



HAL
open science

Contrôle hydrodynamique de la formation des biofilms en milieu eaux usées

Rime El Khatib

► **To cite this version:**

Rime El Khatib. Contrôle hydrodynamique de la formation des biofilms en milieu eaux usées. Sciences agricoles. Institut National Polytechnique de Lorraine, 2011. Français. NNT : 2011INPL091N . tel-01749490

HAL Id: tel-01749490

<https://hal.univ-lorraine.fr/tel-01749490>

Submitted on 29 Mar 2018

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

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



AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

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

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

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

Ecole Nationale Supérieure de Géologie
Ecole Doctorale Sciences et Ingénierie
des Ressources, Procédés, Produits et Environnement

Thèse

Présentée à

L'Institut National Polytechnique de Lorraine

Pour obtenir le grade de

Docteur de l'INPL

Spécialité: Géosciences

Par

Rime EL KHATIB

**Contrôle hydrodynamique de la formation des
biofilms en milieu eaux usées**

Soutenue publiquement le 17 Novembre 2011 devant la commission d'examen

Rapporteurs

Alain LINE
Nicolas BERNET

Professeur
DR

INSA (Toulouse)
INRA-LBE (Narbonne)

Examineurs

François HUMBERT
Sophie AYRAULT
Antoine EL SAMRANI
Christian MUSTIN

Professeur
CR-HDR
Professeur
CR CNRS

ESSTIN (Vandoeuvre)
LSCE-IPSL (Gif-sur-Yvette)
Université Libanaise (Liban)
LIMOS (UHP/Vandoeuvre)

Directeurs de thèse

Bruno LARTIGES
Salaheddine SKALI-LAMI

Professeur
MC-HDR

GET-Université de Toulouse
LEMETA (INPL/Nancy)

Remerciements

Je remercie avant tout le **Conseil National de Recherches Scientifiques Libanais** pour avoir financé ce travail.

Ce travail, a été effectué au sein du Laboratoire Environnement et Minéralurgie, UMR CNRS-INPL 7569 dirigé par Mr **Fabien Thomas** à qui je tiens à adresser mes plus vifs remerciements pour son accueil dans son unité de recherche et son aide durant cette thèse.

Un grand merci à mon directeur de thèse Prof. **Bruno Lartiges** qui m'a apporté sa compétence scientifique et qui a su m'accompagner tout en m'accordant une grande liberté de travail. Je n'oublierai jamais ses conseils scientifiques précieux, ses mots pour me remonter le moral pendant les périodes difficiles et surtout son humanité exceptionnelle.

Mes sincères remerciements à mon co-directeur de thèse, Monsieur **Salaheddine Skali-Lami**, Maître de Conférences à l'ESSTIN, qui m'a accordé de son temps et qui m'a fait bénéficier de toute son expérience dans le domaine de l'hydrodynamique, sans ses réunions précieuses je n'aurais pu assimiler cette partie de ma thèse.

Je remercie également Monsieur **Christian Mustin**, Directeur de recherches au CNRS, pour sa grande disponibilité lors des acquisitions des images en microscopie confocale et surtout la partie traitement d'images dans laquelle il m'a transmis toutes ses connaissances sans hésitation.

Je présente également mes sincères remerciements à Monsieur **Guillaume Caumon**, Directeur du Consortium GOCAD et Monsieur **Christophe Antoine**, pour m'avoir aidé lors de l'application des scripts au logiciel GOCAD[®], pour leur grande disponibilité et pour m'avoir accueillie dans leur laboratoire pour réaliser les traitements d'images.

Mes sincères remerciements à Monsieur **Nicolas Bernert**, Directeur de recherches au INRA-LBE, et Monsieur **Alain Liné**, Professeur à l'INRA – Toulouse, pour avoir accepté la lourde charge de rapporter mes travaux.

Je tiens aussi à remercier profondément Madame **Sophie Ayrault**, Chargé de Recherche à LSCE-IPSL, Monsieur **Antoine El Samrani**, Professeur à l'Université Libanaise-Liban, et **François Humbert**, Professeur à l'ESSTIN, qui ont accepté de participer au jury de cette thèse.

*A tout le personnel, les vacataires et les doctorants au **LEM**, un IMMENSE MERCI. Vous m'avez facilité la vie loin de ma famille et de mon pays, j'ai senti parmi vous que j'étais chez moi.*

*Je n'oublie pas de remercier au **LCPME Hélène**, qui était toujours là pour moi et qui me remontait le moral quand ça n'allait pas.*

*Je remercie également l'équipe du Service Commun de Microscopies Electroniques et de Microsondes (**SCMEM**) de la faculté des sciences, et en particulier Monsieur **Jaafar Ghanbaja** et Monsieur **Alain Kohler**.*

*Sincèrement, je remercie profondément mes amies **Roukaya, Rania, Sarah, Mounira, Amal et Hadia** pour les moments inoubliables que j'ai vécus avec eux à Nancy.*

*Je tiens aussi à remercier chaleureusement mes deux meilleures amies **Lara** et **Myriam** du Liban, les filles si j'ai pu supporter ma solitude le soir dans ma chambre c'était grâce à vous.*

*Mes vifs remerciements vont à mon mari **Mohamad**, qui était toujours présent à tous les moments pour m'aider, me soutenir, et je n'oublierai jamais son soutien quand j'étais malade.*

*Finalement je voudrai dédier ce travail à **mes parents** et **mes frères** à qui je suis complètement reconnaissante ; sans eux je ne serais jamais arrivée à ce niveau en espérant qu'ils resteront toujours fiers de moi.*

SOMMAIRE

INTRODUCTION GENERALE.....	6
Chapitre 1 : CONTEXTE SCIENTIFIQUE.....	11
1.1 COMPOSITION DU BIOFILM.....	12
1.1.1 Les bactéries.....	12
1.1.2 Substances polymériques extracellulaires.....	13
1.2 FORMATION DES BIOFILMS.....	15
1.2.1 Transport des bactéries.....	16
1.2.2 Adhésion.....	20
1.2.3 Croissance, maturation et détachement.....	22
1.3 INFLUENCE DES CONDITIONS HYDRODYNAMIQUES SUR L'ORGANISATION DU BIOFILM.....	23
1.4 VISUALISATION DES BIOFILMS.....	27
1.4.1 Microscopie optique.....	27
1.4.2 Microscopie électronique à balayage (MEB).....	28
1.4.3 Microscopie électronique à transmission (MET).....	29
1.4.4 Microscopie à Rayon X.....	29
1.4.5 Microscopie confocale à balayage Laser (CLSM).....	30
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	33
Chapitre 2 : SECTION EXPERIMENTALE.....	44
2.1 REACTEUR COUETTE-POISEUILLE.....	45
2.1.1 Ecoulement Couette-Poiseuille.....	45
2.1.2 Dispositif expérimental.....	52
2.1.3 Montage expérimental.....	53

2.2	MISE EN MARCHÉ DU REACTEUR	54
2.2.1	Prélèvement d'eaux usées	55
2.2.2	Paramètres de suivi.....	55
2.2.3	Prélèvement et stockage des coupons	56
2.3	LA MICROSCOPIE CONFOCALE	58
2.3.1	Principe et généralités	58
2.3.2	Préparation des échantillons.....	59
2.4	TRAITEMENT D'IMAGES	61
2.4.1	LaserSharp 2000TM (Bio-Rad Cell Science Division).....	61
2.4.2	AutoquantX-Autodeblur.....	62
2.4.3	Image J	65
2.4.4	Gocad®	67
	REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	73
Chapitre 3 : INHIBITION HYDRODYNAMIQUE DE LA CROISSANCE DES BIOFILMS DANS UN REACTEUR COUETTE-POISEUILLE		76
3.1	INTRODUCTION	80
3.2	CHARACTERISTICS OF COUETTE-POISEUILLE FLOW	81
3.3	EXPERIMENTAL SECTION.....	83
3.3.1	Biofilm reactor system	83
3.3.2	Biofilm growth procedure	84
3.3.3	Observation of coupons by Scanning Confocal Laser Microscopy	85
3.3.4	Image processing and 3D reconstruction	86
3.4	RESULTS AND DISCUSSION.....	87
3.4.1	Observation of biofilm development.....	87
3.4.2	Quantification of biofilm morphology	89

3.5	CONCLUDING REMARK.....	91
	References	92
Chapitre 4 : ETUDE DE L'EFFET DU GRADIENT DE VITESSE PARIETAL SUR LA CROISSANCE DES BIOFILMS DES EAUX USEES : STADE INITIAL ET STADE DE BIOFILM MATURE.....		
		96
4.1	INTRODUCTION	100
4.2	EXPERIMENTAL SECTION.....	102
4.2.1	Biofilm reactor system	102
4.2.2	Biofilm growth procedure	103
4.2.3	Observation of coupons by Scanning Confocal Laser Microscopy	104
4.2.4	Image processing and 3D reconstruction	105
4.3	RESULTS AND DISCUSSION.....	108
4.3.1	CLSM follow-up of biofilm growth.....	108
4.3.2	Wall shear rate influence on mature biofilm	112
4.4	CONCLUSION	114
	References	116
Chapitre 5 : CARACTERISTIQUES DES EAUX USEES DANS LES PAYS EN DEVELOPPEMENT: IMPLICATION DANS LA GESTION DES EFFLUENTS		
		121
5.1	INTRODUCTION	125
5.2	EXPERIMENTAL SECTION.....	126
5.2.1	Study area	126
5.2.2	Sampling and sewage characterization.....	127
5.2.3	Characterization of heavy metal-bearing phases.....	127
5.2.4	Characterization of organic matter	129
5.3	RESULTS AND DISCUSSION.....	130

5.3.1	Wastewater quality and major inorganic species	130
5.3.2	Heavy metal loads in GS sewage	133
5.3.3	Nature of heavy metal-bearing particle	135
5.3.4	Chemical speciation of heavy metals in suspended solids and biofilm	139
5.3.5	Nature of organic matter in suspended solids and biofilms	140
5.4	CONCLUSION	144
	References	146
Chapitre 6 :	CONCLUSION GENERALE	152
ANNEXES	156
Annexe 1 :	Scripts utilisés pour la reconstruction 3D	157
Annexe 2 :	Variation journalière des caractéristiques des eaux usées, $\beta=1/3$	174
Annexe 3 :	Variation journalière des caractéristiques des eaux usées, $\beta=1/2$	175
Annexe 4 :	Publication, La houille Blanche, numéro 5/ Novembre 2011	176
Annexe 5 :	Reconstruction 3D, $\gamma= 6 \text{ s}^{-1}$, série 24h	187

INTRODUCTION GENERALE

Les biofilms sont des associations de microorganismes, adhérant entre eux, qui se développent sur toute interface solide-liquide (tissus cellulaires, milieu marin, conduites d'eau, matériels médicaux et industriels, etc ...) (Donlan, 2002 ; Costerton, 2004). Contrairement à ce que leur nom suggère, les biofilms ne forment pas un film continu de bactéries ; leur structure est en effet très complexe et hétérogène, et renferme des microcolonies enrobées dans une matrice extracellulaire polymérique dont la composition et la nature varient selon l'environnement et les conditions dans lesquelles le biofilm s'est formé (Frieze *et al.*, 1997 ; Eberl *et al.*, 2000). Ces agrégations de microorganismes sont souvent séparées par des vides « voids » correspondant à des canaux assurant la diffusion de nutriments de l'extérieur vers l'intérieur du biofilm. Ces canaux servent également à l'évacuation des débris et des métabolites (Fletcher, 1979 ; Lewandowski *et al.*, 1994 ; Lewandowski, 2000 ; Ivleva *et al.*, 2010). La figure 1 montre quelques exemples de biofilms se développant dans des conditions variées.

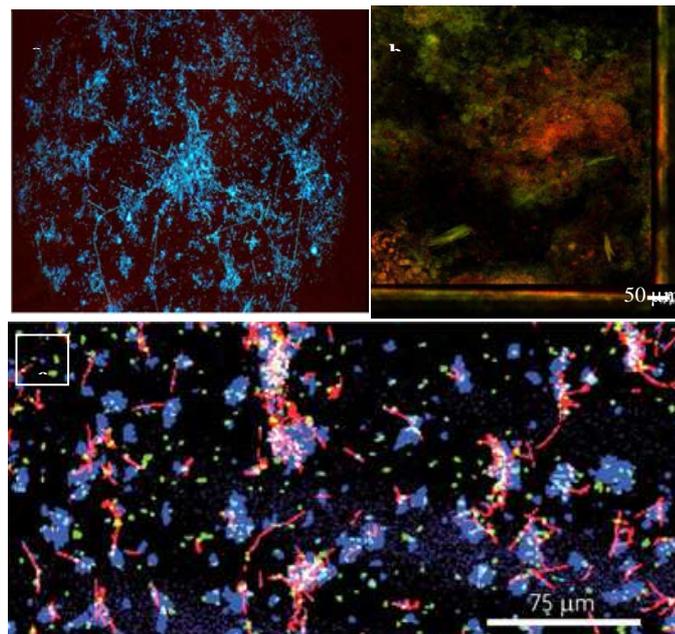


Figure 1 : Images de microscopie confocale: (a) biofilm d'eau potable marqué par DAPI, (Paris, 2008), (b) biofilm d'eau usée marqué par l'acridine orange (Houhou, 2008), (c) biofilm oral multi-espèces dont chaque bactérie est marquée par un fluorophore conjugué IgG spécifique (Kolenbrander *et al.*2010).

Les biofilms jouent un rôle prépondérant en tant que réacteur bio-physico-chimique dans l'environnement. Ils participent au contrôle de la concentration en matière organique et en contaminants métalliques dans les écosystèmes naturels et anthropisés (Horn *et al.*, 2003 ;

Battin *et al.* 2003 ; Nielsen *et al.* 2005 ; El Samrani *et al.* 2004 ; Houhou *et al.* 2009). Dans le réseau d'assainissement, ils sont également à l'origine des dégagements de H₂S et de méthane (Gutierrez *et al.*, 2008 ; Nielson *et al.*, 2008 ; Zhang *et al.*, 2008), le H₂S participant à la corrosion des conduites d'eau usée après oxydation en acide sulfurique par voies chimique et biologique (figure 2). Les fissures dans les conduites permettent l'infiltration des eaux usées et la contamination des eaux souterraines (Stoodley *et al.*, 2002 ; Vollertsen *et al.*, 2008). Le développement de biofilm entraîne une perte de charge dans les conduites par augmentation de la force de friction de l'eau. Ainsi, la formation de biofilm dans une canalisation d'eau de 80 km entraîne une réduction de sa capacité d'écoulement d'environ 55% (Picologlou *et al.*, 1980). Si la dégradation de la matière organique est recherchée dans le traitement des eaux usées (lits filtrants bactériens, cultures fixées), le développement de biofilm dans les réacteurs à membranes détermine un colmatage de ces dernières et une diminution de l'efficacité de traitement (Creber *et al.*, 2010 ; Ciston *et al.*, 2009).



Figure 2 : Images montrant l'impact du biofilm sur les canalisations du réseau d'assainissement.

Une application récente au niveau industriel utilise les biofilms d'eau usée pour la production d'énergie (biogaz et électricité) (Kim *et al.*, 2007 ; Parot, 2007 ; Rosche *et al.*, 2009). Une pile microbienne a également été mise au point par Reimers *et al.*, (2001) et permet de produire de l'électricité à partir de sédiments marins renfermant une flore microbienne et de la matière organique naturelle. Un biofilm se développe sur la surface d'une anode enfoncée dans les sédiments. Ce biofilm possède la capacité d'échanger des électrons avec le support conducteur à la surface duquel il se développe (Reimers *et al.*, 2001).

Qu'il représente un bénéfice ou une nuisance, le contrôle du développement du biofilm s'avère primordial. En ce qui concerne l'élimination des biofilms, l'expérience montre qu'elle est beaucoup plus difficile que celle des cellules en suspension, leur matrice exopolymérique constituant une barrière aux agents antimicrobiens (chlore, enzymes, antibiotiques) (Maukonen *et al.*, 2003 ; Simões *et al.*, 2010). Ces traitements sont plus ou moins efficaces et dépendent de plusieurs facteurs (pH, matières organiques, température, ...). Néanmoins ils fragilisent et diminuent considérablement la population bactérienne sur une surface (Simões *et al.*, 2010). Cependant, plusieurs sous-produits de la désinfection, généralement plus nuisibles du point de vue de l'application désirée, e.g. la distribution d'eau potable, sont générés dans le milieu. De plus, l'utilisation des désinfectants sur le long terme peut induire une résistance des bactéries qui rend le traitement inefficace (Hori et Matsumoto, 2010).

Des processus physiques comme l'ajustement des conditions hydrodynamiques des écoulements (vitesse pariétale, régime turbulent, ...), ou l'application de forces mécaniques comme le brossage et la pression d'eau, ou l'augmentation de température, sont également utilisés (Lelièvre *et al.*, 2002 ; Valt, 2008 ; Simões *et al.*, 2010). La modification de la nature de la surface est aussi un moyen de prévention de développement des biofilms. Cette technique a recours au greffage des surfaces par différentes molécules pour changer leur propriétés physico-chimiques, i.e. leur charge ou leurs caractéristiques hydrophiles ou hydrophobes (Hori et Matsumoto, 2010 ; Simões *et al.*, 2010 ; Cloete et Jacobs, 2001). L'influence des conditions hydrodynamiques sur le développement du biofilm a été étudiée dans des réacteurs à géométrie variée. Ces réacteurs permettent un contrôle du gradient de vitesse pariétal ainsi que des forces de cisaillement qui déterminent le transport des bactéries vers la surface (Stoodley *et al.*, 1999 ; Pereira *et al.*, 2002 ; Busscher et Vander Mei, 2006 ; Paris *et al.*, 2007 ; Wagner *et al.*, 2008). En effet, tout changement des conditions hydrodynamiques entraîne une modification de la morphologie, de la structure, de l'activité, ainsi que de la composition du biofilm (Costerton *et al.*, 1995 ; Battin *et al.*, 2003 ; Simões *et al.*, 2010). Ces études cherchent à mettre en évidence les conditions les plus défavorables pour la croissance des biofilms (Friese *et al.*, 1997 ; Costerton, 1999 ; Eberl *et al.*, 2000 ; Donlan, 2002).

Notre thèse s'inscrit dans la lignée des travaux précédents. Son objectif principal a été d'étudier l'influence du gradient de cisaillement sur le développement du biofilm en milieu eaux usées. Pour cela, nous avons utilisé un réacteur de type Couette-Poiseuille permettant de

travailler sous différentes configurations d'écoulement par simple variation de vitesse débitante du liquide et de la vitesse de rotation du cylindre interne du réacteur. En particulier, il est possible avec ce réacteur de choisir des conditions déterminant un transport de bactéries nul à la paroi. Les biofilms ont été observés en microscopie confocale et différents logiciels de traitement d'images ont été utilisés pour décrire la géométrie du biofilm.

Ce mémoire de thèse comprend six chapitres. Le premier présente un certain nombre de généralités sur les biofilms et l'influence des conditions hydrodynamiques sur leur développement. Le deuxième chapitre détaille le dispositif expérimental utilisé et les différentes procédures de traitement d'images ainsi que la reconstruction 3D des biofilms. Les résultats obtenus dans le cadre de cette étude sont ensuite présentés sous forme de deux articles (chapitre 3 et 4). Cette thèse a initialement démarré au Liban sur la caractérisation des matières en suspension et des biofilms du réseau d'assainissement de Jounieh. Les résultats de cette étude sont exposés dans le chapitre 5 sous la forme d'un article. Les principaux résultats de cette thèse ainsi que les perspectives offertes par cette recherche, seront présentés dans la conclusion.

Chapitre 1 : CONTEXTE SCIENTIFIQUE

1.1 COMPOSITION DU BIOFILM

1.1.1 Les bactéries

Les bactéries représentent un composant essentiel du biofilm, puisque celui-ci ne se développe que si l'adhésion d'un nombre (ou une couche) de bactéries capables de reconnaître « sentir » la surface, est réalisée (Costerton, 1999). En effet, en présence d'une surface solide, les bactéries planctoniques adhérant sur le support deviennent différentes de leurs homologues restées en suspension, par changement au niveau de leur génome, de la structure de leur enveloppe, leur taille et leur forme. Bien que l'unité structurale des biofilms soit la bactérie, cette dernière ne représente environ que 15 à 25% de la composition totale du biofilm, le reste étant occupé par les exopolymères, les nutriments et l'eau.

La nature des microorganismes dans un biofilm est très variée. Elle peut être homogène avec une seule espèce de bactéries, ou hétérogène, renfermant dans ce cas plusieurs espèces microbiennes (figure 3). En outre, l'activité bactérienne au sein même du biofilm n'est pas homogène : les cellules se trouvant à la surface peuvent être soumises à une plus grande concentration d'oxygène. Ainsi, l'analyse de la diffusion de l'oxygène dans des biofilms développés en milieu aérobie par l'intermédiaire de microélectrodes, montre que l'oxygène est rapidement consommé par les bactéries superficielles, et de fait, les cellules au niveau des couches basales adoptent une activité anaérobie (Costerton, 1999 ; Lewandowski, 2000 ; Donlan, 2002 ; Kokare *et al.*, 2009).

Bien que les bactéries se trouvent dans le biofilm sous forme de colonies séparées par des vides et des canaux, la communication est toujours présente entre elles. Cette communication est assurée par le transfert, la régulation et l'expression de gènes « Quorum sensing ». Ce terme recouvre les mécanismes de contrôle des signaux cellule-cellule, qui permettent aux bactéries de réguler leur densité et de s'adapter à tout changement et fluctuations des conditions environnantes (Costerton, 1999 ; Donlan, 2002 ; Kokare *et al.*, 2009). De ce fait, le Quorum sensing se trouve à son tour dépendant des conditions environnantes, et en particulier, de la concentration en nutriments dans le liquide (Purevdorj-Gage et Stoodley, 2004).

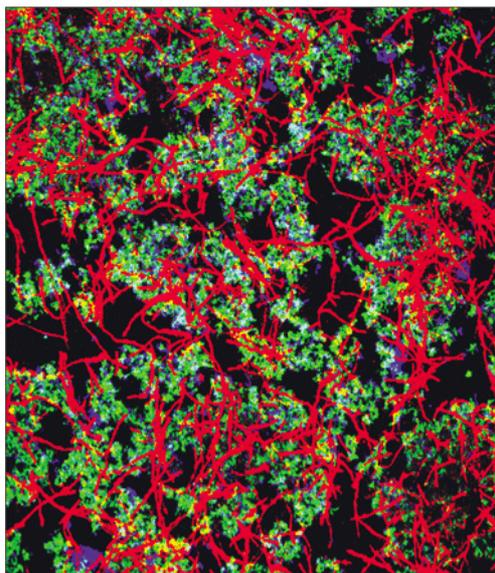


Figure 3 : Micrographes de microscopie confocale représentant un biofilm multi-espèces développé dans une cellule à écoulement : *F. nucleatum* (rouge), *S. oralis* (bleu) et *A. naeslundii* (vert). (Periasamy *et al.*, 2009).

1.1.2 Substances polymériques extracellulaires

Comme mentionné ci-dessus, les bactéries ne constituent qu'une petite partie du biofilm: les exopolymères (EPS) dominent sa composition (50 à 90% de la matière organique). Ainsi, les biofilm des eaux usées contiennent environ 70-98% d'EPS (Ivleva *et al.*, 2010 ; Liang *et al.*, 2010 ; Simões *et al.*, 2010). Les EPS sont produits par les bactéries, qu'elles soient en suspension ou adhérentes dans les biofilms. Leur quantité, leur forme, leurs propriétés, et leurs compositions chimiques, sont déterminées par différents facteurs comme l'âge du biofilm, le type des bactéries, la concentration et la biodisponibilité des nutriments, les conditions hydrodynamiques et la température (Lazarova et Manem, 1995 ; Flemming *et al.*, 2000 ; Salaun, 2009 ; Ivleva *et al.*, 2010).

Les exopolymères (appelés aussi biopolymères) jouent un rôle primordial dans le processus de formation du biofilm, notamment en assurant l'adhésion irréversible des bactéries sur le support solide. Un deuxième rôle des EPS est de maintenir les microcolonies cohérentes entre elles, ce qui facilite les interactions et les communications cellule-cellule (Flemming, 2010). D'une manière générale, les propriétés morphologiques et physico-chimiques des biofilms comme la porosité, la densité, la rugosité, l'élasticité, la stabilité mécanique, l'architecture et l'activité des biofilms, sont définies par la nature et la composition des EPS (Fletcher, 1979 ;

Flemming *et al.* 2000 ; Lewandowski, 2000 ; Klapper *et al.*, 2002 ; Flemming *et al.* 2007 ; Kokare *et al.*, 2009 ; Liang *et al.*, 2010).

Les exopolymères sont des molécules de nature très hétérogène avec des domaines et des fonctions spécifiques, et très flexibles, pouvant se réorienter et s'organiser dans une structure donnée (Bellon-Fontaine et Fourniat, 1994). Les EPS comprennent des polysaccharides, des protéines, des lipides, des acides humiques et des acides désoxyribonucléiques (ADN). Chacun de ces composés possède un rôle bien déterminé dans le biofilm. L'extraction des EPS dans les biofilms montre une composition très riche en polysaccharides et protéines au dépend des autres constituants (Lazarova et Manem, 1995 ; Liang *et al.*, 2010 ; Simões *et al.*, 2010). Le rapport protéines/polysaccharides détermine l'hydrophobicité des bactéries qui elle-même influe sur l'étape d'adhésion des bactéries, puisque plus le caractère hydrophobe de la bactérie augmente, plus elle devient adhérente (Liang *et al.*, 2010).

Les enzymes exopolymériques participent également à l'alimentation en nutriments nécessaires pour le développement du biofilm, en dégradant des macromolécules en molécules plus petites assimilables par les bactéries (Flemming *et al.* 2007). Les acides désoxyribonucléiques (ADN) représentent un composant important des EPS. Leur présence dans la matrice du biofilm a généralement été attribuée à la lyse des cellules. Cependant, différentes études menées sur la matrice des biofilms montrent que l'ADN fait partie des composants essentiels des EPS. L'ADN permet l'échange d'informations génétiques entre les cellules qui jouent un rôle dans l'adhésion et l'agrégation des microcolonies, et par suite joue un rôle important dans le développement du biofilm (Flemming, 2010). Les lipides sont en concentration plus restreinte dans la matrice extracellulaire. Ils présentent des caractéristiques hydrophobes, et interviennent dans l'adhésion et la solvatisation des substances hydrophobes afin de les rendre biodisponibles (Simões *et al.*, 2010).

Outre leur rôle structurant, les EPS jouent un rôle protecteur en déterminant une barrière réactive contre les agents antimicrobiens et les biocides (Simões *et al.*, 2010). Les EPS protègent aussi le biofilm contre la déshydratation par rétention d'eau à l'intérieur du biofilm, la plus part des EPS étant hygroscopiques (Lewandowski, 2000). L'eau constitue une partie importante du biofilm et assure l'hydratation de celui-ci et le maintien de sa porosité (Lewandowski, 2000). Des phases minérales, des cations, et des particules colloïdales, sont également présents dans la composition du biofilm et constituent une source de nutriments

ainsi que des sites de compensation des charges surtout au niveau des surfaces de bactéries et des EPS (Flemming *et al.* 2000 ; Lewandowski, 2000).

1.2 FORMATION DES BIOFILMS

Bien que le développement de biofilms soit un phénomène fréquent voire systématique à l'interface solide/liquide en présence de bactéries, sa formation peut être décrite par une série d'étapes influencées par différents facteurs (mode d'écoulement, nature de la surface, type des nutriments et leurs concentrations respectives, conditions d'aération). La formation du biofilm met donc en œuvre différents processus physicochimiques (diffusion, adhésion, ...) ainsi que des processus biologiques (formation d'agrégats, croissance de microorganismes, production d'exopolymères, ...) (Fletcher, 1979 ; Celmer D. 2008 ; Andersson, 2009).

Jusqu'à présent les différentes études réalisées sur les mécanismes de formation de biofilm ne peuvent pas présumer d'une procédure spécifique, et les différentes voies suggérées comprennent trois étapes essentielles: le transport des bactéries, l'adhésion et la croissance de celles-ci à la surface, et la multiplication de microorganismes avec des phénomènes de détachement de biofilm (figure 4) (Costerton, 1999 ; Gauthier, 2002 ; Liu et Tay, 2002).

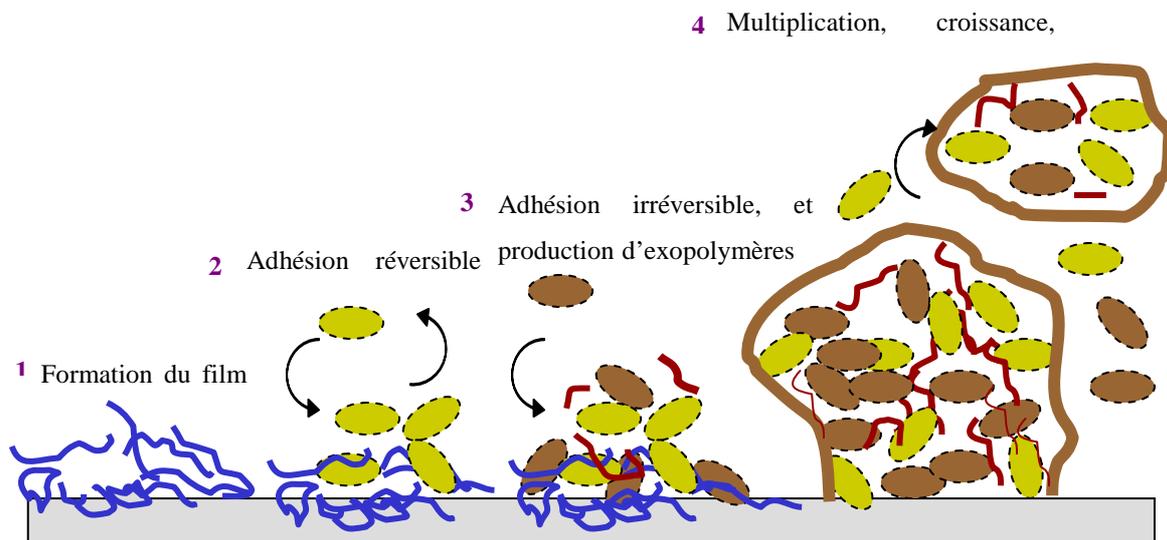


Figure 4 : Schéma illustrant les étapes de formation des biofilms.

1.2.1 Transport des bactéries

L'adhésion de bactéries sur la surface nécessite un rapprochement qui est assuré par le transport de celles-ci du fluide vers le support. Les approches physico-chimiques traditionnelles considèrent les bactéries comme étant des colloïdes sphériques avec une surface bien définie, rigide et uniforme, ce qui est très discutable (Duval et Gaboriaud, 2010). Par contre, l'approche biologique définit la bactérie comme étant une particule à géométrie complexe avec une surface hétérogène et possédant une mobilité (Hori et Matsumoto, 2010). Pour étudier le transport et la formation des biofilms sur les surfaces, différents systèmes hydrodynamiques de géométrie variée ont été utilisés, à savoir réacteur annulaire à rotation (Peyton, 1996 ; Grany *et al.*, 2008), réacteur à disque tournant (Brugnoni *et al.*, 2011), réacteur capillaire (Gjersing *et al.*, 2005 ; Caldwell, 1988) et les cellules à écoulement (Mueller, 1996 ; Busscher et Van der Mei, 2006 ; MacClain et Ford, 2002 ; Li *et al.*, 2011, Paris *et al.*, 2007). Chacun de ces réacteurs possède des avantages et des inconvénients. Les réacteurs capillaires permettent le suivi de croissance des biofilms mais ne permettent pas les analyses chimiques et biologiques. Les réacteurs annulaires présentent une surface très importante pour la croissance des biofilms d'où un nombre plus important d'échantillons et d'analyses ; en revanche, la distribution de fluide n'est pas homogène ce qui entraîne une formation non uniforme du biofilm. Les réacteurs les plus utilisés et les plus connus sont les chambres à écoulement, les observations et les lois tirées de ces expériences n'étant valables en première approximation que pour ces systèmes. Les cellules d'écoulement offrent la possibilité de contrôler les conditions hydrodynamiques et permettent aussi d'analyser les échantillons sans perturbation ou altération. Néanmoins, la surface des cellules est limitée ce qui se traduit par une surface plus petite des échantillons et le nombre d'analyses qui peuvent être effectuées (Huang *et al.*, 1992).

Le transport de masse dans un système en écoulement est de façon générale le bilan de la convection, de la diffusion, et de la sédimentation (Rijnaarts, 1994 ; Ginn *et al.*, 2002 ; Khalizadeh, 2009). Dans un système statique, la diffusion brownienne contrôle le dépôt des bactéries sur la surface. En conditions dynamiques, le transfert de bactéries vers le support sera assuré à la fois par la convection et la diffusion ; ceci implique que le mouvement sera plus rapide et influencé par la vitesse et la nature de l'écoulement.

Dans les chambres à écoulement, la vitesse de fluide décroît en s'approchant de la surface, ce qui diminue de fait le transport par convection et favorise la diffusion (figure 5). Dans un système hydrodynamique, plus la vitesse du fluide augmente, plus le transport par convection augmente, et une augmentation de la concentration en nutriments se produit à proximité de la surface du biofilm, ce qui favorise son développement. En conséquence, le transfert de masse sera beaucoup plus important dans un système en écoulement que dans un liquide statique (Mueller, 1996 ; Busscher et Van der Mei, 2006).

Le transport des bactéries est défini par différentes équations dont la solution analytique peut être très difficile à calculer ; pour résoudre ces équations des approximations sont suggérées et les solutions obtenues sont approximatives (Picioreanu *et al.*, 2000 ; Bakker *et al.*, 2002).

Le flux convectif est donné par l'équation suivante :

$$J_c = C u \cdot n \quad (1)$$

où J_c définit le flux convectif, C la concentration en particules, n la projection de la vitesse du fluide sur la normale à la surface, et u la vitesse locale du fluide dépendant de l'écoulement. Le flux diffusif proportionnel au gradient de vitesse est donné par :

$$J_D = -D \nabla C \quad (2)$$

où J_D est le flux diffusif, et D le coefficient de diffusion.

Si l'on applique la loi de conservation de masse dans un volume fixe limité par la surface S :

$$\frac{\partial C}{\partial t} = \int_V C dv + \int_S (u C - D \nabla C) \cdot n dS = 0 \quad (3)$$

En utilisant le théorème de divergence et en intégrant sur le volume fixe, l'équation devient :

$$\frac{\partial C}{\partial t} + \nabla \cdot (u C - D \nabla C) = 0 \quad (4)$$

Si l'on se place dans le cas d'un liquide non compressible avec un coefficient de diffusion ne dépendant pas de la concentration, l'équation de transport devient :

$$\frac{\partial C}{\partial t} + u \nabla C - D \Delta C = 0 \quad (5)$$

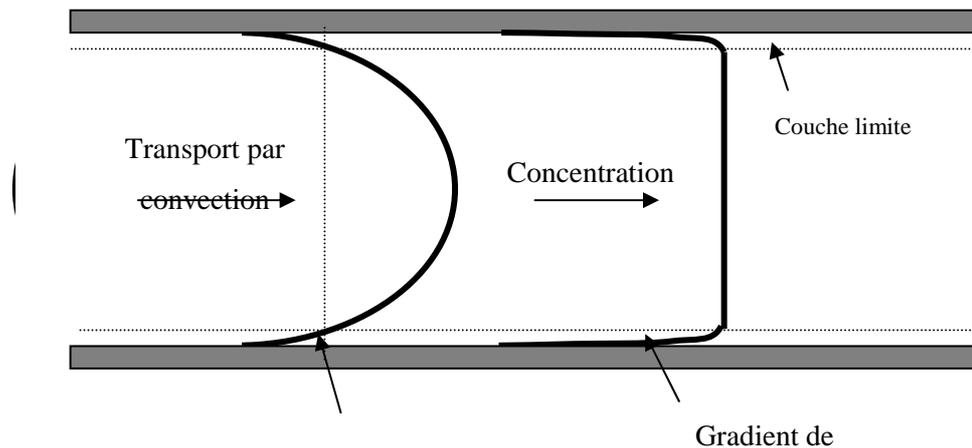


Figure 5 : Représentation schématique des processus de transport dans une chambre d'écoulement.

Comme explicité ci-après, les différentes études menées sur le transport de biomasse dans les chambres d'écoulement utilisent l'approximation de Smoluchowski-Levich (SL) qui considère le transport sous forme d'une équation bidimensionnelle qui combine convection et diffusion tout en négligeant les interactions gravitationnelles, hydrodynamiques et colloïdales (Elimelech, 1994). Le transport est alors équivalent sur les deux surfaces de la cellule (supérieure et inférieure). Cette approximation s'accompagne également de l'hypothèse que toutes les bactéries arrivant à la surface y adhèrent d'une façon irréversible.

Cependant, plusieurs expériences ont montré que cette approximation est insuffisante pour décrire le transport des bactéries dans les chambres à écoulement, le rapport du taux de dépôt expérimental sur le taux de dépôt calculé par l'équation de SL étant supérieur à 1 (Hermansson, 1999). Li *et al.* (2011) ont ainsi montré que le dépôt des bactéries était plus important sur la surface inférieure de la cellule du fait de l'intervention de la sédimentation quelle que soit la vitesse de l'écoulement. En effet, la sédimentation semble dominer le transport des bactéries dans les cellules d'écoulement (Li *et al.*, 2011). D'autre part, McClaine et Ford (2002) ont montré que la sédimentation joue un rôle important dans le transport des souches d'*Escherichia coli* (flagellées et non flagellées) dans les cellules à écoulement à faible vitesse d'écoulement. L'effet de la sédimentation décroît progressivement pour les bactéries mobiles en augmentant la vitesse du fluide (MacClaine et Ford, 2002).

Pour prévoir si la sédimentation intervient dans le transport des bactéries vers la surface, il faut calculer cette vitesse de sédimentation. Pour une bactérie non-motile de forme

ellipsoïdale en suspension dans un fluide à l'état stable (statique), l'expression de la vitesse est calculée à partir des bilans de force en condition statique :

$$\rho_s V g = \rho_f V g + \lambda v_s f \quad (6)$$

avec, ρ_s la densité d'une bactérie (kg.m^{-3}), ρ_f la densité du fluide (kg.m^{-3}), V le volume d'une bactérie (m^3) (égal à $4/3\pi b_b^2 a_b$ pour un ellipsoïde), g la constante gravitationnelle (m.s^{-2}), v_s vitesse de sédimentation (m.s^{-1}), f le coefficient de frottement (égal à $\frac{6\pi a_b \lambda}{\ln \frac{2a_b}{b_b}}$ pour une bactérie

ellipsoïdale, isolée, rigide, à surface lisse, loin de la paroi et en mouvement uniforme (Berg 1993)), λ le facteur de correction (compris entre 1 et ∞) qui prend en compte la proximité de la bactérie de la surface solide.

Ainsi la vitesse de la sédimentation est calculée par :

$$v_s = \frac{4/3\pi b_b^2 a_b (\rho_s - \rho_f)}{6\pi a_b \lambda} \ln \frac{2a_b}{b_b}$$

Pour *E. coli* de diamètre 1 μm , de longueur 2 μm , et de densité comprise entre 1.01 et 1.05 g/cm^3 , MacClaine et Ford (2002) ont déterminé des valeurs de vitesse de sédimentation dans l'eau à 25°C, avec $\lambda=1$, comprises entre 0.0052 et 0.021 cm.h^{-1} .

Adamzyck et Van de Ven (1981) ont étudié le rôle de la sédimentation dans le transport des bactéries en chambre d'écoulement. Selon ces auteurs la sédimentation est liée directement au nombre de Péclet qui détermine le rapport du transport convectif par rapport à la diffusion. En effet, quand le nombre de Péclet (P_e) est faible, la sédimentation joue un rôle très important dans la déposition des bactéries non-mobiles sur une surface. Mais pour une valeur de $P_e \gg 1$ les effets de sédimentation ne sont pas pris en compte.

1.2.2 Adhésion

1.2.2.1 Film conditionnant

La prolifération des biofilms nécessite l'adhésion d'une première couche de bactéries. Certaines études prévoient la formation d'un film appelé film conditionnant sur le support avant la colonisation de ce dernier par les bactéries (Busscher et Van der Mei, 2006 ; Kokare *et al.*, 2009 ; Salaun, 2009). Ce film est le résultat d'un dépôt de macromolécules se trouvant dans le milieu ainsi que des polymères sécrétés par les bactéries au niveau de la surface. La présence de ces polymères sur la surface conduit à des interactions de différente nature avec les cellules bactériennes (Bellon-Fontaine et Fourniat, 1994). Ce film initial améliorerait grandement la fixation initiale de la biomasse (Busscher et Van der Mei, 2006).

La formation du film conditionnant représente un préliminaire à l'adhésion bactérienne qui a lieu en deux étapes : réversible et irréversible. En général, l'étape d'adhésion réversible est rapide et dure de 5 à 10h, mais le risque de détachement du biofilm de la surface est très grand du fait de la mise en œuvre de forces et de liaisons faibles (Costerton, 1999 ; Gauthier, 2002 ; Khalizadeh, 2009 ; Salaun, 2009). L'adhésion irréversible est une étape plus lente que la précédente et indispensable pour le développement du biofilm. Elle fait appel à des forces et des liaisons physiques et électrostatiques (Van der Waals, électrostatiques, liaisons hydrogènes) (Costerton, 1999 ; Gauthier, 2002 ; Salaun, 2009).

1.2.2.2 Description de l'adhésion bactérienne

Plusieurs approches ont été proposées pour décrire l'adhésion des microorganismes sur une surface donnée. La théorie de DLVO (Derjaguin and Landau, Verwey and Overbeek) décrit l'interaction qui prend place dans un électrolyte entre une particule colloïdale chargée et un support également chargé (Hori et Matsumoto, 2010). Les bactéries, compte tenu de leur taille, sont considérées comme des particules colloïdales, et leur adhésion sur un support peut donc être décrite par la théorie de DLVO. L'énergie d'adhésion (ΔG_{adh}) est alors la somme des énergies résultant des interactions attractives de Van der Waals (ΔG_A) et des interactions électrostatiques répulsives (ΔG_E) résultant de la structuration de l'électrolyte en deux couches d'ions à proximité de la surface bactérienne (figure 6a).

$$\Delta G_{adh} = \Delta G_A + \Delta G_E$$

L'énergie d'adhésion dépend notamment de la distance séparant la particule du support, et de la force ionique du milieu (Bellon-Fontaine et Fourniat, 1994 ; Meinders *et al.*, 1995 ; Hori et Matsumoto, 2010). A très faible force ionique il existe une barrière d'énergie qui empêche les bactéries de s'adsorber sur la surface. Par contre pour des forces ioniques élevées, les barrières d'énergie s'atténuent et les bactéries peuvent facilement adhérer à la surface (Hermansson, 1999 ; Redman *et al.*, 2004 ; Hori et Matsumoto, 2010).

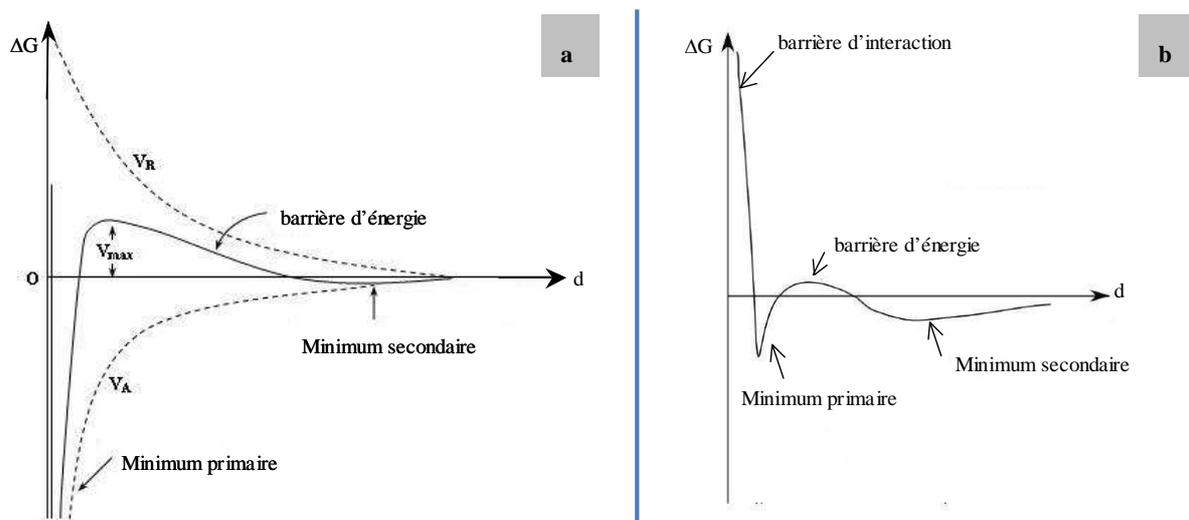


Figure 6 : Diagramme de l'évolution de l'énergie en fonction de la distance séparant la bactérie du support selon les théories : a) théorie DLVO, b) théorie XDLVO.

L'application de la théorie DLVO à des bactéries présente néanmoins plusieurs points faibles, en particulier sa surface est non homogène et complexe (comportant des surstructures exopolymériques), et la bactérie peut elle-même "nager" vers le support (Bellon-Fontaine et Fourniat, 1994). Une extension de cette théorie tenant compte des interactions hydrophobes/hydrophiles entre bactérie et support a été suggérée par Van Oss *et al.* (1985). Dans ce cas, les surfaces hydrophiles donnent lieu à des interactions répulsives alors que des surfaces hydrophobes permettent des interactions attractives à longue portée avec les cellules microbiennes (Van Oss *et al.*, 1985 ; Hermansson, 1999). Ainsi, l'adhésion de *Acinetobacter calcoaceticus* sur des particules de polystyrène a été mieux décrite par cette théorie modifiée (dite XDLVO) que la DLVO classique (Meinders *et al.*, 1995) (figure 6b).

Une autre approche de l'adhésion bactérienne utilise les énergies libres des interfaces mises en jeu, déterminées par la méthode de mesure de l'angle de contact:

$$\Delta G_{adh} = \gamma_{sm} - \gamma_{sl} - \gamma_{ml}$$

avec γ_{sm} , γ_{sl} , γ_{ml} respectivement les énergies libres des interfaces solide-microorganismes, solide-liquide, et microorganismes-liquide. $\Delta G_{adh} < 0$ signifie que les conditions sont favorables pour l'adhésion. Les termes de l'équation ne dépendent pas dans ce cas de la distance entre bactérie et surface puisque le bilan énergétique est écrit à partir de la formation d'une nouvelle interface bactérie-support (Bellon-Fontaine et Fourniat, 1994 ; Hermansson, 1999 ; Hori et Matsumoto, 2010). Là encore, la sécrétion d'exopolymères bactériens de type pili ou adésines qui peuvent assurer la liaison entre support et bactérie, n'est pas prise en compte (Bellon-Fontaine et Fourniat, 1994 ; Hermansson, 1999). Un autre inconvénient de cette approche est de considérer l'étape d'adhésion comme réversible alors que le développement du biofilm implique une fixation irréversible des bactéries (Fletcher, 1979 ; Van Oss *et al.*, 1985 ; Hermansson, 1999 ; Hori et Matsumoto, 2010).

1.2.3 Croissance, maturation et détachement

Après la formation d'une première couche de microorganismes, les bactéries commencent la production d'exopolymères nécessaires pour former le squelette du biofilm (Costerton, 1999 ; Gauthier, 2002 ; Khalizadeh, 2009). Ces EPS se lient au support et forment avec la surface des complexes qui à leur tour vont fixer d'autres bactéries et assurer leur adsorption sur la surface. Le biofilm commence alors à croître par division et multiplication bactérienne (Lazarova et Manem, 1995 ; Costerton, 1999 ; Andersson, 2009). A ce stade, la croissance des bactéries, et par suite du biofilm, est fortement liée aux conditions environnantes d'apport de nutriments, d'oxygène et de température. La croissance du biofilm passe par différents étapes:

- 1- Stade dynamique de croissance au cours duquel la machine biologique est à son maximum de fonctionnement,
- 2- Phase linéaire où le biofilm atteint un développement maximal et constant,
- 3- Stade de ralentissement pendant lequel la quantité de microorganismes vivants adsorbés et la quantité de biofilm qui se détache ainsi que la quantité de cellules mortes, sont à l'équilibre.

Quand le biofilm atteint le stade de maturation, le manque de nutriments, l'âge du biofilm, les stress physique, chimique, et biologique, ainsi que les conditions hydrodynamiques sont les facteurs responsables du détachement des biofilms et de leur redispersion dans le milieu ambiant (Abrahamson *et al.*, 1996 ; Andersson, 2009). Ainsi l'âge de biofilm, la quantité de biomasse fixée, et les conditions environnementales, jouent un rôle très important sur la structure et l'épaisseur du biofilm, et par la suite, sur son activité (Lazarova et Manem, 1995).

1.3 INFLUENCE DES CONDITIONS HYDRODYNAMIQUES SUR L'ORGANISATION DU BIOFILM

Les biofilms qui se développent dans un système donné sont soumis aux gradients de cisaillement présents dans le milieu. Le système peut être stagnant (lacs, réservoirs) avec de faibles gradients de cisaillement, ou présenter des écoulements turbulents donnant lieu à des cisaillements forts (conduites d'eaux, rivières, égouts, eaux de drainage) (Purevdorj-Gage et Stoodley, 2004). Dans un système au repos, les forces exercées par le liquide sur une surface (appelées contraintes) possèdent une seule normale. Pour un liquide en écoulement, la vitesse et la nature de l'écoulement engendrent des forces hydrodynamiques, appelées forces de cisaillement, parallèles à la surface (Stoodley *et al.*, 2002 ; Busscher et Van der Mei, 2006). Ces forces dépendent de différents facteurs parmi lesquels la viscosité du liquide, la géométrie du système, et la nature de l'écoulement, sont les plus importants (Stoodley *et al.*, 1999 ; Busscher et Van der Mei, 2006 ; Brugnoli *et al.*, 2011).

La nature de l'écoulement est déterminée par le nombre de Reynolds (Re). C'est un nombre sans dimension qui dépend de la viscosité du liquide et de la vitesse d'écoulement ainsi que de la longueur de parcours du liquide :

$$Re = \frac{\rho u L}{\mu} = \frac{u L}{\nu}$$

où u est la vitesse du liquide (m/s), ρ la masse volumique du fluide (kg/m^3), L une longueur caractéristique (e.g. le diamètre pour une conduite) (m), μ la viscosité dynamique du fluide (Pa.s), et ν la viscosité cinématique (m^2/s).

