

Couplage hydrodynamique-biomasse dans les procédés de dépollution. Approche locale des mécanismes de croissance et d'adhésion/détachement de micro-organismes sur substrats solides

Serigne Mbaye

▶ **To cite this version:**

Serigne Mbaye. Couplage hydrodynamique-biomasse dans les procédés de dépollution. Approche locale des mécanismes de croissance et d'adhésion/détachement de micro-organismes sur substrats solides. Autre. Université de Grenoble, 2011. Français. NNT : 2011GRENI057 . tel-00769936

HAL Id: tel-00769936

https://theses.hal.science/tel-00769936

Submitted on 4 Jan 2013

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.

UNIVERSITÉ DE GRENOBLE

THÈSE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE GRENOBLE

Spécialité : **Mécanique des Fluides, Procédés, Energétique**

Arrêté ministériel : 7 août 2006
Présentée par

Serigne MBAYE

Thèse dirigée par **Philippe SECHET**
et codirigée par **Frédéric PIGNON**

Préparée au sein du **Laboratoire des Ecoulements Géophysiques et Industriels** et du **Laboratoire de Rhéologie**

École Doctorale Ingénierie – Matériaux Mécanique Energétique Environnement Procédés Production

COUPLAGE HYDRODYNAMIQUE-BIOMASSE DANS LES PROCEDES DE DEPOLLUTION :
Approche locale des mécanismes d'adhésion, de détachement et de croissance de microorganismes sur substrats solides

Thèse soutenue publiquement le **11 Octobre 2011**,
devant le jury composé de :

M. Alain CARTELLIER

DR-CNRS, Laboratoire LEGI, Grenoble, Président

M. Thierry BENEZECH

DR-INRA, Laboratoire PIHM, INRA Lille, Rapporteur

Mme Muriel Mercier-BONIN

CR-INRA, Laboratoire LISBP, Toulouse, Rapporteur

M. Jean-Claude BLOCK

Professeur, Laboratoire LCPME, Nancy, Examinateur

M. Philippe SECHET

Maitre de Conférences, Laboratoire LEGI, Grenoble, Directeur de Thèse

M. Frédéric PIGNON

CR-CNRS, Laboratoire de Rhéologie, Grenoble, Co-directeur de Thèse

M. Jean MARTINS

CR-CNRS, Laboratoire LTHE, Grenoble, Membre Invité

A mon Père,

Qui restera à Tout Jamais dans mes Pensées !

REMERCIEMENTS

Les Travaux de Recherche faisant l'objet de ce manuscrit de Thèse ont été effectués au sein de l'Ecole Nationale Supérieure de L'Energie, l'Eau et l'Environnement (Grenoble INP). J'ai été accueilli au LEGI (Laboratoire d'Ecoulements Géophysiques et Industriels) sous la Direction de M. Philippe Séchet et au Laboratoire de Rhéologie sous la Direction de M. Frédéric Pignon. Une partie de cette thèse a également été réalisée au Laboratoire des Transferts en Hydrologie et Environnement sous la supervision de M. Jean Martins.

J'adresse mes vifs remerciements et une très haute reconnaissance à Philippe Séchet, Frédéric Pignon et Jean Martins pour m'avoir donné la chance de travailler sur leur projet de recherche. Ils ont été d'une sympathie, d'une patience et d'une générosité sans limite dans leur façon de m'inculquer le métier d'Enseignant-Chercheur. Je salue hautement leur qualité scientifique, leur bon sens de la pédagogie, mais aussi et surtout leur qualité humaine. Tout au long de cette période de 4 années, ils m'ont fait suffisamment confiance pour prendre des initiatives, mais avec l'intérêt qu'ils ont porté à la réussite de ce projet, ils m'ont donné de précieux conseils pour mener à bien ces initiatives. Je leur remercie également beaucoup pour m'avoir soutenu dans les moments difficiles.

J'adresse ma profonde gratitude à M. Alain Cartellier du LEGI (Président du Jury), Mme Muriel Mercier-Bonin de l'INRA de Toulouse et M. Thierry Bénézech de l'INRA de Lille (tous deux Rapporteurs) et M. Jean-Claude Block de l'Université de Nancy (Examinateur) pour avoir accepté de participer au jury de thèse.

Mes remerciements vont également à l'adresse de M. Albert Magnin, directeur du laboratoire de Rhéologie (pour les conseils moraux et scientifiques très précieux), mais également à M. Christian Geindreau et Mme Sabine Rolland Du Roscoat du Laboratoire 3S-R (pour les calculs 3D), à M. Jean-Marc Barnoud du LEGI (pour la conception 3D et l'usinage des pièces), à Mme Hélène Galliard du Laboratoire de Rhéologie (pour l'aide et les conseils technico-scientifiques durant toute la thèse), à la stagiaire Ana Madeiros pour l'aide précieuse qu'elle a apportée à la réalisation de cette thèse, à Sylvie Masquelier (pour la fluoresence et la cytomètrie) et à Erwan Vince (pour tout l'apport technique en technologie microbienne).

Mes remerciements s'adressent aussi à tous les membres du LEGI et du Laboratoire de Rhéologie en particulier à (par ordre alphabétique) Patricia Argentino, François Bergerot, Didier Blésès, Nicole Bourhy, Sylvie Champavier, Olivier De-Marchi, Eric Faivre, Sylvie Garofalo,

Frédéric Hugenell, Mohamed Karrouch et Claudine Lylap pour leur aide technique et/ou logistique précieuse pendant toute la durée de la thèse.

Je remercie tous les collègues Doctorants et Post-doctorants du Laboratoire de Rhéologie (Nicolas, Jérémy, Stéphane, Guillaume, Christelle, Abdulgadir, Ahmed, Pierre-Aimé, Mohamed, Mouhamed, Antoine, Etienne, Benoit) du LEGI (Céline, Maxime, François-Xavier) de l'équipe Transpore du LTHE (Aurélien, Aline, Elsa) et du 3S-R (Olivier, Guilherme, Mamadou).

J'adresse également mes remerciements à Augustine Alessio, secrétaire de l'IMEP2 et aux collègues avec qui j'ai co-organisé les éditions 2009 et 2010 de la Journée Des Doctorants.

Un grand merci à l'ensemble de la communauté Sénégalaise de Grenoble, particulièrement à Ismaël, Ibrahima, Dieynaba, Adama, Fatimata, Pape, Thierno… mais aussi à tous les membres du Dahira-Touba-Grenoble.

J'adresse une Grande Reconnaissance à tous mes parents et proches qui m'ont soutenu pendant mes études.

Enfin, un Grand Merci à mon épouse Maguette pour la patience et l'amour dont elle fait preuve envers moi.

RESUME

Les procédés de dépollution en général et les procédés à biomasse fixée en particulier pourraient voir leur efficacité intensifiée si les couplages entre les divers mécanismes locaux qui les gouvernent étaient mieux compris. C'est dans cette problématique scientifique et industrielle que s'insère ce travail de recherche.

Cette thèse a pour objectif d'apporter une meilleure compréhension des mécanismes qui gouvernent le bon fonctionnement et les performances des procédés de dépollution à biomasse fixée et d'en développer leur modélisation.

L'analyse bibliographique des principales publications apparues sur le sujet et les travaux précédents effectués au LEGI montrent que ces mécanismes sont couplés à travers plusieurs échelles, du biofilm au procédé, en passant par l'échelle de quelques pores.

Notre travail se focalise sur la caractérisation à l'échelle microscopique de certains mécanismes liés à la croissance bactérienne ou de biofilms de *Pseudomonas putida 6521* sous l'effet d'écoulements de cisaillement de type Poiseuille. Ces écoulements, générés à des faibles nombres de Reynolds, sont représentatifs de ce que l'on peut rencontrer typiquement à l'échelle des pores lors de la mise en œuvre des procédés de dépollution à cultures fixées.

La première étape de ce travail a été de concevoir puis de développer une chambre d'écoulement à parois planes parallèles pour permettre la mise en œuvre et l'observation *in-situ* de ces phénomènes sous conditions hydrodynamiques contrôlées. Les investigations expérimentales du champ de vitesse dans la chambre d'écoulement ont permis de caractériser le régime hydrodynamique, qui a été identifié comme laminaire, avec un profil Poiseuille 2D-plan pour les différentes conditions de débits explorées. Ceci permet de générer un cisaillement contrôlé et uniforme dans la zone de mesure.

L'étude des processus d'adhésion/détachement sous l'influence de différents paramètres hydrodynamiques et physico-chimiques, nous a permis de définir les conditions de non-détachement sur toute la gamme de Reynolds accessible et représentative de conditions rencontrées en biofiltration. Après avoir validé et quantifié ces conditions, nous avons pu étudier les cinétiques de croissance de colonies bactériennes de *Pseudomonas putida* sous écoulement cisaillé. En conditions non limitantes, nous montrons que le choix des paramètres de la loi de Monod, pour ces instants initiaux de croissance du biofilm et des conditions hydrodynamiques en régime très diffusif, est dépendant du cisaillement imposé, ce qui n'est pas pris en compte dans la plupart des modèles.

Des expériences mettant en œuvre l'observation de la croissance du biofilm sous écoulement à bas nombre de Reynolds ont ensuite permis de mettre en évidence la nature hétérogène de la structure du biofilm. Ce dernier développe des structures filamenteuses ainsi que des protubérances distribuées de manière plus ou moins périodique sur le support solide. Ces structures pourraient entre autre expliquer comment la croissance du biofilm influence le frottement.

Pour étudier l'influence de la microstructure sur ce frottement, une technique de reconstruction 3D du biofilm a été développée et mise en œuvre en complément de la microscopie optique directe. Nous avons pu ainsi simuler l'écoulement local à travers le biofilm et montrer que selon la distribution de la biomasse (répartition idéalisée, répartition mesurée expérimentalement), les perméabilités calculées diffèrent d'un facteur 10. Les réductions de perméabilité calculées à partir de la distribution locale expérimentale de biomasse sont en outre assez réalistes comparées aux mesures trouvées dans la littérature. On met ainsi en évidence l'importance de la microstructure dans la modélisation de la perméabilité du milieu, microstructure qui n'est actuellement pas prise en compte explicitement dans les modèles de perméabilité.

Mots-clés : traitement de l'eau, biofiltres, chambre d'écoulement, hydrodynamique, biofilms, taux de croissance, contrainte de cisaillement, reconstruction 3D, microstructure.

ABSTRACT

The purification processes of urban and industrial effluents in general and the fixed biomass processes in particular could see their efficiency intensified if the couplings between the various local mechanisms which govern them were better understood. It is within this scientific and environmental framework that our thesis fits. We seek to propose a strategy for modelling the local processes which manage the development of the biofilms under flow shear.

This thesis aims to bring a better understanding for the mechanisms which control the functioning and the performance of fixed biomass, and to develop a model for these phenomena.

The bibliographical analysis of the main publication about this topic and the recent works carried out at the LEGI laboratory has shown that these mechanisms are coupled in various scales (biofilm, pore and bioreactor).

Our work is focused on the characterization on a microscopic scale, of certain mechanisms related to the bacterial growth or biofilms under the effect of sheared flows. These flows, generated at low Reynolds numbers, are representative of what one can be typically meet on the pore scales during the implementation of the fixed biomass processes.

At first we developed a parallel plate flow chamber which allowed *in-situ* observations of these mechanisms under controlled flow conditions. Experimental investigations of the hydrodynamic in the flow chamber allowed the characterization of the flow field, which was maintained laminar with a 2-dimensional Poiseuille profile for the explored flow rates. That allowed obtaining a constant and uniform shear stress in the measurement area of the flow chamber.

After the validation and quantification of the non-detachment in the flow chamber, we investigated the bacterial growth kinetics of *Pseudomonas putida* under sheared flow. The study of the cell adhesion and detachment processes thus enabled us to maintain conditions of non-detachment and to rather correctly model the growth kinetics. In non-limiting nutrient conditions, we show that the choice of the parameters in the Monod law, for the first stage of biofilm growth and the choice of hydrodynamic conditions in very diffusive conditions are dependent on imposed shear stress; this is not taken into account in the majority of the models.

Experiments dealing with the observations of flow-induced biofilm growth at low Reynolds number were then performed. Our observations exhibited a heterogeneous and filamentous

structure for the biofilm, with protuberance distributed periodically on the solid support. These structures could amongst other things explain how the growth of film influences friction.

In the future, to study the influence of the microstructure on this quantity, a technique of 3D-reconstruction of the biofilm structure was developed and implemented in complement of direct optical microscopy. We are now able to simulate the distribution of the local velocity profiles in the biofilm and highlight that, depending on the biomass repartition (idealised distribution, real measured distribution), the calculated values of permeability differ from a factor 10. The permeability reduction determined from the experimental local distribution of biomass is moreover rather realistic compared with the measurements found in the literature. We thus show the importance of the microstructure in the modelling of the permeability, microstructure which is currently not taken into account explicitly in the theoretical permeability models.

Key-words: Water treatment, biofilters, flow chamber, hydrodynamic, biofilm, growth rate, shear stress, 3D- reconstruction, microstructure.

TABLE DES MATIERES

REMERCIEMENTS **5**

RESUME **7**

ABSTRACT **9**

TABLE DES MATIERES **11**

LISTE DES ILLUSTRATIONS **15**

CHAPITRE 1 : INTRODUCTION GENERALE **21**

I– CONTEXTE : LA DEPOLLUTION BIOLOGIQUE DES EFFLUENTS **22**

II– TRAITEMENT DE L'EAU PAR BIOFILTRATION **23**

II.1- Principe de fonctionnement des biofiltres **24**

II.2- Efficacité et limites des procédés à cultures fixées **25**

CHAPITRE 2 : ETAT DE L'ART SUR LA CROISSANCE DE BIOFILMS EN MILIEU POREUX **29**

I- INTRODUCTION **30**

II- ETAT DE L'ART SUR LA MODELISATION DES BIOFILMS ET LA CROISSANCE DES BIOFILMS EN MILIEUX POREUX **30**

II.1- Etudes à l'échelle du biofilm **31**

II.1.1- Observations expérimentales 31

II.1.1.1- Les différents composants d'un biofilm *31*

II.1.1.2- Couplages observés entre hydrodynamique et développement de biofilms *35*

II.1.2- Modélisation mathématique et numérique des biofilms avec couplages explicites avec l'hydrodynamique 37

II.1.2.1- Stratégies de modélisation *37*

II.1.2.2- Modélisation de certaines lois constitutives à introduire dans les modèles *41*

II.2- Etudes à l'échelle du milieu poreux **51**

II.2.1- Contributions expérimentales 51

II.2.2- Modélisation numérique des couplages hydrodynamique-biomasse en milieu poreux. Limite des modélisations 56

II.2.2.1- Présentation succinte des différents types de modélisaton *57*

II.2.2.2- Discussion et analyse critique des modèles *66*

II.2.3. Conclusion 74

CHAPITRE 3 : OBJECTIFS SCIENTIFIQUES DE CETTE ETUDE ET PLAN DE TRAVAIL 77

I. OBJECTIFS 78

II. APPROCHE EXPERIMENTALE UTILISEE ET METHODOLOGIE 78

CHAPITRE 4 : SYSTEME BIOLOGIQUE ET EQUIPEMENT EXPERIMENTAL 81

I. LE MICROORGANISME MODELE : PSEUDOMONAS PUTIDA. 82

I.1- Présentation 82

I.2- Préparation des cultures 83

I.3- Mesure de la cinétique de croissance 84

II. DESCRIPTION DE LA PLATEFORME EXPERIMENTALE ET DE LA CHAMBRE D'ECOULEMENT 87

II.1- La plateforme expérimentale 87

II.2- La chambre d'écoulement 88

II.2.1- Plaque supérieure 89

II.2.2- Joint d'étanchéité 89

II.2.3- Support d'adhésion (plaque inférieure) 89

II.2.3.1- Lamelle en verre borosilicaté 89

II.2.3.2- Lame en claire de vinyle optique 90

II.3- Caractérisation de l'hydrodynamique 91

II.3.1- Critère de validation des mesures 91

II.3.2- Hypothèses qualitatives sur le régime d'écoulement 92

II.4- Choix des conditions de travail en regard des conditions hydrodynamiques typiques rencontrées dans les systèmes étudiés (biofilms en milieu poreux) 96

III. CONCLUSION 98

CHAPITRE 5 : PHASE INITIALE DE FORMATION DES BIOFILMS - ETUDE DE LA CROISSANCE BACTERIENNE SOUS ECOULEMENT CISAILLE 99

I. INTRODUCTION 100

II. MECANISMES D'ADHESION / DETACHEMENT DE BACTERIES SOUS ECOULEMENT 101

II.1- Approche expérimentale 101

II.2- Dispositif expérimental 103

II.3- Protocole opératoire 105

II.3.1- Conditions de préparation des suspensions bactériennes 106

II.3.2- Méthode d'énumération de la population bactérienne adhérée 107

II.3.3- Estimation de la précision des résultats issus du comptage 108

II.4- Résultats 108

II.4.1- Effet de la contrainte hydrodynamique sur la cinétique de détachement 108
II.4.1.1- Suivi du détachement pour un palier de cisaillement constant 108
II.4.1.2- Suivi du détachement pour des cisaillements croissants par palier 110
II.4.2- Effet du temps de contact initial et des conditions physico-chimiques 111
II.4.2.1- Influence du temps de contact 111
II-4.2.2. Influence de l'histoire du cisaillement sur la cinétique de détachement 114
II.4.2.3- Influence de la nature ionique du fluide en écoulement 117
II.5- Discussion 119
II.6- Conclusion 122
II.7- Caractérisation du détachement pendant la croissance initiale sur les surfaces 124
III. ETUDE DE LA CROISSANCE INITIALE SUR LES SURFACES 126
III.1- Dispositif expérimental 126
III.2- Mode opératoire 127
III.3- Choix du mode d'énumération des bactéries 128
III.4- Résultats 130
III.4.1- Observations qualitatives des différentes étapes du développement cellulaire sur la surface 130
III.4.2- Analyse quantitative de la phase de croissance initiale sous cisaillement contrôlé 132
III.4.2.1- Mesure du taux de croissance 132
III.4.2.2- Reproductibilité des résultats 136
III.4.2.3- Evolution du taux de croissance avec la contrainte de cisaillement 138
III.5- Discussion 141
III.5.1- Explication basée sur un changement de métabolisme 142
III.5.2- Explication basée sur l'existence d'une couche limite de concentration à la paroi 143
III.5.2.1- Mécanisme de transport d'un nutriment au travers de la membrane d'une cellule bactérienne 144
III.5.2.2- Couche limite de concentration 147
III.5.2.3- Coefficient de transfert de masse 147
III.6- Conclusion 150
CHAPITRE 6 : DEVELOPPEMENT DE BIOFILMS SUR SUPPORTS SOLIDES 153
I. INTRODUCTION 154
II. DISPOSITIF ET PROTOCOLE EXPERIMENTAL 154
III. ANALYSE DU DEVELOPPEMENT DE BIOFILM SOUS ECOULEMENT 156
IV. DEPLOIEMENT D'UNE METHODOLOGIE D'ETUDE DU DEVELOP-PEMENT 3D D'UN BIOFILM SOUS ECOULEMENT 165
IV.1- Reconstruction 3D de la structure de biofilms 165

IV.2-Simulation de l'écoulement dans une portion de biofilm/ perméabilité locale 168
IV.3-Discussion....170
IV.4- Perspectives d'utilisation de la reconstruction 3D pour l'étude des couplages hydrodynamique-croissance de biofilm.....172
V. CONCLUSION....173
CHAPITRE 7 : CONCLUSION GENERALE, BILAN ET PERSPECTIVES....175
I. CONCLUSION GENERALE....176
II. BILAN ET PERSPECTIVES....180
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES....185
ANNEXES....203
ANNEXE A : QUALITE DES EFFLUENTS NATURELS ET INDUSTRIELS....204
A.1- Classification des polluants selon leur origine....204
A.2- Classification des polluants selon leur nature chimique....204
ANNEXE B : COMPOSITION DES MILIEUX DE CULTURES....206
B.1- Milieu Luria-Bertani (LB)....206
B.2- Milieu LB modifié....206
B.3- Milieu Luria-Agar (LA)....207
ANNEXE C : MESURE DE LA POPULATION BACTERIENNE PAR SPECTROPHOTOMETRIE....208
ANNEXE D : DEVELOPPEMENT D'UN TRAITEMENT AUTOMA-TIQUE DES IMAGES POUR LE COMPTAGE : INTERET ET LIMITES....210
D.1- Seuillage des images....210
D.2- Méthode de comptage....211
D.3- Conclusion....215
ANNEXE E : COUCHE LIMITE DE CONCENTRATION PRES D'UNE PAROI EN ECOULEMENT DE POISEUILLE 2D PLAN....217
ANNEXE F : MICROSCOPIE DE FLUORESCENCE POUR LA MESURE DE LA VIABILITE CELLULAIRE..219

LISTE DES ILLUSTRATIONS

Figure 1.1 : Schéma de fonctionnement du système d'évaluation SEQ-Eau. 22
Figure 1.2 : Schéma global de fonctionnement d'un biofiltre..... 25
Figure 2.1 : Schéma général d'une cellule procaryote (d'après cours A. Guillet, Pagora, Grenoble-INP) 32
Figure 2.2a : paroi d'une cellule à gram+ 33
Figure 2.2b : paroi d'une cellule à gram- 33
Figure 2.3 : Les différentes étapes de la formation d'un biofilm (Stoodley et al, 2002)..... 36
Figure 2.4 : Différentes structurations externes du biofilm : la contrainte de cisaillement pariétal augmente entre les clichés (a) et (e) (d'après Picioreanu et van Loosdrecht, Delft University, Pays-Bas)..... 37
Figure 2.5 : exemple de modélisation simplifiée (adapté de Mathematical Modeling of Biofilms, 2006). Le biofilm est composé d'une « base », décrite par une épaisseur L_F et les concentrations S et X en substrat et biomasse. La surface est caractérisée par une rugosité et une aire interfaciale. La consommation des substrats et la croissance bactérienne sont gérées dans le biofilm par des équations de réaction-diffusion. Le transfert de masse à l'interface dépend d'un coefficient fonction de la rugosité locale et de la vitesse moyenne dans la partie fluide (bulk). Ce dernier compartiment est considéré comme étant à mélange complet. L'évolution de la concentration en substrat est gérée par un bilan de masse sur le volume. Enfin la vitesse de croissance de l'épaisseur dépend d'une vitesse u_F elle-même dépendante de la variation de volume du biofilm (donc dX/dt).. 38
Figure 2.6 : Principales étapes de modélisation des interactions biofilm/hydrodynamique. 39
Figure 2.7 : Exemples de structures obtenues lors de la simulation numérique de biofilms utilisant des automates cellulaires..... 40
Figure 2.8 : Allure typique de la croissance des populations bactériennes..... 42
Figure 2.9 : Comparaison entre données expérimentales (marqueurs) de Wäsche et al. (2002) et données calculées (lignes) pour des biofilms cultivées sous écoulement à différents régimes hydrodynamiques, et à différentes concentrations de substrats nutritifs. 46
Figure 2.10 : Hétérogénéité de la structure des biofilms (image recueillie de Telgmann et al., 2004)..... 49
Figure 2.11 : Evolution de la perméabilité relative avec la porosité relative. Comparaison avec certains modèles théoriques de la littérature (Karrabi et al, 2011) 56
Figure 2.12 : schéma d'un réseau composé de plusieurs tubes capillaires interconnectés. 61
Figure 2.13 : Schéma descriptif de l'occupation des pores d'un milieu poreux..... 62
Figure 2.14 : Définition du Volume Elémentaire Représentatif (d'après Kapellos et al., 2007). La structure aléatoire inhomogène du biofilm (à gauche) est remplacée par une cellule unitaire élémentaire (à droite) comprenant une cellule bactérienne encapsulée dans un milieu poreux effectif. Cette cellule unitaire représente de manière simplifiée la structure du biofilm au voisinage d'une cellule bactérienne isolée (phases : k = cellule bactérienne, π = EPS hydratés, μ = solution aqueuse non liée aux EPS, β = reste des EPS et cellules bactériennes)..... 65
Figure 2.15 : Simulation de l'écoulement dans un milieu poreux affecté par l'occupation des pores pas la biomasse..... 66
Figure 2.16 : Comparaison entre d'une simulation 1D avec les résultats expérimentaux de Taylor and Jaffe (1990) ? d'après Brovelli et al. (2009). 67

Figure 2.17 : Evolution de la perméabilité relative en fonction de la porosité relative (expériences de Karrabi et al., 2011 comparées avec le modèle de Thullner et celui de Clément). 71
Figure 2.18 : Schéma conceptuel de la percolation de biomasse le long du chemin de moindre résistance hydraulique : deux chemins potentiels de même longueur pour aller de l'UBC (A) à l'UBC (B) vide. Les cellules de plus faibles niveau de gris sont les moins concentrées en biomasse. Le chemin 1 (-- ->) est choisi car l'écoulement y rencontre moins de biomasse donc moins de résistance. 72
Figure 4.1 : Cellules de P. putida souche 6521 adhérées sur substrat de verre 82
Figure 4.2 : Milieu LA colonisé par P. putida 83
Figure 4.3 : Milieu de culture LB stérile sous hotte à flux laminaire 84
Figure 4.4 : Pré-culture de P. putida à l'état congelé 84
Figure 4.5 : Cinétique de croissance d'une culture libre de P. putida en milieu LB sans peptone à différentes concentrations initiales de phénol 86
Figure 4.6 : Plate-forme expérimentale installée en salle propre 87
Figure 4.7 : Cellule d'écoulement montée sur la platine du microscope optique 88
Figure 4.8 : Vues détaillées latérale (haut) et de dessus (bas) de la chambre d'écoulement montée sur la platine du microscope optique 91
Figure 4.9 : Vitesse selon z sur la ligne (x = l/2, y = w/2, z) : pointillés = vitesses théoriques et symboles pleins = vitesses expérimentales. Mesures réalisées par suivi in-situ de particules microsphériques de 1 µm de diamètre, de concentration 6.25 e+7 particules par ml d'eau stérilisée. Température = 24 ± 1 °C. 95
Figure 4.10 : Variation du profil de vitesse locale suivant la direction de l'écoulement (axe x). Pour tout x compris entre L/4 et 3L/4 ; L = 28 mm ; u(x) = constante, Q = 100 µl/min. 96
Figure 5.1 : Schéma montrant les différentes phases de la formation de biofilm en particulier les phases 1 et 2, faisant l'objet de cette étude 100
Figure 5.2 : circuit d'écoulement pour les expériences de détachement 104
Figure 5.3 : Evolution de N/No (proportion de cellules adhérées rapporté au nombre de cellules initialement adhérées N0. N0=96, 79 et 123 respectivement pour Tw=9,3 Pa, 19.6 Pa et 24,3 Pa) en fonction de la contrainte pariétale appliquée ; pour des cellules suspendues dans du NaCl à 15 mM. Le premier cisaillement est appliqué après un Tc de 10 min sur support en claire de vinyle optique. Température = 24 +/- 1°C. 109
Figure 5.4 : Evolution de N/No (proportion de cellules adhérées rapportée au nombre de cellules initialement adhérées N0. N0 = 79) en fonction de la contrainte pariétale appliquée ; pour des cellules suspendues dans du NaCl à 0.15 mM. Le premier cisaillement est appliqué après un Tc de 45min sur support en claire de vinyle optique. Température = 24 +/- 1°C. 110
Figure 5.5 : Images montrant l'évolution du détachement de cellules de P. putida adhérées sur un support en claire de vinyle optique ; pour des cellules suspendues dans du NaCl à 0,15 mM. Cisaillement après un Tc de 45 min. Température = 24 +/- 1°C. 113
Figure 5.6 : Influence du temps de contact initial sur le taux de détachement cellulaire - Evolution de N/No (N0=79 pour Tc = 15 min, N0 = 120 pour Tc = 30 min) en fonction de la contrainte pariétale appliquée pour des cellules suspendues dans du NaCl à 15 mM; pour deux temps de contact différents. Température = 24 +/- 1°C 114
Figure 5.7 : Influence du temps de contact initial et de l'effet d'histoire du cisaillement sur le taux de détachement cellulaire - Evolution de N/No et de Tw en fonction du temps à différents temps de contact;. Expérience 1 : Tc = 42 min, No = 306, avec augmentation graduelle à partir de 0,25 Pa ; Expérience 2 : Tc =

84 min, No = 264, avec application brusque d'un cisaillement de 9,50 Pa suivi d'une augmentation graduelle de Tw .CaCl2 à 50 mM; Température = 24 +/- 1 °C *115*
Figure 5.8 : Influence du temps de contact initial et de l'effet d'histoire sur le taux de détachement cellulaire - Evolution de N/No en fonction de la contrainte pariétale appliquée ; pour deux temps de contact différents; Tc = 42 min, No = 306, : Tc = 84 min, No = 264, CaCl2 à 50 mM; Température = 24 +/- 1 °C. *116*
Figure 5.9 : Influence de la force ionique sur le taux de détachement ; Evolution de N/No en fonction de la contrainte pariétale appliquée ; pour 2 solutions salines de $CaCl_2$ de forces ioniques I1 = 10 mM (No = 136) et I2 = 50 mM (No = 149); support d'adhésion en claire de vinyle optique ; Température = 24 +/- 1°C ; Tc = 30 min. *118*
Figure 5.11 : Système d'écoulement pour la cinétique de colonisation du support d'adhésion. Pompage par pousse-seringue Vit-Fit. *126*
Figure 5.12 : Schéma de succession des étapes de la mise en œuvre de la croissance de cellules adhérées sur support solide. *128*
Figure 5.13 : Microscope optique Olympus IX70 à objectif inversé (Laboratoire de Rhéologie, UJF-Grenoble) *129*
Figure 5.14 : Cellules de P. putida adhérées sur support de verre - croissance sous cisaillement pariétal de 76,8 mPa – Température = 24°C +/- 1 – Milieu de culture LB sans peptone avec phénol 20 ppm – pH = 7. ..... *131*
Figure 5.15 : Ajustement des données expérimentales pour une des expériences menées à Tw = 9,6 mPa. *133*
Figure 5.16 : Ajustement des données expérimentales pour une des expériences menées à Tw = 76,8 mPa. *133*
Figure 5.17 : Représentation en coordonnées semi-logarithmiques des données de la figure 5.15 avec Tw = 9,6 mPa. *134*
Figure 5.18 : Représentation en coordonnées semi-logarithmiques des données de la figure 5.16 avec Tw = 76,8 mPa. *134*
Figure 5.19a : ajustement des données expérimentales pour une expérience menée à Tw = 9,6 mPa; avec un temps de latence choisi à 150 min. *135*
Figure 5.19b : ajustement des données expérimentales pour une expérience menée à Tw = 76,8 mPa ; avec un temps de latence choisi à 150 min. *135*
Figure 5.20 : Images montrant les cellules adhérées pendant la phase de latence. *135*
Figure 5.21 : Courbe de croissance pour 3 essais à Tw = 9,6 mPa. *136*
Figure 5.22 : Courbe de croissance pour 3 essais à Tw = 76,8 mPa *137*
Figure 5.24 : Evolution du taux de croissance cellulaire sous écoulement cisaillé de P. putida en fonction de la contrainte pariétale de cisaillement ; support d'adhésion en verre, T = 24 +/- 1 °C. *140*
Figure 5.25 : Schéma montrant la relation entre l'écoulement et les transferts de substrats à travers une membrane bactérienne *144*
Figure 5.26 : Schéma montrant les différents modes de transport de substrat à travers une membrane bactérienne *146*
Figure 5.27 : Evolution du taux de croissance en fonction du Reynolds - Calcul du coefficient α *149*
Figure 6.1 : Système d'écoulement pour le développement de biofilm. Pompage par pompe péristaltique *155*
Figure 6.2 : Développement de P. putida adhérées sur paroi de verre et soumises à un écoulement cisaillé de milieu LB sans peptone à 20 mg/l de phénol, à très faible débit, Q = 25,5 µl/min, observation à l'objectif 100x à 25 +/- 1 °C. a) t = 30 min : 1eres phases de l'adhésion. b) t = 23h : phases de biofilm. *157*

Figure 6.3 : Biofilm de P. putida adhéré sur paroi de verre et soumis à un écoulement cisaillé de milieu LB sans peptone à 20 mg/l de phénol, à très faible débit, Q = 25,5 µl/min, observation à l'objectif 100x à 25 +/- 1 °C. Visualisation 3D de la structure du biofilm formé dans une chambre d'écoulement – observation section par section avec un pas de 2 µm – sections de 0 à 22 µm – images prise à t = 23h. 158
Figure 6.4 : Evolution de la densité cellulaire surfacique n fonction de la hauteur z par rapport au support... 159
Les photographies sont prises à t = 23 h. 159
Figure 6.5 : Biofilm de P. putida adhéré sur paroi de verre et soumis à un écoulement cisaillé de milieu LB sans peptone à 20 mg/l de phénol, à très faible débit, Q = 25,5 µl/min, observation à l'objectif 100x à 25 +/- 1 °C. Evolution en fonction du temps de la densité cellulaire surfacique au niveau de la couche située à z = 10 µm par rapport au support d'adhésion. suivi à partir de To = 23h30min. 161
Figure 6.6 : Evolution de la densité cellulaire à z = 10 µm en fonction du temps à partir de To = 23h30min.. 162
Figure 6.7 : Age = 7 j - Structure de biofilms de P. putida sous écoulement à 160 µl/min et adhérés sur support de verre. Mise en évidence de l'arrangement selon la direction de l'écoulement. Agrandissement 10x. 162
Figure 6.8 : Age = 7 j - Structure de biofilms de P. putida sous écoulement à 160 µl/min et adhérés sur support de verre. Age = 7 j - Arrangement de la structure dans la direction de l'écoulement ; observations effectuées après fluorescence Live/Dead ; agrandissement 40X. 163
Figure 6.9 : - Structure de biofilms de P. putida sous écoulement à 160 µl/min et adhérés sur support de verre. Age = 8 j - Arrangement de la structure dans la direction de l'écoulement ; observations effectuées après fluorescence Live/Dead ; agrandissement 40X ; à différentes positions..... 163
Figure 6.10 : Mise en évidence de la mobilité et de l'organisation d'un biofilm développé sur milieu de culture solide - Biofilm de V. parahaemolyticus incubé pendant 5 jours (d'après Mc Carter, 1999)..... 164
Figure 6.13 : Simulation numérique de la distribution du champ des vitesses longitudinales 170
Figure 7.1 : Effet de l'orientation de l'axe des cellules sur la force de détachement..... 181
Figure B.1 : Milieu de culture LB stérile sous hotte à flux laminaire..... 206
Figure B.2 : Milieu LA liquide..... 207
Figure C.1 : Schéma de fonctionnement d'un spectrophotomètre UV 208
Figure D.1 : Cellules de P. putida adhérées sur support de verre – Température = 24°C +/- 1 – Milieu de culture LB sans peptone avec phénol 20 ppm – pH = 7. Image en couleur = originale, image en noir et blanc = traitée (seuil en mode binaire par code Matlab). T = 1h10 (cellules individuelles, traitement de l'image facile). 212
Figure D.2 : Cellules de P. putida adhérées sur support de verre - croissance sous cisaillement pariétal de 76 mPa – Température = 24°C +/- 1 – Milieu de culture LB sans peptone avec phénol 20 ppm – pH = 7. Image en couleur = originale, image en noir et blanc = traitée (seuil en mode binaire par code Matlab). T = 2h10 (petites colonies, traitement de l'image possible)..... 213
Figure D.3a - Comparaison des cinétique de croissance mesurées manuellement et automatiquement pour des cellules de P. putida sous cisaillement à Tw = 9,6 mPa à 24+/-1°C..... 214
Figure D.3b - Comparaison des cinétique de croissance mesurées manuellement et automatiquement pour des cellules de P. putida sous cisaillement à Tw = 76,8 mPa à 24+/-1°C..... 214
Figure D.4 : Illustration de la sensibilité du traitement d'image par rapport au seuil entre les niveaux de gris des bactéries et du fond de l'image..... 215
Figure E.1 : Schéma idéalisé du développement d'une couche limite de concentration sur paroi absorbante.. 217

Figure F.1 : Analyse de la viabilité de suspensions bactériennes au moyen du kit Live/Dead. Les cellules vivantes sont marques vertes par le Syto 9, et les cellules mortes sont marquées rouges par l'IP. L'ajout simultané du Syto 9 et de l'IP suivi d'une excitation à 470 nm montre un spectre de fluorescence. image tirée de Molecular Probes..... 219

CHAPITRE 1 : INTRODUCTION GENERALE

I– Contexte : la dépollution biologique des effluents

Les problèmes d'environnement liés aux activités de l'homme deviennent de plus en plus importants. En effet, que ce soit au niveau industriel, urbain ou agricole, la pollution générée par l'homme affecte de plus en plus le cycle de l'eau, et des traitements artificiels doivent venir en aide et compléter les cycles naturels d'auto-épuration.

Pour l'Union Européenne, l'un des grands challenges environnementaux à moyen terme est d'aboutir à un bon état écologique. La réduction des émissions de polluants dans les effluents urbains et industriels est donc d'une importance capitale.

Grace à l'avancée des techniques d'identification de polluants de ces dernières années, des systèmes permettant une évaluation plus précise et plus stricte de la qualité des eaux voient le jour (ex. système SEQ-EAU, cf. fig.1.1). Ces techniques sont plus précises et plus complètes car prenant en compte de nouvelles formes de polluants, notamment les pesticides et les micropolluants qui affectent lourdement l'écosystème (Annexe A).

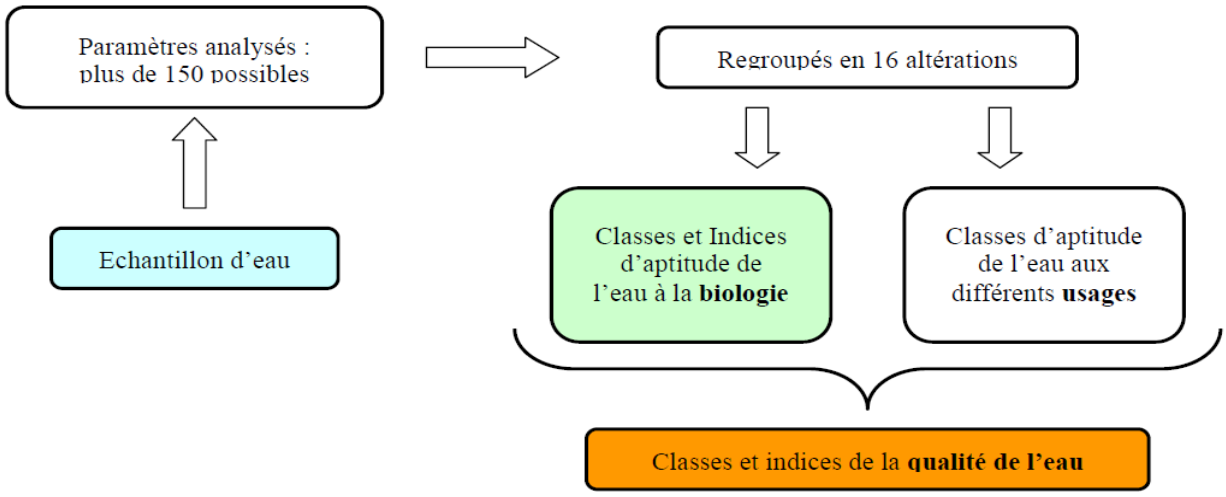


Figure 1.1 : Schéma de fonctionnement du système d'évaluation SEQ-Eau.

Jusqu'à récemment, l'utilisation de procédés physico-chimiques était la principale voie de recours pour dépolluer les effluents et limiter les émissions dans le milieu naturel. Ces procédés présentent cependant l'inconvénient d'être chers et peuvent également engendrer de nouveaux sous-produits plus ou moins dangereux (ex : chlore : THM, ozone : atrazine, etc.).

Pour limiter ce dernier inconvénient, le traitement biologique des effluents dans des installations appropriées est un moyen plus efficace pour optimiser le processus de dépollution. Le principe général d'un procédé biologique ou bioprocédé de dépollution, est d'utiliser les propriétés naturelles de microorganismes afin d'éliminer certains polluants chimiques ou biochimiques dans des conditions optimales de fonctionnement. Généralement dévolus aux pollutions présentes dans les effluents urbains et certains effluents industriels, leur extension à des sources de polluants plus diverses et plus industrielles est une voie prometteuse. Cependant, étant donné la complexité et la variété des molécules présentes dans les polluants visés, la biomasse de ces systèmes n'est pas toujours adaptée pour dégrader toutes les catégories de polluants. Un des challenges des procédés biologiques futurs serait donc de proposer des systèmes capables de s'adapter à des sources très diverses en sélectionnant des souches bactériennes spécifiques.

Pour finir, la combinaison de procédés biologiques et de procédés physico-chimiques avancés (carbone actif, résines échangeuses d'ions, ozonation, membranes, …) est une autre solution technique envisageable pour se rapprocher des exigences.

Ce travail de recherche vise des applications spécifiquement dédiées aux procédés biologiques, en particulier l'utilisation des biofiltres. Notre objectif à long terme est en particulier d'apporter une meilleure compréhension des mécanismes qui gouvernent le fonctionnement de ces procédés, en particulier la croissance de biofilms en milieu poreux. Cette compréhension est en effet nécessaire pour alimenter des modèles performants à l'échelle des bioréacteurs et exploitables en ingénierie. Ces modèles sont également nécessaires, en complément des expérimentations sur pilote, afin d'aider au design des systèmes, à l'optimisation et la conduite des procédés. Comme on le verra par la suite, cet objectif requiert de s'intéresser à des phénomènes se produisant à différentes échelles.

II– Traitement de l'eau par biofiltration

Les procédés biologiques comprennent deux grandes classes de réacteurs :

- Les procédés à cultures libres, où la biomasse épuratrice est en suspension sous forme de flocs dans des bassins agités, aérés ou non.

- Les procédés à cultures fixées, pour lesquels la biomasse se développe sous forme d'un biofilm adhéré sur un support solide. Il existe différentes implémentations pour ce type de procédé : lits bactériens, biodisques, biofiltres.

Le contexte général de cette thèse concerne principalement l'utilisation des biofiltres. Ce procédé va être présenté plus en détail par la suite. Cependant, certains résultats de cette étude pourraient être aisément étendus aux autres types de procédés à cultures fixées.

II.1- Principe de fonctionnement des biofiltres

Les biofiltres sont des milieux poreux constitués d'un matériau granulaire solide à forte surface spécifique, à travers lesquels s'infiltrent des effluents liquides ou gazeux chargés de polluants. Pour ce procédé, plus connu sous le nom de « biofiltration », les bactéries chargées de la dégradation des polluants sont accrochées à des surfaces, contrairement aux procédés à cultures libres. Si les conditions physiologiques et environnementales sont favorables (matière organique, matière minérale, acidité, température…), la biomasse épuratrice se développe et forme un biofilm que nous allons décrire plus loin. S'il s'agit d'un procédé aérobie, l'oxygène nécessaire à la biomasse est soit directement dissous dans l'influent à traiter, soit injecté directement dans le biofiltre sous forme gazeuse; ce dernier cas donne lieu à un écoulement triphasique (gaz-liquide-solide).

La dynamique du biofilm correspond à un équilibre entre divers phénomènes bio-physico-chimiques (croissance, érosion, détachement) et cet équilibre est dicté par l'hydrodynamique. Comprendre cette relation entre la dynamique de la biomasse et l'hydrodynamique nécessite de s'intéresser d'abord à des processus au niveau local : adhésion initiale des cellules, croissance du biofilm primaire, mise en place d'un biofilm mature. A une autre échelle, il s'agit de comprendre comment le biofilm se distribue spatialement au niveau des pores et comment cette structuration régit le comportement macroscopique du système.

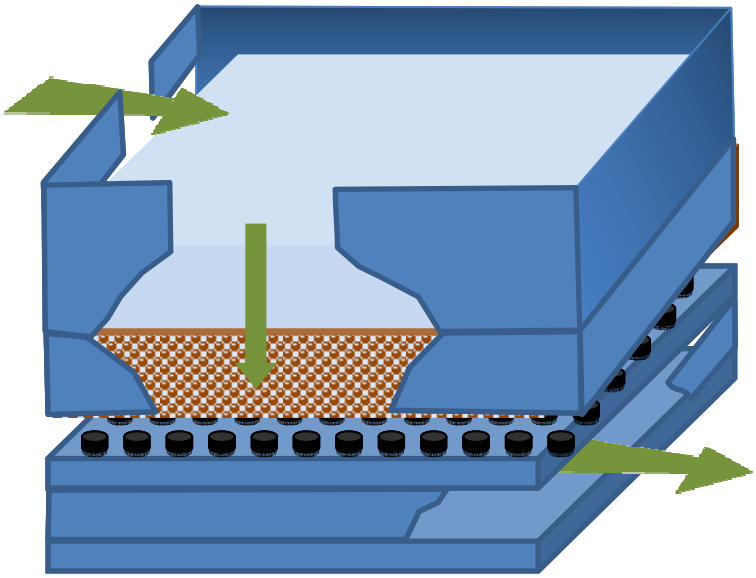


Figure 1.2 : Schéma global de fonctionnement d'un biofiltre

II.2- Efficacité et limites des procédés à cultures fixées

Les biofiltres constituent une alternative encourageante par rapport aux procédés classiques de traitement de l'eau. L'avantage de ces procédés se trouve dans leur capacité à traiter des effluents fortement chargés en polluants organiques (efficacité comparable aux procédés biologiques classiques pour un moindre coût).

Les biofiltres sont des systèmes à ***géométrie plus compacte*** avec une taille des installations jusqu'à dix fois plus petite que ceux des procédés à boues activées. En effet de par leur propension à coloniser la surface sous forme de colonies bactériennes puis de biofilms, la concentration des cellules fixées est beaucoup plus importante que dans les procédés à cultures libres.

Cette forte concentration en biomasse active s'associe à une ***activité métabolique beaucoup plus forte*** pour ces procédés, par rapport aux procédés par boues activées. Ainsi, Polprasert (1989) a observé une capacité épuratoire plus importante pour les microorganismes sessiles (i.e. constituant le biofilm) par rapport à leur homologues planctoniques (i.e. en suspension dans la phase aqueuse).

Une bonne ***adaptation physiologique*** du biofilm aux conditions environnementales est également remarquée chez les microorganismes qui se développent sous forme de biofilm. Leur

bonne résistance vis-à-vis de la toxicité de certains polluants d'origine organique est en notamment soulignée par certains auteurs (Lazarova and Manem, 1995 ; Donlan, 2002). Cette résistance à la toxicité est le résultat de la production par les microorganismes d'exopolymères formant une matrice protectrice qui permet de limiter les mécanismes de détachement induits par l'écoulement cisaillé. Cette barrière joue aussi un rôle de barrière de diffusion et contrôle ainsi les flux et les transferts de masse.

Le caractère compact du système rend aussi la ***production de boues nettement moins importante***; d'ailleurs les caractéristiques des boues secondaires produites lors du traitement diffèrent considérablement selon qu'elles soient produites par cultures fixées ou par cultures libres.

Même si les procédés à cultures fixées possèdent beaucoup plus d'avantages, ils présentent certaines limites et leur efficacité pourrait encore être améliorée. Ainsi, de par la présence de la barrière de diffusion induite par la matrice polymérique, les microorganismes attachés présentent un taux de croissance plus faible que celui des microorganismes planctoniques pour certaines conditions opératoires (effluents très dilués par exemple). Par ailleurs, le transfert de l'oxygène est réduit au fur et à mesure que le biofilm s'épaissit, ce qui limite la décomposition aérobie dans les procédés à cultures fixées.

A l'échelle locale, le caractère généralement hétérogène de la structure du biofilm modifie le transfert local de nutriments à l'intérieur du biofilm et affecte sa morphologie (ratio massique entre cellules actives et cellules inactives).

A l'échelle globale, la croissance et le détachement de biofilms peuvent conduire à la création de chemins préférentiels pour le champ d'écoulement, ce qui réduit le temps de séjour, perturbe la distribution spatiale de l'effluent à traiter, et réduit ainsi l'efficacité du traitement.

Le plus gros frein au bon fonctionnement des systèmes de biofiltration est que dans la plupart des cas, la croissance du biofilm n'est pas parfaitement maitrisée en raison principalement de la complexité de l'hydrodynamique dans les biofiltres.

Par exemple, la croissance du biofilm peut conduire à un colmatage progressif du biofiltre. En effet l'épaisseur du biofilm augmente progressivement, affectant ainsi fortement l'hydrodynamique dans le milieu poreux en diminuant sa conductivité hydraulique, sa porosité et sa dispersivité. Il en résulte une faible diffusion des nutriments vers les couches internes du biofilm, mais aussi des pertes de pression dans le système. Du point de vue économique, cela entraîne des coûts énergétiques de fonctionnement et affecte donc la performance du procédé. Il existe des techniques de traitement du colmatage, mais elles nécessitent au préalable l'arrêt total du procédé suivi d'un lavage total du biofiltre en fluidisant le milieu poreux, avant remise

en fonctionnement. Cette discontinuité constitue une forte contrainte pour l'utilisation des biofiltres puisqu'elle engendre des coûts et une perte considérable de temps. La nécessité de mettre en place des stratégies plus performantes pour stopper, limiter ou traiter le biocolmatage dans les biofiltres est donc de taille; y arriver passera par un meilleur contrôle du développement des biofilms durant le procédé.

L'analyse de ces aspects permet de se rendre compte du degré important du couplage entre l'hydrodynamique et la dynamique bactérienne, couplage rendu encore plus complexe pour un biofiltre fonctionnant en conditions aérobies avec des écoulements triphasiques.

Tous ces inconvénients font que les biofiltres, beaucoup utilisés en milieu urbain, sont moins répandus sur d'autres applications. Leur extension à des domaines plus variés ainsi que l'optimisation de leur performance nécessitent de mener des investigations encore plus poussées sur ces procédés.

CHAPITRE 2 : ETAT DE L'ART SUR LA CROISSANCE DE BIOFILMS EN MILIEU POREUX

I- Introduction

La motivation initiale et l'objectif à long terme du projet dans lequel s'inscrit ce travail de recherche concernent la modélisation la plus objective possible du fonctionnement des biofiltres de traitement des effluents urbains et industriels.

La modélisation des bioprocédés n'est pas un sujet nouveau en soi : des modèles opérationnels pour les boues activées existent et fonctionnent depuis longtemps. Ces modèles peuvent être basés soit sur des approches de type système, avec une hydrodynamique des bassins gérée de manière simplifiée (bassins à mélange complet homogène, bassins de type piston avec dispersion longitudinale) ou calculée de manière précise grâce aux équations de Navier Stokes. Les aspects biologiques sont dans les deux cas le plus souvent traités avec des équations de convection-dispersion pour les divers solutés et la phase biologique, ces équations étant couplées par divers termes sources représentant les cinétiques de croissance et de dégradation des substrats (par exemple : modèle ASM1 de Henze et al, 2000). Les approches utilisées sur les cultures libres ont ensuite été transposées pour la modélisation d'autres systèmes (lits bactériens, biofiltres….) mais ont rapidement montré leurs limites.

Dans les cultures libres, la phase biologique peut être vue, en première approche, comme une suspension et du fait du degré important de mélange des écoulements rencontrés, la biomasse se comporte de manière « passive » vis-à-vis de l'écoulement.

Dans le cas d'un biofiltre, les choses sont différentes : l'existence d'un biofilm provoque une séparation nette entre une partie de l'écoulement et la phase biologique. Les couplages entre la croissance du biofilm et l'écoulement sont très importants (transfert de masse à l'interface biofilm-phase aqueuse, et au sein même du biofilm, bio-colmatage, création de chemins préférentiels…).

II- Etat de l'art sur la modélisation des biofilms et la croissance des biofilms en milieux poreux

Il existe de nombreux travaux sur l'étude des biofilms et sur la croissance des biofilms en milieux poreux dans la littérature. Les travaux les plus anciens étaient principalement consacrés

à la compréhension du transport microbien et du développement de biofilms dans les sols, avec pour application la bioremédiation ou la compréhension du transport de certains polluants. Les contributions issues de ces travaux ne sont pas forcément directement transposables vers celles rencontrées dans les bioprocédés à cultures fixées, du fait de la nature hétérogène des sols par rapport aux procédés industriels ainsi que des conditions diverses et variées rencontrées, en termes de physico-chimie et d'hydrodynamique.

Il existe actuellement deux grands types de contributions qui sont en lien avec la problématique dont il est question ici :

(i) Contributions émanant d'études directement dévolues aux applications à grandes échelles des biofilms en milieux poreux : ces applications incluent la bioremédiation ou la contamination des sols, et le traitement des effluents liquides et sont basées sur des approches de type « Chemical Engineering».

(ii) Contributions issues d'études plus fines consacrées à la caractérisation des biofilms eux-mêmes (développement, structure, composition, propriétés mécaniques…) à plusieurs échelles.

Ces deux catégories de travaux, mettant en œuvre des approches expérimentales et numériques, ne sont pas forcément exercées par les mêmes communautés scientifiques. Le lien entre ces communautés est encore assez ténu, car les travaux effectués, selon les communautés, ont des objectifs différents, font appel à des champs disciplinaires différents, et se consacrent à certains aspects spécifiques des biofilms.

II.1- Etudes à l'échelle du biofilm

II.1.1- Observations expérimentales

II.1.1.1- Les différents composants d'un biofilm

Un biofilm est principalement composé de micro-organismes encapsulés dans une matrice extracellulaire organique constituée d'exopolymères (EPS). Ces EPS participent à la survie des cellules bactériennes en agissant comme une barrière protective contre des stress extérieurs. Ils constituent une réserve de nutriments et, en tant que matrice « solide », permettent de maintenir l'intégrité du biofilm.

On distingue :

a) Les bactéries

Les bactéries sont des organismes dit procaryotes, de formes et de tailles très diverses. Certaines bactéries sont capables de changer de forme au cours de leur existence : elles sont alors dites pléomorphes. Leur taille moyenne se situe généralement autour de 1 à 1,5 µm de large pour 2 à 6 µm de long.

La constitution des cellules procaryotes est presque la même quelle que soit l'espèce bactérienne considérée (fig. 2.1) : une paroi rigide et de structure complexe entoure la cellule. La membrane plasmique interne, séparée de la paroi par l'espace périplasmique, peut former des structures internes appelés mésomes. L'intérieur de la cellule procaryote entourée par la membrane plasmique, constitue le cytoplasme, contenant le nucléoïde porteur du matériel génétique et des corps d'inclusions simples comme les ribosomes ou des vacuoles.

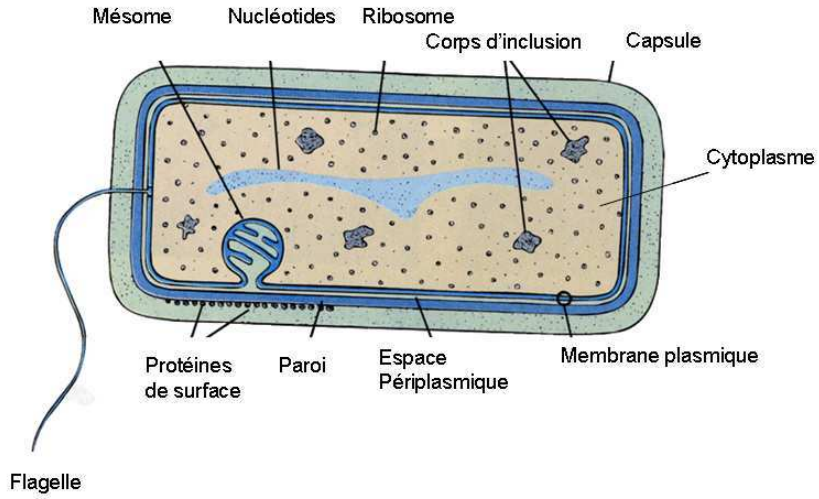


Figure 2.1 : Schéma général d'une cellule procaryote (d'après cours A. Guillet, Pagora, Grenoble-INP)

Certaines cellules possèdent un flagelle, des cils ou une capsule externe, qui sont des composants facultatifs de la cellule procaryote.

On ne décrira pas ici tous les composants d'une cellule bactérienne. Cependant, étant donné que l'on sera amené par la suite à s'intéresser aux propriétés d'adhésion bactérienne, quelques détails sur la paroi cellulaire sont nécessaires.

La paroi cellulaire est un élément important car elle donne à la bactérie sa forme et la protège de la lyse osmotique (entrée d'eau pouvant aboutir à une explosion de la bactérie) par sa rigidité. Toutes les parois bactériennes contiennent un peptidoglycane, un polymère complexe que l'on ne trouve que dans les cellules bactériennes.

Les bactéries se trouvent classées en deux types en fonction de la structure de la paroi : les bactéries à Gram + (fig. 2.2a) et Gram- (fig.2.2b).

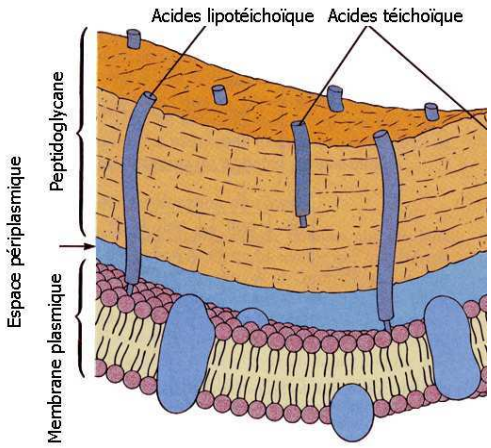


Figure 2.2a : paroi d'une cellule à gram+

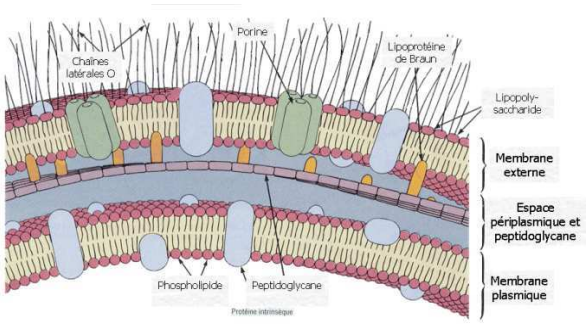


Figure 2.2b : paroi d'une cellule à gram-

Dans le cas des bactéries à Gram+, la paroi est constituée de peptidoglycane (formé d'une partie glucidique et d'une partie peptidique). On trouve aussi des acides téichoïques qui, connectés au peptidoglycane et aux lipides de la membrane plasmique deviennent lipotéichoïques. Ce sont ces molécules qui assurent le lien entre la paroi et la membrane plasmique, séparées par l'espace périplasmique constitué d'un gel. Ce sont ces molécules d'acide qui sont responsable de la charge négative de la surface de bactéries à Gram+.

Dans le cas des bactéries à Gram-, la paroi est plus complexe et le peptidoglycane, formé d'une couche de 1 nm d'épaisseur, ne représente que 5 à 10 % de la masse totale de la paroi et est enchâssé entre deux membranes plasmiques. A l'extérieur du peptidoglycane on trouve la membrane externe. Elle est constituée de lipopolysaccharides ayant une partie lipidique, une partie polysaccharide, une chaîne latérale O (quelques sucres particuliers variant suivant les souches bactériennes).

Le fait que pour les bactéries à Gram+, le peptidoglycane soit directement en contact avec le milieu extracellulaire, alors qu'il est enchâssé entre deux membranes plasmiques pour les bactéries à Gram-, lui confère une réactivité différente au colorant de Gram : c'est là l'origine de leur classification.

La membrane est la première barrière de protection de la cellule contre l'entrée des sels, d'antibiotiques ou de toute autre substance nocive. Elle est aussi une barrière à la sortie des enzymes périplasmiques.

Les porines sont des protéines spéciales qui s'assemblent par trois pour former des canaux traversant la membrane externe. Ces canaux seront les chemins d'accès de quelques molécules de "moyenne taille" (glucose, monosaccharides…) qui ne peuvent pas traverser autrement la barrière. Les molécules plus grosses comme les vitamines devront être transportée par des transporteurs spécifiques.

b) Les substances polymériques extra-cellulaires (EPS)

Les EPS comptent entre 50% et 90% de la matière organique totale des biofilms (Flemming *et al.,* 2000). Leurs propriétés physico-chimiques peuvent évoluer dans le temps mais ils sont principalement composés de polysaccharides. Certains de ces polysaccharides sont des polyanions tandis que d'autres possèdent une charge neutre. Cette propriété polyanionique joue un rôle important dans la stabilité du biofilm puisqu'elle assure une cohésion forte entre ces polymères et les cations divalents tels que le Calcium (II) et le Magnésium (II). Dans le cas de certains biofilms à bactéries à Gram+, les polymères peuvent être de nature cationique. Les EPS sont également liées à plusieurs macromolécules telles que des protéines et des lipides (Flemming *et al.,* 2000). Li *et al.* (2008) ont montré que la teneur en protéine est dominante dans les couches internes du biofilm et que sur les couches externes, la teneur des protéines est plus importante que celle des polysaccharides.

Les EPS sont composées en grande partie d'eau, ce qui indique la présence d'un très grand nombre de liaisons hydrogène dans leur structure. En raison de cette forte hydratation, les EPS ont un rôle protecteur contre la dissécation des biofilms dans les milieux naturels. Leur fonction de barrière contre le transfert d'antibiotiques vers le biofilm contribue également à la résistance antimicrobienne des biofilms.

Les EPS sont essentiellement hydrophobes ; mais certains d'entre elles possèdent à la fois les deux propriétés : hydrophobe et hydrophile (Sutherland, 2001). Leur solubilité peut également

varier. Sutherland *et al.* (2001) ont fait remarquer deux propriétés importantes des EPS qui ont une influence sur le biofilm : (i) la structure et la composition des polysaccharides déterminent la conformation principale des biofilms. Par exemple la plupart des EPS possèdent certaines molécules rigides, très peu solubles, tandis que d'autres sont en général très solubles dans l'eau ; (ii) Généralement, la structure des EPS n'est pas uniforme mais peut varier spatialement et temporellement.

Leriche *et al.* (2000) ont montré que le taux de production des EPS ne dépend pas seulement du type d'organisme mais est également fonction de l'âge du biofilm, des conditions de nutriments et de l'environnement aquatique.

II.1.1.2- Couplages observés entre hydrodynamique et développement de biofilms

L'organisation spatiale du biofilm évolue avec le temps. Les biofilms sont constitués d'organismes vivants et en tant que tels, leur formation est un processus dynamique et complexe qui suit différentes phases. On donne ici les principes généraux de ces différentes phases.

Stoodley *et al.*(2002) définissent cinq étapes caractéristiques. La première phase (1), correspond à l'adsorption de molécules à partir du cœur de l'écoulement, et de la création de ce qu'on appelle un film de conditionnement. La seconde phase (2) résulte de l'adhésion primaire des bactéries planctoniques. La troisième phase (3) résulte de la croissance bactérienne des micro-organismes adhérés donnant lieu à des micro-colonies à la surface. La dernière phase (4) consiste en une dissémination et en la croissance de ces colonies sur la surface pour aboutir à un biofilm mature. Finalement, il est communément admis que l'évolution ultérieure du biofilm et son interaction avec l'écoulement amènent au détachement de fragments ou de cellules individuelles qui pourront coloniser d'autres portions de la surface. Ces différentes étapes sont illustrées sur la figure 2.3.

Ces processus sont tous plus ou moins fortement couplés avec l'hydrodynamique, entre autres facteurs environnementaux (ex. physico-chimiques). Dans le souci de mieux contrôler ces couplages, les premières études se sont intéressées à la structuration des biofilms en faisant varier les conditions hydrodynamiques, les paramètres d'étude étant la forme du biofilm, son épaisseur, sa densité (Peyton, 1996 ; Tsai, 2005, etc.). Pendant longtemps, ces couplages avec l'hydrodynamique ont été vus comme résultant de phénomènes purement mécaniques. Ainsi par exemple, les effets de l'interface du biofilm sur les couches limites hydrodynamiques et de

concentration influencent les transferts de masse et la croissance du biofilm (Eberl et al, 2005 ; Wäshe et al, 2002). La morphologie et la taille des biofilms dépendent aussi de l'intensité des mécanismes de détachement (Wanner, 1996 ; Wanner and Gujer, 2004). Les biofilms développés sous faible cisaillement ont plutôt tendance à donner des structures hétérogènes, peu denses, alors que les biofilms développés sous cisaillement important sont plus fins, plus denses et présentent une interface moins tortueuse (fig. 2.4).

