



AVERTISSEMENT

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

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

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

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

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

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

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

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

UNIVERSITÉ DE LORRAINE
ÉCOLE NATIONALE SUPÉRIEURE DE GÉOLOGIE DE NANCY
ÉCOLE DOCTORALE RESSOURCES PROCÉDÉS PRODUITS ENVIRONNEMENT
LABORATOIRE ENVIRONNEMENT GÉOMÉCANIQUE ET OUVRAGES

Thèse

Présentée à l'Université de Lorraine
en vue de l'obtention du titre de

**Docteur de l'Université de Lorraine
en Mécanique - Génie Civil**

Par

Tiangoua KONE

ÉTUDE EXPÉRIMENTALE DU COUPLAGE ENTRE CROISSANCE BACTÉRIENNE ET TRANSPORT D'UN POLLUANT ORGANIQUE EN MILIEU POREUX

Soutenue le 18 Mai 2012 devant la Commission d'Examen

Membres du Jury :

MM.	Michel SARDIN	Président
	François LEHMANN	Rapporteur
	Philippe THONART	Rapporteur
	Henri BERTIN	Examineur
	Jean-Claude BLOCK	Examineur
	Philippe SECHET	Examineur
	Michel Antoine BUÈS	Directeur de thèse
	Fabrice GOLFIER	Co-directeur de thèse
	Constantin OLTÉAN	Co-directeur de thèse, Invité

Qualité et adresse des membres du jury :

Michel SARDIN Examineur	Professeur à l'Université de Lorraine (ENSIC) Laboratoire Réactions et Génie des Procédés LRGP UPR 3349, 1 rue Grandville 54001 Nancy
François LEHMANN Rapporteur	Maître de Conférences, HDR à l'Université de Strasbourg Laboratoire d'HYdrologie et de GEochimie de Strasbourg 1, rue Blessig 67084 Strasbourg Cedex
Philippe THONART Rapporteur	Professeur à l'Université de Liège Département des sciences de la vie / Biochimie et microbiologie industrielles Bât. B40 Biochimie et microbiologie industrielles Boulevard du Rectorat 29 B-4000 Liège 1 (Belgique) Centre wallon de Biologie industrielle (CWBI) Passage des Déportés, 2 B-5030 Gembloux (Belgique)
Henri BERTIN Examineur	Directeur de Recherche CNRS Université de Bordeaux Institut de Mécanique et Ingénierie Bordeaux - UMR CNRS 5295 I2M - Site ENSCBP Bât A 16 avenue Pey-Berland 33607 Pessac Cedex
Jean Claude BLOCK Examineur	Professeur à l'Université de Lorraine Laboratoire de Chimie Physique et Microbiologie pour l'Environnement LCPME UMR 7564 405, rue de Vandoeuvre 54600 Villers-Lès-Nancy
Philippe SECHET Examineur	Maître de Conférences à l'Université de Grenoble Laboratoire des Ecoulements Géophysiques et Industriels (LEGI UMR 5519) Domaine Universitaire BP 53 38041 Grenoble Cedex
Michel Antoine BUÈS Directeur de Thèse	Professeur à l'Université de Lorraine (ENSG) Laboratoire Environnement Géomécanique et Ouvrages EA 1145 Rue du Doyen Marcel Roubault BP 40 54501 Vandoeuvre-Lès-Nancy cedex
Fabrice GOLFIER Co-directeur de Thèse	Maître de Conférences, HDR à l'Université de Lorraine (ENSG) Laboratoire Environnement Géomécanique et Ouvrages EA 1145 Rue du Doyen Marcel Roubault BP 40 54501 Vandoeuvre-Lès-Nancy cedex
Constantin OLTÉAN Co-directeur de Thèse Invité	Maître de Conférences, HDR à l'Université de Lorraine (ENSG) Laboratoire Environnement Géomécanique et Ouvrages EA 1145 Rue du Doyen Marcel Roubault BP 40 54501 Vandoeuvre-Lès-Nancy cedex

À ma grande famille.

Remerciements

Je voudrais sincèrement remercier mon Directeur de Thèse, M. Michel BUÈS ainsi que mes deux co-directeurs de Thèse, MM. Fabrice GOLFIER et Constantin OLTÉAN. Ils m'ont en effet donné la chance d'effectuer ma thèse dans leur unité et m'ont tous, sans mesure, soutenu et orienté jusqu'au bout. Je leur en suis infiniment reconnaissant. Je voudrais exprimer d'une manière particulière à Fabrice gratitude et admiration pour sa patience à mon égard. J'ai été souvent lent à comprendre parce que beaucoup de notions étaient nouvelles pour moi. Mais Fabrice a toujours su rendre simple ce qui est compliqué. C'est ça la marque des « grands ! ». Je ne saurais oublier celui que j'appelle Mc Gyver, M. Éric LEFÈVRE. Sans lui je crois que les manips seraient...je ne trouve pas le mot exact. Mais Eric est incontournable et son aimable collaboration m'a été d'une grande utilité. Il est capable de transformer un déchet en matière première... Salut l'Artiste ! Pour terminer cette première partie, j'adresse un mot de remerciement à Laurent ORGOGOZO, avec qui j'ai démarré les manipulations. Il m'a formé sur les techniques expérimentales en hydrodynamique et cela m'a permis de gagner du temps dans ma thèse. Il est aussi l'artisan des codes (sous Fortran) de traitement des images de traçage. Qu'aurais-je fait sans une si précieuse intervention ? Merci encore Laurent.

Je voudrais avoir une pensée pour ma famille. Je suis si triste de ne pas pouvoir dire à mon oncle M. Kaki KONE qu'il avait eu une vision et que sa vision s'est accomplie. Oui, il m'avait vu faire des études. Alors que mon père, son petit frère, ne l'envisageait pas, et il m'a emmené à l'école primaire de Zélesso sous cette fine pluie, à vélo avec mon frère. Après l'échec (suite à la grève des enseignants) à l'entrée en 6^{ème} il m'a encore donné une 2^{ème} chance et aujourd'hui... A titre posthume je lui témoigne mon admiration et ma gratitude. Sans lui je serais certainement aujourd'hui berger et illettré, incapable de lire un panneau ou une étiquette de signalisation de danger sur une bouteille de pesticide. Chapeau ! Chapeau ! Et MERCI, Sagui (c'est comme cela que je l'appelais). A mon père, à ma mère et à mes frères et sœurs (qui n'ont pas eu la chance que j'ai eue d'étudier), je dis merci pour tout. Merci pour leur assistance, leur soutien et leur réconfort. Je terminerai ce chapitre familial en remerciant mes cousins, en particulier Gnémougoyo KONE et Dopiéomé KONE qui m'ont hébergé chez eux durant mes études. Merci particulièrement à Dop (Dopiéomé) pour l'incroyable chance qu'il m'a donné en finançant mes études du CM2 jusqu'à la Terminale. Je ne saurais avoir les mots justes pour lui témoigner ma reconnaissance.

Je remercie tous mes collègues thésards avec qui nous avons partagé de bons moments. Cette ambiance entre collègues était bien agréable et stimulante pour le travail. Je remercie enfin tout le personnel du LAEGO pour l'accueil et pour les échanges enrichissants.

Je tiens aussi à remercier tous ceux et toutes celles (je ne saurais les citer tous) qui durant mon parcours m'ont aidé d'une manière ou d'une autre. Et d'une manière spéciale, je remercie mon frère et mon ami Olivier WISOBA qui m'a certainement aidé à tenir à Nancy quand je ne connaissais personne ici. Non seulement il a été présent physiquement, mais financièrement il m'a toujours aidé. Merci pour tout !

Et comme on garde toujours le meilleur pour la fin, je voudrais remercier Olive qui a dû supporter toutes les crises de nerfs quand les manips ne marchaient pas. Je la remercie aussi pour le réconfort. Je remercie aussi ses parents qui sont devenus aussi les miens maintenant pour leur assistance et leurs encouragements.

Pour vraiment terminer je remercie l'Etat ivoirien qui m'a donnée une bourse me permettant de faire des études Belgique, passage qui m'a permis de venir en France par la suite. Je remercie aussi l'Institut Carnot Énergie et Environnement en Lorraine (ICÉEL) qui a financé cette thèse. Enfin, remerciements au LCPME pour la franche collaboration.

SOMMAIRE

SOMMAIRE	IX
LISTE DES FIGURES	XV
LISTE DES TABLEAUX	XVII
CHAPITRE I . INTRODUCTION GENERALE	1
1.1. PROBLEMATIQUE DES BIOFILMS	3
1.2. OBJECTIF DE LA THESE	7
CHAPITRE II . SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE	9
2.1. GENERALITES SUR L'ACTIVITE MICROBIENNE	11
2.1.1. DYNAMIQUE DES POPULATIONS BACTERIENNES	11
2.1.2. VIE MICROBIENNE EN BIOFILM	13
2.1.2.1. <i>DEFINITION D'UN BIOFILM</i>	13
2.1.2.2. <i>MECANISMES DE FORMATION DES BIOFILMS</i>	14
2.1.2.3. <i>CONDITIONNEMENT DE LA SURFACE A COLONISER ET TRANSPORT DES BACTERIES</i>	15
a) <i>Formation d'un film conditionnant</i>	15
b) <i>Transport des bactéries vers la surface conditionnée</i>	15
2.1.3. ADHESION BACTERIENNE	16
2.1.3.1. <i>ADHESION REVERSIBLE</i>	16
2.1.3.2. <i>ADHESION IRREVERSIBLE</i>	16
2.1.4. MATURATION DU BIOFILM	17
2.1.5. DETACHEMENT ET DISPERSION	18
2.1.6. FONDEMENTS PHYSICO-CHIMIQUES DE LA FORMATION DES BIOFILMS	19
2.1.6.1. <i>FACTEURS FAVORISANT L'ADHESION BACTERIENNE</i>	19
a) <i>Propriétés de surface</i>	19
b) <i>Facteurs environnementaux</i>	20
c) <i>Vitesse d'écoulement</i>	20
2.1.6.2. <i>THEORIE DE L'ADHESION MICROBIENNE</i>	21
2.1.7. FONDEMENTS GENETIQUES DE LA FORMATION DU BIOFILM	22
2.1.8. PHYSIOLOGIE DES BIOFILMS	24
2.1.8.1. <i>METABOLISME DES BIOFILMS</i>	24
2.1.8.2. <i>TRANSFERT DE GENES</i>	26
2.1.9. NUISANCES INDUITES PAR LES BIOFILMS	26
2.2. ETAT DE L'ART SUR LA CARACTERISATION DU TRANSPORT DE SOLUTES EN MILIEUX POREUX EN PRESENCE DE BIOFILMS	28
2.2.1. PROBLEMATIQUE DU TRANSPORT DE SOLUTES EN MILIEU POREUX	28
2.2.2. IMPACT DU BIOFILM SUR LES PROPRIETES HYDRODYNAMIQUES DU MILIEU POREUX	29
2.2.2.1. <i>POROSITE</i>	29

2.2.2.2. PERMEABILITE	30
2.2.2.3. DISPERSIVITE	31
2.2.3. ETAT DE L'ART SUR LES METHODOLOGIES EXPERIMENTALES	32

CHAPITRE III. MISE EN PLACE DU DISPOSITIF EXPERIMENTAL 37

3.1. INTRODUCTION 41

3.2. CHOIX DE LA SOUCHE BACTERIENNE 42

3.2.1. CONTEXTE DU CHOIX 42

3.2.2. PRESENTATION ET CONDITION DE CULTURE DE LA SOUCHE SHEWENELLA ONEIDENSIS MR-1 43

3.2.2.1. PRESENTATION 43

3.2.2.2. MILIEU DE CULTURE 43

3.3. PRESELECTION DE LA MATRICE SOLIDE ET DIMENSIONNEMENT DE LA CELLULE 45

3.4. ESSAIS DE TRANSPORT CONSERVATIF AVEC L'ERIOGLAUCINE 47

3.4.1. DISPOSITIF EXPERIMENTAL 47

3.4.2. CALIBRATION 49

3.4.3. CONVERSION DES NIVEAUX DE GRIS EN CHAMPS DE CONCENTRATION 52

3.4.4. RESULTATS DES ESSAIS DE TRAÇAGE AVEC L'ERIOGLAUCINE 54

3.4.4.1. INJECTION CRENEAU 55

3.4.4.2. INJECTION ECHELON 56

3.5. FORMATION D'UN BIOFILM SUR LES BILLES DE VERRE ET ESSAIS DE TRANSPORT CONSERVATIF EN PRESENCE DU BIOFILM 58

3.5.1. PREPARATION DE L'INOCULATION ET INOCULATION DU MILIEU POREUX 58

3.5.2. SUIVI DE LA FORMATION DU BIOFILM DANS LE MILIEU POREUX 59

3.5.3. ETUDE DU TRANSPORT CONSERVATIF DE L'ERIOGLAUCINE EN PRESENCE DU BIOFILM 61

3.5.3.1. ETUDE QUALITATIVE DE L'INFLUENCE DE LA CROISSANCE DU BIOFILM SUR LE PANACHE DE SOLUTE 61

3.5.3.2. ETUDE QUANTITATIVE : EVOLUTION SPATIO-TEMPORELLE DU CHAMP DE CONCENTRATION 63

3.6. CONCLUSION PARTIELLE ET PERSPECTIVES EXPERIMENTALES 64

CHAPITRE IV. RESULTATS EXPERIMENTAUX 67

4.1. FORMATION DU BIOFILM DANS LE MILIEU POREUX 69

4.1.1. CARACTERISATION HYDRODYNAMIQUE DU MILIEU POREUX 69

4.1.2. SUIVI DE LA CROISSANCE DU BIOFILM 70

4.2. PROPOSITION D'UNE METHODE POUR L'ESTIMATION IN SITU DU BIOVOLUME **73**

4.3. ETUDE DU TRANSPORT DE L'ERIOGLAUCINE DANS LE MILIEU POREUX AVEC ET SANS BIOFILM **79**

4.3.1. INFLUENCE DE LA CROISSANCE DU BIOFILM SUR LA DISPERSION DU SOLUTE **81**
4.3.2. DETERMINATION DES PARAMETRES DE TRANSPORT **83**

4.4. DISCUSSION **89**

4.5. CONCLUSION **91**

CHAPITRE V. MODELISATION DU TRANSPORT DE SOLUTE EN PRESENCE DE BIOFILM **93**

5.1. ETAT DE L'ART **95**

5.1.1. NOTION D'ECHELLE **95**
5.1.2. CHANGEMENT D'ECHELLE **97**

5.2. METHODE DE CHANGEMENT D'ECHELLE PAR LA PRISE DE MOYENNE VOLUMIQUE **98**

5.2.1. PRINCIPE **98**

5.2.2. FORMULATION DES MODELES MACROSCOPIQUES ISSUS DE LA METHODE DE PRISE DE MOYENNE VOLUMIQUE **101**

5.2.2.1. ETAT DE L'ART **101**

5.2.2.2. MODELE CONCEPTUEL DU SYSTEME FLUIDE/BIOFILM ET CHOIX DES HYPOTHESES SIMPLIFICATRICES **102**

5.2.3. MODELES SIMPLIFIES DE TRANSPORT **104**

5.2.3.1. MODELE D'EQUILIBRE DE MASSE LOCAL (LEA) **104**

5.2.3.2. MODELE DE BIODEGRADATION LIMITEE PAR LA CINETIQUE DE REACTION (REACTION RATE LIMITED CONSUMPTION - RRLC) **105**