Suivant la valeur de Re, l'écoulement peut être classé en régime laminaire ($Re < 2000$) ou turbulent ($Re > 3000$). Pour $2000 < Re < 3000$ le régime est appelé transitionnel (Figure 7). En écoulement laminaire, le fluide se comporte comme un ensemble de couches parallèles qui

glissent l'une sur l'autre lors de l'écoulement. L'écoulement turbulent est beaucoup plus complexe, les lignes de courant sont irrégulières et vont dans tous les sens. Ainsi des tourbillons peuvent se former (Busscher et Van der Mei, 2006 ; Ochoas *et al.*, 2007 ; Brugnoli *et al.*, 2011).

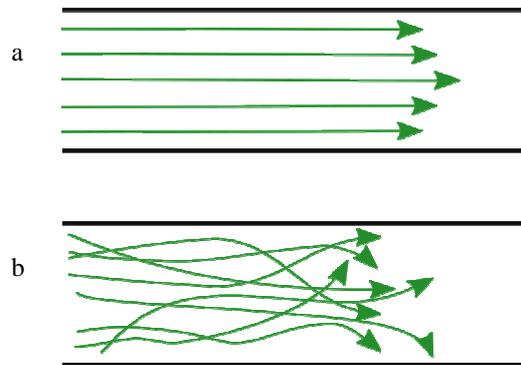


Figure 7: Aspects de lignes de courant dans les différents régimes d'écoulement, a) Laminaire, b) Turbulent.

En général, la vitesse du liquide à l'interface solide-liquide est négligeable, et une couche dite limite se forme. L'épaisseur de cette couche dépend essentiellement de la vitesse linéaire du liquide. Ainsi, à faible vitesse d'écoulement, cette couche devient plus épaisse et l'adhésion des bactéries est ralentie. En revanche, des vitesses d'écoulement plus élevées amplifient le phénomène d'adhésion, mais des vitesses trop élevées déterminent des forces de cisaillement sur le biofilm qui induisent le détachement des cellules bactériennes (Donlan, 2002 ; Horn *et al.*, 2003 ; Busscher et Van der Mei, 2006 ; Ochoas *et al.*, 2007).

Les conditions hydrodynamiques, et notamment la vitesse d'écoulement et les forces qui en résultent, influencent fortement la structure et la morphologie du biofilm, son activité (production d'exopolymères et de métabolites), ainsi que la répartition des microcolonies (Costerton, 1999 ; Stoodley *et al.*, 1999 ; Busscher et Van der Mei, 2006 ; Ochoas *et al.*, 2007). L'activité du biofilm dépend fortement de la quantité de biomasse fixée, de sa densité, sa porosité, du transfert de nutriments à l'intérieur du biofilm, qui sont eux-mêmes influencés par les conditions hydrodynamiques du système (Abrahamson *et al.*, 1996). Les différentes études menées sur la formation des biofilms à partir de consortium naturels ou de souches

pures en présence de conditions hydrodynamiques variées, montrent que l'épaisseur, la biomasse fixée, la nature et la quantité d'EPS produites, ainsi que la répartition des colonies bactériennes, varient largement suivant le mode de cisaillement appliqué (Stoodley *et al.*, 1999 ; Pereira *et al.*, 2002 ; Celmer *et al.*, 2008). Les écoulements à grandes vitesses, notamment turbulents à sous-couche visqueuse, donnent des biofilms denses et favorisent le transfert des nutriments depuis le liquide extérieur vers le biofilm en diminuant l'épaisseur de la couche diffuse (Zhu et Chen, 2001 ; Liu et Tay, 2002 ; Vrouwenvelder *et al.*, 2010). Ceci favorise la production d'exopolymères et plus particulièrement des polysaccharides assurant une structure plus rigide due à une cohésion plus importante entre les cellules (Decho, 2000). En revanche, l'augmentation de la densité du biofilm peut retarder la diffusion des nutriments au sein du biofilm, ce qui peut affecter l'activité de celui-ci, et donc modifier son épaisseur qui peut devenir plus fine (Liu et Tay, 2002 ; Celmer *et al.*, 2008 ; Wagner *et al.*, 2008). La comparaison de l'activité des biofilms sous deux modes d'écoulement (turbulent et laminaire) a mis en évidence l'influence du régime d'écoulement sur l'activité et la composition des biofilms. Les biofilms développés sous écoulement laminaire sont plus actifs que les biofilms développés en milieu turbulent (Simões *et al.*, 2010). A faible force de cisaillement, les biofilms sont beaucoup moins denses, plus poreux, et plus épais. Ces biofilms sont formés par l'agrégation de colonies bactériennes séparées par des espaces interstitiels sous forme de réseau de micro-canaux. Cette architecture favorise un transport de nutriments à l'intérieur du biofilm, ce qui augmente son activité et par conséquent son épaisseur au détriment de sa rigidité par le biais d'une diminution de la production des EPS (Celmer *et al.*, 2008 ; Wagner *et al.*, 2008). En cas de conditions extrêmes (très fort cisaillement), les conditions hydrodynamiques peuvent entraîner la déformation des biofilms voire leur détachement des surfaces (Lewandowski, 2000 ; Ochoas *et al.*, 2007).

La surproduction des exopolymères n'est pas le seul remède aux biofilms pour résister aux conditions hydrodynamiques, en effet une réorientation aura lieu quand le biofilm s'étire par action de force de cisaillement « stretching », les polymères s'alignant pour permettre à de nouvelles liaisons électrostatiques et liaisons hydrogène d'avoir lieu pour renforcer la liaison des cellules voisines.

La morphologie du biofilm est aussi affectée par l'hydrodynamique du fluide en écoulement. Battin *et al.*, (2003) a distingué différentes morphologies du biofilm, des eaux de rivières, dépendant des conditions hydrodynamique et de l'âge de biofilm. Dans un premier temps les

biofilms présentait des microcolonies en forme de cascades « ripple like » dispersées sur la surface dans la direction de l'écoulement. Au changement des conditions hydrodynamiques, des biofilms en forme hexagonale ont été observés (figure 8). Ce mode de développement a été aussi remarqué dans des biofilms de bactéries sulfato-réductrices et des biofilms d'eaux usées. Il peut être expliqué par le fait que les microcolonies s'organisent de façon à assurer et faciliter le transport par advection des nutriments dans le biofilm (Costerton *et al.*, 1995).

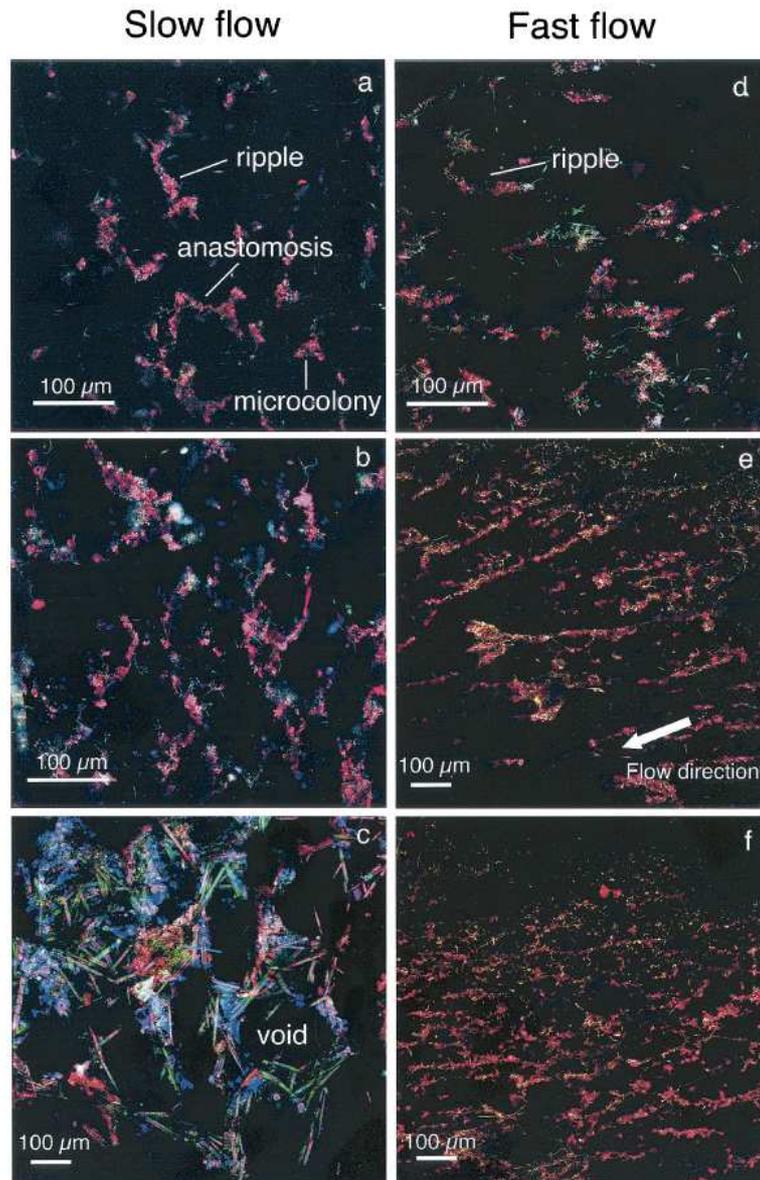


Figure 8 : Images de microscopie confocale montrant la structure et la formation de forme hexagonale des biofilms des eaux de rivière (plan xy) (a, b, et c) : Images de biofilms d'âge 4, 12, 21 jours sous traitement à faible écoulement ; (d, e, et f) : Images de biofilms d'âge 6, 12, 24 jours sous traitement à faible écoulement (Battin *et al.*, 2003).

Un autre impact de l'hydrodynamique sur les biofilms se traduit par la formation d'élongations dans la structure de biofilm appelés « streamers », qui oscillent dans le fluide et qui sont la cause de l'augmentation de force de friction dans le fluide. Ce type de structure a été observé dans les biofilms naturels ainsi que dans des biofilms développés à partir de souches pures (Battin *et al.*, 2003 ; Stoodley *et al.*, 1999).

L'influence de l'hydrodynamique ne se limite pas à modifier la structure, la morphologie, et les propriétés du biofilm. Elle peut aussi conduire, en dépassant les forces de cohésion interne de la matrice bactérienne, au détachement du biofilm et à la redispersion des cellules dans le milieu. Ceci joue un rôle aussi important sur la structuration du biofilm que celui joué par les EPS. En effet, les parties détachées peuvent se refixer à un autre endroit du biofilm présentant des conditions plus favorables pour le développement. En outre, ce détachement de certaines parties du biofilm donne aux cellules sous-jacentes de nouvelles conditions de croissance, et déterminant en retour une nouvelle organisation par rapport au biofilm initial (Purevdorj-Gage et Stoodley, 2004).

1.4 VISUALISATION DES BIOFILMS

Différentes méthodes peuvent être utilisées pour observer et analyser les biofilms. Nous présentons ici les plus employées en détaillant la microscopie confocale qui est mise en œuvre dans cette étude.

1.4.1 Microscopie optique

La microscopie optique est la première technique utilisée pour l'observation des biofilms. Elle donne en premier lieu une information sur la présence du biofilm sur la surface étudiée, et en deuxième lieu une vue générale de son aspect et de son organisation. Une information plus précise peut être obtenue à partir de cette microscopie en introduisant des colorants qui se fixent sur le biofilm et révèlent une caractéristique donnée. Ainsi, le INT (2(-p-iodophenyl)-3-(p-nitrophenyl)-5phenyl tetrazolium chloride) donne une couleur rouge-orange à la partie active du biofilm. Cette technique est simple et rapide mais ne peut fournir que des informations limitées sur la structure du biofilm (Lazarova et Manem, 1995).

1.4.2 Microscopie électronique à balayage (MEB)

Cette méthode fournit des informations équivalentes à la microscopie optique mais à plus haute résolution (figure 9). Cependant, le MEB présente un certain nombre de désavantages dont le plus important est la préparation de l'échantillon pour l'observation (sous vide) qui peut induire une destruction partielle, ou pour le moins une déformation du biofilm (Lazarova et Manem, 1995 ; Surman *et al.*, 1996). Le MEB environnemental (MEB-E) offre l'avantage de pouvoir observer l'échantillon sous vide modéré et atmosphère humide, permettant ainsi une meilleure visualisation de la morphologie du biofilm que le MEB basique (Walker *et al.*, 2001).

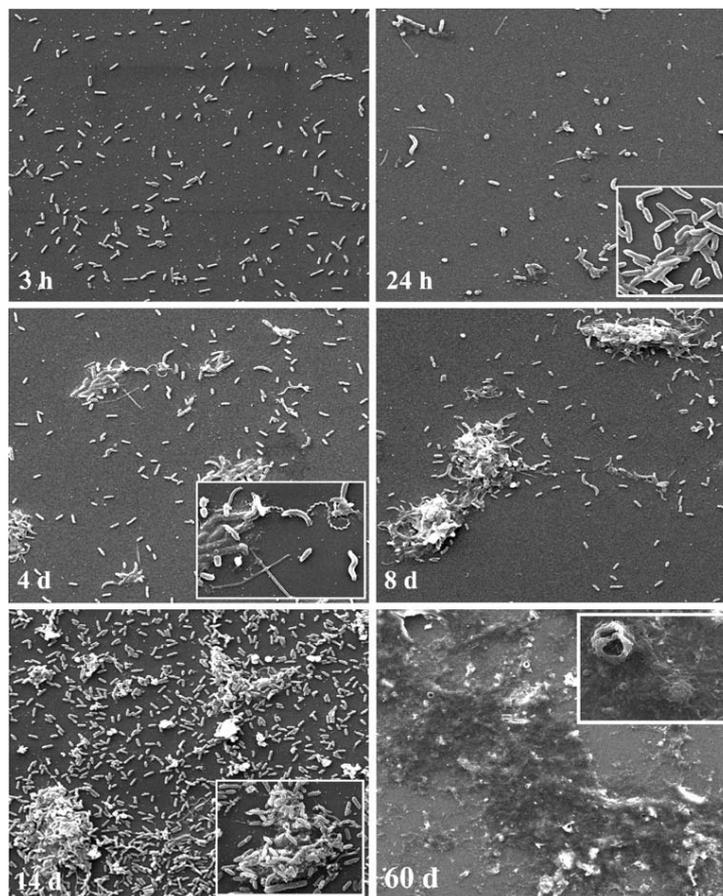


Figure 9 : Photographies de biofilm en microscopie électronique à balayage pour un biofilm à différents temps de croissance. Fernández *et al.*, 2008.

1.4.3 Microscopie électronique à transmission (MET)

Des informations supplémentaires sur la nature ainsi que sur le type de constituants sont obtenues par l'emploi du MET (Lazarova et Manem, 1995 ; Surman *et al.*, 1996). L'utilisation de colorants spécifiques permet de marquer certaines fonctions dans les exopolymères ce qui permet de préciser leur nature et leur localisation dans le biofilm (Eighmy, 1983). L'observation des échantillons nécessite une fixation préalable des biofilms, une inclusion en résine et la réalisation des coupes ultrafines des blocs de résine (Eighmy, 1983 ; Surman *et al.*, 1996 ; DeLeo *et al.*, 1997 ; Walker *et al.* 2001).

1.4.4 Microscopie à Rayon X

La microscopie X (MX) est une technique de microscopie basée sur l'utilisation de photons X. Bien que la résolution soit plus élevée qu'en microscopie optique, cette technique présente un grand inconvénient du fait qu'elle exige un synchrotron pour l'acquisition des images. L'exploitation tomographique informatique « computer-tomography » couplée à la MX permet la visualisation de la structure 3D de l'échantillon mais nécessite une durée longue d'acquisition (Davit *et al.*, 2011 ; Ogura, 2011).

Récemment la microscopie X à balayage (STXM Scanning Transmission X-ray Microscopy), couplée à des sondes biologiques spécifiques, ont permis une étude quantitative voire une cartographie de différents éléments et molécules (lipides, métaux lourds, cations, polysaccharides, etc...) recherchés dans l'échantillon (Dynes *et al.*, 2006) (figure 10).

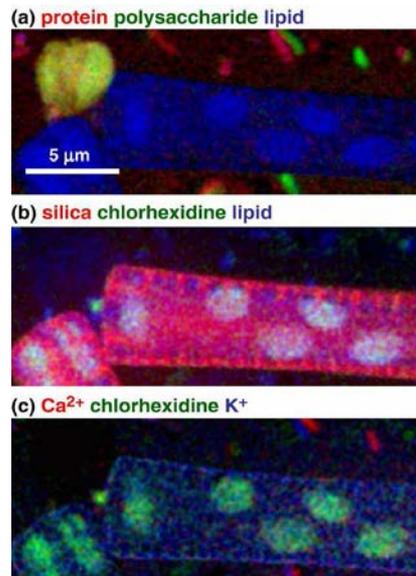


Figure 10 : Cartographie de certains éléments et molécules se trouvant dans une diatomée contenue dans un biofilm de rivière. Le code couleur de chaque élément est mentionné au dessus de chaque image (Dynes *et al.*, 2006).

1.4.5 Microscopie confocale à balayage Laser (CLSM)

Le terme de confocal signifie que toutes les informations se trouvant hors du plan focal du microscope sont éliminées et que seules les informations provenant de la structure éclairée seront enregistrées dans l'image finale de l'échantillon. Cette technique permet d'observer aussi bien les cellules planctoniques que le biofilm. Elle permet d'aller plus loin dans la visualisation de la structure du biofilm en balayant l'échantillon en profondeur, et en fournissant des sections optiques formant dans l'intégrité des images 2-D ou 3-D sans déformer ou abimer l'échantillon (Lazarova et Manem, 1995 ; DeLeo *et al.*, 1997 ; Kokare *et al.*, 2009). Ces sections optiques peuvent être réalisées horizontalement (suivant le plan xy), en profondeur (plan xz), ou en fonction de temps (xt) (Neu, 2000).

L'observation des échantillons est possible selon deux modes : mode fluorescence et mode réflexion. L'emploi de différents fluorochromes permet de localiser et de décrire plus précisément les structures, la composition, et la répartition spatiale des biofilms (Lazarova et Manem, 1995 ; Surman *et al.*, 1996). Un autre avantage de la microscopie confocale est la possibilité de coupler cette technique avec des logiciels informatiques capables de manipuler les images obtenues et de tirer plus d'informations sur la quantité de biomasse fixée, la

surface, le volume, la porosité, les dimensions fractales, les profils chimiques, etc... (DeLeo *et al.*, 1997 ; Lewandowski, 2000 ; Busscher et Van der Mei, 2006).

Les nouveaux microscopes confocaux comportent des systèmes offrant la possibilité de récupérer simultanément, tout en les séparant, les signaux de fluorescence correspondant à différentes longueurs d'onde d'excitation et d'émission. Ceci permet d'utiliser en même temps plusieurs fluorochromes sur le même échantillon, et par la suite d'augmenter le nombre d'informations désirées (Neu, 2000) (figure 11).

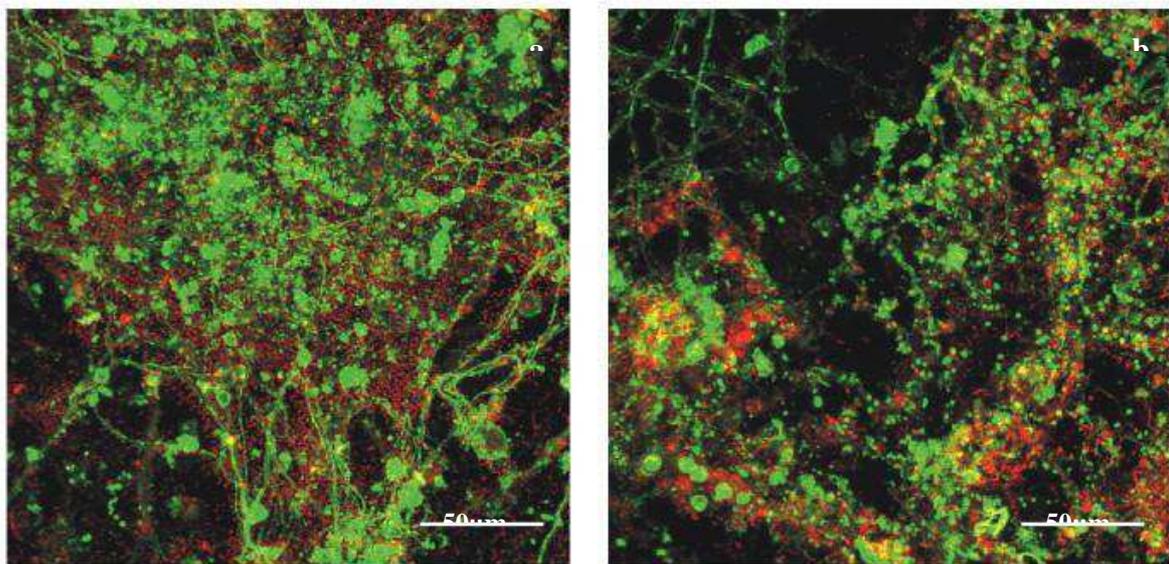


Figure 11 : Images obtenues par microscopie confocale (objectif x40) des biofilms de boues activées développés sous deux écoulements à différents nombres de Reynolds : a) $Re = 1000$, b) $Re = 4000$.

Les EPS (vert) sont marqués par *Aleuria aurantia* lectin- Alexa. L'ADN des bactéries (rouge) est marqué par le fluorochrome SYTO6 (Walker *et al.* 2001).

Cette technique présente néanmoins quelques inconvénients. Le premier demeure le coût conséquent des microscopes confocaux. Un second désavantage est le « bleaching » (photoblanchiment) causé par l'action du faisceau laser sur les fluorochromes, ce qui dégrade l'échantillon et la qualité des images acquises. Néanmoins, ce problème a été surmonté par l'élaboration de nouvelles sondes plus ou moins photostables et adaptées pour ce type d'analyse. Un autre problème rencontré au niveau des microorganismes libres est la mobilité

de ces derniers, leur mouvement durant l'acquisition peut donner des trainées sur les images obtenues. Dans le cas du biofilm, ce problème est très atténué du fait de l'immobilisation des bactéries (Neu, 2000).

Jusqu'à présent cette méthode s'avère être le moyen le plus intéressant pour étudier les caractéristiques des biofilms tout en préservant leur structure initiale. D'après Stewart *et al.* (1995) les résultats issus du CLSM étaient différents de ceux obtenus à partir de la microscopie électronique à balayage. Les images du biofilm observées par le CLSM montraient des colonies sous forme de disques séparées par des vides interstitiels tandis que le MEB présentait une structure différente, les colonies semblaient rétrécies (déshydratation des échantillons au cours de la préparation) et les vides interstitiels et les canaux n'existaient plus (Stewart *et al.*, 1995).

La microscopie confocale peut également être couplée à la spectroscopie Raman, ce qui permet d'associer les images optiques à des analyses de la composition du biofilm. L'avantage de cette combinaison réside dans la facilité de manipulation, l'échantillon ne nécessite aucune préparation ou traitement préalable, et aucun emploi de marqueur ou fluorochrome est exigé. Les interférences dues à la fluorescence du milieu représentent la seule cause limitant l'utilisation de cette technique, puisque celle-ci peut masquer les faibles signaux du Raman (Pätzold *et al.*, 2006 ; Sandt *et al.*, 2007 ; Wagner *et al.*, 2008 ; Allakhverdiev *et al.*, 2009).

Les images acquises par les techniques décrites précédemment permettent de donner des informations visuelles sur la morphologie du biofilm. Pour quantifier sa structure, un certain nombre de paramètres sont utilisés tels que la surface, l'épaisseur du biofilm, l'élasticité, la composition en bactéries et exopolymères, les dimensions fractales etc... (Stoodley *et al.*, 1999 ; Walker *et al.* 2001 ; Klapper *et al.*, 2002 ; Pereira *et al.*, 2002 ; Paris *et al.*, 2007 ; Celmer *et al.*, 2008 ; Wagner *et al.*, 2008).

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

A

Abrahamson M., Lewandowski Z., Geesey G., Skjak-Braek G., Strand W., Christensen B.E. (1996). Development of an artificial biofilm to study the effects of a single microcolony on mass transport. *Journal of Microbiological Methods*, 26(1-2): 161-169.

Adamzyck, Z. and T. G. M. Van de Ven (1981). Deposition of particles under external forces in laminar flow through parallel-plate and cylindrical channels. *J. Coll. Inter. Sci.*, 80: 340-356.

Allakhverdiev R., Lover D., Altstädt V., Schreier P., Kador L. (2009). Confocal Raman microscopy: Non destructive materials analysis with micrometer resolution. *Rev.Adv.Mater.Sci*, 20: 77-84.

Andersson S. (2009). Characterization of bacterial biofilms for wastewater treatment. Stockholm, Royale Istitute of Technology, school of Biotechnology.

B

Bakker D., Busscher H., Van der Mei H. (2002). Bacterial deposition in a parallel plate and a stagnation point flow chamber: microbial adhesion mechanisms depend on the mass transport conditions. *Microbiology*, 148: 597-603.

Battin T., Kaplan L., Newbold J.D., Cheng X. and Hansen C. (2003). Effects of Current Velocity on the Nascent Architecture of Stream Microbial Biofilms. *Applied and Environmental Microbiology*, 69 (9): 5443-5452.

Bellon-Fontaine M.-N., Fourniat J. (1994). Adhésion des microorganismes aux surfaces Biofilms-Nettoyage-Désinfection. Chatenay-Mlabry: Communications présentées à la troisième réunion européenne Adhésion des micro-organismes aux surfaces.

Berg H. C. (1993). *Random walks in biology*. Princeton, NJ.

Brugnoli L., Cubitto. M., Lozano J. (2011). Role of shear stress on biofilm formation of *Candida Kursei* in a rotating disk system. *Journal of food Engineering*, 102: 266-271.

Busscher H., Vander Mei H. (2006). Microbial adhesion in flow displacement systems. *Clinical Microbiology Reviews*, 19(1): 127-141.

C

Caldwell D.E. and Lawrence J.R. (1988). In: *CRC Handbook of laboratory model systems for microbial ecosystems*, vol. 1, J.W.T. Wimpenny, pp 117-138. Florida: CRC Press.

Celmer D., Oleszkiewicz J. A., Cicek N (2008). Impact of shear force on the biofilm structure and performance of a membrane biofilm reactor for tertiary hydrogen-driven denitrification of municipal wastewater. *Water Research*, 42: 3057-3065.

Ciston S., Lueptow R. and Gray K. (2009). Controlling biofilm growth using reactive ceramic ultrafiltration membranes. *Journal of Membrane Science*, 342(1-2):263-268.

Cloete T.E., Jacobs L. (2001). Surfactants and the attachment of *Pseudomonas Aeruginosa* to 3CR12 steel and glass. *Water SA*, 27(1): 21-26.

Costerton J. W., Lewandowski Z., Caldwell D. E., Korber D. R., and Lappin-Scott H.M. (1995). Microbial biofilms. *Annu. Rev. Microbiol.*, 49: 711–745.

Costerton, J. W. (2004). A short history of the development of the biofilm concept. *Microbial Biofilms*. G. A. O. T. Mahmoud Ghanoum. Washington, ASM press.

Costerton J.W. (1999). Discussion: Introduction to biofilm. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 11: 217-221.

Creber S.A., Vrouwenvelder J.S., Van Loosdrecht M.C.M. and Johns M.L. (2010). Chemical cleaning of biofouling in reverse osmosis membranes evaluated using magnetic resonance imaging. *Journal of Membrane Science*, 362(1-2):202-210.

D

Davit Y., Iltis G., Debenest G., S., Veran-Tissoires, Wildenschild D., Gerino M. and Quintard M. (2011). *Journal of Microscopy*, 242 (1): 15-25

Decho A. (2000). Microbial biofilms in intertidal systems: An overview. *Continental Shelf Research*, 20: 1257-1273.

DeLeo P. C., Baveye P., Ghiorse W.C. (1997). Use of confocal laser scanning microscopy on soil thin-sections for improved characterization of microbial growth in unconsolidated soils and aquifer materials. *Journal of Microbiological Methods*, 30(3): 193-203.

Donlan R. M. (2002). Biofilms: Microbial life on surfaces. *Emerging Infectious Diseases*, 8(9): 881-889.

Duval J. et Gaboriaud F.(2010). Progress in electrohydrodynamics of soft microbial particle interphases. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 15:184–195.

Dynes J. J., Lawrence J. R., Korber D. R., Swerhone G. D.W., Leppard G. G., Hitchcock A. P. (2006). Quantitative mapping of chlorhexidine in natural river biofilms. *Science of the Total Environment*, 369: 369–383.

E

Eberl H.J., Picioreanu C., Heijnen J.J, Van Loosdrecht M.C.M. (2000). A three-dimensional study on the correlation of spatial structure, hydrodynamic conditions, and mass transfer and conversion in biofilms. *Chemical Engineering Sciences*, 55: 6209-6222.

Eighmy T., Maratea D., Bishop P. (1983). Electron microscopic examination of wastewater biofilm formation and structural component. *Applied and Environmental Microbiology*, 45(6): 1921-1931.

El Samrani A.G., Lartiges B.S., Ghanbaja J., Yvon J., Kohler A. (2004). Trace element carriers in combined sewer during dry and wet weather: an electron microscope investigation. *Water research*, 38: 2063-2076.

Elimelech M. (1994). Particle deposition on ideal collectors from dilute flowing suspensions: Mathematical formulation, numerical solution, and simulations. *Separations technology*, 4:186-212.

F

Fernández N., Díaz E.E, Amils R., Sanz J.L. (2008). Analysis of Microbial Community during Biofilm Development in an Anaerobic Wastewater Treatment Reactor. *Microb. Ecol.* ; 56: 121-132.

Flemming H.C, Wingender J., Griebe T., Mayer C. (2000). Physico-chemical properties of Biofilms. *Biofilms: Recent advances in their study and control*. L. V. Evans, Harwood Academic Publishers.

Flemming H.C., Neu. T., Wozniak D. (2007). The EPS matrix: The "House of biofilm cells. *Journal of bacteriology*, 189 (22): 7945-7947.

Flemming H-C, Wingender J. (2010). The biofilm matrix. *Nature Reviews: Microbiology*, 8: 623-633.

Fletcher M. (1979). The attachment of bacteria to surfaces in aquatic environments. *Adhesion to Microorganisms to Surfaces*. D. C. Ellwood, J. Melling & P. Rutter, Academic Press.

Friese K. Mages M., Wendet-Potthoff K., Neu T.R. (1997). Determination of heavy metals in biofilms from the River Elbe by total-reflection X-ray fluorescence spectrometry. *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy*, 52(7): 1019-1025.

G

Gauthier F. (2002). Biofilms qualité biologique de l'eau potable au cours de sa distribution, Université de Picardie - Amiens.

Ginn T., Wood B., Nelson K., Scheibe T., Murphy E., Clement T. (2002). Processes in microbial transport in the natural subsurface. *Advances in Water Resources*, 25: 1017-1042.

Gjersing E.L., Codd S.L., Seymour, J.D., Stewart, P.S. (2005). Magnetic resonance microscopy analysis of advective transport in a biofilm reactor. *Biotechnology and Bioengineering*, 89 (7): 822-834.

Grany K., Horn H., Neu T. (2008). Interaction between development, structure and detachment in rotating annular reactors, *Bioprocess Biosyst Eng.*, 31:619-629.

Gutierrez O., Mohanakrishnan J., Sharma K., Meyer R., Keller J., Yuan Z. (2008). Evaluation of oxygen injection as a mean of controlling sulfide production in a sewer system. *Water research*, 42: 4549-4561.

H

Hermansson M. (1999). The DLVO theory in microbial adhesion. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 14: 105-119.

Hori K., Matsumoto S. (2010). Bacterial adhesion: From mechanism to control. *Biochemical Engineering Journal*, 48: 424-434.

Horn H., Reiff H., Morgenroth E. (2003). Simulation of growth and detachment in biofilm systems under defined hydrodynamic conditions. *Biotechnology and Bioengineering*, 81(5): 607-617.

Houhou J. (2008). Le réseau d'assainissement urbain: du collecteur au réacteur bio-physico-chimique. Rapport de thèse, Ecole Nationale Polytechnique de Lorraine, Nancy-France.

Houhou J., Lartiges B.S., Montagres-Pelletier E., Sieliechi J., Ghanbaja J., Kohler A. (2009). Sources, nature, and fate of heavy metal-bearing particles in the sewer system. *Science of the total environment*, 407: 6052-6062.

Huang C-T., Peretti S.W., Bryers J.D. (1992). Use of flow cell reactors to quantify biofilm formation kinetics. *Biotechnology Techniques*, 6 (3):193-198.

I

Ivleva N., Wagner M., Szkola A., Horn H., Neissner R., Haisch C. (2010). Label-Free in situ SERS imaging of biofilms. *J. Phys. Chem. B*, 114: 10184-10194.

K

Khalizadeh P. (2009). Formation de Biofilm à *Pseudomonas aeruginosa*: évaluation d'inhibiteurs potentiels du quorum sensing. Microbiologie. Toulouse, Université de Toulouse. Ecole doctorale SEVAB.

Kim J.R., Jung S.H., Regan J.M., Logan B.E. (2007). Electricity generation and microbial community analysis of alcohol powered microbial fuel cells. *Bioresource Technology*, 98(13): 2568-2577.

Klapper I., Rupp C. J., Cargo R., Purvedorj B., Stoodley P. (2002). Viscoelastic fluid description of bacterial biofilm material properties. *Biotechnology and Bioengineering*, 80(3): 289-296.

Kokare C.R., Chakraborty S., Khopade A.N, Mahadik K.R (2009). Biofilm: Importance and applications. *Indian Journal of Biotechnology*, 8: 159-168.

Kolenbrander P.E., Palmer, R.J., Periasamy, S., Jakubovics, N.S. (2010). Oral multispecies biofilm development and the key role of cell-cell distance. *Nature Reviews Microbiology*, 8 (7): 471-480.

Kuehn M., Hausner M., Bungartz H-J. Wagner M., Wilderer P.A. and Wuertz S. (1998). Automated Confocal Laser Scanning Microscopy and Semiautomated Image Processing for Analysis of Biofilms. *Applied and Environmental Microbiology*, 64 (11): 4115-4127.

L

Lazarova V., Manem J. (1995). Biofilm characterization and activity in water and wastewater treatment." *Water Research*, 29(10): 2227-2245.

Lelièvre C., Antonini. G., Faille C., Bénézech T. (2002). Cleaning in place: Modelling of Cleaning Kinetics of Pipes Soiled by *Bacillus* Spores Assuming a Process Combining Removal and Deposition. *Trans IChemE*, 80(C).

Lewandowski Z. (2000). 1- Structure and Functions of Biofilms. *Biofilms: Recent Advances in Their Study and Control*. L. V. Evans, Harwood Academic Pub.

Lewandowski Z., Stoodley P., Altobelli S., Fukushima E. (1994). Hydrodynamics and kinetics in biofilm systems- Recent advances and new problems. *Wat. Sci. Tech.*, 29(10-11) p. 223-229.

Li J., Busscher H. J., Norde W., Sjollem J. (2011). Analysis of the contribution of sedimentation to bacterial mass transport in a parallel plate flow chamber. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 84: 76-81.

Liang Z., Li W., Yang S., Du P. (2010). Extraction and structural characteristics of extracellular polymeric substances (EPS), pellets in autotrophic nitrifying and activated sludge. *Chemosphere*, 81: 626-632.

Liu Y., Tay J-H. (2002). The essential role of hydrodynamic force in the formation of biofilm and granular sludge. *Water Research*, 36: 1653-1665.

M

MacClaine J.W., Ford R.M. (2002). Adhesion of motil and nonmotil *Escherechia Coli* to glass. *Biotechnology and Bioengineering*, 78(2): 179-189.

Maukonen J., Matto J., Wirtanen G., Raaska L., Mattila-Sandholm T., Saarela M. (2003). Methodologies for the characterization of microbes in industrial environments: a review. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 30: 327–356.

Meinders J. M., Van Der Mei H., Busscher H. J. (1995). Deposition Efficiency and Reversibility of Bacterial Adhesion under Flow. *Journal of Colloid and Interface Science*, 176: 329-341.

Mueller R.F. (1996). Bacterial transport and colonization in low nutrient environments. *Water Research*, 30(11): 2681-2690.

N

Neu T. R. (2000). Confocal Laser microscopy (CLSM) of biofilms. *Biofilms, investigative methods and applications*. U. S. H-C Flemming, T. Griebe, Thechnomic.

Nielson A.H., Lens P., Hvite-Jacobsen T., Vollertsen J. (2005). Effect of aerobic-anaerobic transient conditions on sulfur and metal cycles in sewer biofilms. *Biofilms*, 2: 81-91.

Nielson A.H., Vollertsen J., Stokbro Jensen H., Wium-Andersen T., Hvite-Jacobsen T. (2008). Influence of pipe material and surfaces on sulfide related odor and corrosion in sewers. *Water Research*, 42:4206-4214.

O

Ochoas J, Coufort C., Escudié R., Liné A., Paul E. (2007). Influence of non-uniform distribution of shear stress on aerobic biofilms. *Chemical Engineering Science*, 62: 3672-3684.

Ogura T. (2011). Three-Dimensional X-ray Observation of Atmospheric Biological Samples by Linear-Array Scanning-Electron Generation X-ray.Microscope System. *PLoS ONE* 6(6): e21516. doi:10.1371/journal.pone.0021516.

P

Paris T., Skali-Lami S., Block J-B. 2007. Effect of wall shear rate on biofilm deposition and grazing in drinking water flow chambers. *Biotechnology Bioengineering*, 97 (6), 1550-1561.

Paris, T. (2008). Formation et organisation de biofilms en milieu eau potable. Influence du gradient de vitesse pariétal. U.F.R Sciences & Techniques de la Matière et des Procédés. Ecole Doctorale Energie Mécanique Matériaux, Département de Formation Doctorale Mécanique Energétique. Nancy, Université Henri Point Carré.

Parot, S. (2007). Biofilms électroactifs: formation, caractérisation et mécanismes. Génie des Procédés et de l'Environnement. Toulouse, Institut National Polytechnique de Toulouse.

Pätzold R., K. M., Anders-von Ahlften A. (2006). A new approach to non-destructive analysis of biofilms by confocal Raman microscopy. *Anal Bioanal Chem*, 386: 286-292.

Pereira M., Keuntje M., Wuertz S., Neu T., Melo L. (2002). Effect of flow regime on the architecture of a *Pseudomonas fluorescens* biofilm. *Biotechnology and Bioengineering*, 78(2): 164-171.

Periasamy S., Chalmers N., Du-Thumm L. Kolenbrander P.(2009). *Fusobacterium nucleatum* ATCC 10953 requires *Actinomyces naeslundii* ATCC 43146 for growth on saliva in a three-species community that includes *Streptococcus oralis* 34. *Applied and Environmental Microbiology*, 75: 3250-3257.

Peyton B.M.(1996). Effect of shear stress and substrate loading rate on *Pseudomonas aeruginosa* biofilm thickness and density. *Water research*, 30 (1): 29-36.

Piciooreanu C., Van Loosdrecht M., Heijnen J. (2000). Effect of diffusive and convective substrate transport on biofilm structure formation: A two-dimensional modeling study. *Biotechnology and Bioengineering*, 69(5): 469–583.

Picologlou B., Z. N., Williams G. (1980). Biofilm growth and hydraulic performance. *ASCE J Hydraul Div*, 106(5): 733-746.

Purevdorj-Gage L.B., Stoodley P. (2004). Biofilms structure, behavior, and hydrodynamics. *Microbial Biofilms*. G. A. O. T. Mahmoud Ghannoum. Washington, ASM Press.

R

Redman J., Walker S., Melech M. (2004). Bacterial Adhesion and Transport in Porous Media: Role of the Secondary Energy Minimum. *Environ. Sci. Technol.*, 38: 1777-1785.

Reimers C.E., Tender L.M., Fertig S., Wang W. (2001). Harvesting Energy from the Marine Sediment - Water Interface. *Environ. Sci. Technol.*, 35: 192-195.

Rijnaarts H. H. M. (1994). Interactions between bacteria and solid surfaces in relation to bacterial transport in Porous media. Publisher: Landbouwniversitet te Wageningen.

Rosche B., Li X., Hauer B., Schmid A., Buehler K. (2009). Review Microbial biofilms: a concept for industrial catalysis? *Trends in Biotechnology*, 27(11): 636-643.

S

Salaun S. (2009). Interactions entre la macroalgue *Laminaria digitata* et ses épibiontes bactériens : Etudes moléculaire et spectroscopiques et capacité d'adhésion et de formation de

biofilm. . Ecole doctorale santé information communication matiere et mathematiques-SICMA., Université de Bretagne Sud. Unité mixte de recherche 7139 CNRS-UPMC Paris IV.

Sandt C., Smith-Palmer T., Pink J., BrennanL., Pink D. (2007). Confocal Raman microspectroscopy as a tool for studying the chemical heterogeneities of biofilms in situ. *Journal of Applied Microbiology*, 103: 1808-1820.

Simões M., Simões L., Vieira M (2010). A review of current and emergent biofilm control strategies. *Food Science and Technology*, 43: 573-583.

Stewart P., Murga R., Srinivasani R. and De Beer D. (1995). Biofilm structural heterogeneity visualized by three microscopic methods. *Water Research*, 29(8): 2006-2009.

Stoodley P., Cargo R., Rupp CJ., Wilson S., Klapper I. (2002). Biofilm material properties as related to shear-induced deformation and detachment phenomena. *Journal of industrial Microbiology and Biotechnology*, 29: 361-367.

Stoodley P., Dodds I., Boyle J.D., Lappin-Scott H.M. (1999). Influence of hydrodynamics and nutrients on biofilm structure. *Journal of Applied Microbiology Symposium Supplement*, 85(28): 19S-28S.

Surman S.B., Walker J. T., Goddard D.T., Morton L.H.G, Keevil C.W., Weaver W. , Skinner A., Hanson K., Caldwell D., Kurtz J. (1996). Comparison of microscope techniques for the examination of biofilms. *Journal of Microbiological Methods*, 25: 57-70.

V

Valt, A. (2008). Etude de deux procédés de polymérisation d'un précurseur gazeux dans un plasma radiofréquence basse pression et liquide déposé sur un substrat activé par décharge à barrière diélectrique à pression atmosphérique : application aux propriétés antifouling. Université Pierre et Marie-Curie. Paris, Université Pierre et Marie-Curie.

Van Oss C.J., Good R. J., Chaudhury M.K. (1985). Role of Van der Waals forces and hydrogen bonds in hydrophobic interactions between biopolymers and low energy surfaces. *Journal of Colloid and Interface Science*, 111(2): 378-390.

Vollertsen J., Nielsen A.H., Jensen H.S., Wium-Andersen T., Hvitved-Jacobsen T. (2008). Corrosion of concrete sewers-The kinetics of hydrogen sulfide oxidation. *Science of the total environment*, **394**(1):162-170.

Vrouwenvelder J., Riviere J., Van der Meer W, Loosdrecht M., Kruithof J. (2010). Impact of flow regime on pressure drop increase and biomass accumulation and morphology in membrane systems. *Water Research*, 44: 689-702.

W

Wagner M., Ivleva N. P., Haisch C., Niessner R. (2008). Combined use of confocal laser scanning microscopy (CLSM) and Raman microscopy (RM): Investigation on EPS-Matrix. *Water Research*, XXX: 1-14.

Walker J.T., Verran J., Boyd R.D, Percival S. (2001). Microscopy Methods to Investigate Structure of Potable Water Biofilms. *Methods in Enzymology*, 337: 243-255.

Z

Zartarian F., Mustin C., Villemin G., Ait-Ettager T., Thill A., Bottero J. Y., Mallet J. L., Snidaro D. (1997). Three-Dimensional Modeling of an Activated Sludge Floc. *Langmuir*, 13:35-40.

Zhang L., Schryver P., Gusseme B., Muynck W., Boon N., Verstrete W. (2008). Chemical and biological technologies for hydrogen sulfide emission in sewer systems: A review. *Water Research*, 42:1-12.

Zhu S., Chen. S. (2001). Impacts of Reynolds number on nitrification biofilm kinetics. *Aquacultural Engineering*, 24: 213–229.

Chapitre 2 : SECTION EXPERIMENTALE

2.1 REACTEUR COUETTE-POISEUILLE

2.1.1 Ecoulement Couette-Poiseuille

L'écoulement de Couette-Poiseuille est la résultante de la superposition d'un écoulement de Couette généré par le mouvement d'un fluide généré par translation d'une surface par rapport à une autre, et celui de l'écoulement de Poiseuille généré par un gradient de pression.

Dans le cadre de cette thèse, l'écoulement de Couette-Poiseuille a été réalisé entre deux cylindres co-axiaux de rayons R_{int} et R_{ext} ($R_{\text{int}} < R_{\text{ext}}$) avec le cylindre interne tournant à une vitesse de rotation Ω par rapport au cylindre extérieur fixe. Le profil de vitesses dans l'espace annulaire résulte de la superposition d'un profil parabolique de Poiseuille ($\left(\frac{\partial P}{\partial \theta}\right) \text{ constant} \neq 0$) entre les deux plans constituant les surfaces des cylindres et du profil de Couette.

2.1.1.1 Ecoulement Couette

Dans le cas d'un écoulement de Couette entre deux cylindres coaxiaux et pour un faible espace annulaire, le profil de vitesses est donné par l'équation suivante:

$$V(r) = A + \frac{B}{r} \quad (1)$$

$$\text{avec } A = -\frac{R_{\text{int}}^2 \Omega}{R_{\text{ext}}^2 - R_{\text{int}}^2} \text{ et } B = -AR_{\text{ext}}^2$$

Avec Ω (rd/s) la vitesse de rotation du cylindre interne.

Le profil de vitesses d'un écoulement Couette est linéaire (figure 12b). Ceci implique qu'une particule est soumise au même gradient de vitesse (γ_p) quelle que soit sa position dans le fluide.

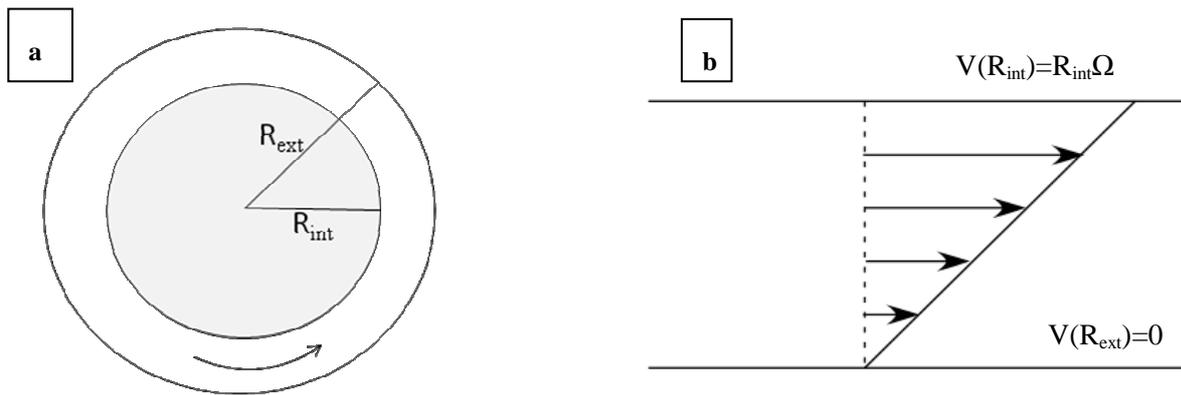


Figure 12 : (a) Géométrie de l'écoulement de Couette. (b) Profil de vitesses dans un écoulement Couette.

Le gradient de vitesses est exprimé par:

$$\gamma_p = R_{int} \Omega / e \quad (2)$$

Avec $e=(R_{ext}-R_{int})$ l'espace annulaire (m).

Ici le gradient de vitesses est constant ; il permet de calculer facilement la force hydrodynamique à laquelle est soumise une particule dans l'entrefer du réacteur.

2.1.1.2 Ecoulement de Poiseuille ortho-radial

En ajoutant une entrée et une sortie le long d'une génératrice des cylindres au dispositif ci-dessus (figure 13), on obtient un écoulement de Poiseuille ortho-radial lorsque les deux cylindres sont immobiles (par opposition à l'écoulement de Poiseuille classique que l'on obtient entre deux plans parallèles). L'écoulement est généré par l'imposition contrôlée d'une différence de pression entre l'entrée et la sortie.

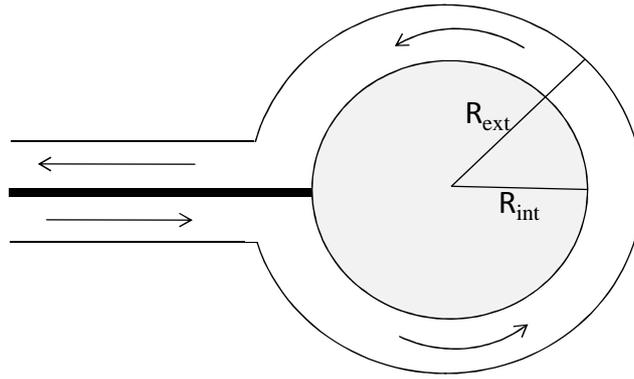


Figure 13 : Schéma de l'écoulement de Poiseuille.

Dans un espace annulaire tel que $e=R_{ext}-R_{int}$ et $e \ll (R_{ext}+R_{int})/2$, le profil de vitesses est exprimé par :

$$V(\xi) = 6V_m\xi(1-\xi) \quad (3)$$

avec $\xi = \frac{r - R_{int}}{R_{ext} - R_{int}}$ (position réduite) et V_m vitesse moyenne de l'écoulement.

Dans un tel écoulement le profil de vitesses est parabolique (Figure 14), chaque particule dans l'espace annulaire est soumise à un gradient de vitesses différent.

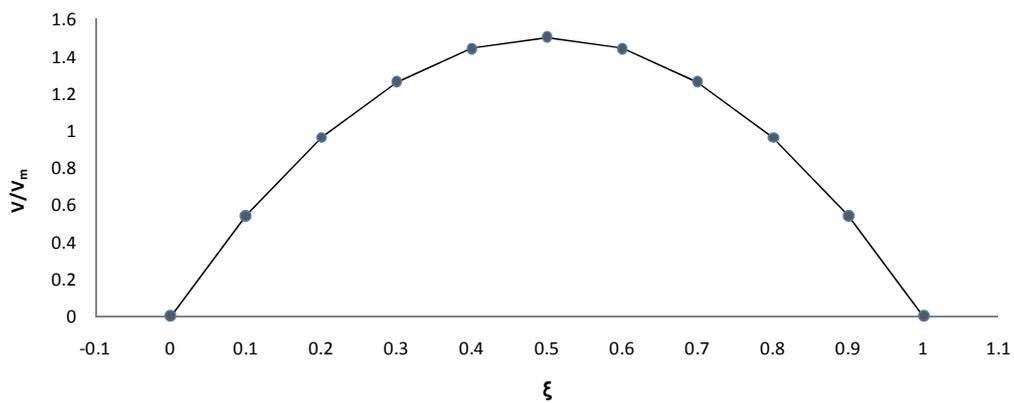


Figure 14 : Profil de vitesse dans un écoulement de Poiseuille.

