



Étude des facteurs d'influence de l'écologie de *Naegleria fowleri* dans les biofilms

Sébastien Goudot

► To cite this version:

Sébastien Goudot. Étude des facteurs d'influence de l'écologie de *Naegleria fowleri* dans les biofilms. Biochimie, Biologie Moléculaire. Université de Lorraine, 2012. Français. NNT : 2012LORR0304 . tel-01749649

HAL Id: tel-01749649

<https://hal.univ-lorraine.fr/tel-01749649>

Submitted on 14 Jan 2020

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>



UNIVERSITÉ
DE LORRAINE

Ecole Doctorale BioSE (Biologie-Santé-Environnement)

Thèse

Présentée et soutenue publiquement pour l'obtention du titre de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE LORRAINE

Mention : « Sciences de la Vie et de la Santé »

par Sébastien GOUDOT

Etude des facteurs d'influence de l'écologie de *Naegleria fowleri* dans les biofilms

Le 6 décembre 2012

Membres du jury :

Rapporteurs :	Yann HÉCHARD, Christine ROQUES	Professeur, Université de Poitiers Professeur, Université de Toulouse
Examineurs :	Frédéric GARABETIAN Jean-Claude BLOCK Frédéric JORAND Sandrine BANAS	Professeur, Université de Bordeaux 1 Professeur, Université de Lorraine Maître de Conférences, Université de Lorraine (directeur de thèse) Maître de Conférences, Université de Lorraine (co-directrice de thèse)
Membres invités:	Laurence MATHIEU Pascaline HERBELIN Sylvie SOREAU	Maître de Conférences, Ecole Pratique des Hautes Etudes Ingénieur, EDF Recherche et Développement Docteur, EDF Recherche et Développement

UMR 7564, CNRS/Université de Lorraine, Laboratoire de Chimie Physique et Microbiologie pour l'Environnement, 405, rue de Vandoeuvre 54601 Villers-lès-Nancy, France.



UNIVERSITÉ
DE LORRAINE

Ecole Doctorale BioSE (Biologie-Santé-Environnement)

Thèse

Présentée et soutenue publiquement pour l'obtention du titre de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE LORRAINE

Mention : « Sciences de la Vie et de la Santé »

par Sébastien GOUDOT

Etude des facteurs d'influence de l'écologie de *Naegleria fowleri* dans les biofilms

Le 6 décembre 2012

Membres du jury :

Rapporteurs :	Yann HÉCHARD, Christine ROQUES	Professeur, Université de Poitiers Professeur, Université de Toulouse
Examineurs :	Frédéric GARABETIAN Jean-Claude BLOCK Frédéric JORAND Sandrine BANAS	Professeur, Université de Bordeaux 1 Professeur, Université de Lorraine Maître de Conférences, Université de Lorraine (directeur de thèse) Maître de Conférences, Université de Lorraine (co-directrice de thèse)
Membres invités:	Laurence MATHIEU Pascaline HERBELIN Sylvie SOREAU	Maître de Conférences, Ecole Pratique des Hautes Etudes Ingénieur, EDF Recherche et Développement Docteur, EDF Recherche et Développement

UMR 7564, CNRS/Université de Lorraine, Laboratoire de Chimie Physique et Microbiologie pour l'Environnement, 405, rue de Vandoeuvre 54601 Villers-lès-Nancy, France.

Avant propos

Cette thèse est le résultat d'un partenariat entre le Laboratoire de Chimie Physique et Microbiologie pour l'Environnement (UMR 7564, CNRS/Université de Lorraine) et le Laboratoire National Hydraulique et Environnement du pôle Recherche & Développement d'EDF. Cette thèse a été encadrée, à l'université par les maîtres de conférences **Frédéric Jorand, Sandrine Banas et Laurence Mathieu**, et en entreprise par les ingénieurs chercheurs **Pascaline Herbelin et Sylvie Soreau**.

Cette thèse a été co-financée par EDF et l'Association Nationale de la Recherche et de la technologie (ANRT), qui sont liées ensemble par une Convention Industrielle de Formation par la Recherche (CIFRE).

Remerciements

*A tous ceux qui m'ont soutenu
durant ces années, famille, amis, collègues,
encadrants et autres. Merci.*

Sommaire

INTRODUCTION	1
CHAPITRE 1 : SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE	5
1. Principe de fonctionnement d'un CNPE et focus sur le CRF	7
2. Les amibes libres	9
2.1. Historique et classification	9
2.2. Biologie	10
2.2.1. Morphologie et cycle de vie	10
2.2.2. Nutrition	11
2.2.3. Locomotion	12
2.3. Distribution	12
3. <i>Naegleria fowleri</i> et son écologie	13
3.1. Taxonomie	13
3.2. Pathogénicité, mode d'infection et traitement	15
3.3. Epidémiologie	16
3.4. Ecologie de <i>Naegleria fowleri</i>	17
3.4.1. Facteurs d'influence	17
3.4.1.1. Température	18
3.4.1.2. Degré hygrométrique	19
3.4.1.3. pH	19
3.4.1.4. Salinité	19
3.4.1.5. Oxygène dissous	19
3.4.1.6. Métaux	20
3.4.1.7. Bactéries	21
3.4.1.7.1. Besoin nutritif	21
3.4.1.7.2. Inhibition par les bactéries	22
3.4.1.8. Compétition et théorie de « l'habitat libre »	22
3.4.2. Distribution dans les habitats aquatiques	23
3.4.2.1. Sols, boues et sédiments	23
3.4.2.2. Air	23
3.4.2.3. Eaux	24
3.4.2.3.1. Eaux environnementales	24
3.4.2.3.2. Eaux de réseaux et de piscines	24
3.4.2.3.3. Eaux usées	25

3.4.2.3.4.	Eaux industrielles	25
3.4.2.4.	Interface solide-eau	26
4.	Le biofilm	27
4.1.	Notions fondamentales	27
4.1.1.	Définition	27
4.1.2.	Les éléments constitutifs d'un biofilm	27
4.1.2.1.	Le support d'adhésion des micro-organismes	28
4.1.2.2.	Les micro-organismes et leurs relations	28
4.1.2.3.	Les substances polymériques exo-cellulaires	29
4.1.2.4.	La phase circulante	31
4.1.2.5.	La phase gazeuse	31
4.1.3.	Les étapes de formation d'un biofilm	32
4.1.3.1.	Le conditionnement de la surface	32
4.1.3.2.	Le transport des micro-organismes	33
4.1.3.3.	L'adhésion au substratum	33
4.1.3.4.	La colonisation du biofilm	34
4.1.3.5.	La croissance du biofilm	35
4.1.3.6.	Le détachement du biofilm	35
4.2.	Influence de l'environnement sur le biofilm	37
4.2.1.	Influence de l'hydrodynamique sur le biofilm	38
4.2.2.	Nature du substratum	40
4.2.3.	Qualité de l'eau	40
4.2.4.	Température	41
4.3.	Biofilms et protozoaires	41
5.	Désinfection à la monochloramine	42
5.1.	La monochloramine	43
5.1.1.	Chimie et réactivité	44
5.1.1.1.	Formation de la monochloramine	44
5.1.1.2.	Décomposition de la monochloramine	45
5.1.2.	Efficacité de la désinfection	47
5.1.2.1.	Action désinfectante de la monochloramine à l'échelle de la cellule microbienne	47
5.1.2.2.	Notions de résistance aux désinfectants	48
6.	Bilan	51
CHAPITRE 2 : DESCRIPTION DES EXPERIMENTATIONS		53
1.	Protocole expérimental	54

1.1.	Synthèse des essais expérimentaux	54
2.	Matériel biologique	57
2.1.	Souche de <i>N. fowleri</i>	57
2.2.	Culture, entretien et conservation de la souche de <i>N. fowleri</i>	57
3.	Dispositif expérimental	57
3.1.	Choix du dispositif expérimental	57
3.2.	Présentation du dispositif expérimental retenu	59
3.3.	Conditions expérimentales	62
3.3.1.	L'hydrodynamique	62
3.3.2.	La température	63
3.3.3.	Supports de colonisation	63
3.3.4.	Eaux d'alimentation	63
3.3.4.1.	Prélèvement	63
3.3.4.2.	Caractéristiques biologiques et physico-chimiques	63
3.4.	Démarrage du dispositif	65
3.4.1.	Procédure de nettoyage du réacteur et des coupons	65
3.4.2.	Mise en eau	65
3.5.	Inoculation de la souche de <i>N. fowleri</i>	66
4.	Suivi analytique	67
4.1.	Synthèse de la procédure d'analyse	67
4.2.	Procédure d'échantillonnage	67
4.2.1.	Biofilm	67
4.2.2.	Eaux	68
4.3.	Caractérisation bidimensionnelle de la structure du biofilm	68
4.3.1.	Prise d'images	68
4.3.2.	Traitement des images	68
4.3.2.1.	Caractérisation des paramètres de texture	68
4.3.2.2.	Caractérisation des paramètres d'aire	69
4.4.	Prétraitement des échantillons	69
4.5.	Caractérisation physico-chimique	70
4.5.1.	Biofilm	70
4.5.2.	Eaux	71
4.6.	Caractérisation microbiologique	71
4.6.1.	Nombre total des bactéries	71
4.6.2.	Amibes libres et <i>N. fowleri</i>	72
4.7.	Conservation et conditionnement des échantillons	74

5. Désinfection à la monochloramine	74
5.1. Description, préparation et dosage de la monochloramine	74
5.2. Procédure d'inactivation	75
5.2.1. Inactivation de <i>N. fowleri</i> sous sa forme planctonique	75
5.2.1. Inactivation de <i>N. fowleri</i> sous sa forme associée au biofilm	75
5.3. Notion et calcul du Ct	76
 CHAPITRE 3 : INFLUENCE DE LA TEMPERATURE ET DE LA CHARGE BACTERIENNE SUR LA DYNAMIQUE DE <i>Naegleria fowleri</i> EN BIOFILM	 77
1. Mise en place d'un protocole pour l'implantation de <i>Naegleria fowleri</i> dans des biofilms d'eau de rivière	80
2. Growth dynamic of <i>Naegleria fowleri</i> in a microbial freshwater biofilm	84
 CHAPITRE 4 : INFLUENCE DE LA NATURE DU MATERIAU SUPPORT SUR LA DYNAMIQUE DE <i>Naegleria fowleri</i> EN BIOFILM	 113
1. Evaluation and comparison of the growth dynamic of biofilm-associated <i>Naegleria fowleri</i> in freshwater biofilm formed on various cooling circuit materials	115
 CHAPITRE 5 : EFFICACITE D'UNE DESINFECTION A LA MONOCHLORAMINE SUR <i>Naegleria fowleri</i>	 135
1. Monochloramine efficacy on planktonic and biofilm-associated <i>Naegleria fowleri</i> cells.	137
 CONCLUSIONS GENERALES ET PERSPECTIVES	 167
 REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	 173
 ANNEXES	 193
Annexe 1 : Dessin technique du réacteur à biofilm	194
Annexe 2 : Formules de calcul des conditions hydrodynamiques	195
Annexe 3 : Code source pour l'analyse de la structure bidimensionnelle du biofilm	198
Annexe 4 : Corrélation entre la quantité de <i>N. fowleri</i> mesurée dans l'eau et dans le biofilm	207

Liste des tableaux

<i>Tableau 1: Fonctions avérées ou hypothétiques des EPS (Lewandowski et Beyenal, 2007).</i>	30
<i>Tableau 2 : Réactions stochiométriques de décomposition de la monochloramine (Duirk et al., 2002)</i>	46
<i>Tableau 3 : Synthèse des différents essais menés et des conditions associées.</i>	55
<i>Tableau 4 : Synthèse des conditions hydrodynamiques.</i>	62
<i>Tableau 5 : Synthèse de la qualité des eaux d'alimentation.</i>	64
<i>Tableau 6 : Synthèse des méthodes analytiques physico-chimiques appliquées au biofilm.</i>	71
<i>Tableau 7: Table NPP utilisé 10×2 mL - 10×0,1 mL - 10×0,01 mL - 10×0,001 mL (en jaune est matérialisé la saturation de la table NPP).</i>	74
<i>Tableau 8 : Synthèse des conditions opératoires pour l'inoculation de N. fowleri dans l'eau.</i>	81

Liste des figures

Figure 1 : Schéma de fonctionnement d'une centrale nucléaire REP équipée d'une tour aéroréfrigérante. _____	7
Figure 2 : Schéma de fonctionnement d'un circuit de refroidissement de CNPE. _____	9
Figure 3 : Trophozoïte (a), forme flagellée (b) et kyste (c) de <i>Naegleria fowleri</i> (Visvesvara et al., 2007). _____	11
Figure 4 : Arbre phylogénétique généré par comparaisons des séquences ITS1 5.8S rDNA selon la méthode UPGMA (De Jonckheere, 2011). _____	14
Figure 5 : Distribution des différents types de <i>Naegleria fowleri</i> et des possibles routes de dispersion (De Jonckheere, 2011). _____	14
Figure 6 : Cycle de vie et d'infection de <i>Naegleria fowleri</i> (Center for Disease Control and Prevention). _____	16
Figure 7 : Distribution des cas de MEAP recensés dans le monde (De Jonckheere, 2011). _____	17
Figure 8 : Phagocytose de bactéries par <i>Naegleria fowleri</i> (Marciano-Cabral, 1988). _____	22
Figure 9 : Représentation schématisée des étapes de formation et d'évolution d'un biofilm (adapté de Foret, 2006 et Lewandowski et Beyenal, 2007). _____	32
Figure 10 : Courbe de croissance théorique d'un biofilm (Lewandowski et Beyenal, 2007). _____	35
Figure 11 : Clichés en microscopie électronique à balayage de différents coupons prélevés sur le circuit de refroidissement d'une centrale nucléaire EDF. A et B : coupons de PVC après 185 jours d'exposition (installés en bassin chaud) ; C et D : coupons de béton après 103 jours d'exposition (installés en bassin froid) ; E et F : coupons d'acier inoxydable (installés en sortie condenseur). _____	38
Figure 12 : Distribution des espèces de chlore en fonction du rapport molaire N/Cl (Cimetière, 2009). _____	44
Figure 13 : Distribution des chloramines en fonction du pH. _____	45
Figure 14 : Schéma réactionnel simplifié de la monochloramine avec la NOM (DOC_{ox} représente la NOM oxydés - DOC_1 et DOC_2 représentent les concentrations en sites réactifs de la NOM respectivement avec la monochloramine et le chlore libre) (Duirk et al., 2005). _____	47
Figure 15 : Schéma du système expérimental avec (1) réacteur en polychlorure de vinyle (2) bain thermostaté (3) pompe d'alimentation en eau (4) bac d'alimentation en eau (5) pompe de recirculation (6) boîtier multiparamètres et sondes (pH, conductivité, température, oxygène dissous) (7) bac de purge. _____	61
Figure 16 : Synthèse de la procédure analytique. _____	67
Figure 17 : Optimisation du temps d'insonification pour la récupération des amibes du biofilm. _____	70
Figure 18 : Evolution des concentrations en <i>N. fowleri</i> dans l'eau et le biofilm en fonction du temps. (A) essai 1 ; (B) essai 2 ; (C) essai 3. La flèche symbolise le moment d'inoculation. Les symboles entourés de rouge signifient que la concentration en amibes est inférieure à la limite de détection. _____	82

Liste des abréviations

AHL	N-Acyl homosérines lactones
BAR	Ratio bactéries/amibe
CNPE	Centre nucléaire de production d'électricité
CRF	Circuit de refroidissement
CSHPF	Conseil supérieur d'hygiène publique de France
DPD	N-N diéthyl-p-phénylènediamine
DSS	Dried suspended solids / Matière sèche en suspension
EDF	Electricité de France
EDS	Eau déminéralisée stérile
EPS	Sustances polymériques exo-cellulaires
FLA	Free-living amoebae / Amibes libres
MEAP	Méningo-encéphalite amibienne primitive
NNA	Gélose agar non nutritive
NOM	Natural organic matter / Matière organique naturelle
NPP	Nombre le plus probable
PBS	Phosphate buffer saline / Tampon phosphate
PSM	Poste sécurité microbiologique
PVC	Polychlorure de vinyle
THM	Trihalométhanes
TOC	Total organic carbon / Carbone organique total

INTRODUCTION

L'environnement renferme une multitude de protozoaires parmi lesquels se trouve les amibes libres ainsi dénommées parce qu'elles sont capables de vivre de manière autonome dans l'environnement et ceci en opposition aux amibes parasitaires qui nécessitent la présence d'un hôte. Les amibes libres sont ubiquistes et présentes dans des environnements naturels (rivières, lacs, sources) comme artificiels (circuits d'eau potable, circuits d'eau domestique, circuits d'eau industrielle, piscines).

La prise de conscience de la nocivité de certaines amibes libres tient à la survenue de pathologies très rares mais aux conséquences parfois dramatiques. A ce jour, parmi la multitude d'espèces existantes, seulement quatre espèces amibiennes sont responsables de pathologies humaines. L'une d'entre elles, *Naegleria fowleri* est responsable de la Méningo-Encéphalite Amibienne Primitive (MEAP), pathologie foudroyante et mortelle, contractée après inhalation de l'amibe. Entre 1965 et 2008, un peu moins de 300 cas ont été rapportés à travers le monde. Dernièrement, ont été recensés, 13 cas au Pakistan, 1 cas au Venezuela, 1 cas en Guadeloupe, 1 cas à Madagascar et plus récemment 5 cas aux Etats-Unis (Caruzo et Cardozo, 2008; De Jonckheere, 2011; Jaffar-Bandjee *et al.*, 2005; Shakoore *et al.*, 2011).

La contamination des systèmes aquatiques par cette amibe est souvent associée à une modification écologique de son environnement (Detterline, 1989). Fréquemment, le réchauffement naturel ou anthropique des eaux douces naturelles a été mis en cause dans l'occurrence de ce pathogène (Tyndall *et al.*, 1989; Detterline et Wilhelm, 1991).

N. fowleri a pu être isolée à partir d'une grande variété de niches écologiques: sols, boues, sédiments, eaux, air et plus récemment, les biofilms. Actuellement, il est considéré que 99% de l'activité microbienne dans les eaux douces à lieu dans les biofilms développés à l'interface solide-eau. Cette omniprésence environnementale des biofilms, associée aux conditions favorables qu'ils présentent en termes d'abondance de nutriments et de stabilité des conditions hydrauliques, font d'eux un habitat privilégié des microorganismes en général et des amibes libres en particulier et donc de *N. fowleri* (Sheehan *et al.*, 2003; Puzon *et al.*, 2009).

En France, certains circuits de refroidissement (CRFs) des centrales nucléaires, alimentés par les eaux de rivière échauffées lors de leur transit dans le circuit, peuvent favoriser le développement des amibes libres et particulièrement de *N. fowleri*. Historiquement, cette

problématique survenue dans les années 1980 est liée au remplacement progressif des tubes de condenseurs en laiton par des tubes en acier inoxydable. Depuis 1996, pour limiter la prolifération et respecter le cadre réglementaire instauré par le Conseil Supérieur d'Hygiène Publique de France (CSHPF), fixant un seuil de 100 *N. fowleri*/L dans les eaux de rivière en aval des installations, EDF met en œuvre des traitements biocides principalement à la monochloramine. Les problématiques soulevées sont de deux ordres, l'un sanitaire et l'autre environnemental. Ainsi, pour EDF, l'enjeu est d'établir un équilibre acceptable entre le risque sanitaire lié à la prolifération de l'amibe pathogène et les risques environnementaux dus aux rejets chimiques associés à l'injection de biocide.

Dans ce contexte, les études engagées depuis plusieurs années, ont pour l'essentiel été menées sur la phase eau des CRFs et ont fait ressortir l'influence des facteurs « température » et « nature du matériau constitutif des tubes de condenseur » sur la colonisation de l'eau des CRFs par *N. fowleri*. Toutefois, la complexité structurale (nombreux compartiments), physico-chimique et biologique propre aux CRFs n'a pas permis de déterminer des indicateurs pertinents suffisamment prédictifs et/ou explicatifs de la prolifération de *N. fowleri*. En revanche, parce qu'ils constituent probablement le foyer de prolifération de l'amibe pathogène, l'une des fortes conclusions à ces études porte sur la nécessité d'investiguer les dépôts et/ou biofilms développés dans les CRFs (surfaces des condenseurs, corps d'échange, béton).

Compte-tenu de l'état des connaissances fondamentales et des problématiques industrielles énoncées, ce travail de thèse vise à enrichir, par des travaux expérimentaux de laboratoire qui permettront de mieux maîtriser les paramètres étudiés, les connaissances sur l'écologie et le comportement de l'amibe libre *N. fowleri* associée aux biofilms.

Dans cette perspective, après avoir dressé un bilan des connaissances scientifiques et industrielles sur ce thème, notre démarche a intégré dans un premier temps le développement et la qualification d'un système expérimental qui permet de disposer d'un biofilm d'eau de rivière contaminé par *N. fowleri*. Il en résulte la mise en place de réacteurs à biofilm et de méthodologies de suivi des matrices eau et biofilm sur leurs composantes biologique et physico-chimique. Sur cette base, notre travail a consisté, dans un second temps, à évaluer l'influence de plusieurs facteurs identifiés comme d'intérêts opérationnels,

à savoir : la **température**, la **nature du matériau** support de la formation des biofilms, l'application d'un **traitement biocide à la monochloramine** et enfin le **rôle des populations** (bactérienne et amibienne) sur la dynamique de *N. fowleri* dans le biofilm.

CHAPITRE 1 : SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE

La première partie de ce mémoire est dédiée à une synthèse des travaux et des notions de la bibliographie se rapportant à notre sujet. Devant la diversité et la quantité d'informations, il était évidemment impossible d'être exhaustif. Nous avons choisi d'organiser notre synthèse bibliographique en cinq parties.

- o Compte tenu du fort contexte industriel de la thèse et du vocabulaire spécifique qui en découle, une première partie vise à introduire la notion de circuit de refroidissement (CRF).
- o Les deux parties suivantes s'attache à définir ce que sont les amibes libres et plus particulièrement *Naegleria fowleri*. Les principaux aspects abordés sont: l'historique, l'épidémiologie, la biologie et l'écologie (facteurs d'influence et habitats).
- o La troisième partie est axée sur le biofilm. Après avoir détaillé les notions fondamentales, nous nous focaliserons sur les facteurs de l'environnement pouvant influencer le biofilm puis nous ferons un état de l'art sur le rôle essentiel des protozoaires au sein des biofilms.
- o Dans une ultime partie, une synthèse sur les méthodes de désinfection par voie chimique est présentée. Nous porterons un intérêt particulier pour la monochloramine au travers de la description de sa chimie, sa réactivité, ses mécanismes d'action et des notions de résistance/tolérance qui lui sont associées.

1. Principe de fonctionnement d'un CNPE et focus sur le CRF

Une centrale nucléaire produit de l'électricité grâce à la chaleur dégagée par la fission d'atomes d'uranium ayant lieu dans la cuve du réacteur. Cette chaleur transforme de l'eau liquide en vapeur d'eau haute pression, laquelle permet de mettre en mouvement une turbine reliée à un alternateur qui produit de l'électricité.

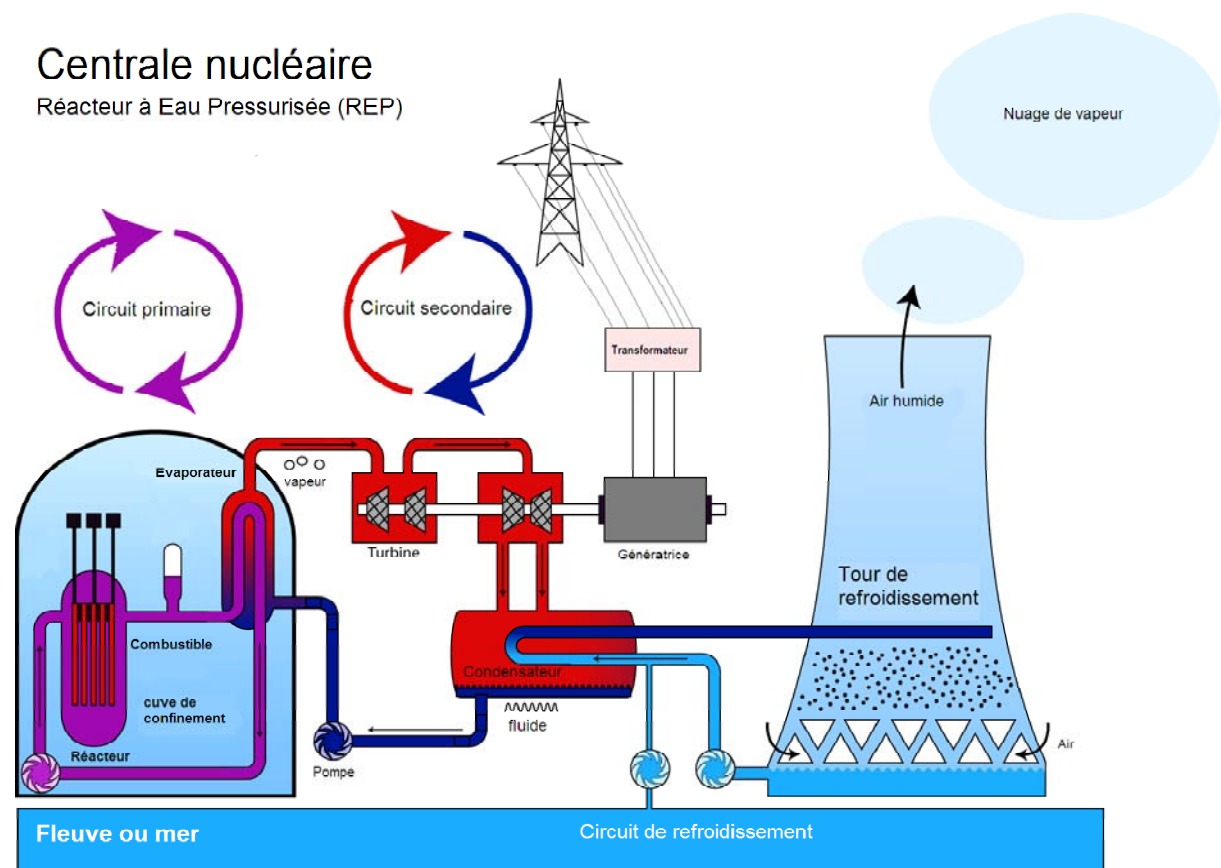


Figure 1 : Schéma de fonctionnement d'une centrale nucléaire REP équipée d'une tour aéroréfrigérante.

Le fonctionnement d'une centrale nucléaire repose sur trois circuits (Figure 1) :

- o Le circuit primaire : dans le réacteur, la fission des atomes d'uranium produit une grande quantité de chaleur, augmentant la température de l'eau qui circule autour du réacteur jusqu'à 320°C. Pour empêcher l'eau de se vaporiser, une pression de 155 bars est maintenue.
- o Le circuit secondaire : la chaleur issue du circuit primaire est transférée à un second circuit (appelée circuit secondaire) par l'intermédiaire d'un générateur de vapeur.

Dans le générateur de vapeur l'eau chaude du circuit primaire chauffe l'eau du circuit secondaire qui se vaporise. La pression engendrée par cette vapeur fait tourner une turbine qui entraîne à son tour un alternateur qui produit alors un courant électrique alternatif.

- o Le circuit de refroidissement : la production d'énergie par les tranches¹ des CNPE engendre une chaleur importante qu'il est essentiel de contrôler. Pour palier à ce problème, des circuits de refroidissement, alimentés par les eaux brutes des points d'eau à proximité (fleuve ou mer), sont mis en place. L'eau est entraînée par des pompes vers le condenseur, qui, en le traversant, se réchauffe, et permet ainsi la condensation de la vapeur d'eau nécessaire à l'entraînement de la turbine, dans le circuit secondaire. Sur les CNPE à circuits semi-fermés (Figure 2), l'eau du CRF, ainsi rechauffée, est envoyée vers un aéroréfrigérant, où elle est dispersée sous forme de pluie et refroidie au contact de l'air. Une partie est dissipée dans l'atmosphère sous forme de panache, l'autre partie est récupérée par le bassin froid et sera à nouveau réentraînée vers le condenseur. Le circuit est purgé en continu afin de limiter la concentration en matières organiques et sels minéraux apportés par les eaux brutes. La présence d'un appoint d'eau est nécessaire pour compenser l'eau perdue par la purge et l'évaporation.

D'autres types de CRF existent, à savoir des circuits dits ouverts. Ils ne disposent pas d'aéroréfrigérant, dans la mesure où le débit de l'eau utilisée est suffisamment élevé pour éviter une baisse trop importante du niveau du cours d'eau lors du démarrage du CRF. Cela concerne essentiellement les CNPE côtières.

¹ Tranche : Unité de production électrique comportant une chaudière nucléaire, un groupe turbo-alternateur et un CRF.

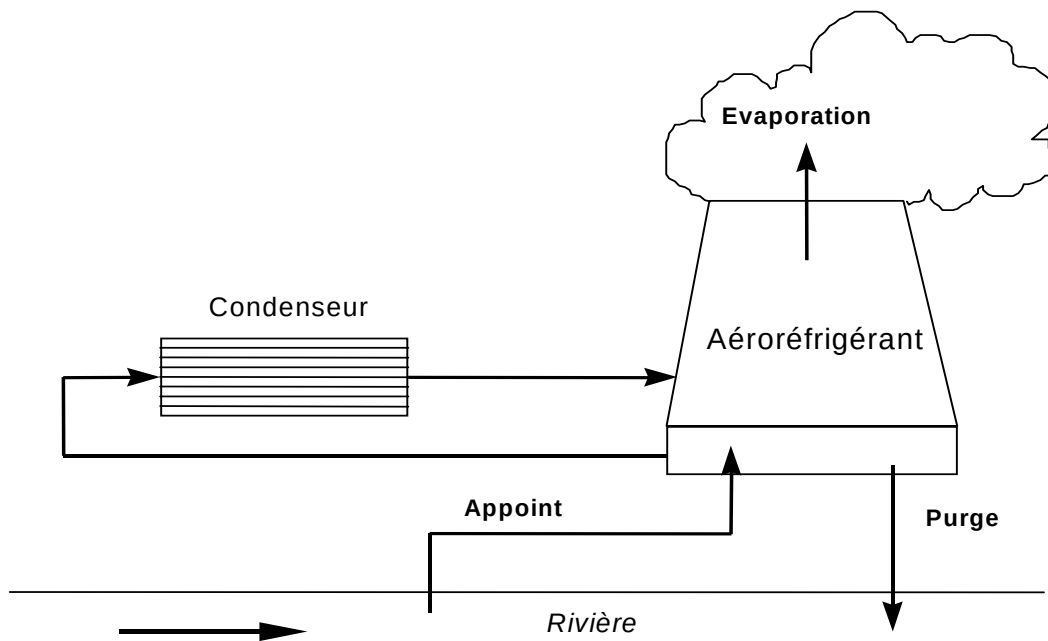


Figure 2 : Schéma de fonctionnement d'un circuit de refroidissement de CNPE.

Les conditions rencontrées dans les CRF (élévation de la température de l'eau de rivière, renouvellement important de l'eau et des nutriments, etc...) favorisent le développement des microorganismes naturellement présents dans l'eau et principalement ceux aux caractères thermophiles et mésophiles. Parmi ces microorganismes, nous retrouvons les amibes libres et plus particulièrement *Naegleria fowleri*.

2. Les amibes libres

2.1. Historique et classification

Les amibes libres sont des organismes eucaryotes unicellulaires. Contrairement aux amibes parasites, les amibes libres sont autonomes dans le milieu naturel et ne dépendent pas d'hôtes pour se développer. Certains genres amibiens sont amphizoïques, c'est-à-dire qu'ils sont tout aussi capables de vivre dans le milieu naturel (eau, sol, ...), que de parasiter un hôte (animal ou homme).

Leur découverte remonte à 1753 lorsque que Baker décrit pour la première fois les amibes libres qu'il nomme les Proteus (Baker, 1753). A cette même période, en 1755, Von Rosenhof réalise les premières observations microscopiques des amibes libres (Rösel von Rosenhof, 1755). Par la suite, Dujardin (1841) décrit les « Limax amebas » comme étant « des animaux

formés d'une substance glutineuse, sans tégument et qui changent de forme à chaque instant par la protension ou rétraction d'une partie de leur corps ». La description morphologique d'une amibe libre intervient à la fin du XIX^{ème} siècle lorsque Schardinger décrit l'*Amoeba gruberi* connue actuellement sous le nom de *Naegleria gruberi* (Schardinger, 1899). Les genres d'amibes libres *Naegleria* et *Hartmannella* ont été décrits en 1912 (Alexeieff, 1912), *Acanthamoebae* en 1930 (Castellani, 1930). En 1912, Awerinzew décrit *Naegleria* comme une amibe flagellée (Awerinzew, 1912). Depuis, de nombreuses amibes libres ont été décrites.

La taxonomie des protozoaires a été longtemps basée sur des critères morphologiques. La classification a été revisitée à plusieurs reprises. Page a développé une classification basée sur des critères morphologiques, biologiques et structuraux (Page, 1976). En 2005, un consortium de biologistes a simplifié la classification des eucaryotes. Dans cette nouvelle classification, les amibes libres telles que les genres *Naegleria*, *Hartmannella* ou *Acanthamoeba* appartiennent aux super-groupes : *Amoebozoa* ou *Excavata* (Adl et al., 2005).

2.2. Biologie

2.2.1. Morphologie et cycle de vie

Les amibes libres sont des organismes dont la taille varie entre quelques dizaines de micromètres à 1 mm de longueur. Les amibes libres se présentent principalement sous deux formes, une forme kystique et une forme trophozoïte ou végétative (Figure 3). Les amibes libres appartenant au genre *Naegleria* possèdent un stade supplémentaire transitoire, le stade flagellé qui permet la locomotion lorsque les conditions du milieu ne sont plus favorables au développement (Figure 3b). Dans certains cas, le retour à la forme trophozoïte est possible sous 24 h (Parija et Jayakeerthe, 1999).

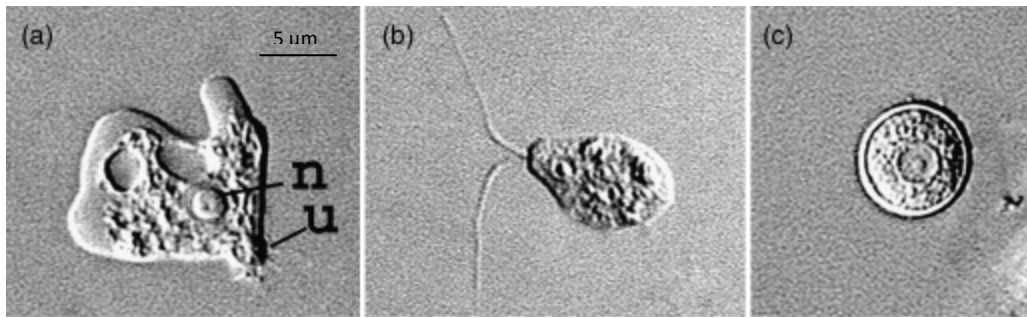


Figure 3 : Trophozoïte (a), forme flagellée (b) et kyste (c) de *Naegleria fowleri* (Visvesvara et al., 2007).

Le cycle cellulaire dépend fortement des conditions environnementales. En conditions favorables, les amibes libres se trouvent sous la forme trophozoïte et sont capables d'assurer plusieurs fonctions : déplacement, nutrition, reproduction asexuée par fission binaire (Visvesvara, 1993).

L'organisation structurale d'un trophozoïte est composée d'un noyau, de mitochondries, d'un réticulum endoplasmique rugueux ou lisse, de ribosomes, d'un appareil de Golgi, de microtubules, de vacuoles contractiles et sécrétoires (Bowers et Korn, 1968).

Lorsque des conditions très défavorables se présentent (manque d'oxygène, dessiccation, modification de la qualité du milieu, augmentation de la population d'amibes libres, etc.), un phénomène d'enkystement se produit. Il correspond au passage de la forme active trophozoïte à la forme kystique qui est une forme de résistance des cellules, qui présente alors un métabolisme réduit (Parry, 2004). Le processus d'enkystement est lent (plusieurs heures) et graduel. Le kyste présente une paroi à deux couches : la couche externe (ectokyste) et la couche interne (endokyste). Lors du retour à des conditions plus favorables, le processus d'enkystement est réversible par dékystement. Des pores appelés ostioles permettent l'émergence du trophozoïte à l'extérieur du kyste (Schuster, 1975).

2.2.2. Nutrition

S'il est possible de maintenir en laboratoire des cultures axéniques de certaines amibes (en l'absence d'autres micro-organismes), les sources nutritionnelles principales dans l'environnement sont les bactéries (Rodriguez-Zaragoza, 1994). Toutefois, les amibes libres sont également capables de se nourrir d'algues, de levures et même d'autres protozoaires plus petits, tels que des euglènes, des diatomées, ou des chorelles (John et Nussbaum, 1983).

Les amibes libres sont des prédateurs, elles utilisent deux modes d'ingestion : la phagocytose et la pinocytose. La phagocytose est le principal mode de nutrition. Elle permet aux amibes libres d'ingérer des particules grâce à leurs pseudopodes. Ces pseudopodes entourent la proie de manière à l'intégrer au cytoplasme au sein d'une vacuole nutritive appelée le phagosome. Par la suite, le phagosome fusionne avec un lysosome contenant des enzymes digestives permettant la dégradation. Les déchets métaboliques sont alors évacués par exocytose (Carosi *et al.*, 1977; Stevens *et al.*, 1980; Rondanelli et Scaglia, 1987). La pinocytose permet l'ingestion d'éléments nutritifs dissous (Greub et Raoult, 2004).

Les amibes libres s'alimentent plus efficacement de proies fixées que de proies libres dans la phase circulante (Rogerson et Laybourn-Parry, 1992). Le taux d'ingestion varie en fonction de l'espèce amibienne et des conditions du milieu. Il a été démontré des taux d'ingestion compris entre 0,2 et 1465 bactéries amibe⁻¹ h⁻¹ (Rogerson *et al.*, 1996; Bulter et Rogerson, 1997; Mayes *et al.*, 1997; Heaton *et al.*, 2001)

2.2.3. Locomotion

Pour se déplacer, les amibes libres ont besoin de la présence d'un support. La locomotion est réalisée par de multiples déformations du cytosquelette appelées pseudopodes. Ces mouvements amiboïdes sont rendus possibles par la présence dans les pseudopodes de deux types de cytoplasme : l'électoplasme et l'endoplasme granulaire. Le mouvement de rétractation et d'extension des pseudopodes est dû à l'action d'un système actine-myosine (Puytorac *et al.*, 1987).

Les amibes du genre *Naegleria* peuvent aussi être pourvues de flagelles pour assurer leur mobilité lorsque les conditions du milieu sont défavorables (Marciano-Cabral, 1988).

2.3. Distribution

Les amibes libres sont dites ubiquitaires. Elles sont naturellement présentes dans les divers environnements du globe. Bien qu'elles évoluent préférentiellement dans des milieux aqueux riches en nutriments (eau, sédiment, biofilm), elles sont toutefois également retrouvées dans le sol et l'air.

En effet, la présence d'amibes libres dans le sol a été remarquée à maintes reprises. Le sol constitue un milieu favorable au développement des amibes libres car il permet la rétention

par capillarité de l'eau et présente les éléments nutritifs nécessaires (Shingh, 1975; Rodriguez-Zaragoza, 1994).

L'air n'est pas un milieu favorable aux amibes libres toutefois, la présence de kystes amibiens dans les aérosols appartenant aux genres *Acanthamoebae* et *Hartmannella* a été rapportée (Cerva *et al.*, 1973; Mollet *et al.*, 1981; Rodriguez-Zaragoza, 1994).

La matière minérale et organique contenue dans l'eau sert de nutriments aux bactéries qui à leur tour seront sources d'alimentation pour les amibes libres qui trouvent ainsi dans les milieux aqueux des conditions optimales pour leur développement.

La présence des amibes libres au sein des biofilms a été constatée. Par exemple, des amibes libres ont été trouvées dans des biofilms issus de circuits d'eaux domestiques (Thomas *et al.*, 2004; Huws *et al.*, 2005; Thomas *et al.*, 2006; Thomas *et al.*, 2008), et également dans des biofilms issus d'unité dentaire (Barbeau et Buhler, 2001).

3. *Naegleria fowleri* et son écologie

3.1. Taxonomie

Le genre *Naegleria* appartient au super-groupe des *Excavata*, groupe des *Heterolobosia*, sous-groupe des *Vahlkampfiidae* (Adl *et al.*, 2005). Historiquement, les deux premières espèces de *Naegleria* isolées ont été *N. gruberi* (Schardinger, 1899) et *N. fowleri* (Carter, 1970). En 2004, avec l'aide des outils de biologie moléculaire (Pelandakis *et al.*, 1998; Pelandakis et Pernin, 2002; De Jonckheere, 2004), on comptait 25 espèces appartenant au genre *Naegleria* (De Jonckheere, 2004). Actuellement, leur nombre a été porté à 45 espèces (Figure 4) (De Jonckheere, 2011).

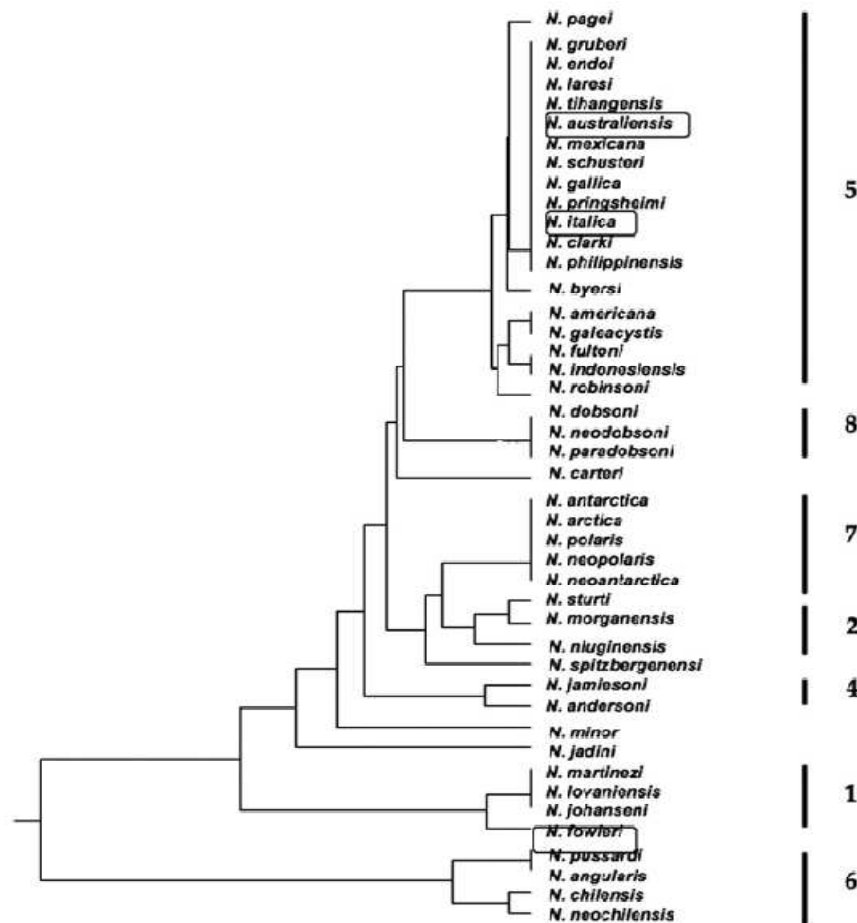


Figure 4 : Arbre phylogénétique généré par comparaisons des séquences ITS1 5.8S rDNA selon la méthode UPGMA (De Jonckheere, 2011).

Au sein de l'espèce *N. fowleri* huit types différents existent et sont inégalement répartis sur les cinq continents (Figure 5) (De Jonckheere, 2011).

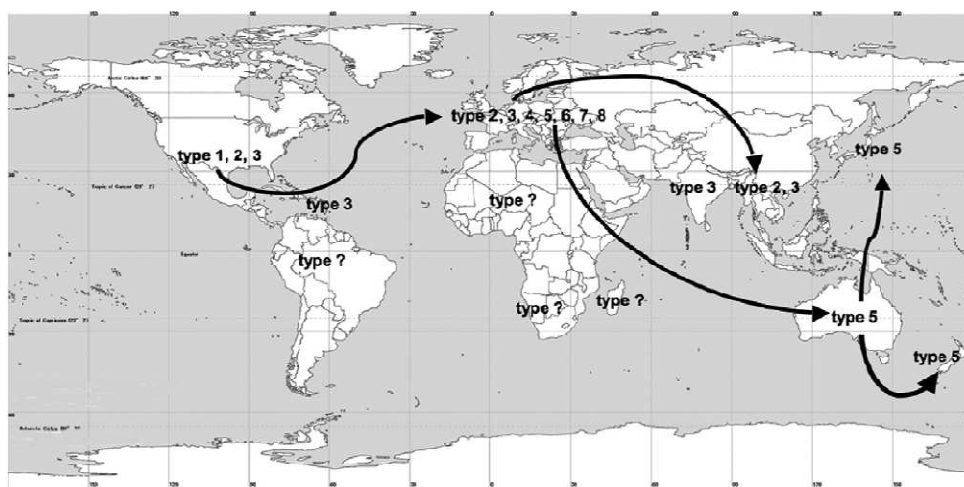


Figure 5 : Distribution des différents types de *Naegleria fowleri* et des possibles routes de dispersion (De Jonckheere, 2011).

En Océanie (Australie et Nouvelle-Zélande) et au Japon, seul le type 5 est présent. Aux Etats-Unis les types 1, 2 et 3 sont représentés alors qu'en Europe l'ensemble des types à l'exception du type 1 sont présents. Par ailleurs, aucune information n'est disponible concernant les types retrouvés en Afrique ou en Amérique du Sud. Les types 5 et 6 détectés en Europe proviennent d'isolement de souches de *N. fowleri* sur deux centrales électriques françaises (Pélandakis *et al.*, 2000). Ces deux types n'ont jamais été associés à des cas de MEAP.

3.2. Pathogénicité, mode d'infection et traitement

La manifestation pathologique décrite chez l'homme et imputable à *N. fowleri*, est la méningo-encéphalite amibienne primitive (MEAP). Aucune prédisposition n'est nécessaire pour contracter et déclarer la maladie (Martinez et Visvesvara, 1997). Cette pathologie touche principalement de jeunes adultes et des enfants en bonne santé ayant eu de récentes expositions avec des eaux douces contaminées (Schuster, 2002; Visvesvara *et al.*, 2007).

Les voies d'entrée pour le pathogène sont principalement les narines, habituellement exposées à l'amibe pendant les périodes de natation ou de bain en eaux chaudes (Martinez, 1993; Visvesvara, 1993; Kilvington et Beeching, 1995) (Figure 6). L'infection peut également se produire en respirant des kystes infectieux présents dans la poussière ou les particules de sol (Visvesvara et Stehr-Green, 1990). Une fois le microorganisme inhalé, celui-ci pénètre la muqueuse nasale, migre vers les nerfs olfactifs, et envahit le cerveau (Bottone, 1993; Martinez, 1993; Schuster, 2002; Blair *et al.*, 2008) (Figure 6).

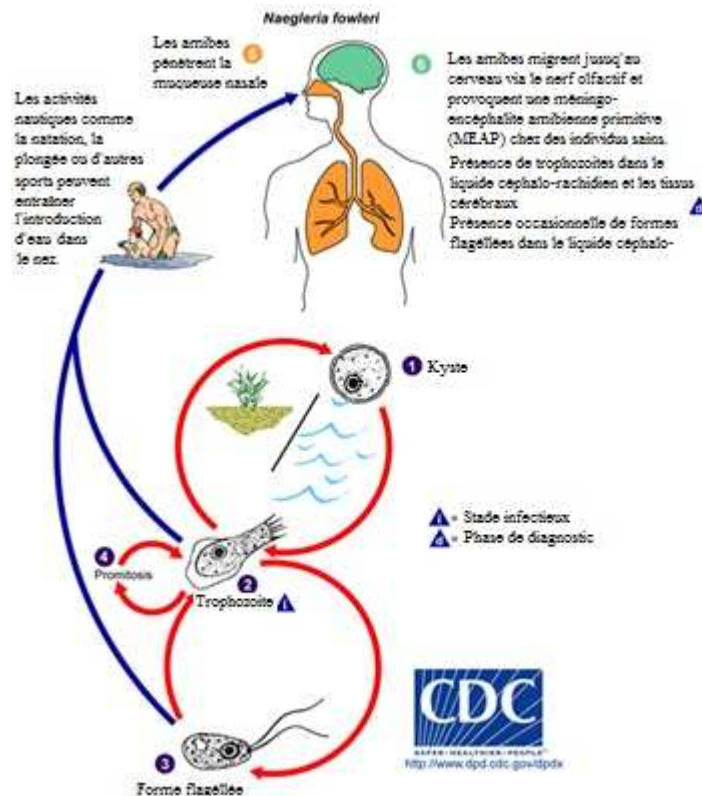


Figure 6 : Cycle de vie et d'infection de *Naegleria fowleri* (Center for Disease Control and Prevention).

Le temps d'incubation après contact avec le pathogène est de 5 à 7 jours, cependant celui-ci peut être écourté à 24h (Visvesvara *et al.*, 2007). Le début de la pathologie est brusque, avec des maux de tête rapidement progressifs, fièvre, nausée, vomissement, pharyngite, et obstruction ou décharge nasale. Pendant que ces symptômes persistent, d'autres phénomènes (léthargie, confusion, nuque raide) se développent. Des convulsions peuvent également se produire, avec une détérioration progressive jusqu'au coma et la mort (Visvesvara *et al.*, 2007). L'intervalle de temps moyen jusqu'à la mort est de 6,4 jours.

Les survivants à une infection par *N. fowleri* sont peu nombreux, moins d'une douzaine sur 200 cas) (Schuster et Visvesvara, 2004). Dans ces cas, l'amphotéricine B (antifongique) a été utilisée comme traitement (Schmidt et Roberts, 1995).

3.3.Epidémiologie

L'infection à *N. fowleri* a été décrite pour la première fois en 1965 (Fowler et Carter, 1965). L'infection touche l'ensemble des continents à l'exception de l'Antarctique. La majorité des cas ont été recensés dans des pays développés et industrialisés comme les Etats-Unis,

l'Australie, la Thaïlande, la République Tchèque, le Mexique, le Nigeria, la Guadeloupe et bien d'autres pays (Figure 7).

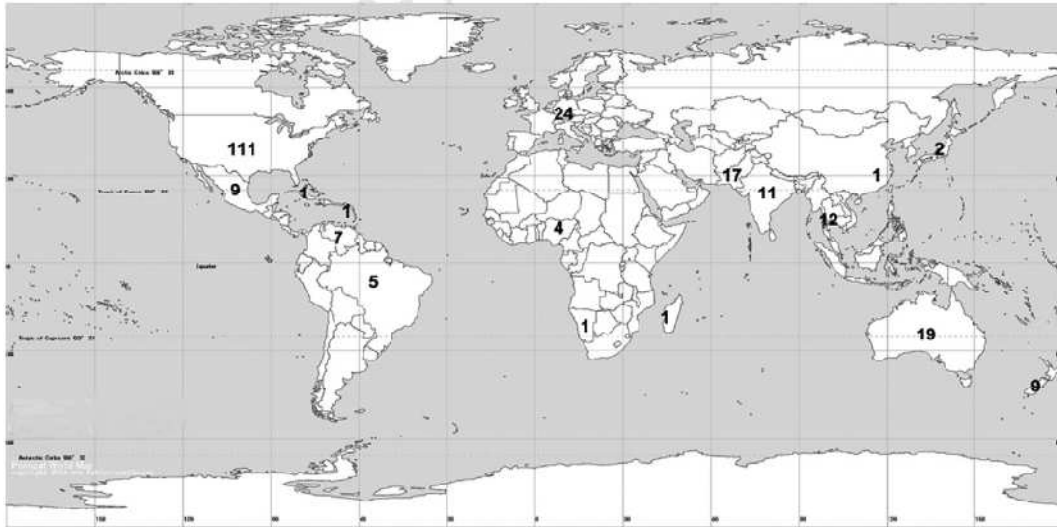


Figure 7 : Distribution des cas de MEAP recensés dans le monde (De Jonckheere, 2011).

Selon les sources, le nombre de cas recensés n'est pas identique, ainsi selon De Jonckheere (2011), on comptait en 2011, 235 cas alors qu'en 2008 Caruzo et Cardozo (2008) rapportait un peu moins de 300 cas, avec 111 cas cliniques enregistrés entre 1962 et 2008 aux Etats-Unis (Yoder *et al.*, 2010), 39 cas en Asie et 24 cas en Europe. D'autres cas sont survenus dans le monde. Par exemple, 13 cas en 17 mois ont été diagnostiqués dans la ville de Karachi (Shakoor *et al.*, 2011), 1 cas au Venezuela (Caruzo et Cardozo, 2008), 1 cas en Guadeloupe en 2008 (De Jonckheere, 2011) et 1 cas à Madagascar (Jaffar-Bandjee *et al.*, 2005). A notre connaissance, les cas les plus récents sont localisés aux Etats-Unis où 5 personnes sont mortes après contact avec le pathogène lors de l'utilisation d'eau potable ou lors d'épisode de baignade en rivière.

3.4. Ecologie de *Naegleria fowleri*

3.4.1. Facteurs d'influence

D'après la littérature, l'influence des facteurs sur le développement de *N. fowleri* a été étudiée principalement *in vitro*. Ces facteurs d'influence se divisent en deux catégories : les facteurs abiotiques (physique ou chimique) et les facteurs biotiques. Bien que les équilibres ambiens en milieu naturel soient complexes et probablement régis par l'influence concomitante de plusieurs facteurs et que les données de la littérature soient peu

abondantes, il est proposé ci-dessous une synthèse de l'influence de chaque paramètre indépendamment des autres, en prenant soin de dissocier les informations acquises *in vitro* de celles issues du milieu naturel.

3.4.1.1. Température

N. fowleri est décrite comme étant une espèce thermophile. *In vitro*, le domaine de préférence thermique pour *N. fowleri* se situe entre 20 et 45°C, avec un optimum thermique à 43°C (Pougnard, 2004). En milieu liquide, des températures inférieures à 20°C inhibent la croissance (Cerva, 1978), alors qu'en dessous de 10°C et au-dessus de 65°C les trophozoïtes de *N. fowleri* dégénèrent (Chang, 1978). Sous la forme kystique, il apparaît que *N. fowleri* est capable de résister à des températures très basses, 2 à 4 mois à 4°C et 1 heure à -30°C, mais également à des températures plus élevées 2 minutes 30 secondes à 65°C (Chang, 1978).