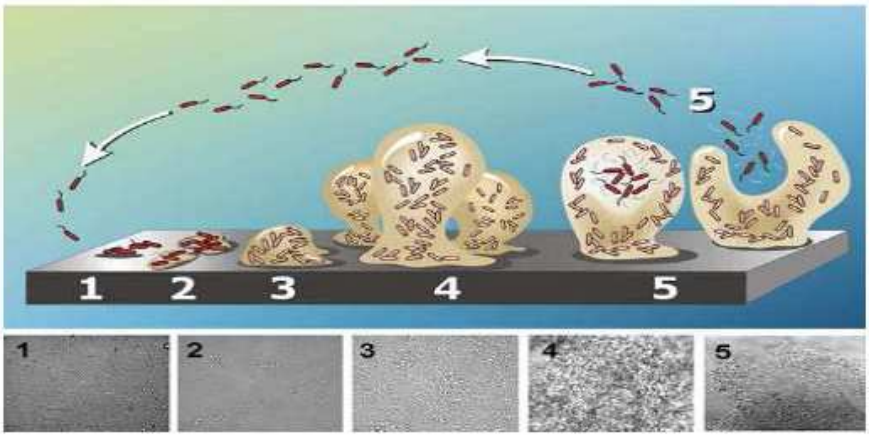


Figure 2.3 : Les différentes étapes de la formation d'un biofilm (Stoodley et al, 2002)

Des travaux plus récents cependant montrent que ces couplages sont plus complexes qu'envisagés initialement : en particulier, ces couplages pourraient impliquer non seulement des effets mécaniques mais aussi des effets physiologiques. Par exemple, Liu et Tay (2001) rapportent que les bactéries dans un biofilm produisent des molécules permettant une communication entre cellules (*quorum sensing* ou « cell-to-cell signaling molecules ») et une autorégulation du biofilm en regard d'un stress environnemental externe. Qi *et al.* (2008) ont montré que la production d'EPS était hautement dépendante du cisaillement. Ce constat, comme on le verra plus tard, rejoint certaines théories pour expliquer les observations faites en milieu poreux à l'échelle globale. Simoes *et al.*(2007) enfin ont observé des métabolismes pour les bactéries et des typologies de biofilm très différents selon, que l'on soit en conditions laminaires ou turbulentes. Là encore, peut-on expliquer ces observations par des phénomènes purement mécaniques (un écoulement turbulent favorisera les phénomènes de transport vers l'interface du biofilm, alors que dans le même temps, les contraintes turbulentes et les effets associés (ex. détachement) seront plus importants) ? Ou au contraire, existe-t-il d'autres phénomènes liés par exemple à une adaptation métabolique du biofilm à un milieu fluctuant ?

Finalement, selon les articles scientifiques les plus récents, les biofilms apparaissent comme des communautés complexes de cellules, capables de réguler leur métabolisme, et de s'adapter à la diversité des facteurs extérieurs ou à la fluctuation de ces facteurs : chaleur, pH, disponibilité des substrats mais aussi conditions hydrodynamiques (cisaillement, pression, vitesse interfaciale…).

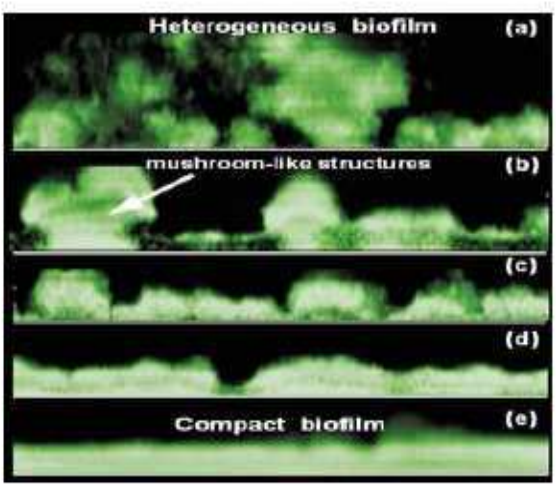


Figure 2.4 : Différentes structurations externes du biofilm : la contrainte de cisaillement pariétal augmente entre les clichés (a) et (e) (d'après Picioreanu et van Loosdrecht, Delft University, Pays-Bas).

II.1.2- Modélisation mathématique et numérique des biofilms avec couplages explicites avec l'hydrodynamique

II.1.2.1- Stratégies de modélisation

Il existe de nombreux modèles pour décrire la dynamique des biofilms.

Dans une première classe de modèles, le système est divisé en différents compartiments (écoulement externe, couche limite, biofilm, support solide) et on modélise les échanges entre ces différents compartiments ainsi que les transformations éventuelles ayant lieu au sein de ces compartiments. La formulation mathématique de ces modèles se fait au moyen d'équations de transport de type convectif-diffusif, la complexité de la structure du biofilm étant prise en compte de manière plus ou moins raffinée en introduisant des lois constitutives représentant les

propriétés liés au transport (diffusion effective dans le biofilm, transfert de masse) ou à l'évolution de la structure du biofilm (aire interfaciale par exemple) (fig. 2.5) Une revue assez exhaustive de ce type de modèles est donné dans la revue « Mathematical Modeling of Biofilms» du groupe IAW Task Group on biofilm modeling (2006).

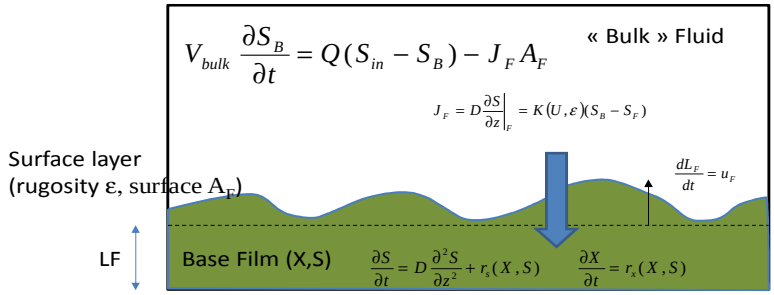


Figure 2.5 : exemple de modélisation simplifiée (adapté de Mathematical Modeling of Biofilms, 2006). Le biofilm est composé d'une « base », décrite par une épaisseur L_F et les concentrations S et X en substrat et biomasse. La surface est caractérisée par une rugosité et une aire interfaciale. La consommation des substrats et la croissance bactérienne sont gérées dans le biofilm par des équations de réaction-diffusion. Le transfert de masse à l'interface dépend d'un coefficient fonction de la rugosité locale et de la vitesse moyenne dans la partie fluide (bulk). Ce dernier compartiment est considéré comme étant à mélange complet. L'évolution de la concentration en substrat est gérée par un bilan de masse sur le volume. Enfin la vitesse de croissance de l'épaisseur dépend d'une vitesse u_F elle-même dépendante de la variation de volume du biofilm (donc dX/dt).

Une classe de modèles plus récents propose de simuler numériquement de manière plus explicite les interactions biofilm/hydrodynamique, notamment au niveau de sa morphologie. Ces études concernent principalement des biofilms développés sur substrats plans, quelques travaux plus récents étant désormais disponibles pour des géométries plus complexes. Ces modèles essaient de suivre l'évolution de l'interface du biofilm en fonction des conditions hydrodynamiques. Un algorithme général (même s'il existe des variantes) est exposé sur la figure 2.6 (Picioreanu *et al.*, 2000).

(i) Pour une structure de biofilm donnée, le champ de vitesses extérieur est calculé.

(ii) La connaissance du champ de vitesses permet alors de résoudre le problème de transport des nutriments vers le biofilm puis dans le biofilm.

(iii) Les équations gérant les différentes transformations et la croissance de la biomasse sont ensuite résolues.

(iv) Dans une dernière étape, la biomasse est propagée de façon à calculer un éventuel changement de la géométrie du biofilm.

A partir de cette procédure générale sur certaines étapes, plusieurs stratégies peuvent être envisagées. Par exemple dans l'étape (ii), le biofilm peut être considéré comme un milieu effectif et on ne gère les phénomènes de transport qu'au moyen d'équations de diffusion. Dans certains modèles plus raffinés, le biofilm est vu comme un milieu poreux, et le calcul du champ d'écoulement fait intervenir un couplage entre les équations de Navier-Stokes dans le milieu externe et de Brinkman (qui sont une généralisation des équations de Darcy) dans le biofilm.

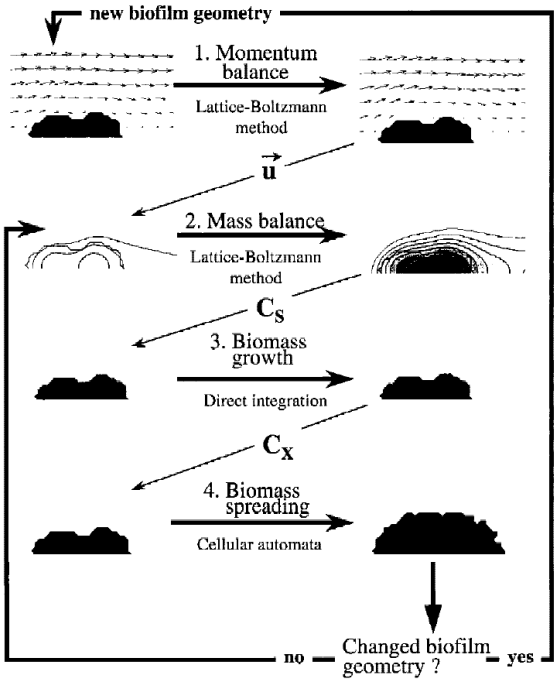


Figure 2.6 : Principales étapes de modélisation des interactions biofilm/hydrodynamique.

Diverses techniques peuvent être utilisées pour simuler la croissance et la « propagation » du biofilm lui-même (étapes iii et iv) comme les automates cellulaires ou les éléments discrets notamment (Picioreanu *et al.,* 2000). Nous n'entrerons pas dans les détails de manière exhaustive. A titre d'exemple, dans la technique des automates cellulaires, l'espace physique est divisé en un certain nombre de mailles et le biofilm est représenté par un champ de concentration en biomasse. Les mailles sont autorisées à se remplir en biomasse jusqu'à une concentration maximale prédéterminée. La cinétique d'accumulation de la biomasse dans une maille est régie par une cinétique de type Monod (que nous définirons plus tard). Une fois que la maille est en état de saturation, des règles simples sont employées pour localiser la maille dans laquelle l'excès de biomasse sera injecté. Les conditions hydrodynamiques locales peuvent être introduites dans ces lois en particulier au niveau de l'interface du biofilm, mais les structures

obtenues sont cependant dépendantes des règles (plutôt subjectives) qui sont utilisées pour propager la biomasse.

D'autres aspects comme l'érosion continue du biofilm ou le détachement de fragments peuvent aussi être introduits (Bryers, 1988; van Loosdrecht *et al.,* 1995) mais là aussi, les résultats obtenus sont fortement dépendant des lois de fermeture utilisées pour caractériser ces phénomènes. La figure 2.7 présente un exemple de résultats tirés de (Loosdrecht et al, 2002).

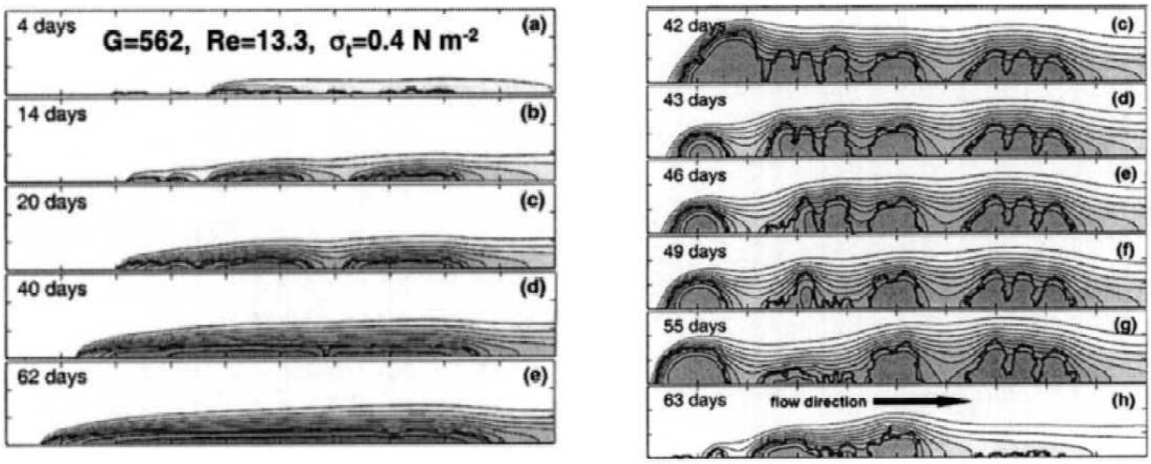


Figure 2.7 : Exemples de structures obtenues lors de la simulation numérique de biofilms utilisant des automates cellulaires.

Même si les observations qualitatives sont satisfaisantes, les simulations ne sont cependant pas toujours confrontées finement à des résultats expérimentaux sur des biofilms cultivés dans les mêmes conditions opératoires : il est difficile de juger complètement de la pertinence physique de certains éléments des modèles numériques (lois de propagation de la biomasse d'une maille à l'autre, lois constitutives introduites pour les effets d'érosion et de détachement …) et de leur caractère prédictif. Les cinétiques de croissance elles-mêmes ne sont pas forcément correctes : dans un papier récent sur les simulations numériques de biofilms avec de telles techniques, Laspidou *et al.* (2010) concluent qu'une réelle avancée dans ce type de modèles apparaitra lorsque certains phénomènes biologiques, comme la « communication extracellulaire » via des molécules « signaux » seront incorporés afin d'avoir des règles de propagation et de croissance de la biomasse basées sur une approche plus physique. Comme on le verra dans le reste de cette revue, certaines tentatives sur ce point ont été entreprises à l'échelle des milieux poreux.

II.1.2.2- Modélisation de certaines lois constitutives à introduire dans les modèles

Quelles que soient les stratégies adoptées, les modèles doivent intégrer certaines lois constitutives représentant les phénomènes de croissance, d'attachement et de détachement du biofilm ainsi qu'éventuellement l'adhésion initiale des cellules. Nous présentons ci-après un résumé des approches concernant certaines de ces lois constitutives.

a) Modélisation des cinétiques de croissance

a.1) Les différentes phases de la croissance bactérienne :

La croissance est la multiplication du nombre de cellules d'une population bactérienne. Durant la croissance, la bactérie grandit puis se divise en deux ; l'ADN et les autres constituants de la cellule vont également se dupliquer à travers un ensemble de mécanismes enzymatiques. La croissance peut se produire aussi bien en milieu solide qu'en milieu liquide. La cinétique de croissance est répartie sur plusieurs phases distinctes dont l'enchaînement peut être représenté par une courbe de croissance (fig. 2.8). Pour un milieu de culture liquide sous conditions de nutriments non renouvelées (croissance en batch), ces différentes phases peuvent être décrites comme suit :

- **Phase de latence :** Cette phase correspond à l'adaptation du microorganisme aux conditions de culture (nutriments, physico-chimie…). Il n'y a pas de croissance dans cette phase. Celle-ci est nécessaire pour permettre à la bactérie de synthétiser les enzymes adaptées au nouveau substrat.

- **Phase exponentielle :** Cette phase est caractérisée par une croissance rapide de la population bactérienne. La cinétique de croissance suit une loi exponentielle dont le paramètre essentiel est le taux de croissance, noté μ. Celle-ci dépend des conditions physico-chimiques du milieu de culture. La phase exponentielle correspond également à une viabilité maximale des cellules et donc à une mortalité moindre.

- **Phase de ralentissement :** Cette phase correspond à la diminution du taux de croissance et de la concentration éléments nutritifs, et au commencement de

l'accumulation de certains déchets toxiques, qui vont s'intensifier lors de la phase stationnaire. Il existe un début d'autolyse des bactéries.

- **Phase stationnaire :** Le taux de croissance devient nul (μ = 0) ; cette phase correspond à un équilibre entre multiplication et mortalité.

- **Déclin :** La phase de déclin correspond à l'épuisement total de toutes les ressources nutritives du milieu de culture. Le taux de croissance est négatif (μ < 0). Il y a accumulation de métabolites toxiques. Il se produit une diminution d'organismes viables et une lyse cellulaire sous l'action des enzymes protéolytiques endogènes. Cependant, il persiste une croissance par libération de substances lors de la lyse.

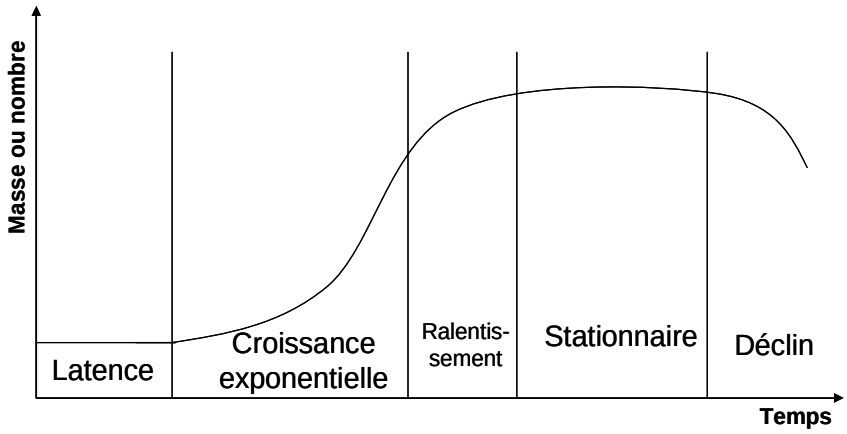


Figure 2.8 : Allure typique de la croissance des populations bactériennes

a.2) Modélisation de la croissance bactérienne :

La dynamique de la croissance bactérienne peut être modélisée de différentes façons. La plus courante est d'utiliser une loi de la forme **:**

$$\frac{dB}{dt} = (\mu - b)B \qquad (Eq.2.1)$$

B est la concentration en biomasse ou le nombre de cellules bactériennes dans le milieu, μ le taux de croissance [T^{-1}], b le coefficient de mortalité [T^{-1}] et t est le temps [T].

Dans cette équation, le taux de mortalité b est souvent décrit par une constante et on s'intéressera plus particulièrement au taux de croissance qui dépend des conditions extérieures. Si on suppose que la cadence de division cellulaire est constante, la solution de l'équation donne une croissance de type exponentiel :

$$B = B_{0.} e^{(\mu - b)t} \qquad (Eq.2.2)$$

Bo = biomasse initiale supposée proportionnelle au nombre de cellules;

Dans le cas général, le taux de croissance (μ) n'est pas constant et dépend des conditions physico-chimiques, en particulier des différents substrats qui limitent ou inhibent la croissance. Une des formulations les plus utilisées est la loi de Monod qui s'écrit :

$$\mu = \mu_{\max} \prod_i \frac{Li}{k_{Li} + Li} \qquad (Eq.2.3)$$

Où L_i est la concentration du substrat i dans le milieu de culture, K_{Li}, la constante de saturation pour le substrat i, μ_{max} le taux de croissance maximum et μ le taux de croissance effectif. L'expression se simplifie si pour tout élément i, sa concentration L_i est largement supérieure à K_{Li}, μ tend alors vers 1. L_i n'intervient pas sur la vitesse de croissance et on retrouve une croissance exponentielle. Dans le cas contraire, la croissance est ralentie si pour un substrat i, L_i est inférieur ou du même ordre de grandeur que K_{Li}. Le substrat i est alors un facteur limitant.

Nous nous n'étendrons pas plus sur les formulations des cinétiques de croissance. Il en existe en outre d'autres que celles de la loi de Monod. Retenons juste les points suivants :

- les paramètres intervenant dans les lois cinétiques ne font apparaître que les conditions physico-chimiques ;

- s'il existe des effets de l'hydrodynamique sur ces cinétiques, elles n'apparaissent pas explicitement dans ces lois ;

- Strictement parlant, B dans la loi de Monod est le nombre de bactérie/volume. Souvent, en bioprocédés, on raisonne en concentration de biomasse. C'est ce qui est fait en cultures libres. Même si on se limite à un système mono-espèce, comme on le verra plus tard dans la description des modèles de croissance des biofilms en milieu poreux, cette formulation peut

être critiquable lorsque l'on s'intéresse aux biofilms, notamment lorsque la « biomasse » est représentée par un champ de concentration unique représentant l'ensemble bactéries+EPS. De plus, les paramètres de la loi de Monod sont calés sur des valeurs expérimentales issues de cultures en batch où les bactéries sont en suspension. Rien ne prouve que les paramètres mesurés soient encore valables dans les biofilms sous écoulement.

b) Modélisation des transferts de masse

Comme on l'a vu au paragraphe précédent, le taux de croissance bactérien est modulé par la concentration des nutriments disponibles. Selon la complexité du modèle de biofilm utilisé, il peut alors être nécessaire de calculer la concentration locale vue par la biomasse au sein du biofilm et il faut s'intéresser aux modifications apportées au processus de transfert de masse par le biofilm.

Les travaux de recherche menés ces vingt dernières années ont permis de mieux comprendre le mécanisme de transfert de masse au sein des biofilms sous l'effet des conditions hydrodynamiques (Zhang and Bishop, 1994 ; Yang and Lewandowski, 1995 ; Bishop *et al.*, 1997; Garcia Lopez *et al.*, 2003).

Certains auteurs utilisant des microélectrodes ont pu mesurer le coefficient de diffusivité locale dans un biofilm (Beyenal and Lewandowski, 2000 ; Bryers and Drummond, 1998). A partir de l'application de la conservation de la masse de traceurs transportés par l'écoulement au sein de biofilms, les coefficients de diffusivité moyenne de ces biofilms ont pu être estimés (Zhang *et al.,* 1998 ; Brito and Melo, 1999). Dans d'autres travaux de recherche (Horn and Hempel, 1997 ; Nicolella *et al.*, 1998 ; Picioreanu *et al.*, 2000 ; Wasche *et al.*, 2002), on a utilisé le nombre de Sherwood pour décrire l'effet des conditions hydrodynamiques sur le transfert de masse. Le nombre de Sherwood est un nombre adimensionnel utilisé ici pour analyser le transfert de masse à travers une interface biofilm/phase aqueuse. Il est donné par le rapport entre le transfert total de masse et le transfert par diffusion.

$$S_h = \frac{K_c L_c}{D} \qquad (Eq.2.4)$$

Dans cette équation, K_c est le coefficient de transfert de masse, L_c une longueur caractéristique désignant la couche limite de concentration et D est le coefficient de diffusion du soluté considéré. En général le nombre de Sherwood dépend des nombres de Reynolds et de Schmidt et s'exprime sous la forme suivante :

$$S_h = a.\mathrm{Re}^n.Sc^m \qquad (Eq.2.5)$$

n et m dépendent des conditions d'écoulement et du biofilm. Par exemple dans l'expérience que Wäsche *et al.* (2002) ont effectuée sur un réacteur tubulaire, les valeurs trouvées sont :

- pour un écoulement laminaire : n = m = 0.5 et $a = 8.7\left(\frac{d}{L}\right)^{0.5} \cdot \frac{1}{\Omega}$ $(Eq.2.6)$;

- pour un écoulement turbulent : n = 0.75, m = 0.5 et $a = 0.16.\frac{1}{\Omega}$ $(Eq.2.7)$

Ω est un facteur de structure dépendant également de l'hydrodynamique et des conditions de nutriments du milieu de culture ; il est donc fonction du nombre de Reynolds et du taux de croissance spécifique à la surface du biofilm : Ω = f(Re, μ^*). Dans la figure 2.9 sont comparées les données expérimentales de Wäsche *et al.* (2002) et les valeurs calculées à partir des équations 2.5 à 2.7.

Le mécanisme de transfert de masse est l'un des paramètres de contrôle des bio-procédés en étant le moteur du transport des nutriments dans le biofilm. Par exemple, une limitation en oxygène et en substrat dans un milieu de culture affecte directement l'activité des biofilms d'après Xavier *et al.* (2005). En effet cet oxygène est nécessaire dans les procédés pour la respiration aérobie et l'oxydation des nutriments, et les substrats sont nécessaires pour la synthèse organique. Il est par conséquent essentiel de pouvoir contrôler le transfert de masse au sein des biofilms afin de maintenir un bon état de fonctionnement du procédé.

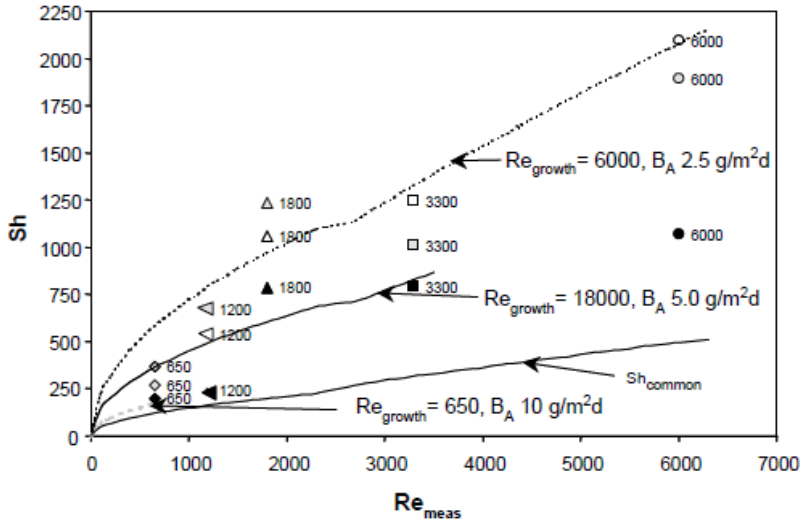


Figure 2.9 : Comparaison entre données expérimentales (marqueurs) de Wäsche *et al.* (2002) et données calculées (lignes) pour des biofilms cultivées sous écoulement à différents régimes hydrodynamiques, et à différentes concentrations de substrats nutritifs.

On peut penser que d'autres paramètres, caractéristiques de la structure du biofilm interviennent dans les corrélations du type de l'Eq 2.5, 2.6 et 2.7. En effet, les biofilms semblent capables d'optimiser le transfert de nutriments en arrangeant leur structure et en adaptant leur morphologie à la nature et à l'intensité de la contrainte de cisaillement qui leur est appliquée (Xavier *et al.*, 2005 ; Simoes *et al.*, 2007). Ils ont tendance en effet à augmenter leur résistance aux forts taux de cisaillement et maximiser le taux de distribution de nutriments dans les couches internes du biofilm d'après Beyenal et Lewandowski (2002).

Un bon contrôle du transfert de masse peut ainsi être obtenu si on dispose d'informations précises sur la morphologie et la structuration des biofilms. Par exemple, une résistance élevée au cisaillement correspond à une densité forte et par conséquent à une diminution du taux de transport interne de masse. A basse vitesse d'écoulement, le biofilm présente une faible densité et une diffusivité élevée mais la résistance au cisaillement demeure faible. A vitesse d'écoulement élevée, le biofilm se densifie, devient plus résistant et présente une diffusivité faible. Cependant, la diffusivité effective augmente du support vers la phase planctonique quelque soit la vitesse d'écoulement à cause d'une réduction de la densité depuis le support vers les couches externes du biofilm.

Dans le même ordre d'idées, Peyton *et al.* (1996) ont prouvé expérimentalement qu'une augmentation du taux de transfert de masse au sein d'un biofilm fait croître l'épaisseur maximale du biofilm; cette épaisseur maximale correspondant à l'état stationnaire du biofilm. Par contre une augmentation de la vitesse de transfert de masse jusqu'au-delà d'une certaine

limite n'aura pas d'effet sur l'épaisseur maximale. C'est le cas par exemple lorsque le transport du substrat est effectué à des vitesses d'écoulement très grandes dépassant certaines limites ; cela a aussi pour conséquence de provoquer des phénomènes de détachement et par conséquent d'affecter très fortement les propriétés mécaniques du biofilm.

c) Modélisation des phénomènes d'attachement et de détachement

Aspects phénoménologiques

Comme on l'a vu précédemment, un des éléments qui contrôle la morphologie du biofilm est le gradient des vitesses à l'interface. Ce gradient contrôle la couche limite hydrodynamique et la couche limite de concentration (donc le transfert de masse, cf. § précédent). Le gradient de vitesse est aussi directement lié à la contrainte de cisaillement et donc aux phénomènes de détachement/attachement.

Le détachement intervient lorsque le cisaillement local dépasse un certain seuil correspondant à la cohésion interne du biofilm. La vitesse de détachement d'un biofilm est généralement fonction de plusieurs facteurs tels que :

- **La contrainte de cisaillement :**

  Cela est évident sachant qu'elle dérive directement de la vitesse d'écoulement ; donc son augmentation entraîne l'intensification des effets de détachement.

- **la position des cellules détachées :**

  En effet la vitesse d'écoulement dont dérive la contrainte de cisaillement est faible dans les couches internes, et devient forte dans les couches externes du biofilm en raison de son profil moyen parabolique. Par conséquent les cellules proches de la paroi vont être moins cisaillées et subissent des forces de détachement moins intenses que les cellules situées proches de la zone planctonique.

- **Le rapport cellules/EPS en termes de quantité :**

  Ce rapport a une influence directe sur les propriétés rhéologiques du biofilm et donc sur sa cohésion interne ; par conséquent elle affecte la capacité du biofilm à résister plus ou moins à la force de détachement.

Plusieurs auteurs ont proposé une corrélation entre la densité (ou la cohésion) et l'intensité du détachement (Ohashi and Harada, 1994 ; Kwork *et al.,* 1998) et la composition des EPS (Applegate and Bryers, 1991 ; Ohashi and Harada, 1994 ; Beyenal and Lewandowski, 2002 ; Stoodley *et al.,* 1999a ; Liu and Tay, 2001). Un biofilm épais et non dense résulte d'un faible taux de cisaillement tandis qu'un biofilm dense lui, va être dû à un fort taux de cisaillement. La connaissance de la morphologie est donc nécessaire pour la détermination des forces agissant sur le biofilm.

D'autres études similaires ont également montré que la contrainte de cisaillement caractérise la cohésion interne du biofilm (Characklis and Marshall, 1990 ; Stoodley *et al.,* 1999 ; Liu and Tay, 2002). Cette cohésion interne correspond à un équilibre entre la contrainte hydrodynamique et la résistance à la déformation. Cet équilibre a été analysé au moyen de l'expression suivante :

$$R = \frac{\text{contrainte hydrodynamique}}{\text{résistance à la déformation}} = \frac{\tau}{\xi} \qquad (Eq.2.8)$$

Le ratio R est analogue au nombre de Weber W, qui est très souvent utilisé pour étudier la déformation des gouttelettes et bulles. R est inférieur à 1 quand le biofilm résiste à la contrainte hydrodynamique. Au fur et à mesure que R augmente, la cohésion du biofilm diminue et le biofilm se détache plus facilement sous l'effet de la contrainte de cisaillement τ exercée par le fluide environnant. ξ est une caractéristique rhéologique et correspond à la force requise pour générer une rupture dans le milieu. Ceci laisse suggérer donc que le comportement rhéologique du biofilm est également affecté par l'hydrodynamique.

Dunsmore *et al.* (2002) ont en effet mesuré le taux de déformation de clusters de biofilm, et ont montré que leur viscoélasticité est directement affectée par la vitesse d'écoulement pour laquelle ils ont été développés. Cette viscoélasticité étant étroitement liée à la cohésion interne, leurs travaux confirment donc l'idée selon laquelle la résistance d'un biofilm à la déformation devient de plus en plus forte lorsque la vitesse d'écoulement augmente.

Les conditions de croissance (conditions de nutriments, température, …) et les étapes successives de l'évolution du biofilm conditionnent cette cohésion, puisque ce sont elles qui déterminent la morphologie (densité, composition) dont cette cohésion dépend.

Toutes les régions d'un biofilm ne sont pas soumises aux mêmes forces de cisaillement et aux mêmes taux de transfert de masse (de Beer *et al.,* 1994, de Beer and Stoodley, 1995). Manz *et al.,*

(2003) ont par exemple montré que l'intensité des forces de cisaillement locales peut être 3 fois plus élevée que la valeur moyenne de la force de cisaillement à la paroi d'adhésion.

Telgmann *et al.,* (2004), en se basant sur les travaux de Stoodley *et al.* (1999b), et Picioreanu *et al.* (2001) ont introduit les notions de structure primaire et structure secondaire dans le but de classifier les hétérogénéités de structure des biofilms (fig. 2.10). La structure primaire prend en compte les très petits canaux vides, où les forces de cisaillement sont négligeables. Dans la structure secondaire, ces canaux de faibles dimensions ne sont pas pris en compte ; on observe des structures lisses et de plus grande taille sur lesquelles les forces de détachement locales sont très importantes.

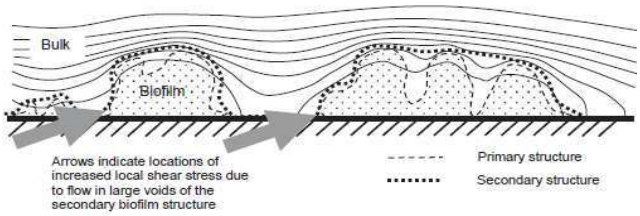


Figure 2.10 : Hétérogénéité de la structure des biofilms (image recueillie de Telgmann et al., 2004).

Avec une approche similaire, d'autres travaux ont montré que la distribution des contraintes de cisaillement locales affecte également le développement des biofilms. Ochoa *et al.* (2005) ont développé un biofilm sur une lamelle de plastique et à cisaillement faible ; quand l'épaisseur maximale du biofilm est atteinte, ils l'ont soumis à un test d'érosion. Ils ont distingué deux zones dont les caractéristiques hydrodynamiques sont différentes. Au niveau des couches internes du biofilm, la distribution des contraintes de cisaillement est totalement irrégulière ; tandis que le contraire est observé sur les couches loin de la paroi d'adhésion et proche de la zone planctonique pour laquelle une distribution uniforme de la contrainte de cisaillement est détectée.

Le mécanisme de détachement et son effet sur le développement et la morphologie des biofilms ne sont pas encore clairement élucidés. Selon van Loosdrecht *et al.* (1995), le mécanisme général du développement des biofilms résulte d'un équilibre stable entre croissance et détachement. Ainsi par exemple, pour un biofilm épais et non dense, les taux de croissance sont élevés et les forces de cisaillement locales sont généralement élevées, provoquant ainsi le détachement de flocs de grande taille.

En se basant sur la taille des particules détachées, Bryers (1988) a caractérisé les types de détachement en introduisant les notions de « *sloughing* » et d'érosion qui sont les modes principaux de détachement, participant par ailleurs à la stabilité des biofilms en équilibrant leur croissance. Le « *sloughing* » correspond au détachement de larges particules de l'ordre de

l'épaisseur du biofilm, tandis que l'érosion et l'abrasion sont associées au détachement de petites particules. Le « *sloughing* » favorise ainsi l'hétérogénéité de la morphologie des biofilms alors que l'érosion diminue leur rugosité et les rend plus lisses et plus épais.

Ohashi et Harada (1994) ont montré expérimentalement qu'à des vitesses d'écoulement lentes, le « *sloughing* »intervenait aux premières étapes de la formation du biofilm; ce phénomène a été interprété comme étant dû à la présence de canaux vides relativement larges, et la diminution du taux des EPS. Il s'en-suit un second processus d'érosion à un stade avancé de la formation du biofilm. A des vitesses d'écoulement élevées, ils ont montré que le « *sloughing* » n'intervenait pas. Ce résultat a été confirmé par Xavier *et al.* (2005) qui, par une approche numérique, ont démontré que le détachement par « *sloughing* » se réduisait lorsque les forces de détachement par érosion devenaient plus intenses.

Corrélations existantes

Il existe dans la littérature une multitude de modèles mathématiques pour étudier le détachement. Kommedal et Bakke (2003) ont testé plusieurs d'entre eux (25 corrélations !) par comparaison avec leurs expériences de détachement. Certaines de ces corrélations sont présentées dans le tableau 2.1 : en général, le taux de détachement est relié à certaines caractéristiques macroscopiques du biofilm telles que l'épaisseur du biofilm L_f, la concentration de la biomasse et le taux de croissance spécifique μ_s.

Tableau 2.1 : Expressions tirées de la littérature et utilisées pour la modélisation du détachement de biofilm (certaines testées par Kommedal and Bakke, 2003).

N°	Model	Reference
1	$r_{det} = k_{det} L_f$	Peyton and Characklis (1992)
2	$r_{det} = k_{det} X L_f$	Bakke et.al (1984); Melo and Bott (1997)
3	$r_{det} = k_{det} X L_f^2$	Wanner and Gujer (1986)
4	$r_{det} = k_{det} L_f^2$	Stewart et.al (1996)
5	$r_{det} = k_{det} X^2$	Bryers (1987) ; Trulear and Characklis (1982)
6	$r_{det} = k_{det} \mu_s L_f$	Speitel and DiGiano (1987)
7	$r_{det} = k_{det} \mu_s X L_f$	Peyton and Characklis (1993)
8	$r_{det} = k_{det} \mu^2 X L_f^2$	Stewart (1993)
9	$r_{det} = k_{det,0} X L_f^2 + k_{det,1} \mu^2 X L_f^2$	Stewart (1993)
10	$r_{det} = k_{det} \mu_s L_f + k_{det,0} L_f$	Speitel and DiGiano (1987)
11	$r_{det} = k_{det} X \tau$	Bakke et.al (1990)
12	$r_{det} = k_{det} X \tau^{0.58}$	Rittmann (1982)

Le nombre de corrélations existantes montre la complexité et la difficulté à prédire de façon précise ce mécanisme, ce qui est conforme à la variété des processus mis en évidence au paragraphe précédent.

II.2- Etudes à l'échelle du milieu poreux

II.2.1- Contributions expérimentales

A l'échelle du milieu poreux, des investigations expérimentales et numériques ont aussi été menées pour tenter de comprendre le couplage entre l'hydrodynamique locale et la croissance des biofilms. Du point de vue expérimental, de nombreux travaux ont été effectués en micro-colonnes ou micro-modèles et la plupart des théories existantes sont issues de ces travaux. Ces études étaient dédiées principalement à la détermination de propriétés effectives des milieux poreux telles que la perméabilité et la dispersivité (Cunningham *et al.,* 1991, Taylor and Jaffe 1990, Vandevivere *et al.,* 1992, 1995a, Karrabi *et al.,* 2011). D'autres propriétés comme le taux de détachement ont plutôt été étudiées sur micro-canaux ou autres types de réacteurs (tubulaire,…) à l'échelle du biofilm et non pas à l'échelle du milieu poreux. Ces travaux ont été présentés au paragraphe précédent. Enfin à l'échelle pilote, dans le cas des bioprocédés, il existe quelques expériences dédiées spécifiquement à l'étude du couplage entre l'hydrodynamique et la croissance de la biomasse (à notre connaissance, citons Deront *et al.*, 1998 ; Menoret, 2001 ; Di Iaconi *et al.*, 2006; et Karrabi *et al.*, 2011). La plupart de ces travaux visaient, à partir de mesures globales, à étudier indirectement quelques propriétés du biofilm (épaisseur, densité) ainsi que les couplages existant entre ces propriétés, et la dynamique du réacteur. Notons que les analyses faites sont souvent basées sur des hypothèses qui peuvent s'avérer discutables. Par exemple, Deront *et al.* (1998) ont étudié le bio-colmatage d'un biofiltre pilote industriel fonctionnant en régime diphasique (écoulement liquide-gaz, le gaz étant sous forme de bulles d'air). Ils déduisent de leurs mesures de pression une épaisseur de biofilm en supposant que la corrélation de Turpin and Huntington (1967) qui permet de calculer la perte de charge est valide. Cette corrélation, adaptée aux écoulements diphasiques gaz-liquide, possède la même structure que la loi d'Ergun (une variante de la loi de Kozeny) classiquement utilisée pour les écoulements monophasiques dans des milieux granulaires. Les paramètres de la corrélation de Turpin and Hungtington font intervenir les propriétés géométriques du milieu (porosité, diamètre des grains) dans l'expression des perméabilités. La mesure de pression permet donc de déduire une

perméabilité, ainsi qu'une porosité puis une épaisseur de biofilm. Cette procédure est discutable ; en effet : (i) La méthode suivie par Deront *et al. (*1998) suppose une répartition *a priori* uniforme de la biomasse dans les pores (ii) il a été montré par Bordas *et al.* (2006) que de manière générale, les lois du type Kozeny ou d'Ergun n'étaient pas forcément directement adaptables pour les écoulements diphasiques dispersés. (iii) De même, comme on le verra ci-après, pour un écoulement monophasique en milieu poreux avec biofilm, il n'est déjà pas certain qu'une structure de loi de type Kozeny soit de la même façon valide.

Pour éviter le plus possible d'hypothèses *a priori*, certaines de ces difficultés peuvent être surmontées en mesurant indépendamment autant de paramètres globaux que possible (en particulier, les profils axiaux de porosité, de concentration en matière sèche et de pression). C'est ce qui a été fait dans la thèse de Karrabi (2009), effectuée au LEGI par exemple, et dont certains résultats serviront à la discussion plus tard dans ce chapitre. Notons que chez Karrabi (ainsi que la plupart des auteurs cités sauf Deront *et al.* (1998) les mesures ont été faites en monophasique, avec une phase liquide enrichie en O_2 si nécessaire afin de s'affranchir du caractère normalement diphasique de l'écoulement : seuls les effets dus au biofilm ont alors été étudiés. Comme dans les travaux précédents, certaines données (comme la distribution de la biomasse dans une section et la microstructure du biofilm) ne sont évidemment pas accessibles simplement en suivant une procédure globale.

De manière générale, lorsque l'on examine les résultats de la littérature, on constate que le degré de réduction de la perméabilité est attribué à plusieurs facteurs dont la géométrie des pores, l'organisation des cellules bactériennes dans le milieu poreux (biofilm continu, « plugs », colonies). L'existence d'exopolymères semble aussi impliquée, leur production dépendant de la souche bactérienne et des conditions environnementales. Shaw *et al.* (1985) en particulier montrent que le processus de colmatage avec des bactéries vivantes et des bactéries mortes est différent et que le biocolmatage ne suit pas forcément les processus classiques rencontrés avec des matériaux inertes (comme en filtration classique). A noter cependant que, comme le montrent Vandevivere et Baveye (1992), l'existence des EPS seuls n'est pas une condition suffisante et que les observations sont fortement dépendantes des structures générées à petites échelles par ces EPS (et donc de la souche bactérienne qui produit ces EPS).

Quelques auteurs ont proposé des théories simples pour rendre compte des réductions de perméabilité observées (Clément *et al.*, 1992 ; Thullner *et al.*, 2002 ; Taylor and Jaffe, 1990 ; Vandevivere, 1995), mais l'interprétation des observations ne fait pas consensus. Plusieurs théories, pas forcément incompatibles, coexistent, certaines proposées par les mêmes auteurs. Ainsi, la forte réduction de perméabilité initiale peut s'expliquer par l'existence de micro-colonies qui, en se développant dans les jonctions entre plusieurs pores, déconnecteraient une partie du milieu poreux de l'écoulement, entrainant ainsi une accélération des vitesses

d'écoulement dans les pores adjacents (*cut-and-junction* model, Taylor and Jaffe, 1990). Ces mêmes auteurs proposent aussi une théorie basée sur un biofilm continu se développant uniformément autour des grains pour expliquer certaines observations : la perte de perméabilité est alors due à la réduction de l'espace interstitiel disponible pour le fluide, ce qui provoque une augmentation de la vitesse interstitielle et une diminution du diamètre hydraulique.

De même lorsque le degré de colmatage devient important, les perméabilités expérimentales atteignent des valeurs de saturation. Cette saturation est expliquée de manière différente ; elle correspond soit à la perméabilité du biofilm lui-même, soit à une perméabilité moyenne effective d'une section tenant compte de l'existence d'espaces vides encore disponibles pour le mouvement du fluide (théorie « *open pore* », Taylor et Jaffe, 1990) : dans ce cas, la contrainte de cisaillement augmente avec la réduction de perméabilité et la biomasse qui se détache sous l'action de cette contrainte maintient les pores « ouverts ». Taylor et Jaffe (1990) postulent qu'il existe un état d'équilibre, correspondant à une contrainte de cisaillement critique, et pour laquelle le taux de croissance net du biofilm compense exactement le taux d'enlèvement de la biomasse. Signalons que l'existence de cet équilibre suppose implicitement une adaptation du taux de croissance du biofilm à la contrainte de cisaillement et au taux de détachement du biofilm. De même l'existence de chemins préférentiels au sein du milieu poreux peut cadrer avec cette théorie en généralisant la notion de pores « ouverts ».

Les observations de Karrabi *et al.* (2011) sur un biofiltre pilote semblent accréditer cette dernière vision des choses : dans leur expérimentation, Karrabi *et al.* (2011) ont constaté qu'une augmentation du cisaillement amène à un état stationnaire correspondant à une quantité globale de matière sèche plus importante dans les pores. Cela ne semble pas lié à une augmentation de la croissance avec une augmentation du flux de nutriments vers le biofilm car aux nombres de Reynolds (de pore) auxquels ont été effectuées les expériences (inférieur à 2), le coefficient de transfert de masse à l'interface biofilm/fluide évolue très peu (Garcia et al., 2003). Cette adaptation du taux de croissance net renvoie directement à certaines questions et hypothèses faites par les auteurs travaillant directement sur les biofilms (par exemple une possible adaptation du taux de production de polymères), observations discutées au paragraphe II-11.

Des modèles de perméabilité, basés généralement sur une représentation simplifiée du milieu poreux et du biofilm, ont été proposés pour rendre compte des observations expérimentales. Ces modèles sont présentés dans la thèse de Karrabi (2009). Ils relient la perméabilité relative $k(\Phi)/k0$ à la porosité relative du milieu Φ/Φ_0 où Φ_0 et Φ sont la porosité initiale et la porosité à l'instant t d'une section du milieu poreux et k0 la perméabilité du milieu poreux non colonisé. Nous nous contentons de rappeler leurs expressions sans démonstration.

On distingue les modèles de type puissance où :

$$\frac{k}{k_0} = \left(\frac{\phi}{\phi_0}\right)^n \qquad (Eq2.9)$$

Dans le cas d'un biofilm uniformément réparti autour de sphères Taylor et Jaffé (1990) trouvent n = 3/2 ; n = 2 si on considère un milieu poreux comme un ensemble de tubes parallèles de même diamètre. Par une approche totalement différente (statistique), Clément (1996) aboutit aussi à un modèle en puissance avec n = 19/6.

Thullner (2002) donne des expressions de la porosité relative à partir de simulations sur un réseau de capillaires interconnectés et pour deux modes de croissance de la biomasse. Dans le cas d'un biofilm croissant de manière uniforme sur la paroi des capillaires, il trouve :

$$\frac{k(\phi)}{k_0} = \left[\left(\frac{\phi/\phi_0 - \alpha_0}{1-\alpha_0}\right)^b + \frac{k_{\min}}{k_0}\right] \cdot \frac{1}{1 + k_{\min}/k_0} \qquad (Eq2.10)$$

Où $k_{\min}$, α_0 et b sont des paramètres ajustables dépendant de l'écart type σ de la distribution de la taille de pores.

Dans le cas où le biofilm est vu comme croissant sous forme de microcolonies déconnectant certains pores de l'écoulement, il trouve :

$$\frac{k(\phi)}{k_0} = \alpha_t \left(\frac{\phi/\phi_0 - \alpha_0}{1-\alpha_0}\right)^3 + (1-\alpha_t) \cdot \left(\frac{\phi/\phi_0 - \alpha_0}{1-\alpha_0}\right)^2 \qquad (Eq2.11)$$

Où α_t et α_0 sont des paramètres ajustables.

Enfin, Vandevivere (1995) propose un modèle mixant deux concepts : un concept où les pores sont vus comme des capillaires dont les parois sont colonisées progressivement par un biofilm

uniforme. A partir d'un certain degré de colonisation, la biomasse se détache pour former des « plugs » obstruant une partie des tubes capillaires. La perméabilité du tube est alors la moyenne harmonique entre la perméabilité k0 de la fraction propre et k_{min} la perméabilité des plugs occupant une certaine fraction du tube.

$$\frac{k(\phi)}{k_0} = F(f_x)\cdot(1-f_x)^2 + [1-F(f_x)]\cdot\left(\frac{a}{a+f_x-a.f_x}\right) \qquad (Eq.2.12)$$

Avec, $a = k_{min}/k_0$ et $f_x = 1-\phi/\phi_0$

$F(f_x)$ est une fonction décroissante permettant de faire basculer le modèle d'un comportement à l'autre à partir d'une fraction volumique de biomasse critique f_c :

$$F(f_x) = \exp[-0.5\,(f_x/f_c)^2] \qquad (Eq.2.13)$$

Certains de ces modèles sont présentés sur la figure 2.11. Signalons qu'aucun de ces modèles ne fait réellement consensus. D'une part, la majorité des travaux ont été effectués avec pour objectif la modélisation de ce qui se passe dans des sols, donc dans des gammes de nombre de Reynolds très petites et des structures de milieux poreux spécifiques de ces milieux. Il est difficile à l'heure actuelle de généraliser ces propositions à d'autres configurations où les nombres de Reynolds peuvent être plus élevés et la structure de la matrice poreuse différente. D'autre part, confrontés aux résultats expérimentaux, les modèles proposés ne permettent pas d'expliquer toutes les mesures dont on dispose. Les résultats de Karrabi *et al.* (2011) présentés à la figure 2.12 montrent que la réduction de perméabilité est importante dès que le milieu commence à être colonisé. La plupart des modèles (Clément, 1996 ; biofilm uniforme de Taylor et Jaffe, 1990 ou Thullnner, 2002 -*version modèle biofilm continu*, ...) qui se comportent comme la loi de Kozeny ne permettent pas de rendre compte de ce comportement.

De même les modèles de typ microcolonies (Thullner (2002)) donnent aussi des réductions de perméabilité plus faibles que celles observées en début de colonisation. Le modèle le plus satisfaisant (du moins sur les données de Karrabi *et al.* (2011) est celui de Vandevivere (1995) qui mixte plusieurs des concepts cités plus haut. Signalons que ces modèles sont avant tout des modèles phénoménologiques, basés sur une distribution *a priori* simplifiée de la biomasse. Etant donné les comportements expérimentaux, **la question sous-jacente est de savoir si la connaissance d'une porosité macroscopique est suffisante pour modéliser la réduction de perméabilité, ou si d'autres paramètres, liés à la micro-structuration locale du biofilm**

ainsi que d'autres phénomènes éventuels tels que des effets rhéologiques doivent être intégrés.

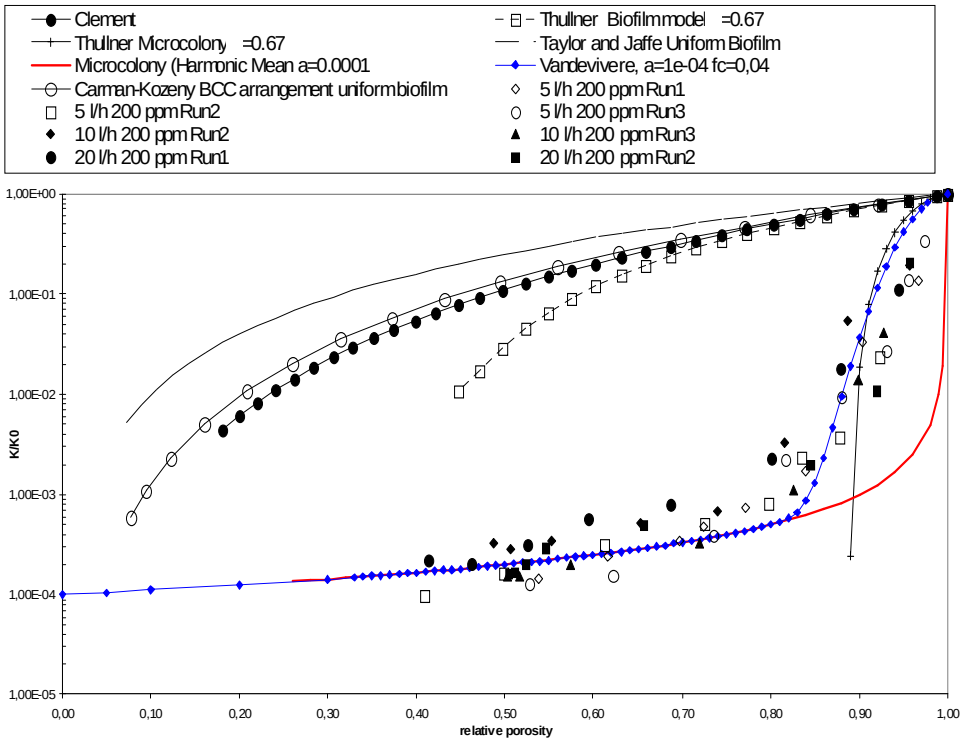


Figure 2.11 : Evolution de la perméabilité relative avec la porosité relative. Comparaison avec certains modèles théoriques de la littérature (Karrabi et al, 2011)

Des travaux similaires ont été réalisés sur les propriétés de dispersion du milieu (en particulier la dispersion longitudinale), mais les résultats se sont montrés difficiles à interpréter et généraliser : la dispersion longitudinale par exemple dépend fortement de la distribution de la biomasse au niveau des pores et d'une section : ainsi, en fonction de cette distribution, on a constaté que la dispersion longitudinale pouvait croître ou décroître avec la quantité de biomasse (Bielefeld *et al.*, 2002).

II.2.2- Modélisation numérique des couplages hydrodynamique-biomasse en milieu poreux. Limite des modélisations

Les modèles à l'échelle du milieu poreux se décomposent en plusieurs familles. La première famille de modèles concerne les ***modèles de type continu*** à l'échelle de Darcy où le milieu

poreux est vu comme un milieu effectif. Récemment sont sortis des modèles plus complets, où les processus aux différentes échelles sont explicitement simulés, en particulier la simulation de la croissance du biofilm, de sa microstructure ainsi que des structures formées au sein des pores. Ce type de modélisation utilise des techniques déjà présentées au paragraphe II-121. Les modèles de type « ***network*** » sont une famille de modèles intermédiaires : certaines caractéristiques du biofilm (comme l'évolution de son épaisseur) sont simulées, mais les hypothèses de répartition de la biomasse sont fixées *a priori* (répartition uniforme sur les parois de capillaires ou la surface de billes constituant le poreux).

II.2.2.1- Présentation succinte des différents types de modélisaton

a) Modèles « continus » à l'échelle de Darcy

En général, les constituants du biofilm sont représentés par différents champs représentant la fraction volumique (ou la concentration massique) de chaque constituant en un point du milieu poreux. Ces constituants peuvent être la biomasse active, la biomasse inactive, les EPS.... Dans certains cas, la biomasse en suspension est aussi prise en compte. L'écoulement dans le milieu poreux est représenté par la loi de Darcy. Le transport des différentes espèces chimiques et l'évolution des champs représentant le biofilm sont régis par des équations de convection-diffusion-réaction ou de diffusion-réaction. La croissance des bactéries est modélisée par une formulation du type Monod. La baisse de disponibilité des différents substrats au fur et à mesure que le biofilm croît est prise en compte en utilisant une fonction de limitation (proposée initialement par Zysset *et al.*, 1994). Cette fonction fait décroître le taux de croissance avec la fraction volumique du biofilm dans le pore. La modélisation du couplage hydrodynamique-biomasse est effectuée par l'utilisation d'une des lois perméabilité-biomasse issues de la littérature et présentée précédemment. Lorsque le biofilm est décrit par un champ de concentration massique, il faut de plus faire intervenir une loi constitutive permettant de transformer les concentrations massiques en un taux d'occupation volumique des pores. Pour fixer les idées, nous présentons le modèle de Kildsgaard *et al.* (2001) (repris et adapté ensuite par Brovelli *et al.*, 2009). Ce modèle est régi par 4 équations de convection-diffusion en plus l'équation de Darcy. Il a été développé pour étudier la croissance d'un biofilm pour un système 2D, le modèle ayant ensuite été confronté à des résultats expérimentaux sur une expérience de laboratoire. Notons que nous présentons ici le modèle sous une forme légèrement différente que le papier original de Kildsgaard *et al. (*2001) afin de simplifier le discours : en particulier, on a

enlevé les termes sources de l'équation de Darcy du modèle initial, ce qui ne change rien au fond de la discussion. Le modèle s'écrit :

Quantité de mouvement :

$$q_i = \frac{\partial}{\partial x_i}\left(K_{ij}\nabla \cdot \frac{\partial h}{\partial x_i}\right) \qquad (Eq.2.14)$$

Biomasse attachée (biofilm) :

$$\frac{dX_s}{dt} = \phi\mu Y_{x,ea} G(\phi) X_s - K_d X_x - k_{\det} X_x + \frac{\phi}{\rho_{bulk}} K_{att}.X_a \qquad (Eq.2.15)$$

Biomasse en suspension :

$$\phi\frac{dX_a}{dt} = \frac{\partial}{\partial x_i}\left(D_{ij}\frac{\partial X_a}{\partial X_j}\right) - q_i\frac{\partial X_a}{x_i} + \phi Y_{x,ea}\mu X_a - \phi K_d.X_a + \rho_{bulk}k_{\det}X_s - \phi K_{att}.X_a \qquad (Eq.2.16)$$

Accepteur d'électron :

$$\phi\frac{\partial S_{ea}}{\partial t} = \frac{\partial}{\partial x_i}\left(D_{ij}\frac{\partial S_{ea}}{\partial x_j}\right) - q_i\frac{\partial S_{ea}}{\partial x_i} - \phi\mu X_a - G(\phi)\mu\cdot\rho_{bulk}X_s \qquad (Eq.2.17)$$

Donneur d'électron :

$$\phi\frac{\partial S_s}{\partial t} = \frac{\partial}{\partial x_i}\left(D_{ij}\frac{\partial S_s}{\partial x_j}\right) - q_i\frac{\partial S_s}{\partial x_i} - \phi\mu.Y_{ea,s}X_a - G(\phi)\mu.Y_{ea,s}\rho_{bulk}X_s \qquad (Eq.2.18)$$

q_i est la composante i du vecteur de débit spécifique q (qui se réduit à la vitesse superficielle en configuration 1D), h la charge hydraulique, K le tenseur des conductivités hydrauliques (supposé isotrope par la suite). ρ_{bulk} est la densité (apparente) du milieu poreux. X_s représente la biomasse dite « solide » (i.e. sous forme de biofilm) et X_a la biomasse aqueuse (i.e en suspension) selon la terminologie prise par les auteurs. Notons que les concentrations sont données en masse de bactéries/masse de grain dans le poreux, quantité qui est mesurable expérimentalement. S_{ea} est la concentration de l'accepteur d'électron (O_2 par exemple pour un processus aérobie) et S_s est la concentration du donneur d'électron (le substrat). $G(\Phi)$ est une fonction de limitation qui dépend de la concentration de la "biomasse" dans les pores, et donc de la porosité Φ. Elle est maximum et vaut 1 quand les pores sont vides et tend vers une valeur finie quand la biomasse dans les pores tend vers une valeur X_{max} correspondant au taux d'occupation maximum possible

des pores. μ est le taux de croissance des bactéries en suspension ou attachées. Cette cinétique est modélisée selon une loi de type Monod dans le modèle original ou le modèle repris par Brovelli *et al.* (2009) :

$$\mu = \mu_{\max} \frac{S_s}{K_s + S_s} \frac{S_{ea}}{K_{ea} + S_{ea}} \qquad (Eq.2.19)$$

Dans le modèle les paramètres de cette loi (μ_{max}, K_s et K_{ea}) sont les mêmes, que la biomasse soit en suspension ou attachée. K_d est le taux de mortalité des cellules, pris identique pour les bactéries attachées ou en suspension.

$Y_{x,ea}$ et $Y_{ea,s}$ sont les différents taux de conversion substrat/biomasse ou donneur/accepteur d'électron.

K_{att} représente la cinétique d'attachement des bactéries sur le support solide. Dans le cas de Kildsgaard, elle s'écrit de manière condensée :

$$K_{att} = f(\phi, d_p, d_a)|q|^{1/3} \qquad (Eq.2.20)$$

d_p est le diamètre des grains du milieu poreux, et d_a le diamètre des particules en phase aqueuse (la biomasse aqueuse). La fonction *f* est tirée des théories classiques en filtration colloïdale et permet de définir à l'échelle du milieu poreux effectif, la probabilité d'interception d'un colloïde en fonction des propriétés géométriques du milieu. La modélisation exacte de la fonction *f* n'est pas explicitée dans l'article de Kildsgaard *et al.* (2001).

Dans le cas où on considère une direction privilégiée pour l'écoulement, la cinétique s'écrit :

$$K_{att} = \frac{3(1-\phi).\eta\alpha}{2.dp} \mathrm{v} \qquad (Eq.2.21)$$

où v est la vitesse superficielle. η et α seront définis plus loin. On reconnait ici le « paramètre de filtration », défini par O'Mélia and Ali (1978), et utilisé classiquement en filtration des colloïdes. C'est cette formulation qui est intégrée dans le modèle de (Brovelli *et al.*, 2009).

La cinétique d'attachement nécessite de définir 2 paramètres : un paramètre qui traduit la probabilité d'une bactérie d'entrer en contact avec un grain (η) et d'y rester accrochée (α). η ne dépend que des conditions hydrodynamiques et exprime la probabilité qu'un colloïde suive plus ou moins bien une ligne de courant et entre en contact avec le grain. Ce paramètre prend en compte la taille des particules à travers des phénomènes tels que la gravité et le mouvement brownien entre autres : dans le cas d'un milieu poreux idéalisé, la fonction de courant peut être calculée et on peut déterminer théoriquement, pour des colloïdes sphériques, la probabilité de

contact à partir de considérations sur l'hydrodynamique (Spielman, 1977). Le produit ηα traduit l'efficacité de collision, c'est-à-dire, la probabilité que la particule reste attachée avec le grain ηα après être entrée en contact. Dans leur modèle, Brovelli *et al.* (2009) on considéré le groupement comme étant une constante empirique à caler.

K_{det}, qui représente la cinétique de détachement est un paramètre ajusté dans le cas de Kildsgaard *et al.* (2001). Dans le cas de Brovelli *et al.* (2009), le taux de détachement a été défini de manière simplifiée en se basant sur l'équation semi-empirique de Rittmann (1982) non référencé dans la biblio (Cf. Tableau 2.1 du chapitre bibliographique) :

$$K_{det} = C_1 \cdot \tau^{0.58} \qquad (Eq.2.22)$$

τ est le cisaillement local. Il peut être explicité facilement dans un milieu granulaire propre composé de billes de taille homogène, en fonction de la porosité, du diamètre des grains, de la perméabilité et des conditions hydrodynamiques (cf. Karrabi, 2009). Dans le cas où on souhaite suivre la même procédure pour calculer le cisaillement pour un poreux colonisé par un biofilm, il est nécessaire de supposer une distribution *a priori* de la biomasse dans le pore (biofilm uniformément réparti autour des grains entre autres).

Enfin, la relation entre la perméabilité et la porosité du milieu est modélisée par un des modèles présentés plus haut (la loi de Clément, le modèle de micro-colonies de Thullner, le modèle du biofilm uniforme de Thullner), la porosité relative étant calculée à partir de la connaissance de la concentration X_s.

Notons que l'équation pour la biomasse attachée ne comprend pas de termes de dispersion et que la modélisation du tenseur de dispersion D_{ij} n'est pas explicitée dans les articles. Il existe là aussi plusieurs formulations plus ou moins empiriques permettant de décrire ce paramètre de dispersion en fonction de la géométrie du milieu poreux et du contenu en biomasse.

b) Modélisation de type Network

Les modèles de type network permettent une description plus fine des processus tout en gardant une structure de modèle assez simple. Le milieu poreux est représenté par un réseau de capillaires de diamètres et de longueur variable (figure 2.12).

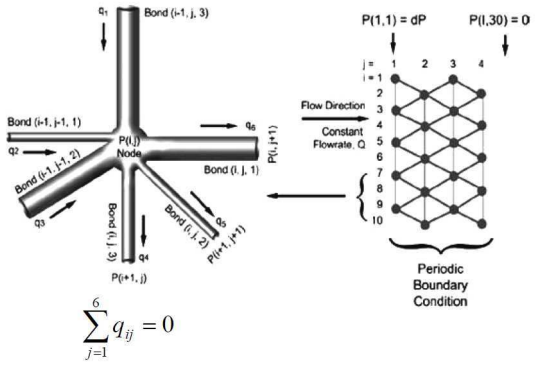


Figure 2.12 : schéma d'un réseau composé de plusieurs tubes capillaires interconnectés.