5.2.3.3. MODELE DE BIODEGRADATION LIMITEE PAR LE TRANSFERT DE MASSE OU MASS TRANSFER LIMITED CONSUMPTION (MTLC) **106**

5.2.3.4. MODELE A DEUX EQUATIONS (TEM) **107**

5.3. COMPARAISON ENTRE RESULTATS NUMERIQUES ET RESULTATS EXPERIMENTAUX **110**

5.3.1. DEMARCHE DE MODELISATION **110**

5.3.1.1. DOMAINE D'ETUDE **110**

5.3.1.2. CONDITIONS AUX LIMITES **113**

5.3.1.3. DONNEES D'ENTREE DES MODELES **114**

5.3.2. COMPORTEMENT HYDRODYNAMIQUE EN CONDITION ABIOTIQUE **115**

5.3.3. COMPORTEMENT HYDRODYNAMIQUE EN CONDITION BIOTIQUE **118**

5.3.3.1. En présence du biofilm de 17 jours **118**

5.3.3.2. En présence du biofilm de 29 jours **121**

5.3.4. EVALUATION DE LA DISPERSION EN FONCTION DU BIOVOLUME ET DE LA VITESSE D'INJECTION	124
5.3.5. COMPARAISON AVEC LES SOLUTIONS THEORIQUES ISSUES DU CHANGEMENT D'ECHELLE	126
5.4. DISCUSSION GENERALE	130
CHAPITRE VI. CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES	133
6.1. CONCLUSIONS	135
6.2. PERSPECTIVES	137
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	139
ANNEXES	151
ANNEXE 1 : PROTOCOLE DE REMPLISSAGE DE LA CELLULE D'ECOULEMENT	153
ANNEXE 2 : COURBE DE TRANSMISSION DU FILTRE PASSE-BANDE	155

LISTE DES FIGURES

Figure 1. Diagramme schématique illustrant les approches microcolonies et biofilms utilisées pour modéliser la biomasse en milieu poreux saturé (d'après Clément et al., 1999).	6
Figure 2 : Différentes étapes décrivant l'évolution d'une culture bactérienne (Buchanan, 1918).	12
Figure 3 : Implication des appendices cellulaires selon le stade de formation du biofilm et l'espèce bactérienne (David et O'Toole, 2000).	23
Figure 4 : Mise en évidence de canaux d'eau dans la structure du biofilm mature (Donlan, 2002).	25
Figure 5 : Courbes de croissance de <i>Shewanella oneidensis</i> MR-1 en fonction de la composition du milieu (Le Pape, 2009).	44
Figure 6 : Cellule d'écoulement en acier inoxydable.	46
Figure 7 : Dispositif expérimental pour la croissance du biofilm et les essais de traçage.	48
Figure 8 : Système de vannes de la cellule d'écoulement (Orgogozo, 2009).	50
Figure 9 : Images de calibration de la cellule avec les billes de verre Retsch®.	51
Figure 10 : Exemple de régression linéaire pour un pixel quelconque.	53
Figure 11 : Procédure de traitement des images de traçage.	54
Figure 12 : Courbe de percée au centre pour une injection impulsion.	55
Figure 13 : Courbe de percée au centre de la cellule pour une injection continue de soluté.	57
Figure 14 : Suivi de la croissance du biofilm sur billes de verre Retsch®.	60
Figure 15 : Panache de soluté en l'absence et en présence de biofilm à trois régime d'écoulement (a) $6,09 (\pm 0,11) \cdot 10^{-5}$ m/s, (b) $1,44 (\pm 0,07) \cdot 10^{-4}$ m/s et (c) $2,84 (\pm 0,06) \cdot 10^{-4}$ m/s.	62
Figure 16 : Mise en évidence de la croissance du biofilm sur les billes de verre Retsch®.	64
Figure 17 : Suivi de la croissance du biofilm dans le milieu poreux.	71
Figure 18 : Images de la cellule avec biofilm prises avec le microscope AZ100.	72
Figure 19 : Structure de la molécule de Bleu Dextran.	74
Figure 20 : Estimation de l'évolution de la porosité : (a) avec l'Erioglaurine et (b) avec le Bleu Dextran.	77
Figure 21 : Lissage du champ de concentration (29 jours).	80
Figure 22 : Deuxième rognage des images lissées.	81
Figure 23 : Panaches d'Erioglaurine à (a) $v = 2,22 (\pm 0,13) \cdot 10^{-5}$ m/s et à (b) $v = 1,33 (\pm 0,02) \cdot 10^{-4}$ m/s.	82
Figure 24 : Courbes de percée du traceur à (a) $v = 2,22 (\pm 0,13) \cdot 10^{-5}$ m/s et à (b) $v = 1,33 (\pm 0,02) \cdot 10^{-4}$ m/s.	85
Figure 25 : Contrainte sur les longueurs caractéristiques (d'après Orgogozo, 2009).	99
Figure 26 : Exemple de cellules unitaires (Golfier, 2012 depuis un réseau 2D à une caractérisation 3D d'un milieu réel par micro-tomographie (le biofilm est en vert, les grains sont en rouge)).	101
Figure 27 : Comparaison entre simulations numériques directes (DNS) et modèle à 2 équations pour $Péclet = 100$ et $Damköhler = 10$ sur un milieu poreux 2D complexe (Orgogozo et al., soumis).	109
Figure 28 : Domaine d'étude 1D et section d'observation.	111
Figure 29 : Condition limite en entrée pour l'essai de traçage à 29 jours ($v = 1,33 \cdot 10^{-4}$ m/s).	113
Figure 30 : Comparaison entre expérience et simulation en l'absence de biofilm.	117
Figure 31 : Comparaison entre expérience et simulation en présence du biofilm de 17 jours.	120
Figure 32 : Comparaison entre expérience et simulation en présence du biofilm de 29 jours.	123
Figure 33 : Influence de la croissance du biofilm sur la dispersion hydrodynamique.	125
Figure 34 : Image tridimensionnelle du réseau de billes (représentées en marron) et de la biomasse qui les recouvre (en jaune) à l'échelle du pore après 17 jours de culture.	127
Figure 35 : Influence de la croissance du biofilm sur la dispersion hydrodynamique (solution théorique).	127
Figure 36 : Comparaison entre valeurs de dispersion déterminées théoriquement et expérimentalement.	129

LISTE DES TABLEAUX

<i>Tableau 1 : Quelques études expérimentales sur le transport bioréactif.</i>	34
<i>Tableau 2 : Evolution de la conductivité hydraulique avec la croissance du biofilm.</i>	60
<i>Tableau 3 : Paramètre expérimentaux des expériences de traçages.</i>	86
<i>Tableau 4 : Valeurs du nombre de Péclet de pore associées aux différentes simulations.</i>	112
<i>Tableau 5 : Valeurs des données d'entrée des modèles.</i>	114
<i>Tableau 6. Caractéristiques géométriques des cellules unitaires</i>	126

CHAPITRE I

INTRODUCTION GENERALE

1.1. Problématique des biofilms

Le terme « biofilm » a été utilisé pour la première fois par Harremoës (1977). La plupart des définitions s'accordent sur le fait que le biofilm est un mode de vie de nombre d'organismes unicellulaires (bactéries, algues, levures, ...). Ces micro-organismes adhèrent irréversiblement à une surface ou à une interface (solide/liquide, liquide/gaz ou liquide/liquide) grâce à une matrice de substances polymériques extracellulaires (EPS). On parle alors de micro-organismes sessiles par opposition à des micro-organismes en suspension dits planctoniques. La matrice d'EPS est essentiellement composée de polysaccharides et confère au biofilm une grande stabilité. L'étude de ces structures biologiques complexes que sont les biofilms est devenue un champ pluridisciplinaire qui intéresse de nombreux chercheurs, si bien que différents centres de recherche ainsi que des institutions lui sont exclusivement dédiés. Citons entre autres :

- le Centre pour l'Ingénierie du Biofilm (The Montana State University Center for Biofilm Engineering (CBE), USA) créé en 1990 ;
- le Centre de Recherche du Biofilm de l'Université de Standford (Standford Biofilm Research Center, USA), créé en novembre 2001 ;
- le PNIR-Biofilms (Pôle de recherche National à Implication Régionale), créé en janvier 2005 en France à l'initiative du Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS) ;
- le Centre de Recherche-Biofilms pour les Bio-interfaces de l'Université de Malmö, Suède (Biofilms-Research Center for Biointerfaces, Malmö University), créé en 2005.

Ce grand intérêt pour les biofilms réside dans leurs diverses implications environnementales et industrielles mais aussi dans leur incidence sur la santé humaine. En effet, les surfaces colonisables par les microorganismes pour former des biofilms sont diverses. Elles peuvent aller des surfaces inanimées rencontrées dans le sol et les systèmes aquatiques jusqu'aux tissus vivants tels que l'émail dentaire, les valves cardiaques, ou les poumons et l'oreille moyenne (Donlan, 2001). Ainsi, selon le milieu colonisé et le domaine d'activité concerné, la présence de biofilm pourra fortement conditionner les finalités et enjeux considérés.

D'un point de vue médical, tout d'abord, les biofilms ont un impact sur la santé publique. En effet, outre les murs des salles d'intervention, les surfaces de cathéters et d'implants médicaux sont colonisables par les microorganismes, ce qui entraîne l'apparition de maladies nosocomiales chez divers patients hospitalisés (Barbeau *et al.*, 1998 ;

Wisplinghoff *et al.*, 2004). La difficulté majeure à laquelle sont confrontés les professionnels de la santé humaine est que le mode de vie en biofilm confère aux cellules microbiennes d'une part une résistance accrue aux agents antimicrobiens que sont les antibiotiques, les désinfectants et les germicides et, d'autre part, la capacité de lutter contre les attaques du système de défense de l'hôte dans le cas de micro-organismes pathogènes (Costerton *et al.*, 1985 ; Anwar *et al.*, 1990 ; Donlan et Costerton, 2002).

Dans les procédés industriels, les biofilms sont à l'origine de multiples nuisances car ils constituent un réservoir de contamination important. Les biofilms abritent, en effet, la plupart des bactéries pathogènes et des bactéries destructrices comme c'est le cas dans l'industrie laitière (Mittelman, 1998). Les nuisances liées à ces consortiums bactériens ne se limitent pas à leur caractère infectieux potentiel suite aux contaminations dans les procédés industriels agro-alimentaires. Les biofilms réduisent aussi les performances des systèmes de filtration par membrane (Baker et Dudley, 1998 ; Flemming, 2002) en les encrassant. Ce phénomène d'accumulation de dépôts indésirables de nature biologique sur une surface est connu sous le terme de *biofouling*. Outre les systèmes de filtration membranaires, d'autres dispositifs industriels peuvent être sujets au *biofouling*, notamment les systèmes de refroidissement, les réservoirs de stockage, les systèmes de distribution d'eau potable. L'accumulation du biofilm sur ces systèmes peut conduire à la bio-corrosion qui engendre des coûts de maintenance importants (Videla, 2002).

En dépit de ces effets nuisibles, les biofilms peuvent aussi être exploités de manière avantageuse dans certains procédés industriels. Il s'agit en particulier des procédés de traitement des effluents domestiques par des boues activées (système à biomasse en suspension où les bactéries forment des biofilms sous forme de floccs) et par des systèmes à biomasse fixée comme les biofiltres et les biodisques. Ces procédés biologiques peuvent également être utilisés pour le traitement des effluents industriels (*e.g.* : eaux usées, rejets gazeux, ...). Un autre champ d'application des biofilms, qui constitue plus particulièrement le contexte général de cette étude, est la biorémediation des sites et des sols pollués (biobarrières, bio-augmentation, ...) et la refunctionalisation de ceux-ci après traitement (restauration des propriétés agronomiques du sol par l'utilisation de micro-organismes). Dans tous ces procédés de traitement de la pollution, c'est la capacité des bactéries à utiliser les polluants organiques comme source de carbone et d'énergie qui est exploitée. Ces procédés de biorémediation impliquent des interactions biologiques et physicochimiques complexes entre la phase fluide, les bactéries et la matrice de sol. En effet, dans la zone saturée du sol, le transport des solutés (*e.g.* : composés organiques) est régi par de nombreux facteurs englobant : (i) la nature

chimique de ces substances (qui gouverne leurs interactions avec la matrice solide, leurs interactions les unes avec les autres et leurs interactions avec les micro-organismes du sol), (ii) les propriétés physicochimiques et hydrodynamiques de la matrice solide et (iii) l'activité biologique au sein du milieu. Les caractéristiques de la matrice solide telles que la composition minéralogique, la composition granulométrique et la texture jouent un rôle important dans le devenir des substances chimiques dans la zone saturée du sol. Si la composition granulométrique et la texture du sol déterminent les propriétés hydrodynamiques/hydrodispersives (*i.e.* : la porosité, la perméabilité ou encore la dispersivité) de la matrice poreuse, la composition minéralogique (teneur en matière organique notamment) conditionnera la réactivité de la matrice avec les espèces chimiques en présence. Quant à l'activité biologique due à la présence de micro-organismes, elle peut modifier les propriétés intrinsèques du milieu et le transport des substances chimiques en solution. En effet, cette activité microbienne influera sur le destin de ces espèces chimiques en solution à travers des processus de biodégradation et de biotransformation. Lorsque ces réactions biologiques se produisent naturellement, elles favorisent l'atténuation naturelle des polluants organiques du sol. L'activité biologique dans le sol, en particulier dans la zone saturée, conduit alors à la formation d'un biofilm. L'état d'avancement des recherches permet de dire que le mode de vie en biofilm, *i.e.* : microorganismes fixés à une surface, est le choix préférentiel des micro-organismes dans l'environnement (Zobell, 1943). Cette organisation leur procure de nombreux avantages comme la résistance aux stress environnementaux (restriction ou manque de nutriments, présence d'agents antimicrobiens, ...) et la lutte contre la prédation. Pour comprendre les mécanismes physico-chimiques et biologiques impliqués dans l'atténuation naturelle en vue de l'optimisation des procédés industriels de biorémédiation, de nombreuses études de laboratoire ont été menées et continuent de l'être. Cependant, malgré les avancées technologiques (développement de méthodes microscopiques et spectroscopiques) appuyés par l'essor des méthodes de simulation numérique, la dynamique des biofilms en milieux poreux (*e.g.* : la répartition spatiale du biofilm et de ses constituants) est encore mal connue. Le couplage des effets dus au transport de solutés dans une matrice colonisée par un biofilm amplifie cette méconnaissance et constitue un défi pour les scientifiques.

De nombreux chercheurs (*e.g.* : Taylor et Jaffé, 1990a, b ; Cunningham *et al.*, 1991 ; Veynas *et al.*, 2002 ; Thullner *et al.*, 2002a, b ; Seifert et Engensgaard, 2007 ; Chatelier, 2010 ; Karrabi *et al.*, 2011) ont abordé ce problème. L'objectif principal de la plupart de ces études est : (i) la caractérisation des couplages existants entre comportement hydrodynamique et

mécanismes biologiques au travers d'expériences à l'échelle du laboratoire et (ii) la mise au point de modèles de croissance microbienne, de modèles de transport réactif ou de modèles couplant ces deux aspects. En termes de modélisation, on peut distinguer trois principaux modèles conceptuels (Baveye et Valocchi, 1989). Ces différentes approches reposent sur la formulation adoptée pour représenter la structure du biofilm au sein du milieu poreux : modèle de biofilm où la biomasse est répartie de manière uniforme sur les grains (Taylor et Jaffé, 1990a, b ; Rittmann, 1993), le modèle de microcolonies caractérisé par une occupation partielle des sites sous forme de micro-aggrégats (e.g. Molz *et al.*, 1986) ou encore l'approche macroscopique où l'on s'affranchit des hypothèses sur la distribution spatiale de la biomasse (e.g. : Kindred et Celia, 1989 ; Clément *et al.*, 1996). Plus récemment, des modèles basées sur des développements mathématiques rigoureux ont tenté de relier cette description macroscopique aux caractéristiques microscopiques du système (e.g. : Wood *et al.*, 2002, 2007 ; Golfier *et al.*, 2009, 2011 ; Orgogozo *et al.*, 2009, 2010). La Figure 1 montre une illustration des approches biofilm et microcolonies.