La dérivation de l'équation (3) permet le calcul du gradient pariétal de vitesses exprimé par l'équation suivante :

$$\gamma_p = \frac{6V_m}{e} \quad (4)$$

2.1.1.3 Ecoulement de Couette-Poiseuille

La superposition des 2 écoulements décrits plus haut conduit à l'écoulement de Couette-Poiseuille qui est fonction des conditions opératoires adoptées (vitesse de rotation et débit d'injection) où différents types d'écoulement peuvent se produire entre les deux cylindres concentriques. Afin de déterminer le type d'écoulement dans notre réacteur, deux paramètres adimensionnels doivent être définis :

- Le nombre de Reynolds:

$$Re = \frac{Ve}{\nu}$$

où $V=R_{int} \Omega$ ($m.s^{-1}$) est la vitesse linéaire du cylindre interne, $e=(R_{ext}-R_{int})$ l'espace entre les deux cylindres et ν est la viscosité cinématique du fluide ($m^2.s^{-1}$).

- Le nombre de Taylor qui correspond à une combinaison du nombre de Reynolds et d'un facteur géométrique. Ce nombre est donné par la relation suivante:

$$Ta = Re(e/R_{int})^{1/2}$$

La stabilité marginale de cet écoulement a été étudiée par Chandrasekhar (1996) qui établit, par une approche asymptotique, l'expression du nombre de Taylor critique pour des rapports $(V_q/R_{int}\Omega)$ supérieurs à 3 :

$$T_c = \frac{11.36}{\frac{V_q}{R_{int}\Omega} - \frac{1}{2}}$$

avec V_q la vitesse débitante dans le réacteur.

Pour des rapports $V_q/R_{int}\Omega < 3$ et plus précisément $(0.1 < V_q/R_{int}\Omega < 3)$ S. Skali-Lami (1991) donne une expression du nombre de Taylor sous la forme :

$$T_c = \frac{25.6}{\left(\frac{V_q}{R_{int}\Omega}\right)^{0.63}}$$

Le profil de vitesses de l'écoulement dans le cas général résultant de la superposition de celui de Couette et de celui de Poiseuille (équations 1 et 3) permet d'établir l'équation suivante :

$$V(\xi) = 6V_m \xi(1-\xi) + \frac{R_{int}\Omega}{e(R_{ext} + R_{int}) \left[\frac{R_{ext}^2}{e\xi + R_{int}} - (e\xi + R_{int}) \right]} \quad (5)$$

L'intégration de ce profil de vitesses conduit à l'expression de la vitesse débitante (V_q), (V_m étant la vitesse débitante de l'écoulement Poiseuille isolé) :

$$V_q = V_m + \frac{R_{int}\Omega}{2} \quad (6)$$

En introduisant ce terme dans l'équation 5, on obtient le profil adimensionnel de vitesses:

$$\frac{V(\xi)}{R_{int}\Omega} = (1-\xi) + 6\left(\frac{V_q}{R_{int}\Omega} - \frac{1}{2}\right)\xi(1-\xi) \quad (7)$$

En posant $\beta = \frac{V_q}{R_{int}\Omega}$, l'équation devient :

$$\frac{V(\xi)}{R_{int}\Omega} = (1-\xi) + 6\xi(1-\xi)\left(\beta - \frac{1}{2}\right) \quad (8)$$

Pour $\beta=1/2$, le deuxième terme dans l'équation 8 sera nul, ce qui correspond à un écoulement de poiseuille nul, et dans ce cas l'écoulement est strictement un écoulement Couette.

L'expression du gradient pariétal sur le cylindre extérieur ($\xi=1$) est obtenue par dérivation de l'équation 8 :

$$\gamma_p = R_{int}\Omega \left[1 - 6\left(\beta - \frac{1}{2}\right) \right] \frac{1}{e} \quad (9)$$

Le facteur β (rapport entre la vitesse débitante et la vitesse de rotation du cylindre interne) détermine le profil de vitesses et par suite le gradient de cisaillement appliqué. Dans cette thèse, nous avons utilisé deux configurations principales, $\beta=1/2$ et $\beta=1/3$. Pour $\beta=1/2$ nous avons un écoulement de Couette strict (vitesse d'écoulement maximale à la surface du cylindre interne et nulle à la surface du cylindre externe). L'expression du gradient de cisaillement devient :

$$\gamma = \frac{R_{\text{int}} \Omega}{e} \quad (10)$$

Le tableau 1 montre les débits correspondant aux taux de cisaillement appliqués dans ce cas.

Tableau 1 : Quelques mesures du taux de cisaillement avec les débits et vitesses de rotation du cylindre interne correspondants.

γ (s ⁻¹)	Ω (t/min)	Débit (L/h)
1	0.71	2.21
3	2.16	6.62
6	4.31	13.23
10	7.19	22.05
25	17.97	55.13

D'autre part, pour $\beta = 1/3$, la vitesse et le gradient de vitesses sont nuls sur la paroi extérieure. Cela signifie qu'aucun transport par convection n'a lieu vers cette paroi. Cette situation au niveau pariétal est l'équivalent d'une zone de stagnation (figure 15), mais avec un renouvellement du fluide loin de la paroi.

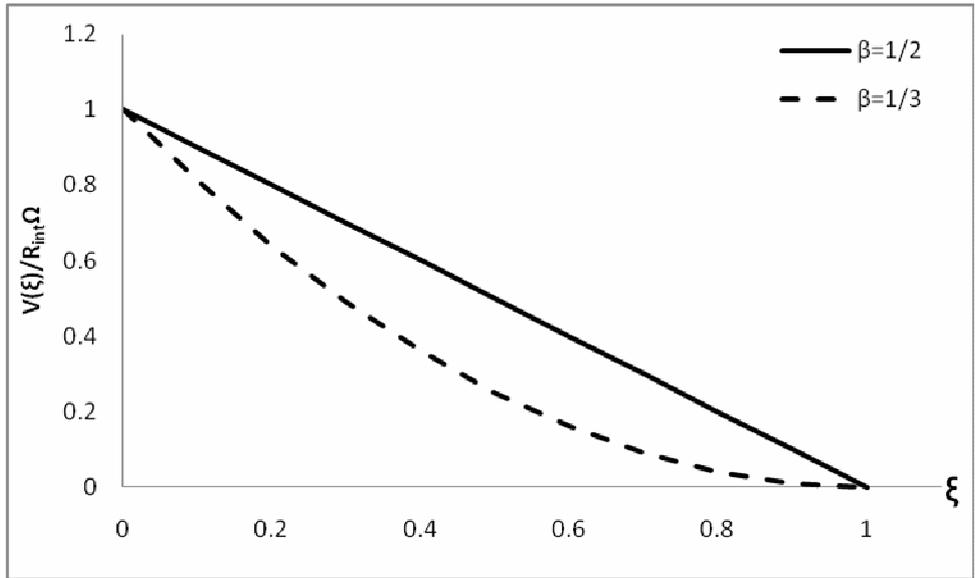


Figure 15 : Comparaison des profils de vitesses des écoulements pour $\beta = 1/3$ et $\beta = 1/2$.

D'autres profils de vitesses sont aussi possibles en variant β , résumés par le tableau 2 et la figure 16.

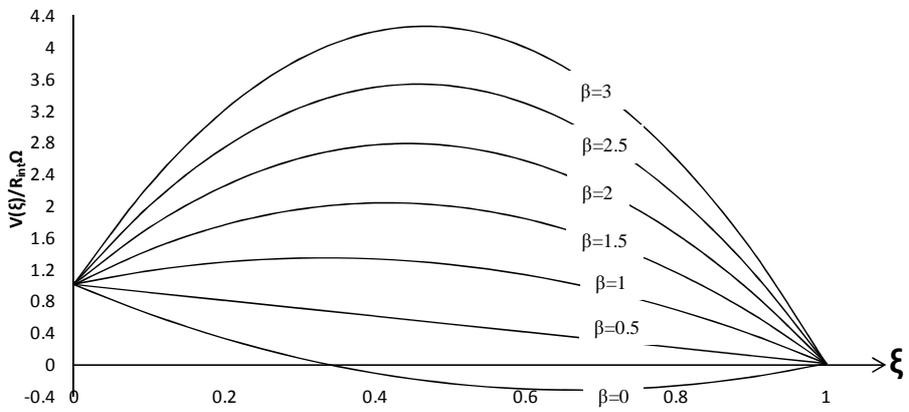


Figure 16 : Profils de vitesses des écoulements obtenus par variation du rapport de vitesse débitante sur vitesse de rotation du cylindre interne dans le réacteur Couette-Poiseuille (β).

Tableau 2 : Type d'écoulement en fonction de la valeur de β

	Mode d'écoulement
$\beta < 1/3$	Écoulement retour : Le liquide à proximité de la paroi extérieure se déplace en sens inverse de l'écoulement principal.
$1/3 < \beta < 1/2$	Régime compétitif : Le profil de vitesse est compris entre le profil de vitesses d'un écoulement de Couette et un profil à la limite de l'écoulement retour
$1/2 < \beta$	Écoulement de Poiseuille dominant : La vitesse débitante est grande par rapport à la vitesse de rotation du cylindre

L'utilisation du réacteur Couette-Poiseuille permet alors d'étudier le développement des biofilms sous différentes configurations d'écoulement, offrant ainsi une large gamme de conditions hydrodynamiques en faisant varier le rapport de la vitesse de rotation du cylindre sur la vitesse débitante.

2.1.2 Dispositif expérimental

Le réacteur Couette-Poiseuille utilisé pour étudier le développement des biofilms dans des conditions contrôlées d'écoulement et de cisaillement a été fabriqué aux ateliers du Laboratoire d'Énergétique et de Mécanique Théorique et Appliquée (LEMTA).

Il est constitué de deux cylindres concentriques en polychlorure de vinyle (PVC), espacés de 3.5 mm (figure 17). Le cylindre extérieur de rayon 5cm et de hauteur 10 cm est statique et porte 16 coupons de prélèvement de 16mm de diamètre. La surface concave de ceux-ci est ajustée pour s'adapter à la forme du cylindre extérieur. Le cylindre interne est plein et entraîné par un moteur à vitesse réglable (Dunkermotoren, Germany) de façon à contrôler sa vitesse de rotation autour de son axe. A l'entrée du réacteur, un divergent est installé pour assurer une distribution homogène du liquide entrant sur toute la hauteur du réacteur.

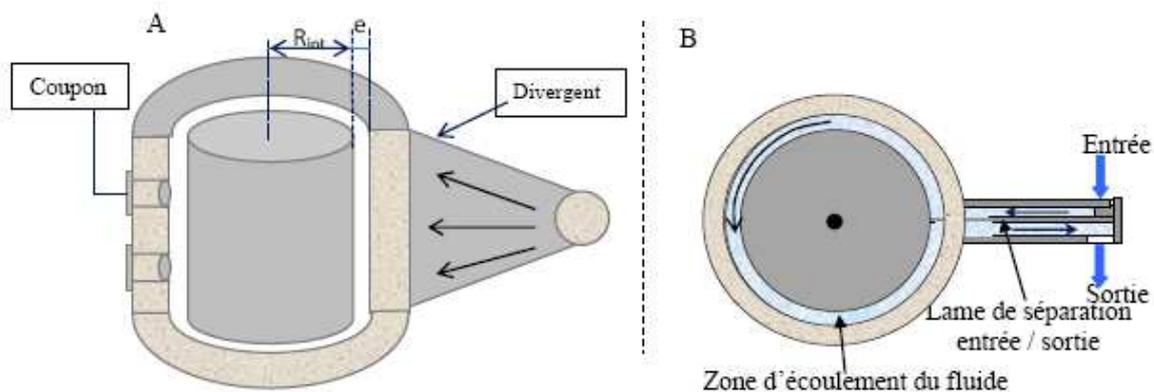


Figure 17 : Coupe longitudinale (A) et transversale (B) du réacteur Couette-Poiseuille.

Comme nous l'avons vu ci-dessus, ce réacteur permet d'obtenir différents profils de vitesses par simple variation du débit du fluide et de la vitesse de rotation du cylindre interne. La première configuration utilisée est celle d'un écoulement Couette strict ($\beta=1/2$) avec des gradients de cisaillement de 1 et 6 s^{-1} qui correspondent respectivement à des débits de 2.21 et 13.23 L/h. Dans ces conditions, le nombre de Reynolds est respectivement de 12.27 et 73.59 pour les gradients 1 et 6 s^{-1} ce qui donne un écoulement laminaire pour les deux gradients.

Le but de l'application de la deuxième configuration ($\beta=1/3$) est d'essayer de ralentir le plus possible le développement du biofilm sur la surface des coupons. Les mêmes vitesses de rotation correspondant aux 1 et 6 s^{-1} sont appliquées dans cette configuration. Les débits pour les gradients 1 et 6 s^{-1} (pour $\beta=1/3$) sont respectivement de 1.47 et 8.82 L/h et les nombres de Reynolds correspondant sont respectivement 4.08 et 24.5.

2.1.3 Montage expérimental

Un volume de 15 litres d'eaux usées, versé dans une cuve carrée en plexiglas de 25 cm d'arrête, constitue le réservoir d'alimentation du réacteur. L'eau dans la cuve est maintenue sous agitation par un agitateur tournant à une vitesse de 150 tours/minutes à l'aide d'une palette repliable en polypropylène de diamètre 98.5 mm, et dont la longueur d'axe est de 350 mm et de diamètre de l'axe 8mm (VWR 442-2121). L'eau est pompée de la cuve à l'intérieur du réacteur à l'aide d'une pompe immergée à débit réglable (Fisher W75601) lequel est

déterminé en fonction du taux de cisaillement appliqué dans chaque expérience ($1s^{-1}$ et $6s^{-1}$) (figure 18).

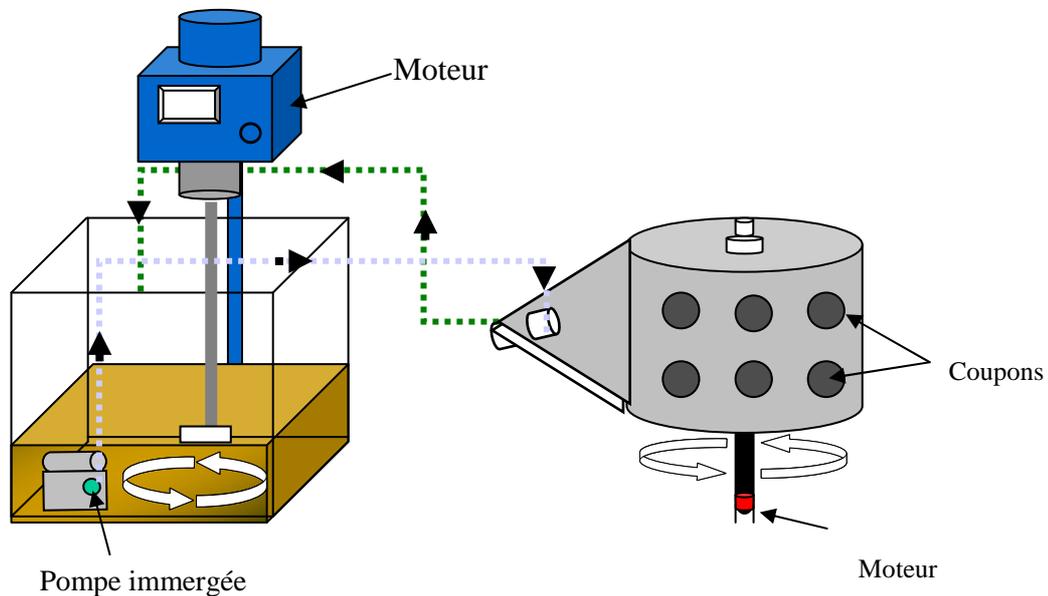


Figure 18 : Schéma du montage expérimental pour la croissance des biofilms.

Les tuyaux d'alimentation et de recirculation sont en polyuréthane (Legris 1025406K02) de 4 mm de diamètre interne. Le positionnement du tuyau de retour joue un grand rôle dans le contrôle du débit de l'eau pompée. En effet le réglage fin du débit correspondant à la vitesse de cisaillement appliquée est réalisé par l'ajustement de la hauteur de ce tuyau.

Pour maintenir la pression atmosphérique à l'intérieur du réacteur, une pipette en plastique a été introduite dans le couvercle du réacteur.

2.2 MISE EN MARCHÉ DU REACTEUR

Le déroulement des expériences a été limité à 5 jours puisque l'accès à la station d'épuration pour le prélèvement des eaux usées n'a pu avoir lieu en dehors des jours ouvrables. Le prélèvement a été quotidien et aucun stockage n'a été effectué pour éviter de modifier les caractéristiques des eaux usées et ainsi altérer les conditions de croissance du biofilm. Comme les eaux usées sont fortement chargées, le développement du biofilm a débuté rapidement

(12h après le démarrage de l'alimentation du réacteur), et après 5 jours d'expérience des biofilms épais (jusqu'à 300 μm) se sont développés à la surface des coupons.

2.2.1 Prélèvement d'eaux usées

Les eaux usées ont été prélevées à la station d'épuration de Maxéville-Nancy. Cette station a été mise en service en 1971, a une capacité de 600 000 Equivalents habitants (300 000 pour la filière urbaine et 300 000 pour la filière industrielle). Elle traite les eaux usées de toutes les communes de l'agglomération du Grand Nancy ainsi que les eaux usées industrielles des brasseries situées à Champigneulle à raison d'un débit de 93 000 m^3/jour .

A leur arrivée à la station, les eaux usées sont relevées par des vis sans fin (vis d'Archimède) et débarrassées de leurs gros déchets, sables et graisses, puis des matières en suspension dans des décanteurs lamellaires. Ensuite la pollution dissoute est éliminée par des bactéries qui se développent dans un réacteur de type Biolift. Ces bactéries forment des boues qui se déposent dans des clarificateurs et sont ainsi séparées de l'eau, qui, épurée, peut retourner après une déphosphatation physicochimique à la rivière (Meurthe).

Les eaux usées, nécessaires pour la réalisation des expériences, ont été prélevées au niveau du bassin C après les opérations de dégrillage, dessablage et déshuilage afin d'éviter que la graisse et les grosses particules de l'eau usée puissent colmater la pompe et les tuyaux du réacteur de croissance des biofilms.

2.2.2 Paramètres de suivi

Les eaux usées sont prélevées à l'aide d'une gamelle en plastique (bêcher en plastique de 1 L au bout d'un manche télescopique) et transportées au laboratoire dans un jerrican en polyéthylène de 20L. Elles sont renouvelées quotidiennement pendant une semaine pour assurer un apport suffisant en bactéries et nutriments pendant la durée de l'expérience. Le temps entre prélèvement des eaux usées et démarrage du réacteur, après renouvellement de la suspension bactérienne, est environ de 30 à 60 min.

Les caractéristiques physicochimiques des eaux usées ainsi que la densité bactérienne sont mesurées toutes les heures après renouvellement de l'eau du réacteur. Le pH, la conductivité, le potentiel redox et l'oxygène dissous, sont mesurés par un multiparamètre (WTW, Multiline F/SET), alors que la turbidité est évaluée par un appareil de type Hach 2100P.

La densité bactérienne dans les eaux usées est déterminée par un comptage sur cellule de Thomas (VWR 720-0150). La profondeur de la cellule est de 0,1 mm et son quadrillage est composé de 5 grands carrés avec le carré central divisé en 16 carrés qui sont à nouveau redivisés en 16 petits carrés. Chaque petit carré forme la zone de comptage qui a une surface de $25 \times 10^{-4} \text{ mm}^2$ (1 bactérie par champ $\equiv 4 \times 10^6$ bact/mL) (Figure 19).

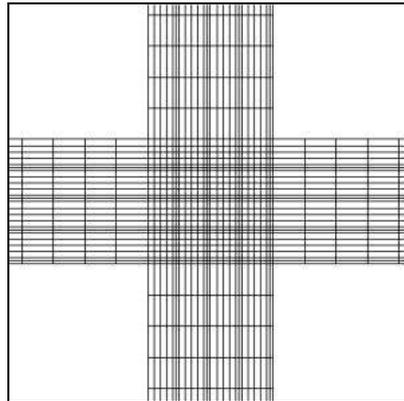


Figure 19 : Représentation du quadrillage de la cellule de Thomas.

Avant dénombrement, la suspension bactérienne est homogénéisée pendant 15 min en utilisant un vortex (Velp scientifica, zx3). Le comptage des bactéries a été effectué sur 15 à 20 zones différentes en utilisant un objectif $\times 40$. Pour avoir une numération correcte, il faut avoir entre 5 à 20 cellules bactériennes par champ de comptage (cas idéal). Une dilution des eaux usées a du être effectuée au préalable.

La densité N de l'inoculum (bactéries/ mL) est calculée en utilisant l'équation :

$$N = \frac{n}{x} \times (4 \times 10^6) = \bar{n} \times (4 \times 10^6)$$

n : nombre de bactéries comptées, x : nombre de carrés comptés (erreur = $1/\sqrt{x}$).

2.2.3 Prélèvement et stockage des coupons

L'inconvénient majeur du réacteur Couette-Poiseuille réside dans le prélèvement des coupons. En effet, le moteur doit être arrêté, et le réacteur vidé délicatement de façon à pouvoir retirer le coupon sans avoir une projection d'eau usée qui pourrait détacher le biofilm. Un tel

jaillissement pourrait décrocher les biofilms sur les coupons restants et ainsi changer la morphologie de ceux-ci.

Le deuxième inconvénient que présente ce réacteur est la formation d'un dépôt dans sa partie inférieure. Ce phénomène de dépôt a été remarqué au cours de la première expérience. Initialement, le suivi de développement du biofilm devait être étudié sur les deux séries de coupons inférieurs et supérieurs du réacteur. La quantité de dépôt s'est en fait avérée être beaucoup plus importante sur les coupons inférieurs en raison de la décantation d'une partie des matières en suspension. En conséquence, dans la suite des expériences, nous avons prélevé uniquement les coupons supérieurs du cylindre externe. De fait, le nombre de coupons a été réduit à 8 (à la place de 16), ce qui diminue du même coup le nombre de biofilms étudiés.

Dans la configuration $\beta=1/2$, deux expériences ont été réalisées pour chaque gradient étudié (1 et 6 s^{-1}). La première expérience a été réalisée pendant 5 jours ; le premier coupon a été prélevé 12h après le démarrage du réacteur puis les prélèvements ont été réalisés toutes les 24h. La durée de la deuxième expérience est de 24h, et les prélèvements sont effectués après une heure de mise en marche du réacteur pour le premier coupon puis à des intervalles de 5h pour les autres coupons.

Dans la configuration $\beta=1/3$, les expériences ont été réalisées pendant 5 jours ; le premier coupon est prélevé après 12h, puis les prélèvements sont effectués toutes les 24h.

Après récupération d'un coupon, l'excès d'eau est éliminé par égouttage en faisant très attention à ne pas perdre le biofilm. Le coupon est ensuite pesé et placé dans une petite boîte (partie contenant le biofilm vers le haut) contenant au fond quelques mL d'eau ultrapure de façon à saturer en vapeur d'eau la boîte et éviter le dessèchement du biofilm. La boîte est stockée en chambre froide à 4°C avant observation en microscopie confocale à balayage laser. L'observation est réalisée le plus tôt possible, en général 1 jour après le prélèvement des coupons afin de minimiser le temps d'évolution du biofilm. Quelques coupons (qui seront indiqués dans la suite) ont été observés une semaine après le prélèvement en raison de la non-disponibilité du microscope ; ces coupons ont révélé un développement de champignons et de microorganismes sur le biofilm observé.

2.3 LA MICROSCOPIE CONFOCALE

Les coupons obtenus dans les différentes expériences ont été observés par un microscope inversé Nikon TE 2000U Eclipse équipé d'une tête confocale Radiance 2100AGR-3Q Biorad et de 4 sources laser fournissant 7 longueurs d'onde d'excitation différentes.

2.3.1 Principe et généralités

La microscopie optique classique (épi-fluorescence) donne des images de résolution limitée et peu contrastées puisque l'éclairage du champ d'observation se fait sur toute l'épaisseur de l'échantillon. Ainsi l'image obtenue rassemble l'ensemble des photons issus de l'échantillon et de points situés en dehors du plan focal. On observe de plus une perte de résolution, en particulier dans la direction de l'axe optique (z), qui provient de la collection des photons émis par les plans au voisinage du plan focal. Par ailleurs, lorsque l'échantillon est incliné par rapport à l'objectif, seule une partie de l'objet est nette dans l'image.

Le principe de la microscopie confocale (CLSM), illustré dans la figure 20, a permis de résoudre ces différents problèmes. La surface de l'échantillon est éclairée par un faisceau laser, et la fluorescence et la lumière parasite de rétro-diffusion sont ensuite réfléchies par un miroir dichroïque. Avant d'atteindre le détecteur (tube photomultiplicateur), le faisceau lumineux passe par un diaphragme ajustable, appelé « pinhole », au niveau du foyer arrière de l'objectif (plan focal conjugué au plan focal de l'objectif), placé devant le détecteur. Ce diaphragme permet la sélection des photons arrivant au détecteur et seuls les photons participant à la formation de l'image de l'échantillon sont récupérés (Földes-Papp *et al.*, 2003). Ceci permet d'augmenter la résolution de l'image obtenue, d'éliminer les signaux provenant des régions défocalisées, d'éliminer le bruit de fond provenant de la dispersion de la lumière à travers l'échantillon, d'optimiser le rapport signal/bruit, et permet l'acquisition des images en 2D et 3D qui pourront faire l'objet d'une reconstruction 3D (Halbhuber et König, 2003).

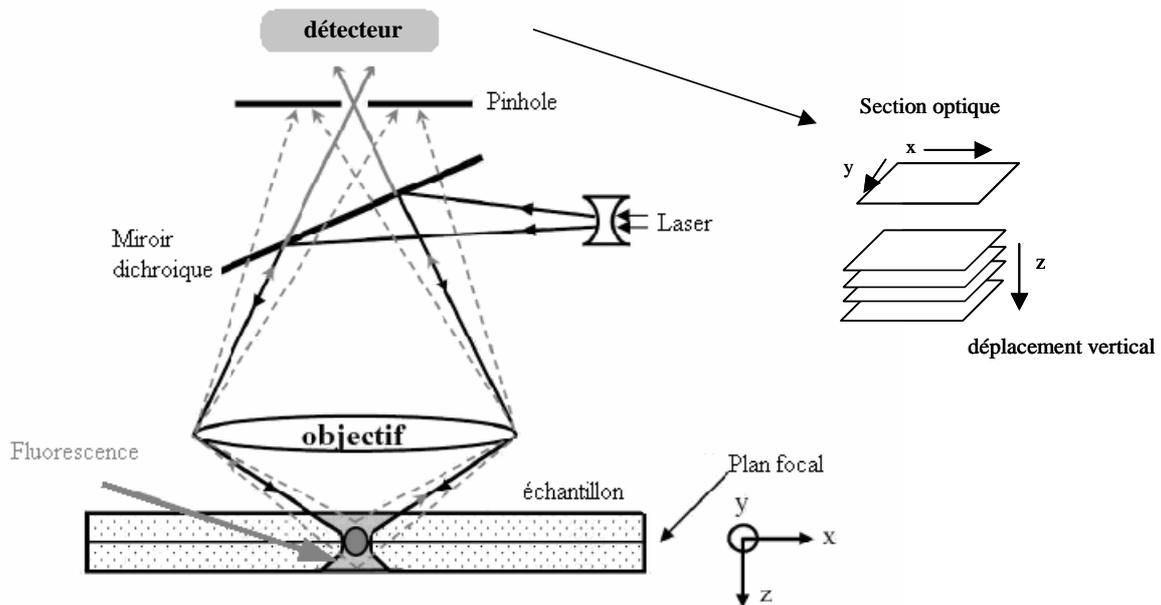


Figure 20 : Schéma du principe du microscope confocal

Un avantage important de l'emploi du microscope confocal à balayage est de pouvoir se déplacer en z d'un pas défini constant dz , et à chaque avancée d'un pas, une image xy est enregistrée dans la mémoire de l'ordinateur. En fin d'acquisition, une pile de sections optiques (images xy) espacées de dz est obtenue, la somme des projections des images xy donne une image globale 2D. D'autre part, un fichier numérique contenant des images de dimension x y z est également stocké.

2.3.2 Préparation des échantillons

Avant d'observer les biofilms au CLSM, ces derniers sont colorés par un fluorochrome. L'acridine orange, utilisée dans notre étude, est un fluorochrome à longueur d'onde d'excitation et d'émission spécifique du marquage des acides nucléiques (ADN et ARN) ainsi que des exopolymères extracellulaires (Wirtanen *et al.*, 2001 ; Jana-Sur and Chakraborty, 2005). L'acridine orange se comporte différemment vis à vis de l'ADN et de l'ARN. En présence d'ADN qui est une double hélice comprenant deux brins de nucléotides, l'acridine orange s'intercale entre les deux brins et cette nouvelle forme une fois excitée émet dans le vert avec un maximum de 530 nm. En présence d'ARN qui est constitué d'un simple brin, une liaison électrostatique (condensation) prend place entre l'acridine orange et les nucléotides présents sur le brin, la nouvelle forme émettant alors dans le rouge avec un maximum à 640 nm (Frenster, 1971 ; Lauretti *et al.*, 2003 ; Darzynkiewicz, 1990). L'acridine orange a

également été utilisée pour l'identification des acides mucopolysaccharides et des protéines glycosylées (Saunders, 1964 ; Hichs and Matthaei, 1958) ainsi que les protéines formant les endospores (Schichnes *et al.*, 2006).

Pour réaliser cette coloration, l'acridine orange est déposée sur l'échantillon de biofilm placé sur le coupon à l'aide d'une micropipette de 100µL ; le coupon est remué doucement pour disperser le colorant sur la totalité de la surface, puis il est placé à l'obscurité pendant 20 à 30 min pour la fixation de l'acridine sur le biofilm. Pour éliminer l'excès de fluorochrome, le coupon est trempé dans de l'eau ultra pure à plusieurs reprises jusqu'à élimination de l'excès d'acridine. Comme le montre la figure 21, le coupon est ensuite placé sur un dispositif comprenant une lame en quartz contenant de l'eau ultrapure pour maintenir l'hydratation de l'échantillon. Les observations en microscopie confocale sont réalisées avec les objectifs x4 et x20 (figure 21).

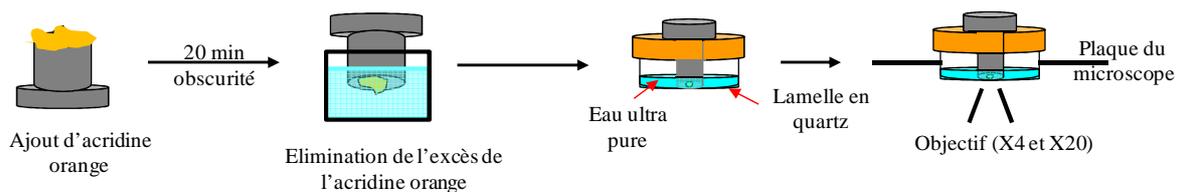


Figure 21 : Schéma descriptif du dispositif d'installation de l'échantillon sur la platine du microscope

Durant le balayage des échantillons par confocal, le mode « Lambda-Strobing » a été utilisé. Ce mode consiste à exciter ligne par ligne l'échantillon afin de minimiser l'interférence des plans voisins « bleed-through ». Par ailleurs, le microscope confocal a été placé sur une table pneumatique anti-vibration de façon à réduire au maximum toute action mécanique pouvant s'exercer sur le biofilm. Les piles d'images (512x512 pixel²) sont générées par le logiciel accompagnant le microscope confocal (LaserSharp2000TM software Bio-Rad Cell Science Division).

Bien que les bords aient également été observés, l'acquisition des images a essentiellement été effectuée sur la partie centrale du coupon. En fonction de la répartition spatiale du biofilm sur le coupon, 3 à 4 images (objectif x4) et 4 à 6 images (objectif x20) ont été acquises par coupon et destinées ultérieurement au traitement d'image.

2.4 TRAITEMENT D'IMAGES

Malgré les nombreux avantages de la microscopie confocale, les images acquises sont parfois bruitées et présentent le plus souvent des régions floues (blurred en anglais) surtout à cause de la fluorescence interférente de la surface du coupon dans notre cas. Une ou plusieurs étapes de traitement des images sont donc nécessaires pour améliorer la résolution (éliminer le bruit de fond). Ces traitements visent à atténuer le bruit mesuré sur le détecteur, à améliorer la résolution par élimination des régions défocalisées (**debluring**) et à diminuer le rapport signal/bruit afin de pouvoir effectuer une reconstruction 3D de qualité et réaliser les analyses quantitatives sans interférence.

Différents logiciels ont été mis en œuvre pour l'amélioration de la résolution des images (figure 22).

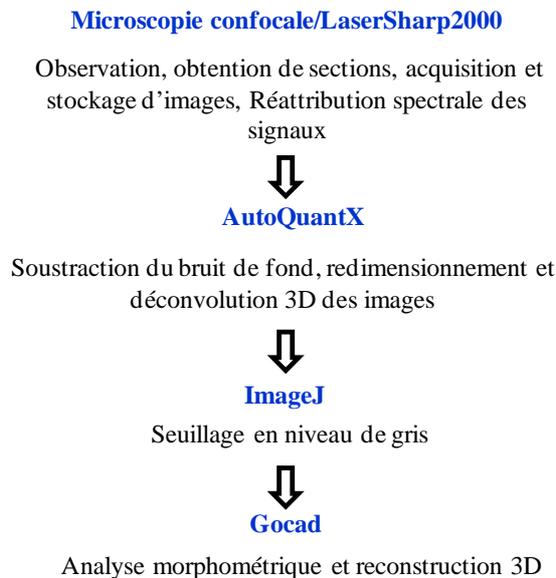


Figure 22 : Organigramme du traitement d'images.

2.4.1 LaserSharp 2000TM (Bio-Rad Cell Science Division)

Ce logiciel est le logiciel accompagnant le microscope confocal. Dans un premier temps il permet l'acquisition des piles d'images lors de l'observation des échantillons. Il permet ensuite l'ouverture directe des fichiers contenant les piles d'images sur un autre ordinateur, et l'obtention des dimensions de l'image, le nombre de coupes et le *spacing* (distance entre deux

coupes dz). Ce logiciel permet aussi la réattribution spectrale des signaux de fluorescence en appliquant un algorithme de calcul représenté par la fonction « Reassignement ». L'application de cet algorithme permet l'amélioration de la séparation des canaux de fluorescences émises par les bactéries et les exopolymères ainsi que par le support.

2.4.2 AutoquantX-Autodeblur

En imagerie des systèmes optiques, l'image d'un point est une réponse impulsionnelle qui correspond à une fonction bidimensionnelle appelée fonction d'étalement du point ou « Point Spread Function, PSF ». La somme de ces PSF formera alors l'image.

La résolution est limitée par cette fonction d'étalement qui est la description mathématique du disque d'Airy (tache de diffraction) obtenue à partir de chaque point de l'échantillon. L'image est alors la convolution entre ce point lumineux (parfait dans l'absolu) et le système optique dans son ensemble. Comme l'illustre la figure 23, grâce au plan focal (sténopé) utilisé en microscopie confocale la résolution est meilleure que celle obtenue par microscopie conventionnelle (Héliot, 2005).

Même si la résolution est meilleure, les images obtenues ne donnent néanmoins qu'une connaissance approximative de la PSF et présentent plusieurs aberrations en particulier l'élongation au niveau de l'axe vertical (Z). Pour pouvoir établir des calculs quantitatifs à partir des images, il est impératif d'éliminer ou d'atténuer ces défauts. La déconvolution est un moyen de traitement d'image appliquant différents types d'algorithme (Chomik *et al.*, 1997, Holmes, 1988).

En général, les algorithmes appliqués dans la déconvolution 3D se basent sur la PSF comme paramètre essentiel. Comme les informations concernant la PSF dans les images acquises par microscopie confocale sont limitées, l'emploi d'un algorithme ne nécessitant pas la PSF comme paramètre de base est plus intéressant.

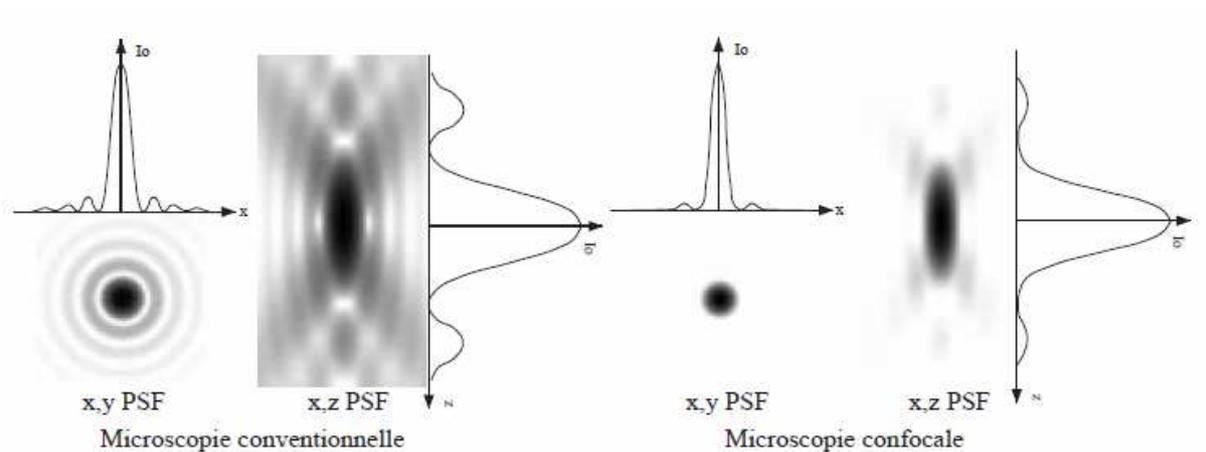


Figure 23 : Comparaison des fonctions d'étalement du point en microscopie conventionnelle (à gauche) et confocale (à droite). L'intensité de lumière est représentée négativement (en sombre). (*Base de la microscopie confocale, Bordeaux 2005*).

La méthode de déconvolution utilisée dans cette thèse est la « Blind deconvolution » qui met en œuvre un algorithme présentant l'avantage de s'adapter à la PSF réelle du microscope qui peut être significativement différente de la PSF théorique et de la PSF mesurée. En conséquence, le logiciel utilise une PSF adaptative avec un certain nombre d'itérations, les fluorescences parasites étant alors automatiquement éliminées et les images ainsi restaurées ne possédant que des valeurs positives et un meilleur rapport signal/bruit. Cette méthode comporte aussi des algorithmes itératifs et contraints se basant sur la statistique de voisinage local (local neighbourhood statistics), ce qui exige une connaissance préalable de la corrélation que partage un pixel avec son voisin (Razaz et Nicholson, 2000).

En général, la pile d'images est redimensionnée par ré-échantillonnage (Resize), et de nouvelles images intermédiaires sont créées. Ceci permet d'avoir un « spacing » (dz), pas entre deux sections optiques consécutives, plus petit que le pas résolu qui est fixé normalement avant l'acquisition des images par CLSM. Quand le pas en z fixé avant déconvolution est inférieur à $\frac{1}{2}$ du pas réel, on obtient une meilleure résolution spatiale et la restauration des coupes optiques est améliorée.

Le logiciel que nous avons utilisé est *AutoquantX-Autodeblur* (MediaCybernetics, Version X1.4.1). Ce logiciel a permis l'amélioration de la résolution et la correction des distorsions (deblurring) de l'image (Razaz et Nicholson, 2000, Landmann, 2002, Holmes, 1988).

L'emploi de *AutoquantX-Autodeblur* a permis de réaliser les différentes étapes suivantes :

- 1 - Une amélioration du rapport signal/bruit grâce à l'application d'un filtrage de l'arrière plan « Background subtraction ». Ainsi, toute zone contenant une quantité de bruit importante et un nombre de données minimal est sélectionnée, et un algorithme de calcul est appliqué. Celui-ci élimine tous les points possédant des intensités égales ou inférieures à ceux qui se trouvent dans la région choisie.
- 2 - Un re-dimensionnement de l'image « Resize »: des coupes intermédiaires sont intercalées dans la pile d'images obtenue afin d'obtenir un pas en Z inférieur au pas résolu (fixé par l'appareil) ce qui entraîne une déconvolution plus efficace. En général, ce facteur ne doit pas dépasser 2 car si le pas fixé Z est inférieur à ½ du pas réel, on obtient une meilleure résolution spatiale et la restauration des coupes optiques est améliorée.
- 3 - Une déconvolution 3D: cette déconvolution 3D peut se faire sur chaque canal particulier ou sur l'ensemble de l'image comprenant les 3 canaux mais dans ce dernier cas, l'opération prendra plus de temps. Le temps de déconvolution dépend du nombre de coupes et de la quantité de données qui se trouve dans l'image. La PSF adaptative utilisée comprend 30 itérations de déconvolution avec une suppression moyenne du bruit et un traitement bloc à bloc activé (*Z montage*) si le nombre de coupes optiques est supérieur à 100.
- 4 - Un enregistrement des piles d'images déconvoluées 32 bits au format *.raw* et *.ipl*

Les étapes concernant la soustraction de l'arrière plan, le resize et la déconvolution sont effectuées sur l'ensemble des piles d'images, mais pour l'étape de sauvegarde, chaque canal est sauvegardé à part. Trois fichiers numériques sont donc finalement obtenus. Chaque fichier renferme une pile d'images se rapportant à chaque canal (bactéries, exopolymères et coupon). Ceci constitue une étape primordiale pour l'application des traitements d'image ultérieurs car ils seront réalisés séparément sur chaque canal.

Cette première étape de traitement d'image prend de 1 à 3h selon l'épaisseur du biofilm et de sa surface. L'image d'un biofilm de 100 μm d'épaisseur nécessite environ 2h de déconvolution.

La figure 24 donne un exemple du résultat de la déconvolution 3D d'une image obtenue au microscope confocal avec un grandissement x20. L'image montre que le bruit de fond est bien atténué, le contour du biofilm est mieux visible, et en conséquence les informations numériques de l'image sont plus précises ce qui permettra une meilleure quantification des caractéristiques morphométriques dans les traitements ultérieurs.

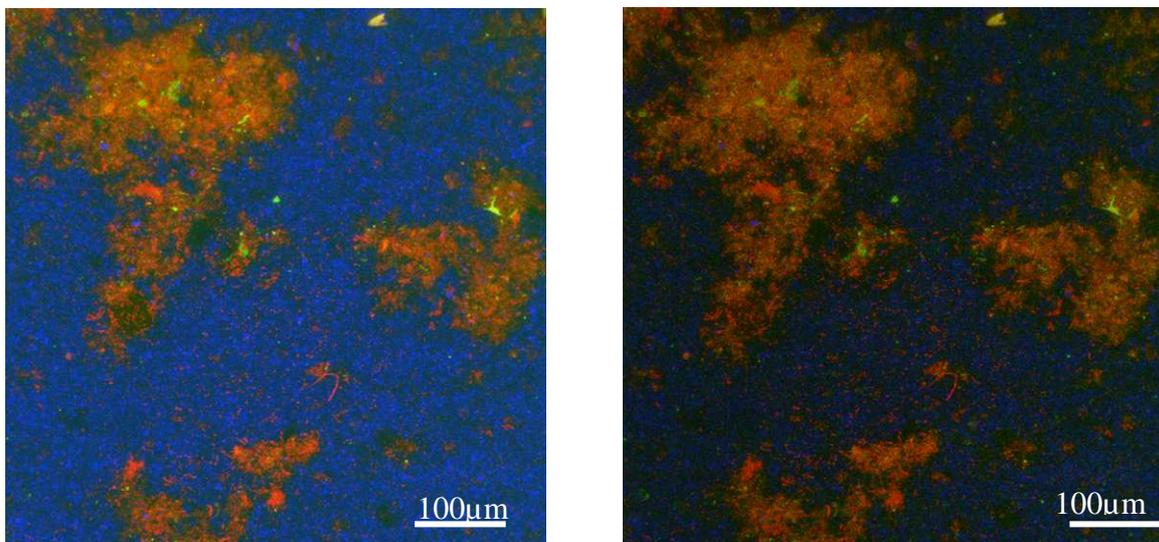


Figure 24 : Image obtenue par microscopie confocale (à gauche) et résultat du traitement de l'image par l'intermédiaire d'AutoquantX-Autodeblur (à droite).

2.4.3 Image J

Les images déconvoluées subissent un seuillage (thresholding) et une binarisation (Binary). Cette étape est réalisée par l'intermédiaire du logiciel Image J (MacBiophotonics), développé en langage *Java* par le NIH « National Institute of Mental Health » à Bethesda, Maryland – USA.

La binarisation est le processus de conversion d'une image signal non idéale en une image binaire idéale. Elle consiste à appliquer un algorithme de calcul qui répartira les pixels en deux classes noir et blanc. En particulier, elle donne la valeur 1 aux structures qui vérifient les critères sélectionnés et 0 aux autres, 0 étant pour le groupe présentant le fond de l'image

(groupe blanc) et 1 pour les pixels appartenant à l'image (groupe noir). Une fois l'image binaire obtenue plusieurs analyses et calculs peuvent être appliqués (Chehikian, 1989). Le résultat du seuillage est une image binaire contenant des pixels noirs et blancs, d'où le terme de *binarisation*.

Le seuillage en niveaux de gris de l'image consiste alors à fixer un intervalle de valeurs où tous les pixels ayant une valeur plus petite que la borne inférieure de l'intervalle seront remis à zéro et seront considérés comme faisant partie du fond de l'image, alors que les pixels appartenant à l'intervalle sélectionné seront considérés comme constituants de l'image. Il faut faire attention au choix de cet intervalle, un seuillage faible risque de garder des pixels qui ne font pas partie de l'image ce qui donne du bruit de fond ; en revanche, un seuillage fort peut éliminer des données appartenant à l'objet.

La figure 25 illustre la binarisation et le seuillage effectués sur une section optique (numéro 55) d'une image de biofilm comprenant 120 coupes.

Application du logiciel Image J

Les piles d'image sont chargées en niveaux de gris et transformées en 8-bits à la place de 32-bits. Les propriétés x, y et z sont ensuite ajustées suivant les valeurs obtenues après le redimensionnement. Un seuillage binaire est ensuite appliqué, le résultat étant une image binaire à deux classes noir et blanc. Un algorithme morphologique d'érosion est appliqué. L'érosion consiste à définir un élément structurant X original qui est un pixel avec le nombre de points l'entourant à une distance symétrique. Tout pixel de l'image ne respectant pas l'élément structurant X sera éliminé par érosion. L'érosion ne préserve pas la connexité par contre la dilatation la préserve si l'élément structurant est connexe.

Une fois l'érosion appliquée, la nouvelle image est comparée avec l'image brute afin d'éviter la suppression de pixels correspondant au biofilm lors du seuillage. Après le traitement avec Image J, la pile d'images obtenue sera un ensemble de n fichiers (n= nombre de coupes) qui seront sauvegardés individuellement. Le plugin « Gocad writer », développé par Christian Mustin (LIMOS-FST/UHP-CNRS 7137), permet l'enregistrement automatique de ces fichiers ainsi que la conversion des images en fichiers sous format (.vs) « point set » adéquats pour le chargement de données sur « Gocad® ». Grâce à « Gocad writer » le temps de traitement d'image par Image J est passé d'une demi-journée à environ 1h par image/par canal.

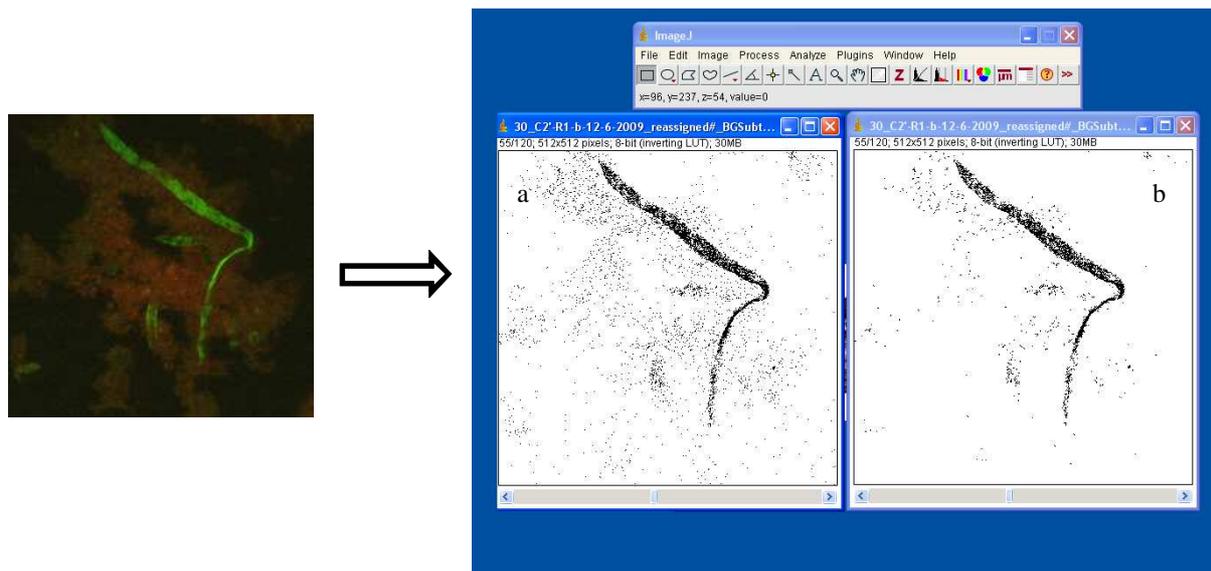


Figure 25 : A gauche : Image de biofilm après déconvolution (120 coupes) ; A droite : Impression d'écran montrant le logiciel Image J avec la barre d'outils en haut de l'écran avec a) image seuillée et binarisée b) image seuillée binarisée et érodée de la coupe 55 de la pile de sections optiques correspondants à l'image à gauche.

2.4.4 Gocad®

Le traitement d'image décrit précédemment n'est en fait qu'une étape préparatoire permettant d'améliorer et de définir les données contenues dans les images des biofilms acquises par microscopie confocale. L'objectif final est d'effectuer une reconstruction 3D du biofilm permettant une analyse morphométrique de celui-ci. Cette étape a été réalisée grâce au logiciel « Gocad® ».