L'écoulement dans chaque tube capillaire est alors décrit par la relation de Hagen-Poiseuille.

$$q_{ij} = \frac{\pi}{8}\frac{r_{ij}^4}{\mu l_{ij}}\Delta P_{ij} \qquad (Eq.2.23)$$

Avec q_{ij} le débit dans un capillaire entre deux nœuds, i et j, r_{ij} le rayon correspondant, l_{ij} la longueur du tube, μ la viscosité dynamique du fluide et ΔP_{ij} la perte de pression entre le nœud i et j.

La conservation de la masse au nœud i s'écrit alors :

$$\sum_{j=1}^{n} q_{ij} = 0 \qquad (Eq.2.24)$$

Le transport des solutés se fait à l'aide d'équations de convection-diffusion et la croissance de la biomasse dans chaque tube se fait par l'intermédiaire d'une équation cinétique de type Monod. Connaissant la concentration massique de la biomasse dans chaque pore, et moyennant certaines hypothèses sur la répartition de la biomasse dans le pore, ainsi que la structure (porosité du biofilm), on peut alors calculer le volume occupé par le biofilm, son épaisseur et calculer l'écoulement dans chaque capillaire pour un taux d'occupation donné (fig. 2.13). Des phénomènes comme le détachement peuvent être implémentés dans le modèle.

Par exemple, entre deux instant t et t+dt, en supposant la biomasse répartie de manière uniforme sur les parois du tube (fig. 2.14) et en supposant un biofilm homogène, on obtient :

$$r_1 = r_0\sqrt{1-\frac{c_x}{\rho_x}} \qquad (Eq.2.25)$$

Où c_x est la concentration massique de la biomasse dans le pore et ρ_x sa masse volumique.

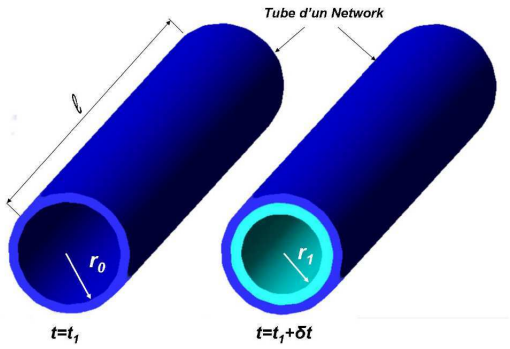


Figure 2.13 : Schéma descriptif de l'occupation des pores d'un milieu poreux

L'épaisseur du biofilm est donnée par :

$$L_x = r_0\left(1-\sqrt{1-\frac{c_x}{\rho_x}}\right) \qquad (Eq.2.26)$$

Notons aussi que, comme l'interface entre le biofilm et le liquide est définie, il est possible d'introduire des termes dans les équations de transport des solutés permettant de prendre en compte le transfert de masse entre le liquide et le biofilm : par rapport au modèle précédent, il n'est pas nécessaire d'introduire forcément une fonction de limitation, la limitation de la croissance par la concentration locale en nutriment dans le biofilm pouvant être prise en compte. Selon le degré de complexité désiré, il est possible de simuler des biofilms mono ou pluri-espèces, homogènes (concentration en biomasse constante sur l'épaisseur) ou stratifié etc…

Les modèles de Thullner (2002) donnant la relation entre la perméabilité du milieu et le taux d'occupation des pores sont basés sur des simulations à partir de ce type de représentation. Le modèle de Shafahi et Vafai (2009) entre dans cette catégorie, mais ici le réseau est constitué à partir d'un arrangement de sphères.

c) Modèles multi-échelles ou hiérarchiques

Des modèles plus sophistiqués ont été récemment mis au point, pour lesquels les outils de simulation numérique des biofilms présentés au paragraphe II-12 sont explicitement intégrés. Ils constituent une amélioration des modèles du type network dans la mesure où ils permettent une modélisation plus raffinée des phénomènes de transport et de développement du biofilm à travers le couplage entre l'écoulement dans le pore et à l'intérieur du biofilm, la description des sollicitations mécaniques auxquelles est soumis le biofilm et le développement de sa structure.

Nous présentons par exemple le modèle de Kapellos, 2007. Ce modèle simule la croissance du biofilm localement à l'échelle du pore dans un milieu poreux constitué de grains. Le modèle utilise une hiérarchie de sous-modèles afin de gérer les différentes échelles. Le calcul comporte plusieurs phases :

Etape 1 : *Inoculation du milieu*

A partir du calcul du champ de vitesse initial du milieu propre, le modèle simule d'abord la phase d'inoculation du système en effectuant un suivi Lagrangien de cellules bactériennes. Les cellules bactériennes sont considérées comme des sphères transportées par l'écoulement et soumises seulement à la force de traînée. Le contact entre une bactérie et un grain est géré par des considérations géométriques simples (distance entre le centre de masse de la bactérie et du grain considéré inférieur à la somme du rayon de la bactérie et du grain). L'action éventuelle de forces physico-chimiques pour prévenir l'adhésion n'est pas considérée.

Etape 2 : *Croissance des bactéries*

L'espace des pores est divisé en mailles ou « Unit Biomass Cells » (UBC). Un vecteur d'état associé à chaque UBC permet de décrire son contenu (nombre de cellules bactériennes, fraction volumique de cellules bactériennes, EPS et eau présentes dans une UBC) ainsi que son état physiologique (fraction de cellules bactériennes actives, inactives, etc.). A noter que les bactéries sont affectées d'une masse et qu'il y a donc une relation entre le nombre de cellules bactériennes et leur fraction volumique et massique dans une UBC. La croissance et mortalité des bactéries d'une même UBC ainsi que la production et la lyse des EPS sont gérées par des lois du 1er ordre :

$$\begin{aligned} \frac{dX_k}{dt} &= \mu_{k,g} X_k - \mu_{k,m} X_k \\ \frac{dX_\pi}{dt} &= Y_{\pi/k} \mu_{k,g} X_k - \mu_{lys} X_\pi \end{aligned} \qquad (Eq.2.27)$$

Où X_k et X_π représentent la concentration de la biomasse et des EPS respectivement. $\mu_{k,g}$ et $\mu_{k,m}$ sont les taux de croissances et de mortalités des bactéries. $Y_{\pi,k}$ est le taux de conversion pour les polymères et μ_{lys} la cinétique de destruction des polymères par autolyse.

$\mu_{k,g}$ le taux de croissance est modélisé par une formulation de type Monod :

$$\mu_{k,g} = \mu_{\max,eff}\left(\frac{S_s}{K_s + S_s}\right)\times\left(\frac{S_{ea}}{K_{ea} + S_{ea}}\right) \qquad (Eq.2.28)$$

Dans une UBC, l'augmentation de X_k se fait de manière continue, ce qui correspond à une augmentation de la masse moyenne des bactéries actives. Lorsque cette masse atteint un seuil maximum critique admissible prédéterminé, on considère que les cellules se divisent : le nombre de bactéries est alors multiplié par deux et leur masse divisée du même facteur.

Le taux de croissance maximal $\mu_{max,eff}$ est modulé par des fonctions (que nous n'expliciterons pas ici) permettant de prendre en compte une diminution du taux de croissance intrinsèque μ_{max} des cellules bactériennes sous l'effet d'une contrainte mécanique ou de la concentration de molécules chimiques « signal » : des effets d'inhibition de la croissance cellulaire sous l'effet de contraintes trop importantes ou des processus s'apparentant au « *quorum sensing* » sont donc pris en compte. Pour ce dernier processus, la cinétique de production des molécules « signals » est proportionnelle à la masse de bactéries présentes. La fonction choisie pour inhiber la croissance est une fonction sigmoïde telle que le taux de croissance intrinsèque μ_{max} chute rapidement au-delà d'une concentration seuil. Il y a donc inhibition du développement de la population bactérienne au fur et à mesure que celle-ci augmente (même si les concentrations locales en substrat ne sont pas limitantes).

Etape 3 : *Prolifération du biofilm*

Cette étape est effectuée en utilisant des automates cellulaires. L'espace des pores est entièrement discrétisé en UBC, les UBC ne contenant que de l'eau correspondant à des points situés dans l'écoulement en dehors du biofilm. Dès que la fraction volumique en biomasse d'une UBC dépasse une valeur critique, la biomasse se trouvant sur un chemin allant de l'UBC en « excès » jusqu'à une UBC « vide » la plus proche est répartie d'une cellule à l'autre le long de ce chemin. La procédure exacte n'est pas détaillée ici mais sera critiquée dans un paragraphe qui suit. *In fine*, l'interface du biofilm est modifiée et le biofilm se développe dans le pore.

Etape 4 : *Calcul des propriétés effectives du biofilm*

La résolution du problème de l'écoulement rampant et de la diffusion passive d'un constituant dans un VER (cf. figure 2.14) représentant de façon schématique les différents « compartiments » du biofilm a permis aux auteurs de définir une expression analytique de la perméabilité effective du milieu et le coefficient de diffusion effective de chaque soluté . Entre autre paramètres, ces lois font intervenir notamment les fractions volumiques en cellule bactérienne, EPS et eau dans le VER (en plus d'autres paramètres plus arbitraires comme la porosité de la matrice d'EPS, le rayon d'une fibre d'EPS, etc.). La valeur de ces fractions volumiques étant connue en chaque point du maillage (UBC) par l'étape précédente, on peut alors calculer les propriétés effectives du biofilm en tout point.

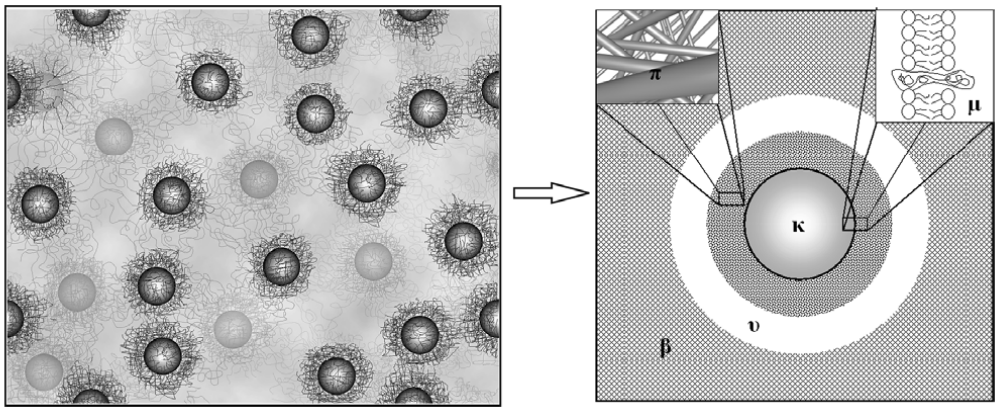


Figure 2.14 : Définition du Volume Elémentaire Représentatif (d'après Kapellos *et al.*, 2007). La structure aléatoire inhomogène du biofilm (à gauche) est remplacée par une cellule unitaire élémentaire (à droite) comprenant une cellule bactérienne encapsulée dans un milieu poreux effectif. Cette cellule unitaire représente de manière simplifiée la structure du biofilm au voisinage d'une cellule bactérienne isolée (phases : k = cellule bactérienne, π = EPS hydratés, μ = solution aqueuse non liée aux EPS, β = reste des EPS et cellules bactériennes)

Etape 5 : *Résolution du problème dynamique*

Le problème dynamique est traité en résolvant les équations de Navier-Stokes dans les pores (UBC ne contenant que de l'eau) et les équations de Brinkman dans le biofilm.

Etape 6 : *Gestion des phénomènes de détachement*

Les UBC appartenant à l'interface du biofilm en contact avec le fluide sont soumises à un cisaillement qui peut être calculé, le champ de vitesse étant connu. Si cette contrainte excède une certaine valeur critique, l'UBC correspondante est considérée comme étant détachée du biofilm

ou de la surface des grains. Cette UBC est considérée comme une particule de masse connue et transportée. Les forces d'interaction particules-particules (entre 2 UBC de type « biofilm) et particules/surfaces sont négligées, ainsi que la gravité. Le fragment se comporte donc comme un élément transporté passivement par l'écoulement. Un fragment entrant en contact le long de sa trajectoire avec une particule solide (ou la surface d'un biofilm) est considéré comme capturé si le cisaillement local est inférieur au cisaillement critique. Le champ de vitesse est recalculé en cas de détachement d'au moins un fragment.

Etape 7 : *Calcul des profils de concentration des solutés.*

Le transport et la consommation des différents solutés sont aussi résolus, les coefficients de diffusion effective dans le biofilm étant connus.

On repasse ensuite à l'étape 2 pour calculer le prochain pas de temps.

Un exemple de résultats de simulations est donné figure 2.15. On voit se développer des colonies au sein du poreux, colonies qui perturbent le champ d'écoulement.

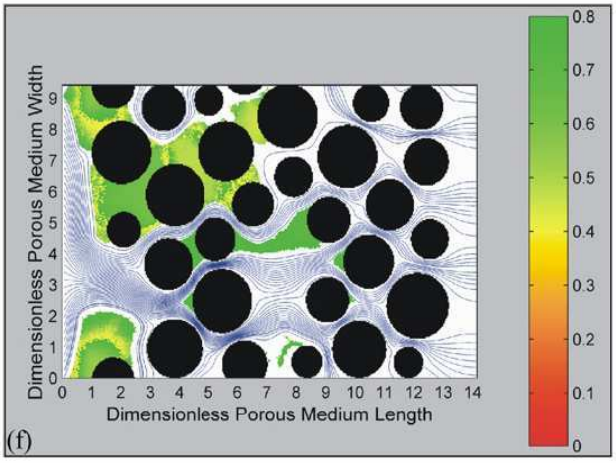


Figure 2.15 : Simulation de l'écoulement dans un milieu poreux affecté par l'occupation des pores pas la biomasse.

II.2.2.2- Discussion et analyse critique des modèles

Il est difficile de donner une analyse exhaustive des performances des modèles. Cela tient essentiellement au fait que les expériences disponibles ne rendent compte que de variables

globales alors que certains modèles donnent une description plus ou moins précise de champs locaux sur un nombre assez conséquent de paramètres. Néanmoins, lorsque ces comparaisons existent, la variable choisie est souvent **la réduction de perméabilité du milieu**, car c'est une variable assez facilement accessible et assez représentative des effets de la croissance du biofilm dans le milieu poreux. Nous mènerons principalement la discussion à partir de certains résultats obtenus sur des modèles de type continu ou de type multi-échelles. Les limitations des modèles de type network sont en effet liées à des problématiques qui seront évoqués sur les 2 premières familles de modèles.

a) Modèles de type continu (Kildsgaard *et al.*, 2001 ; Brovelli, 2009)

La figure 2.16 présente des résultats obtenus par Brovelli *et al.* (2009) sur les données expérimentales de Taylor et Jaffe (1990). Il s'agit selon les auteurs du meilleur résultat obtenu parmi toutes les simulations effectuées pour ce jeu de données. Les paramètres du modèle ont été calés pour les résultats expérimentaux des jours 14 et 28. Les données du 42ème jour servent à la vérification du modèle.

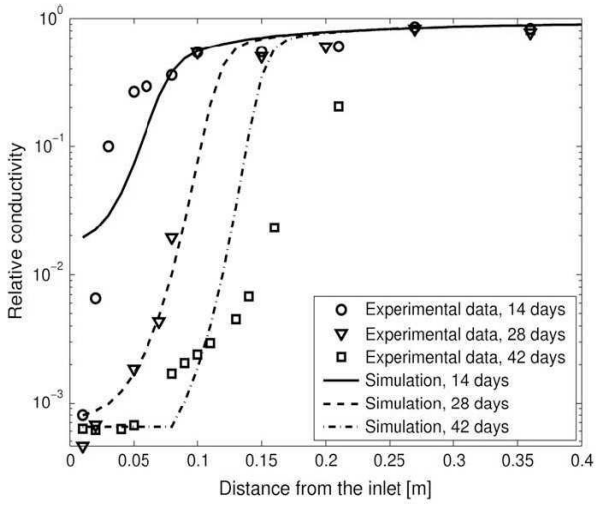


Figure 2.16 : Comparaison entre d'une simulation 1D avec les résultats expérimentaux de Taylor and Jaffe (1990) ? d'après Brovelli *et al.* (2009).

Le modèle perd son caractère prédictif sur le long terme dans la mesure où, sur les données de validation (42ème jour), les réductions de conductivité hydraulique sont très différentes des données expérimentales. Au 42ème jour, les réductions observées (dans les zones non saturées par le biofilm) sont généralement plus grandes que celles simulées. Plusieurs limites peuvent

expliquer ce comportement. En premier lieu, le choix de la loi de conductivité hydraulique K(Φ) a son importance. Les limites du modèle peuvent donc résider dans la pertinence de ce choix, ainsi que du calcul de la porosité à l'instant t. Derrière ce dernier calcul se posent les problèmes des cinétiques de croissance/détachement du biofilm ainsi que la représentation du biofilm lui-même.

a.1) Croissance nette du biofilm

Dans les modèles de type continu, le biofilm est représenté, nous l'avons vu, par un ou plusieurs champs de concentration, selon le degré de complexité que l'on veut introduire dans le modèle. Dans l'exemple de modèle que nous avons présenté, la biomasse attachée est représentée par une seule concentration X_s, qui inclut les polymères, les bactéries et autres constituants du biofilm. La croissance du biofilm est en outre dans ce modèle gérée par une loi de type Monod, modulée par une fonction de limitation.

(i) Quel est le sens d'une formulation du type Monod pour la croissance du biofilm dans la mesure où les polymères, bactéries (voire d'autres constituants) ne sont pas représentés séparément dans le modèle ? Cette approche suggère que la cinétique de croissance/production de chaque constituant individuel peut être modélisée par des lois de structure similaires à la loi de Monod, ce qui permet d'utiliser la même formulation à l'échelle du biofilm. Cela semble douteux : comme le rapportent Laspidou et Rittmann (2002), les relations exactes entre la production d'EPS, la consommation des substrats et la vitesse de croissance des micro-organismes est un sujet portant à controverse. Par exemple des comportements spécifiques observés par certains auteurs (comme la surproduction de polymère sous l'effet d'une augmentation du cisaillement (Qi *et al.*, 2008), s'ils sont avérés, sont difficiles à représenter avec cette approche.

(ii) De même, si l'introduction d'une fonction de limitation, permet de rendre compte de manière simplifié de certains effets qui limitent la croissance du biofilm (comme la limitation de la pénétration des nutriments dans le biofilm au fur et à mesure que le contenu en biomasse augmente dans le pore), la formulation de cette loi est assez empirique. Entre autre, elle ne fait pas intervenir explicitement des paramètres liés à l'hydrodynamique locale, alors que les transferts de masse au sein du biofilm sont liés à cette hydrodynamique. Cela pourrait expliquer les décalages sur le long terme entre simulations et prédictions.

(iii) Enfin, la loi de Monod a été établie pour des bactéries en suspensions libres, dans des conditions très favorables de croissance. Les changements de phénotype et de génotype rapportés dans la littérature lorsqu'une bactérie passe de l'état planctonique à un état sessile (Liu et Tay, 2001), peuvent poser la pertinence de l'utilisation des mêmes paramètres de croissance pour les bactéries en suspension et attachées comme cela est fait dans le modèle présenté.

a.2) Modélisation de l'attachement/détachement

La loi de détachement introduite dans le modèle peut porter à discussion. Kildsgaard *et al.* (2001) estiment que, ne connaissant pas la distribution de la biomasse dans les pores, il leur est impossible de calculer un cisaillement moyen et d'appliquer une loi empirique basée sur ce paramètre. De plus, ces auteurs expliquent aussi que le taux de détachement doit dépendre de l'âge du biofilm. *In fine*, ils concluent qu'étant donné le nombre de paramètres cachés dans cette loi, rester sur une loi du 1er ordre avec un paramètre qui sera calé est un bon compromis.
La loi de Rittmann utilisée par Brovelli *et al.* (2009) implique un détachement continu, quel que soit l'état du biofilm (en termes d'épaisseur et d'âge). Ce choix contredit les arguments proposés par Kildsgaard *et al.* (2001). Les processus de détachement de type « sloughing » sont donc difficiles à mettre en œuvre avec une telle formulation (pas d'effet de seuil dans le modèle de détachement).
Le calcul du cisaillement est en outre effectué en supposant un équilibre entre la perte de pression et les forces de frottement. Le cisaillement résultant s'écrit :

$$\tau = \frac{\mu(1-\Phi)^3}{d_p^2 \Phi M} \mathrm{V} \qquad (Eq.2.29)$$

Où M est la surface spécifique à l'interface biofilm/fluide, d_p est le diamètre des grains du poreux, ϕ la porosité, v la vitesse superficielle du fluide et μ la viscosité du fluide. Cette expression suppose que la perte de pression suit la loi de Kozeny et que le biofilm est réparti de manière uniforme autour des grains. Nous avons déjà vu que ces hypothèses sont discutables.

Les éléments évoqués en a.1) et a.2) ont une influence sur la cinétique de croissance apparente nette du biofilm. Cela pourrait expliquer les décalages sur le long terme entre simulations et prédictions, à travers un taux d'occupation des pores simulé très différent de ceux des expériences à un instant donné.

a.3) Structure du biofilm et structure de la loi de perméabilité

Au-delà de la vitesse de croissance du biofilm lui-même, la structure de la loi de perméabilité choisie peut être mise en cause. Brovelli *et al.* (2009) ont testé la loi de Clément *et al.* (1996), ainsi que les 2 modèles de Thullner (2002) qui représentent le biofilm sous forme continue ou de micro-colonies. Il n'est malheureusement pas dit quelle loi était utilisée dans les résultats de la figure 2.15

De toute façon, comme nous l'avons vu, quelle que soit la loi utilisée, les résultats de Karrabi *et al.* (2011) montrent qu'elles ne sont pas forcément les plus adaptées. De même les porosités calculées dans les modèles continus à partir des concentrations en biomasse sont des porosités qui ne tiennent pas compte de la répartition de la biomasse dans les pores. En particulier cette porosité se décompose entre la fraction correspondant à l'espace libre des pores (ou porosité « mobile ») (où le fluide s'écoule librement) et une porosité plus liée au biofilm lui-même, et où le liquide s'écoule moins librement (voire pas du tout). Or dans la plupart des lois de perméabilité présentées, c'est la variation de la porosité « mobile » qui est à l'origine de la baisse de perméabilité. Cette porosité mobile correspond à la structure secondaire décrite par Telgmann *et al.* (2004) qui ne prend pas en compte les très petits canaux vides et donc la microstructure du biofilm.

Ces observations ramènent encore une fois à la question déjà évoquée de la prise en compte de la microstructure dans les lois de perméabilité (ou de conductivité hydraulique). Des lois constitutives basées sur une porosité macroscopique ne peuvent pas inclure des effets de la microstructure et de son évolution éventuelle avec l'âge du biofilm et la structure spatiale de l'écoulement. Cela pourrait expliquer la dégradation sur le long terme de la prédiction du modèle du fait de ces paramètres « cachés ».

a.4) Conditions initiales

Un point important concerne les conditions initiales. La répartition initiale de la biomasse dans les expériences est difficilement accessible. Brovelli *et al.* (2009) soulignent ainsi la grande sensibilité des résultats des simulations à ces conditions initiales, qui finalement deviennent un paramètre de calage du modèle. Une phase d'inoculation pourrait être implémentée pour simuler l'état initial dans les mêmes conditions que celles des expériences (durée, quantité de cellules injectée dans le système etc.). Le terme d'attachement du modèle est adapté pour réaliser cette opération. Cependant, les formulations employées empruntent beaucoup aux modèles de transport des colloïdes en milieu poreux. Un point clé consiste à définir l'efficacité de capture d'une bactérie par un grain du milieu poreux (paramètre α dans l'équation 2.21). Ce

paramètre est difficile à définir objectivement : il dépend de conditions physico-chimiques mais probablement aussi, pour un système vivant, à d'autres processus liés au comportement de la bactérie.

b) Modèles multi-échelles (Kapellos, 2007).

En ce qui concerne le modèle de Kapellos (2007), il n'y a pas malheureusement de comparaison avec l'expérience : des résultats concernant la simulation de l'évolution de la porosité et de la perméabilité du milieu sont néanmoins donnés pour des Reynolds de pore très proches de ceux utilisés dans la thèse de Karrabi *et al.* (2011). Ces résultats ont été traduits en terme de relation $k/k0 = f(\phi/\phi_o)$ et ont été portés sur la figure 2.17 en regard des données expérimentales de Karrabi *et al.* (2011).

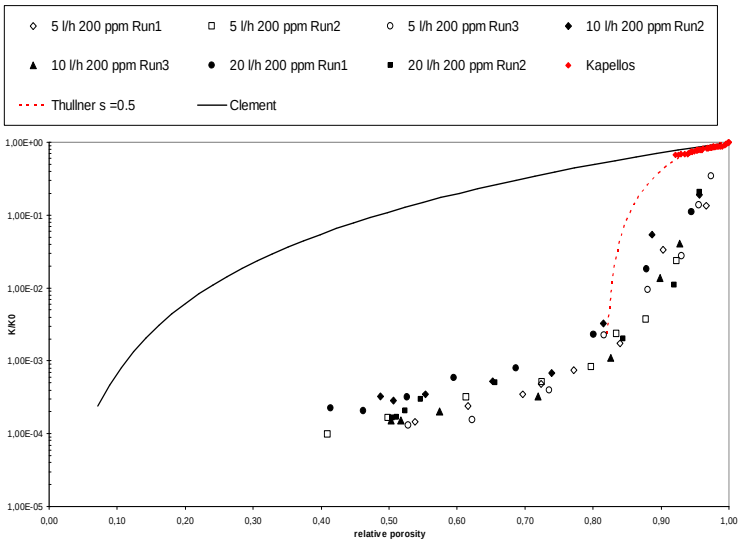


Figure 2.17 : Evolution de la perméabilité relative en fonction de la porosité relative (expériences de Karrabi *et al.*, 2011 comparées avec le modèle de Thullner et celui de Clément).

On s'aperçoit que le modèle donne des résultats assez proches des modèles théoriques classiques en termes de perméabilité. Bien qu'il procède d'une intention très justifiée de simuler au maximum les différents processus aux différentes échelles pour rendre en compte au mieux des couplages entre ces différents processus, certains choix faits par les auteurs ne rendent peut être pas ce modèle apte à simuler une microstructure correcte. Par exemple, sans chercher à

être exhaustif sont détaillées ci-dessous les difficultés des modèles à rendre compte de la physique des phénomènes :

b.1) Modélisation de la prolifération du biofilm (automates cellulaires) :

Comme déjà évoqué par ailleurs, les lois de propagation mises en œuvre dans ces modèles sont relativement arbitraires. En particulier, la procédure utilisée par Kapellos *et al.* (2007) est plus une procédure « géométrique » que « physique » : lors du choix de la direction de propagation de la biomasse, une large gamme de chemins possibles reliant les deux cellules cibles est générée de manière aléatoire. Le chemin selon laquelle la biomasse sera répartie est celui dit « de moindre résistance » c'est-à-dire celui pour lequel le contenu total en biomasse est le moins important. La biomasse est ensuite répartie le long de ce chemin selon une procédure s'apparentant au jeu des chaises « musicales » ou « jeu du taquet » : l'UBC de départ déloge la cellule immédiatement adjacente en ne gardant que la moitié de sa biomasse. La cellule délogée répète le même processus jusqu'à ce que l'on atteigne la cellule vide.

Avec une telle procédure, le développement géométrique de l'interface du biofilm en un point peut être dû à des événements se produisant de manière non locale (figure 2.18) ce qui ne respecte pas la physique des phénomènes liés à la prolifération du biofilm.

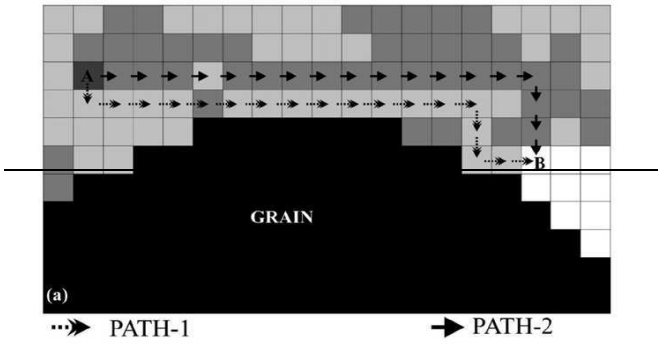


Figure 2.18 : Schéma conceptuel de la percolation de biomasse le long du chemin de moindre résistance hydraulique : deux chemins potentiels de même longueur pour aller de l'UBC (A) à l'UBC (B) vide. Les cellules de plus faibles niveau de gris sont les moins concentrées en biomasse. Le chemin 1 (-- ->) est choisi car l'écoulement y rencontre moins de biomasse donc moins de résistance.

b-2) Détachement du biofilm

La modélisation du cisaillement critique n'est pas développée dans le modèle : ce cisaillement est un paramètre d'ajustement. On peut postuler que ce cisaillement critique est fonction de la résistance mécanique du biofilm et pour avoir un modèle complet, cette résistance devrait pouvoir être intégrée au modèle. Nous avons vu (paragraphe II.1.2.2-c) que des travaux concernant la modélisation de ce paramètre existent (Characklis and Marshall, 1990 ; Stoodley *et al.*, 1999).

Une autre limite possible dans l'approche de Kapellos *et al.* (2007) est que seules les cellules élémentaires (UBC) à l'interface biofilm/fluide sont sujettes à ce cisaillement critique et sont détachées du biofilm : le processus simulé est donc aussi plus un processus d'érosion superficielle, alors que l'intégration de la résistance mécanique du biofilm permettrait éventuellement la modélisation de détachement de « patch » complets comme il a été observé par ailleurs (phénomène de « sloughing », cf. paragraphe II-122.c).

b.3) Cinétiques de croissance :

Le modèle simulant les équations de transport dans le pore et le biofilm est apte à rendre compte de l'inhibition de la croissance par le substrat. D'autres effets inhibiteurs de croissance implémentés, comme le *quorum sensing* ou l'inhibition par les forces de pression) semblent répondre à certaines observations de la littérature (Kreft, 2004 ; Dogan and Erckmen, 2004). Cependant il est très difficile de juger de la pertinence des choix effectués, ces phénomènes étant complexes et mal connus. Tout au plus peut-on dire que, en ce qui concerne l'inhibition par des contraintes mécaniques, les valeurs des paramètres implémentées dans le modèle indiquent que cet effet se fait sentir pour des pressions très élevées (100 bar pour diminuer le taux de croissance intrinsèque de 10 %) : pour des applications pratiques en ingénierie, modéliser ces effets ainsi ne semble pas très adapté.

En ce qui concerne la production des EPS, elle est assujettie à la croissance de la biomasse selon une forme similaire à celle de la consommation du substrat, avec un taux de conversion indépendant des conditions hydrodynamiques. Une augmentation éventuelle de la production de polymère avec le cisaillement (tel qu'observé par Qi *et al.*, 2008) est donc difficile à prendre en compte avec un tel modèle (si tant est que ce phénomène est avéré bien sûr). De même, Kreft et Wimpenny (2001) ont corrélé la cinétique de croissance de biofilm et le taux de production des EPS : ils ont montré que des bactéries qui sécrètent plus d'EPS verraient leur vitesse de croissance réduite par rapport à celle de bactéries qui en produisent moins. Or, dans le modèle de Kapellos, la cinétique de production des polymères, directement proportionnelle au taux de croissance μ ne permet pas de rendre compte de cette observation.

b.4) Phase d'inoculation du poreux

Le modèle présente une phase permettant de simuler la colonisation initiale du milieu poreux. Cependant l'efficacité de capture n'est basée que sur la notion de trajectoire limite et de mise en contact de la bactérie avec le grain. Des effets physico-chimiques ou liés au vivant ne sont pas pris en compte. Quelle est l'influence des différences de conditions initiales que cela induit sur le développement ultérieur des structures développées par le biofilm et les effets induits macroscopiquement sur la perméabilité ?

II.2.3. Conclusion

La modélisation de la croissance de biofilms en milieu poreux est un sujet complexe en raison des forts couplages existant entre la croissance du biofilm à l'échelle locale et sa traduction macroscopique sur la dynamique du système. Le paramètre global le plus représentatif à cet égard est la perméabilité du milieu poreux dont l'évolution traduit le couplage entre le colmatage progressif des pores et la modification du comportement hydrodynamique que cela induit. L'échec relatif des lois de perméabilités développées pour rendre compte de ces observations expérimentales semble montrer que ce paramètre est sans doute fortement lié à la distribution de la biomasse dans les pores et dans le milieu poreux : il intègre donc aussi tout l'historique de la croissance et de la structuration du biofilm, des premiers instants de la colonisation du milieu poreux jusqu'au colmatage final. Selon les stratégies de modélisation choisies, on doit intégrer dans les modèles de nombreux processus plus ou moins complexes, à même de rendre compte de cette croissance et de cette structuration. On se rend finalement compte que l'on a du mal dans les modèles, même les plus raffinés, à prédire ces couplages.

Ainsi, les modèles écrits directement à l'échelle globale intègrent probablement mal ou pas du tout des paramètres cachés, liés à des comportements à micro-échelles du biofilm. Ces comportements ont une influence importante à l'échelle globale sur le long terme. Par exemple, on a vu que dans les modèles continus (comme ceux de Kildsgaard *et al.*, 2001 et Brovelli *et al.*, 2009), la modélisation de la perméabilité à travers une seule variable globale (la porosité moyenne) n'était pas forcément suffisante. De plus, si dans ces modèles, un accent particulier est mis sur la modélisation de ce paramètre, d'autres phénomènes connexes ont leur importance, en particulier le taux de croissance net du biofilm : la modélisation à l'échelle macroscopique des processus gérant ce phénomène peut aussi poser question. Ainsi, l'utilisation d'une fonction de limitation, même si elle est à même de représenter qualitativement certains processus de limitation de la croissance du biofilm, ne prend pas assez en compte les couplages forts entre

hydrodynamique locale et transfert de masse ou structure du biofilm. De même, le processus de détachement est encore mal compris et le choix diversifié des corrélations pour modéliser ce phénomène aura une incidence certaine sur le comportement à long terme du modèle.

Utiliser des modèles plus raffinés ne résout pas forcément le problème. Si on peut prendre en compte de manière plus précise des processus tels que le transfert de masse à l'interface biofilm/fluide, le couplage entre l'écoulement externe et interne au biofilm, ainsi que la description de chaque composant du biofilm (cellule bactérienne, polymères,…), ces modèles doivent eux aussi intégrer beaucoup de processus, pas souvent bien encore modélisés ou compris. Parmi eux, on retrouve encore des phénomènes tels que la cinétique de détachement et d'érosion du biofilm, mais aussi des processus liés à l'influence de l'hydrodynamique sur certains paramètres cinétiques (par exemple l'influence éventuelle des conditions hydrodynamiques sur le métabolisme des bactéries, influence à prendre en compte dans les lois de croissance bactérienne ou les cinétiques de production des polymères). Enfin, dans certains de ces modèles, les méthodes utilisées pour faire évoluer géométriquement la structure du biofilm à l'échelle des pores sont souvent basées sur des méthodologies relativement empiriques. Cela peut expliquer pourquoi, confrontés à des mesures globales, mêmes ces modèles peinent encore à reproduire correctement le comportement dynamique global des systèmes.

Au-delà de la bonne capture de la structuration du biofilm et de son évolution au cours du temps, un problème sous-jacent à tous les modèles est la question des conditions initiales. Si la modélisation des processus de transport de cellules bactériennes et l'évaluation de la probabilité de rencontre entre une bactérie et un grain du milieu poreux sont relativement classiques (car faisant intervenir des outils connus depuis longtemps en filtration colloïdale), certains processus restent encore mal connus. En particulier, la probabilité qu'une bactérie adhère à un grain est une question ouverte : cette probabilité fait intervenir des aspects hydrodynamiques (seuil de contraintes de cisaillement) mais aussi des aspects physico-chimiques beaucoup plus difficiles à appréhender notamment lorsque l'on a à faire à un organisme vivant. Au final, il semble incontournable de s'intéresser aux processus à toutes les échelles de manière systématique et progressive, afin de mieux comprendre ce qui se passe. Ces investigations comprennent :

(i) des investigations à l'échelle de l'ordre de grandeur de quelques pores afin d'étudier l'évolution de la distribution de la biomasse dans le milieu poreux. De nouvelles méthodes, basées sur des techniques de tomographie-X commencent à émerger pour effectuer ce type de travaux (Ex. Thèse de Davit Y., 2010)

(ii) des investigations à l'échelle microscopique pour étudier la structuration du biofilm et son évolution sous sollicitations hydrodynamiques depuis les premiers instants de colonisation jusqu'au biofilm mature.

C'est dans ce dernier cadre (échelles du biofilm) que se situent les travaux de cette thèse dont les objectifs et le plan d'étude, suite à cette revue bibliographique, sont présentés au chapitre suivant.

CHAPITRE 3 : OBJECTIFS SCIENTIFIQUES DE CETTE ETUDE ET PLAN DE TRAVAIL

I. Objectifs

Comme on l'a vu précédemment, les procédés à cultures fixées sont des systèmes complexes, où les cellules bactériennes et autres substances bio-polymèriques sont soumises à des sollicitations hydrodynamiques et des conditions physico-chimiques variables. Ces phénomènes affectent en retour les différents mécanismes physiques, chimiques et biologiques intervenant dans l'adhésion bactérienne mais également dans la formation, la structuration du biofilm ainsi que dans le transport des nutriments A long terme, dans le cas d'un biofiltre, ces processus affectent le développement du biofilm au niveau du milieu poreux et la dynamique globale du système (entre autre au niveau du biocolmatage). Même si le contexte de la thèse concerne une meilleure compréhension et modélisation de systèmes comme les biofiltres, cet objectif constitue un but à long terme. L'étude bibliographique précédente a en effet montré que, pour avancer sur les limitations des modélisations actuelles, il est nécessaire de s'intéresser à une grande variété de processus liés au développement du biofilm, et ceci, à plusieurs échelles : milieu poreux, quelques pores, échelle du biofilm.

L'objectif de ce travail consiste à s'intéresser d'abord à certains processus locaux gérant le développement de biofilms sous écoulement et d'apporter une contribution, tant au niveau des outils à développer pour réaliser ce type d'étude qu'au niveau de la compréhension de certains mécanismes régissant les couplages hydrodynamiques/développement de biofilms sous écoulements. Ce travail nécessite une approche pluridisciplinaire, à l'interface de plusieurs domaines allant de la mécanique à la biologie.

II. Approche expérimentale utilisée et méthodologie

L'étude est basée en grande partie sur une approche expérimentale utilisant une micro-cellule d'écoulement. Le développement à part entière de cet équipement a été effectué dans le cadre de cette thèse et il a été fait en sorte que les conditions hydrodynamiques à l'intérieur de la cellule soient bien maitrisées. Contrairement à la majorité des travaux consultés dans la littérature, nous nous sommes intéressés à chacune des étapes successives du développement du biofilm, de l'adhésion initiale jusqu'à l'état mature. L'originalité de l'approche adoptée est d'avoir effectué **des outils pour pouvoir effectuer** ces mesures en continu sous écoulement. Nous nous sommes intéressés ensuite à certains processus micro-échelles, qui d'après l'étude

bibliographique, peuvent expliquer certaines carences des modèles à macro-échelles décrivant l'impact de la croissance de biofilms sur l'hydrodynamique en milieu poreux. Les étapes suivies dans ce travail sont les suivantes :

- Dans une première étape, nous avons caractérisé le système biologique utilisé ainsi que la micro-cellule d'écoulement qui a été développée.

    - Nous avons ainsi identifié les conditions optimales de croissance de *P. putida* : milieu de culture, température, pH, affinité par rapport au phénol. Il s'agit de mettre au point des expériences de cinétique de croissance bactérienne en faisant variant les conditions de culture (type de milieu de culture, concentration en phénol, température). L'analyse des résultats a permis de définir pour notre système biologique, les conditions les mieux adaptées pour son développement en cultures libres.

    - Puis des analyses physico-chimiques et un recueil de données de la littérature ont été réalisés concernant les propriétés de surface (charge, potentiel zêta, hydrophobie, énergie de surface) du système biologique et du support d'adhésion.

    - Le contrôle des conditions opératoires à l'échelle microscopique dépend fortement du système expérimental utilisé. Avant de réaliser la chambre d'écoulement, des simulations numériques ont été préalablement réalisées sur plusieurs géométries et tailles afin de pouvoir prédire les caractéristiques de l'hydrodynamique (contrôle des effets de bords et des singularités pour avoir l'écoulement le plus stable possible). Sur la base de ces simulations, la chambre d'écoulement a été dimensionnée et réalisée pour permettre de réaliser des observations *in-situ.*

Ce travail fait l'objet du chapitre 4.

- La mise en œuvre de la croissance de cellules initialement adhérées sur un support solide et la détermination des paramètres des cinétiques de croissance en conditions de nutriments non-limitant, ainsi que l'influence des conditions hydrodynamique sur ces paramètres font l'objet du chapitre 5. L'étude bibliographique montre en effet que, dans les modèles d'ingénierie, une utilisation systématique de la loi de Monod est effectuée, sans forcément intégrer une distinction nette entre le comportement des cellules bactériennes en suspension et les cellules bactériennes attachées. Or, l'étude bibliographique montre que le comportement biologique des bactéries adhérées à un support solide est relativement complexe et que notamment, le cisaillement peut avoir une influence sur le métabolisme bactérien. La validité de la loi de Monod dans ces conditions mérite donc d'être étudiée.

- Dans la dernière étape de l'étude, le développement de biofilms sur support solide a été mis en œuvre avec des observations de la structure des couches de biofilm en fonction du temps. Une étude de faisabilité de reconstruction de la structure locale 3D du biofilm avec les outils dont nous disposons a été mise en œuvre. Des calculs de l'écoulement à l'intérieur de cette structure sont alors mis en œuvre afin de montrer l'influence de la microstructure du biofilm sur la perméabilité du milieu. Ce travail est présenté dans le chapitre 6. Ce point renvoie directement à certaines questions évoquées dans la bibliographie sur les effets à macro-échelles de phénomènes apparaissant à petites échelles, et qui, au premier ordre, ont un effet direct sur la modélisation des biofiltres industriels.

CHAPITRE 4 : SYSTEME BIOLOGIQUE ET EQUIPEMENT EXPERIMENTAL

I. Le microorganisme modèle : Pseudomonas putida.

I.1- Présentation

La souche bactérienne *Pseudomonas putida 6521* est le microorganisme sélectionné pour cette étude (fig. 4.1). *Pseudomonas* est un genre de microorganisme unicellulaire en forme de bâtonnet droit (diamètre : 0,5 à 1,0 µm ; longueur : 1,5 à 4,0 µm) et possédant une fluorescence naturelle.

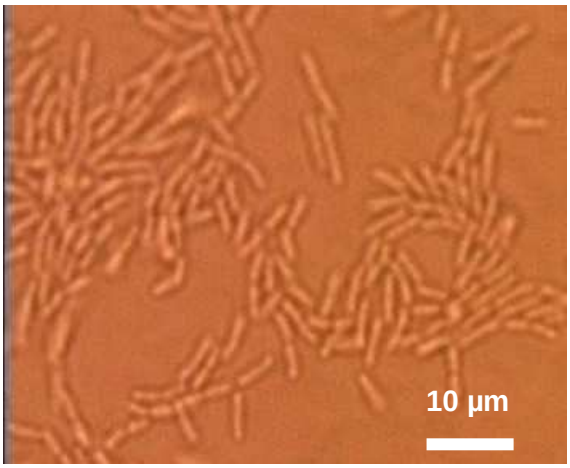


Figure 4.1 : Cellules de *P. putida* souche 6521 adhérées sur substrat de verre

Cette bactérie se développe par duplication cellulaire en conditions aérobies (présence d'oxygène). Sa température optimale de croissance est comprise entre 20 et 30°C. La possibilité de la voir se développer à 4°C est relativement faible ; au-delà de 40°C la croissance est impossible. La croissance de *P. putida* est optimale à pH neutre ; elle est impossible en dessous de 4,5 selon Palleroni (1984).

La paroi de cette bactérie est hydrophile comme cela a été montré par des mesures d'angle de contact par Rochex *et al.* (2004). Power *et al.* (2007) ont également confirmé ce caractère hydrophile par des mesures d'angle de contact.

Le choix de cette bactérie s'explique en raison des applications visées à moyen terme. En effet, la souche choisie est intéressante pour sa capacité à éliminer des composés de la famille des phénols que l'on rencontre dans les rejets d'un certain nombre d'industries ; de plus elle produit facilement un biofilm ce qui est le but recherché ici.

I.2- Préparation des cultures

Un échantillon de la souche *P. putida* a été prélevé à partir d'un milieu de culture solide LA (Luria Agar, fig. 4.2) fourni par le laboratoire LTHE (Grenoble).



Figure 4.2 : Milieu LA colonisé par *P. putida*

Cet échantillon a ensuite été inoculé dans 25 ml de culture liquide LB (Luria Bertani, fig. 4.3) sans peptone contenue dans un tube de 50 ml. La composition de ces milieux de culture est donnée en annexe B.



Figure 4.3 : Milieu de culture LB stérile sous hotte à flux laminaire

Après 48h d'incubation à température ambiante, quelques échantillons de 1 ml y sont prélevés et transférés dans des microtubes de 2 ml. Les pré-cultures ainsi obtenues sont conservées avant utilisation, dans un congélateur à -20°C, avec 20 % de glycérol stérile pour protéger la paroi des bactéries contre l'effet des cristaux de glace (figure 4.4).

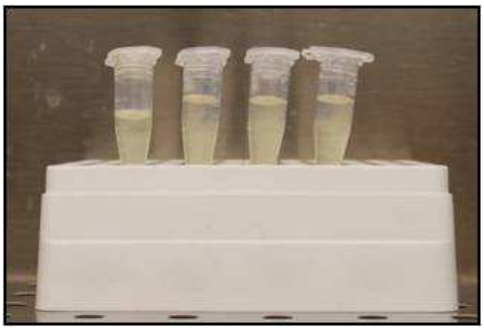


Figure 4.4 : Pré-culture de *P. putida* à l'état congelé

I.3- Mesure de la cinétique de croissance

Dans cette expérience menée au LTHE, l'objectif est de mesurer l'évolution de la densité cellulaire en fonction du temps et de mettre en évidence l'effet éventuel de la présence de phénol (choisi dans cette étude comme polluant modèle) sur la cinétique de croissance et sur le pouvoir dégradant de la bactérie *P. putida*. Pour préparer une culture, on décongèle une pré-culture puis

on l'homogénéise par remixage ; elle est ainsi prête pour mettre en œuvre la croissance en conditions libres. On y prélève ensuite un échantillon de 200 µl que l'on injecte dans 150 ml de milieu LB sans peptone, contenu dans un erlenmeyer de 250 ml. Pour assurer la condition aérobie, ce dernier est fermé au moyen d'un bouchon poreux en coton pour permettre la diffusion d'oxygène tout en évitant la contamination ou l'introduction de particules exogènes. L'erlenmeyer est ensuite monté sur un agitateur (tournant à 150 tours/min) placé dans une étuve réglé à 27°C.

Pour faire des mesures de cinétique de croissance, on prélève un échantillon de 1 ml toutes les heures et par centrifugation à 5000 tours/min pendant 5 min, on sépare les cellules et la phase liquide puis on suspend les cellules dans du NaCl à 0,15 mM. La suspension est homogénéisée, re-centrifugée à 5000 tours/min et les cellules sont encore séparées de la phase liquide avant d'être suspendue une dernière fois dans du NaCl à 0,15 mM. La densité cellulaire de cette suspension est enfin estimée par mesure de l'absorbance au moyen d'un spectrophotomètre (Perkin Elmer *Inc.*). L'annexe C explique de façon un peu plus détaillée le principe de mesure de l'absorbance également appelée « densité optique ». Cette analyse effectuée sur plusieurs échantillons prélevés à des instants successifs permet de tracer la cinétique de croissance, d'identifier ses phases et de mesurer le taux de croissance correspondant à la phase exponentielle. La cinétique de croissance est mesurée pour 5 milieux de culture dont les différentes concentrations initiales en phénol Co en phénol sont 10, 20, 50, 100 et 200 mg/l (fig. 4.5).

L'allure des cinétiques fait apparaître les différentes phases de la croissance comme déjà reporté depuis plusieurs décennies dans de nombreuses études (Monod, 1949; van Niel, 1949; Herbert *et al.,* 1956; van Es and Meyer-Reil, 1982). La phase de déclin n'a pas été mesurée. Les taux de croissance sont obtenus en modélisant la phase de croissance par une loi exponentielle du type :

$$n_i = n_o.\exp(\mu.t) \qquad (Eq.4.1)$$

Le tableau 4.1 donne les valeurs de µmax de la phase exponentielle. Pour les concentrations de phénol comprises entre 10 et 100 mg/l, on retrouve le même taux de croissance. Cela veut dire que la source de carbone principale se trouve dans la composition des extraits de levure (5000 mg/l) dans le milieu. Cela met en évidence le caractère non-limitant du phénol dans cette gamme de concentration. Par contre, à Co = 200 mg/l, le taux de croissance diminue ; le phénol a donc des effets inhibiteurs sur la cinétique de croissance.

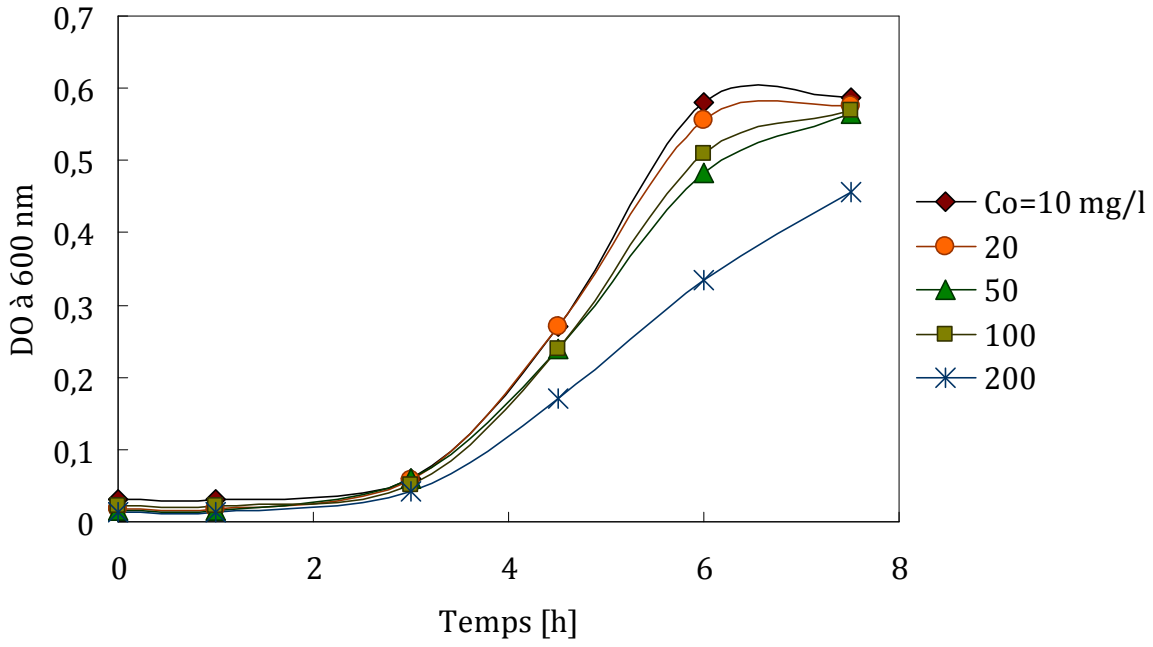


Figure 4.5 : Cinétique de croissance d'une culture libre de *P. putida* en milieu LB sans peptone à différentes concentrations initiales de phénol.

Tableau 4.1 : Valeurs de μ_{max} pour la croissance en milieu LB modifié en conditions batch

Co [mg/l]	μ_{max} [1/h]	R^2 [-]
10	0,762	0,965
20	0,754	0,959
50	0,767	0,991
100	0,761	0,963
200	0,699	0,959

Ces informations sont utiles car elles nous permettront de pouvoir contrôler les conditions de nutriments lors de la croissance en chambre d'écoulement de cellules fixées sur supports solides. Pour cette dernière le but sera de mettre en évidence une éventuelle influence de l'hydrodynamique sur la cinétique de croissance ; nous allons pouvoir ainsi, en travaillant en conditions de substrat non-limitant, nous affranchir de l'effet des conditions de culture pour pouvoir nous intéresser uniquement au rôle de l'hydrodynamique sur la croissance et le développement de biofilms sur supports solides.

II. Description de la plateforme expérimentale et de la chambre d'écoulement

II.1- La plateforme expérimentale

La plate-forme expérimentale est montée dans une salle propre (figure 4.6) en surpression pour limiter le dépôt de poussières et ainsi les risques de contamination. Le système d'écoulement et le microscope ont été installés sur un banc optique associé à une instrumentation de pince optique.

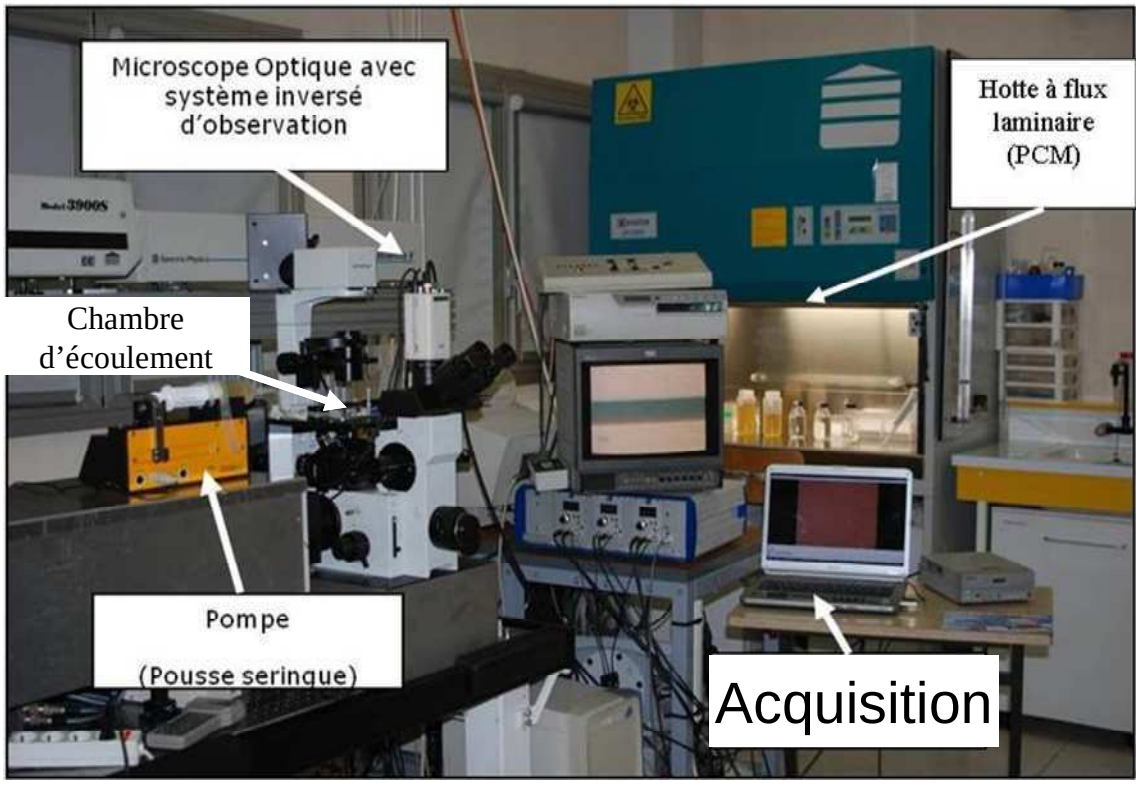


Figure 4.6 : Plate-forme expérimentale installée en salle propre

Toutes les opérations de manipulation des suspensions bactériennes et des milieux de culture ainsi que de remplissage du système d'écoulement sont effectuées dans une hotte à flux laminaire (*Faster BH 2004*).

Le système d'écoulement est composé des éléments suivants : un réservoir amont contenant le milieu de culture, une pompe, une chambre d'écoulement montée sur un microscope et un réservoir aval. Cependant pour le développement de biofilms, on a travaillé en circuit fermé. Trois types de pompe (péristaltique, pousse-seringue, pompe volumétrique à palette) ont été utilisées afin de pouvoir couvrir une large gamme de débit. Le pousse-seringue qui offre un débit constant au cours du temps a été principalement utilisée lors de la mise en œuvre de la croissance cellulaire.

II.2- La chambre d'écoulement

Une cellule d'écoulement micronique (fig. 4.7) a été conçue et développée au cours de cette thèse dans l'optique d'étudier la cinétique de croissance de cellules de *P. Putida*, et l'influence éventuelle de l'écoulement sur cette cinétique sur une échelle se situant entre la taille des cellules (quelques microns) et celle de biofilms (quelques dizaines voir centaines de microns).

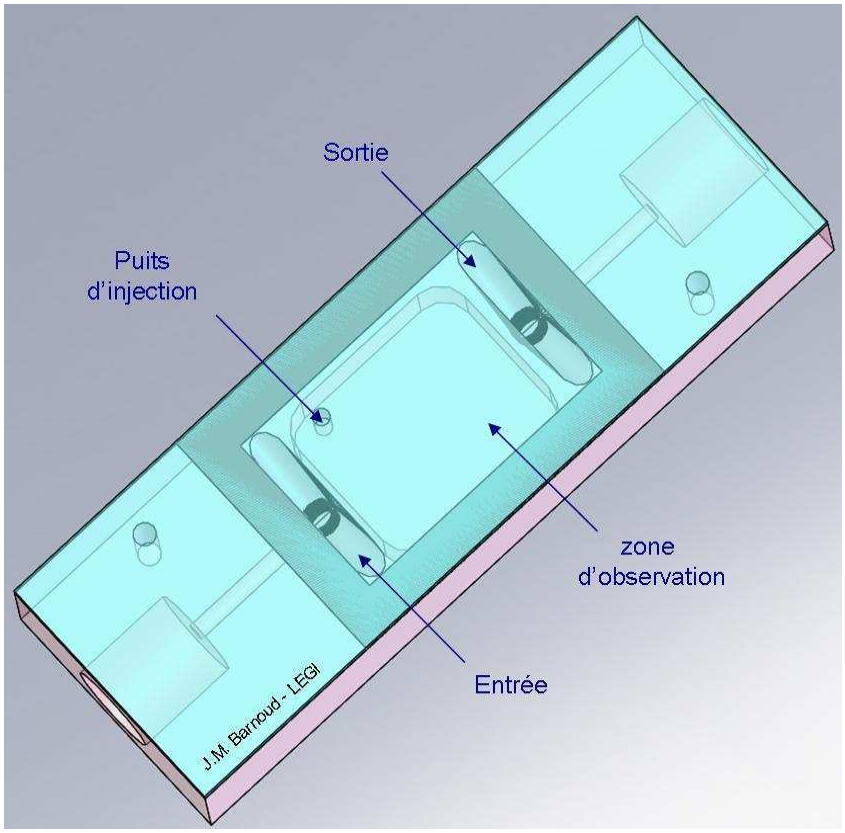


Figure 4.7 : Cellule d'écoulement montée sur la platine du microscope optique

II.2.1- Plaque supérieure

La plaque supérieure a les dimensions suivantes : longueur l = 75mm, largeur w = 25mm, et épaisseur e = 13 mm, et est en PPMA. Elle est percée des puits d'entrée, de sortie et d'injection des suspensions bactériennes.

II.2.2- Joint d'étanchéité

Ses dimensions intérieures sont : l = 28 mm, w = 17 mm et e = 250 µm. Il est collé entre les deux plaques inférieure et supérieure et délimite ainsi la zone parallélépipédique d'écoulement tout en assurant son étanchéité par rapport au fluide.

II.2.3- Support d'adhésion (plaque inférieure)

Suivant les conditions de contrainte hydrodynamique, deux types de plaques inférieures ont été utilisés :

II.2.3.1- Lamelle en verre borosilicaté

Ces lamelles ont été utilisées pour les expériences de suivi de croissance cellulaire et de développement de biofilm qui ont été effectuées sur une gamme de débits réduite de 0,1 à 10 ml/min. Ses dimensions sont : l = 22 mm, w = 32 mm et e = 0,15 mm. Elle est transparente et de faible rugosité (0,25 nm).

Pour le traitement, on a utilisé un mélange sulfochromique de formule chimique H_2SO_4-(K_2/Na_2) Cr2O7 (Prolabo, VWR) comme suit : on laisse tremper les lamelles de verre dans un bain sulfochromique pendant 4h, puis les lamelles sont rincées 3 fois dans de l'eau distillée stérile et conservées dans un récipient contenant de l'eau stérile. Pour chaque expérience, une lamelle est prélevée et séchée sous hotte à flux laminaire. Les lamelles ne sont pas réutilisées.

Les propriétés de surface de ces lamelles préalablement traitées ont été déterminées par Castelain *et al.* (2007). Par la technique de mesure des angles de contact (*Digidrop, GBX Scientific Instruments*), ils ont mis en évidence le caractère très hydrophile des lamelles avec un angle de contact de 15° suite au traitement effectué. Pour nos expériences de mise en œuvre de croissance cellulaire et de développement de biofilms sur supports solides, nous avons préparé nos lamelles en suivant la même procédure de traitement.

II.2.3.2- Lame en claire de vinyle optique

Ces lames ont été utilisées pour les expériences de suivi de détachement cellulaire qui ont été effectuées sur une gamme de débits élevée de 2 à 750 ml/min. Ce type de support est fabriqué à partir de claire de vinyle optique (*Electron Microscopy Sciences, Hatfield, PA. 19440*) avec un indice de réfraction identique à celui du verre. Ses dimensions sont : l = 75 mm, w = 25 mm et e = 0,5 mm.

Les propriétés de surface de ces lames ont été caractérisées expérimentalement par la mesure de l'angle de contact décrite ci-dessus. Les plaques ont été immergées dans des solutions de NaCl de forces ioniques variables (0,15 mM, 1,5 mM, 15 mM et 150 mM) pour étudier l'influence de l'environnement ionique sur leur polarité et donc sur le détachement des cellules individuelles initialement adhérées. Comme liquide, nous avons utilisé le Formamide, l'Ethylèneglycol, le Glycérol et l'Eau. Le tableau 4.2 donne les angles de contact mesurés pour ces différents liquides.

Tableau 4.2 : Valeurs des angles de contact pour le support en claire de vinyle

I [mM]	θ-Eau	θ-Ethylèneglycol	θ-Formamide	θ-Glycérol
0,15	81,7	69,9	66	81,2
1,5	79	67,3	63,6	73
15	85,3	71,1	71	80
150	77,9	66	71,3	76,3

Les valeurs des angles de contact sont comprises entre 63 et 85°, valeurs élevées mais inférieures à 90°. La surface du support en claire de vinyle présente donc un caractère faiblement hydrophile.

II.3- Caractérisation de l'hydrodynamique

II.3.1- Critère de validation des mesures

Pour l'étude de l'adhésion microbienne dans la chambre d'écoulement, il est nécessaire d'avoir un régime d'écoulement bien établi et contrôlé dans la zone d'observation, d'où l'importance et la rigueur à accorder au dimensionnement des systèmes d'écoulement. En particulier, la forme de l'entrée et de la sortie doit être bien choisie pour atteindre un régime établi le plus rapidement possible. Ce critère a été testé et vérifié par Bakker *et al.* (2003) qui ont simulé et comparé les profils de vitesses pour des chambres d'écoulement de formes différentes. Ils ont montré que la forme et la taille de l'entrée et la sortie des chambres d'écoulement pouvaient avoir une influence sur le régime hydrodynamique.