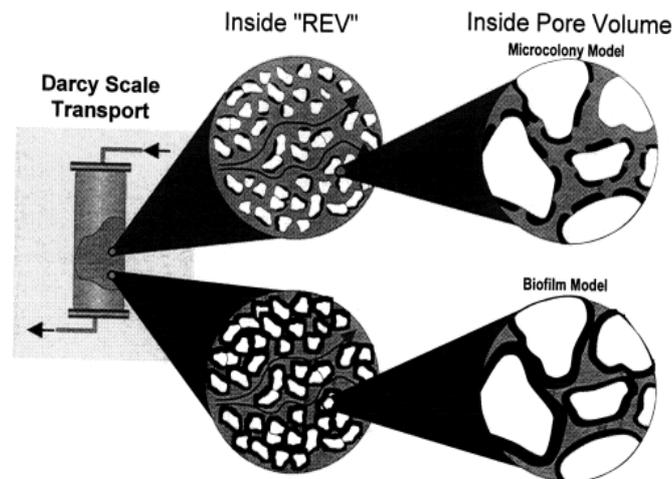


Figure 1. Diagramme schématisant les approches microcolonies et biofilms utilisées pour modéliser la biomasse en milieu poreux saturé (d'après Clément *et al.*, 1999).

REV = Representative Elementary Volume (Volume Élémentaire Représentatif).

Les modèles mathématiques proposés sont nombreux. Mais quelle que soit l'école de pensée, force est de constater que les données quantitatives déterminées expérimentalement sont encore insuffisantes pour comprendre les processus biologiques en milieux poreux (Baveye et Valocchi, 1989 ; Clément *et al.*, 1999). Des travaux d'approfondissement sont donc nécessaires pour juger de la pertinence de tel ou tel modèle. Ce constat nous emmène à l'objectif du présent travail.

1.2. Objectif de la thèse

Nous avons mentionné que l'activité biologique dans le milieu poreux aura une incidence directe sur les propriétés intrinsèques de ce dernier. Par ailleurs, l'amplitude des effets du biofilm dépendra de l'intensité et du rendement de l'activité biologique abritée. Aussi, les paramètres importants à prendre en compte dans la modélisation du transport de soluté en milieu poreux en présence de biofilm sont entre autres, pour le milieu : la porosité, la perméabilité du milieu et la dispersivité, et pour le biofilm : sa fraction volumique dans le milieu poreux (épaisseur et distribution spatiale), la fraction volumique de bactéries actives dans le biofilm (quantité et distribution spatiale), la fraction volumique de substances polymériques extracellulaires dans le biofilm, La détermination de ces paramètres passe nécessairement par : (i) une bonne caractérisation de la matrice poreuse, (ii) une meilleure compréhension des processus de croissance du biofilm dans le milieu poreux et (iii) la caractérisation du transport de soluté organique en présence de biofilm. Ces trois axes constituent le point central de ce travail de thèse. La finalité sera d'explorer les effets couplés reliant l'hydrodynamique du milieu et l'activité microbienne et de comparer les résultats expérimentaux obtenus aux modèles macroscopiques de transport issus de la littérature et, en particulier, ceux établis par Golfier *et al.* (2009) et Orgogozo (2009).

Avant d'aborder les aspects expérimentaux de ce travail, nous présenterons, dans le chapitre 2, une revue de la littérature en deux volets. Le premier volet sera consacré aux mécanismes de formation des biofilms. Le second volet fera un état de l'art sur la dynamique des biofilm en milieu poreux et leur implication dans le transport de solutés organiques. Dans le chapitre 3, nous nous attacherons à la démarche expérimentale qui a conduit à la mise en place du dispositif de mesure. Dans le chapitre 4, nous exposerons les résultats expérimentaux du transport conservatif en présence du biofilm. Nous y présenterons aussi les résultats de caractérisation du biofilm. Dans le 5^{ème} chapitre, nous aborderons la modélisation du transport en présence du biofilm. Ce chapitre permettra de comparer les données expérimentales avec les modèles numériques de Orgogozo (2009). Il se terminera par une discussion des principaux résultats. La dernière partie du manuscrit sera consacrée aux conclusions et aux perspectives expérimentales.

CHAPITRE II

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

La compréhension des processus biologiques en milieu poreux et l'étude de leur impact sur le comportement hydrodynamique du système nécessitent tout d'abord de connaître les microorganismes qui participent à ces processus. Cela nécessite aussi de comprendre et savoir décrire précisément les chaînes réactionnelles ainsi que les étapes d'évolution de cette biomasse.

Dans la première partie de ce chapitre, nous nous intéresserons à l'activité microbienne d'une manière générale. Nous décrirons brièvement le cycle de vie d'une culture bactérienne avant de nous étendre sur les processus physicochimiques et biologiques impliqués dans la formation des biofilms. Dans la seconde partie du chapitre, nous ferons un état de l'art sur les implications hydrodynamiques induites par l'activité microbienne en milieu poreux.

2.1. Généralités sur l'activité microbienne

Les microorganismes de l'environnement sont extrêmement variés de par leurs classes, leurs familles, leurs genres et leurs espèces. Ils diffèrent aussi selon leurs caractéristiques métaboliques (*e.g.* : nature de la source de carbone, nature de l'accepteur d'électron, expression génétique, ...). Nous nous intéresserons en particulier aux bactéries car elles représentent la contribution majeure aux processus de biodégradation et donc à l'atténuation naturelle de la pollution organique du sol.

2.1.1. Dynamique des populations bactériennes

Dans les conditions optimales de culture, l'évolution (ou la croissance) d'une culture bactérienne à partir d'un inoculum issu d'une culture en phase stationnaire peut être décrite par sept grandes étapes comme le montre la Figure 2 (Buchanan, 1918).

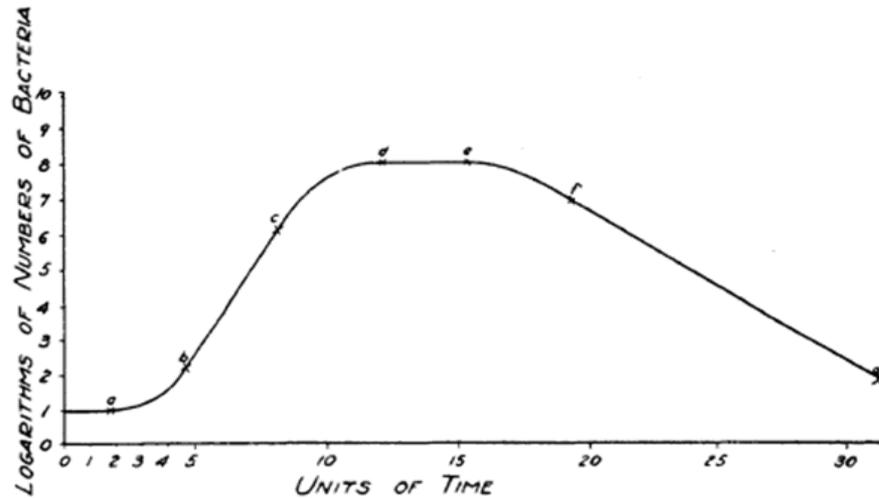


Figure 2 : Différentes étapes décrivant l'évolution d'une culture bactérienne (Buchanan, 1918).

Les différentes phases peuvent être détaillées comme suit :

- 1) **Phase stationnaire initiale** ($0 < t < a$) : le nombre de bactéries reste constant durant cette phase. La vitesse spécifique ou taux de croissance μ (*i.e.* : le taux de multiplication par bactérie) est nul.
- 2) **Phase de latence ou phase d'accélération de la croissance** ($a < t < b$) : durant cette phase, le taux de croissance s'accroît avec le temps. Cette augmentation continue jusqu'à atteindre le temps minimum de génération par organisme (*i.e.* : le temps nécessaire pour doubler la biomasse) selon les conditions de l'expérience.
- 3) **Phase de croissance exponentielle** ($b < t < c$) : la vitesse spécifique de croissance μ reste constante durant cette phase *i.e.* : le temps minimum de génération est maintenu.
- 4) **Phase de décélération de la croissance** ($c < t < d$) : la vitesse spécifique de croissance décroît, *i.e.* : le temps de génération augmente. Le nombre de bactéries continue toujours à augmenter mais moins vite que durant la phase de croissance exponentielle.
- 5) **Phase stationnaire maximale** ($d < t < e$) : le nombre de bactéries cesse ici de croître en raison de l'épuisement du substrat. La vitesse de croissance spécifique est redevenue nulle et le temps de génération tend alors vers l'infini.
- 6) **Phase d'accélération de la décroissance** ($e < t < f$) : cette phase est marquée par la diminution du nombre de bactéries. Cette diminution commence faiblement puis s'accélère jusqu'à atteindre un rythme exponentiel.
- 7) **Phase de décroissance exponentielle** ($f < t < g$) : la décroissance exponentielle est maintenue.

Ces 7 étapes constituent encore aujourd'hui une description de référence pour analyser la dynamique de population bactérienne en « culture batch » bien que certains phénomènes complexes ne soient pas considérés ici (*e.g.* : l'apparition d'une seconde phase de croissance après épuisement du glucose chez certaines souches de *Escherichia coli* due à la réutilisation de certains produits de fin de métabolisme, cf. Holms, 1986).

L'équation de croissance de Monod (1941) est classiquement utilisée pour représenter de manière mathématique cette évolution au cours des phases 3 à 5. Les phases de latence (phases 1 et 2) et de décroissance (phases 6 et 7) ne sont pas considérées ici. Ce modèle exprime la relation entre le taux de croissance et la concentration en substrat limitant (*i.e.* : un substrat dont l'épuisement entraîne l'arrêt de la croissance) et s'écrit comme suit :

$$\mu_M = \mu_{M \max} \frac{c}{K_c + c} \quad (1)$$

Où :

μ_M est le taux de croissance à l'instant t ;

μ_{Mmax} est le taux maximum de croissance durant la période où le substrat n'est pas limitant, *i.e.* : le taux de croissance lors de la phase exponentielle (phase 3) ;

c est la concentration en substrat limitant ;

K_c correspond à la concentration en substrat pour laquelle le taux de croissance est inférieur de moitié à sa valeur maximale.

La dynamique des cultures bactériennes présentée ici concerne les cultures en réacteur fermé (batch) où les conditions de croissance sont contrôlées par l'expérimentateur. Ces conditions sont le plus souvent les conditions optimales de croissance bactérienne. Cependant, dans le milieu naturel, les paramètres environnementaux peuvent évoluer vers des conditions moins favorables (*e.g.* : substrat et/ou accepteur d'électrons limitants, compétition pour le substrat, prédation, présence d'agents antimicrobiens, ...). Afin de répondre à ces fluctuations environnementales, les micro-organismes développent une nouvelle forme de vie, la vie en biofilm, en adaptant leur métabolisme. Nous verrons par la suite les processus biophysicochimiques impliqués dans l'adoption de ce mode de vie. Il est important toutefois de préciser qu'en dépit de ces différences, le modèle de Monod initialement développé pour la croissance de bactéries planctoniques a été étendu – sans réelle justification – à la description du mode de croissance des biofilms, et se retrouve dans la plupart des modèles numériques de croissance (échelle du pore ou échelle macroscopique) issus de la littérature.

2.1.2. Vie microbienne en biofilm

Avant de nous intéresser aux mécanismes de formation d'un biofilm nous commencerons par le définir.

2.1.2.1. Définition d'un biofilm

Les définitions du biofilm sont nombreuses et dépendent bien souvent des disciplines scientifiques des auteurs. Certains auteurs mettent l'accent sur la structure même du biofilm,

quand d'autres prêtent une attention particulière à leurs aspects physiologiques et génétiques. Nous suivrons ici la définition proposée par Donlan et Costerton (2002) englobant aussi bien les caractéristiques observables que les caractéristiques physiologiques des microorganismes formant les biofilms. Ainsi ils définissent le biofilm comme « *une communauté microbienne sessile caractérisée par des cellules irréversiblement attachées à un support ou à une interface ou attachées les unes aux autres, enveloppées dans une matrice de substances polymériques extracellulaires qu'elles ont produites, ces cellules présentant une modification phénotypique en rapport avec le taux de croissance et la transcription des gènes* ». Dans le contexte des processus biologiques en milieu poreux, nous considérons le terme biofilm au sens large, *i.e.* : en incluant le développement sous forme de microcolonies par exemple.

Le biofilm est donc un mode de vie des microorganismes dits sessiles par opposition aux microorganismes en suspension dits planctoniques. Il est admis depuis les travaux de Zobell (1943) que dans un milieu aqueux et en présence d'une surface immergée, les bactéries préfèrent vivre sous forme sessile plutôt que sous forme planctonique. Les mécanismes de formation de ces complexes microbiens sont largement connus grâce aux nombreuses études de laboratoire menées ces dernières décennies.

2.1.2.2. Mécanismes de formation des biofilms

De ce qui précède, il ressort que les biofilms se développent essentiellement sur des interfaces solide/liquide, solide/gaz, liquide/liquide et liquide/gaz. Dans le cas solide/liquide, le support solide ou substratum peut être une surface inerte (une roche, un implant médical, une canalisation, ...) ou un tissu vivant (Block, 1992 ; Cerf et Carpentier, 1993 ; Donlan, 2002). Dans une solution aqueuse contenant des molécules organiques, des molécules minérales et des microorganismes et, en présence d'une surface, les biofilms se forment en quatre étapes : (i) le conditionnement de la surface à coloniser et le transport des bactéries vers la surface pré-conditionnée, (ii) l'adhésion des bactéries à la surface pré-conditionnée, (iii) la colonisation de la surface ou maturation du biofilm et (iv) le détachement/dispersion des bactéries. Nous verrons en détails ces différentes étapes.