Gocad® est un logiciel développé à l'Ecole Nationale Supérieure de Géologie de Nancy (ENSG-France). Il est utilisé principalement par les compagnies pétrolières, minières et les universités. Gocad® est un géomodeleur qui définit des fonctionnalités pour la représentation 3D d'objets. Il est programmé en langage C et C++ permettant l'application de plusieurs opérations et algorithmes définissant différents paramètres et propriétés de l'objet reconstruit. Par rapport à un système bien défini, un système naturel présente généralement de nombreuses contraintes telles que des discontinuités dans la structure, des trous, des zones découpées, une structure tourmentée, etc... (Moyen, 2005). Gocad®, grâce aux modèles et aux opérations qu'il contient, peut créer des modèles représentatifs d'un système naturel en

tenant compte de toutes ces contraintes. L'objet sera représenté par un ensemble de nœuds (points) interconnectés dont chacun possède des coordonnées x , y et z dans l'espace. Un modèle peut être représenté sous forme continue ou discrète. Le modèle continu est mal adapté pour les systèmes naturels comprenant des trous ou des discontinuités dans la structure (Moyen, 2005). Le modèle discret nécessite un maillage (schéma topologique) qui relie les éléments de l'objet entre eux. Selon les critères de présentation de l'objet, le maillage peut être structuré ou non structuré. Dans le maillage structuré, à l'inverse du maillage non structuré, des motifs répétitifs sont créés et les connections entre les nœuds suivent des règles bien déterminées. Le maillage volumique dépend de deux critères : la façon dont les nœuds sont connectés et la position des nœuds (géométrie) dans la structure 3D. Le maillage structuré comprend deux représentations, la grille régulière (voxet) et la grille irrégulière (Sgrid) (figure 26). Dans notre étude, nous nous sommes basés sur le maillage en grille régulière. Le voxet représente alors le volume dans lequel les sections optiques 2D sont classées et le voxel représentera l'unité de base pour effectuer le traitement. Dans ce cas, le voxel sera l'équivalent du pixel et correspondra à l'unité volumique du pixel.

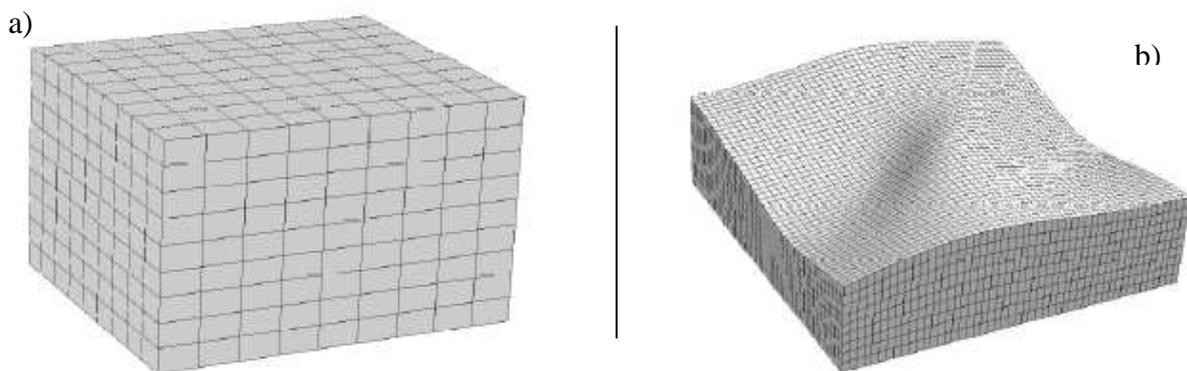


Figure 26 : a) Exemple de maillage structuré régulier (Voxet), b) maillage structuré irrégulier (Sgrid) (Moyen, 2005).

Le voxet se présente alors comme une grille cartésienne dans laquelle les volumes sont représentés sous forme d'ensemble de cubes ou de parallélépipèdes élémentaires (figure 26a) qui s'empilent suivant les trois axes. L'espace dans la mémoire de l'ordinateur occupé par ces objets est faible. En revanche, ce type de grille ne possède aucune souplesse lors de

l'accommodation des objets de formes complexes. Ces objets présentent l'inconvénient d'occuper des volumes très importants en mémoire.

Application de Gocad®

La première étape consiste à charger les fichiers « .vs » générés par Image J et correspondant à chaque canal dans Gocad. L'ensemble des points formant ainsi chaque canal est donc affiché et une propriété correspondante à chaque canal est créée. Une grille régulière « voxet » est alors créée dans laquelle les sections optiques 2D seront classées. Les dimensions de la grille correspondent normalement aux dimensions de l'image données en u, v et w qui sont respectivement 512, 512 et le nombre de coupes. Afin de diminuer la taille du fichier, une modification (réduction) de ces dimensions est possible mais ceci est déconseillé car la résolution peut diminuer fortement si la taille est trop réduite, ce qui peut influencer les calculs ultérieurs.

L'utilisation de l'acridine orange comme fluorochrome lors des acquisitions par le CLSM a permis de collecter séparément les fluorescences émises par les bactéries et celles émises par les EPS. Ceci permet de définir des voxets et des propriétés bien différents pour les bactéries et pour les EPS. Les cellules bactériennes et les molécules des exopolymères seront représentées sous forme parallélépipède. De plus les voxels « bactéries » seront désignés par la couleur verte et les voxels « EPS » par la couleur rouge (figure 27).

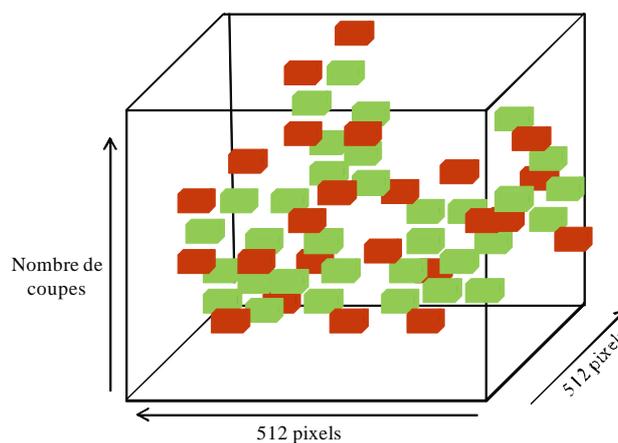


Figure 27 : Représentation schématique du voxel contenant l'unité structurale le voxel (petits parallélépipèdes : rouge = EPS et vert=bactéries).

Pour le calcul des caractéristiques du biofilm, sa densité, son volume, son épaisseur, la co-localisation bactéries/exopolymères, la distribution des bactéries et des EPS dans le biofilm,

des programmes en langage C « Script » correspondant ont été développés par Guillaume Caumon (Ecole Nationale Supérieure de Géologie de Nancy-ENSG-France). Ces scripts sont appliqués sur l'objet (voxet) ou plus précisément sur les propriétés contenues dans le voxet (bactéries et EPS). Avant d'utiliser un script, il est important de lire attentivement son contenu pour donner aux nouvelles propriétés créées le même nom que celui qui figure dans le script de façon à pouvoir stocker et visualiser le paramètre calculé. Dans notre cas la propriété bactérie est nommée « vert » et celle des EPS est appelée « rouge ».

Les différents scripts appliqués sont:

1/ Erosion/dilatation: L'image binaire issue du traitement par Image J contient des voxels (pixels) isolés qui peuvent gêner la quantification des voxels appartenant au biofilm. Un filtrage par des séries de dilatation et d'érosion est donc effectué sur les données binaires dans le voxet. Cette étape consiste à ajouter (cas de la dilatation) ou à supprimer (cas de l'érosion) un voxel donné en se basant sur le nombre de ces voisins. La dilatation convertit un voxel du fond de l'image (en contact avec les voxels du biofilm) en un voxel du biofilm (foreground). En revanche, l'érosion transforme un voxel du biofilm (en contact avec les voxels du fond de l'image) en un voxel du fond de l'image. La difficulté de ce type de filtrage réside dans l'ordre de l'application de la dilatation et de l'érosion, et dans le choix des voxels à ajouter ou à supprimer.

Pour effectuer cette commande de dilatation/érosion, un script (cf. annexe) a été développé qui tient compte d'une part des 26 voxels entourant le voxel d'intérêt, et d'autre part, de la connexion 3D entre les sections d'images d'une pile donnée. La mise au point de ce script sur une série d'images de biofilm a abouti à l'application d'un cycle de dilatation suivi par deux cycles d'érosion sur une image donnée. La dilatation et l'érosion ont été appliquées en prenant en compte, respectivement au moins 22 et 25 voxels de voisinage. Ce nombre varie suivant l'épaisseur du biofilm et sa répartition 3D. Ainsi, pour un petit biofilm (30 μm et occupant une petite surface) le nombre de voisins a été 15 et 20 respectivement pour la dilatation et l'érosion. Ainsi le temps de traitement a été prolongé car il fallait tester sur chaque image le nombre convenable de voisins à mettre dans le script.

L'application de ce script constitue une étape primordiale pour bien définir les constituants du biofilm et éliminer les cellules isolées qui peuvent fausser les résultats et éliminer tout bruit. Il

permet ultérieurement une reconstruction 3D adéquate et les calculs correspondants des structures du biofilm.

2/ Population de biofilm: Un script Gocad® basé sur les données issues des fluorescences des bactéries et des EPS a été développé pour déterminer la contribution exacte de bactéries et de polymères dans le biofilm. Ce script donne le nombre de bactéries et des EPS ainsi que le nombre de voxels qui ont les mêmes coordonnées en x, y et z dans les voxets des bactéries et ceux des EPS.

3/ Volume du biofilm: Les volumes des bactéries et des EPS ont été calculés séparément en multipliant le nombre des voxels par le volume unitaire du voxel. Le volume unitaire du voxel est calculé par multiplication des coordonnées $x * y * z$ de chaque pixel. Nous rappelons que ces coordonnées correspondent aux pas obtenus par microscopie confocale.

Pour calculer le volume global du biofilm un script (annexe) consistant à fusionner les voxels des bactéries et des EPS a été développé. La fusion donne lieu à un nouveau voxel en *or logique*, et le volume du biofilm a été ensuite calculé comme mentionné précédemment.

4/ Surface du biofilm : le calcul de la surface du biofilm a été réalisé par la détermination du nombre de voxels formant la base du biofilm (partie adhérente à la surface du coupon) puis en le multipliant par la surface du voxel (Gocad® script). Le pourcentage de recouvrement de la surface est ensuite calculé en rapportant la surface obtenue à la surface totale du coupon ($344510 \mu\text{m}^2$).

5/ Epaisseur: L'épaisseur du biofilm a été calculée par projection des voxels les plus hauts sur la base du biofilm (plan basal inférieur du voxel), et le nombre de voxels entre chaque voxel haut et la base a été déterminé. L'histogramme représentant le nombre de voxels hauts en fonction de leur hauteur a alors été tracé. De cette façon, l'épaisseur moyenne du biofilm correspond à la médiane de la courbe gaussienne ajustée de l'histogramme (figure 28). Enfin, le profil d'épaisseur du biofilm (mono-, pseudo-, bi-, poly-modal,...) a été déterminé en utilisant le même histogramme, mais en soustrayant le nombre de voxels 0.

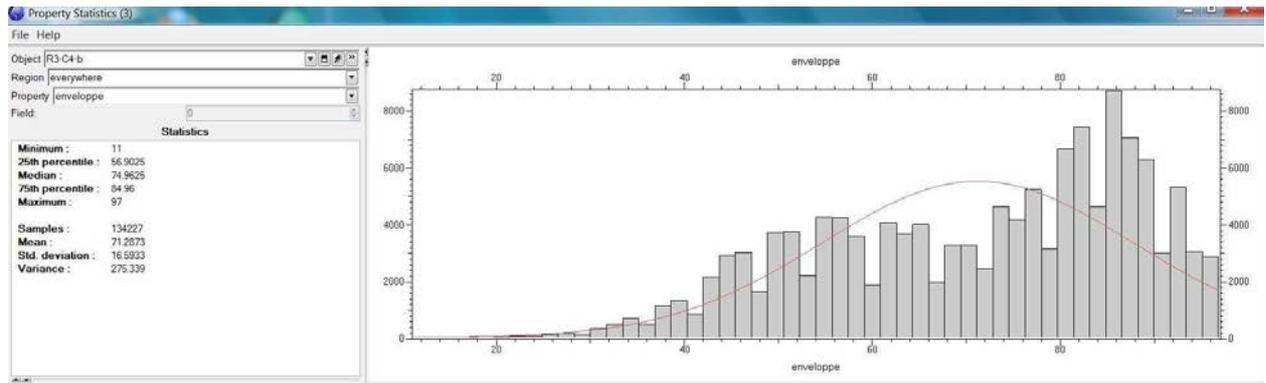


Figure 28 : Histogramme représentatif de l'épaisseur calculée dans Gocad®.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

C

Chandrasekhar S. Hydrodynamic and hydromagnetic stability. Oxford Clarendon press 1996.

Chehikian A. (1989). Binarisation d'images : 2 solutions à ce problème. *Traitement du Signal*, 6(1): 59-68.

Chomik A., Dieterlen, A., Xu, C., Haeberlé, O., Meyer, J.J., Jacquey, S. (1997) Quantification in optical sectioning of some deconvolution algorithms in view of 3D image segmentation. *J. Opt.*, 28: 225-233.

D

Darzynkiewicz, Z. (1990). Chapter 27 Differential Staining of DNA and RNA in Intact Cells and Isolated Cell Nuclei with Acridine Orange. *Methods in Cell Biology*, 33 (Issue C): 285-298.

F

Földes-Papp Z., Demel U., Tilz G.P. (2003). Review: Laser scanning confocal fluorescence microscopy: an overview. *International Immunopharmacology*, 3 (13-14) : 1715-1729.

Frenster J.H. (1971). Electron Microscopic Localization of Acridine Orange Binding to DNA within Human Leukemic Bone Marrow Cells. *Cancer Research*, 31: 1128-1133.

H

Halbhuber, K.-J., König, K. (2003). Modern laser scanning microscopy in biology, biotechnology and medicine. *Annals of Anatomy*, 185 (1): 1-20.

Héliot L. *Microscopie Confocal II et III : Introduction à la Microscopie Confocale à balayage laser*. Base de la microscopie confocale, Bordeaux - 2005.

Hicks J.D., Matthaei E. (1958). A selective stain for mucin. *Journal of Pathology and Bacteriology*, 75: 473-476.

Holmes T. J. (1988). Maximum-Likelihood image restoration adapted for noncoherent optical imaging. *J. Opt. Soc. Am.*, 5: 666-673.

J

Jana-Sur, P., and A. K. Chakraborty. (2005). Studies on the interaction of bacterial capsular polysaccharide-Klebsiella K16 with cationic dyes. *J. Photochem. Photobiol. Chem.*, 173: 64-69.

L

Landmann, L. (2002). Deconvolution improves colocalisation analysis of multiple fluorochromes in 3D confocal data sets more than filtering techniques. *J. Microsc.*, 208(2): 134-147.

Lauretti, F. Lucas De Melo, F. , Benati, F.J. , De Mello Volotão, E. , Santos, N. , Carvalho Linhares, R.E. , Nozawa, C. 2003. Use of acridine orange staining for the detection of rotavirus RNA in polyacrylamide gels. *Journal of Virological Methods*, 114, (Issue 1): 29-35.

M

Moyen R. (2005). Paramétrisation 3D de l'espace en géologie sédimentaire : le modèle GeoChron. Rapport de thèse. Doctorat de l'Institut National Polytechnique de Lorraine : Spécialité Géosciences.

R

Razaz M. and Nicholson S. (2000). 3d blind image reconstruction using combined nonlinear and statistical techniques, 4: 932–935.

S

Saunders A.M. (1964). Histochemical identification of acid mucopolysaccharides with acridine orange. *Journal of Histochemistry*, 12: 164-170.

Schichnes D., Nemson J. A., Ruzin S.E. (2006). Fluorescent Staining Method for Bacterial Endospores. MICROSCOPE, 54(2): 91–93.

Skali Lami S. (1991). Contribution à l'étude de l'écoulement de pate à papier interaction floculation-turbulence. Rapport de thèse.. INPL-Nancy.

W

Wirtanen, G., S. Salo, I. M. Helander, and T. Mattila-Sandholm. (2001). Microbiological methods for testing disinfectant efficiency on Pseudomonas biofilm. Colloides Surf. B Biointerfaces, 20:37-50.

**Chapitre 3 : INHIBITION HYDRODYNAMIQUE DE LA
CROISSANCE DES BIOFILMS DANS UN REACTEUR
COUETTE-POISEUILLE**

La formation d'un biofilm est un mécanisme complexe qui comprend plusieurs étapes. Le développement est initié par le transport et l'adhésion d'une première couche de bactéries sur une surface, puis ces bactéries adhérentes commencent à se multiplier et à produire les exopolymères qui renforcent leur adhésion et constituent la matrice initiale du biofilm. Une fois le biofilm mature, sa structure devient plus complexe et présente une architecture comprenant des microcolonies séparées par des pores et des canaux. La dernière étape dans le cycle du biofilm est son détachement et/ou sa redispersion dans le milieu (Costerton, 1999 ; Liu *et al.*, 2002).

Ces assemblages bactériens participent au contrôle de la concentration en matière organique naturelle dans le milieu, mais le plus souvent, engendrent un certain nombre de problèmes tels que corrosion des canalisations ou dépôt sur des fenêtres de capteur. Les méthodes de lutte contre les biofilms constituent un domaine actif de recherches. En effet, la matrice d'exopolymères forme une barrière active contre les agents antimicrobiens et une stratégie durable qui contourne ce problème est encore à découvrir.

Un des facteurs jouant un rôle prépondérant sur la formation du biofilm et affectant sa structure est l'hydrodynamique et plus spécifiquement le transport de masse (bactéries et nutriments). Dans ce travail, nous nous intéressons à limiter le transport convectif des bactéries vers la surface. Pour cela, nous utilisons un réacteur Couette-Poiseuille permettant de contrôler la configuration d'écoulement au voisinage de la paroi de développement des biofilms. Une configuration dite de "non dépôt" qui consiste à annuler le gradient de vitesse près de la surface, est investiguée. Les biofilms sont développés à partir des eaux usées qui constituent un réservoir conséquent de différentes espèces bactériennes. Les expériences de non dépôt sont ensuite comparées à celle établies dans des conditions optimales de croissance.

Hydrodynamic inhibition of biofilm growth using a Couette-Poiseuille reactor

R. AI KHATIB¹, S. SKALI-LAMI², B.S. LARTIGES^{1,3}, C. MUSTIN⁴, G. CAUMON⁵

¹ *Nancy University - LEM-ENSG/INPL-CNRS, Pôle de l'Eau, 15 Avenue du Charmois, BP 40 - 54 501 Vandœuvre Cedex, FRANCE*

² *Nancy University - LEMTA-ENSEM/INPL-CNRS, 2, Avenue de la Forêt de Haye, BP 160 - 54 504 Vandœuvre Cedex, FRANCE*

³ *University of Toulouse – GET/UPS-CNRS-IRD – 14, Avenue E. Belin, 31400 Toulouse, FRANCE*

⁴ *Nancy University LIMOS/UHP-CNRS, 7137 boulevard des Aiguillettes, BP 70239 - 54506 Vandoeuvre Cedex, FRANCE*

⁵ *Nancy University LIAD-ENSG/INPL-CNRS, Rue du Doyen M. Roubault, BP 40 - 54501 Vandoeuvre Cedex, FRANCE*

(*) To whom correspondence should be addressed

E-mail: bruno.lartiges@get.obs-mip.fr

reem_el_khatib@yahoo.com

salaheddine.skali-lami@ensem.inpl-nancy.fr

ABSTRACT

We take advantage of the variety of velocity profiles that can be achieved in Couette-Poiseuille flow to investigate the influence of convective transport on the development of nascent biofilms. The growth reactor is made of two coaxial vertical cylinders with the inner one rotating, and it is continuously fed over the height of the annular gap by a divergent duct. The velocity profile in the gap is adjusted by controlling both the rotation rate of the inner cylinder and the injection rate of the feed solution. Two velocity profiles are explored: (i) the "no-deposit" configuration for which both non zero bulk velocity and zero shear rate are achieved at the wall, i.e. a stagnant zone is formed in the vicinity of the reactor surface that suppresses convective transport ; (ii) the "optimum" configuration for which a constant shear gradient is established across the annular gap, that facilitates the transport of bacteria and substrate to the surface. Using sewage as the biomass source and scanning confocal laser microscopy to image the biofilm, we show that the "no-deposit" configuration strongly inhibits the biofilm growth on the outer stationary cylinder, with a up to 48 hour delay compared to the "optimum" development conditions. These promising results can be implemented in the design of inline sensors and passive samplers.

Keywords: Couette-Poiseuille flow, biofilm, sewage

3.1 INTRODUCTION

Biofilms are tenacious microorganisms assemblages that develop at solid/liquid interfaces, biotic or abiotic (Friese *et al.*, 1997 ; Costerton *et al.*, 1999 ; Eberl *et al.*, 2000 ; Donlan, 2002). Although they are recognized to play a crucial role in the degradation of organic matter both in natural and industrial environments (Battin *et al.*, 2003 ; Sprouse and Rittmann, 1990), they remain essentially known for triggering a variety of problems in water processes (pipe corrosion, membrane fouling, pathogens reservoirs in drinking water pipes,...), and in health related issues (bacterial colonization of medical implants, nosocomial infections,...) (Costerton, 1999 ; Delille *et al.*, 2007 ; Paris *et al.*, 2007 ; Gutierrez *et al.*, 2008 ; Nielson *et al.*, 2008 ; Zhang *et al.*, 2008 ; Silverstein *et al.*, 2006). Indeed, the self-produced slimy matrix of exopolymers that enclose the microorganisms in biofilms protects them from biocides and disinfectants by acting both as a physical and a chemical barrier (Stewart *et al.*, 1998). Moreover, the presence of heterogeneous microbial populations and of dormant cells further contributes to the resilience of biofilms (Mah and O'Toole, 2001).

The biofilm formation is a complex process that is classically decomposed in four main steps (i) transport and adhesion of pioneer microorganisms to the surface, (ii) production of exopolymers and growth of adherent cells to form microcolonies, (iii) elaboration of a mature biofilm characterized in particular by a complex architecture with water channels and pores, and by a redistribution of bacteria within the structure, (iv) detachment and/or dispersal of single cells or clusters in the liquid medium thus enabling a further spreading of the biofilm (Costerton, 1999 ; Liu *et al.*, 2000). Obviously, hydrodynamics and mass transfer (nutrients, macromolecules, bacterial cells) represent principal factors governing biofilm growth and organization (Characklis *et al.*, 1990 ; Stoodley *et al.*, 1999 ; Mueller, 1996 ; Busscher and Van der Mei, 2006 ; Schultz *et al.*, 2000 ; Battin *et al.*, 2003). Nevertheless, besides direct curative treatments which efficiency can be quite poor, the strategy usually employed for limiting the biofilm development consists in preventing the initial adhesion of microorganisms either by functionalizing the material surfaces or/and by using coatings containing bactericidal agents (Banerjee *et al.*, 2011). An alternative and more straightforward approach that we explore in this paper, is to minimize the convective transport of bacterial cells to the interface.

Previous studies carried out using parallel-plate flow chambers in laminar flow, i.e. a Poiseuille parabolic velocity distribution, have shown that, at the start of biofilm formation, the number of bacteria attached to the surface increased with the wall shear rate (McClaine and Ford, 2002 ; Paris *et al.* 2007). Actually, it can then be expected that under hydrodynamic conditions that cancel the velocity gradient at the wall, the transfer of bacteria to the surface should be limited since it then only relies on brownian diffusion and sedimentation processes. So Both processes are very weak because the size of bacteria is greater à 1µm and their density is very close to 1. As shown below, the corresponding velocity profile can be readily achieved by coupling a Couette flow, i.e. generated by a moving wall, to a Poiseuille flow, i.e. produced by a pressure gradient. In this paper, the no- deposit conditions are tested with raw domestic sewage, which represents a rather harsh and concentrated cocktail of microorganisms. They are then compared with optimum hydrodynamic conditions for biofilm growth in the same reactor.

3.2 CHARACTERISTICS OF COUETTE-POISEUILLE FLOW

The Couette-Poiseuille reactor used in this study is made of two coaxial vertical cylinders, with the inner one rotating, fed homogeneously over the height of the annular gap by a divergent duct (cf. fig. 30). The flow from the discharge outlet is separated from the inlet to prevent any recirculation in the reactor. The velocity profile in the gap can then be adjusted by controlling both the rotation rate of the inner cylinder and the injection rate of the feed solution. In laminar flow conditions, providing that the gap spacing e is small enough ($e \ll (R_{ext} + R_{int})/2$), the velocity profile $V(\xi)$ is given by the following expression:

$$V(\xi) = [6V_m\xi(1-\xi)] + \left[\frac{R_{int}\Omega}{e(R_{ext} + R_{int}) \left(\frac{R_{ext}^2}{e\xi + R_{int}} - (e\xi + R_{int}) \right)} \right] \quad (1)$$

where V_m is mean velocity (m/s) associated to the ortho-radial pressure gradient of Poiseuille flow, Ω is the rotation rate of the inner cylinder (rad/s), R_{int} and R_{ext} are the radius of the inner and outer cylinders (m), respectively, $e = (R_{ext} - R_{int})$ (m) is the gap spacing, and ξ is a reduced coordinate such that $\xi = \frac{r - R_{int}}{R_{ext} - R_{int}}$, with r being the radial position.

On the right-hand side of equation (1), the first term gives the velocity profile determined by the Poiseuille flow, whereas the second term represents the velocity distribution induced by the rotation of the inner cylinder, i.e. the Couette flow. The bulk velocity V_q is obtained by integrating equation (1) over a cross-section:

$$V_q = V_m + \frac{R_{\text{int}}\Omega}{2} \quad (2)$$

Introducing V_q in equation (1) and considering $\beta = \frac{V_q}{R_{\text{int}}\Omega}$, yield the non dimensional velocity field:

$$\frac{V(\xi)}{R_{\text{int}}\Omega} = (1 - \xi) + 6\xi(1 - \xi)\left(\beta - \frac{1}{2}\right) \quad (3)$$

The shear rate at the wall γ_p is then obtained by differentiating equation (3) with respect to ξ and by setting ξ to 1 (stationary outer cylinder, i.e. $r = R_{\text{ext}}$):

$$\gamma_p = \left(\frac{\partial V(\xi)}{\partial \xi}\right)_{\xi=1} = R_{\text{int}}\Omega \left[1 - 6\left(\beta - \frac{1}{2}\right)\right] \frac{1}{e} \quad (4)$$

As illustrated in figure 29, the value of β characterizes the variety of velocity profiles that can be obtained in the Couette-Poiseuille reactor. Thus, for $\beta = 1/2$, the velocity profile becomes linear and the shear rate is constant in the gap spacing (laminar Couette flow conditions). In that case, γ_p is simply $\gamma_p = \frac{R_{\text{int}}\Omega}{e}$. For β values greater than $1/2$, the velocity field is coupled to Couette and Poiseuille flows (fig. 29). Obviously, the ortho-radial Poiseuille flow is obtained if the inner cylinder becomes stationary. The configuration of interest in our study is that obtained for $\beta = 1/3$. Indeed, the bulk flow velocity is non zero and the shear rate γ_p is zero at the stationary wall. In other terms, a small stagnant region is created in the vicinity of the wall, which should drastically limit the mass transfer of substrate and bacteria, and hence, the biofilm growth.

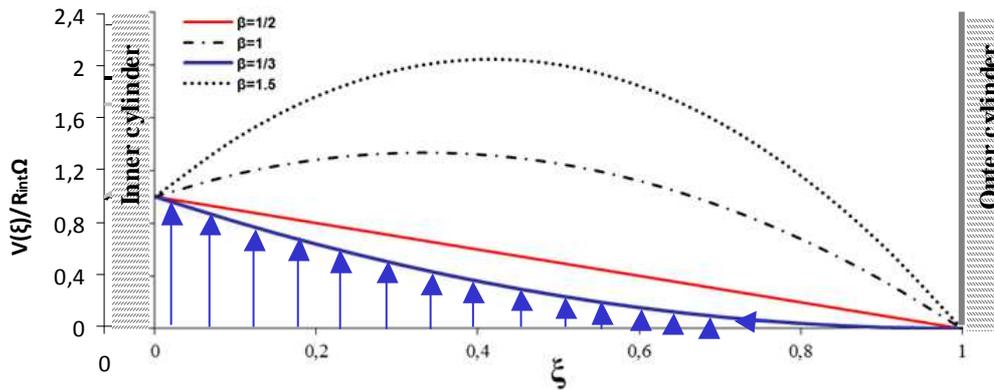


Figure 29 : Flow velocity profiles in Couette-Poiseuille reactor.

3.3 EXPERIMENTAL SECTION

3.3.1 Biofilm reactor system

The biofilms were grown in a Couette-Poiseuille reactor incorporated in a recycle loop with a square tank reservoir (fig. 30). The Couette-Poiseuille reactor consists of two concentric PVC cylinders, 10 cm high. The inner cylinder is rotated with a precision motor (Maxon A-max PLG32) connected to a digital controller (Encoder HEDL-5540). The diameter of the inner rotating cylinder is equal to 10 cm and the gap spacing between the cylinders is $e = 3.5$ mm. Such a geometry yields a e/R_{int} ratio of 0.07 that ensures that the shear profile between the two co-axial cylinders is equivalent to that generated between two parallel plates. Laminar flow conditions are created in the gap provided that the Taylor number Ta is less than 41 for $\beta=1/2$ Chandrasekhar 1961:

$$Ta = \frac{R_{\text{int}} \Omega e}{\nu} \sqrt{\frac{e}{R_{\text{int}}}}$$

with ν the kinematic viscosity of the fluid (m^2/s). In addition, Skali-Lami (1991) showed that for the Couette-Poiseuille reactor, the critical Taylor number should be lower than $Ta^* = 25.6/\beta^{0.63}$ with $0.1 < \beta = \frac{V_q}{\Omega R_{\text{int}}} < 3$ to maintain a stable flow. In the present work, for each value of β investigated, two shear rate conditions were tested. Hence, the rotation rates Ω of inner cylinder were equal to 0.71 and 4.31 rad/s for both $\beta = 1/3$ and $\beta = 1/2$, and the bulk flows were 1.471 and 8.82 L/h for $\beta = 1/3$, and equal to 2.21 and 13.23 L/h for $\beta = 1/2$. Those conditions imply maximum Ta values of 3.36 and 20.16 for $\beta = 1/2$ and 1.12 and 62.71 for $\beta = 1/3$ which were always less than ν^* .

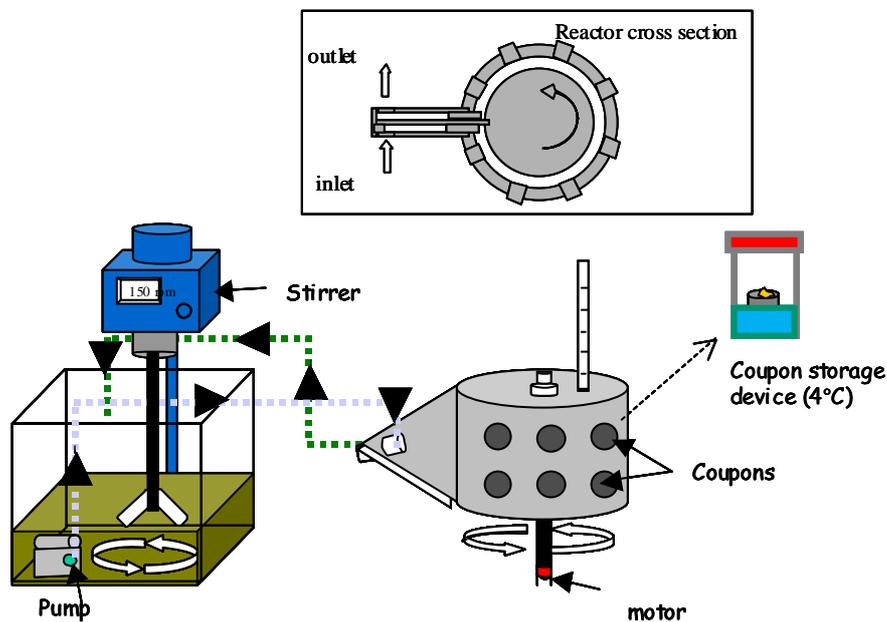


Figure 30: Experimental device.

The outer stationary cylinder is equipped with 16 removable coupons (16 mm in diameter) to collect the biofilms formed on the wall (fig. 30). Coupons are carefully fit in the cylinder wall in order to avoid any disturbance of the shear profile in the gap spacing.

3.3.2 Biofilm growth procedure

The reactor was supplied with raw domestic sewage collected daily from Maxéville wastewater treatment plant, which treats the sewage of Greater Nancy urban community (about 300 000 inhabitants). A detailed characterization of this urban wastewater can be found

in Houhou *et al.* (2009). Grab samples of sewage were taken after primary treatment to avoid any large suspended matter and fat that would clog the reactor or tubings. The wastewater (15 L) was placed into the square tank reservoir (side-length of 25 cm) and was agitated at 150 rpm with a folding paddle impeller. The sewage was pumped into the Couette-Poiseuille reactor by using a submersible pump with adjustable flow (Fisher W75601). Polyurethane tubing (Legris 1025406K02), 4 mm in internal diameter, were used to circulate the wastewater. Moreover, the flow rate of injected sewage was adjusted by changing the height of the return tubing.

A typical biofilm growth experiment lasted about 5 days. Sewage was therefore renewed every 24h to avoid substrate depletion and to maintain the bacteria count. Various characteristics of the wastewater, i.e. temperature, pH, conductivity, dissolved oxygen concentration, redox potential (Multiline parameter WTW), turbidity (Hach 2100P), and bacterial count (Thomas cell VWR 720-0150), were regularly monitored and analyzed during the experiments. As shown from the graphs reported in Supporting Information, the physico-chemical parameters investigated were relatively constant within a given biofilm growth experiment, and were rather reproducible from run to run. The average bacterial count, temperature, conductivity, pH, were about $7.81 \cdot 10^7 \pm 1.75 \cdot 10^7$ count/mL, $19.7 \pm 1.3^\circ\text{C}$, $1185 \pm 157.7 \mu\text{S/cm}$, and 7.79 ± 0.23 , respectively.

3.3.3 Observation of coupons by Scanning Confocal Laser Microscopy

Preliminary experiments provided the sampling times at which the coupons were collected and replaced by new ones. During sampling, the flow was stopped and the reactor was partially emptied. To avoid any disturbance brought by the introduction of a clean surface on the shear profile, sampling was performed in the opposite direction of flow from the outlet to the inlet of reactor. Coupons were stored at 4°C with the growth surface up, in a hermetically closed polyethylene vessel containing an aliquot of water at the bottom to prevent biofilm drying (fig. 30). Microscopic observations were generally carried out the following day and no later than 4 days after sampling. Fungi growth was only detected after one week storage on coupons showing biofilm development.

Coupons were stained with acridine orange (AO) buffered solution (Sigma-Aldrich, $22 \mu\text{M}$ AO, 5 mM EDTA, 0.15 M NaCl, 0.1 M phosphate-citrate buffer [pH 6]). Acridine orange

behaves differently in the presence of DNA and RNA: it exhibits a maximum fluorescence emission at 525 nm (green) for an excitation wavelength of 502 nm when the dye fits between both strands of the double helix, whereas, when bound to RNA, it gives a maximum emission at 650 nm (red) when excited at 460 nm. (Wirtanen *et al.*, 2001 ; Jana-Sur and Chakraborty, 2005 ; Frenster, 1971 ; Lauretti *et al.*, 2003 ; Darzynkiewicz, 1990). This fluorochrome has also been widely used for visualizing mucopolysaccharid acids and glycolyzed proteins (Saunders, 1964 ; Hichs and Matthaei, 1958). The samples were stained with 100 μ L of acridine orange buffered solution during 30 min at room temperature in the dark, and then washed 3 times with ultra-pure water (MilliQ-plus) to remove excess of dye.

Coupons, placed upside-down in glass-bottom dishes (WillCo-Dish[®], \varnothing 22 mm), were observed with an inverted light microscope (NIKON TE 2000 U) equipped with a confocal head (Radiance 2100 Rainbow, Biorad). Due to the slight concavity of coupons, only objectives (\times 4 or \times 20 magnification) with long working distances (up to 1mm) were found well-suited for image acquisition. The 488 nm and 457 nm lines of an argon ion laser, close to the excitation maxima of acridine orange, were used as light sources. The fluorescence signals of stained bacteria and exopolymers were recorded in the 530-560 nm frequency range and over 600 nm, respectively. Image stacks (512×512 pixel², corresponding to $344510 \mu\text{m}^2$) were generated using LaserSharp2000[™] software (Bio-Rad Cell Science Division). During sample sectioning, the line by line excitation mode (Lambda-Strobing) was used to reduce bleed-through. It should be noted that CLSM was installed on a pneumatic vibration-proof table to reduce motion of biofilms appendices.

3.3.4 Image processing and 3D reconstruction

Three to five images were acquired in the central region of each coupon using Laserssharp2000[™]. After reassignment of the fluorescence in each channel (bacteria, exopolymers, and coupon surface) with the previous software, image enhancement was performed using Blind Deconvolution (AutoQuant X v1.4.1 software – MediaCybernetics), i.e. the knowledge of the point spread function is not required (Holmes, 1988), binarization and thresholding of images were carried out with MacBiophotonics ImageJ software (NIH, Bethesda, Maryland, USA), and 3D reconstruction of biofilm images and biofilm quantification were performed using Gocad[®] software (Earth Decision, version 2.1.6). The detailed image processing procedure can be found in El Khatib *et al.* (2011).

The biofilm thickness at a given location was determined using a developed Gocad® script using the following steps. First, a projection of top voxels on the basal plane of voxel (substratum) was carried out counting at the same time the number of voxels between each top voxel and the substratum containing either bacteria voxel or exopolymer voxel. An histogram plotting the overall local thickness was obtained and the average biofilm thickness was defined from the median of the sum of biofilm local thicknesses. The biofilm surface area was calculated using a developed Gocad® script. The number of voxels constituting the basal layer of the biofilm was determined and the surface was calculated by multiplying the number of voxel by the voxel surface area which is $x*y$ corresponding to a pixel 2D coordinates (μm). The coverage area (%) was then determined by normalizing the biofilm surface to the image surface (corresponding to $344510 \mu\text{m}^2$).

3.4 RESULTS AND DISCUSSION

3.4.1 Observation of biofilm development

Two types of velocity profile were used in the Couette-Poiseuille reactor, (i) $\beta=1/3$ for which both zero velocity and zero shear rate are achieved at the wall, (ii) $\beta=1/2$ for which a constant shear gradient is established across the annular gap. To define an equivalence criterion between those two configurations with regard to biofilm growth is far from obvious. In this paper, the spatial mean shear rate across the annular gap $\bar{\gamma}$ provides the basis of comparison between the experiments carried out according to the two velocity distributions, but such choice is highly arguable.

Figure 31 shows the temporal series of 2D confocal images obtained for the $\beta = 1/2$ configuration and $\bar{\gamma}$ equal to 1 s^{-1} and 6 s^{-1} . At $\bar{\gamma} = 6 \text{ s}^{-1}$, the biofilm development starts very early with a myriad of isolated bacteria (little green dots on the images) that can be detected after only 1 h exposure of the coupon surface to the sewage. Elongated cell clusters, observed from $t = 5 \text{ h}$, become thicker with time ($t = 12 \text{ h}$), and then detach from the wall mainly by sloughing ($t = 18 \text{ h}$). In addition, the elongated axis of bacterial microcolonies is most often oriented at a 45° angle to the flow direction. Such feature has been previously reported by Paris et al. (2007) in mixed culture biofilms grown under laminar flow. A similar sequence of events, but shifted in time by about 12h, occurs at $\bar{\gamma} = 1 \text{ s}^{-1}$. The biofilm architecture is

nevertheless slightly different at the lower shear rate since streamers can be evidenced after an exposure time of 18 h. The orientation of cell clusters with respect to the flow direction is also less obvious.

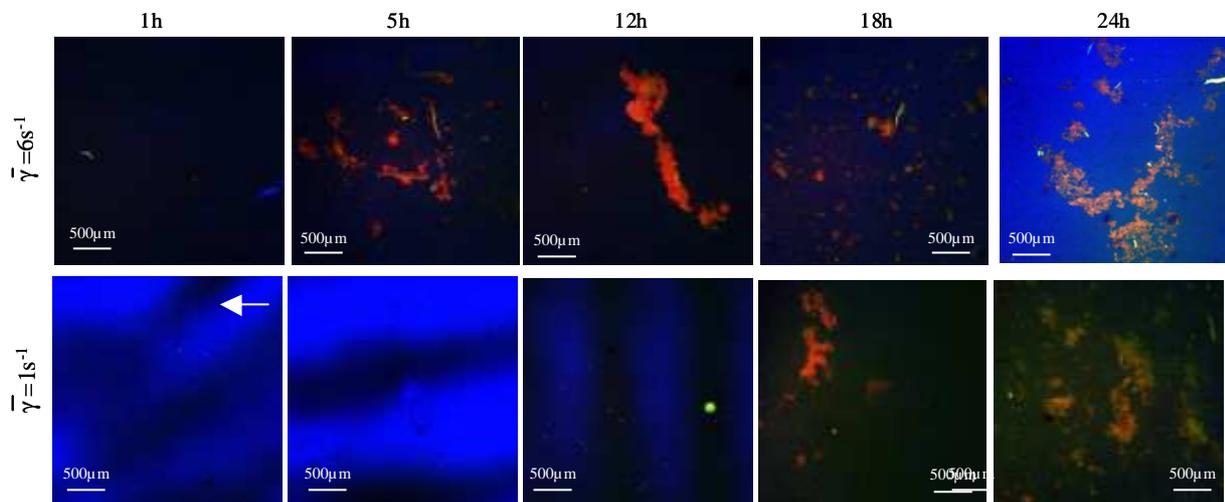


Figure 31: CLSM images (zoom x4) for optimum growth $\beta = 1/2$ conditions for $\bar{\gamma} = 6\text{s}^{-1}$ and $\bar{\gamma} = 1\text{s}^{-1}$. The flow direction is indicated by a white arrow.

The experiments conducted using the $\beta = 1/3$ velocity profile, i.e. the transport by convection to the wall is negligible, reveal that the biofilm development is dramatically delayed at both $\bar{\gamma} = 1\text{s}^{-1}$ and 6s^{-1} . As illustrated in figure 32, the coupon surface remains incredibly clean after a 24 h exposure to the sewage at $\bar{\gamma} = 6\text{s}^{-1}$, the initial stage of biofilm growth being detected at 48 h.

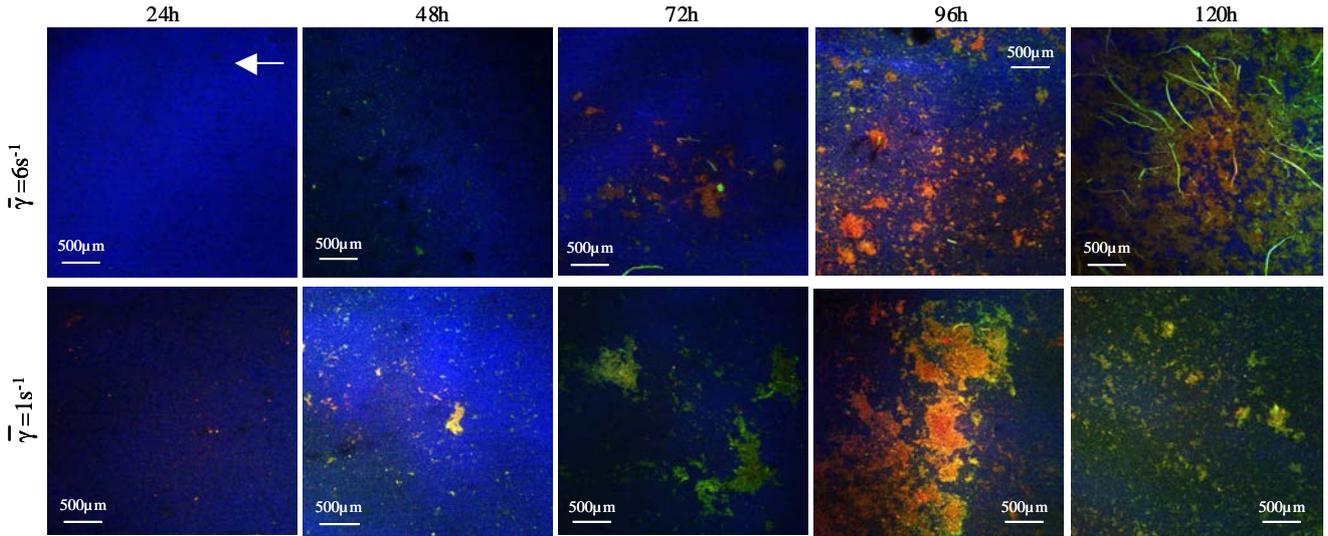


Figure 32: CLSM images (zoom x4) for no-deposit ($\beta= 1/3$) conditions. The flow direction is indicated by a white arrow.

The biofilm development is also severely inhibited at $\bar{\gamma} = 1 \text{ s}^{-1}$, although the coupon surface is rapidly coated with bacteria, presumably because diffusion processes are predominant under those hydrodynamic conditions. Beyond 48 h, the biofilm growth becomes abundant at both spatial mean shear rates investigated, and characteristic orientations of the biofilm structure at 45° to the flow direction can be observed. Actually, cancelling the convection at the outer stationary wall implies a much larger shear rate at the wall of inner rotating cylinder (cf. fig. 29), and hence, an enhanced transport of bacteria and nutrients to that surface. Therefore, a significant biofilm growth occurs at the inner rotating cylinder surface, which eventually changes the gap spacing, the velocity profile, and hence, triggers the development of biofilm on the wall of outer stationary cylinder.

3.4.2 Quantification of biofilm morphology

Figure 33 depicts the evolution as a function of time of both biofilm thickness and surface area coverage for the four hydrodynamic configurations investigated in this study. For $\beta = 1/2$ and $\bar{\gamma} = 6 \text{ s}^{-1}$, the biofilm thickness and the surface area coverage rapidly attain $150 \mu\text{m}$ and 25%, respectively, at 12h. Subsequently, those values slightly decrease, thus suggesting that cell clusters start to detach from the biofilm. At the lower spatial mean shear rate ($\bar{\gamma} = 1 \text{ s}^{-1}$),

both the biofilm thickness and the surface coverage area increase linearly after a lag phase of about 5 h, to reach values of 200 μm and 30%, respectively, at 24 h.

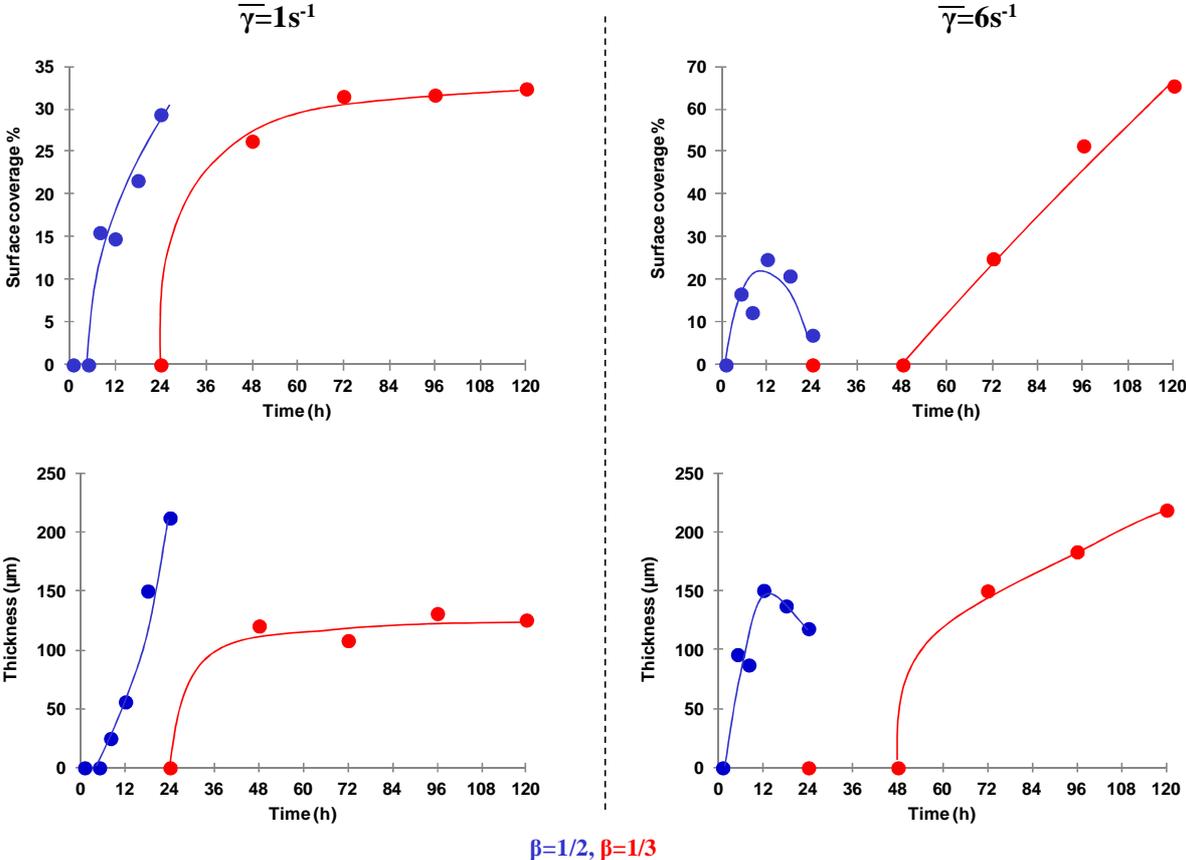


Figure 33 : Biofilm surface coverage and thickness for no-deposit conditions ($\beta= 1/3$) and for optimum conditions ($\beta= 1/2$, first 24h).

For $\beta = 1/3$, once the initial velocity profile has been altered by the biofilm development on the inner rotating cylinder, both thickness and surface coverage area strongly increase with time at $\bar{\gamma} = 6 \text{ s}^{-1}$ to reach values much higher than those obtained with the previous configuration, i.e. 218 μm and 65% at 120 h (fig. 33b). On the other hand, the biofilm characteristics stabilize at a surface coverage area of $30 \pm 2 \%$ and a biofilm thickness of $100 \pm 20 \mu\text{m}$ when $\bar{\gamma} = 1 \text{ s}^{-1}$.