Les études menées en environnement s'accordent à dire qu'en première approximation, une température de 25°C dans les milieux liquides est nécessaire à la présence de *N. fowleri* (De Jonckheere et Voorde, 1977; Wellings *et al.*, 1977; Wellings *et al.*, 1979; Brown *et al.*, 1983; Griffin, 1983; Tyndall *et al.*, 1989; Huizinga et McLaughlin, 1990). Par ailleurs, au cours d'une étude menée sur 5 centrales électriques en fonctionnement, il a été mis en évidence que l'isolement de *N. fowleri* dans l'eau des CRFs n'a été observé que pour une température seuil minimale de 31°C en sortie de condenseur commune à l'ensemble des sites (Tousset et Vazelle, 2000). Une étude complémentaire a permis de définir une température minimale de l'eau de 26°C pour la détection de *N. fowleri* à des concentrations supérieures à 201 *N. fowleri*/L et de 30°C pour des concentrations supérieures à 1000 *N. fowleri*/L (Herbelin, 2006). Pour les sédiments, la présence de *N. fowleri* a été constatée pour des températures inférieures, jusqu'à 16°C (Wellings *et al.*, 1977; Wellings *et al.*, 1979). De manière générale, le domaine thermique dans lequel *N. fowleri* a pu être isolée dans les diverses matrices de l'environnement était de 12 à 55°C (Kasprzak *et al.*, 1982; Sykora *et al.*, 1983; Tyndall *et al.*, 1989; Jamerson *et al.*, 2009). Il semble que 30°C soit la température moyenne pour permettre un développement important de l'espèce pathogène dans l'environnement (Cerva et Simanov, 1983; Newsome et Wilhelm, 1983; Pougnard, 2004).

Par ailleurs, la température a un effet sur la pathogénicité des souches de *N. fowleri*. Une étude réalisée par (Gupta et Das, 1999) a mis en évidence une perte croissante de la virulence entre 25 et -15°C.

3.4.1.2. Degré hygrométrique

N. fowleri est un microorganisme hydro-tellurique qui nécessite la présence dans son environnement d'un certain taux d'humidité (Rodriguez-Zaragoza, 1994). L'étude menée par (Chang, 1978) a montré que la dessiccation était létale pour *N. fowleri*. Ainsi, à 26°C et en présence d'une humidité relative de 22%, les trophozoïtes sont détruits et les kystes survivent seulement 5 minutes.

3.4.1.3. pH

Le pH n'apparaît pas être un facteur limitant pour *N. fowleri*. *In vitro*, *N. fowleri* tolère une gamme de pH relativement large de 4,6 à 9,5 pour la forme trophozoïte et de 2 à 10 pour la forme kystique (Carter, 1970). Par ailleurs, il a été déterminé un pH optimum pour l'initiation de la croissance en milieu axénique compris entre 5,5 et 6,5 (Weik et John, 1977). Dans l'environnement, les études menées confirment cette large tolérance puisque *N. fowleri* a été isolée dans des milieux ayant des pH compris entre 4,0 et 9,1 (De Jonckheere, 1977; De Jonckheere et Voorde, 1977; Wellings *et al.*, 1977; Fliermans *et al.*, 1979; Sykora *et al.*, 1983).

3.4.1.4. Salinité

La tolérance au chlorure de sodium des amibes du genre *Naegleria* est très faible. Selon (Carter, 1970), une concentration moyenne équivalente à de l'eau de mer (40 g/L) empêche la multiplication des amibes du genre *Naegleria* (Carter, 1970). Des données expérimentales montrent une sensibilité marquée pour *N. fowleri*, avec une limite de tolérance comprise entre 0,2 et 2% de NaCl (Cerva, 1978; Tiewcharoen et Junnu, 2001).

3.4.1.5. Oxygène dissous

Il a été constaté que les amibes du genre *Naegleria* ne nécessitaient pas des teneurs importantes en oxygène et que les demandes en oxygène variaient suivant les espèces, *N. fowleri* étant la moins aérobique (Cerva, 1978). Les données relatives au besoin en oxygène de *N. fowleri* ne s'accordent pas. En effet, alors que Weik et John (1977) ont montré que *N.*

fowleri ne se développait pas en atmosphère anaérobie, Kyle et Noblet (1985) isolaient *N. fowleri* dans des sédiments en anaérobie. D'autres études menées dans l'environnement n'ont pas établi de relation entre la quantité d'oxygène dissous et la présence de *N. fowleri* (Jamerson *et al.*, 2009). Ces conclusions opposées des différents auteurs sont probablement dues au fait que le niveau de concentration en oxygène dissous n'est pas forcément un critère fondamental au développement de *N. fowleri*. Ainsi, Marciano-Cabral (1988) conclut sur le fait que les besoins de *N. fowleri* en oxygène sont minimes, ce qui fait de l'espèce une exception parmi les amibes libres.

3.4.1.6. Métaux

Des études réalisées *in vitro* et *in vivo* sur les besoins en fer exogène de *Naegleria* ont montré que l'apport de fer favorise la croissance de ce genre (Duma, 1980; Newsome et Wilhelm, 1983; Kyle et Noblet, 1985; Pougard, 2004). Toutefois, certaines études contredisent ces résultats : une étude menée en Moselle (57, France) ne montre aucune relation entre le fer (de 0,02 et 0,36 ppm) et la présence de *N. fowleri* (Dive *et al.*, 1981). Par ailleurs, Brown *et al.* (1983) aboutissent à la même conclusion dans des sources d'eaux thermales en Nouvelle-Zelande où les concentrations en fer variaient de 0,01 et 2,6 ppm.

Par contre, la présence de chélatants du fer tels que l'acide rhodotorulique et la desferrioxamine B (produits par des bactéries, algues et champignons) inhibent la croissance de *N. fowleri* (Newsome et Wilhelm, 1983). Les besoins en fer constitueraient aussi un aspect important de la pathogénicité de *N. fowleri* (Alonso et Zubiaur, 1985).

Les métaux libres tels que le cuivre, le zinc, l'argent, le nickel à des concentrations communément retrouvées dans l'environnement ou dans des systèmes industriels ont peu d'influence sur la survie de *N. fowleri* en milieux aqueux. En effet, Cassells *et al.* (1995) ont montré *in vitro* que des concentrations supérieures à 80 et 800 µg/L de cuivre et d'argent ne suffisaient pas à observer une inactivation de *N. fowleri* après 72h de contact en milieu liquide. Ces résultats sont confirmés par Pougard (2004) qui pour des concentrations de 2,26 mg/L de zinc, 4,64 mg/L de fer, 503 µg/L de cuivre et 102 µg/L de nickel n'a pas observé d'influence sur la cultivabilité et donc la viabilité de *N. fowleri* après 72h de contact en milieu liquide.

Les éléments apportés sur le cuivre et le zinc sont à mettre en regard des concentrations de *N. fowleri* rencontrées dans les CRFs munis de condenseurs en laiton pour lesquels EDF observe des concentrations bien moindre par rapport aux CRFs munis de condenseurs en acier inoxydable. Concernant le zinc les concentrations mesurées dans les CRFs sont 30 fois plus faible que les 2,26 mg/L testé en laboratoire et sans effet sur *N. fowleri*. A l'identique, la concentration moyenne maximale en cuivre mesurée dans les CRFs munis de condenseur en laiton est de 270 µg/L, soit 2 fois inférieure à la concentration testée en laboratoire et sans effet sur la cultivabilité de *N. fowleri*. Ces données indiquent que les concentrations de cuivre et de zinc circulant rencontrées dans les CRFs ne semblent pas directement liées à la faible présence de l'amibe pathogène (Pougnard, 2004).

3.4.1.7. Bactéries

3.4.1.7.1. Besoin nutritif

Les bactéries constituent un des substrats fondamentaux à la croissance de *N. fowleri*, dans la mesure où c'est une amibe bactérivore. Alors que certaines études tendent à montrer l'absence de corrélation entre l'abondance bactérienne et les amibes libres (De Jonckheere, 1978; Cerva et Simanov, 1983; Delattre *et al.*, 1991), d'autres montrent une influence marquée du compartiment bactérien sur les amibes libres. Ainsi, Kyle et Noblet (1985) démontrent que les amibes libres sont principalement isolées dans les eaux riches en cyanobactéries filamenteuses. Jamerson *et al.* (2009) indiquent que *Naegleria* croît fortement en présence d'*Enterobacteriaceae*. Une autre équipe montre que *N. fowleri* est plus fréquemment isolée dans des eaux contaminées par d'importantes concentrations en coliformes (Sykora *et al.*, 1983). Enfin, certains auteurs font une association entre pollution thermique engendrée par les installations industrielles et croissance de bactéries qui servent de source de nourriture pour la croissance de *Naegleria* thermotolérantes (De Jonckheere et Voorde, 1977; Duma, 1980; Dive *et al.*, 1981; Kasprzak *et al.*, 1982; Easterman *et al.*, 1984; Tyndall *et al.*, 1989; Huizinga et McLaughlin, 1990; Puzon *et al.*, 2009).

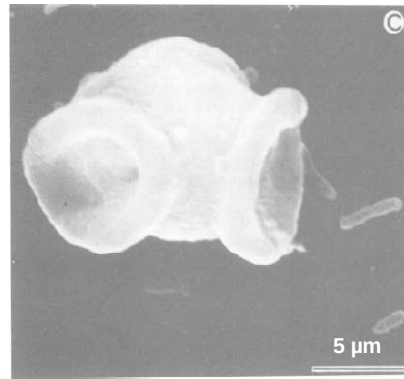


Figure 8 : Phagocytose de bactéries par *Naegleria fowleri* (Marciano-Cabral, 1988).

Malgré la disparité des informations, *N. fowleri* étant une amibe libre bactériophage (Figure 8), la charge bactérienne représente probablement un des facteurs d'influence de la croissance de l'amibe libre pathogène. Toutefois, de nombreuses interrogations subsistent quant à l'influence de ce paramètre compte tenu de la variabilité d'abondance et de diversité de ces proies bactériennes dans les milieux.

3.4.1.7.2. Inhibition par les bactéries

La formation de pigments et d'exotoxines par certaines bactéries exerce un effet protecteur contre la prédation par les protozoaires. Par exemple, la sécrétion par *Bacillus licheniformis* d'une substance M-4 provoque un effet lytique sur *N. fowleri*. Après quelques minutes de contact, on constate l'altération de la membrane et des mouvements brusques du cytoplasme (Cordovilla *et al.*, 1993). De façon identique, Duma (1981) met en évidence l'effet inhibiteur de *Serratia marcescens*, vis à vis des amibes libres. La présence de cette bactérie dans le milieu induit l'enkystement et l'incorporation dans le cytoplasme amibien d'un pigment bipyrrrole rouge ; la croissance est alors stoppée.

3.4.1.8. Compétition et théorie de « l'habitat libre »

Detterline et Wilhelm (1991) ont étudié 59 sites de loisirs (lacs ou rivières) des Etats-Unis. Ils ont estimé et attribué pour chacun de ces sites un indice de perturbation de l'environnement qui tenait compte des changements d'origine naturelle (sources chaudes, éruption volcanique) ou humaine (centrales électriques, rejets industriels, pesticides, engrais, etc.) survenus au cours des dernière années. Cet indice prenait la valeur de 1 pour des écosystèmes stables et de 3 pour des écosystèmes récemment perturbés. Leurs conclusions ont été que la présence de *N. fowleri* n'était significativement pas corrélée à la

température, à la concentration en fer, et à la concentration en amibes libres thermotolérantes. En revanche, elle était corrélée à l'indice de perturbation de l'environnement. Cette constatation appuie l'hypothèse de « l'habitat vide » émise par Griffin (1983). Il énonce un modèle général dans lequel l'intervention humaine et / ou des événements naturels provoqueraient un évincement des compétiteurs et des prédateurs de *N. fowleri* et lui offrirait ainsi la possibilité de recoloniser le milieu, notamment grâce à sa mobilité *via* sa forme flagellée.

Pour illustrer l'importance de la compétition, citons les travaux de Detterline (1989) qui conclue que la présence de compétiteurs est toujours défavorable à *N. fowleri* même à température élevée. A contrario, en l'absence de compétiteurs, *N. fowleri* peut s'installer.

3.4.2. Distribution dans les habitats aquatiques

N. fowleri est cosmopolite dans sa distribution géographique et environnementale. Elle a pu être isolée à partir d'une grande variété d'habitats naturels ou artificiels (habitats transformés ou altérés par l'homme). Pour John, (1982) cette opposition entre le milieu naturel et le milieu artificiel constitue un facteur important dans la fréquence d'isolement du pathogène. Les habitats dans lesquels *N. fowleri* a déjà pu être isolée peuvent être divisés en quatre grandes catégories : sols, air, eaux et interfaces solide-eau.

3.4.2.1. Sols, boues et sédiments

La présence de *N. fowleri* dans les sols est documentée. Ainsi, le pathogène a été isolé au Nigeria à partir d'échantillons de sols agricoles et de jardins (Lawande *et al.*, 1979), mais également en Australie (Anderson et Jamieson, 1972), en Nouvelle-Zelande (Cursons *et al.*, 1979). De même, cette espèce a été retrouvée dans des sédiments en anaérobiose (Wellings *et al.*, 1979), dans des échantillons de boues issus de spa thermaux en Italie du Nord (Scaglia *et al.*, 1983), dans des boues d'effluents thermiques de sidérurgies belges (De Jonckheere et Voorde, 1977), ou encore dans des boues résiduares d'égouts en Inde (Singh et Das, 1972).

3.4.2.2. Air

L'air n'apparaît pas comme un milieu favorable à la survie des amibes libres et en particulier de *N. fowleri*, sensible à la dessiccation. Ainsi, sa recherche dans l'air à proximité d'une centrale électrique aux Etats-Unis n'a donné aucun résultat alors que la contamination dans les effluents liquides augmentait pendant le fonctionnement de la centrale (Tyndall *et al.*,

1989). Toutefois, Lawande (1983) met en évidence pour la première fois la présence de *N. fowleri* dans l'air au Nigeria en période d'Harmattan (vent sec porteur de particules fines). Après avoir exposé à l'air pendant une demi-heure les milieux de culture, ces derniers se sont révélés positifs pour la présence du pathogène.

3.4.2.3. Eaux

L'eau est certainement l'habitat où *N. fowleri* a été le plus fréquemment isolée de l'environnement. Une variation saisonnière des concentrations en *N. fowleri* a été mise en évidence par plusieurs auteurs. Les concentrations sont plus importantes durant la période estivale alors qu'un échauffement naturel ou artificiel est constaté (Tyndall *et al.*, 1989; Pougard, 2004), mais également en automne et au printemps (Kasprzak *et al.*, 1982; Cerva et Simanov, 1983; Kyle et Noblet, 1985). Pour Kyle et Noblet, (1986), le fait que *N. fowleri* soit un colonisateur primaire, couplé à l'avantage que lui confère sa forme flagellée, lui permettrait de coloniser de nouvelles niches écologiques qui apparaissent lors des modifications saisonnières des environnements aquatiques. Les eaux contenant le pathogène sont d'origines diverses.

3.4.2.3.1. Eaux environnementales

Au cours de l'été 1971 Nelson (1972) a isolé le pathogène à partir d'un échantillon d'eau prélevé dans un étang où une victime avait nagé quelques années auparavant. Cela constituait le premier isolement de *N. fowleri* à partir d'une source environnementale. Depuis, on a trouvé l'agent pathogène dans des mares chauffées et des sources d'eaux chaudes (Martinez et De Jonckheere, 1981; Brown *et al.*, 1983; Kyle et Noblet, 1986; O'Dell et Ramaley, 1986; De Jonckheere, 2011), des étangs (Griffin, 1983), des lacs (Kasprzak, 1974; Wellings *et al.*, 1977; Lawande *et al.*, 1979) et dans des rivières (Griffin, 1983).

3.4.2.3.2. Eaux de réseaux et de piscines

Les eaux de réseaux de distribution ont systématiquement subi une désinfection. Cependant, certaines conditions particulières peuvent mettre à mal ce processus (défauts de la filière de traitement, fuites, etc.). Ainsi, la détection de *N. fowleri* dans les réseaux d'eau potable a pu être diagnostiquée et pose de gros problèmes.

Récemment en décembre 2011, deux personnes sont mortes en Louisiane aux Etats-Unis après avoir utilisé l'eau du robinet pour se nettoyer les sinus. La contamination des eaux de

réseaux n'est pas nouvelle. Le pathogène a été isolé dans l'eau potable en Australie du Sud, en Europe, en Amérique, en Asie et en Afrique (Jamieson et Anderson, 1973; Jadin, 1974; Willaert *et al.*, 1974; Dorsch *et al.*, 1983; Marciano-Cabral *et al.*, 2003; Blair *et al.*, 2008).

A l'identique, la contamination des piscines a été relevée à plusieurs reprises à la suite de cas de MEAP (Fowler et Carter, 1965; Cerva et Novak, 1968; Symmers, 1969; Jadin *et al.*, 1971; Jamieson et Anderson, 1973; Willaert *et al.*, 1973; Kadlec *et al.*, 1978; De Jonckheere, 1982; Scaglia *et al.*, 1983; Gogate et Deodhar, 1985).

3.4.2.3.3. Eaux usées

Bien que cette contamination soit bien moins décrite, *N. fowleri* a été retrouvée dans des échantillons de boues de station d'épuration en Inde, en Corée et au Nigeria (Singh et Das, 1972; Lawande *et al.*, 1979). Par ailleurs, sa présence a également été rapportée dans les eaux d'égouts en France, en Russie et en Inde (Singh et Das, 1972; Goordeva, 1973; Beurtin *et al.*, 1986).

3.4.2.3.4. Eaux industrielles

Fliermans *et al.* (1979), à la suite de leurs observations ont énoncé que les systèmes aquatiques modifiés thermiquement étaient des habitats propices à la prolifération de *N. fowleri*. Depuis, des études ont été engagées sur l'occurrence de *N. fowleri* dans les eaux issues de systèmes de refroidissement industriels souvent associés à des centrales électriques aux Etats-Unis (Caroline du Sud, Illinois, Virginie, Floride, Texas, Pennsylvanie), en Belgique et en France (Stevens *et al.*, 1977; Dive *et al.*, 1981; Duma, 1981; Sykora *et al.*, 1983; Tyndall *et al.*, 1989; Huizinga et McLaughlin, 1990; Behets *et al.*, 2007; Jamerson *et al.*, 2009).

Dans leur étude, Tyndall *et al.* (1989) ont montré que durant les périodes de rejets d'effluents échauffés, les concentrations de l'agent pathogène *N. fowleri* avaient augmenté de deux ordres de grandeur. De même, Behets *et al.* (2007) ont montré que *N. fowleri* a été l'espèce la plus fréquemment rencontrée parmi les espèces d'amibes libres thermotolérantes. Enfin, Jamerson *et al.* (2009) ont trouvé que sur les 16 sites échantillonnés sur le lac Anna en Virginie au cours de l'été 2007, neuf ont été trouvés positifs pour *N. fowleri*. L'étude menée par Dive *et al.* (1981) en France a montré des rejets positifs en *N. fowleri* sur deux centrales électriques (La Maxe et les Ansereuilles). La fréquence

d'isolement était 10 fois supérieure en aval qu'en amont des centrales. La concentration maximale enregistrée était de 18 *N. fowleri*/L. Huizinga et McLaughlin (1990) ont détecté la présence naturelle de *N. fowleri* sur le lac Clinton dans l'Illinois, et confirment, l'augmentation de la fréquence d'isolement de l'amibe sur l'ensemble de la colonne d'eau, pour des températures supérieures à 25°C, faisant suite à l'implantation d'une centrale électrique.

Ces éléments sont à mettre en regard des mesures réalisées dans les eaux des CRFs des CNPE d'EDF et pour lesquels une réglementation existe et impose de respecter la concentration de 100 *N. fowleri* en rivière à l'aval des installations. En dehors des périodes de traitement, les colonisations dans les CRFs en *N. fowleri* sont saisonnières et reste épisodiques avec des concentrations maximales de l'ordre de 10^3 *N. fowleri*/L (Tousset *et al.*, 2001).

3.4.2.4. Interface solide-eau

Il est admis que les amibes sont des organismes qui se déplacent principalement sur un substrat solide et qui se nourrissent des proies fixées à ce substrat (Rogerson et Laybourn-Parry, 1992; Parry, 2004; Loret et Greub, 2010). Les proies, principalement des bactéries, recouvrent ces surfaces en structure organisée constituée de plusieurs couches de cellules enrobées dans une matrice de polymères. Ces structures correspondent à ce qui est désigné par le terme de biofilm. Pour Eddyani *et al.* (2008), le biofilm présente des conditions favorables en termes d'abondance de nutriments et de stabilité des conditions hydrauliques suffisantes pour promouvoir le développement de *N. fowleri*. Par ailleurs, cette aptitude est confirmée par Sheehan *et al.* (2003) qui ont mis en évidence la présence de *N. fowleri* dans des biofilms présents à la surface de rochers dans les parcs nationaux de Yellowstone et Grand Teton aux Etats-Unis. De même, Puzon *et al.* (2009) ont détecté la présence de l'amibe pathogène dans des biofilms prélevés à la surface des tuyaux d'un réseau de distribution d'eau. Ainsi, le biofilm doit être considéré comme un élément clé de l'écologie de l'amibe. Un intérêt particulier lui sera consacré dans cette synthèse.

4. Le biofilm

4.1. Notions fondamentales

Toute surface solide immergée dans l'eau, capte et accumule un dépôt de molécules organiques, et est soumise à une colonisation plus ou moins rapide par des micro-organismes qui exploitent ce micro-environnement (Zubkov et Sleigh, 1999). Ainsi, 99% de l'activité microbienne d'un milieu aquatique sont compris dans le biofilm selon Bryers et Characklis (1982), ce qui révèle toute l'importance des biofilms dans les écosystèmes aquatiques.

4.1.1. Définition

Apporter une définition consensuelle de ce qu'est un biofilm est relativement difficile compte tenu de la diversité des systèmes naturels. Nous retiendrons celle de Lewandowski et Beyenal (2007) : Un biofilm est « un agrégat organisé de micro-organismes enrobés dans une matrice de polymères microbiens extracellulaires et attachés à une surface. La distribution des micro-organismes au sein du biofilm n'est pas laissée au hasard. Ils sont agrégés et/ou organisés en colonies mixtes, dans lesquelles les espèces microbiennes accomplissent diverses fonctions et communiquent entre elles par signaux chimiques ».

4.1.2. Les éléments constitutifs d'un biofilm

De nombreux auteurs s'accordent à dire qu'un biofilm est une entité physique, définie par sa composition et sa structure. Ils ajoutent que cette entité est évolutive et fonctionnelle et est régie par des activités métaboliques, des réactions physico-chimiques, un réseau de communication (Squinazzi, 2006; Lewandowski et Beyenal, 2007). Ainsi, un biofilm est défini par cinq composantes et/ou compartiments majeurs et leurs interactions mutuelles (Lewandowski *et al.*, 2007), à savoir :

- **Le support d'adhésion des micro-organismes**
- **Les micro-organismes**
- **Les substances polymériques exo-cellulaires (EPS)**
- **La phase liquide**
- **La phase gazeuse**

4.1.2.1. Le support d'adhésion des micro-organismes

Le développement d'un biofilm à l'interface solide-liquide s'effectue de manière spontanée et préférentiellement sur des supports présentant des conditions favorables à la prolifération microbienne.

Les supports d'adhésion ou « substratum » peuvent être plus ou moins colonisés par les micro-organismes et ils jouent un rôle important dans la sélection de la biomasse et son organisation. En effet, les propriétés du substratum (âge et état de la surface, relargage de composés biodégradables, surface hydrophobe, infractuosités, dépôts, surface érodée, surface entartrée) conditionnent l'adhésion des micro-organismes dits « pionniers ». Dans certains cas, le substratum peut même être source de nutriments.

Ainsi, dans les milieux anthropisés, l'ensemble des matériaux (métalliques à base de cuivre, acier inoxydable ou acier galvanisé ; polymères de synthèse, polybutène, polypropylène, polyéthylène, polychlorure de vinyle non plastifié ; et les matériaux souples, silicone, polychlorure de vinyle plastifié, caoutchouc) sont susceptibles d'être colonisés (Squinazzi, 2006).

4.1.2.2. Les micro-organismes et leurs relations

La composante biologique d'un biofilm correspond à l'ensemble des micro-organismes vivants dans le biofilm. Cette composante est dépendante, d'une part de la diversité et de l'hétérogénéité des micro-organismes présents dans le milieu, et d'autre part, des facteurs environnementaux. Ainsi, un biofilm peut être extrêmement complexe (biofilms naturels), ou plus simple (biofilms de laboratoire monospèce type *Pseudomonas aeruginosa* ou *Escherichia coli*).

Au sein d'un biofilm naturel, de nombreux micro-organismes sont quasiment toujours recensés, c'est le cas des bactéries, des protozoaires, des algues, et des champignons (Wimpenny *et al.*, 2000). De ce constat est né le concept de relation trophique. Le premier niveau des relations trophiques au sein de ce biofilm consiste en l'utilisation par la biomasse bactérienne, à des fins métaboliques, structurelles et reproductrices, d'une source de carbone produite par les organismes photosynthétiques. Le second niveau, met en jeu des organismes eucaryotes à savoir les protozoaires, qui se développent au dépend du maillon inférieur (bactéries, algues) (Azam *et al.*, 1983). Toutefois, l'élément principal d'un biofilm

selon la littérature et les nombreuses expérimentations, reste la communauté bactérienne, qui constitue la base même du biofilm notamment par la synthèse des EPS, élément constitutif majeur d'un biofilm.

Au sein du biofilm des réseaux d'eau, certaines espèces de bactéries semblent plus fréquemment rencontrées que d'autres. Parmi les hétérotrophes, les bactéries les plus fréquemment rencontrées seraient les *Legionella*, les *Pseudomonas*, les *Aeromonas*, ou encore les mycobactéries non tuberculeuses (Foret, 2006). La disparité ne s'arrête pas au genre et espèces bactériens, elle concerne également les cinétiques de croissance et la capacité colonisatrice des micro-organismes. Cette capacité colonisatrice d'un micro-organisme, qui seul a une faible aptitude, peut être améliorée par la présence d'un autre micro-organisme (Squinazzi, 2006). Ce phénomène qui requiert une coordination entre les différents micro-organismes, n'est possible que par une communication particulière appelé « *quorum sensing* » (Davies *et al.*, 1998). Cette communication, est le plus souvent spécifique à une même espèce, cependant une communication croisée entre les différentes espèces a déjà été démontrée (Gray, 1997). Le « *quorum sensing* » est assuré par l'intermédiaire de molécules chimiques dites « signal » qui sont très souvent des AHLs (N-acyl homosérine lactones). Par exemple, chez *Pseudomonas aeruginosa*, la sécrétion d'un type particulier d'AHL provoque la fabrication d'un biofilm plat et uniforme (Davies *et al.*, 1998).

4.1.2.3. Les substances polymériques exo-cellulaires

Plusieurs formes de base ont été identifiées soit globulaires, allongées ou une combinaison des deux premières formes. Les EPS, fortement hydratés (95 à 99% d'eau), sont constitués principalement de polysaccharides linéaires : les alginates (composés de deux différents résidus de sucres : 1,4 α -L-acide guluronique et 1,4- β -D-acide mannuronique), mais également de macromolécules comme des protéines, des substances humiques et de l'acide désoxyribonucléique (ADN) (Lewandowski et Beyenal, 2007). L'ensemble des auteurs s'accorde pour dire que la structure tridimensionnelle des EPS conditionne, pour une large partie, les propriétés physico-chimiques des biofilms (viscoélasticité et solubilité), et par conséquent les rôles fonctionnels. Le Tableau 1 rassemble les fonctions avérées ou hypothétiques des EPS au regard de leurs intérêts fonctionnels :

Tableau 1: Fonctions avérées ou hypothétiques des EPS (Lewandowski et Beyenal, 2007).

Fonctions	Intérêts fonctionnels
Adhésion aux surfaces et conditionnement des surfaces	- Etape initiale de colonisation des surfaces. - Modification de la surface du substratum - Accumulation de bactéries sur des surfaces riches en nutriments dans des environnements oligotrophes².
Agrégation des micro-organismes, formation de floccs et de biofilm	- Assure la jonction entre les cellules et les particules inorganiques de l'environnement. - Génération d'un milieu pour les processus de communication.
Reconnaissance cellule-cellule	- Relations symbiotiques avec les plantes, les animaux. - Initiation à la pathogénicité.
Eléments de structure des biofilms	- Stabilisation des biofilms (association avec cations multivalents). - Détermination de la forme de la structure des EPS (capsule, gaine). - Forme des canaux facilitant le transport des éléments nutritifs.
Barrière de protection	- Résistance aux défenses non spécifiques (phagocytose, réponse anticorps). - Résistance à certains biocides (désinfectants, antibiotiques). - Protection de la nitrogénase cyanobactérienne contre l'oxygène.
Rétention d'eau	- Prévention de la dessiccation
Sorption de composés organiques exogènes et d'ions inorganiques	- Captage et accumulation de nutriments de l'environnement. - Sorption des xénobiotiques (détoxification). - Accumulation d'ions métalliques toxiques (détoxification). - Formation du gel de polymère. - Formation minérale.
Activités enzymatiques des polysaccharides	- Digestion de macromolécules exogènes issues de l'acquisition nutritionnelle.
Interaction des polysaccharides avec les enzymes	- Accumulation, rétention et stabilisation des enzymes sécrétées.

² Oligotrophe : milieu pauvre en éléments nutritifs

Au regard de ce tableau, il devient évident que toute modification des conditions du milieu, pouvant conduire à une altération de cette structure tridimensionnelle concourt à une modification du biofilm.

4.1.2.4. La phase circulante

La phase circulante, est une composante indispensable à la formation, au maintien et à l'activité d'un biofilm. En effet, cette dernière est au contact direct du biofilm qui l'intègre via ses canaux (Lewandowski et Beyenal, 2007). Les échanges de matières au sein d'un biofilm sont tributaires des conditions hydrodynamiques et de la composition de la phase circulante ainsi que des caractéristiques de l'interface entre cette phase circulante et le biofilm.

La phase circulante permet d'alimenter le biofilm en nutriments, qui selon Foret (2006) ont deux principales origines:

- o **Une origine organique** : acides aminés, hydrates de carbone, stérols, alcools.
- o **Une origine minérale** : fer (souvent identifié et représentant jusqu'à 30% du biofilm), calcium, silicium, magnésium, sodium, ...

Les rôles secondaires attribués à la phase circulante sont : la détoxification, qui permet au biofilm de se séparer des déchets métaboliques et des toxiques éventuels, la virulence, le transport des micro-organismes. Par exemple, le fer est nécessaire à l'activité des cytochromes (respiration) et des catalases (détoxification de certains radicaux libres), voire même à des phénomènes de virulence de certaines espèces pathogènes.

4.1.2.5. La phase gazeuse

L'effet de la phase gazeuse sur un biofilm est très rarement analysé. En effet, les éléments gazeux sont très souvent dissous dans la phase circulante (oxygène dissous), par conséquent ces éléments sont souvent assimilés à une substance de la phase circulante. Cependant, quand les micro-organismes du biofilm sont microaérophiles³, la composition de la phase gazeuse doit être contrôlée (Lewandowski et Beyenal, 2007).

³ Microaérophile : bactéries qui ne fonctionnent correctement que sous pression réduite en dioxygène

4.1.3. Les étapes de formation d'un biofilm

La formation d'un biofilm met en jeu un ensemble de processus physiques, chimiques et biologiques. Ainsi, le biofilm résulte de plusieurs étapes développées ci-dessous et synthétisées par la Figure 9.

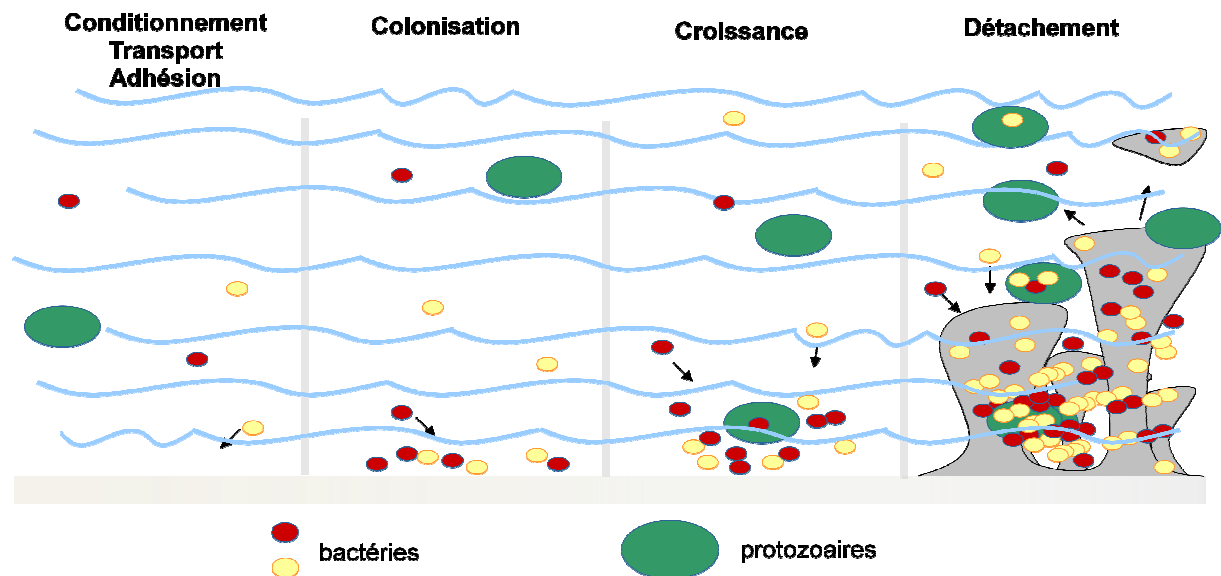


Figure 9 : Représentation schématique des étapes de formation et d'évolution d'un biofilm (adapté de Foret, 2006 et Lewandowski et Beyenal., 2007).

4.1.3.1. Le conditionnement de la surface

La formation d'un biofilm passe par une première étape de formation de la «couche de conditionnement». Cette couche dépend des éléments présents dans l'eau, de leurs concentrations et de leurs affinités pour le substratum. Le transport et la fixation des éléments de l'eau vers le substratum se font selon trois mécanismes qui sont : l'advection, la diffusion et l'adsorption moléculaire. Les éléments constitutifs de cette «couche de conditionnement» sont organiques (majoritaire) et minérales. Pour ce qui est des éléments d'origine organique, il s'agit essentiellement : des acides humiques, des complexes de polysaccharides, des protéines, des lipides et des acides gras. Les éléments constitutifs d'origine minérale sont mineurs (Chamberlain, 1992). Certains cristaux minéraux, comme la calcite, ont la capacité de favoriser une adhésion rapide des micro-organismes au substratum, par modification des propriétés physico-chimiques, et notamment la neutralisation des charges électriques (Hiernaux, 2005).

Potentiellement, les effets de cette couche sur l'installation du biofilm sont variés aussi bien au niveau du support que des bactéries : des modifications des propriétés physico-chimiques du substratum pouvant faciliter l'adhésion des particules, le relargage limité d'éléments métalliques toxiques par le support, une adsorption et neutralisation de substances toxiques provenant de la phase circulante.

L'adhésion des micro-organismes peut se résumer en deux étapes dynamiques successives : le transport vers la surface et l'adhésion initiale non spécifique et/ou l'adhésion spécifique.

4.1.3.2. Le transport des micro-organismes

Toute adsorption de micro-organismes sur un substratum suppose un rapprochement de ceux-ci vers le substratum. Ce rapprochement est possible via un transport des micro-organismes, véhiculés par la phase circulante. Le transport est conditionné par les conditions hydrodynamiques du système, avec notamment le flux et les forces de cisaillement. Ainsi, selon l'importance de l'hydrodynamique, on peut retenir différents types de transport : la sédimentation (gravité), le chimiotactisme⁴, les forces engendrées par le fluide en mouvement.

4.1.3.3. L'adhésion au substratum

Cette étape est fortement dépendante des propriétés du substratum, et du taux de transport des micro-organismes vers ce dernier (Lewandowski et Beyenal, 2007). De plus, toutes les souches bactériennes n'ont pas la même capacité à coloniser les surfaces. Les premières bactéries à se fixer sont dites « pionnières », elles disposent d'une force d'adhésion efficace apportée, par exemple les appendices protéiques tels que les pili (Zubkov et Sleight, 1999).

Trois types d'interactions interviennent dans le mécanisme de l'adhésion, lorsque les micro-organismes arrivent à faible distance du substratum (de l'ordre du nanomètre ou de la dizaine de nanomètre) : les forces attractives de Van der Waals, les forces électrostatiques, les forces acide-base de Lewis (Characklis et Marshall, 1989). La mécanique consiste tout

⁴ Chimiotactisme : c'est la propriété que possède une cellule vivante de se déplacer sous l'influence de stimuli chimiques du milieu.

d'abord en une adhésion initiale, souvent réversible et non spécifique, suivie par une adhésion irréversible et spécifique.

- o **Adhésion réversible** : Il s'agit d'interactions physico-chimiques faibles entre les micro-organismes et le substratum, de l'ordre de 40 kJ mol^{-1} . Ce sont les forces de Van der Waals qui interviennent lorsque la distance entre le micro-organisme et la surface est supérieure à 50 nm, auxquelles s'ajoutent les interactions électrostatiques pour une distance comprise entre 10 et 20 nm. Cette phase est aspécifique et de courte durée 5 à 10 heures (Characklis et Marshall, 1989).
- o **Adhésion irréversible** : Cette phase, plus lente, fait appel au métabolisme bactérien et notamment à l'activation de l'expression de nombreux gènes promoteurs entraînant une synthèse accrue d'EPS, afin de consolider leur fixation au support. Cette adhésion irréversible apparaît pour des distances de séparation très petites, inférieures à 1,5 nm. Les interactions ici mises en jeu sont de types hydrophobes et/ou covalentes, leur énergie de liaison est comprise entre 40 et 400 kJ mol^{-1} (Characklis et Marshall, 1989).

4.1.3.4. La colonisation du biofilm

Après l'adhésion, dans des conditions favorables, les micro-organismes fixés de manière irréversible au substratum se multiplient et produisent des EPS (Foret, 2006). La colonisation correspond à la couche primaire de développement, période pendant laquelle l'épaisseur du biofilm et sa masse sont négligeables. Les activités sont essentiellement centrées sur l'adsorption d'éléments organiques et inorganiques, et la fixation des premières espèces bactériennes sur le support (Lewandowski et Beyenal, 2007).

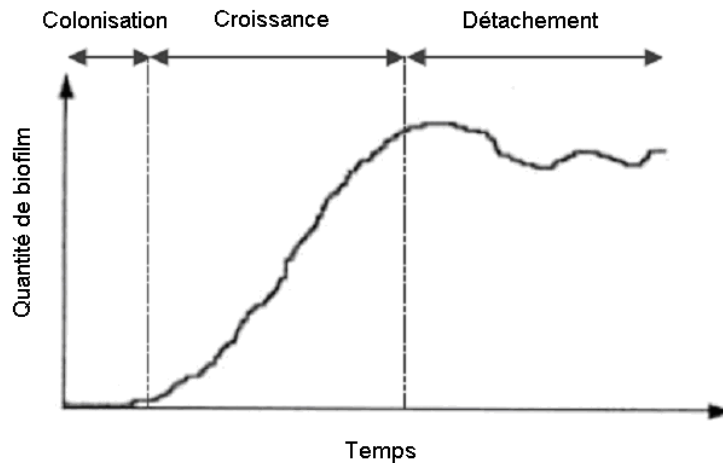


Figure 10 : Courbe de croissance théorique d'un biofilm (Lewandowski et Beyenal., 2007).

4.1.3.5. La croissance du biofilm

Comme l'illustre la Figure 10, le biofilm a une croissance exponentielle qui se traduit par l'augmentation importante de l'épaisseur du biofilm et de la densité microbienne. Il y a au sein du biofilm, une invasion du substratum par les espèces colonisatrices, principalement d'origine bactérienne, une multiplication de ces dernières avec en parallèle une synthèse d'EPS, l'apparition de micro-colonies, et l'apparition de nouvelles populations comme des algues, des champignons, des protozoaires (Lewandowski et Beyenal, 2007).

Les temps de colonisation et de croissance du biofilm sont conditionnés par plusieurs éléments dont la concentration en nutriments apportés par la phase circulante. En conditions favorables, un biofilm pourrait atteindre l'équilibre après 2 à 3 semaines (Hallam *et al.*, 2001; Tsai *et al.*, 2004). En revanche, une durée supérieure à 200 jours a été avancée en condition d'appauvrissement en nutriment (Boe-Hansen *et al.*, 2002). Le temps de formation du biofilm est dépendant des cinétiques de croissance des micro-organismes, et des facteurs environnementaux (physico-chimie, prédation, conditions hydrodynamiques,...) (Lewandowski et Beyenal, 2007).

4.1.3.6. Le détachement du biofilm

Dans sa phase dite de stabilisation, le biofilm « mature » est un véritable écosystème dont la croissance arrive en plateau. L'un des facteurs explicatif de la stabilisation du biofilm est le décrochage de petits fragments à l'origine de la perte de biomasse. Ce détachement des

couches externes du biofilm conduisant à la libération de micro-organismes, est une étape d'extension et de colonisation de nouvelles surfaces. Les connaissances actuelles du détachement sont assez mal connues, pourtant il semble que sous l'action de plusieurs contraintes, il se produise un détachement naturel ou spontané (programmé) (Dunne, 2002).

- o **Détachement « naturel »** : Ce détachement est la conséquence directe des effets des forces de cisaillement dues au régime hydraulique (Picioreanu *et al.*, 2001). De nombreux auteurs s'accordent sur les mécanismes à l'origine du détachement : l'érosion, responsable de la perte de petits fragments de biomasse dans la partie supérieure du biofilm ; l'écaillage, avec un détachement rapide de morceaux voire de la totalité du biofilm ; l'abrasion provoquée par la phase circulante et ses particules en suspension ; les prédateurs essentiellement les protozoaires, par broutage (Pederson, 1990; Stoodley *et al.*, 2001).
- o **Détachement « programmé »** : Le détachement du biofilm peut parfois être induit par les micro-organismes. En effet, lorsque les conditions deviennent néfastes pour le développement (stress hydraulique, manque de nutriments, ...), certaines bactéries comme par exemple *Pseudomonas aeruginosa*, causent leur propre décrochage par libération d'enzymes spécifiques, telles que des polysaccharidases, capables de dépolymériser le biofilm (Donlan, 2002).

L'épaisseur du biofilm est définie comme la distance entre le substratum et l'interface entre le biofilm et la phase circulante. Cette épaisseur peut s'étendre de quelques micromètres à quelques centimètres, suivant la nature et la concentration en nutriments, les conditions hydrodynamiques, la nature des bactéries, la nature du support et son âge (Characklis, 1990). Par exemple, les conditions hydrodynamiques de type régime laminaire conduisent à des épaisseurs de biofilm plus importantes (Wasche *et al.*, 2002). Lorsque le biofilm est fin (inférieur à 40 μm), le transfert des nutriments et de l'oxygène ne sera pas limité. En revanche, lorsque le biofilm est plus épais (supérieur à 80 μm), l'activité des couches profondes est plus faible. A partir d'une certaine épaisseur de biofilm, le flux de nutriments (azote, glucose, oxygène) peine à satisfaire les besoins nutritifs des couches profondes, entraînant une diminution de la densité du biofilm, afin de rétablir la diffusion et la poursuite du développement (Seker *et al.*, 1995). D'autre part, la distribution des espèces

chimiques dans le biofilm n'est pas uniforme, ce qui conforte la notion d'hétérogénéité d'un biofilm (Xu *et al.*, 1998).

Un biofilm est donc un ensemble d'éléments d'origine biotique et abiotique, en interaction dynamique dans le temps et l'espace. Des facteurs intrinsèques (signaux chimiques, organisation structurale et fonctionnelle, prédation etc....) et extrinsèques (conditions hydrodynamiques et physico-chimiques) interviennent tout au long de sa vie. La formation d'un biofilm est donc directement liée à la variation d'un ou plusieurs de ces facteurs (Rice *et al.*, 1993).

4.2. Influence de l'environnement sur le biofilm

Le biofilm est fortement influencé par son environnement et de nombreux paramètres peuvent intervenir sur son développement. Les images ci-dessous (Figure 11) sont des clichés pris en microscopie électronique de différents biofilms issus de circuits de refroidissement. Ces photos montrent la forte influence des paramètres support de colonisation, température et hydrodynamique sur la structure et l'architecture du biofilm.

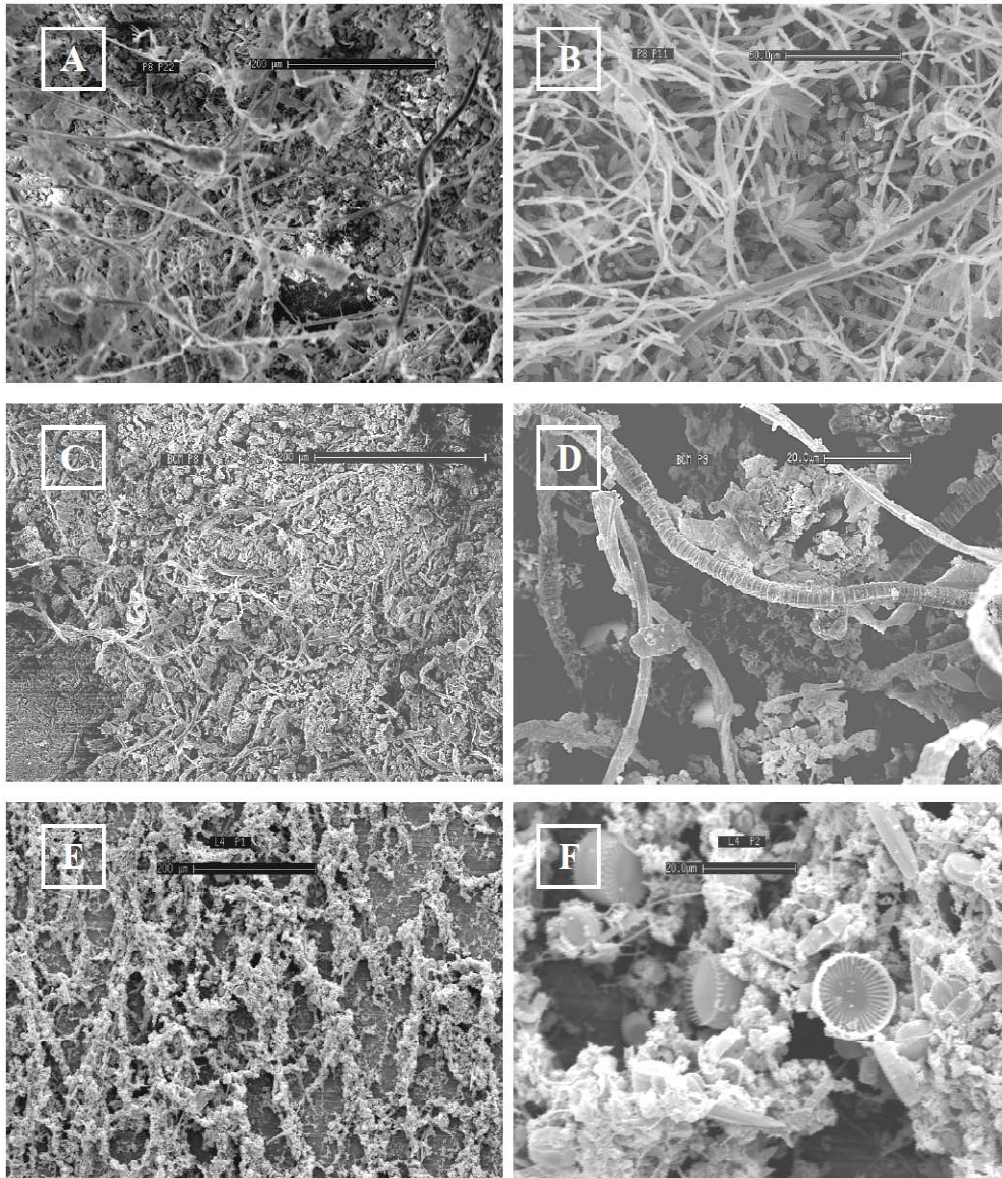


Figure 11 : Clichés en microscopie électronique à balayage de différents coupons prélevés sur le circuit de refroidissement d'une centrale nucléaire EDF. A et B : coupons de PVC après 185 jours d'exposition (installés en bassin chaud) ; C et D : coupons de béton après 103 jours d'exposition (installés en bassin froid) ; E et F : coupons d'acier inoxydable (installés en sortie condenseur).

4.2.1. Influence de l'hydrodynamique sur le biofilm

Les biofilms multi-espèces naturels sont difficiles à interpréter et à reproduire. Ils sont capables de se développer pour des régimes hydrauliques très variés allant de l'hydrostatique au turbulent rugueux (Stoodley *et al.*, 1994). Toutefois, l'hydrodynamique a une influence significative sur le développement, l'activité, l'architecture et la composition du biofilm. Ainsi, une augmentation du débit à l'interface eau/biofilm conduit via un

transport de matière plus important à une adhésion et un développement plus rapide des microorganismes (Bakker *et al.*, 2003; Stoodley *et al.*, 2001; Busscher et van der Mei, 2006). Toutefois, il existe un débit critique pour lequel les contraintes de cisaillement résultantes sont suffisamment importantes pour prévenir l'adhésion, et parfois même provoquer le détachement des microorganismes. D'autres études ont montré, pour des biofilms hétérogènes multi-espèces de réseau d'eau potable, l'influence prononcée des contraintes de cisaillement sur l'établissement d'un biofilm et le détachement mécanique des clusters (Paris *et al.*, 2007; Abe *et al.*, 2012).

Par ailleurs, Kirisits *et al.* (2007) soulignent l'importance de l'hydrodynamique dans le mécanisme de communication (*quorum sensing*) pour un biofilm de *Pseudomonas aeruginosa*. Rickard *et al.* (2004) démontrent qu'une perte de diversité d'un biofilm multi-espèces d'eau potable est liée à l'augmentation des contraintes de cisaillement de 0.1 à 305 s⁻¹. Enfin, de nombreux auteurs s'accordent pour dire que l'architecture d'un biofilm est fortement dépendante des conditions hydrodynamiques. Pour Busscher et van der Mei (2006) et Purevdorj *et al.* (2002) un régime turbulent est propice à la formation d'un biofilm plutôt stable et rigide caractérisé par une configuration de type canaux, alors qu'un régime laminaire est plutôt propice à un biofilm plus uniforme.

Sur l'ensemble de la littérature scientifique explorée, aucune étude n'a été dédiée à l'influence de l'hydrodynamique sur *N. fowleri* dans le biofilm. Toutefois, certaines informations utiles ont été relevées sur d'autres organismes. Ainsi, Decave *et al.* (2002) ont établi des cinétiques de détachement de l'amibe *Dictyostelium discoideum* de leur support (lame de verre) en condition d'écoulement laminaire pour différentes contraintes de cisaillement. Ils concluent sur le fait que le détachement des amibes libres suit une courbe de type exponentielle qui est directement reliée aux contraintes de cisaillement. Ainsi, ils estiment que pour une contrainte inférieure à 0,9 N m⁻² le détachement est négligeable, et qu'au-delà de cette valeur le détachement augmente significativement et atteint même 90% pour 5 N m⁻². Ils retiennent une contrainte de cisaillement de 2,6 N m⁻² qui correspond à la force à appliquer pour détacher la moitié des amibes libres.

Toujours dans la même étude, Decave *et al.* (2002) montrent que la nature du support impacte fortement la valeur seuil de la contrainte de cisaillement à appliquer pour avoir un

détachement. Cette observation est appuyée par les travaux de Owens *et al.* (1987) qui montrent que sous une contrainte de cisaillement de 6 N m^{-2} les amibes libres restent adhérentes à un support en verre saturé avec de l'octadécyl. Alors que pour un support traité par un polymère, une contrainte de cisaillement de $0,03 \text{ N m}^{-2}$ suffit à décrocher 97% des amibes libres. Dans une autre étude, Decave *et al.* (2003) indiquent que les amibes *Dictyostelium discoideum* semblent aller dans le sens du flux d'eau indépendamment de la contrainte de cisaillement. Un changement brutal de direction du flux entraîne un changement immédiat du déplacement des amibes libres.

Dans son étude, Paris (2008) a investigué sur 50 jours, au moyen de chambres d'écoulement, l'influence des conditions hydrodynamiques (plus spécifiquement le gradient de vitesse pariétale) sur le dépôt bactérien. Il a en parallèle suivi l'influence de la prédation par les protozoaires (en particulier les amibes libres) sur la biomasse fixée. Il conclut que l'hydrodynamique n'a aucun effet sur le taux de prédation des amibes libres. En revanche, elle affecte la physiologie et la biodiversité des amibes libres. En effet, des observations en continu montrent que pour un taux de cisaillement de 35 s^{-1} , des amibes libres de grande taille sont observées (*Thecamoebae*, environ $100 \mu\text{m}$) alors que pour un taux de cisaillement de 195 s^{-1} , ce sont plutôt des petites amibes libres (environ $5 \mu\text{m}$) qui sont notées.

4.2.2. Nature du substratum

D'une manière générale, le type de substrat sur lequel se développe le biofilm induit des différences dans sa structure (Figure 11) (Rogers *et al.*, 1994; Chandra *et al.*, 2001). Par exemple, l'utilisation de matériaux cuivreux est défavorable au développement de biofilm. Il diminue à la fois la concentration et la diversité des bactéries et des protozoaires. De plus, le cuivre peut avoir un effet inhibiteur à distance, une partie des molécules de cuivre diffuse dans la colonne d'eau et peut s'accumuler dans les organismes situés plus en aval (Rogers *et al.*, 1994). De façon similaire, Lehtola *et al.* (2004) et Lehtola *et al.* (2005) ont montré que le biofilm formé sur les conduites en polyéthylène était plus important en taille, que celui formé sur des conduites en cuivre.

4.2.3. Qualité de l'eau

Les nutriments peuvent dans certaines circonstances être l'un des facteurs limitant de la production bactérienne du biofilm et influencer sa composition (Chenier *et al.*, 2003).

Lorsque la concentration en nutriments est faible, le biofilm est moins colonisé et la présence d'espaces vides est plus importante (Diaz Villanueva *et al.*, 2011). Une augmentation des éléments limitant, carbone et azote, provoque une réponse immédiate du biofilm, à la fois en terme de biomasse, mais aussi en termes morphologiques : des structures « ridées » disparaissent, les amas de cellules sont plus larges, certains vont même fusionner et former ainsi une structure poreuse. Ces changements morphologiques mais également de biomasse sont réversibles lors du retour aux concentrations initiales en carbone et azote (Stoodley *et al.*, 1998). La composition en nutriments a donc un impact sur l'architecture du biofilm (Moller *et al.*, 1997).

4.2.4. Température

Les variations de température ont un impact conséquent sur les biofilms, non seulement parce qu'elle affecte l'activité et les propriétés des microorganismes, mais aussi parce qu'elle influence certains paramètres physico-chimiques. Ainsi, la température va pour partie, moduler les propriétés de surfaces et l'activité métabolique et enzymatique des microorganismes (Briandet *et al.*, 1999; Cappello et Guglielmino, 2006).

Par exemple, une augmentation de la température de milieux aquatiques naturels (de 4,5°C à 7°C) peut s'accompagner d'une augmentation de la vitesse de production photosynthétique nette (28 à 115 %), de la vitesse de respiration (29 à 103 %) et de l'abondance bactérienne (DeNicola, 1996; Battin *et al.*, 2003). Par ailleurs, une augmentation de la température, peut conduire à la formation d'un biofilm d'eau de rivière plus dense et à une diversité bactérienne plus importante (Diaz Villanueva *et al.*, 2011).