2.1.2.3. Conditionnement de la surface à coloniser et transport des bactéries

a) Formation d'un film conditionnant

Avant toute adhésion bactérienne à la surface immergée, les molécules organiques et les ions présents en solution sont transportés et déposés sur la surface. Toutefois, la nature des molécules et des ions qui se concentreront dans le voisinage de la surface dépend des propriétés chimiques de la surface elle-même. L'accumulation des molécules organiques et des ions conduit à la formation d'un film conditionnant. Ce film modifie les propriétés initiales de la surface si bien que les affinités d'un microorganisme, pour une surface dans son état initial et pour la même surface pré-conditionnée, sont différentes. Le film conditionnant, à travers la modification des propriétés de la surface, favorise l'adhésion bactérienne à celle-ci en constituant une source de nutriments et d'interactions spécifiques bactéries/molécules organiques (Dunne, 2002 ; Walker et Marsh, 2004).

b) Transport des bactéries vers la surface conditionnée

Une fois le conditionnement de la surface effectuée, l'adhésion bactérienne ne peut avoir lieu que si des bactéries planctoniques sont transportées vers la surface. Cela nécessite un mouvement physique visant à initier le contact bactérie-bactérie ou bactérie-surface (Liu et Tay, 2002). Ce processus est gouverné par la conjugaison de plusieurs facteurs dont la force de gravité, le mouvement Brownien, la diffusion, la chimiotaxie, les forces dynamiques du fluides (transport convectif), les interactions électrostatiques et la mobilité cellulaire (grâce aux structures cellulaires à la surface de la cellule telles que les flagelles, les pili et les pseudopodes) (Harbron et Kent, 1988 ; Wahl, 1989 ; Cerf et Carpentier, 1993 ; Bos et *al.*, 1999 ; Liu et Tay, 2002 ; Dunne, 2002 ; Walker et Marsh 2004 ; Palmer et *al.*, 2007). En l'absence d'écoulement, le processus d'adhésion commencera dès lors que la bactérie atteindra le voisinage immédiat de la surface. Mais dans les zones à fort écoulement, l'intervention des structures cellulaires (transport actif) sera très importante (Walker et Marsh, 2004). En effet, toute surface immergée dans l'eau est entourée d'une fine couche physiquement bien structurée de molécule d'eau (Wahl, 1989). C'est la couche limite hydrodynamique dont les dimensions sont inversement proportionnelles à la vitesse du fluide

et dans laquelle les forces de viscosités sont prépondérantes (Walker et Marsh, 2004). Ce n'est qu'après la traversée de cette zone que le processus d'adhésion peut commencer (Wahl, 1989 ; Walker et Marsh, 2004).

2.1.3. Adhésion bactérienne

L'adhésion bactérienne sur une surface, étape essentielle dans la formation du biofilm, a été largement étudiée. Elle résulte des interactions physico-chimiques entre les bactéries et la surface pré-conditionnée. En fait, l'adsorption des molécules organiques et des ions du milieu modifie fortement les propriétés de la surface. Ainsi, différentes forces seront impliquées dans le processus d'adhésion qui se déroule en deux temps : l'adhésion réversible ou adsorption et l'adhésion irréversible.

2.1.3.1. Adhésion réversible

Lorsqu'une bactérie s'approche d'une surface (éventuellement pré-conditionnée), il se produit de faibles interactions (interactions de longue portée telles que les forces d'attraction de van der Waals, les forces électrostatiques et les interactions hydrophobiques) entre elle et ce support. Ces interactions conduisent à l'immobilisation partielle des bactéries sur la surface (Harbron et Kent, 1988 ; Kumar et Anand, 1998 ; Dunne, 2002). Durant cette phase d'adhésion primaire, les bactéries présentent encore un mouvement Brownien et peuvent être détachées par simple rinçage ou en condition de cisaillement. Cette adhésion est dite réversible.

2.1.3.2. Adhésion irréversible

Dans un second temps, les bactéries s'attachent fermement et de manière irréversible à la surface. Cette étape nécessite l'intervention de structures bactériennes spécialisées, telles que les exopolymères (EPS) produits par les bactéries ainsi que les appendices cellulaires qui interagissent avec ces EPS. Des liaisons covalentes sont établies aussi entre le glycocalix bactérien et le film de macromolécules recouvrant la surface (Wahl, 1989). Des liaisons

cellule-cellule interviennent également car la présence d'une espèce de micro-organisme sur la surface peut promouvoir l'adhésion d'une autre. Pour un approfondissement sur l'adhésion bactérienne en termes de mécanismes, le lecteur trouvera plus de détails dans des ouvrages comme celui de Savage et Fletcher (1985).

2.1.4. Maturation du biofilm

La phase de maturation commence quand les cellules bactériennes sont irréversiblement attachées à la surface. Elle est contrôlée par un certain nombre de facteurs dont la disponibilité des nutriments, le pH interne, le transfert de l'oxygène, la source de carbone et l'osmolarité (Dunne, 2002). Après l'adhésion irréversible des bactéries, le développement du biofilm implique plusieurs mécanismes dont la division binaire, la mobilité sur la surface et la co-adhésion (Hall-Stoodley et Stoodley, 2002). La croissance des bactéries adhérentes à la surface est possible grâce aux nutriments du film conditionnant et à ceux présents dans le fluide environnant (Kumar et Anand, 1998). Les processus de croissance, de division cellulaire et de déplacement le long de la surface conduisent à la formation de micro-colonies dispersées. Ces micro-colonies dispersées se développent tout d'abord de manière horizontale le long du support puis transversalement (Walker et Marsh, 2004). Elles s'élargissent ensuite et coalescent pour former une couche de cellules couvrant la surface. Le processus de maturation se poursuit par la production d'exopolysaccharides (EPS) qui aident à l'ancrage des cellules sur la surface afin de stabiliser les colonies contre les fluctuations de l'environnement (Kumar et Anand, 1998 ; Watnick et Kolter, 2000). Par la suite, les colons secondaires, c'est-à-dire les microorganismes qui n'ont pas la capacité d'adhérer initialement à la surface, vont préférentiellement s'attacher aux cellules pionnières de l'adhésion par co-adhésion (Walker et Marsh, 2004). Des structures spécialisées peuvent être nécessaires dans cette étape. À titre d'exemple, Reisner *et al.* (2009) ont mis en évidence le rôle indispensable des flagelles, des fimbriae de type I, des curli et de la protéine membranaire (membrane externe) Ag43 dans la maturation du biofilm de *Escherichia coli* K-12.

La maturation du biofilm aboutit à la formation d'une structure tridimensionnelle constituée d'une communauté hétérogène d'un point de vue spatio-temporel. Un état d'équilibre est rarement atteint puisqu'une communauté microbienne de biofilm évolue continuellement suite à des processus internes et des processus externes tels que la succession,

la perturbation physique, la compétition et la prédation (Wahl, 1989 ; Walker et Marsh, 2004). Toutefois, le biofilm peut atteindre une masse critique où la couche la plus externe produit des cellules planctoniques qui se détachent du biofilm et qui, une fois libérées, peuvent coloniser d'autres surfaces (Dunne, 2002).

2.1.5. Détachement et dispersion

À un stade avancé de la maturation du biofilm, des cellules individuelles ou des parties du biofilm peuvent être séparées de la masse hétérogène suite à la diminution de nutriments, à l'apparition d'anaérobiose, ou encore sous l'effet des forces de cisaillement ou de tout autre stress environnemental (Boyd et Chakrabarty, 1994 ; Walker et Marsh, 2004). Allison *et al.* (1998) ont montré, également, que la dégradation enzymatique (par l'action des EPS lyases spécifiques) des exopolymères joue un rôle spécifique dans le détachement et la dispersion des cellules de *Pseudomonas. fluorescens* en conditions de limitation en nutriments. De même, Boyd et Chakrabarty (1994) ont montré le rôle déterminant de l'exopolysaccharide alginate de *Pseudomonas. aeruginosa* dans le degré de détachement des cellules d'une surface d'agar. Sa présence renforce l'adhésion bactérienne et sa dégradation, par l'alginate lyase, augmente le détachement cellulaire. Par ailleurs, le détachement sera d'autant plus facile que la matrice d'exopolysaccharides sera moins polymérisée, *i.e.* : moins dense (Boyd et Chakrabarty, 1994).

Le contrôle du détachement/dispersion est important dans la prévention des maladies induites par les biofilms de bactéries pathogènes.

En résumé, quel que soit le support solide, la formation et le développement, voire même la qualité du biofilm (son épaisseur, sa texture, ...), dépendent d'un ensemble de facteurs tels que :

- les propriétés physicochimiques (rugosité, charges de surface, ...) de la surface à coloniser ;
- la nature (genre et espèce) et la concentration de la population bactérienne en présence ;
- les conditions environnementales incluant la nature et la composition chimique du milieu environnant.

Les quatre étapes décrites plus haut sont donc une succession de processus physiques

et biologiques (Wahl, 1989).

2.1.6. Fondements physico-chimiques de la formation des biofilms

2.1.6.1. Facteurs favorisant l'adhésion bactérienne

D'un point de vue physicochimique, le processus d'adhésion bactérienne est principalement gouverné par les propriétés de la surface, les facteurs environnementaux et les produits de gènes essentiels (Dunne, 2002). La vitesse d'écoulement joue également un rôle important dans l'adhésion bactérienne (Walker et Marsh, 2004) pour les systèmes à écoulement tels que les milieux poreux, les conduites d'eau potable, le système circulatoire sanguin, ...

a) Propriétés de surface

Les propriétés physico-chimiques des deux surfaces en présence (la bactérie et le support solide) sont particulièrement déterminantes dans le processus d'adhésion microbienne (Donlan, 2002). Pour le support du biofilm, la texture et l'hydrophobicité de la surface et la présence ou non de film conditionnant détermineront les interactions avec la cellule bactérienne. Pour cette dernière, l'hydrophobicité de sa surface et la présence sur celle-ci d'appendices cellulaires tels que les flagelles (Pratt et Kolter, 1999 ; Donlan, 2002 ; Hall-Stoodley et Stoodley, 2002), les fimbriae (Donlan, 2002), les pili - notamment les pili de type IV (Watnick et Kolter, 2000 ; Hall-Stoodley et Stoodley, 2002) et autres adhésines de surface telles que les lipopolysaccharides (LPS) et les exopolysaccharides- EPS (Walker et Marsh, 2004) gouvernent le processus d'adhésion bactérienne et la maturation du biofilm. L'accent doit être mis sur le fait que l'hydrophobicité de la surface bactérienne joue un rôle important dans la formation des biofilms. L'hydrophobicité est une propriété interfaciale directement liée à l'énergie de surface de Gibbs, *i.e.* : la somme nette des interactions attractives de van der Waals et des interactions électrostatiques (Palmer *et al.*, 2007). Une augmentation de l'hydrophobicité de la surface cellulaire créera une diminution équivalente dans l'excès de l'énergie de surface de Gibbs. Cela favorise l'interaction cellule-cellule qui constitue par la suite une force motrice pour l'agrégation bactérienne hors de la phase aqueuse (Liu et Tay, 2002).

Un autre paramètre déterminant dans le processus d'adhésion est la charge nette des deux surfaces (Palmer *et al.*, 2007). La charge de surface de la bactérie, qui est souvent déterminée par son potentiel zêta, est généralement négative au pH physiologique, *i.e.* : à pH 7. Son amplitude peut varier d'une espèce bactérienne à une autre et peut être influencée par les conditions de culture, l'âge de la culture, la force ionique et le pH (Palmer *et al.*, 2007).

b) Facteurs environnementaux

La présence d'un film conditionnant et les propriétés de celui-ci sont essentielles dans l'adhésion bactérienne (Walker et Marsh, 2004). En effet, les propriétés de la surface telles que l'énergie libre de surface, l'hydrophobicité et les charges électrostatiques sont modifiées par la présence du film conditionnant (Kumar et Anand, 1998 ; Palmer *et al.*, 2007). La composition chimique du milieu environnant jouera aussi un rôle important dans l'adhésion. Ainsi, De Kerchove et Elimelech (2008) ont montré dans le cas de *P. aeruginosa* que la présence de cations divalents tels que Ca^{2+} et Mg^{2+} détermine les interactions spécifiques entre les surfaces bactérienne et solide respectivement. Ces auteurs ont également révélé que ces cations divalents modifient les propriétés de surface de la cellule bactérienne. Par ailleurs, Fridjonsson *et al.* (2011) ont souligné un lien étroit entre la présence de calcium et la capacité de formation du biofilm par *Sporosarcina pasteurii*. Ils ont montré que cette souche est incapable de former un biofilm en l'absence de calcium. Mais, la présence d'autres composés tels que les protéines dans le fluide environnant peut réduire l'adhésion bactérienne suite à une compétition entre ces protéines et les bactéries pour les sites d'adsorption sur la surface (Palmer *et al.*, 2007).

c) Vitesse d'écoulement

Dans les systèmes où il existe un écoulement, la vitesse de déplacement des fluides en présence influe sur le processus d'adhésion des bactéries à la surface solide. Le transport convectif facilite : (i) le rapprochement des bactéries de la surface et favorise donc l'attachement initial des bactéries et (ii) l'approvisionnement des bactéries en nutriments. La vitesse d'écoulement influe aussi sur la texture du biofilm. En effet, un cisaillement hydrodynamique élevé conduit généralement à des biofilms plus compacts, plus stables et

plus denses (Liu et Tay, 2002). Ces auteurs rapportent que le cisaillement joue un rôle sur le comportement métabolique et génétique des biofilms ainsi que sur la production d'exopolysaccharides qui augmente avec le cisaillement. Il est maintenant admis que les biofilms se forment dans les environnements à fort cisaillement (Donlan et Costerton, 2002). Par ailleurs, Chatelier (2010) a montré une augmentation de la production de biomasse et de substances polymériques extracellulaires avec la vitesse d'alimentation du réacteur dans le cadre d'une étude de la dénitrification.

2.1.6.2. Théorie de l'adhésion microbienne

D'un point de vue physico-chimique deux théories sont généralement utilisées pour expliquer l'adhésion de microorganismes aux surfaces : la théorie DLVO du nom de ses auteurs Derjaguin et Landu (1941) et Verwey et Overbeek, (1948) et l'approche thermodynamique (Van Oss *et al.*, 1986 ; Bos *et al.*, 1999 ; Hori et Matsumoto, 2010). La théorie DLVO décrit habituellement la stabilité des suspensions colloïdales. Selon cette théorie, lorsque deux particules colloïdales s'approchent l'une de l'autre suite au mouvement Brownien, elles sont soumises aux forces d'attractions de Lifshitz-van der Waals (résultant du moment dipolaire créé par la rotation des électrons autour du noyau atomique) et aux forces de répulsion électrostatique dues à la double couche électrique. La somme de ces deux groupes de forces détermine la stabilité de la suspension colloïdale.

Cette théorie a été utilisée (*e.g.* : van Loosdrecht *et al.*, 1989) pour modéliser l'adhésion microbienne, étape cruciale dans la formation des biofilms. Les cellules bactériennes ont en effet des charges de surface et peuvent être assimilées à des particules colloïdales. Mais les interactions hydrophobiques n'étant pas prises en compte dans la formulation DLVO initiale, Van Oss *et al.* (1986) ont introduit la théorie DLVO étendue (XDLVO) qui est une approche thermodynamique basée sur le calcul des énergies libres de surface, *i.e.* : l'énergie libre obtenue à partir de la détermination de la tension de surface (Harbron et Kent, 1988). Cette approche thermodynamique de la surface microbienne inclut l'hydrophilicité ou l'hydrophobicité dans la théorie de l'attachement microbien et du développement du biofilm. L'adhésion microbienne peut être estimée en utilisant l'énergie libre totale d'interaction entre les cellules bactériennes et la surface solide immergée dans l'eau.

Bien qu'elle permette la compréhension de certains aspects de l'adhésion, l'approche physicochimique est très limitée. En fait, la surface de la cellule bactérienne est une surface très dynamique pouvant répondre aux changements environnementaux liés à la force ionique, au pH, à la présence de macromolécules et à la présence d'autres surfaces biotiques et abiotiques. La surface bactérienne peut posséder des structures telles que les flagelles et les fimbriae, lesquelles peuvent jouer un rôle important dans l'adhésion bactérienne et la formation du biofilm comme nous l'avons vu plus haut. Or, la théorie DLVO ne prend pas en compte ces structures cellulaires (Busscher et Van Der Mei, 1997 ; Boks *et al.*, 2008) même si ces structures ne modifient les propriétés physico-chimiques globales de la cellule bactérienne que si leur présence est susceptible d'influer fortement sur l'hydrophobicité et la charge de la cellule. En outre, l'utilisation de cette théorie - initialement développée pour des particules rigides et imperméables - est remise en cause depuis quelques années pour les bactéries (Duval et Ohshima, 2006). De nouveaux formalismes (Ohshima, 2008 ; Duval *et al.*, 2011) ont ainsi récemment vu le jour afin de prendre en compte la spécificité de leur rhéologie (particules « molles » et perméables). Cette discussion nous amène à introduire certaines considérations génétiques afin de mieux appréhender les mécanismes de formation des biofilms.