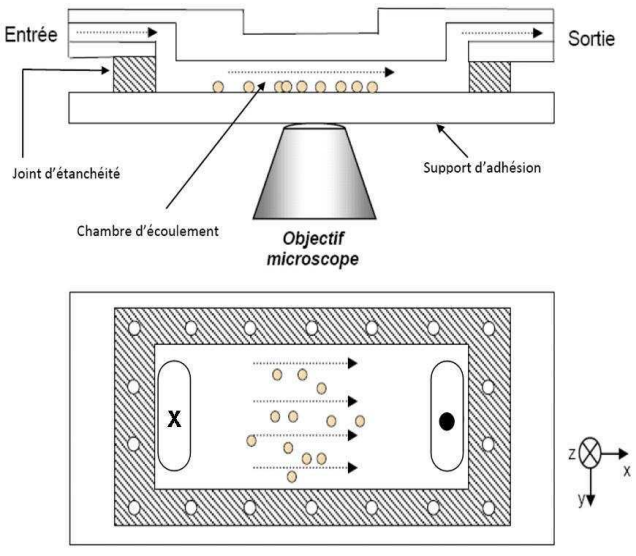


Figure 4.8 : Vues détaillées latérale (haut) et de dessus (bas) de la chambre d'écoulement montée sur la platine du microscope optique

Pour notre part, nous avons choisi une géométrie permettant une répartition uniforme du flux sur une grande partie de la surface d'observation. En effet, l'entrée et la sortie ont été réalisées

de manière symétrique afin de minimiser les zones de recirculation qui pourraient affecter l'écoulement dans la zone d'observation (fig. 4.8).

II.3.2- Hypothèses qualitatives sur le régime d'écoulement

La taille et la forme de la chambre d'écoulement nous permettent de dégager certaines hypothèses simplificatrices concernant le profil des vitesses d'écoulement :

- Dans la zone d'observation, la vitesse est réduite globalement à sa composante longitudinale, i.e. à celle suivant la direction (x) de l'écoulement.

$$\vec{V}(u,v,w) \approx \vec{V}(u,0,0) \qquad (Eq.4.2)$$

- Cette vitesse u ne varie suivant les directions (x) et (y) que près des parois (x = 0 et x = L ; y = 0 et y = w). Nous avons pu vérifier par des mesures de profil des vitesses suivant x et y cette hypothèse, dans la zone d'observation donc, on peut admettre que :

$$\frac{\partial u}{\partial x} = \frac{\partial u}{\partial y} = 0 \qquad (Eq.4.3)$$

L'ordre de grandeur des vitesses locales dans la chambre d'écoulement implique que le nombre de Reynolds va rester toujours très faible par rapport à sa valeur de transition laminaire-turbulent.

- Le rapport d'aspect (hauteur / largeur) est très faible devant 1 :

$$\frac{h}{b} = \frac{0,25}{17} = \frac{1}{68} << 1 \qquad (Eq.4.4)$$

Dans ces conditions, Happel et Brenner (1965) ont montré que les effets de parois n'affectent que très peu l'écoulement et cet effet est perçu uniquement sur une région très réduite à proximité des parois latérales de la chambre d'écoulement.

- Le régime hydrodynamique est laminaire dans la chambre d'écoulement ; cela est dû aux dimensions internes très faibles (écoulement capillaire). En effet le nombre de Reynolds dans la chambre est donné par :

$$\mathrm{Re} = \frac{\rho_f Q}{(w+h)\mu} \qquad (Eq.4.5)$$

ρ_f = 1000 kg.m^{-3} et μ = 10^{-3} Pa.s sont la masse volumique et la viscosité dynamique du fluide en écoulement.

Alors pour notre chambre d'écoulement aux dimensions connues, on a :

$$R_e \approx 0{,}966.Q \text{ ; avec Q (ml/min)} \qquad (Eq.4.6)$$

- Pour un écoulement laminaire dans la chambre d'écoulement, l'expression théorique de la contrainte de cisaillement à la paroi notée Tw, est donnée par la relation suivante (Elimelech, 1994 ; Bakker *et al.,* 2003) :

$$T_w = \mu . \left.\frac{du}{dz}\right|_{paroi} = \frac{6\mu Q}{h^2 w} \qquad (Eq.4.7)$$

Le profil théorique de la vitesse d'écoulement est parabolique et nul aux parois :

$$\left.\frac{du}{dz}\right|_{h/2} = 0 \qquad (Eq.4.8)$$

En utilisant l'expression de la contrainte de cisaillement à la paroi, on obtient :

$$u(z) = \frac{6Q}{h^3 l} z(h-z) \qquad (Eq.4.9)$$

Pour valider la nature laminaire du régime d'écoulement, nous avons déterminé les profils expérimentaux des vitesses par PTV (*Particle Tracking Velocimetry*). Cela a été fait par suivi *in-situ* de particules microsphériques en polystyrène, ceci à différents débits. Les résultats ont été comparés avec ceux du calcul théorique.

Les vitesses d'écoulement appliquées lors de la caractérisation de l'hydrodynamique de la chambre d'écoulement sont comprises entre 48 et 194 µm/s. Ces vitesses correspondent à de faibles contraintes de cisaillement. Le choix de cette gamme relativement très faible est justifié par la taille réduite de la zone d'observation traversée par les particules (130 x 90 µm^2). En conséquence, le temps mis par les particules pour traverser la zone d'observation est relativement court, avec seulement 0,67 s pour un débit faible de 49,4 µl/min (Tableau 4.3). La caméra CCD dont nous disposons n'est pas adaptée si on veut appliquer des débits plus forts

puisque ce temps serait de quelques centièmes de secondes et la caractérisation du champ de vitesse peu précise.

Tableau 4.3 : Gamme de variation du débit, de la vitesse débitante et du temps de séjour des bactéries.

Q [µl/min]		U = Q/S [µm/s]		Re [--]		Temps mis par les particules pour traverser la zone d'observation [s]	
min	max	min	max	min	max	min	Max
12,3	49,4	48	194	0,01	0,05	0,67	2,69

La figure 4.9 montre la validité de l'hypothèse de laminarité du régime d'écoulement.

Il est également vérifié dans la figure 4.10 que l'écoulement est du type 2D loin des parois, c'est-à-dire que le profil des vitesses est invariable selon le plan (x, y) dans la zone d'observation. La concordance entre les résultats expérimentaux et théoriques vérifiée à la figure 4.10 implique que sur toute la zone longitudinale délimité par x1 = 8 mm et x3 = 20 mm, le profil des vitesses est identique. Par ailleurs, le rapport h/w = 0,015 très faible. Alors l'établissement du régime est aussi valable selon y loin des parois latérales. Toutes nos mesures dans les différentes conditions de débit mettent en évidence un profil 2D établi dans la zone parallélépipédique de la chambre et loin des parois.

Cette qualification de l'écoulement est primordiale pour la suite car elle permet de bien contrôler l'hydrodynamique (Gaver et Kute, 1998); l'existence d'un écoulement laminaire et établi 2D plan nous permettra d'exercer un cisaillement uniforme dans la **zone** d'étude pourvu que le débit imposé soit contrôlé. Pour atteindre les conditions typiques d'écoulement citées au paragraphe II.4, nous devrons néanmoins travailler dans des gammes de débits plus élevées que celles utilisées pour la caractérisation de la cellule. Etant donné les nombres de Reynolds impliqués pour certaines expériences (débit maximum dans la thèse de l'ordre de 750 ml/min, ce qui correspond à un Reynolds de 1400), nous pourrons toujours considérer que nous sommes en conditions laminaire 2D, établi.

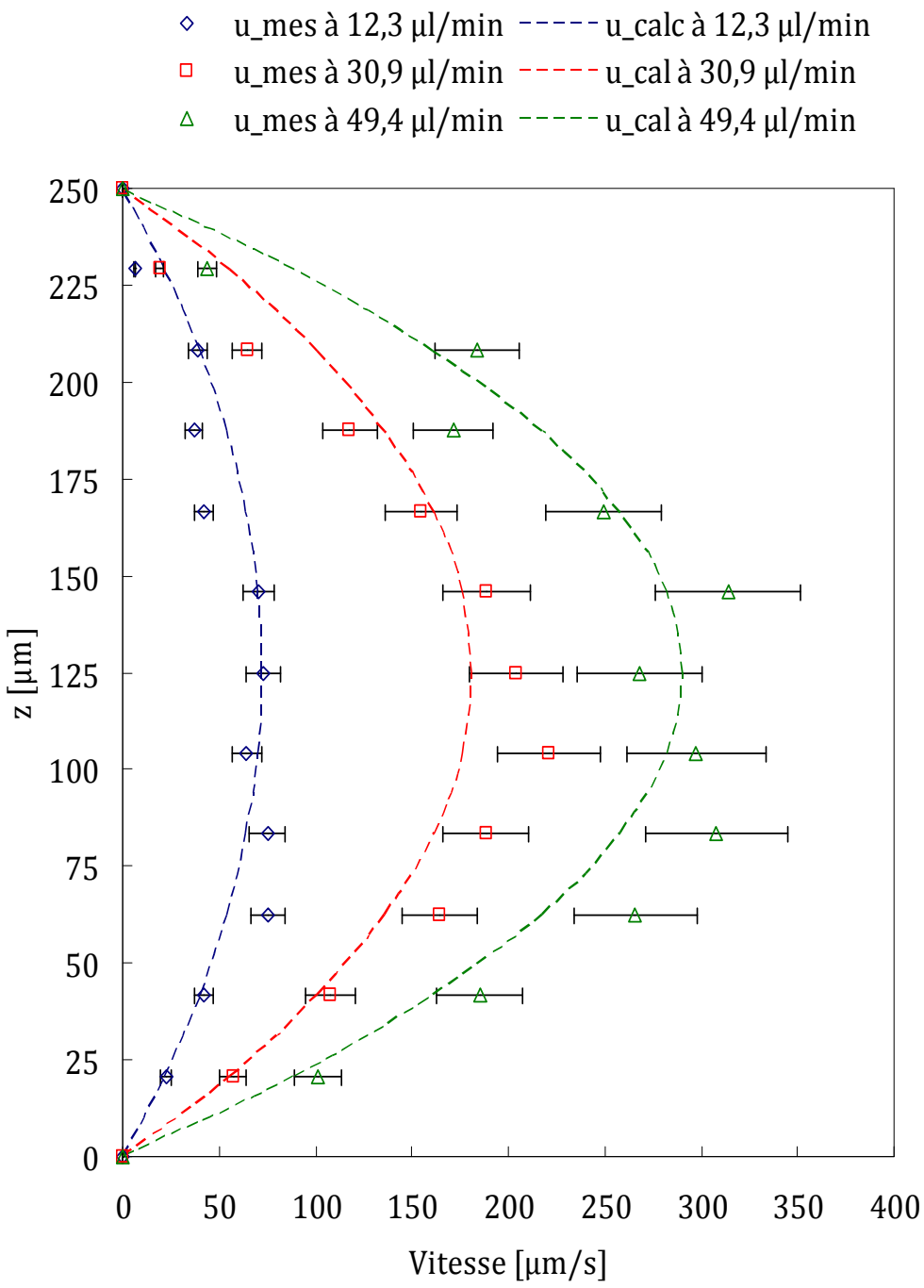


Figure 4.9 : Vitesse selon z sur la ligne (x = l/2, y = w/2, z) : pointillés = vitesses théoriques et symboles pleins = vitesses expérimentales. Mesures réalisées par suivi in-situ de particules microsphériques de 1 µm de diamètre, de concentration 6.25 e+7 particules par ml d'eau stérilisée. Température = 24 ± 1 °C.

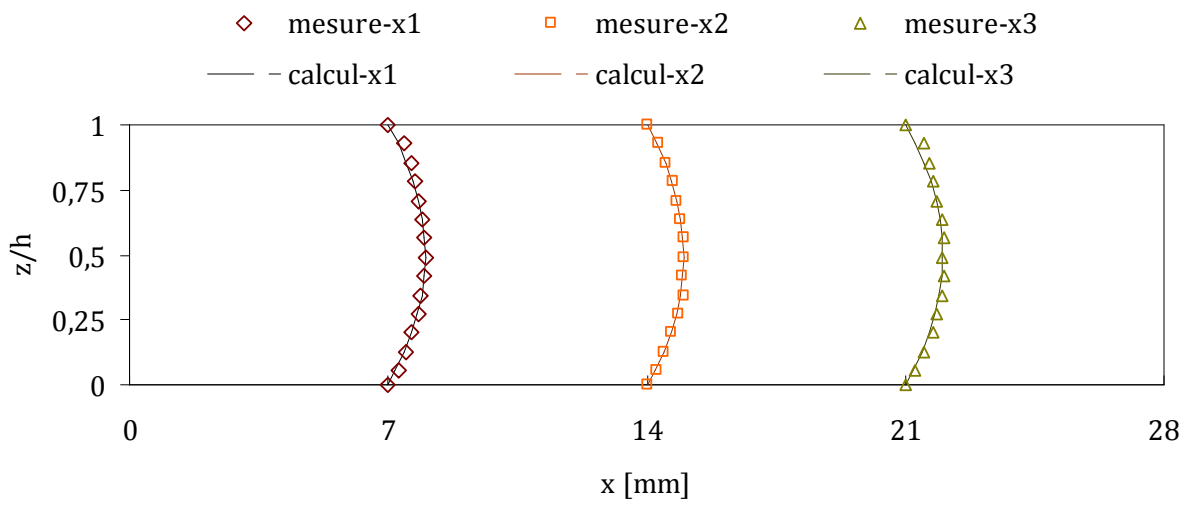


Figure 4.10 : Variation du profil de vitesse locale suivant la direction de l'écoulement (axe x). Pour tout x compris entre L/4 et 3L/4 ; L = 28 mm ; u(x) = constante, Q = 100 µl/min.

II.4- Choix des conditions de travail en regard des conditions hydrodynamiques typiques rencontrées dans les systèmes étudiés (biofilms en milieu poreux)

Le paragraphe précédent a montré que la cellule d'écoulement permettait de réaliser un écoulement de Poiseuille 2D parfaitement contrôlé. Dans les expériences qui sont décrites par la suite, on se place dans des conditions hydrodynamiques proches de celles rencontrées dans les systèmes de biofiltration industrielle, comme celles appliquées lors de la thèse de Karrabi (2009) ou certaines études de la revue bibliographique.

En ce qui concerne les travaux de Karrabi (2009), le pilote expérimental était constitué d'une colonne de 60 cm de hauteur et de 15 cm de diamètre, remplie de billes de biolite © de 4 mm de diamètre. Les mesures de porosité effectuées pour le biofiltre propre se sont montrées très reproductibles d'une expérience à l'autre lors de cette thèse avec pour valeur ϕ_o = 0,350 ± 0,007. La dispersion sur les valeurs de perméabilité était un peu plus importante avec des valeurs de ko = 1,32x10^{-8} ± 5, x10^{-9}. Les expériences ont été réalisées à des débits de 5, 10 et 20 l/h, ce qui correspond à des valeurs de la vitesse superficielle allant de 0,28 à 1,13 m/h. Dans le cas des biofiltres industriels, les vitesses superficielles sont classiquement de 1 à 2 m/h avec des valeurs extrêmes pouvant aller jusqu'à 5 m/h, rarement plus.

Pour caractériser les expériences de Karrabi et les conditions opératoires classiques sur les biofiltres, on peut raisonner à partir du nombre de Reynolds de pores qui est défini par l'expression suivante :

$$\mathrm{Re} = \frac{\rho_f .U.d_p}{\mu.(1-\phi)} \qquad (Eq.4.10)$$

ρ_f et μ sont la masse volumique et la viscosité dynamique du fluide, U la vitesse superficielle et d_p le diamètre des grains.

Connaissant la perméabilité initiale et la porosité initiale du milieu poreux, et en supposant un arrangement des grains imposés (Body Cubic Centered, BCC), on peut aussi calculer, pour une vitesse superficielle donnée, le cisaillement moyen correspondant en écrivant l'équilibre entre la perte de pression et les forces de frottements (Karrabi, 2009). Les résultats sont consignés dans le tableau 4.4. Pour les valeurs de vitesse superficielle hors de la gamme étudiée par Karrabi (2009), on a raisonné en utilisant un diamètre de grain égal aussi à 4 mm, tout en gardant une porosité de 0,35. C'est légitime dans la mesure où la biolite© utilisée dans la thèse de Karrabi correspond aux tailles classiques dans les biofiltres industriels.

Tableau 4.4 : Valeurs typiques des nombres de Reynolds et du cisaillement moyen pour les expériences de Karrabi (2009) et un biofiltre industriel (valeur extrême)

	Q (l/h)	Vitesse superficielle (m/h)	Re_p	τ (mPa)
Karrabi (2009)	5	0,28	0,48	4
	10	0,56	0,96	9
	20	1,13	1,93	20
Biofiltre industriel (gamme maximum)		5	8,55	80

En suivant la même procédure nous avons aussi consigné les ordres de grandeur des conditions opératoires pour certaines expériences citées dans la bibliographie (Taylor and Jaffe, 1990 ; Vandevivere, 1992 ; Deront *et al.*, 1998) même si certaines d'entre elles correspondent à des régimes rarement rencontrés en filtration mais plutôt dans les études sur l'infiltration dans les sols (Taylor and Jaffe, 1990 ; Vandevivere, 1992). Le tableau 4.5 présente les systèmes utilisés et les conditions opératoires associées.

En conclusion, les expériences menées sur des configurations de type sol et pour lesquelles les données expérimentales assez exhaustives sont disponibles donnent des valeurs de cisaillement de quelques millièmes de mPa à 1 mPa. Les configurations plus adaptées aux milieux poreux granulaires et aux régimes d'écoulement utilisés en filtration industrielle donnent des

cisaillements allant de quelques mPa à quelques dizaines de Pa. Les gammes de débit choisies dans les expériences en micro-cellule devront pouvoir couvrir au moins cette gamme, voire même aller au-delà.

Tableau 4.5 : Paramètres géométriques et conditions hydrodynamiques typiques des expériences de la littérature

	Système	d_p [mm]	Re_p	τ[mPa]
Deront *et al.*, 1988	Biofiltre industriel (Biofor ©)	2,7	3,5	32
Vandevivere, 1998	Mini-colonnes	0,063 à 0,125 microns	0,0025 (valeur moyennee)	0,008 (valeur moyennee)
Taylor and Jaffe, 1990	Mini-colonnes	0,7	0,12	1

III. Conclusion

Cette étude nous a permis de caractériser le système biologique utilisé et ses conditions de croissance en conditions de culture libre. Les conditions optimales de croissance de la bactérie *P. putida* ont été déterminées. Ces résultats serviront par la suite de référence pour l'étude de la croissance de bactéries en condition de culture fixée. On cherchera entre autre à s'affranchir au maximum des effets de concentrations en nutriments (conditions non inhibitrices et non limitantes) dans ces expériences pour tenter de mettre en évidence l'effet d'un stress hydrodynamique sur la croissance bactérienne.

La chambre d'écoulement où se dérouleront ses expériences a en outre été caractérisée. La mesure du profil de vitesse dans cette chambre d'écoulement a permis de mettre en évidence la validité d'un écoulement 2D établi pour les différentes conditions d'étude présentées dans les chapitres suivants. On assure donc un contrôle de la contrainte de cisaillement pariétal par la seule variation du débit. De plus cette contrainte est constante et uniforme dans la zone d'observation.

CHAPITRE 5 : PHASE INITIALE DE FORMATION DES BIOFILMS - ETUDE DE LA CROISSANCE BACTERIENNE SOUS ECOULEMENT CISAILLE

I. Introduction

Dans cette partie, on s'intéresse à l'effet éventuel du cisaillement sur la modification du comportement des bactéries en termes de vitesse de croissance.

Pour ce faire, on se placera donc dans des conditions non limitantes en termes de substrat (carbone, oxygène). Le traitement des données se fait par visualisation et traitement d'images (manuel ou semi-automatique) : cette technique n'est applicable que sur la phase de mise en place du biofilm primaire juste après la phase d'adhésion des bactéries sur le substrat solide (phase 2 sur la figure 5.1). Cette phase correspond à une étape *a priori* antérieure à l'apparition du « *quorum sensing* ».

Comme évoqué dans la bibliographie, certains travaux montrent (Sauer and Camper, 2001 ; Sauer *et al.,* 2001) qu'après la phase initiale de colonisation du substratum solide, les bactéries qui sont passées d'un état planctonique à un état « biofilm » voient leur vitesse de croissance multipliée, le phénotype des bactéries étant modifié sous l'effet de facteurs pas encore bien identifiés. Ce phénomène s'accompagne de la production d'effecteurs chimiques qui permettent aux bactéries de communiquer entre elles (*quorum sensing*).

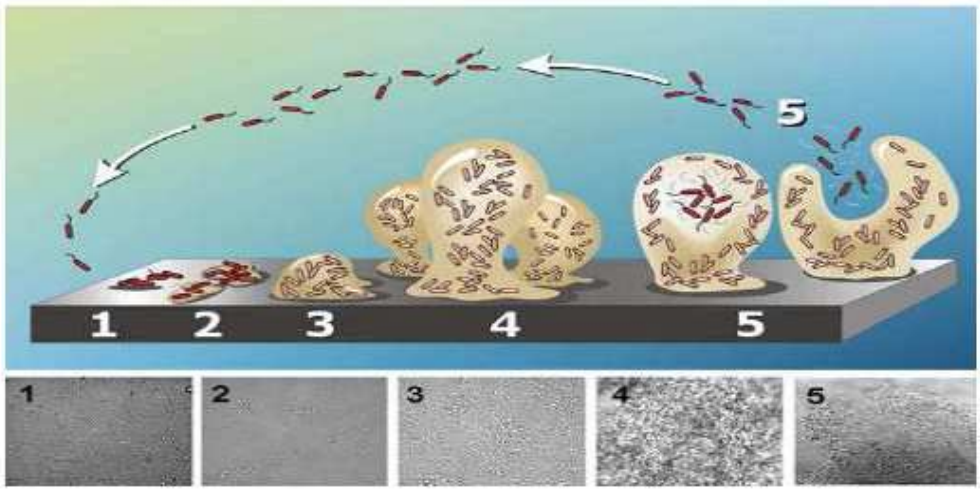


Figure 5.1 : Schéma montrant les différentes phases de la formation de biofilm en particulier les phases 1 et 2, faisant l'objet de cette étude

Ce que l'on cherche, c'est mettre en évidence un effet direct éventuel du cisaillement (ou de la vitesse d'écoulement) sur le comportement des bactéries durant cette phase initiale de la constitution du biofilm.

A notre connaissance, il existe peu d'études sur le sujet. Or, cette phase de colonisation et la vitesse à laquelle elle se produit, auront une incidence directe sur l'évolution ultérieure du biofilm et sa distribution spatiale dans le système étudié.

La quantification de la croissance initiale de microorganismes sur supports solides est une technique relativement difficile à mettre en œuvre en raison de la survenance éventuelle d'autres effets non moins importants comme le détachement cellulaire sous l'effet du cisaillement. L'approche expérimentale que nous avons adoptée a consisté à contrôler les conditions opératoires de manière à ce qu'il n'y ait pas de détachement pendant la phase de croissance initiale.

Les principaux facteurs ayant une influence directe sur les mécanismes de détachement cellulaire ont été répertoriés dans l'état de l'art présenté en chapitre 2. Ces facteurs sont : la contrainte de cisaillement, le temps de contact, la force ionique, le type d'ion, le type de support et le type de microorganisme. Dans un premier temps nous avons mené des expériences d'adhésion/détachement de cellules de *P. putida* sur supports solides en évaluant l'influence des facteurs cités ci-dessus. Les résultats de ces investigations serviront ensuite lors du suivi de croissance initiale des biofilms sous écoulement.

Donc avant d'aborder l'aspect croissance initiale qui constitue l'objectif principal de cette étude, nous présentons au préalable les résultats issus des expériences de détachement.

II. Mécanismes d'adhésion / détachement de bactéries sous écoulement

II.1- Approche expérimentale

Le but des expériences menées dans cette partie est de caractériser les tendances générales de la capacité d'adhésion de cellules de *P. putida* sur supports solides, sous l'effet d'un écoulement de cisaillement pariétal. Il s'agit d'apporter les éléments nécessaires à la compréhension des

mécanismes impliqués dans la croissance bactérienne qui a lieu lors de la colonisation de biofiltres. On ne cherchera pas à effectuer une étude exhaustive sur les propriétés d'adhésion/détachement de ces micro-organismes sur des surfaces solides, mais plutôt on s'appliquera à examiner l'importance relative des différents paramètres pouvant influencer les processus de colonisation. Ces paramètres sont l'intensité du cisaillement, le temps de contact initial après déposition des bactéries sur le support, les conditions physico-chimiques du milieu en écoulement. Plus généralement l'historique des phases de repos/phases de cisaillement en relation avec les niveaux de cisaillement appliqués sera aussi étudié.

Différents supports ont dû être utilisés pour s'adapter aux différentes conditions d'écoulement explorées. Aux régimes d'écoulement pour lesquels les contraintes de cisaillement sont faibles de l'ordre 0,02 à 0,6 Pa (gamme des conditions typiques données dans les tableaux 4.4 et 4.5), des lamelles de verre (0,15 mm d'épaisseur) ont pu être utilisées. Ces faibles niveaux de contrainte n'ayant pas engendré de déformation de ce support. Cependant, les taux de détachement obtenus n'excédaient pas 10 %. Ces faibles taux de détachements ne nous ont pas permis d'effectuer une étude plus approfondie avec une statistique suffisante pour évaluer l'influence de paramètres comme la force ionique ou le temps de contact. On a donc choisi d'explorer des gammes de cisaillement plus élevées pour lesquels il a été nécessaire de choisir un support d'adhésion plus résistant. Les conditions expérimentales étaient alors celles du tableau 5.1, ce qui correspond à des contraintes de cisaillements largement plus grandes que celles que l'on s'attend à rencontrer sur les systèmes à cultures fixés (du moins en début de colonisation).

Tableau 5.1 : Caractéristiques hydrauliques des expériences de détachement

Q [ml/min]		U = Q/S [m/s]		Re [-]		Tw [Pa]	
min	max	min	Max	min	max	min	max
2,13	750	0,008	2,94	2	735	0,2	70,6

Des lames de microscope en claire de vinyle de 500 µm d'épaisseur ont été choisies car elles permettaient de résister à des niveaux de contraintes allant jusqu'à quelques dizaines de pascals. Ce type de support possède une bonne qualité optique et un indice de réfraction proche de celui des lamelles de verre. De par sa facilité de mise en œuvre et sa capacité à explorer une gamme étendue de contrainte pariétale, c'est ce support en clair de vinyle qui a été privilégié pour évaluer l'influence des paramètres pouvant influencer le détachement. Ces résultats

d'adhésion/détachements permettront d'interpréter les processus intervenant lors du suivi de la croissance bactérienne sus support en lamelle de verre.

Pour toutes les expériences, le milieu du support (x = L/2 ± 1 mm; y = w/2 ± 1 mm) est choisi comme zone d'observation. Les observations étant faites au microscope optique avec un objectif X100, la taille de la zone d'observation (130 x 95 µm) est donc relativement faible rapportée aux dimensions du support (28 x 17 mm).

Par ailleurs il est nécessaire d'apporter un élément permettant d'établir la validité de nos mesures sur une surface limitée et de pouvoir étendre ce résultat à la majeure partie du support d'adhésion (hors zones d'entrée et de sortie du fluide ainsi qu'au voisinage des parois) : pour chaque expérience, la condition d'uniformité de la répartition des bactéries sur le support a été vérifiée, en balayant au préalable toute la surface du support d'adhésion et en s'assurant que les observations microscopiques présentaient un nombre équivalent de bactéries uniformément réparties sur toute la surface disponible. A partir de là, on a pu considérer que les résultats obtenus pour la zone limitée où ont été effectuées les mesures sont représentatifs de la majeure partie du support d'adhésion. Etant donné le nombre important de paramètres à explorer, et le soin nécessaire, coûteux en temps, pour réaliser une expérience d'adhésion/détachement, il n'a pas été possible de répéter systématiquement toutes les mesures de détachement. Néanmoins les résultats obtenus sont issus d'expériences réalisées avec la plus grande rigueur; le grand nombre d'expériences menées a permis d'accumuler suffisamment de données et nous avons basé notre interprétation en termes de fiabilité des mesures du point de vue statistique, par la comparaison logique de l'évolution du nombre de bactéries détachées en fonction de tel o bu tel paramètre.

II.2- Dispositif expérimental

Le système d'écoulement utilisé pour les expériences de détachement est constitué d'une pompe centrifuge à immersion (*Ehime Compact 600*) dont la gamme de débit va de 150 à 600 l/h, d'un débitmètre à flotteur (figure 5.2). La microcellule ne pouvant pas supporter des débits forts, nous avons réalisé un branchement en T pour faire recirculer l'excès de débit. La configuration est un circuit fermé afin d'engendrer un écoulement à débit constant sans variation de la charge hydraulique entre l'amont et l'aval de la chambre d'écoulement.

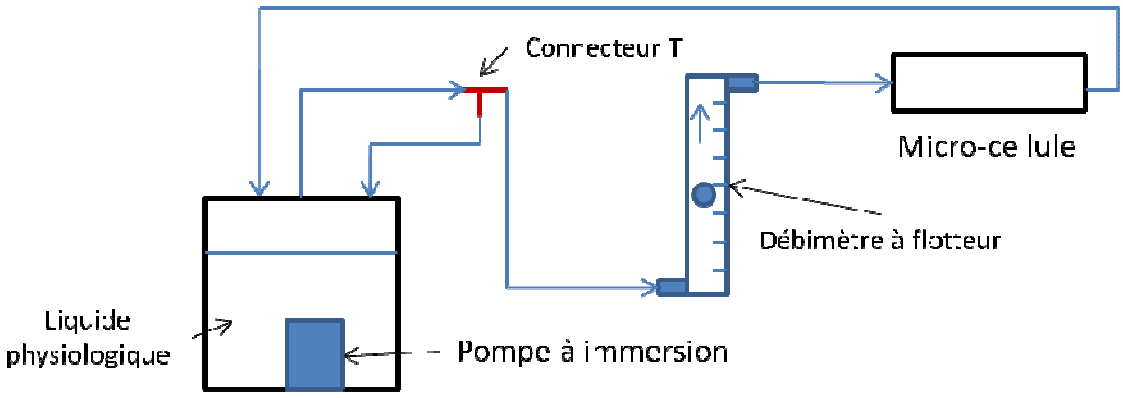


Figure 5.2 : circuit d'écoulement pour les expériences de détachement

Le support d'adhésion est une **lame en claire de vinyle** (Cf. chapitre 4). Elle est nettoyée à l'éthanol 70%, rincée à l'eau stérile et séchée sous hotte à flux laminaire. Nous expliquons ci-dessous les raisons qui ont motivé le choix de ce support d'adhésion à la place du support de verre :

- Résistance aux niveaux élevés de débit et donc de cisaillement pariétal : en effet la fragilité des lamelles de verre ne permet pas d'appliquer les niveaux de cisaillements requis pour étudier le détachement cellulaire sous écoulement ;

- Bonnes propriétés optiques : ces lames en claire de vinyle ont été conçues spécialement pour servir de lame de microscope ; elles possèdent un indice de réfraction proche des lamelles de verre ;

- Hydrophobicité : Les lames en claire de vinyle ont un angle de contact compris entre 60 et 80°, ce qui tend à amoindrir la force d'adhésion des bactéries *P. putida* à caractère hydrophile. Par rapport aux lamelles de verre très hydrophiles et pour lesquelles l'adhésion des bactéries *P. putida* est certainement plus forte. les résultats obtenus sur les lames en claire de vinyle peuvent être utilisés comme limite basse du détachement sur support en verre. En d'autres termes si un niveau de seuil de détachement est mis en évidence sur le support en clair de vinyle, ce niveau serra au moins inférieur à celui qui pourrait être mesuré sur un support en verre.

II.3- Protocole opératoire

Les paramètres dont on veut voir l'effet sur le détachement sont les suivants :

i) la force ionique et la valence des cations

La force ionique d'une solution que nous notons I est reliée à la concentration molaire de ces ions. Par exemple une molécule AB dans une telle solution s'ionise et donne les ions A^+ et B^- selon l'équation chimique suivante :

$$AB \rightarrow A^+ + B^-. \qquad \text{(Eq. 5.1)}$$

La force ionique de la solution AB est donnée par la relation suivante.

$$I_{AB} = \frac{Z_A^2 \cdot C_A + Z_B^2 \cdot C_B}{2} \qquad \text{(Eq. 5.2)}$$

Où Z_i et C_i sont respectivement la valence et la concentration molaire de l'ion i.

Ainsi par exemple, pour une solution de NaCl la force ionique est égale à la concentration molaire ; alors que pour une solution de $CaCl_2$, la force ionique est égale à 3 fois la concentration molaire.

ii) Le temps de contact initial Tc

L'influence de ce paramètre qu'on définit par la durée de séjour des bactéries en condition statique avant la mise en œuvre de l'écoulement est étudiée. Des expériences ont été menées avec des temps de contact initial différents et les cinétiques de détachement sont analysées et comparées. L'effet d'histoire est également étudié pour des expériences à des temps de contact initial différents mais en modifiant l'amplitude des premières sollicitations à la fin de ces temps de contact.

II.3.1- Conditions de préparation des suspensions bactériennes

Les suspensions bactériennes utilisées pour les expériences de détachement sont obtenues à partir de cultures libres préalablement incubées dans une étuve thermostatée (*LMS Cooled Incubators, La sources Ltd, Grande Bretagne*) à 27°C ; l'agitation de la culture est assuré par un barreau aimanté entraîné par un agitateur magnétique. L'oxygénation a été assurée par l'agitation préalable du milieu de culture sous la hotte à flux laminaire ; cette agitation du flacon ouvert permet la diffusion de l'oxygène dans le milieu jusqu'à saturation (Cs = 6,2 ± 0.1 mg/l).

Pour toutes les expériences, les suspensions ont été prélevées dans la phase stationnaire (au bout de 16h) de croissance des bactéries, afin d'obtenir pour la biomasse de tous les échantillons les mêmes propriétés bio-physico-chimiques.

Ces suspensions cellulaires sont ensuite centrifugées à 8000 tours/min pendant 10 min pour faire sédimenter les cellules au fond du tube et former ainsi un culot, puis remises en suspension dans une solution ionique. Cette solution est de même nature ionique que le fluide utilisé pour appliquer des contraintes de cisaillement dans la chambre d'écoulement.

Pour chaque expérience de détachement la procédure de nettoyage et d'assemblage du système d'écoulement est identique :

- Assemblage ;
- Décontamination par circulation d'éthanol à 70 % ;
- Rinçage du système par circulation d'eau stérilisée ;
- Remplissage de tout le système, chambre d'écoulement comprise : cette dernière est ensuite montée sur la platine du microscope, support d'adhésion tourné vers le bas au-dessus de l'objectif du microscope inversé.

Ensuite la suspension bactérienne préalablement préparée est injectée dans la chambre par l'intermédiaire du canal d'injection, puis le système est fermé immédiatement et laissé au repos. A l'issue d'une durée fixée de 10 minutes, nécessaire à l'adhésion initiale des bactéries en conditions statiques, l'écoulement est amorcé en circuit ouvert pendant 5 min pour permettre l'évacuation des cellules non adhérées, mais avec un débit assez faible (102 µl/min) pour ne pas détacher celles qui sont déjà adhérées. A la fin de cette première phase commence la période d'attente qu'on a appelé temps de contact initial Tc. A la fin de ce temps Tc, une photographie de la surface d'adhésion est prise et le nombre de bactéries à cet instant est appelé No. Ensuite

l'écoulement est amorcé et deux types de procédure de variation de débit (ou de cisaillement) ont été mises en œuvre.

i) Première procédure : un cisaillement constant pendant toute l'expérience

Un cisaillement constant est appliqué durant tout le suivi du détachement (Fig. 5.3). Des photos sont prises à des instants successifs afin d'obtenir le nombre N(t) de bactéries restant adhérées pour analyser la cinétique de détachement.

ii) Deuxième procédure : un cisaillement croissant par paliers de durées égales

Pour cette procédure principale, l'augmentation des contraintes de cisaillement en fonction du temps est schématisée sur la figure 5.4. Les paliers durent chacun 3 minutes. A l'issue de chaque palier la surface d'adhésion est photographiée afin d'obtenir le nombre N(t) de bactéries restant adhérées.

II.3.2- Méthode d'énumération de la population bactérienne adhérée

Pour la méthode d'énumération, on énumère de façon manuelle bactérie par bactérie jusqu'à atteindre le nombre de 25 qu'on définit comme une séquence. Puis on réitère ce comptage autant de fois que nécessaire pour couvrir toute la surface d'observation. A la fin on additionne le nombre de séquences de 25 et le dernier lot pour avoir le total N(t) de bactéries adhérées sur la zone photographiée. Cette méthode de comptage s'est avérée la plus rigoureuse et générait une erreur minimale. Si un doute était suspecté on a systématiquement répété le comptage.

II.3.3- Estimation de la précision des résultats issus du comptage

Soit $A = \frac{N}{No}$ la proportion de bactéries adhérées à un instant t par rapport au nombre No initialement adhérées.

Alors, $\frac{dA}{A} = \frac{dN}{N} - \frac{dNo}{No}$, d'où l'incertitude $\frac{\Delta A}{A} = \frac{\Delta N}{N} + \frac{\Delta No}{No}$ (Eq. 5.3).

Sur 100 bactéries, on a supposé qu'il peut y avoir une erreur de ± 1 bactérie; donc $\frac{\Delta N}{N} = \frac{\Delta No}{No} = 2\%$. La précision exprimée en pourcentage est alors $\frac{\Delta A}{A} = 4\%$ et correspond à l'étendue des barres d'erreurs.

II.4- Résultats

II.4.1- Effet de la contrainte hydrodynamique sur la cinétique de détachement

L'expérience consiste à appliquer un écoulement cisaillé dans la chambre d'écoulement, soumettant ainsi les particules adhérées sur le support d'adhésion à une force de cisaillement susceptible de provoquer leur détachement. Il est à noter que l'âge des cellules n'a pas affecté la validité de nos mesures dans la mesure où toutes les suspensions étudiées ont été prélevées de leur milieu de croissance dans la phase stationnaire pour un temps de mise en culture de 16h.

II.4.1.1- Suivi du détachement pour un palier de cisaillement constant

La figure 5.4 montre la variation de la proportion de cellules adhérées par rapport au nombre No de cellules adhérées initialement en fonction du temps pour 3 expériences de détachement

pendant lesquelles la contrainte pariétale de cisaillement reste constante : Tw_1 = 9,3 Pa, Tw_2 = 19,6 Pa ; Tw_3 = 24,3 Pa.

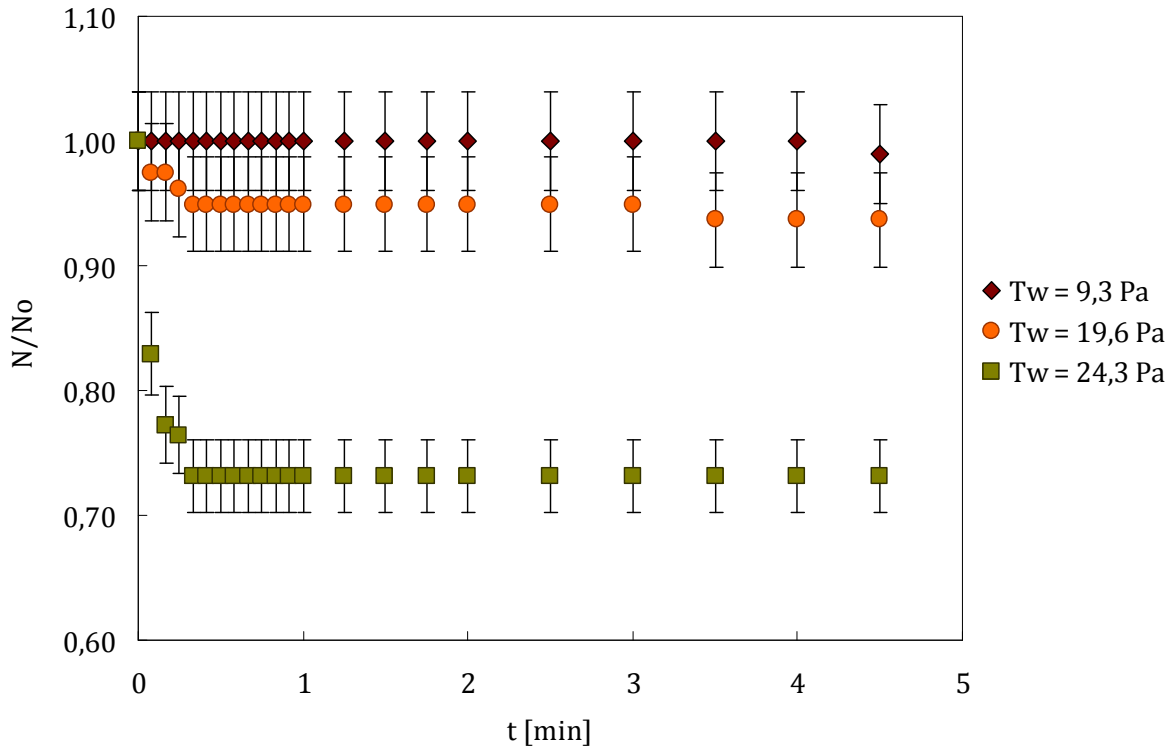


Figure 5.3 : Evolution de N/No (proportion de cellules adhérées rapporté au nombre de cellules initialement adhérées N0. N0=96, 79 et 123 respectivement pour Tw=9,3 Pa, 19.6 Pa et 24,3 Pa) en fonction de la contrainte pariétale appliquée ; pour des cellules suspendues dans du NaCl à 15 mM. Le premier cisaillement est appliqué après un Tc de 10 min sur support en claire de vinyle optique. Température = 24 +/- 1°C.

N/No chute brutalement au début de l'expérience (entre 0 et 20 s) puis se stabilise jusqu'à la fin de l'expérience qui dure 4 min 30 s. Pour des expériences de cette durée on pourra donc considérer qu'un régime permanent est atteint et que la valeur de N/No est bien représentative de la condition de cisaillement appliquée. Lors des expériences effectuées par la procédure par palier présentées ci-dessous, ceci nous permet de justifier l'utilisation de palier d'une durée de 3 minutes chacun. En effet à amplitude de cisaillement croissante on peut raisonnablement supposer que la cinétique de détachement soit de plus en plus rapide. La mise en évidence de la stabilisation du détachement obtenue ici pour les amplitudes de cisaillement les plus faibles explorées de 9,3 à 24,3 Pa, devrait être valable aussi pour les amplitudes de cisaillement supérieures lors d'un palier d'une durée de 3 minutes.

Le résultat présenté sur la figure 5.3 montre qu'à amplitude de cisaillement croissant, la valeur finale de N/No diminue. L'augmentation du cisaillement entraîne de manière logique un plus fort détachement des bactéries de leur support.

II.4.1.2- Suivi du détachement pour des cisaillements croissants par palier

La durée des paliers est fixée à 3 minutes sur la base du temps de stabilisation trouvé lors de la procédure de cisaillement constant (paragraphe 4.1.1).

La mesure de la cinétique consiste à énumérer le nombre de cellules restants adhérées N(t) à la fin de chaque palier de cisaillement, puis à calculer le rapport entre N(t) et No (nombre de cellules initialement adhérées). Pour cette procédure d'écoulement, on représente sur un même graphique la variation en fonction du temps de N(t)/No et de la contrainte de cisaillement pariétale Tw.

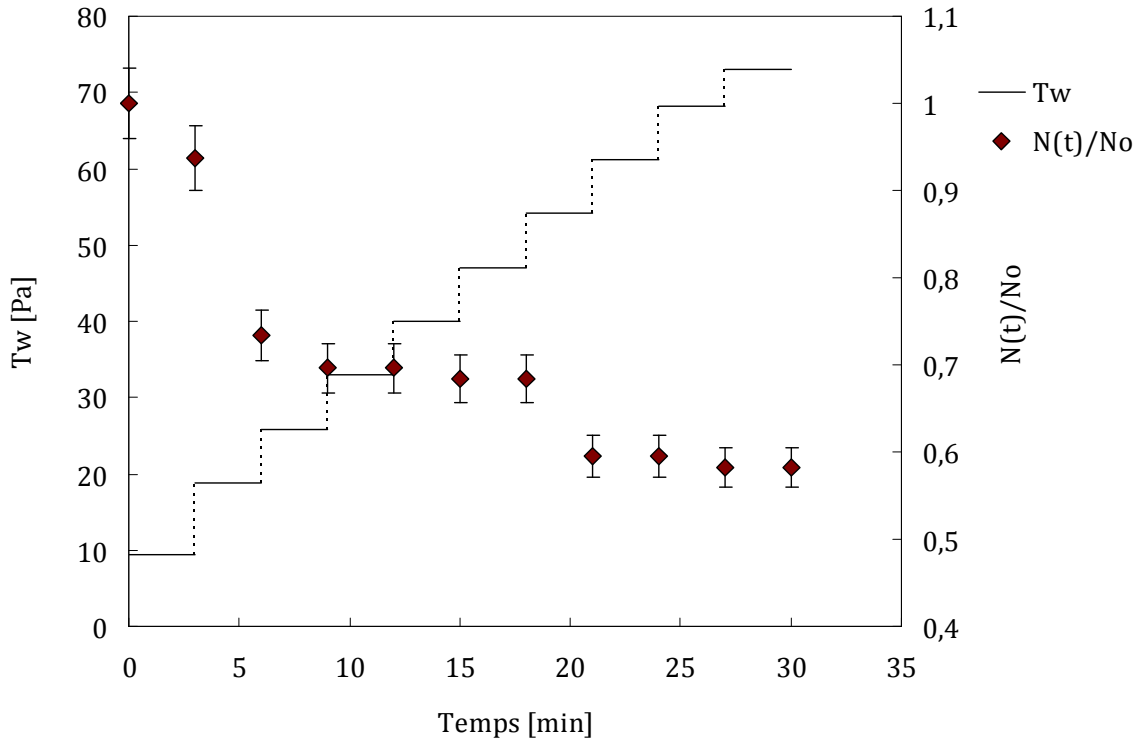


Figure 5.4 : Evolution de N/No (proportion de cellules adhérées rapportée au nombre de cellules initialement adhérées N0. N0 = 79) en fonction de la contrainte pariétale appliquée ; pour des cellules suspendues dans du NaCl à 0.15 mM. Le premier cisaillement est appliqué après un Tc de 45min sur support en claire de vinyle optique. Température = 24 +/- 1°C.

La figure 5.4 montre que l'écoulement cisaillé entraîne un détachement des cellules, et que ce détachement est favorisé par l'augmentation du débit d'écoulement ou de la contrainte pariétale

correspondante. Les photographies représentées à la figure 5.5 illustrent l'existence du processus de détachement. On y observe les photographies prises à l'issu de l'application des contraintes 32,9 et 40 et 46,1 Pa.

II.4.2- Effet du temps de contact initial et des conditions physico-chimiques

Bien que la force de cisaillement soit le facteur moteur des processus de détachement cellulaire, nous allons voir que le détachement est réellement influencé par les conditions physico-chimiques et par le temps de contact initial. En particulier nous montrons que le temps de contact initial sur la paroi d'adhésion joue un rôle important dans l'adhésion à cause de mécanismes biologiques mis en œuvre par la biomasse attachée. Le rôle de la salinité du fluide en écoulement (force ionique, nature ionique) dans le mécanisme de détachement est également analysé.

II.4.2.1- Influence du temps de contact

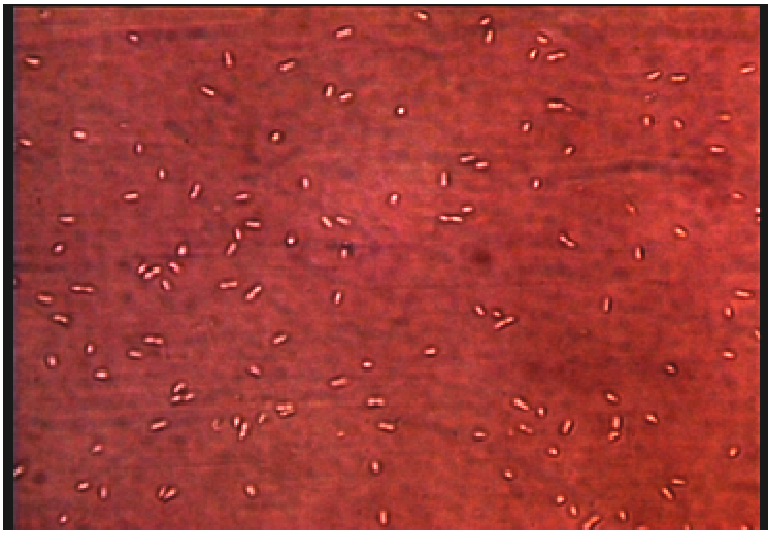
Pour cette étude, deux suspensions cellulaires sont préparées dans les mêmes conditions de salinité mais à des temps de contact initial différents. La variation de N/No en fonction de la contrainte appliquée est représentée à la figure 5.6 lors d'une procédure à cisaillement croissant par palier. Pour une procédure identique en terme de sollicitation sous cisaillement (durée des paliers et niveaux d'intensité du cisaillement) le taux de particules restant adhérées est plus élevé pour le temps de contact Tc = 30 min que pour le temps de contact Tc = 15 min. Un autre point important mis en évidence dans le résultat présenté en figure 5.6 est qu'il existe une contrainte critique correspondant à un seuil, au-delà de laquelle le taux de détachement augmente fortement. Il est de plus intéressant de noter que ce seuil de contrainte augmente avec le temps de contact (Tw_s = 45 Pa pour un Tc de 15 min et Tw_s = 54 Pa pour un Tc = 30 min).

Ces résultats montrent que la force d'adhésion est plus élevée à temps de contact initial plus long. Cet effet a déjà été mis en évidence sur des levures par Mercier-Bonin et *al.* (2004) puis par Castelain *et al.* (2007). Ce résultat est souvent interprété par l'existence d'un métabolisme cellulaire survenant lorsque les cellules sont en contact avec la surface. Il est ainsi admis que pendant le contact sur la paroi d'adhésion, les cellules vont sécréter des adhésines qui

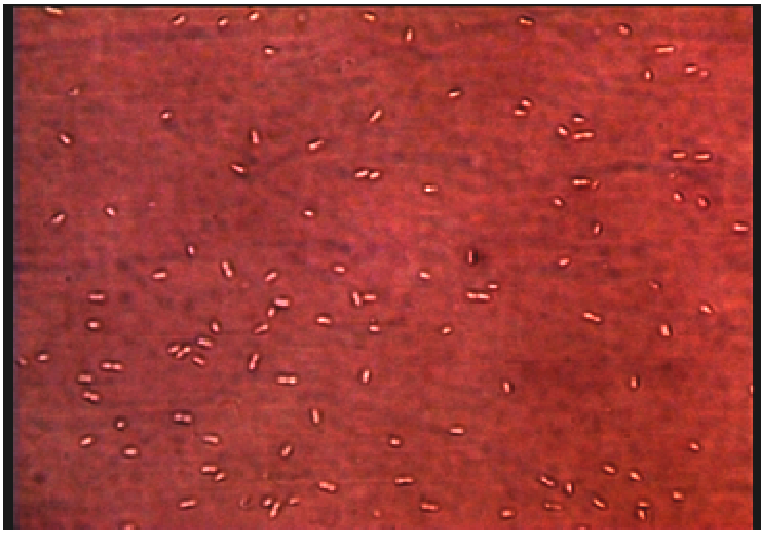
renforcent l'adhésion cellulaire en limitant les effets de répulsion près de la surface. Ces polymères servent ainsi de "ponts adhésifs" entre les bactéries (Reynolds et Fink, 2001) et le support (Marshall *et al.,* 1992).

Néanmoins l'interprétation de cette dépendance temporelle à partir de la production de polymères reste encore sujette à discussion puisque le milieu n'est constitué que d'eau et de NaCl à 15 mM, donc pas vraiment riche en nutriments.

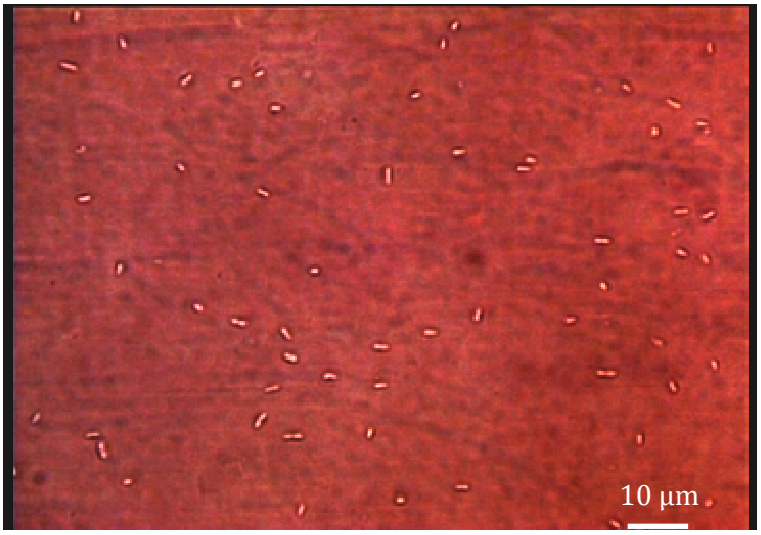
De façon générale, le mécanisme d'adhésion ne dépend pas uniquement du microorganisme ou du type de support, mais comme l'ont suggéré Mercier-Bonin *et al.* (2004), du couple microorganisme-support dans son environnement, c'est à dire de l'effet de la force ionique ou du temps de contact sur l'adhésion et des évolutions des interactions du type hydrophile/hydrophile, ou hydrophile/hydrophobe, entre le support et les bactéries.



9-12 min; 32,9 Pa



12-15 min; 40 Pa



15-18 min; 46,1 Pa

Figure 5.5 : Images montrant l'évolution du détachement de cellules de *P. putida* adhérées sur un support en claire de vinyle optique ; pour des cellules suspendues dans du NaCl à 0,15 mM. Cisaillement après un Tc de 45 min. Température = 24 +/- 1°C.

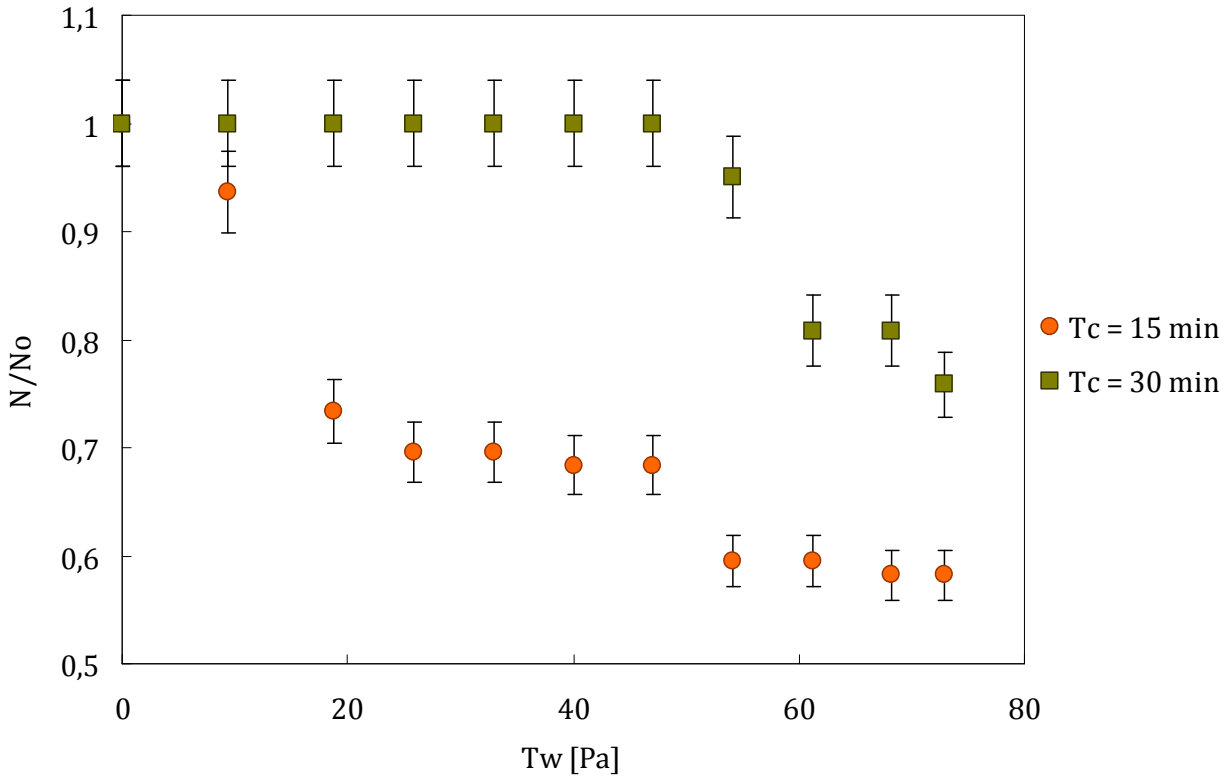


Figure 5.6 : Influence du temps de contact initial sur le taux de détachement cellulaire - Evolution de N/No (N0=79 pour Tc = 15 min, N0 = 120 pour Tc = 30 min) en fonction de la contrainte pariétale appliquée pour des cellules suspendues dans du NaCl à 15 mM; pour deux temps de contact différents. Température = 24 +/- 1°C .

II-4.2.2. Influence de l'histoire du cisaillement sur la cinétique de détachement

Une autre approche expérimentale pour étudier les effets couplés du temps de contact et de la contrainte hydrodynamique est le suivi de « l'histoire » du cisaillement. Pour ce faire, on a préparé comme auparavant les suspensions avec les mêmes conditions de salinité. En plus de la différence de temps de contact initial, la procédure d'incrémentation des contraintes appliquées est aussi différente pour les deux expériences présentées :

- Pour l'expérience 1, le temps de contact initial est de 42 minutes, puis on procède à une augmentation graduelle de Tw en partant de 0,25 Pa jusqu'à 16,7 Pa.

- Expérience 2 : le temps de contact initial est de 84 minutes, puis on applique une contrainte pariétale initiale élevée de 9,5 Pa suivie d'une augmentation graduelle de Tw jusqu'à 16,7 Pa.

Les paliers de cisaillement durent chacun 4 minutes et sur la figure 5.7, la cinétique de diminution de la proportion des cellules adhérentes N(t)/No est associée à l'augmentation de Tw, et ce pour les deux expériences. Ce graphe décrit globalement la chronologie des phénomènes mis en œuvre et met bien en évidence l'influence de la contrainte hydrodynamique sur le détachement.

(i) On peut faire une analyse globale de la cinétique de détachement et tirer des éléments de comparaison entre les deux expériences :

- Expérience 1 avec Tc = 42 min, N/No_final = 0,04 correspondant à un détachement total de 96 %.

- Expérience 2 avec Tc = 84 min, N/No_final de 0,83, c'est-à-dire 17 % de détachement total.

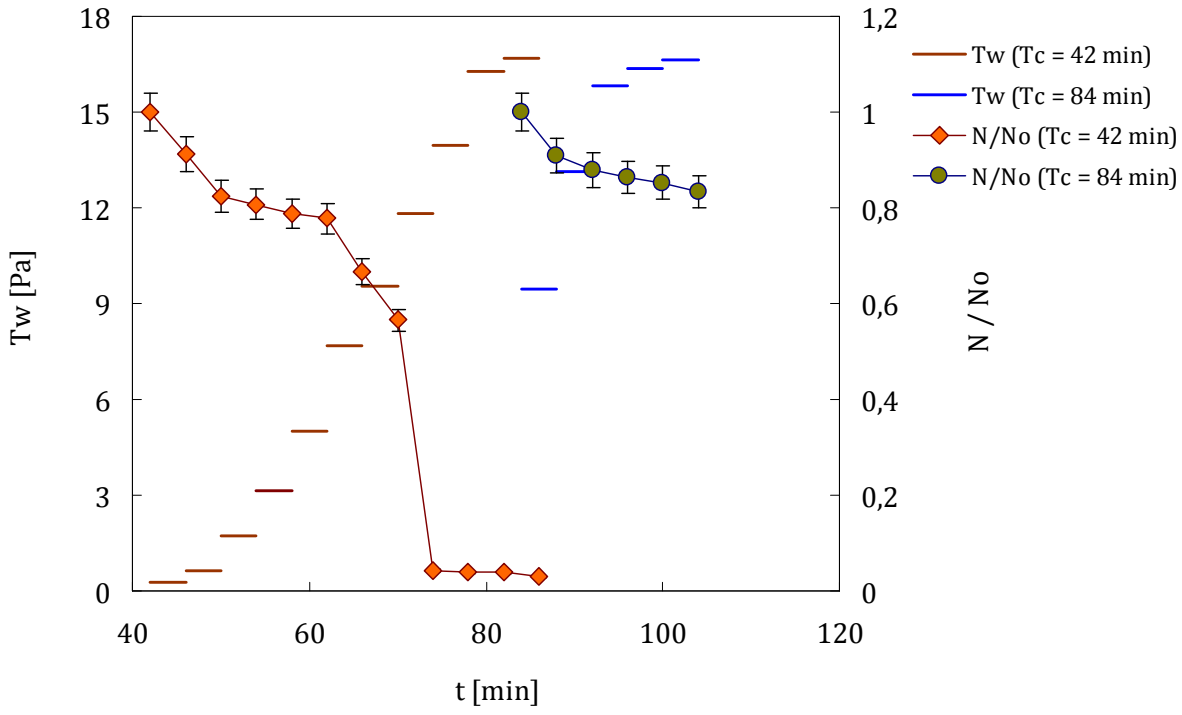


Figure 5.7 : Influence du temps de contact initial et de l'effet d'histoire du cisaillement sur le taux de détachement cellulaire - Evolution de N/No et de Tw en fonction du temps à différents temps de contact;. Expérience 1 : Tc = 42 min, No = 306, avec augmentation graduelle à partir de 0,25 Pa ; Expérience 2 : Tc = 84 min, No = 264, avec application brusque d'un cisaillement de 9,50 Pa suivi d'une augmentation graduelle de Tw .CaCl2 à 50 mM; Température = 24 +/- 1 °C

Ces résultats mettent en évidence à nouveau une intensification de la cinétique de détachement en fonction du temps. Cela vient confirmer le résultat du paragraphe 4.2.1 (fig. 5.8).

(ii) Pour l'expérience 1, N/No atteint son minimum (N/No_final = 0,04 à Tw = 14 Pa) ; ce minimum se prolonge de 74 et 86 min malgré l'augmentation de Tw entre 14 et 16,7 Pa.

(iii) Pour aller plus finement dans la comparaison on représente N/No en fonction de Tw, ce qui permet d'analyser ce qui se passe point par point pour les deux expériences (fig. 5.8).

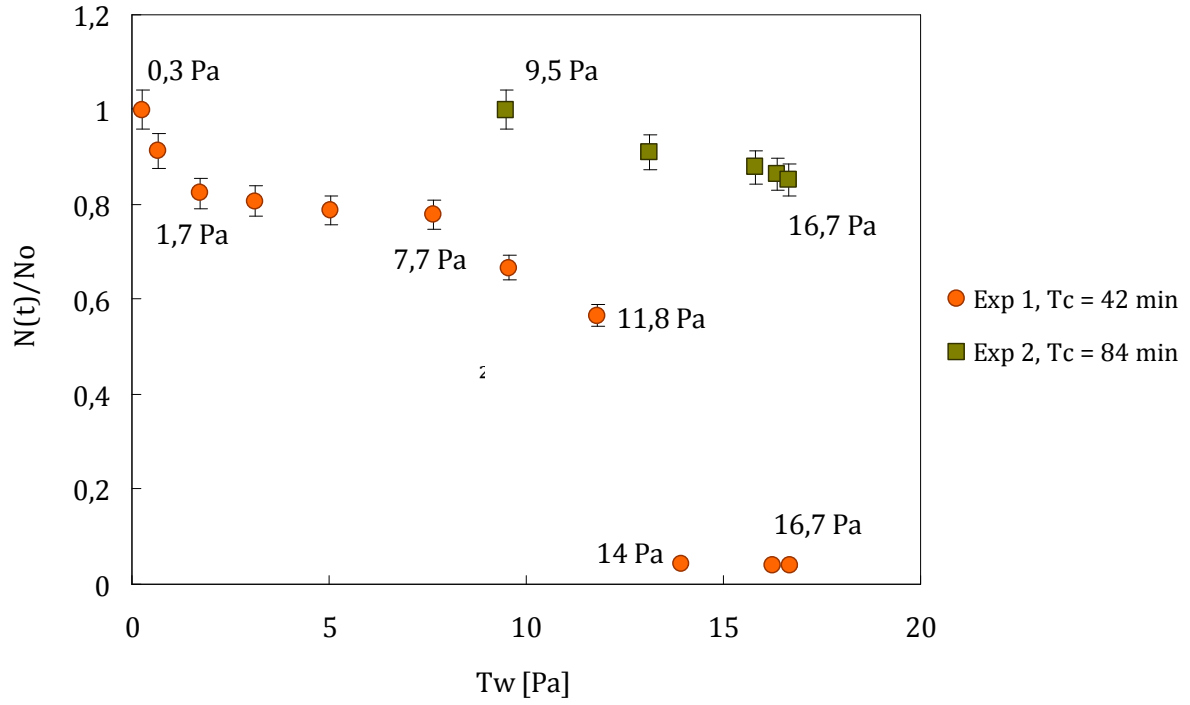


Figure 5.8 : Influence du temps de contact initial et de l'effet d'histoire sur le taux de détachement cellulaire - Evolution de N/No en fonction de la contrainte pariétale appliquée ; pour deux temps de contact différents; Tc = 42 min, No = 306, : Tc = 84 min, No = 264, CaCl2 à 50 mM; Température = 24 +/- 1 °C.