4.3. Biofilms et protozoaires

Il y a peu de références bibliographiques faisant état du rôle des amibes libres dans la dynamique des biofilms. Bien souvent les études menées portent uniquement sur le rôle et l'identification plus large des protozoaires. La capacité des protozoaires à brouter conditionne plusieurs phénomènes dans le biofilm:

- o **Régulation de la population bactérienne et maintien de l'état physiologique** : Un des facteurs les plus influents de contrôle et de régulation de la dynamique d'un biofilm est le broutage par les protozoaires (Pederson, 1990). Il a été estimé que les

protozoaires sont capables de consommer de 30 à 100% de la production bactérienne du biofilm par jour (Sherr *et al.*, 1983).

- o **Topographie du biofilm** : Les protozoaires provoquent le décrochement de petits fragments de biofilm (à l'exception des amibes libres qui, du fait de leur déplacement lent sont moins concernées). En effet, les mouvements et courants associés au déplacement et à l'alimentation, notamment des ciliés et des flagellés, entraînent des perturbations qui arrachent les bactéries du biofilm, les remettant ainsi en suspension. Ces dernières, pourront être alors aisément ingérées (Parry, 2004).
- o **Hébergement de bactéries pathogènes** : Certaines bactéries pathogènes, comme *Legionella* ou *Listeria*, ont la capacité d'éviter les mécanismes de digestion des protozoaires, en s'échappant de la vacuole digestive et en se répliquant dans le cytosol (Newsome *et al.*, 1985; Sanden *et al.*, 1992; Parry, 2004; Thomas *et al.*, 2004). D'autres bactéries, notamment parmi des coliformes, résistent au cycle de digestion, et sont excrétées hors du protozoaire viable (Parry, 2004).
- o **Reminéralisation de l'azote et du phosphore** : Il s'agit seulement d'une suspicion, en effet à ce jour, aucune étude ne confirme le rôle des protozoaires dans la reminéralisation de l'azote et du phosphore dans les biofilms (Parry, 2004). En revanche, cette faculté a déjà été démontrée dans le sol, où, par exemple les amibes libres contribuent pour 20 à 40% de la reminéralisation de l'azote (Clarholm, 1985; Davidson *et al.*, 1990).

5. Désinfection à la monochloramine

La désinfection par traitement chimique est la méthode la plus fréquemment employée pour maintenir une qualité microbiologiquement acceptable dans les réseaux et les circuits d'eaux. La stratégie adoptée consiste systématiquement à maintenir une concentration résiduelle suffisamment élevée pour contrôler la population microbienne.

Les molécules chimiques utilisées dans la désinfection des eaux sont de natures très diverses. On trouve notamment les désinfectants oxydants (chlore, dioxyde de chlore, monochloramine), les désinfectants non oxydants (isothiazolone, dibromonitripropioamide, glutaraldehyde, bromonitropropandiol, ammoniums quaternaires, etc.) et les ions métalliques (cuivre, argent).

En France, depuis plus d'une dizaine d'années, la problématique *N. fowleri* dans les circuits de refroidissement est traitée principalement par l'utilisation de la monochloramine. Ce traitement présente une bonne efficacité désinfectante avec un taux de traitement usuel visant le maintien de $0,25 \pm 0,05 \text{ mg/L Cl}_2/\text{L}$ en sortie condenseur, qui permet de respecter le seuil réglementaire sanitaire de 100 *N. fowleri*/L en rivière.

Cette partie s'attache à présenter la monochloramine, au travers d'un bref historique, sa chimie, sa réactivité et les facteurs pouvant l'influencer. Par ailleurs, son mode d'action à l'encontre des biofilms et des amibes libres ainsi que la notion de résistance sont également abordés.

5.1. La monochloramine

Historiquement la monochloramine a été utilisée pour la première fois en 1917, dans le traitement d'un système de potabilisation de l'eau à Ottawa au Canada (Wolfe *et al.*, 1984). En 2005, aux Etats-Unis, 29% des centres de traitement de l'eau potable utilisaient les chloramines (principalement la monochloramine) (Seidel *et al.*, 2005). Dans les pays anglo-saxons (Etats-Unis, Canada, Australie...) de nombreuses unités de production d'eau potable ont adopté une désinfection finale à la monochloramine afin de réduire la formation de sous produits dans les réseaux de distribution (Cimetière, 2009). En France, la désinfection à la monochloramine n'est pas autorisée pour la désinfection des eaux de distribution mais est principalement appliquée pour la désinfection des eaux de surface utilisées dans un but industriel (industrie de l'énergie, etc...).

Sa faible réactivité en milieu liquide (Kim *et al.*, 2002), notamment sur les matières organiques naturelles, de même qu'avec les polysaccharides extracellulaires (LeChevallier *et al.*, 1988) permet d'assurer le maintien d'un résiduel de désinfectant plus stable dans le temps et une meilleure pénétration des matrices complexes type biofilms et de limiter fortement la formation de trihalométhanes (THMs) (Kim *et al.*, 2002).

5.1.1. Chimie et réactivité

5.1.1.1. Formation de la monochloramine

La formation des chloramines est obtenue par une réaction d'oxydation de l'ammoniaque par le chlore (Doré, 1989). Cette réaction conduit dans un premier temps à la formation de monochloramine (NH_2Cl) puis de di- (NHCl_2) et tri-chloramine (NCl_3) [1-3]. L'ensemble des chloramines (NH_2Cl , NHCl_2 , NCl_3) est communément appelé chlore combiné.



La spéciation dépend essentiellement des facteurs pH, rapport azote/chlore (N/Cl), température et temps de contact (Harrington *et al.*, 2003; Kirmeyer *et al.*, 2004). Le rapport N/Cl est défini comme le rapport entre les concentrations en espèces azotées et le chlore total. La distribution des différentes espèces du chlore en fonction du rapport molaire N/Cl (Figure 12) montre que, pour $\text{N/Cl} > 1$, la quasi totalité du chlore total est représentée par les chloramines (chlore combiné). De plus la Figure 13, illustrant la spéciation des chloramines en fonction du pH, montre que pour des $\text{pH} > 7,2$ la majorité des chloramines est sous la forme de monochloramine.

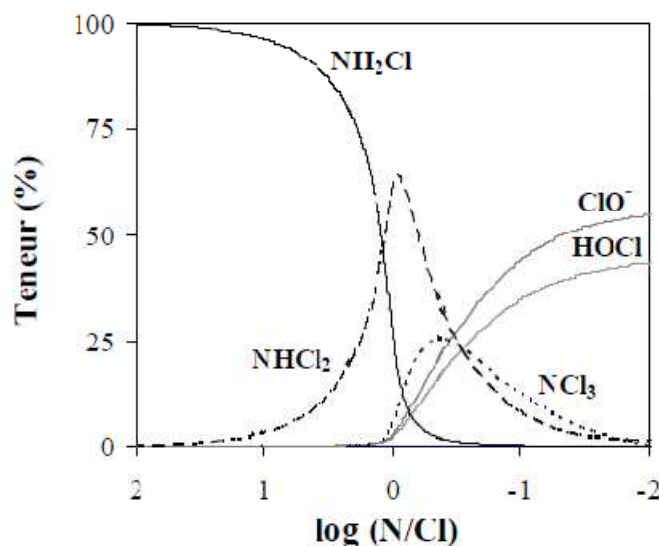


Figure 12 : Distribution des espèces de chlore en fonction du rapport molaire N/Cl (Cimetière, 2009).

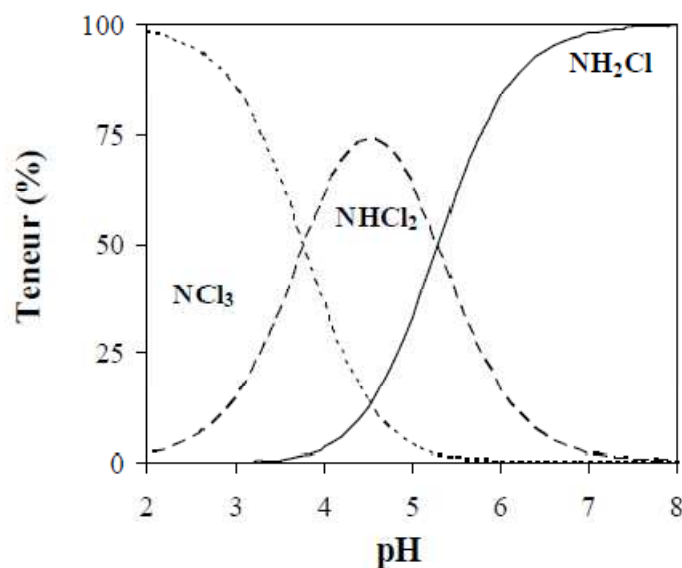


Figure 13: Distribution des chloramines en fonction du pH.

5.1.1.2. Décomposition de la monochloramine

o Auto-décomposition

La monochloramine est relativement instable à pH neutre, même en absence de composés organiques. Cette décomposition implique de nombreuses réactions et fait intervenir différents paramètres (pH, température, force ionique...). La série de réactions complexes comprend (Tableau 2) :

- L'hydrolyse de la monochloramine (réactions 1.1-1.4),
- L'interconversion de la monochloramine en dichloramine (réactions 1.5-1.6),
- Les réactions d'oxydation et de réduction (réactions 1.7-1.10),
- Les réactions d'équilibre pour les espèces dépendantes du pH (réactions 1.13-1.16).

Rq : Les réactions 1.11 et 1.12 ne sont pas des réactions d'autodécomposition mais des réactions de la monochloramine avec les matières organiques.

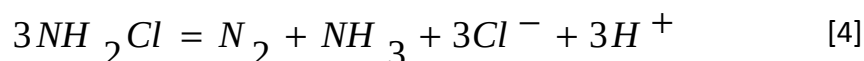
Tableau 2 : Réactions stochiométriques de décomposition de la monochloramine (Duirk *et al.*, 2002)

Reaction stoichiometry	Rate/equilibrium constant (25 °C)	Reference
1.1 $\text{HOCl} + \text{NH}_3 \rightarrow \text{NH}_2\text{Cl} + \text{H}_2\text{O}$	$k_{1.1} = 1.5 \times 10^{10} \text{ M}^{-1} \text{ h}^{-1}$	12
1.2 $\text{NH}_2\text{Cl} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{HOCl} + \text{NH}_3$	$k_{1.2} = 7.6 \times 10^{-2} \text{ h}^{-1}$	12
1.3 $\text{HOCl} + \text{NH}_2\text{Cl} \rightarrow \text{NHCl}_2 + \text{H}_2\text{O}$	$k_{1.3} = 1.0 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ h}^{-1}$	13
1.4 $\text{NHCl}_2 + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{HOCl} + \text{NH}_2\text{Cl}$	$k_{1.4} = 2.3 \times 10^{-3} \text{ h}^{-1}$	13
1.5 $\text{NH}_2\text{Cl} + \text{NH}_2\text{Cl} \rightarrow \text{NHCl}_2 \text{ NH}_3$	$k_{1.5} = \text{pH dependent}$	11
1.6 $\text{NHCl}_2 \text{ NH}_3 \rightarrow \text{NH}_2\text{Cl} + \text{NH}_2\text{Cl}$	$k_{1.6} = 2.16 \times 10^8 \text{ M}^{-2} \text{ h}^{-1}$	14
1.7 $\text{NH}_2\text{Cl} + \text{NHCl}_2 \rightarrow \text{N}_2 + 3\text{H}^+ + 3\text{Cl}^-$	$k_{1.7} = 55.0 \text{ M}^{-1} \text{ h}^{-1}$	15
1.8 $\text{NHCl}_2 + \text{H}_2\text{O} \rightarrow {}^b\text{I} + 2\text{HCl}$	$k_{1.8} = 4.0 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ h}^{-1}$	16
1.9 ${}^b\text{I} + \text{NHCl}_2 \rightarrow \text{HOCl} + \text{N}_2 + \text{HCl}$	$k_{1.9} = 1.0 \times 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ h}^{-1}$	15
1.10 ${}^b\text{I} + \text{NH}_2\text{Cl} \rightarrow \text{N}_2 + \text{H}_2\text{O} + \text{HCl}$	$k_{1.10} = 3.0 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ h}^{-1}$	15
1.11 $\text{NH}_2\text{Cl} + \text{DOCr}_1 \rightarrow {}^a\text{Products}$	$k_{\text{doc1}} = \text{fit parameter}$	This work
1.12 $\text{NH}_2\text{Cl} + \text{DOCr}_2 \rightarrow {}^a\text{Products}$	$k_{\text{doc2}} = \text{fit parameter}$	This work
1.13 $\text{HOCl} \leftrightarrow \text{H}^+ + \text{OCl}^-$	$\text{p}K_a = 7.5$	17
1.14 $\text{NH}_4^+ \leftrightarrow \text{H}^+ + \text{NH}_3$	$\text{p}K_a = 9.3$	17
1.15 $\text{H}_2\text{CO}_3 \leftrightarrow \text{H}^+ + \text{HCO}_3^-$	$\text{p}K_a = 6.3$	17
1.16 $\text{HCO}_3^- \leftrightarrow \text{H}^+ + \text{CO}_3^{2-}$	$\text{p}K_a = 10.3$	17

^a $k_s = k_1[\text{H}^+] + k_{\text{H}_2\text{CO}_3}[\text{H}_2\text{CO}_3] + k_{\text{HCO}_3^-}[\text{HCO}_3^-]$. ^bI represents the unidentified monochloramine autodecomposition intermediate. ^aProducts include ammonia, chloride, and non-reactive NOM sites.

Vikesland *et al.* (2001) rappellent que les réactions d'hydrolyse (réactions 1.2 et 1.3) et d'interconversion par catalyse acide (réaction 1.5) de la monochloramine, importantes dans la formation de dichloramine, sont dépendantes du pH, de la force ionique, de la température et de l'alcalinité. De plus, des études antérieures ont montré que les sulfates, les phosphates et les carbonates (Valentine et Jafvert, 1988) ainsi que l'acide acétique (Granstrom, 1954) pouvaient accélérer la décomposition de la monochloramine via cette catalyse acide.

Woolschlager *et al.* (2001) ont mené des travaux sur les mécanismes de décomposition des chloramines dans les canalisations d'eau potable. Il résume la réaction d'auto-décomposition des chloramines :



o Réaction avec la matière organique

Duirk *et al.* (2005) ont mis en évidence l'existence des deux voies réactionnelles de la monochloramine avec la matière organique naturelle (NOM) : une décomposition initiale et rapide de la monochloramine résultant d'une réaction directe de la monochloramine avec la NOM, suivie d'une réaction lente et longue consommant la majorité de monochloramine résultant probablement d'une réaction de la NOM avec l'acide hypochloreux produit par l'hydrolyse de la monochloramine. Ainsi dans cette seconde étape, la monochloramine apparaît agir comme un réservoir de chlore en faible concentration. Leur approfondissement

des voies réactionnelles de décomposition de la monochloramine en présence de NOM a abouti au schéma présenté sur la Figure 14.

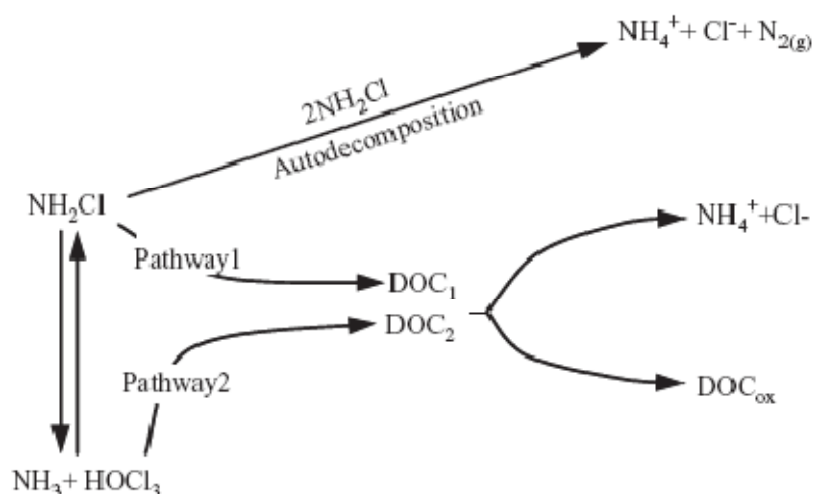


Figure 14 : Schéma réactionnel simplifié de la monochloramine avec la NOM (DOC_{ox} représente la NOM oxydés - DOC_1 et DOC_2 représentent les concentrations en sites réactifs de la NOM respectivement avec la monochloramine et le chlore libre) (Duirk *et al.*, 2005).

5.1.2. Efficacité de la désinfection

5.1.2.1. Action désinfectante de la monochloramine à l'échelle de la cellule microbienne

Le mécanisme par lequel la monochloramine inactive les microorganismes n'est pas complètement élucidé. Une des raisons évoquée pour expliquer cette incertitude est la multiplicité des sites cellulaires capables de réagir avec le désinfectant oxydant (Harrington *et al.*, 2003). Toutefois quelques mécanismes d'action ont déjà été proposés.

Ingols (1958), a proposé que la monochloramine réagisse avec les enzymes membranaires des cellules. Lu Shih et Lederberg (1976) ont mis en évidence *in vivo* sur *B. subtilis* et *in vitro* sur l'ADN nu extrait de la bactérie, des cassures de l'ADN pouvant être simple ou double brins selon la concentration de monochloramine appliquée. Cette idée est confirmée par LeChevallier *et al.* (1988) qui suggèrent que la monochloramine réagit plutôt spécifiquement avec les acides nucléiques, le tryptophane, et le soufre des acides aminés. Par ailleurs, Jacangelo *et al.* (1991) ont montré que l'application de la monochloramine sur *E. coli* n'a pas gravement endommagé l'enveloppe cellulaire ou affecté le fonctionnement des acides

nucléiques. En revanche, il est apparu que certaines protéines associées au métabolisme (respiration, transport) étaient inhibées.

Plus récemment, Mogoia *et al.* (2011) ont montré que la monochloramine a un mode d'action différent des autres oxydants chlorés (chlore et dioxyde de chlore). L'effet induit, dépend de la dose de monochloramine et contrairement aux autres oxydants chlorés, ce biocide n'entraîne pas de changement de la taille des cellules et pas de perméabilisation de la membrane cellulaire.

Les essais d'inactivation des souches de *N. fowleri* par la monochloramine, réalisées à EDF R&D, permettent de déterminer le produit de la concentration en monochloramine et du temps de contact (Ct) nécessaire pour abattre 99% des amibes. Ces essais ont été réalisés sur des kystes de *N. fowleri* à 23°C, pH 8. Les Ct obtenus étaient compris entre 9 et 27 mg min/L. Dans son étude, Leprince (2000) a évalué l'efficacité d'un traitement à la monochloramine sur deux souches de *N. fowleri* isolées sur un CRF, sous les formes kystes et trophozoïtes. Les résultats montrent à pH 8 et pH 9 (tampon HYDRION), 25 et 30°C, un ratio entre les Ct kystes et les Ct trophozoïtes variable de 1 à 9.

Si à l'heure actuelle, il est reconnu que le maintien d'un résiduel de monochloramine suffisamment élevé dans les réseaux d'eaux est efficace vis-à-vis de l'élimination des microorganismes (notamment les pathogènes), il faut toutefois considérer les phénomènes de résistance/tolérance des microorganismes.

5.1.2.2. Notions de résistance aux désinfectants

La notion de résistance d'un microorganisme à l'activité désinfectante, peut être définie comme étant l'aptitude temporaire ou permanente d'un microorganisme à se multiplier sous des conditions qui détruiraient d'autres microorganismes. La notion de tolérance est différente, elle est utilisée pour décrire l'inhibition d'un microorganisme par un désinfectant.

Au cours de ces dernières années, il a été montré à plusieurs reprises que les désinfectants conventionnels, utilisés avec succès pour lutter contre le développement des bactéries planctoniques se sont avérés moins efficaces à l'encontre des bactéries fixées au sein des biofilms (LeChevallier *et al.*, 1988; Cochran *et al.*, 2000; Stewart *et al.*, 2001; Tachikawa *et al.*, 2005; Berry *et al.*, 2010).

Il a été prouvé que les bactéries sont capables de répondre et de s'adapter aux stress chimiques générés par les désinfectants (Maillard, 2007). Jusqu'à présent, la notion de résistance à l'action des désinfectants a été essentiellement décrite pour les bactéries. Etant donné que certains mécanismes de résistance des bactéries ne sont pas liés à l'organisme mais à son environnement, nous pouvons supposer qu'il devrait en être de même pour les amibes libres des habitats tels que les biofilms, les sédiments, les sols.

Pour les amibes libres, très peu de données rapportent un quelconque phénomène de résistance des amibes libres en biofilm. Dans leur étude, Loret *et al.* (2005), après avoir appliqué pendant 3 mois sur un pilote de réseau d'eau domestique (35°C, pH 7,6) un traitement à la monochloramine de 0,5 mg/L, concluent sur l'inefficacité du traitement à inhiber la population amibienne de l'eau et du biofilm.

Plusieurs phénomènes ont été considérés pour expliquer l'effet « protecteur » du biofilm.

- **Un phénomène de barrière « physique »** engendré par la présence de la matrice exopolymérique. En effet, la présence des polymères extracellulaires permet la limitation de la diffusion des désinfectants et l'établissement d'un gradient de concentration (Maillard, 2007). De Beer *et al.* (1994) évoque une pénétration limitée du chlore libre dans le biofilm en raison de sa grande réactivité avec les composés organiques et inorganiques des couches supérieures du biofilm. En revanche, dans leurs études Tachikawa *et al.* (2005) et Lee *et al.* (2011), démontrent que la monochloramine a la spécificité de réagir très faiblement avec la matrice exopolymérique des biofilms. Les auteurs s'accordent à dire que la monochloramine est un biocide possédant un bon pouvoir pénétrant des matrices complexes et une forte stabilité.
- **L'importance de la structure du biofilm** dans le phénomène de résistance aux désinfectants. Behnke *et al.* (2011), rapportent que l'efficacité de la désinfection dépend de la distribution de la taille des amas cellulaires des biofilms (clusters). Auparavant Huang *et al.* (1995) ont montré lors d'une expérience de désinfection à la monochloramine que la disposition des bactéries en micro-colonies permettait de ralentir la progression du désinfectant et de conserver l'activité respiratoire des bactéries placées au centre des clusters.

Pour la majorité des désinfectants, la résistance due au biofilm conduit à l'utilisation d'un dosage supérieur de désinfectant.

En plus des phénomènes de protection liés au biofilm, s'ajoutent les mécanismes de résistance liés aux propriétés intrinsèques des micro-organismes (Russell, 1995; Maillard, 2007). La résistance intrinsèque peut être liée à une réduction de la pénétration du désinfectant, ou, moins fréquemment, être liée à une activité enzymatique de dégradation du composé désinfectant. L'activité désinfectante varie entre les différents types de microorganismes. Pour les bactéries, les résistances intrinsèques sont plus fréquemment retrouvées chez les Gram-, les mycobactéries et les spores compte tenu de la nature de leur membrane.

Au sein des amibes libres, cette différence de sensibilité existe également et prend deux dimensions, l'état physiologique dans lequel se trouvent les amibes libres et les différences inter-genres voir inter-espèces.

- **L'état physiologique** est un facteur qui modifie la sensibilité au désinfectant. Dans leur étude, Khunkitti *et al.* (1996) ont montré que les kystes matures étaient plus résistants que les prékystes⁵ eux-mêmes plus résistants que les trophozoïtes. Moon *et al.* (2008) ont montré que l'acquisition de cette résistance était due à la mise en place de la paroi, à la modulation des gènes et à la synthèse spécifiques de protéines d'enkystement. Par ailleurs, Critchley et Bentham, (2009) ont mis en évidence sur trois genres/espèces amibiens différents *Acanthamoebae* sp., *H. vermiformis* et *Vahlkampfia* sp. l'importance de l'état physiologique dans le processus de désinfection. Ainsi, selon le désinfectant considéré, des concentrations en désinfectant supérieures d'un facteur 1,3 à 5 doivent être appliquées pour inhiber les kystes amibiens en comparaison avec les trophozoïtes.
- **Les différences inter-genres** : Plusieurs études ont démontré que le genre *Naegleria* serait plus sensible que le genre *Acanthamoeba* à l'action de certains désinfectants chlorés comme le chlore et le dioxyde de chlore (Cursons *et al.*, 1980; Storey *et al.*, 2004).

⁵ Prékyste : C'est la forme intermédiaire à la forme trophozoïte et au kyste mûr, elle se caractérise par le ralentissement des mouvements de l'amibe sous sa forme trophozoïte, son arrondissement et l'épaississement de sa paroi.

6. Bilan

Les habitats hébergeant *N. fowleri* sont multiples. Ainsi, cette amibe fréquente des matrices solides poreuses (sols, sédiments), des matrices semi-solides (boues, biofilms) et des matrices liquides (eaux de toutes sortes). Par ailleurs, même si l'air est un milieu hostile pour les amibes libres, il semble que les kystes de *N. fowleri* peuvent être transportés par voie aérienne. A ce jour, en comparaison avec les matrices eau et/ou sédiments, le biofilm est une matrice relativement peu décrite en tant qu'habitat du pathogène *N. fowleri*. De plus, son rôle écologique dans le cycle de vie de *N. fowleri*, notamment sur les aspects survie, prolifération et dissémination est méconnu. Toutefois, au regard des récentes études réalisées et relatées ci-dessus, il apparaît que **le biofilm se positionne comme une niche écologique privilégiée** des amibes libres et donc de *N. fowleri*. En effet, à ce jour, il est désormais établi que **le biofilm constitue le foyer de multiplication et de dissémination** de *N. fowleri* sur les circuits de refroidissement semi-fermés des centrales nucléaires en bord de rivière.

Parmi les facteurs influençant l'occurrence de *N. fowleri*, plusieurs sont à retenir mais **la température** s'avère être le plus décrit. Une synthèse des études à ce sujet, montre qu'en première approximation, dans l'environnement, une température minimale de 25°C dans les milieux liquides et de 15°C dans les milieux poreux est nécessaire à la présence de *N. fowleri*. Toutefois, l'effet de la température est sujet à controverse. Ainsi, selon certains auteurs, l'intervention unique de la température sur l'occurrence de *N. fowleri* n'est pas montrée (De Jonckheere et Voorde, 1977). En revanche, l'effet de la température serait plutôt indirect, il bouleverserait l'équilibre établi ce qui favoriserait le pathogène *N. fowleri*. Malgré l'importance indéniable de la température, l'analyse bibliographique montre que d'autres facteurs doivent être pris en compte. Il s'agit notamment de certains facteurs biotiques comme la **densité bactérienne** (ressource nutritionnelle indispensable), ou encore la présence de **compétiteurs amibiens**. Par ailleurs, un retour d'expérience industrielle démontre l'importance dans les proliférations de *N. fowleri* de la **nature du matériau support des biofilms** et notamment de la nature du matériau du condenseur des CRFs de certaines centrales électriques.

Pour lutter contre les développements de *N. fowleri*, depuis plus d'une dizaine d'année, certains circuits de refroidissement des CNPE en France nécessitent un **traitement biocide à la monochloramine**. Ce traitement présente une bonne efficacité désinfectante en maintenant un résiduel usuel de $0,25 \pm 0,05$ mg/L Cl_2 /L en sortie de condenseur, qui permet de respecter le seuil réglementaire sanitaire de 100 *N. fowleri*/L en rivière. Toutefois, peu de données sont disponibles sur l'efficacité d'un tel traitement sur les biofilms contaminés par *N. fowleri*.

Le couplage de la problématique avec l'ensemble de ces éléments obtenus via la littérature et le retour d'expérience industrielle, nous amène dans notre travail de thèse à nous questionner sur :

- **L'importance des facteurs température et charge bactérienne sur la dynamique de croissance de *N. fowleri* dans les biofilms**
- **L'importance de la nature du support du développement des biofilms sur la dynamique de croissance de *N. fowleri* dans les biofilms**
- **L'impact d'un traitement à la monochloramine sur *N. fowleri* dans les biofilms**

Chacune de ces questions a fait l'objet de travaux expérimentaux qui sont explicités dans les chapitres 2, 3, 4, 5.

CHAPITRE 2 : DESCRIPTION DES EXPERIMENTATIONS

1. Protocole expérimental

L'objectif majeur de notre travail est d'étudier l'écologie de *N. fowleri* au sein de biofilms complexes formés à partir d'une eau de rivière. Certains facteurs d'intérêts ont été ciblés à savoir : la température, la nature du matériau support des biofilms et enfin, l'application d'un traitement biocide à la monochloramine.

Dans ce cadre, la méthodologie employée porte sur l'utilisation, en conditions contrôlées de pilotes de type réacteur à biofilm pour former et suivre des biofilms complexes d'eau de rivière intégrant une population de *N. fowleri* artificiellement implantée.

Le dénombrement de *N. fowleri* dans les matrices eau et biofilm est assuré par la recherche du nombre le plus probable de microorganismes (NPP). Ce dénombrement se base sur l'approche statistique de la loi du maximum de vraisemblance où des dilutions connues de la suspension amibiennes sont cultivées sur une gélose non nutritive (NNA), recouverte d'un tapis bactérien d'*E. coli*. Les matrices eau et biofilm sont suivies par des paramètres physico-chimiques et microbiologiques.

L'utilisation en parallèle de deux pilotes, c'est-à-dire alimentés par la même eau, permet l'étude simultanée de deux conditions ou d'avoir un pilote « témoin ». Les essais ont été reproduits à minima deux fois pour vérifier la reproductibilité et la robustesse des observations.

1.1.Synthèse des essais expérimentaux

Le Tableau 3 ci-dessous fait un récapitulatif des différents essais et des conditions expérimentales associées.

Tableau 3 : Synthèse des différents essais menés et des conditions associées.

Nomenclature de l'essai	Objectifs	Date de prélèvement de l'eau de Loire (amont CNPE de Dampierre-en-Burly)	Date de début de l'essai	Date de fin de l'essai	Nature matériaux et température associée
EP1	Mise en place et validation du système expérimental	04-mai-09	18-mai-09	24-juillet-09	Réacteur 1 : VERRE (32°C)
EP2		08-juillet-09	10-août-09	27-août-09	Réacteur 1 : VERRE (32°C)
ET1*	Tester l'influence de la température (22, 32 et 42°C) sur dynamique de <i>N. fowleri</i> dans les biofilms.	20-novembre-09	02-décembre-09	15-février-10	Réacteur 1 : VERRE (42°C)
ET2		30-mars-10	26-avril-10	27-juillet-10	Réacteur 2 : VERRE (32°C)
					Réacteur 1 : VERRE (42°C)
ET3		06-décembre-11	19-décembre-11	31-janvier-12	Réacteur 2 : VERRE (32°C)
	Réacteur 1 : VERRE (22°C)				
EM1	Tester l'influence de la nature du matériau (PVC,	7-février-11	21-février-11	5-avril-11	Réacteur 1 : VERRE/PVC (42°C)

	inox 316L, laiton et titane) sur la dynamique de <i>N. fowleri</i> dans les biofilms.				Réacteur 2 : VERRE/INOX 316L (42°C)
	Le verre constitue le				Réacteur 1 : VERRE/PVC (42°C)
EM2	témoin.	19-avril-11	26-avril-11	9-juin-11	Réacteur 2 : VERRE/INOX 316L (42°C)
					Réacteur 1 : VERRE/INOX 316L (42°C)
EM3		15-juin-11	30-juin-11	12-aout-11	Réacteur 2 : VERRE (42°C)
					Réacteur 1 : VERRE/LAITON (42°C)
EM4		26-septembre-11	24-octobre-11	05-décembre-11	Réacteur 2 : VERRE/TITANE (42°C)
					Réacteur 1 : VERRE/LAITON (42°C)
EM5		07-mars-12	23-avril-12	06-juin-12	Réacteur 2 : VERRE/TITANE (42°C)

*EP3 est la même campagne qu'ET1

Par ailleurs, des essais d'inactivation à la monochloramine (essais $Ct_{99\%}$) ont été menés *ex vitro* (hors des réacteurs) sur les échantillons de biofilm prélevés dans les réacteurs.

2. Matériel biologique

2.1. Souche de *N. fowleri*

La souche de *N. fowleri* étudiée appartient au souchier EDF sous le nom AMI005. Cette souche a été isolée le 27/03/2007 à partir d'un prélèvement d'eau dans le circuit de refroidissement du CNPE de Dampierre-en-Burly. Son identification a été réalisée selon 3 étapes successives:

- o Identification morphologique au microscope
- o Réalisation d'un test de flagellation
- o Confirmation par un test immunoenzymatique (cf. § 4.6.2)

2.2. Culture, entretien et conservation de la souche de *N. fowleri*

La culture de la souche de *N. fowleri* est réalisée par culture monoxénique sur un milieu gélosé NNA à 1,5%, recouverte d'une fine couche d'*E. coli*, support nutritif de l'amibe (Indicia Biotechnology, Oullins, France). La souche est incubée entre 2 et 5 jours à 43°C.

L'entretien de la souche est effectué par de multiples repiquages à intervalles de temps réguliers, entre 2 et 3 mois, selon la viabilité de la souche (aspect morphologique de la souche). Le repiquage consiste à découper un cube de gélose et à le déposer face contaminée sur un nouveau milieu. De nouveau l'incubation est réalisée entre 2 et 5 jours à 43°C.

Suite à cette procédure d'entretien, la souche est conservée à l'obscurité à 20-25°C dans la boîte de culture (fermée hermétiquement à l'aide de parafilm).

3. Dispositif expérimental

3.1. Choix du dispositif expérimental

Un réacteur à biofilm est défini ici comme un système au sein duquel un biofilm se développe sous des conditions contrôlées et où ce développement peut être quantifié. Les

réacteurs peuvent être naturels (lacs, rivières, marais) ou artificiels (lits bactériens, biofiltres des stations d'épurations). Il est possible à l'échelle du laboratoire de reproduire et simuler un biofilm naturel, cependant il n'existe pas de réacteur à biofilm de laboratoire universel reproduisant en tout point un biofilm naturel et satisfaisant toutes les conditions de recherches envisagées sur les biofilms. Ainsi, la sélection d'un réacteur à biofilm de laboratoire, requiert de choisir le type de biofilm développé, le type de mesure possible, ... Dès lors, il faut prendre en considération pour l'interprétation des résultats les limites du système choisi, qui ne reprend que partiellement les diverses fonctions et interactions d'un biofilm naturel.

Les réacteurs de laboratoire sont construits pour satisfaire deux principales exigences à savoir: faciliter le développement de biofilm et faciliter les mesures caractérisant ce biofilm. Ces deux exigences sont bien évidemment modulées par les critères de l'étude expérimentale. Il existe de très nombreux types de réacteurs de laboratoire: les réacteurs plats, les réacteurs annulaires, les réacteurs tubulaires, ou encore les *packed-bed* réacteurs. Un réacteur à biofilm, ne peut pas être considéré seul, il doit être vu en tant que système pour prendre en compte différentes variables et un mode de fonctionnement.

Les variables sont des facteurs qui affectent le développement du biofilm. Elles sont distinguées selon deux types à savoir : les variables contrôlées (fixées) et celles mesurées. Les variables contrôlées régissent le développement du biofilm et sont choisies au préalable. Les variables mesurées sont déterminées en fonction des objectifs de l'étude expérimentale.

Comme énoncé ci-dessus, chaque réacteur à biofilm a ses limites. Le mode de fonctionnement choisi peut modifier ces limites. Les réacteurs de laboratoire opèrent typiquement selon deux principales configurations décrites ci-dessous.

- o Sans boucle de recirculation : ce type de fonctionnement impose de faible vitesse et débits. Les principaux avantages sont la simplicité de fonctionnement et la réduction des sources de contamination. Néanmoins, il y a certains désavantages comme la génération de gradients de concentrations en nutriments le long du réacteur. Ainsi, ce type de fonctionnement n'offre pas des conditions expérimentales homogènes du réacteur. Les applications associées sont du type biomédical pour déterminer l'efficacité de certains antimicrobiens.

- o Avec boucle de recirculation : ce type de fonctionnement est le plus utilisé. Il offre l'avantage de contrôler la vitesse de la phase circulante et ainsi de contrôler le flux de nutriments de manière à éviter les gradients le long du réacteur. Un autre avantage réside dans le fait qu'un taux de recyclage élevé permet par augmentation du contact entre la phase liquide et l'air de délivrer une quantité suffisante en oxygène.

Après avoir recensé les systèmes d'études *in vitro* de biofilm, et mis en adéquation ces systèmes avec les besoins de notre étude, notre choix s'est porté sur l'utilisation d'un réacteur plat qui présente comme avantages:

- o De faciliter l'accès de l'expérimentateur aux surfaces de colonisation en vue des échantillonnages ;
- o D'être compatible avec une durée d'essai minimale de 2 mois ;
- o De posséder une boucle de recirculation ;
- o De présenter une surface importante de colonisation.

3.2.Présentation du dispositif expérimental retenu

La schématisation (Figure 15 et Annexe 1) du système expérimental dans son intégralité permet de montrer les différents éléments constitutifs à savoir :

- o Un bassin d'appoint connecté au circuit d'alimentation en eau de rivière préalablement ré oxygénée.
- o Un bassin de purge identique, connecté au circuit de purge et au circuit de mesure.
- o Une partie centrale plane, lieu d'accueil des coupons (78 coupons au maximum).
- o Le circuit d'alimentation en oxygène comprend une pompe ; une vanne de régulation ; un filtre de 25 mm de diamètre et de 0,2 μ m de porosité (Whatman) et un diffuseur fines bulles.
- o Le circuit d'alimentation en eau et nutriments qui comprend un bidon de 20 litres, un agitateur magnétique et son barreau aimanté, une pompe (Watson-Marlow 101U/R), un tuyau en silicone de diamètre interne/externe (1,6/3,2 mm) et de longueur (0,7 m) pour un volume (1,4 mL).
- o Le circuit de recirculation comprend une pompe (Ismatec ecoline VC280), un tuyau en silicone de diamètre interne/externe (9/13 mm) et de longueur (1,5 m) pour un volume (95 mL).

- o La purge du circuit est assurée par un trop plein.
- o Le circuit de mesure comprend un boîtier multi paramètres (EUTECH instruments PCD 6500) et ses sondes (pH, température, conductivité et oxygène dissout) positionnées dans le bassin de purge, afin de ne pas perturber l'écoulement en amont du développement du biofilm.

L'ensemble du dispositif expérimental est placé dans un laboratoire de type P3 du fait des exigences réglementaires liées au caractère pathogène du microorganisme *N. fowleri* classé en groupe de risque 3.

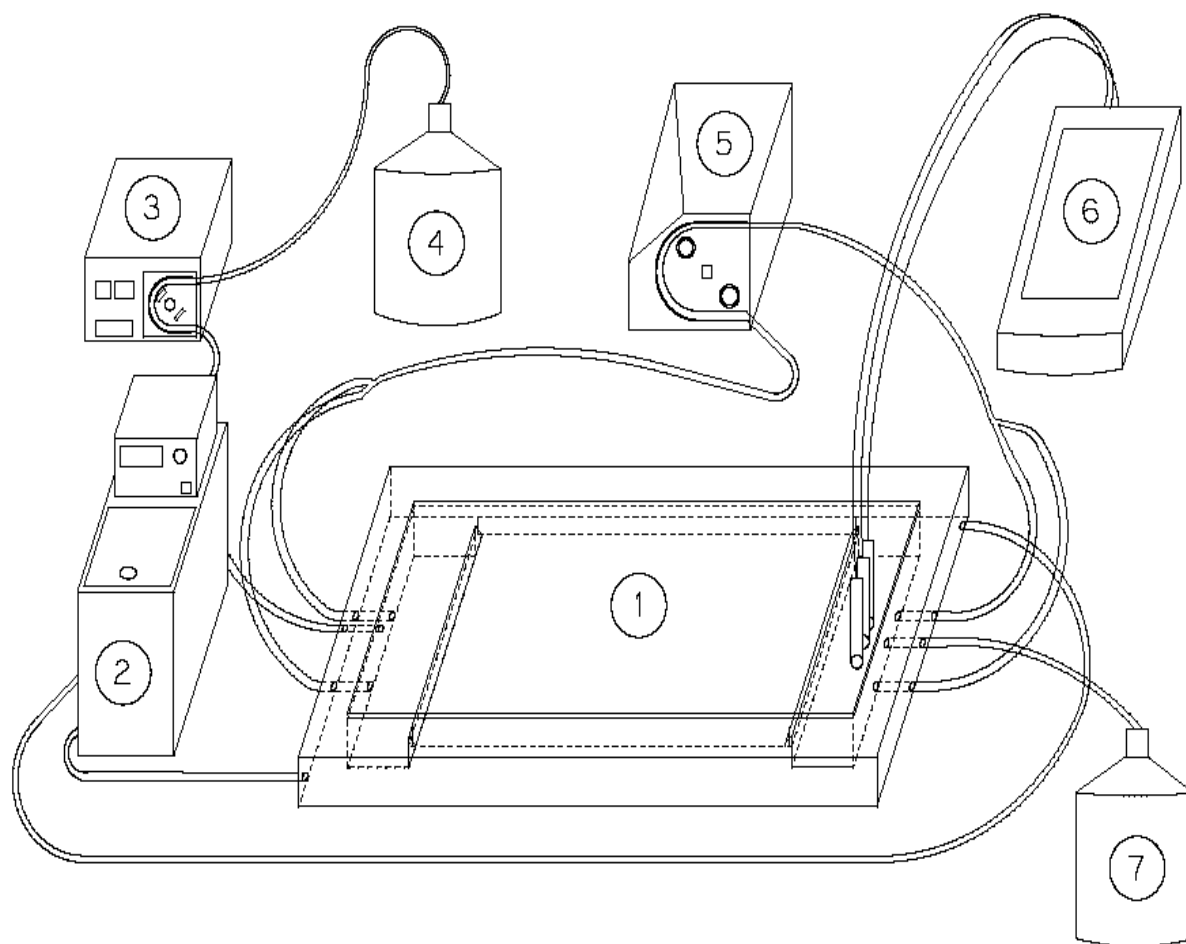


Figure 15 : Schéma du système expérimental avec (1) réacteur en polychlorure de vinyle (2) bain thermostaté (3) pompe d'alimentation en eau (4) bac d'alimentation en eau (5) pompe de recirculation (6) boîtier multiparamètres et sondes (pH, conductivité, température, oxygène dissous) (7) bac de purge.

3.3. Conditions expérimentales

3.3.1. L'hydrodynamique

Le Tableau 4 ci-dessous fait une synthèse des conditions hydrodynamiques appliquées pour l'étude. Les formules de calculs utilisées sont données en Annexe 2.

Tableau 4 : Synthèse des conditions hydrodynamiques.

	Intitulé	Symbole	Unité	Valeur
Variables dimensionnantes	Vitesse de circulation	U_{moy}	m s^{-1}	1×10^{-2}
	Hauteur d'eau	He	m	5×10^{-3}
		Tr	s	86400
	Volume total théorique	Vt	m^3	$2,73 \times 10^{-3}$
	Périmètre mouillé	Pm	m	$2,8 \times 10^{-1}$
Variables de fonctionnement	Surface perpendiculaire à l'écoulement	Sp	m^2	$1,35 \times 10^{-3}$
	Débit total	Qt	$\text{m}^3 \text{s}^{-1}$	$1,35 \times 10^{-5}$
	Débit d'alimentation	Qa	$\text{m}^3 \text{s}^{-1}$	$1,58 \times 10^{-8}$
	Débit de recirculation	Qr	$\text{m}^3 \text{s}^{-1}$	$1,35 \times 10^{-5}$
	Taux de recyclage	Rr	-	854
	Temps de séjour	Ts	s	202
	Rayon hydraulique	Rh	m	$4,82 \times 10^{-3}$
	Diamètre hydraulique	Dh	m	$1,93 \times 10^{-2}$
Grandeurs caractéristiques	Nombre de Reynolds	Re	-	241
	Contrainte de cisaillement	tw	N m^{-2}	$1,32 \times 10^{-2}$
	Taux de cisaillement	g	s^{-1}	16,6
	Longueur Hydrodynamique	Ld	m	$2,8 \times 10^{-1}$

3.3.2. La température

La température de consigne pouvait être modifiée entre 22 et 42°C en fonction des essais (Tableau 3)

3.3.3. Supports de colonisation

Le matériau support du développement des biofilms pouvait également varier en fonction des essais (Tableau 3). Les matériaux utilisés étaient : verre (verre dépolie) ; polychlorure de vinyle (Troidur EN) ; acier inoxydable 316L ; laiton (CuZn36Pb3 brut) et du titane (grade 2 brut). En revanche, indépendamment de leur nature, les coupons présentaient une géométrie identique soit des dimensions de 80 mm × 25 mm × 1 mm (L × l × h).

3.3.4. Eaux d'alimentation

3.3.4.1. Prélèvement

L'eau d'alimentation du réacteur est de l'eau de Loire prélevée en amont du CNPE de Dampierre-en-Burly (100 mètres avant le pont amont/rejet). Pour suffire à la réalisation d'un essai, 400 litres ont été prélevés, répartis dans des bidons de 20 litres et stockés à 4°C. A chaque nouvel essai, le prélèvement d'eau a été renouvelé.

3.3.4.2. Caractéristiques biologiques et physico-chimiques

Le Tableau 5 ci-dessous fait la synthèse de la qualité de l'eau d'alimentation utilisée pour chacun des essais.

Tableau 5 : Synthèse de la qualité des eaux d'alimentation.

Paramètres	EP1	EP2	ET1	ET2	ET3	EM1	EM2	EM3	EM4	EM5
pH	8,36	8,45	8,28	8,35	7,98	8,47	8,25	8,12	8,32	8,45
Oxygène dissous (mg/L)	7,85	8,38	8,58	7,65	7,94	7,89	8,35	7,69	7,58	8,47
Conductivité ($\mu\text{S}/\text{cm}$)	248	505	253	234	279	305	326	298	341	353
Carbone organique total (mg/L)	3,7	3,2	4,4	3,5	3,4	2,9	3,3	3,2	2,8	3,0
Matières en suspension (mg/L)	12	11	19	15	8	11	6	7	10	11
Amibes thermophiles (NPP/L)	<105 (Idd)	<105	<105	<105	<105	<105	<105	<105	<105	<105
Bactéries (cellules/L)	$3,6 \times 10^8$	$4,5 \times 10^8$	$4,6 \times 10^8$	$3,8 \times 10^8$	$3,3 \times 10^8$	$1,9 \times 10^8$	$2,9 \times 10^8$	$4,2 \times 10^8$	$1,8 \times 10^8$	$2,8 \times 10^8$

3.4.Démarrage du dispositif

3.4.1. Procédure de nettoyage du réacteur et des coupons

Avant sa mise en service, l'ensemble des éléments du système expérimental (réacteur, connecteurs, tuyaux, etc.) est nettoyé et désinfecté, afin d'éliminer au maximum les traces de contamination (biologiques et/ou chimiques). La procédure est la suivante :

- o Autoclavage des éléments thermorésistants (tuyaux, connecteurs,...)
- o Assemblage des éléments du système expérimental
- o Mise en circulation d'une solution d'acide chlorhydrique (1M) (Merck) pendant 4 heures.
- o 4 volumes (1 volume étant équivalent au volume de fonctionnement du réacteur) de rinçage à l'eau déminéralisée stérile.
- o Vérification du pH
- o Mise en circulation d'une solution de chlore (Merck) à 100 mg Cl_2/L durant 4 heures.
- o 4 volumes de rinçage à l'eau déminéralisée stérile.
- o Vérification du résiduel de chlore dans l'eau de rinçage par une méthode rapide de dosage (méthode HACH au chlore libre).

Remarque : cette procédure est également utilisée comme procédure de nettoyage post-expérimentale, elle est toutefois complétée en amont par une désinfection à l'aide d'un nettoyant biologique (surfanios), couplée à un brossage mécanique.

3.4.2. Mise en eau

Les 78 coupons sont introduits à l'aide d'une pince stérile dans la partie plate du réacteur à 0,28 m du point d'entrée de manière à respecter la longueur hydrodynamique permettant d'assurer l'homogénéité de l'eau dans le réacteur. Le réacteur est alors rincé puis rempli avec 2,7 litres (volume du réacteur + volume des tuyaux) litres d'eau de Loire. Les différents circuits sont lancés (recirculation, alimentation en eau, purge et mesure). Ceci constitue le temps initial t_0 .

3.5. Inoculation de la souche de *N. fowleri*

La procédure de préparation de l'inoculum repose sur une procédure interne au laboratoire EDF R&D DRD/P77/Inoculum 06b. Elle consiste à prélever sur une boîte un carré de gélose d'une souche de *N. fowleri* (kystes), et de la placer (face contaminée au contact de la gélose) sur un nouveau milieu non nutritif gélosé à 1,5% (Indicia Biotechnology) recouvert d'une fine pellicule d'*Escherichia coli*. Cette boîte est incubée de 3 à 5 jours à 43°C. La préparation de l'inoculum est réalisée en tampon PBS 1× stérile. Elle consiste à gratter et à suspendre le nouveau front (trophozoïtes) avec une anse stérile.

L'inoculation est réalisée sous la forme d'un «spike» d'un volume concentré en trophozoïtes de *N. fowleri* directement dans le réacteur. Le volume à introduire est déterminé par simple calcul après avoir déterminé la concentration de l'inoculum par un comptage à la cellule de Thoma. La concentration finale dans l'eau du réacteur est fixée à 10^5 amibes/L.

4. Suivi analytique

4.1. Synthèse de la procédure d'analyse

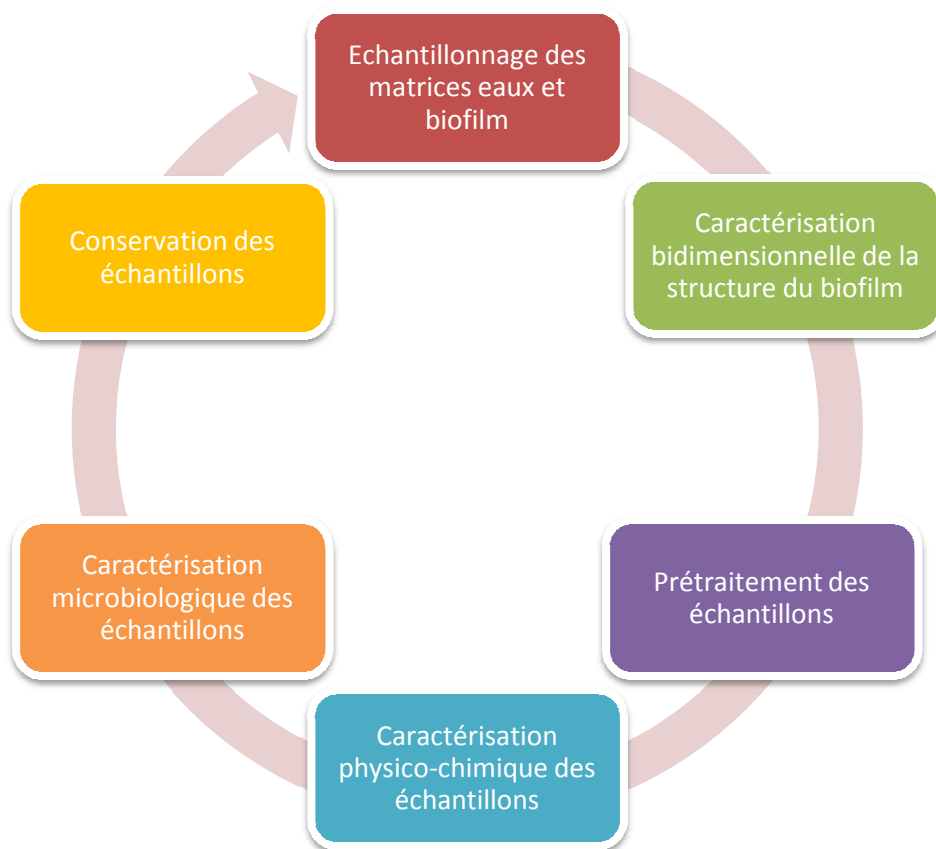


Figure 16 : Synthèse de la procédure analytique.

4.2. Procédure d'échantillonnage

4.2.1. Biofilm

L'échantillonnage consiste à prélever avec une pince préalablement stérilisée par passage à la flamme aléatoirement 3 coupons dans le réacteur. La fréquence d'échantillonnage moyenne est comprise entre 1 et 7 jours, toutefois un suivi rapproché est réalisé durant les phases « importantes » (formation du biofilm, implantation de *N. fowleri*). Les coupons sont ensuite rincés, dans une boîte de pétri stérile de 90 mm de diamètre (VWR), contenant 10 mL de tampon phosphate (PBS) 1× stérile (NaCl : 8g ; KCl : 0,2g ; Na₂HPO₄ : 1,44 g ; KH₂PO₄ ; 2,4 g ; 1 L d'eau déminéralisée stérile), de manière à éliminer ce qui n'est pas du biofilm, mais un simple dépôt.

4.2.2. Eaux

L'échantillonnage consiste à prélever 30 mL de l'eau du réacteur au niveau du bassin de purge du réacteur et 30 mL de l'eau d'alimentation au niveau du tuyau d'amenée (juste en amont du point d'entrée dans le réacteur).

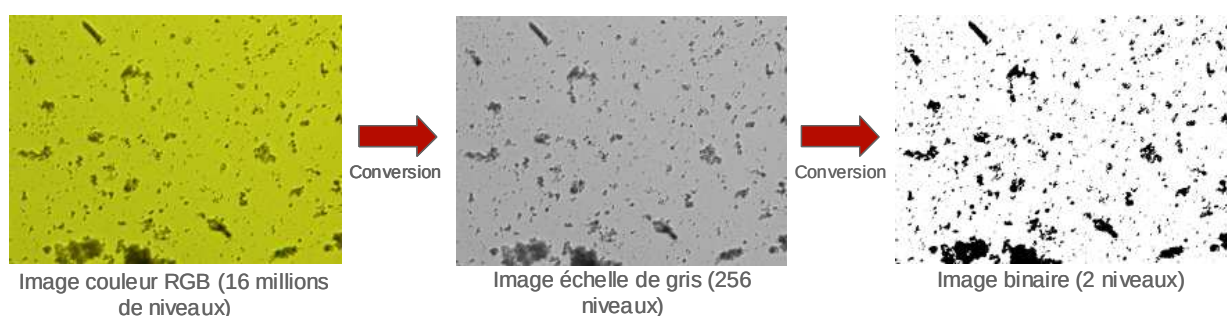
4.3. Caractérisation bidimensionnelle de la structure du biofilm

4.3.1. Prise d'images

Les coupons sont disposés dans les couvercles des boîtes de pétri contenant 2 mL de PBS 1× stérile. Ils sont alors observés à l'aide d'un microscope (Olympus AX60) en lumière transmise aux grossissements $\times 100$. 10 champs microscopiques par coupon sont choisis aléatoirement et capturés au moyen d'une caméra (Olympus DP20) et d'un logiciel d'acquisition d'images (Olympus cell A).

4.3.2. Traitement des images

Les images sont ensuite traitées par un programme, développé par Lewandowski et Beyenal (2007) qui permet dans un premier temps de transformer une image couleur (16 millions de niveaux) en une image échelle de gris (256 niveaux) et dans un second temps en une image binaire (2 niveaux).