2.1.7. Fondements génétiques de la formation du biofilm

Le processus de formation du biofilm commence lorsque les bactéries détectent certains signaux environnementaux (variables selon les organismes) susceptibles de déclencher la transition de la forme planctonique à la forme sessile (Davey et O'Toole, 2000). Par exemple, une limitation en nutriments ou une accumulation de métabolites toxiques favorise la formation du biofilm (Donlan et Costerton, 2002). D'un point de vue génétique, la formation du biofilm est un processus dynamique très complexe. En effet, outre les propriétés physicochimiques de la surface, les structures membranaires de la cellule telles que les flagelles, les pili et les curli jouent un rôle plus ou moins important selon les stades de développement du biofilm, les conditions du milieu environnant (Pratt et Kolter, 1998 ; Pratt et Kolter, 1999 ; Davey and O'Toole, 2000) et l'espèce bactérienne (Figure 3). En effet, toutes les formes bactériennes ne s'adsorbent pas avec la même aisance sur une même surface. D'un point de vue morphologique, ce sont les caractéristiques biologiques et les exigences physiologiques des différentes formes bactériennes qui déterminent l'ordre de colonisation.

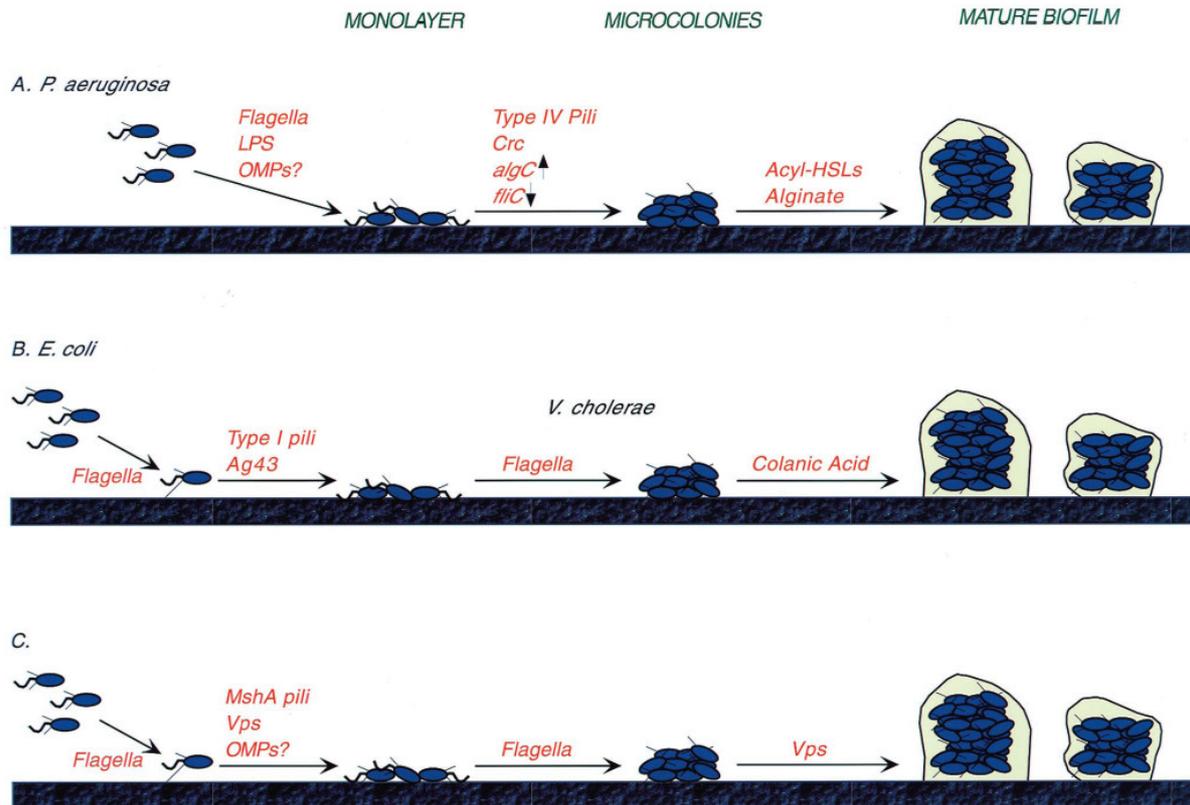


Figure 3 : Implication des appendices cellulaires selon le stade de formation du biofilm et l'espèce bactérienne (David et O'Toole, 2000).

Les bactéries pionnières sont souvent en forme de bâtonnets et s'adsorbent verticalement, diminuant ainsi les répulsions électriques. Suivent ensuite les formes rondes (coques) et enfin les formes pédonculées et les formes filamenteuses (Wahl, 1989).

D'une manière générale, pour initier l'adhésion bactérienne, point de départ du biofilm, les microorganismes doivent être transportés dans le voisinage immédiat de la surface éventuellement pré-conditionnée. Ce transport peut être effectué grâce à la motilité cellulaire induite par des structures comme le flagelle (Pratt et Kolter, 1998 ; Davey and O'Toole, 2000 ; Watnick et Kolter, 2000). Cette motilité permet de vaincre les répulsions électrostatiques à l'interface surface/liquide (Pratt et Kolter, 1998). Une fois dans le voisinage de la surface, la cellule engage des interactions avec celle-ci en vue de l'adhésion. Ces interactions initiales avec la surface sont accélérées par les organites générateurs de forces tels que les flagelles (Watnick et Kolter, 2000).

Les lipopolysaccharides (LPS) et les exopolysaccharides (EPS) jouent aussi un rôle dans ce processus d'attachement grâce aux interactions protéines-protéines et protéines-glucides (Walker et Marsh, 2004). Une fois en contact avec la surface, d'autres organites

cellulaires tels que les pili de type IV contribuent à la formation de micro-colonies en favorisant le déplacement des cellules sur la surface (O'Toole et Kolter, 1998 ; Pratt et Kolter, 1998). A ce stade, la production d'exopolysaccharides favorise la stabilisation des micro-colonies et le maintien de la structure tridimensionnelle du biofilm mature (Watnick et Kolter, 2000). La formation et le développement de ce biofilm mature passent par une modification des comportements physiologiques chez les bactéries.

2.1.8. Physiologie des biofilms

Les bactéries sont des organismes vivants qui, bien que dépourvues de système nerveux leur permettant de se localiser par rapport à un corps animal, déploient certaines stratégies de survie où qu'elles soient (Donlan et Costerton, 2002). La mise en place de ces stratégies, notamment la mutation de la forme planctonique à la forme sessile, induit des modifications métaboliques et génétiques profondes.

2.1.8.1. Métabolisme des biofilms

Le potentiel de croissance d'un biofilm bactérien est limité par la nature et la disponibilité des nutriments dans l'environnement immédiat et le transfert de ces nutriments aux cellules à l'intérieur du biofilm. Cette étape nécessite un flux hydrodynamique optimum au travers du biofilm pour favoriser la croissance et l'approvisionnement des couches internes de celui-ci (Dunne, 2002). Le biofilm mature est structurellement hétérogène d'un point de vue spatio-temporel, si bien que les différentes couches du biofilm ne sont pas alimentées en nutriments de la même manière. Ainsi, les couches les plus internes peuvent être fortement privées de nutriments (Donlan et Costerton, 2002). Le biofilm est hétérogène aussi quant aux espèces bactériennes qui le composent. De ce fait, le métabolisme du biofilm est très complexe. Un nutriment donné peut avoir des effets directs ou des effets indirects sur l'environnement du biofilm. Il peut constituer une source d'énergie, une source d'azote ou une source de carbone pour un ou plusieurs micro-organismes dans le milieu. Les métabolites de certains micro-organismes peuvent également être utilisés par d'autres micro-organismes comme nutriments. Ainsi, l'utilisation d'un nutriment donné dans le métabolisme de l'un ou plusieurs des micro-organismes peut avoir un effet autogène, *i.e.* : modifier le milieu par sa

présence physique ou un effet allogène, soit encore modifier le milieu par son action ou par des échanges avec le milieu. En réalité, le mode de vie en biofilm entraîne chez les bactéries des changements morphologiques et physiologiques importants par rapport à leurs homologues planctoniques. Ces changements peuvent être le résultat de gradients de concentration de solutés réactifs suite à une limitation de la diffusion, principal mode de transport des solutés dans le biofilm (Stewart, 2003). Werner *et al.* (2004) ont montré une stratification de l'activité métabolique à l'intérieur d'un biofilm de *P. aeruginosa* due à la limitation de l'oxygène. Teal *et al.* (2006) ont mis en évidence une stratification spatiale du métabolisme dans les biofilms de *Shewanella oneidensis*. Ces auteurs ont souligné que la plupart des cellules du biofilm mature de *S. oneidensis* développent des programmes métaboliques selon leur microenvironnement local et leur stade de développement. Le positionnement spatial dans le biofilm sera donc déterminant pour les cellules bactériennes quant à leur(s) cinétique(s) de croissance notamment. La structure tridimensionnelle du biofilm est aussi très hétérogène de par sa composition en micro-colonies de cellules bactériennes encastées dans la matrice d'exopolysaccharides (EPS). Ces micro-colonies sont séparées les unes des autres par des vides interstitiels appelés canaux d'eau (Figure 4). Ces canaux servent à la circulation de liquides et favorisent la diffusion des nutriments, de l'oxygène et même des agents antimicrobiens (Donlan, 2002).

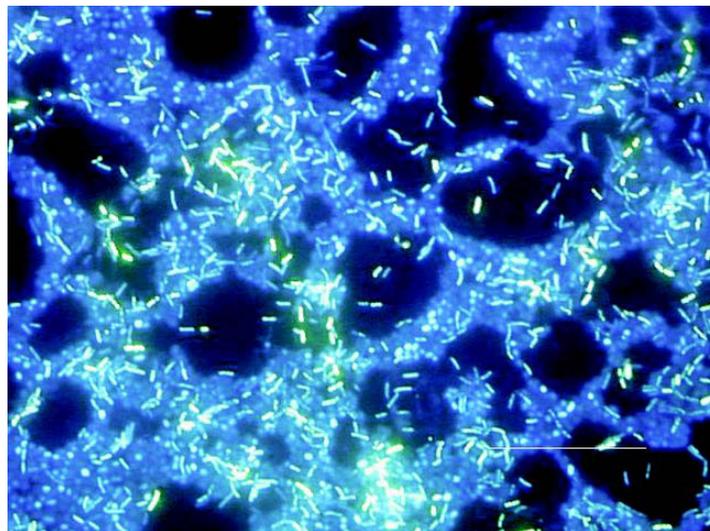


Figure 4 : Mise en évidence de canaux d'eau dans la structure du biofilm mature (Donlan, 2002).

Biofilm de *P. aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, and *Flavobacterium* spp. Développé durant 14 jours sur une surface en acier inoxydable dans un réacteur d'eau potable de laboratoire. Biofilm ensuite marqué au DAPI (4,6-diamidino-2-phenylindole) et analysé par microscopie à épifluorescence. Le trait blanc est de l'ordre de 20 μm .

Mais bien que ces canaux d'eau transportent les solutés vers l'intérieur et/ou vers l'extérieur du biofilm, ils ne garantissent pas que ces solutés atteignent toutes les micro-

colonies (Stewart, 2003). Cette disparité dans l'approvisionnement des différentes couches du biofilm conduit à des régimes de croissance différents à l'intérieur du biofilm. Cela peut néanmoins constituer un avantage (et donc une menace pour l'hôte) dans la capacité de survie et la persistance des micro-organismes pathogènes notamment sur les implants médicaux.

2.1.8.2. Transfert de gènes

Nous avons dit que les bactéries forment un biofilm suite aux signaux qu'elles reçoivent des autres cellules et de l'environnement. Cette forme de communication que les cellules bactériennes développent entre elles est appelée *quorum sensing*. Elle leur permet de percevoir notamment la densité de la population bactérienne environnante. Cette communication inter-espèces (*quorum sensing*) est induite par des composés extracellulaires (molécules de signal) dont le rôle principal est d'influer sur l'expression des gènes, sur la coopérativité et la compétition métabolique, sur le contact physique et sur la production d'exoproduits antimicrobiens (Davey and O'Toole, 2000). Lorsque les bactéries forment un biofilm, l'expression des gènes dépend du stade de croissance de celui-ci, les phénotypes pouvant être différents selon les étapes de développement du biofilm (Sauer *et al.*, 2002). O'Toole et Kolter (1998b) ont montré que la synthèse de nouvelles protéines est nécessaire dans les premières étapes de la formation du biofilm de *P. fluorescens* WCS365. Hammer et Bassler (2003) ont aussi noté que la maturation du biofilm de *Vibrio cholerae* est contrôlée par le *quorum sensing* qui dirige l'expression des gènes impliqués dans la biosynthèse des exopolymères. Les propriétés physiologiques des cellules du biofilm sont donc différentes de celles de leurs homologues planctoniques car les bactéries sessiles synthétisent des gènes que les bactéries planctoniques sont incapables de synthétiser (Donlan et Costerton, 2002). Le transfert des gènes impliqués dans la formation et le développement des biofilms confère aux bactéries de nombreux avantages tels que la résistance accrue aux agents antimicrobiens.

2.1.9. Nuisances induites par les biofilms

Le mode de vie en biofilm confère aux cellules une résistance accrue aux agents antimicrobiens que sont les antibiotiques, les désinfectants et les germicides, mais également une capacité à lutter contre les attaques du système de défense de l'hôte dans le cas de micro-

organismes pathogènes (Costerton *et al.*, 1985 ; Anwar *et al.*, 1990 ; Donlan et Costerton, 2002). Dans une étude comparative, Anderl *et al.* (2000) ont montré une tolérance à l'ampicilline (malgré sa forte pénétration dans le biofilm) bien plus forte chez le biofilm d'une souche mutante de *Klebsiella pneumoniae* que chez les cellules planctoniques de la même souche mutante. La résistance des biofilms aux agents antimicrobiens peut résulter de plusieurs mécanismes, comme la limitation de la diffusion dans le biofilm (Donlan et Costerton, 2002 ; Stewart, 2003). En fait, une barrière diffusionnelle est créée par la matrice de substances polymériques extracellulaires (EPS) qui peut réagir avec les molécules antimicrobiennes ou jouer sur le transport de ces molécules vers l'intérieur du biofilm (Donlan et Costerton, 2002). La susceptibilité des cellules du biofilm aux agents antimicrobiens dépend aussi des modifications physiologiques induites par le transfert des gènes lors de la formation du biofilm (Fux *et al.*, 2005). *In fine*, la faible assimilation des molécules des agents antimicrobiens peut s'expliquer par la faible croissance observée pour les microorganismes sessiles en comparaison avec leurs homologues planctoniques (Donlan et Costerton, 2002). Ainsi, la capacité des micro-organismes à former des biofilms notamment sur les implants médicaux fait d'eux des vecteurs de maladies nosocomiales (Barbeau *et al.*, 1998 ; Wisplinghoff *et al.*, 2004 ; Cerca *et al.*, 2005). Le détachement des cellules ou agrégats de cellules du biofilm fait aussi des biofilms des agents infectieux et des sources de contamination dans l'industrie. Stoodley *et al.* (2001) ont pu caractériser de manière quantitative le détachement de cellules individuelles et d'agrégats de cellules du biofilm, mettant ainsi en évidence les risques sanitaires liés à ce mode de croissance.