3.5 CONCLUDING REMARK

Using the Couette-Poiseuille reactor in a configuration that determines a stagnation zone in the vicinity of the wall, strongly inhibits the biofilm development. However, such configuration concomitantly enhances the convective transport of nutrients and bacteria on the opposite wall of the reactor, and hence biofilm growth, which eventually alters the flow characteristics after a certain period of time. Maintaining the chosen velocity profile could nevertheless be achieved either by slightly increasing the rotation rate of the inner cylinder as the gap spacing decreases or, more simply, by continuously scraping the biofilm off the rotating cylinder. If a Couette-Poiseuille flow with $\beta = 1/3$ can not be easily implemented to control biofilm development in most industrial processes, such hydrodynamic configuration may be seriously envisioned for many inline sensors and passive samplers that can be installed at the wall of outer stationary cylinder.

Acknowledgements: R. AL KHATIB would like to thank the Lebanon National Council for Scientific Research for funding her doctoral studies.

References

- Busscher H., Vander Mei H. (2006). Microbial adhesion in flow displacement systems. *Clinical Microbiology Reviews*, 19(1): 127-141.
- Banerjee I., Pangule R.C., Kane R.S. (2011). Antifouling coatings: recent developments in the design of surfaces that prevent fouling by proteins, bacteria, and marine organisms. *Advanced Materials*, 23(6): 690-718.
- Battin T., Kaplan L., Newbold J.D., Cheng X. and Hansen C. (2003). Effects of Current Velocity on the Nascent Architecture of Stream Microbial Biofilms. *Applied and Environmental Microbiology*, 69 (9): 5443-5452.
- Chandrasekhar S. Hydrodynamic and hydromagnetic stability. Oxford Clarendon press 1996.
- Characklis W.G. (1990). Biofilm process. In: Characklis W.C. and Marshall K.C. Eds. *Biofilms*. John Willey & Sons, Inc., New York, N.C. 195-231.
- Costerton J.W., Stewart P.S., Greenberg E.P. (1999). Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science*, 284:1318-1322.
- Costerton J.W. (1999). Discussion: Introduction to biofilm. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 11: 217-221.
- Darzynkiewicz, Z. (1990). Chapter 27 Differential Staining of DNA and RNA in Intact Cells and Isolated Cell Nuclei with Acridine Orange. *Methods in Cell Biology*, 33 (Issue C) :285-298.
- Dellile A., Quilès F., and Humbert F. (2007). In situ monitoring of the Nascent *Pseudomonas fluorescens* biofilm response to variations in the dissolved organic carbon level in low-nutrient water by attenuated total reflectance-fourier transformation infrared spectroscopy. *Appl. Environ. Microbiol.*, 73: 5782-5788.
- Donlan R. M. (2002). Biofilms: Microbial life on surfaces. *Emerging Infectious Diseases*, 8(9): 881-889.

- Eberl H.J., Picioreanu C., Heijnen J.J., Van Loosdrecht M.C.M. (2000). A three-dimensional study on the correlation of spatial structure, hydrodynamic conditions, and mass transfer and conversion in biofilms. *Chemical Engineering Sciences*, 55: 6209-6222.
- Flemming, H-C., and Wingender J. (2003). The crucial role of extracellular polymeric substances in biofilms, p. 178-210. In S. Wuertz, P. Bishop, and P. Wilderer (ed.), *Biofilms in wastewater treatment, an interdisciplinary approach*. IWA Publishing, UK.
- Fletcher M. (1979). *The attachment of bacteria to surfaces in aquatic environments. Adhesion to Microorganisms to Surfaces*. D. C. Ellwood, J. Melling & P. Rutter, Academic Press.
- Frenster J.H. (1971). Electron Microscopic Localization of Acridine Orange Binding to DNA within Human Leukemic Bone Marrow Cells. *Cancer Research*, 31:1128-1133.
- Friese K. Mages M., Wendet-Potthoff K., Neu T.R. (1997). Determination of heavy metals in biofilms from the River Elbe by total-reflection X-ray fluorescence spectrometry. *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy*, 52(7): 1019-1025.
- Gutierrez O., Mohanakrishnan J., Sharma K., Meyer R., Keller J., Yuan Z. (2008). Evaluation of oxygen injection as a mean of controlling sulfide production in a sewer system. *Water research*, 42: 4549-4561.
- Hicks J.D. and Matthaei E. 1958. A selective stain for mucin. *Journal of Pathology and Bacteriology*, 75, 473-476.
- Holmes T. J. 1988. Maximum-Likelihood image restoration adapted for noncoherent optical imaging. *J. Opt. Soc. Am.* 5:666-673.
- Houhou J, Lartiges BS, Montagres-Pelletier E, Sieliechi J, Ghanbaja J, Kohler A. (2009). Sources, nature, and fate of heavy metal-bearing particles in the sewer system. *Science of the total environment*. *Water Research*, 407: 6052-6062.
- Ivleva N., Wagner M., Szkola A., Horn H., Neissner R., Haisch C. (2010). Label-Free in situ SERS imaging of biofilms. *J. Phys. Chem. B*, 114: 10184-10194.

- Jana-Sur, P., and A. K. Chakraborty. 2005. Studies on the interaction of bacterial capsular polysaccharide-Klebsiella K16 with cationic dyes. *J. Photochem. Photobiol. Chem.* 173:64-69.
- Klapper I., Rupp C. J., Cargo R., Purvedorj B., Stoodley P. (2002). Viscoelastic fluid description of bacterial biofilm material properties. *Biotechnology and Bioengineering*, 80(3): 289-296.
- Lauretti, F. , Lucas De Melo, F. , Benati, F.J. , De Mello Volotão, E. , Santos, N. , Carvalho Linhares, R.E. , Nozawa, C. (2003). Use of acridine orange staining for the detection of rotavirus RNA in polyacrylamide gels. *Journal of Virological Methods* , 114 (1) : Pages 29-35.
- Liu Y., Tay J-H. (2002). The essential role of hydrodynamic force in the formation of biofilm and granular sludge. *Water Research*, 36: 1653-1665.
- MacClaine J.W., Ford R.M. (2002). Adhesion of motil and nonmotil *Escherichia Coli* to glass. *Biotechnology and Bioengineering*, 78(2): 179-189.
- Mah T.F., O'Toole G.A. (2001). Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. *Trends Microbiol.* 9(1) :34-49.
- Mueller R.F. (1996). Bacterial transport and colonization in low nutrient environments. *Water Research*, 30(11): 2681-2690.
- Nielson A.H., Vollertsen J., Stokbro Jensen H., Wium-Andersen T., Hvite-Jacobsen T. (2008). Influence of pipe material and surfaces on sulfide related odor and corrosion in sewers. *Water Research*, 42:4206-4214.
- Paris T., Skali-Lami S., Block J-B. 2007. Effect of wall shear rate on biofilm deposition and grazing in drinking water flow chambers. *Biotechnology Bioengineering*, 97 (6), 1550-1561.
- Saunders A.M. (1964). Histochemical identification of acid mucopolysaccharides with acridine orange. *Journal of Histochemistry*, 12: 164-170.

Schultz M.P., Finlay J.A., Callow, M.E., Callow, J.A. (2000). A turbulent channel flow apparatus for the determination of the adhesion strength of microfouling organisms. *Biofouling*, 15 (4): 243-251

Silverstein A.D., Henry G.D., Evans B., Pasmore M., Simmons C.J., Donatucci C.F. (2006). Biofilm Formation on Clinically Noninfected Penile Prostheses. *Journal of Urology*, 176 (3): 1008-1011.

Skali Lami S. (1991). Contribution à l'étude de l'écoulement de pate à papier interaction floculation-turbulence. PhD report. INPL-Nancy

Sprouse G. and Rittmann B.E. (1990). Colloid removal in fluidized-bed biofilm reactor. *J. Environ. Eng.*, 116 : 314-3294.

Stewart P.S. (1998). A review of experimental measurements of effective diffusive permeabilities and effective diffusion coefficients in biofilms. *Biotechnol. Bioeng.*, 59: 261-272.

Stoodley P., Dodds I., Boyle J.D., Lappin-Scott H.M. (1999). Influence of hydrodynamics and nutrients on biofilm structure. *Journal of Applied Microbiology Symposium Supplement*, 85(28): 19S-28S.

Wirtanen G., Salo S., Helander I.M., Mattila-Sandholm T. (2001). Microbiological methods for testing disinfectant efficiency on *Pseudomonas* biofilm. *Colloides Surf. B Biointerfaces.*, 20:37-50.

Wirtanen, G., S. Salo, I. M. Helander, and T. Mattila-Sandholm. (2001). Microbiological methods for testing disinfectant efficiency on *Pseudomonas* biofilm. *Colloides Surf. B Biointerfaces*, 20:37-50.

Zhang L., Schryver P., Gusseme B., Muynck W., Boon N., Verstrete W. (2008). Chemical and biological technologies for hydrogen sulfide emission in sewer systems: A review. *Water Research*, 42:1-12.

**Chapitre 4 : ETUDE DE L'EFFET DU
GRADIENT DE VITESSE PARIETAL SUR LA
CROISSANCE DES BIOFILMS DES EAUX
USEES : STADE INITIAL ET STADE DE
BIOFILM MATURE**

Les conditions hydrodynamiques sont connues pour avoir un impact important sur le développement des biofilms, en particulier sur les quantités de bactéries et d'exopolymères, la nature d'exopolymères produits, et bien sûr le transport de nutriments (Stoodly *et al.*, 1999 ; Costerton, 1999 ; Vandervivere et Kirchman, 1993). Ces études font appel à l'utilisation de réacteurs de géométries spécifiques, notamment les chambres d'écoulement, afin de contrôler les conditions hydrodynamiques et tout particulièrement le gradient de vitesse pariétal.

Les expériences réalisées à grandes vitesses d'écoulement montrent que le nombre de bactéries transportées vers la surface est important et que les biofilms développés tendent à avoir une structure dense avec des microcolonies adhérant plus fortement sur la surface en raison d'une grande production d'exopolymères (Decho, 2000 ; Zhu et Chen, 2001 ; Liu *et al.*, 2002 ; Vrouwenvelder *et al.*, 2010). Cependant, des forces de cisaillement trop élevées impliquent une déstabilisation des propriétés mécaniques du biofilm et un détachement de bouts de biofilm avec leur re-redispersion dans le milieu.

Pour les faibles écoulements (faibles forces de cisaillement), la structure du biofilm est beaucoup plus poreuse, et les biofilms sont plus épais. Dans ces conditions, les microcolonies se trouvent séparées par des vides importants formant des canaux qui favorisent le transport de nutriments au sein du biofilm. Par conséquent, l'activité du biofilm augmente, et de là, son épaisseur augmente également.

Dans ce chapitre, nous étudions l'influence du gradient de vitesse pariétal à la fois sur la croissance initiale du biofilm et à son stade de maturation. Les biofilms sont développés à partir des eaux usées dans un réacteur Couette-poiseuille permettant la maîtrise initiale du profil de cisaillement au niveau de la surface de développement. L'observation des biofilms est réalisée en microscopie confocale à balayage laser et les images obtenues sont traitées pour donner une reconstruction 3D qui permet de déterminer des informations plus précises sur la structure du biofilm, les différents biovolumes (bactérie/polymère extracellulaire), ainsi que son épaisseur.

Effect of wall shear rate on initial and maturation phases of biofilms grown from urban wastewater.

R. AI KHATIB¹, S. SKALI-LAMI², B.S. LARTIGES^{1,3}, C. MUSTIN⁴, G. CAUMON⁵

¹ Nancy University - LEM-ENSG/INPL-CNRS, Pôle de l'Eau, 15 Avenue du Charmois, BP 40 - 54 501 Vandœuvre Cedex, FRANCE

² Nancy University - LEMTA-ENSEM/INPL-CNRS, 2, Avenue de la Forêt de Haye, BP 160 - 54 504 Vandœuvre Cedex, FRANCE

³ University of Toulouse – GET/UPS-CNRS-IRD – 14, Avenue E. Belin, 31400 Toulouse, FRANCE

⁴ Nancy University LIMOS/UHP-CNRS, 7137 boulevard des Aiguillettes, BP 70239 - 54506 Vandoeuvre Cedex, FRANCE

⁵ Nancy University LIAD-ENSG/INPL-CNRS, Rue du Doyen M. Roubault, BP 40 - 54501 Vandoeuvre Cedex, FRANCE

(*) To whom correspondence should be addressed

E-mail: bruno.lartiges@get.obs-mip.fr

reem_el_khatib@yahoo.com

salaheddine.skali-lami@ensem.inpl-nancy.fr

ABSTRACT

The effect of two wall shear rates (1s^{-1} and 6s^{-1}) on biofilm growth, at both initial and maturation phase was investigated using a Couette-Poiseuille reactor. This type of reactor permitted to work under stable laminar flow with constant wall shear rate across the gap spacing. Biofilm were grown using wastewater as source, and visualization was carried out using a confocal laser scanning microscope. Images were then subjected to a series of image treatment and quality enhancement that allow afterwards 3D reconstruction and quantitative analysis. Results show that the influence of shear is predominant at the beginning of biofilm growth. However, hydrodynamics also determine a fingerprinting of mature biofilm morphology and composition regarding bacteria and EPS accumulation, thickness and surface coverage.

Keywords: Couette-Poiseuille, biofilm, shear rate, mass transport

4.1 INTRODUCTION

Hydrodynamic conditions and particularly flow velocity are known to play a crucial role in biofilm development. Indeed, the resulting shear forces strongly affect biofilm structure and activity, i.e. quantity of adhered bacteria, exopolymeric production, and obviously mass transport (Stoodly *et al.*, 1999 ; Costerton, 1999 ; Vandervivere and Kirchman, 1993). Various studies carried out with natural, multi- and monospecies biofilms showed that thickness, surface coverage, biomass concentration, EPS production, and spatial arrangement of microcolonies, presented a variety of patterns according to the flow nature and the applied shear rate (Celmer *et al.*, 2008 ; Stoodly *et al.*, 1999, Klapper *et al.*, 2002 ; Pereira *et al.*, 2002). At first approximation, the mass transport (nutrients and bacteria) increases with flow velocity, hence biofilm development is enhanced (Mueller, 1996 ; Busscher and Van der Lei, 2006 ; Maclaine and Ford, 2002).

The flux of bacteria to the wall is given by (Paris *et al.* 2007) :

$$\Phi \approx C_0 A \left(\frac{\gamma D^2}{L} \right)^{(1/3)} \quad (1)$$

with C_0 the bacterial concentration in the bulk, A the surface area of the wall, γ the wall shear rate, D the diffusion coefficient, and L the length of the wall in the direction of the flow. Equation (1) can be rewritten as:

$$\frac{d(nv_0)}{dt} \approx C_0 A \left(\frac{\gamma D^2}{L} \right)^{(1/3)} \quad (2)$$

with n the number of deposited cells within an average volume v_0 ,

By integrating equation (2), and assuming that A and D are constant, we obtain:

$$\frac{n}{A} \approx \frac{C_0}{v_0} \left(\frac{A^2}{L} \right)^{(1/3)} \left(\frac{\gamma D^2}{A^2} \right)^{(1/3)} t \quad (3)$$

$$\text{or } \frac{n}{A} \approx \frac{C_0}{v_0} \left(\frac{A^2}{L} \right)^{(1/3)} t^* \quad (4) \text{ with } t^* = \left(\frac{\gamma D^2}{A^2} \right)^{(1/3)} t.$$

Therefore, for given bacterial concentration, surface area, and diffusion coefficient, the number of deposited bacteria at the wall per unit surface area should not depend on shear rate when plotted against t^* (Paris *et al.*, 2007).

Experiments conducted in turbulent flow with various types of flow cells, have shown that the developed biofilms tend to have a compact dense structure related to higher EPS production and higher mass transfer from bulk liquid towards biofilm. Therefore, such biofilms are more cohesive and more resistant when facing external stresses (Decho, 2000 ; Zhu et Chen, 2001 ; Liu *et al.*, 2002 ; Vrouwenvelder *et al.*, 2010). Higher shear forces can induce a destabilization of biofilm mechanical properties which leads to biofilm detachment and redispersion in the fluid (Purevdorj-Gage and Stoodley, 2004). On the other hand, low shear forces results in fluffy and porous but thicker biofilms. These biofilms present large voids that separate microcolonies and form a kind of internal network. This architecture is assumed to improve nutrient transport within the biofilm which will then intensify its activity and therefore, thickness will increase (Celmer *et al.*, 2008 ; Wagner *et al.*, 2008).

In this work, we studied the effect of wall shear rate on both the initial development phase and the maturation phase of biofilms grown from urban wastewater. The development of biofilms in sewer systems is now becoming a very interesting issue due to their role in sewer systems (biocorrosion of sewer pipes, biodegradation of organic matter, accumulation and transport of pollutants) (Nielson *et al.*, 2008 ; Houhou *et al.*, 2009 ; El Khatib *et al.* 2011). This role is directly related to biofilm activity and structure whose are influenced by hydrodynamic conditions of the system.

A Couette-Poiseuille reactor was developed to insure laminar flow and stable shear rate at the wall during each experiment. The biofilms grown were observed with confocal laser scanning microscope (CLSM) and images were subjected to image enhancement and 3D reconstruction. As One-dimensional study only describes biofilm and gives variation of biofilm structural parameters (density, porosity, substrate concentration, etc...) in one direction which is from bulk to the surface only, studies are now adopting 2D and 3D modeling. This type of modeling reveals the heterogeneity of biofilm structure and provides a better quantification and evolution of the internal structure (streamers, cluster shape, channel size, density, biovolume, etc...) with time (Bishop and Rittmann, 1996).

4.2 EXPERIMENTAL SECTION

4.2.1 Biofilm reactor system

The biofilms were grown in a Couette-Poiseuille reactor incorporated in a recycle loop with a square tank reservoir (fig. 34). The Couette-Poiseuille reactor consists of two concentric PVC cylinders, 10 cm high. The inner cylinder is rotated with a precision motor (Maxon A-max PLG32) connected to a digital controller (Encoder HEDL-5540). The diameter of the inner rotating cylinder is equal to 10 cm and the gap spacing between the cylinders is $e = 3.5$ mm. Such geometry yields an e/R_{int} ratio of 0.07 that ensures that the shear profile between the two co-axial cylinders is equivalent to that generated between two parallel plates. Laminar flow conditions are created in the gap provided that the Taylor number Ta is less than 41 for $\gamma=1/2$ (Chandrasekhar, 1961):

$$Ta = \frac{R_{\text{int}}\Omega e}{\nu} \sqrt{e/R_{\text{int}}}$$

with ν the kinematic viscosity of the fluid (m^2/s). In addition, Skali-Lami (1991) showed that for the Couette-Poiseuille reactor, the critical Taylor number should be lower than $Ta^* = 25.6/\beta^{0.63}$ with $0.1 < \beta = \frac{V_q}{\Omega R_{\text{int}}} < 3$ to maintain a stable flow.

In the present work, a Couette flow was used, i.e. β is equal to $1/2$ (El Khatib et al. 2011), and two shear rate conditions were tested $\gamma=6\text{s}^{-1}$ and $\gamma=1\text{s}^{-1}$. Hence, the rotation rates Ω of inner cylinder were equal to 0.71 and 4.31 rad/s and the bulk flows were 2.21 and 13.23 L/h for respectively $\gamma=1\text{s}^{-1}$ and $\gamma=6\text{s}^{-1}$. Those conditions imply maximum Ta values of 3.36 and 20.16 for $\gamma=1\text{s}^{-1}$ and $\gamma=6\text{s}^{-1}$ which were always less than ν^* .

The outer stationary cylinder is equipped with 16 removable coupons (16 mm in diameter) to collect the biofilms formed on the wall (fig. 34). Coupons are carefully fit in the cylinder wall in order to avoid any disturbance of the shear profile in the gap spacing.

4.2.2 Biofilm growth procedure

The reactor was supplied with raw domestic sewage collected daily from Maxéville wastewater treatment plant, which treats the sewage of Greater Nancy urban community (about 300 000 inhabitants). A detailed characterization of this urban wastewater can be found in Houhou *et al.* (2009). Grab samples of sewage were taken after primary treatment to avoid any large suspended matter and fat that would clog the reactor or tubings. The wastewater (15 L) was placed into the square tank reservoir (side-length of 25 cm) and was agitated at 150 rpm with a folding paddle impeller. The sewage was pumped into the Couette-Poiseuille reactor by using a submersible pump with adjustable flow (Fisher W75601). Polyurethane tubing (Legris 1025406K02), 4 mm in internal diameter, were used to circulate the wastewater. Moreover, the flow rate of injected sewage was adjusted by changing the height of the return tubing.

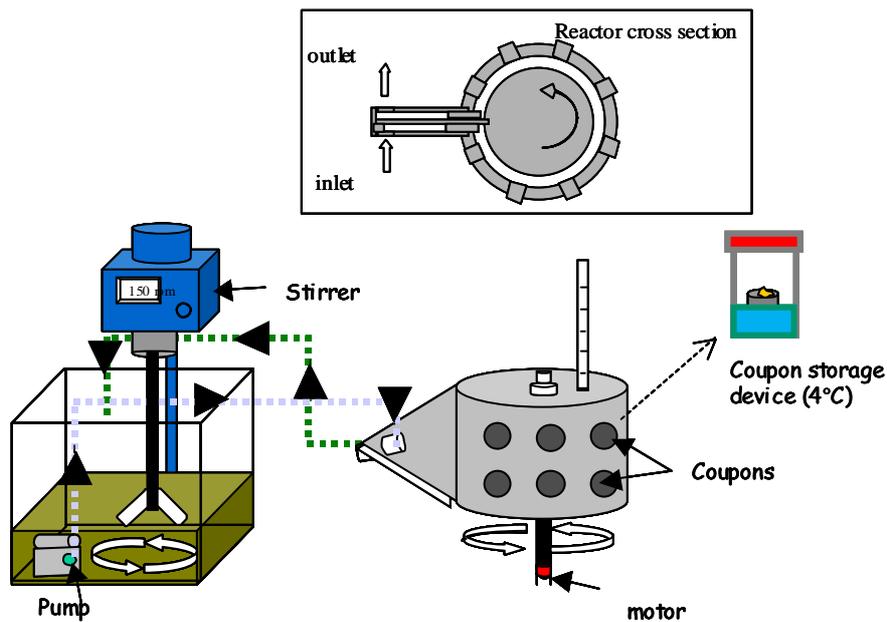


Figure 34: Experimental device. Inset: cross section of the Couette-Poiseuille reactor.

A typical biofilm growth experiment lasted about 5 days. Sewage was therefore renewed every 24h to avoid substrate depletion and to maintain the bacteria count. Various characteristics of the wastewater, i.e. temperature, pH, conductivity, dissolved oxygen concentration, redox potential (Multiline parameter WTW), turbidity (Hach 2100P), and bacterial count (Thomas cell VWR 720-0150), were regularly monitored and analyzed during the experiments. As shown from the graphs reported in Supporting Information, the physico-chemical parameters investigated were relatively constant within a given biofilm growth experiment, and were rather reproducible from run to run. The average bacterial count, temperature, conductivity, pH, were about $7.81 \cdot 10^7 \pm 1.75 \cdot 10^7$ count/mL, $19.7 \pm 1.3^\circ\text{C}$, $1185 \pm 157.7 \mu\text{S/cm}$, and 7.79 ± 0.23 , respectively.

4.2.3 Observation of coupons by Scanning Confocal Laser Microscopy

Preliminary experiments provided the sampling times at which the coupons were collected and replaced by new ones. During sampling, the flow was stopped and the reactor was partially emptied. To avoid any disturbance brought by the introduction of a clean surface on the shear profile, sampling was performed in the opposite direction of flow from the outlet to the inlet of reactor. Coupons were stored at 4°C with the growth surface up, in a hermetically closed polyethylene vessel containing an aliquot of water at the bottom to prevent biofilm drying (fig. 34). Microscopic observations were generally carried out the following day and no later than 4 days after sampling. Fungi growth was only detected after one week storage on coupons showing biofilm development.

Coupons were stained with acridine orange (AO) buffered solution (Sigma-Aldrich, 22 μM AO, 5 mM EDTA, 0.15 M NaCl, 0.1 M phosphate-citrate buffer [pH 6]). Acridine orange behaves differently in the presence of DNA and RNA: it exhibits a maximum fluorescence emission at 525 nm (green) for an excitation wavelength of 502 nm when the dye fits between both strands of the double helix, whereas, when bound to RNA, it gives a maximum emission at 650 nm (red) when excited at 460 nm. (Wirtanen *et al.*, 2001 ; Jana-Sur and Chakraborty, 2005 ; Frenster, 1971 ; Lauretti *et al.*, 2003 ; Darzynkiewicz, 1990). This fluorochrome has also been widely used for visualizing mucopolysaccharid acids and glycolyzed proteins (Saunders, 1964 ; Hichs and Matthaei, 1958). The samples were stained with 100 μL of

acridine orange buffered solution during 30 min at room temperature in the dark, and then washed 3 times with ultra-pure water (MilliQ-plus) to remove excess of dye.

Coupons, placed upside-down in glass-bottom dishes (WillCo-Dish[®], Ø 22 mm), were observed with an inverted light microscope (NIKON TE 2000 U) equipped with a confocal head (Radiance 2100 Rainbow, Biorad). Due to the slight concavity of coupons, only objectives ($\times 4$ or $\times 20$ magnification) with long working distances (up to 1mm) were found well-suited for image acquisition. The 488 nm and 457 nm lines of an argon ion laser, close to the excitation maxima of acridine orange, were used as light sources. The fluorescence signals of stained bacteria and exopolymers were recorded in the 530-560 nm frequency range and over 600 nm, respectively. Image stacks (512×512 pixel², corresponding to $344510 \mu\text{m}^2$) were generated using LaserSharp2000[™] software (Bio-Rad Cell Science Division). During sample sectioning, the line by line excitation mode (Lambda-Strobing) was used to reduce bleed-through. It should be noted that CLSM was installed on a pneumatic vibration-proof table to reduce motion of biofilms appendices.

4.2.4 Image processing and 3D reconstruction

Three to five images were acquired in the central region of each coupon using Laserssharp2000[™]. After reassignment of the fluorescence in each channel (bacteria, exopolymers, and coupon surface) with the previous software, image enhancement was performed using Blind Deconvolution (AutoQuant X v1.4.1 software – MediaCybernetics), i.e. the knowledge of the point spread function is not required (Holmes, 1988), binarization and thresholding of images were carried out with MacBiophotonics ImageJ software (NIH, Bethesda, Maryland, USA), and 3D reconstruction of biofilm images and biofilm quantification were performed using Gocad[®] software (Earth Decision, version 2.1.6).

3D reconstruction allowed biofilm three-dimensional modeling, the investigation of biofilm spatial arrangement, and finally morphometric and quantitative analysis of biofilm components. Gocad software was used to model the complex geometry of biofilms. It was previously applied in a spatial arrangement study of activated sludge flocs (Zartarian *et al.*, 1997). Gocad is a geomodeler that defines multi functions for 3D representation of an object. It is programmed in C and C⁺⁺ languages which permits the application of a variety of algorithms allowing the characterization of different object parameters. The application of this software is even possible on natural systems although they present many complications (a non

homogenous structure that may present holes, discontinuity, smooth edges etc...). The object will then be represented as a group of interconnected points and each one has x, y and z coordinate in the space and presentation may be in continue or discrete mode. The discrete mode is the most adapted and used in the case of natural objects (Moyen, 2005). The discrete representation requires object enmeshing in a grid. Two types of grid are possible, grid with regular meshes –voxet- and grid with irregular meshes- Sgrid- (points, polygonal curves, triangulated surface, tetrahedralized solids). In this study, biofilms were represented in regular grid. In this case 2D optical sections were distributed in the voxet volume and the voxel corresponding to the pixel volume will represent the structural unit of the voxet. Hence, data (bacteria and exopolymers) will be illustrated in the voxet as a group of elemental cubes or parallelepiped following the three axes (fig.35). The main disadvantage of this type of grid is the space that generated files occupy in the disk memory; hence powerful computers with big ram are required. For the calculation of biofilm parameters, a script related to every parameter was applied.

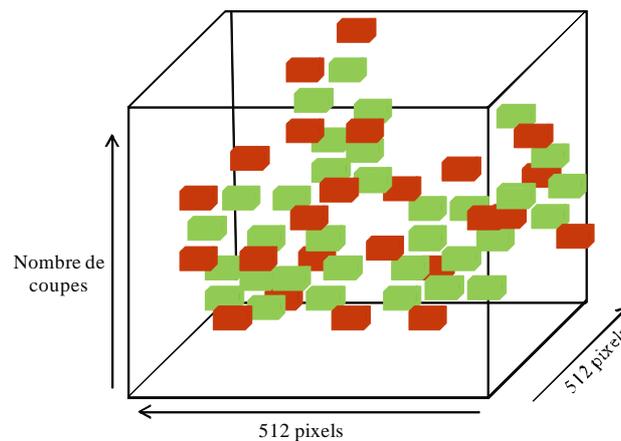


Figure 35 : Schematic representation of a voxet (red : EPS voxel, Green: bacteria voxel).

Initially, binary data files with .vs extension are loaded in Gocad, hence three properties referring to bacteria and exopolymers are automatically created. The use of acridine orange permits the collection of the bacteria and EPS fluorescence separately ; therefore, two voxets were created, the bacteria voxet and the EPS voxet, and the biofilm will then be the merge of these two voxets. Various scripts containing different algorithms were applied on each

property of the biofilm. All the scripts used in this study are given in the supporting information.

Application of 3D reconstruction

In the first step, the biofilm properties undergo dilatation and erosion cycles. The dilatation, unlike erosion, corresponds to adding pixels from binary images, depending on the pattern of neighboring pixels (Russ, 2006), in order to better define the biofilm outline and eliminate the isolated voxels. Dilatation transforms background pixels that are connected with biofilm pixels, into biofilm ones. On the contrary, erosion removes isolated biofilm pixels that have been selected by thresholding. Furthermore, there are different rules to select which voxels to add or to remove and the order for the combination of dilatation and erosion (Russ, 2006).

In our case dilatation and erosion were carried out using a script for each operation. After testing several of combinations dilatation/erosion combinations, the 3D dilatation and 3D erosion were applied by taking into account the 26 adjacent voxels. Dilatation was carried out by adding (turning on) a background voxel in contact with 20 biofilm voxels, while, erosion was conducted by eliminating (turning off) a biofilm voxel in contact with 22 background voxels. Actually, the number of neighbors in erosion and dilatation script is not constant and depends on the number of voxels which composed the biofilm. For instance, in thin and small biofilms, the neighbors' numbers were 15 and 20 for dilatation and erosion operations, respectively.

The number of bacteria and exopolymer, in addition to the number of bacteria and EPS sharing the same voxels, were calculated using a developed Gocad® script based on the data (voxels) originating from bacteria and EPS fluorescences. The volume of bacteria and EPS were calculated separately by multiplying voxels in each voxel by the unitary volume of a voxel. This was calculated by multiplying $x*y*z$ corresponding to a pixel coordinates (μm) obtained in confocal microscopy acquisition. Then, for the determination of biofilm volume, a script consisting of bacteria and EPS voxel merged was applied. Then, the biofilm volume was calculated in the same way as mentioned previously for bacteria and EPS volume calculation.

The biofilm thickness at a given location was determined using a developed Gocad® script using the following steps. First, a projection of top voxels on the basal plane of voxel (substratum) was carried out counting at the same time the number of voxels between each

top voxel and the substratum containing either bacteria voxel or exopolymer voxel. An histogram plotting the overall local thickness was obtained and the average biofilm thickness was defined from the median of the sum of biofilm local thicknesses. The biofilm surface area was calculated using a developed Gocad® script. The number of voxels constituting the basal layer of the biofilm was determined and the surface was calculated by multiplying the number of voxel by the voxel surface area which is $x*y$ corresponding to a pixel 2D coordinates (μm). The coverage area (%) was then determined by normalizing the biofilm surface to the image surface (corresponding to $344510 \mu\text{m}^2$).

4.3 RESULTS AND DISCUSSION

Preliminary tests showed that the biofilm growth on upper coupons was not similar to that on the lower coupons. Actually, the deposited biofilm mass was much more important on the lower coupons due to significant settling of suspended matter. This limited the study to 8 coupons (upper coupons) instead of 16 which meant 8 data points per experiment. Moreover, the availability of confocal microscope and image acquisition, led to minimize the coupon number to six coupons per experiment to prevent a longer storage (i.e. more than 2 days). For these reasons, two types experiments were run, the first one on the initiation phase of biofilm development (short term), and the second one on mature biofilm behavior (long term).

4.3.1 CLSM follow-up of biofilm growth

Biofilm development is known to be a complex process that includes several steps influenced by a number of physical and chemical factors (Celmer *et al.*, 2008 ; Andersson, 2009). The biofilm growth classically starts by bacteria deposition on a preliminary formed film, and then microcolonies begin to develop because of by bacteria multiplication. At maturation phase, the biofilm will have a heterogeneous architecture including bacterial microcolonies separated by gaps and channels. Detachment and dispersal of single cells or clusters in the liquid medium are then observed, thus enabling a further spreading of the biofilm (Costerton, 1999 ; Liu *et al.*, 2000). In our case, those steps are illustrated in figure 36: At the beginning, small microcolonies develop on the coupon surface and later on, the number of microcolonies and the surface colonization increases (72h).

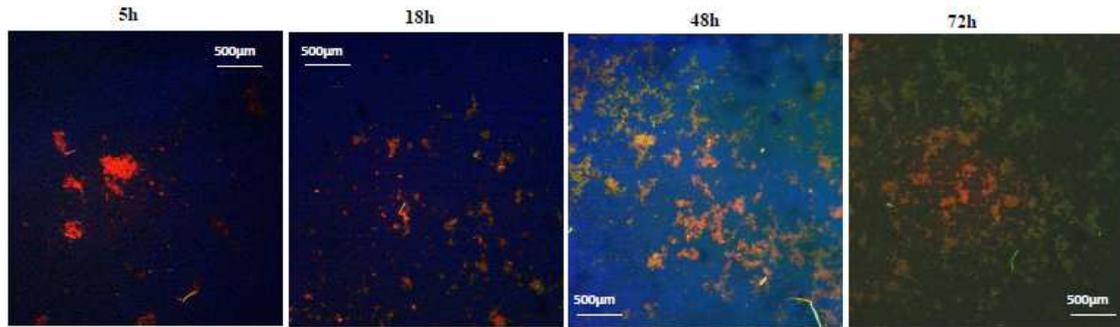


Figure 36: Confocal images of microcolonies size evolution with time

Mass transport plays a crucial role in the biofilm development process. In flowing systems, the transport results from the combination of convection and diffusion (Rijinaarts, 1994 ; Maclaine and Ford, 2002). Hence, a higher fluid velocity yields a higher mass transport towards the surface, which then leads to faster microorganism adhesion although the high shear rate may also induce biofilm detachment (Roosjen *et al.*, 2005, Donlan, 2002). This was clearly noticed in our experiments since colonization at higher wall shear rate ($\gamma=6s^{-1}$) occurred earlier than at the lower shear rate ($\gamma=1s^{-1}$). This is in agreement with Paris *et al.* (2007) who found that tap water biofilm colonized faster the wall of plexiglass blocks in flow chambers at higher wall shear rate.

As mentioned above, the convection-diffusion transport controls the first phase of biofilm development. This implies that equation (4), applied to our case, should lead to superimposed curves of bacteria/unit of surface at both wall shear rate conditions. Indeed, the two curves are superimposed at the first 8h of biofilm development (fig.37a). Domestic sewage is characterized by a large number of microorganism species, but may also contain small fragment of disrupted biofilm from the sewer walls. Nevertheless, the $time*\gamma^{1/3}$ representation as abscissa seems to be working on the other parameters expressing biofilm growth such as surface coverage, thickness and exopolymer count. The curves are not only superimposed at the beginning of biofilm growth, but they show a similar pattern at longer experimental times (fig. 37 b-c).

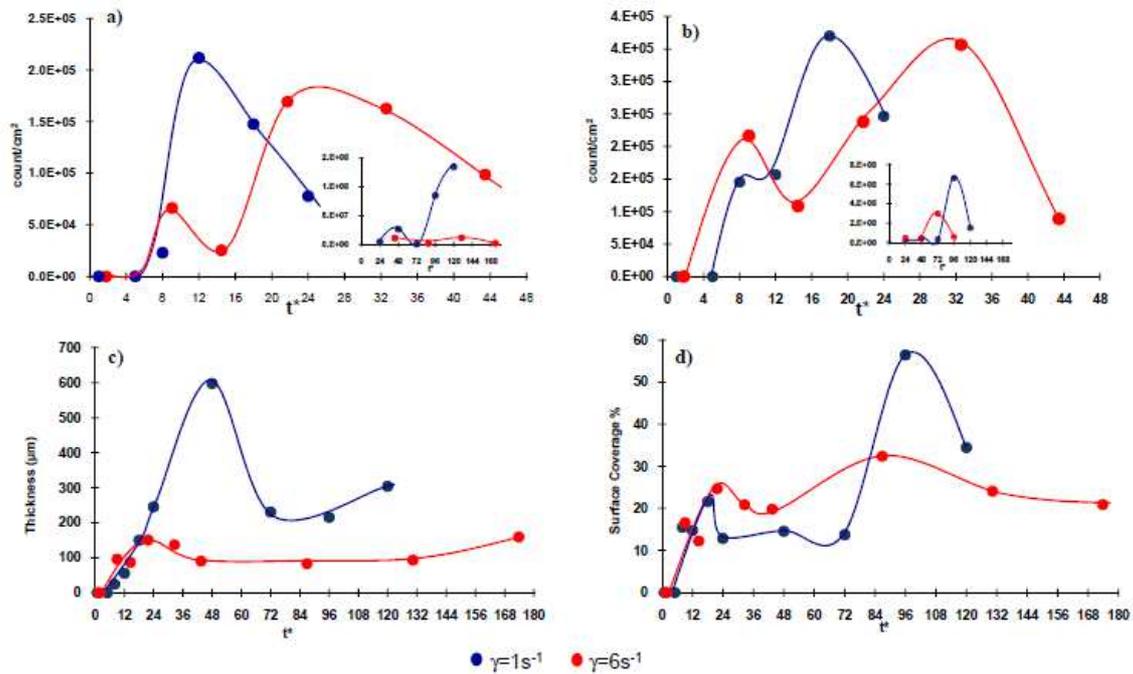


Figure 37: Biofilm structural parameters as a function of t^* . a: bacteria count/cm², b: EPS count/cm², c: biofilm thickness, d: biofilm surface coverage.

3D analysis of confocal images permitted to calculate various biofilm structural parameters such as bacteria and polymer amount per unit of surface, surface and thickness. In addition to it allowed illustrating the biofilm structure in terms of exopolymer and bacteria distribution and the presence of streamers and appendices (fig. 38).

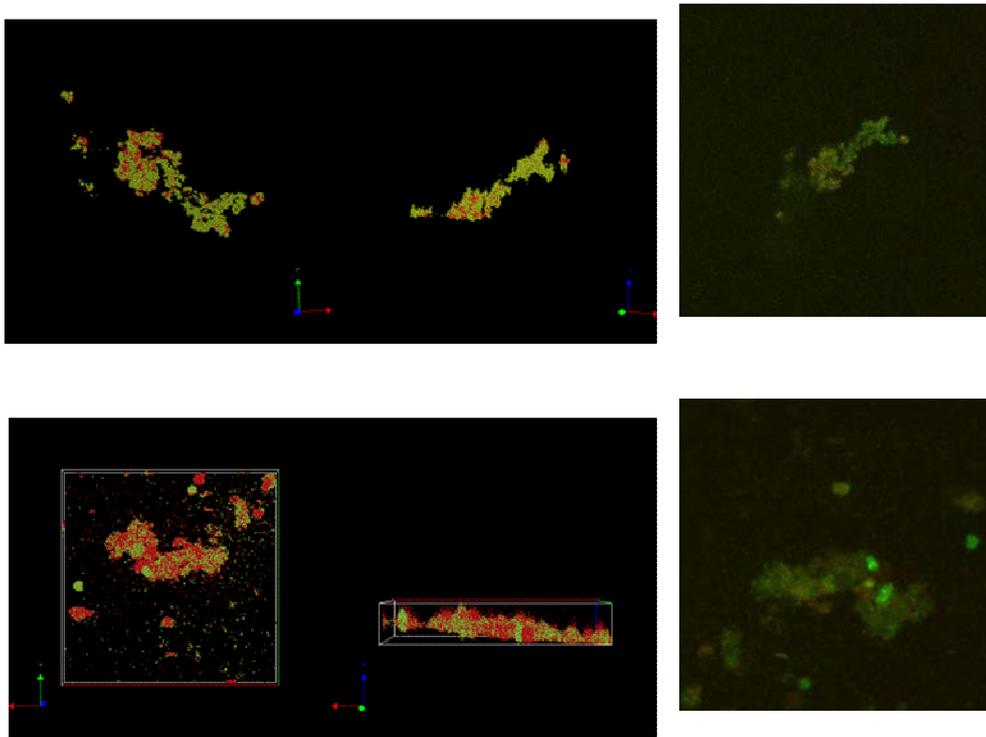


Figure 38: 3D representation of biofilm images reconstructed in Gocad® on the left, and raw corresponding confocal images on the right.

At lower shear rate ($\gamma=1\text{s}^{-1}$) the thickness and the biofilm surface kept increasing in the first 24h with a thickness and surface coverage of respectively $150\ \mu\text{m}$ and 29%. The corresponding behavior at higher shear rate ($\gamma=6\text{s}^{-1}$) was not the same, since the values presented small fluctuations. After each increase in thickness or surface area, a little decrease follows (fig. 39 a-b).

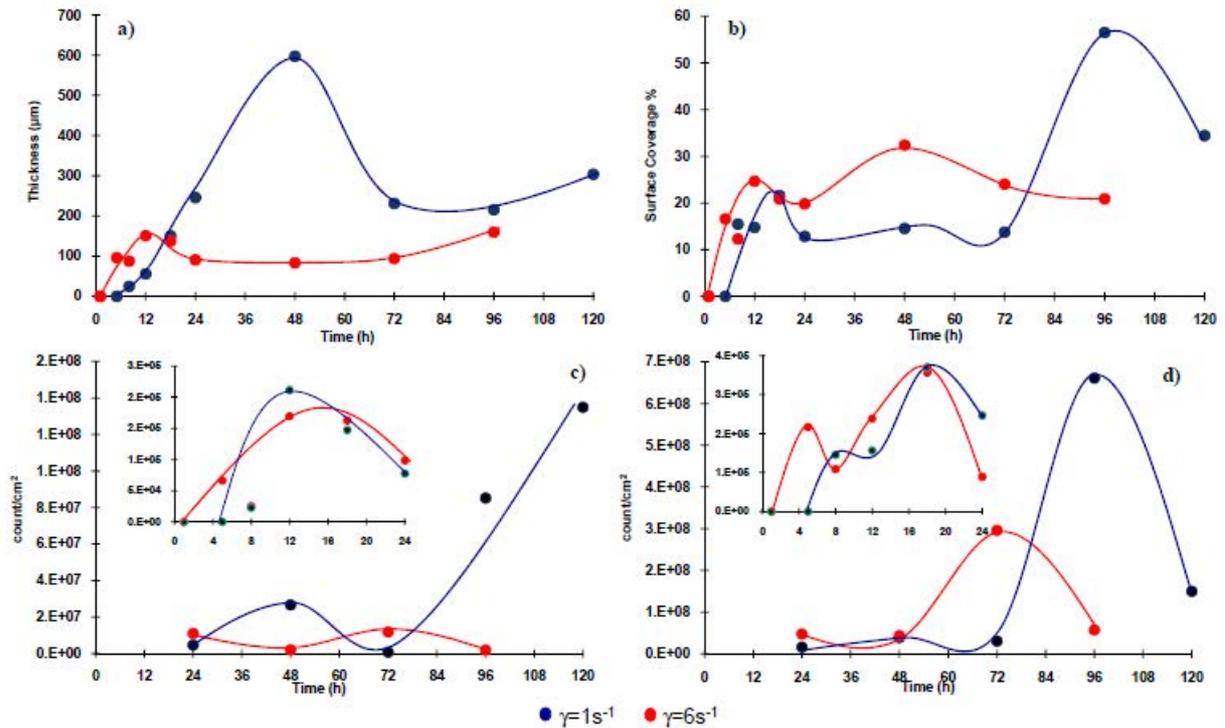
As for structural biofilm components, a high amount of EPS was adsorbed on coupon surfaces due to convection-diffusion transport and in both conditions the amount of EPS was way higher than bacteria (fig. 39 c-d-inset). In the first 12 hours, the EPS load was more important at $\gamma=6\text{s}^{-1}$ $2.2 \times 10^5\ \text{EPS}/\text{cm}^2$ while at $\gamma=1\text{s}^{-1}$ no deposit took place until 8h with an amount of $1.5 \times 10^5\ \text{EPS}/\text{cm}^2$. Afterwards (after 18 hours) the production of EPS strongly increased at $\gamma=1\text{s}^{-1}$. Klapper (2002) also found that the biofilm structure was dominated by the EPS matrix in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms grown under both laminar and turbulent flow. In the first adhesion step, polymeric substances and mineral and organic compound form a conditioning film, and then bacteria start the production of new EPS to ensure irreversible adhesion to the surface. Later on, bacteria begin to produce exopolymers that bridge the microcolonies and form the skeleton of the biofilm (Flemming, 2010, Hermansson, 1999).

On the other hand, the bacteria number did not show the same pattern as the EPS number. In the first 8 hours, no bacteria deposition was observed at $\gamma=1^{-1}$ while a number of cells (6.6×10^4) adhered at the surface at 5h then decreased at 8h. This may represent the first step of reversible adhesion where cell adhesion is not strong and any stress leads to their detachment. This step is fast and lasts from 5 to 10h (Costerton, 1999). After 8h, loads of bacteria were almost the same in both cases and the curves followed the same pattern.

4.3.2 Wall shear rate influence on mature biofilm

3D analysis permitted to calculate different biofilm structural parameters such as bacteria and polymer quantity per unit of surface, surface and thickness. At all sampling times, the biofilms grown at low shear rate were much thicker than those developed at higher shear rate (fig. 39 a). Clemer (2008) also reported higher biofilm thickness at lower shear rate in wastewater biofilms developed in a membrane reactor, as thickness decreased with increased mixing speed. Actually, the top biofilm layer would be the most weakly bonded to the whole biofilm and the probability of its detachment is the highest (Celmer et al., 2008).

At $\gamma=1s^{-1}$, the thickness increased from 24h until a maximum value (600 μm), then drastically decreased to 300 μm at 120h. This may be due to detachment from lower mechanical stability of biofilm structure or when a particle in the bulk hits the biofilm (Morgenroth and Wilderer, 2000). At higher wall shear rate ($\gamma=6s^{-1}$), the behavior was different, thickness proliferation in the z direction was stable (almost 90 μm) during the first 72 hours then increased up to 150 μm at 96h. In fact, as shear stress rises, the EPS production increases and the biofilms become denser, hence the nutrient diffusion at the basal cell layer decreases which leads to thinner biofilms (Costerton., 1999 ; Flemming and Wingender, 2003).



coverage, c: bacteria count/cm², d: EPS count/cm².

The evolution of surface coverage as a function of time was different from the thickness pattern. At $\gamma = 1 \text{ s}^{-1}$, the surface coverage area did not evolve in the first 72 hours (almost 13.7 %) then increased suddenly at 96 hours (60%) then decreased again to 30% (fig. 39b). At higher wall shear rate ($\gamma = 6 \text{ s}^{-1}$), the biofilm growth proceeded in x,y direction for the first 48 hours (32%), then slightly decreased (20%) afterwards. This may be explained by the shear forces resulting from fluid velocity that would limit biofilm growth in both lateral directions (y and z) and even causing detachment of small parts of deposited biofilm (Horn *et al.*, 2003, Picioreanu *et al.*, 2000). In addition, a high thickness results from inactive basal cells in the deep layers of biofilm. This leads to a multiplication and growth of top cells (streamers and fingers) while the cells in the deep layers are “inactive” (Picioreanu *et al.*, 2000).

At each wall shear rate, both bacteria and EPS followed the same pattern with time (figure 39c-d). At wall shear rate 1 s^{-1} , the amount of bacteria increased with time to a maximum value of 1.35×10^8 count/cm² except for coupon 72h (8.33×10^5) where detachment and loss of biofilm during staining step was noted. As for shear rate 6 s^{-1} , values fluctuated between 2×10^6 and 1×10^7 . This fluctuation may be explained by bacteria exposed to a wall shear due to higher flow velocity which may lead to detachment (decrease of bacteria load) and dispersion

in the bulk then re-adsorption of bacteria in response of shear stress (Pereira *et al.*, 2002). Stoodley (1999) explained this by the equation of biofilm accumulation rate. This would be written as: growth rate + attachment rate - detachment rate (Bryers and Characklis, 1981). As mass transfer will increase with flow velocity, leading to an increase of growth rate, the shear rate will also increase leading to biofilm detachment. In other terms, even if the flow velocity increment will bring more cells to the surface, the shear rate will in turn prevent their adhesion to the surface (Stoodly *et al.*, 1999). This also is in agreement with our results as the deposited cells were more numerous at $\gamma=1s^{-1}$ than those observed at $\gamma=6s^{-1}$.

As for EPS, more polymer production was observed at shear $6s^{-1}$ but at 96h a drastic production of EPS was observed at $1s^{-1}$, but did not last as it decreased at 120h. *Sphingomonas sp.* biofilms grown in stainless steel flow cells presented poor concentration of EPS at the beginning then a sudden increase was observed at 96h (Venugopalan *et al.*, 2004). In fact, at higher shear, bacteria tend to produce more polymers that allow them to reinforce their attachment to the surface and their cohesion together by reducing void spaces (Costerton, 1999 ; Flemming, 2010 ; Vandervivere and Kirchman, 1993). This was shown in biofilm grown in turbulent flow compared to those grown under laminar flow. In turbulent flow, the biofilm produced more EPS which minimized the voids between microcolonies and determined a mechanical stability for biofilm (Pereira *et al.*, 2002).

4.4 CONCLUSION

The study of biofilm growth under controlled wall shear rates within a stable laminar flow, allowed us to investigate the effect of wall shear rate on biofilm structure and components organisation. At high flow velocity, bacteria deposition was faster due to higher mass transport at the surface. This was also demonstrated by plotting bacteria accumulation curves, in addition to some structural parameters, against non dimensional time t^* . As for mature biofilm, higher wall shear rate conditions resulted in compact dense biofilms, with large surface spreading and higher EPS load. At lower flow velocity, biofilms were thicker, porous, and growth was noticed to take place in vertical direction. Streamers were also observed in the case of low shear rate, but those were not strong enough and disruption took place during the sample preparation process. A 45° orientation of microcolonies illustrated the hydrodynamic influence on microcolonies and biofilm organisation.

Acknowledgments: R. AL KHATIB would like to thank the Lebanon National Council for Scientific Research for funding her doctoral studies. She would also like to thank the National Graduate School of Geology and especially, the LGA laboratory for their nice welcome when she worked on Gocad for 3D reconstruction.