4.3.2.1. Caractérisation des paramètres de texture

A partir des images échelle de gris, le programme (Annexe 3) rend possible le calcul (sous la forme de valeurs) de paramètres de texture. Ils permettent de quantifier la structure 2D du biofilm en comparant la taille, la position et l'orientation des éléments visuels (matérialisés par les pixels). Les paramètres sont :

- o *Homogeneity* (H) : C'est une mesure de la répétition spatiale des pixels.
- o *Energy* (E): C'est une mesure de la répétition directionnelle des pixels.
- o *Textural entropy* (TE) : C'est une mesure de la variation de ton d'une image.

4.3.2.2. Caractérisation des paramètres d'aire

A partir des images binaires, le programme rend possible le calcul (sous la forme de valeurs) de paramètres d'aire. Ils permettent de quantifier la morphologie 2D du biofilm (en particulier des micro-colonies) sur des critères de taille, forme et orientation des pixels. Les paramètres sont :

- o *Areal Colonization* (AC) : elle est exprimée en pourcentage et correspond à une estimation du taux de recouvrement de la surface (lame de verre). Elle se base sur le calcul du rapport entre les pixels noirs (colonisés) et les pixels blancs (vierges).
- o *Average Vertical and Horizontal Run Length* (AVRL et AHRL) : c'est le nombre moyen de pixels colonisés horizontal et vertical représentant une micro-colonie.
- o *Average and Maximum Diffusion Distance* (ADD et MDD) : C'est la distance minimale et maximale moyenne d'un pixel colonisé à un pixel non colonisé.
- o *Perimeter* (P) : il est exprimé en nombre de pixels et correspond à la somme des pixels noirs (colonisés) en contact avec l'espace interstitiel (pixels blancs).

4.4. Prétraitement des échantillons

La caractérisation microbiologique et physico-chimique des échantillons de biofilms nécessite leur remise en suspension. Pour cela, après observations microscopiques, les coupons sont transférés dans un pilulier stérile de 180 mL (VWR) contenant 150 mL de PBS 1× stérile. Sous poste de sécurité microbiologique (PSM), les coupons subissent un grattage mécanique à l'aide d'un écouvillon stérile (VWR) suivi d'une agitation 30 secondes au vortex (Heidolph) et enfin d'un passage durant 10 minutes dans un bain à ultrasons (Fischer Scientific ; puissance 140W ; fréquence 50/60 Hz). Ce temps de passage aux ultra-sons a fait l'objet au préalable d'une étude visant à déterminer le temps optimal de traitement pour la récupération des amibes tout en respectant au mieux leur intégrité (Figure 17).

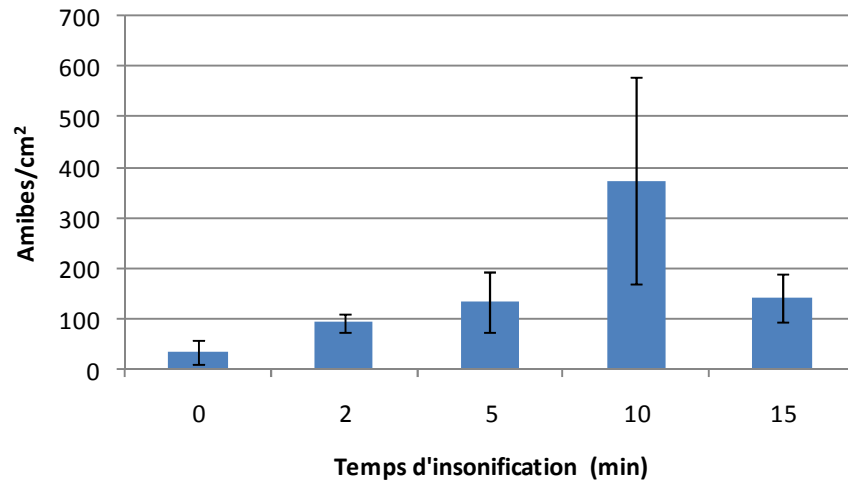


Figure 17: Optimisation du temps d'insonification pour la récupération des amibes du biofilm.

4.5.Caractérisation physico-chimique

4.5.1. Biofilm

La caractérisation physico-chimique des échantillons de biofilm (Tableau 6) a été réalisée par un laboratoire privé (société EPI).

Tableau 6 : Synthèse des méthodes analytiques physico-chimiques appliquées au biofilm.

Paramètre	Méthode analytique	Réplicat	Précision
Matière sèche	Pesée de culot de centrifugation après séchage à 105°C	1	0,5 mg/mL
Matière volatile	Pesée de culot de centrifugation après séchage à 525°C	1	0,5 mg/mL
Carbone organique total (extracellulaire)	Oxydation UV-persulfate	2	1 µg/mg MS
Glucides (extracellulaire)	Spectrophotométrie-méthode au phénol	2	5 µg/mg MS
Protéines (extracellulaire)	Spectrophotométrie-méthode à l'acide bicinchoninique	3	5 µg/mg MS
Fer total	Spectrophotométrie-méthode à l'orthophénantroline après minéralisation préalable avec H ₂ O ₂ et UV	3	0,1 µg/mg MS
Cuivre total	Voltampérométrie de redissolution anodique avec ajouts dosés et après minéralisation		0,1 µg/mg MS

4.5.2. Eaux

Un suivi physico-chimique des paramètres pH, température, conductivité et oxygène dissous est réalisé au moyen d'un boîtier multiparamètres (EUTECH instruments PCD 6500) et ses sondes pH, température, conductivité et oxygène dissous positionnées dans le bassin de purge, afin de ne pas perturber l'écoulement en amont du développement du biofilm.

4.6.Caractérisation microbiologique

4.6.1. Nombre total des bactéries

Le nombre total de bactéries est basé sur un marquage spécifique de l'ADN. La molécule utilisée est le SYBR Green I qui est un colorant fluorescent appartenant au groupe des cyanines. Les couples de spectres d'absorption (lumière incidente) et d'émission (fluorescence restituée) sont 488/525 nm. Les échantillons préalablement formolés à 11%

subissent une première étape de traitement par ultrasons durant 30 minutes (puissance 140W ; fréquence 50/60 Hz), afin de resuspendre les bactéries adhérentes et de désagréger les amas bactériens (biofilm). Ensuite, un volume défini < 1mL d'échantillon est prélevé et complété à 1 mL avec du PBS préalablement filtré (membrane 0,22 µm, VWR), 50 µl d'une solution de SYBR Green I diluée au 1/10000^{ème} sont alors ajoutés. Après un bref passage au vortex (30 secondes), l'échantillon est laissé 10 à 15 minutes à température ambiante et à l'obscurité (15 minutes étant préférables pour diminuer le *fading*⁶). L'échantillon marqué est alors filtré sur une membrane en polycarbonate noir de diamètre 22 mm et de porosité 0,2 µm (CHEMUNEX) et la membrane est rincée avec 5 mL de PBS 1X préalablement filtré sur une membrane 0,2 µm. La membrane une fois bien sèche est alors observée au grossissement ×1000 à l'aide d'un microscope à épifluorescence (Olympus AX61, UR-FLT). Les bactéries (ADN) qui fluorescent en vert sont alors dénombrées sur 10 à 30 champs. Les résultats sont exprimés en bactéries cm⁻².

4.6.2. Amibes libres et *N. fowleri*

Sur la base des connaissances, méthodes et outils actuels, cette mesure est réalisée sur les biofilms resuspendus et les eaux de purge et d'alimentation du réacteur. Ces mesures reposent sur deux procédures internes EDF R&D DRD/P77/Nfi99d et EDF R&D DRD/P77/NfiBIOFILM06a.

L'analyse comprend plusieurs étapes :

- o Mise en culture : Elle repose sur un ensemencement direct de 1 mL de chacune des dilutions d₀ à d₃ sur un milieu non nutritif gélosé à 1,5% (Indicia Biotechnology) recouvert d'un tapis d'*E. coli*. Puis, à l'aide d'un râteau stérile, le liquide est étalé sur l'ensemble de la boîte. Les boîtes ensemencées au jour J sont placées à l'étuve à 43°C. A J+1, on élimine l'eau de condensation se trouvant dans le couvercle des boîtes et les boîtes sont retournées si le milieu est sec, sinon l'opération est renouvelée à J+2.
- o Lecture : Une lecture des boîtes est réalisée de J+2 à J+5 pour les ALT et jusqu'à J+10 pour les ALNT. La lecture des boîtes consiste à observer les boîtes à l'œil nu dans un premier temps et au microscope inversé (grossissement ×40) pour repérer les fronts

⁶ Décoloration due à la diminution de la fluorescence

de croissance amibiens. Pour chacun d'eux, les trophozoïtes et les kystes sont observés (grossissement $\times 200$) pour repérer leur aspect morphologique caractéristique. Si cet aspect correspond à des amibes du genre *Naegleria* (kystes ronds à double enveloppe), la forme végétative de ce front est repérée et entourée à l'aide d'un feutre sur le fond de la boîte de Pétri. Ces boîtes sont mises de côté pour le test de flagellation.

- o Le test de flagellation : Sous PSM, prélever le morceau de gélose préalablement repéré à l'aide d'une anse métallique stérilisée par passage à la flamme. Mettre le morceau de gélose dans un tube à hémolyse contenant 0,5 mL d'EDS. Agiter le tube au vortex (10 secondes). Porter alors à incubation dans une étuve à 37°C pendant 2 heures, lire les tests de flagellation (grossissement $\times 40$). Si les formes trophozoïtes tournent sur elles-mêmes (hélicoptère) ou présentent une trajectoire en torpille dans différentes directions, le test est positif : il y a présence de *Naegleria*. Dans le cas contraire, le test est négatif.

Remarque : Si un test est négatif au bout de deux heures d'incubation, il a été effectué une relecture du test après 4 heures à 37°C.

Le test ELISA (identification de l'amibe *N. fowleri*) : Le test ELISA sera utilisé à partir des tests de flagellation positifs. Le principe du test repose sur l'utilisation de microplaques de 96 puits. Les puits de microtitration ont été sensibilisés par un anticorps monoclonal spécifique du déterminant antigénique codé Mp2C15 de l'amibe *N. fowleri* (pas de réactions croisées avec les autres espèces de *Naegleria*). Cet anticorps monoclonal assure la capture des antigènes amibiens. Un même anticorps marqué à la biotine se fixe ensuite sur les antigènes amibiens capturés lors de la première étape. Un complexe streptavidine/peroxydase assure la révélation de l'immunocapture.

Le calcul du NPP permet d'estimer la concentration de microorganismes viables présents dans une unité de volume d'un milieu. Ce calcul se base sur la probabilité de présence d'un ou plusieurs micro-organismes dans différents prélèvements effectués en multiple et selon une suite géométrique. Selon le nombre de prélèvements positifs pour la culture du microorganisme, une table statistique (Tableau 7) permet de déduire le nombre de microorganismes viables initialement présents par unité de volume.

Tableau 7: Table NPP utilisé 10×2 mL - 10×0,1 mL - 10×0,01 mL - 10×0,001 mL (en jaune est matérialisé la saturation de la table NPP).

répétitions				réponses positives				facteur de dilution en litres				Resultats en germes /litre			
N				P				M							
1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	L	Lecartype(L)	Lin95	Lsup95
5	5	5	5	1	0	0	0	0,002	0,0001	0,00001	10 ⁻⁶	105	105	15	744
5	5	5	5	2	0	0	0	0,002	0,0001	0,00001	10 ⁻⁶	238	169	59	956
5	5	5	5	3	0	0	0	0,002	0,0001	0,00001	10 ⁻⁶	420	246	133	1326
5	5	5	5	4	0	0	0	0,002	0,0001	0,00001	10 ⁻⁶	709	374	252	1994
5	5	5	5	5	0	0	0	0,002	0,0001	0,00001	10 ⁻⁶	1473	827	490	4427
5	5	5	5	5	1	0	0	0,002	0,0001	0,00001	10 ⁻⁶	2390	1628	629	9084
5	5	5	5	5	2	0	0	0,002	0,0001	0,00001	10 ⁻⁶	4481	3115	1147	17506
5	5	5	5	5	3	0	0	0,002	0,0001	0,00001	10 ⁻⁶	7777	4502	2500	24189
5	5	5	5	5	4	0	0	0,002	0,0001	0,00001	10 ⁻⁶	12755	6531	4675	34799
5	5	5	5	5	5	0	0	0,002	0,0001	0,00001	10 ⁻⁶	23107	11438	8757	60969
5	5	5	5	5	5	1	0	0,002	0,0001	0,00001	10 ⁻⁶	32894	17228	11784	91820
5	5	5	5	5	5	2	0	0,002	0,0001	0,00001	10 ⁻⁶	49295	28308	15995	151925
5	5	5	5	5	5	3	0	0,002	0,0001	0,00001	10 ⁻⁶	79202	45047	25978	241479
5	5	5	5	5	5	4	0	0,002	0,0001	0,00001	10 ⁻⁶	129893	66852	47368	356191
5	5	5	5	5	5	5	0	0,002	0,0001	0,00001	10 ⁻⁶	239273	120577	89113	642465
5	5	5	5	5	5	5	1	0,002	0,0001	0,00001	10 ⁻⁶	346949	188571	119569	1006727
5	5	5	5	5	5	5	2	0,002	0,0001	0,00001	10 ⁻⁶	354891	490	338	2611

4.7. Conservation et conditionnement des échantillons

Les échantillons de biofilm sont inactivés par ajout de formaldéhyde à 37% (Merck) pour une concentration finale de 11% (v/v) et stockés à 4°C.

5. Désinfection à la monochloramine

L'objectif de ces essais est d'évaluer l'efficacité de la monochloramine à l'encontre de *N. fowleri* selon le modèle défini par Watson and Chick (Chick, 1908; Watson, 1908), à travers la détermination du produit : concentration en monochloramine × temps de contact permettant d'obtenir l'inactivation de 99% de la population amibienne (Ct_{99%}). Les Ct_{99%} ont été mesurés pour les différentes formes de *N. fowleri* à savoir :

- o Trophozoïtes de *N. fowleri* sous leur forme planctonique (libre en solution)
- o Kystes de *N. fowleri* sous leur forme planctonique
- o Trophozoïtes et/ou kystes sous leur forme biofilm (associés au biofilm)

5.1. Description, préparation et dosage de la monochloramine

La préparation et le dosage de la solution de monochloramine sont réalisés selon la procédure technique interne au laboratoire EDF R&D DRD/P77/NH₂ClO6a. Brièvement, la monochloramine, a été préparée en mélangeant de l'eau bi-distillée contenant une solution

d'hypochlorite de sodium (NaOCl) avec une solution d'ammoniaque (NH₃). Le rapport de masse Cl₂/N était de 4,8 pour un pH de 8,3. La concentration finale visée de la solution mère de monochloramine était de 1000 mg/L. Une fois prête, cette solution est laissée à équilibrer à 4°C pendant 3 heures avant son utilisation. La solution de monochloramine a été préparée quotidiennement et utilisée immédiatement. La mesure de la concentration en monochloramine est décrite dans la norme AFNOR NF 90-038 (1994). Cette mesure repose sur une méthode colorimétrique qui consiste à doser le chlore total par spectrophotométrie après réaction avec la N-N diéthyl-p-phénylènediamine (DPD) (HACH, Lange) qui oxyde les halogènes en une mériquinone stable. Les concentrations en monochloramine sont exprimées en équivalent chlore soit en mg Cl₂/L.

5.2.Procédure d'inactivation

5.2.1. Inactivation de *N. fowleri* sous sa forme planctonique

Les essais ont été menés en *triplicata*. Quelques millilitres d'une suspension pure de trophozoïtes ou kystes de *N. fowleri* (§ 3.4) sont transférés dans un bécher contenant 150 mL d'eau de Loire autoclavée (pH 8,2) de manière à obtenir une concentration finale théorique de 10⁵ amibes/L. L'eau est autoclavée de manière à éliminer les amibes naturellement présentes. Les béchers sont mis sous agitation à 25°C. La monochloramine est alors ajoutée de manière à obtenir une concentration finale théorique de 1 mg Cl₂/L. La concentration en *N. fowleri* est alors suivie dans le temps par la méthode NPP après 0, 5, 10, 20, 30 et 60 min pour les kystes et 0, 2, 5, 8, 10, 15, 20, 30 et 60 min pour les trophozoïtes. Le traitement à la monochloramine est stoppé par addition de thiosulfate de sodium 0,1 M en excès. Des mesures de la concentration en monochloramine sont réalisées en début et en fin d'expérience. De plus, un contrôle sans monochloramine est réalisé par mesure de la concentration en *N. fowleri* en début et en fin d'expérience.

5.2.1. Inactivation de *N. fowleri* sous sa forme associée au biofilm

Au total 5 essais ont été conduits ; 3 essais ont été réalisés en fixant la concentration de la monochloramine à 1 mg Cl₂/L et en faisant varier le temps de contact de 0 à 60 min ; les deux essais restant ont été réalisés en fixant le temps de contact à 60 min et en faisant varier la concentration de monochloramine de 0 à 0,5 mg Cl₂/L.

Pour chacun des essais, 14 coupons (lame de verre) colonisés par des biofilms âgés de 8 à 10 jours, ont été échantillonnés, rincés avec du tampon phosphate stérile (PBS) et transférés dans 700 mL d'eau de Loire autoclavée (pH 8,2). Les béchers sont mis sous agitation à 25°C. La monochloramine est alors ajoutée de manière à obtenir une concentration finale théorique recherchée et variable selon les essais de 0 à 1 mg Cl₂/L. La concentration en *N. fowleri* est alors suivie dans le temps par recherche du NPP. Comme décrit ci-dessus, le traitement à la monochloramine est stoppé par addition de thiosulfate de sodium 0,1 M en excès. Des mesures de la concentration en monochloramine sont réalisées en début et en fin d'expérience. De plus, un contrôle sans monochloramine est réalisé par mesure de la concentration en *N. fowleri* en début et en fin d'expérience.

5.3. Notion et calcul du Ct

Dans le but d'évaluer l'efficacité de la monochloramine sur *N. fowleri*, l'inactivation amibienne (perte de cultivabilité) est enregistrée en fonction du Ct (concentration du désinfectant × temps de contact), qui correspond au final à une exposition exprimée en mg min/L. Le Ct_{99%} est défini comme l'exposition nécessaire pour inactiver 2 unités logarithmiques de la concentration en amibes.

Le calcul du Ct est basé sur le modèle de Chick-Watson (Chick, 1908; Watson, 1908) défini par l'équation 1 qui suit :

$$\ln \frac{N}{N_0} = -kC^n t \quad (1)$$

Où N est la concentration en amibes après exposition au désinfectant (amibes/L ou amibes/cm²), N₀ est la concentration en amibes avant exposition (amibes/L ou amibes/cm²), k est la vitesse de désinfection en L/mg min, C est la concentration en désinfectant (mg Cl₂/L), t est le temps (min) et n est le facteur de dilution.

CHAPITRE 3 : INFLUENCE DE LA TEMPERATURE ET DE LA CHARGE BACTERIENNE SUR LA DYNAMIQUE DE *Naegleria fowleri* EN BIOFILM

En préalable à l'étude de l'influence des facteurs température et charge bactérienne sur la dynamique de *N. fowleri* dans les biofilms, un travail expérimental a visé à définir les conditions permettant une implantation acceptable de l'amibe dans le biofilm du réacteur. Ces résultats, n'ayant pas été intégrés dans l'article relatif à l'aspect température et densité bactérienne, ils sont donnés ici dans la première partie de ce chapitre 3. En seconde partie, l'article publié dans la revue Water Research est livré dans son intégralité.

(i) Mise en place d'un protocole pour l'implantation de *Naegleria fowleri* dans des biofilms d'eau de rivière

Sur la base d'essais expérimentaux, une justification est donnée quant au protocole retenu pour planter et maintenir pendant plusieurs semaines dans un biofilm complexe d'eau de rivière comme principale ressource nutritive, une population de *N. fowleri* artificiellement introduite.

Après avoir testé différents scénarios d'implantation, les résultats montrent que l'inoculation d'une concentration importante de *N. fowleri* dans la phase eau circulante du réacteur, initiée 24 heures après le lancement de la formation des biofilms d'eau de rivière, est favorable au transfert, à l'installation et au maintien de l'amibe dans les biofilms.

Ces travaux ont fait l'objet de communications orales à plusieurs congrès nationaux : Colloque biofilms & santé organisé par ECOMICTH et le Réseau National Biofilm à Poitiers, les 11 et 12 janvier 2010 ; VIII^{ème} Congrès National de la Société Française de Microbiologie à Marseille, les 2, 3 et 4 juin 2010 ; Colloque organisé par l'Association Scientifique Européenne pour l'Eau et la Santé à Paris, les 25 et 26 novembre 2010.

Une fois ce modèle d'implantation mis en place et validé, nous avons poursuivi sur l'étude des facteurs d'influence : température et charge bactérienne, objet de la seconde sous-partie.

(ii) Dynamique de croissance de *Naegleria fowleri* dans un biofilm d'eau douce.

La synthèse des études dans le domaine, montre qu'en première approximation, dans l'environnement, une température minimale de 25°C dans les milieux liquides et de 15°C dans les milieux poreux est nécessaire à la présence de *N. fowleri*. Par ailleurs, de nombreuses études environnementales montrent qu'une augmentation de la température de 30 à 40°C est positivement associée à l'augmentation de la fréquence d'isolement de *N.*

fowleri dans les eaux et les sédiments (Sykora *et al.*, 1983; Huizinga et McLaughlin, 1990; Behets *et al.*, 2007). Les études menées en interne à EDF confirment l'influence de la température sur le genre *Naegleria* et l'espèce *N. fowleri*. Ainsi, en 1988, il a été mis en évidence que la présence d'une surface chaude favorisait la multiplication des *Naegleria* spp dans une masse d'eau à son contact et que cette colonisation de la surface était proportionnelle à la température de travail jusqu'à 40° C (Oger, 1988). En 2000, une étude *in situ*, sur 5 CNPE en fonctionnement a permis de mettre en évidence une température seuil d'environ 31°C de l'eau en sortie condenseur, commune à l'ensemble des CNPE étudiés pour la présence des *Naegleria* spp et de *N. fowleri* (Tousset et Vazelle, 2000).

Dans cette seconde partie, nous avons suivi la croissance de *N. fowleri* dans les biofilms développés à deux températures, respectivement 32 et 42°C, toutes deux choisies au regard de la littérature et de la problématique industrielle comme, respectivement, les températures « seuil » et « optimale » de développement de l'amibe. Les résultats obtenus dans l'étude qui suit, démontre d'une part l'influence marquée de la température comme paramètre sélectif des espèces amibiennes et d'autre part l'influence majeure du paramètre charge bactérienne (ressource nutritive) comme moteur de la prolifération (en terme de vitesse de développement) de *N. fowleri* au sein des biofilms.

Cette partie a fait l'objet de la publication d'un article scientifique accepté le 15 mai 2012 par la revue *Water Research* et de deux communications internationales affichées (4th Congress of the Federation of European Microbiological Societies, Genève, Suisse, les 26-30 juin 2011 ; XIVth Free Living Amoebae Meeting organisé par University of West India à Montego Bay en Jamaïque, les 10-15 octobre 2011).

1. Mise en place d'un protocole pour l'implantation de *Naegleria fowleri* dans des biofilms d'eau de rivière

La mise en œuvre du système d'étude expérimental composé de réacteurs à biofilms de laboratoire et des méthodologies de suivi des biofilms exposés et justifiés dans le chapitre 2, nous a permis de valider notre dispositif expérimental pour la formation et la caractérisation d'un biofilm complexe d'eau de rivière (Goudot et Herbelin, 2008). La capacité des bactéries issues de l'eau de rivière à créer un biofilm à l'interface entre le support et l'eau a été exploitée pour servir de ressources nutritives aux amibes libres et permettre leur installation. Ainsi, comme énoncé ci-dessus, l'objectif premier est de définir et fixer un protocole pour implanter de manière durable *N. fowleri* dans un biofilm d'eau de rivière.

Au regard de la faible quantité de *N. fowleri* (inférieure à la limite de détection de 105 *N. fowleri*/L) dans l'eau de rivière (Tableau 8), il était difficile d'envisager une implantation des amibes naturellement présentes dans l'eau. Nous avons donc choisi de réaliser une injection unique sous la forme d'un inoculum ou « spike » concentré de *N. fowleri* dans l'eau du réacteur. Ce choix expérimental présente certains avantages notamment celui de disposer d'une souche unique, connue et caractérisée de *N. fowleri* et bien sûr de maîtriser les conditions d'inoculation (temps d'injection et quantité injectée). Une fois cette injection réalisée, nous avons suivi le transfert de l'amibe de la phase eau vers le biofilm.

Pour rappel, le biofilm a été développé dans un réacteur à biofilm de type réacteur plat, caractérisé par un volume total de 2,7 litres, fonctionnant en circuit semi-fermé et alimenté en continu par de l'eau de rivière. L'écoulement appliqué est de type laminaire et caractérisé par un débit de circulation de 810 mL min⁻¹, une vitesse moyenne d'écoulement de 1 cm s⁻¹ et un taux de cisaillement de 17 s⁻¹. Le temps de séjour moyen est de 24 h. Pour cette étude, la température est maintenue à 32°C. Le choix de cette température est justifié par le fait que : (i) elle est proche de la température seuil d'isolement et/ou de développement de l'amibe dans les CRFs et dans l'environnement (ii) c'est une température moyenne se situant dans l'intervalle de température retrouvée en CRF (20 à 45°C).

Au total, 3 essais expérimentaux ont été menés dans un ordre chronologique (EP1 à EP3). A chacun des essais était associé un scénario différent d'implantation (Tableau 8). Les

différences portaient sur deux paramètres à savoir la quantité de *N. fowleri* apportée par l'inoculum et le moment d'injection dans le réacteur.

Tableau 8 : Synthèse des conditions opératoires pour l'inoculation de *N. fowleri* dans l'eau.

Essai	Concentration en <i>N. fowleri</i> dans l'eau d'alimentation (<i>N. fowleri</i> /L)	Concentration finale en <i>N. fowleri</i> dans l'eau du réacteur après inoculation (<i>N. fowleri</i> /L)	Temps de fonctionnement du réacteur avant inoculation (jour)	Concentration en amibes libres autochtones du biofilm le jour de l'inoculation (amibes/cm ²)
EP1	< 105 (Idd)	23107	17	233
EP2	< 105 (Idd)	23107	2	233
EP3	< 105 (Idd)	239273	1	11

Idd : limite de détection

O **Essai 1** : Initialement, la stratégie consistait à injecter *N. fowleri* à une concentration communément retrouvée pour les amibes libres totales dans les eaux de rivière soit environ 2×10^4 amibes/L dans l'eau du réacteur. Le moment d'inoculation a été choisi à 17 jours de manière à introduire *N. fowleri* dans un biofilm déjà colonisé et en pseudo-stabilité pour les flores bactérienne et amibienne autochtones. Les résultats (Figure 18A) montrent que *N. fowleri* est présente dans les biofilms 48 heures après son inoculation dans l'eau. Entre le 19^{ème} et le 30^{ème} jour, la densité mesurée varie entre la limite de détection (0,26 *N. fowleri*/cm²) et un maximum de 6 *N. fowleri*/cm². Ces résultats n'ont pas été satisfaisants et l'hypothèse avancée s'appuie sur le fait qu'au moment de l'injection de *N. fowleri* et de son transfert vers le biofilm, celle-ci était peu compétitive vis-à-vis de la population amibienne autochtone déjà bien implantée dans le biofilm à hauteur de 233 amibes/cm² (Tableau 8).

O **Essai 2** : A partir des résultats obtenus précédemment, nous avons choisi de modifier pour ce second essai le moment d'inoculation de *N. fowleri* dans l'eau, celui-ci étant avancé à 2 jours. L'idée était de favoriser la compétitivité de *N. fowleri* en l'introduisant dans un biofilm « jeune » et ne présentant pas ou très peu d'amibes autochtones. Les résultats (Figure 18B) montrent clairement l'échec de cette stratégie puisque qu'après l'inoculation de *N. fowleri* dans l'eau, aucun transfert vers le biofilm n'a eu lieu. Les concentrations

enregistrées restent inférieures à la limite de détection de $0,26 \text{ N. fowleri}/\text{cm}^2$. Au regard de la concentration en amibes libres autochtones du biofilm au jour d'inoculation soit $233 \text{ amibes}/\text{cm}^2$ (Tableau 8). Le moment d'implantation ne semble pas être propice pour favoriser la compétitivité de *N. fowleri*.

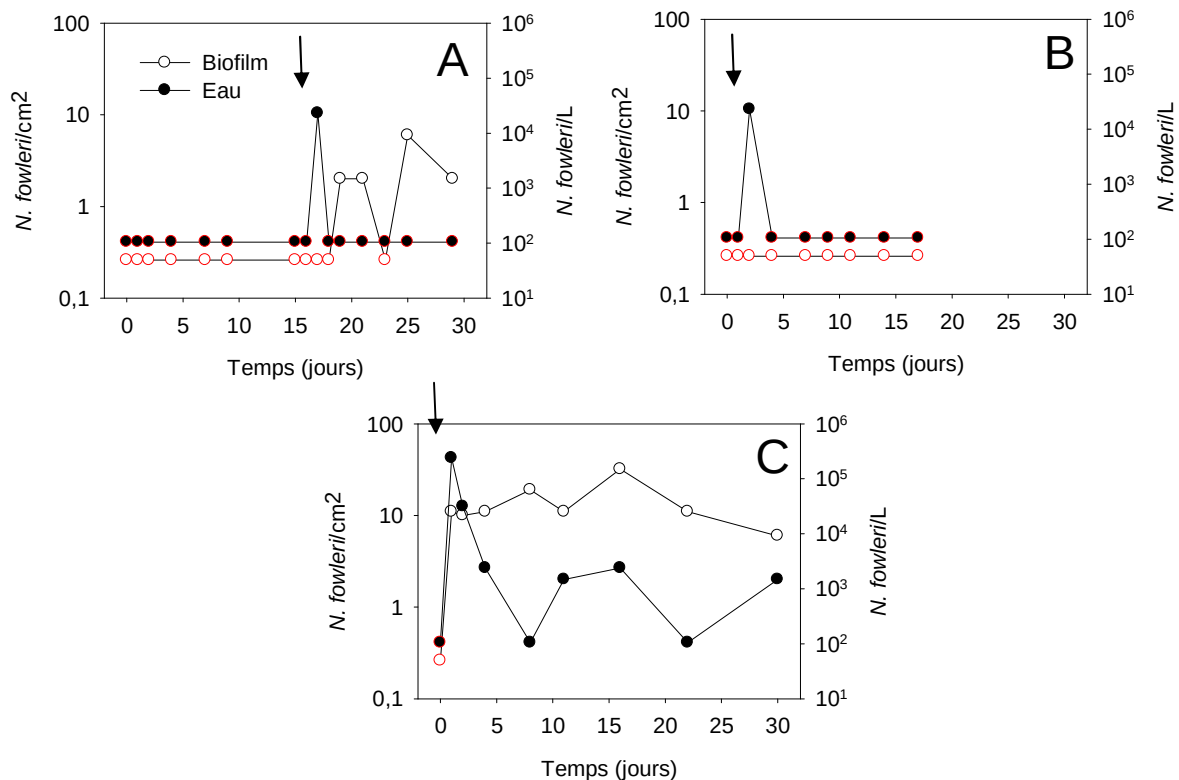


Figure 18 : Evolution des concentrations en *N. fowleri* dans l'eau et le biofilm en fonction du temps. (A) essai 1 ; (B) essai 2 ; (C) essai 3. La flèche symbolise le moment d'inoculation. Les symboles entourés de rouge signifient que la concentration en amibes est inférieure à la limite de détection.

Essai 3 : Dans cet essai, nous avons inoculé *N. fowleri* dans l'eau du réacteur 24 heures après sa mise en route. D'autre part nous avons choisi d'augmenter la concentration de *N. fowleri* injectée à $2 \times 10^5 \text{ N. fowleri}/\text{L}$ dans l'eau du réacteur. Les résultats obtenus (Figure 18C) montrent un transfert de *N. fowleri* de la phase eau vers le biofilm 24 heures après l'injection. Les densités surfaciques mesurées sur les 30 jours d'essai sont stables et comprises entre un minimum de 6 et un maximum de $32 \text{ N. fowleri}/\text{cm}^2$. Enfin, durant cet essai, nous avons pu mesurer dans l'eau, pour la première fois, des concentrations en *N.*

fowleri post inoculation comprises entre la limite de détection de 105 *N. fowleri*/L et 2390 *N. fowleri*/L.

En définitive, c'est sur la base de ce modèle d'implantation que l'ensemble de nos expériences ont été entreprises, à commencer par l'étude des facteurs température et charge bactérienne sur la dynamique de *N. fowleri* dans les biofilms.

2. Growth dynamic of *Naegleria fowleri* in a microbial freshwater biofilm

Sébastien Goudot^{a,b}, Pascaline Herbelin^{a*}, Laurence Mathieu^{b, c}, Sylvie Soreau^a, Sandrine Banas^b, Frédéric Jorand^{b*}

^a EDF Research and Development, Laboratoire National d'Hydraulique et Environnement, 6 Quai Watier, F-78401 Chatou Cedex, France.

^b Université de Lorraine – LCPME - UMR 7564 CNRS – UL, Institut Jean Barriol, 405 rue de Vandoeuvre F-54600 Villers-lès-Nancy, France.

^c Ecole Pratique des Hautes Etudes (EPHE), Paris, France.

*Author contact information. Phone: +33(0) 1 30 87 75 35 / +33(0) 3 83 68 52 48;

E-mail address: pascaline.herbelin@edf.fr; frederic.jorand@univ-lorraine.fr

Water Research, 2012, 46: 3958

Abstract

The presence of pathogenic free-living amoebae (FLA) such as *Naegleria fowleri* in freshwater environments is a potential public health risk. Although its occurrence in various water sources has been well reported, its presence and associated factors in biofilm remain unknown. In this study, the density of *N. fowleri* in biofilms spontaneously growing on glass slides fed by raw freshwater were followed at 32°C and 42°C for 45 days. The biofilms were collected with their substrata and characterized for their structure, numbered for their bacterial density, thermophilic free-living amoebae, and pathogenic *N. fowleri*. The cell density of *N. fowleri* within the biofilms was significantly affected both by the temperature and the nutrient level (bacteria/amoeba ratio). At 32°C, the density remained constantly low (1 to 10 *N. fowleri*/cm²) indicating that the amoebae were in a survival state, whereas at 42°C the density reached 30 to 900 *N. fowleri*/cm² indicating an active growth phase. The nutrient level, as well, strongly affected the apparent specific growth rate (μ) of *N. fowleri* in the range of 0.03 to 0.23 h⁻¹. At 42°C a hyperbolic relationship was found between μ and the bacteria/amoeba ratio. A ratio of 10⁶ to 10⁷ bacteria/amoeba was needed to approach the apparent $\mu_{\max}$ value (0.23 h⁻¹). Data analysis also showed that a threshold for the nutrient level of close to 10⁴ bacteria/amoeba is needed to detect the growth of *N. fowleri* in freshwater biofilm. This study emphasizes the important role of the temperature and bacteria as prey to promote not only the growth of *N. fowleri*, but also its survival.

Keywords - *N. fowleri*, free living amoeba, reactor, temperature, freshwater biofilms.

1. Introduction

Free-living amoebae (FLA) are highly diverse and ubiquitous organisms that have been isolated from various natural environments (rivers, lakes, springs) and man-made water systems (drinking water networks, poorly chlorinated swimming pools) (Sibille *et al.*, 1998; Thomas *et al.*, 2008; Jamerson *et al.*, 2009). *Naegleria fowleri* is a free-living thermotolerant amoeboflagellate of health interest, because it is the causative agent of a primary amoebic meningoencephalitis (PAM) (Marciano-Cabral, 1988), a fatal central nervous system disease. This infection is rare but the acute illness severe (Pond, 2005). To date, less than 300 cases of PAM have been reported worldwide from 1965 to 2008 and attributed to *N. fowleri* (Caruzo et Cardozo, 2008), 15 new cases were known in India, Pakistan and Guadeloupe (France) (Angrup *et al.*, 2010; De Jonckheere, 2011; Shakoor *et al.*, 2011).

Studies postulate that both natural and man-made factors such as temperature rises disturb the environment and contribute to the spread of *N. fowleri*. Thus, this amoeba was shown to be the most frequently encountered thermotolerant amoebae in the thermally enriched cooling water of a Belgian power plant (Behets *et al.*, 2007). In addition, the survey of a newly created cooling lake in southern California showed that during periods of higher temperatures, the concentration of *N. fowleri* increased by as much as 2 orders of magnitude (Tyndall *et al.*, 1989). In a similar way, the survey of the cooling water in Lake Anna (Virginia, US) showed that of 16 sites sampled during the summer of 2007, nine were found to be positive for *N. fowleri* (Jamerson *et al.*, 2009).

Due to their surface-associated lifestyle, FLA graze effectively on attached preys (Parry, 2004). The soil was assumed to be the ideal habitat for FLA and that the rainfall runoff introduced amoebae into water (Kyle et Noblet, 1985). However, from recent studies, the biofilm from various environments has been considered to be the major reservoir for FLA including pathogenic species (Parry, 2004; Huws *et al.*, 2005; Pickup *et al.*, 2007; Puzon *et al.*, 2009), where they found nutrients (bacterial cells and dissolved organics) (Barbeau et Buhler, 2001) and protection from disinfectants (Thomas *et al.*, 2004). Several authors suggested that high temperatures (30 to 40°C) are involved in the environmental occurrence of the pathogen and appear to facilitate its growth (Wellings *et al.*, 1977; Marciano-Cabral, 1988; Huizinga et McLaughlin, 1990; Sheehan *et al.*, 2003). However, to our knowledge, the

influence of the temperature on *N. fowleri* dynamic in a complex biofilm (where other species of amoebae coexist with bacteria) has never been documented.

The main goal of the present work was therefore to determine the growth dynamic of *N. fowleri* during the formation of a freshwater biofilm at 32 and 42°C. We assumed 32°C as the threshold temperature for the presence of the pathogen in water (Huizinga et McLaughlin, 1990) and 42°C as the optimal growth temperature (according to (Griffin, 1983), from laboratory experiments). After being artificially spiked in an open channel reactor, *N. fowleri* density was followed within the biofilms as well as the structure of the biofilms, the bacterial density and the thermophilic FLA density for several runs at 42 and/or 32°C conducted during 45 days each.

2. Materials and methods

2.1 *Naegleria fowleri* strain and growth conditions

The strain of *N. fowleri* AMI005 (EDF collection, LNHE, Chatou, France) had been previously isolated from cooling water of power station (unpublished data). The strain was grown (3 to 5 days) at 43°C on non-nutrient agar (NNA, Indicia Biotechnology, Oullins, France) previously overlaid with an *Escherichia coli* suspension and identified by the enzyme-linked immunosorbent assay (Indicia Biotechnology) using monoclonal antibody 5D12 (Pougnard *et al.*, 2002).

2.2 Biofilm reactor

The biofilm reactor setup consisted of a flat-plate open channel made of polyvinylchloride and had external dimensions of 41 cm wide, 12 cm deep and 136 cm long with a working volume of 2.7 L including the tubing volume (Fig.1). All tubing was made of silicone platinum and heat-sterilized. A set of two identical reactors was used. Each reactor was previously acid-cleaned (HCl 1 M, 4 hours), disinfected (100 mg $\text{eq Cl}_2/\text{L}$, 4 hours) and finally rinsed by deionized water (5 times the working volume). The reactors were operated in continuous flow mode ensured by peristaltic pumps. The inlet flow and the recycle flow rate were respectively maintained at 1.9 and 810 mL/min. The hydraulic retention time was 24 hours. According to (Lewandowski et Beyenal, 2007), a high recycle ratio (recycle flow/inlet flow),

maintained at 427, provides uniform substrate concentration along the reactor. The flow presents a laminar velocity profile in the length direction characterized with a Reynolds number of 241. The shear rate exerted by the flow on the biofilm was 17 s^{-1} .

The biofilms grew on the glass slides ($8 \times 2.5 \times 0.1 \text{ cm}$, VWR, France) at the bottom of the reactor. For each run, 78 acid- and chlorine-cleaned glass slides were positioned at the bottom of the reactor at the distance of 30 cm from the inlet (Fig.1). This distance was calculated to give uniform hydrodynamic conditions (Lewandowski et Beyenal, 2007) in order to produce a homogeneous development of the biofilms on all of the glass slides. Analyzing biofilms randomly collected at three locations of the reactor served as an experimental control for this point. No significant difference has been obtained (data not shown).

2.3 Experimental set-up

Ten runs were accomplished for a period of 45 days each. Four runs were conducted with two reactors at the same time at two temperatures and using the same inlet water. That is to say, within the two serial runs named R1 and R2, there were two reactors (R1-32 and R1-42 or R2-32 and R2-42) fed with the same water each but carried out at 32°C or 42°C, respectively. Six other runs named R3-42°C to R8-42°C were independently (a new freshwater inlet for each run) carried out at 42°C.

For each run, 11 samples from three coupons were randomly and regularly collected at 2-7 day intervals over a 45-day period for analysis. The coupons were gently washed with 10 mL of bacteria-free phosphate buffer saline solution pH 7.4 (PBS, previously $0.2 \mu\text{m}$ filtered and heat sterilized), in order to remove cells and deposits not strongly attached to the support material (i.e. not considered a part of the biofilm).

2.3.1 Characteristics of freshwater at the inlet and outlet

For each run, the reactors were fed with inlet freshwater (Loire River, Dampierre-en-Burly, France) stored in an agitated and refrigerated (4°C) tank for the duration of a run (~ 6 weeks). The freshwater was collected between November 2009 and February 2011. Microbial and physico-chemical characteristics of the inlet water are presented in Table 1. Except for thermophilic FLA, no drastic variation in water quality was noted between the

inlet and outlet. The high values of the standard deviations for the inlet water data were attributed to the seasonal variations. The decrease of dissolved di-oxygen between inlet and outlet water could be attributed both to microbial consumption and to temperature changes. Conversely, the large thermophilic FLA density at the water outlet was due to the single injection of *N. fowleri*.

2.3.2 Setup of the *Naegleria fowleri* inoculation

A suspension of *N. fowleri* was prepared by scraping the front of ten amoeba plates (see section 2.1) and poured into 5 mL PBS. A defined volume of this suspension (only trophozoïte forms, $10^8 - 10^9$ amoebae L^{-1}) was then injected into the reactor 24 hours after its startup in order to reach 10^5 trophozoïtes/L (final concentration).

2.4 Biofilm imaging

Images of the biofilms were captured by a camera (Olympus DP20) connected to a microscope (Olympus, AX60) under visible light and $\times 1000$ magnification. For each sample day, a total of 30 images were taken at random locations within the biofilm. The images were used to quantify the biofilm structure as described by (Lewandowski et Beyenal, 2007). To give an overview, the 16-bit color images were first transformed in 8-bit grey-scale images. This makes it possible to determine the textural parameter (textural entropy) that describes the microscale heterogeneity of the biofilm. Because of variations in local thickness or cells density, the grey level of the images varies. Textural entropy, a unit-less number, is a measure of the randomness in the gray scale of the images. Thus, increased numbers of cell clusters increase textural entropy due to increased gray level. The higher the textural entropy, the more heterogeneous the image is (Lewandowski et Beyenal, 2007). To calculate structural parameters (areal colonization and average vertical and horizontal run lengths), the gray-scale images were converted to binary images consisting of 1200×1600 pixels ($500 \times 700 \mu m$) by selecting a threshold value that partitions the images into black and white pixels. The areal colonization and the average vertical and horizontal run length parameters quantify the morphological structure of the biofilm described by the size and shape of its clusters. The areal colonization, expressed as a percentage, is defined as the inverse of the ratio between the void area and the total area. It gives information about the relative coverage of the biofilm on the surface. As a biofilm matures, the areal colonization

increases and reaches a steady state. The average of the run lengths measures the expected dimension in micrometers of a cell cluster in each direction (vertical and horizontal) and is therefore a measure of the cluster size.

2.5 Bacterial and free living amoebae cell counts

The biofilms on the glass slide coupons were first removed by scraping with a sterile swab in 150 mL of bacteria-free PBS. Then, the biofilm was extracted and the glass slides were treated by ultrasound for 10 min (ultrasonic bath, 140 W, 50/60 Hz; Fisher Scientific). The power and duration of the ultrasound treatment had been previously optimized with respect to the highest cell detachment and lowest mortality of the amoebae (SI-1).

The number of bacterial cells in the biofilm extracts was determined by epifluorescence microscopy by direct count of the cells recovered on a black Nucleopore filter 0.2 μm pore-sized membrane and previously stained by the DNA fluorochrome SybrGreen I (S7567, InVitrogen) (Noble et Fuhrman, 1998).

The FLA cells were counted by the most probable number (MPN) approach already described by (Pougnard *et al.*, 2002). Immediately after collection, the sample was suspended by magnetic stirring, and five 1 mL replicates for each of a four fold serial dilution were spread onto NNA plates previously overlaid with *E. coli*. The plates were incubated at 43°C and the presence of an amoebic migration front was assessed daily for 5 days by microscopic examination. To confirm the *Naegleria* genus, positive samples were further analyzed to determine flagellation induction by incubating vegetative forms in demineralized water at 37°C for 2 h. Finally, *N. fowleri* was identified by the enzyme-linked immunosorbent assay (Indicia Biotechnology) (Reveiller *et al.*, 2003).

2.6 Statistical analysis

To define statistical significance between the physico-chemical characteristics of the freshwater, the structural and microbiological characteristics of the biofilm with the *N. fowleri* cells density, and thereby evaluate the influence of each parameter on the *N. fowleri* population, we used the Pearson test using a 95% confidence level. All analyses were performed with XLSTAT Version 2010.1.01 (Addinsoft, Paris, France).

3. Results

3.1 Monitoring the freshwater biofilm

3.1.1 Bacterial cell density

The increase of the cell numbers attached to the coupons point out the colonization of the substrata by the bacteria. Results from series 1 runs (R1-32 and R1-42) and series 2 runs (R2-32 and R2-42) were given as an example (Fig. 2); other runs (R3 to R8) at 42°C showed similar data. This colonization is assumed to be the result of both the attachment and growth of the bacteria. It showed two phases: a fast one from 0 to ~ 2-4 days, followed by a slowdown phase (from ~ 4-45 days) where the biofilm development is attenuated (Fig.2). It was not possible to tell whether the cells' growth rate or their adhesion rate contributed more to this colonization rate. However, it is expected that the highest rates are the result of the cells adhering to the readily available fixation sites rather than the growth of adhered bacteria. No significant difference in the rate of colonization appeared between trials or between the two settled temperatures.

3.1.2 Biofilm structure

The biofilm structure for series 1 runs (R1-32 and R1-42°C) and series 2 runs (R2-32°C and R2-42°C) was examined on the assumption that the temperature could induce a change in its architecture, and that could modify the amoebic development (e.g.: by influencing access to nutritional resources).

Microscopic examination showed the gradual accumulation of biofilm onto the glass coupons (Fig. 3). Thus, from 2 to 20-30 days, the biofilm initially composed by several microaggregates randomly distributed onto the glass coupons became more and more dense and heterogeneous over time. These observations are confirmed by the calculation of the structural parameters. Indeed, regardless of the run and at either 32 or 42°C, a linear and regular increase of the textural entropy (Fig. 4A) was observed, as well as for the surface covered by the biofilm (Fig. 4B). However, the values varied significantly from one run to another. Thus, the textural entropy and the surface covered varied respectively from ~2 to ~5 and from 0 to ~10% for series 1 runs as opposed to a variation from ~2 to ~7 and from 0 to ~25% for series 2 runs either the temperature 32°C or 42°C.

From 20-30 days to the end of the experiment, the biofilm structure was fairly constant with values of textural entropy ranged from ~ 5 (series 1 runs) to ~ 7 (series 2 runs) (Fig. 4) indicating a heterogeneous structure of the biofilms. In other words, the biofilms were constituted by cell monolayers as well as complex aggregates of cells as illustrated by the optical pictures (Fig. 3). Microbial cells clusters were spherical indeed, the vertical and horizontal sizes of the clusters were equal: $7\text{ }\mu\text{m}$ for series 1 runs and $4\text{ }\mu\text{m}$ for series 2 runs (Fig. 4C and D).

No significant difference was seen between 32°C or 42°C for any of the biofilm structural indicators. The difference between the biofilms of the two run series was probably the result of unidentified operational parameters or differences in the inlet water quality. Similar results were obtained for a run series that compared two reactors supplied by the same inlet water and maintained at 22 and 42°C (not shown).

3.1.3 Dynamic of the amoebae in the biofilm

At 24 hours, *N. fowleri* was introduced by a single injection (10^5 trophozoites/L) in the circulating water. Before that, any thermophilic FLA was detected (< 0.3 amoeba/ cm^2 ; i.e. 6 amoebae/slide) regardless of the run and either 32 or 42°C (Fig. 2). Considering the hydraulic residence time, the theoretical washout time for the injected *N. fowleri* cells is around four days. Indeed, after 4 days the amoebic concentrations in the water bulk are 2 orders of magnitude less than those at the injection time (SI-2). In other cases, two hours after the injection, 1 to 10 of *N. fowleri*/ cm^2 were found on the substrata either at 32 or 42°C and regardless of the run series (Fig. 2). That clearly indicates the transfer of *N. fowleri* from the water bulk to the substrata.

For runs at 32°C , the freshwater biofilm does not significantly promote *N. fowleri*, insofar as its density never exceeds a maximum of 30 *N. fowleri* cells/ cm^2 . In contrast, it appeared that the indigenous amoebae such as *Naegleria* spp and other thermophilic FLA were able to proliferate and dominate. Indeed, for R1-32, a strong decay of *N. fowleri* occurred the days after the spike. Its density rapidly reached the detection limit (on the 8th day) (Fig. 2A). Conversely, a thermophilic FLA population identified as belonging to the genus *Naegleria* strongly increased from the detection limit (< 0.3 amoeba/ cm^2) to 200 amoebae/ cm^2 . Then, between the 11th and 45th days, the two populations remained almost constant and close to

the detection limit for *N. fowleri* or to 100 amoebae / cm² for *Naegleria* spp (Fig. 2A). For R2-32, after the spike, the *N. fowleri* population remained fairly constant between 6 to 30 amoebae/cm² throughout the run. Until the 22nd day *N. fowleri* was the predominant amoebic species. Then, a peak of another thermophilic FLA, occurred on the 30th day with a maximum of 600 amoebae/cm² (Fig. 2B).

Conversely, both runs performed at 42°C exhibited a significant increase of *N. fowleri* occurring during the first 7 days where the maximal *N. fowleri* densities reached were 900 and 200 cells/cm² and remained relatively stable during 1 or 3 weeks after, for R1 and R2, respectively (Fig. 2C and D). Along these periods, *N. fowleri* was the main, detectable thermophilic FLA. After this time, simultaneously to a strong decrease of *N. fowleri* density, again, the large difference between *N. fowleri* and FLA densities revealed the emergence of other indigenous thermophilic FLA (Fig. 2C and D). Finally, at 42°C, *N. fowleri* is able to grow in the biofilm and to reach a higher density than under 32°C. However, maintaining its population over time seems difficult and subject to competition from indigenous amoebae.

3.2 Kinetic parameters at 42°C

In order to estimate the growth parameters of *N. fowleri* in the biofilm, 6 other independent runs (single run) were performed at 42°C. To calculate $\mu_{\max}$ and K_s we have considered several assumptions. First, we have assumed that the bacterial cells in the biofilm were the substrate limiting the growth of the amoebae. Secondly, to get the kinetic constants, it was necessary to vary the concentration of the substrate and to measure μ_{expo} . However, the bacterial density of the biofilms is difficult to control because it depends, in particular, on the inlet freshwater that was different from one run to another. Therefore, we have expressed the substrate as the bacteria/amoeba ratio (named BAR). The bacterial cell and amoebae densities (cells/cm²) corresponded to those present at the time of the injection. Third, we did not consider the detachment of amoebae from the substrata, since the inlet and outlet of *N. fowleri* were negligible after the spike. Finally, the differences observed between the densities of *N. fowleri* at 32 and 42°C (see section 3.1.3) support the assumption that at 42°C the growth of the amoebae dominate over the attachment.

For each of the 8 runs performed at 42°C, the apparent exponential growth rates (μ_{expo}) have been calculated (SI-3) and plotted against the BAR (Fig. 5). The hyperbolic relationship of Fig.

5 supports the assumption that the cell density controlled the growth of the amoeba ($R^2=0.77$). From the equation of the fitted hyperbolic curve, we estimated $\mu_{\max} = 0.23 \text{ h}^{-1}$ and $K_s \approx 1.2 \times 10^5$ bacteria / amoebae. The corresponding generation time was ≈ 3 hours.

4. Discussion

It is currently estimated that 99% of microbial activities in freshwater are associated with surfaces such as biofilms (Parry, 2004). These natural ecosystems contain a large diversity of microbial communities and are also known to host pathogens such as *N. fowleri* (Maclean *et al.*, 2004). In this present work, we aimed to give a better knowledge about the growth dynamic of this pathogen within a freshwater biofilm and to identify parameters promoting its persistence in thermally polluted water environments. For that, *N. fowleri* was spiked into laboratory reactor biofilms under two temperatures and fed with natural river waters collected in different seasons. The bacterial and amoebic populations within the biofilms were followed over time. Despite a systematic bacterial decrease (loss of 35 to 87% of the bacterial population) from 2 to 16 days, our experimental design allowed the installation of a bacterial biofilm sufficiently large and dense to support the growth of amoebae and to study the dynamic of *N. fowleri* within freshwater biofilms.

The results demonstrate that *N. fowleri* was able to proliferate in such biofilms at 42°C. At 32°C, the amoeba did not exhibited significant growth but persist at a low level for several weeks. This is consistent with field studies which indicate that a temperature increase from 30 to 40°C is positively associated with the frequency of identification of *N. fowleri* in river waters and sediments (Sykora *et al.*, 1983; Huizinga et McLaughlin, 1990; Behets *et al.*, 2007). However, it was shown that pathogenic *Naegleria* strains can be present at relatively low temperatures, 10°C in the water, 16°C in the mud and 8°C in soils (Sykora *et al.*, 1983; Marciano-Cabral, 1988; Maclean *et al.*, 2004), suggesting that other factors than temperature would influence the persistence of this amoeba.

It has previously been indicated (Matz *et al.*, 2004) that *P. aeruginosa* exhibits an antigrazing response towards flagellated protozoa by forming microcolonies which slows the ingestion process. That has been also observed with both amoebae *A. castellanii* and *H. vermiformis* (Pickup *et al.*, 2007). Thus, we can expect that the biofilm structure could influence the effectiveness of grazing and therefore the growth of amoebae. In the present study, the

biofilm structure changed continuously along the biofilm growth especially between days 20 and 30. Through the characterization of the biofilms we attempted to find relationships between the *N. fowleri* density and the descriptors of the biofilm structure. However, no significant relationship, according to Pearson, was found, suggesting the biofilm structure does not significantly influence the growth of the amoebae, or that the descriptors we choose for the biofilm structure are not relevant.