Les nuisances liées aux biofilms ne se limitent pas à leur caractère infectieux. Les biofilms réduisent par exemple les performances des systèmes de filtration par membrane (Baker et Dudley, 1998 ; Flemming, 2002). Ils affectent également d'autres dispositifs industriels comme par exemple les systèmes de refroidissement, les réservoirs de stockage et les systèmes de distribution d'eau potable. La prolifération de biofilm en milieu industriel engendre donc des coûts importants (Videla, 2002).

Malgré ces nombreuses nuisances, les biofilms peuvent être exploités de manière avantageuse notamment pour la biorémediation des sites et sols pollués. Ces procédés de biorémediation impliquent des interactions biologiques et physicochimiques entre les bactéries et la matrice de sol. La compréhension de ces interactions en vue d'une meilleure efficacité d'un procédé de biorémediation de sol contaminé dépendra du couplage entre la croissance du biofilm et les processus de transports des polluants. Nous présenterons dans la section suivante un état de l'art sur ces aspects.

2.2. Etat de l'art sur la caractérisation du transport de solutés en milieux poreux en présence de biofilms

2.2.1. Problématique du transport de solutés en milieu poreux

Le transport de solutés en milieux poreux a longtemps été décrit par le modèle de transport Fickien classique. Ce modèle s'applique généralement à un milieu poreux homogène et les équations sont définies selon une approche de *continuum* sur un volume élémentaire représentatif (VER). Mais les systèmes naturels sont temporellement et spatialement très hétérogènes. Du point de vue spatial, les hétérogénéités peuvent être subdivisées: (i) en micro-hétérogénéité (*e.g.* : macropores et éléments structurés) qui prend en compte la structure du sol et (ii) en macro-hétérogénéité qui décrit la variabilité spatiale des propriétés du sol (Feyen *et al.*, 1998). Les propriétés du sol concernées par ces hétérogénéités sont aussi bien physiques (porosité, conductivité hydraulique, dispersion), hydrogéochimiques (*e.g.* : capacité de sorption) que biologiques (Ptak *et al.*, 2004). Puisque les moyennes sont prises à des échelles supérieures à la taille des grains, l'hétérogénéité spatiale dans les champs de concentration en dessous de l'échelle du volume élémentaire n'est pas explicitement résolue (Meile et Tuncay, 2006). Ainsi, des écarts importants entre les études de laboratoire et les études sur site (échelle supérieure) ont été constatés (*e.g.* : dans les valeurs de dispersion), dus à ces hétérogénéités (Dagan, 1984 ; Frippiat et Holeyman, 1986 ; Gelhar *et al.*, 1992). Toutes ces hétérogénéités conduisent à des processus de transport non Fickien, *i.e.* : pour lesquels le modèle de convection-dispersion n'est plus capable de prédire le régime de transport à l'échelle du champ. Des modèles plus complexes sont alors nécessaires. L'une des formulations les plus connues correspond au modèle à double porosité ou modèle mobile-immobile (Coats and Smith, 1964 ; Brusseau *et al.*, 1989 ; Gwo *et al.*, 1996). Nous reviendrons plus longuement par la suite sur ces aspects. En dépit de cette limite, le modèle classique de convection-dispersion continue à être une base de travail très importante dans la modélisation du transport réactif ou transport non conservatif (*e.g.* : transport avec réaction de biodégradation). La biodégradation est un mécanisme non conservatif qui doit être considéré avec une grande attention dans le transport de solutés dans la zone saturée du sol. En effet, les micro-organismes du sol et, en particulier, les bactéries peuvent former des agrégats ou des biofilms qui jouent un rôle essentiel dans l'atténuation naturelle de la pollution organique

présente. Ces complexes microbiens influent fortement sur les propriétés de transport du milieu poreux et sur le devenir des solutés.

2.2.2. Impact du biofilm sur les propriétés hydrodynamiques du milieu poreux

En milieu poreux et en présence de l'écoulement d'un fluide dans lequel sont contenus les éléments nutritifs nécessaires au métabolisme microbien, les biofilms peuvent se former aisément comme nous l'avons vu précédemment. Le développement de cette biomasse a des conséquences immédiates sur les propriétés hydrodynamiques du milieu poreux ainsi que sur le processus de transport de solutés.

2.2.2.1. Porosité

Si l'espace poral est utilisé pour l'écoulement de l'eau, il constitue aussi, et surtout, la zone d'expansion du biofilm se formant à l'interface solide-liquide. Plusieurs études ont montré que l'épaisseur du biofilm augmente avec la taille de pores (Torbaty *et al.*, 1986 ; Cunningham *et al.*, 1991 ; Vayenas *et al.*, 2002 ; Bielefeldt *et al.*, 2002). Torbaty *et al.* (1986) attribuent la colonisation préférentielle des pores de grandes dimensions par les micro-organismes à la différence de flux de masse (nutriments) traversant les pores. Les pores de grandes dimensions reçoivent plus de nutriments que les pores de petites dimensions. La croissance microbienne est donc plus importante dans les grands pores.

Avec la croissance du biofilm, l'espace poral se réduit progressivement modifiant ainsi les connexions inter-porales et donc la tortuosité du milieu poreux. En effet, dans les systèmes de milieux poreux comportant un biofilm, deux types de porosité sont généralement considérés : (i) la porosité mobile, *i.e.* : celle occupée par la phase fluide en mouvement et connue en hydrogéologie comme porosité effective ou efficace (pores interconnectés) et (ii) la porosité immobile, *i.e.* : celle du biofilm qualifiée aussi de porosité secondaire (Stoodley *et al.*, 1994 ; Sharp *et al.*, 2005). Cette vision est cependant peu à peu battue en brèche et la question de savoir si cette porosité du biofilm participe ou non à l'écoulement mérite d'être posée. Wanner *et al.* (1995) et Sharp *et al.* (1999), en effet, avaient déjà observé l'apparition de canaux d'écoulement dans le biofilm qui participent à la distribution du nutriment au sein du consortium bactérien. De même, Thullner et Baveye (2008) ont montré que l'attribution

d'une perméabilité effective au biofilm et donc l'hypothèse d'un écoulement d'eau dans celui-ci permettait d'obtenir une meilleure adéquation entre résultats expérimentaux et numériques.

2.2.2.2. Perméabilité

Directement relié à cette réduction du volume poral, de nombreuses études ont montré une diminution de la perméabilité lors de la croissance du biofilm dans des études en colonnes (Mitchell et Nevo, 1964 ; Torbati *et al.*, 1986 ; MacLeod *et al.*, 1988 ; Taylor et Jaffé, 1990a ; Cunningham *et al.*, 1991 ; Vandevivere et Baveye, 1992a ; Kim et Fogler, 2000 ; Thullner *et al.*, 2002 ; Bielefeldt *et al.*, 2002 ; Seifert et Engesgaard, 2007 ; Chatelier, 2010 ; Karrabi *et al.*, 2011). La perméabilité peut être réduite de plusieurs facteurs, trois à quatre en général dans la plupart des études en milieu saturé. Dans une colonne de sable insaturée ou à saturation variable, Rockhold *et al.* (2005) ont observé une perméabilité de quarante-quatre fois inférieure à la valeur initiale, due à la croissance du biofilm. Le phénomène responsable de cette diminution de la perméabilité est la bio-obstruction. En fait, la bio-obstruction est un phénomène physique qui traduit la baisse de la capacité de conduction de l'eau dans le milieu poreux. Elle peut être due non seulement au relargage de métabolites gazeux dans l'espace poral et à l'accumulation facilitée par les microorganismes de précipités insolubles, mais aussi à l'accumulation de cellules microbiennes dans l'espace poral et à la production d'exopolymères (EPS) (Baveye *et al.*, 1998). L'importance des EPS dans le phénomène de bio-obstruction avait déjà été relevée par Mitchell et Nevo (1964). Vandevivere et Baveye (1992b) et plus tard Thullner *et al.* (2002a) ont montré que même pour de faibles densités de cellules dans le milieu poreux, la production d'EPS peut réduire de manière importante la perméabilité. Plus que la densité cellulaire (*i.e.* : l'épaisseur du biofilm), la distribution spatiale de la biomasse semble être déterminante dans la réduction de la perméabilité. Thullner *et al.* (2004) ont, à cet effet, comparé les données expérimentales de Thullner *et al.* (2002a) avec trois modèles de bio-obstruction : (i) le modèle de Clement *et al.* (1996) qui est une généralisation macroscopique (Thullner *et al.*, 2004) du modèle de Taylor *et al.* (1990), lui-même basé sur la croissance microbienne d'un biofilm homogène sur l'ensemble des grains, (ii) le modèle proposé par Thullner *et al.* (2002b) considérant une croissance microbienne en micro-colonies dans le milieu poreux et (iii) un modèle excluant la connectivité des pores. Les résultats montrent une meilleure adéquation entre les données expérimentales et le modèle de croissance microbienne en micro-colonies. Le phénomène de

bio-obstruction doit donc être considéré d'une manière particulière dans la modélisation des processus de biorémédiation. En fait, si l'obstruction des pores, suite à l'activité microbienne dans les parties contaminées d'un aquifère, peut limiter la disponibilité des réactifs aux microorganismes, elle peut aussi augmenter le rendement du processus de bioremédiation grâce à la formation de bio-barrière qui favorisent le contact entre les bactéries et le contaminant (Thullner *et al.*, 2002).

2.2.2.3. *Dispersivité*

L'influence de la croissance bactérienne sur les processus de transport en milieu poreux, et en particulier sur les mécanismes dispersifs, a été beaucoup moins étudiée. Taylor et Jaffé (1990b) estiment que lorsque le milieu poreux est le siège d'une importante croissance du biofilm, le transport de soluté est dominé par la dispersion. Dans leur étude sur la bio-obstruction, Seifert et Engesgaard (2007) ont montré l'effet graduel de la croissance du biofilm sur le transport dû à une augmentation de la dispersion et du transfert de masse dans le biofilm. Des résultats similaires ont été trouvés par d'autres chercheurs (Taylor et Jaffé, 1990b ; Sharp *et al.*, 1999 ; Engesgaard *et al.*, 2006 ; Chatelier, 2010). Selon Sharp *et al.* (1999), l'augmentation de la dispersion due à la croissance du biofilm est le résultat de l'augmentation de la tortuosité du milieu poreux et du développement de zones mortes et de chemins préférentiels d'écoulement. Les chemins préférentiels d'écoulement (chenalisation de l'écoulement) induits par la croissance du biofilm ont été visuellement mis en évidence dans de nombreuses études (Kildsgaard et Engesgaard, 2002 ; Seymour *et al.*, 2007 ; Chatelier 2010). Dans leur expérience en colonne avec une injection centrale du glucose, Thullner *et al.* (2002a) ont observé que l'écoulement contournait la zone du milieu occupée par le biofilm sans pour autant modifier la perméabilité globale du milieu. Ces observations confirment que la présence du biofilm induit des hétérogénéités locales dans le milieu poreux. Ainsi, non seulement l'épaisseur du biofilm (présence d'un milieu au comportement hydrodynamique différent de la phase fluide : différence au niveau du coefficient de diffusion, advection faible voire nulle) influe sur la dispersion mais aussi, et surtout, la distribution spatiale de la biomasse joue un rôle sur l'hydrodynamique du système. Les observations expérimentales restent cependant encore contradictoires. Bielefeldt *et al.* (2002), par exemple, ont observé une augmentation suivie d'une diminution de la dispersion du milieu avec la croissance microbienne. Ils ont attribué ce résultat au fait que la faible charge en substrat conduit

initialement à un biofilm discontinu, *i.e.* : occupant préférentiellement quelques pores. Cette forte hétérogénéité s'accompagne d'une augmentation de la dispersion. Toutefois, au fur et à mesure de la croissance du biofilm, celui-ci devient plus homogène (occupation plus uniforme des pores), et la dispersion diminue de nouveau. Le lecteur trouvera un complément bibliographique à cet aperçu de l'état de l'art dans Rosenbrand (2010). Cet auteur propose une revue de la littérature très détaillée sur l'influence du biofilm sur les propriétés de transport.

En résumé, le développement d'une phase biofilm dans le milieu poreux induit des hétérogénéités en termes de transport à deux niveaux d'échelle :

- à l'interface phase fluide/phase biofilm avec des temps caractéristiques de transport dans les deux phases qui peuvent être différents (advection et diffusion dans le milieu fluide d'un côté, dispersion essentiellement dans la phase biofilm si l'on néglige la chenalisation de la structure du biofilm) ;
- à l'échelle de l'échantillon rocheux ou poreux, sous l'effet du développement non uniforme du biofilm qui crée des chemins préférentiels d'écoulement.

Dans le Chapitre V, nous verrons plus longuement comment décrire d'un point de vue mathématique l'influence de ces mécanismes biotiques sur la caractérisation des processus de transport.

En conclusion, cet état de l'art souligne l'importance des couplages existants entre croissance bactérienne et hydrodynamique du milieu poreux. Nous verrons dans le paragraphe suivant les diverses méthodologies adoptées pour quantifier ces effets et la difficulté de les mesurer *in situ*.

2.2.3. Etat de l'art sur les méthodologies expérimentales

Un nombre considérable d'études expérimentales ont été menées pour permettre une meilleure compréhension du couplage transport de soluté/croissance du biofilm. Les plus marquantes sont rassemblées dans le Tableau 1. Ce tableau met en lumière la difficulté de caractériser le biofilm dans le milieu poreux. En effet, la difficulté principale de telles études réside dans le fait que la dynamique du biofilm en milieu poreux dépend de nombreux facteurs (composition du milieu, vitesse d'écoulement et chenalisation, transport du nutriment, ...) qui nécessitent d'être caractérisés en parallèle. Le transport de nutriment, en particulier, est déterminé le plus souvent uniquement en sortie de colonne. Cette méthode

permet d'avoir une information moyennée sur l'ensemble du domaine. Cependant, il est bien connu que la répartition du biofilm est souvent inhomogène. Par conséquent, une telle information moyennée sous-estime les hétérogénéités locales. Quelques travaux récents (Kildsgaard et Engesgaard 2002 ; Oates *et al.*, 2005 ; Rockhold *et al.*, 2006) ont toutefois montré la capacité de méthodes optiques à visualiser l'évolution spatio-temporelle des champs de concentration même en présence de biomasse. Cette méthodologie, basée sur la relation de Beer-Lambert, est utilisée depuis longtemps pour suivre l'évolution d'un panache de soluté dans un milieu poreux transparent (*e.g.* : Mainhagu *et al.*, 2007). La présence d'un biofilm vient toutefois modifier les propriétés de transmissivité du milieu ce qui peut venir perturber la calibration. Rockhold *et al.* (2006) ou encore Oates *et al.* (2005) ont réussi à s'affranchir de cet effet mais pour une occupation de la biomasse extrêmement localisée et des valeurs de biovolume faibles. Nous verrons dans les Chapitre III et IV comment nous avons réussi à appliquer cette méthodologie en présence d'un biofilm occupant jusqu'à 50% du volume de pore initial.