References

- Andersson S. (2009). Characterization of bacterial biofilms for wastewater treatment. Master report, Royal Institute of Technology, School of Biotechnology: Stockholm, Sweden.
- Bryers J., Characklis W. (1981). Early fouling biofilm formation in a turbulent flow system: Overall kinetics. *Water Research*, 15 (4): 483-491.
- Bishop P., Rittmann B. (1996). Modelling heterogeneity in biofilms: Report of the discussion session. *Water Science and Technology*, 32 (8): 263-265.
- Busscher H., Van der Mei H. (2006). Microbial adhesion in flow displacement systems. *Clinical Microbiology Reviews*, 19(1): 127-141.
- Celmer D., Oleszkiewicz J. A., Cicek N (2008). Impact of shear force on the biofilm structure and performance of a membrane biofilm reactor for tertiary hydrogen-driven denitrification of municipal wastewater. *Water Research*, 42: 3057-3065.
- Chandrasekhar S. (1961). Hydrodynamic and hydromagnetic stability. Oxford Clarendon press
- Costerton J.W. (1999). Discussion: Introduction to biofilm. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 11: 217-221.
- Darzynkiewicz, Z. 1990. Chapter 27 Differential Staining of DNA and RNA in Intact Cells and Isolated Cell Nuclei with Acridine Orange. *Methods in Cell Biology*, 33 (C): 285-298.
- Decho A. (2000). Microbial biofilms in intertidal systems: An overview. *Continental Shelf Research*, 20: 1257-1273.
- Donlan R. M. (2002). Biofilms: Microbial life on surfaces. *Emerging Infectious Diseases*, 8(9): 881-889.
- Flemming H-C, Wingender J. (2010). The biofilm matrix. *Nature Reviews: Microbiology*, 8: 623-633.

Flemming H-C., Wingender J.. (2003). The crucial role of extracellular polymeric substances in biofilms, p. 178-210. In S. Wuertz, P. Bishop, and P. Wilderer (ed.), *Biofilms in wastewater treatment, an interdisciplinary approach*. IWA Publishing, UK.

Frenster J.H. (1971). Electron Microscopic Localization of Acridine Orange Binding to DNA within Human Leukemic Bone Marrow Cells. *Cancer Research*, 31:1128-1133.

Hermansson M. (1999). The DLVO theory in microbial adhesion. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 14: 105-119.

Hicks J.D., Matthaei E. (1958). A selective stain for mucin. *Journal of Pathology and Bacteriology*, 75: 473-476.

Holmes T. J. (1988). Maximum-Likelihood image restoration adapted for noncoherent optical imaging. *J. Opt. Soc. Am.*, 5: 666-673.

Horn H., Reiff H., Morgenroth E. (2003). Simulation of growth and detachment in biofilm systems under defined hydrodynamic conditions. *Biotechnology and Bioengineering*, 81(5): 607-617.

Houhou J, Lartiges BS, Montagres-Pelletier E, Sieliechi J, Ghanbaja J, Kohler A. (2009). Sources, nature, and fate of heavy metal-bearing particles in the sewer system. *Science of the total environment*. *Water Research*, 407: 6052-6062.

Jana-Sur, P., Chakraborty A. K.. (2005). Studies on the interaction of bacterial capsular polysaccharide-Klebsiella K16 with cationic dyes. *J. Photochem. Photobiol. Chem.*, 173: 64-69.

Klapper I., Rupp C. J., Cargo R., Purvedorj B., Stoodley P. (2002). Viscoelastic fluid description of bacterial biofilm material properties. *Biotechnology and Bioengineering*, 80(3): 289-296.

Lauretti F., Lucas De Melo F., Benati F.J., De Mello Volotão E., Santos N., Carvalho Linhares R.E., Nozawa C. (2003). Use of acridine orange staining for the detection of rotavirus RNA in polyacrylamide gels. *Journal of Virological Methods*, 114 (1): 29-35.

- Liu Y., Tay J-H. (2002). The essential role of hydrodynamic force in the formation of biofilm and granular sludge. *Water Research*, 36: 1653-1665.
- MacClaine J.W., Ford R.M. (2002). Adhesion of motil and nonmotil *Escherechia Coli* to glass. *Biotechnology and Bioengineering*, 78(2): 179-189.
- Morgenroth E., Wilderer P.A. (2000). Influence of detachment mechanisms on competition in biofilms. *Water Research*, 34 (2) : 417-426.
- Moyen R. (2005). Paramétrisation 3D de l'espace en géologie sédimentaire : le modèle GeoChron. Thesis report. Doctorat de l'Institut National Polytechnique de Lorraine : Spécialité Géosciences.
- Mueller R. F. (1996). Bacterial transport and colonization in low nutrient environments. *Water Research*, 30(11): 2681-2690.
- Nielson A.H., Vollertsen J., Stokbro Jensen H., Wium-Andersen T., Hvite-Jacobsen T. (2008). Influence of pipe material and surfaces on sulfide related odor and corrosion in sewers. *Water Research*, 42:4206-4214.
- Paris T., Skali-Lami S., Block J-B. 2007. Effect of wall shear rate on biofilm deposition and grazing in drinking water flow chambers. *Biotechnology Bioengineering*, 97 (6), 1550-1561.
- Pereira M., Keuntje M., Wuertz S., Neu T., Melo L. (2002). Effect of flow regime on the architecture of a *Pseudomonas fluorescens* biofilm. *Bitechnology and Bioengineering*, 78(2): 164-171.
- Piciooreanu C., Van Loosdrecht M., Heijnen J. (2000). Effect of diffusive and convective substrate transport on biofilm structure formation: A two-dimensional modeling study. *Biotechnilogy and Bioengineering*, 69(5): 469–583.
- Purevdorj-Gage L.B., Stoodley P. (2004). Biofilms structure, behavior, and hydrodynamics. *Microbial Biofilms*. G. A. O. T. Mahmoud Ghannoum. Washington, ASM Press.
- Rijnaarts H. H. M. (1994). Interactions between bacteria and solid surfaces in relation to bacterial transport in Porous media. Publisher: Landbouwniversitet te Wageningen.

- Roosjen A., Boks N.P., Van Der Mei H.C., Busscher H.J., Norde W. (2005). Influence of shear on microbial adhesion to PEO-brushes and glass by convective-diffusion and sedimentation in a parallel plate flow chamber. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 46 (1, 25) : 1-6.
- Russ J. C. (2006). *The image processing handbook*. CRC Press, Boca Raton FL.
- Saunders A.M. (1964). Histochemical identification of acid mucopolysaccharides with acridine orange. *Journal of Histochemistry*, 12:164-170.
- Skali Lami S. (1991). Contribution à l'étude de l'écoulement de pâte à papier interaction floculation-turbulence. Thesis report, Docteur ES Sciences. INPL-Nancy.
- Stoodley P., Dodds I., Boyle J.D., Lappin-Scott H.M. (1999). Influence of hydrodynamics and nutrients on biofilm structure. *Journal of Applied Microbiology Symposium Supplement*, 85(28): 19S-28S.
- Vandevivere P., Kirchman D.L. (1993). Attachment stimulates Exopolysaccharide synthesis by a bacterium. *App. Environ. Microbiol.*, 59: 3280-3286.
- Venugopalan P., Kuehn M., Hausner M., Springael D., Wilderer P.A., Wuertz S. (2005). Architecture of a nascent *Sphingomonas* sp. Biofilm under varied hydrodynamic conditions. *Applied and Environmental Microbiology*, 71 (5): 2677-2686.
- Vrouwenvelder J., Riviere J., Van der Meer W, Loosdrecht M., Kruithof J. (2010). Impact of flow regime on pressure drop increase and biomass accumulation and morphology in membrane systems. *Water Research*, 44: 689-702.
- Wagner M., Ivleva N. P., Haisch C., Niessner R. (2008). Combined use of confocal laser scanning microscopy (CLSM) and Raman microscopy (RM): Investigation on EPS-Matrix. *Water Research*, XXX: 1-14.
- Wirtanen G., Salo S., Helander I.M., Mattila-Sandholm T.. (2001). Microbiological methods for testing disinfectant efficiency on *Pseudomonas* biofilm. *Colloides Surf. B Biointerfaces.*, 20: 37-50.

Zartarian F., Mustin C., Villemin G., Ait-Ettager T., Thill A., Bottero J. Y., Mallet J. L., Snidaro D. (1997). Three-Dimensional Modeling of an Activated Sludge Floc. *Langmuir*, 13:35-40.

Zhu S., Chen S. (2001). Impacts of Reynolds number on nitrification biofilm kinetics. *Aquacultural Engineering*, 24: 213–229.

**Chapitre 5 : CARACTERISTIQUES DES EAUX
USEES DANS LES PAYS EN DEVELOPPEMENT:
IMPLICATION DANS LA GESTION DES EFFLUENTS**

La gestion des eaux usées, leur traitement, et leur éventuelle valorisation, ont été parmi les dernières préoccupations des municipalités dans les pays en voie de développement. Ceci est dû en premier lieu au manque de conscience de l'impact des rejets de ces eaux usées sans traitement préalable dans le milieu naturel. De plus, les moyens financiers et techniques dont disposent ces pays, sont restreints et limités ce qui retarde énormément la construction de stations de traitement appropriées. Le problème ne se limite pas au manque de stations de traitement: dans la plupart des pays méditerranéens, les réseaux d'assainissement et la collecte des eaux usées ne sont effectuées que dans les grandes villes, alors que les villages et les banlieues se trouvent dépourvues de ce service.

Avec l'urbanisation et l'industrialisation, la production des eaux usées augmente et leur composition et caractéristiques deviennent de plus en plus complexes et variées. Les traitements conventionnels utilisés dans les stations d'épuration des pays développés peuvent se révéler être inadéquats et la recherche de nouveaux moyens d'épuration s'avère être nécessaire.

Ce travail porte en un premier lieu, sur l'étude de la spéciation de la matière organique et des contaminants métalliques contenus dans les matières en suspension et biofilms des eaux usées urbaines de Jounieh (Liban) qui sont rejetées dans la mer méditerranée. Comme la qualité de ces eaux est complexe et varie selon l'environnement urbain (type d'habitat, industries locales,...), l'échantillonnage a eu lieu pendant les jours ouvrables et les weekends. Nous nous sommes également intéressés au rôle des biofilms en tant que réacteurs bio-physico-chimique et à leur influence sur le devenir des polluants dans les eaux usées. Ces biofilms permettent notamment d'enregistrer une partie de l'historique de la contamination présente dans le réseau d'assainissement.

Characteristics of urban wastewater in emerging countries: Implications for effluent management

R. AL KHATIB^{1,2*}, B.S. LARTIGES^{1,3*}, A. EL SAMRANI^{2*}, P. FAURE⁴, J. HOUHOU^{1,2},
J. GHANBAJA⁵

¹ Nancy University - LEM-ENSG/INPL-CNRS, Pôle de l'Eau, 15 Avenue du Charmois, BP 40, 54 501 Vandœuvre Cedex, FRANCE

² Lebanese university-Faculty of Sciences-Doctoral School-Platform of Research for Environmental Sciences-Campus Hadath, Lebanon

³ University of Toulouse – GET – 14, Avenue E. Belin, 31400 Toulouse, France

⁴ Nancy University - SCMEM-FST/UHP, 7137 boulevard des Aiguillettes, BP 239, 54506 Vandoeuvre Cedex, FRANCE

(*) To whom correspondence should be addressed

E-mail: bruno.lartiges@get.obs-mip.fr

rime.alkhatib@ensg.inpl-nancy.fr

elsamrani@hotmail.com

ABSTRACT

In emerging countries, the aquatic environment is often highly degraded by the discharge of untreated sewage from urbanized areas. Adapting any treatment technology to the local situation, modelling the environmental impact of pollution, requires a better knowledge of contaminants contained in the urban effluents. In this paper, analytical scanning and transmission electron microscopy, sequential chemical extraction of heavy metals and pyrolysis-gas chromatography on solvent extractable organic matter, are used to provide both direct and indirect speciation of sewage suspended solids and biofilm samples from an urban sewer. Compared to developed countries where the domestic activities represent the main source of heavy metal pollution in wastewater, the combined sewer system of an emerging country also integrates significant contributions from the private drinking water supply system, industrial discharges, and road dust transported by street washing. The dynamic chemical environment of the sewer is shown to induce drastic changes in the speciation of many metals over a short time scale. Sewer biofilms can be used as environmental archives since they provide a good averaging of contaminant loads for those urban effluents that are highly variable in nature and concentration. Electron microscope observations of heavy metal-bearing phases proved to be necessary to provide a consistent interpretation of chemical extraction results.

Keywords: urban wastewater, biofilm, heavy metal, electron microscopy.

5.1 INTRODUCTION

The lack of wastewater treatment facilities in emerging countries leads to a substantial release of contaminants in the aquatic environment from urbanized areas (Mara, 2004). The environmental impacts of those discharges are quite diverse, from a severe sediment contamination in the vicinity of outfalls, heavy metal accumulation across trophic levels, changes in the assemblage of the phytoplankton community due to nutrient additions from sewage, and on a larger scale, to a significant perturbation of element geocycling (Galloway, 1979, Krepakevich and Pospelova, 2010 ; Azzurro *et al.*, 2010 ; Reopanichkul *et al.*, 2010).

While previous research has mainly focused on determining the loadings of contaminants from the effluent to the receiving environment and on evaluating the areas affected by the anthropogenic discharges (Galloway, 1979 ; Gromaire *et al.*, 2000 ; Gasperi *et al.*, 2008 ; Hwang *et al.*, 2009 ; Krepakevich and Pospelova, 2010), studies clarifying the nature of organic matter in sewage or the speciation of heavy-metal bearing particles in urban wastewater, remain scarce (El Samrani *et al.*, 2004 ; Houhou *et al.*, 2009b ; Mansuy-Huault *et al.*, 2009). Such information is nevertheless a prerequisite for the modeling of contaminant mobility and bioavailability in the receiving watercourses. Improving the existing knowledge about the quality of local effluents, also contributes to a better design of wastewater treatment plants to be built in emerging countries, and on the long term, is necessary to assess any change in environmental policy regarding the urban water cycle.

The main purpose of this study is then to investigate the nature of heavy metal-bearing particles and organic matter contained in an urban wastewater which is injected to the Mediterranean Sea. As such effluents are known to be complex and highly variable in composition (Soonthornnanda and Christensen, 2008), sampling was conducted during weekdays and weekends, and biofilms in contact with the wastewater were also characterized as potential historical records of contaminant inputs in the sewer system. In addition to chemical analyses that provided the total metal concentrations, both electron microscopy combined with energy dispersive X-ray spectrometry and sequential extraction were used to describe the speciation of heavy metal-bearing particles, whereas solvent extractable organic matter was characterized by gas chromatography-mass spectrometry.

5.2 EXPERIMENTAL SECTION

5.2.1 Study area

Sewage samples were taken from Golden Star pumping station (GS) that discharges wastewater collected from the Keserwan urban area (Jounieh, Lebanon) into the sea at Tabarja bay (fig. 40). In Lebanon, more than 85 % of the wastewater generated - 249 Mm³ of domestic sewage and about 43 Mm³ of industrial effluent every year - are directly discharged into the Mediterranean Sea through 53 main outfalls (Karaa *et al.*, 2005 ; State of Environment , 2001 ; El-Fadel *et al.*, 2001 ; Bdour *et al.*, 2009).

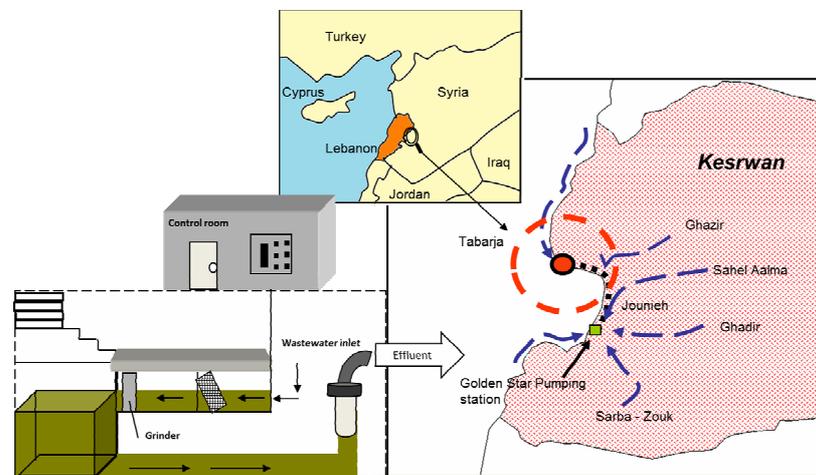


Figure 40: Location of study area and schematic of Golden Star pumping station

The Keserwan combined sewer receives both domestic sewage from about 128 000 people, and industrial wastewater originating from local jewelry makers, glass carving stores, a leather tannery, a metal plating industry, ceramic tile industries, a vegetable oil industry, and a textile dyeing factory (State of Environment, 2001 ; El-Fadel *et al.*, 2001, EM water, 2004). In addition, septic service trucks frequently unload effluent between 11h00 and 17h00 upstream of GS pumping station, which strongly impacts the sewage characteristics for a few minutes. GS pumping station includes a bar screen at the inlet to protect the pumps from large solids, a 200 m³ collection basin, and it handles wastewater at a 250 L/s pumping rate.

5.2.2 Sampling and sewage characterization

Sampling campaigns were conducted under dry-weather conditions in the time period September 2007 to September 2009. Sewage grab samples (20 weekday and 7 weekend samples) were taken from the collection basin and were immediately characterized for temperature, pH, and conductivity (WTW – Multiline F/SET), and turbidity (Hach 2100P). The wastewater characterization also included the measurements of Biological Oxygen Demand (BOD₅) (VELP Scientifica FTC 90I, Italy), Chemical Oxygen Demand (COD) (VELP Scientifica ECO 16, Italy), and a rough determination of Total Suspended Solids (TSS) by drying duplicates of 10 mL sewage at 105°C for 24 h. The sewage was filtered on-site through pre-washed 0.22 µm pore size cellulose-acetate filters (Chromafil® CA-20/25) and the filtrates were analyzed for metals (Perkin-Elmer ELAN 6000 ICP-MS), anions (Ionic Chromatography ICS3000 Dionex), and Dissolved Organic Carbon (Leco SC144 DRPC). Biofilm samples were scrapped off the collection basin walls and stored at 4°C in glass vials until analysis. The bulk chemical analyses of three biofilm samples collected at different sampling dates and one suspended matter sample were conducted by ICP-MS after LiBO₃ fusion and HNO₃ dissolution. Samples of drinking water were collected from 5 houses located in the vicinity of GS pumping station.

5.2.3 Characterization of heavy metal-bearing phases

Freeze-dried suspended matter collected on filters and biofilms were examined using both Transmission (Philips CM20) and Scanning (Hitachi 54800) Electron Microscopes equipped with Energy-Dispersive X-ray Spectrometers (EDXS). For TEM imaging and microanalysis, the samples were resuspended in ethanol under ultrasonication, and a drop of suspension was evaporated on a carbon-coated copper grid (EuroMEDEX, Mesh 200). A spot size of about 70 nm was used to record EDX spectra with a counting time of 40 seconds. EDX calibration standards were run to obtain quantitative analyses of major and trace elements with a detection limit of about 100 ppm. SEM-EDXS analyses were performed on samples deposited on double sided carbon adhesive tape, and were carbon coated. Backscattered electron imaging (BEI) was used to locate the particles of interest. In that mode, brightness is related to the average atomic number of materials, and, provided that the heavy element content is sufficient, the heavy metal-bearing mineral phases appear as bright spots that can be easily

detected within the organic matrix of samples such as biofilms or sewage suspended matter (Houhou *et al.*, 2009b).

The above direct speciation mode was completed with a sequential extraction analysis of heavy metals inspired by modified Tessier four-step extraction procedure (Tessier *et al.*, 1979). The method, summarized in Table 3, allows to discriminate the forms of heavy metals contained in exchangeable, soluble, reducible, oxidizable, and residual fractions, noted hereafter F1, F2, F3, F4, and F5, respectively. The heavy metal concentrations in each fraction and the total heavy metal load were determined by Atomic Absorption spectrometry (Analytik Jena, Zeenit 700).

Table 3: Summary of the sequential extraction procedure used to assess heavy metal fractionation in Golden Star samples (suspended solids and biofilms).

Extraction step	Operationally defined fraction	Experimental conditions (for 5 g of freeze-dried sample)
I	F1 Exchangeable	40 mL 0.5 M NaNO ₃ - 30 min of mixing at room temperature – centrifugation at 5000 rpm for 30min
II	F2 Soluble	40 mL 0.1 M EDTA added to the residue from step 1 - 30 min of mixing at room temperature - centrifugation at 5000 rpm for 30min
III	F3 Reducible	20 mL sodium citrate (79.4 g/L) and 20 mL NaCO ₃ (9.82 g/L) are added to the residue from step 2 - 30 min of mixing at 80°C, then 1 g of sodium bi-sulfite is added to the mixture - 30 min of further mixing at 80°C - centrifugation at 5000 rpm for 30min
IV	F4 oxidizable	20 mL H ₂ O ₂ (35%) and 8 mL 0.02 M HNO ₃ are added to residue from step 3 - 4 hours of mixing at 85°C, then 12 mL of 3.2 M CH ₃ COONH ₄ , and 20 % (v/v) of 3 M HNO ₃ are added to mixture - 30 min of further mixing at 85°C - centrifugation at 5000 rpm for 30min.
V	F5 Residual	40 mL HNO ₃ (65 %) are added to the residue from step 4 - 30 min of mixing at 20°C followed by centrifugation at 5000 rpm for 30min.

5.2.4 Characterization of organic matter

Resin-embedded samples of sewage suspended matter and biofilm were prepared for TEM observation. The samples, first fixed with glutaraldehyde and osmium tetroxide, were passed through stepwise acetone dehydration, before being impregnated in a graded series of epoxy resin monomer in acetone solutions, and finally polymerized in molds at 60°C for 24h (Lartiges *et al.*, 2001). Sections (100 nm thick) were cut on a Reichert OM U2 ultramicrotome with a diamond knife, stained with lead citrate and uranyl acetate, and placed on copper grids for TEM examination.

The solvent extractable organic matter was separated using a ASE200 DIONEX automated solvent extraction system. The freeze-dried sample (1 g) was first mixed with 15 g of Fontainebleau sand, copper chips being also added for desulphurization. The organic compounds were then extracted using methylene chloride (MC), and the extract was evaporated to dryness. The residue was dissolved in 4 mL MC, an aliquot of 15 mg was taken to dryness, and redissolved in 300 µL MC. The organic compounds were then separated into aliphatic, aromatic, and polar fractions using alumina and silica chromatographic columns. The aliphatic and aromatic fractions were eluted from the alumina column with 3 mL MC, whereas the residual polar fraction was eluted with 50/50 vol% methanol/MC. The aliphatic compounds were then separated from the aromatic fraction using the silica column with 3x1 mL pentane. Finally, the aromatic fraction was recovered by washing the silica column with 5x500 µL of 35/65 vol% MC/pentane mixture. The polar fraction was purified on the silica column with 50/50 vol% methanol/MC. The three fractions were taken to dryness, the aliphatic and aromatic compounds were redissolved in hexane, whereas the polar fraction was derivatized with 150 µL of BSTFA and 250 µL of MC at 60°C for 15 min.

Gas Chromatography (GC) was carried out using a Hewlett-Packard G1800A (Agilent Technologies) equipped with a DB 5-MS 60 m*0.125 mm capillary column, linked to a Hewlett-Packard G1034C Mass Spectrometer operating in fullscan mode. The injector was in splitless mode at 300°C, the GC oven initial temperature being initially set at 70°C for 2 min, followed by a 15°C min⁻¹ ramp to 130°C, then by a 3°C min⁻¹ ramp to 315°C, and a final hold for 15 min. Helium was the carrier gas set at a flow rate of 1.4 mL/min.

5.3 RESULTS AND DISCUSSION

5.3.1 Wastewater quality and major inorganic species

The main characteristics for Golden Star sewage are presented in table 4. In accordance with the Mediterranean climate experienced by the coastal area of Lebanon, the average temperature of GS sewage is rather high, which certainly favors the bacterial activity and may stimulate mineral precipitation such as carbonates within the sewer system (Pantsar-Kallio *et al.*, 1999 ; Eriksson *et al.*, 2000). Nevertheless, on the whole, the mean values of parameters measured on GS sewage fall within the ranges classically reported in the literature for wastewaters (Tchobanoglou *et al.*, 2003).

Table 4: Routine wastewater parameters at Golden Star pumping station during weekdays and weekends.

	Weekday	Weekend
pH	7.6±0.3	7.7±0.2
Conductivity (µS/cm)	1209±100	1764±215
Turbidity (NTU)	241 ± 73	280±47
Redox potential (mV)	-269±53	-181± 43
Dissolved oxygen (ppm)	0.5±0.03	0.96 ± 0.46
TSS (mg/L)	1108.6±153.2	ND*
BOD ₅ (mg/L)	109.7±6.8	ND*
COD (mg/L)	256.9±55.5	ND*
Temperature (°C)	26.4±0.8	18.1±4.5

*ND not determined

During weekdays, the relatively low values noted for conductivity, BOD₅ and COD concentrations, certainly reflect the contribution of industrial wastewaters to the effluent load.

The COD/BOD₅ ratio is about 2.3, thus indicating that GS organic matter is easily biodegradable.

Table 5 lists the soluble concentrations of major inorganic ions in GS sewage and tap water. In Lebanon, the drinking water supply often relies both on municipal supply and private groundwater extraction (Korfali and Jurdi, 2007). As the drinking water samples were collected at various houses around the study site, this explains why, in tap water, the standard deviations for measurements of potassium, magnesium, calcium, and to a lesser extent chlorine, are rather important. Notable differences can be observed between weekend and weekday effluents. Thus, the phosphate level in weekend wastewaters is much higher than in weekday sewage. However, at the moment, Lebanon has not yet banned orthophosphate in laundry detergents, and the phosphate load can certainly be related to the frequent use of washing machines during the weekend (Almeida *et al.*, 1999 ; Eriksson *et al.*, 2002 ; Butler *et al.*, 1995 ; Comber *et al.*, 1996 ; Heitland *et al.*, 2006 ; Gray and Becker, 2002). The amount of sulfate and sodium in the weekend sewage may also be explained in part by the use of washing powder, since those ions are common constituents of traditional detergents (Eriksson *et al.*, 2002). Nevertheless, some Na and SO₄ ions certainly originate from human excreta. Interestingly, tap water represents a principal source of nitrate in GS wastewater. However, as can be observed in the oxygen-depleted weekday wastewater, microbial denitrification may occur in the sewer system and hence, remove all the nitrate content.

Table 5: Soluble concentrations of major inorganic ions in GS sewage and tap water.

Ion (mg/L)	Weekday sewage	Weekend sewage	Tap water
PO ₄ ³⁻	1.91 ± 3.2	17.98 ± 2.32	BDL*
SO ₄ ²⁻	43.05 ± 13.4	80.61 ± 9.4	11.2 ± 2.3
Cl ⁻	218.02 ± 61.7	270.77 ± 26.46	105 ± 14.8
NO ₃ ⁻	BDL*	3.28 ± 0.53	3.64 ± 0.93
Na ⁺	114.4 ± 10.6	191.2 ± 23.9	5.1 ± 0.8
K ⁺	21.34 ± 4.5	21 ± 2.5	6.4 ± 8.2
Ca ²⁺	55.87 ± 5.04	60.5 ± 1.3	63.2 ± 24.7
Mg ²⁺	17.98 ± 0.92	32.9 ± 2.2	27.6 ± 20.5
Ba ²⁺ × 10 ⁻³	16.64 ± 0.54	20.1 ± 1.7	27.6 ± 8.2

* Below Detection Limit

In contrast, the concentrations of Ba, Ca, and K, in both weekday and weekend effluents are almost constant. Tap water is the main source of calcium and barium in GS wastewater. These cations usually exhibit a non-conservative behaviour in the sewer system with frequent precipitations of carbonates and barite (Eriksson *et al.*, 2000 ; Houhou *et al.*, 2009a). In our case, the solubility calculations indicate that the weekend effluent is indeed slightly supersaturated with regard to barite, whereas the weekday sewage is close to saturation. Human excreta are generally considered as the main contributor to the potassium load in wastewater (Verbanck *et al.* 1989 ; Vinneras and Jönsson, 2002). Hence, the constancy of dissolved K in both weekday and weekend sewages appears rather puzzling, since it would suggest that the dilution of domestic sewage due to industrial discharges is actually negligible.

On the contrary, chlorine known to behave most often conservatively (Viers *et al.*, 2001), implies a one-third dilution of domestic wastewater by the industrial discharge, provided that industrial wastewater does not contribute to the chlorine budget.

5.3.2 Heavy metal loads in GS sewage

The dissolved metal concentrations in GS sewage and tap water are given in Table 6

Table 6: Dissolved and total metal concentrations in GS sewage, tap water, biofilms, and total suspended matter. BDL: Below Detection Limit. NA: Not Applicable.

Metal	Tap water ($\mu\text{g/L}$)	Weekend sewage ($\mu\text{g/L}$)	Weekday sewage ($\mu\text{g/L}$)	Suspended matter ($\mu\text{g/g}$)	Biofilm ($\mu\text{g/g}$)	Total metal in weekday sewage ($\mu\text{g/L}$)
As				2.03	2.67	
Bi	0.0027 ± 0.002	0.012 ± 0.015	0.015 ± 0.002	4.157	3.01 ± 0.50	4.62
Cd	0.028 ± 0.017	0.024 ± 0.012	0.03 ± 0.007	0.925	0.91 ± 0.35	1.05
Co	0.15 ± 0.06	0.38 ± 0.06	0.32 ± 0.04	1.687	1.87 ± 0.20	2.18
Cr	3.18 ± 1.79	17.50 ± 5.29	6.75 ± 0.15	25.36	55.16 ± 8.86	34.84
Cu	3.53 ± 3.37	5.49 ± 3.49	31.43 ± 23.13	126.3	173.93 ± 33.08	171.37
Ni	3.08 ± 0.63	6.87 ± 0.67	5.44 ± 0.2	30.4	21.86 ± 2.48	39.1
Pb	0.17 ± 0.11	0.73 ± 0.35	0.89 ± 0.12	130.85	103.06 ± 15.90	145.8
Sn				20.38	118.5	
Zn	284.14 ± 248.67	43.73 ± 12.69	46.02 ± 15.22	1180	987.67 ± 328.96	1353.4
Mn	0.33 ± 0.34	8.24 ± 6.09	27.96 ± 9.33	BDL	BDL	NA

Obviously, the dissolved Zn found in wastewater essentially originates from tap water. Indeed, even though the municipal drinking water system mainly uses unlined iron and cast iron pipes, the private distribution network is made up of galvanized iron and stainless steel pipes (Korfali and Jurdi, 2007). The high level of Zn, but also part of dissolved Ni and the considerably high Cr concentration with regard to the maximum admissible concentration in drinking water (EU Directive 98/83), can then be related to the corrosion of those pipes (Sorme and Lagerkvist, 2002, Comber *et al.*, 1996, Kamar, 2009, Houhou *et al.*, 2009b). Similarly, the value of dissolved Al in sewage can be explained by the Al input from drinking water since an aluminum coagulant is used at Dbayeh treatment facility supplying the study site. On the other hand, the levels of Cr and Ni strongly increase in weekend wastewater, which is in accordance with previous reports showing that household sources releasing stainless steel fragments such as washing machines, dish washers, kitchen cookware, and kitchen sinks, are significant contributors for those metals in sewage (Chino *et al.*, 1991 ; Sorme and Lagerkvist, 2002 ; Comber and Gunn, 1996 ; Houhou *et al.*, 2009b). The contribution of industrial discharges to the soluble metal load in weekday sewage concerns essentially Cu and Mn. Both metals may be tentatively related to the activity of a metal plating industry located nearby (State of Environment, 2001).

Table 6 also presents the total metal loads in weekday wastewater, as well as the heavy metal contents found in suspended matter and in three biofilms collected at various times over the period of the study. Obviously, most of the metal load transported in GS wastewater is associated with suspended solids. This may explain why the heavy metal levels found in biofilms are equivalent with those measured for sewage suspended matter, and why they are rather constant over time. Indeed, in those sewer biofilms, the quantity of metal adsorbed from solution should be negligible in comparison with the amount of suspended solids transferred to the wall by shear forces. In that case, the biofilm should provide a continuous and quantitative record of the particle contamination history in the sewer. Such view has been previously put forward by Rocher *et al.* (2004) for hydrocarbons stored in sewer biofilms.

The total heavy-metal levels in weekday wastewater appear rather high in comparison with those typically reported in the literature (Gasperi *et al.*, 2008 ; Houhou *et al.*, 2009b). High concentrations in Zn and Pb are usually attributed to roof runoff (Chebbo *et al.*, 2001). This explanation cannot hold for the study area, the major source of Zn in GS sewage being probably tap water. On the other hand, the Pb pollution found in wastewater should rather be

linked with the urban road dust sediment that is transferred to the combined sewer by frequent morning street-washing (Gromaire *et al.*, 2000 ; Barrett *et al.* 2010). It should be noted that in Lebanon, leaded gasoline remains a common grade, and average Pb concentrations as high as 353 $\mu\text{g/g}$ have been measured in roadside dust along urban streets (Hashisho and El Fadel, 2004). Part of Zn and Cd load may also originate from traffic-induced emissions (Legret and Pagotto, 1999, Sorme and Lagerkvist, 2002). The total Cu concentration appears to be significantly higher than usual copper levels reported in the literature for wastewater (Gasperi *et al.*, 2008 ; Houhou *et al.*, 2009b), the main source of this element in GS sewage likely originating from the discharge of metal plating wastes. In a previous paper, Houhou *et al.*, (2010b) reported that very similar concentrations of total Cu, Zn, Cd, Ni, and Cr, are measured nowadays in the sewage of various western cities. Such observation, attributed in part to the globalization of consumer behavior, cannot be extended to countries such as Lebanon where a stringent environmental legislation for industrial discharges has not been implemented yet.

5.3.3 Nature of heavy metal-bearing particle

The dominant crystalline phases revealed by X-ray diffraction in the biofilms were quartz (SiO_2), bassanite ($\text{CaSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$), and anatase (TiO_2). Bassanite is very likely formed during the freeze-drying of samples since the solubility calculations indicate that such a species is not stable in GS sewage. The occurrence of abundant quartz particles in sediments from a separate sewer system has been related to its use as scouring powder in household cleaning (Houhou *et al.* 2009b), but in the present case (combined sewer), it may also result from sand used for construction work and mobilized by street cleaning. The presence of anatase may be attributed to its use as pigment in a ceramic industry located in the vicinity of Golden Star pumping station.

A direct speciation of heavy metal-bearing particles contained in sewage suspended solids and in sewer biofilms was carried out by combining electron microscopy with EDXS analysis. Barium sulfate and barium sulfate associated with zinc sulfide, iron oxides, metal sulfides, and various alloys, were the phases commonly identified using this approach (fig. 41).

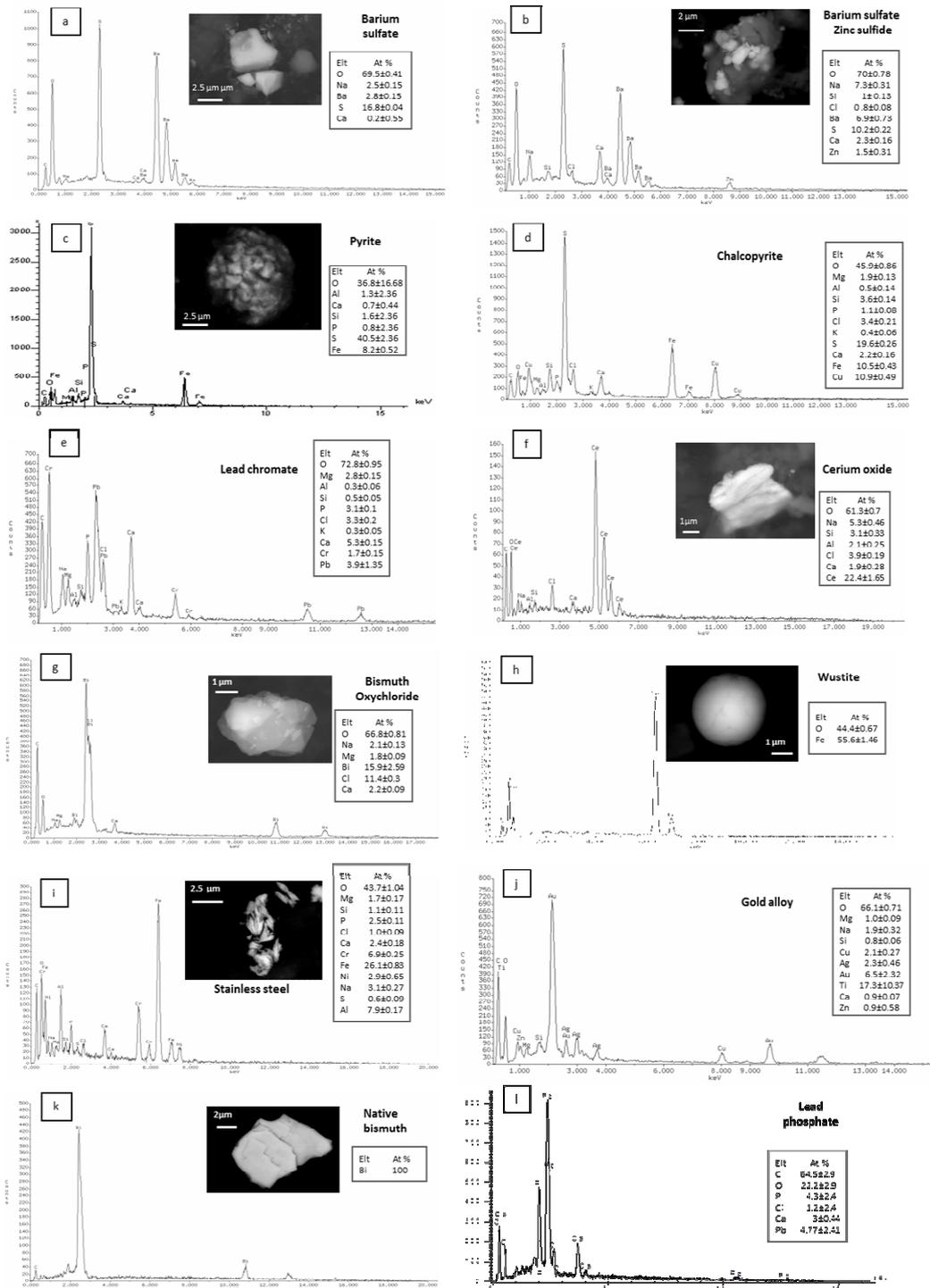


Figure 41: Electron micrographs and EDXS spectra of typical heavy metal-bearing particles found in Golden Star urban effluent.

The frequent occurrence of barium sulfate is certainly the result of the supersaturation of GS sewage for barite, although anthropic sources such as car brakes are also likely here (El Samrani *et al.*, 2004). The association between barium sulfate and zinc sulfide has a double origin as indicated by the bimodal histogram of the Ba/Zn elemental ratio (inset of fig. 42). The first mode – Ba/Zn close to 1 – probably identifies lithopone (Clark, 2002 ; Adams, 2004), a white pigment used in some enamels and paints that could originate from the ceramic industry. The second mode – Ba/Zn around 4 – could correspond to ZnS particles directly grown on the barite surface under the influence of sulfate-reducing bacteria (El Samrani *et al.*, 2004). Other metal sulfides such as mackinawite (FeS), pyrite (FeS₂ – fig. 41c), galena (PbS), covellite (CuS), chalcopyrite (CuFeS₂ – fig. 41d), sphalerite (ZnS), and argentite (Ag₂S), were found in equivalent amounts in suspended solids and biofilms. As discussed by several authors (El Samrani *et al.*, 2004 ; Zhang *et al.*, 2008 ; Houhou *et al.*, 2009b), those sulfides are formed by the reaction of dissolved metal species with the hydrogen sulfide produced by sulfato-reducing bacteria (Gutierrez *et al.*, 2008, Nielsen *et al.*, 2008).

The weight of the ceramic industry in the amount of anthropogenic particles discharged in GS sewage is even more obvious when oxide particles are considered: pigments such as lead oxide (PbO) (10.5 %), bismuth oxide (5.8%), chromium oxide (1.2%) and lead chromate (PbCrO₄) (2.3%) (Zheng and Shi, 2007 ; Clark, 2002), but also polishing agents such as cerium oxides (6.9%) (fig. 41e), are frequently observed in weekday wastewater and in biofilms. Other identified oxides include bismuth oxychloride (BiOCl) (2.3%) (fig. 41f) and wustite (FeO) (fig. 41g), that should rather be related to the cosmetic industry.

Besides stainless steel fragments (fig. 41h) that were predominantly found in weekend sewage in accordance with the relative levels of total Cr and Ni measured in suspended solids, a variety of metal alloys were observed in GS wastewater. Brasses such as Cu-Zn, Cu-Zn-Al (aluminium brass), and Cu-Zn-Sn (white brass), were identified in biofilms and only in weekday sewage. The presence of those brasses may be associated with the activity of the metal plating industry. Fe-Cr particles, attributed to fragments of razor blades by Houhou *et al.* (2009b), were identified in high amounts in weekend wastewater, whereas Fe-Cr alloys bearing minor amounts of Sn and Sb were analyzed in weekday sewage. Micron size particles of gold (fig. 41i) - 22 karat (Au 91.7%, Ag 3.2%, and Cu 5.1%) and 18 karat (Au 75%, 9% Ag, and Cu 16%)– were evidenced in weekday wastewater. Obviously, such particles originate from the jewelry industry (Ingo *et al.*, 1998 ; Manni *et al.*, 2001). More

anecdotally, particles of native bismuth (fig. 41j) and thorium dioxide found in biofilms could be the signature of granite kitchen sinks which are popular in Lebanon.

A previous investigation of phosphate minerals neoformed in wastewater revealed that a significant amount of Zn can be entrapped into those minerals (Houhou *et al.*, 2009a). In the present case, such Zn incorporation within the phosphate phases could not be evidenced with regard to the minimum detection limit of EDXS. On the other hand, lead-bearing phosphate species that might originate from a remobilization in the sewer system of Pb from roadside dust, frequently occur (fig. 41k). Figure 42 shows the relative abundance between weekdays and weekends of the three main types of metal bearing particles distinguished above. Neoformed mineral species, i.e. particles precipitated as metal sulfides or phosphates, are in equivalent amount in weekday and weekend wastewater, and they largely dominate the other categories of particles. This indicates that the dynamic chemical environment of the sewer system determines drastic changes in the speciation of many metals over a short time scale. Logically, the occurrence of particles originating from domestic uses and industrial processes are more abundant during weekend and weekday, respectively.

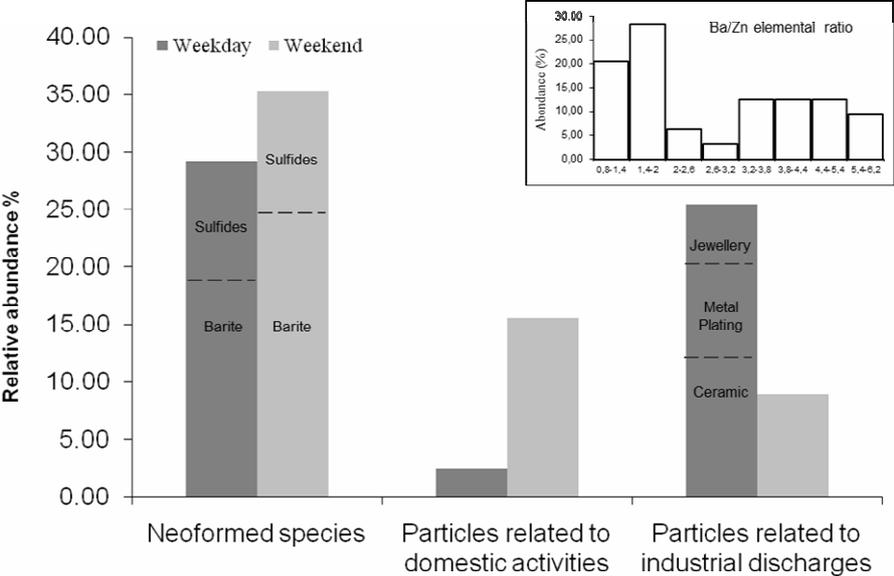


Figure 42: Relative abundance of heavy metal-bearing particles detected by backscattered electron imaging from (i) domestic activities, (ii) industrial wastes, and (iii) the sewer system. The inset shows the histogram of Ba/Zn elemental ratios in barite/sphalerite mixed particles.

5.3.4 Chemical speciation of heavy metals in suspended solids and biofilm

A major drawback of the direct speciation conducted with electron microscopy is that the total amount of trace element associated with a given species is not known. In addition, some heavy metal-bearing phases may be overlooked because of the relatively low sensitivity of EDXS microanalysis. However, a chemical speciation is not devoid of artifacts either, and incomplete dissolution of the target phase, readsorption of dissolved species, or precipitation of neoformed phases, have been described in the literature (Ostergren *et al.*, 1999 ; La Force and Fendorf, 2000, Houhou *et al.*, 2009a). Figure 43 presents the partitioning of Zn, Pb, and Cu, between exchangeable (F1), soluble (F2), reducible (F3), oxidizable (F4), and residual fractions (F5). Zn is mainly associated with the soluble and reducible fractions in suspended solids and biofilms, and to a lesser extent with the oxidizable fraction.

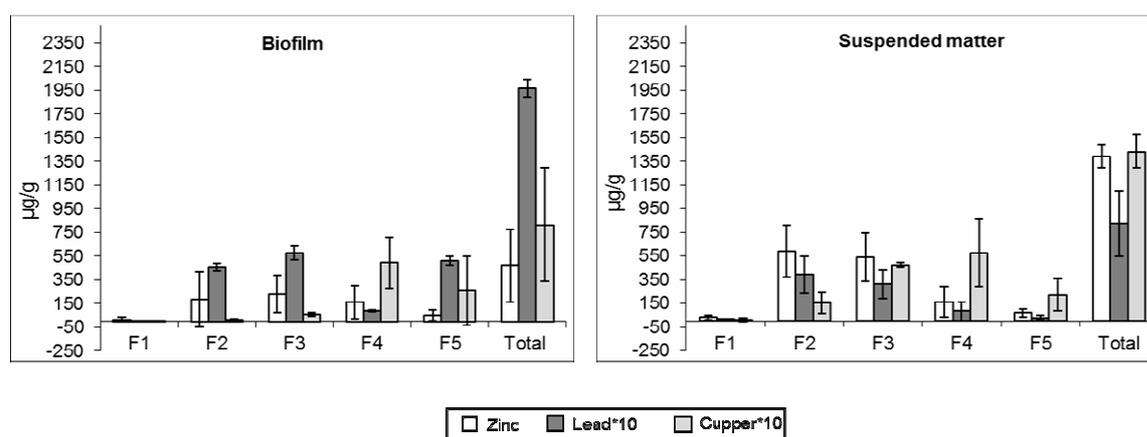


Figure 43: Partitioning of Zn, Pb, and Cu, between exchangeable (F1), soluble (F2), reducible (F3), oxidizable (F4), and residual fractions (F5), in sewage suspended solids and biofilm samples.

At first approximation, this speciation seems rather contradictory with the electron microscopy observations since Zn was only detected as sulfide (ZnS). However, no particular precaution was taken during the storage of freeze-dried samples, and a partial oxidation of those metal sulfides would then significantly increase the amount of Zn contained in the reducible fraction. Such an evolution of speciation during storage has recently been described for suspended river sediments by Priadi *et al.*, (2011b).

A similar partitioning is observed for Pb in suspended solids, whereas it is mainly associated with the residual fraction in biofilms. The latter observation is consistent with the abundant occurrence of lead phosphate in that compartment, the very low solubility of this mineral species leading to its extraction with the residual fraction (Ma and Rao, 1997). Cu is mainly distributed between F3, F4, and F5, in suspended solids, and between F4 and F5 in biofilms. Assuming that F3 corresponds to partially oxidized copper sulfide, Cu would then be primarily associated with the organic and/or sulfide fraction identified by SEM as covellite and chalcopyrite, and with the residual fraction that could then correspond to copper brassy. Eventually, the results obtained by chemical extraction can be easily related to the direct speciation carried out by electron microscopy.

5.3.5 Nature of organic matter in suspended solids and biofilms

Typical micrographs of sewage suspended solids and biofilm samples are shown in figure 44. An intense microbial activity is systematically observed within the suspended material with numerous bacterial aggregates embedded in a matrix of extracellular polymeric substances (fig. 44a), and frequent biodegradation features at the surface of decaying organic fibers (fig. 44b).

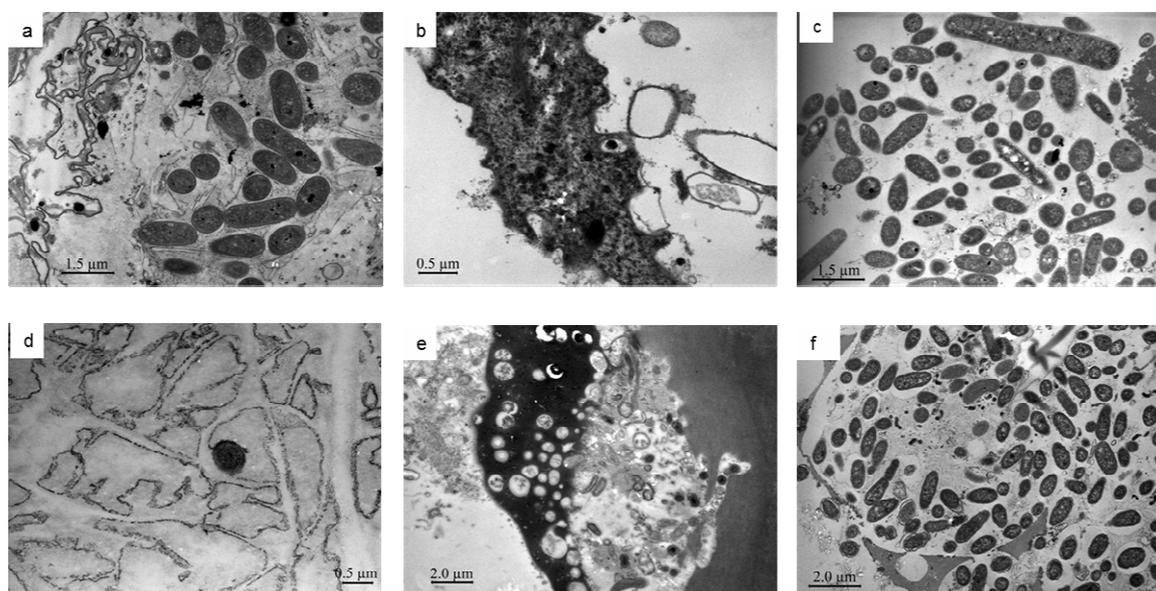


Figure 44: Electron micrographs of stained ultrathin sections of suspended solids (a-b) and sewer biofilms (c-f).