During the biofilm growth, a balance was shown between bacterial cells (prey) and amoebic cells (predators). (Alexander, 1981) advanced that a balance must exist between the predator and the prey. (Paris *et al.*, 2007) have observed, from biofilm reactors fed with drinking water, the natural arrival of an amoebic population induced the decrease of the bacterial population by 70% over a period ranging from 9 to 35 days. The consumption rates were estimated to be in a range of 1.2×10^4 to 2.3×10^4 bacterial cells/cm²/h (Paris *et al.*, 2007). Concomitantly to the growth of the amoebic population, our results showed a decrease of 35 to 87% of the bacterial biomass, corresponding to consumption rates of 1.7×10^3 to 1.1×10^4 bacterial cells/cm²/h. Moreover, (Marciano-Cabral, 1988) has proposed that the composition of the bacterial community would also influence the incidence of *Naegleria* spp. For instance, *N. fowleri* would occur more frequently in water contaminated by high concentrations of coliforms than in water without coliforms (Sykora *et al.*, 1983). (Puzon *et al.*, 2009) indicated that the more abundant food source and elevated water temperature, 20-25°C, likely contribute to the increase in *N. fowleri* cell density. Our study showed a direct link between the bacteria/amoeba ratio and the *N. fowleri* growth. Therefore, the nutritional availability represented by the BAR (bacteria/amoeba ratio) parameter appears to be a major criteria for the amoebic growth. From the data collected on the 8 independent runs performed at 42°C, the growth rates (μ) were between 0.03 and $\mu_{\max} = 0.23 \text{ h}^{-1}$, which corresponds to a mean generation time of 3 to 23 hours. To our knowledge, no data is available for the growth parameters of *N. fowleri* within natural biofilms as a nutrient source. In axenic conditions in the presence of Nelson's medium at 37°C, other authors found that the logarithmic growth of *N. fowleri* occurred during the initial 36 hours and that the mean generation time was 5.5 hours (Weik et John, 1977). In other cases, $\mu_{\max}$ was determined in the presence of five different bacterial preys (*E. coli*, *K. aerogenes*, *P. aeruginosa*, *S. aureus* and *K. ozaenae*) to be 3 to 10 times (ranged from 0.03 to

0.07 h⁻¹) lower than our results but under 20°C and with other amoeba species (*Acanthamoeba castellanii* and *Hartmannella vermiformis*) (Pickup *et al.*, 2007). Therefore, the growth kinetic data proposed by our present work is in the same range as those from axenic medium or pure bacterial strain suspension experiments. This would signify that a complex biofilm, growing from a freshwater river could be as nutritious for the amoebae as synthetic and axenic media or pure bacterial strains.

Our results indicated an affinity constant (K_s) of 1.2×10^5 bacteria cells/amoeba. In other words, this would signify that below this value, the specific growth rate of the amoeba is two times lower than μ_{max} . Experimental data also suggests that a threshold of $\sim 10^4$ bacteria/amoeba is needed to initiate the growth of *N. fowleri* (not shown) whereas with 10^6 to 10^7 bacteria/amoeba the μ_{max} is reached. (Alexander, 1981) hypothesized that (i) the protozoan population size is a direct function of the initial number of prey and (ii) a threshold in a prey density below which protozoa are unable to grow exists. In this present study, we give experimental data consistent with this assumption.

However, temperature and food should not be considered the only two main parameters for the growth and persistence of *N. fowleri*. Even under apparently favorable temperature (42°C) and apparent available prey (cell density > 10^6 cells/cm²) *N. fowleri* decreased dramatically. Two main causes can be suggested: (i) competition with other amoebae, and/or (ii) exhaustion of the most profitable prey. This last factor suggests that the amoebae may eat specific prey and therefore would be dependent on the morphology of bacterial prey (size, composition, etc.). In this regard, some studies show, for *Acanthamoebae* and *Hartmannella* spp, that certain bacterial species such as *Synechococcus* are ingested in food vacuoles, but are inefficiently digested, possibly because the cell wall is two to five times thicker than the cells walls of other gram-negative bacteria (Pickup *et al.*, 2007). Therefore, knowledge of the ecological niche of *N. fowleri* in the biofilm should help us to better understand its persistence and growth in man-made systems such as cooling systems. Finally, since our experiments only focused on young biofilms, the question of the growth dynamics of *N. fowleri* on mature biofilms needs to be explored in future studies.

5. Conclusion

The colonization of a freshwater biofilm by *Naegleria fowleri*, experimentally injected in the reactor, is significantly more efficient at 42°C than at 32°C. In addition, the ratio bacterial preys/amoeba is shown to be an essential parameter for the growth of the amoebae at 42°C. The maximal growth rate (0.23 h^{-1}) of *N. fowleri* is associated with a generation time ~ 3 hours which is shorter than those found for axenic media. Other parameters, like competition with indigenous amoebae or the exhaustion of specific bacterial preys, need to be explored in order to enlighten our knowledge of the ecology of *N. fowleri*.

Acknowledgements

S. Morel, S. Barrouilhet (EDF R&D) and C. Merelli (CAPSIS) are duly acknowledged for their excellent technical assistance. This work was supported by EDF. S. Goudot is the recipient of an industrial research training contract (CIFRE) between EDF and the ANRT (French national association of research and technology).

References

- Angrup A., L. Chandel, A. Sood, K. Thakur, S. C. Jaryal, 2010. Primary amoebic meningoencephalitis due to *Naegleria fowleri*. *Journal of Institute of Medicine*, August, 32(2), 56-59.
- Alexander, M., 1981. Why microbial predators and parasites do not eliminate their prey and hosts. *Annual review of Microbiology* 35, 113-133.
- Barbeau, J., Buhler, T., 2001. Biofilms augment the number of free-living amoebae in dental unit waterlines. *Research Microbiology* 152 (8), 753-760.
- Behets, J., Declerck, P., Delaedt, Y., Verelst, L., Ollevier, F., 2007. Survey for the presence of specific free-living amoebae in cooling waters from Belgian power plants. *Parasitology Research* 100 (6), 1249-1256.
- Caruzo, G. and J. Cardozo (2008). Primary amoebic meningoencephalitis: a new case from Venezuela. *Trop Doct* 38(4): 256-7.
- De Jonckheere, J. F. (2011). The impact of man on the occurrence of the pathogenic free-living amoeboflagellate *Naegleria fowleri*. *Future Microbiology* 7(1): 5-7.
- Griffin, J.L., 1983. The pathogenic amoeboflagellate *Naegleria fowleri*: environmental isolations, competitors, ecologic interactions, and the flagellate-empty habitat hypothesis. *Journal of Protozoology* 30 (2), 403-409.
- Huizinga, H.W., McLaughlin, G.L., 1990. Thermal ecology of *Naegleria fowleri* from a power plant cooling reservoir. *Applied and Environmental Microbiology* 56 (7), 2200-2205.
- Huws, S.A., McBain, A.J., Gilbert, P., 2005. Protozoan grazing and its impact upon population dynamics in biofilm communities. *Journal of Applied Microbiology* 98 (1), 238-244.
- Jamerson, M., Remmers, K., Cabral, G., Marciano-Cabral, F., 2009. Survey for the presence of *Naegleria fowleri* amoebae in lake water used to cool reactors at a nuclear power generating plant. *Parasitology Research* 104 (5), 969-978.
- Kyle, D.E., Noblet, G.P., 1985. Vertical distribution of potentially pathogenic free-living amoebae in freshwater lakes. *Journal of Protozoology* 32 (1), 99-105.

- Lewandowski, Z., Beyenal, H., 2007 Fundamentals of Biofilm research, CRC Press. Taylor and Francis Group.
- Maclean, R.C., Richardson, D.J., LePardo, R., Marciano-Cabral, F., 2004. The identification of *Naegleria fowleri* from water and soil samples by nested PCR. Parasitology Research 93 (3), 211-217.
- Marciano-Cabral, F., 1988. Biology of *Naegleria* spp. Microbiology Review 52 (1), 114-133.
- Matz, C., Bergfeld, T., Rice, S. A., Kjelleberg, S. 2004 Microcolonies, quorum sensing and cytotoxicity determine the survival of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms exposed to protozoa grazing . Environmental Microbiology 6(3) 218-226.
- Noble, R.T., Fuhrman, J. A. 1998 Use of SYBR Green I for rapid epifluorescence counts of marine viruses and bacteria. Aquatic Microbial Ecology 14 (2), 113-118.
- Paris, T., Skali-Lami, S., Block, J.C., 2007. Effect of wall shear rate on biofilm deposition and grazing in drinking water flow chambers. Biotechnology and Bioengineering 97 (6), 1550-1561.
- Parry, J.D., 2004. Protozoan grazing of freshwater biofilms. Advance in Applied Microbiology 54, 167-196.
- Pickup, Z.L., Pickup, R., Parry, J.D., 2007. Effects of bacterial prey species and their concentration on growth of the amoebae *Acanthamoeba castellanii* and *Hartmannella vermiformis*. Applied and Environmental Microbiology 73 (8), 2631-2634.
- Pond K., 2005. Water recreation and disease. Plausibility of associated infections: acute effects, sequelae and mortality. WHO ed., IWA, London, UK, pp. 259.
- Pougnard, C., Catala, P., Drocourt, J.L., Legastelois, S., Pernin, P., Pringuez, E., Lebaron, P., 2002. Rapid detection and enumeration of *Naegleria fowleri* in surface waters by solid-phase cytometry. Applied and Environmental Microbiology 68 (6), 3102-3107.
- Puzon, G.J., Lancaster, J.A., Wylie, J.T., Plumb, I.J., 2009. Rapid detection of *Naegleria fowleri* in water distribution pipeline biofilms and drinking water samples. Environmental Science and Technology 43 (17), 6691-6696.

- Reveiller, F.L., Varenne, M.P., Pougard, C., Cabanes P.A., Pringuez, E., Pourima, B., Legastelois, S., Pernin, P., 2003. An enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the identification of *Naegleria fowleri* in environmental water samples. *J Eukaryot Microbiol.* 50(2), 109-113.
- Shakoor, S., M. A. Beg, *et al.* (2011). Primary amoebic meningoencephalitis caused by *Naegleria fowleri*, Karachi, Pakistan. *Emerg Infect Dis* **17**(2): 258-61
- Sheehan, K.B., Fagg, J.A., Ferris, M.J., Henson, J.M., 2003. PCR detection and analysis of the free-living amoeba *Naegleria* in hot springs in Yellowstone and Grand Teton National Parks. *Applied and Environmental Microbiology* 69 (10), 5914-5918.
- Sibille, I., Sime-Ngando, T., Mathieu, L., Block, J.C., 1998. Protozoan bacterivory and *Escherichia coli* survival in drinking water distribution systems. *Applied and Environmental Microbiology* 64 (1), 197-202.
- Sykora, J.L., Keleti, G., Martinez, A.J., 1983. Occurrence and pathogenicity of *Naegleria fowleri* in artificially heated waters. *Applied and Environmental Microbiology* 45 (3), 974-979.
- Thomas, V., Bouchez, T., Nicolas, V., Robert, S., Loret, J.F., Levi, Y., 2004. Amoebae in domestic water systems: resistance to disinfection treatments and implication in *Legionella* persistence. *Journal of Applied Microbiology* 97 (5), 950-963.
- Thomas, V., Loret, J.F., Jousset, M., Greub, G., 2008. Biodiversity of amoebae and amoebae-resisting bacteria in a drinking water treatment plant. *Environmental Microbiology* 10 (10), 2728-2745.
- Tyndall, R.L., Ironside, K.S., Metler, P.L., Tan, E.L., Hazen, T.C., Fliermans, C.B., 1989. Effect of thermal additions on the density and distribution of thermophilic amoebae and pathogenic *Naegleria fowleri* in a newly created cooling lake. *Applied and Environmental Microbiology* 55 (3), 722-732.
- Weik, R.R., John, D.T., 1977. Agitated mass cultivation of *Naegleria fowleri*. *Journal of Parasitology* 63 (5), 868-871.

Wellings, F.M., Amuso, P.T., Chang, S.L., Lewis, A.L., 1977. Isolation and identification of pathogenic *Naegleria* from Florida lakes. *Applied and Environmental Microbiology* 34 (6), 661-667.

Tables

Table. 1. Microbial and physico-chemical characteristics of the inlet and outlet freshwater. Data from outlet water is the mean of the 11 measures made over the 45 days of the operating time. The freshwater was collected in November 2009 and February 2011. Standard deviations are indicated in brackets and ND means “not determined”.

	Inlet water (n=8)	Outlet water	
Temperature		32°C (n=2)	42°C (n=8)
pH	8.28 (0.5)	8.38 (0.06)	8.55 (0.08)
DO ^a (mg/L)	8.58 (1.3)	6.35 (0.4)	5.66 (0.21)
TOC ^b (mg/L)	5.4 (3.6)	ND	ND
DSS ^c (mg/L)	19 (13)	ND	ND
Bacteria (cells/L)	4.5×10^8 (9.8×10^7)	1.4×10^9 (1.2×10^9)	8.6×10^8 (4.8×10^8)
ThFLA ^d (cells/L)	< 105 ^e	3900 (2100)	2400 (2100)

^a Dissolved oxygen.

^b Total organic carbon.

^c Dried suspended solids.

^d Thermophilic free-living amoebae.

^e Detection limit.

Figure captions

Fig. 1. Schematic view of the experimental setup. (1), flat-plate reactor; (2), thermostated bath; (3), peristaltic pump for inlet freshwater; (4), 4°C refrigerated tank (30 liters) for inlet freshwater; (5), peristaltic pump for recycle loop; (6), integrated system analysis for water quality; (7), tank for outlet reactor water. Each reactor received 78 glass microscope slides (8 × 2.5 cm) at the bottom.

Fig. 2. Temporal fluctuations of the biofilms under 32°C and 42°C for runs series 1 (A = R1-32, C = R1-42) and runs series 2 (B= R2-32, D = R2-42): bacteria (●), thermophilic free-living amoebae (▽) and *Naegleria fowleri* (▲). The arrow indicates the spike of *N. fowleri*.

Fig. 3. Optical microscopy pictures of biofilms on glass coupons from day 0 to day 45 at 42°C (R1-42). The number at the top-left indicates the time in days.

Fig. 4. Average and standard deviations of the textural entropy (A), areal colonization (B), average vertical run lengths (C), average horizontal run lengths (D). The data provided from thirty images of biofilm for R1-32 (●), R2-32 (○), R1-42 (▼), R2-42 (△) at random locations. R1 and R2, 32 and 42 refer to run series and temperature.

Fig. 5. Variation of the apparent specific growth rate (μ_{expo}) as a function of the bacteria/amoeba ratio (BAR) for *N. fowleri* at 42°C calculated from 8 runs (R1 to R8).

Figure 1

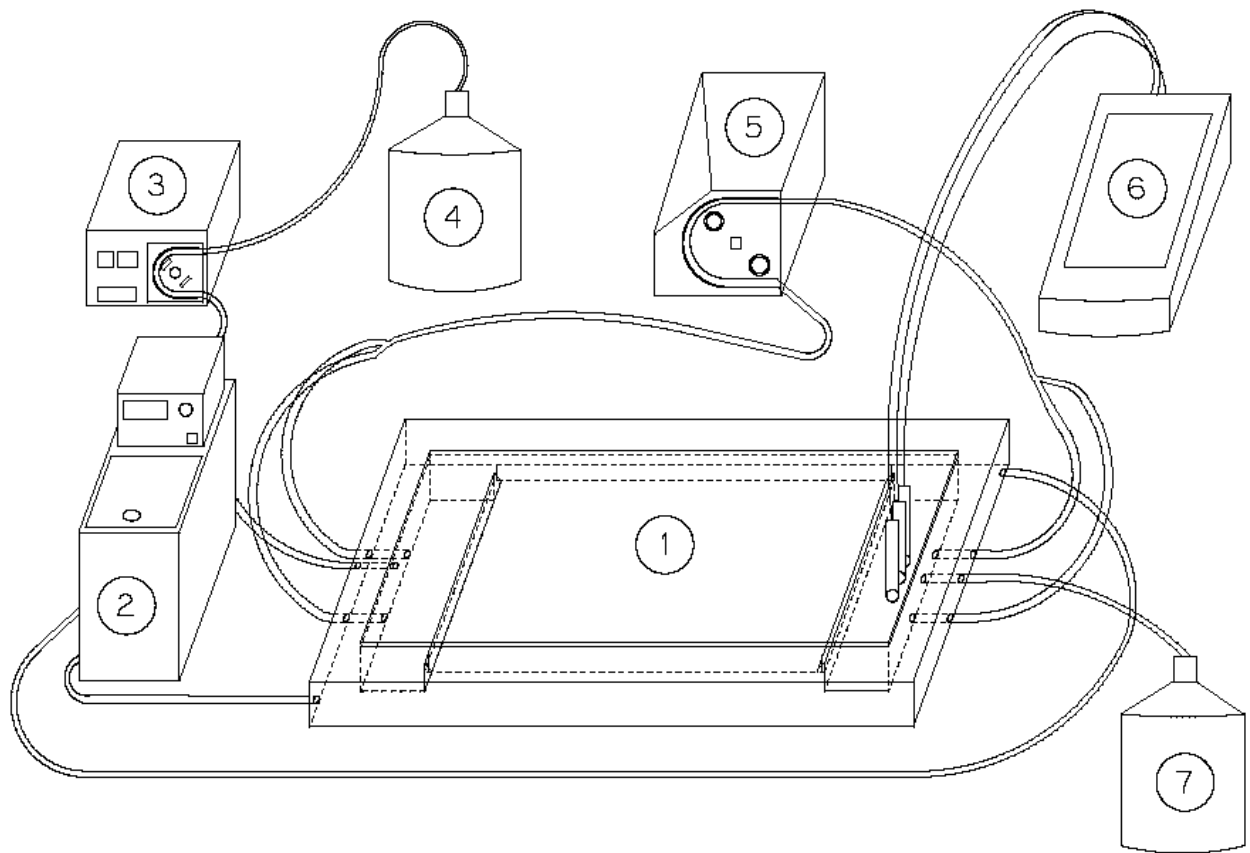


Fig. 1. Schematic view of the experimental setup. (1), flat-plate reactor; (2), thermostated bath; (3), peristaltic pump for inlet freshwater; (4), 4°C refrigerated tank (30 liters) for inlet freshwater; (5), peristaltic pump for recycle loop; (6), integrated system analysis for water quality; (7), tank for outlet reactor water. Each reactor received 78 glass microscope slides (8 × 2.5 cm) at the bottom.

Figure 2

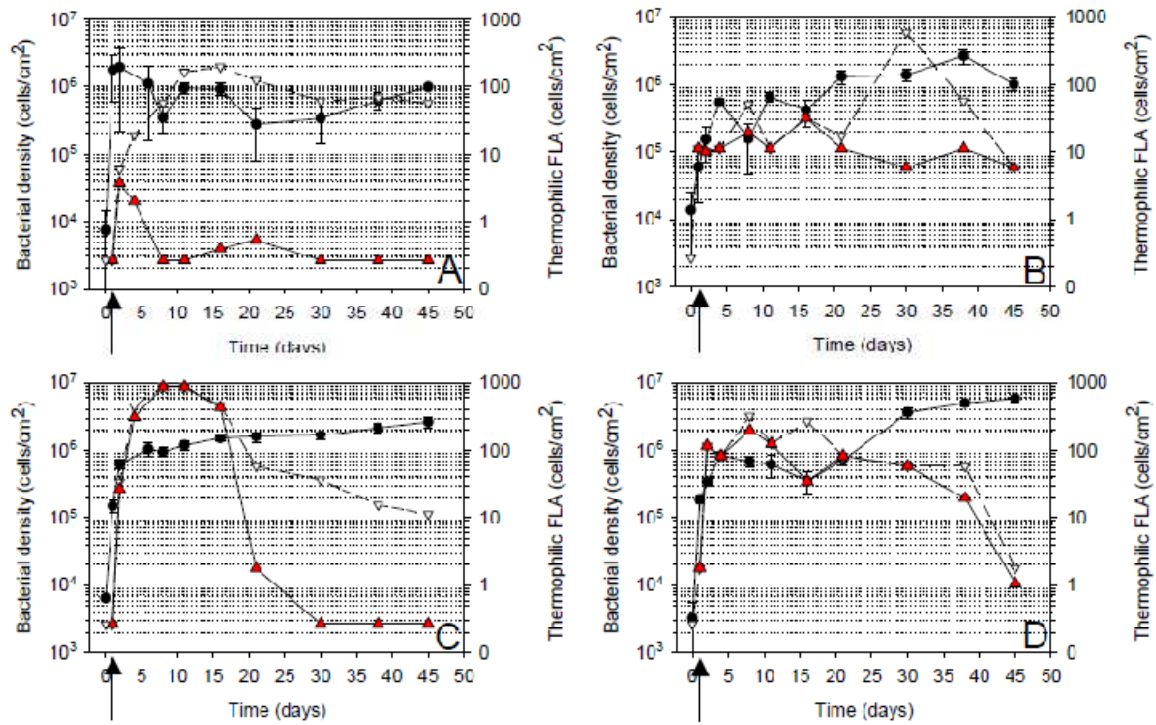


Fig. 2. Temporal fluctuations of the biofilms under 32°C and 42°C for runs series 1 (A = R1-32, C = R1-42) and runs series 2 (B= R2-32, D = R2-42): bacteria (●), thermophilic free-living amoebae (▽) and *Naegleria fowleri* (▲). The arrow indicates the spike of *N. fowleri*.

Figure 3

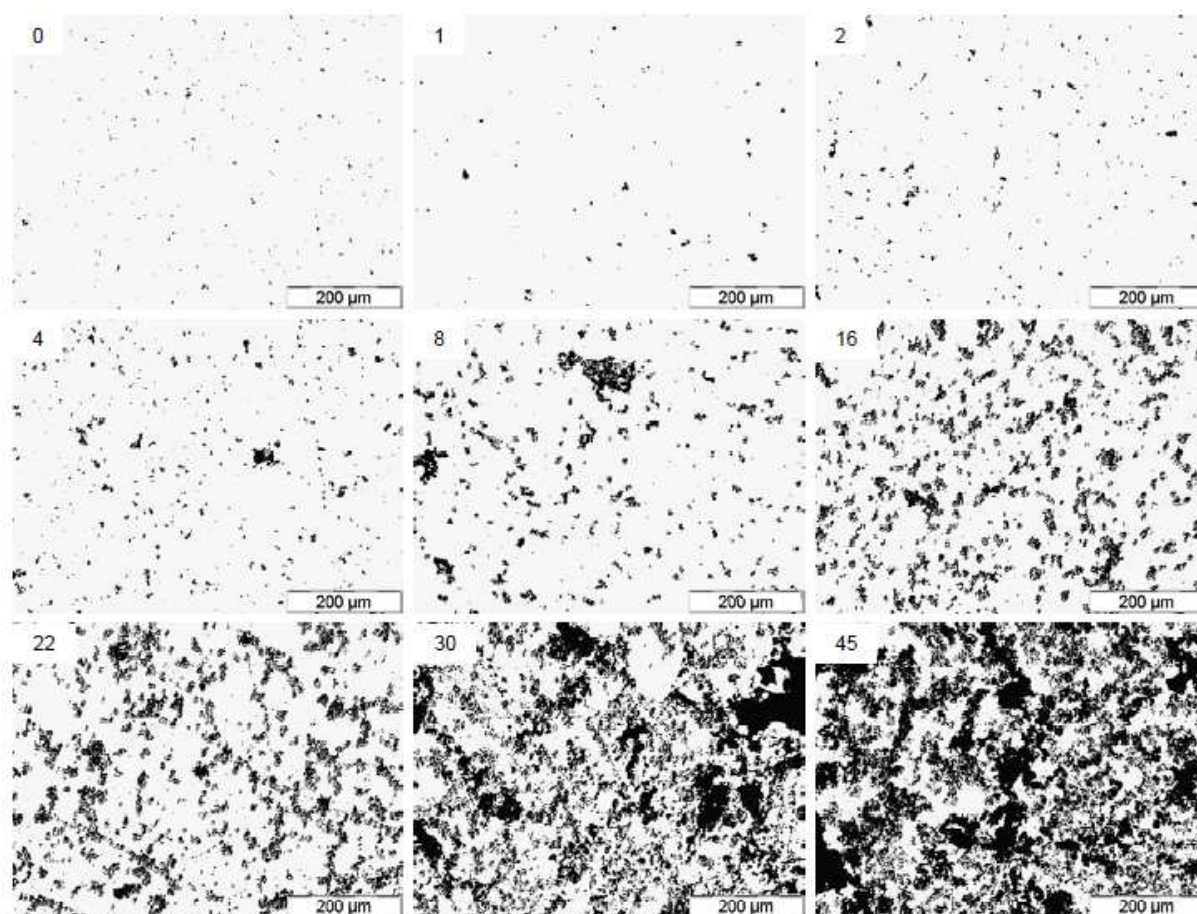


Fig. 3. Optical microscopy pictures of biofilms on glass coupons from day 0 to day 45 at 42°C (R1-42). The number at the top-left indicates the time in days.

Figure 4

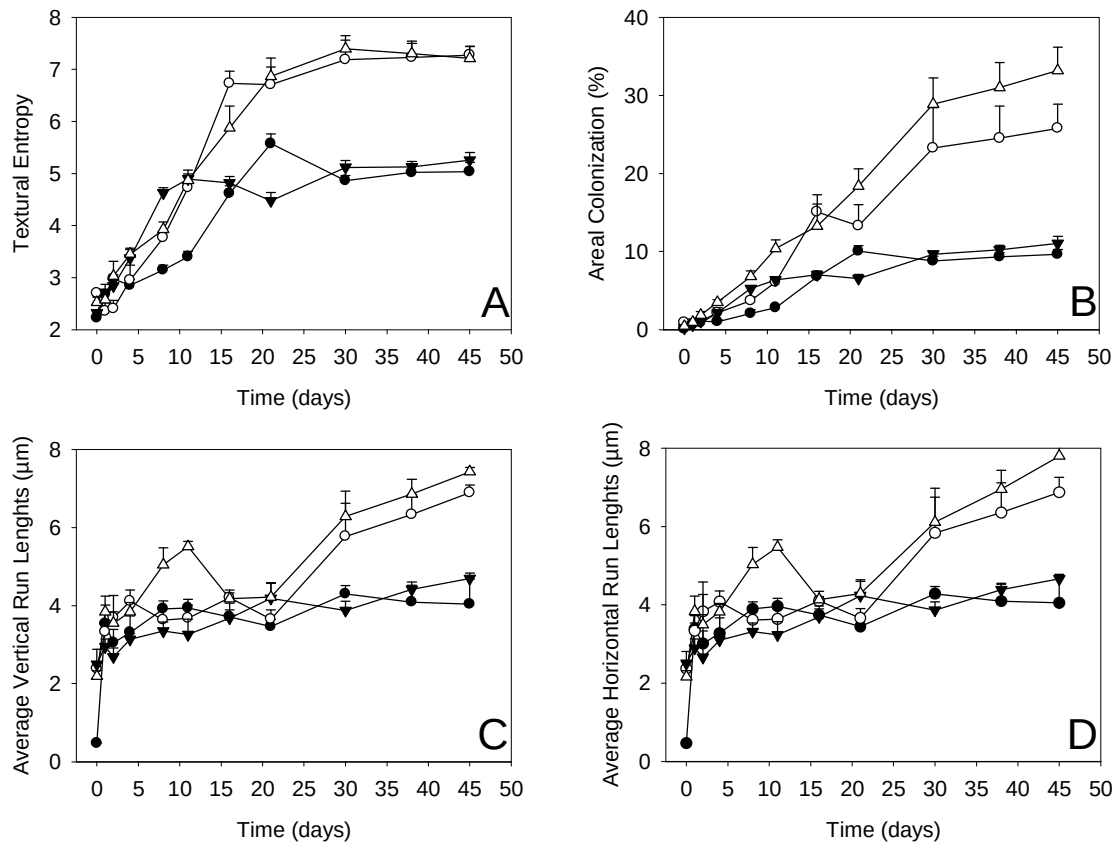


Fig. 4. Average and standard deviations of the textural entropy (A), areal colonization (B), average vertical run lengths (C), average horizontal run lengths (D). The data provided from thirty images of biofilm for R1-32 (●), R2-32 (○), R1-42 (▼), R2-42 (△) at random locations. R1 and R2, 32 and 42 refer to run series and temperature.

Figure 5

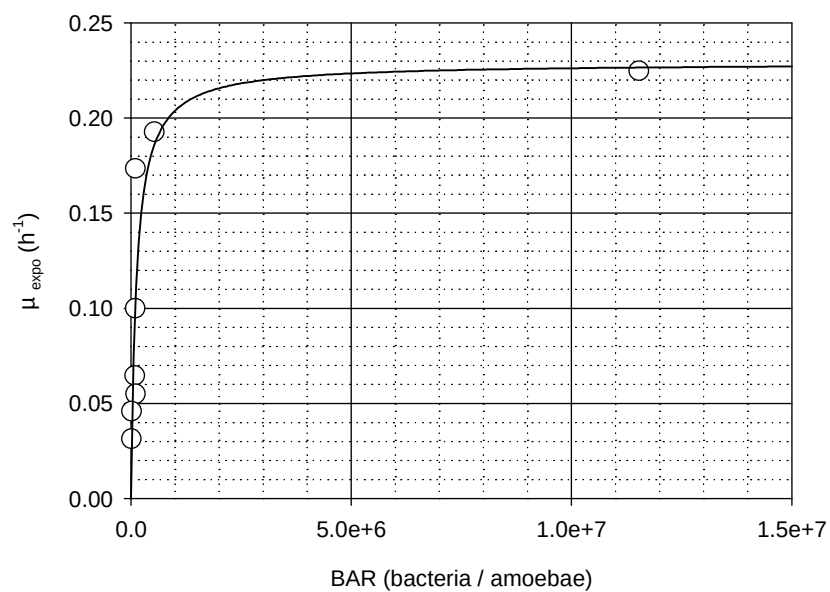
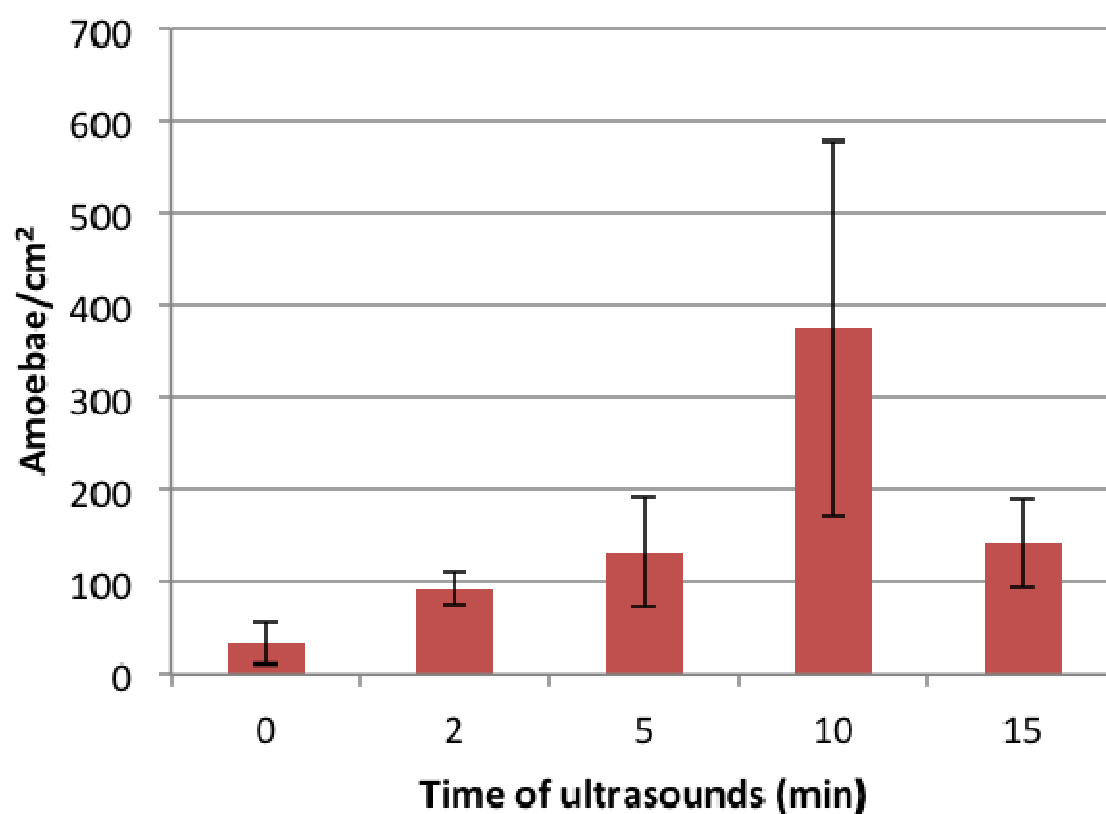


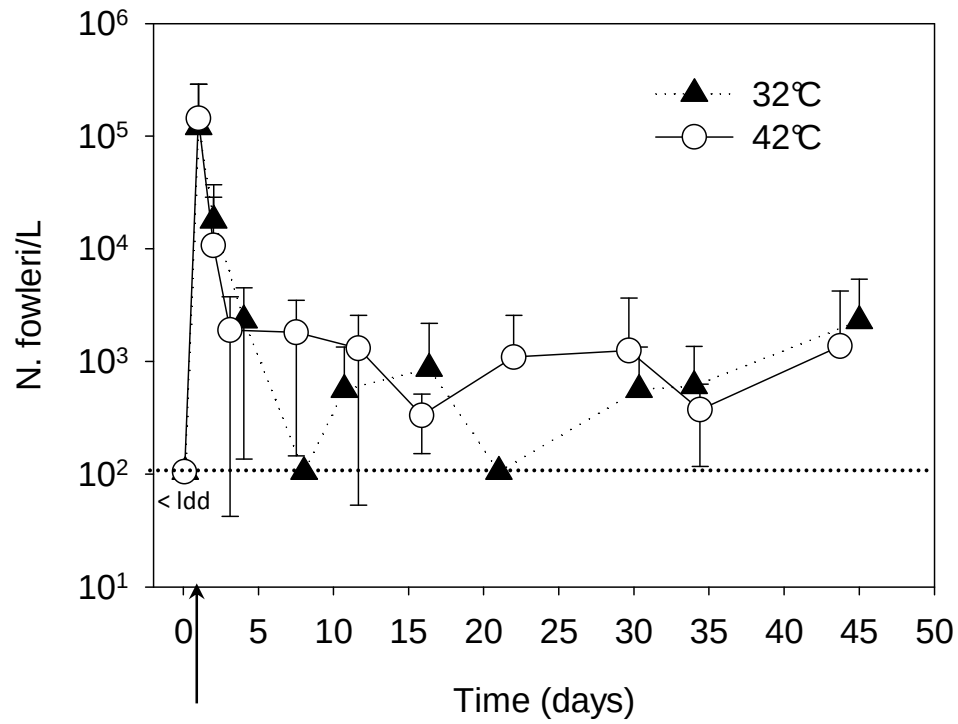
Fig. 5. Variation of the apparent specific growth rate (μ_{expo}) as a function of the bacteria/amoeba ratio (BAR) for *N. fowleri* at 42°C calculated from 8 runs (R1 to R8).

Supplementary informations

SI. 1. Amoebic density variation versus sonication time of the biofilms.



SI.2. Temporal fluctuations for *N. fowleri* in the outlet water under 32°C (▲) and 42°C (○). The arrow indicates when *N. fowleri* was introduced. The dotted line represents the detection limit. < ldd means under the detection limit. The arrow indicates the spike of *N. fowleri*.



SI.3. Temporal fluctuations in biofilm of *Naegleria fowleri* (•) densities at 42°C for 8 runs including R1 to R8.

The specific apparent growth rate (μ) of microbial cells is defined by equation (1) where X is the amoeba cell density and t the time of growth.

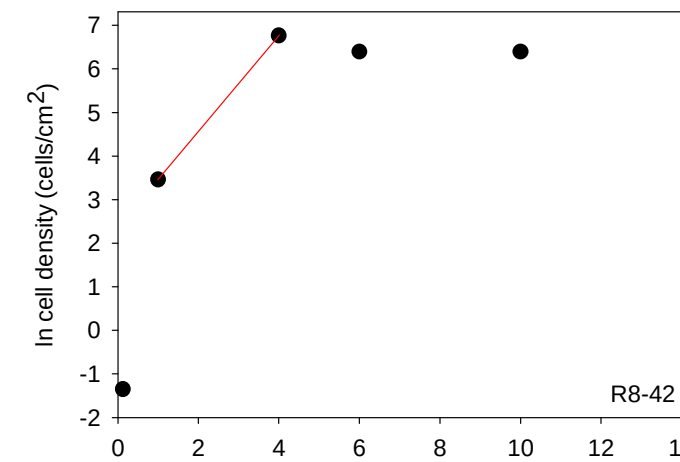
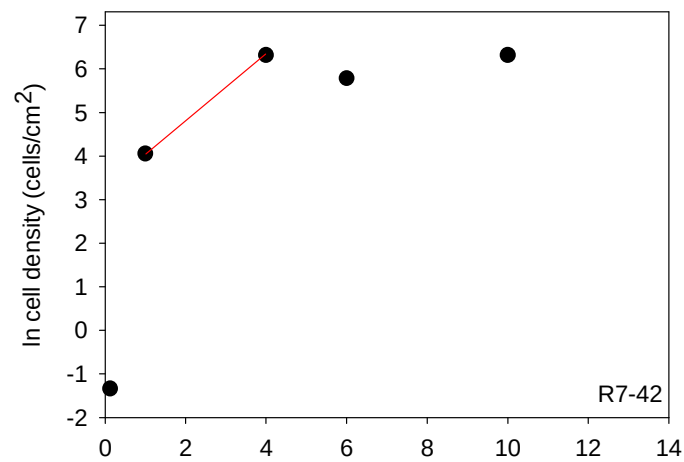
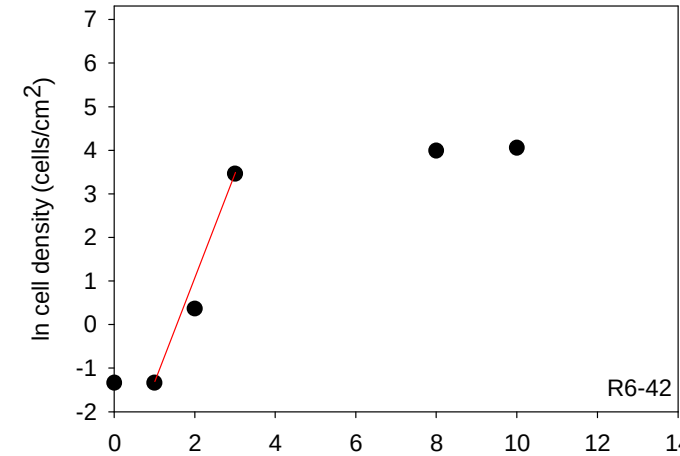
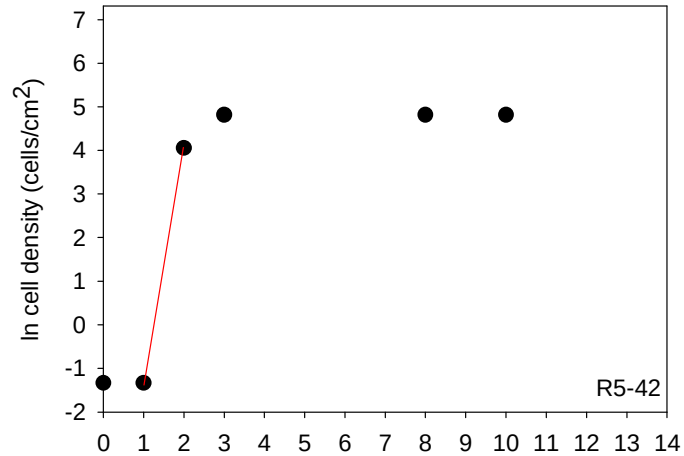
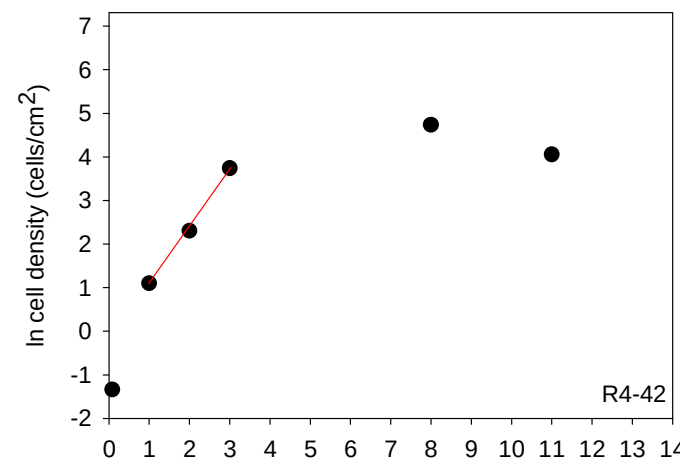
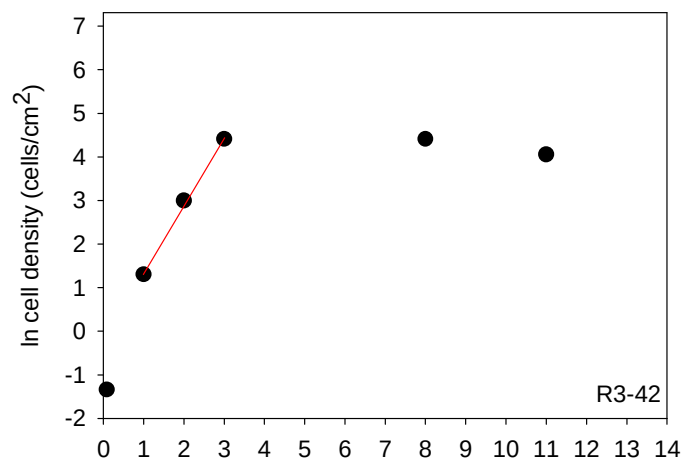
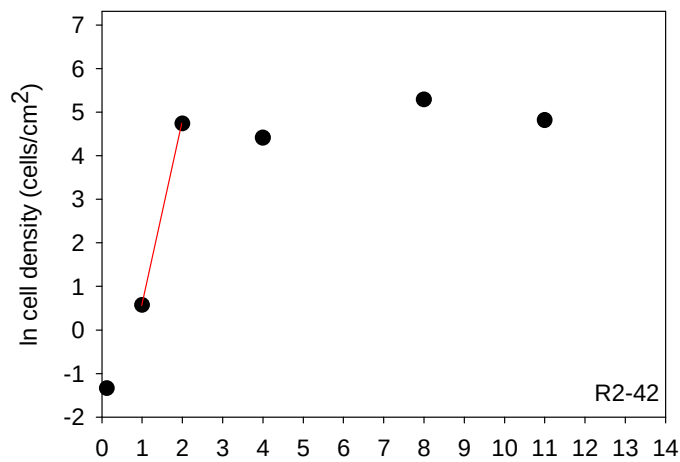
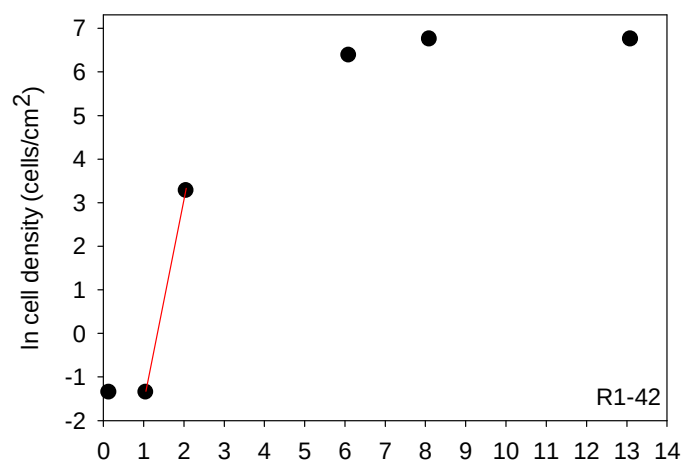
$$\mu = \frac{1}{X} \times \frac{dX}{dt} \quad (1)$$

By assuming that the amoeba grow essentially within the biofilm, and the amount of amoebae detached from the biofilm are negligible as regards to the amoeba into the biofilm, the specific apparent growth rate during the exponential growth phase (μ_{expo}) was estimated from linear regressions on plots of $\ln(X)$ versus time. The μ_{expo} is then given by equation (2).

$$\mu_{\text{expo}} = \frac{\ln X_1 - \ln X_0}{t_1 - t_0} \quad (2)$$

The kinetic parameters, half saturation constant (K_s) and maximal growth rate (μ_{max}), were determined by fitted the from Monod relation equation (3) assuming: (i) the bacteria are the limiting growth limiting substrate and (ii) the bacteria/amoeba ratio (BAR) is a proxy of the substrate concentration.

$$\mu_{\text{expo}} = \frac{(\mu_{\text{max}} \times \text{BAR})}{(K_s + \text{BAR})} \quad (3)$$



Time (days)

Time (days)

CHAPITRE 4 : INFLUENCE DE LA NATURE DU MATERIAU SUPPORT SUR LA DYNAMIQUE DE *Naegleria fowleri* EN BIOFILM

Pour compléter l'évaluation des facteurs d'influence de l'écologie de *N. fowleri* dans les biofilms complexes d'eau de rivière, ce chapitre s'attache à étudier l'influence de la nature du matériau support sur la dynamique de *N. fowleri* en biofilm. Notre choix s'est porté sur les matériaux : polychlorure de vinyle, acier inoxydable, laiton et titane, tous identifiés comme représentants majeurs des surfaces constitutives des CRFs des centrales électriques. En effet, les deux dispositifs présentant les surfaces en contact avec l'eau les plus importantes sont le corps d'échange de l'aéroréfrigérant, constitué en général de PVC, et le condenseur constitué de tubes métalliques en acier inoxydable, en laiton et/ou titane.

A ce jour, les données de la littérature scientifique à ce sujet sont peu nombreuses, l'essentiel des informations disponibles provient des études menées en interne par EDF. Ainsi, il a été mis en évidence, vis à vis de *N. fowleri*, l'incidence de la nature du matériau condenseur, dans la mesure où les densités mesurées en *N. fowleri* dans l'eau et dans les dépôts issus des circuits équipés de condenseurs en acier inoxydable étaient quasi systématiquement supérieures à celles des sites équipés de condenseurs en laiton lorsque les températures étaient favorables (Le-Brun *et al.*, 2004).

Dans l'étude qui suit, après avoir développé, à 42°C, des biofilms d'eau de rivière sur les différents matériaux testés, nous avons introduit et suivi la colonisation de *N. fowleri*. Les résultats montrent globalement la faible influence de la nature des matériaux dans les cas du polychlorure de vinyle, de l'acier inoxydable et du titane vis-à-vis de la dynamique de *N. fowleri* dans les biofilms. En revanche, avec le laiton comme support, la colonisation des biofilms par *N. fowleri* est significativement plus faible que pour les autres coupons. Une inhibition due à la présence de cuivre issu du laiton est suspectée et discutée.

Cette partie fera l'objet d'une proposition de publication dans une revue internationale.

1. Evaluation and comparison of the growth dynamic of biofilm-associated *Naegleria fowleri* in freshwater biofilm formed on various cooling circuit materials

Abstract

Biofilm formation is a common phenomenon in aquatic environments. In industrial water systems, the occurrence of biofilm-associated pathogenic free-living amoebae (FLA) such as *Naegleria fowleri* is a potential hygienic problem, and factors associated with its occurrence remain poorly understood. This study was aimed at evaluating the impact of four cooling circuit materials, polyvinyl chloride, stainless steel, brass and titanium, as substrates on the growth dynamic of *N. fowleri* in a freshwater biofilm formed at 42°C. Colonization of the freshwater biofilms by *N. fowleri* was found to be effective on polyvinyl chloride, stainless steel and titanium. For these three cooling circuit materials favorable to the proliferation of *N. fowleri*, the ratio of bacterial prey/amoeba is found to be an essential parameter for the growth dynamic of *N. fowleri*. A maximum growth rate of 0.22 h^{-1} was associated with a generation time of ≈ 3 hours. In contrast, no colonization of *N. fowleri* was found in the presence of brass, an inhibition due to the presence of copper is therefore strongly suspected.

Keywords - *N. fowleri*, free living amoeba, freshwater biofilms, cooling circuit materials, copper.

1. Introduction

The use of fresh water for industrial processes, as in cooling water systems or drinking water networks, provides a favorable aquatic environment for the growth of highly diverse and ubiquitous microorganisms. From recent studies, it appears that biofilms readily grow on the extensive and diverse surfaces present in industrial water systems, such as heat exchangers, cooling towers, water tanks, etc. These biofilms are preferred ecological reservoirs for free-living amoebae (FLA), where they crawl to find nutrients (bacterial cells and dissolved organics) (Parry, 2004; Huws *et al.*, 2005; Loret *et al.*, 2005; Puzon *et al.*, 2009).

Among the large variety of FLA species present in these ecosystems *Naegleria fowleri* (*N. fowleri*), a thermotolerant amoeboflagellate of health-related interest, as it has been isolated as the causative agent of primary amoebic meningoencephalitis (PAM), a fatal central nervous system disease (Marciano-Cabral, 1988). (Behets *et al.*, 2007) showed that *N. fowleri* was the most frequently encountered thermotolerant FLA in the thermally enriched cooling water of a Belgian power plant. In a similar way, the survey of the cooling water in Lake Anna (Virginia, US) showed that of 16 sites sampled during the summer of 2007, nine were found to be positive for the presence of *N. fowleri* (Jamerson *et al.*, 2009).

Although the occurrence of this pathogenic FLA was reported, only a few studies have attempted to identify the factors that promote its occurrence, survival and growth. Only temperature has been reported as a key parameter (De Jonckheere *et Voorde*, 1977; Wellings *et al.*, 1977; Brown *et al.*, 1983; Tyndall *et al.*, 1989; Huizinga *et McLaughlin*, 1990; Jamerson *et al.*, 2009). However, the precise nature of its role is not fully understood. In addition, several authors suggested that many other known or unknown factors in addition to temperature could probably influence the potential of *N. fowleri* to colonize environments (De Jonckheere, 1977; Griffin, 1983).

In this context, and because industrial cooling water systems involve a wide range of materials, this study aims to evaluate and compare the growth dynamic of biofilm-associated *N. fowleri* in the freshwater biofilm formed on various cooling circuit materials. The choice of these cooling circuit materials (polyvinyl chloride, stainless steel, brass and titanium) is justified by their extensive use in cooling water systems. We have used flat-plate open channel reactors to produce biofilms spontaneously growing on the tested materials.

The reactors were fed by raw river water and installed in a laboratory facility with a protective level 3 (P3 laboratory). *N. fowleri* was inoculated into the circulating water; its density within the biofilms, as well as several chemical and biological parameters, were then followed for several runs conducted at 42 °C for 45 days each.

2. Materials and methods

2.1 *Naegleria fowleri* strain and growth conditions

The strain of *N. fowleri* AMI005 (EDF collection, LNHE, Chatou, France) had previously been isolated from the cooling water of a power station. The strain was grown (3 to 5 days) at 43°C on non-nutrient agar (NNA, Indicia Biotechnology, Oullins, France) previously overlaid with an *Escherichia coli* suspension and identified by the enzyme-linked immunosorbent assay (Indicia Biotechnology) using monoclonal antibody 5D12 (Pougnard *et al.*, 2002).

2.2 Experimental setup

As previously described (Goudot *et al.*, 2012), a flat-plate open channel reactor was operated in continuous flow mode. The inlet flow and the recycle flow rate were maintained at 1.9 and 810 mL/min respectively. The hydraulic retention time was 24 hours. The flow presents a laminar velocity profile in the longitudinal direction characterized by a shear rate of 17 s⁻¹.

Four test campaigns (C1 to C4) were conducted for a period of 45 days each. Each test campaign was conducted with two reactors at the same time fed by the same inlet fresh water and each reactor had a different test material (polyvinyl chloride, stainless steel, brass, and titanium). In all, a total of 8 assays were performed (Table 1). In parallel to test materials, we put a control material (glass). In addition to test materials, we have systematically coupled with a control material (glass). This allowed us to compare and evaluate the reproducibility between assays and campaigns.

The fresh water (Loire River, France) was collected between February 2011 and March 2012 and stored in a mixed and refrigerated (4°C) tank for the duration of a run (~ 6 weeks). Microbial and physicochemical characteristics of the inlet water are presented in Table 2.

Except for the parameter of dried suspended solids, no drastic variation in water quality was noted.

For each assay, seven samples of three coupons were randomly collected every 2-7 days for analysis. The coupons were gently washed with 10 mL of bacteria-free phosphate buffer saline solution pH 7.4 (PBS), in order to remove cells and deposits not strongly attached to the support material (i.e. not considered part of the biofilm).

2.3 Setup of the Naegleria fowleri inoculation

As already described (Goudot *et al.*, 2012), a suspension of *N. fowleri* was prepared by scraping the front of an amoeba plate culture (see § 2.1) and poured into PBS. The suspension (trophozoite form only) was then injected into the reactor 24 hours after its startup in order to reach 10^5 trophozoites/L.

2.4 Biofilm bacterial and free-living amoeba cell counts

The biofilm on the coupons was first removed by scraping with a sterile swab into 150 mL of bacteria-free PBS. Then the extracted biofilm and the coupons were treated with ultrasound for 10 min (ultrasonic bath, 140 W, 50/60 Hz; Fisher scientific).

The number of bacterial cells in the biofilm extracts was determined by epifluorescence microscopy by direct count of the cells recovered on a black Nucleopore filter with a membrane of 0.2 μm pore size, previously stained with the DNA fluorochrome SybrGreen I (S7567, InVitrogen).

The thermophilic FLA cells were counted by the most probable number (MPN) approach described by (Pougnard *et al.*, 2002). Immediately after collection, the sample was suspended by magnetic stirring, and five 1 mL replicates for each of a four-cascade ten-fold dilution were spread onto NNA plates previously overlaid with *E. coli*. The plates were incubated at 43°C and the presence of an amoebic migration front was assessed daily for 5 days by microscopic examination. To identify the *Naegleria* genus, positive samples were further analyzed to determine flagellation induction by incubating vegetative forms in demineralized water at 37°C for 2 h. Finally, *N. fowleri* was identified by the enzyme-linked immunosorbent assay (Indicia Biotechnology).

2.5 Statistical analysis

Comparisons between samples (assays) were assessed using ANOVA, where statistical significance was considered ($p < 0.05$). Statistical analyses were performed using XLSTAT Version 2010.1.01 (Addinsoft, Paris, France) and graphical representations were produced using SigmaPlot version 10.

3. Results

3.1 Bacterial biomass

The increase over time of the bacterial cell density in the biofilms developed on the different tested materials, polyvinyl chloride, stainless steel, brass and titanium indicates the colonization of the substrates by the bacteria (Fig. 1). This colonization is assumed to be the result of both attachment and growth of the bacteria. Similar results were obtained for the control material (data not shown).

Temporal analysis of the biofilm bacterial colonization kinetics reveals two major phases: a first phase from 0 to 3 days characterized by a fast increase in bacterial density, followed by a second phase from 3 to 45 days characterized by a slowdown in biofilm development. Comparison and classification of the different tested materials with regard to their ability to promote bacterial colonization is difficult, and no significant differences were noted between the assays. Nevertheless, the C3-R1-B assay, with reduced colonization and different phasing, appears to be an exception (Fig. 1).

3.2 Dynamic of the indigenous amoebae and *N. fowleri* in the biofilm

Figure 2 shows the thermophilic FLA cell and *N. fowleri* cell densities over time for all four campaigns.