Pour l'expérience 1, on a un détachement rapide au début (entre 0,3 et 1,7 Pa), suivi d'un détachement globalement lent jusqu'à 11,8 Pa. Puis à partir de 11,8 Pa on constate à nouveau une chute brusque jusqu'à 14 Pa, qui atteint finalement un plateau. Ce dernier correspondant au minimum de N(t)/No, et se prolonge jusqu'à Tw = 16,7 Pa.

Pour l'expérience 2, on applique initialement une contrainte de 9,5 Pa. Avec l'augmentation successive des paliers de cisaillement on constate une diminution de N(t)/No qui est quasi-linéaire de 9,5 Pa à 16,7 Pa avec une pente relativement faible.

Ce résultat montre bien que la force d'adhésion est plus élevée pour le temps Tc de contact de 84 min, par rapport à Tc = 42 min dans la gamme de contrainte comprise entre 9,5 et 16,7 Pa.

Ces résultats mettent en évidence le rôle important joué par le temps de contact initial sur les mécanismes de détachement cellulaire. En effet, nous avons montré que des cellules adhérées sur des temps de contact longs étaient capables de résister à des contraintes de cisaillement plus élevées que celles attachées à des temps de contact nettement inférieurs. Le temps de contact est donc un des paramètres influençant fortement le taux de détachement.

On a mis en évidence également que les courbes de détachement démarrent par un détachement rapide (chute rapide de N/No), suivi d'un état stable (N(t) quasi-constant) ; puis lorsque Tw dépasse un certain seuil de contrainte, un second phénomène de détachement rapide intervient. Ceci met en évidence le caractère discontinu du détachement qui s'opère de façon discontinue au voisinage d'une contrainte seuil.

II.4.2.3- Influence de la nature ionique du fluide en écoulement

L'influence de la force ionique et de la valence des cations de la phase aqueuse a été analysée dans cette expérience de détachement. Nous mettons ici en évidence l'influence de la force ionique et du type d'ion sur la cinétique de détachement induit par écoulement cisaillé et donc sur la capacité d'adhésion bactérienne sur le support solide. La contrainte de cisaillement est appliquée selon la procédure principale : augmentation du débit (et donc de l'amplitude de Tw) par palier.

Pour l'étude de la force ionique, deux expériences de détachement ont été menées dans les mêmes conditions opératoires mais avec des forces ioniques différentes : I_1 ($CaCl_2$) = 10 mM, et I_2 ($CaCl_2$) = 50 mM. La figure 5.9 montre l'évolution de la proportion de cellules restant adhérées en fonction du temps.

Pour la force ionique de 10 mM, il reste à la fin de l'expérience 10 % des bactéries initialement adhérées, soit 90 % de détachement au final. Pour la même expérience avec une force ionique de 50 mM on assiste à une diminution du pourcentage de cellules détachées (66 %). Cela signifie que pour les forces ioniques plus élevées, le détachement est réduit. De façon similaire, on met en évidence l'influence de la valence des cations en solutions en comparant la cinétique de détachement de deux expériences à mêmes conditions opératoires mais à valence différente pour les cations en solutions : NaCl à 50 mM et $CaCl_2$ à 50 mM. On remarque (figure 5.10) que lorsque la valence de l'ion est plus faible, le détachement résultant est augmenté.

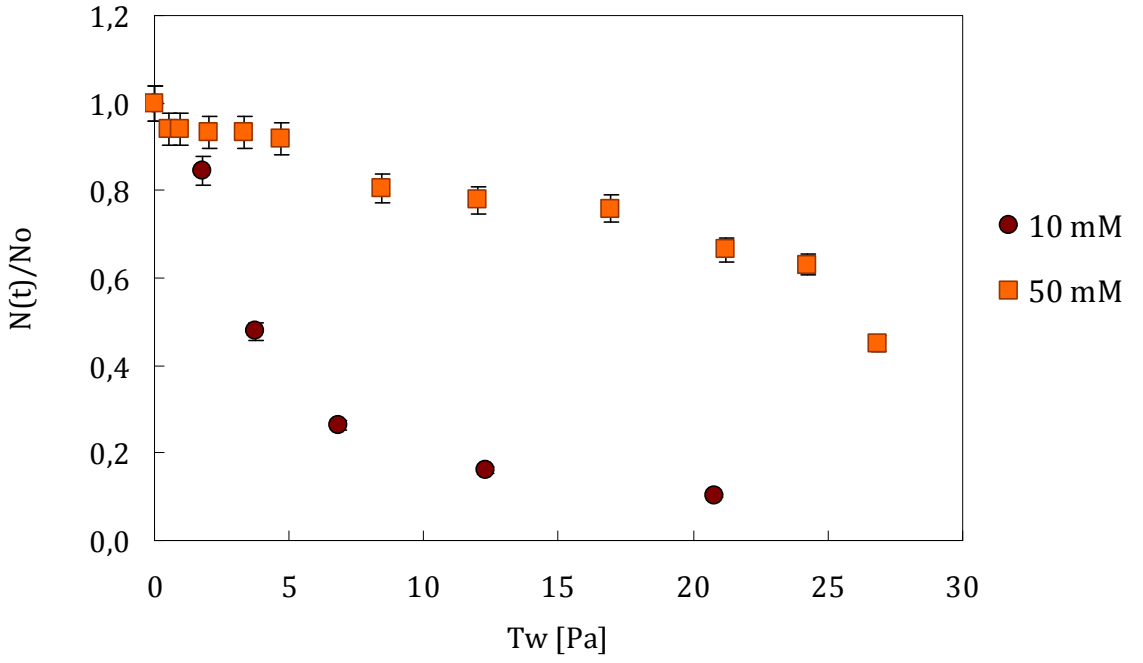


Figure 5.9 : Influence de la force ionique sur le taux de détachement ; Evolution de N/No en fonction de la contrainte pariétale appliquée ; pour 2 solutions salines de $CaCl_2$ de forces ioniques I1 = 10 mM (No = 136) et I2 = 50 mM (No = 149); support d'adhésion en claire de vinyle optique ; Température = 24 +/- 1°C ; Tc = 30 min.

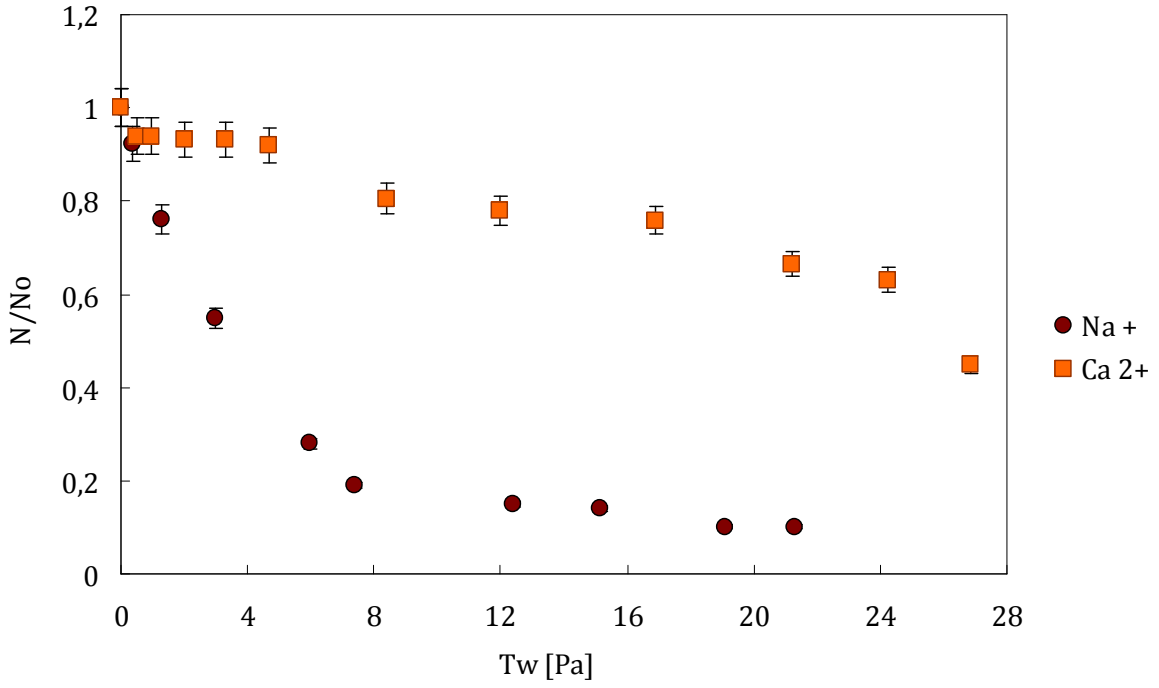


Figure 5.10 : Influence du type d'ion sur le taux de détachement ; Evolution de N/No en fonction de la contrainte pariétale appliquée ; pour deux solutions salines de NaCl (No = 149) CaCl2 (No = 179) et de de même force ionique I = 50 mM; support d'adhésion en claire de vinyle optique ; Température = 24+/- 1°C, Tc = 30 min.

II.5- Discussion

Le détachement de cellules de *P. putida* induit par un écoulement de cisaillement, sur un support en claire de vinyle, a été étudié. Une chambre d'écoulement cisaillé adaptée à la microscopie optique a permis d'effectuer des observations à l'échelle locale de l'ordre du micromètre et des zones d'observation de l'ordre de la centaine de μm^2. L'homogénéité spatiale des organisations bactériennes a été validée sur la majeure partie de la surface totale du support d'adhésion. La cohérence des résultats obtenus vis-à-vis des différents paramètres d'étude, conforte les tendances observées malgré une non-répétabilité systématique des mesures effectuées. L'influence des différents paramètres explorés sont analysés ci-dessous et confrontés aux résultats de la littérature.

Un des résultats marquants de cette partie est d'avoir mis en évidence l'importance du **temps de contact initial** sur le taux de détachement. De manière plus générale ce taux de détachement est fortement dépendant des effets d'histoire, dus aux différentes conditions de cisaillement imposées au cours du temps (temps de contact bactérie-support à cisaillement nul, type de protocole d'application du cisaillement : constant au cours du temps ou cisaillement croissant par paliers de 3 minutes).

L'ensemble des résultats obtenus tendent à montrer que plus ce temps de contact initial est long, plus le taux de détachement est réduit lors de l'application d'un cisaillement, et ceci quel que soit le type de sollicitation (continu au cours du temps ou croissant par palier). Ce résultat est en accord avec des levures de *S. cerevisiae* (Mercier-Bonin *et al.*, 2004 ; Castelain *et al.*, 2007) qui ont montré que la force d'adhésion de levures croît avec l'allongement du temps de contact et ceci qu'elles soient de nature hydrophile ou hydrophobe.

Un des moteurs principaux de cet effet d'augmentation de l'adhésion au cours du temps de contact peut être attribué à la production de substances extracellulaires telles que des EPS, des protéines, de l'ADN extracellulaire, etc. Durant ce temps de contact, la production de certaines de ces macromolécules dans le milieu extracellulaire entraîne la formation d'un film de conditionnement favorable à l'adhésion bactérienne. Ce film de conditionnement augmente en épaisseur dans le temps, jouant ainsi un rôle de barrière et agissant ainsi sur les effets dus aux interactions non-spécifiques de type van-der Waals et aux interactions acido-basiques de Lewis, l'équilibre de ces deux types d'interaction contrôlant principalement selon Guillemot *et al.* (2006) le mécanisme d'adhésion cellulaire.

De façon générale, le mécanisme d'adhésion ne dépend pas uniquement du microorganisme ou du type de support, mais comme l'on suggéré Mercier-Bonin *et al.* (2004), du couple microorganisme-support dans son environnement.

Guillemot *et al.* (2007) ont noté l'importance jouée par la présence de **protéines** extracellulaires sur le mécanisme d'adhésion sur surface en mettant en évidence l'influence qu'ils exercent sur les propriétés physico-chimiques du support d'adhésion, notamment en augmentant l'hydrophobie. Cette augmentation d'hydrophobie, selon plusieurs auteurs rend l'adhésion plus forte quel que soit pour le microorganisme ou le support. Par exemple, Power *et al.* (2007) ont montré que la capacité d'adhésion de bactéries *P. putida* augmente lorsqu'on augmente l'hydrophobie du support et des bactéries. De même, pour Faille *et al.* (2002) qui ont étudié l'adhésion de spores et de cellules d'*E. coli* sur des surfaces inertes, l'hydrophobie de surface joue un grand rôle. En effet leurs travaux ont montré que la force de détachement de spores de *B. cereus* et de *B. subtilis* est plus forte sur les matériaux hydrophobes. Cette force est aussi plus importante pour *B. cereus* hydrophobe que pour *B. subtilis* hydrophile.

Theerthankar *et al.* (2010) ont mené des expériences concernant la production d'ADN extracellulaire et ont montré qu'elle joue un rôle importance sur l'adhésion bactérienne sur surface en favorisant les interactions acido-basiques**.** Cette production de macromolécules extracellulaires est elle-même liée à des processus microbiologiques non explorés dans le cadre de cette thèse.

Ce qui est certain, c'est que pendant la phase d'adhésion initiale le passage d'une bactérie de l'état planctonique à l'état sessile s'accompagne de nombreux processus (de natures biologique, chimique et physique) qui altèrent son génotype et son phénotype et lui permettent de s'adapter à l'environnement au voisinage d'une surface. Ces processus varient d'un micro-organisme à l'autre (Mc. Carter, 1999) et leur déclenchement en regard des conditions environnementales (en particulier hydrodynamique) reste un champ d'investigation encore largement ouvert.

La charge de surface des cellules est également susceptible de jouer aussi un rôle dans l'adhésion. Les mesures de potentiel zêta que nous avons effectuées indiquent un caractère donneur d'électrons pour les cellules bactériennes de *P. putida*. Ceci est en accord avec les travaux de Rochex *et al.* (2002) qui en plus, comme Power *et al.* (2007) ont mis en évidence un caractère hydrophile pour *P. putida*. Ces propriétés de *P. putida* indiquent une influence de la charge sur l'adhésion puisque van Loosdrecht *et al.* (1987) ont démontré que l'influence de la charge de surface sur les phénomènes d'adhésion est plus importante pour les cellules hydrophiles que pour les cellules hydrophobes.

Par ailleurs, une autre question qui peut être soulevée est de savoir dans quelle mesure la **concentration en nutriments** pourrait-elle affecter la force d'adhésion ? Selon Marshall *et al.*

(1992), l'adhésion irréversible, tout en étant dépendant du temps serait inhibée par la présence de glucose à forte teneur. Ces effets d'histoire ne sont en général pas pris en compte dans les modèles à notre connaissance. Par exemple, (Décavé et al, 2002) ont modélisé le détachement de cellules par une loi du premier ordre caractérisée par une constante cinétique k (t^{-1}) qui dépend de la contrainte appliquée mais qui est indépendante du temps de contact. Nos résultats montrent que cela n'est pas forcément suffisant en toute rigueur. Etant donné le peu nutriments présents en suspension, nous proposons que s'il y a production de substances polymériques, celle-ci serait due à une sécrétion à partir de la membrane cellulaire pour résister à la contrainte hydrodynamique et non par synthèse organique à partir de nutriments. Des analyses quantitatives biochimiques ou l'utilisation de marqueurs fluorescents adaptés permettraient de confirmer ou infirmer cette hypothèse.

Un autre point important mis en évidence **est la diminution du taux de détachement à force ionique croissante et valence de l'ion croissante**. Cette augmentation de la capacité d'adhésion à force ionique et valence des cations croissants peut s'expliquer par la réduction de la répulsion électrostatique entre le support et la paroi cellulaire, tous deux chargés négativement. Cette réduction de la double-couche est plus marquée pour les ions Ca^{2+} que pour les ions Na^{+} monovalents. Ces résultats concordent avec d'autres résultats de recherche, comme ceux de van Loosdrecht *et al.* (1987), Ducker *et al.* (1991), Simoni *et al.* (2000). L'addition de cations Ca^{2+} tend, selon Christendat *et al.* (2005), à mettre en œuvre des interactions de type liaisons hydrogène qui ont pour conséquence de provoquer une adhésion plus forte entre surfaces.

Enfin la mise en évidence de l'existence d'un seuil de contrainte qu'il faut franchir pour enclencher un détachement supplémentaire après stabilisation de la cinétique, est une information éventuellement importante dans les applications qui nous concernent directement, en particulier la modélisation de la phase initiale de la colonisation d'un biofiltre. Comme nous l'avons montré dans l'analyse bibliographique (chapitre 2), certains modèles (Brovelli, 2009, Kildsgaard et al, 2001) considèrent des lois (i) indépendantes de la phase de maturation du biofilm (ii) qui induisent une cinétique de détachement qui augmente de manière continue avec le cisaillement. Or, si les effets de seuils sont maintenant bien connus pour les biofilms « matures » (phénomène de sloughing), nous mettons en évidence ces effets dès la phase d'adhésion. Notons que la nature des supports utilisés (qui se devaient d'être transparents pour des contraintes d'observabilité) nous donne des contraintes nécessaires au détachement largement supérieures aux conditions opératoires dans les biofiltres. Il est difficile d'extrapoler plus loin étant donné le manque de connaissance que nous avons actuellement sur la nature physico-chimique des surfaces des supports industriels.

Sur la base de nos résultats expérimentaux, des travaux futurs devront définir de manière plus systématique comment évolue la contrainte de cisaillement critique avec le temps de contact, ou comment évolue le taux de détachement, à contrainte fixée, avec la durée du temps de contact initial, pour des conditions physico-chimiques de surfaces données. Ces données expérimentales supplémentaires permettront d'améliorer la modélisation des conditions initiales de colonisation des biofiltres. En effet des cellules en suspension et entraînées par un écoulement à travers un milieu poreux ont une probabilité de se déposer sur le matériau granulaire, qui dépend des conditions physico-chimiques du milieu et du temps. En outre une fois le contact bactérie-support effectué, la probabilité que la bactérie reste accrochée est aussi dépendante de ces facteurs (Kim, 2005) : si, selon la nature des surfaces des supports industriels, le détachement peut apparaître pour des conditions de cisaillement plus faibles que dans nos expériences, en particulier sur les premiers instants de mise en contact, le terme d'efficacité de collision utilisé dans certains modèles (terme $\eta\alpha$ dans les modèles de Brovelli, 2009 et Kildsgaard et al, 2001) devrait intégrer ces effets de seuils qui sont liés au temps de contact. Cette étude permettrait aussi de valider ou d'invalider certains partis pris d'autres modèles (comme le modèle de Kapellos *et al.* (2007) cité dans le chapitre bibliographique) où seule la probabilité de contact η est prise en compte. Une autre des limites de notre approche expérimentale est la difficulté d'étendre les expériences à la **mesure directe des forces d'adhésion** sur les supports solides. En effet la forme non sphérique et le manque d'information sur la rigidité de la bactérie *P. putida* ne permettent pas d'appliquer les équations relevant des écoulements diphasiques pour calculer avec précision la force hydrodynamique qui s'exerce localement sur sa surface. Cela rend difficile de lier ou de comparer nos résultats avec les modèles théoriques existants en raison du fait que ces modèles s'appliquent sur des objets rigides et de forme sphérique (Lorthois *et al.*, 2001; Guillemot *et al.*, 2007; Mercier-Bonin *et al.*, 2009; Mercier-Bonin *et al.*, 2011).

C'est pour cela que notre travail s'est uniquement focalisé sur la comparaison des cinétiques de détachement induit par cisaillement sous l'effet de facteurs liés aux surfaces, aux conditions environnementales et au temps.

II.6- Conclusion

Nos expériences de détachement ont permis de caractériser les propriétés d'adhésion de bactéries de *P. putida* sur une lame en claire de vinyle optique et soumise à une contrainte de cisaillement.

- Il a été mis en évidence que l'augmentation du temps de contact initial favorise l'adhésion cellulaire.

- Le caractère discret du détachement a aussi été mis en évidence : le détachement a lieu lorsqu'un seuil de contrainte est atteint. Ce seuil est caractérisé par une augmentation marquée de la vitesse de détachement de la quantité de cellules détachées.

- Il a été mis en évidence que l'adhésion des cellules bactériennes augmente à force ionique croissante.

- La valence supérieure de l'ion calcium Ca^{2+} par rapport à l'ion sodium Na^{+} monovalent est aussi un paramètre physico-chimique qui accroît l'adhésion des bactéries sur leur support.

Les résultats de cette étude sont très révélateurs de la complexité des processus mis en jeu dans l'adhésion bactérienne sur surfaces solides.

Néanmoins, dans le cadre de cette thèse, ils ne sont utilisés que pour appuyer des arguments d'interprétation concernant les résultats issus des expériences de mise en œuvre de la croissance sur surfaces. Par conséquent il faudra considérer cette étude comme faisant partie intégrante du but principal recherché de la caractérisation de la croissance des biofilms sous écoulement.

Cependant d'un autre point de vue, si cette étude est approfondie par d'autres mesures expérimentales, elle pourra servir pour la modélisation des conditions initiales de colonisation de biofiltres. En effet pour des cellules en suspension et entraînées par un écoulement à travers un milieu poreux, l'efficacité de collision avec le matériau granulaire est une fonction des conditions physico-chimiques du milieu comme la force ionique, la densité cellulaire de la suspension (Gross *et al.,* 1995) ou le temps. En outre une fois le contact bactérie-support effectué, la probabilité que la bactérie y reste accrochée, appelée efficacité d'adhésion est aussi dépendante de la force ionique et du type d'ion (Elimelech and O'Melia, 1990).

L'utilité de ces expériences dans le contexte de cette thèse est répartie en plusieurs points :

(i) Elles mettent en évidence l'importance des effets d'histoire lors des expériences de détachement induit par écoulement cisaillé. L'introduction de ce concept d'histoire du cisaillement marque l'une des originalités de cette thèse même si des investigations plus poussées n'ont pu être effectuées notamment à cause de l'orientation scientifique du contexte de la thèse. La plupart des protocoles de cisaillement décrits dans les articles appliquent souvent comme seul protocole une augmentation de la contrainte pariétale par paliers de durées égales. Or durant l'application de ces paliers, le temps de contact augmente en même temps. Donc la corrélation entre le taux de détachement et la

contrainte de cisaillement ne dépend pas uniquement des conditions physico-chimiques et du temps de contact initial, mais est également affecté par l'histoire du cisaillement.

(ii) Elles permettent comme on le verra dans le paragraphe III ci-dessous, **de valider la condition de non détachement cellulaire pendant la phase initiale** de croissance du biofilm. En effet les niveaux de cisaillement très élevés n'ont pu provoquer dans certaines conditions un détachement cellulaire conséquent.

II.7- Caractérisation du détachement pendant la croissance initiale sur les surfaces

Dans ce paragraphe de transition on aborde le cas du phénomène de détachement cellulaire pendant la phase initiale de croissance en donnant des éléments de validation de la condition de non-survenance de ce phénomène.

Les modèles globaux qui traitent de la croissance bactérienne sur supports solides sous écoulement incorporent généralement un terme représentant la cinétique de détachement cellulaire. Exemple : Barton *et al.* (1996) qui ont proposé un modèle mathématique pour calculer la cinétique de croissance de bactéries individuelles en croissance sur un support en polymère par l'équation suivante :

$$n_i = n_o.\left(2^{\Delta t / g} - k_{des}.\Delta t\right)^i \qquad \text{(Eq. 5.6).}$$

n_i est le nombre de bactéries adhérées à l'instant i.Δt, n_o le nombre de bactéries adhérées au début de la phase de croissance, g le temps de régénération c'est-à-dire entre deux divisions cellulaires et k_{des} le taux de détachement, c'est-à-dire le nombre de bactéries détachées par unité de temps.

Sur la base des résultats des expériences de détachement présentées ci-dessous, les expériences de mise en œuvre de la croissance initiale sont contrôlées pour éviter les effets de détachement. Pour ce faire, différentes conditions opératoires ont été maintenues pendant toute la durée des expériences pour s'assurer de l'inexistence de phénomène de détachement pendant la croissance :

i) Cisaillement faible : Comparés aux niveaux de cisaillement appliqués pendant les expériences de détachement cellulaire, les faibles débits appliqués lors des expériences de croissance cellulaire ne doivent logiquement entrainer aucun détachement. En effet pour les expériences de détachement, la contrainte appliquée s'étend jusqu'à 70 Pa alors qu'ici la valeur maximale est de 1 Pa (tableau 5.2). Les conditions hydrodynamiques du tableau 5.2 correspondent en outre aux gammes typiques de nombre de Reynolds et cisaillement rencontrés des systèmes qui nous intéressent (tableau 4.4).

Tableau 5.2 : Caractéristiques hydrauliques lors de la croissance initiale sur surfaces

Q [ml/min]		Re [-]		Tw [mPa]	
min	max	min	max	min	max
0,10	10,63	0,09	10	9	1000

ii) Force ionique de NaCl élevée : Le milieu de culture LB en écoulement à travers la chambre d'écoulement a une concentration de 5 g/l de NaCl, ce qui correspond à une force ionique de 5000 mM, jusqu'à 100 fois plus élevée que les forces ioniques utilisés lors des expériences de détachement. L'augmentation de la force d'adhésion en fonction du temps observée lors de ces expériences de détachement vient également renforcer l'hypothèse de non-survenue de phénomènes de détachement pendant la phase de croissance.

Ces points explicatifs constituent une base solide permettant de s'assurer de l'impact quasi-nul des effets de détachement sur nos mesures de cinétiques de croissance, que nous allons à présent aborder.

iii) Film de conditionnement :La formation d'un film de conditionnement est le résultat de l'adsorption de nutriments issus du milieu de culture par la surface d'adhésion. Au cours du temps ce processus continue et l'épaisseur de ce film augmente, réduisant fortement la répulsion électrostatique.

III. Etude de la croissance initiale sur les surfaces

III.1- Dispositif expérimental

Pour cette étude, l'écoulement du milieu nutritif dans la micro-cellule se fait par pompage au moyen d'une pousse-seringue programmable (Lambda, VIT-FIT, HP) associée à une seringue de 100 ml. On travaille ainsi en circuit ouvert (fig. 5.11).

Le calcul du débit dans ce cas se fait par calibration puisque la pousse-seringue n'affiche que la vitesse de déplacement de la seringue. La calibration se fait par pesée de volumes écoulés pour des durées données, donc on aboutit au flux correspondant à chaque vitesse de déplacement. Le support d'adhésion est une lamelle de verre. Elle est traitée au mélange sulfochromique (suspension pendant 3h) puis rincée à l'eau stérile et séchée par ventilation sous hotte à flux laminaire.

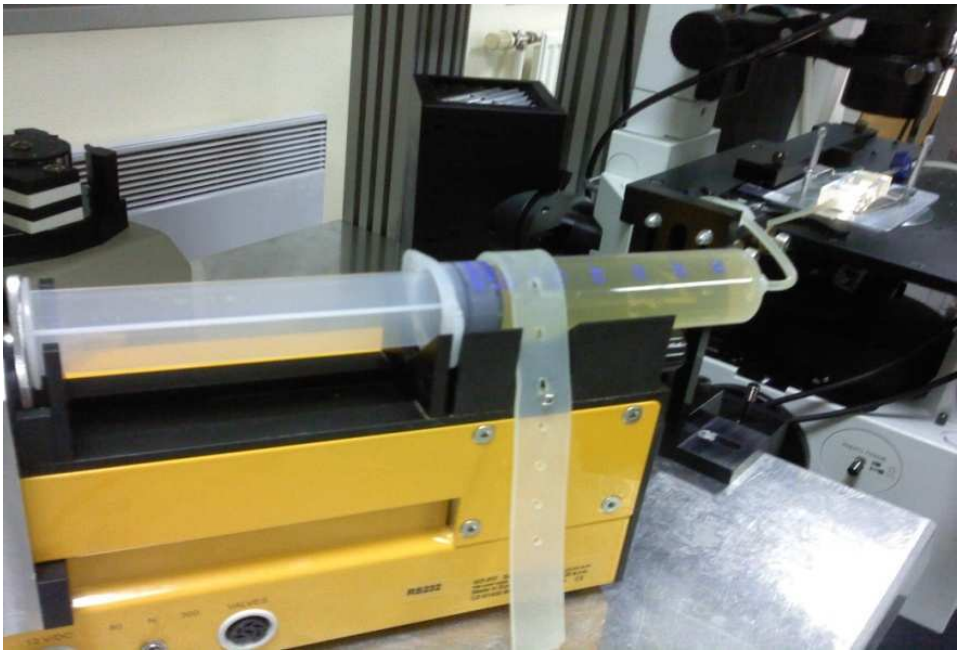


Figure 5.11 : Système d'écoulement pour la cinétique de colonisation du support d'adhésion. Pompage par pousse-seringue Vit-Fit.

III.2- Mode opératoire

Pour cette expérience du milieu de culture LB modifié (LB, sans peptone caséine, avec du phénol 20 ppm) a été préparé et stérilisé selon la procédure détaillée dans le chapitre 4. Une culture de *P. putida* est mise en œuvre en conditions batch à T = 27°C. Lorsque la phase stationnaire est atteinte, 50 µl y sont prélevés et ajoutés à 950 µl de milieu de culture stérile pour avoir une suspension bactérienne diluée 20 fois. Puis la non-contamination de la culture est vérifiée en observant au microscope optique une lamelle de verre sur laquelle est déposée une goutte de suspension. Après préparation et remplissage du système d'écoulement, on prélève 300 µl de la suspension diluée que l'on injecte dans la chambre d'écoulement. La lame de verre préalablement nettoyée et séchée est ensuite installée de façon à ce qu'il n'y ait pas de bulle d'air, car la présence de ces dernières perturbe l'écoulement.

Le système est ensuite monté comme le montre la figure 5.12 ci-dessus. L'adhésion initiale a lieu en conditions statiques, c'est-à-dire sans écoulement pour permettre la sédimentation, le dépôt et l'adhésion de cellules sur le support inférieure de la chambre d'écoulement. Cette phase dure entre t = 0 min et t = 10 mn. Après sédimentation et adhésion initiale en conditions statiques, un écoulement faible (Tw = 9,6 mPa, soit Q = 102 µl/min) est appliqué pendant 5 minutes (de t = 10 min à t = 15 min) pour évacuer les cellules en suspension (non fixées sur le support). Dans ces conditions, on est sûr que toutes les cellules suspendues sont évacuées de la chambre d'écoulement. En effet dans cette étape, un volume de 510 µl est évacué et le volume total de la chambre d'écoulement n'est que 119 µl (0,25 * 17 * 28 mm^3), soit l'évacuation de 5 fois le volume de la chambre d'écoulement, suffisant pour entraîner toutes les cellules suspendues. Le système est ensuite mis en condition statique c'est-à-dire sans écoulement pendant 15 min (de t = 15 min à t = 30 min). A cet instant une photographie est prise pour permettre de connaître le nombre initial de cellules fixées No sur la zone d'observation. L'écoulement est ensuite amorcé avec un débit fixé. Ensuite des photographies de la surface observée sont prises à des intervalles de temps réguliers pour permettre le suivi et l'analyse de la cinétique de colonisation du support de verre. Le temps de référence (t = 0 s) pour le suivi de la croissance est celui correspondant au début de l'évacuation des cellules non adhérées. L'expérience est répétée avec des débits différents pour estimer l'influence du cisaillement sur la cinétique de croissance. La succession de ces différentes étapes est schématisé ci-dessous (fig. 5.12).

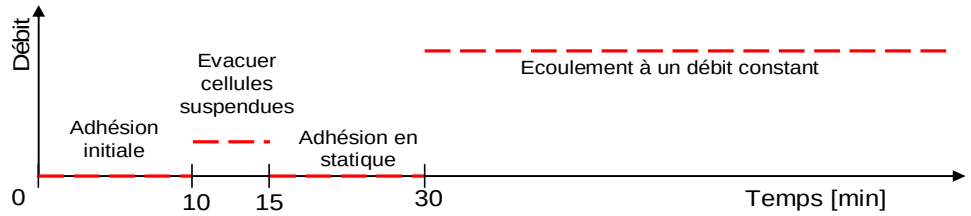


Figure 5.12 : Schéma de succession des étapes de la mise en œuvre de la croissance de cellules adhérées sur support solide.

Pour toutes les expériences, les observations ont été effectuées au centre du support, donc loin des parois, de l'entrée et de la sortie. Les analyses de l'écoulement déjà effectuées permettent d'admettre que toutes les cellules dans cette zone sont soumises à la même contrainte de cisaillement pariétale. Cette hypothèse est rendue possible par la nature bidimensionnelle de l'écoulement déjà caractérisé en amont. On en déduit que les paramètres de croissance des cellules ne devraient pas être affectés par la position de leur site d'adhésion sur le support. Etant donné également que le traitement du support est le même pour toutes les expériences, la cinétique de croissance ne devrait pas être influencée par la nature physico-chimique du support d'adhésion.

Les conditions d'alimentation en nutriment sont les mêmes qu'en batch, à savoir une concentration en nutriments et carbone non limitant, et un milieu saturé en oxygène. La procédure de nettoyage du surface du support d'adhésion ainsi que la température (24 ± 1°C) sont les mêmes quelles que soient les expériences. De plus le pH du milieu est toujours préalablement ajusté à 7.

III.3- Choix du mode d'énumération des bactéries

L'observation des images est effectuée au moyen d'un microscope à objectif inversé (Olympus, modèle IX70 ; fig. 5.13). Trois objectifs de microscope (Olympus) sont disponibles (100x à immersion d'huile, 40X et 10x). Le microscope est également équipé d'un système de zoom à 1,5x. Une caméra CCD (KY-F55B, JVC) récupère les images et les envoie à un enregistreur numérique qui les transfère à un écran (*HR Trinitron, PVM-14M4E, Sony*) et à un ordinateur portable (VIAO VGN-NR38E, Sony) pour la sauvegarde, le traitement et l'analyse des images. L'avantage du système de microscope inversé est qu'il permet d'observer directement les objets

attachés sur le support d'adhésion qui est la paroi inférieure de la chambre d'écoulement. Au moment des expériences, aucun additif n'a été ajouté à l'écoulement afin d'améliorer le contraste des images. Depuis, nous avons acquis différents produits (DAPI©, colorant dit 'Live/Dead'), ainsi que les filtres optiques nécessaires : ils permettent de rendre la bactérie fluorescente et à priori d'améliorer le contraste. Ces produits ont été utilisés pour les expériences concernant le biofilm mature mais pas au cours des expériences présentées dans ce chapitre. Le peu de contraste des images a été déterminant dans le choix du traitement des données. Nous avons ainsi tenté de procéder à une automatisation la plus poussée du comptage des cellules bactériennes au cours du temps.

Quoique le traitement soit simple à mettre en œuvre (seuillage des images puis comptage en nombre ou surface de la portion colonisée de la surface solide), il s'est avéré que du fait du peu de contraste des images, les traitements automatiques ou semi-automatiques étaient *in fine* source d'incertitudes et de variabilité importantes sur les résultats. C'est pourquoi les résultats présentés si dessous résultent d'un comptage manuel des objets présents sur les images. Quoique fastidieux, nous avons en effet estimé cette procédure plus sûre. L'étude sur les sources d'incertitudes dues à un traitement automatique des images est cependant présentée en annexe D. En effet, ce travail, qui a pris du temps, pourra être repris et être utilisé lors de travaux futurs, dans la mesure où, comme nous l'avons déjà dit, nous possédons maintenant des outils permettant directement d'agir sur la fluorescence des bactéries et donc d'améliorer considérablement le contraste des images.



Figure 5.13 : Microscope optique Olympus IX70 à objectif inversé (Laboratoire de Rhéologie, UJF-Grenoble)

III.4- Résultats

III.4.1- Observations qualitatives des différentes étapes du développement cellulaire sur la surface

Avant de procéder à une étude plus quantitative des résultats, il est intéressant de procéder à une description qualitative des phénomènes observés (figure 5.14). L'exemple présenté correspond à une contrainte pariétale de cisaillement de 76,8 mPa (Q = 816 µl/min).

La première photographie, prise à t = 0 h 30 min juste après l'adhésion initiale, correspond au début de l'application de l'écoulement du milieu nutritif.

La photographie correspondant à t = 4 h 30 met en évidence le début du développement cellulaire et la formation de petites colonies bactériennes. Ce phénomène met en évidence la fin de la phase de latence. On constate que la durée de cette phase de latence est faible comparée à celle mesurée en conditions de culture libre et qui avoisine les 7 h. L'explication à ce phénomène résulte du fait que les suspensions bactériennes injectées dans la chambre d'écoulement ont été prélevées à partir d'un milieu de culture libre qui venait tout juste d'être stoppé au début de la phase stationnaire de croissance; ce milieu contient les mêmes éléments nutritifs mais en plus faible quantité car étant non renouvelé. Cette situation fait que les cellules adhérées s'adaptent plus rapidement aux conditions nutritives, d'où leur temps de latence écourté.

La croissance intervient facilement par duplication des cellules ; chaque cellule engendre ainsi deux descendants qui vont se juxtaposer bout à bout pour former des petites chaînes de 2 à 4 cellules. Dans le temps ces chaînes vont se grouper pour former des petites colonies. En exemple sur cette figure 5.14, on montre la croissance de deux colonies marquées C1 et C2 et on peut mesurer la population à des instants voulus (ici, t1 = 0 h 30 min, t2 = 4 h 30 min et t3 = 6 h 30 min).

- A t = 6h30, les petites colonies se développent avec un fort taux de croissance ; les analyses présentées dans la suite ont montré que cette phase de croissance suit une allure exponentielle (voir plus loin, d'où le nom de phase exponentielle donné à cette étape de croissance). En outre le fait que ces colonies soient persistantes est une première vérification de la faible probabilité des phénomènes de détachement.

- A t = 8 h 30 min, presque toute la surface est colonisée ; la première couche de biofilm est formée et quelques structures commencent à s'orienter verticalement pour former une couche superficielle. A partir de cette phase, il est difficile de procéder à un comptage des cellules adhérées et l'expérience s'achève.

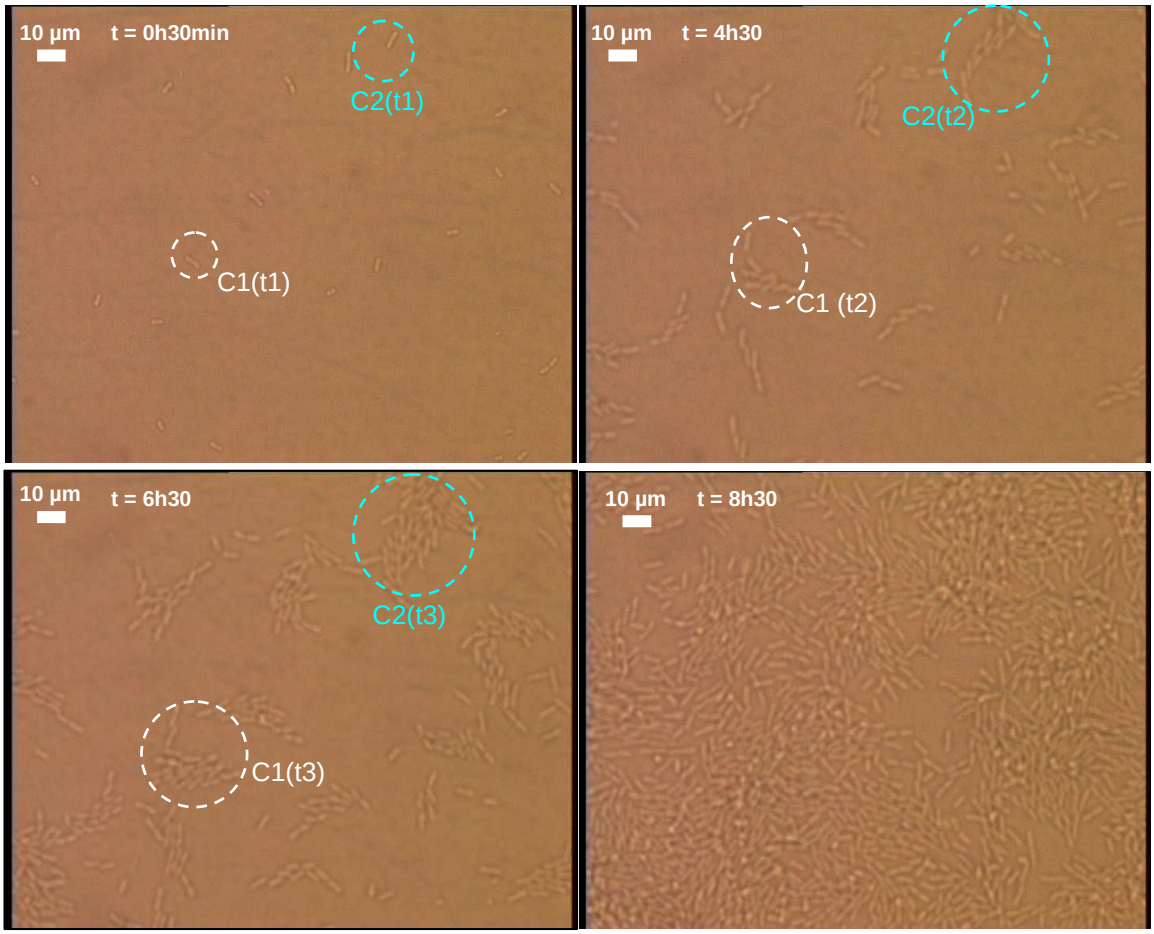


Figure 5.14 : Cellules de *P. putida* adhérées sur support de verre - croissance sous cisaillement pariétal de 76,8 mPa – Température = 24°C +/- 1 – Milieu de culture LB sans peptone avec phénol 20 ppm – pH = 7.

III.4.2- Analyse quantitative de la phase de croissance initiale sous cisaillement contrôlé.

III.4.2.1- Mesure du taux de croissance

Les mesures ont été faites dans des conditions où ni la source de carbone, ni l'oxygène ne sont limitant (Cf. chapitre 3). Les bactéries utilisées pour l'ensemencement de la micro-chambre d'écoulement sont prélevées dans le milieu de culture toujours au même instant, en début de phase stationnaire. La croissance s'effectuant en milieu renouvelé et avec du carbone en excès, on s'attend à arriver très rapidement dans une phase de croissance exponentielle, cette croissance s'effectuant avec un taux de croissance optimal μ_{max} qui est une constante pour une cellule bactérienne donnée. Cependant, le prélèvement de la culture s'étant fait sur le plateau de la courbe de croissance en batch, on peut s'attendre à ce qu'il y ait un temps de latence plus ou moins long correspondant à une réadaptation des bactéries aux conditions opératoires. La question se pose donc si l'on doit directement chercher une relation exponentielle dès le début de la mesure où si l'on doit tenir compte d'un certain temps de latence.

Les figures 5.15 et 5.16 montrent les résultats de croissance pour deux contraintes de cisaillement différentes (9,6 et 76,8 mPa).

Les données expérimentales ont fait l'objet d'un ajustement par une loi exponentielle (par une technique des moindres carrées) en considérant que la croissance suivait cette loi dès le début de l'expérience. La constante initiale dans la loi exponentielle est en particulier forcée à N0, nombre de bactéries en début de mesure.

Cette figure montre à première vue que l'ajustement par une loi exponentielle dès les premiers instants de la colonisation est valide. Cependant, lorsque l'on trace cet ajustement en coordonnées semi-logarithmique (fig. 5.17 et 5.18), on constate une légère déviation par rapport à cette loi sur environ les 150-200 premières minutes. L'ajustement de la pente pouvant être sensible à ce temps de latence, nous avons essayé des ajustements en intégrant un temps de latence avant le début de la croissance exponentielle (figure 5.19).

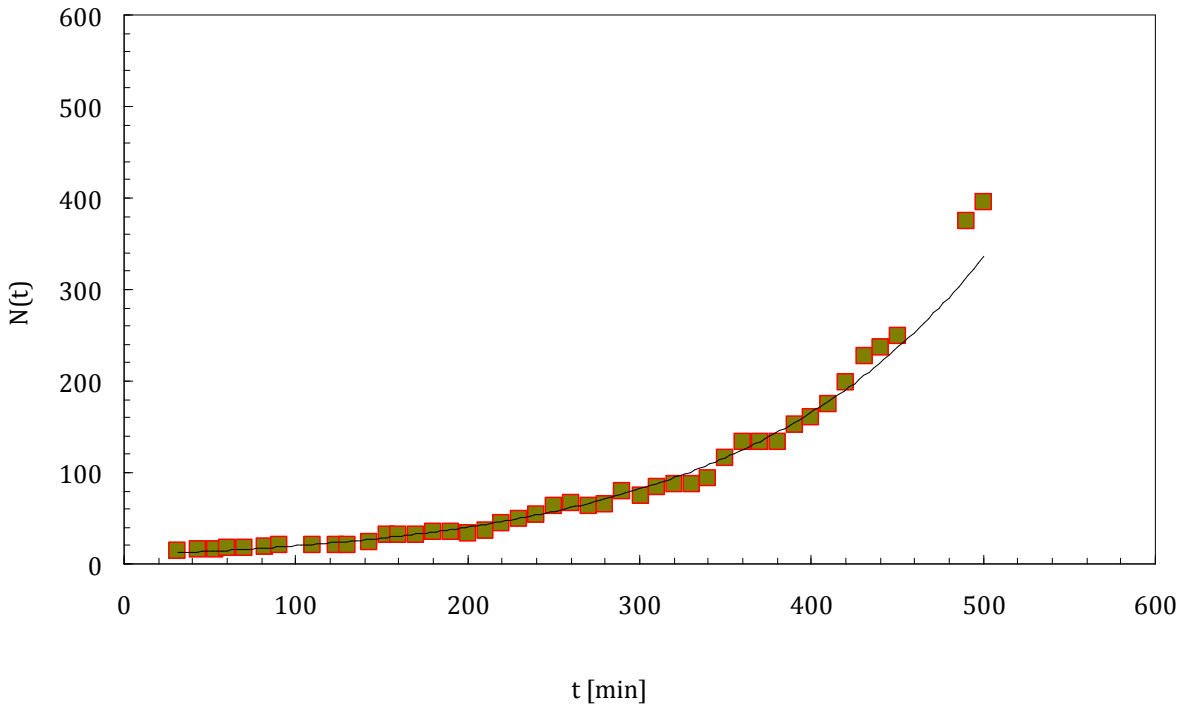


Figure 5.15 : Ajustement des données expérimentales pour une des expériences menées à Tw = 9,6 mPa.

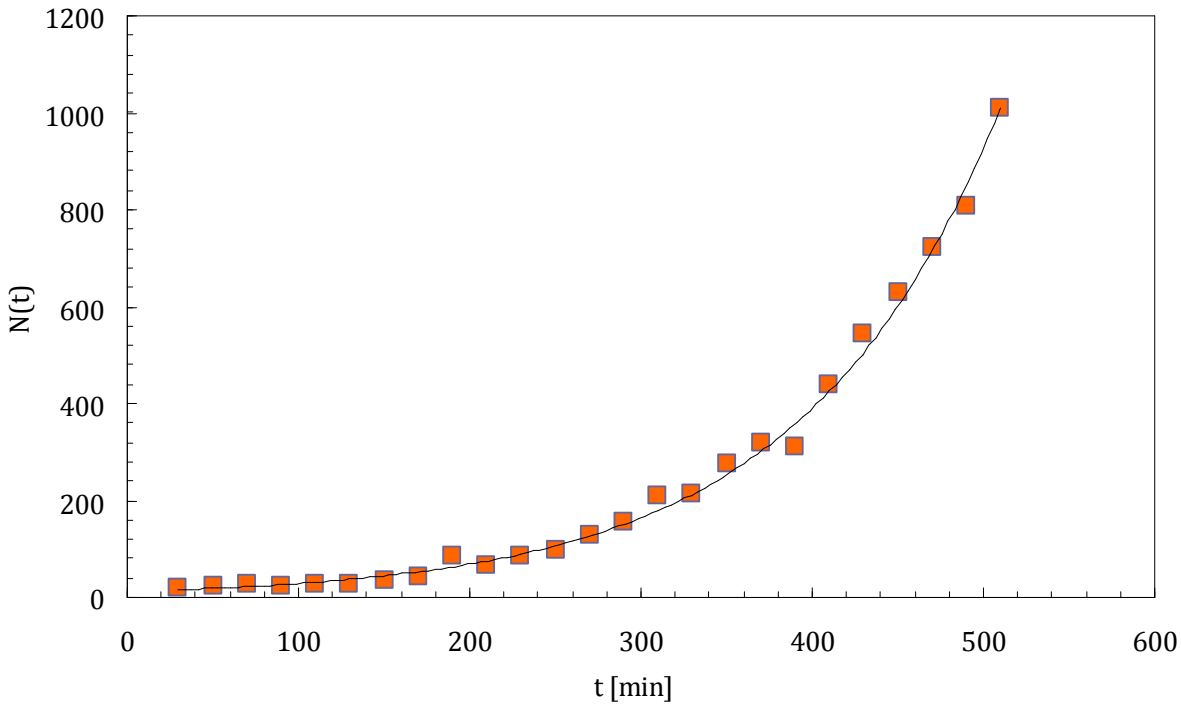


Figure 5.16 : Ajustement des données expérimentales pour une des expériences menées à Tw = 76,8 mPa.

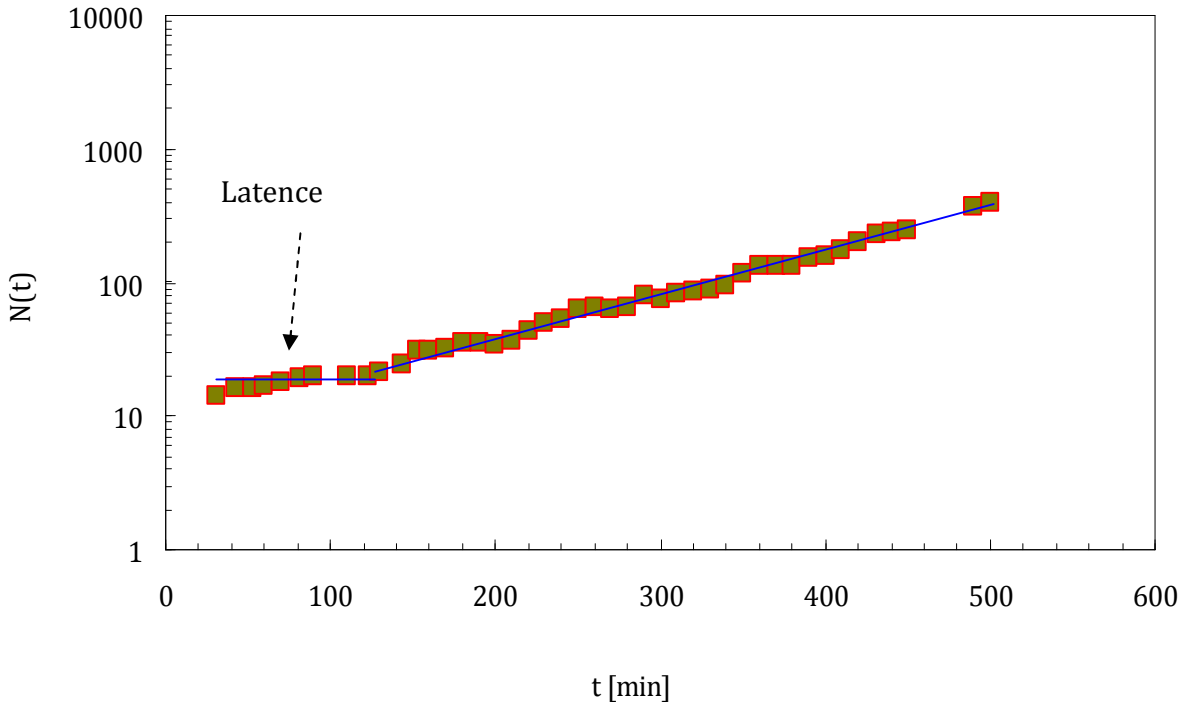


Figure 5.17 : Représentation en coordonnées semi-logarithmiques des données de la figure 5.15 avec Tw = 9,6 mPa.

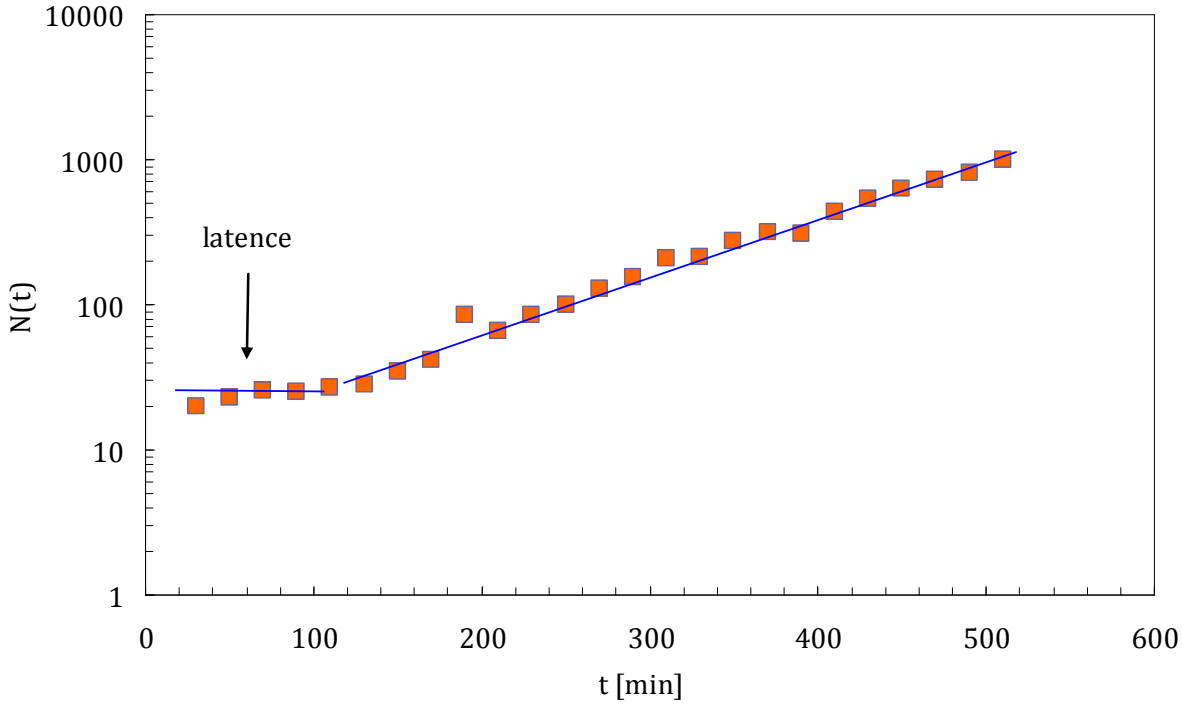


Figure 5.18 : Représentation en coordonnées semi-logarithmiques des données de la figure 5.16 avec Tw = 76,8 mPa.

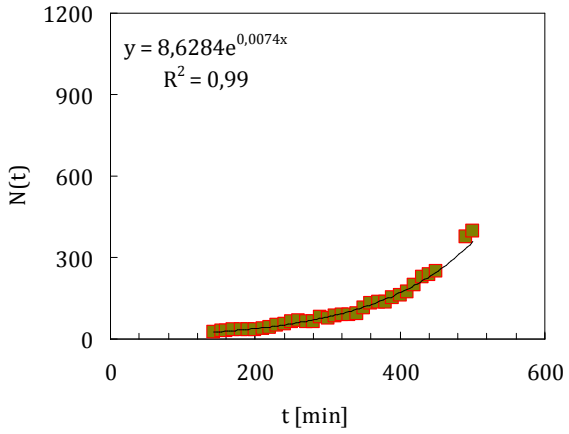


Figure 5.19a : ajustement des données expérimentales pour une expérience menée à Tw = 9,6 mPa; avec un temps de latence choisi à 150 min.

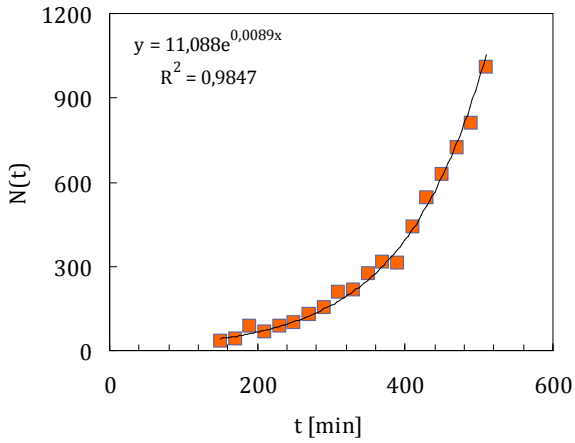


Figure 5.19b : ajustement des données expérimentales pour une expérience menée à Tw = 76,8 mPa ; avec un temps de latence choisi à 150 min.

En toute rigueur, il faudrait effectuer une étude de sensibilité sur la valeur de ce temps de latence. Cependant, ce temps est délicat à établir car il correspond à une période où les bactéries se divisent peu (ou pas) et où le nombre de cellules bactériennes est faible : la variation relative des objets comptés est donc relativement sensible, suite à des phénomènes autres que la croissance pure des bactéries (entre autre, décrochage d'une bactérie, ou dépôt d'une cellule provenant d'un endroit de la cellule). Cependant, les courbes montrent bien que durant la phase de latence le nombre de bactéries reste constant. De plus la figure 5.20 ci-dessous, à 3 instants différents pendant la phase de latence montre bien que ce phénomène est limité; on n'y constate en effet aucun dépôt ni détachement cellulaire.

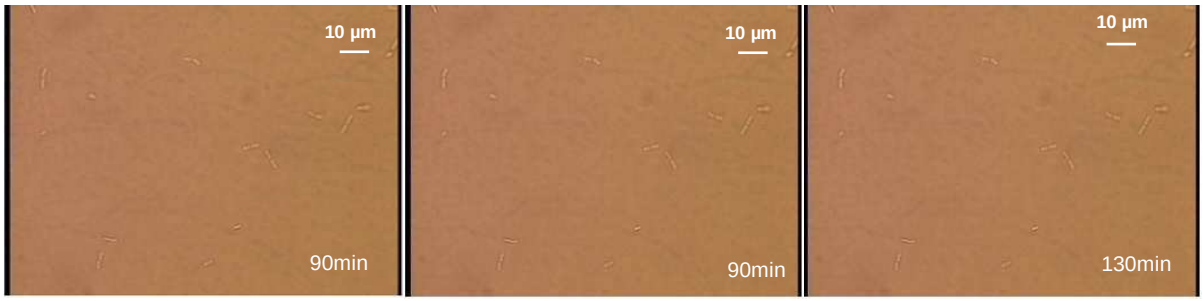


Figure 5.20 : Images montrant les cellules adhérées pendant la phase de latence.

III.4.2.2- Reproductibilité des résultats

Une autre question concerne la reproductibilité des résultats. Les résultats présentés aux figures 5.21 et 5.22 correspondent à des cinétiques mesurées 3 fois à la même contrainte de cisaillement de 9,6 mPa et 76,8 mPa respectivement. Ils sont présentés pour un temps de latence de 150 min. Le taux de croissance est calculé en prenant la pente de l'allure exponentielle présentée en coordonnées semi-logarithmiques. Les taux de croissance issus de ces expériences sont donnés en h^{-1} dans les tableaux 5.3 et 5.4.

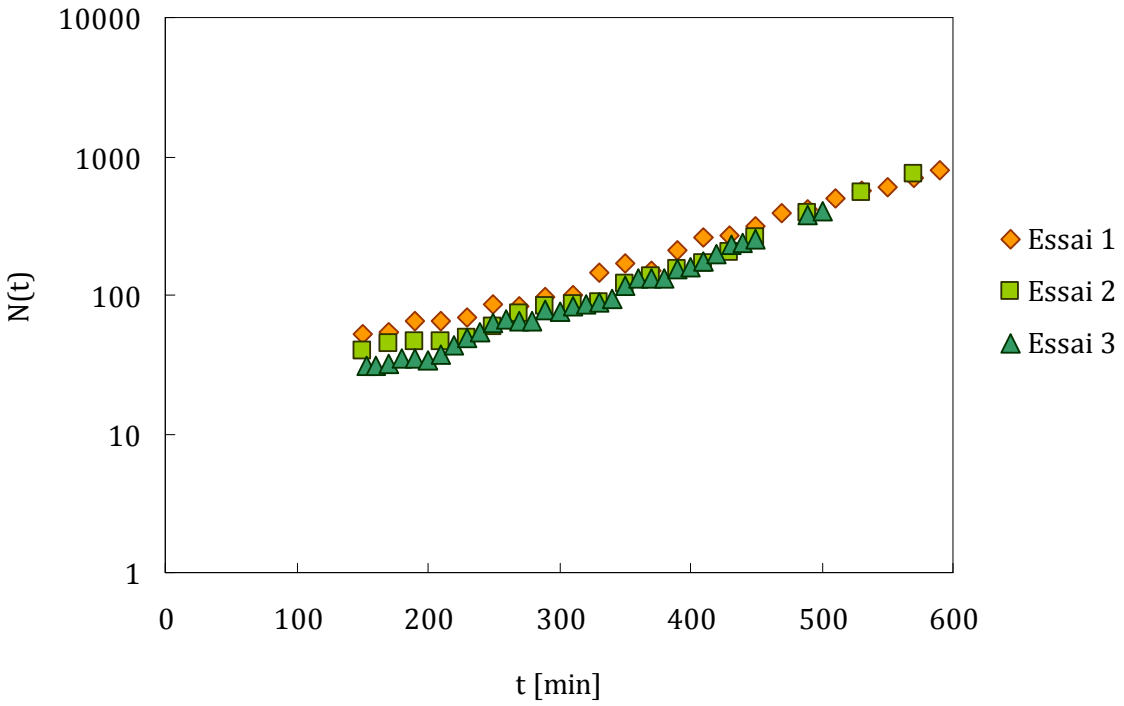


Figure 5.21 : Courbe de croissance pour 3 essais à Tw = 9,6 mPa.

Comme on peut le constater, les résultats sont là aussi reproductibles, les différences extrêmes observées étant de l'ordre de 13 %. De plus, avec un taux de latence de 150 min, on obtient des coefficients de corrélation encore très satisfaisants, ce qui montre que ce temps de latence est relativement bien estimé. Lorsque l'on compare les taux de croissance mesurés à 9,6 mPa et 76,8 mPa, on observe que la cinétique de croissance est plus rapide pour 76.8 mPa. Cette modification du taux de croissance avec le cisaillement, inattendue, demande à être confirmée sur d'autres conditions hydrodynamiques. Si cette tendance se poursuit avec des écarts significatifs, une variabilité de 10 à 15% sur les cinétiques à cisaillement fixé n'est pas rédhibitoire et les mesures peuvent être considérées comme reproductibles (vis-à-vis de ces évolutions).

Ces résultats montrent que la prise en compte, ou non, d'un temps de latence dans l'ajustement des données modifie très peu l'évolution relative du taux de croissance avec le cisaillement. Même si les valeurs absolues de ces taux de croissance sont certainement sensibles à la valeur de ce temps, les évolutions observées sont suffisamment significatives pour que cette sensibilité n'entache pas les conclusions que l'on peut tirer. C'est pourquoi nous n'avons pas procédé à une étude plus fine du temps de latence.