In contrast, TEM examination of biofilm samples reveals a range of diverse situations that can be related to the variation in bacteria abundance in the thickness of the biofilm (Mahfoud *et al.* 2009). At the biofilm/sewage interface that contains the majority of microbial biomass, ongoing biodegradation characterized by remnants of cell walls (fig. 44c) and partially degraded plastic chunks can be observed (fig. 44d). In contrast, other micrographs completely devoid of active bacteria (fig. 44 e-f), might identify deeper zones within the biofilm (Mahfoud *et al.*, 2009). Interestingly, cellulose fibers originating from toilet papers which are frequently observed in biofilms and suspended solids in western countries (Houhou *et al.*, in preparation), were not detected. This may be related to the local usage of not flushing down the toilet paper. Such habit can certainly impact the sewer functioning as it was established that about 15% of sewer solids correspond to toilet paper in UK (Friedler *et al.*, 1996).

The measured values of total organic carbon and volatile matter in biofilm samples were 633 ± 107 mg/g and 202 ± 135 mg/g, respectively, which is of the order of magnitude of organic contents for sewer biofilms reported in the literature (Chebbo *et al.*, 2001). The amount of extractable organic matter was 433 ± 115 mg/g with percentages of aliphatic, aromatic, and polar fractions of 38.2%, 18.1%, and 15.7%, respectively, the loss during the fractioning process being about 30%.

The GC-MS analysis is dominated by n-alkanes, pentacyclic triterpanes, and an unresolved complex mixture (UCM) (fig. 45a). n-Alkanes are detected with chain length from C12 to C29 (fig. 45c). The value of the Carbon Preference Index (CPI), defined as the odd/even carbon number n-alkanes (Bray and Evans 1961) equal to 1.03, confirms the petrogenic fingerprint (Moilleron *et al.* 2002 ; Jeanneau *et al.* 2006, Jeanneau *et al.* 2008). Moreover, the distribution of pentacyclic triterpanes (especially hopanes) is dominated by isomers in geological conformation (17α , 21β and 17β , 21α) whereas a biological conformation (17β , 21β) is not detected (figure 45b). Such distribution is typical of thermally matured organic matter (Peter and Moldowan 1993) related to petroleum or associated byproducts such as road asphalts (Faure *et al.*, 2000), The UCM shape in the chromatogram (fig. 45a) is also similar to those obtained for road asphalts or used vehicle oil (Faure and Landais, 2000 ; Faure *et al.*, 2000 ; Jeanneau *et al.*, 2008).

The aromatic fraction reveals the presence of substituted polycyclic aromatic hydrocarbons (mainly alkyl-phenanthrenes and alkyl-pyrenes) consistent with petroleum byproducts (Jeanneau *et al.* 2008). This is in contrast to previous results in the literature which reported

the predominance of parent PAH such as phenantrene, pyrene, and fluoranthene in sewage sludges (Rocher *et al.*, 2004 ; Sanchez-Brunet *et al.*, 2007). Linear alkyl benzene (LAB), anionic surfactants from domestic detergents (Eganhouse and Sherblom, 2001), are also dominant molecules in the aromatic fraction.

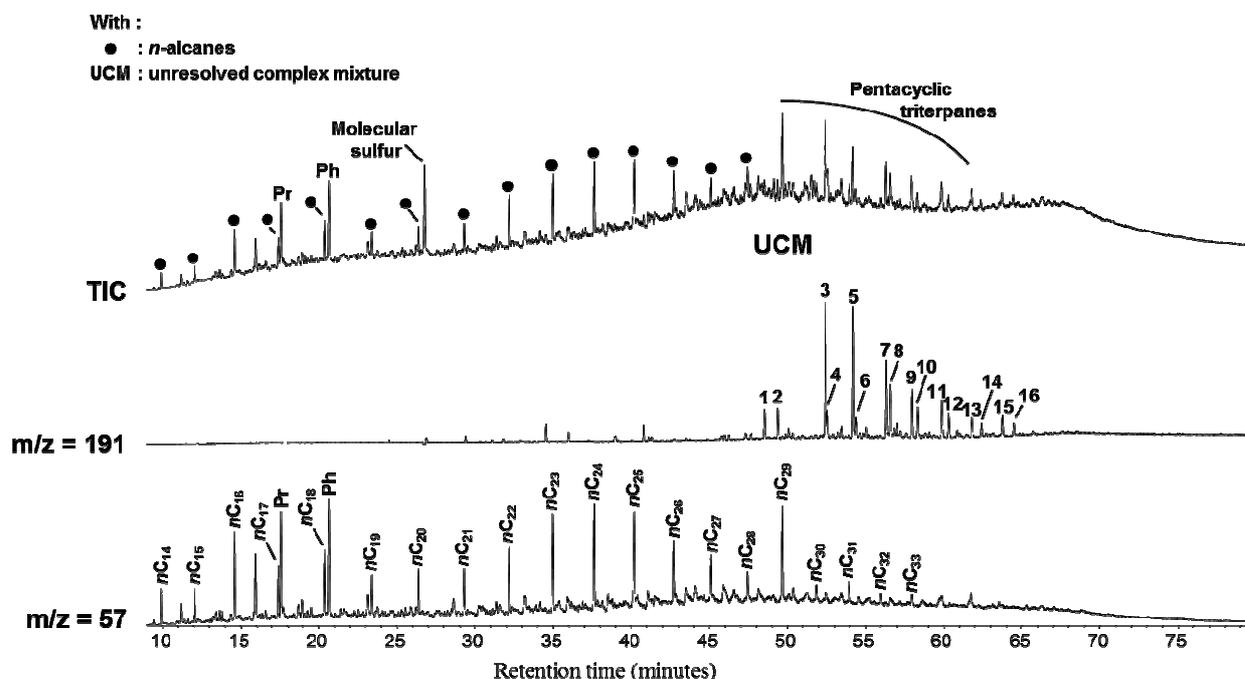


Figure 45: Aliphatic hydrocarbons chromatogram from the biofilm obtained with GC-MS analysis: (a) Total ion current (TIC), (b) $m/z = 191$ (pentacyclic triterpanes) and (c) $m/z = 57$ (n-alkanes). See table 7 for pentacyclic triterpanes identification (UCM).

Other classical fingerprints of domestic activity such as coprostanol, a faecal sterol produced from the reduction of cholesterol (Eganhouse and Sherblom, 2001 ; Maldonado *et al.*, 2000), cholesterol, cholestanol, and coprostanone, can be evidenced in the polar fraction. Finally, fatty acids with a 14 to 18 carbon number with an even to odd predominance occur. Such distribution is generally associated with a contribution of bacterial biofilm (Killops and Killops, 2005). Eventually, the nature of organic matter found in biofilm samples reveals an obvious signature of traffic-related pollution that confirms the transfer of road dust by street washing to the sewer system.

Table 7: Identification of pentacyclic triterpanes (cf. figure 45).

Symbol	Compound	Carbon number
1	18a(H)-22,29,30-trisnorhopane	(C27)
2	17a(H)-22,29,30-trisnorneohopane	(C27)
3	17a(H), 21b(H)-30-norhopane	(C29)
4	18a(H)-30-norneohopane	(C29)
5	17a(H), 21b(H)-hopane	(C30)
6	17b(H), 21a(H)-30 homomoretane	(C31)
7	22S-17a(H), 21b(H)-30 homohopane	(C31)
8	22R-17a(H), 21b(H)-30 homohopane	(C31)
9	22S-17a(H), 21b(H)-30 bishomohopane	(C32)
10	22R-17a(H), 21b(H)-30 bishomohopane	(C32)
11	22S-17a(H), 21b(H)-30 trishomohopane	(C33)
12	22R-17a(H), 21b(H)-30 trishomohopane	(C33)
13	22S-17a(H), 21b(H)-tetrakishomohopane	(C34)
14	22R-17a(H), 21b(H)-tetrakishomohopane	(C34)
15	22S-17a(H), 21b(H)-pentakishomohopane	(C35)
16	22R-17a(H), 21b(H)-pentakishomohopane	(C35)

5.4 CONCLUSION

The results of the present study indicate that, in an emerging country, the sewer system integrates the pollution from four main sources: besides domestic activities, the private drinking water supply system, industrial discharges, and road dust transported in the sewer by street washing, represent majors contributors to the pollution transported by the urban effluent. The relative importance of those sources changes drastically over time as evidenced by the difference in metal levels recorded between weekday and weekend effluents. In that context, the relatively constant composition of biofilms scrapped off the pipe walls appears to provide a time-average measurement of the contamination. The molecular characterization of the solvent-extractable organic matter from biofilm confirms a major contribution of petroleum byproducts consistent with a traffic-related pollution. The speciation study reveals the predominance of neoformed minerals such as sulfides and phosphates, and highlights the strong biogeochemical dynamics that takes place within the sewer system. Unlike western countries in which any discharge from the industry is strictly regulated, some anthropogenic particulate markers of various activities such as jewellery making or ceramics manufacturing can be easily identified here.

The metal concentrations found in urban wastewater certainly differ according to the nature of local industrial discharges to the sewer system or the relative importance of private drinking water supply system. However, based on the results reported in table 4, the gross annual fluxes for anthropogenic metal discharge from lebanese urban effluents into the sea can be estimated to be approximately $36.2 \cdot 10^3$ kg for Pb, $42.5 \cdot 10^3$ kg for Cu, and $8.6 \cdot 10^3$ kg for Cr. Knowing that the lebanese annual surface water flow to the sea is about $3900 \cdot 10^6$ m³, assuming a suspended sediment concentration of 5 mg/L, and using the average concentration of trace elements in the suspended sediment of World rivers given by Viers *et al.* (2009), the corresponding natural inputs are about $1.2 \cdot 10^3$ kg for Pb, $1.5 \cdot 10^3$ kg for Cu, and $2.5 \cdot 10^3$ kg for Cr. This implies that, at the moment in Lebanon, the anthropogenic fluxes of heavy metals to the Mediterranean sea are much greater than the natural ones. Hence, the present study provides a base-line against which any improvement of sewage quality due a change in environmental policy can be assessed.

Acknowledgements

R. AL KHATIB would like to thank the Lebanon National Council for Scientific Research for funding her doctoral studies. This work was supported in part by the France-Lebanon bilateral cooperation (CEDRE grant). RK, AS, and BL are grateful to the staff of Golden Star pumping facility for logistical support during field sampling. We also wish to thank the SARM staff (CRPG-UPR 80) where chemical analyses were carried out.

References

- Adams R. Roskill sees barytes pigments/fillers demand growing at 2.5% per annum. Focus on Pigments 2004 ; 2004(1):1-2.
- Almeida MC, Butler D, Friedler E. At-source domestic wastewater quality. Urban Water 1999 ; 1:49-55.
- Azzurro E, Matiddi M, Fanelli E, Guidetti P, La Mesa G, Scarpato A, Axiak V. Sewage pollution impact on Mediterranean rocky-reef fish assemblages. Marine Environmental Research 2010 ; 69(5):390-397.
- Barrett JES, Taylor KG, Hudson-Edwards KA, Charnock JM. Solid-phase speciation of Pb in urban road dust sediment: a XANES and EXAFS study. Environ. Sci. Technol. 2010 ; 44:2940-2946.
- Bdour A. N, Hamdi M, Taraweh Z. Perspectives on sustainable wastewater treatment technologies and reuse options in the urban areas of the Mediterranean region. Desalination 2009 ; 237:162-174.
- Butler D, Friedler E, Gatt K. Characterizing the quantity and quality of domestic wastewater inflows. Wat.Sci.Tech. 1995 ; 31 (7):13-24.
- Chebbo G, Gromaire MC, Aherre M, Garnaud S. Production and transport of urban wet weather pollution in combined sewer systems: the « Marais » experimental urban catchment in Paris. Urban water 2001 ; 3:3-15.
- Chino M, Moriyama K, Saito H, Mori T. The amount of heavy metals derived from domestic sources in Japan. Water, Air, and Soil Pollution 1991 ; 57-58:829-837.
- Clark R. Pigment identification by spectroscopic means: an art/science interface. C.R.chimie 2002 ; 5:7-20.
- Comber SDW, Gunn AM. Heavy metals entering sewage-Treatment works from domestic sources. J. CIWEM 1996 ; 137-142
- Eganhouse RP, Sherblom PM. Anthropogenic organic contaminants in the effluent of a combined sewer overflow: impact on Boston Harbor. Marine Environmental Research 2001 ; 51:51-74.

El Samrani AG, Lartiges BS, Ghanbaja J, Yvon J, Kohler A. Trace element carriers in combined sewer during dry and wet weather: an electron microscope investigation. *Water research* 2004 ;38:2063-2076.

El-Fadel M, Zeinati M, El-Jisr K, Jamali D. Industrial-waste management in developing countries: The case of Lebanon. *Journal of Environmental Management* 2001 ; 61: 281-300.

EMwater (Efficient Management of Wastewater), European project, final report, 2004. http://www.emwater.org/activities/final_cs_lebanon.pdf.

Eriksson E, Auffarth K, Henze M, Ledin A. Characteristics of grey wastewater. *Urban Water* 2002 ; 4:85–104

Faure P, Landais P, Schlepp L, Michels R. Evidence for diffuse contamination of river sediments by road asphalt particles. *Environ. Sci. Technol.* 2000 ; 34:1174-1181.

Faure P, Landais P. Contributions organiques naturelles et anthropiques dans les sédiments du lac de Kruth-Wildenstein (Haut-Rhin, France). *C.R. Acad. Sci.* 2000 ; 330 : 39-46.

Friedler E., Brown DM, Butler D. A study of WC derived sewer solids. *Wat. Sci. Tech.* 1996 ; 33(9):17-24.

Galloway J.N. Alteration of trace metal geochemical cycles due to the marine discharge of wastewater. *Geoch. Cosmochim. Acta* 1979 ; 43:207-218.

Gasperi J, Garnaud S, Rocher V, Moilleron R. Priority pollutants in wastewater and combined sewer overflow. *Sci. Total Environ* 2008 ; 407: 263-272.

Gray SR, Becker NSC. Contaminant flows in urban residential water systems. *Urban Water* 2002 ; 4:331–346.

Gromaire MC, Garnaud S, Ahyerre M, Chebbo G. The quality of street cleaning waters: comparison with dry and wet weather flows in a Parisian combined sewer system. *Urban Water* 2000 ; 2:39-46.

Gutierrez O, Mohanakrishnan J, Sharma K, Meyer R, Keller J, Yuan Z. Evaluation of oxygen injection as a mean of controlling sulfide production in a sewer system. *Water research* 2008 ; 42:4549-4561.

Hashisho Z, El-Fadel M. Impacts of Traffic-induced Lead emissions on air, soil, and blood lead levels in Beirut. *Environmental Monitoring and Assessment* 2004 ; 93(1-3): 185-202.

Heitland P, Helmut D. Biomonitoring of 30 trace elements in urine of children and adults by ICP-M.S. *Clinica Chimica Acta* 2006 ;365:310 – 318.

Houhou J, Lartiges BS, Hofmann A, Frappier G, Ghanbaja J, Temgoua A. Phosphate dynamics in an urban sewer: A case of Nancy, France. *Water research* 2009a ; 43:1088-1100.

Houhou J, Lartiges BS, Montarges-Pelletier E, Sieliechi J, Ghanbaja J, Kohler A. Sources, nature, and fate of heavy metal-bearing particles in the sewer system. *Science of the total environment* 2009b ; 407:6052-6062

Hwang H-M, Green PG, Young TM. Historical trends of trace metals in a sediment core from a contaminated tidal salt marsh in San Francisco Bay. *Environ. Geochem. Health* 2009 ; 31:421-430.

Ingo GM, Chiozzini G, Faccenda V, Bemporad E, Riccucci C. Thermal and microbial characterizations of CaSO₄-SiO₂ investment materials for casting jewellery alloys. *Thermochimica Acta* 1998 ; 321:175-183.

Jeanneau L, Faure P, Montarges-Pelletier E, Ramelli M. Impact of a Highly Contaminated River on a More Important Hydrologic System: Changes in Organic Markers. *Science of Total Environment* 2006 ; 372:183-192.

Jeanneau L, Faure P, Montarges-Pelletier E. Quantitative multimolecular marker approach to investigate the spatial variability of the transfer of pollution from the Fensch River to the Moselle River (France). *Science of Total Environment* 2008 ; 389: 503-513.

Jeanneau L. Approche moléculaire quantitative appliquée à l'étude du transfert de micropolluants organiques à la confluence entre la Fensch et la Moselle (France). Institut National Polytechnique de Lorraine. Theses. 2007.

Kamar G. Policy Dialogue on Integrated Water Resources Management Planning in the Republic of Lebanon, Domestic and Industrial Water Needs and Management. **EUWI** 2009.

Karaa K, Karam F, Tarabey N. Wastewater treatment and reuse in Lebanon: key factors for future agricultural uses. In Hamdy A. (ed.), El Gamal F. (ed.), Lamaddalena N. (ed.), Bogliotti C. (ed.), Guelloubi R. (ed.) *Non-conventional water use: WASAMED project* Bari : CIHEAM-IAMB / EU DG Research, 2005. 310 p. (Options Méditerranéennes : Série B. Etudes et Recherches ; n. 53). ISBN 2-85352-331-4. 3. WASAMED (WATER SAVING in MEDITERRANEAN agriculture) Workshop, 2004/12/07-10, Cairo (Egypt)

Killops SD, Killops VJ. Introduction to organic geochemistry, 2nd edition. Blackwell, Oxford p.30-70, 2005.

Korfali S, Jurdi M. Assessment of domestic water quality: case study, Beirut, Lebanon. Environ. Monit. Assess. 2007 ; 135:241-251.

Krepakevich A, Pospelova V. Tracing the influence of sewage discharge on coastal bays of southern Vancouver Island (BC, Canada) using sedimentary records of phytoplankton. Continental shelf Res. 2010 ; 30:1924-1940.

La Force MJ, Fendorf S. Solid-phase iron characterization during common selective sequential extractions. Soil Science Society of America Journal 2000 ; 64(5): 1608-1615.

Lartiges BS, Deneux-Mustin S, Villemin G, Mustin C, Barrès O, Chamerois M, Gerard B, Babut M. Composition and structure and size distribution of suspended particules from the rhine river. Water Res. 2001 ;35 (3):808-816.

Lebanon State of Environment Report 2001, Ministry of Environment, Republic of Lebanon, <http://www.moe.gov.lb/Reports/Pages/SOER2001.aspx>

Legret M, Pagotto C. Evaluation of pollutant loadings in the runoff waters from a major rural highway. The Science of the Total Environment 1999 ; 235:143-150.

Ma, LQ, Rao GN. Effects of phosphate rock on sequential chemical extraction of lead in contaminated soils. Journal of environmental quality 1997 ; 26(3) ; 788-794.

Mahfoud C, El Samrani AG, Mouawad R, Hleihel W, El Khatib R, Lartiges BS, Ouaini N. Disruption of biofilms from sewage pipes under physical and chemical conditioning. Journal of environmental sciences 2009 ; 21:1-8.

Maldonado C, Indira Venkatesan M, Philips C, Bayona J. Distribution of trialkylamines and coprostanol in San Pedro Shelf sediment adjacent to a sewage outfall. Marine Pollution Bulletin 2000 ; 40 (80): 680-687.

Manni A, Saviano G, Massacci P. Technical note characterization of gold particles in recoverable waste matrix. Minerals Engineering 2001 ; 14 (12):1679-1684.

Mansuy-Huault L, Regier A, Faure P. Analysing hydrocarbons in sewer to help in PAH source appointment in sewage sludges. Chemosphere 2009 ; 75:995-1002.

Mara D. Domestic wastewater treatment in developing countries. Earthscan Ed. 2004.

Moilleron R, Gonzalez A, Chebbo G, Thévenot D. Determination of aliphatic hydrocarbons in urban runoff samples from « Le Marais » experimental catchment in Paris centre. *Water research* 2002 ; 36:1275-1285.

Nielson AH, VJ, Stokbro Jensen H, Wium-Andersen T, Hvite-Jacobsen T. Influence of pipe material and surfaces on sulfide related odor and corrosion in sewers. *Water Research* 2008 ; 42:4206-4214.

Ostergren JD, Brown GE, Parks GA, Tingle TN. Quantitative speciation of lead in selected mine tailings from Leadville. *Co. Environ. Sci. Technol.* 1999 ; 33: 1627-1636.

Pantsar-Kallio M, Mujunenb S, Hatzimihalisc G, Koutou P, Minkkinenb P, Wilkie P, Connor M. Multivariate data analysis of key pollutants in sewage samples: a case study. *Analytica Chimica Acta* 1999 ; 393:181-191.

Peters KE, Moldowan JM. *The Biomarker Guide. Interpreting molecular fossils in petroleum and ancient sediments.* Prentice Hall, Englewood Cliffs, NJ. 363 pages, 1993.

Priadi C, Ayrault S, Pacini S, Bonte P. Urbanization impact on metals mobility in riverine suspended sediment: Role of metal oxides. *International Journal of Environmental Science and Technology* 2011 ; 8(1):1-18.

Priadi C, Ayrault S, Morin G, Bonte P. EXAFS and SEM evidence for zinc sulfide solid phases in suspended matter from the Seine River, France. *Environ. Sci. Technol.* (submitted (b)).

Reopanichkul P, Carter RW, Worachananant S, Crossland CJ. Wastewater discharge degrades coastal waters and reef communities in southern Thailand. *Marine Environmental Research* 2010 ; 69(5):287-296.

Rocher V, Azimi S, Moilleron R, Chebbo G. Hydrocarbons and heavy metals in the different sewer deposits in the « Le Marais » catchment (Paris, France): stocks, distribution and origins. *Science of the Total Environment* 2004 ; 323:107-122.

Sanchez-Martin MJ, Gracia-delgado M, Lorenzo LF, Rodriguez-Cruz MS, Arienzo M. Heavy metals in sewage sludge amended soils determined by sequential extraction as a function of incubation time of soils. *Geoderma* 2007 ;142: 262-273.

Soonthornnonda P, Christensen, ER. Source apportionment of pollutants and flows of combined sewer wastewater. *Wat. Res.* 2008 ; 42: 1989-1998.

Sorme L, Lagerkvist R. Sources of heavy metals in urban wastewater in Stockholm. *The Science of the Total Environment* 2002 ; 298:131–145.

Tchobanoglous G, Burton FL, Stensel, HD. *Wastewater Engineering: Treatment and Reuse*, 4th Edition. Metcalf & Eddy, New York. 2003.

Tessier A, Campbell PGC, Bisson M. Sequential extraction procedure for the speciation of particulate trace metals. *Analytical Chemistry* 1979 ; 51:844-851.

Verbanck M, Vanderborght J-P, Wollast R. Research notes. Major ion content of urban wastewater: assessment of per capita loading. *Research Journal of the Water Pollution Control Federation* 1989 ; 6(11-12): 1722-1728.

Viers J, Dupre B, Braun J-J, Freydier R, Greenberg S, Ngoupayou J.N, Nkamdjou LS. Evidence for non-conservative behaviour of chlorine in humid tropical environments. *Aquatic geochemistry* 2001 ;7(2):127-154.

Viers J, Dupre B, Gaillardet J. Chemical composition of suspended sediments in World rivers: new insights from a new database. *Science of the Total Environment* 2009 ; 407:853-868.

Vinneras B and Jönsson H. The performance and potential of faecal separation and urine diversion to recycle plant nutrients in household wastewater. *Bioresource Technology* 2002 ; 84(3):275-282.

Zhang L, Schryver P, Gusseme B, Muynck W, Boon N, Verstrete W. Chemical and biological technologies for hydrogen sulfide emission in sewer systems: A review. *Water Research* 2008 ; 42:1-12.

Zheng C, Shi K. A review on the use of waste glasses in the production of cement and concrete. *Resources, Conservation and Recycling* 2007 ; 52:234-247.

Chapitre 6 : CONCLUSION GENERALE

Ce travail a permis de montrer l'effet du gradient de vitesse pariétale sur le transport des bactéries vers la surface de développement du biofilm, ainsi que sur différents paramètres tels que le nombre de bactéries, la quantité d'exopolymères déposés, l'épaisseur du biofilm, et le pourcentage de recouvrement de la surface. Un réacteur Couette-Poiseuille a été utilisé pour contrôler les conditions hydrodynamiques et maintenir un écoulement laminaire stable. Ce réacteur permet une bonne maîtrise de la configuration de l'écoulement tout en contrôlant le gradient de vitesse près de la paroi. L'observation de la structure générale du biofilm a été réalisée par microscopie confocale à balayage laser (CLSM). Cette technique permet d'une part d'avoir des images 2D qui donne une idée sur la morphologie générale du biofilm. D'autre part, un fichier numérique contenant des images de dimension x y z est également stocké. Pour accéder au calcul des différents paramètres structuraux du biofilm, un logiciel permettant l'application des algorithmes mathématiques spécifiques ainsi qu'une reconstruction 3D des biofilms, « Gocad ® », a été utilisé. Un traitement préalable des images obtenues a été réalisé avec une série de logiciels informatiques, afin d'améliorer la résolution et de diminuer le rapport signal/bruit pour pouvoir effectuer ultérieurement une reconstruction 3D de qualité et réaliser les analyses quantitatives.

Dans un premier temps, nous nous sommes intéressés à limiter la croissance des biofilms sur la surface par annulation du transport de masse vers cette surface. Pour ce faire, une configuration dite de « non-dépôt » a été appliquée. Celle-ci consiste à annuler le gradient de vitesse près de la surface, ce qui implique qu'aucun transport par convection ne peut avoir lieu vers la surface, et ce qui empêche de fait l'initiation à la formation du biofilm. L'application de cette configuration a permis de maintenir la paroi vierge de biofilm pendant au moins deux jours, néanmoins une croissance importante sur l'autre paroi du cylindre est obtenue, ce qui altère rapidement les conditions d'écoulement au voisinage de la surface du coupon. D'où l'observation de biofilms sur la surface des coupons au-delà de deux jours. Une comparaison avec une configuration offrant des conditions optimales de croissance a été établie ; celle-ci a montré que dans les conditions favorables au développement un nombre important de bactéries adhère sur la surface dans les toutes premières heures de l'expérience (5h). Ce résultat est très prometteur, puisque l'application de ce type de configuration sur des eaux moins chargées (eaux potables, eaux de rivières, ...) permettrait de maintenir propre la surface d'un capteur ou d'une membrane.

Une autre étude concernant l'influence du gradient de vitesse pariétale sur la structure et l'organisation du biofilms a été effectuée avec le réacteur Couette-Poiseuille. La configuration, utilisée dans ce cas, implique un transport maximal de masse vers la surface tout en maintenant un gradient de vitesse constant. L'étude a porté sur les deux phases de formation du biofilm, le stade initial et le stade de biofilm mature. Deux gradients de vitesse ont été choisis, $\gamma=6s^{-1}$ et $\gamma=1s^{-1}$, et les résultats obtenus ont montré que:

- lorsque la vitesse d'écoulement augmente, le transport de masse est favorisé et l'adhésion débute plus rapidement qu'à faible vitesse d'écoulement.
- la représentation graphique de l'accumulation des bactéries à la paroi et des différents paramètres structuraux du biofilm en fonction de $t*\gamma^{1/3}$ comme axe des abscisses permet de superposer les courbes obtenues aux deux gradients de vitesse.
- l'épaisseur et le recouvrement de la surface augmentent durant les premières 24h à $\gamma=1s^{-1}$, tandis qu'à $\gamma=6s^{-1}$, les courbes présentent une forme sigmoïdale résultant du détachement par effet de cisaillement.
- la quantité de polymères, dans les deux cas, est beaucoup plus importante que la quantité de bactéries adhérees qui est elle plus ou moins équivalente pour les deux gradients de vitesse étudiée.

En ce qui concerne l'influence de l'hydrodynamique sur le biofilm mature, les biofilms développés à faible gradient sont plus épais et présentent une structure renfermant de larges « voids ». Des élongations ou « streamers » sont aussi observés mais ces derniers ne sont pas assez rigides et sont souvent décrochés lors du lavage du coupon ainsi que lors de l'observation au microscope confocale. Quand la vitesse de l'écoulement augmente, les biofilms deviennent moins épais mais plus compact, la quantité d'exopolymères augmente, et les microcolonies tendent à réduire le vide pour augmenter la cohésion entre elles. Ces résultats sont en accord avec la littérature sur les biofilms développés dans les chambres d'écoulement (Stoodley et al., 1999 ; Pereira et al., 2002 ; Picioreanu et al., 2000).

L'hydrodynamique ne paraît pas affecter seulement la structure et la composition du biofilm, mais également l'orientation de celui-ci. En effet, les microcolonies composant le biofilm montrent une orientation préférentielle à 45° du sens de l'écoulement.

Des expériences à cisaillement beaucoup plus important sont à envisager pour mieux comprendre le comportement des biofilms vis à vis des conditions de fort cisaillement. L'étude de l'influence de l'hydrodynamique sur l'activité du biofilm dans ce type de réacteur s'avère aussi être très intéressant. Ceci pourrait offrir de nouvelles pistes pour le contrôle des polluants et de leur accumulation dans le biofilm.

L'objectif sur lequel a démarré cette thèse était l'étude de la spéciation de la matière organique et des contaminants métalliques dans les eaux usées de Jounieh-Liban, rejetées dans la mer méditerranée. Cette étude se trouve la première à être établie au Liban en ce qui concerne l'étude des polluants à l'échelle nanométrique en utilisant la microscopie électronique. Cette étude a montré le rôle primordial que joue le biofilm comme étant un réacteur bio-physico-chimique capable d'accumuler, de transformer et d'influer sur le devenir des polluants. De plus le biofilm s'est révélé être un registre des contaminants rejetés dans les réseaux d'assainissement.

Les résultats trouvés montrent que la pollution des eaux usées de Jounieh résulte non seulement des eaux usées domestiques mais aussi des rejets non contrôlés des eaux usées industrielles, du nettoyage des routes, ainsi que du réseau privé de distribution des eaux potables. La composition de ces eaux renferme des concentrations en métaux lourds dépassant les limites autorisées et qui sont déchargés dans la mer sans traitement préalable. La caractérisation de la matière organique extractible révèle une contribution du trafic routier.

Cette étude constitue une base de données préliminaires concernant la qualité des eaux usées Libanaises déchargées dans le milieu naturel. Les résultats exigent la mise en place d'un traitement indispensable de ces effluents avant rejet. Néanmoins cette étude reste une étude de cas d'une seule région au Liban, il serait nécessaire d'élargir la zone d'étude pour couvrir tout le pays.

ANNEXES

Annexe 1 : Scripts utilisés pour la reconstruction 3D

Dilatation des bactéries

Propriété principale = vert

```
BEGIN {  
max_nb = 15 ;  
}  
  
{  
vert_dilat = 1 ;  
if( vert < 0.05 ) {  
    nb = 0 ;  
    if( neigh( vert, 0, 0, 1 ) > 0.05 ) { nb++ ; }  
    if( neigh( vert, 0, 0, -1 ) > 0.05 ) { nb++ ; }  
    if( neigh( vert, 0, 1, 0 ) > 0.05 ) { nb++ ; }  
    if( neigh( vert, 0, -1, 0 ) > 0.05 ) { nb++ ; }  
    if( neigh( vert, 1, 0, 0 ) > 0.05 ) { nb++ ; }  
    if( neigh( vert, -1, 0, 0 ) > 0.05 ) { nb++ ; }  
  
    if( neigh( vert, 1, 0, 1 ) > 0.05 ) { nb++ ; }  
    if( neigh( vert, -1, 0, 1 ) > 0.05 ) { nb++ ; }  
    if( neigh( vert, 1, 0, -1 ) > 0.05 ) { nb++ ; }  
    if( neigh( vert, -1, 0, -1 ) > 0.05 ) { nb++ ; }  
}
```

```
if( neigh( vert, 0, 1, 1 ) > 0.05 ) { nb++ ; }
if( neigh( vert, 0, 1, -1 ) > 0.05 ) { nb++ ; }
if( neigh( vert, 0, -1, 1 ) > 0.05 ) { nb++ ; }
if( neigh( vert, 0, -1, -1 ) > 0.05 ) { nb++ ; }
if( neigh( vert, 1, 1, 0 ) > 0.05 ) { nb++ ; }
if( neigh( vert, -1, 1, 0 ) > 0.05 ) { nb++ ; }
if( neigh( vert, 1, -1, 0 ) > 0.05 ) { nb++ ; }
if( neigh( vert, -1, -1, 0 ) > 0.05 ) { nb++ ; }
```

```
if( neigh( vert, 1, 1, 1 ) > 0.05 ) { nb++ ; }
if( neigh( vert, -1, 1, 1 ) > 0.05 ) { nb++ ; }
if( neigh( vert, -1, -1, 1 ) > 0.05 ) { nb++ ; }
if( neigh( vert, -1, 1, -1 ) > 0.05 ) { nb++ ; }
if( neigh( vert, -1, -1, -1 ) > 0.05 ) { nb++ ; }
if( neigh( vert, 1, -1, 1 ) > 0.05 ) { nb++ ; }
if( neigh( vert, 1, -1, -1 ) > 0.05 ) { nb++ ; }
if( neigh( vert, 1, 1, -1 ) > 0.05 ) { nb++ ; }
```

```
if( nb < max_nb ) {
    vert_dilat = 0 ;
}
}
}
```

Dilatation des EPS

Propriété principale = rouge

```
BEGIN {  
max_nb = 15 ;  
}  
  
{  
rouge_dilat = 1 ;  
if( rouge < 0.05 ) {  
    nb = 0 ;  
    if( neigh( rouge, 0, 0, 1 ) > 0.05 ) { nb++ ; }  
    if( neigh( rouge, 0, 0, -1 ) > 0.05 ) { nb++ ; }  
    if( neigh( rouge, 0, 1, 0 ) > 0.05 ) { nb++ ; }  
    if( neigh( rouge, 0, -1, 0 ) > 0.05 ) { nb++ ; }  
    if( neigh( rouge, 1, 0, 0 ) > 0.05 ) { nb++ ; }  
    if( neigh( rouge, -1, 0, 0 ) > 0.05 ) { nb++ ; }  
  
    if( neigh( rouge, 1, 0, 1 ) > 0.05 ) { nb++ ; }  
    if( neigh( rouge, -1, 0, 1 ) > 0.05 ) { nb++ ; }  
    if( neigh( rouge, 1, 0, -1 ) > 0.05 ) { nb++ ; }  
    if( neigh( rouge, -1, 0, -1 ) > 0.05 ) { nb++ ; }  
    if( neigh( rouge, 0, 1, 1 ) > 0.05 ) { nb++ ; }  
    if( neigh( rouge, 0, 1, -1 ) > 0.05 ) { nb++ ; }  
    if( neigh( rouge, 0, -1, 1 ) > 0.05 ) { nb++ ; }  
}
```

```
if( neigh( rouge, 0, -1, -1 ) > 0.05 ) { nb++ ; }  
if( neigh( rouge, 1, 1, 0 ) > 0.05 ) { nb++ ; }  
if( neigh( rouge, -1, 1, 0 ) > 0.05 ) { nb++ ; }  
if( neigh( rouge, 1, -1, 0 ) > 0.05 ) { nb++ ; }  
if( neigh( rouge, -1, -1, 0 ) > 0.05 ) { nb++ ; }
```

```
if( neigh( rouge, 1, 1, 1 ) > 0.05 ) { nb++ ; }  
if( neigh( rouge, -1, 1, 1 ) > 0.05 ) { nb++ ; }  
if( neigh( rouge, -1, -1, 1 ) > 0.05 ) { nb++ ; }  
if( neigh( rouge, -1, 1, -1 ) > 0.05 ) { nb++ ; }  
if( neigh( rouge, -1, -1, -1 ) > 0.05 ) { nb++ ; }  
if( neigh( rouge, 1, -1, 1 ) > 0.05 ) { nb++ ; }  
if( neigh( rouge, 1, -1, -1 ) > 0.05 ) { nb++ ; }  
if( neigh( rouge, 1, 1, -1 ) > 0.05 ) { nb++ ; }
```

```
if( nb < max_nb ) {  
    rouge_dilat = 0 ;  
}  
  
}  
  
}
```

Erosion des bactéries (cycle 1)

```
BEGIN {  
max_nb = 22 ;  
}  
  
{  
vert_erod_a = 0 ;  
if( vert_dilat > 0.5 ) {  
    nb = 0 ;  
  
    if( neigh( vert_dilat, 0, 0, 1 ) < 0.5 ) { nb++ ; }  
    if( neigh( vert_dilat, 0, 0, -1 ) < 0.5 ) { nb++ ; }  
    if( neigh( vert_dilat, 0, 1, 0 ) < 0.5 ) { nb++ ; }  
    if( neigh( vert_dilat, 0, -1, 0 ) < 0.5 ) { nb++ ; }  
    if( neigh( vert_dilat, 1, 0, 0 ) < 0.5 ) { nb++ ; }  
    if( neigh( vert_dilat, -1, 0, 0 ) < 0.5 ) { nb++ ; }  
  
    if( neigh( vert_dilat, 1, 0, 1 ) < 0.5 ) { nb++ ; }  
    if( neigh( vert_dilat, -1, 0, 1 ) < 0.5 ) { nb++ ; }  
    if( neigh( vert_dilat, 1, 0, -1 ) < 0.5 ) { nb++ ; }  
    if( neigh( vert_dilat, -1, 0, -1 ) < 0.5 ) { nb++ ; }  
    if( neigh( vert_dilat, 0, 1, 1 ) < 0.5 ) { nb++ ; }  
    if( neigh( vert_dilat, 0, 1, -1 ) < 0.5 ) { nb++ ; }  
    if( neigh( vert_dilat, 0, -1, 1 ) < 0.5 ) { nb++ ; }  
    if( neigh( vert_dilat, 0, -1, -1 ) < 0.5 ) { nb++ ; }  
    if( neigh( vert_dilat, 1, 1, 0 ) < 0.5 ) { nb++ ; }  
}
```

```

if( neigh( vert_dilat, -1, 1, 0 ) < 0.5 ) { nb++ ; }
if( neigh( vert_dilat, 1, -1, 0 ) < 0.5 ) { nb++ ; }
if( neigh( vert_dilat, -1, -1, 0 ) < 0.5 ) { nb++ ; }

if( neigh( vert_dilat, 1, 1, 1 ) < 0.5 ) { nb++ ; }
if( neigh( vert_dilat, -1, 1, 1 ) < 0.5 ) { nb++ ; }
if( neigh( vert_dilat, -1, -1, 1 ) < 0.5 ) { nb++ ; }
if( neigh( vert_dilat, -1, 1, -1 ) < 0.5 ) { nb++ ; }
if( neigh( vert_dilat, -1, -1, -1 ) < 0.5 ) { nb++ ; }
if( neigh( vert_dilat, 1, -1, 1 ) < 0.5 ) { nb++ ; }
if( neigh( vert_dilat, 1, -1, -1 ) < 0.5 ) { nb++ ; }
if( neigh( vert_dilat, 1, 1, -1 ) < 0.5 ) { nb++ ; }

if( nb < max_nb ) {
    vert_erod_a = 1 ;
}
}

}

```

Erosion des bactéries (cycle 2)

```
BEGIN {  
max_nb = 23 ;  
}  
  
{  
vert_erod_b = 0 ;  
if( vert_erod_a > 0.5 ) {  
    nb = 0 ;  
    if( neigh( vert_erod_a, 0, 0, 1 ) < 0.5 ) { nb++ ; }  
    if( neigh( vert_erod_a, 0, 0, -1 ) < 0.5 ) { nb++ ; }  
    if( neigh( vert_erod_a, 0, 1, 0 ) < 0.5 ) { nb++ ; }  
    if( neigh( vert_erod_a, 0, -1, 0 ) < 0.5 ) { nb++ ; }  
    if( neigh( vert_erod_a, 1, 0, 0 ) < 0.5 ) { nb++ ; }  
    if( neigh( vert_erod_a, -1, 0, 0 ) < 0.5 ) { nb++ ; }  
  
    if( neigh( vert_erod_a, 1, 0, 1 ) < 0.5 ) { nb++ ; }  
    if( neigh( vert_erod_a, -1, 0, 1 ) < 0.5 ) { nb++ ; }  
    if( neigh( vert_erod_a, 1, 0, -1 ) < 0.5 ) { nb++ ; }  
    if( neigh( vert_erod_a, -1, 0, -1 ) < 0.5 ) { nb++ ; }  
    if( neigh( vert_erod_a, 0, 1, 1 ) < 0.5 ) { nb++ ; }  
    if( neigh( vert_erod_a, 0, 1, -1 ) < 0.5 ) { nb++ ; }  
    if( neigh( vert_erod_a, 0, -1, 1 ) < 0.5 ) { nb++ ; }  
    if( neigh( vert_erod_a, 0, -1, -1 ) < 0.5 ) { nb++ ; }  
    if( neigh( vert_erod_a, 1, 1, 0 ) < 0.5 ) { nb++ ; }  
}
```

```

if( neigh( vert_erod_a, -1, 1, 0 ) < 0.5 ) { nb++ ; }
if( neigh( vert_erod_a, 1, -1, 0 ) < 0.5 ) { nb++ ; }
if( neigh( vert_erod_a, -1, -1, 0 ) < 0.5 ) { nb++ ; }

if( neigh( vert_erod_a, 1, 1, 1 ) < 0.5 ) { nb++ ; }
if( neigh( vert_erod_a, -1, 1, 1 ) < 0.5 ) { nb++ ; }
if( neigh( vert_erod_a, -1, -1, 1 ) < 0.5 ) { nb++ ; }
if( neigh( vert_erod_a, -1, 1, -1 ) < 0.5 ) { nb++ ; }
if( neigh( vert_erod_a, -1, -1, -1 ) < 0.5 ) { nb++ ; }
if( neigh( vert_erod_a, 1, -1, 1 ) < 0.5 ) { nb++ ; }
if( neigh( vert_erod_a, 1, -1, -1 ) < 0.5 ) { nb++ ; }
if( neigh( vert_erod_a, 1, 1, -1 ) < 0.5 ) { nb++ ; }

if( nb < max_nb ) {
    vert_erod_b = 1 ;
}
}

}

```

Erosion des EPS (cycle 1)

```
BEGIN {  
max_nb = 22 ;  
}  
{  
rouge_erod_a = 0 ;  
if( rouge_dilat > 0.5 ) {  
    nb = 0 ;  
    if( neigh( rouge_dilat, 0, 0, 1 ) < 0.5 ) { nb++ ; }  
    if( neigh( rouge_dilat, 0, 0, -1 ) < 0.5 ) { nb++ ; }  
    if( neigh( rouge_dilat, 0, 1, 0 ) < 0.5 ) { nb++ ; }  
    if( neigh( rouge_dilat, 0, -1, 0 ) < 0.5 ) { nb++ ; }  
    if( neigh( rouge_dilat, 1, 0, 0 ) < 0.5 ) { nb++ ; }  
    if( neigh( rouge_dilat, -1, 0, 0 ) < 0.5 ) { nb++ ; }  
  
    if( neigh( rouge_dilat, 1, 0, 1 ) < 0.5 ) { nb++ ; }  
    if( neigh( rouge_dilat, -1, 0, 1 ) < 0.5 ) { nb++ ; }  
    if( neigh( rouge_dilat, 1, 0, -1 ) < 0.5 ) { nb++ ; }  
    if( neigh( rouge_dilat, -1, 0, -1 ) < 0.5 ) { nb++ ; }  
    if( neigh( rouge_dilat, 0, 1, 1 ) < 0.5 ) { nb++ ; }  
    if( neigh( rouge_dilat, 0, 1, -1 ) < 0.5 ) { nb++ ; }  
    if( neigh( rouge_dilat, 0, -1, 1 ) < 0.5 ) { nb++ ; }  
    if( neigh( rouge_dilat, 0, -1, -1 ) < 0.5 ) { nb++ ; }  
    if( neigh( rouge_dilat, 1, 1, 0 ) < 0.5 ) { nb++ ; }  
}
```

```

if( neigh( rouge_dilat, -1, 1, 0 ) < 0.5 ) { nb++ ; }
if( neigh( rouge_dilat, 1, -1, 0 ) < 0.5 ) { nb++ ; }
if( neigh( rouge_dilat, -1, -1, 0 ) < 0.5 ) { nb++ ; }

if( neigh( rouge_dilat, 1, 1, 1 ) < 0.5 ) { nb++ ; }
if( neigh( rouge_dilat, -1, 1, 1 ) < 0.5 ) { nb++ ; }
if( neigh( rouge_dilat, -1, -1, 1 ) < 0.5 ) { nb++ ; }
if( neigh( rouge_dilat, -1, 1, -1 ) < 0.5 ) { nb++ ; }
if( neigh( rouge_dilat, -1, -1, -1 ) < 0.5 ) { nb++ ; }
if( neigh( rouge_dilat, 1, -1, 1 ) < 0.5 ) { nb++ ; }
if( neigh( rouge_dilat, 1, -1, -1 ) < 0.5 ) { nb++ ; }
if( neigh( rouge_dilat, 1, 1, -1 ) < 0.5 ) { nb++ ; }

if( nb < max_nb ) {
    rouge_erod_a = 1 ;
}
}

}

```

Erosion des EPS (cycle 2)

```
BEGIN {  
max_nb = 23 ;  
}  
{  
rouge_erod_b = 0 ;  
if( rouge_erod_a > 0.5 ) {  
    nb = 0 ;  
    if( neigh( rouge_erod_a, 0, 0, 1 ) < 0.5 ) { nb++ ; }  
    if( neigh( rouge_erod_a, 0, 0, -1 ) < 0.5 ) { nb++ ; }  
    if( neigh( rouge_erod_a, 0, 1, 0 ) < 0.5 ) { nb++ ; }  
    if( neigh( rouge_erod_a, 0, -1, 0 ) < 0.5 ) { nb++ ; }  
    if( neigh( rouge_erod_a, 1, 0, 0 ) < 0.5 ) { nb++ ; }  
    if( neigh( rouge_erod_a, -1, 0, 0 ) < 0.5 ) { nb++ ; }  
  
    if( neigh( rouge_erod_a, 1, 0, 1 ) < 0.5 ) { nb++ ; }  
    if( neigh( rouge_erod_a, -1, 0, 1 ) < 0.5 ) { nb++ ; }  
    if( neigh( rouge_erod_a, 1, 0, -1 ) < 0.5 ) { nb++ ; }  
    if( neigh( rouge_erod_a, -1, 0, -1 ) < 0.5 ) { nb++ ; }  
    if( neigh( rouge_erod_a, 0, 1, 1 ) < 0.5 ) { nb++ ; }  
    if( neigh( rouge_erod_a, 0, 1, -1 ) < 0.5 ) { nb++ ; }  
    if( neigh( rouge_erod_a, 0, -1, 1 ) < 0.5 ) { nb++ ; }  
    if( neigh( rouge_erod_a, 0, -1, -1 ) < 0.5 ) { nb++ ; }  
    if( neigh( rouge_erod_a, 1, 1, 0 ) < 0.5 ) { nb++ ; }  
}
```

```
if( neigh( rouge_erod_a, -1, 1, 0 ) < 0.5 ) { nb++ ; }  
if( neigh( rouge_erod_a, 1, -1, 0 ) < 0.5 ) { nb++ ; }  
if( neigh( rouge_erod_a, -1, -1, 0 ) < 0.5 ) { nb++ ; }
```

```
if( neigh( rouge_erod_a, 1, 1, 1 ) < 0.5 ) { nb++ ; }  
if( neigh( rouge_erod_a, -1, 1, 1 ) < 0.5 ) { nb++ ; }  
if( neigh( rouge_erod_a, -1, -1, 1 ) < 0.5 ) { nb++ ; }  
if( neigh( rouge_erod_a, -1, 1, -1 ) < 0.5 ) { nb++ ; }  
if( neigh( rouge_erod_a, -1, -1, -1 ) < 0.5 ) { nb++ ; }  
if( neigh( rouge_erod_a, 1, -1, 1 ) < 0.5 ) { nb++ ; }  
if( neigh( rouge_erod_a, 1, -1, -1 ) < 0.5 ) { nb++ ; }  
if( neigh( rouge_erod_a, 1, 1, -1 ) < 0.5 ) { nb++ ; }
```

```
if( nb < max_nb ) {  
    rouge_erod_b = 1 ;  
}  
  
}
```

Détermination de la population du biofilm

```
BEGIN {  
  nb_bact = 0 ;  
  nb_poly = 0 ;  
  nb_bact_et_poly = 0 ;  
  nb_nobact_et_poly = 0 ;  
  nb_bact_et_nopoly = 0 ;  
  
  }  
  {  
  if( rouge_erod_b > 0.5 ) {  
    nb_poly ++ ;  
    if( vert_erod_b > 0.5 ) {  
      nb_bact ++ ;  
      nb_bact_et_poly ++ ;  
    } else {  
      nb_nobact_et_poly ++ ;  
    }  
  } else {  
    if( vert_erod_b > 0.5 ) {  
      nb_bact ++ ;  
      nb_bact_et_nopoly ++ ;  
    }  
  }  
}
```

```
}  
END {  
print> "stats.txt" "Nombre de bacteries ", nb_bact ;  
print> "stats.txt" "Nombre de polymeres ", nb_poly ;  
print> "stats.txt" "Nombre de bacteries et de polymeres ", nb_bact_et_poly ;  
print> "stats.txt" "Nombre de polymeres sans bacterie ", nb_nobact_et_poly ;  
print> "stats.txt" "Nombre de bacterieies sans polymere ", nb_bact_et_nopoly ;  
print> "stats.txt" "Prob(bactereies | polymere) = ", nb_bact_et_poly / nb_poly ;  
print> "stats.txt" "Prob(polymere | bacterie) = ", nb_bact_et_poly / nb_bact ;  
}
```

Fusion des voxets bactérie/EPS

```
{  
  biofilm = vert_erod_b ;  
  if( biofilm == 0 ) {  
    biofilm = rouge_erod_b ;  
  }  
}
```

Volume du biofilm

```
BEGIN {  
  volume_biofilm = 0 ;  
  volume_voxel = 1.14569 * 1.14569 * 1.142 ;  
}  
{  
  volume_biofilm += volume_voxel * biofilm ;  
}  
END {  
  print "Volume Total de biofilm ", volume_biofilm ;  
}
```

Epaisseur

```
{
if( W == NW-1 ) {
    thickness = 0 ;
    for( depth = NW-1 ; depth >-1 ; --depth ) {
        if( thickness == 0 ) {
            if( neigh(biofilm,0,0,-depth) > 0.5 ) {
                thickness = depth + 1 ;
                break ;
            }
        }
    }
    enveloppe = thickness ;
}
}
```