For the two first test campaigns (C1 and C2), biofilms were developed on polyvinyl chloride (C1-R1-PVC and C2-R2-PVC) and stainless steel (C1-R1-SS and C2-R2-SS). Before *N. fowleri* was introduced at 24 h by a single injection into the circulating water, any thermophilic FLA was detected (< 0.3 amoeba/cm²). During the first seven days following injection, there was a significant increase in *N. fowleri*, with all the biofilms colonized in a range of 30 to 60 *N. fowleri*/cm². This clearly indicates transfer of *N. fowleri* from the bulk water to the substrates

and subsequently its growth in the biofilms. Then, between the 8th and 45th days, the densities remained relatively stable. The dynamics of biofilm colonization by the amoebae is not significantly different for the two materials tested (polyvinyl chloride and stainless steel). Moreover these colonizations of the biofilm by amoebae could only largely be explained by growth of *N. fowleri*, the main detectable thermophilic FLA. Similar results were obtained for control material (data not shown).

For the two other test campaigns (C3 and C4), biofilms were grown on brass (C3-R1-B and C4-R1-B) and titanium (C3-R2-T and C4-R2-T). The biofilms developed on brass do not significantly promote either thermophilic FLA or *N. fowleri*, insofar as their density never exceeds a maximum of 15 amoebae/cm² and 4 *N. fowleri*/cm²; most of the time the densities were around or below the detection limit (0.3 amoebae/cm²). In addition, compared with brass material, the control material was not differently colonized by *N. fowleri* and thermophilic FLA (data not shown).

In contrast, for biofilms developed on titanium, we noted a significant increase in thermophilic FLA during the first days, with a maximum of 40 amoebae/cm² for C3 and 200 amoebae/cm² for C4. After this time, the thermophilic FLA densities stabilized for C3, whereas a strong decrease to 1 to 10 amoebae/cm² was observed for C4. For *N. fowleri*, we noted for C3 that *N. fowleri* was again the main thermophilic FLA; however, for C4, the large difference between the *N. fowleri* and thermophilic FLA densities revealed the emergence of other indigenous amoebae presumed to belong to the genus *Hartmannella*. Similar colonization of thermophilic FLA and *N. fowleri* was noted on control material (data not shown).

Finally, *N. fowleri* is able to grow in the freshwater biofilm developed on polyvinyl chloride, stainless steel and titanium, whereas no amoebic colonization was found on brass.

3.3 Trophic relationships between bacteria and *Naegleria fowleri*

For five of the eight assays where growth of *N. fowleri* was noted, on polyvinyl chloride (C1-R1-PVC and C2-R2-PVC), stainless steel (C1-R1-SS and C2-R2-SS) and titanium (C3-R2-T), the apparent exponential growth rate (μ_{expo}) has been calculated as previously described (Goudot *et al.*, 2012). In Figure 3, these growth rates are plotted for the substrates versus the ratio between bacteria and amoebae (BAR). The BAR corresponds to the amount of prey available per amoeba in the biofilm at the time of injection of *N. fowleri* into the reactors.

The last three assays (C3-R1-B, C4-R1-B and C4-R2-T), in which no significant growth of *N. fowleri* was noted, were excluded from the curve.

The curve analysis (Fig. 3) demonstrates that the amount of prey available (BAR) controls the growth rate of *N. fowleri* (μ_{expo}). Indeed, an elevated BAR is associated with an elevated μ_{expo} . The curve can be fitted by the Monod relationship (hyperbola) with a coefficient $R^2=0.86$. From the equation of the fitted hyperbolic curve, we estimate the maximal growth rate at $\mu_{\text{max}}=0.22 \text{ h}^{-1}$ and the half saturation constant at $K_s=1.7 \times 10^5$ bacteria/amoeba. The corresponding generation time was ≈ 3 hours.

4. Discussion

In this study, we aimed to evaluate the impact of the biofilms developed on different cooling circuit materials as substrates for the growth of biofilm-associated *N. fowleri*.

Colonization of the surfaces by the bacteria was very fast and there were no clear differences in the formation of bacterial biofilms on different surfaces, with the exception of one of the two assays performed in the presence of brass (C3-R1-B). (Pedersen, 1990) had similar findings when studying the formation of bacterial biofilm on polyvinyl chloride, stainless steel and polyethylene.

After its introduction into the bulk water, *N. fowleri* was able to transfer and colonize the biofilms formed on three of the four different tested materials: polyvinyl chloride, stainless steel and titanium and for associated control material (glass). For these three materials, the nutritional availability represented by the BAR parameter appears to be a major criterion for *N. fowleri* growth. The maximum growth rate $\mu_{\text{max}}=0.22 \text{ h}^{-1}$ and the half saturation constant $K_s=1.7 \times 10^5$ bacteria/amoeba were comparable to those of a previous study conducted under the same operational conditions (temperature, system hydraulics, etc.) on glass (Goudot *et al.*, 2012).

Although, *N. fowleri* was usually present on the titanium material and associated control material, the encountered concentrations in the C4-R2-T assay were very low compared to the others assays, with the exception of assays performed with brass material (even though not significant with the MPN method). The low value of the ratio BAR for this assay ($< 10^5$ bacteria/amoeba) explained these results. The low ratio BAR was due to the early and high

implementation and growth of indigenous thermophilic FLA. These results suggested that the amoebic competitive inhibition which occurs in the biofilms does not favour the growth of *N. fowleri*.

On the other hand, the inhibition of biofilm colonization by *N. fowleri* observed in the presence of brass may be due to numerous and complex factors. However, some factors such as temperature, system hydraulics and water quality can be discounted, since they were controlled and uniform in all the campaigns or all the assays of the same campaign. Upon consideration, the best explanation for the inhibition of *N. fowleri* in the biofilms formed on brass could be the presence of a toxic such as copper, also reported as an antimicrobial agent. Indeed, while in small amounts copper is an essential trace element in most pro- and eukaryotic organisms, it can easily become toxic in excess. In our experiments, measurement of the dissolved copper in the water for all the assays showed that in the presence of brass coupons the dissolved copper concentration (30 to 110 µg/L) was 10 to 30 times greater than the copper concentration for other materials (under the detection limit of 3 µg/L). As a result, the action of dissolved copper on *N. fowleri* could be explained by two hypothetical mechanisms: (i) direct action of copper on *N. fowleri* and/or (ii) indirect action of copper on *N. fowleri* through a community-level effect due to interspecies interaction between amoebic community (predators) and bacterial community (prey) in the biofilm.

- (i) In the case of direct action, the presence of total copper at a mean concentration of 50 µg/L is assumed to be insufficient to kill *N. fowleri*. Indeed, in their works, (Cassells *et al.*, 1995) and (Pougnard, 2004) have already reported that electrolytically generated silver/copper concentrations up to 80 + 800 µg/L and a dissolved copper concentration of 500 µg/L respectively caused no significant inactivation of *N. fowleri* after 72h exposure.
- (ii) In the case of indirect action, the mechanism for the observed inhibition of biofilm colonization by *N. fowleri* would be due to the negative influence of dissolved copper on the nutritional resource of the amoebae (the bacterial community). Indeed, this phenomenon has already been demonstrated by (Fuma *et al.*, 2003), who have evaluated the effects of copper on a microcosm consisting of populations of the flagellate alga *Euglena gracilis* as a producer, the ciliate protozoan *Tetrahymena thermophila* as a consumer and the bacterium

Escherichia coli as a decomposer. The results showed that 6350 µg/L of copper extinguished first *E. coli* and then *T. thermophila* in the microcosm. No action was noted for the flagellate alga *Euglena gracilis*. The authors considered the extinction of *E. coli* to be a direct effect of copper, because 6350 µg/L of copper almost extinguished *E. coli* in a pure culture. In contrast, they considered that the extinction of *T. thermophila* in the microcosm was a community-level effect, because 6350 µg/L did not affect the cell density of *T. thermophila* in the pure-culture system. Under other conditions, other authors have shown the negative effects of copper on the biofilm bacterial community. For example, (Boivin *et al.*, 2006) showed that exposure to 432 µg/L of copper provoked distinct changes in the DGGE profiles of the bacterial consortia, which did not reverse upon copper depuration, in environmental biofilms. (Zhang *et al.*, 2006) reported that in wastewater biofilms, copper contamination selected for specific species that were able to tolerate this stress and that may contribute to its remediation.

Finally, after consideration of these two possibilities, it seems that the hypothesis of indirect inhibition of *N. fowleri* through its trophic relationship with the bacteria (prey-predator) is more accurate. However, this possibility remains to be confirmed because (i) although our results do not support direct action of copper on *N. fowleri* viability, it is conceivable that in our experiments the copper concentration of 30 to 100 µg/L was sufficient to inhibit the growth of *N. fowleri* and/or prevent its transfer to the biofilm, and (ii) we need to confirm the community-level effect of the copper and the bacterial count method because the inhibition of biofilm bacterial colonization was observed only for one (C3-R1-B) of the two tests performed in the presence of brass.

5. Conclusion

To conclude, colonization of freshwater biofilms by *N. fowleri* was effective for biofilms formed on polyvinyl chloride, stainless steel and titanium. For these three cooling circuit materials favorable to the proliferation of *N. fowleri*, the ratio of bacterial prey/amoeba is found to be an essential parameter for the growth dynamic of *N. fowleri*. A maximum growth rate of 0.22 h⁻¹ is associated with a generation time of ≈ 3 hours. In contrast, no colonization of *N. fowleri* was found in the presence of brass, and inhibition due to the

presence of copper is suspected. However, the exact action mechanism needs to be confirmed.

Acknowledgements

S. Barrouihlet (EDF R&D) is duly acknowledged for her excellent technical assistance. This work was supported by EDF. S. Goudot is the recipient of an industrial research training contract (CIFRE) between EDF and the ANRT (French National Association for Research and Technology).

References

- Behets J, Declerck P, Delaedt Y, Verelst L, Ollevier F (2007) Survey for the presence of specific free-living amoebae in cooling waters from Belgian power plants. *Parasitol Res* 100(6): 1249-1256.
- Boivin ME, Massieux B, Breure AM, Greve GD, Rutgers M *et al.* (2006) Functional recovery of biofilm bacterial communities after copper exposure. *Environ Pollut* 140(2): 239-246.
- Brown TJ, Cursons RT, Keys EA, Marks M, Miles M (1983) The occurrence and distribution of pathogenic free-living amoebae in thermal areas of the North Island of New Zealand. *N Z J Mar Freshwater Res*, 1983, 17: 59-69.
- Cassells JM, Yahya MT, Gerba CP, Rose JB (1995) Efficacy of a combined system of copper and silver and free chlorine for inactivation of *Naegleria fowleri* amoebas in water. *Water Sci Technol* 31: 119-122.
- De Jonckheere J (1977) Use of an axenic medium for differentiation between pathogenic and nonpathogenic *Naegleria fowleri* isolates. *Appl Environ Microbiol* 33(4): 751-757.
- De Jonckheere J, Voorde H (1977) The distribution of *Naegleria fowleri* in man-made thermal waters. *Am J Trop Med Hyg* 26(1): 10-15.
- Fuma S, Ishii N, Takeda H, Miyamoto K, Yanagisawa K *et al.* (2003) Ecological effects of various toxic agents on the aquatic microcosm in comparison with acute ionizing radiation. *J Environ Radioact* 67(1): 1-14.
- Goudot S, Herbelin P, Mathieu L, Soreau S, Banas S *et al.* (2012) Growth dynamic of *Naegleria fowleri* in a microbial freshwater biofilm. *Water Res Epub ahead of print*.
- Griffin JL (1983) The pathogenic amoeboflagellate *Naegleria fowleri*: environmental isolations, competitors, ecologic interactions, and the flagellate-empty habitat hypothesis. *J Protozool* 30(2): 403-409.
- Huizinga HW, McLaughlin GL (1990) Thermal ecology of *Naegleria fowleri* from a power plant cooling reservoir. *Appl Environ Microbiol* 56(7): 2200-2205.

- Huws SA, McBain AJ, Gilbert P (2005) Protozoan grazing and its impact upon population dynamics in biofilm communities. *J Appl Microbiol* 98(1): 238-244.
- Jamerson M, Remmers K, Cabral G, Marciano-Cabral F (2009) Survey for the presence of *Naegleria fowleri* amebae in lake water used to cool reactors at a nuclear power generating plant. *Parasitol Res* 104(5): 969-978.
- Loret JF, Robert S, Thomas V, Cooper AJ, McCoy WF *et al.* (2005) Comparison of disinfectants for biofilm, protozoa and *Legionella* control. *J Water Health* 3(4): 423-433.
- Marciano-Cabral F (1988) Biology of *Naegleria* spp. *Microbiol Rev* 52(1): 114-133.
- Page FC (1976) An illustrated key to freshwater and soil amoebae: Freshwater biological association. 155 p.
- Parry JD (2004) Protozoan grazing of freshwater biofilms. *Adv Appl Microbiol* 54: 167-196.
- Pedersen K (1990) Biofilm development on stainless steel and PVC surfaces in drinking water distribution systems. *Water Research* 24: 239-249.
- Pougnard C (2004) Etude du développement de l'amibe pathogène *N.fowleri* : Mise au point d'une technique de dénombrement rapide par cytométrie en phase = solide et analyse de l'influence de facteurs physico-chimiques.
- Pougnard C, Catala P, Drocourt JL, Legastelois S, Pernin P *et al.* (2002) Rapid detection and enumeration of *Naegleria fowleri* in surface waters by solid-phase cytometry. *Appl Environ Microbiol* 68(6): 3102-3107.
- Puzon GJ, Lancaster JA, Wylie JT, Plumb IJ (2009) Rapid detection of *Naegleria fowleri* in water distribution pipeline biofilms and drinking water samples. *Environ Sci Technol* 43(17): 6691-6696.
- Tyndall RL, Ironside KS, Metler PL, Tan EL, Hazen TC *et al.* (1989) Effect of thermal additions on the density and distribution of thermophilic amoebae and pathogenic *Naegleria fowleri* in a newly created cooling lake. *Appl Environ Microbiol* 55(3): 722-732.
- Wellings FM, Amuso PT, Chang SL, Lewis AL (1977) Isolation and identification of pathogenic *Naegleria* from Florida lakes. *Appl Environ Microbiol* 34(6): 661-667.

Zhang X, Brussee K, Coutinho CT, Rooney-Varga JN (2006) Chemical stress induced by copper: examination of a biofilm system. Water Sci Technol 57(9): 191-199.

Tables

Table. 1. Nomenclature of the assays.

Test campaign nomenclature	Nomenclature of the assays	
	Reactor 1 (R1)	Reactor 2 (R2)
Campaign No. 1 (C1)	polyvinyl chloride (C1-R1-PVC)	stainless steel (C1-R2-SS)
Campaign No. 2 (C2)	polyvinyl chloride (C2-R1-PVC)	stainless steel (C2-R2-SS)
Campaign No. 3 (C3)	brass (C3-R1-B)	titanium (C3-R2-T)
Campaign No. 4 (C4)	brass (C4-R1-B)	titanium (C4-R2-T)

Table. 2. Microbial and physico-chemical characteristics of the inlet freshwater. The freshwater was collected between February 2011 and March 2012.

Parameters	Unit	Campaign No.1 (C1)	Campaign No.2 (C2)	Campaign No.3 (C3)	Campaign No.4 (C4)
Date of collection	-	07/02/2011	19/04/2011	26/09/2011	07/03/2012
Thermophilic FLA	cells/L	<105 ^a	<105 ^a	<105 ^a	<105 ^a
<i>N. fowleri</i>	cells/L	<105 ^a	<105 ^a	<105 ^a	<105 ^a
Bacteria	cells/L	1.5×10 ⁸	2.3×10 ⁸	1.5×10 ⁸	1.8×10 ⁸
pH	pH unit	8.2	8.3	8.7	8.4
Dissolved Oxygen	mg/L	6.5	7.8	4.9	5.3
Conductivity	μS/cm	237	258	291	278
Dried suspended solids	mg/L	11	6	<2 ^a	9
Total organic carbon	mg/L	2.9	3.3	2.7	3.7
Dissolved organic carbon	mg/L	2.8	2.9	2.7	3.2
Calcium	mg/L	39	35	34	37
Magnesium	mg/L	5.5	6	6	5.6
Nitrates	mg/L	15	4.7	3.7	4.1
Nitrites	mg/L	0.05	0.09	<0.03 ^a	<0.03 ^a
Ammonium	mg/L	<0.05 ^a	0.08	<0.05 ^a	<0.05 ^a
Copper	μg/L	<5 ^a	<5 ^a	<5 ^a	<5 ^a

^a Detection limit

Figures captions

Fig. 1. Temporal fluctuations of the bacterial biofilm density under 42°C for all assays: polyvinyl chloride (green); stainless steel (red); titanium (blue); brass (pink)

Fig. 2. Temporal fluctuations of the amoebae in the biofilms under 42°C for campaigns C1-C4: thermophilic free-living amoebae (●▼) and *Naegleria fowleri* (○△). The arrow indicates the spike of *N. fowleri*.

Fig. 3. Variation of the apparent specific growth rate (μ_{expo}) as a function of the bacteria/amoeba ratio (BAR) for *N. fowleri* at 42°C calculated from 5 assays: C1-R1-PVC (●); C1-R2-SS (○); C2-R1-PVC (▼); C2-R2-SS (▽); C3-R2-T (■).

Figure 1

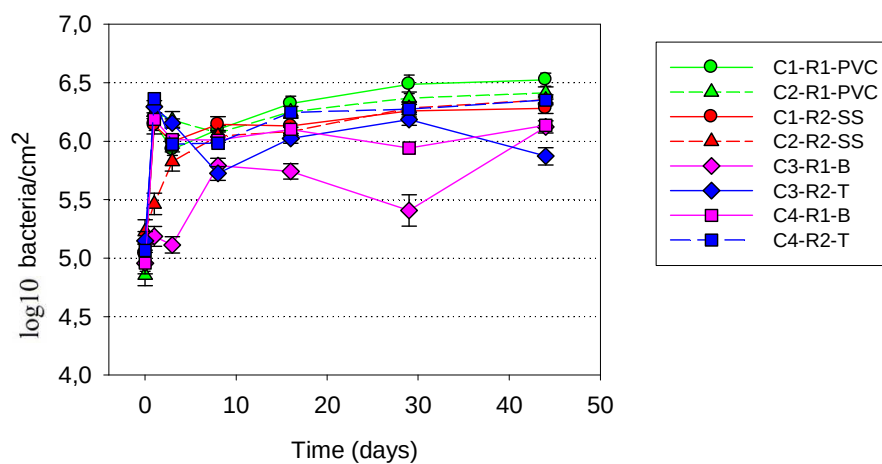


Fig. 1. Temporal fluctuations of the bacterial biofilm density under 42°C for all assays: polyvinyl chloride (green); stainless steel (red); titanium (blue); brass (pink)

Figure 2

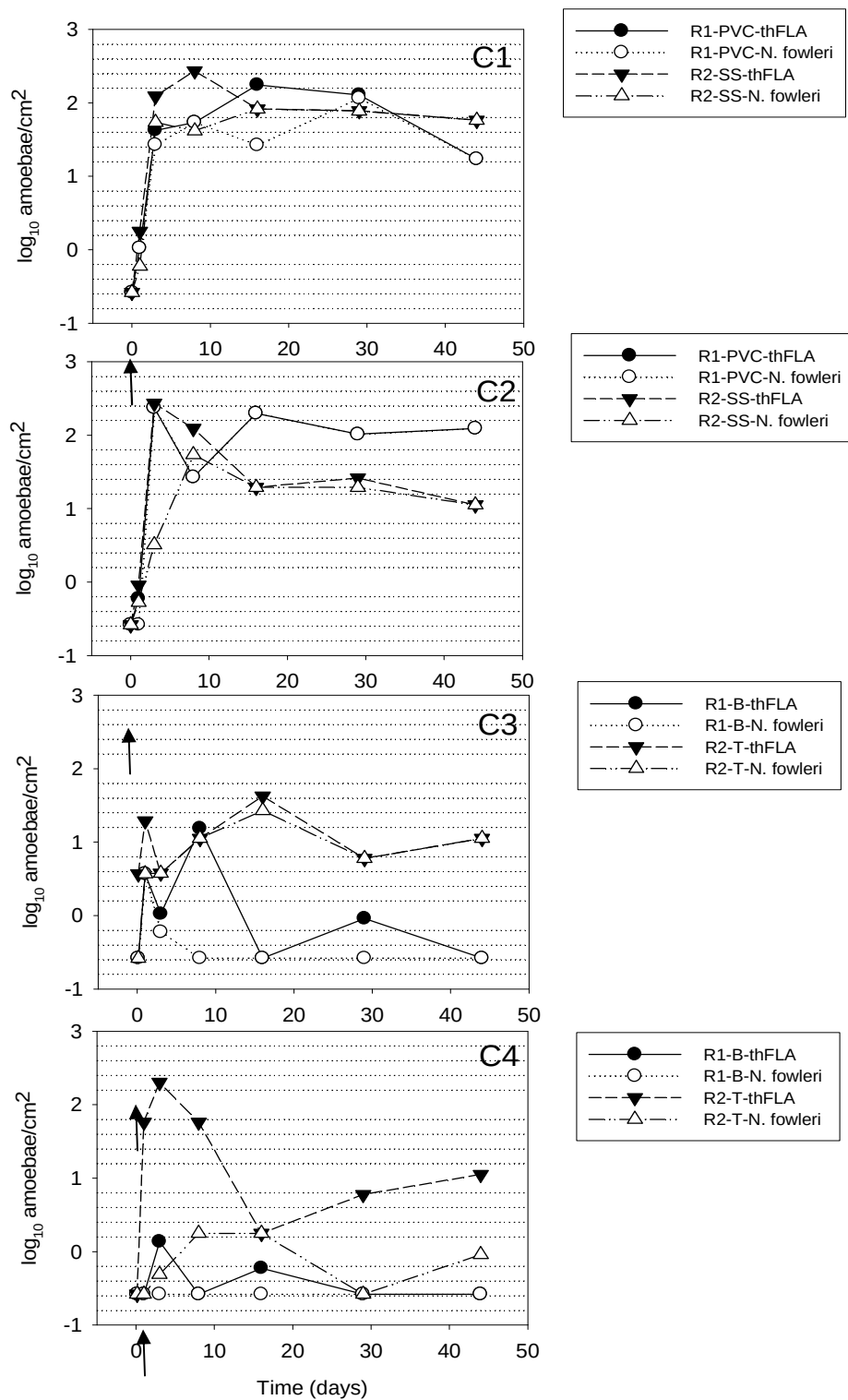


Fig. 2. Temporal fluctuations of the amoebae in the biofilms under 42°C for campaigns C1-C4: thermophilic free-living amoebae (●▼) and *Naegleria fowleri* (○△). The arrow indicates the spike of *N. fowleri*.

Figure 3

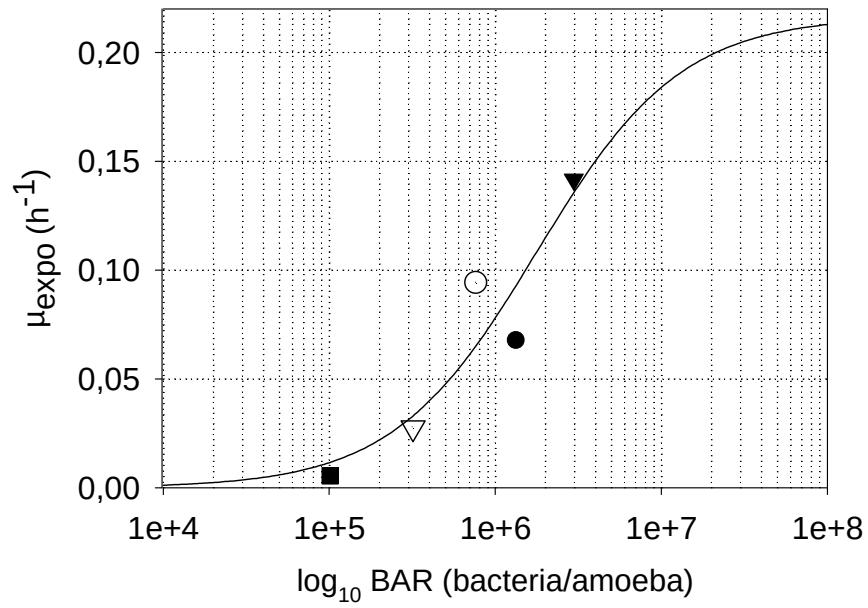


Fig. 3. Variation of the apparent specific growth rate (μ_{expo}) as a function of the bacteria/amoeba ratio (BAR) for *N. fowleri* at 42°C calculated from 5 assays: C1-R1-PVC (●); C1-R2-SS (○); C2-R1-PVC (▼); C2-R2-SS (▽); C3-R2-T (■).

CHAPITRE 5 : EFFICACITE D'UNE DESINFECTION A LA MONOCHLORAMINE SUR *Naegleria fowleri*

L'utilisation de réactifs chimiques reste la méthode la plus fréquemment employée pour désinfecter les réseaux et les circuits d'eau. Le plus souvent, la stratégie adoptée consiste à maintenir une concentration résiduelle de désinfectant suffisamment élevée pour maîtriser la prolifération microbienne dans l'eau. Les produits chimiques employés appartiennent souvent à la classe des biocides oxydants. Les données bibliographiques présentées au chapitre 1 mettent en exergue les potentialités du biofilm à réduire l'effet biocide du désinfectant.

En France, depuis plus d'une dizaine d'années, la problématique *N. fowleri* dans les circuits de refroidissement est traitée par l'utilisation comme agent oxydant de la monochloramine. Ce traitement présente globalement une bonne efficacité vis-à-vis des *N. fowleri* présentes dans l'eau, toutefois peu d'informations sont disponibles dans la littérature vis-à-vis de *N. fowleri* et des amibes du biofilm. Les informations disponibles sont principalement issues d'études internes à EDF. Ils montrent l'efficacité du traitement à la monochloramine vis-à-vis de *N. fowleri* lorsqu'il est mis en œuvre sur les circuits aux taux de traitement usuels. C'est dans ce contexte précis que s'inscrit le travail du présent chapitre, qui a pour objectif principal de mettre en évidence, s'il existe, le phénomène de protection que pourrait conférer le biofilm à *N. fowleri*. A défaut, de pouvoir réaliser les essais sur les réacteurs de laboratoire, en raison de l'impossibilité technique de maintenir un résiduel de monochloramine stable, deux approches de type « batch » ont été réalisées pour comparer les $Ct_{99\%}$ de *N. fowleri* seule, sous ses formes planctoniques trophozoïte et kystique, aux $Ct_{99\%}$ de *N. fowleri* en communauté sous ses formes associées au biofilm. Ce travail n'a pas permis de mettre en lumière un effet protecteur du biofilm contre l'action de la monochloramine. Par ailleurs, nous avons confirmé l'importance de l'état physiologique de *N. fowleri*, avec une résistance 5 fois supérieure de la forme kystique en comparaison à la forme trophozoïte vis-à-vis du traitement à la monochloramine.

Cette partie a fait l'objet de la soumission d'un article scientifique le 2 août 2012 dans la revue Water Research.

1. Monochloramine efficacy on planktonic and biofilm-associated *Naegleria fowleri* cells.

Sébastien Goudot^{a,b}, Pascaline Herbelin^{a*}, Laurence Mathieu^{b,c}, Sylvie Soreau^a, Sandrine Banas^b, Frédéric Jorand^{b*}

^a EDF Research and Development, Laboratoire National d'Hydraulique et Environnement, 6 Quai Watier, F-78401 Chatou Cedex, France.

^b Université de Lorraine, Laboratoire Chimie Physique et Microbiologie pour l'Environnement, UMR 7564 CNRS – UL, Institut Jean Barriol, 405 rue de Vandoeuvre F-54600 Villers-lès-Nancy, France.

^c Ecole Pratique des Hautes Etudes (EPHE), LCPME, UMR 7564 CNRS - Université de Lorraine, 15 avenue du Charmois F-54500 Vandoeuvre-lès-Nancy, France.

*Author contact information. Phone: +33 (0)1 30 87 84 68 / +33 (0)3 83 68 52 48

E-mail: pascaline.herbelin@edf.fr; frederic.jorand@univ-lorraine.fr

Abstract

Widespread in the environment, free-living amoebae (FLA) are found mainly in aqueous ecosystems, often with the surfaces where they graze on bacterial biofilms. The occurrence of FLA in these systems is a problem for water network managers and health authorities for two reasons: firstly some are pathogenic FLA as *Naegleria fowleri* responsible for primary amoebic meningoencephalitis and secondly, they have been reported to play the role of reservoir and vector of numerous pathogenic bacteria by promoting their survival and multiplication. Thus controlling these amoebae in man-made water systems such as cooling tower, hot water system or cooling circuits of nuclear plants is a priority. But there is general paucity of information on the efficacy of biocides against amoebae and particularly the fate of trophozoïtes and cysts within microbial biofilms following biocidal treatment is under-reported. The present study evaluates the efficacy of monochloramine against planktonic forms (trophozoïtes and cysts) and biofilm-associated forms of *N. fowleri* according to the models defined by Watson and Chick, determining biocide concentration x contact time (Ct) values. We demonstrated that monochloramine efficiency's may vary with *N. fowleri* life stages: first, monochloramine was effective on both planktonic and biofilm-associated *N. fowleri* cells with Ct values ranging from 4 to 17 mg Cl₂ min/L at 25°C and pH 8.2 in sterilized raw river water. Secondly, the inactivation pattern of biofilm-associated *N. fowleri* by monochloramine was intermediate between those for trophozoïtes and cysts, but nearer the cysts and far below the trophozoïtes inactivations. And finally, the biofilm-associated FLA cells, others than *N. fowleri*, expressed lower sensitivity to monochloramine. In terms of disinfectant sensitivity, it is suggested that the biofilm life-stage of amoebae trophozoïtes could be as important as their cyst form. This is a key point for *N. fowleri* control in water systems and a help to adapt treatment strategies against amoebae within the dual purpose of protection of health and environment.

Keywords - *N. fowleri*, free living amoeba, freshwater biofilms and monochloramine.

1. Introduction

Natural aquatic environments (rivers, lakes, springs) and man-made water systems (drinking water networks or poorly chlorinated swimming pools) are both common habitats of free-living amoebae (FLA) (Sibille *et al.*, 1998; Thomas *et al.*, 2004; Jamerson *et al.*, 2009). Some genera of these FLA are opportunistic or non-opportunistic pathogens capable of causing severe human diseases such as keratitis or gastroenteritis. One of the most serious diseases caused by FLA is primary amoebic meningoencephalitis, a fatal central nervous system disease. *N. fowleri* is the causative agent of this infection, which results from water containing amoebae entering the nasal cavity (Marciano-Cabral, 1988; Visvesvara *et al.*, 2007). This infection is rare and to date, less than 300 cases have been reported worldwide from 1965 to 2008. The occurrence of *N. fowleri* is associated with warmed water such as water from cooling systems, swimming pools or warm natural water.

In addition to being causative agents of infectious diseases, FLA have been reported to play the role of reservoir and vector of infectious bacteria by promoting the survival and multiplication of *Legionella pneumophila* (Fields *et al.*, 2002). Taking into account both their pathogenic properties and their interactions with pathogenic bacteria in aqueous environments, controlling amoeba in water is clearly a public health concern.

Disinfection is the main practice for controlling the wide variety of pathogenic microorganisms and reducing the level of microbiological diseases transmitted by contaminated waters. Despite increasing health concerns over FLA, there is still a lack of information on the mechanisms of action and efficacy of biocides on amoebae in real systems, and concerning their resistance to various biocides or disinfectants. Only few studies have investigated the chlorine impact on *Acanthamoeba* spp. trophozoïtes (Cursons *et al.*, 1980; Critchley et Bentham, 2009) and *Acanthamoeba* cysts, which are more resistant to disinfection (De Jonckheere et Voorde, 1977; Thomas *et al.*, 2004). For instance, trophozoïtes of *A. castellanii* exposed to 5 mg éq Cl₂/L exhibited cellular damage and a 99.9 % decrease in cultivability after 30 s of exposure at 25°C and pH 7 (Mogoa *et*

al., 2010). And, treatment of *Acanthamoeba* spp. cysts with chlorine concentrations as high as 50 or 100 mg/L, for 18 h or 10 min respectively, remained ineffective (Kilvington et Price, 1990; Storey *et al.*, 2004).

Chloramine is another chlorine compound widely used for water disinfection. Although less reactive than chlorine, it has the advantage of not forming disinfection by-products such as trihalomethanes. It also appears to diffuse better through the polymeric matrix of biofilms than other chlorine disinfectants (LeChevallier *et al.*, 1988; Tachikawa *et al.*, 2005). However, as in the case of chlorine, very few studies have been published exploring the inhibitory efficacy of monochloramine on amoebae. Moreover, all such studies were performed in a buffered liquid medium on a pure culture of amoeba species (Ercken *et al.*, 2003; Dupuy *et al.*, 2010; Mogoia *et al.*, 2011), not representative of natural ecology of amoeba.

Since bacteria are their main nutrient source, FLA are mainly found onto or near surfaces, where they graze on biofilm bacteria. It has been postulated that biofilm could also provide physical and chemical protection for FLA against predators and disinfectants (Barbeau et Buhler, 2001; Thomas *et al.*, 2004). Biofilms are therefore considered a major reservoir of FLA (Parry, 2004; Huws *et al.*, 2005; Pickup *et al.*, 2007; Puzon *et al.*, 2009; Goudot *et al.*, 2012). However, only one study has examined the efficacy of monochloramine disinfection on amoebic communities of biofilms. It found that a permanent monochloramine treatment of 0.5 mg/L for 3 months (35°C and pH 7.6) was ineffective against the amoebic community (all species) in both water and biofilm (Loret *et al.*, 2005).

Since 1980, French power plants monitor their cooling circuits for the presence of *N. fowleri*. In order to protect river users, particularly during recreational activities and to reduce health risks downstream from power plants, chemical or physical treatments are implemented in cooling water systems to control and inactivate the pathogens in the water. Currently in France, several water cooling circuits are treated with monochloramine to prevent microbiological risks.

In this context, the main objective of the present study was to evaluate the efficacy of monochloramine against biofilm-associated *N. fowleri*, using a biofilm reactor allowing the freshwater biofilms to develop from raw river waters and experimentally introduced *N. fowleri* (Goudot *et al.*, 2012). While there is no official, standardized method available for testing the efficacy of disinfectants on amoebae, we used the model defined by Watson and Chick to determine the $Ct_{99\%}$ (monochloramine concentration $\times$ contact time leading to an inactivation of 99% of the amoebic population). $Ct_{99\%}$ values were assessed for inactivation of the planktonic form of *N. fowleri* in both life stages: cysts and trophozoites. $Ct_{99\%}$ values were also assessed for the inactivation of biofilm-associated *N. fowleri*. Monochloramine has a biocidal effect on planktonic and biofilm-associated forms of *N. fowleri* (cyst and trophozoites) and its efficacy appears to depend primarily on the intrinsic resistance of the amoebae (cyst form), rather than the surrounding environment (water or biofilm).

2. Materials and methods

2.1 *N. fowleri* strain and culture conditions

The AMI005 strain of *N. fowleri* (EDF collection, LNHE, Chatou, France) was isolated from power station cooling water. It was grown (for 3 to 5 days) at 43°C on non-nutrient agar (NNA, Indicia Biotechnology, Oullins, France) previously overlaid with an *Escherichia coli* suspension and identified by an enzyme-linked immunosorbent assay (Indicia Biotechnology) using monoclonal antibody 5D12 (Pougnard *et al.*, 2002). Trophozoites were obtained after 2 days of culture by specific selection and sampling of the amoebic migration fronts from the culture dishes. The same thing was done for cysts after 5 days of culture.

2.2 *N. fowleri* and thermophilic free-living amoebic cell count technique

The thermophilic FLA were counted using the most probable number (MPN) approach described by (Pougnard *et al.*, 2002)). Immediately after collection, the sample was suspended by magnetic stirring and five 1 mL replicates of each concentration of a four-

cascade ten-fold dilution were spread onto NNA plates previously overlaid with *E. coli*. The plates were incubated at 43°C and the presence of an amoebic migration front was assessed daily for 5 days by microscopic examination. To identify the *Naegleria* genus, positive samples were further analyzed to determine the induction of flagellation by incubating vegetative forms in demineralized water at 37°C for 4 h. Finally, *N. fowleri* was identified using an enzyme-linked immunosorbent assay (Indicia Biotechnology).

2.3 Freshwater biofilm formation and set-up of *N. fowleri* inoculation

A flat-plate open channel reactor previously described by Goudot *et al.* (2012) was operated in continuous flow mode. The inlet flow and the recycle flow rate were maintained at 1.9 and 810 mL/min respectively. The hydraulic retention time was 24 h. The flow presents a laminar velocity profile in the length direction characterized by a shear rate of 17 s⁻¹.

The reactor was fed with inlet freshwater (Loire River, France), collected in June 2011 and stored in an agitated, refrigerated (4°C) tank for the duration of the experiments. Microbial and physical-chemical characteristics of the inlet water are presented in Table 1. The biofilm grew on glass slide coupons (8 × 2.5 × 0.1 cm, VWR, France) at the bottom of the reactor for at least 8 to 10 days. Averages of microbial and physical-chemical characteristics of the biofilm are presented in Table 2. As already described (Goudot *et al.*, 2012), a suspension of *N. fowleri* trophozoites prepared in PBS was injected into the reactor 24 h after its start-up in order to reach a final concentration of 10⁵ trophozoites/L.

2.4 Disinfection assays

2.4.1 Preparation of monochloramine

A monochloramine stock solution was prepared by mixing under agitation a sodium hypochlorite solution (152 g/L, ACROS Organics) in an ammonia solution (30%, ACROS Organics) at a Cl₂/N mass ratio of 4.8 and at a pH of 8.3. With these stoichiometric conditions, the theoretical concentration of the stock solution of monochloramine was

about 1000 mg Cl_2/L . Monochloramine solution was prepared daily and used extemporary. Its concentration was determined by the DPD method using Hach Methods 8167 on a DR/2500 spectrophotometer (Hach Company, Loveland , CO) at 530 nm.

2.4.2 Planktonic disinfection set-up

The assays of planktonic amoebae disinfection were performed in batch conditions. For each treatment assay, a volume of *N. fowleri* cell suspension (see §2.3) was transferred into 150 mL of autoclaved freshwater (the same as used to feed the reactor) (pH 8.2), resulting in a concentration of around 3×10^4 to 8×10^4 amoebae/L depending on the assays. The freshwater had previously been autoclaved in order to remove any naturally present amoebae. A volume of the monochloramine stock solution was then added to obtain a theoretical final concentration of 1 mg Cl_2/L . The concentration of monochloramine and the survival of *N. fowleri* trophozoïtes (assays T1 to T3) and cysts (assays C1 to C3) were regularly monitored for 60 min at 25°C under agitation (magnetic stirrer). Sterile sodium thiosulfate 0.1 M was added in excess for neutralization of oxidant residuals. For each experiment, control flasks without addition of monochloramine were performed in parallel and sampled at the beginning and end of the assay.

2.4.3 Biofilm disinfection set-up

Five disinfection assays were conducted on biofilm-associated amoebae. Three of the five trials (B1 to B3) were performed by fixing the concentration of monochloramine at 1 mg Cl_2/L and varying the contact time from 0 to 60 min. The two remaining assays (B4 and B5) were conducted by fixing the contact time at 60 min and varying the concentration of monochloramine from 0 to 0.5 mg Cl_2/L .

For each monochloramination assay 14 glass slide coupons colonized by an 8- to 10-day-old biofilm were sampled from the reactor and gently rinsed with sterile phosphate-buffered saline (PBS) in order to remove cells and deposits not strongly attached to the substrata (i.e. not considered a part of the biofilm), and transferred to 700 mL of autoclaved freshwater (pH 8.2). These biofilm samples were incubated at 25°C with

agitation and the monochloramine stock solution was added to reach the theoretical final concentration according to the assays. The concentration of monochloramine and the survival of the indigenous thermophilic FLA and *N. fowleri* were monitored over 60 min. Neutralization of residual monochloramine was done with sterile sodium thiosulfate 0.1M in excess. Controls without addition of the disinfectant were performed in parallel. For the enumeration of the FLA and *N. fowleri* cells within the biofilm, two glass slide coupons were scrapped with a swab (VWR, France) in 100 mL of bacteria-free PBS followed by ultrasound treatment for 10 min (ultrasonic bath, 140 Watts, 50/60 Hz; Fisher scientific) (Goudot *et al.*, 2012). Results are expressed as Ct_{99%} and disinfectant decay rates calculated as described in the SI.2.

2.5 Calculation of the Ct_{99%} and k disinfection rate

In order to evaluate the effectiveness of a disinfectant, the microbial inactivation (loss of cultivability) was recorded as a function of Ct (concentration × time), which corresponds to the disinfectant exposure (mg min/L). The Ct_{99%} is the Ct necessary for 2-log inactivation.

Calculation of the Ct is based on the Chick-Watson model (Chick, 1908; Watson, 1908) (equation 1), as follows:

$$\ln \frac{N}{N_0} = -kC^n t \quad (1)$$

where N is the concentration of microorganisms after exposure to disinfectant (amoebae/L or amoebae/cm²), N₀ is the concentration of amoebae prior to exposure to disinfectant (amoebae/L or amoebae/cm²), k is the inactivation rate constant (L/mg Cl₂ min), C is the disinfectant concentration (mg Cl₂/L), t is the time (min) and n is the disinfection dilution factor.

For planktonic disinfection assays, we assumed n=1. This assumption is supported by a previous planktonic disinfection study on *N. fowleri* (Leprince, 2000). Conversely for

biofilms, in our experiments, n was estimated to be equal to 0.94 (SI.1). Thus, the monochloramine inactivation of *N. fowleri* in water and biofilm corresponds to a first-order reaction that gives equal importance to the monochloramine concentration factor and the time factor. As a result, the Chick-Watson model (equation 1) can be simplified as follows (equation 2):

$$\ln \frac{N}{N_0} = -kCt \quad (2)$$

2.6 Statistical analysis

To define statistical significance, we used the non-parametric Mann-Whitney test using a 95% confidence level. All analyses were performed with SigmaPlot Version 10 (Systat Software).

3. Results

3.1 Inactivation of planktonic forms of *N. fowleri*

In order to assess the disinfection efficiency of monochloramine on planktonic forms of *N. fowleri*, suspensions of trophozoïtes and cysts were exposed for 60 min to initial concentrations of monochloramine ranging from 1.04 to 1.12 mg Cl₂/L (SI.2). Biocide consumption was monitored during the experiment and was less than 14% at the end of the experiments (SI.2). Monochloramine was thus assumed to be stable during the experiment time of 1 h.

Results of inactivation are shown as semi-log curves ($\log N/N_0$) as a function of the Ct value (mg Cl₂ min/L) (Fig. 1). Compared to the control samples (*N. fowleri* decrease <0.4 log), extensive amoebic inactivation (>2 log) took place during these experiments, indicating that monochloramine was effective at eradicating both planktonic trophozoïtes and cysts of *N. fowleri* under the experimental conditions (Fig. 1). The efficacy was 4.3 times higher for the trophozoïte than for the cyst form and Ct_{99%} values were evaluated at 3.6 to 3.9 mg Cl₂ min/L and 14.1 to 17.3 mg Cl₂ min/L, respectively. These Ct_{99%} values

correspond to disinfection rate coefficients (k) comprised between 0.50 and 0.58 L/mg Cl₂ min for the trophozoïtes and 0.12 and 0.14 L/mg Cl₂ min for the cysts (Fig. 2).

The statistical comparison of the efficacy of monochloramine confirmed the difference observed between trophozoïte and cyst forms, as well as between tests and controls (without monochloramine) ($p < 0.05$).

3.2 Inactivation of biofilm-associated *N. fowleri* cells

Before the introduction of *N. fowleri* on day 1, no indigenous thermophilic FLA or *N. fowleri* were detected in the freshwater biofilm (concentration below the detection limit of 0.3 amoeba/cm²) of the reactor. On day 1, two hours after its introduction into the bulk water, around 10 *N. fowleri*/cm² were found in the biofilm, indicating the transfer of *N. fowleri* to the substrata (Fig. 3). A significant increase in *N. fowleri* density, up to 200 - 300 *N. fowleri*/cm², then occurred during the first 3 days. After this point, the density remained quasi-stable until the 12th day. The amoebae were clearly visible by optical microscopy crawling the support surface and biofilms (Fig. 4). Over these periods, *N. fowleri* was the main detectable thermophilic FLA. Some other indigenous thermophilic FLA were detected but none were fully identified. However, using morphological criteria by optical microscopy (Page, 1976) and a non-recognized molecular method, the genus *Hartmanella* was presumed.

Biocidal assays were performed on the 8- to 10-day-old biofilm-associated *N. fowleri* using a batch approach as described in the experimental set-up. As in the batch assays with planktonic trophozoïtes, biocide consumption after 1 h at 25°C was low and represented less than 18% at the end of the experiment (SI.2). The monochloramine was thus assumed to be stable throughout the experiment. Compared with control samples (*N. fowleri* decrease <0.5 log), the cultivability of the amoebae was severely inactivated (≥ 3 log), indicating that monochloramine was effective in eradicating biofilm-associated *N. fowleri* cells (Fig. 5A). The Ct_{99%} values were evaluated at 8.6 to 16.1 mg Cl₂ min/L, for disinfection rate coefficients (k) comprised between 0.11 and 0.24 L/mg Cl₂ min (Fig. 2). Since the MPN

method for counting *N. fowleri* from a mixed suspension of biofilm cannot distinguish between the trophozoïte and cyst form, these data on biofilm-associated *N. fowleri* could refer to a mix of both trophozoïte and cyst forms.

In contrast, the decrease in the other biofilm-associated thermophilic FLA cells did not exceed a maximum of 2 log for Ct values, up to 60 mg Cl₂ min/L (Fig. 5B), indicating that monochloramine was less effective in eradicating indigenous thermophilic FLA associated with biofilm than those experimentally injected.

Statistical analyses confirmed this discrepancy as a significant difference in inhibition between biofilm-associated *N. fowleri* cells and other thermophilic FLA cells, as well as between test and control samples ($p < 0.05$).

4. Discussion

Widespread in nature, FLA are classical inhabitants of freshwater microbial ecosystems (Khan, 2006). They are thought to have a major impact on the dynamics of microbial biomass and particularly on multimicrobial biofilms by feeding on various microorganisms and contributing to the regulation of the biofilm dynamic and composition (Barbeau et Buhler, 2001; Huws *et al.*, 2005; Paris *et al.*, 2007). *N. fowleri* have been traced to recreational water-related activities and in domestic water sources (Marciano-Cabral, 1988; Tyndall *et al.*, 1989; Marciano-Cabral *et al.*, 2003) only in rare instances (Cabanes *et al.*, 2001). The majority of incidents are due to failures in the treatment process. One study revealed a positive association between *N. fowleri* isolation and a low free chlorine level (Easterman *et al.*, 1984).

Despite the FLA health concerns, there is a paucity of information concerning the mechanisms of action of biocides against amoeba and their inactivation efficiency.

In the present study we were mainly interested in testing the trophocidal and cysticidal activities of monochloramine (a disinfectant used in man-made water systems as power plants cooling circuits) against *N. fowleri* and sensitivity of the life-style stage of this pathogenic amoeba when exposed to monochloramine. We evaluated Ct values and

compared the inactivation by monochloramine of planktonic *versus* biofilm-associated *N. fowleri* cells and trophozoïtes *versus* cysts. We determined the disinfectant concentration x time (Ct) values leading to 2-log reduction of FLA, including *N. fowleri*.

Trophozoïtes are considered relatively sensitive to most chemicals, but cysts have been shown to be more resistant (Thomas *et al.*, 2004; Coulon *et al.*, 2010). For the first time, we determine that in its planktonic stage, *N. fowleri* cysts were five-fold more resistant to monochloramine than the trophozoïtes, and Ct_{99%} values ranged from around 15 to around 4 mg Cl₂/L min, respectively. This was in line with the scarce studies on *Naegleria* inactivation (De Jonckheere et Voorde, 1977; Chang, 1978). Recently, (Gerba *et al.*, 2009) found concentration time product for chlorine of 6 mg Cl₂ min/L for *N. fowleri* trophozoïtes and 31 mg Cl₂ min/L for cysts. The reason for a higher resistance of cysts to chlorine disinfection is due to the structure of the cysts that is hardier than that of the trophozoïtes (Visvesvara *et al.*, 2007).

The efficiency of the treatments was dependant on the target strain (Coulon *et al.*, 2010; Dupuy *et al.*, 2010) and led to morphological modifications (Mogoa *et al.*, 2011). Those authors speculated that monochloramine should have a different mode of action on amoebae trophozoïtes as compared to chlorine or chlorine dioxide.

Biofilm-associated amoebae have never been explored in terms of disinfectant sensitivity, while this life-style stage appeared to be of great importance in the survival of amoebae in the environment. Whereas it is well known that biofilm microorganisms are less susceptible to the effects of antimicrobial treatments (Behnke *et al.*, 2011), the fate of trophozoïtes and cysts within microbial biofilms following biocidal treatment is under-reported. Our pioneering results showed that the resistance of *N. fowleri* cells, within the freshwater biofilm exposed to monochloramine led to an intermediate ranking, compared to Ct values obtained for cysts or trophozoïtes. Concentration time products of 9 to 16 mg Cl₂ min/L were necessary for the inactivation of biofilm-associated *N. fowleri* cells, against < 4 mg Cl₂ min/L for trophozoïtes and 14-17 mg Cl₂ min/L for cysts. This means that

Naegleria trophozoïtes within biofilm could present a monochloramine resistance in the range of that of planktonic cysts.

One would have thought that biofilm-associated amoebae were more resistant than the planktonic cysts because of a protective role of biofilms widely described for bacteria (Berry *et al.*, 2010), but only suspected for amoeba.

Two main hypotheses could explain this discrepancy. Firstly, the freshwater biofilm on which we worked was relatively young and thin (Goudot *et al.*, 2012) and organised as cluster (Fig. 4). This probably facilitates the penetration of monochloramine, which is also well-recognized as a stable biocide with greater penetration than chlorine (Tachikawa *et al.*, 2005; Lee *et al.*, 2011). Thus the amoebae would have been more exposed to the oxidant. Secondly, *Naegleria fowleri* was a laboratory-grown strain experimentally inoculated in the reactor. As for bacterial strains, one also could expect a different behaviour between laboratory and environmental microorganisms, the latter being less sensitive to stress. This could be related to the better resistance to monochloramine of the indigenous thermophilic biofilm-associated FLA cells which displayed a different behaviour compared to the biofilm-associated *N. fowleri*. A 2 log-reduction of the indigenous FLA trophozoïtes was never reach within the biofilm even for Ct values >20 mg Cl₂ min/L, suggesting that low disinfectant levels have only limited activity on FLA (Thomas *et al.*, 2004). The better resistance of these indigenous thermophilic FLA could be explain both by the weak sensitivity of these genera to the action of oxidants and their localization within the biofilm.

Whether it is the life stage of the amoeba (trophozoïte or cyst) rather than its ecological niche (biofilm-associated or planktonic) that determines the disinfectant efficacy of monochloramine remains under question. Finally, our results provide for the first time disinfectant exposure values for *Naegleria fowleri* treatments in three life-style stages of the amoeba: trophozoïtes, cysts and biofilm-associated, that might be used as references for disinfection of freshwater systems and also improve our understanding of the persistence of *N. fowleri* in water systems.

5. Conclusions

Our work has compared for the first time the efficiency of monochloramine on *N. fowleri* in its planktonic and sessile life-stage and its trophozoïtes and cysts forms. This oxidant was efficient on trophozoïtes, cysts and biofilm-associated amoebae. However, its efficiency may vary with their life-style stages:

- o Monochloramine was effective on both planktonic and biofilm-associated *N. fowleri* cells in Ct values ranging from 4 to 17 mg Cl₂ min/L at 25°C and pH 8.2 in sterilized raw river water, corresponding to disinfection rate coefficients of 0.1 to 0.6 L/mg Cl₂ min.
- o The inactivation pattern of biofilm-associated *N. fowleri* by monochloramine was intermediate between those for trophozoïtes and cysts, but nearer the cysts and far below the trophozoïtes inactivation's.
- o Compared to *N. fowleri*, biofilm-associated FLA cells expressed lower sensitivity to monochloramine.

This study could contribute to efforts to control *N. fowleri* in water systems and help to adapt treatment strategies against amoebae within the dual purpose of protection of health and environment.

Acknowledgements

S. Morel, S. Barrouilhet, H. Salhi (EDF R&D) are duly acknowledged for their excellent technical assistance. This work was supported by EDF. S. Goudot is the recipient of an industrial research-training contract (CIFRE) between EDF and the ANRT (French national association of research and technology).

References

- Barbeau, J., Buhler, T., 2001. Biofilms augment the number of free-living amoebae in dental unit waterlines. *Res Microbiol* 152 (8), 753-760.
- Behnke, S., Parker, A. E., Woodall, D., Camper, A. K., 2011. Comparing the chlorine disinfection of detached biofilm clusters with those of sessile biofilms and planktonic cells in single- and dual-species cultures. *Appl Environ Microbiol* 77 (20), 7176-7184.
- Berry, D., Holder, D., Xi, C., Raskin, L., 2010. Comparative transcriptomics of the response of *Escherichia coli* to the disinfectant monochloramine and to growth conditions inducing monochloramine resistance. *Water Res* 44, 4942-4931.
- Cabanes, P. A., Wallet, F., Pringuez, E., Pernin, P., 2001. Assessing the risk of primary amoebic meningoencephalitis from swimming in the presence of environmental *Naegleria fowleri*. *Appl Environ Microbiol* 67, 2927-2931.
- Chang, S. L., 1978. Resistance of pathogenic *Naegleria* to some common physical and chemical agents. *Appl Environ Microbiol* 35 (2), 368-375.
- Chick, H., 1908. An Investigation of the Laws of Disinfection. *J Hyg (Lond)* 8 (1), 92-158.
- Coulon, C., Collignon, A., McDonnell, G., Thomas, V., 2010. Resistance of *Acanthamoeba* Cysts to Disinfection Treatments Used in Health Care Settings—*ç*. *J Clin Microbiol* 48 (8), 2689-2697.
- Critchley, M., Bentham, R., 2009. The efficacy of biocides and other chemical additives in cooling water systems in the control of amoebae. *Journal of Applied Microbiology* 106, 784-789.
- Cursons, R. T., Brown, T. J., Keys, E. A., 1980. Effect of disinfectants on pathogenic free-living amoebae: in axenic conditions. *Appl Environ Microbiol* 40 (1), 62-66.