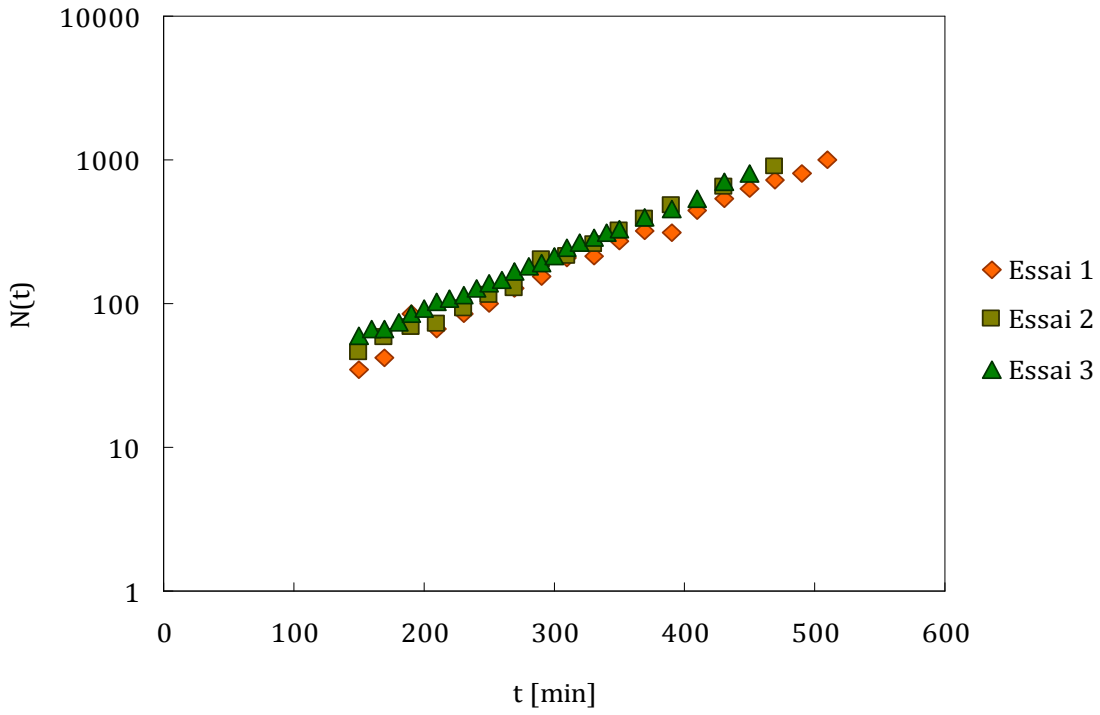


Figure 5.22 : Courbe de croissance pour 3 essais à Tw = 76,8 mPa

Tableau 5.3 : Taux de croissance de cellules de P. putida sous écoulement cisaillé à 9,6 mPa; Vérification de la concordance des valeurs de μ pour les 3 expériences effectuées aux mêmes conditions opératoires.

	μ [h^{-1}]	Coefficient de corrélation R^2
Essai 1	0,396	0,99
Essai 2	0,426	0,97
Essai 2	0,444	0,99

Tableau 5.4 : Taux de croissance de cellules de P. putida sous écoulement cisaillé à 76,8 mPa; Vérification de la concordance des valeurs de µ pour les 3 expériences effectuées aux mêmes conditions opératoires.		
	µ [h^{-1}]	Coefficient de corrélation R^2
Essai 1	0,534	0,98
Essai 2	0,576	0,99
Essai 3	0,522	0,99

III.4.2.3- Evolution du taux de croissance avec la contrainte de cisaillement

Les données ci-dessus ont été complétées avec deux séries de données prises à un cisaillement de 153,6 mPa et 1000 mPa. Les expériences suivent le même protocole expérimental, on peut considérer donc nos expériences bien contrôlées et les mesures significatives. Notons aussi, que les expériences à 1000 mPa, ont été effectuées avec un objectif x40. Le champ observé était plus grand. Pour éviter des erreurs de comptage, le nombre de cellules bactériennes étant beaucoup plus important, nous avons divisé l'image en différentes colonies (dont le nombre de cellules initial était de 1 à 3 cellules) et nous les avons suivies dans le temps. Pour cette valeur du cisaillement, on présente ici les résultats sur le nombre total de bactéries. La figure 5.23 présente les cinétiques de croissance pour les 2 dernières expériences (temps de latence 150 min). Le tableau 5.5 récapitule tous les résultats obtenus jusqu'à présent pour un temps de latence de 150 min. Notons que pour les 2 dernières expériences, un ajustement exponentiel n'est possible que si l'on prend en compte ce temps. La figure 5.24 présente l'évolution du taux de croissance de cellules fixées en fonction de la contrainte de cisaillement pariétale et du nombre de Reynolds pour toutes les expériences réalisées. Le taux de croissance correspondant aux conditions de cultures libres est également représenté sur cette figure 5.24.

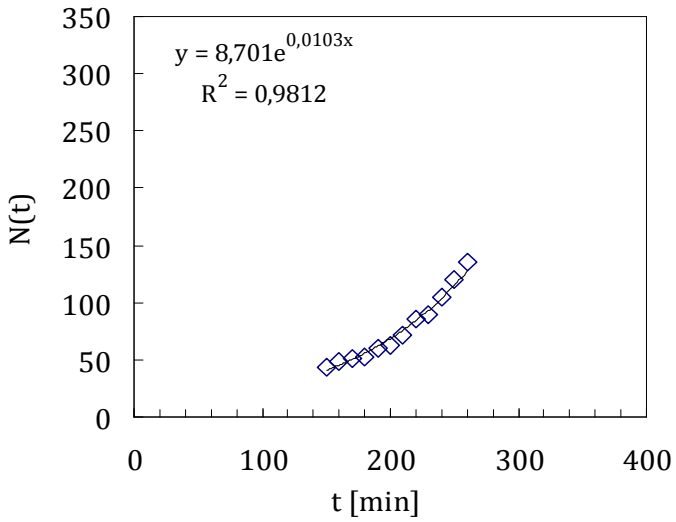


Figure 5.23a : Essai de croissance à 153,6 mPa

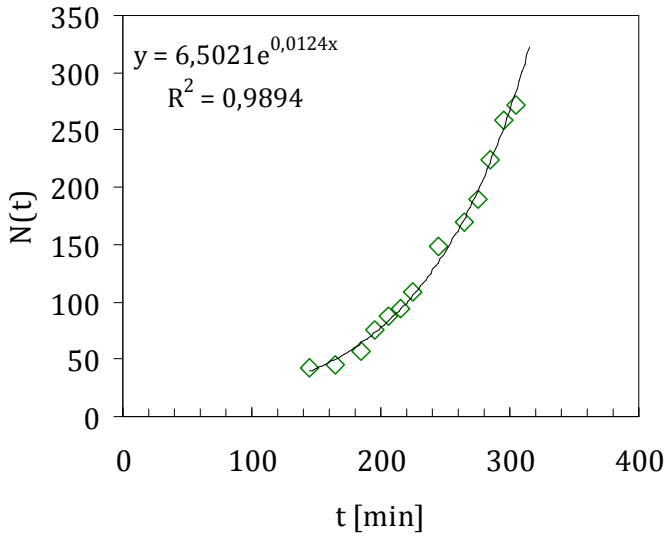


Figure 5.23b : Essai de croissance à 1000 mPa

Tableau 5.5 : Taux de croissance cellulaire sous écoulement cisaillé de *P. putida* adhérées sur support de verre à plusieurs valeurs de cisaillement. Calcul effectué à partir d'un temps de latence de 150 min, expériences effectuées à 24 +/- 1 °C.

Tw [mPa]	μ [h^{-1}]	μ_moyen [h^{-1}]	Coefficient de corrélation R^2
9,6 mPa	0,396	0,422	0,99
9,6 mPa	0,426		0,98
9,6 mPa	0,444		0,99
76,8 mPa	0,534	0,544	0,98
76 ,8 mPa	0,576		0,99
76,8 mPa	0,522		0,99
153 mPa	0,618	0,618	0,98
1000 mPa	0,744	0,744	0,99

En considérant le canal de la chambre d'écoulement comme un pore, on peut définir le nombre de Reynolds par la relation suivante :

$$\mathrm{Re} = \frac{\rho.V.dp}{\mu(1-\phi)} \qquad \text{(Eq. 5.7)}$$

Où V est la vitesse débitante, dp un diamètre particulaire, Φ la porosité, ρ et μ sont respectivement la masse volumique et la viscosité du fluide en écoulement. Cette expression correspond exactement à la définition classique du nombre de Reynolds, donnée par :

$$\mathrm{Re} = \frac{\rho.V.h}{\mu} \qquad \text{(Eq. 5.8)}$$

h qu'on définit ici comme un diamètre hydraulique du microcanal est proportionnel au diamètre particulaire.

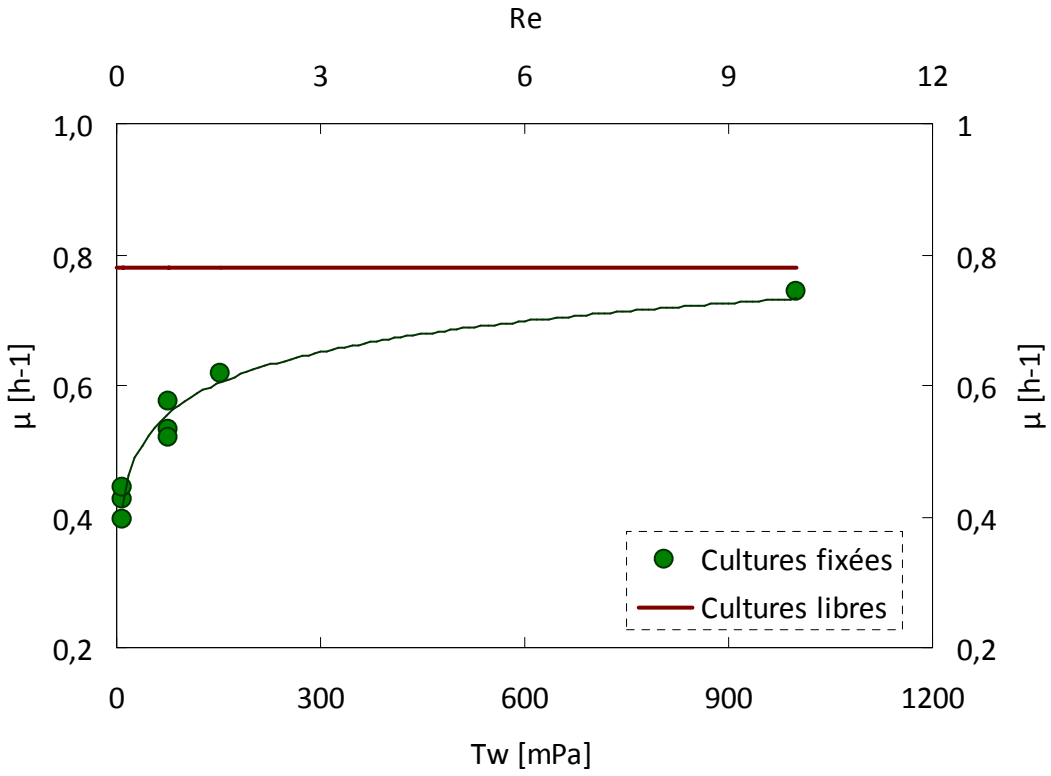


Figure 5.24 : Evolution du taux de croissance cellulaire sous écoulement cisaillé de *P. putida* en fonction de la contrainte pariétale de cisaillement ; support d'adhésion en verre, T = 24 +/- 1 °C.

Dans la thèse de Karrabi *et al.* (2009), pour des débits de 5 l/h, 10 l/h et 20 l/h, les nombres de Reynolds correspondants sont respectivement de 0,5, 1 et 10 et les contraintes de cisaillement correspondantes sont respectivement de 4 mPa, 9 mPa et 20 mPa.

La courbe de croissance de figure 5.24 montre qu'aux faibles valeurs de la contrainte de cisaillement, nos expériences sont en bonne adéquation avec les travaux de Karrabi *et al.* (2009). Cette zone à faibles valeurs du cisaillement correspond à une forte variation du taux de croissance bactérienne μmax, avec des valeurs très différentes de celles mesurées en conditions de cultures libres.

Pour cette zone d'écoulement lent correspondant à un régime diffusionnel, nos résultats montrent qu'on n'a pas le droit de prendre les paramètres mesurés en conditions de cultures libres. Par exemple, si on revient à certaines études présentées dans l'état de l'art, Brovelli *et al.* (2009) comparent leurs données à celles issues de Taylor et Jaffe, (1990) pour valider leur modèle. Les paramètres de croissance pour la loi de Monod dans le modèle de Brovelli *et al.* (2009) ont été pris constants (et égaux à leur valeur obtenue en cultures libres). Or le nombre de Reynolds de Taylor et Jaffe, (1990) sont encore plus bas que ceux examinés ici. Donc le fait de simuler le début de la colonisation sans tenir compte des résultats présentés précédemment peut avoir des conséquences sur la prédiction de l'évolution dans le pilote des réacteurs.

La particularité de la configuration étudiée est que les conditions initiales correspondent à celles d'un pilote non colonisé. Dans ce cas l'influence de ces conditions initiales sur la colonisation du biofiltres est évidente.

III.5- Discussion

On constate que le taux de croissance μ croît de manière monotone avec le cisaillement (ou la vitesse d'écoulement représentée par le nombre de Reynolds) pour atteindre une valeur quasi-identique aux mesures réalisées en condition batch. Le taux de croissance mesuré μ est en outre bien un taux de croissance optimal correspondant à une phase exponentielle. La variation de ce taux de croissance optimal semble être l'indice d'un effet du cisaillement sur le comportement bactérien. Ces taux de croissance inférieurs à celui obtenu en condition libre, ont été observés par Barton *et al.* (1999) qui ont étudié la croissance de colonies bactériennes sur des surfaces polymériques sous écoulement laminaire en chambres d'écoulement. Mais le fait que ce taux de croissance tende vers la valeur en obtenue en cultures libres s'accorde mal avec une hypothèse

liant l'effet du cisaillement à un changement de métabolisme des micro-organismes. Une autre explication pourrait être liée à des effets de transfert de masse.

III.5.1- Explication basée sur un changement de métabolisme

Une explication basée sur un changement de métabolisme des bactéries, ou sur l'effet du « *quorum sensing* » dès les premiers instants de colonisation du substratum solide aurait pu aussi être envisagée. De tels changements ont par exemple été observés par Mc Carter (1999) pour des cultures en boîte de Pétri (sans écoulement sur milieu nutritif solide – agar-), pour un micro-organisme particulier (*V. parahaemoyticus*). Cet auteur observe entre autre dans certaines conditions une inhibition de la différentiation des cellules qui peut être réversible.

Dans notre cas, les expériences ont lieu après un temps d'adhésion assez conséquent et on peut considérer que la bactérie s'est adaptée à la surface solide. De plus les observations effectuées mettent en évidence le développement continu de colonies bactériennes, mais qui ne semble s'accompagner ni d'un changement de forme, ni d'une variation de mobilité. Quant aux effets de « *quorum sensing* », les études de (Sauer *et al.,* 2001) montrent qu'ils interviennent plus tard dans le processus d'établissement du biofilm, en l'occurrence à la fin de la phase de colonisation initiale.

De plus les valeurs de cisaillement imposées semblent très faibles en regard d'un éventuel « stress » imposé aux bactéries.

Enfin, comme dit par ailleurs, le fait que la cinétique de croissance tende vers sa valeur obtenue en cultures libres n'entre pas bien dans le cadre d'un changement de métabolisme.

Pour ces raisons, bien que nous n'ayons pu les vérifier expérimentalement, ces dernières hypothèses nous semblent douteuses, du moins avec cette souche et l'explication basée sur le seul transfert de masse nous semble plus appropriée.

III.5.2- Explication basée sur l'existence d'une couche limite de concentration à la paroi

Si les effets observés sont liés à des phénomènes de transfert de masse, notre résultat n'est pas évident à expliquer sur la base de la seule loi de Monod dans la mesure où on a essayé de travailler en conditions non limitantes.

Rappelons que dans la vision classique de cette loi, en supposant qu'il n'y a pas d'inhibition par les divers substrats, le taux de croissance s'écrit (Cf. chapitre 3).

$$\mu = \mu_{\max} \prod_i \frac{S_i}{K_{si} + S_i} \qquad \text{(Eq. 5.9)}$$

Cette loi est *a priori* valable dès lors que les conditions nutritives, l'aération et l'homogénéisation sont optimales (ce qui est le cas en cultures libres).

Dans cette vision macroscopique, le taux de croissance ne dépend que de la concentration moyenne locale des divers substrats vue par la cellule bactérienne.

Dans notre cas, l'existence éventuelle d'une couche limite de concentration pourrait engendrer des concentrations très différentes à la paroi par rapport à la concentration moyenne dans le cœur de l'écoulement. La concentration près de la paroi pourrait alors évoluer en fonction des conditions hydrodynamiques.

Dans le cas d'une paroi imperméable, propre, sans bactérie, la condition de flux nul à la paroi ($dS/dz\big|_{z=0}$ = 0) donne, comme solution des équations de la couche limite, un profil de concentration S(z) des divers substrats constant sur la hauteur z : dans le micro canal, la concentration des diverses espèces dissoutes est donc homogène partout et égale à la concentration en entrée donnée par le système d'alimentation. Et comme nos conditions sont *a priori* non-limitantes, la loi de Monod appliquée au niveau macroscopique ne devrait pas donner de variation du paramètre μ.

Cependant, même si globalement dans la chambre d'écoulement les concentrations sont homogènes, au niveau local, près de la bactérie, un écoulement se développe. Il peut exister alors une couche limite de concentration, de faible épaisseur comparée aux dimensions de la chambre d'écoulement.

Nous avons essayé d'expliquer nos résultats sur cette base. Un schéma idéalisé du problème est représenté sur la figure 5.25.

Comme on le voit, il y a deux flux à considérer : (i) un flux provenant directement de la différence de concentration entre l'interface extérieure de la membrane cellulaire et le cœur de l'écoulement, noté φ (ii) un flux lié au transport transmembranaire des solutés φ_{tr}. Avant d'aller plus loin, il est nécessaire d'expliciter ces derniers modes de transport.

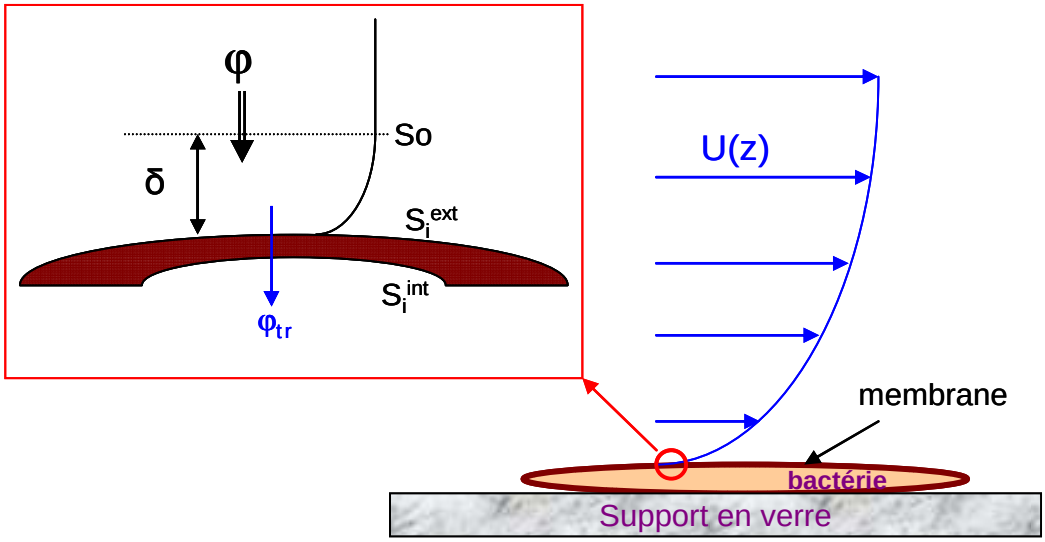


Figure 5.25 : Schéma montrant la relation entre l'écoulement et les transferts de substrats à travers une membrane bactérienne

III.5.2.1- Mécanisme de transport d'un nutriment au travers de la membrane d'une cellule bactérienne

D'après la littérature, pour les bactéries à Gram$^-$, on distingue ainsi plusieurs modes d'alimentation que l'on divise communément en deux groupes : les transports passifs et les transports actifs (fig. 5.26).

a) Transport passif

Il existe deux modes de transport passif :

- **La simple diffusion** ou diffusion libre de certains types de nutriments à travers la membrane. Dans ce cas, la vitesse de diffusion est proportionnelle au gradient de concentration et à la perméabilité de la membrane vis-à-vis du composé. Les molécules diffusent pour équilibrer leur concentration entre le contenu cytoplasmique et le milieu extérieur où l'espace périplasmique qui est un reflet du milieu extérieur. Par exemple, l'oxygène, l'eau, le CO_2 et l'ammoniac sont assimilés selon ce mode de transport.

- La **diffusion facilitée** : la membrane cytoplasmique est imperméable à tous les composés autres que ceux cités plus haut. Ce type de transport est dû à l'existence de protéines transmembranaires qui se comportent comme des transporteurs spécifiques à une molécule donnée ou un groupe de molécules donné. On appelle ces molécules des perméases. Les protéines canal ou porines entrent aussi dans cette catégorie. Le transport est dû à un changement de conformation de la perméase, qui facilite la diffusion du soluté (toujours dans le sens du gradient). La vitesse de transfert est limitée par le nombre de molécules de transporteurs. Quand tous les transporteurs sont occupés, la vitesse de transfert est à son maximum car on a atteint la saturation : c'est ce qui se passe en général dans un milieu de culture où la concentration des nutriments n'est pas limitante; l'évolution de la vitesse de transfert suit d'ailleurs une allure assez semblable à celle donnée pour la cinétique de croissance obtenue pour nos expériences de mise en œuvre de la croissance sur la surface.

b) Transport actif

Les modes de transport actif nécessitent de l'énergie et permettent l'accumulation de nutriments dans le cytoplasme contre leur gradient de concentrations. Ils font aussi intervenir des perméases.

On distingue :

- Le transport actif primaire qui nécessite de l'ATP et permet le changement de conformation du transporteur.

Le transport actif secondaire qui utilise le gradient électrochimique de protons de part et d'autre de la membrane, selon plusieurs schémas :

Dans le premier schéma, le substrat est introduit à l'intérieur de la cellule en même temps que des protons et de fait ne peut que diffuser dans une seule direction (on parle de symport). Les protons sont réutilisés par la chaîne respiratoire puis renvoyés à l'extérieur, ce qui permet le maintien du gradient.

Un second mécanisme dit antiport, comprend l'exclusion de protons vers l'extérieur. C'est ce qui crée le gradient électrochimique et fournit ensuite l'énergie pour le transport des autres molécules. Ces protons repénètrent ensuite dans la cellule en accompagnant le substrat grâce à un symport.
A ces deux modes de transport (passif et actif) est associée ce que l'on appelle la translocation de groupe, mode de transport très utilisé par les bactéries. Le substrat transporté est transformé par phosphorylation (par exemple) et implique une cascade d'éléments impliquant diverses enzymes (Burnett and Kennedy, 1954).

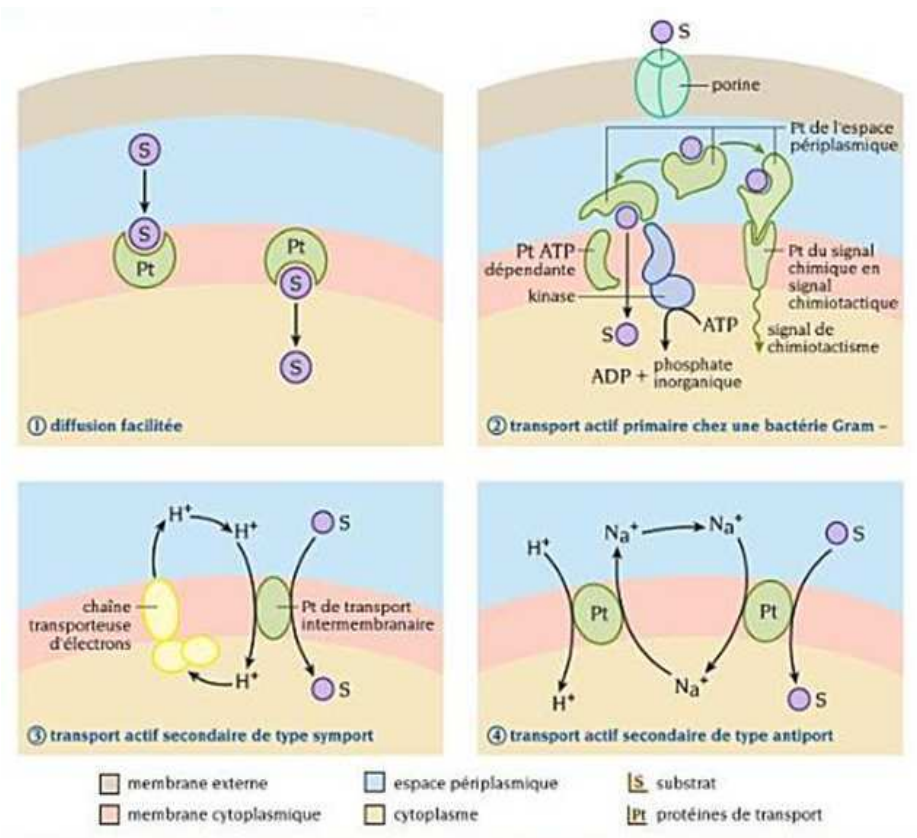


Figure 5.26 : Schéma montrant les différents modes de transport de substrat à travers une membrane bactérienne

III.5.2.2- Couche limite de concentration

On suppose la bactérie suffisamment petite en épaisseur pour que le champ de vitesse parabolique ne soit pas perturbé.

Dans ce cas, on peut montrer (Annexe E) que l'évolution de l'épaisseur de la couche limite de concentration le long de la bactérie évolue de la façon suivante :

$$\frac{\delta}{h} \propto Pe^{-\alpha} \qquad \text{(Eq. 5.10)}$$

Avec $\alpha < 1$ dépendant de la condition à la limite en vitesse sur la bactérie. Pour deux cas extrêmes : $\alpha = 1/3$ (membrane bactérienne solide, condition d'adhésion), $\alpha = 1/2$ (membrane « fluide », condition de glissement).

III.5.2.3- Coefficient de transfert de masse

Le flux de transfert de masse du cœur de l'écoulement, vers la membrane bactérienne s'écrit :

$$\varphi = k\left(S_0 - S_i^{ext}\right) = D\,\frac{(S_0 - S_i^{ext})}{\delta} \qquad \text{(Eq. 5.11)}$$

k est le coefficient de transfert de masse, S_0 la concentration du soluté considéré dans l'écoulement, S_i^{ext} la concentration du soluté considéré à l'interface extérieure de la membrane cellulaire et D le coefficient de diffusion du soluté considéré.

On a donc : $$k \propto \frac{D}{\delta} \propto Pe^{\alpha} \qquad \text{(Eq. 5.12)}$$

En ce qui concerne le transport transmembranaire, il est régi par l'équation suivante donnant l'expression du flux transmembranaire :

$$\varphi_{tr} = \psi(S_i^{ext} - S_i^{\text{int}}) \qquad \text{(Eq. 5.13)}$$

En ce qui concerne le taux de croissance, on devrait ainsi, si on suit un formalisme de type Monod, plutôt écrire :

$$\mu = \mu_{\max} \frac{S_i^{ext}}{Ks + S_i^{ext}} \qquad \text{(Eq 5.14)}$$

Il est difficile d'aller plus loin car les mécanismes de transport dans ce cas (comme nous l'avons expliqué plus haut dans le paragraphe III.5.2), ne sont pas que des transferts diffusifs passifs purs. μ dépend donc de la nature du soluté considéré, du mécanisme de transfert à travers la membrane et de la cinétique d'assimilation du soluté par la bactérie.

Les deux flux φ et φ_{tr} sont en outre couplés et leur importance relative contrôle les concentrations S_i^{int} et S_i^{ext}. Vues les données disponibles, l'ordre de grandeur de ces concentrations ainsi que leur évolution avec les conditions hydrodynamiques sont difficiles à estimer. En supposant le champ de concentration global de soluté peu influencé par la croissance des bactéries, on peut considérer que chaque micro-organisme voit la même concentration S_i^{ext} d'où une croissance de type exponentielle (μ est une constante pour un débit donné). De plus, si on se place dans un cas idéalisé où la résistance au transfert est principalement contrôlée par la couche limite de concentration (hypothèse difficile ici à valider), la concentration à l'interface extérieure de la membrane cellulaire est a *priori* inférieure à la concentration S_0, ce qui pourrait expliquer que $\mu < \mu_{max.}$ (on peut se retrouver en conditions limitantes pour ce soluté).

Le transfert de masse vers la cellule membranaire augmentant avec le nombre de Péclet (donc avec la vitesse d'écoulement dans la chambre) et en supposant de plus que la cinétique de croissance μ est fonction de ce coefficient de transfert, on a alors :

$$\mu = f(k) \propto f(Pe^{\alpha}) \propto f(\mathrm{Re}^{\alpha} S_c^{\alpha}) \propto f(\mathrm{Re}^{\alpha}) \qquad \text{(Eq. 5.15)}$$

Où Re est le nombre de Reynolds et Sc le nombre de Schmidt.

L'ajustement des données expérimentales par une loi puissance (fig. 5.27) donne :

$$\mu = 0.5625.\mathrm{Re}^{0.1247} \qquad \text{(Eq. 5.16)}$$

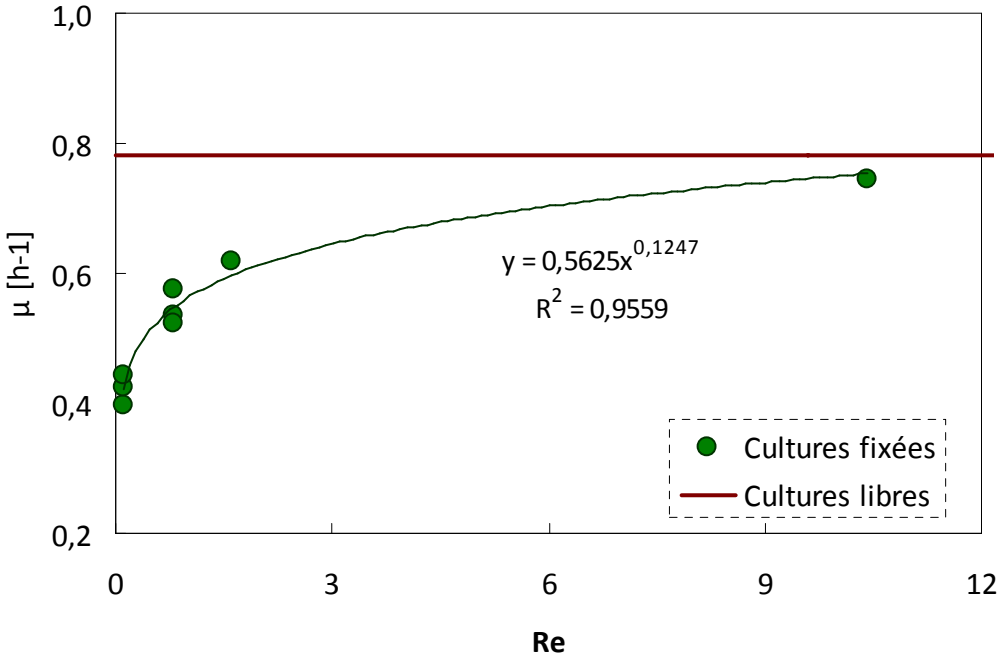


Figure 5.27 : Evolution du taux de croissance en fonction du Reynolds - Calcul du coefficient α

Si on suppose une condition à la limite de type adhérence : α = 1/3 ~ 0,33 soit k ~ $Re^{0,33}$.

On aurait alors :

$$\mu \propto f(k) \propto \beta' \mathrm{Re}^{n} \propto \beta' \mathrm{Re}^{\alpha.m} \propto \beta' k^{m} \qquad \text{(Eq. 5.17)}$$

Cela donne m = 0,37. Dans le cas d'une condition de glissement, on aurait m = 0,25 = 1/4.

Pour expliciter les valeurs de l'exposant m et de la constante β' en fonction des processus réels intervenant au niveau de la cellule bactérienne, il sera nécessaire de mener une étude plus approfondie à l'échelle du micro-organisme, ce qui est hors du contexte de cette thèse. L'évolution de la cinétique de croissance à la puissance du nombre de Reynolds semble cependant bien impliquer des effets de transfert de masse dans nos observations.

Nous ne prétendons pas non plus présenter un modèle dans la mesure où le lien taux de croissance-transfert de masse est probablement plus complexe que la simple loi puissance issue

de l'analyse des données : le taux de croissance dépend non seulement du flux atteignant puis traversant la membrane mais aussi de la vitesse d'assimilation du soluté considéré.

III.6- Conclusion

Les résultats expérimentaux présentés ici mettent en évidence l'influence de la contrainte de cisaillement pariétal, ou plus précisément de la vitesse d' écoulement, à faible nombre de Reynolds (0 à 10) sur le taux de croissance de bactéries de *P. putida* adhérées sur le support inférieur en verre d'une chambre d'écoulement à parois planes et parallèles. Les mesures ont été effectuées en conditions non limitantes pour les divers substrats.

Il a été démontré que dans ce cas la croissance est optimale et suit une allure exponentielle s'exprimant sous la forme $n(t) = n_o e^{\mu t}$. Cette tendance de la cinétique vers une loi exponentielle a été aussi observée par Barton *et al.* (1996) puis par Gottenbos *et al.* (1999) sur des surfaces polymériques. Cependant, dans la gamme des contraintes de cisaillement (ou de Reynolds) appliquée, le taux de croissance μ est dépendant des conditions hydrodynamiques et augmente avec la contrainte de cisaillement à la paroi (ou le nombre de Reynolds). Ces taux de croissances optimaux observés tendent vers la valeur du taux de croissance optimal μ_{max} obtenue en cultures libres.

Dans le domaine de l'ingénierie, cela laisse transparaître une certaine confusion dans l'utilisation de la loi de Monod. Dans la modélisation des bioprocédés à cultures libres, par exemple, l'utilisation des résultats obtenus en cultures libres pour les cinétiques bactériennes est une pratique courante. Cela pourrait être relativement justifié dans la mesure où les conditions d'agitation dans les bassins sont du même ordre de grandeur ou suffisamment importantes comparées aux conditions en cultures libres. Même si les bactéries s'organisent en flocs, dans les applications industrielles, étant donné le faible taux de pénétration des divers substrats (dont l'oxygène pour les processus aérobies), c'est surtout la surface des flocs qui est active. Dans de bonnes conditions d'agitation, les temps de renouvellement aux surfaces des bactéries et le transfert de masse des différents solutés correspondent probablement à leur valeur optimale. Le seul facteur limitant qui apparaisse dans le taux de croissance est alors la concentration moyenne à une échelle « locale » (c'est-à-dire supérieure à l'échelle de la bactérie, mais petite devant l'échelle du réacteur) des différents nutriments (qui indirectement régissent

les gradients de concentrations et le taux de pénétration des substrats). Le paramètre μ_{max} cache tous les autres phénomènes et est considéré comme intrinsèque au couple bactérie/substrat.

Dans la chambre d'écoulement, le système fonctionne dans des conditions hydrodynamiques beaucoup moins sévères en termes de mélange (pas de turbulence). Nous pensons que l'existence d'une couche limite de concentration très fine à l'échelle de la bactérie gère le transfert des nutriments vers la surface membranaire (même si dans la chambre d'écoulement, au niveau global, la concentration des divers solutés est constante et homogène). Un raisonnement très simplifié sur les ordres de grandeurs respectifs des flux vers la membrane de la bactérie et à travers la membrane, ainsi que l'analyse des données expérimentales, aboutissent à une cinétique de croissance variant en Re^n et un taux de croissance évoluant en puissance du flux. Il nous est par contre impossible en l'état de relier la valeur de cette puissance ainsi que d'autres paramètres intervenant dans notre raisonnement à des paramètres physiques du problème, et donc de fournir un modèle général du taux de croissance μ basé sur la connaissance de la valeur optimale en batch μ_{max} et des conditions locales d'écoulement. En particulier, il nous manque des connaissances sur les mécanismes gérant les flux de solutés à travers la membrane bactérienne et la façon dont les nutriments sont assimilés.

En ce qui concerne les biofiltres ou d'autres types de procédés à cultures fixées :

- il était déjà acquis que les résultats concernant les mesures de cinétique de croissance en batch ne sont pas applicables directement pour un biofilm mature. D'une part, les profils de concentration en substrat dépendent des phénomènes de transfert de masse à l'interface biofilm/eau. Le taux de croissance apparent du biofilm résulte dans ce cas là de la moyenne de beaucoup de processus intervenant dans le biofilm : effets mécaniques (transport diffusif et convectif dans le biofilm qui dépendent de sa structure) et effets biologiques qui dépendent de l'état physiologique des cellules (*quorum sensing*, *mutation*….).

- pour la phase initiale de colonisation du substrat solide dans un procédé à cultures fixées, nos résultats montrent que les choses sont aussi assez complexes. Les vitesses moyennes à l'échelle des pores sont dans la même gamme que celles observées en micro-cellule. On ne pourra donc pas transposer directement les paramètres cinétiques observés en cultures libres sans tenir en compte des phénomènes de transfert de masse mis en évidence ici. De plus, si on peut définir une vitesse moyenne d'écoulement (vitesse superficielle ou vitesse de pore), il existe aussi des fluctuations de vitesse à l'échelle de pores (Ogawa and Matsuka, 2001). Ces fluctuations auront aussi une influence sur les phénomènes de transfert.

CHAPITRE 6 : DEVELOPPEMENT DE BIOFILMS SUR SUPPORTS SOLIDES

I. Introduction

Dans ce chapitre on montre les résultats d'observations relatives à la mise en œuvre du développement de biofilms en chambre d'écoulement dans des conditions hydrodynamiques bien contrôlées. Il est connu que les biofilms sont capables de modifier leur comportement afin de s'adapter aux conditions hydrodynamiques auxquelles ils sont soumis : arrangement de la structure pour mieux résister aux forts cisaillements (Ex : Peyton *et al.*, 1996; Beyenal et Lewandowsky, 2002; Simoes *et al.*, 2007…) ; modification de l'activité des biofilms pour s'adapter aux conditions de substrat-limitant et/ou oxygène-limitant, etc. L'influence de l'hydrodynamique sur les propriétés mécaniques des biofilms est aussi bien comprise (Ex : Stoodley *et al.*, 1999a; Liu and Tay, 2001, …).

Nous allons dans un premier temps présenter le dispositif expérimental et la technique utilisée. Ensuite nous montrerons des images de biofilms prises à des instants différents au cours de leur évolution. Puis nous en déduirons une tendance générale de la cinétique de colonisation d'une couche de biofilm au cours du temps.

Une fois le biofilm formé, nous examinerons le taux d'occupation surfacique des différentes couches du biofilm (du support jusqu'à la phase planctonique). Puis nous nous intéresserons à une ou plusieurs couches de hauteur fixée par rapport au support d'adhésion pour examiner l'évolution de cette densité surfacique en fonction du temps.

Dans une seconde étape, nous procéderons, par une approche informatique, à une reconstruction 3D des biofilms observées afin d'obtenir des informations supplémentaires sur la structuration globale induite par cisaillement.

II. Dispositif et protocole expérimental

Pour l'étude du développement de biofilms en cellule d'écoulement, la pompe utilisée (fig. 6.1) est une pompe péristaltique (Gilson, M312). Le calcul du débit se fait par calibration en convertissant la vitesse de rotation de la tête de la pompe en débit. Le protocole standard adopté est le suivant : une suspension de bactéries est injectée dans la chambre d'écoulement

préalablement remplie d'un milieu nutritif (LB, oxygène, phénol). Après sédimentation en statique puis adhésion des bactéries selon un temps de contact fixé, on met en œuvre l'écoulement du milieu nutritif, permettant ainsi le transport des nutriments vers les cellules et donc la formation du biofilm.



Figure 6.1 : Système d'écoulement pour le développement de biofilm. Pompage par pompe péristaltique

Pour atteindre l'état de biofilm mature, il faut laisser fonctionner le système pendant plusieurs jours. Pour cela il est nécessaire de faire l'expérience en circuit fermé. Les étapes de préparation de la biomasse, d'injection, de sédimentation, d'adhésion initiale et d'évacuation de la biomasse non fixée sont effectuées dans les mêmes conditions que celles de la mise en œuvre de la colonisation initiale de surface. La seule différence est qu'après la colonisation complète du support, on laisse l'expérience se poursuivre pour atteindre l'état de biofilm.

Dans cette partie on propose de raisonner en termes de débit d'écoulement et non de contrainte pariétale ou de vitesse d'écoulement. En effet, en raison de la présence du biofilm, et de sa structure plus ou moins hétérogène, l'écoulement au niveau des parois va être affecté par l'épaisseur du biofilm (modification des conditions aux limites). En particulier, même si l'écoulement est laminaire, le profil de Poiseuille n'est plus valable et le cisaillement pariétal réel ne peut plus être calculé comme dans les chapitres précédents.

La taille microscopique de la section d'écoulement et la déformabilité du support d'adhésion imposent de travailler à des vitesses d'écoulements relativement basses (par comparaison aux valeurs typiques données dans le), ce qui constitue une limite en termes de débits.-Pour notre étude les protocoles sont réalisés à des gammes de débits comprises entre 25 et 188 µl/min.

Tableau 6.1 : Caractéristiques hydrauliques lors du développement de biofilm

Q [µl/min]		Re [-]		Tw [mPa]	
min	max	min	max	min	max
25	188	0,02	0,18	2,4	17,7

En raison de ces échelles de débits relativement petites, on suppose dans toute cette partie que le régime d'écoulement est parfaitement laminaire ; en effet le nombre de Reynolds (calculé pour une cellule sans biofilm) est compris entre 0,02 et 0,18.

III. Analyse du développement de biofilm sous écoulement

Un premier essai à Q = 25,5 µl/min a permis de vérifier que l'on peut développer un biofilm au moyen de la chambre d'écoulement que nous avons conçue et développée. Ce test avait aussi comme autres objectifs de savoir si un régime stationnaire pouvait être obtenu et dans ce cas quelle épaisseur de biofilms on pouvait atteindre. Le temps de contact initial est de 30 min et correspond à l'adhésion initiale de No bactéries sur le support de verre (fig. 6.2.a). Ainsi à t = 23h, le support de verre est totalement colonisé avec la formation de filaments plus ou moins liés pour former une structure fibreuse et poreuse (6.2.b). A ce stade, le système atteint l'état de biofilm avec la formation d'une structure hétérogène.

(i) L'évolution du système est suivie par des captures d'images et permet de mettre en évidence la croissance bactérienne, c'est-à-dire l'évolution de l'épaisseur du biofilm. La position de la lamelle est considérée comme la référence (Z = 0 µm) ; cette référence sert à identifier la position des autres couches du biofilm.

Avec un équipement de microscopie optique, seules des observations en deux dimensions sont possibles. Pour analyser l'évolution de la structure du biofilm, on a enregistré des images couche par couche. La figure 6.3 représente des photographies de couches cellulaires espacées

successivement de 2 µm (de 0 à 22 µm) ; elles illustrent l'état de développement avancé du biofilm.

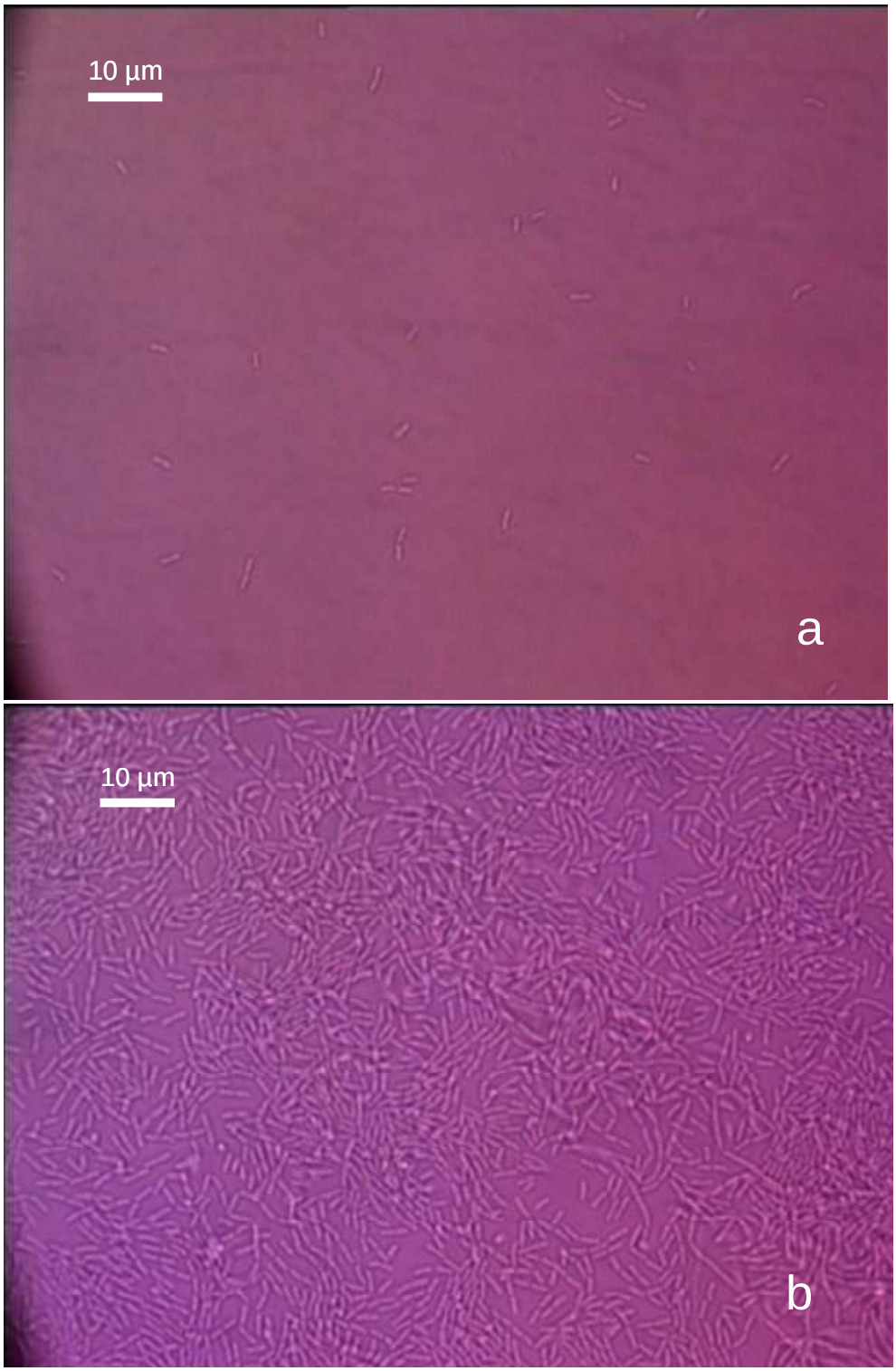


Figure 6.2 : Développement de *P. putida* adhérées sur paroi de verre et soumises à un écoulement cisaillé de milieu LB sans peptone à 20 mg/l de phénol, à très faible débit, Q = 25,5 µl/min, observation à l'objectif 100x à 25 +/- 1 °C. a) t = 30 min : 1eres phases de l'adhésion. b) t = 23h : phases de biofilm.

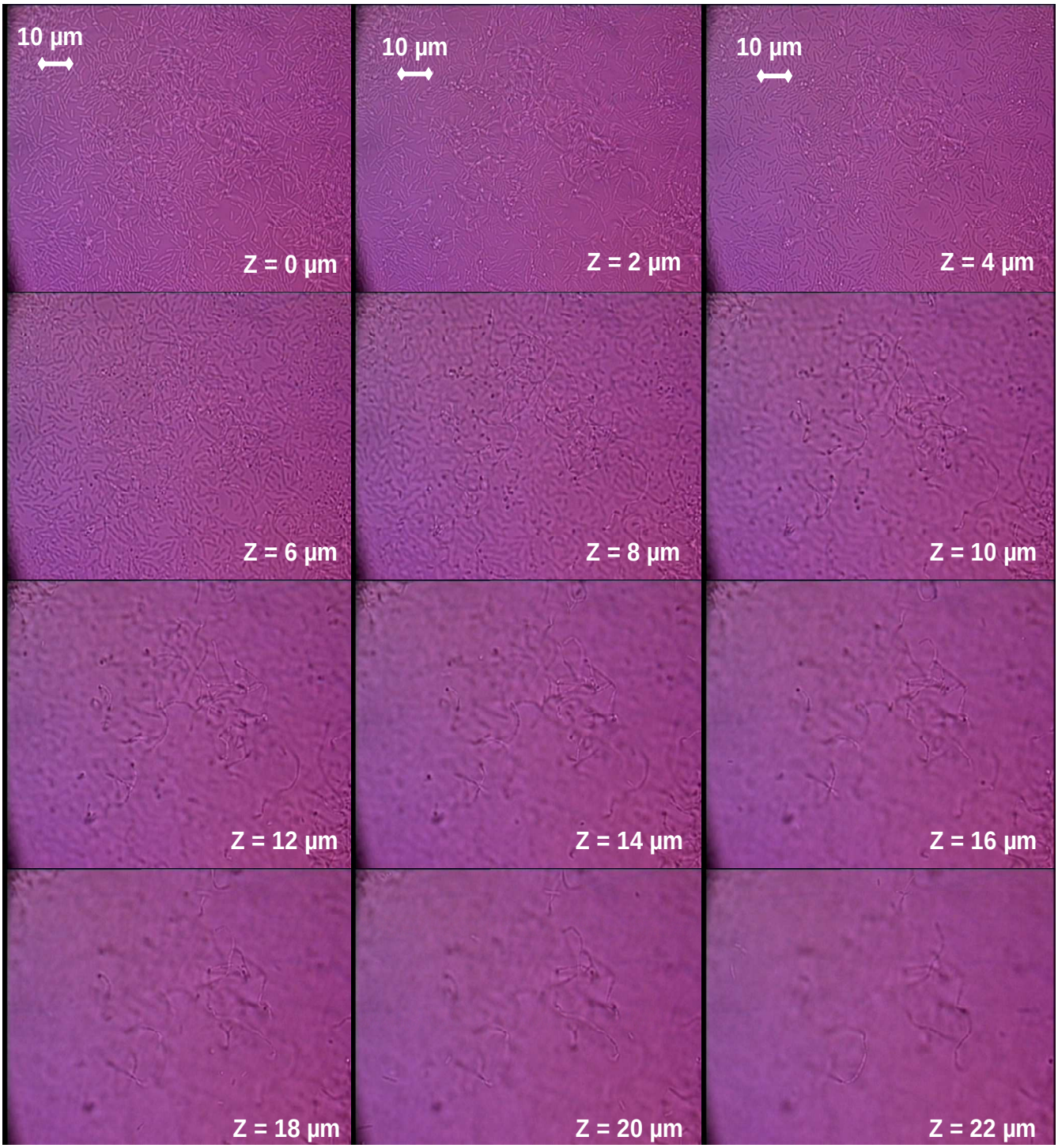


Figure 6.3 : Biofilm de *P. putida* adhéré sur paroi de verre et soumis à un écoulement cisaillé de milieu LB sans peptone à 20 mg/l de phénol, à très faible débit, Q = 25,5 µl/min, observation à l'objectif 100x à 25 +/- 1 °C. Visualisation 3D de la structure du biofilm formé dans une chambre d'écoulement – observation section par section avec un pas de 2 µm – sections de 0 à 22 µm – images prise à t = 23h.

(iii) On constate que la structure du biofilm est de très faible densité avec une tendance à occuper des positions très éloignées du support sans même que les couches internes ne soient totalement colonisées. Cela est la conséquence du débit d'écoulement très faible et donc du très faible cisaillement. En effet ces images ont été prises à un âge du biofilm de

23h, et certains filaments ont déjà poussé jusqu'à une hauteur de 22 µm par rapport au support d'adhésion. Dans tous les cas, on note une structuration aléatoire de ces filaments, du moins à cette condition hydrodynamique caractérisée par une faible vitesse d'écoulement.

(ii) On constate que la densité cellulaire diminue des couches proches de la paroi vers la phase planctonique. Cette densité cellulaire, exprimée ici en pourcentage, est définie comme étant le rapport entre l'aire occupée par la biomasse dans une couche par rapport à l'aire totale observée à travers l'objectif du microscopique. Le profil de variation de la densité cellulaire des couches en fonction de leur position est représenté par la figure 6.4.

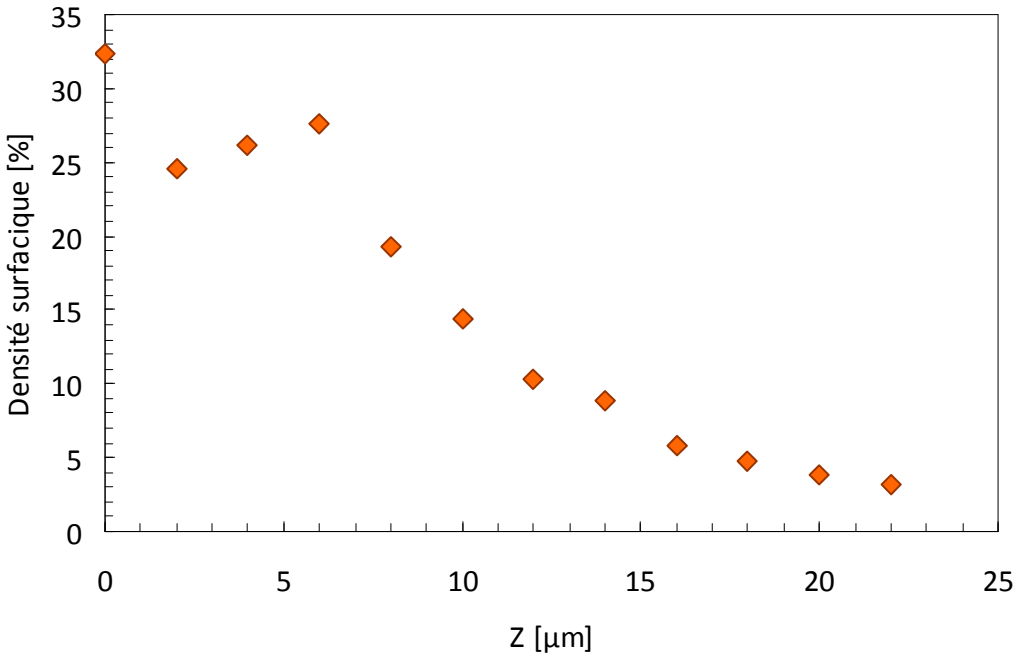


Figure 6.4 : Evolution de la densité cellulaire surfacique n fonction de la hauteur z par rapport au support.

Les photographies sont prises à t = 23 h.

Ce profil indique une forte diminution de la concentration de biomasse du support d'adhésion vers la zone planctonique. En effet la plus grande partie de la biomasse est restée confinée entre la paroi et la couche z = 6 µm. La faible concentration de cellules dans les couches loin de la paroi correspond à des filaments qui poussent verticalement. Cette croissance verticale résulte d'un faible cisaillement.

(iv) On s'est intéressé également dans cette expérience à la cinétique de développement dans une couche de hauteur fixée (ici la couche située à z = 10 µm) pour un biofilm déjà formé. Une première photo est prise à To = 23h30, puis d'autres sont prises à des instants différents jusqu'à To + 6h (fig. 6.5). Le calcul de la densité cellulaire surfacique a permis de caractériser la cinétique de croissance dans cette couche. La couche est progressivement colonisée suite au développement cellulaire et l'évolution temporelle de la densité cellulaire est représentée graphiquement par la figure 6.6. La densité surfacique augmente linéairement avec le temps, de To à To + 2h puis reste constante jusqu'à To + 6h.

Cette stabilisation de la densité surfacique peut être du à une limitation de nutriments (rappelons qu'ici le circuit d'écoulement est fermé, et que le milieu n'est donc pas renouvelé). Il peut également s'expliquer par l'atteinte d'un équilibre entre taux de croissance et taux de détachement. Enfin, il est également connu qu'à partir d'un certain âge de biofilm, la capacité des cellules à réagir vis-à-vis de l'approvisionnement en nutriments peut diminuer progressivement. Cela limiterait la synthèse cellulaire et par conséquent la cinétique d'occupation de la couche comme l'ont démontré certains travaux (Picioreanu, 1998).

L'analyse des densités cellulaires surfacique est simplement à caractère qualitatif ; en effet le faible contraste entre la biomasse et les vides rend difficile le seuillage des images. Sur la figure 6.7 (agrandissement x 10), on observe qualitativement des structures allongées formant des « ligaments » d'environ 200 µm à 500 µm de longueur et de quelques µm à une dizaine de µm de largeur. Ces structures s'organisent autour de « trous » de 200 à 300 µm de long et de 80 à 110 µm de large.

L'observation localisée de ces structures à une échelle plus petite (agrandissement 40X) révèle qu'elles sont constituées de nombreux canaux vides et de structures également allongées (dendrites) dans la direction de l'écoulement. C'est le cas montré dans les figures 6.8 et 6.9 correspondant aux temps t = 7 j et t = 8 j respectivement.

Ces observations semblables à deux échelles différentes indiquent une structure fractale comme observé par (Harshey, 2003) sur des biofilms générés par d'autres micro-organismes (*C. sporogenes* et *V. parahaemolyticus).*

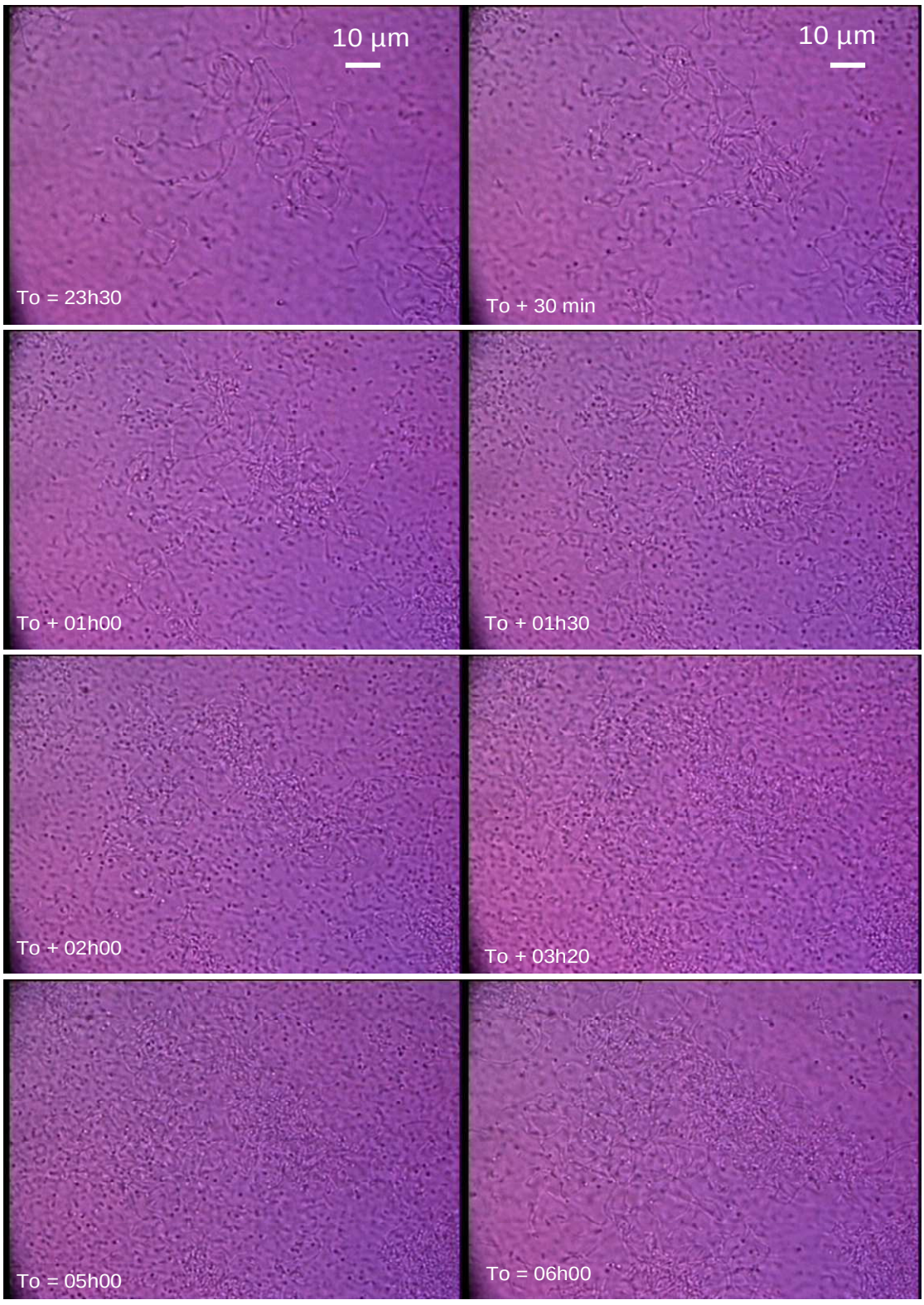


Figure 6.5 : Biofilm de *P. putida* adhéré sur paroi de verre et soumis à un écoulement cisaillé de milieu LB sans peptone à 20 mg/l de phénol, à très faible débit, Q = 25,5 µl/min, observation à l'objectif 100x à 25 +/- 1 °C. Evolution en fonction du temps de la densité cellulaire surfacique au niveau de la couche située à z = 10 µm par rapport au support d'adhésion. suivi à partir de To = 23h30min.

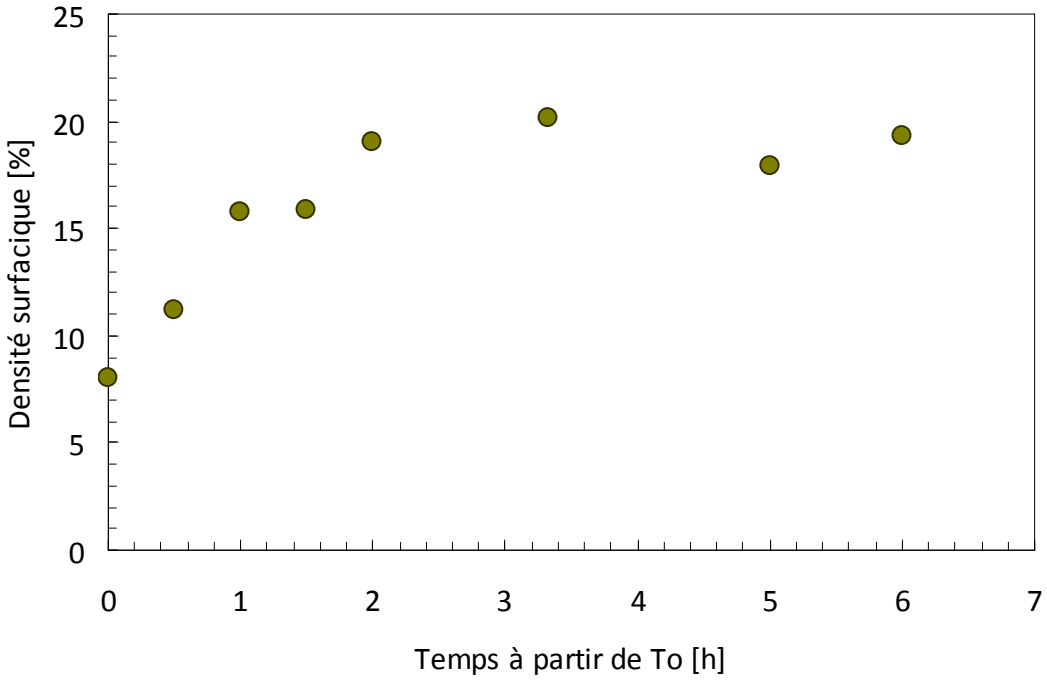


Figure 6.6 : Evolution de la densité cellulaire à z = 10 µm en fonction du temps à partir de To = 23h30min.