Par ailleurs, la plupart des études quantifient l'obstruction du milieu poreux par le biofilm essentiellement par des méthodes destructives. Selon la nature du milieu poreux modèle utilisé (micro-modèle, lits de billes transparents, ...), seules l'épaisseur locale du biofilm (Vayenas *et al.*, 2002) ou la densité bactérienne (habituellement par prélèvement de coupons ou mesure *post-mortem*) sont quantifiées. Le biovolume occupé, lorsqu'il est déterminé, est extrapolé au prix d'hypothèses fortes (en considérant par exemple une valeur de densité apparente du biofilm) bien que cette information puisse être cruciale pour une interprétation correcte du transport au sein de la cellule. Nous essaierons, là encore, de pallier ce manque dans la mise en place de notre dispositif expérimental.

Tableau 1 : Quelques études expérimentales sur le transport bioréactif.

Référence	Matrice solide	Type de modélisation	Population bactérienne	Caractérisation du biofilm dans le milieu poreux				Caractérisation du transport
				Paramètres du biofilm	Méthode de détermination	Bactéries totales et bactéries actives	Méthode de détermination	
Taylor et Jaffé (1990a,b)	Sable		<i>Culture issue d'eau d'égout et de boue activée</i>	Biomasse exprimée en carbone organique bactérien <i>i.e.</i> : la différence entre carbone organique total et carbone organique soluble	Non déterminées			Courbes de percée par section transversale mesurée (<i>in situ</i>) à l'aide d'une sonde
Cunnigham <i>et al.</i> , (1991)	Sable et Billes de verre		<i>Pseudomonas Aeruginosa</i>	Epaisseur totale (maximum) : 63 µm Carbone organique total (analysé <i>post mortem</i>)	Observation du biofilm par microscopie et traitement d'images.	Comptage de bactéries totales	Analyses destructives <i>post mortem</i>	Mesure et simulation de la perméabilité, de la porosité et du coefficient de friction
Kildsgaard et Engesgaard (2002)	Sable	2D	Microorganismes issus d'une station d'épuration (après l'étape de dénitrification)	Biomasse non quantifiée				Visualisation de l'impact du biofilm sur les chemins d'écoulement
Thullner <i>et al.</i> , (2002a)	Billes de verre	2D	<i>Pseudomonas PS⁺ DSMZ 12877</i>	Fraction totale <0,01% Polysaccharides (maximum) : 29 µg/g billes Protéines (maximum) : 53µg/g billes	Analyses destructives <i>post mortem</i>	Totales : 190x10 ⁶ cellules /g billes Actives : 17x10 ⁶ cellules /g billes	Analyses destructives <i>post mortem</i> Ultrasonication puis comptage des bactéries	Courbes de percée en sortie de colonne
Vayenas <i>et al.</i> , (2002)	Verre trempé		<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Epaisseur du biofilm	Marquage de la phase fluide avec une suspension d'indigo, puis mesure de l'épaisseur du biofilm à l'aide d'images de	Biofilm actif et biofilm inactif distingués	Calcul théoriques à partir des mesures d'épaisseur de biofilm	Etude de la biodégradation de NAPLs par collecte d'échantillons liquides

				microscope		
Rockhold <i>et al.</i> , 2007	Sable	2D	<i>Pseudomonas fluorescens</i> HK44	Traitement post-mortem pour déterminer la densité cellulaire		Transport conservatif suivi à l'aide d'une caméra digitale
Seifert et Engesgaard (2007)	Sable	1D	Inoculum issu d'une station d'épuration	Biomasse non estimée pour deux raisons (i) l'intérêt de l'étude était d'étudier le comportement de la colonne après désinfection et (ii) la difficulté à sélectionner une mesure représentative de la concentration en biomasse et à la relier à un volume		Traçage conservatif avec courbes de percée en sortie de colonne
Fridjonsson <i>et al.</i> , (2011)	Billes de polystyrène		<i>Sporosarcina Pasteurii</i>	Etude de la dispersion par Résonance Magnétique Nucléaire	Non déterminées	Etude de la dispersion par Résonance Magnétique Nucléaire
Karrabi <i>et al.</i> , (2011)	Billes d'argile (Biolite)	1D	<i>Pseudomonas putida</i>	Concentration en biomasse <i>i.e.</i> : masse sèche de microorganismes +exopolymères	Analyses destructives <i>post mortem</i>	Non déterminées Prélèvement d'échantillons

En considérant ces observations, nous nous proposons d'étudier le couplage transport de soluté/croissance du biofilm en tentant de caractériser en parallèle les diverses hétérogénéités spatio-temporelles. Concrètement, notre premier défi est de former un biofilm spatialement homogène dans un milieu poreux modèle. Le deuxième défi est de caractériser le transport de soluté *in situ* et en temps réel ainsi que de quantifier le développement de biomasse qui l'accompagne. Comme le souligne le tableau ci-dessus, ce niveau d'information n'a jamais pu être obtenu de manière directe dans les précédents travaux sur ce sujet. L'objectif ultime est de pouvoir comparer les données expérimentales aux données numériques. Pour relever ces défis, et en particulier le premier, un dispositif expérimental performant a été envisagé et développé. La mise en place de ce dispositif constitue l'objet du chapitre suivant.

CHAPITRE III

MISE EN PLACE DU DISPOSITIF EXPERIMENTAL

3.1. Introduction

Dans ce chapitre, nous exposerons la démarche méthodologique que nous avons adoptée pour atteindre les objectifs fixés initialement (cf. chapitre I). Afin de faciliter par la suite la comparaison avec les simulations numériques, il serait préférable de réussir à conserver un milieu qui soit le plus homogène possible (avec et sans biofilm). Ceci permettrait de considérer une cellule unitaire unique qui soit représentative de la géométrie microscopique du milieu et d'avoir une valeur constante des paramètres effectifs sur le domaine. Cette condition implique toutefois que la croissance du biofilm (lorsqu'il est présent) soit pratiquement uniforme dans tout le domaine. Cet aspect constitue en soi un défi expérimental majeur. Et comme nous l'avons signalé dans le chapitre précédent, afin de caractériser au mieux les processus de couplage intervenant au cours des expériences, nous ne voulons pas nous limiter uniquement à l'acquisition des courbes de percée effectuée en sortie de colonne (*i.e.* : par mesure de concentration de l'effluent de la colonne) comme c'est généralement le cas dans la quasi-totalité des études expérimentales de ce type (Torbaty *et al.*, 1986 ; MacLeod *et al.*, 1988 ; Taylor et Jaffé, 1990a ; Cunningham *et al.*, 1991 ; Vandevivere et Baveye, 1992a ; Kim et Fogler, 2000 ; Thullner *et al.*, 2002 ; Bielefeldt *et al.*, 2002 ; Seifert et Engesgaard, 2007 ; Chatelier, 2010 ; Karrabi *et al.*, 2011) où l'on obtient une information moyennée sur tout le domaine. Afin de caractériser au mieux les processus de couplage intervenant au cours des expériences et quantifier en particulier l'influence potentielle des hétérogénéités à proximité de l'entrée, un suivi au cours du temps des champs spatiaux de concentration sera effectué par la technique d'absorption lumineuse à l'aide de caméras CCD haute-définition. Enfin, dans le but de faciliter l'interprétation des résultats et de réussir éventuellement à modéliser les comportements observés, nous limiterons les possibilités de couplage en simplifiant les processus biologiques impliqués (une seule espèce bactérienne, accepteur d'électron en excès, ...).

Sur la base de ce constat et afin de mener à bien notre étude, nous avons listé les différentes conditions spécifiques que les composantes du système, matrice solide et biofilm, doivent satisfaire :

- **Pour la matrice solide.** Elle doit : (i) être transparente lorsqu'elle est saturée en eau pour permettre l'acquisition du champ de concentration d'un traceur, (ii) être inerte vis-à-vis du traceur choisi afin de permettre la détermination des propriétés intrinsèques du milieu telles que la porosité et la perméabilité initiales et (iii) favoriser

l'adhésion bactérienne en vue du développement du biofilm ;

- **Pour la composante biofilm.** Par souci de simplification, contrairement à ce qui est couramment rencontré dans la nature où les biofilms sont constitués de plusieurs espèces microbiennes, nous commencerons par étudier le transport en présence d'un biofilm bactérien mono-espèce. Il s'agira donc d'étudier le transport conservatif pour caractériser les propriétés hydrodynamiques du milieu en présence du biofilm. Aucune interaction entre la matrice biologique et le traceur (*i.e.* : absence de biodégradation et d'adsorption) n'est donc attendue. Nous discuterons dans les perspectives le cas d'un traceur biodégradable.
- **Les contraintes hydrodynamiques.** Ces contraintes sont résumées dans la thèse de Orgogozo (2009). Elles portent sur : (i) le comportement de l'écoulement et du transport qui doit être bidimensionnelle, (ii) les conditions aux limites à satisfaire et (iii) le régime de transport étudié (écoulement darcéen, valeurs faibles et/ou intermédiaires du nombre de Péclet).

La première partie de notre travail consistera donc à rechercher les quatre éléments constitutifs du dispositif expérimental final qui sera utilisé pour l'étude approfondie des interactions biofilm-polluant organique à savoir : (1) la conception de la cellule d'écoulement, (2) le choix de la matrice solide, (3) le choix de la souche bactérienne et (4) la recherche d'un traceur conservatif et d'un composé biodégradable. Nous commencerons par la recherche de la souche bactérienne.

3.2. Choix de la souche bactérienne

3.2.1. Contexte du choix

La thèse de Orgogozo (2009) a constitué le point de départ de ce travail. Bien qu'elle ait été essentiellement numérique, elle s'est aussi intéressée en parallèle à la mise en place d'un dispositif expérimental en vue d'une validation des modèles. Ce développement n'a pas pu être mené jusqu'à son terme mais il a fourni de précieuses indications sur les choix à effectuer. Concernant par exemple la souche bactérienne, nous avons opté pour la souche de *Shewanella oneidensis* MR-1 en raison de : (i) sa capacité à former facilement un biofilm dans les chambres d'écoulement et (ii) l'importante littérature disponible sur cette bactérie.

3.2.2. Présentation et condition de culture de la souche *Shewanella oneidensis* MR-1

3.2.2.1. Présentation

Shewanella oneidensis MR-1 est une bactérie de la famille des *Shewanellaceae* et du genre *Shewanella*. Comme toutes les bactéries du genre *Shewanella*, *S. oneidensis* MR-1 est aérobie, anaérobie facultative. D'un point de vue morphologique, *S. oneidensis* MR-1 est un bacille à Gram négatif. Elle possède un flagelle polaire simple et dénudé de gaine, ce qui lui donne la capacité d'être mobile (Venkateswaran, 1999 ; Nealson et Scott, 2006). D'un point de vue physiologique, *S. oneidensis* MR-1 croit à des températures optimales comprises entre 25 et 35°C (30°C pour notre étude) et pour des valeurs de pH comprises entre 7 et 8 (7,4 pour notre étude). Toutefois, elle peut se développer aussi bien à une température faible de 4°C qu'à une température élevée de 40°C (Venkateswaran, 1999). Comme source de carbone et d'énergie, *S. oneidensis* MR-1 est capable d'utiliser des acides organiques (*e.g.* : acétate, lactate, pyruvate, ...), des alcools (*e.g.* : éthanol) et des acides aminés tels que la sérine et la cystéine (Nealson et Myers, 1990 ; Nealson et Scott, 2006) et même des molécules complexes comme l'ADN extracellulaire (Pinchuk *et al.*, 2008). De même que les autres espèces *Shewanella*, cette bactérie est capable d'utiliser un grand nombre d'accepteurs d'électrons dont l'oxygène (O₂), le nitrate (NO₃⁻), le thiosulfate (S₂O₃²⁻), des éléments métalliques tels que le fer (chélate de Fe(III), oxydes et hydroxydes de fer), le manganèse (manganèse solide Mn(IV), manganèse solide (Mn(III), ...), et même des composés organiques comme le fumarate (voir Nealson et Scott, 2006, pour plus de détails). L'utilisation des métaux comme accepteurs d'électrons par ces bactéries traduit leur capacité à les réduire.

Les tests de croissance microbienne seront réalisés en deux temps : en milieu liquide pour fixer les paramètres optima de croissance et en milieu solide pour étudier la dynamique microbienne dans une matrice poreuse.

3.2.2.2. Milieu de culture

La souche pure de *Shewanella oneidensis* MR-1 conservée à -80°C sur des cryotubes est cultivée sur milieu gélosée. La gélose est composée de 25 g/L de milieu riche LB-Miller et de 15 g/L d'agar. Les deux constituants sont conditionnés par BD Difco®. En l'absence d'agar, un milieu riche LB-Miller est utilisé pour pratiquer des cultures en solution. Le choix du

milieu liquide dépend des besoins de l'expérience. Pour suivre la croissance bactérienne, un milieu de culture dénommé LML+F (voir Anceaux, 2008, pour plus de détails) est utilisé. Ce milieu, dont le pH est ajusté à 7,4, se compose de 0,2 g/L d'extrait de levure (apport de protéines, de vitamines, de minéraux, ...), de 0,1 g/L de peptone (source d'acides aminés et de polypeptides), de 10 mM de tampon HEPES (contrôle des variations de pH), de 5 mM de lactate (source de carbone et de donneur d'électrons) et de 20 mM de fumarate (accepteur d'électrons). Ce milieu de culture est dit milieu minimum. La croissance est donc suivie en effectuant une culture dans ce milieu minimum à partir d'une pré-culture en milieu riche liquide. Pour cela, 0,5 mL de la pré-culture est prélevé et introduit dans un Erlenmeyer® de 250 mL contenant 50 mL de milieu minimum (ratio Volume suspension/Volume récipient = 1/5). La suspension est ensuite placée dans un bain-marie (type AQUATRON 920477) agité à 30°C. La croissance bactérienne est ensuite suivie par turbidimétrie en prélevant régulièrement des échantillons dans la suspension de culture. La Figure 5 montre une illustration de la croissance de *S. oneidensis* MR-1.

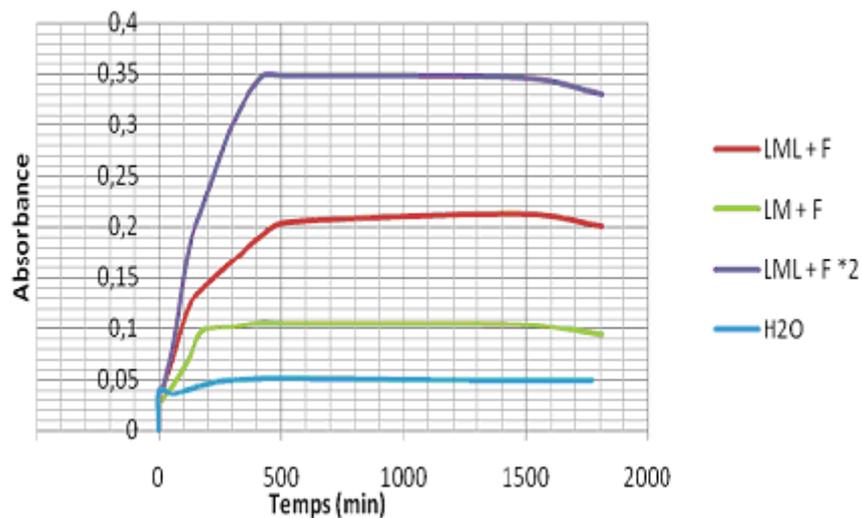


Figure 5 : Courbes de croissance de *Shewanella oneidensis* MR-1 en fonction de la composition du milieu (Le Pape, 2009).