- De Jonckheere, J., Voorde, H., 1977. The distribution of *Naegleria fowleri* in man-made thermal waters. *Am J Trop Med Hyg* 26 (1), 10-15.
- Dupuy, M., Mazoua, S., Berne, F., Bodet, C., Garrec, N., Herbelin, P., Menard-Szczebara, F. *et al.*, 2010. Efficiency of water disinfectants against *Legionella pneumophila* and *Acanthamoeba*. *Water Res* 45 (3), 1087-1094.
- Esterman, A., Dorsch, M., Cameron, S., Roder, D., Robinson, B., Lake, J., Christy, P., 1984. The association of *Naegleria fowleri* with chemical, microbiological and physical characteristics of south australian water supplies. *Water Research* 18, 549-553.
- Ercken, D., Verelst, L., Declerck, P., Duvivier, L., Van Damme, A., Ollervier, F., 2003. Effects of peracetic acid and monochloramine on the inactivation of *Naegleria lovaniensis*. *Water Sci Technol* 47 (3), 167-171.
- Fields, B. S., Benson, R. F., Besser, R. E., 2002. *Legionella* and Legionnaires' disease: 25 years of investigation. *Clin Microbiol Rev* 15 (3), 506-526.
- Gerba, C. P., Blair, B., Sarkar, P., Bright, K. R., MacLean, R., Marciano-Cabral, F. (2009) Occurrence and control of *Naegleria fowleri* in drinking water wells. Chapter 19, in *Giardia and Cryptosporidium: from molecule to disease*.: Ortega-Pierres *et al* (Eds), CAB International. 238-247 p.
- Goudot, S., Herbelin, P., Mathieu, L., Soreau, S., Banas, S., Jorand, F., 2012. Growth dynamic of *Naegleria fowleri* in a microbial freshwater biofilm. *Water Res* 46, 3958-3966.
- Huws, S. A., McBain, A. J., Gilbert, P., 2005. Protozoan grazing and its impact upon population dynamics in biofilm communities. *J Appl Microbiol* 98 (1), 238-244.
- Jamerson, M., Remmers, K., Cabral, G., Marciano-Cabral, F., 2009. Survey for the presence of *Naegleria fowleri* amebae in lake water used to cool reactors at a nuclear power generating plant. *Parasitol Res* 104 (5), 969-978.

- Khan, N. A., 2006. Acanthamoeba: biology and increasing importance in human health. FEMS Microbiol Rev 30, 564–595.
- Kilvington, S., Price, J., 1990. Survival of *Legionella pneumophila* within cysts of *Acanthamoeba polyphaga* following chlorine exposure. J Appl Bacteriol 68 (5), 519-525.
- LeChevallier, M. W., Cawthon, C. D., Lee, R. G., 1988. Inactivation of biofilm bacteria. Appl Environ Microbiol 54 (10), 2492-2499.
- Lee, H. W., Wahman, D. G., Bishop, P. L., Pressman, J. G., 2011. Free Chlorine and Monochloramine Application to Nitrifying Biofilm: Comparison of Biofilm Penetration, Activity, and Viability. Environ Sci Technol 45, 1412-1419.
- Leprince, S., 2000. Etude comparative de l'inactivation de l'inactivation des amibes libres du genre *Naegleria* par voie chimique et physique. Thèse de l'Université de Caen.
- Loret, J. F., Robert, S., Thomas, V., Cooper, A. J., McCoy, W. F., Levi, Y., 2005. Comparison of disinfectants for biofilm, protozoa and *Legionella* control. J Water Health 3 (4), 423-433.
- Marciano-Cabral, F., 1988. Biology of *Naegleria* spp. Microbiol Rev 52 (1), 114-133.
- Marciano-Cabral, F., MacLean, R., Mensah, A., LaPat-Polasko, L., 2003. Identification of *Naegleria fowleri* in domestic water sources by nested PCR. Appl Environ Microbiol 69 (10), 5864-5869.
- Mogoa, E., Bodet, C., Legube, B., Héchard, Y., 2010. Acanthamoeba castellanii: cellular changes induced by chlorination. Exp Parasitol 126 (1), 97-102.
- Mogoa, E., Bodet, C., Morel, F., Rodier, M. H., Legube, B., Héchard, Y., 2011. Cellular response of the amoeba *Acanthamoeba castellanii* to chlorine, chlorine dioxide, and monochloramine treatments. Appl Environ Microbiol 77 (14), 4974-4980.

- Pages, F. C. (1976) An illustrated key to freshwater and soil amoebae with notes on cultivation and ecology. The Ferry House Far Sawrey, Ambleside, Cumbria: Freshwater Biological Association, 155 pp.
- Paris, T., Skali-Lami, S., Block, J. C., 2007. Effect of wall shear rate on biofilm deposition and grazing in drinking water flow chambers. *Biotechnol Bioeng* 97 (6), 1550-1561.
- Parry, J. D., 2004. Protozoan grazing of freshwater biofilms. *Adv Appl Microbiol* 54, 167-196.
- Pickup, Z. L., Pickup, R., Parry, J. D., 2007. Effects of bacterial prey species and their concentration on growth of the amoebae *Acanthamoeba castellanii* and *Hartmannella vermiformis*. *Appl Environ Microbiol* 73 (8), 2631-2634.
- Pougnaud, C., Catala, P., Drocourt, J. L., Legastelois, S., Pernin, P., Pringuez, E., Lebaron, P., 2002. Rapid detection and enumeration of *Naegleria fowleri* in surface waters by solid-phase cytometry. *Appl Environ Microbiol* 68 (6), 3102-3107.
- Puzon, G. J., Lancaster, J. A., Wylie, J. T., Plumb, I. J., 2009. Rapid detection of *Naegleria fowleri* in water distribution pipeline biofilms and drinking water samples. *Environ Sci Technol* 43 (17), 6691-6696.
- Sibille, I., Sime-Ngando, T., Mathieu, L., Block, J. C., 1998. Protozoan bacterivory and *Escherichia coli* survival in drinking water distribution systems. *Appl Environ Microbiol* 64 (1), 197-202.
- Storey, M. V., Winiiecka-Krusnell, J., Ashbolt, N. J., Stenstrom, T. A., 2004. The efficacy of heat and chlorine treatment against thermotolerant *Acanthamoebae* and *Legionellae*. *Scand J Infect Dis* 36 (9), 656-662.
- Tachikawa, M., Tezuka, M., Morita, M., Isogai, K., Okada, S., 2005. Evaluation of some halogen biocides using a microbial biofilm system. *Water Res* 39 (17), 4126-4132.

- Thomas, V., Bouchez, T., Nicolas, V., Robert, S., Loret, J. F., Levi, Y., 2004. Amoebae in domestic water systems: resistance to disinfection treatments and implication in *Legionella* persistence. *J Appl Microbiol* 97 (5), 950-963.
- Tyndall, R. L., Ironside, K. S., Metler, P. L., Tan, E. L., Hazen, T. C., Fliermans, C. B., 1989. Effect of thermal additions on the density and distribution of thermophilic amoebae and pathogenic *Naegleria fowleri* in a newly created cooling lake. *Appl Environ Microbiol* 55 (3), 722-732.
- Visvesvara, G. S., Moura, H., Schuster, F. L., 2007. Pathogenic and opportunistic free-living amoebae: *Acanthamoeba* spp., *Balamuthia mandrillaris*, *Naegleria fowleri*, and *Sappinia diploidea*. *FEMS Immunol Med Microbiol* 50 (1), 1-26.
- Watson, H. E., 1908. A Note on the Variation of the Rate of Disinfection with Change in the Concentration of the Disinfectant. *J Hyg (Lond)* 8 (4), 536-542.

Tables

Table. 1. Microbial and physical-chemical characteristics of the river water (Loire, collected in June 2011) at the inlet of the reactor.

Parameters	Inlet water
Thermophilic FLA (cells/L)	<10 ⁵ ^a
<i>N. fowleri</i> cells (cells/L)	<10 ⁵ ^a
Bacteria (cells/L)	4.2×10 ⁸
pH	8.2
Conductivity (μS/cm)	288
DO ^b (mg/L)	5.6
TOC ^c (mg/L)	3.2
DOC ^d (mg/L)	2.9
DSS ^e (mg/L)	7

^a detection limit

^b dissolved oxygen

^c total organic carbon

^d dissolved organic carbon

^e dried suspended solids

Table. 2. Microbial and physical-chemical characteristics of the freshwater biofilm (standard deviations in brackets).

Parameters	Biofilm (n=3)
Thermophilic FLA (cells/cm ²)	392 (150)
<i>N. fowleri</i> cells (cells/cm ²)	295 (90)
Bacteria (cells/cm ²)	7.2×10 ⁵ (2.4×10 ⁵)
TOC ^a (mg/cm ²)	0.05 (0.02)
DSS ^b (mg/cm ²)	0.70 (0.24)

^a total organic carbon

^b dried suspended solids

Figure captions

Fig. 1: Reduction of the cultivability of planktonic *Naegleria fowleri* cells as a function of Ct values (monochloramine initial concentration of 1 mg CL₂/L during 60 min at 25°C), on trophozoïte forms (three independent assays: (T1)□, (T2)■, (T3)▲) or cyst forms (C1)□, (C2)□, (C3)△; controls without oxidant for trophozoïtes (◆) and cysts (◇). The straight line at the bottom indicates the detection limit.

Fig. 2: Disinfection rate coefficients (k) of *Naegleria fowleri* for planktonic trophozoïte (T1-T3); planktonic cysts (C1-C3), and biofilm-associated cells (B1-B5).

Fig. 3: Changes in cell density of thermophilic FLA cells (□) and *Naegleria fowleri* cells (□) in the biofilm over time, below 42°C. The black arrow indicates the *Naegleria fowleri* spike. The dashed arrow indicates the time at which the biofilm coupons were sampled for disinfection assays.

Fig. 4: Optical microscopy pictures of biofilm on glass coupon extracted from the reactor after *Naegleria fowleri* spike on the 10th day. A circle indicates biofilm-associated amoebae.

Fig. 5: Reduction of biofilm-associated *Naegleria fowleri* cells (A) and of biofilm-associated thermophilic FLA (B) as a function of Ct values of monochloramine treatment. With B1 (□); B2 (■); B3 (▲); B4 (◆); B5 (▼) and control (□). The grey tone points are those obtained from value below the detection limit.

Figure 1

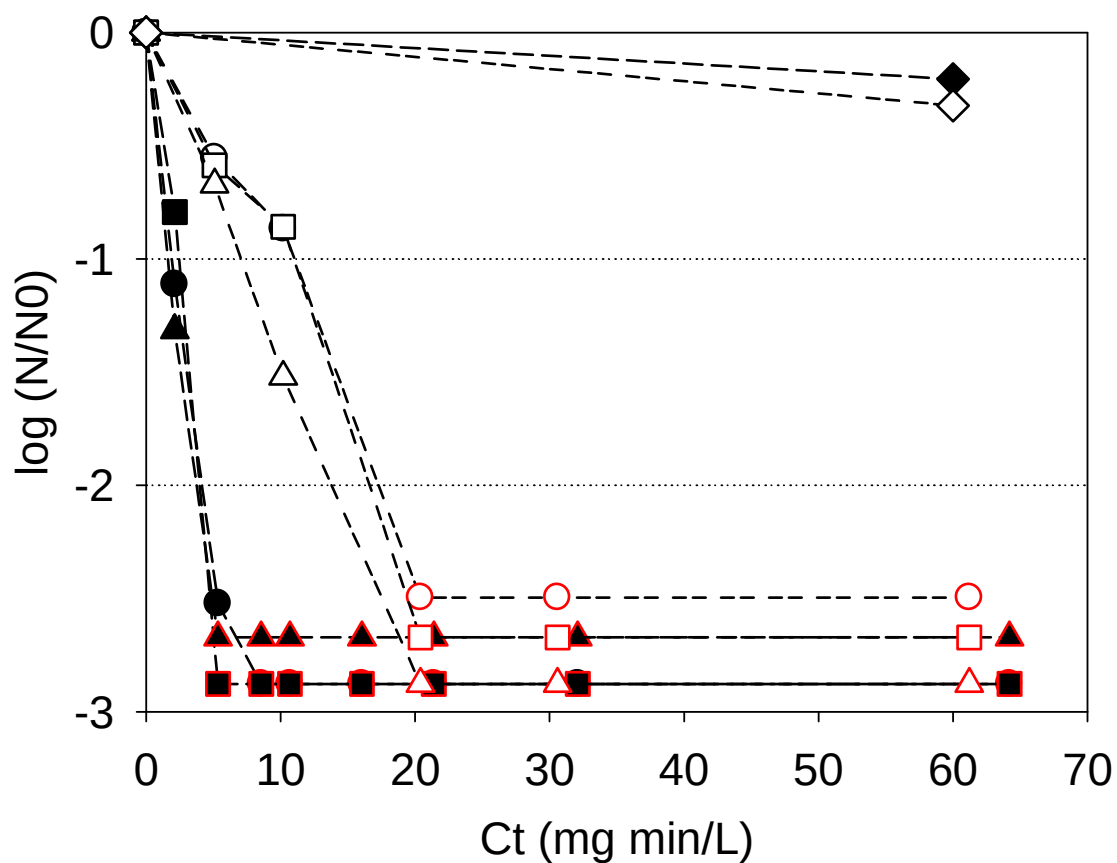


Fig. 1: Reduction of the cultivability of planktonic *Naegleria fowleri* cells as a function of Ct values (monochloramine initial concentration of 1 mg CL_2/L during 60 min at 25°C), on trophozoite forms (three independent assays: (T1)□, (T2)■, (T3)▲) or cyst forms (C1)□, (C2)□, (C3)△; controls without oxidant for trophozoites (◆) and cysts (◇). The straight line at the bottom indicates the detection limit.

Figure 2

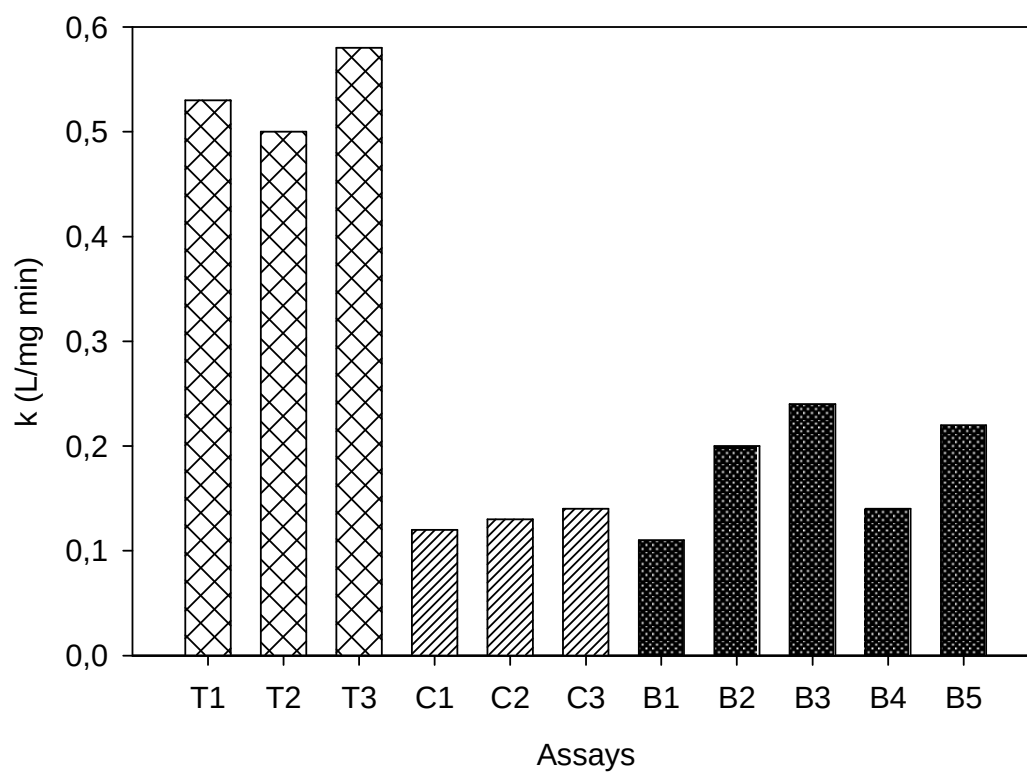


Fig. 2: Disinfection rate coefficients (k) of *Naegleria fowleri* for planktonic trophozoïte (T1-T3); planktonic cysts (C1-C3), and biofilm-associated cells (B1-B5).

Figure 3

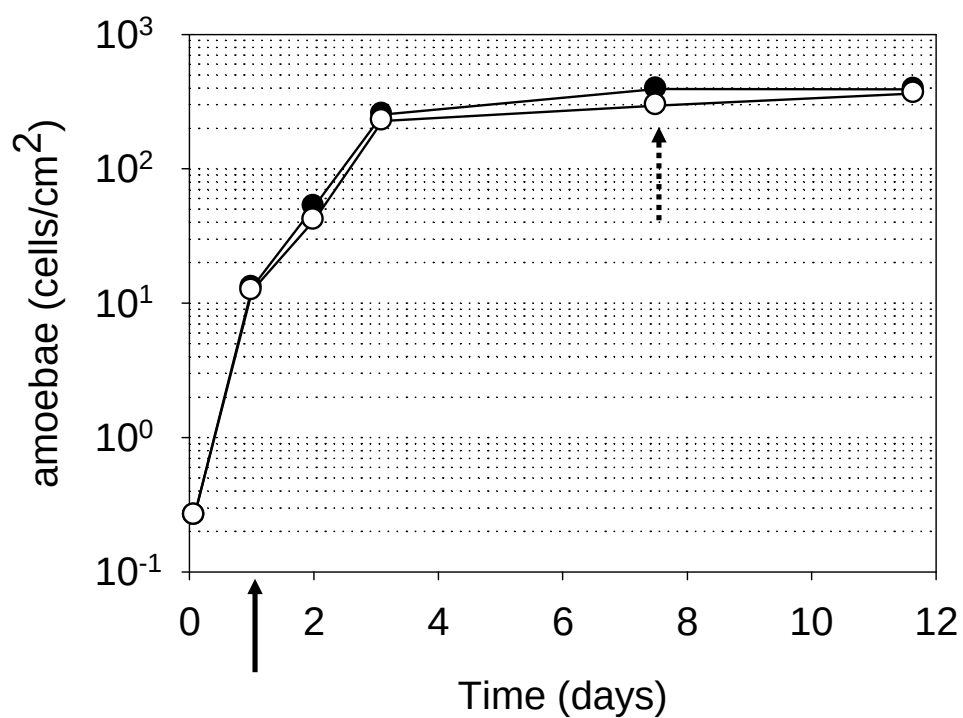


Fig. 3: Changes in cell density of thermophilic FLA cells (□) and *Naegleria fowleri* cells (●) in the biofilm over time, below 42°C. The black arrow indicates the *Naegleria fowleri* spike. The dashed arrow indicates the time at which the biofilm coupons were sampled for disinfection assays.

Figure 4

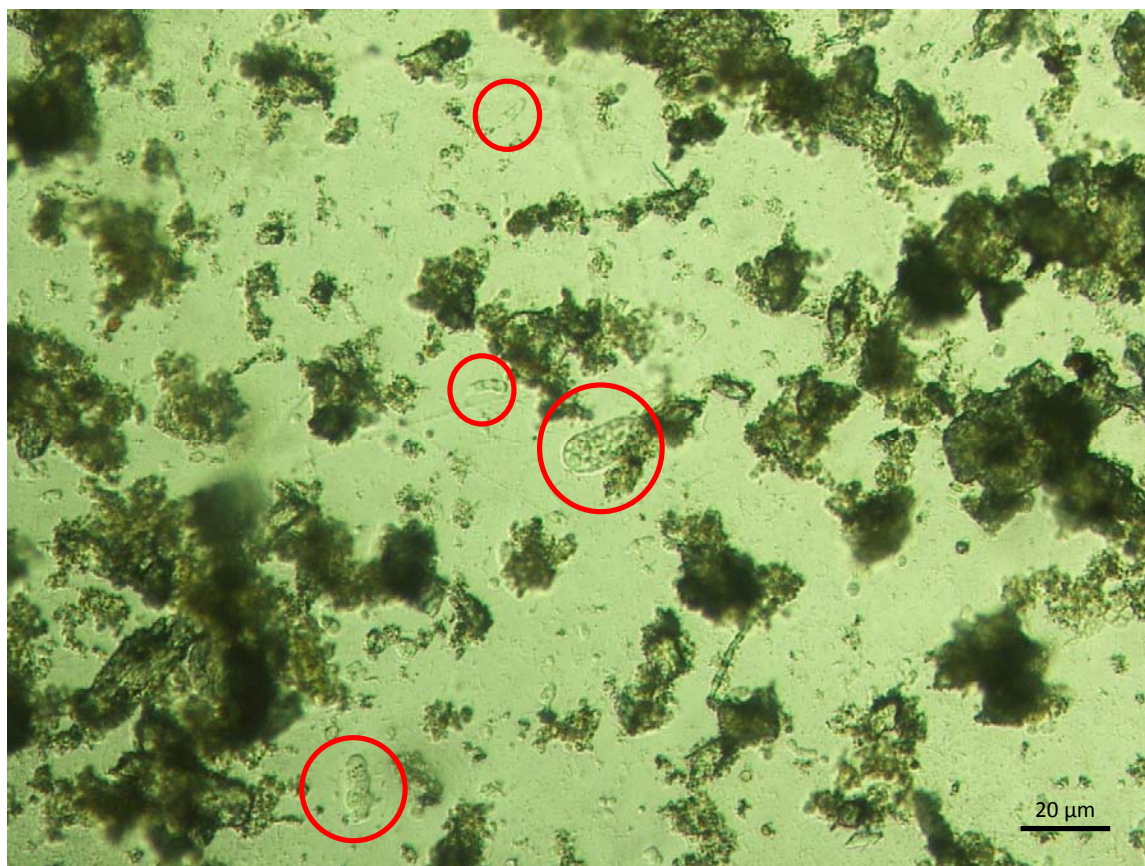


Fig. 4: Optical microscopy pictures of biofilm on glass coupon extracted from the reactor after *Naegleria fowleri* spike on the 10th day. A circle indicates biofilm-associated amoebae.

Figure 5

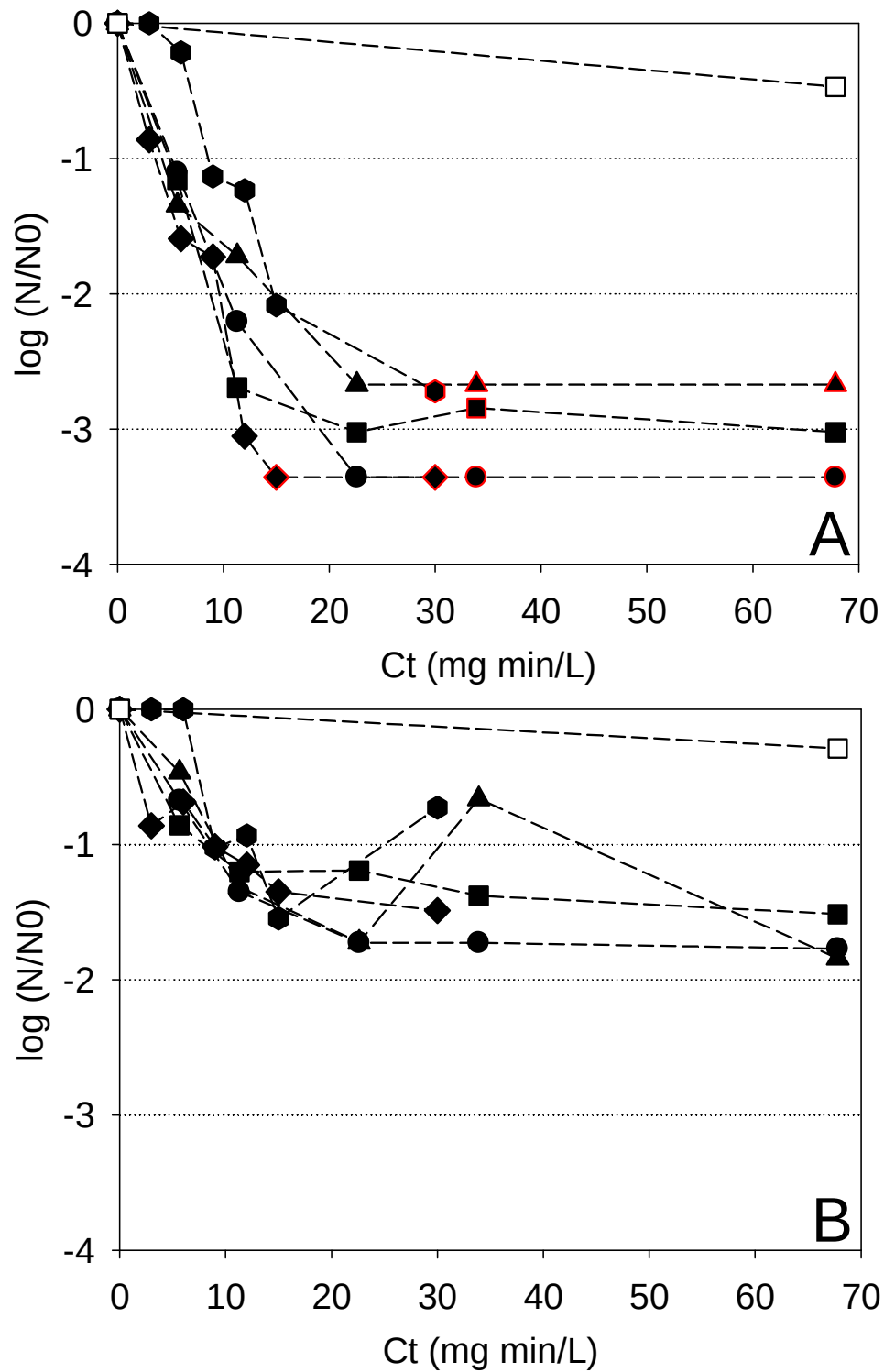


Fig. 5: Reduction of biofilm-associated *Naegleria fowleri* cells (A) and of biofilm-associated thermophilic FLA (B) as a function of Ct values of monochloramine treatment. With B1 (□); B2 (■); B3 (▲); B4 (◆); B5 (▼) and control (□). The grey tone points are those obtained from value below the detection limit.

Supplementary informations

SI. 1. Determination of the disinfection dilution factor for biofilms

Calculation of the disinfection dilution factor and is based on the Van't Hoff model (Van't Hoff, 1896) (equation 1), as follows:

$$K = C^n t \quad (1)$$

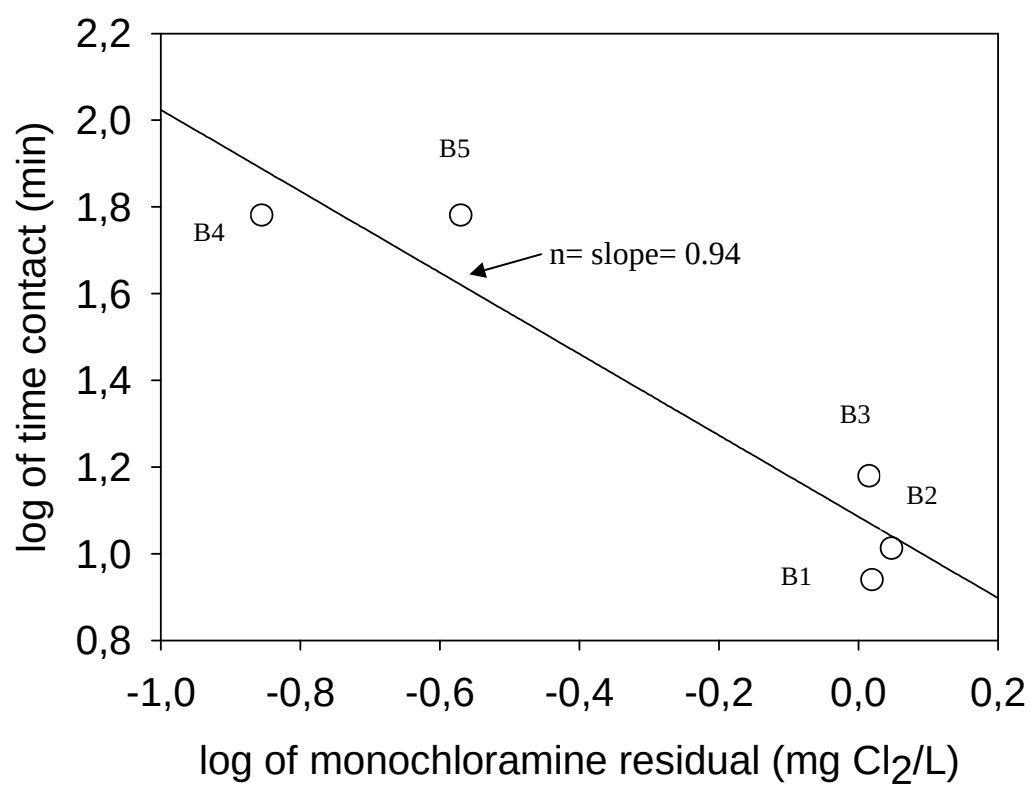
K being a constant, equation 1 can be expanded to (equation 2), as follows:

$$K = C_1^n t_1 = C_2^n t_2 \quad (2)$$

Hence,

$$n = \frac{\log(t_1 / t_2)}{\log(C_2 / C_1)} \quad (3)$$

Equation 3 indicates a linear relationship between the log of the contact time (t) and the log of the monochloramine concentration (C). Thus, for the five biofilm disinfection assays (B1 to B5), we plotted the log values of the contact time versus the log values of the monochloramine concentration (Watson, 1908), which enabled us to obtain a 99% reduction of the biofilm-associated *N. fowleri* population. The slope of the linear curve is minus the value of the dilution factor (n). In our experiments, n was estimated to be equal to 0.94.



SI. 2. Monochloramine consumption during the different tests.

	Experiment number	Initial concentration of monochloramine at T0 (mg Cl ₂ /L)	Final concentration of monochloramine at 60 min (mg Cl ₂ /L)	Consumption (%)
Inactivation of planktonic <i>N. fowleri</i> trophozoïtes	T1	1.12	1.06	5
	T2	1.05	1.00	8
	T3	1.04	0.96	8
Inactivation of planktonic <i>N. fowleri</i> cysts	C1	1.09	1.01	7
	C2	1.05	0.9	14
	C3	1.04	0.92	5
Inactivation of biofilm-associated <i>N. fowleri</i>	B1	1.13	1.03	9
	B2	1.13	0.93	18
	B3	0.86	0.78	9

CONCLUSIONS GENERALES ET PERSPECTIVES

La MEAP est une pathologie rare dont le diagnostic est encore méconnu d'un grand nombre de médecins et de biologistes. Le risque de contamination lié à l'inhalation de l'amibe *N. fowleri* est toujours d'actualité, dernièrement en 2011 aux Etats-Unis, cinq personnes sont décédées à la suite d'un contact avec l'amibe pathogène lors de l'utilisation d'eau potable ou d'épisodes de baignade en rivière.

Depuis le premier cas clinique diagnostiqué en 1965, l'intérêt porté par la communauté scientifique pour *N. fowleri* a contribué à fournir des données sur la biologie, la pathogénicité, l'épidémiologie et l'écologie de l'amibe. Il est intéressant de constater que l'émergence de cette amibe résulte le plus souvent de modifications d'origines naturelles ou anthropiques du milieu associées à un bouleversement des équilibres microbiens. A cette occasion, l'influence néfaste du réchauffement des eaux douces naturelles dû à des activités industrielles ou lié à des processus géochimiques a été démontrée à plusieurs reprises.

Longtemps oublié de la liste des niches écologiques potentielles des amibes libres et de *N. fowleri*, le biofilm est à ce jour décrit par la littérature scientifique comme une matrice privilégiée pour l'amibe pathogène. En la matière, les études menées par EDF ont établi le biofilm comme un foyer potentiel de multiplication et de dissémination de *N. fowleri* dans les circuits de refroidissement.

La survenue dans les années 80 de la problématique de la prolifération de *N. fowleri* sur certains CRFs installés en bordure de rivière est liée au remplacement progressif des tubes de condenseurs en laiton par des tubes en acier inoxydable. Dès lors, dans une démarche responsable de gestion du risque sanitaire et environnemental, en accord avec les autorités compétentes, EDF hygiénise les CRFs des installations concernées.

C'est dans ce contexte que notre étude a été initiée, le but étant de déterminer l'influence de trois paramètres fortement associés à la problématique industrielle: la température, la nature du matériau support et l'application d'un traitement à la monochloramine sur la dynamique de *N. fowleri* dans des biofilms naturels d'eau de surface. Les enjeux associés à cette étude sont d'une part, de vérifier/affiner pour la matrice biofilm certaines observations déjà établies dans l'eau ou dans les dépôts et, d'autre part de conforter/justifier certaines pratiques industrielles, comme le choix du matériau pour le retubage des condenseurs.

Cette étude a été réalisée via la mise en œuvre de réacteurs à biofilms alimentés en eau de rivière spécifiquement conçus et la mise au point d'un protocole permettant l'implantation de *Naegleria fowleri* pendant plusieurs semaines. Les résultats obtenus ont permis :

- **D'affiner le rôle de la température, facteur d'influence prépondérant, sur la dynamique de *N. fowleri* associée au biofilm.** En effet, le delta température de 10°C observé entre les deux températures d'essais, a fortement affecté le développement de *N. fowleri* dans le biofilm. Une température de 32°C n'a pas permis le développement de l'amibe mais autorise tout au plus sa persistance ou sa survie. A l'inverse, le maintien d'une température de 42°C a permis sa prolifération. Pour tenter d'expliquer cette différence de colonisation, le suivi de nombreux paramètres a été réalisé. Les résultats apportés ne permettent pas d'affirmer que cette différence de colonisation de *N. fowleri* dans les biofilms est attribuable à une structure particulière du biofilm.

- **De démontrer que les biofilms développés sur les matériaux : polychlorure de vinyle, acier inoxydable et titane sont propices à une colonisation par *N. fowleri*.**
A cette occasion nous avons démontré l'influence du ratio BAR sur la colonisation en *N. fowleri* indépendamment du matériau considéré (en dehors du laiton).
A l'inverse, nous avons conforté l'effet inhibiteur observé en présence de laiton, toutefois les éléments dont nous disposons ne permettent pas d'affirmer le mécanisme exact d'inhibition. En l'état, nous avançons deux hypothèses, la première concerne une action directe sur *N. fowleri* dans les biofilms par le cuivre issu du laiton. Cependant compte tenu des concentrations de cuivre observées dans l'eau, l'hypothèse la plus pertinente apparaît être la seconde, qui porte sur une inhibition indirecte de *N. fowleri* par l'action du cuivre sur le compartiment bactérien et donc une conséquence sur la disponibilité de la ressource nutritionnelle.

- **De démontrer que l'application d'une désinfection à la monochloramine est efficace sur tous les états de *N. fowleri*, planctonique ou associée au biofilm, kyste ou trophozoïtes dans la gamme 4 à 17 mg Cl₂ min/L à 25°C en eau de Loire.** Dans le détail, avec des Ct_{99%} respectivement de 14 à 17 mg Cl₂ min/L et moins de 4 mg Cl₂ min/L, les kystes de *N. fowleri* présentent une résistance 4 à 5 fois supérieure à un traitement à la monochloramine que celle des trophozoïtes dans la phase planctonique. D'autre part, sous sa forme associée au biofilm, il est nécessaire pour inactiver 2 log de *N. fowleri* d'appliquer un traitement à la monochloramine de 9 à 16

mg Cl₂ min/L. En définitive, l'inactivation de *N. fowleri* sous sa forme associée au biofilm est intermédiaire à l'inactivation des trophozoïtes et des kystes de *N. fowleri* sous leur forme planctonique.

- o **De mettre en évidence à 42°C une forte relation entre le taux de croissance de *N. fowleri* dans les biofilms et le ratio bactéries/amibe (BAR).** La vitesse de croissance maximale enregistrée de *N. fowleri* dans les biofilms est de 0,22 à 0,23 h⁻¹, soit un temps de génération (doublement de la population) minimum de 3 h. Le Ks (seuil à partir duquel la vitesse de croissance est divisée par moitié) a été estimé entre 1,2×10⁵ et 1,7×10⁵ bactéries/amibe. Plus généralement, les résultats montrent que des BAR < 10⁴ bactéries/amibe ne sont pas favorables à la croissance de *N. fowleri* dans les biofilms (vitesse de croissance nulle) et à l'inverse des BAR > 10⁴ bactéries/amibe sont associés à une croissance de l'amibe.
- o **De souligner l'influence des compétitions entre *N. fowleri* et d'autres genres et espèces d'amibes.** En effet, au cours de nos travaux, nous avons fréquemment remarqué la substitution de *N. fowleri* par d'autres genres, notamment *Hartmannella*.

La connaissance des concentrations de *N. fowleri* dans l'eau (Annexe 4), en complément de celles mesurées dans le biofilm est primordiale dans le contexte industriel de rejet des eaux de CRFs en rivière. C'est pourquoi des mesures de *N. fowleri* en suspension dans l'eau ont systématiquement été réalisées en marge des mesures dans les biofilms. Ces données ont été rassemblées dans l'Annexe 4 qui met en relation par classe les concentrations mesurées dans l'eau et celles mesurées dans le biofilm. Tout essai confondu, **la détection de *N. fowleri* dans l'eau est concomitante à sa présence dans le biofilm et vice versa.**

La réflexion globale qui ressort de cette étude est que **la dynamique de *N. fowleri* dans les biofilms (i.e. : survie, implantation, croissance, maintien, déclin) est principalement régie par la concomitance des facteurs température et ressource nutritive.** La nature du matériau support du biofilm, la désinfection à la monochloramine et la compétition amibienne, apparaissent plutôt comme des paramètres capables de perturber cette

dynamique. Toutefois, nous devons être prudents sur l'extrapolation de cette dernière analyse aussi bien vers les environnements complexes naturels que les environnements anthropiques. Nos conditions d'essais et l'état actuel de nos connaissances, ne permettent pas d'affirmer que dans des écosystèmes complexes, *N. fowleri* réagisse à l'identique de nos essais en réacteur de laboratoire.

La frontière objective que nous fixons à l'extrapolation aux CRFs de nos résultats en dehors du cadre de nos travaux, est en majeure partie dûe aux limites techniques que présente la démarche expérimentale engagée et on peut objectivement s'interroger sur :

- o La représentativité, au sens écologique et physiologique des cellules de *N. fowleri* entretenues sur gélose nutritive et artificiellement implantées en comparaison aux cellules environnementales.
- o La représentativité des biofilms développés dans notre système expérimental comparé aux biofilms environnementaux (âge, morphologie, composition).

La prise en compte des limites évoquées ci-dessus, nous amène à reconsidérer certaines de nos conclusions comme (i) l'absence de différence entre l'inactivation par la monochloramine de *N. fowleri* associée au biofilm ou seule dans l'eau ou encore (ii) l'observation de la faible compétitivité de *N. fowleri* face aux amibes indigènes du biofilm, même si de telles observations ont déjà été étayées dans la littérature. Il demeure dans l'immédiat que notre travail de recherche pourrait être utilisé à plusieurs égards. Dans une démarche d'anticipation des proliférations de *N. fowleri* sur les CRFs, nos travaux confirment l'importance de la température et mettent en avant l'importance de la ressource nutritive. Ces résultats pourraient permettre d'améliorer la recherche d'indicateurs pertinents pour aider au pilotage et à l'exploitation des CRFs, notamment pour optimiser les périodes, les cibles et la localisation des traitements à la monochloramine, mais également de surveiller des zones spécifiques des CRFs.

La suite de ce travail pourrait prendre plusieurs directions, pour valider les hypothèses retenues ou mettre en évidence d'autres paramètres de la dynamique de *N. fowleri*:

- o Dans un premier temps, sur les aspects matériaux i) valider les hypothèses sur l'effet des supports en laiton. ii) conforter les résultats obtenus sur les supports en titane iii)

investiguer le développement de *N. fowleri* dans des biofilms sur support béton, seul matériau constitutif des CRFs non testé à ce jour.

- o Dans un second temps, compléter les travaux engagés sur l'effet de la température, en envisageant de travailler à des températures inférieures, intermédiaires, et supérieures à la gamme 32-42°C, voire de faire varier la température au cours de l'incubation des biofilms.
- o Etudier les relations biotiques, en investiguant, l'influence de la charge bactérienne et des compétitions amibiennes, dans différentes conditions de température, matériaux support, ...
- o Exploiter les résultats obtenus sur les niveaux de colonisation amibiens dans l'eau en regard des colonisations dans le biofilm et approfondir par de nouveaux essais expérimentaux les relations entre ces deux compartiments.
- o Enfin, à terme, il est capital de valider les observations réalisées en laboratoire par des essais terrains, sur CRFs, de manière à se confronter à la complexité de ces systèmes et de palier aux limites techniques évoquées ci-dessus.

Bien que les travaux de poursuite soient nombreux, ce travail a contribué à faire avancer l'état des connaissances sur les amibes libres et surtout avoir mis en avant l'importance du biofilm dans la dynamique de prolifération de *N. fowleri*.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Abe Y., Skali-Lami S., Block J.C. et Francius G. (2012) Cohesiveness and hydrodynamic properties of young drinking water biofilms. *Water Res* 46: 1155-1166.
- Adl S.M., Simpson A.G., Farmer M.A., Andersen R.A., Anderson O.R., Barta J.R., *et al.* (2005) The new higher level classification of eukaryotes with emphasis on the taxonomy of protists. *J Eukaryot Microbiol* 52: 399-451.
- Alexander M. (1981) Why microbial predators and parasites do not eliminate their prey and hosts. *Annu Rev Microbiol* 35: 113-133.
- Alexeieff A. (1912) Sur les caractères cytologiques de la systématique des amibes du groupe limax et des amibes parasites des vertébrés. *Bulletin de la Société Zoologique de France*.
- Alonso P. et Zubiaur E. (1985) Phagocytic activity of three *Naegleria* strains in the presence of erythrocytes of various types. *J Protozool* 32: 661-664.
- Anderson K. et Jamieson A. (1972) Primary amoebic meningoencephalitis. *Lancet* 2: 379.
- Angrup A., Chandel L., Sood A., Thakur K. et Jaryal S.C. (2010) Primary amoebic meningoencephalitis due to *Naegleria fowleri*. *Journal of Institute of Medicine* 32: 56-59.
- Avery S.V., Howlett N.G. et Radice S. (1996) Copper toxicity towards *Saccharomyces cerevisiae*: dependence on plasma membrane fatty acid composition. *Appl Environ Microbiol* 62: 3960-3966.
- Awerinzew S. (1912) Beitrage zur Entwicklungsgeschichte von *Lagenophrys* sp. *Biologisches Centralblatt* 32: 714-718.
- Azam F., Fenchel T., Field J.G., Gray J.S., Meyer-Reil L.A. et Thindgtad F. (1983) The ecological role of water column microbes in the sea. *Mar. Ecol. prog. Ser.* 10: 257-263.
- Baker H. (1753) Employment for the Microscope. In Two Parts. *London*.
- Bakker D.P., van der Plaats A., Verkerke G.J., Busscher H.J. et van der Mei H.C. (2003) Comparison of velocity profiles for different flow chamber designs used in studies of microbial adhesion to surfaces. *Appl Environ Microbiol* 69: 6280-6287.
- Barbeau J. et Buhler T. (2001) Biofilms augment the number of free-living amoebae in dental unit waterlines. *Res Microbiol* 152: 753-760.
- Battin T.J., Kaplan L.A., Denis Newbold J. et Hansen C.M. (2003) Contributions of microbial biofilms to ecosystem processes in stream mesocosms. *Nature* 426: 439-442.

- Behets J., Declerck P., Delaedt Y., Verelst L. et Ollevier F. (2007) Survey for the presence of specific free-living amoebae in cooling waters from Belgian power plants. *Parasitol Res* 100: 1249-1256.
- Behnke S., Parker A.E., Woodall D. et Camper A.K. (2011) Comparing the chlorine disinfection of detached biofilm clusters with those of sessile biofilms and planktonic cells in single- and dual-species cultures. *Appl Environ Microbiol* 77: 7176-7184.
- Berry D., Holder D., Xi C. et Raskin L. (2010) Comparative transcriptomics of the response of *Escherichia coli* to the disinfectant monochloramine and to growth conditions inducing monochloramine resistance. *Water Res* 44: 4942-4931.
- Beurtin D., Festy B. et Georges P. (1986) Recherche de *Naegleria thermophiles* dans les boues de la station d'épuration d'Achères. *Bull Soc Fr Parasitol* 4: 205-206.
- Blair B., Sarkar P., Bright K.R., Marciano-Cabral F. et Gerba C.P. (2008) *Naegleria fowleri* in well water. *Emerg Infect Dis* 14: 1499-1501.
- Boe-Hansen R., Albrechtsen H.J., Arvin E. et Jorgensen C. (2002) Dynamics of biofilm formation in a model drinking water distribution system. *Journal of water supply: Research and Technology, Aqua* 51: 399-406.
- Boivin M.E., Massieux B., Breure A.M., Greve G.D., Rutgers M. et Admiraal W. (2006) Functional recovery of biofilm bacterial communities after copper exposure. *Environ Pollut.* 140: 239-246.
- Bottone E.J. (1993) Free-living amebas of the genera *Acanthamoeba* and *Naegleria*: an overview and basic microbiologic correlates. *Mt Sinai J Med* 60: 260-270.
- Bowers B. et Korn E.D. (1968) The fine structure of *Acanthamoeba castellanii*. I. The trophozoïte. *J Cell Biol* 39: 95-111.
- Briandet R., Meylheuc T., Maher C. et Bellon-Fontaine M.N. (1999) *Listeria monocytogenes* Scott A: cell surface charge, hydrophobicity, and electron donor and acceptor characteristics under different environmental growth conditions. *Appl Environ Microbiol* 65: 5328-5333.
- Brown T.J., Cursons R.T., Keys E.A., Marks M. et Miles M. (1983) The occurrence and distribution of pathogenic free-living amoebae in thermal areas of the North Island of New Zealand. *N. Z. J. Mar. Freshwater Res.*, 1983, 17: 59-69.
- Bryers J.D. et Characklis W.G. (1982) Processes governing primary biofilm formation. *Biotechnol Bioeng* 24: 2451-2476.

- Bulter H. et Rogerson A. (1997) Consumption rates of six species of marine benthic naked amoebae (*Gymnamoeba*) from sediments in the cycle sea area. *J. Mar. Biol. Assoc. UK* 77: 898-997.
- Busscher H.J. et van der Mei H.C. (2006) Microbial adhesion in flow displacement systems. *Clin Microbiol Rev* 19: 127-141.
- Cabanes P.A., Wallet F., Pringuez E. et Pernin P. (2001) Assessing the risk of primary amoebic meningoencephalitis from swimming in the presence of environmental *Naegleria fowleri*. *Appl. Environ. Microbiol.* 67: 2927-2931.
- Cappello S. et Guglielmino P.P. (2006) Effect of growth temperature on polystyrene adhesion of *Pseudomonas aeruginosa* ATCC27853. *Brazilian Journal of Microbiology* 37: 205-207.
- Carosi G., Scaglia M., Filicie G. et Willaert E. (1977) A comparative electron microscope study of axenically cultivated, trophozoïtes of free-living amoebae of the genus *Acanthamoeba* and *Naegleria* with spatial reference to the special *N. gruberi* (Schardinger, 1899), *N. fowleri* (Carter, 1970), and *N. jadini* (Willaert & Le Ray, 1973). *Arch. Protistendk* 273: 164-273.
- Carter R.F. (1970) Description of a *Naegleria* sp. isolated from two cases of primary amoebic meningo-encephalitis, and of the experimental pathological changes induced by it. *J Pathol* 100: 217-244.
- Caruzo G. et Cardozo J. (2008) Primary amoebic meningoencephalitis: a new case from Venezuela. *Trop Doct* 38: 256-257.
- Cassells J.M., Yahya M.T., Gerba C.P. et Rose J.B. (1995) Efficacy of a combined system of copper and silver and free chlorine for inactivation of *Naegleria fowleri* amoebas in water. *Water Sci Technol* 31: 119-122.
- Castellani A. (1930) An amoeba found in culture of yeast: preliminary note. *Journal of Tropical Medecine and Hygiene*.
- Cerva L. (1978) Some further characteristics of the growth of *Naegleria fowleri* and *N. gruberi* in axenic culture. *Folia Parasitol (Praha)* 25: 1-8.
- Cerva L. et Novak K. (1968) Amoebic meningoencephalitis: sixteen fatalities. *Science* 16: 92.
- Cerva L. et Simanov L. (1983) *Naegleria fowleri* in cooling circuits of industrial and power plants in North Moravia. *Folia Parasitol (Praha)* 30: 97-101.

- Cerva L., Serbus C. et Skocil V. (1973) Isolation of limax amoebae from the nasal mucosa of man. *Folia Parasitol (Praha)* 20: 97-103.
- Chamberlain A.H.L. (1992) The role of adsorbed layers in bacterial adhesion. *Biofilms-Sciences and Technology*. L. F. Melo and al. (eds): 59-67.
- Chandra J., Kuhn D.M., Mukherjee P.K., Hoyer L.L., McCormick T. et Ghannoum M.A. (2001) Biofilm formation by the fungal pathogen *Candida albicans*: development, architecture, and drug resistance. *J Bacteriol* 183: 5385-5394.
- Chang S.L. (1978) Resistance of pathogenic *Naegleria* to some common physical and chemical agents. *Appl Environ Microbiol* 35: 368-375.
- Characklis W. G. et Marshall K. (1989) *Biofilms*: Wiley-interscience publication, New York.
- Characklis W.G. (1990) Attached microbial growth-II. Frictional resistance due to microbial slimes. *Water Research* 7: 1-17.
- Chenier M.R., Beaumier D., Roy R., Driscoll B.T., Lawrence J.R. et Greer C.W. (2003) Impact of seasonal variations and nutrient inputs on nitrogen cycling and degradation of hexadecane by replicated river biofilms. *Appl Environ Microbiol* 69: 5170-5177.
- Chick H. (1908) An investigation of the laws of disinfection. *J Hyg (Lond)* 8: 92-158.
- Cimetière N. (2009) Etude de la décomposition de la monochloramine en milieu aqueux et réactivité avec des composés phénoliques Université de Poitiers. pp 206.
- Clarholm M. (1985) Interactions of bacteria, protozoa and plants leading to mineralization of soil nitrogen. *Soil Biol. Biochem* 17: 181-188.
- Cochran W.L., McFeters G.A. et Stewart P.S. (2000) Reduced susceptibility of thin *Pseudomonas aeruginosa* biofilms to hydrogen peroxide and monochloramine. *J Appl Microbiol.* 88: 22-30.
- Cordovilla P., Valdivia E., Gonzalez-Segura A., Galvez A., Martinez-Bueno M. et Maqueda M. (1993) Antagonistic action of the bacterium *Bacillus licheniformis* M-4 toward the amoeba *Naegleria fowleri*. *J Eukaryot Microbiol.* 40: 323-328.
- Coulon C., Collignon A., McDonnell G. et Thomas V. (2010) Resistance of *Acanthamoeba* Cysts to Disinfection Treatments Used in Health Care Settings. *J Clin Microbiol* 48: 2689-2697.
- Critchley M. et Bentham R. (2009) The efficacy of biocides and other chemical additives in cooling water systems in the control of amoebae. *Journal of Applied Microbiology* 106: 784-789.

- Cursons R.T., Brown T.J. et Keys E.A. (1980) Effect of disinfectants on pathogenic free-living amoebae: in axenic conditions. *Appl Environ Microbiol* 40: 62-66.
- Cursons R.T., Donald J.J., Brown T.J. et Keys E.A. (1979) Cultivation of pathogenic and nonpathogenic free-living amoebae. *J Parasitol* 65: 189-191.
- Davidson E.A., Stark J.M. et Firestone M.K. (1990) Microbial production and consumption of nitrate in an annual grassland. *Ecology* 71: 1968-1975.
- Davies D.G., Parsek M.R., Perason J.P., Igleswski B.H., Costerton J.W. et Greenberg E.P. (1998) The involvement of cell to cell signals in the development of a bacterial film. *Science* 280: 295-298.
- De Beer D., Srinivasan R. et Stewart P.S. (1994) Direct measurement of chlorine penetration into biofilms during disinfection. *Appl Environ Microbiol* 60: 4339-4344.
- De Jonckheere J. (1977) Use of an axenic medium for differentiation between pathogenic and nonpathogenic *Naegleria fowleri* isolates. *Appl Environ Microbiol* 33: 751-757.
- De Jonckheere J. et Voorde H. (1977) The distribution of *Naegleria fowleri* in man-made thermal waters. *Am J Trop Med Hyg* 26: 10-15.
- De Jonckheere J.F. (1978) Quantitative study of *Naegleria fowleri* in surface water. *Protistologica* 14: 475-481.
- De Jonckheere J.F. (1982) Hospital hydrotherapy pools treated with ultra violet light: bad bacteriological quality and presence of thermophilic *Naegleria*. *J Hyg (Lond)* 88: 205-214.
- De Jonckheere J.F. (2004) Molecular definition and the ubiquity of species in the genus *Naegleria*. *Protist* 155: 89-103.
- De Jonckheere J.F. (2011) The impact of man on the occurrence of the pathogenic free-living amoeboflagellate *Naegleria fowleri*. *Future Microbiol* 7: 5-7.
- Decave E., Garrivier D., Brechet Y., Fourcade B. et Bruckert F. (2002) Shear flow-induced detachment kinetics of *Dictyostelium discoideum* cells from solid substrate. *Biophys J* 82: 2383-2395.
- Decave E., Rieu D., Dalous J., Fache S., Brechet Y., Fourcade B., et al. (2003) Shear flow-induced motility of *Dictyostelium discoideum* cells on solid substrate. *J Cell Sci* 116: 4331-4343.
- Delattre J.M., Oger C. et Aprosi G. (1991) Interrelations between amoebae and bacteria in the Moselle river, France. *Water Science and Technology* 24: 193-195.

- DeNicola D.M. (1996) *Periphyton responses to temperature at different ecological levels*. San Diego.
- Detterline J.L. (1989) The occurrence of *Naegleria fowleri*: testing the flagellate-empty habitat hypothesis. *Doctoral Dissertation, Memphis State Univ, Memphis, Tennessee*.
- Detterline J.L. et Wilhelm W.E. (1991) Survey of pathogenic *Naegleria fowleri* and thermotolerant amebas in federal recreation waters. *Trans. Am. Microcos. Soc.* 110: 244-261.
- Diaz Villanueva V., Font J., Schwartz T. et Romani A.M. (2011) Biofilm formation at warming temperature: acceleration of microbial colonization and microbial interactive effects. *Biofouling* 27: 59-71.
- Dive D.G., Leclerc H., De Jonckheere J. et Delattre J.M. (1981) Isolation of *Naegleria fowleri* from the cooling pond of an electric power plant in France. *Ann Microbiol (Paris)* 132A: 97-105.
- Donlan R.M. (2002) Biofilms: Microbial Life on Surfaces. *Emerging Infectious Diseases*. 11, 9: 881-888.
- Doré M. (1989) Chimie des oxydants et traitement des eaux. *Technique et documentation, Lavoisier Ed., Paris*: 503 p.
- Dorsch M.M., Cameron A.S. et Robinson B.S. (1983) The epidemiology and control of primary amoebic meningoencephalitis with particular reference to South Australia. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 77: 372-377.
- Duirk S.E., Gombert B., Choi J. et Valentine R.L. (2002) Monochloramine loss in the presence of humic acid. *J Environ Monit.* 4: 85-89.
- Duirk S.E., Gombert B., Croué J.P. et Valentine R.L. (2005) Modeling monochloramine loss in the presence of natural organic matter. *Water Res.* 39: 3418-3431.
- Dujardin F. (1841) Histoire naturelle des zoophytes. Infusoires, comprenant la physiologie et la clasification de ces animaux et la manière de les étudier à l'aide du microscope. 684 pp. Librairie Encyclopédique de Roret, Paris.
- Duma R.J. (1980) Study of pathogenic free-living amebas in fresh-water lakes in Virgina. *Environmental Health Effects Research Series E.P.A., 600/S1-80-0-037, U.S. E.P.A.*
- Duma R.J. (1981) Study of pathogenic free amoebas in fresh-water lakes in Virginia. EPA No. 600/S1-080-0-037: 145.