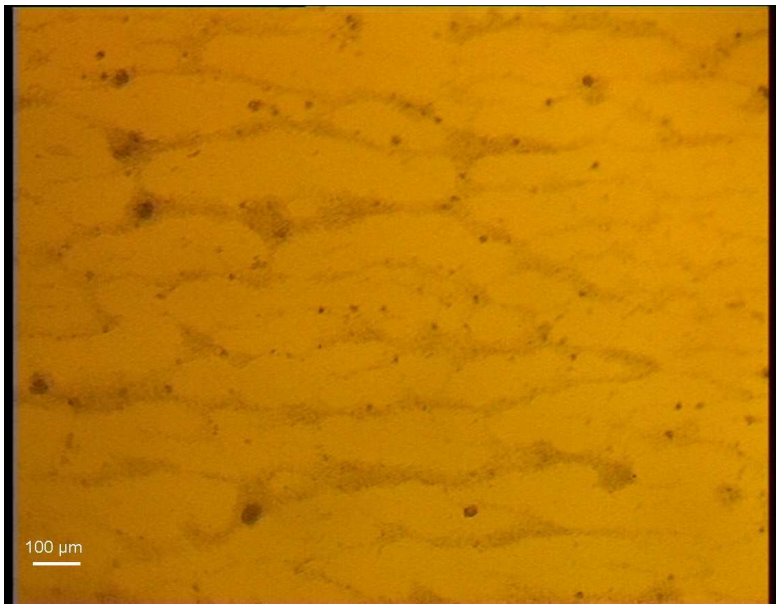


Figure 6.7 : Age = 7 j - Structure de biofilms de *P. putida* sous écoulement à 160 µl/min et adhérés sur support de verre. Mise en évidence de l'arrangement selon la direction de l'écoulement. Agrandissement 10x.

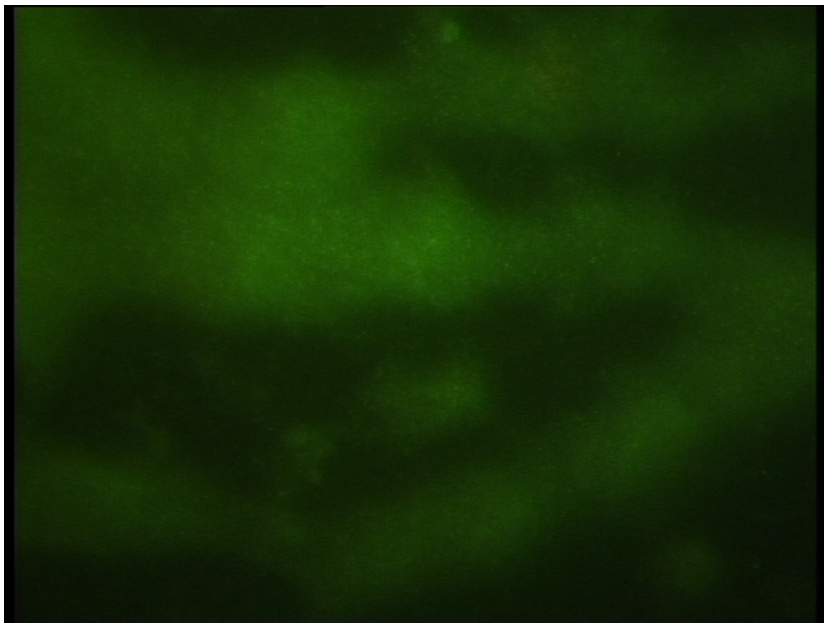


Figure 6.8 : Age = 7 j - Structure de biofilms de P. putida sous écoulement à 160 µl/min et adhérés sur support de verre. Age = 7 j - Arrangement de la structure dans la direction de l'écoulement ; observations effectuées après fluorescence Live/Dead ; agrandissement 40X.

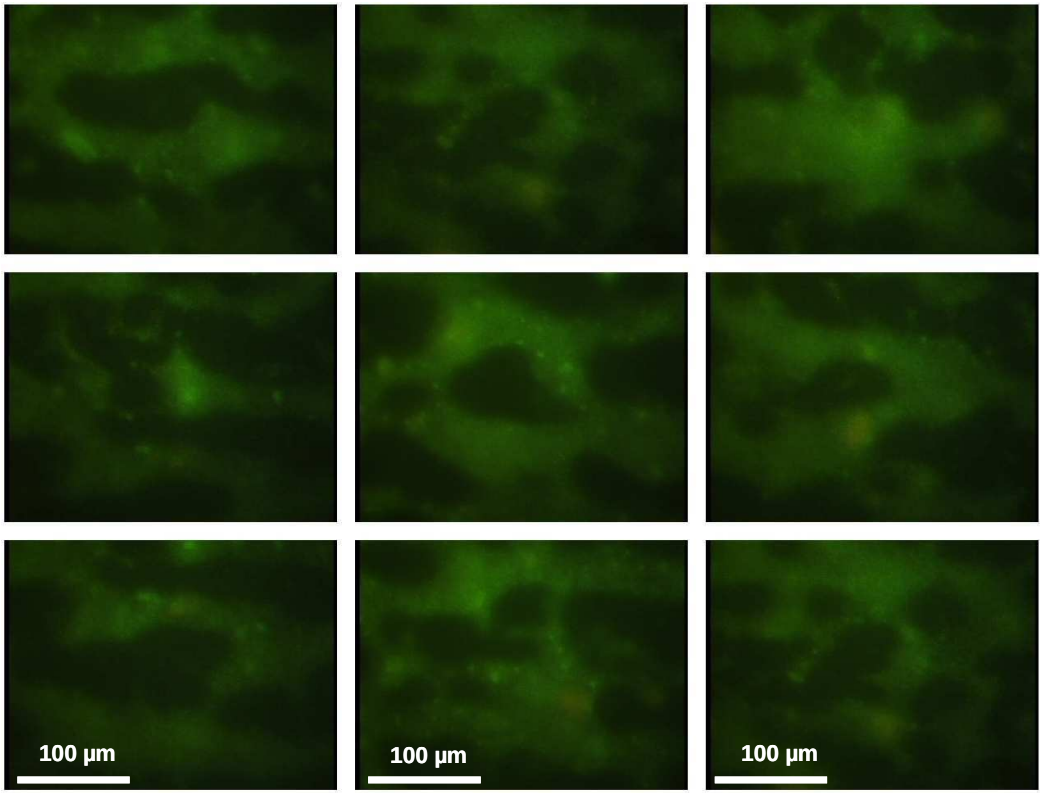


Figure 6.9 : - Structure de biofilms de P. putida sous écoulement à 160 µl/min et adhérés sur support de verre. Age = 8 j - Arrangement de la structure dans la direction de l'écoulement ; observations effectuées après fluorescence Live/Dead ; agrandissement 40X ; à différentes positions

Il est difficile de généraliser ces observations. Ainsi, dans le cas de biofilms formés sans écoulement sur boîte de Pétri (fig. 6.10), selon la souche étudiée, les biofilms s'organisent en structures très variables, ces structures étant contrôlées par différents processus microbiologiques (chimiotactisme = molécules chimiques spécifiques, changement de phénotype (voire mutation) qui contrôlent la mobilité des cellules (Mc Carter, 1999). A ces différentes stratégies de développement se rajouteront des couplages avec l'hydrodynamique (développement de structures dans le sens privilégié de l'écoulement, effet du cisaillement etc.) qui peuvent être à l'origine de la structure spatiale que nous observons. Par exemple, Beyenal and Lewandowski (2002) invoquent une réponse à la contrainte de cisaillement pour limiter les phénomènes de détachement mais également pour contrôler le transfert de masse. Il existe donc un phénomène d'« autorégulation » et d'adaptation du biofilm (qui fait intervenir l'activité bactérienne et sa réponse à un stress extérieur) dont les couplages avec l'hydrodynamique sont difficiles à généraliser voire à complètement expliquer sur la base des observations.

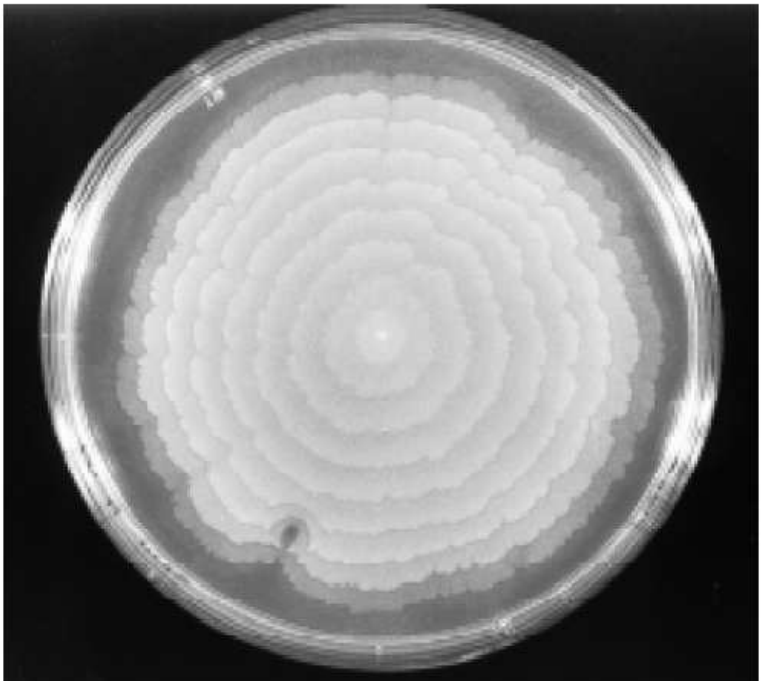


Figure 6.10 : Mise en évidence de la mobilité et de l'organisation d'un biofilm développé sur milieu de culture solide - Biofilm de *V. parahaemolyticus* incubé pendant 5 jours (d'après Mc Carter, 1999).

Pour mieux observer la structure nous avons testé l'application de la fluorescence Live-Dead (*Molecular Probes Inc., USA* ; cf. annexe F). Le marqueur utilisé est un mélange 1/1 de deux fluorophores (Syto9 et Iodure de Propidium). L'avantage de ce marquage est qu'il laisse intègre la structure des membranes bactériennes et qu'il permet en même temps d'estimer la viabilité

du biofilm (Annexe F). En effet, les bactéries vivantes apparaissent vertes suite à l'action du fluorophore Syto9 et les mortes apparaissent rouges grâce à l'action de l'Iodure de Propidium. Les figures 6.8 et 6.9 montrent une très bonne viabilité des biofilms développés lors de cette étude.

IV. Déploiement d'une méthodologie d'étude du développement 3D d'un biofilm sous écoulement

IV.1- Reconstruction 3D de la structure de biofilms

L'une des limites majeures de la microscopie optique directe est qu'elle ne permet pas d'observer directement la structure tridimensionnelle des biofilms. Seules sont possibles des observations 2D des différentes couches, ce qui ne permet pas d'aller plus loin dans l'analyse du développement de biofilms. Pour pouvoir contourner cette limite, une approche informatique a été développée et mise en œuvre pour permettre, à partir d'une séquence d'images prises à des hauteurs successives d'un biovolume, de restituer la structure 3D de ce dernier. Ainsi, à défaut de disposer de moyens et techniques plus sophistiquées telles que la microscopie confocale ou la tomographie X, on peut décrire la structure spatiale d'un biofilm à partir de cette technique.

Dans notre cas, un biofilm a été développé jusqu'à une épaisseur de 44 µm. Nos observations ont été effectuées avec un microscope optique à objectif inversé muni de l'objectif 40x (modèle UPLFLN, Olympus). Pour ce dispositif optique, la structure globale du biofilm ne peut pas être observée instantanément sur toute son épaisseur. La portion d'épaisseur de biofilm visible de manière nette au moyen de l'objectif, notée *d*, est appelée profondeur de champ et est donnée par l'expression suivante :

$$d = \frac{\lambda . n}{Na^2}$$

Dans cette relation, λ est la longueur d'onde d'excitation Live-Dead (λ = 0,470 µm, cf. annexe F), n l'indice de réfraction du milieu d'immersion (ici n = 1 car l'objectif n'est pas à immersion) et *Na* l'ouverture numérique de l'objectif utilisé (ici Na = 0,75). La profondeur de champ résultant est de 0,835 µm.

Comme nous l'avons constaté ci-dessus, les biofilms peuvent être considérés comme des milieux poreux non transparents, à surface rugueuse et dont la microstructure offre un réseau tridimensionnel de fibres et/ou de filaments s'étendant sur quelques dizaines de microns. Cet aspect d'irrégularité et de non transparence de la microstructure affecte l'efficacité de la méthode d'observation utilisée qui est elle-même une technique invasive.

Nous adoptons une méthode de reconstruction 3D qui permet d'observer toute la structure spatiale du biofilm tout en contournant les difficultés expliquées ci-dessus. La méthode comporte les étapes suivantes :

1ère étape : **Acquisition d'images 2D**

Ici les images sont prises entre z = 0 (couche de biofilm en contact avec le support d'adhésion) et z = 44 µm avec un intervalle de 1 µm entre chaque image (figure 6.11).

L'observation est faite avec l'objectif 40x avec donc une profondeur de champ de 0,835 µm. Cela montre donc que l'intervalle de 1 µm entre deux images est largement suffisant pour que l'observation d'une couche de biofilm ne soit pas perturbée par la présence des couches voisines situées à 1 µm en dessous et au-dessus.

2ème étape : Traitement des images

Les images originales 2D sont importées dans Image J, codées sur 8 bits, seuillées puis leur format est adapté afin de pouvoir mettre en œuvre la reconstruction 3D.

3ème étape : Superposition des images et génération de la structure 3D

Un code Matlab permet ensuite d'effectuer la superposition des images et de générer un fichier de format RAW, qui est à son tour importé dans image J qui affiche la structure 3D du biofilm. La figure 6.12 montre de structures issues de la reconstruction 3D.

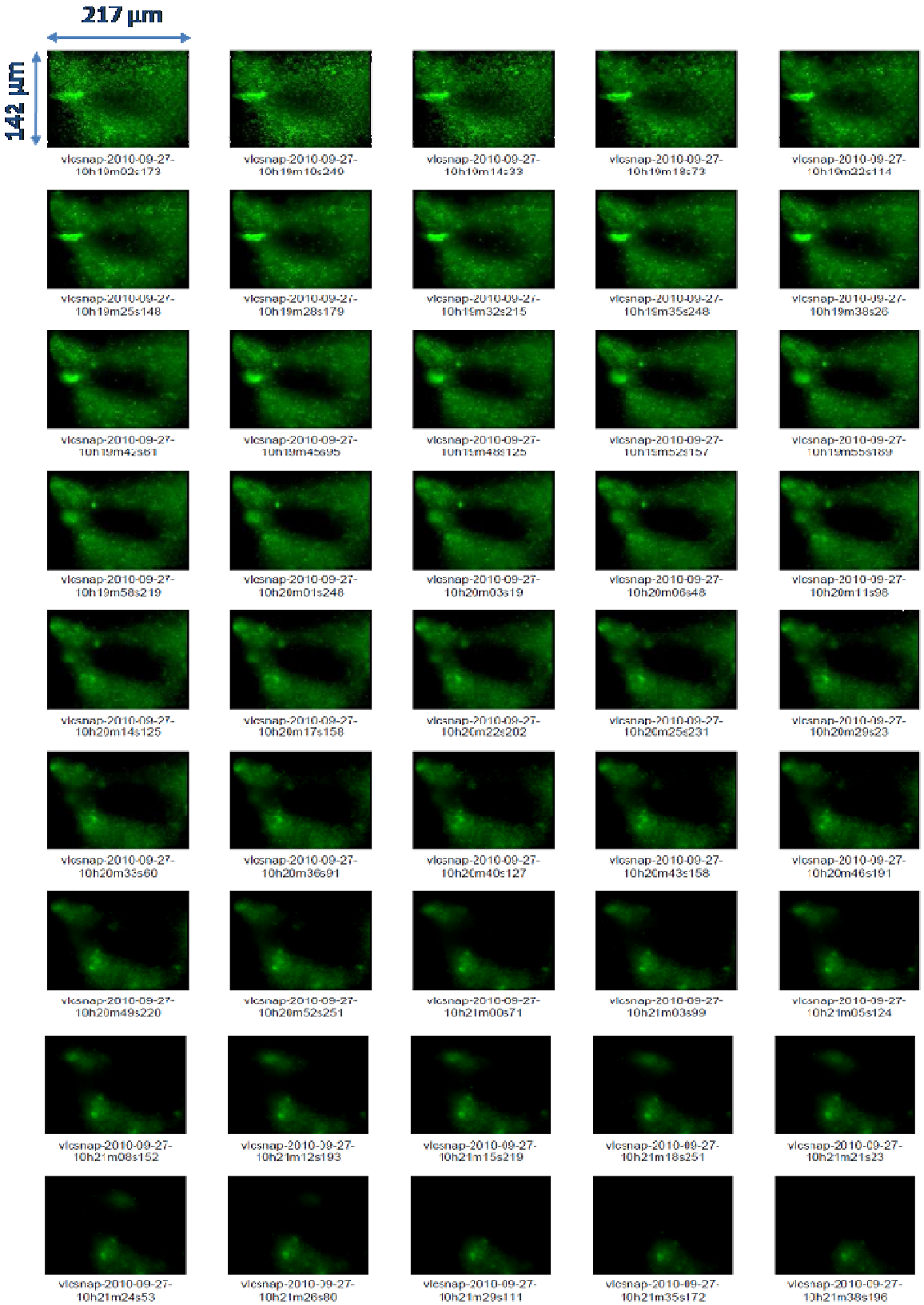


Figure 6.11 : Séquence d'images choisies pour la reconstruction 3D et situées entre 0 et 44 µm. Biofilm développé à 188 µl/min et observé en fluorescence « Live-Dead ».

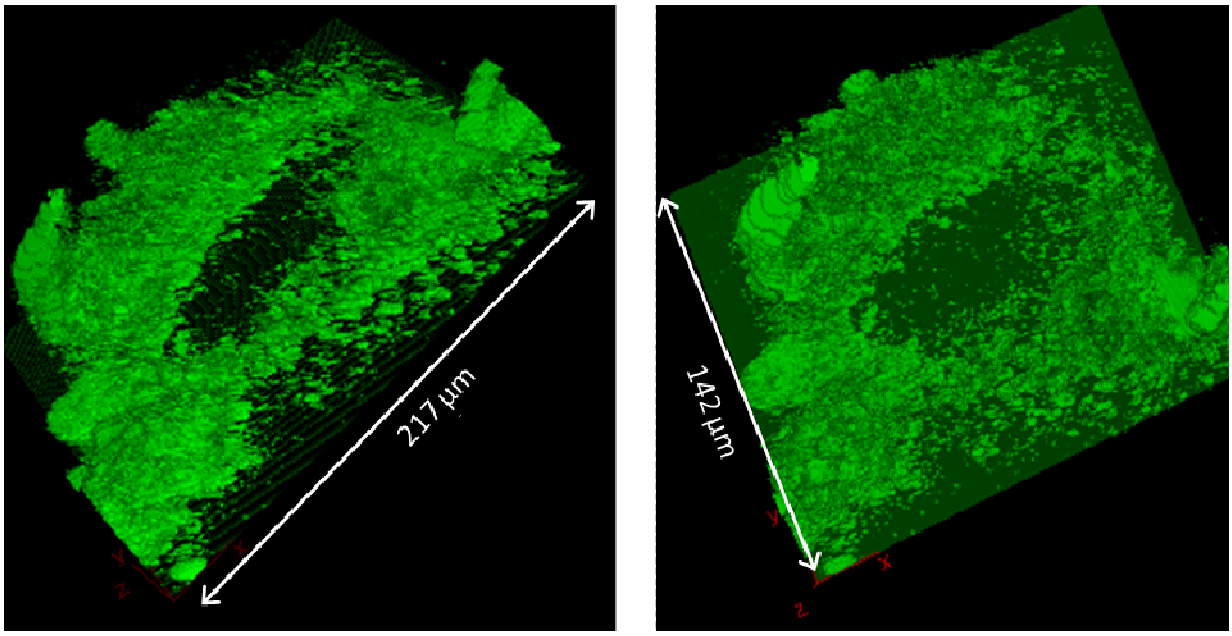


Figure 6.12 : Structure 3D construite à partir de photographies de couches de biofilm réel développé sous écoulement.

Comme on le voit, cette technique est très efficace pour restituer la structure tridimensionnelle du biofilm, avec la présence de structures en forme de dendrites qu'on ne pouvait pas observer dans leur globalité simplement avec la microscopie optique directe. Ces structures sont bien typiques des biofilms hétérogènes souvent observés dans des conditions de très faibles nombres de Reynolds.

L'objectif à moyen terme est d'utiliser cette reconstruction 3D et l'intégrer dans un code numérique de calcul d'écoulement. Ceci permettra la simulation de l'écoulement à travers les structures tridimensionnelles mises en évidence.

IV.2-Simulation de l'écoulement dans une portion de biofilm/ perméabilité locale

A partir de cette reconstruction 3D, nous avons essayé d'estimer quel était l'impact du biofilm sur l'hydrodynamique en termes de frottement ou perte de charge. Etant donné les résolutions spatiales nécessaires et le volume de données à manipuler (en particulier pour le maillage et la définition de la zone correspondant au biofilm), les logiciels classiques de CFD (Computational

Fluid Dynamics) ne sont pas forcément adaptés. Dans le travail présenté ici, nous avons utilisé le logiciel de calcul *GeoDict* pour simuler l'écoulement local au sein de la structure 3D. Ce logiciel est un logiciel destiné initialement à faire des simulations sur des reconstructions issues de mesures tomographiques hautes résolutions. Ce logiciel permet de résoudre les équations de Stokes en utilisant la méthode des volumes finis.

Nous serons limités par certaines contraintes techniques dues aux applications visées par ce logiciel et le calcul présenté a pour but surtout de donner des ordres de grandeur.

Une première contrainte dont nous devons tenir compte est la nécessité, pour le logiciel *Geodict* d'avoir des voxels de tailles isométriques, c'est-à-dire dont la résolution spatiale est la même dans les trois directions. Or, lorsque les images du biofilm ont été prises, la distance entre 2 coupes n'est pas forcément égale à la résolution spatiale des images. Dans notre cas les images sont prises avec un pas de 1 µm, soit une résolution de 0,33 µm/pixel environ. Entre deux plans, dans la procédure de reconstruction présentée au paragraphe IV.1, certaines images ont donc été dupliquées pour obtenir une reconstruction respectant les conditions d'isométricité. L'image 3D présentée au chapitre précédent (figure 6.12) représente au final une structure de données de taille N = 700 x 556 x 280 voxels.

L'idéal aurait été de simuler une configuration sur un volume correspondant à la hauteur totale de la cellule d'écoulement. Nous aurions pu ainsi accéder aux champs de vitesse dans la cellule, en particulier les profils de vitesses longitudinales sur une verticale et comparer la moyenne de ces profils et les gradients pariétaux à leurs équivalents pour un écoulement de Poiseuille.

Il n'est malheureusement pas possible pour l'instant de faire ce calcul complet. Pour faire un calcul complet sur la hauteur totale de la cellule, il faudrait rajouter au volume correspondant à la zone colonisée par le biofilm, un volume correspondant à la zone d'écoulement libre dans la cellule. La hauteur totale faisant 250 µm, la structure de données à manipuler aurait été considérable étant donné la contrainte sur l'isométricité des voxels imposée par le logiciel : la reconstruction 3D du biofilm représente à elle seule 4 x N données (le facteur 4 provenant des 4 champs à calculer, vitesses u, v, w et pression p). La simulation complète du champ de vitesses en rajoutant la zone d'écoulement libre nous est inaccessible pour l'instant avec les moyens de calculs dont nous disposons.

Le calcul que nous présentons correspond à un calcul d'écoulement sur le biofilm seul, en considérant des conditions de périodicité sur chaque face du volume. On suppose également des conditions de flux nul à la surface du biofilm. Du fait de ces conditions aux limites, on ne simule pas exactement ce qui se passe dans la micro-cellule d'écoulement. L'idée de ce calcul simplifié est de donner des ordres de grandeur de la porosité et de la perméabilité du milieu en fonction de l'occupation du volume de contrôle par le biofilm. On s'intéressera donc ici à la perméabilité

« équivalente » du milieu. Pour cela, un gradient de pression est imposé entre les faces amont et aval du volume de contrôle. Les champs de vitesse et de pression sont alors calculés. Le temps de calcul a été de 20 h environ pour une telle géométrie et de telles conditions aux limites.

IV.3-Discussion

La figure 6.13 présente le champ des vitesses longitudinales obtenu par le calcul.

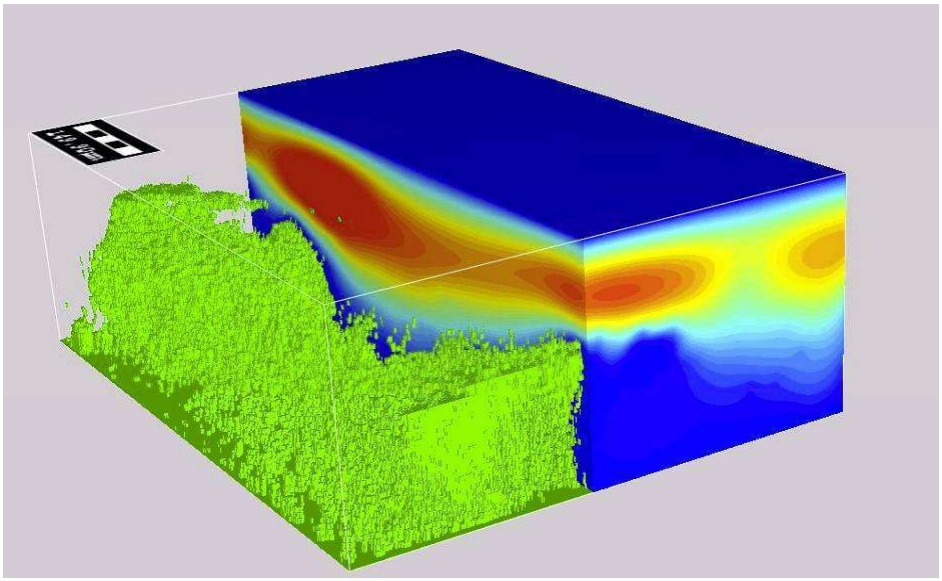


Figure 6.13 : Simulation numérique de la distribution du champ des vitesses longitudinales

Etant donné les nombres de Reynolds auxquels nous travaillons, peu importe la valeur numérique exacte du gradient de pression imposé : le système a un comportement linéaire à ces nombre de Reynolds (régime laminaire) et le gradient de pression est proportionnel à la vitesse moyenne dans le volume de contrôle. Ce coefficient de proportionnalité est la valeur de la perméabilité recherchée. De même sur la figure, les champs de vitesses sont normalisés, la vitesse maximale normée (1) correspondant à la couleur rouge, la valeur minimale (0) à la valeur bleue.

Ce calcul simplifié qui n'a pas, rappelons-le, pour but de simuler parfaitement l'écoulement dans la micro-cellule colonisée par le biofilm, il permet néanmoins de tirer des enseignements très intéressants quant à l'impact du biofilm sur certains paramètres globaux. Nous raisonnerons pour cela en terme de ratio par rapport au volume de contrôle non colonisé : en supposant un écoulement 2D plan dans le volume de calcul, on peut ainsi montrer aisément que la perméabilité du milieu non colonisée est égale à $Ko = h^2/12$ où h est la profondeur de la cellule (égale à l'épaisseur maximale du biofilm dans notre cas).

Le rapport K/Ko des perméabilités ainsi obtenu est égal à 0,113 dans nos conditions de calculs. L'espace vide de biofilm dans le volume de mesure (c'est-à-dire la macro-porosité dans le volume élémentaire étudié) a en outre été estimé à 83,95 % grâce à certaines fonctionnalités du logiciel.

In fine, on obtient donc une réduction de perméabilité d'un facteur 10 pour une porosité relative de 0,84 environ.

Toujours dans l'optique d'avoir des ordres de grandeur, imaginons que le biofilm soit uniformément réparti sur la paroi inférieure du micro canal considéré. L'épaisseur a correspondante (en supposant un biofilm compact, non poreux) est alors $a = h(1- \varepsilon)$ où ε est la porosité du milieu (égale à 0,84 ici). La perméabilité du volume considéré (en conservant les mêmes hypothèses pour les conditions aux limites) serait alors égale à $K' = \varepsilon^2 h^2 /12$ soit un rapport $K'/Ko = \varepsilon^2 = 0,7$ et une réduction de perméabilité d'un facteur 1,42 seulement.

On voit donc qu'à porosité égale, la distribution de matière dans le volume considéré influence de manière non négligeable la perte d'énergie. L'influence de cette microstructure s'explique par l'augmentation de l'aire interfaciale et les perturbations locales engendrées sur les champs de vitesses (accélération, courants de retour).

Comme aussi évoqué dans le chapitre bibliographique, ce calcul montre que si on effectue des simulations numériques d'un milieu colonisé par un biofilm à des échelles de l'ordre du pore comme le modèle de Kapellos (2007), il est primordial de bien capturer la microstructure et la distribution de la biomasse dans les pores. Les lois de propagation du biofilm lors de sa croissance (comme celles introduites lorsque l'on utilise des automates cellulaires) ainsi que les mécanismes de détachement, transport et recapture de fragments de biofilms sont des points clés pour représenter correctement cette distribution. Or ces mécanismes sont, comme nous l'avons déjà dit encore assez mal compris avec un degré d'empirisme non négligeable notamment dans les méthodes simulant les biofilms par automates cellulaires (ou d'autres techniques plus ou moins équivalentes).

A une échelle plus macroscopique, chercher une relation liant la perméabilité K du milieu à un paramètre global comme la porosité n'est donc pas suffisant et il faudrait introduire des paramètres permettant de prendre en compte simplement la microstructure et la distribution de la biomasse dans ce type de relations. Ce calcul montre en particulier que les modèles théoriques basés sur une distribution uniforme du biofilm sur les parois des pores, ou supposant implicitement une telle distribution, sont inadaptés pour rendre compte des couplages entre la croissance du biofilm et l'hydrodynamique. Et que les écarts observés, sans aller chercher d'autres mécanismes liés à des effets rhéologiques ou autres, peuvent être attribués assez largement aux hypothèses prises quant à la distribution de la biomasse.

IV.4- Perspectives d'utilisation de la reconstruction 3D pour l'étude des couplages hydrodynamique-croissance de biofilm.

En l'état actuel, la reconstruction 3D dont nous disposons est une reconstruction 3D locale prise sur une portion particulière du biofilm. Il est possible de simuler l'écoulement à l'intérieur de la structure qui a été reconstruite afin d'en tirer des informations sur les distributions locales de vitesses, la distribution des contraintes de cisaillement ou de pression, le frottement moyen, la perméabilité etc.

Nous avons présenté dans ce paragraphe la faisabilité d'étudier finement certains couplages entre la structuration d'un biofilm sous écoulement et l'hydrodynamique du système.

Nous avons été capables de faire une reconstruction 3D de la structure d'un biofilm sans avoir recours à la microscopie confocale. Bien que cette technique de reconstruction demande à être améliorée (en particulier en termes de technique de fluorescence et de seuillage des images), les résultats sont qualitativement en accord avec ce que l'on attend en termes d'hétérogénéité du biofilm aux nombre de Reynolds explorés.

Grâce à cette reconstruction 3D, nous avons pu avoir accès à la porosité du volume de contrôle observé, simuler les vitesses locales dans le biofilm et enfin calculer les effets du biofilm sur la perte de charge locale. Bien que la procédure de calcul doive là aussi encore être améliorée (certaines hypothèses de calcul, notamment au niveau des conditions aux limites sont relativement simplistes), il s'agit à notre connaissance d'un des premiers calculs effectués à partir d'un biofilm réel. Et les perspectives engendrées par un tel calcul sont prometteuses.

Ainsi, les ordres de grandeur obtenus en termes de réduction de perméabilité sont qualitativement en accord avec l'hypothèse d'une influence majeure de la microstructure sur la perte d'énergie.

Pour obtenir des quantités significatives qui puissent se comparer à des mesures globales effectuées à macro-échelle, outre la simulation de l'écoulement complet au-dessus du biofilm pour être plus réalistes et proches des conditions dans la chambre d'écoulement, il faut moyenner ces informations sur un volume élémentaire représentatif (VER) qui reste à déterminer. D'après les résultats présentés au paragraphe III, figure 6.7, pour un biofilm cultivé dans des conditions de débits proches de la figure 6.12, ce volume devrait avoir au moins une surface de l'ordre de 500 µm x 200 µm, taille typique des structures périodiques observées à cette échelle. Dans ce cas précis, cela ne représente donc pas une surface énorme à balayer comparé aux images utilisées pour la reconstruction 3D. Nous n'avons pas pu procéder à cette étude : un système de déplacement automatisé et reproductible de la cellule d'écoulement sous le microscope doit encore être développé et n'était pas disponible au moment de la thèse. Enfin, comme déjà évoqué dans le paragraphe précédent, ce travail demandera aussi une puissance de calcul largement supérieure à celle dont nous disposons actuellement.

V. Conclusion

Dans cette étude, l'objectif était de suivre le développement de biofilms en chambre d'écoulement à faible cisaillement. Au préalable, la croissance du biofilm est étudiée en suivant la cinétique d'évolution de l'épaisseur du biofilm et de la densité cellulaire surfacique sur les différentes couches en fonction du temps. Le résultat indique une cinétique de croissance rapide au début mais qui se stabilise dans le temps ; il est également constaté que la densité surfacique baisse rapidement des couches internes vers les couches externes du biofilm.

L'étude révèle également, comme déjà montré auparavant dans certains travaux de recherche, l'organisation de biofilms en réponse à l'écoulement, même à faible débit.

La technique de reconstruction 3D développée et mise en œuvre en complément de la microscopie optique directe a permis de pouvoir mieux interpréter l'architecture globale de biofilms sans forcément passer par l'utilisation de techniques plus sophistiquées (mais plus onéreuses) comme la microscopie confocale ou électronique à balayage. Elle a permis de simuler l'écoulement local dans l'espace interstitiel à l'intérieur du biofilm et constitue donc un outil efficace pour décrire quantitativement les pertes de charge. Par des méthodes de changement

d’échelle, elle permettra à terme d’avoir des outils d’interprétation des mesures globales sur pilote à partir d’informations à l’échelle locale sur le biofilm.

CHAPITRE 7 : CONCLUSION GENERALE, BILAN ET PERSPECTIVES

I. Conclusion générale

La motivation initiale de ce travail de recherche concerne à long terme la modélisation objective de certains bioprocédés à cultures fixées, en particulier les biofiltres. La modélisation de ces systèmes est plus complexe que celle de leurs analogues à cultures libres, du fait de la présence d'un biofilm et des interactions très fortes entre la croissance du biofilm et l'écoulement.

Selon un travail précédent effectué au LEGI (Karrabi, 2009 ; Karrabi *et al.,* 2011), et les résultats trouvées dans la littérature, il est apparu que cette tâche nécessitait des investigations à petites échelles sur la croissance des biofilms sous écoulement.

Notre travail s'est ainsi focalisé sur l'étude à l'échelle microscopique de certains mécanismes liés à la croissance bactérienne de *Pseudomonas putida* 6521 en présence de phénol sous l'effet d'écoulements cisaillés. Nous nous sommes placés dans des conditions de nombre de Reynolds représentatifs de ceux rencontrés typiquement à l'échelle des pores dans ce type de procédés.

Le choix du couple *Putida/phénol* est justifié par le fait que la thèse de Karrabi utilisait cette souche, dont les applications industrielles pour l'élimination de composés phénolés sont avérées.

La mise en œuvre de la croissance de *P. putida* en cultures libres en milieu LB a permis de déterminer les conditions optimales de croissance de la souche, et son affinité par rapport au phénol qui a été choisi comme modèle de polluant carboné. Le milieu LB étant riche en nutriments, la mise en culture libre a permis d'imposer des conditions non limitantes pour le carbone lors des études en chambre d'écoulement.

Pour mettre en œuvre la croissance en cultures fixées en conditions de cisaillement contrôlées, une chambre d'écoulement à parois planes et parallèles a été conçue et développée dans l'optique d'y mener des investigations *in-situ* des mécanismes ci-dessus cités, au moyen d'un équipement de microscopie optique.

La caractérisation de l'hydrodynamique dans cette chambre d'écoulement par la méthode PTV (Particle Tracking Velocimetry) a été effectuée afin de pouvoir contrôler efficacement les contraintes de cisaillement appliquées à la biomasse adhérée. Des mesures expérimentales ont confirmé que le régime hydrodynamique y est parfaitement laminaire et de nature bidimensionnelle dans la zone d'observation des processus mis en œuvre.

Pour étudier les mécanismes de croissance sous écoulement dans des conditions optimales, une étude préliminaire a concernée certains phénomènes impliqués dans l'adhésion cellulaire. En effet, généralement, la formation d'un biofilm est un processus précédé de 3 phases initiales qui sont successivement : l'adhésion réversible, la consolidation (ou adhésion irréversible) et la colonisation du support d'adhésion (ou croissance de cellules individuelles). Il est connu depuis longtemps que ces mécanismes sont contrôlés principalement par la combinaison complexe entre 3 facteurs : la nature du modèle biologique, celle du support d'adhésion et les conditions environnementales dans lesquelles intervient l'adhésion. Pour estimer la capacité d'adhésion bactérienne sur supports solides dans les conditions dans lesquelles ont été effectuées les études de croissance bactérienne, des expériences de détachement à différentes conditions physico-chimiques ont été menées.

Lors de ces expériences nous avons examiné les différents paramètres pertinents susceptibles d'influencer les processus de colonisation de biofiltre. Ces paramètres sont l'intensité du cisaillement, le temps de contact initial après déposition des bactéries sur le support, les conditions physico-chimiques du milieu en écoulement. Ces expériences préliminaires ont montré que, à nature de support fixé, les conditions hydrodynamiques et physicochimiques dans lesquelles se sont déroulées les expériences de croissance limitent de façon drastique le détachement cellulaire. En effet, il a fallu imposer des cisaillements largement supérieurs à ceux rencontrés dans les conditions envisagées pour pouvoir observer un détachement cellulaire significatif : les cinétiques de croissance obtenues dans toute la gamme de cisaillements appliqués lors de nos expériences ne sont donc pas affectées par des processus de détachement.

Au-delà de ces aspects préliminaires, ces expériences ont permis en outre de déceler les résultats suivants :

(i) l'adhésion des cellules bactériennes est renforcée quand la force ionique ou la valence des ions présents en suspension augmente ; (ii) Le caractère discontinu du détachement a aussi été mis en évidence : le détachement intervient lorsqu'un seuil de contrainte est atteint (iii) Enfin, l'adhésion des cellules bactériennes est renforcée si leur temps de contact initial sur le support d'adhésion, avant application du cisaillement, est plus long. Une fois la bactérie en contact avec le support en effet, elle met en œuvre divers processus biologiques, parmi lesquels la sécrétion au cours du temps de biopolymères et d'autres molécules appelées adhésines dont le rôle est de consolider progressivement l'adhésion sur la surface. La contrainte seuil critique apparaît donc dépendre de l'histoire de la cellule bactérienne en particulier le temps de contact.

Ces études devront être étendues à des supports dont la nature est proche de ceux rencontrés dans les biofiltres industriels. En effet, selon que la nature du support (et les interactions physico-chimiques qui en résultent) autorise un détachement significatif à des nombres de

Reynolds (ou cisaillement) plus faibles que ceux nécessaires dans notre étude, un modèle permettant de prédire la colonisation initiale d'un bioréacteur à cultures fixées devra prendre en compte ces phénomènes, en particulier un seuil de contrainte dépendant de l'histoire vécue par la cellule bactérienne. Ou alors, une simple modélisation basée seulement sur la probabilité de contact entre bactérie et support solide sera suffisant (hypothèse prise dans le modèle de Kapellos (2007) par exemple).

Des expériences de colonisation de surface en régime laminaire ont aussi été menées, dans les phases précédant la formation du biofilm proprement dit. Ces expériences, bien reproductibles, ont été menées de telle sorte à s'affranchir de phénomènes de limitations en nutriments et en oxygène (milieu continuellement renouvelé et saturé en oxygène). Le taux de croissance, du fait de phénomènes de détachement limité voire inexistant dans nos conditions hydrodynamique, a pu être calculé. Ce paramètre suit bien une loi exponentielle ce qui correspond à un taux de croissance μ maximum, *a priori* indépendant des conditions hydrodynamiques en conditions non limitantes. Cependant, les résultats ont montré une augmentation de ce paramètre avec la vitesse d'écoulement, dans la gamme des faibles nombre de Reynolds étudiée. Le paramètre cinétique tend ensuite vers sa valeur obtenue en cultures libres. Nous ne pensons pas qu'il s'agit d'un effet direct du cisaillement sur le métabolisme des cellules étant donné les faibles cisaillements mis en jeu. Un raisonnement simple basé sur l'existence d'une couche limite de concentration au niveau de la cellule bactérienne (qui limite les transferts de masse), ainsi que l'analyse des données expérimentales ont permis de montrer que le taux de croissance suit une loi puissance en nombre de Reynolds. Dans l'hypothèse d'une croissance limitée par des effets de transferts de masse, le taux de croissance devrait en outre évoluer en suivant une loi de puissance du nombre de Reynolds. Il n'est pas possible pour l'instant de dégager un modèle général pour la croissance de cellules adhérées mais ces gammes de nombre de Reynolds pouvant se retrouver dans les applications industrielles envisagées, cette dépendance devra être prise en compte. Ainsi, les lois de croissance utilisées dans les modèles (par exemple Kildsgaard *et al.,* 2001, Brovelli *et al.,* 2009), en particulier dans les instants initiaux de colonisation du milieu poreux, ne tiennent pas compte de ces effets et les paramètres injectés dans les modèles sont issus des mesures en cultures libres. Cela pourrait expliquer certains écarts à long terme observés sur la simulation des régimes transitoires dans ces milieux.

L'étude s'est enfin achevée par la mise en œuvre de la formation de biofilms sous écoulement. Cette étude est surtout à caractère qualitatif avec un simple suivi au microscope optique de la structure de couches de biofilms à des instants différents. Malgré la difficulté de mener une étude quantitative (*ex*. impossibilité d'effectuer des prélèvements de biofilms en continu pour doser des substances telles que la COT, les EPS, protéines …), les analyses issues des observations effectuées ont dégagé une bonne description du comportement des biofilms sous écoulement.

Dans nos conditions, le biofilm montre des structures plus ou moins périodiques s'organisant dans le sens de l'écoulement, avec des zones colonisées beaucoup plus denses que d'autres. Dans ces zones denses les bactéries apparaissent s'organiser en structures filamenteuses formant des protubérances dans l'écoulement. Ces observations correspondent bien à la nature très hétérogène des biofilms, déjà rapportée pour des conditions d'écoulement à bas nombre de Reynolds. La nature spatialement hétérogène des structures formées pourrait être à l'origine d'une augmentation de la résistance hydraulique et expliquer la forte perte de charge observée par Karrabi et al. (2011), et d'autres auteurs même, dans les premiers instants de colonisation de leur biofiltre pilote. Nous avons pu analyser qualitativement la distribution de densité cellulaire dans l'épaisseur. Celle-ci est apparue plus importante dans les couches inférieures (proches de la paroi) que les couches externes et en accord avec l'existence de ces structures filamenteuses.

Pour évaluer l'impact de la microstructure sur la perte d'énergie observée dans ces systèmes, nous avons développé une méthodologie permettant d'effectuer une reconstruction 3D de l'enveloppe des zones denses du biofilm pour une condition de cisaillement fixée. La spécificité de notre travail réside dans le fait que nous n'avons pas utilisé de microscopie confocale, outil classiquement utilisé pour obtenir des images résolues à micro-échelle dans un plan du biofilm et dans le fait que les observations peuvent se faire de manière continue, sous écoulement.

Les résultats ont montré la faisabilité et la validité de notre méthode. Ainsi on retrouve bien une structure localement et spatialement hétérogène avec des protubérances et des structures allongées se développant dans le sens de l'écoulement. De plus, nous avons pu effectuer un calcul de l'écoulement dans la microstructure ainsi reconstituée et les ordres de grandeurs des perméabilités calculés montrent bien l'importance de la distribution locale de la biomasse sur ce paramètre. En particulier, on retrouve bien la sous-estimation de la perméabilité obtenue dans des modèles basés sur une répartition simple de la biomasse dans le pore : les ordres de grandeur des perméabilités calculés en prenant la distribution expérimentale observée donnent des réductions de perméabilité d'un facteur 10 par rapport aux modèles théoriques existants. Cela est d'une importance considérable car les lois de perméabilités utilisées en modélisation actuellement n'incluent pas de paramètres décrivant cette microstructure et ne se basent que sur une porosité moyenne globale. L'outil développé, en permettant d'accéder à cette microstructure, permettra à terme de définir certains de ces paramètres (aire interfaciale entre autres) et de progresser sur cet aspect.

II. Bilan et perspectives

Cette thèse constitue une première contribution dans le domaine pour les équipes qui m'ont encadré. Au terme de ce travail, j'aurai la satisfaction d'avoir mis au point des outils et des protocoles validés, qui constituent une première pierre indispensable pour mener des investigations sur le sujet.

Beaucoup de questions s'ouvrent (du fait de la complexité du sujet, qui nécessite des points de vue assez divers pour être totalement appréhendé). Néanmoins des perspectives de travail se dégagent nettement. Nous en donnons ici quelques unes, la liste n'étant pas exhaustive.

- En ce qui concerne le détachement cellulaire :

Une étude plus systématique du détachement en fonction du temps de contact est nécessaire, pour dégager les lois régissant l'évolution du cisaillement critique à partir duquel apparaît le détachement en fonction de ce temps, du taux de détachement en fonction du cisaillement à âge fixé ou du taux de détachement à contrainte fixée en fonction de l'âge des cellules….

Ce travail nécessite aussi l'investigation de la nature du support pour se rapprocher des conditions industrielles. L'utilisation directement du matériau servant en milieu industriel est cependant difficile pour des techniques (observations) mais on peut approcher les conditions physiques de ces matériaux en agissant sur les propriétés physicochimiques de la lame support (fonctionnalisation de la surface).

La force de traînée qui est à l'origine du détachement dépendant de la surface frontale par rapport à la direction de l'écoulement et par conséquent de l'angle d'orientation de l'axe géométrique des cellules, plus cet angle est grand plus la surface sur laquelle s'exerce la contrainte hydrodynamique est grande et plus le détachement est ainsi favorisé.

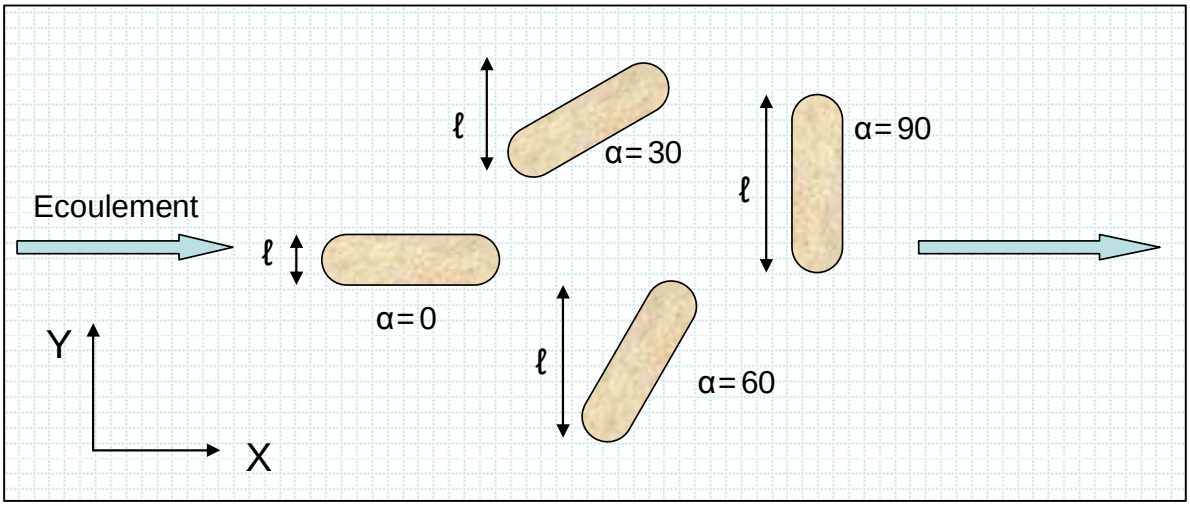


Figure 7.1 : Effet de l'orientation de l'axe des cellules sur la force de détachement

Donc en prenant en compte ces effets d'orientation géométrique vis-à-vis de la direction de l'écoulement, on va pouvoir rendre l'étude du détachement cellulaire induit par écoulement cisaillé plus fine. Un des objectifs à moyen terme de notre étude est d'effectuer des expériences d'adhésion / détachement en regardant la distribution du nombre de particules adhérées en fonction de leur angle d'orientation et ceci sous différentes vitesses d'écoulement, c'est-à-dire proposer une loi de distribution N(α,t). Ce travail demande en amont un développement technique rigoureux et des appareils de visualisation de haute résolution, dans la mesure où il ne s'agit plus de compter les bactéries mais de déterminer leur angle. La validité statistique de ce travail nécessitera en outre un nombre d'échantillons important dans le dépouillement des résultats et ne pourra se faire qu'en utilisant des procédures de traitement d'images plus ou moins automatisées. Hors nous avons montré (cf. Annexe A) que l'automatisation du processus de comptage n'était pas quelque chose de facile et que l'on pouvait obtenir rapidement des biais importants sur les résultats.

- En ce qui concerne la croissance cellulaire sur supports solides :

Les mesures visuelles devraient pouvoir être couplées avec des mesures physico-chimiques et microbiologiques pour pouvoir approfondir l'analyse des comportements observés. Un effet éventuel du stress hydrodynamique sur le comportement des bactéries nécessiterait aussi de travailler à des cisaillements plus élevés. Mais cela nécessitera une modification de la cellule ou un changement de type de chambre d'écoulement (par exemple un réacteur permettant de faire un écoulement de type Couette).

Maintenant que nous disposons de méthodes de microscopie plus avancées (fluorescence DAPI et Live/Dead), les outils de traitement d'images développés pour le chapitre 6 pourront être utilisés de manière plus systématique.

- En ce qui concerne le développement de biofilm :

La technique de reconstruction 3D appliquée à différents instants au cours de la croissance du biofilm devrait permettre d'obtenir des données quantitatives sur l'évolution au cours du temps du volume occupé, de la structure (épaisseur moyenne, rugosité, porosité, etc.). Couplé avec d'autres mesures (matière sèche, EPS…), cela permettrait d'établir une base de données utile pour analyser des informations issues d'autres expériences (mesures sur pilote, simulation numérique de biofilm etc.). L'acquisition récente d'un cytomètre de flux, devrait aussi permettre l'étude en continu des phénomènes de détachement ou d'érosion du biofilm pour des degrés de croissance plus importants et des biofilms plus « matures ».

En ce qui concerne les résultats des calculs que nous avons présentés, ceux-ci avaient essentiellement pour but de montrer des ordres de grandeur et l'influence de certains aspects de la microstructure du biofilm sur les paramètres hydrodynamiques. Comme nous l'avons dit au chapitre 6, ces calculs doivent être améliorés en ce qui concerne les conditions aux limites. Nous avons déjà évoqué la nécessité de simuler de manière plus réaliste la chambre d'écoulement en prenant en compte la zone d'écoulement libre autour du biofilm. Un autre point est la condition aux limites sur le biofilm lui-même : nous avons effectué nos simulations en mettant une condition d'adhérence sur l'enveloppe du biofilm (qui est visualisé par les colorants utilisés pour la visualisation du biofilm) et l'écoulement pris en compte est celui observé dans les « chenaux » constitués par la structure 3D. Hors, cette dernière, comme le montrent les visualisations en lumière « naturelle » est une structure hétérogène (filamenteuse dans nos conditions) entourée de polymères (dans lesquels diffusent les colorants utilisés pour la reconstitution 3D). Un calcul plus complet nécessiterait de prendre en compte la nature micro-poreuse de la structure ainsi constituée afin d'évaluer l'importance de la micro-porosité interne sur le frottement global. Tout ceci demandera aussi une puissance de calcul largement supérieure à celle dont nous disposons actuellement.

Enfin, les calculs présentés ont été effectués localement, sur une portion fixée du biofilm. Pour obtenir des quantités significatives qui puissent se comparer à des mesures globales effectuées à macro-échelle, il faut moyenner ces informations sur un volume élémentaire représentatif (VER) qui reste à déterminer : un système de déplacement automatisé et reproductible de la cellule

d'écoulement sous le microscope doit encore être développé et n'était pas disponible au moment de la thèse.

- Pour finir, sur toutes les expériences présentées, nous avons toujours travaillé à cisaillement constant. Or certains auteurs évoquent aussi la réactivité des bactéries non pas à des contraintes (ou d'autres facteurs) constantes mais à leurs fluctuations. L'influence des fluctuations pour des conditions moyennes fixées concerne les différents points que nous avons regardés dans cette thèse. Cette étude est importante dans la mesure où dans un biofiltre, même s'il existe une vitesse moyenne et que l'écoulement moyen est unidirectionnel, il existe des fluctuations (spatiales et temporelles) autour de cette vitesse moyenne. La micro-cellule est adaptée pour ce type d'étude grâce au pousse-seringue dont la course peut être programmée.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Applegate D.H., and Bryers J.D., 1991. Effects of carbon and oxygen limitations and calcium concentrations on biofilm removal processes. *Biotechnology and Bioengineering* 37, 17–25;

2. Ashkin A., 1992. Forces of single beam gradient laser trap on a dielectric sphere in the ray optic regime. *Biophysical Journal* 61, 569-582;

3. Bakke R., and Olsson P.W., 1986. Biofilm thickness measurements by light microscopy. *Journal of Microbiological Methods* 5, 93-98;

4. Bakker D.P., Bussher H.J., and van der Mei H.C., 2002. Bacterial deposition in a parallel plate and a stagnation point flow chamber: microbial adhesion mechanisms depend on the mass transport conditions. *Microbiology* 148, 597–603;

5. Bakker D.P., Huijs F.M., de Vries J., Klijnstra J.W., Bussher H.J., and van der Mei H.C., 2003. Bacterial deposition to fluoridated and non-fluoridated polyurethane coatings with different elastic modulus and surface tension in a parallel plate and a stagnation point flow chamber, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 32, 179–190;

6. Bakker D.P., van der Plaats A., Verkerke G.J., Bussher H.J., and van der Mei H.C., 2003. Comparison of velocity profiles for different flow chamber designs used in studies of microbial adhesion to surfaces. *Applied and Environmental Microbiology* 69, 6280–6287;

7. Barton A.J., Sager R.D., and Pitt W.G., 1996. Measurement of bacterial growth rates on polymers. *Journal of Biomedical Materials Research* 32, 271-278;

8. Batté M., Appenzeller B.M.R., Grandjean D., Fass S., Guthier V., Jorand F., Mathieu L., Boualam M., Sabi S., and Block J.C., 2003. Biofilms in drinking water distribution systems. *Reviews in Environmental Science and Biotechnology* 2, 147–168;

9. Bellon-Fontaine M.N., and Cerf O., 1991. Mécanismes d'adhésion des microorganismes aux surfaces : facteurs influant sur l'adhésion. *Industries alimentaires et agricoles* 108, 13–17;

10. Bellon-Fontaine M.N., Rault J., and van Oss C.J., 1996. Microbial adhesion to solvents: a novel method to determine the electron-donor/electron-acceptor or Lewis acid-base properties of microbial cells. *Colloids and surfaces B: Biointerfaces* 7, 47-53;

11. Bergmaier D., 2001. Production d'exopolysaccharides par fermentation avec des cellules immobilisées de *Lb. Rhamnosus RW-9595M* d'un milieu à base de perméat de lactosérum. Thèse de doctorat de l'Université de Laval. Québec. Canada;

12. Bertani G., 1951. Studies on *lysogenesis. I*. The mode of phage liberation by lysogenic Escherichia coli. *Journal of Bacteriology* 62, 293-300;

13. Beyenal H., and Lewandowski Z., 2000. Combined effect of substrate concentration and flow velocity on effective diffusivity in biofilms. *Water Research* 34, 528-538;

14. Beyenal H., and Lewandowski Z., 2002. Internal and external mass transfer in biofilms grown at various flow velocities. *Biotechnology Progress* 18, 55-61;

15. Bielefeldt A., McEachern C., and Illangasekare T., 2002. Hydrodynamic changes in sand due to biogrowth on naphthalene and decane, *Journal of Environmental Engineering* 128, 51-59;

16. Bishop P.L., Gibbs J.T., and Cunningham B.E., 1997. Relationship between concentration and hydrodynamic boundary layers over biofilms. *Environmental Technology* 18, 375–385;

17. Brovelli A., Malaguerra F., and Barry D.A., 2009. Bioclogging in porous media: Model development and sensitivity to initial conditions. *Environmental Modelling and Software* 24, 611-626;

18. Bordas M.L., Cartellier A., Séchet P., and Boyer C., 2006. Bubbly flow through fixed beds: Microscale experiment in the dilute regime and modelling. *AIChE Journal* 52, 3722-3743;

19. Bos R., van der Mei H.C. and Bussher H.J., 1999. Physico-chemistry of initial microbial adhesive interactions – its mechanisms and methods for study. *FEMS Microbiology Reviews* 23, 179-230;

20. Bowen W.R., Lovitt R.W., and Wright C.J., 2001. Atomic Force Microscopy study of the adhesion of *S. cerevisiae*. *Journal of Colloid and Interface Science* 237, 54-61;

21. Brito A.G., and Melo F., 1999. Mass transfer coefficients within anaerobic biofilms: effects of external liquid velocity. *Water Research* 33, 3673-3678;

22. Brooks S.B., and Tozeren A., 1996. Flow past an array of cells that are adherent to the bottom plate of a flow channel. *Computers and Fluids* 25, 741-757;

23. Bryers J.D., 1988. Modelling biofilm accumulation. *In:* Bazin M.J. and Prosse J.I. editors. Physiological models in Microbiology. *CRC Press. Boca Raton,* FL, 109-104;

24. Bryers J.D., and Drummond F., 1998. Local macromolecule diffusion coefficients in structurally non-uniform bacterial biofilms using fluorescence recovery after photobleaching (FRAP). *Biotechnology and Bioengineering* 60, 462-473;

25. Burnett G., and Kennedy E.P., 1954. The enzymatic phosphorylation of proteins. *Journal of Biological Chemistry 211,* 969-980;

26. Bussher H.J., and Weerkamp A.H., 1987. Specific and non-specific interactions in bacterial adhesion to solid substrata. *FEMS Microbiology letters* 46, 165-173;

27. Busscher H.J., Bellon-Fontaine M.N., Mozes N., van der Mei H.C., Sjolemma J., Leonard A.J. Rouxet P.J., and Cerf O., 1990. An interlaboratory comparison of physico-chemical methods for studying the surface properties of microorganisms - application to *S. thermophilus and L. mesenteroides. Journal of Microbiological Methods* 12, 101-115;

28. Caldwell D.E., and Lawrence J.R., 1988. *In:* CRC Handbook of Laboratory Model Systems for Microbial Ecosystems, vol. 1, J.W.T. Wimpenny, pp. 117-138. Florida: CRC Press;

29. Caldwell D.E., Korber D.R., and Lawrence J.R., 1992. Imaging of bacterial cells by fluorescence exclusion using scanning confocal laser microscopy. *Journal of Microbiological Methods* 15, 249–261;

30. Cao Y.S., and Alaerts G.J., 1994. Influence of reactor type and shear stress on aerobic biofilm morphology, population and kinetics. *Water Research* 29, 107-118;

31. Castelain M., Pignon F., Piau J.M., Magnin A., Mercier-Bonin M., and Schmitz P., 2007. Removal forces and adhesion properties of *S. cerevisiae* on glass probe by optical tweezers. *Journal of Chemical Physics* 127, 135104. 1-14;

32. Castelain M., 2007. "Rhéologie micronique : Adhesion de levures *Saccharomyces Cerevisiae* sur le verre", Thèse de doctorat, Grenoble - INP, France;

33. Characklis W.G., 1973. Attached microbial growths - II. Frictional resistance due to microbial slimes. *Water Research* 7, 1249-1258;

34. Characklis, W., and Marshall K., 1990. Biofilms processes. *In: bio*films, eds. Characklis, W., and Marshall K., 195-233. *John Wiley & Sons, Inc*. New York, N.Y;

35. Characklis W.G., McFeters G.A. and Marshall K.C., 1990. Physiological ecology in biofilm systems. *In:* Characklis W.G. and Marshall K.C. editors. Biofilms. New York: John Wiley & Sons; pp. 341-94;

36. Chavant P., et Hebraud M., 2010. Croissance de *L. monocytogenes* en biofilm en fonction de la surface et de la température et effets de différents traitements sur la survie. Theix: INRIA, 2 p;

37. Chen M.J., Zhang Z., and Bott T.R., 1998. Direct measurement of the adhesive strength of biofilms in pipes by micromanipulation. *Biotechnological Techniques* 12, 875–880 ;

38. Clement T.P., Hooker B.S., and Skeen R.S., 1996. Macroscopic models for predicting changes in saturated porous media properties caused by microbial growth, *Journal of Ground Water* 34, 934-942;

39. Cowan M.M., Warren T.M., and Fletcher M., 1991. Mixed species colonization of solid surfaces in laboratory biofilms. *Biofouling* 3, 23-34;

40. Christendat D., Abraham T., Xu Z., and Masliyah J., 2005. Adhesion forces between functionalized probes and hydrophilic silica surfaces. *Journal of Adhesion Science and Technology* 19, 149-163;

41. Cunningham A.B., Chracklis W.G., Abedeen F., and Crawford D., 1991. Influence of biofilm accumulation on porous media hydrodynamics. *Environmental Science and Technology* 25, 1305–1311;

42. Davies D.G., Parsek M.R., Pearson J.P., Iglewski B.H., Costerton J.W., and Greenberg E.P., 1998. The involvement of cell-to-cell signals in the development of a bacterial biofilm. *Science* 280, 295-298;

43. Davit Y., 2010. Multiple-scale analysis of transport phenomena in porous media with biofilms. Thèse de doctorat, INP Toulouse. 248p;

44. De Beer D., Stoodley P. and Lewandowski Z., 1994. Liquid flow in heterogeneous biofilms. *Biotechnology and Bioengineering* 44, 636–641;

45. De Beer D., Stoodley P., 1995. Relation between the structure of an aerobic biofilm and transport phenomena. *Water Science and Technology* 32, 11–18;

46. Deront M., Samb F.M., Adler N., and Peringer P., 1998. Biomass growth monitoring using pressure drop in a cocurrent biofilter. B*iotechnology and Bioengineering* 60, 97–104;

47. Devinny J.S., and Ramesh J., 2005. A phenomenological review of biofilter models. *Chemical Engineering Journal* 113, 187-196;

48. Di Iaconi C., Ramadori R., and Lopez A., 2006. Combined biological and chemical degradation for treating a mature municipal leachate. *Biochemical Engineering* 31, 118–124;

49. Dogan C., and Erkmen O., 2004. High pressure inactivation kinetics of *L. monocytogenes* inactivation in broth, milk, and peach and orange juices. *Journal of Food Engineering 62,* 47–52;

50. Donlan M., 2002. Biofilms: Microbial Life on Surfaces. *Emerging Infectious Diseases* 8, 881-890;

51. Droste R.L., 1998. Endogenous decay and bioenergetics theory for aerobic wastewater treatment. *Water Research* 32, 410–418;

52. Ducker W.A., Senden T.J., and Pashley R.M., 1991. Direct measurement of colloidal forces using an atomic force microscope. *Nature* 353, 239-241;

53. Dufrene Y.P., 2004. Refining our perception of bacterial surfaces with the Atomic Force Microscope. *Journal of Bacteriology* 186, 3283-3285;

54. Dunne W.M., 2002. Bacterial adhesion: Seen any good biofilms lately? *Clinical Microbiology Reviews* 15, 155–166;

55. Dunsmore B.C., 2002. The influence of fluid shear on the structure and material properties of sulphate-reducing bacterial biofilms. *Industrial Microbiology & Biotechnology* 29, 347–353;

56. Eberl H.J., Picioreanu C., Heijnen J.J., and van Loosdrecht M.C.M., 2000. A three-dimensional numerical study on the correlation of spatial structure, hydrodynamic conditions, and mass transfer and conversion in biofilms. *Chemical Engineering Science* 55, 6209-6222;

57. Elimelech M., and O'Melia C.R., 1990. Kinetic deposition of colloidal particles in porous media. *Environmental Science and Technology* 24, 1528-1536;