Epaisseur (suite)

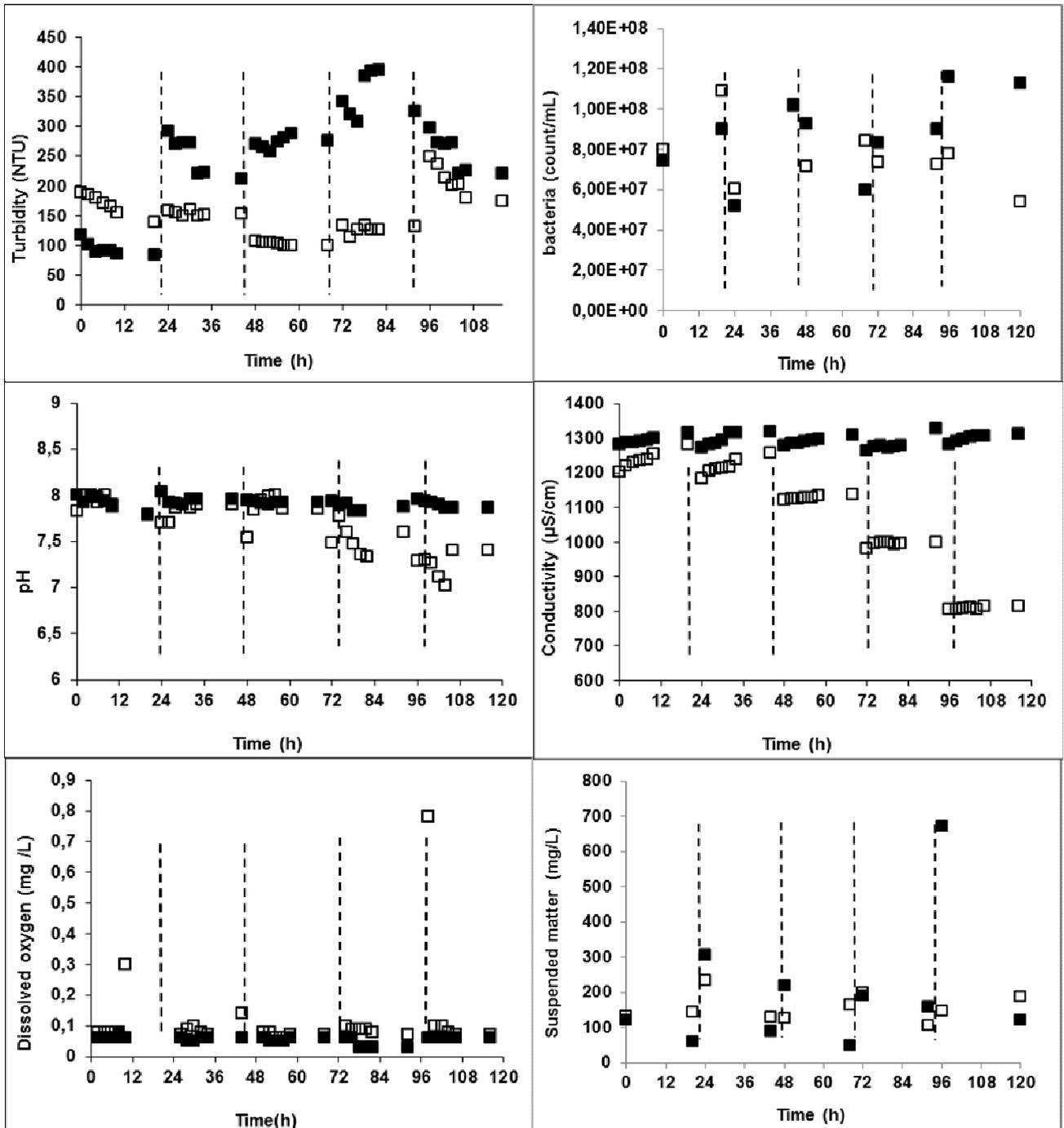
```
{
if( enveloppe == 0 ) {
    enveloppe = enveloppe_NDV ;
}
}
```

Surface du biofilm

```
Begin { area=0 ;  
  {  
    if (biofilm>0.5) {  
      area +=1 ;  
    }  
  }  
}  
END {  
  print> "Area=", area*sizeu*sizev ;  
}
```

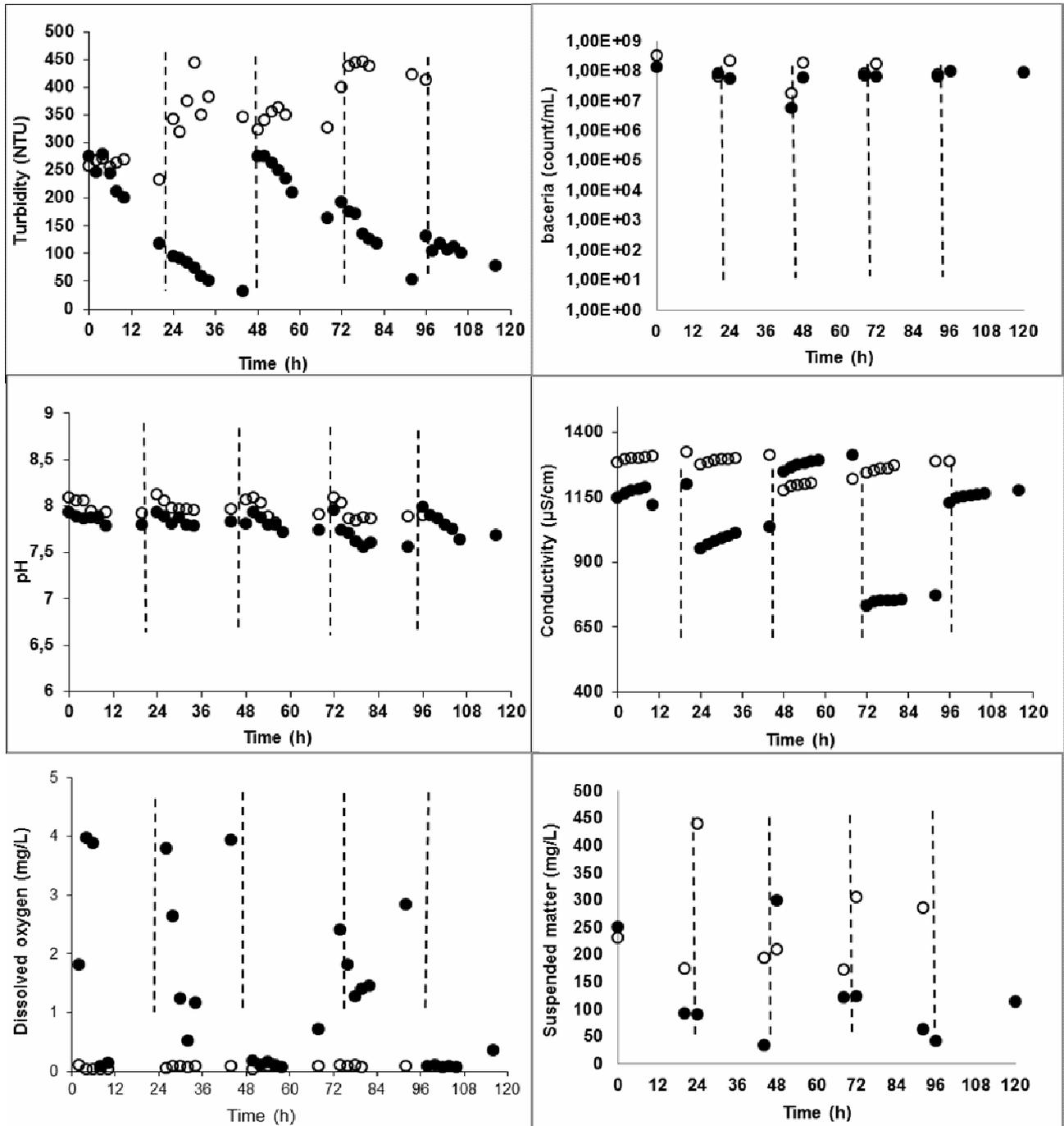
Annexe 2 : Variation journalière des caractéristiques des eaux usées, $\beta=1/3$

■ $\overline{\gamma} = 1\text{s}^{-1}$ □ $\overline{\gamma} = 6\text{s}^{-1}$



Annexe 3 : Variation journalière des caractéristiques des eaux usées, $\beta=1/2$

● $\gamma=1s^{-1}$ ○ $\gamma=6s^{-1}$



CONTROLE HYDRODYNAMIQUE DE L'ORGANISATION DES BIOFILMS EN MILIEU EAUX USEES

Rim Al Khatib ¹, Bruno Lartiges ¹

Christian Mustin ², Salah Skali-Lami ³

⁽¹⁾Nancy Université-INPL-LEM-ENSG/INPL-CNRS, Pôle de l'Eau, 15 avenue du Charmois, BP40, 54501 Vandoeuvre Cedex, France, Tél : 33 (0)3 83 59 62 97- Fax : 33 (0)3 83 59 62 55, reem_el_khatib@yahoo.com - bruno.lartiges@get.obs-mip.fr

⁽²⁾ Nancy Université-INPL-LIMMOS-FST/UHP-CNRS 7137 boulevard des Aiguillettes, BP 239, 54506 Vandoeuvre Cedex, France, Téléphone : +33 (0)3 83 68 42 82- Fax : +33 (0)3 83 68 42 84.

⁽³⁾ École nationale supérieure d'électricité et de mécanique ENSEM-INPL, 2 avenue de la Forêt de Haye, BP 160 - F-54504 Vandœuvre lès Nancy, Tél./phone +33 (0)3 83 59 55 52 - Fax : +33 (0)3 83 59 55 51.

Résumé Nous étudions le développement de biofilms d'eaux usées dans un réacteur Couette-Poiseuille, afin de contrôler les conditions hydrodynamiques qui président à leur formation. Les biofilms formés sur des coupons de prélèvement sont marqués à l'acridine orange, et observés en microscopie confocale. Dans des conditions de gradient constant, les biofilms formés sous un cisaillement de 1 s^{-1} sont épais, peu denses, poreux, et présentent des élongations (streamers) qui oscillent dans le flux. En revanche, les biofilms générés avec un cisaillement de 6 s^{-1} sont denses et peu épais. Le réacteur utilisé permet également de déterminer un gradient pariétal nul, et dans ce cas, le développement du biofilm se trouve inhibé pendant plus de deux jours.

Mots clé : Biofilm ; force de cisaillement ; exopolymères ; écoulement couette-poiseuille ; eaux usées

*Hydrodynamic control of wastewater biofilm
organization*

Abstract: We investigate biofilm formation in a Couette-Poiseuille reactor, in order to monitor precisely the hydrodynamical conditions that govern biofilm development. The biofilms are grown on coupons, and then stained with acridine orange, and observed under confocal microscopy. We show that biofilms formed under a constant 6 s^{-1} shear rate are more compact and thinner than those grown under 1 s^{-1} that are porous, thicker, and present streamers. On the other hand, using a shear profile that determines a parietal gradient equal to zero, prevents the growth of biofilm for more than two days.

Keywords: Biofilm, shear rate, exopolymeric substances, Couette-Poiseuille flow, wastewater

I INTRODUCTION

Les biofilms sont des associations de microcolonies bactériennes d'espèces différentes qui se développent sur toute surface à l'interface solide/liquide dans des conditions variées de température, apport en nutriments, conditions hydrodynamiques,... [1]. Dans les réseaux d'assainissement, la formation des biofilms joue un rôle primordial dans la transformation, le stockage et l'élimination des polluants. Les changements de conditions hydrodynamiques, le vieillissement, et la quantité de substrat dans le milieu, affectent les caractéristiques physico-chimiques des biofilms et peuvent provoquer le détachement de ces derniers libérant ainsi les micropolluants dans le réseau [2]. Bien que le développement de biofilm soit un phénomène fréquent voire systématique à l'interface solide/liquide en présence de bactéries, sa formation passe par une série d'étapes influencées par différents facteurs (mode d'écoulement, nature de la surface, type des nutriments et leurs concentrations, conditions d'aération). La formation du biofilm met donc en œuvre différents processus physicochimiques (diffusion, adhésion, ...) ainsi que des processus biologiques (formation d'agrégats, croissance de microorganismes, production d'exopolymères, ...) [3, 4]. Au stade actuel des connaissances, les mécanismes de formation des biofilms comprennent trois mécanismes essentiels: le transport de bactéries, l'adhésion et la croissance, et la multiplication de microorganismes [5-7].

Influence des conditions hydrodynamiques

L'activité du biofilm est fortement liée à son volume, la quantité de biomasse fixée, sa densité, sa porosité et le transfert de nutriments à l'intérieur du biofilm [8]. La vitesse d'écoulement du liquide et les forces de cisaillement qui en résultent, semblent être les facteurs influençant le plus la structure du biofilm notamment en raison de leur impact sur la répartition des microcolonies et sur la production des exopolymères [5, 9]. En effet, les différentes études menées sur la formation des biofilms à partir de systèmes naturels ou de souches pures sous différentes conditions hydrodynamiques, montrent que l'épaisseur et la masse fixée, la nature et la quantité d'exopolymères (EPS) produits ainsi que la répartition des colonies bactériennes, varient largement suivant le mode de cisaillement appliqué [3, 9, 10]. Les écoulements à grande vitesse, voire turbulents, engendrent des biofilms denses et augmentent

le transfert des nutriments depuis le liquide extérieur vers le biofilm, ce qui favorise la production d'exopolymères notamment les polysaccharides. Ainsi le biofilm possède une structure plus rigide et la cohésion entre les cellules sera plus importante [11]. Mais ceci aura un effet défavorable sur le transfert de nutriments au sein même du biofilm, ce qui va diminuer l'activité de celui-ci : les biofilms seront plus fins [3, 7, 12]. A faible force de cisaillement, les biofilms sont beaucoup moins denses, plus poreux et plus épais. Ces biofilms sont formés par l'agrégation de colonies bactériennes séparées par des vides interstitiels déterminant des canaux qui assurent le transfert de nutriments à l'intérieur du biofilm, ce qui augmente son activité et aboutit à des biofilms plus épais mais moins rigides car la production des EPS est moins importante [3, 12].

Nous nous intéressons, dans ce travail, à la croissance de biofilms en milieu eaux usées urbaines dans des conditions contrôlées d'écoulement et de cisaillement. Un réacteur Couette-Poiseuille a été choisi pour la réalisation des expériences et la croissance des biofilms à partir des eaux usées.

II MATERIELS ET METHODES

II.1 Réacteur de croissance

Le réacteur Couette-Poiseuille (figure 1) est formé de deux cylindres concentriques en polychlorure de vinyle (PVC) espacé de 3,5 mm. Le cylindre est de 10 cm de hauteur, statique et porte 16 coupes de prélèvement des biofilms de 16 mm de diamètre. La surface concave de ceux-ci est ajustée pour s'adapter à la forme du cylindre extérieur. Le cylindre interne est plein et entraîné par un moteur à vitesse réglable de façon à contrôler sa vitesse de rotation autour de son axe. La vitesse de rotation du cylindre interne détermine en partie le profil de cisaillement du fluide qui circule entre les deux cylindres. A l'entrée du réacteur, un divergent est installé pour assurer une distribution homogène du liquide entrant sur toute la hauteur du réacteur.

L'avantage de ce réacteur est de pouvoir assurer un écoulement Couette-Poiseuille qui n'est que le couplage d'un écoulement Couette avec un écoulement Poiseuille. Cet écoulement présente l'avantage de pouvoir travailler dans différentes configurations d'écoulement en variant le rapport vitesse de rotation du cylindre interne sur vitesse débitante du fluide [13].

Le profil de vitesse d'écoulement de Couette suivant le modèle de notre réacteur (cylindre interne mobile et cylindre externe fixe) est linéaire (figure 2). Ceci implique qu'une particule sera soumise au même gradient de vitesse (γ_p) quelle que soit sa position dans le fluide, l'expression de la vitesse sera $\gamma_p = R_{int} / e$ avec Ω (radians) la vitesse de rotation du cylindre interne et e (m) l'espace entre les deux cylindres ($R_{ext} - R_{int}$). Cette particularité de gradient de vitesse permet de calculer la force hydrodynamique à laquelle sera soumise une particule dans l'entrefer du réacteur.

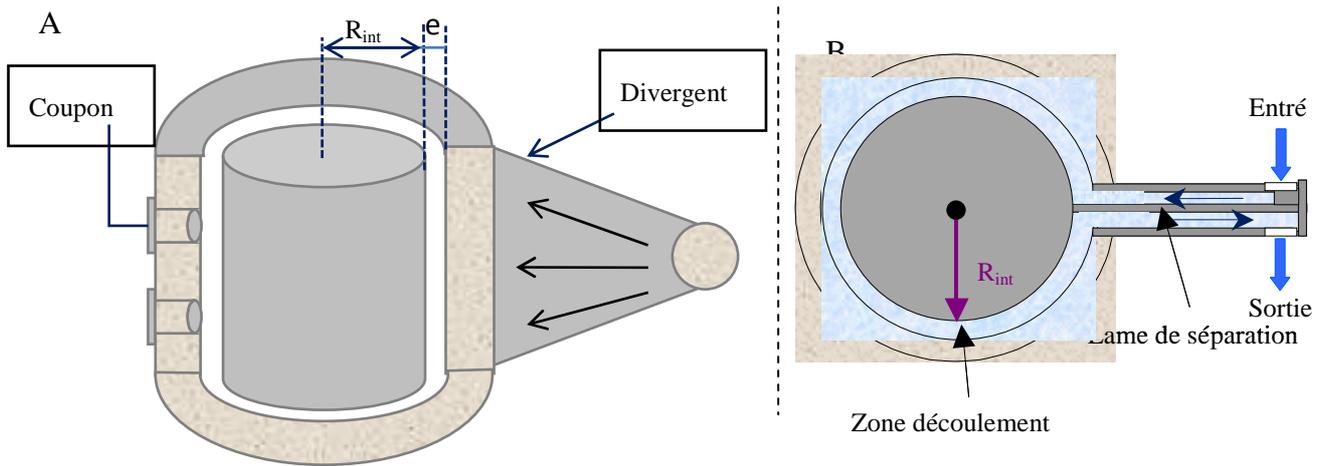


Figure 1 : Coupe longitudinale (A) et transversale (B) du réacteur Couette-Poiseuille.

En ajoutant une entrée et une sortie à notre système (figure 1B), un écoulement de Poiseuille est obtenu. Dans le cas de nos conditions expérimentales, à savoir cylindre interne *mobile*, l'écoulement devient un écoulement Couette-Poiseuille. L'expression du gradient de cisaillement pour des petits espaces annulaires [13] est donnée par :

$$\gamma = R_{int} \Omega \left(1 - 6 \left(\beta - \frac{1}{2} \right) \right) \frac{1}{e}$$

$$\beta = \frac{V_q}{R_{int} \Omega} \text{ avec } V_q \text{ la vitesse moyenne du fluide}$$

Le facteur β (rapport entre la vitesse débitante et la vitesse de rotation du cylindre interne) détermine le profil de vitesse et par la suite le gradient de cisaillement appliqué.

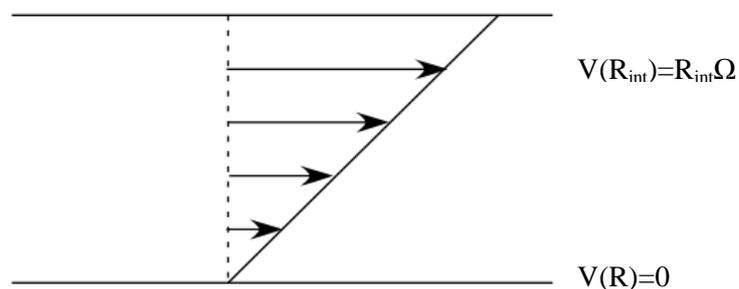


Figure 2 : Profil de vitesse dans un écoulement Couette.

Dans nos expériences, $\beta = 1/2$, ce qui correspond à un écoulement de Couette strict (vitesse maximale d'écoulement à la surface du cylindre interne et nulle à la surface du cylindre externe). L'expression de gradient de cisaillement devient :

$$\gamma = \frac{R_{\text{int}} \Omega}{e}$$

II.2 Mise en marche du réacteur

15 litres d'eaux usées, collectés à la STEP de Maxéville après dessablage et dégrillage, de façon à éviter les grosses particules et la graisse qui peuvent colmater la pompe, sont versés dans une cuve à section carrée en plexiglas qui sera le réservoir d'alimentation du réacteur. Cette eau est renouvelée quotidiennement pendant une semaine. L'eau usée dans la cuve est maintenue sous agitation à une vitesse de 150 tours/minutes à l'aide d'une palette repliable d'agitation en polypropylène (VWR 442-2121). L'eau est pompée dans un tuyau (Legris 1025406K02) en polyuréthane de 4 mm de diamètre de la cuve à l'intérieur du réacteur à l'aide d'une pompe immergée à débit réglable (Fisher W75601) (figure 3). L'eau sortant du réacteur retourne ensuite à la cuve. La position du tuyau de retour joue un grand rôle dans le contrôle du débit de l'eau pompée, en effet le réglage du débit correspondant à la vitesse de cisaillement appliquée est réalisé par l'ajustement de la hauteur de ce tuyau.

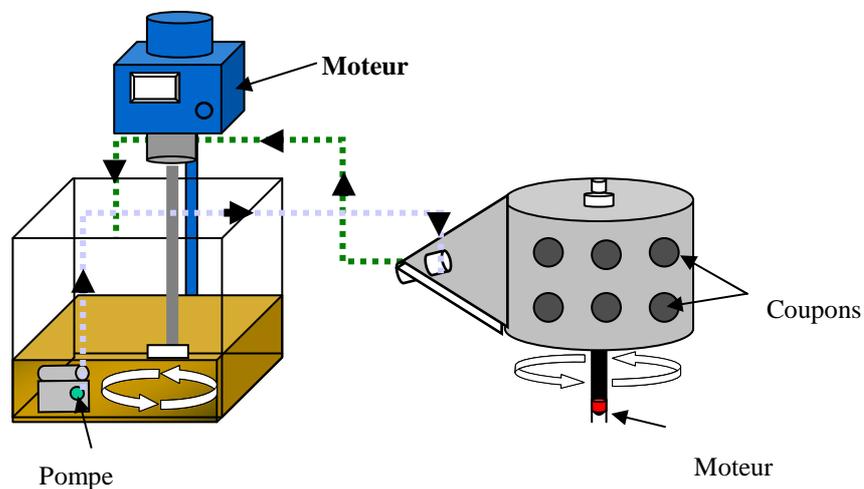


Figure 3 : Schéma du montage expérimental pour la croissance des biofilms.

Le suivi de l'évolution de l'eau usée est réalisé chaque heure par la mesure du pH, de la conductivité, du potentiel redox, de l'oxygène dissous (WTW, Multiline F/SET) et de la turbidité (Hach 2100P). Un comptage bactérien sur cellule de Thomas (VWR 720-0150) est effectué pour une évaluation du nombre de bactéries au début de la journée et au moment de renouvellement de l'eau après 24 h.

Un coupon, sur lequel se développe le biofilm, est prélevé chaque 24 h, l'eau est partiellement éliminée en égouttant le coupon. Le coupon est ensuite pesé et placé dans une petite boîte à bouchon en polyéthylène (partie contenant le biofilm vers le haut) contenant au fond quelques mL d'eau ultrapure. La boîte est ensuite placée à 4°C avant l'observation en microscopie confocale à balayage laser. L'observation par microscopie confocale est réalisée le plus tôt possible (1 jour après le prélèvement des coupons) afin de minimiser une évolution possible du biofilm.

II.3 Observation par microscopie confocale

Avant d'observer les biofilms au microscope confocal à balayage laser (confocal laser scanning microscopy, CLSM), ces derniers sont colorés avec de l'acridine orange. Ce fluorochrome possède des longueurs d'onde d'excitation et d'émission spécifiques au marquage des acides nucléiques (ADN et ARN) et des exopolymères extracellulaires [14, 15]. Pour réaliser cette coloration, 100µL d'acridine orange sont déposés à l'aide d'une micropipette sur l'échantillon de biofilm du coupon. Le coupon est remué doucement pour disperser le colorant sur la totalité de sa surface. Il est ensuite placé à l'obscurité pendant 20 à 30 min pour la fixation de l'acridine sur le biofilm. Pour éliminer l'excès de colorant, le coupon est lavé en ajoutant 100 µL d'eau ultrapure à plusieurs reprises jusqu'à élimination de l'excès d'acridine. Le coupon est ensuite placé sur un dispositif comprenant une lame en quartz, contenant de l'eau ultrapure pour assurer une atmosphère humide pour l'échantillon, et observé en microscopie confocale sous objectifs x4 et x20 (figure 5). Les observations sont stockées sous forme de piles d'images (3D). Les piles d'images obtenues sont destinées à différents logiciels de traitements d'image. Ces logiciels visent en premier lieu l'amélioration de la résolution, l'atténuation du bruit de fond et la déconvolution 3D (LaserSharp 2000 et Autoquant X-Autodeblur). En deuxième lieu les piles d'image sont chargées en niveaux de gris et transformées en 8-bits et un seuillage binaire est ensuite appliqué : le résultat est alors une image binaire à deux classes noir et blanc (Image J). En dernière étape la reconstruction 3D et le calcul des différents paramètres (épaisseur du biofilm, dimensions fractales, volume et co-localisation, etc...) sont réalisées par le logiciel GOCAD développé à l'Ecole Nationale Supérieure de géologie à Nancy (ENSG-France).

Le développement du biofilm est réalisé pendant une semaine, ainsi 8 coupons sont générés. L'acquisition des images au confocal des biofilms obtenus est ensuite menée sur 5 jours. La partie amélioration de la qualité des images ainsi que la déconvolution 3D en arrivant à la reconstruction 3D est un travail long qui peut durer jusqu'à 4 mois selon l'épaisseur des biofilms obtenus. Pour ces raisons citées ci-dessus, les expériences ont été réalisées en duplicata pour les différents gradients de

cisaillement. Ce travail présente une partie des résultats obtenus pour une expérience par gradient, les traitements d'image n'étant pas finalisés pour l'ensemble des expériences.

III RESULTAT ET DISCUSSION

Le contrôle des caractéristiques physicochimiques ainsi que la quantité de bactéries des eaux usées renouvelées, montre une très faible variation de la qualité de l'eau au cours de l'expérience. Le renouvellement quotidien des eaux usées assure donc un apport constant de nutriments et de bactéries dans le réacteur tout au long des expériences.

Les expériences dans le réacteur de croissance sont effectuées sous deux gradients de cisaillements (1 s^{-1} et 6 s^{-1}), afin d'étudier l'impact de la variation des forces hydrodynamiques sur la structure et la croissance du biofilm. Les algorithmes mathématiques appliqués par l'intermédiaire du logiciel Gocad sur les piles d'image 3D obtenues par microscopie confocale ont permis de calculer les épaisseurs des biofilms, la quantité de biomasse fixée ainsi que l'estimation du volume de polymères, la surface et le volume de biofilm qui occupe la surface de coupons.

Les résultats (figure 4) montrent que la formation du biofilm n'est pas similaire pour les deux gradients. Concernant l'épaisseur, les résultats montrent que les biofilms obtenus sous cisaillement 1 s^{-1} sont plus épais que ceux obtenus à 6 s^{-1} . L'épaisseur paraît augmenter avec le temps jusqu'à atteindre une valeur au-dessus de laquelle le biofilm se détache et son épaisseur décroît. Pour le cisaillement 1 s^{-1} , une chute de l'épaisseur est observée après 72 h de mise en marche de réacteur puis elle augmente à nouveau dans les jours qui suivent. Cette chute observée peut être due à un détachement de biofilm lors de sa croissance : le biofilm atteint une épaisseur très importante de sorte que l'espace entre les deux cylindres devient très étroit et les particules en suspension dans le fluide entraînent une partie du biofilm d'où une baisse de son épaisseur. A noter que les valeurs d'épaisseur obtenues sont probablement sous-estimées car une petite partie du biofilm se détache lors de la préparation des coupons pour l'observation en microscopie confocale.

Concernant les quantités de biomasse et de polymères produits, elles sont différentes dans les deux cas. A 6 s^{-1} , la quantité de polymères et de bactéries dans la phase d'initiation de la formation de biofilm est beaucoup plus importante, montrant que la croissance de biofilm est initialisée par la production de polymères qui vont assurer l'adhésion des bactéries. Une fois que le biofilm commence à croître, cette quantité de polymères devient proportionnelle à la quantité de bactéries. Pour le cisaillement de 1 s^{-1} , le comportement est différent, la quantité de polymères et de bactéries augmentent avec la croissance du biofilm. Au dernier prélèvement, l'épaisseur du biofilm est maximale (environ 350 microns) et la quantité de biomasse est la plus élevée tandis que la quantité de polymères est très faible. Ceci peut être confirmé par les études qui trouvent une diminution de la production de polymères quand l'épaisseur du biofilm augmente [3, 12]. Les résultats montrent aussi

que la majorité des polymères élaborés à l'intérieur du biofilm semble former une matrice indépendante tandis que les bactéries semblent formées de deux catégories équivalentes une liées aux exopolymères et l'autre sans polymères.

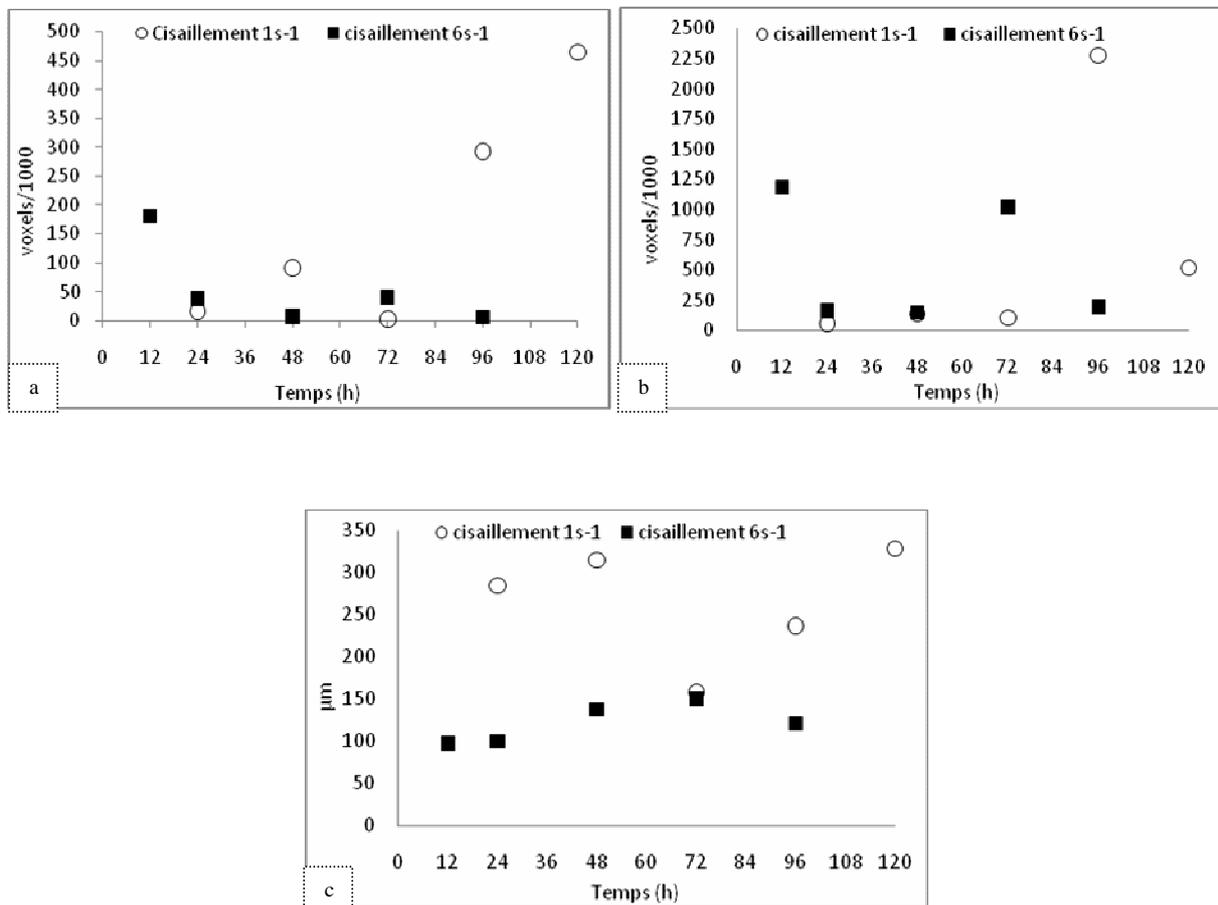


Figure 4 : Résultats obtenues à partir de Gocad : a) quantité de bactéries (exprimé par voxels), b) quantité de polymères (exprimé par voxels), c) épaisseur de biofilm sur le coupon

L'observation des coupons par microscopie confocale montre que pour les deux cisaillements, l'initiation du biofilm commence par l'adsorption de substrat sur le coupon suivi par l'adsorption des bactéries et le développement et l'agrégation de microcolonies. Pour le cisaillement 6 s⁻¹, nous remarquons que la propagation des colonies bactériennes est surfacique, les colonies sont de petite taille mais occupent toute la surface du coupon. Pour le cisaillement 1 s⁻¹, la prolifération des colonies se fait verticalement, le nombre de colonies occupant la surface des coupons est limité et la croissance se fait en épaisseur. Un phénomène commun observé sur tous les coupons est l'élongation des colonies

dans le sens d'écoulement à un angle d'environ 45 degré. Ceci peut être corrélé aux forces de cisaillement qui entraînent les cellules filles lors de leur division dans le sens d'écoulement [9].

Deux expériences additionnelles, avec les mêmes gradients de cisaillement, en condition dite de « non dépôt », ont été réalisées dans le but d'avoir les conditions les plus défavorables pour la formation de biofilm. Dans ce cas, la vitesse d'écoulement est nulle à la surface du cylindre interne et maximale à la surface du cylindre externe. Les premiers résultats des observations en microscopie confocale montrent une différence nette entre les deux conditions. Que ce soit au gradient 6 s^{-1} ou 1 s^{-1} aucun développement de biofilm n'a été observé durant les deux premiers jours (figure 5).

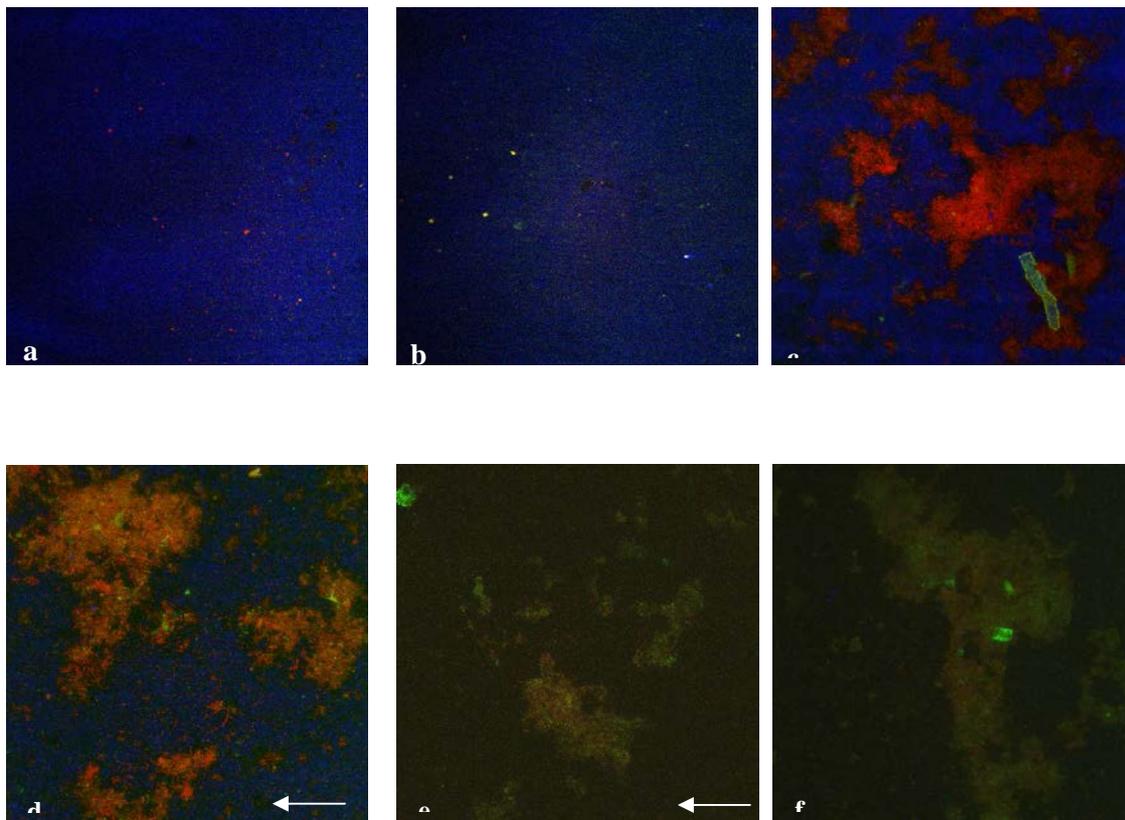


Figure 5 : Images obtenues par microscopie confocale (objectif x20), flèche blanche indiquant le sens d'écoulement : a) coupon 24 h condition de non dépôt, b) coupon 48 h condition de non dépôt, c et d) coupons respectivement 24 et 48 h (condition normale, cisaillement 6 s^{-1}), e et f) coupons respectivement 24 et 48 h (condition normale, cisaillement 1 s^{-1})

Après 48 h, un dépôt de biofilm commence à se former dont l'origine est à rechercher dans les modifications des conditions hydrodynamiques à la surface du cylindre interne du réacteur: en effet le

nouveau profil de cisaillement, s'il défavorise la formation de biofilm sur les coupons, facilite la croissance de biofilm sur le cylindre interne.

IV CONCLUSION

Les expériences réalisées dans le réacteur Couette-Poiseuille ont permis l'étude du développement des biofilms à partir des eaux usées dans un écoulement laminaire sous différents gradients de vitesses pariétales. La reconstruction 3D et l'application des algorithmes de calcul sur les données issues des images obtenues à partir de la microscopie confocale ont permis d'étudier la structure et les caractéristiques des biofilms formés. Les biofilms présentaient deux modes différents de développement ainsi que des structures différentes selon le taux de cisaillement appliqué (1 s^{-1} , 6 s^{-1}). Une étude sur l'étape initiale de formation de biofilm semble nécessaire à réaliser pour voir l'influence de l'hydrodynamique sur l'étape d'initiation à la croissance. Celle-ci sera réalisée dans les mêmes conditions en s'intéressant au prélèvement des coupons dans un intervalle [0-24h].

La formation de biofilm se trouve très ralentie (au moins 48 h) en appliquant la condition de « non dépôt ». Ceci s'avère très important pour toutes les applications nécessitant d'éviter le développement de biofilm. Ainsi une application de ces conditions sur des eaux moins chargées comme eaux potables est prometteur pour la lutte contre la prolifération de biofilms dans les réseaux d'eau potable.

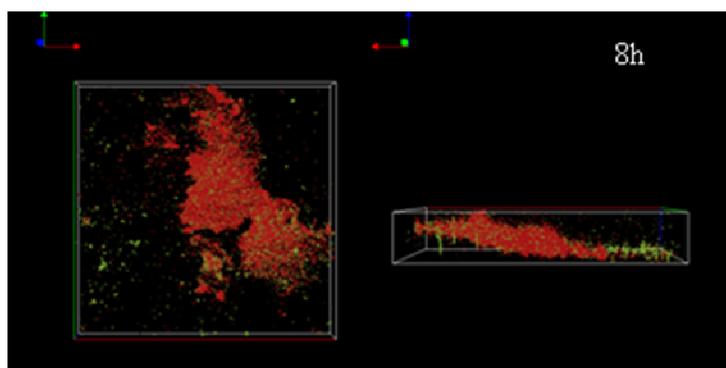
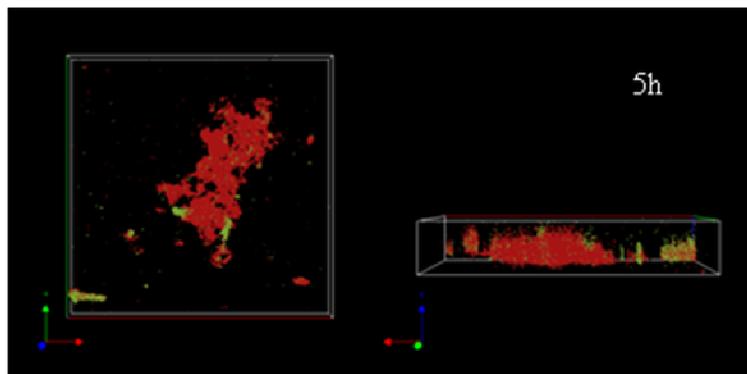
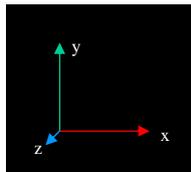
REFERENCES

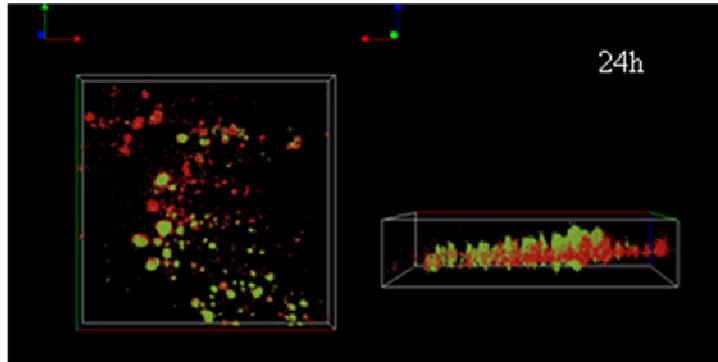
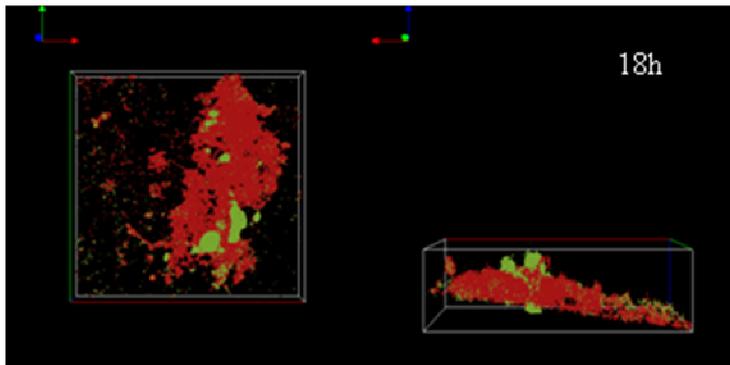
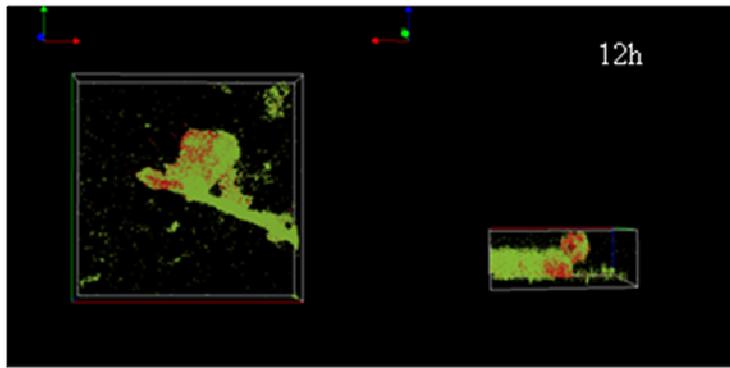
1. Eberl H.J., Picioreanu C., Heijnen J.J., Van Loosdrecht M.C.M. (2000)- *A three-dimensional study on the correlation of spatial structure, hydrodynamic conditions, and mass transfer and conversion in biofilms*. Chemical Engineering Sciences, 55: 6209-6222.
2. Horn H., Reiff H., Morgenroth E (2003)-*Simulation of growth and detachment in biofilm systems under defined hydrodynamic conditions*. Biotechnology and Bioengineering, 81(5): 607-617.
3. Celmer D., Oleszkiewicz J.A., Cicek N. 2008- *Impact of shear force on the biofilm structure and performance of a membrane biofilm reactor for tertiary hydrogen-driven denitrification of municipal wastewater*. Water Research, 42: 3057-3065.
4. Andersson S. (2009), master report - *Characterization of bacterial biofilms for wastewater treatment*. Royale Institute of Technology, school of Biotechnology: Stockholm.
5. Costerton J.W. (1999) *Discussion : Introduction to biofilm*. International Journal of Antimicrobial Agents, 11: 217-221.
6. Gauthier, F. (2002) , rapport de thèse - *Biofilms qualité biologique de l'eau potable au cours de sa distribution*. Université de Picardie - Amiens.

7. Liu Y. and Tay J-H. (2000)- *The essential role of hydrodynamic force in the formation of biofilm and granular sludge*. Water Research, 36: 1653-1665.
8. Abrahamson M., Lewandowski Z., Geesey G., Skjak-Braek G., Strand W., Christensen B.E. (1996)- *Development of an artificial biofilm to study the effects of a single microcolony on mass transport*. Journal of Microbiological Methods, 26(1-2): 161-169.
9. Stoodley P., Dodds I., Boyle J.D., Lappin-Scott H.M. (1999)- *Influence of hydrodynamics and nutrients on biofilm structure*. Journal of Applied Microbiology Symposium Supplement, 85(28): 19S-28S.
10. Pereira M., Kuehn M., Wuertz S., Neu T., Melo L. (2002)- *Effect of flow regime on the architecture of a Pseudomonas fluorescens biofilm*. Biotechnology and Bioengineering, 78(2): 164-171.
11. Decho A. (2000)- *Microbial biofilms in intertidal systems: An overview*. Continental Shelf Research, 20: 1257-1273.
12. Wagner M., Ivleva N.P., Haisch C., Niessner R. (2008)- *Combined use of confocal laser scanning microscopy (CLSM) and Raman microscopy (RM): Investigation on EPS-Matrix*. Water Research, XXX: 1-14.
13. Paris, T. (2008), Rapport de thèse - *Formation et organisation de biofilms en milieu eau potable. Influence du gradient de vitesse pariétal.*, in U.F.R Sciences & Techniques de la Matière et des Procédés. Ecole Doctorale Energie Mécanique Matériaux , Département de Formation Doctorale Mécanique Energétique. Université Henri Point Carré: Nancy.
14. Wirtanen G., Salo S., Helander I.M, Mattila-Sandholm T. (2001)- *Microbiological methods for testing disinfectant efficiency on Pseudomonas biofilm*. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 20(1): 37-50.
15. Jana-Sur P. and Chakraborty A.K. (2005)- *Studies on the interaction of bacterial capsular polysaccharide-Klebsiella K16 with cationic dyes*. J. Photochem. Photobiol. Chem, 173: 64-69.

Annexe 5 : Reconstruction 3D, $\gamma=6\text{ s}^{-1}$, série 24h

Les images présentées ci-dessous, représentent des exemples de reconstructions 3D effectuées sur des images de CLSM des biofilms obtenus à 5, 8, 12, 18 et 24h de croissance dans le réacteur Couette-Poiseuille avec $\beta=1/2$ et $\gamma=6\text{s}^{-1}$. La couleur rouge correspond aux exopolymères et la couleur verte correspond aux bactéries.





AUTORISATION DE SOUTENANCE DE THESE
DU DOCTORAT DE L'INSTITUT NATIONAL
POLYTECHNIQUE DE LORRAINE

o0o

VU LES RAPPORTS ETABLIS PAR :

Monsieur Nicolas BERNET, Directeur de Recherche, LBE - INRA, Narbonne

Monsieur Alain LINÉ, Professeur, INSA, Toulouse

Le Président de l'Institut National Polytechnique de Lorraine, autorise :

Madame AL KHATIB Rime

à soutenir devant un jury de l'INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE LORRAINE,
une thèse intitulée :

"Contrôle hydrodynamique de la formation des biofilms en milieu eaux usées. "

en vue de l'obtention du titre de :

DOCTEUR DE L'INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE LORRAINE

Spécialité : « Géosciences »

Fait à Vandoeuvre, le 07 novembre 2011

Le Président de l'I.N.P.L.,

F. LAURENT.



Contrôle hydrodynamique de la formation des biofilms en milieu eaux usées

Resumé

Les biofilms bactériens se développent sur toute interface liquide-solide dès que les conditions sont favorables. Ils correspondent à des assemblages de microcolonies qui baignent dans une matrice extracellulaire polymérique. Parmi les facteurs contrôlant le développement des biofilms, l'hydrodynamique est un paramètre clé qui affecte la morphologie et la composition du biofilm. Nous nous intéressons plus particulièrement dans cette thèse à l'influence du gradient de vitesse pariétal sur la formation du biofilm. Pour cela, nous utilisons un réacteur Couette-Poiseuille qui permet de travailler sous écoulement laminaire stable dans différentes conditions d'écoulement. Les biofilms obtenus après circulation d'eaux usées, sont prélevés sur des coupons et visualisés par microscopie confocale à balayage laser. Différents paramètres caractérisant la morphologie du biofilm sont déterminés après reconstruction 3D de leur structure à l'aide du modèleur GOCAD. Nous montrons que le transport convectif constitue une étape essentielle dans la formation initiale du biofilm, et qu'un gradient pariétal nul permet d'inhiber le développement de celui-ci.

Mots clés : Couette-Poiseuille, biofilm, shear rate, mass transport, reconstruction 3D

Hydrodynamic control of biofilm formation in wastewater system

Abstract

Bacterial biofilms develop on any solid-liquid interface whenever conditions are appropriate. They correspond to microcolony assemblages embedded in an extracellular matrix. Among the factors controlling biofilm growth, hydrodynamics is a key parameter affecting both biofilm morphology and composition. In this thesis we investigate the influence of hydrodynamics, and more precisely the wall shear rate effect on biofilm development. For this purpose, a Couette-Poiseuille reactor, allowing to work under stable laminar flow with different flow velocities, was used. Biofilms grown from urban wastewater on coupon surfaces were observed with confocal scanning microscopy. A 3D modeling using GOCAD software was established, thus allowing the determination of various biofilms structural characteristics. The results show the essential role of convective mass transport in biofilm formation, actually a zero wall shear rate inhibited bacterial deposition, and hence biofilm growth.

Keywords: Couette-Poiseuille, biofilm, shear rate, mass transport, wastewater, 3D reconstruction.

Laboratoire Environnement et Mineralurgie LEM, ENSG, UMR CNRS/INPL 7569

15 avenue du Charmois, BP 40, 54501, Vandoeuvre Les Nancy cedex