- Dunne W.M., Jr. (2002) Bacterial adhesion: seen any good biofilms lately? *Clin Microbiol Rev* 15: 155-166.
- Dupuy M., Mazoua S., Berne F., Bodet C., Garrec N., Herbelin P., et al. (2010) Efficiency of water disinfectants against *Legionella pneumophila* and *Acanthamoeba*. *Water Res* 45: 1087-1094.
- Easterman A., Dorsch M., Cameron S., Roder D., Robinson B., Lake J. et Christy P. (1984) The association of *Naegleria fowleri* with chemical, microbiological and physical characteristics of south australian water supplies. *Water Res* 18: 549-553.
- Eddyani M., De Jonckheere J.F., Durnez L., Suykerbuyk P., Leirs H. et Portaels F. (2008) Occurrence of free-living amoebae in communities of low and high endemicity for Buruli ulcer in southern Benin. *Appl Environ Microbiol* 74: 6547-6553.
- Ercken D., Verelst L., Declerck P., Duvivier L., Van Damme A. et Ollervier F. (2003) Effects of peracetic acid and monochloramine on the inactivation of *Naegleria lovaniensis*. *Water Sci Technol* 47: 167-171.
- Fields B.S., Benson R.F. et Besser R.E. (2002) *Legionella* and Legionnaires' disease: 25 years of investigation. *Clin Microbiol Rev* 15: 506-526.
- Fliermans C.B., Tyndall R.L., Domigue E.L. et Willaert E.J.P. (1979) Isolation of *Naegleria fowleri* from artificially heated waters. *J. Therm. Biol.* 4: 303-305.
- Foret C. (2006) Maintien de la qualité des eaux dans les réseaux par des procédés innovants de traitement et de detection des biofilms. *Doctorat de l'Université de Poitiers*: 190 pp.
- Fowler M. et Carter R.F. (1965) Acute pyogenic meningitis probably due to *Acanthamoeba* sp.: a preliminary report. *Br Med J* 2: 740-742.
- Fuma S., Ishii N., Takeda H., Miyamoto K., Yanagisawa K., Ichimasa Y., et al. (2003) Ecological effects of various toxic agents on the aquatic microcosm in comparison with acute ionizing radiation. *J Environ Radioact.* 67: 1-14.
- Gerba C.P., Blair B., Sarkar P., Bright K.R., MacLean R. et Marciano-Cabral F. (2009) Occurrence and control of *Naegleria fowleri* in drinking water wells. Chapter 19, in *Giardia and Cryptosporidium: from molecule to disease*.: Ortega-Pierres et al (Eds), CAB International.
- Gogate A. et Deodhar L. (1985) Isolation and identification of pathogenic *Naegleria fowleri* (aerobia) from a swimming pool in Bombay. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 79: 134.

- Goordeva L.M. (1973) Isolation and cultivation of limax amoebae capable to grow at 37°C. *Progr Protozool* 139: 159.
- Goudot S. et Herbelin P. (2008) Rapport de stage de Master 2: Développement d'un réacteur à biofilm adapté à l'étude des amibes libres du genre *Naegleria*. 71 pp.
- Goudot S., Herbelin P., Mathieu L., Soreau S., Banas S. et Jorand F. (2012) Growth dynamic of *Naegleria fowleri* in a microbial freshwater biofilm. *Water Res* 46: 3958-3966.
- Granstrom (1954) The disproportionation of the monochloramine. *Ph.D. Thesis, Havard University, Cambridge, MA*. pp 111.
- Gray K.M. (1997) Intracellular communication and group behaviour in bacteria. *Hydrobiologia* 255: 247-253.
- Greub G. et Raoult D. (2004) Microorganisms resistant to free-living amoebae. *Clin Microbiol Rev* 17: 413-433.
- Griffin J.L. (1983) The pathogenic amoeboflagellate *Naegleria fowleri*: environmental isolations, competitors, ecologic interactions, and the flagellate-empty habitat hypothesis. *J Protozool* 30: 403-409.
- Gupta S. et Das S.R. (1999) Stock cultures of free-living amebas: effect of temperature on viability and pathogenicity. *J Parasitol* 85: 137-139.
- Hallam N.B., West J.R., Forster C.F. et Simms J. (2001) The potential for biofilm growth in water distribution systems. *Water Res* 35: 4063-4071.
- Harrington G.W., Noguera D.R., Bone C.C., Kandou A.I., Oldenburg J.M., Regan J.M. et Van Hoven D. (2003) Ammonia from chloramines decay: Effects on distribution system nitrification. *Denver, CO: AwwaRF and AWWA*.
- Heaton K., Drinkall J., Minett A., A.P. H. et Parry J.D. (2001) Ameoboid grazing on surface-associated prey. *Biofilm Community Interaction-Change or Necessity. Southeast Asian J Trop Med Public Health*. 32: 172-178.
- Herbelin P. (2006) Synthèse des contaminations en *Naegleria fowleri* et recherche d'éléments explicatifs des développements dans les circuits de refroidissement de CNPE. HP-P77-2006-01443-FR. pp 135.
- Hiernaux P. (2005) Contribution de la fraction minérale des eaux au développement et à la structure des biofilms: apport des méthodes microscopiques et spectrométriques. *Thèse de l'Université de Poitiers*.

- Huang C.T., Yu F.P., McFeters G.A. et Stewart P.S. (1995) Nonuniform spatial patterns of respiratory activity within biofilms during disinfection. *Appl Environ Microbiol.* 61: 2252-2256.
- Huizinga H.W. et McLaughlin G.L. (1990) Thermal ecology of *Naegleria fowleri* from a power plant cooling reservoir. *Appl Environ Microbiol* 56: 2200-2205.
- Huws S.A., McBain A.J. et Gilbert P. (2005) Protozoan grazing and its impact upon population dynamics in biofilm communities. *J Appl Microbiol* 98: 238-244.
- Ingols R.S. (1958) The effect of monochloramine and chromate on bacterial chromosomes. *Public Health Works* 89: 105-106.
- Jacangelo J.G., Olivieri V.P. et Kawata K. (1991) Investigating the Mechanism of Inactivation of *Escherichia coli* B by Monochloramine. *Journal of American Water Works Association* 83: 80-87.
- Jadin J.B. (1974) Les amibes dans les eaux. *Pathol. Biol* 22: 81-87.
- Jadin J.B., Hermanne J., Robyn G. et Willaert E. (1971) 3 cas de MEAP en Europe occidentale à Anvers. *Bull. Acad. Nat. Med* 155: 232-238.
- Jaffar-Bandjee M.C., Alessandri J.L., Molet B., Clouzeau J., Jacquemot L., Sampéris S. et Saly J.C. (2005) Primary amebic meningoencephalitis: 1st case observed in Madagascar. *Bull Soc Pathol Exot.* 98: 11-13.
- Jamerson M., Remmers K., Cabral G. et Marciano-Cabral F. (2009) Survey for the presence of *Naegleria fowleri* amoebae in lake water used to cool reactors at a nuclear power generating plant. *Parasitol Res* 104: 969-978.
- Jamieson A. et Anderson K. (1973) A method for the isolation of *Naegleria* species from water samples. *Pathology* 5: 55-58.
- Johannes R.E. (1965) Influence of marine protozoa on nutrient regeneration. *Limnol. Oceanogr* 10: 434-442.
- John D.T. (1982) Primary amebic meningoencephalitis and the biology of *Naegleria fowleri*. *Annu Rev Microbiol* 36: 101-123.
- John D.T. et Nussbaum S.L. (1983) *Naegleria fowleri* infection acquired by mice through swimming in amebae-contaminated water. *J Parasitol* 69: 871-874.
- Kadlec V., Cerva L. et Skvarova J. (1978) Virulent *Naegleria fowleri* in an indoor swimming pool. *Science* 201: 1025.

- Kasprzak W. (1974) Free-living, potentially pathogenic amoebae in natural environments. *Wiad Parazytol* 20: 244-246.
- Kasprzak W., Mazur T. et Cerva L. (1982) *Naegleria fowleri* in thermally polluted waters). *Folia Parasitol (Praha)* 29: 211-218.
- Khan N.A. (2006) *Acanthamoeba*: biology and increasing importance in human health. *FEMS Microbiol Rev* 30: 564–595.
- Khunkitti W., Lloyd D., Furr J.R. et Russell A.D. (1996) The lethal effects of biguanides on cysts and trophozoites of *Acanthamoeba castellanii*. *J Appl Bacteriol* 81: 73-77.
- Kilvington S. et Price J. (1990) Survival of *Legionella pneumophila* within cysts of *Acanthamoeba polyphaga* following chlorine exposure. *J Appl Bacteriol* 68: 519-525.
- Kilvington S. et Beeching J. (1995) Identification and epidemiological typing of *Naegleria fowleri* with DNA probes. *Appl Environ Microbiol* 61: 2071-2078.
- Kim B.R., Anderson J.E., Mueller S.A., Gaines W.A. et Kendall A.M. (2002) Literature review--efficacy of various disinfectants against *Legionella* in water systems. *Water Res* 36: 4433-4444.
- Kirisits M.J., Margolis J.J., Purevdorj-Gage B.L., Vaughan B., Chopp D.L., Stoodley P. et Parsek M.R. (2007) Influence of the hydrodynamic environment on quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *J Bacteriol* 189: 8357-8360.
- Kirmeyer G., Martel K., Thompson G. et Radder L. (2004) Optimizing chloramines treatment: 2nd Ed. *Denver, CO: AwwaRF and AWWA*.
- Kyle D.E. et Noblet G.P. (1985) Vertical distribution of potentially pathogenic free-living amoebae in freshwater lakes. *J Protozool* 32: 99-105.
- Kyle D.E. et Noblet G.P. (1986) Seasonal distribution of thermotolerant free-living amoebae. I. Willard's Pond. *J Protozool* 33: 422-434.
- Lawande R.V. (1983) Recovery of soil amoebae from the air during the harmattan in Zaria, Nigeria. *Ann Trop Med Parasitol* 77: 45-49.
- Lawande R.V., Ogunkanmi A.E. et Egler L.J. (1979) Prevalence of pathogenic free-living amoebae in Zaria, Nigeria. *Ann Trop Med Parasitol* 73: 51-56.
- Le-Brun M., Soreau S., Mataix V. et Colin-Gross N. (2004) Synthèse comparative des caractéristiques des dépôts formés dans les différents compartiments des circuits tertiaires semi-fermés des CNPE. HP-77/04/074/A.

- LeChevallier M.W., Cawthon C.D. et Lee R.G. (1988) Inactivation of biofilm bacteria. *Appl Environ Microbiol* 54: 2492-2499.
- Lee H.W., Wahman D.G., Bishop P.L. et Pressman J.G. (2011) Free chlorine and monochloramine application to nitrifying biofilm: comparison of biofilm penetration, activity, and viability. *Environ. Sci. Technol.* 45: 1412-1419.
- Lehtola M.J., Miettinen I.T., Lampola T., Hirvonen A., Vartiainen T. et Martikainen P.J. (2005) Pipeline materials modify the effectiveness of disinfectants in drinking water distribution systems. *Water Res* 39: 1962-1971.
- Lehtola M.J., Miettinen I.T., Keinänen M.M., Kekki T.K., Laine O., Hirvonen A., *et al.* (2004) Microbiology, chemistry and biofilm development in a pilot drinking water distribution system with copper and plastic pipes. *Water Res* 38: 3769-3779.
- Leprince S. (2000) Etude comparative de l'inactivation des amibes libres du genre *Naegleria* par voie chimique et physique, Université de Caen. pp 185.
- Lewandowski Z. et Beyenal H. (2007) *Fundamentals of BIOFILM RESEARCH*: CRC Press. Taylor and Francis Group. New York. pp 452.
- Loret J.F. et Greub G. (2010) Free-living amoebae: Biological by-passes in water treatment. *Int J Hyg Environ Health.* 213: 167-175.
- Loret J.F., Robert S., Thomas V., Cooper A.J., McCoy W.F. et Lévi Y. (2005) Comparison of disinfectants for biofilm, protozoa and *Legionella* control. *J Water Health* 3: 423-433.
- Lu Shih K. et Lederberg J. (1976) Effects of chloramine on *Bacillus subtilis* deoxyribonucleic acid. *J Bacteriol* 125: 934-945.
- Maclean R.C., Richardson D.J., LePardo R. et Marciano-Cabral F. (2004) The identification of *Naegleria fowleri* from water and soil samples by nested PCR. *Parasitol Res* 93: 211-217.
- Maillard J.Y. (2007) Bacterial resistance to biocides in the healthcare environment: should it be of genuine concern? *J Hosp Infect* 65 Suppl 2: 60-72.
- Marciano-Cabral F. (1988) Biology of *Naegleria* spp. *Microbiol Rev* 52: 114-133.
- Marciano-Cabral F., MacLean R., Mensah A. et LaPat-Polasko L. (2003) Identification of *Naegleria fowleri* in domestic water sources by nested PCR. *Appl Environ Microbiol* 69: 5864-5869.
- Martinez A.J. (1993) Free-living amebas: infection of the central nervous system. *Mt. Sinai J. Med* 60: 271-278.

- Martinez A.J. et De Jonckheere J. (1981) Les infections par les amibes libres. *Bull. Inst. Pasteur* 79: 171-205.
- Martinez A.J. et Visvesvara G.S. (1997) Free-living, amphizoic and opportunistic amebas. *Brain Pathol* 7: 583-598.
- Matz C., Bergfeld T., Rice S.A. et Kjelleberg S. (2004) Microcolonies, quorum sensing and cytotoxicity determine the survival of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms exposed to protozoa grazing. *Environmental Microbiology* 6: 218-226.
- Mayes D.F., Rogerson A., Marchant H. et Laybourn-Parry J. (1997) Growth and consumption rates bacterivorous Antarctic naked marine amoebae. *Mar. Ecol. Prog. Ser* 160: 101-108.
- Mogoa E., Bodet C., Legube B. et Héchard Y. (2010) *Acanthamoeba castellanii*: cellular changes induced by chlorination. *Exp Parasitol* 126: 97-102.
- Mogoa E., Bodet C., Morel F., Rodier M.H., Legube B. et Héchard Y. (2011) Cellular response of the amoeba *Acanthamoeba castellanii* to chlorine, chlorine dioxide, and monochloramine treatments. *Appl Environ Microbiol* 77: 4974-4980.
- Moller S., Korber D.R., Wolfaardt G.M., Molin S. et Caldwell D.E. (1997) Impact of nutrient composition on a degradative biofilm community. *Appl Environ Microbiol* 63: 2432-2438.
- Mollet B., Feki A., Haag R. et Kremer M. (1981) Isolement d'amibes libres par écouvillonnage nasal pratiqué chez 300 sujets sains. *Rev. Oto-Neuro-Ophtalmo* 53: 121-126.
- Moon E.K., Chung D.I., Hong Y.C., Ahn T.I. et Kong H.H. (2008) *Acanthamoeba castellanii*: gene profile of encystation by ESTs analysis and KOG assignment. *Exp Parasitol* 119: 111-116.
- Nelson E.C. (1972) *Va. J. Sci.* 23: 145.
- Newsome A.L. et Wilhelm W.E. (1983) Inhibition of *Naegleria fowleri* by microbial iron-chelating agents: ecological implications. *Appl Environ Microbiol* 45: 665-668.
- Newsome A.L., Baker R.L., Miller R.D. et Arnold R.R. (1985) Interactions between *Naegleria fowleri* and *Legionella pneumophila*. *Infect Immun* 50: 449-452.
- Noble R.T. et Fuhrman J.A. (1998) Use of SYBR Green I for rapid epifluorescence counts of marine viruses and bacteria. *Aquatic Microbial Ecology* 14: 113-118.
- O'Dell W.D. et Ramaley R.F. (1986) Incidence of *Naegleria* in thermal pools of Wyoming. *IVth Intl Conference on free-living amebas, Londres.*

- Oger C. (1988) Etude expérimentale de la contamination des circuits de refroidissement par les amibes pathogènes. HE31/88-45.
- Owens N.F., Gingell D. et Rutter P.R. (1987) Inhibition of cell adhesion by a synthetic polymer adsorbed to glass shown under defined hydrodynamic stress. *J Cell Sci* 87: 667-675.
- Page F.C. (1976) *An illustrated key to freshwater and soil amoebae*: Freshwater biological association. Freshwater Biological Association, Scientific Publication No. 34, Titus Wilson & Son Ltd.
- Parija S.C. et Jayakeerthe S.R. (1999) *Naegleria fowleri*: a free living amoeba of emerging medical importance. *J Commun Dis* 31: 153-159.
- Paris T. (2008) Formation et organisation de biofilms en milieu eau potable. Influence du gradient de vitesse pariétal Université Henri Poincaré. pp 182.
- Paris T., Skali-Lami S. et Block J.C. (2007) Effect of wall shear rate on biofilm deposition and grazing in drinking water flow chambers. *Biotechnol Bioeng* 97: 1550-1561.
- Parry J.D. (2004) Protozoan grazing of freshwater biofilms. *Adv Appl Microbiol* 54: 167-196.
- Pedersen K. (1990) Biofilm development on stainless steel and PVC surfaces in drinking water distribution systems. *Water Research* 24: 239-249.
- Pederson K. (1990) Biofilm development on stainless steel and PVC surfaces in drinking water. *Water Research* 24: 239-243.
- Pélandakis M. et Pernin P. (2002) Use of multiplex PCR and PCR restriction enzyme analysis for detection and exploration of the variability in the free-living amoeba *Naegleria* in the environment. *Appl Environ Microbiol* 68: 2061-2065.
- Pélandakis M., De Jonckheere J.F. et Pernin P. (1998) Genetic variation in the free-living amoeba *Naegleria fowleri*. *Appl Environ Microbiol* 64: 2977-2981.
- Pélandakis M., Serre S. et Pernin P. (2000) Analysis of the 5.8S rRNA gene and the internal transcribed spacers in *Naegleria* spp. and in *N. fowleri*. *J Eukaryot Microbiol.* 47: 116-121.
- Picioreanu C., van Loosdrecht M.C. et Heijnen J.J. (2001) Two-dimensional model of biofilm detachment caused by internal stress from liquid flow. *Biotechnol Bioeng* 72: 205-218.
- Pickup Z.L., Pickup R. et Parry J.D. (2007) Effects of bacterial prey species and their concentration on growth of the amoebae *Acanthamoeba castellanii* and *Hartmannella vermiformis*. *Appl Environ Microbiol* 73: 2631-2634.

- Pond K. (2005) Water recreation and disease. Plausibility of associated infections: acute effects, sequelae and mortality. *WHO ed., IWA, London, UK* : pp 259.
- Pougnard C. (2004) Etude du développement de l'amibe pathogène *N. fowleri* : Mise au point d'une technique de dénombrement rapide par cytométrie en phase solide et analyse de l'influence de facteurs physico-chimiques. Université de Lyon. pp 205.
- Pougnard C., Catala P., Drocourt J.L., Legastelois S., Pernin P., Pringuez E. et Lebaron P. (2002) Rapid detection and enumeration of *Naegleria fowleri* in surface waters by solid-phase cytometry. *Appl Environ Microbiol* 68: 3102-3107.
- Purevdorj B., Costerton J.W. et Stoodley P. (2002) Influence of hydrodynamics and cell signaling on the structure and behavior of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Appl Environ Microbiol* 68: 4457-4464.
- Puytorac P.D., Grain J. et Mignot J.P. (1987) Précis de protistologie. Paris: Société Nouvelle des Éditions de Boubée. pp 581.
- Puzon G.J., Lancaster J.A., Wylie J.T. et Plumb I.J. (2009) Rapid detection of *Naegleria fowleri* in water distribution pipeline biofilms and drinking water samples. *Environ Sci Technol* 43: 6691-6696.
- Reveiller F.L., Varenne M.P., Pougnard C., P.A. C., Pringuez E., Pourima B., (2003) An enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the identification of *Naegleria fowleri* in environmental water samples. *J Eukaryot Microbiol*. 50: 109-113.
- Rice J.K., Garey J., Mussali Y.G. et Puckorius P. (1993) Condenser microbiofouling control handbook. *EPRI Report TR-102507s*.
- Rickard A.H., McBain A.J., Stead A.T. et Gilbert P. (2004) Shear rate moderates community diversity in freshwater biofilms. *Appl Environ Microbiol* 70: 7426-7435.
- Rodriguez-Zaragoza S. (1994) Ecology of free-living amoebae. *Crit Rev Microbiol* 20: 225-241.
- Rogers J., Dowsett A.B., Dennis P.J., Lee J.V. et Keevil C.W. (1994) Influence of temperature and plumbing material selection on biofilm formation and growth of *Legionella pneumophila* in a model potable water system containing complex microbial flora. *Appl Environ Microbiol* 60: 1585-1592.
- Rogerson A. et Laybourn-Parry J. (1992) Aggregate dwelling protozooplankton communities in estuaries. *Arch. Hydrobiol* 125: 411-422.
- Rogerson A., Hannah F. et Gothe G. (1996) The grazing potential of some unusual marine benthic amoebae feeding on bacteria. *Europ. J. Protositol* 32: 271-279.

- Rondanelli E.G. et Scaglia M. (1987) Pathogenic amphizoic ameba (*Naegleria* - *Acanthamoeba* sp.) morphology and cytology. *Amphizoic Amoeba-Human Pathology*, Piccin publs., Padua, Italy: 87-125.
- Rösel von Rosenhof A.J. (1755) InsectenBelüstigung, Dritter Theil. *Nürnberg: Joann Joseph Fleischmann*: 433-550.
- Russell A.D. (1995) "Mechanisms of bacterial resistance to biocides." *International Biodeterioration & Biodegradation*: 247-265.
- Sanden G.N., Morrill W.E., Fields B.S., Breiman R.F. et Barbaree J.M. (1992) Incubation of water samples containing amoebae improves detection of legionellae by the culture method. *Appl Environ Microbiol* 58: 2001-2004.
- Scaglia M., Strosselli M., Grazioli V., Gatti S., Bernuzzi A.M. et de Jonckheere J.F. (1983) Isolation and identification of pathogenic *Naegleria australiensis* (Amoebida, *Vahlkampfiidae*) from a spa in northern Italy. *Appl Environ Microbiol* 46: 1282-1285.
- Schardinger F. (1899) Entwicklungskreis einer *Amoeba lobosa* (*Gymnamoeba*): *Amoeba gruberi*. *Sitzb. Kraislerl. Akad. Wiss. Wein. Abt.* 108: 713-734.
- Schmidt G.D. et Roberts L.S. (1995) Foundations of parasitology. *William C. Brown, Chicago, Ill.*
- Schuster F.L. (1975) Ultrastructure of cysts of *Naegleria* sp., a comparative study. *Journal of Protozoology* 22: 352-359.
- Schuster F.L. (2002) Cultivation of pathogenic and opportunistic free-living amebas. *Clin Microbiol Rev* 15: 342-354.
- Schuster F.L. et Visvesvara G.S. (2004) Opportunistic amoebae: challenges in prophylaxis and treatment. *Drug Resist Updat.* 7: 41-51.
- Seidel C.J., McGuire M.J., Summers R.S. et Via S. (2005) Have utilities switched to chloramines ? *Journal of American Water Works Association* 97: 87-97.
- Seker S., Beyenal H. et Tanyolaç A. (1995) Comparison of the bacterial dynamics in various French distribution systems. *Journal of water supply: Research and Technology* 44: 10-17.
- Shakoor S., Beg M.A., Mahmood S.F., Bandea R., Sriram R., Noman F., et al. (2011) Primary amebic meningoencephalitis caused by *Naegleria fowleri*, Karachi, Pakistan. *Emerg Infect Dis* 17: 258-261.

- Sheehan K.B., Fagg J.A., Ferris M.J. et Henson J.M. (2003) PCR detection and analysis of the free-living amoeba *Naegleria* in hot springs in Yellowstone and Grand Teton National Parks. *Appl Environ Microbiol* 69: 5914-5918.
- Sherr B.F., Sherr E.B. et Berman T. (1983) Grazing, growth, and ammonium excretion rates of a heterotrophic microflagellate fed with four species of bacteria. *Appl Environ Microbiol* 45: 1196-1201.
- Shingh B.N. (1975) Pathogenic and nonpathogenic amoebae. *John Wiley & Sons, Inc., New York, 1975*.
- Sibille I., Sime-Ngando T., Mathieu L. et Block J.C. (1998) Protozoan bacterivory and *Escherichia coli* survival in drinking water distribution systems. *Appl Environ Microbiol* 64: 197-202.
- Singh B.N. et Das S.R. (1972) Occurrence of pathogenic *Naegleria aerobia*, *Hartmanella culbertsoni* and *Hartmanella rhyodes* in sewage sludge samples of Lucknow. *Curr. Sci.* 41: 277-281.
- Squinazzi F. (2006) *BIOFILM ET MATERIAUX des réseaux intérieurs de distribution d'eau de la maîtrise des réseaux à la qualité de l'eau*. Laboratoire d'hygiène de la ville de Paris. pp 56.
- Stevens A.R., De Jonckheere J. et Willaert E. (1980) *Naegleria lovaniensis* new species: isolation and identification of six thermophilic strains of a new species found in association with *Naegleria fowleri*. *Int J Parasitol* 10: 51-64.
- Stevens A.R., Tyndall R.L., Coutant C.C. et Willaert E. (1977) Isolation of the etiological agent of primary amoebic meningoencephalitis from artificially heated waters. *Appl Environ Microbiol* 34: 701-705.
- Stewart P.S., Rayner J., Roe F. et Rees W.M. (2001) Biofilm penetration and disinfection efficacy of alkaline hypochlorite and chlorosulfamates. *J Appl Microbiol.* 91: 525-532.
- Stoodley P., Debeer D. et Lewandowski Z. (1994) Liquid Flow in Biofilm Systems. *Appl Environ Microbiol* 60: 2711-2716.
- Stoodley P., Dodds I., Boyle J.D. et Lappin-Scott H.M. (1998) Influence of hydrodynamics and nutrients on biofilm structure. *J Appl Microbiol* 85 Suppl 1: 19S-28S.
- Stoodley P., Wilson S., Hall-Stoodley L., Boyle J.D., Lappin-Scott H.M. et Costerton J.W. (2001) Growth and detachment of cell clusters from mature mixed-species biofilms. *Appl Environ Microbiol* 67: 5608-5613.

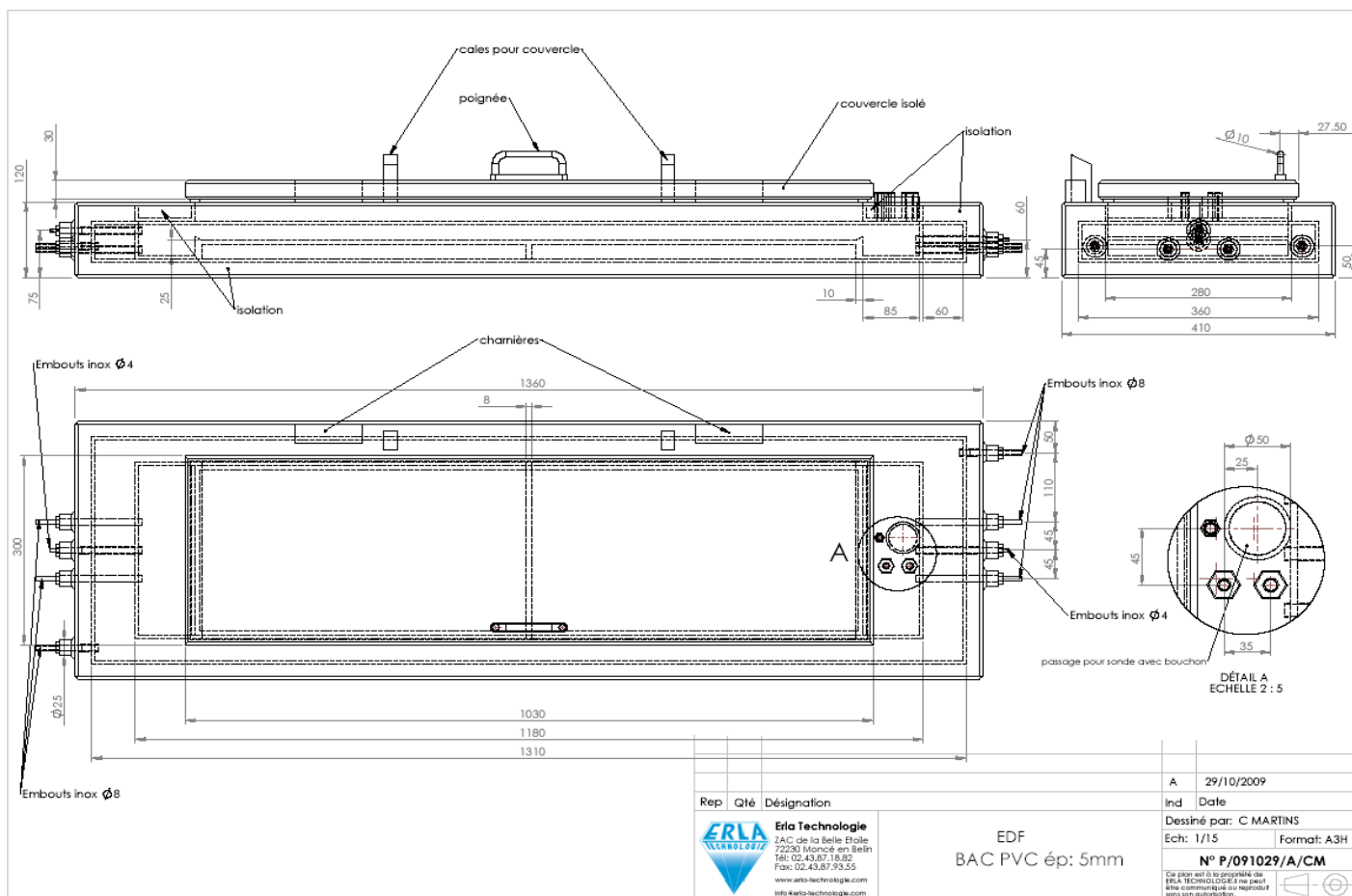
- Storey M.V., Winiecka-Krusnell J., Ashbolt N.J. et Stenstrom T.A. (2004) The efficacy of heat and chlorine treatment against thermotolerant *Acanthamoebae* and *Legionellae*. *Scand J Infect Dis* 36: 656-662.
- Sykora J.L., Keleti G. et Martinez A.J. (1983) Occurrence and pathogenicity of *Naegleria fowleri* in artificially heated waters. *Appl Environ Microbiol* 45: 974-979.
- Symmers W.C. (1969) Primary amoebic meningoencephalitis in Britain. *Br Med J* 4: 449-454.
- Tachikawa M., Tezuka M., Morita M., Isogai K. et Okada S. (2005) Evaluation of some halogen biocides using a microbial biofilm system. *Water Res* 39: 4126-4132.
- Thomas V., Herrera-Rimann K., Blanc D.S. et Greub G. (2006) Biodiversity of amoebae and amoeba-resisting bacteria in a hospital water network. *Appl Environ Microbiol* 72: 2428-2438.
- Thomas V., Loret J.F., Jousset M. et Greub G. (2008) Biodiversity of amoebae and amoebae-resisting bacteria in a drinking water treatment plant. *Environ Microbiol* 10: 2728-2745.
- Thomas V., Bouchez T., Nicolas V., Robert S., Loret J.F. et Levi Y. (2004) Amoebae in domestic water systems: resistance to disinfection treatments and implication in *Legionella* persistence. *J Appl Microbiol* 97: 950-963.
- Tiewcharoen S. et Junnu V. (2001) Distribution of pathogenic *Naegleria* spp. in Thailand. *Southeast Asian J Trop Med Public Health*. 32: 172-178.
- Tousset N. et Vazelle D. (2000) La température : un facteur déterminant dans le développement de *Naegleria fowleri* en circuit de refroidissement de CNPE. HP-P71/2000/016/A.
- Tousset N., Vazelle D., Khalanski M., Pringuez E., Letao M. et Chaperon G. (2001) The ecology of *Naegleria* and *Naegleria fowleri* in industrial cooling systems. In *IX International Meeting on the Biology and Pathogenicity of Free-Living Amoebae Proceedings*. Paris.
- Tsai Y.P., Pai T.Y. et Qiu J.M. (2004) The impacts of the AOC concentration on biofilm formation under higher shear force condition. *J Biotechnol* 111: 155-167.
- Tyndall R.L., Ironside K.S., Metler P.L., Tan E.L., Hazen T.C. et Fliermans C.B. (1989) Effect of thermal additions on the density and distribution of thermophilic amoebae and pathogenic *Naegleria fowleri* in a newly created cooling lake. *Appl Environ Microbiol* 55: 722-732.

- Valentine R.L. et Jafvert C.T. (1988) General acid catalysis of monochloramine disproportionation. *Environ. Sci. Technol.* 22: 691-696.
- Van't Hoff J.H. (1896) Studies in chemical dynamics. *Chemical Publishing Co., Easton, Pa.*: 19.
- Vikesland P.J., Ozekin K. et Valentine R.L. (2001) Monochloramine decay in model and distribution system waters. *Water Res* 35: 1766-1776.
- Visvesvara G.S. (1993) Epidemiology of infections with free-living amebas and laboratory diagnosis of microsporidiosis. *Mt Sinai J Med* 60: 283-288.
- Visvesvara G.S. et Stehr-Green J.K. (1990) Epidemiology of free-living ameba infections. *J Protozool* 37: 255-335.
- Visvesvara G.S., Moura H. et Schuster F.L. (2007) Pathogenic and opportunistic free-living amoebae: *Acanthamoeba* spp., *Balamuthia mandrillaris*, *Naegleria fowleri*, and *Sappinia diploidea*. *FEMS Immunol Med Microbiol* 50: 1-26.
- Wasche S., Horn H. et Hempel D.C. (2002) Influence of growth conditions on biofilm development and mass transfer at the bulk/biofilm interface. *Water Res* 36: 4775-4784.
- Watson H.E. (1908) A note on the variation of the rate of disinfection with change in the concentration of the disinfectant. *J Hyg (Lond)* 8: 536-542.
- Weik R.R. et John D.T. (1977) Agitated mass cultivation of *Naegleria fowleri*. *J Parasitol* 63: 868-871.
- Wellings F.M., Amuso P.T., Chang S.L. et Lewis A.L. (1977) Isolation and identification of pathogenic *Naegleria* from Florida lakes. *Appl Environ Microbiol* 34: 661-667.
- Wellings F.M., Amuso P.T., Lewis A.L., Farmero M.J., Moody D.J. et Osikowicz C.L. (1979) Pathogenic *Naegleria* distribution in nature. *E.P.A 600/1-79-018, U.S. E.P.A.*
- Willaert E., Jamieson A., Jadin J.B. et Anderson K. (1973) Caractères morphologiques, biologiques et immunochimiques de *Naegleria jadini* sp. (Amoebida, Vahlkampfididae). *Protistologica* 9: 417-426.
- Willaert E., Jamieson A., Jadin J.B. et Anderson K. (1974) Epidemiological and immunoelectrophoretic studies on human and environmental strains of *Naegleria fowleri*. *Ann Soc Belg Med Trop* 54: 333-342.
- Wimpenny J., Manz W. et Szewzyk U. (2000) Heterogeneity in biofilms. *FEMS Microbiol Rev* 24: 661-671.

- Wolfe R.L., Ward N.R. et Olson B.H. (1984) Inorganic chloramines as drinking water disinfectants: a review. *Journal - American Water Works Association* 76: 74-88.
- Woolschlager J., Rittmann B., Piriou P., Kiene L. et Schwartz B. (2001) Using a comprehensive model to identify the major mechanisms of chloramines decay in distribution systems. *Water Sci. Technol. : Water Supply* 1: 103-110.
- Xu K., Dexter S.C. et Luther G.W. (1998) Voltammetric microelectrodes for biocorrosion studies. *Corrosion* 54: 814.
- Yoder J.S., Eddy B.A., Visvesvara G.S., Capewell L. et Beach M.J. (2010) The epidemiology of primary amoebic meningoencephalitis in the USA, 1962-2008. *Epidemiol Infect* 138: 968-975.
- Zhang X., Brussee K., Coutinho C.T. et Rooney-Varga J.N. (2006) Chemical stress induced by copper: examination of a biofilm system. *Water Sci Technol.* 57: 191-199.
- Zubkov M.V. et Sleight M.A. (1999) Growth of amoebae and flagellates on bacteria deposited on filters. *Microb Ecol* 37: 107-115.

ANNEXES

Annexe 1 : Dessin technique du réacteur à biofilm



Annexe 2 : Formules de calcul des conditions hydrodynamiques

La caractérisation de l'hydrodynamique fait appel à un ensemble de constantes et de variables (physiques et géométriques). Une classification est faite selon quatre groupes distincts :

O **Les variables « dimensionnantes »** nécessaires pour dimensionner le réacteur selon les conditions hydrodynamiques souhaitées. Elles sont choisies au préalable.

- H_e désigne la hauteur d'eau [m] ;
- U_{moy} désigne la vitesse moyenne dans la section [m.s^{-1}] ;
- T_r désigne le temps de rétention hydraulique [s] ;
- Z_f désigne la hauteur de la pente de fond [m] ;

O **Les variables géométriques** définissent les grandeurs géométriques de la section d'écoulement introduite ci-dessus (elles sont équivalentes à la géométrie du réacteur)

- IR désigne la largeur du réacteur [m] ;
- LRb désigne la longueur du réacteur [m] ;
- $LRpp$ désigne la longueur de la partie plane du réacteur [m] ;
- HRb désigne la hauteur des bassins du réacteur [m] ;

O **Les constantes physiques** interviennent dans les calculs des variables et grandeurs caractéristiques de l'hydrodynamique, ce sont des données qui dépendent pour une partie de la température et pour une autre partie de la nature du matériau de construction du réacteur.

- T désigne la température [$^{\circ}\text{C}$] ;
- g désigne l'accélération de la pesanteur [$\text{m}^2.\text{s}^{-1}$] ;
- ρ désigne la masse volumique du fluide [kg.m^{-3}] ;

- ν eau désigne la viscosité cinématique [$\text{m}^2.\text{s}^{-1}$] ;
- μ eau désigne la viscosité dynamique [$\text{N.s}^{-1}.\text{m}^{-2}$] ou [Pa.s^{-1}] ;
- k_s désigne la rugosité [m];
- k_r désigne la rugosité relative; **(1)**
- α désigne le coefficient de correction cinétique ;
- λ désigne le facteur de friction ; **(2)**

O **Les variables calculées** à partir des données ci-dessus sont à l'inverse des variables « dimensionnantes » subies.

- V_t désigne le volume total [m^3] ; **(3)**
- P_m désigne le périmètre mouillé [m] ; **(4)**
- S_m désigne la surface mouillée [m^2] ; **(5)**
- Q_t désigne le débit total [$\text{m}^3.\text{s}^{-1}$] ; **(6)**
- Q_a désigne le débit d'alimentation [$\text{m}^3.\text{s}^{-1}$] ; **(7)**
- Q_r désigne le débit de recirculation [$\text{m}^3.\text{s}^{-1}$] ; **(8)**
- R_r désigne le taux de recyclage ; **(9)**
- T_s désigne le temps de séjour hydraulique [s] ; **(10)**
- R_h désigne le rayon hydraulique [m] ; **(11)**
- D_h désigne le diamètre hydraulique [m] ; **(12)**

L'ensemble des formules introduites ci-dessous est issu des travaux de (Lewandowski et Beyenal, 2007; Paris, 2008).

$$(1) k_r = \frac{k_s}{D_h};$$

$$(2) \lambda = \frac{64}{Re} \text{ pour un régime laminaire et } \sqrt{\lambda} = -2 \log \left(\frac{k_s}{3.71 \times R_h} + \frac{2.51}{Re \times \sqrt{\lambda}} \right) \text{ pour un régime turbulent. (Diagramme de MOODY)}$$

$$(3) V_t = (2 \times L_{Rb} \times l_R \times (H_{Rb} + H_e)) + (L_{Rpp} \times l_R \times H_e);$$

$$(4) P_m = l_R + (2 \times H_e);$$

$$(5) S_m = l_R \times H_e;$$

$$(6) Q_t = U_{moy} \times S_m;$$

$$(7) Q_a = \frac{V_t}{T_r};$$

$$(8) Q_r = Q_t - Q_a;$$

$$(9) R_r = \frac{Q_r}{Q_a};$$

$$(10) T_s = \frac{V_t}{Q_t};$$

$$(11) R_h = \frac{S_m}{P_m};$$

$$(12) D_h = 4R_h;$$

Annexe 3 : Code source pour l'analyse de la structure bidimensionnelle du biofilm

Ce code est opérationnel sous Matlab R2009b.

- o Il faut dans un premier temps rentrer le script de manière à définir l'emplacement des images à traiter. Ici voici l'exemple pour une image.

```
name_1='E:\DONNEES\goudot-seb\MES          DOCUMENTS\Dossier\Thèse\Objectif
1.1\ET32(1)\Résultats\Images\150210\65\1.jpg'

name_1_gray='E:\DONNEES\goudot-seb\MES      DOCUMENTS\Dossier\Thèse\Objectif
1.1\ET32(1)\Résultats\Images\150210\65\1_gray.tif'

name_1_binary='E:\DONNEES\goudot-seb\MES    DOCUMENTS\Dossier\Thèse\Objectif
1.1\ET32(1)\Résultats\Images\150210\65\1_binary.tif'

e1='E:\DONNEES\goudot-seb\MES              DOCUMENTS\Dossier\Thèse\Objectif
1.1\ET32(1)\Résultats\Images\150210\65\1.jpg'
```

- o Dans un second temps, une fois le chemin d'accès spécifié, il faut rentrer le programme. Ici l'exemple pour traiter l'image ci-dessus.

```
%1

N1='e1'

xlswrite('report.xls',e1,'Index','A1')

I=imread(name_1)

%conversion en image de gris

GLI=rgb2gray(I)

imwrite(GLI,name_1_gray)
```

```

X=imread(name_1_gray)

gl=256;

%paramètres de texture

gl=gl; % Number of gray levels

offset=1; % distance between spatially related pixels

% Horizontal scan

HF=graycomatrix(X,'GrayLimits',[], 'NumLevels',gl, 'Offset', [0 offset]) ; % Forward scan

HB=graycomatrix(X,'GrayLimits',[], 'NumLevels',gl, 'Offset', [0 -offset]) ; % Backward scan

% Vertical scan

VD=graycomatrix(X,'GrayLimits',[], 'NumLevels',gl, 'Offset', [offset 0]) ; % downward

VU=graycomatrix(X,'GrayLimits',[], 'NumLevels',gl, 'Offset', [-offset 0]); % upward

% sum of all scans

GH=HF+HB; % Horizontal spatial dependence matrix

GV=VD+VU; % Vertical spatial dependence matrix

glcmT=GH+GV; %Spatial dependence matrix

% ----- Calculate parameters -----

total_variation=sum(sum(glcmT)); % summing elements of spatial dependence matrix

CCM_N=glcmT/total_variation; % Normalized spatial dependence matrix

size (CCM_N);

Energy=sum(sum(CCM_N.*CCM_N)); % Eq.5. 2

% calculation of Textural Entropy

T=nonzeros(CCM_N); % remove cells with zero value (we can not calculate log)

```

```

TZ=T;          % assign it another matrix

TZ=-TZ.*log(T);    % p(i,j)*log(p(i,j)). note log() converts T into a list or one dimensional
matrix

TexturalEntropy=sum(TZ);    % sum above element (it is one dimensional now) Eq.5. 1

% calculation of homogeneity (IDM)

IDMY=double(zeros(gl,gl)); % initialize to zero

for i=1: gl

    for j=1:gl

        IDMY(i,j)=1/(1+(i-j)^2);

    end

end

IDMY=IDMY.*CCM_N;

Homogeneity=sum(sum(IDMY)); % Eq.5. 3

TE=TexturalEntropy

E=Energy

H=Homogeneity

%calcul du threshold

GL=256;

Grey_levels=GL;  % Number of gray levels in the image

threshold_from_otsu = graythresh(X) %OTSU METHOD

d=size(X); % calculate size of image - it should be variable

XH = imhist(X);

```

```

INDEX_MATRIX=1:Grey_levels;

INDEX_MATRIX=INDEX_MATRIX'; % transform it

% plot(INDEX_MATRIX,XH(:,1)) % to see the histogram

threshold=50000; % any number bigger than Gry_levels

for tc=1: Grey_levels

    %tc % Foreground calculations

    FG=double(XH(1:tc,1)); % foreground histogram

    IM_FG=INDEX_MATRIX(1:tc,1); % foreground index

    FG_RESULT=FG.*IM_FG; % multiply index and histogram

    Sum_FG=sum(FG_RESULT); % sum foreground * histogram

    Sum_FG_Index=sum(FG); % sum of histogram FG

    % Eliminate division with zero

    if Sum_FG_Index==0;

        Avr_FG=0;

    else

        Avr_FG=Sum_FG/Sum_FG_Index; % average index= gray level

    end

    % Background calculations

    BG=double(XH((tc+1):Grey_levels,1)); % Background histogram

    IM_BG=INDEX_MATRIX((tc+1):Grey_levels,1); % background index

    BG_RESULT=BG.*IM_BG; % multiply index and histogram

```

```

Sum_BG=sum(BG_RESULT); % sum background*histogram

Sum_BG_Index=sum(BG); % sum histogram

if Sum_BG_Index==0;

    Avr_BG=0;

else

    Avr_BG=Sum_BG/Sum_BG_Index; % average index

end

% calculate threshold -average of foreground and back ground

threshold=(Avr_FG+Avr_BG)/2;

    if threshold<=(tc+1)

        if threshold>=(tc-1)

            break;

        end % if

    end % if

end % for

threshold_from_iterative_selection=threshold/Grey_levels

t=threshold/Grey_levels

%conversion en image binaire

subplot(2,2,1),imshow(X);title('GL Image')

bwOriginal=im2bw(X,t)

subplot(2,2,2);imshow(bwOriginal);title('Thresholded Image')

imwrite (bwOriginal,name_1_binary)

```



```
%Arealporosity
```

```
Y=imread(name_1_binary)
```

```
d=size(Y); % calculate size of image - it should be variable
```

```
ArealPorosity= 1-sum(sum(Y))/(d(1)*d(2)) % porosity = total_void pixels/total_pixels
```

```
subplot(2,2,1), imshow(Y); % show original image
```

```
% AverageRunlenghts
```

```
for horz=1: (d(2)+1)
```

```
    Y((d(1)+1),horz)=0;
```

```
end % horz
```

```
for vert=1: (d(1)+1)
```

```
    Y(vert,(d(2)+1))=0;
```

```
end % vert
```

```
% Vertical scan
```

```
% -----
```

```
% make last elements void so index will not be exceed
```

```
RunIndex=0; % for index of matrix
```

```
VRL_matrix=0;
```

```
for horz=1: d(2)
```

```
    vert=0;
```

```
    while (vert<d(1))
```

```
        vert=vert+1;
```

```
        Veritcal_run_lenght=0;
```

```

    if (Y(vert,horz)==1); % is cluster start run

    %

    Veritcal_run_lenght=0; % the length of vertical runs count first one

    RunIndex=RunIndex+1;

    % calculate run length while see one void cluster

    while (Y(vert,horz)==1) % as long as it is cluster

        Veritcal_run_lenght=Veritcal_run_lenght+1;

        vert=vert+1; % move to next pixel

    end % end while

    VRL_matrix(RunIndex)=Veritcal_run_lenght;

    end % if cluster

end % while vertical

end % for horizontal

% calculate VRL

AVRL=sum(sum(VRL_matrix))/RunIndex

% Horizontal scan

% -----

RunIndex=0; % for index of matrix

HRL_matrix=0;

for vert=1: d(1)

    horz=0;

    while (horz<(d(2)))

```

```

    horz=horz+1;

    Horizontal_run_lenght=0;

    if (Y(ver,horz)==1); % is cluster start run

        Horizontal_run_lenght=0; % the length of vertical runs count first one

        RunIndex=RunIndex+1;

        % calcualte runlengh while see one void cluster

        while (Y(ver,horz)==1) % as long as it is cluster

            Horizontal_run_lenght=Horizontal_run_lenght+1;

            horz=horz+1; % move to next pixel

        end % end while

        HRL_matrix(RunIndex)=Horizontal_run_lenght;

    end % if cluster

end % while vertical

end % for horizontal

% calculate VRL

AHRL=sum(sum(HRL_matrix))/RunIndex

%Diffusiondistances(XX)

D = bwdist(Y,'euclidean'); % Euclidean distance map

ADD=sum(sum(D))/sum(sum(Y)) % sum all distances then divide to sum of cluster pixels for
original image

MDD=max(max(D))

%perimeter

```

```
Y_perimeter=bwperim(Y);    % it is a new image

Perimeter=sum(sum(Y_perimeter)) % calculate perimeter


xlswrite('report.xls',N1,'ArealPorosity','A1')

xlswrite('report.xls',ArealPorosity,'ArealPorosity','D1')

xlswrite('report.xls',N1,'Homogeneity','A1')

xlswrite('report.xls',H,'Homogeneity','D1')

xlswrite('report.xls',N1,'Entropy','A1')

xlswrite('report.xls',E,'Entropy','D1')

xlswrite('report.xls',N1,'TexturalEntropy','A1')

xlswrite('report.xls',TE,'TexturalEntropy','D1')

xlswrite('report.xls',N1,'Runlengths','A1')

xlswrite('report.xls',AVRL,'Runlengths','D1')

xlswrite('report.xls',AHRL,'Runlengths','E1')

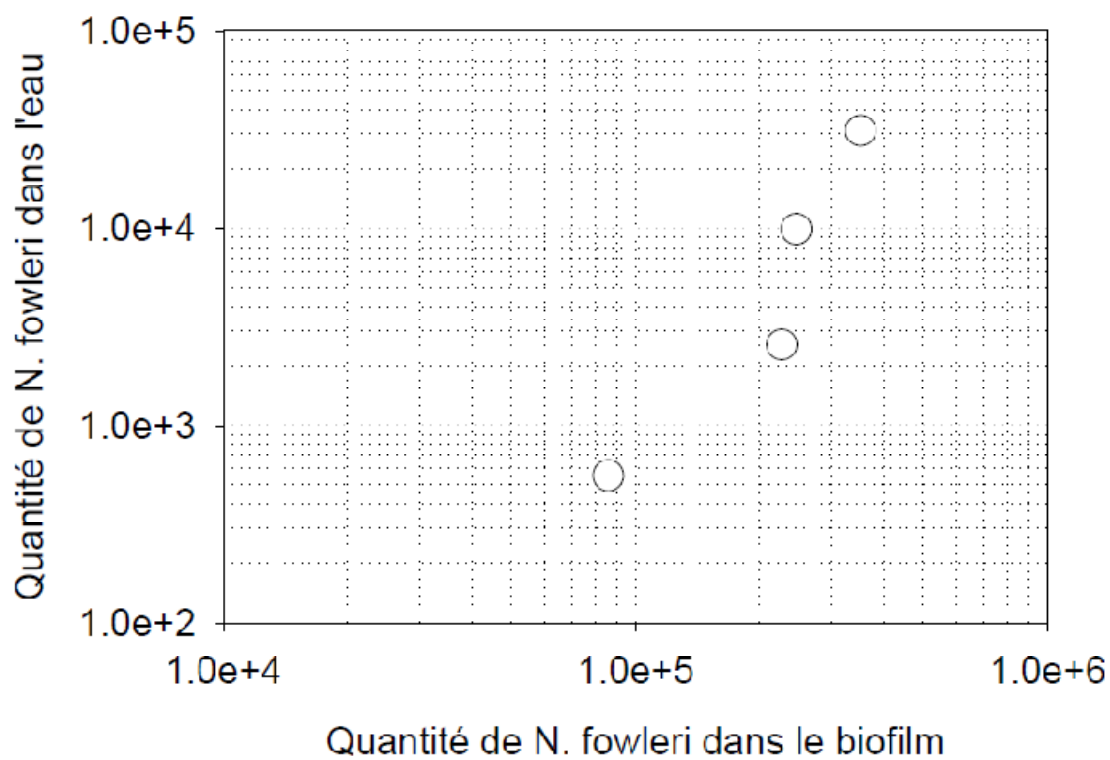
xlswrite('report.xls',N1,'Diffusiondistances','A1')

xlswrite('report.xls',ADD,'Diffusiondistances','D1')

xlswrite('report.xls',MDD,'Diffusiondistances','E1')

xlswrite('report.xls',N1,'Perimeter','A1')

xlswrite('report.xls',Perimeter,'Perimeter','D1')
```

Annexe 4 : Corrélation entre la quantité de *N. fowleri* mesurée dans l'eau et dans le biofilm

Résumé

Dans l'objectif d'anticiper et de réduire la prolifération de l'amibe pathogène *Naegleria fowleri* dans les circuits de refroidissement de certaines centrales électriques, notre travail vise à mieux comprendre l'écologie de cette amibe dans des environnements complexes tels que les biofilms d'eau douce récemment reconnus comme niche écologique préférentielle des amibes libres. Des essais de laboratoire ont été réalisés pour déterminer l'impact des facteurs environnementaux naturels et anthropiques: température, nature du matériau support de la formation du biofilm, charge nutritionnelle et monochloramination sur le comportement et le devenir de *Naegleria fowleri* dans le biofilm. Ces travaux ont permis de démontrer que la survie, l'implantation, la croissance, le maintien et le déclin de *Naegleria fowleri* dans les biofilms sont principalement gouvernés par la concomitance des facteurs température et ressource nutritive. Les autres facteurs: nature du matériau, désinfection à la monochloramine et compétition amibienne, se présentent plutôt comme des paramètres de perturbation ou d'inhibition de cette dynamique. Par ailleurs, les résultats obtenus sur la colonisation du biofilm par les amibes confortent le rôle prépondérant de cet habitat comme réservoir naturel des amibes libres et *Naegleria fowleri*.

Mots clés : *Naegleria fowleri* ; amibes libres ; biofilm ; température ; ressource nutritive ; monochloramine ; matériau.

Abstract

This study is aiming at preventing and reducing the proliferation of the pathogenic free-living amoeba *Naegleria fowleri* in several power plants cooling circuits. This work contributes to provide a better understanding of the ecology of this amoeba in complex environments such as freshwater biofilms, which recently has been recognized as privileged ecological niche for free-living amoebae. Laboratory tests were conducted to determine the impact of environmental factors such as temperature, type of support material for the biofilm formation, nutritional resources and monochloramination treatment on the behavior and the fate of *Naegleria fowleri* in the biofilm. This work has demonstrated that the survival, implantation, maintain, growth and decline of *Naegleria fowleri* in biofilms are mainly governed by a combination of the temperature and nutritional resource factors. The other factors: type of support material, monochloramination treatment, and amoebic competition, appeared rather as disruptive or inhibitory parameters of this dynamic. Moreover, the obtained results for the amoebic colonization of the biofilm matrix confirm the crucial role of this habitat as natural reservoir for free-living amoebae and *Naegleria fowleri*.

Keywords: *N. fowleri*; free-living amoebae; biofilm; temperature; nutritional resource; monochloramine; material