58. Elimelech M., 1994. Particle deposition on ideal collectors from dilute flowing suspensions: mathematical formulation, numerical solutions and simulation. *Separations Technology* 4, 2531-2537;

59. Escher A.R., 1986. Bacterial colonization of a smooth surface: An analysis with image analyzer, Ph.D. Dissertation, Montana State University, Bozeman, MT;

60. Faille C., Jullien C., Bellon-Fontaine M.N., Slomianny C., and Benezech T., 2002. Adhesion of *Bacillus* spores and *Escherichia coli* cells to inert surfaces: role of surface hydrophobicity. *Canadian Journal of Microbiology* 48, 728–738;

61. Flemming H.C., Wingender J., Griebe T., and Mayer C., 2000. Physico-chemical properties of biofilms. *In*: Evans LV, editor. Biofilms: recent advances in their study and control. Amsterdam: *Harwood Academic Publishers*, 19-34;

62. Fletcher M., 1977. The effects of culture concentration and age, time and temperature on bacterial attachment to polystyrene. *Canadian Journal of Microbiology*. 23, 1–6;

63. Fletcher M., and Marshall K.C., 1982. Are solid surface of ecological significance to aquatic bacteria ? *Advances in Microbial Ecology* 47, 135–143;

64. Fletcher M., 1991. The physiological activity of bacteria attached to solid surfaces. *Advances in Microbial physiology* 32, 53–85;

65. Garcia Lopez L.A., *et al.,* 2003. A technique using membrane flow cell to determine average mass transfer coefficients and tortuosity factors in biofilms. *Water Science and Technology* 47, 61-67;

66. Garrett T.R., Bhakoo M., and Zhang Z., 2008. Characterisation of bacterial adhesion and removal in a flow chamber by micromanipulation measurements. *Biotechnology Letters*. 30, 427–433;

67. Gaver D.P., and Kute S.M., 1998. A theoretical model study of the influence of fluid stresses on a cell adhering to a micro-channel wall. *Biophysical Journal* 75, 721–733;

68. Gavrilescu M., and Macoveanu M., 2000. Attached-growth process engineering in wastewater treatment. *Bioprocess Engineering* 23, 95–106;

69. Gross M.J., Albinger O., Jewett D.G., Logan B.E., Bales R.C., and Arnold R.G., 1995. Measurement of bacterial collision efficiencies in porous media. *Water Research* 29, 1151-1158;

70. Gottenbos B., van der Mei H.C., and Bussher H.J., 1999. Models for studying initial adhesion and surface growth in biofilm formation on surfaces. *Methods in Enzymology* 310, 523-534;

71. Guillemot G., Vaca-Medina G., Martin-Yken H., Vernhet A., Schmitz P., and Mercier-Bonin M., 2006. Shear-flow induced detachment of *S. cerevisiae* from stainless steel: influence of yeast and solid surface properties. *Colloid and Surfaces B: Biointerfaces* 49, 126-135;

72. Guillemot G., Lorthois S., Schmitz P., and Mercier-Bonin M., 2007. Modelling adhesion force between *S. cerevisiae* yeast cells and polystyrene from shear flow induced detachment experiments. *Chemical Engineering Research and Design* 85, 800–807;

73. Hamza A., Pham V.A., Matsuura T., and Santerre J.P., 1997. Development of membranes with low surface energy to reduce the fouling in ultrafiltration applications. *Journal of Membrane Science* 131, 217–227;

74. Happel J., and Brenner H., 1965. Low Reynolds number hydrodynamics. Prentice Hall, Inc. Englewood Cliffs, NJ;

75. Harshey R.M., 2003. Bacterial motility on a surface: many ways to a common goal. *Annual Review in Microbiology* 57, 249-73;

76. Henze M., Gujer W., and Takashi M., 2000. Activated sludge models ASM1, ASM2, ASM2d and ASM3. *eds* IWA task group on mathematical modelling for design and operation of biological wastewater treatment;

77. Herbert D., Elsworth R., and Telling R.C., 1956. The continuous culture of bacteria: a theoretical and experimental study. *Microbiology* 14, 601–622;

78. Hermansson M., 1999. The DLVO theory in microbial adhesion. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 14, 105–119;

79. Herzberg M., and Elimelech M., 2007. Accumulation de biofilms sur membrane par osmose inverse: Effet de l'augmentation de la pression osmotique sur le biofilm. *Membrane Science* 295, 11-20;

80. Heukelekian H., Heller A., 1940. A relation between food concentration and surface for bacterial growth. *Journal of Bacteriology* 40, 547-558;

81. Horn H., and Hempel D.C., 1997. Growth and decay in an auto-/heterotrophic biofilm. *Water Research* 31, 2243–52;

82. Hu J.Y., 1999. The effect of Water treatment processes on the biological stability of potable water. *Water Research* 33, 2587-2592;

83. Huang C.T., Peretti S.W., and Bryers J.W., 1992. Use of Flow cell reactors to quantify biofilm formation kinetics. *Biotechnology Techniques* 6, 193-198;

84. Israelachvili J.N., 1992. Intermolecular and surface forces, Academy Press (2nd ed.), London.

85. Jones H.C., Roth I.L., and Sanders W.M., 1969. Electron microscopic study of slime layer. *Journal of Bacteriology* 99, 316-325;

86. Kapellos E., Alexious T.S., and Payatakes A.C., 2007. Hierarchical simulator of biofilm growth and dynamics in granular porous materials. *Advances in Water Resources* 30, 1648-1667;

87. Kapellos G.E.., Alexious T.S., and Payatakes A.C., 2007. A multiscale theoretical model for diffusive mass transfer in cellular biological media. *Mathematical Biosciences* 210, 177-237;

88. Karrabi M., 2009. Coupling between hydrodynamic and biofilm in porous media (application in a biofilter). Thèse de doctorat, Grenoble INP, 201p;

89. Karrabi M., Séchet P., Morra C., Cartellier A., Geindreau C., and Martins J.M.F., 2011. Investigation of Hydrodynamic/biomass growth coupling in a pilot scale granular bioreactor at low pore Reynolds number. *Chemical Engineering Science* 66, 1765-1782;

90. Kim Y.S., 2005. Simulation of filtration for suspension transport in porous media. Thèse de doctorat, Department of Civil and Environmental Engineering, Massachusetts Institute of Technology, USA;

91. Kildsgaard J., and Engesgaard P., 2001. Numerical analysis of biological clogging in two dimensional sand box experiments. *Journal of Contaminant Hydrology* 50, 261–285;

92. Klein J.D., Clapp A.R., and Dickinson R.B., 2003. Direct measurements of interaction forces between a single bacterium and a flat plate. *Colloids and Interfaces* 261, 379-385;

93. Kommedal R., and Bakke R., 2003. Modeling *Pseudomonas aeroginusa* biofilm detachment. HiT Working Paper no. 3/2003. Faculty of Technology, Department of Environmental Technology (Porsgrunn);

94. Kreft J.U,, and Wimpenny J.W.T., 2001. Effect of EPS on biofilm structure and function as revealed by an individual-based model of biofilm growth. *Water Science and Technology* 43, 135-141;

95. Kreft J.U., 2004. Biofilms promote altruism. *Microbiol-SGM* 50, 2751–2760.

96. Korber D.R., Lawrence J.R., Sutton B., and Caldwell D.E., 1989. Effect of laminar flow velocity on the kinetics of surface recolonization by Mot+ and Mot- Pseudomonas fluorescens. *Microbial Ecology* 18, 1-19;

97. Kwok W.K., Picioreanu C., Ong S.L., van Loosdrecht M.V.M., Ng W.J., and Heijnen J.J., 1998. Influence of biomass production and detachment forces on biofilm structures in a biofilm airlift suspension reactor. *Biotechnology and Bioengineering* 58, 400–407;

98. Laspidou C.S., and Rittmann B.E., 2002. Non-steady state modeling of extracellular polymeric substances, soluble microbial products, and active and inert biomass. *Water Research* 36, 1983–1992;

99. Laspidou C.S., Kungolos A., and Samaras P., 2010. Cellular-automata and individual-based approaches for the modeling of biofilm structures: Pros and cons. *Desalination* 250, 390-394;

100. Lazarova V., and Manem J., 1995. Biofilm characterization and activity analysis in water and wastewater treatment. *Clinical Biochemistry* 29, 2227–2245;

101. Leriche V., Sibille P., and Carpentier B., 2000. Use of an enzyme-linked lectin-sorbent assay to monitor the shift in polysaccharide composition in bacterial biofilms. *Applied Environmental Microbiol*ogy 66, 1851-1856;

102. Li J.L., Car R., Tang C., and Wingreen N.S., 2007. Hydrophobic interaction and hydrogen-bond network for a methane pair in liquid water. *PNAS* 104, 2626-2630;

103. Li T., Bai R., and Liu J., 2008. Distribution and composition of extracellular polymeric substances in membrane-aerated biofilm. *Journal of Biotechnology* 135, 52-57;

104. Lin Y., de Kreuk M., van Loosdrecht M.C.M., and Avner A., 2010. Characterization of alginate-like exo-polysaccharides isolated from aerobic granular sludge in pilot-plant. *Water Research* 44, 3355-3364;

105. Liu Y., and Tay J.H., 2001. Detachment forces and their influence on the structure and metabolic behaviour of biofilms. *World J. of Microbiology and Biotechnol*ogy 17, 111–117;

106. Liu Y., and Tay J.H., 2002. The essential role of hydrodynamic shear force in the formation of biofilm and granular sludge. *Water Research* 36, 1653–1665;

107. Lorthois S., Schmitz P., and Anglès-Cano E., 2001. Experimental study of fibrin/fibrin specific molecular interactions using a sphere/plane adhesion model. *Journal of Colloid and Interface Science* 241, 52-62;

108. Spielman L.A., 1977. Particles capture from low-speed laminar flows. *Annual Review of Fluid Mechanics* 9, 297-319;

109. Mansfield F., 2007. The interaction of bacteria and metal surfaces. *Electrochimica Acta* 52, 7670–7680;

110. Marshall K.C., Stout R., and Mitchell R., 1971. Mechanism of the initial events in the sorption of marine bacteria to surfaces. *Journal of General Microbiol*ogy 68, 337-348;

111. Manz B., Volke F., Goll D., and Horn H., 2003. Measuring local flow velocities and biofilm structure in biofilm systems with magnetic resonance imaging (MRI). *Biotechnology and Bioengineering* 84, 424–432;

112. Mc Carter L., 1999. The multiple identities of *v. parahaemolyticu*. *J. Molecular Microbiology and Biotechnology* 1, 51-57;

113. Mc Eldowney S., and Fletcher M., 1986. Effect of growth conditions and surface characteristics of aquatic bacteria on their attachment to solid surfaces. *General Microbiology* 132, 513– 523;

114. Mercier-Bonin M., Ouazzani K., Schmitz P., and Lorthois S., 2004. Study of bioadhesion on a flat plate with a yeast/glass model system. *Journal of Colloid and Interface Science* 271, 342–350;

115. Mercier-Bonin M., Adoue M., Zanna S., Marcus P., Combes D., and Schmitz P., 2009. Evaluation of adhesion force between functionalized microbeads and protein coated stainless steel using shear-flow induced detachment. *Journal of Colloid and Interface Science* 338, 73–81;

116. Mercier-Bonin M., Dehouche A., Morchain J., and Schmitz P., 2011. Orientations and detachment dynamics of Bacillus spores from stainless steel under controlled shear flow: Modelling of the adhesion force. *International Journal of Food Microbiology* 146, 182-191;

117. Menoret C., 2001. Traitement d'effluents concentrés par cultures fixes sur gravier ou pouzzolane, Thèse de doctorat en Mécanique, Génie Mécanique et Génie Civil, Université des Sciences du Languedoc, Montpellier II, 124p;

118. Monod J., 1949. The growth of bacterial cultures. *Annual Reviews of Microbiology* 3, 371–394;

119. Moreau M., Capdeville B., Audic J.M., and Calvez L., 1994. Kinetic behaviour of heterotrophic and autotrophic biofilms in wastewater treatment processes. *Water Science and Technology* 29, 386-391;

120. Nicolella C., van Loosdrecht M.C.M., Heijnen J.J., 1998. Mass transfer and reaction in a biofilm airlift suspension reactor. *Chem. Engineering Science* 53, 2743-2753;

121. Ofek I., and Doyle R.J., 1994. Bacterial adhesion to cells and tissues. Chapman & Hall, New York, N.Y. 578p;

122. Ogawa K., Matsuka T., Hirai S., and Okazaki K., 2001. Three-dimensional velocity measurement of complex interstitial flows through water-satured porous media by tagging method in mri technique. *Measurement Science and technology* 12, 172-180;

123. Ohashi A., and Harada H., 1994. Characterization of detachment mode of biofilm developed in an attached-growth reactor. *Water Science and Technology* 30, 35–45;

124. Olofsson A.C., Zita A., and Hermansson M., 1998. Floc stability and adhesion of green-fluorescent-protein-marked bacteria to flocs in activated sludge. *Microbiology* 144, 519-528.

125. O'Melia C.R., and Ali W., 1978. The role of retained particles in deep bed filtration. *Progress and Advances in Water Technology* 10, 167;

126. Otsu N., 1979. A threshold selection method from gray-level histograms. I*EEE Transactions on systems, Man and Cybernetics* 9, 62–66;

127. Owens D.K., and Wendt R.C., 1969. Estimation of the surface free energy of polymers. *Journal of applied Polymer Science* 13, 1741-1747;

128. Palleroni N.J., 1984. Gram-negative aerobic rods and cocci. *In:* Krieg N.R. and Holt J.G. ed. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. The Williams & Williams Co. Baltimore, Md. USA. Vol 1, 140-199;

129. Paris T., Skali-Lami S., and Block J.C., 2007. Effect of wall shear rate on biofilm deposition and grazing in drinking water flow chambers. *Biotechnology and Bioengineering* 97, 1550-1560;

130. Paris T., 2008. Formation et organisation de biofilm en milieu eau potable – influence du gradient de vitesse pariétal. Thèse de doctorat de l'Université Nancy-I, 195p;

131. Perez J., Poughon L., Dussap C.G., Montesinis J.L., and Godia F., 2005. Dynamics and steady state operation of a nitrifying fixed bed biofilm reactor: mathematical model based description. *Process Biochemistry* 40, 2359–2369;

132. Peyton B.M., 1996. Effect of shear stress and substrate loading rate on *Pseudomonas aeroginusa* biofilm thickness and density. *Water Research* 30, 29-36;

133. Picioreanu C., van Loosdercht M.C.M., and Heijnen J.J., 1998. Mathematical modelling of biofilm structure with a hybrid differential-discrete cellular automaton approach. *Biotechnology and Bioengineering* 58, 101-116 ;

134. Picioreanu C., van Loosdercht M.C.M., and Heijnen J.J., 2000. A theoretical study of the effect of surface roughness on mass transport and transformation in biofilms. *Biotechnology and Bioengineering* 68, 355–69;

135. Picioreanu C., van Loosdercht M.C.M., and Heijnen J.J., 2001. Two-dimensional model of biofilm detachment caused by internal stress from liquid flow. *Biotechnology and Bioengineering* 72, 205-218;

136. Taherzadeh D., Picioreanu C., Küttler U., Simone A., Wall W.A., and Horn H.,, 2010. Computational study of the drag and oscillatory movement of biofilm streamers in fast flows. *Biotechnology and Bioengineering* 105, 600-610;

137. Polprasert C., and Charnpratheep K., 1989. Heavy metal removal in attached-growth waste stabilization ponds. *Water Research* 23, 625–631;

138. Power L., Itier S., Hawton M., and Schraft H., 2007. Time lapse confocal microscopy studies of bacterial adhesion to self-assembled monolayers and confirmation of a novel approach to the thermodynamic model. *Langmuir* 23, 5622–5629;

139. Qi P., Wang W., and QI Z., 2008. Effect of Shear Stress on Biofilm Morphological Characteristics and the Secretion of Extracellular Polymeric Substances, 978-1-4244-1748-3/08/2008 *IEEE*;

140. Reynolds T.B., and Fink G.R., 2001. Baker's yeast, a model for fungal biofilm formation. *Science* 291, 878-881;

141. Rijnaarts H.H.M., Norde W., Bouwer E.J., Lyklema J., and Zehnder A.J.B., 1993. Bacterial adhesion under static and dynamic conditions. *Applied Environnemental Microbiology* 59, 3255-3265;

142. Rittmann B.E., 1982. The effect of shear stress on biofilm loss rate, *Biotechnology and Bioengineering* 24, 501 - 506;

143. Rochex A., Lecouturier D., Pezron I., and Lebeault J.M., 2004. Adhesion of *Pseudomonas putida* strain isolated from a paper machine to cellulose fibres. *Applied Microbiology and Biotechnology* 65, 727-733;

144. Rochex A., and Lebeault J.M., 2007. Effects of nutrients on biofilm formation and detachment of *Pseudomonas putida* strain from a paper machine. *Water Research* 41, 2885-2892;

145. Rockhod M.L., Yarwood R.R., Niemet M.R., Bottomley P.J., brockman F.J., and Selker J.S., 2007. Visualization and modelling of the colonization dynamics of a bioluminescent bacterium in variably saturated translucent quartz sand. *Advances in Water Resources* 30, 1593–1607;

146. Rosenberg M., and Kjelleberg S., 1986. Hydrophobic interactions: role in bacterial adhesion. *Advances and Microbial Ecology* 9, 353-393;

147. Sauer K., and Camper A., 2001. Characterization of Phenotypic Changes in *P. putida* in Response to Surface-Associated Growth. *Journal of Bacteriology* 183, 6579-6589;

148. Sauer K., Camper A.K., Ehrlich G.D., Costerton J.W., and Davies D.G., 2001. P*. aeroginosa* displays multiple phenotypes during development as a biofilm. *Journal of Bacteriology* 184, 1140-1154;

149. Schlichting, H., 1975. Outline of boundary-layer theory, 24–46. *In:* F. J. Cerra (ed.), *Boundary-layer theory*. McGraw-Hill, New York, N.Y;

150. Séguret F., 1998, Etude de l'hydrodynamique des procédés de traitement des eaux usées à biomasse fixée, Thèse de doctorat, Univ. Bordeaux 1;

151. Shafahi M., and Vafai K., 2009. Biofilm affected characteristics of porous structures. *International Journal of Heat and Mass Transfer* 52, 574–581;

152. Simoes M., Pereira M.O., Sillankorva S., Azeredo J., and Vieira M.J., 2007. The effect of hydrodynamic conditions on the phenotype of Pseudomonas fluorescens biofilms. *Biofouling* 23, 249-258;

153. Sjollema J., Busscher H.J., and Weerkamp A.H., 1989. Real-time enumeration of adhering microorganisms in a parallel plate flow cell using automated image analysis. *Journal of Microbiological Methods* 9, 73–78;

154. Spielman L.A., 1977. Particle capture from low speed laminar flows. *Annual Reviews of Fluid Mechanics* 9, 297-319;

155. Stainer R.Y., Palleroni N.J., and Doudoroff M., 1966. The aerobic *Pseudomonas*: a taxonomic study, *Journal of General Microbiology* 43, 159-271;

156. Stewart P.S., 1992. A model of biofilm detachment. *Biotechnology and Bioengineering* 41, 111-117;

157. Stoodley P., Lewandowski Z., Boyle J.D., Lappin-Scott H.M., 1999. Structural deformation of bacterial biofilms caused by short-term fluctuations in fluid shear: an *in situ* investigation of biofilm rheology. *Biotechnology and Bioengineering* 65, 83-92;

158. Stoodley P., Dodds I., Boyle J.D., Lappin-Scott H.M., 1999a. Influence of hydrodynamics and nutrients on biofilm structure. *Journal of Applied Microbiology* 85, 19–28;

159. Stoodley P., Boyle J.D., Debeer D., and Lappin-Scott H.M., 1999b. Evolving perspectives of biofilm structure. *Biofouling* 14, 75–90;

160. Stoodley P., Dodds I., Boyle J.D., Lappin-Scott H.M., 2002. Biofilms as Complex Differentiated Communities. *Annual Reviews in Microbiology* 56, 187-209;

161. Sutherland I.W., 2001. Biofilm exopolysaccharides: a strong and sticky framework. *Microbiology* 147, 3–9;

162. Taylor S.W., and Jaffe P.R., 1990. Biofilm growth and the related changes in the physical properties of a porous medium: 1. Experimental investigation, *Water Resources Research* 26, 2153–2159;

163. Telgmann U., Horn H., and Morgenroth E., 2004. Influence of growth history and erosion from biofilms. *Water Research* 38, 3671-3684;

164. Theerthankar D., 2010. Role of extracellular DNA in initial bacterial adhesion and surface aggregation. *Applied and Environmental Microbiology* 76, 3405–3408;

165. Thullner M., Mauclaire L., Schroth M.H., Kinzelbach W., and Zeyer J., 2002. Interaction between water flow and spatial distribution of microbial growth in a two-dimensional flow field in saturated porous media, *Contaminant Hydrology* 58, 169-189;

166. Thullner M., Schroth M.H., Zeyer J., and kinzelbach W., 2004. Modeling of a microbial growth experiment with bioclogging in a two-dimensional saturated porous media flow field. *Journal of Contaminant Hydrology* 70, 37-62;

167. Trulear M.G., 1983. Cellular reproduction and extracellular polymer formation in the development of biofilms. Ph.D, Dissertation, Montana State University, Bozeman, MT;

168. Tsai Y.P., 2005. Impact of flow velocity on the dynamic behaviour of biofilm bacteria. *Biofouling* 21, 267-277;

169. Turakhia M.H., 1986. The influence of calcium on biofilm processes, Ph.D. Dissertation, Montana State University, Bozeman MT;

170. Turpin J.L., and Huntington R.L., 1967. Prediction of pressure drop for two phase, two-component concurrent flow in packed beds. *AIChE Journal* 13, 1196–202;

171. Vandevivere P., and Baveye P., 1992. Saturated hydraulic conductivity reduction caused by aerobic bacteria in sand columns. *Soil Science Society of America journal* 56, 1-13;

172. Vandevivere P., 1995. Bacterial clogging of porous media: a new modelling approach, *Biofouling* 8, 281-291;

173. van Es F.B., and Meyer-Reil L.A., 1982. Biomass and metabolic activity of heterotrophic marine bacteria. *Advances in Microbiology and Ecology* 6, 111–170;

174. van Niel C.B., 1949. The kinetics of growth of microorganisms, p. 91–102. *In* E. D. Parpart (ed.), *The chemistry and physiology of growth*. Princeton University Press, Princeton, N.J.;

175. van Loosdrecht M.C., Lyklema J., Schraa G., and Zehnder A.J., 1987. The role of bacterial cell wall hydrophobicity in adhesion. *Applied Environmental Microbiol*ogy 53, 1893-1897;

176. van Loosdrecht M.C., Lyklema J., Norde W., Schraa G., and Zehnder A.J., 1987. Electrophoretic mobility and hydrophobicity as a measured to predict the initial steps of bacterial adhesion. *Applied Environmental Microbiol*ogy 53, 1898-1901;

177. van Loosdrecht M.C., Eikelboom D., Gjaltema A., Mulder A., Tijhuis L., and Heijnen J.J., 1995. Biofilm structures. *Water Science and Technology* 32, 35–43;

178. Van Oss C.J., Good R.J., Chaudhury, M., 1986. The role of Van der Waals forces and hydrogen bonds in hydrophobic interactions between biopolymers and low energy surfaces. *Journal of Interface Science* 111, 378–390;

179. van Oss C.J., 1995. Hydrophobic, hydrophilic and other interactions in epitope-paratope binding. *Molecular Immunology* 32, 199-211;

180. van Oss C.J., and Giese R.F., 1995. The hydrophilicity and hydrophobicity of clay minerals. *Clays and Clay Minerals* 43, 474-477;

181. Wanner O., 1996. Modelling of biofilms. *Biofouling* 10, 31–41;

182. Wanner O., and Gujer W., 2004. A multispecies biofilm model. *Biotechnology and Bioengineering* 28, 314 – 328;

183. Wäsche S., Horn H., and Hempel D.C., 2002. Influence of growth conditions on biofilm development and mass transfer at the bulk/biofilm interface. *Water Research* 36, 4775–4784;

184. Watnick P., and Kolter R., 2000. Biofilms, city of Microbes. *Journal of Bacteriology* 182, 2675-2679;

185. Weiss L., and Harlos J.P., 1972. Short-term interactions between cell surfaces. *Progress in Surface Science* 1, 355-405;

186. Xavier J.B., Picioreanu C., and van Loosdrecht C.M., 2005. A general description of detachment for multidimensional modelling of biofilms. *Biotechnology and Bioengineering* 91, 651–669;

187. Yang S., and Lewandowski Z., 1995. Measurement of local mass transfer coefficient in biofilms. *Biotechnology and Bioengineering* 48, 737–44;

188. Yi C., and Pk C., 2002. The role of hydration force on the stability of the suspension of *S. cerevisiae* – application of the extended DLVO theory. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical Eng Aspects* 211, 67–77;

189. Zhang T.C., and Bishop P.L., 1994. Experimental determination of the dissolved oxygen boundary layer and mass transfer resistance near the fluid-biofilm interface. *Water Science and Technology* 30, 47–58;

190. Zhang S.F., Splendiani A., and Fretas dos Santos L.M. 1998. Determination of pollutant diffusion coefficients in natural formed biofilms using a single tube extractive membrane bioreactor. *Biotechnology and Bioengineering* 59, 80-89;

191. Zheng D., Taylor G.T., and Gyananathet G., 1994. Influence of laminar flow velocity and nutrient concentration on attachment of marine bacterioplankton. *Biofouling* 8, 107-120;

192. Zysset A., Stauffer F., and Dracos T., 1994. Modeling of reactive groundwater transport governed by biodegradation. *Water Resources Research* 30, 2433-2434;

193. Zita A., and Hermansson M., 1997. Effects of Bacterial Cell Surface Structures and Hydrophobicity on Attachment to Activated Sludge Flocs. *Applied Environmental Microbiology* 63, 1168-1170;

194. Zita A., and Hermansson M., 1997. Determination of bacterial cell surface hydrophobicity of single cells in cultures and in wastewater in situ. *FEMS Microbiology Letters* 152, 299-306;

195. Zobell C.E., 1943. The effect of solid surfaces upon bacterial activity. *Journal of Bacteriology* 46, 39-56;

ANNEXES

Annexe A : Qualité des effluents naturels et industriels

A.1- Classification des polluants selon leur origine

- **Les polluants d'origine urbaine**

Il s'agit des détergents, des graisses, des matières organiques et azotées, des germes, des matières fécales, etc. En contact avec les égouts, ils sont transportés par ruissellement dans nos cours d'eau et finissent par les contaminer après décomposition.

- **Les polluants d'origine agricole**

L'intensification des cultures et le recours à certaines pratiques pour cultiver de façon plus efficace, comme l'utilisation excessive d'engrais et de pesticides, ont engendré une dégradation des sols et augmenté les phénomènes de transport vers les cours d'eau de divers contaminants. Les différents polluants de l'eau d'origine agricole atteignent les cours d'eau par le ruissellement de surface ou par l'écoulement souterrain. Ils peuvent altérer la qualité de l'eau destinée à l'approvisionnement en eau potable et constituer ainsi un risque pour la santé humaine.

- **Les polluants d'origine industrielle**

Il s'agit principalement de métaux lourds, de molécules organiques toxiques, etc. Ce sont des eaux rejetées par les établissements industriels après utilisation dans des procédés de fabrication (textile, papeterie, métallurgie, etc.) ou refroidissement de certains systèmes (turbines, réacteurs, etc.). Il faut également noter le rejet de quantités importantes d'éléments nocifs dans l'air.

A.2- Classification des polluants selon leur nature chimique

Il est très difficile de réaliser une liste exhaustive de tous les polluants de l'eau, surtout aujourd'hui où l'avancée des techniques permet d'identifier progressivement de plus en plus de polluants. Ces points les rendent compétitifs. Cependant on peut classer les polluants dans deux grands groupes :

- **les matières organiques biodégradables**

Elles causent la chute de la concentration en oxygène dans les eaux de surface, sont caractérisées par des paramètres globaux, souvent la DCO ou la DBO.

- **Les matières azotées et phosphorées ou «nutriments» :**

Elles sont à l'origine des phénomènes d'eutrophisation. L'azote ammoniacal contribue en plus à diminuer la concentration en oxygène du milieu et peut avoir des effets toxiques.

C'est la nature et la concentration des différentes substances contenues dans une eau qui permettent de mesurer sa qualité.

Annexe B : Composition des milieux de cultures

B.1- Milieu Luria-Bertani (LB)

La souche bactérienne de *P. putida* est développée dans un milieu nutritif liquide dont la composition de base est celle du milieu Luria-Bertani. Ce milieu est constitué de Peptone Caséine à 10 g/l (Sigma Aldrich, Saint Louis), d'Extraits de levure à 5 g/l (Fluka Chemika, Buchs, Suisse) et de Chlorure de sodium à 10 g/l (Chimie-Plus *laboratories,* Dencié) ; puis le pH du milieu est ajusté à 7 en ajoutant de l'Hydroxyde de Sodium (0,1 N). Ce milieu est utilisé uniquement dans la configuration en batch (milieu non renouvelé, bactéries suspendues) pour étudier les paramètres de croissance et la dégradation de phénol. L'ensemble est stérilisé dans un autoclave à une température de 120°C pendant 20 minutes puis laissé refroidir sous hotte à flux laminaire (fig. 4.2).



Figure B.1 : Milieu de culture LB stérile sous hotte à flux laminaire

B.2- Milieu LB modifié

C'est du milieu LB dans lequel la peptone caséine est supprimée et on ajoute une autre source de carbone qui est le phénol. Les autres éléments et leur teneur ainsi que et les conditions de stérilisation restent inchangés par rapport au LB. Ce milieu est utilisé lors de la mise en œuvre de la croissance des cellules fixées soumises à un écoulement cisaillé. On s'intéresse dans cette

expérience à la dégradation d'un modèle de polluant carboné qui est le phénol. L'objectif à long terme de notre étude étant d'utiliser nos travaux pour des applications industrielles justifie le choix du phénol qui est un polluant rencontré couramment dans les procédés de dépollution. Ce polluant constitue donc un bon modèle pour débuter sur ce sujet, d'autant plus que le couple *putida*/phénol est très étudié.

B.3- Milieu Luria-Agar (LA)

C'est du milieu LB auquel est ajouté un agent solidifiant, l'agar à 15 g/l. Après préparation et stérilisation, le milieu LA en surfusion à 55°C est versé dans des boites de Pétri qui sont remplies, et laissées au repos sous hotte stérile (Fig. 4.3). Après solidification partielle (état de gel) les boites sont retournées pour éviter la chute sur le milieu de gouttelettes d'eau issues de la condensation de la vapeur d'eau sur la plaque supérieure. Après refroidissement et solidification totales du milieu, les boites sont conservées ou utilisées pour servir de stock pendant plusieurs semaines.



Figure B.2 : Milieu LA liquide

Annexe C : Mesure de la population bactérienne par spectrophotométrie

Il existe plusieurs méthodes pour mesurer la population de suspensions bactériennes : détermination du poids sec, mesure de la densité optique, mesure d'un ou de plusieurs constituants cellulaires, mesure de la consommation d'un substrat, mesure des produits de sécrétion, mesure des variations physico-chimiques induites par la croissance, etc. Au laboratoire la plus pratique est de faire des mesures de turbidité ou absorbance à 600 nm.

C'est une méthode analytique quantitative qui consiste à mesurer la concentration d'une espèce biologique (ici cellules bactériennes) ou chimique (ici phénol ou protéines) en solution. Elle est basée sur la capacité d'un milieu à absorber la lumière qui le traverse. L'équipement utilisé pour mesurer l'absorbance s'appelle un spectrophotomètre UV vis. Pour notre étude, cet équipement est du type λ25 de *Perkin Elmer* (Perkin Elmer *Inc*.) et est associé à un logiciel de traitement des spectres d'absorption (UV Winlab). Le principe de fonctionnement d'un spectrophotomètre est le suivant : une source lumineuse traverse un filtre de longueurs d'ondes monochromatiques en ne laissant passer que les ondes du domaine UV. La lumière transmise par ce filtre traverse une cuve en verre contenant la suspension étudiée ; une partie de l'intensité reçue, *Io,* est absorbée. L'intensité *I* de la lumière transmise est par conséquent inférieure à I_o. Plus la suspension est concentrée plus elle absorbe la lumière dans les limites de proportionnalités énoncées par la loi de Beer - Lambert.

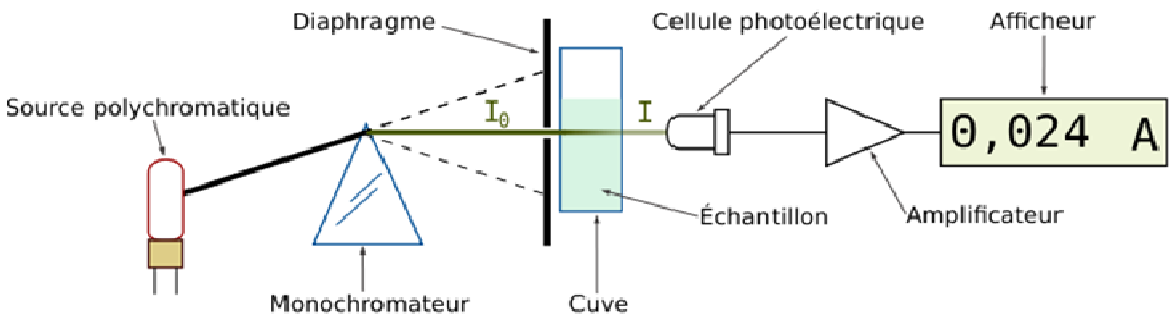


Figure C.1 : Schéma de fonctionnement d'un spectrophotomètre UV

On définit la densité optique ou l'absorbance de la solution par la relation suivante :

$$A = \log_{10}\left(\frac{I}{I_o}\right)$$

La loi de Beer-Lambert décrit que, à une longueur d'onde λ donnée, l'absorbance d'une solution est proportionnelle à la concentration des espèces de la solution, ainsi qu'à la longueur du trajet optique (distance sur laquelle la lumière traverse la solution). Alors, pour une solution contenant une seule espèce absorbante :

$$A_\lambda = \varepsilon_\lambda . l . c$$

- $\mathbf{A_\lambda}$ est l'absorbance ou la densité optique de la solution pour une longueur d'onde donnée $\boldsymbol{\lambda}$;
- $\boldsymbol{c}$ est la concentration de l'espèce absorbante (nombre d'espèces par litre, ou nombre de moles par litre);
- $\boldsymbol{l}$ (en cm) est la longueur du trajet optique ;
- $\boldsymbol{\varepsilon_\lambda}$ est le coefficient d'extinction de l'espèce absorbante en solution. Il rend compte de la capacité de cette espèce à absorber la lumière, à la longueur d'onde λ.

Annexe D : Développement d'un traitement automatique des images pour le comptage : Intérêt et limites

Etant donné le nombre important d'images que nous avions à traiter, une technique automatisée permettant de traiter en une seule séquence toutes les images obtenues lors d'une expérience a été envisagée, ce qui aurait permis d'optimiser nettement le temps de travail.

Cette technique consiste à développer un programme informatique sous Matlab (Version R2006a) qui a pour fonctions principales :

- Améliorer la qualité des images générées par la caméra CCD du microscope par l'utilisation éventuelle de divers filtres (homogénéisation du fond, correction de lumière)
- Seuiller les images pour obtenir une image binaire séparant les bactéries du reste de l'image;
- Calculer automatiquement le nombre de cellules adhérées sur le support au cours de la croissance cellulaire et déterminer la cinétique de croissance.

La technique bien que très utile et intéressante notamment par sa capacité à traiter un très grand nombre d'images en un laps de temps présente cependant des limites. Même sur des images a priori « simples » comme les nôtres, la qualité et l'exactitude des résultats dépendent de plusieurs facteurs liés à la qualité des images mais aussi au choix des fonctions morphologiques et des paramètres de ces fonctions.

D.1- Seuillage des images

Cette étape est très fortement conditionnée par la qualité initiale des images. Dans notre cas (lumière naturelle) , les niveaux de gris entre les objets et le fond de l'image étaient très proches, cela qui rendait le passage à l'échelle binaire très sensible au seuil de binarisation.

De plus comme nous fonctionnions sous écoulement, il était difficile d'améliorer ce contraste en utilisant une méthode de soustraction de fond. Du fait de cet écoulement, des perturbations optiques sont en effet toujours présentes et la soustraction de fond, loin de générer une image propre et nette peut rajouter du bruit de fond.

Le seuillage s'est donc effectué à partir des images brutes. Il existe des options permettant le calcul automatique du seuil, mais du fait des perturbations de contrastes engendrées par l'écoulement ou la croissance des bactéries, le seuil obtenu était dépendant de l'image. De plus, le seuil calculé n'était pas toujours optimum et devait être corrigé par un facteur correctif multiplicatif.

Le choix de ce facteur correctif aurait pu être automatisé : une pratique courante consiste notamment en traitement d'image, à seuiller les images et à compter les objets sur une plage assez large de seuil. Quand tout se passe bien, la courbe du nombre d'objet obtenu en fonction du seuil présente une plage de seuils correspondant à un nombre d'objet constant. Si le seuil est trop bas, le nombre d'objet est en effet trop important car compte du bruit, si le seuil est trop haut, on commence à exclure un certain nombre d'objets des images. Dans notre cas, même si une telle plage existait, manifestement, une inspection visuelle montrait que cette plage ne correspondait pas au seuil optimal pour une image donnée.

Il est apparu donc très vite que sur cette étape, le traitement ne pouvait être que semi-automatique : le choix du seuil était toujours calculé automatiquement mais le facteur correctif était choisi par l'opérateur après une succession d'essais et une inspection visuelle des résultats. Le facteur correctif a en outre été considéré constant pour une série d'image correspondant à une expérience donnée.

En conclusion, même si nous avons essayé d'automatiser au maximum certaines fonctions du traitement, cette automatisation n'est que partielle (en particulier du fait de la sensibilité des résultats au seuil de binarisation). Le traitement nécessite donc encore une intervention et un contrôle *a posteriori* de l'opérateur au niveau du seuillage. Quoiqu'imparfaite, cette méthode semblait cependant donner qualitativement des résultats cohérents sur les images binaires, images pouvant être exploitées pour le comptage.

D.2- Méthode de comptage

Une fois les images seuillées et binarisées, le comptage des objets peut se faire en adoptant deux approches différentes. (i) Mesure de la concentration cellulaire surfacique par comptage direct du nombre de cellules bactériennes adhérées à un instant donné par unité de surface du substrat. (ii) Mesure du pourcentage de colonisation par calcul de la surface totale (en pixels ou mm^2) colonisée par les particules bactériennes à un instant donné par unité de surface du support. Ces deux termes sont équivalents, mais il y a un choix judicieux à faire en fonction de la

quantité de biomasse adhérée à analyser. En effet pour des cellules individuelles adhérées, le comptage s'avère plus facile et plus rapide. Cependant pour le traitement des colonies bactériennes, le comptage devient très difficile et dans ce cas, le calcul de l'aire de cette colonie s'avère nécessaire voire indispensable.

- **Comptage direct des cellules**

Pendant les premiers instants de la croissance, cette méthode est très efficace car le support d'adhésion est peu colonisé. Les seuils choisis permettent une discrimination satisfaisante des objets d'autant plus que l'on ne cherche pas à avoir leur contour exact mais seulement un point correspondant à la présence d'un objet à cette position. On peut donc se permettre de prendre une marge de sécurité sur le facteur de correction de seuil et de le prendre relativement haut.

Le facteur correctif dans ce cas est d'environ 1.2

Un exemple de résultat est présenté sur les figures D.1 et D.2 où l'image traitée reproduit fidèlement l'image originale en terme de nombres d'objets, même lorsque les premières colonies se forment.

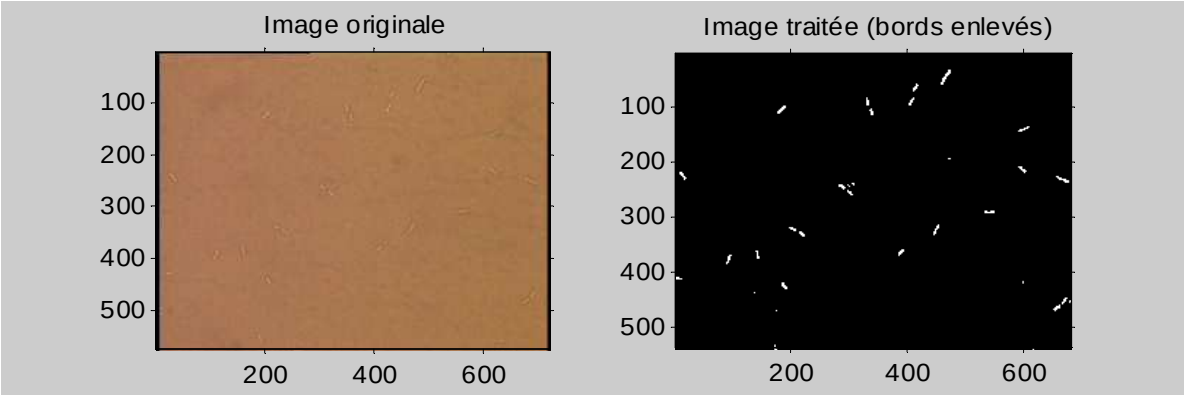


Figure D.1 : Cellules de P. putida adhérées sur support de verre – Température = 24°C +/- 1 – Milieu de culture LB sans peptone avec phénol 20 ppm – pH = 7. Image en couleur = originale, image en noir et blanc = traitée (seuil en mode binaire par code Matlab). T = 1h10 (cellules individuelles, traitement de l'image facile).

Lorsqu'on fait un comptage manuel, et qu'on compare les résultats avec ceux de la méthode automatisée, on obtient une bonne précision (fig. D.3) sur les 200 premières minutes de

croissance (qui correspond quasiment à la phase de latence identifiée au chapitre 6 … et donc peu intéressant pour le calcul de la cinétique de croissance).

En revanche après la formation de plusieurs colonies l'analyse devient difficile. En effet dans cette phase la croissance accélérée est accompagnée de la sécrétion d'exopolymères entrainant la formation d'agrégats continus. La méthode de comptage direct nécessite que chaque objet d'une colonie soit parfaitement séparé de ceux qui l'entourent. Il faut donc prendre des seuils assez hauts au niveau des colonies … mais cela peut amener à la disparition d'objets isolés à d'autres endroits de l'image.

Un exemple de résultat de résultat est représenté sur la figure D.4 (pour une autre expérience). Le facteur correctif optimal pour des bactéries isolées (fc = 1,2) entraine une surestimation des objets, certaines bactéries étant compté deux fois (d'où des erreurs importante par rapport au comptage manuel aux temps longs lors des expériences de croissances) Dans cet exemple on voit nettement que la meilleure valeur du seuil est $f_c = 1,14$. Trouver un seuil optimal est difficile : il est dépendant de chaque image. Un mauvais choix de seuil peut alors induire sur les autres images des artefacts liés au bruit (s'il est trop bas), ou au contraire induire une séparation imparfaite des objets d'une colonie (s'il est trop haut).

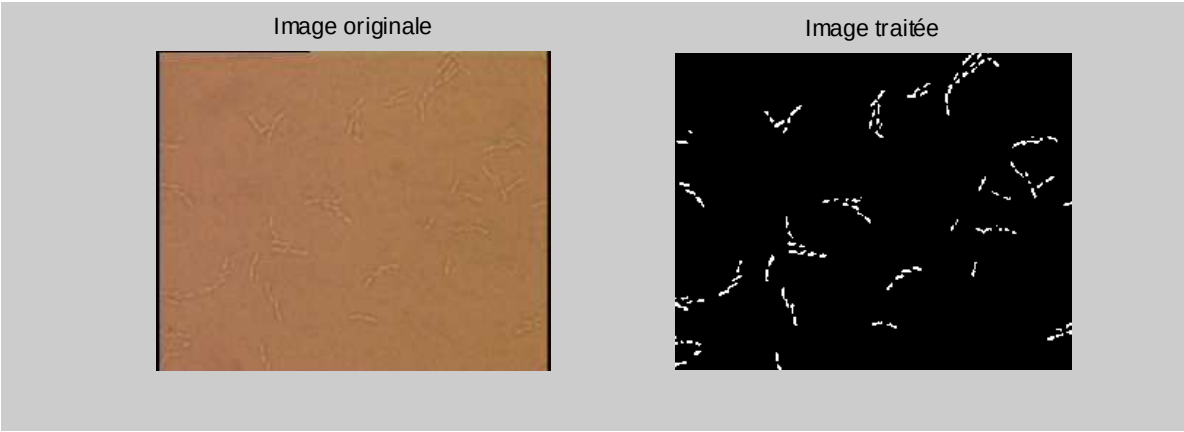


Figure D.2 : Cellules de P. putida adhérées sur support de verre - croissance sous cisaillement pariétal de 76 mPa – Température = 24°C +/- 1 – Milieu de culture LB sans peptone avec phénol 20 ppm – pH = 7. Image en couleur = originale, image en noir et blanc = traitée (seuil en mode binaire par code Matlab). T = 2h10 (petites colonies, traitement de l'image possible).

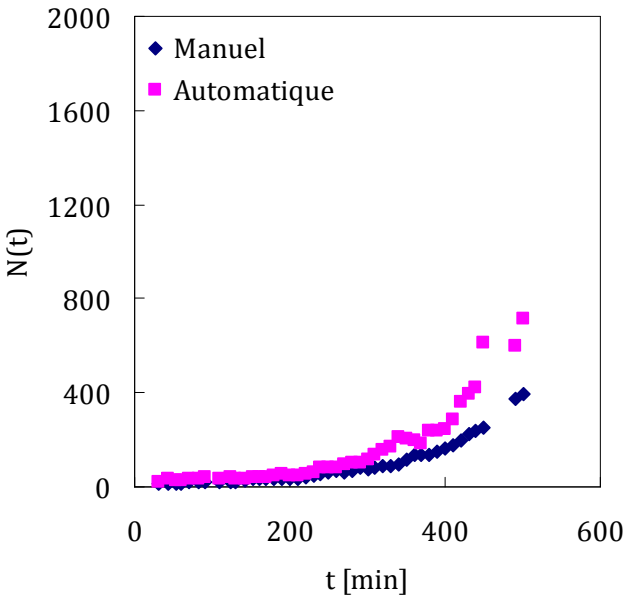


Figure D.3a - Comparaison des cinétique de croissance mesurées manuellement et automatiquement pour des cellules de P. putida sous cisaillement à Tw = 9,6 mPa à 24+/-1°C.

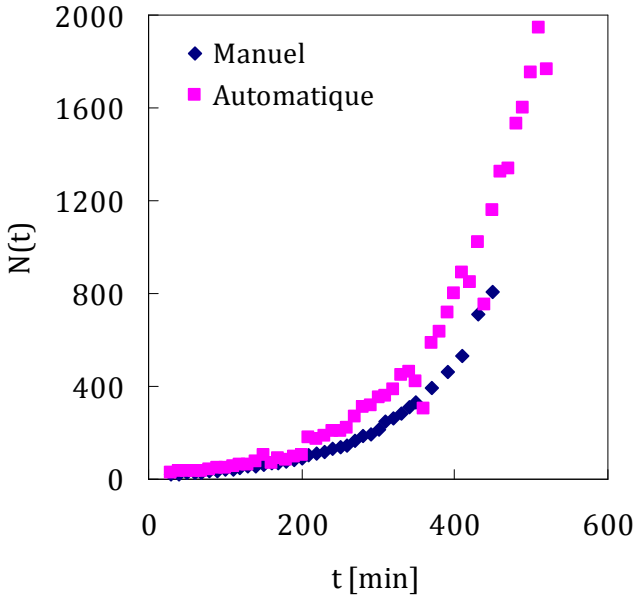


Figure D.3b - Comparaison des cinétique de croissance mesurées manuellement et automatiquement pour des cellules de P. putida sous cisaillement à Tw = 76,8 mPa à 24+/-1°C.

- **Comptage en surface**

Pour contourner cette difficulté, nous avons essayé de mesurer non pas le nombre de bactéries mais l'aire totale qu'elles occupent sur le support d'adhésion. L'idée est ensuite de raisonner, si on le souhaite en termes de nombre de cellules en divisant l'aire colonisée par l'aire moyenne occupée par une cellule. Mais là aussi plusieurs difficultés apparaissent :

- D'une part, la surface occupée par une cellule sur le support solide est entre deux divisions cellulaires et la conversion aire colonisée/population ne peut être effectuée de façon précise.

- D'autre part, cette méthode nécessite une très bonne résolution de la caméra. En effet, du fait de la sensibilité au seuil du traitement, une erreur de un pixel sur le pourtour d'une surface peut entrainer des erreurs importantes sur la surface calculée. Par exemple, les images ci-dessus font 720x576 pixels pour une résolution de 0,18 micron/pixel. On va raisonner sur une colonie idéalisée (uniformément colonisée et de forme géométrique simple). Une colonie typique sur l'image de la figure 2.4 fait de l'ordre de 30x30 pixels. Si on assimile cette surface à une surface uniformément colonisées, une erreur uniforme de 1 pixel sur le pourtour de cette colonie amène à une surface mesurée de 841 ou 961 pixel^2 soit des surfaces mesurées de 27µm^2 ou 31 µm^2 au lieu de 29 µm^2. L'erreur sur la surface est de 6% et par conséquent

sur le nombre de bactérie (dont on considère la surface constante). D'une part l'erreur de comptage sera plus importante sur les petites colonies. D'autre part, les erreurs de comptage se cumulent sur une image. Il nous semblait très risqué de ce fier à ce mode de comptage indirect étant donné le contraste de nos images (sensibilité au seuil de binarisation) et la résolution de la caméra.

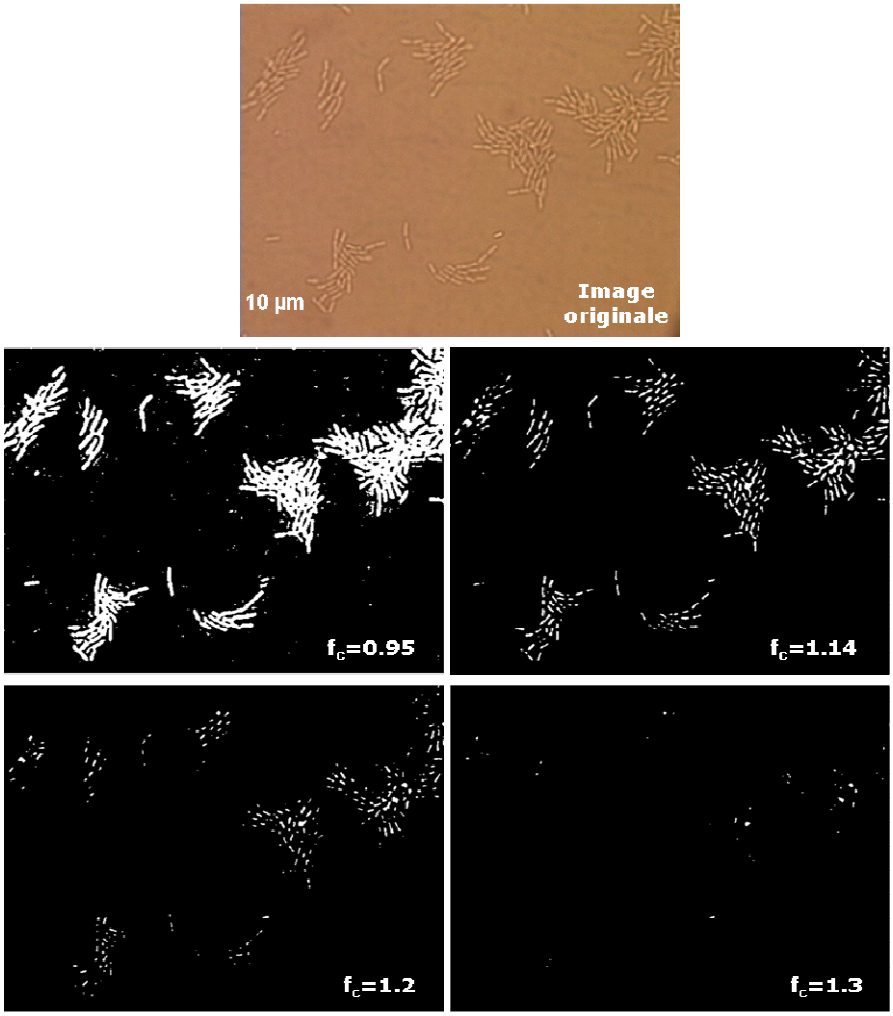


Figure D.4 : Illustration de la sensibilité du traitement d'image par rapport au seuil entre les niveaux de gris des bactéries et du fond de l'image.

D.3- Conclusion

In fine, quelle que soit la méthode utilisée, la procédure de traitement nécessite quoiqu'il arrive une calibration manuelle image/image du seuil de binarisation pour être vraiment fiabilisée, ce

qui est tout aussi coûteux en temps qu'un comptage manuel direct (tout en ne garantissant pas forcément la précision du résultat). De plus la phase de croissance exponentielle correspond aux formations des microcolonies, là où le traitement automatique montre ces limites. C'est pourquoi nous avons finalement décidé, pour la série de donnée que nous avions, de procéder au comptage manuel de la population bactérienne.

Annexe E : couche limite de concentration près d'une paroi en écoulement de Poiseuille 2D plan

On suppose un canal plan dans lequel est établi un écoulement laminaire de type poiseuille 2D plan. Sur ce canal est déposée une bactérie d'épaisseur suffisamment faible pour confondre l'origine du repère lié à la bactérie et l'origine du repère lié au canal. On suppose donc l'écoulement de Poiseuille non perturbé. Le champ de concentration d'un soluté S_0 dont la valeur est homogène est transporté par l'écoulement vers la bactérie.

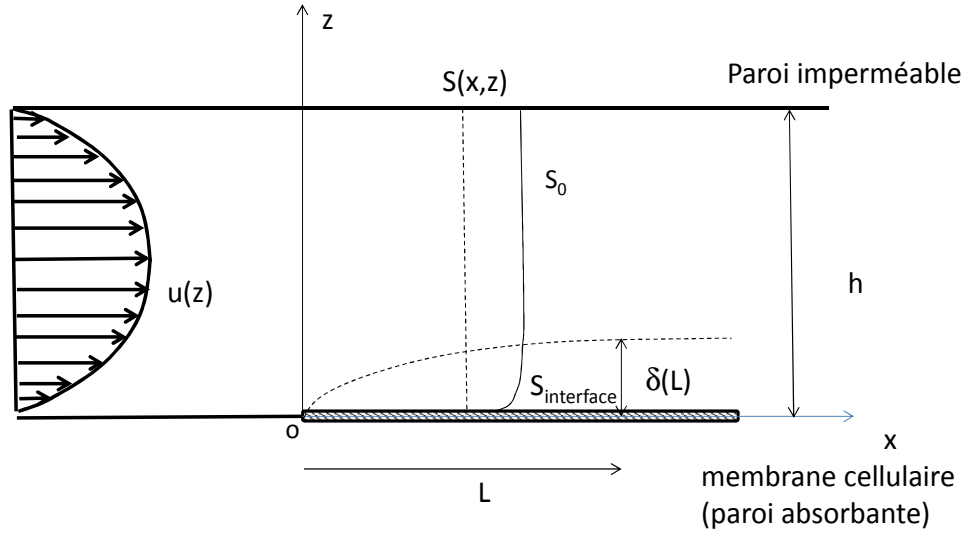


Figure E.1 : Schéma idéalisé du développement d'une couche limite de concentration sur paroi absorbante.

Le transfert global de soluté va dépendre à la fois du développement d'une couche limite de concentration au niveau de la surface de la bactérie ainsi que du flux transmembranaire au niveau de la membrane bactérienne. On ne s'intéresse ici, qu'à la couche limite de concentration entre la membrane de la bactérie et l'écoulement (la membrane est vue comme une paroi absorbante non modélisée avec une concentration en soluté $S_{interface}$ à la surface de la cellule bactérienne)

A l'équilibre, l'équation de convection-diffusion s'écrit :

$$u(z)\frac{\partial S}{\partial x} = D\frac{\partial^2 S}{\partial z^2} \qquad \text{(Eq. D.1)}$$

En considérant une distance z << h/2, le profil de vitesse parabolique donné au chapitre 4 peut être approximé par un profil linéaire qui dans notre cas s'écrit :

$$u(z) \approx \frac{6Uz}{h} \qquad \text{(Eq. D.2)}$$

où U est la vitesse débitant dans la chambre d'écoulement (U = Q/A avec A section de la chambre d'écoulement)

En supposant une condition d'adhérence du fluide sur la membrane de la bactérie, on a donc :

$$\frac{6Uz}{h} \cdot \frac{\partial S}{\partial x} = D \frac{\partial^2 S}{\partial z^2} \qquad \text{(Eq. D.3)}$$

On appelle L la position par rapport à l'origine sur la membrane cellulaire, δ l'épaisseur de la couche limite de concentration à partir de cette position. L'égalité des ordres de grandeurs de chaque terme lorsque l'on se place à la frontière de la couche limite massique donne :

$$\frac{6U\delta}{h} \cdot \frac{\Delta S}{L} = D \frac{\Delta S}{\delta^2} \qquad \text{(Eq. D.4)}$$

Avec $\Delta S = (S_0 - S_{interface})$ où $S_{interface}$ est la concentration maintenue à l'interface de la membrane de la cellule (et qui dépend de l'équilibre relatif entre les apports du au gradient de concentration dans la couche limite et le flux transmembranaire à travers la membrane de la cellule bactérienne)

En introduisant le nombre de Péclet : Pe = U.h/D, on obtient alors :

$$\delta^3 \propto \frac{DLh}{U} \text{ soit } \frac{\delta}{h} \propto Pe^{-1/3}\left(\frac{L}{h}\right)^{1/3} \qquad \text{(Eq. D.5)}$$

Dans le cas d'une condition au limite de glissement (membrane cellulaire « fluide »), la vitesse u(z) = U. On obtient :

$$U \cdot \frac{\Delta S}{L} = D \frac{\Delta S}{\delta^2} \qquad \text{(Eq. D.6)}$$

$$\frac{\delta}{h} \propto Pe^{-1/2}\left(\frac{L}{h}\right)^{1/2} \qquad \text{(Eq. D.7)}$$

Annexe F : Microscopie de fluorescence pour la mesure de la viabilité cellulaire

La fluorescence est utilisée dans ce travail pour mesurer la viabilité de la biomasse dans le système au moyen d'un marquage fluorescent appelé « marquage Live-Dead ». Elle permet donc de déterminer le ratio des cellules vivantes et des cellules mortes par rapport à la biomasse totale. Après 15 minutes d'exposition du milieu à cette substance, les cellules vivantes prennent la coloration verte tandis que les cellules mortes deviennent rouges. Le principe est le suivant : La substance contient deux marqueurs fluorescents qui se différencient par leur habilité à pénétrer dans les cellules : le SYTO 9 à fluorescence verte et l'iodure de propidium (IP) à fluorescence rouge.

Quand il est utilisé seul, le SYTO 9 peut pénétrer à la fois dans les cellules mortes et vivantes. Quand à l'Iodure de Propidium, il pénètre uniquement dans les cellules mortes. De ce fait lorsque les deux marqueurs sont présents, l'IP réduit la fluorescence du SYTO 9, il en résulte une coloration verte des cellules vivantes et rouge des cellules mortes.

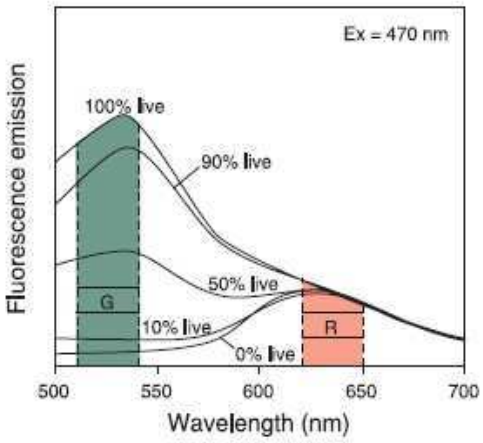


Figure F.1 : Analyse de la viabilité de suspensions bactériennes au moyen du kit Live/Dead. Les cellules vivantes sont marques vertes par le Syto 9, et les cellules mortes sont marquées rouges par l'IP. L'ajout simultané du Syto 9 et de l'IP suivi d'une excitation à 470 nm montre un spectre de fluorescence. image tirée de Molecular Probes.

Pour notre microscope, l'observation des cellules vivantes et mortes peut être faite séparément ou simultanément. Cette étude va permettre de pouvoir mesurer l'activité bactérienne vis-à-vis des conditions hydrodynamiques et physico-chimiques du milieu mais également des substrats organiques et minéraux.

Résumé court

Les biofilms sont d'une importance considérable dans de nombreuses applications industrielles et environnementales, parmi lesquels les biofiltres utilisés en traitement de l'eau. L'interaction forte entre l'écoulement et le développement du biofilm dans ce type de procédés rend très difficile leur modélisation sans des progrès drastiques dans la compréhension de phénomènes apparaissant à diverses échelles (échelles de quelques pores, échelles du biofilm). Dans cette thèse nous avons conçu et développé une chambre d'écoulement dont la caractérisation expérimentale du champ d'écoulement a permis d'étudier l'influence de l'hydrodynamique sur la croissance bactérienne et le développement de biofilms. Nous avons ensuite mis en évidence l'influence de la nature ionique du fluide en écoulement et du temps de contact initial sur le détachement cellulaire. Nous avons également montré que la cinétique de détachement cellulaire est associée à l'existence d'une contrainte seuil, qui elle-même dépend du temps de contact initial et fait donc apparaitre des effets d'histoire. Les résultats ont aussi montré qu'à faible nombre de Reynolds, les lois de croissance utilisées en conditions de cultures libres ne sont pas applicables pour une biomasse fixée sur support solide. L'étude révèle également, comme déjà montré auparavant dans certains travaux de recherches, l'organisation de biofilms en réponse à l'écoulement, même à faible nombre de Reynolds. La technique de reconstruction 3D développée et mise en œuvre a permis de simuler l'écoulement local à travers le biofilm et constitue donc un outil efficace pour décrire quantitativement les pertes de charges liées au frottement. Par des méthodes de changement d'échelle, elle permettra à terme de développer des outils d'interprétation des mesures globales sur pilote à partir d'informations à l'échelle locale sur le biofilm.

***Mots-clés** : traitement de l'eau, biofiltres, chambre d'écoulement, hydrodynamique, biofilms, taux de croissance, contrainte de cisaillement, reconstruction 3D, microstructure.*

Short Abstract

The biofilms are of considerable importance in many industrial and environmental applications, among which biofilters used in water treatment. The strong interaction between the flow and the biofilm development in this type of processes returns very difficult their modelling without drastic progress in the comprehension of phenomena appearing on various scales (scales of some pores, scales of the biofilm). In this thesis we have developed a flow chamber for which the experimental investigation of the local flow field had leaded to study the influence of hydrodynamic on bacterial surface growth and biofilm development. We have shown that the ionic strength of fluid flowing and the bacterial initial contact time exerted an influence on cell detachment. The yield shear stress associated with the cell detachment kinetic has also been shown to be time dependent and thus makes appeared the effects of history. The results also showed that the growth kinetics measured in batch was not applied, for low Reynolds number in the case of a biomass fixed to solid support and subjected to a shear stress. The study reveals also, as already shown before in certain research tasks, the biofilms organization in response to the sheared flow, even with small Reynolds number. The technique of 3d-reconstruction developed and implemented in complement to the direct optical microscopy allowed a better interpretation of the global biofilm architecture. We are now able to simulate the distribution of the local velocity profiles in the influence of biofilm microstructure on hydrodynamic. The understanding of the local velocity profiles will allow in short-term to calculate the flow-induced friction and will permit to describe quantitatively the pressure losses related to the biofilm hydraulic resistance in biofilters. This method will allow also in the medium-term, to link the microstructure of the biofilm and quantitative direct measurements (dry matter, EPS....). From these informations at local scale, one will be able, by methods of scaling, to have tools for interpreting the global measurements at pilot scale.

***Key-words**: Water treatment, biofilters, flow chamber, hydrodynamic, biofilm, growth rate, shear stress, 3D-reconstruction, microstructure.*