LML+F est le milieu minimum décrit plus haut, LM+F est le milieu LML+F sans lactate (la source de carbone), LML+F*2 est le milieu LML+F deux fois concentré et H₂O est l'eau déminéralisée sans additifs.

Les courbes sont comparables à des courbes de croissance habituellement rencontrées en microbiologie avec les différentes phases de croissance (phase de latence, phase de croissance exponentielle, phase stationnaire et phase de déclin – cf. §2.1.1), la croissance augmentant avec la teneur en carbone.

Dans la suite de notre étude, nous verrons si la souche *Shewanella oneidensis* MR-1 peut satisfaire à nos attentes. La première étape consiste à choisir une matrice solide et un système de culture pour notre futur biofilm.

3.3. Présélection de la matrice solide et dimensionnement de la cellule

Les tests préliminaires (matériels et méthodes, dispositif expérimental, résultats, ...) qui ont conduit à la présélection de la matrice solide sont largement décrits dans la thèse de Orgogozo (2009). Pour résumer, deux colorants, la Rhodamine 6B (CAS : 87915-38-6, $\lambda_{\max} = 548$ nm) et le Rose Bengale B (CAS 632-69-9, $\lambda_{\max} = 548$ nm), ont été testés sur deux matrices solides, le Nafion[®] (35-60 mesh Powdion, classe granulométrique : environ $\varnothing = 0,3$ mm de diamètre moyen) et les billes de verre Retsch[®] (type 22.222.0002 avec $0,25 \leq \varnothing \leq 0,5$ mm). Les résultats ont montré que les deux colorants pressentis sont fortement adsorbés sur le Nafion. Quant aux billes de verre, une adsorption importante subsiste pour la Rhodamine 6B mais elle est plus faible, bien que non négligeable, pour le Rose Bengale B. Par ailleurs, les deux matrices se sont montrées favorables à l'adhésion de *Shewanella oneidensis* MR-1 avec un meilleur résultat pour le Nafion. *In fine*, ces observations nous ont conduits à choisir les billes de verre Retsch comme matrice solide pour la suite des expérimentations notamment pour la formation du biofilm. Ce choix ne sera confirmé (ou infirmé) qu'après des tests approfondis. Quant au choix du colorant en tant que traceur, les effets d'adsorption des deux colorants précédents ont nécessité des investigations supplémentaires. Suite à une phase de tests, l'Erioglaurine ou Brillant Blue a été retenue pour sa très faible (quasi nulle) adsorption sur le verre. Les essais avec l'Erioglaurine et les billes de verre n'ont pas pu être menés dans la thèse de Orgogozo (2009). Ils ont donc constitué la première partie des expérimentations du présent travail de thèse.

Les tests préliminaires décrits plus haut ont été effectués avec le dispositif expérimental décrit dans les travaux de Orgogozo (2009), dispositif qui a toutefois vite montré ses limites (système d'injection non-adapté). Le faible diamètre des aiguilles d'injection constituait un véritable frein à la croissance du biofilm dans le milieu poreux dû à la bio-obstruction. Ces limites ont été corrigées lors de la conception d'un nouveau dispositif en acier inoxydable en introduisant des réservoirs de mélange en amont et en aval de la zone d'étude (Figure 6).

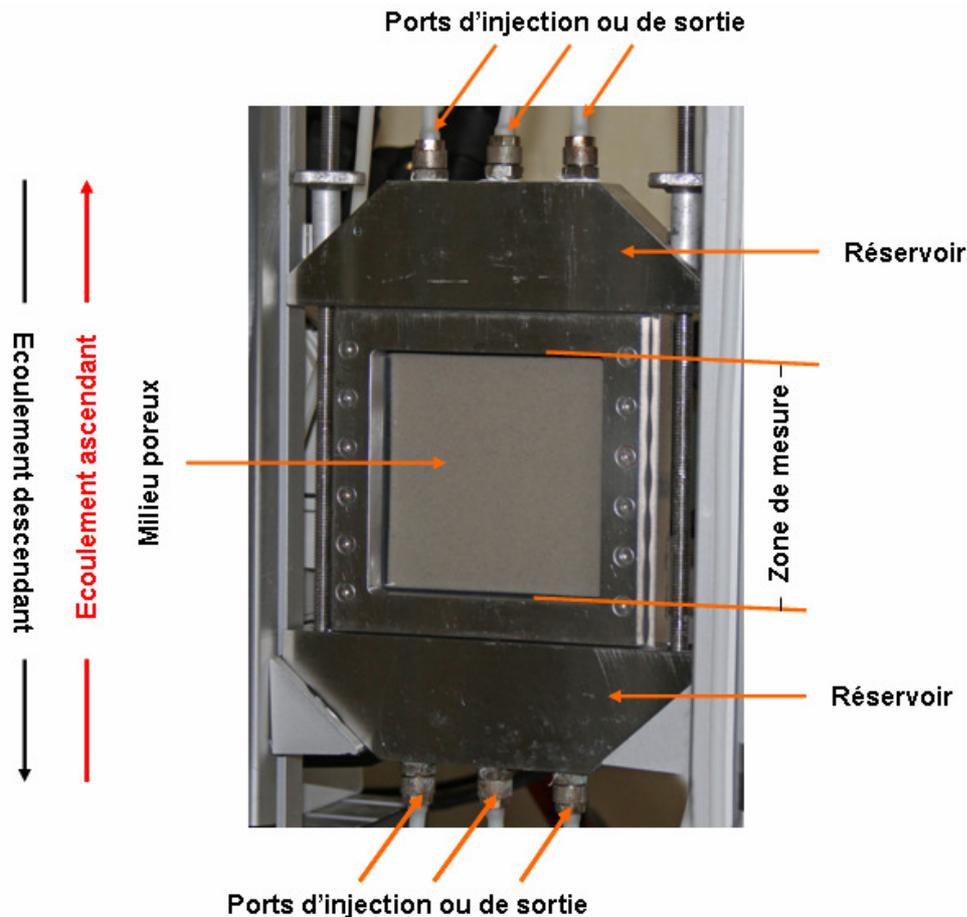


Figure 6 : Cellule d'écoulement en acier inoxydable.

La cellule d'écoulement est conçue pour assurer un écoulement alterné dans les deux sens selon les besoins. Elle est constituée de trois parties : deux réservoirs amont et aval et une zone de mesure de plus faible épaisseur. Cette zone de mesure, dont les dimensions sont $10 \times 10 \times 0,5 \text{ cm}^3$, contient le milieu poreux. Il s'agit d'un compartiment constitué par deux plaques de verre transparentes, séparées par une distance $\delta = 0,5 \text{ cm}$ et insérées dans un cadre en acier inoxydable. Ce système permet ainsi de visualiser la croissance et l'évolution spatio-temporelle du biofilm et/ou du traceur à l'intérieur du chenal d'écoulement. Le milieu poreux occupant la zone d'étude est isolé du réservoir inférieur par un tamis en acier inoxydable. La mise en place du milieu poreux suit un protocole expérimental précis (garantissant une bonne reproductibilité des résultats) décrit dans l'annexe 1. Sur la partie supérieure, une fine couche de limaille d'acier inoxydable, bien tassée, est utilisée pour empêcher toute fuite du massif. En effet, la fente de remplissage trop étroite ($\delta = 2 \text{ mm}$) ne permettrait pas de poser un tamis sans risquer de modifier la stabilité et le tassement du massif.

Une fois le compartiment central rempli par le milieu poreux, il est relié aux deux

réservoirs par un système de serrage permettant d'assurer l'étanchéité du système. Trois ports d'injection (ou de sortie, selon le sens de circulation) ont été prévus au niveau de chacun des réservoirs. Au moment de la conception initiale de la cellule, ces réservoirs (celui servant de réservoir d'entrée) avaient pour but : (i) de limiter les effets de colmatage en entrée (ce problème avait été rencontré initialement avec l'utilisation de multi-injecteurs) et (ii) d'assurer une injection sur toute la section du domaine pour une concentration fixée de soluté. Autrement dit, l'idée était de réussir à maintenir une condition limite de Dirichlet à l'entrée de la zone de mesure. Cependant, en dépit de nos efforts, les premières expériences réalisées ont mis en évidence une certaine difficulté pour obtenir un mélange homogène au sein du réservoir avant de démarrer l'injection. La résolution de ce problème expérimental sera détaillée par la suite.

La cellule telle que présentée a servi à tester le choix de l'Erioglaucine comme traceur conservatif. La première étape de ces essais de traçage consistera à valider ou non le choix des billes de verre Retsch[®] comme matrice solide sur la base du critère de non réactivité avec ce nouveau traceur.

3.4. Essais de transport conservatif avec l'Erioglaucine

3.4.1. Dispositif expérimental

Le traceur choisi est l'Erioglaucine (CAS : 3844-45-9, $\lambda_{\max} = 625$ nm). La matrice solide est constituée de billes de verre Retsch[®] (type 22.222.0002 avec $0,25 \leq \emptyset \leq 0,5$ mm). Une pompe Ismatec[®] MCPZ Process IP 65 est utilisée pour la circulation de fluides (eau, traceur et nutriments) dans le système. Cette pompe est munie d'une tête magnétique Micropump (P/N 82092 1006 modèle O/C GAX21.CFSB) lui permettant d'assurer un débit constant. Une caméra CCD (Couple Charge Device) intensifiée Princeton Instruments[®] PI-MAX3 (16Bits, 1024×1024 pixels) sert à visualiser l'évolution spatio-temporelle du traceur injecté dans la cellule d'écoulement. Cette caméra est pilotée par ordinateur à l'aide du logiciel Princeton Instruments[®] WinSpec/32, Version 2.5.25.2. Afin d'optimiser l'acquisition du champ spatial des concentrations en soluté, un filtre passe-bande 600-650 nm Laser Components SAS[®] (Type 628BP50 SHO/128571 G.F) est installé sur la caméra CCD. La courbe de transmission du filtre passe-bande est présentée dans l'annexe 2. Un microscope Nikon AZ100 (objectif AZ# plan fluor x5 télécentrique) muni d'un objectif Sigma 24 mm

F1.8 DG Macro Aspherical est utilisé pour l'observation locale du biofilm. Ce microscope permet d'avoir un grossissement de 400 fois avec une distance focale de plus de 1 cm. Quel que soit l'appareil d'acquisition d'images, la cellule est rétro-éclairée par un panneau lumineux Mascot Technology®. Afin d'alterner les prises de vue, la caméra et le microscope ont été installés sur un système robot Charly Robot Isel® Automation. Piloté par ordinateur à l'aide d'un processeur Schrittmotor-controller C142-4 Isel®, le robot permet de se déplacer dans les trois directions. Le système d'écoulement est muni de tubes Cole-Palmer® 6424-67 (diamètre interne : 0,125 mm et diamètre externe : 0,250 mm). Des vannes trois voies (Vanne PP/KYNAR LUER 3 Voies 88084) avec leurs accessoires permettent de faire les raccordements entre les branches du circuit d'écoulement. Ces tubes ont montré une faible interaction avec l'Erioglaucine (aucune adsorption notable). Le montage expérimental ainsi constitué est présenté sur la Figure 7.

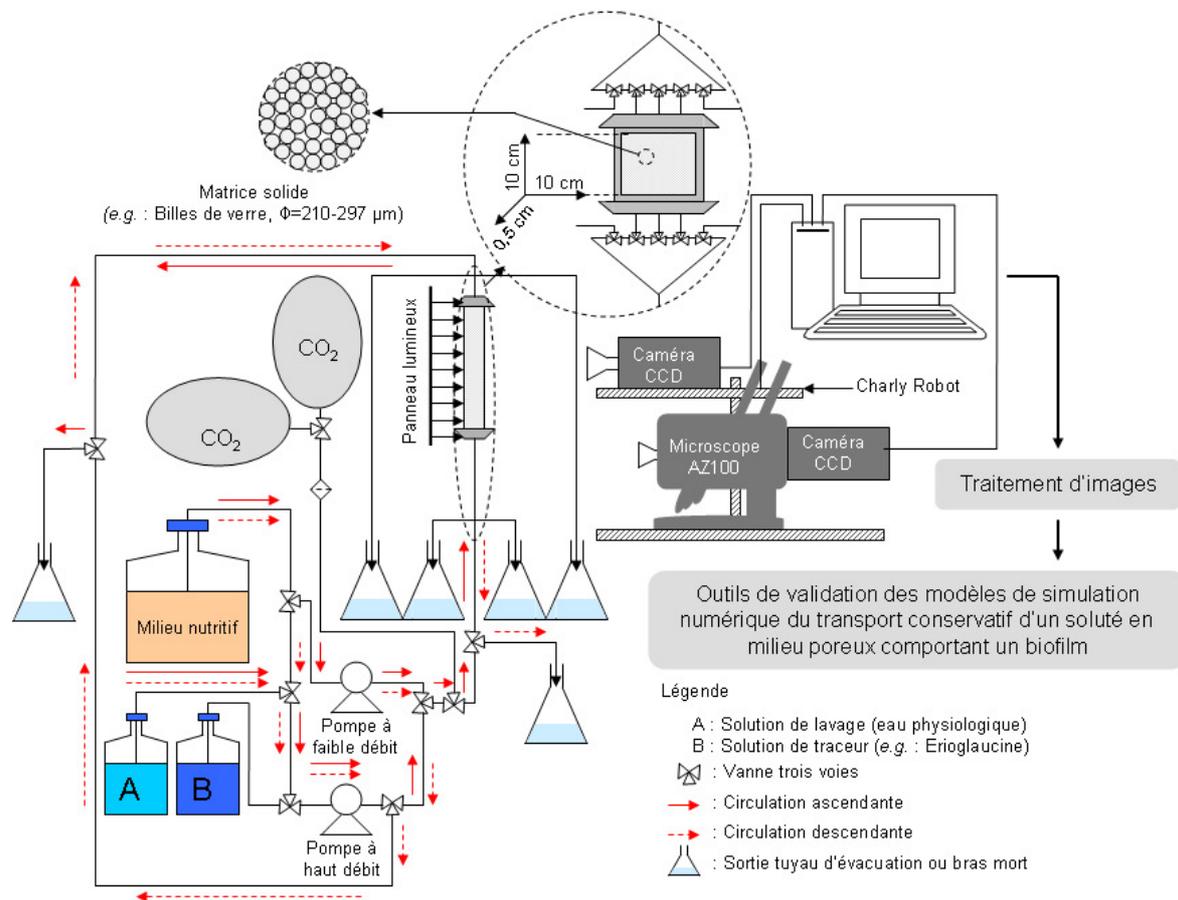


Figure 7 : Dispositif expérimental pour la croissance du biofilm et les essais de traçage.

Ce dispositif est évolutif selon les besoins. Le système est maintenu stérile autant que faire se peut. La cellule contenant le milieu poreux est préalablement stérilisée à l'autoclave à 121°C durant 15 min avant son utilisation. Un procédé similaire a été appliqué aux tubes du

circuit d'écoulement. Seuls les manifolds sont stérilisés chimiquement avec du biocide. Toutes les solutions utilisées sont ensuite autoclavées avant usage. Pour les expériences portant sur la formation du biofilm, l'enceinte où le dispositif expérimental est monté et maintenue à 30°C durant toute la durée de la culture.

Afin de limiter le piégeage de bulles d'air au sein du milieu poreux saturé, l'air présent dans la cellule est préalablement chassé en injectant du CO₂. Lors de l'utilisation du CO₂ avant la saturation en eau, un filtre à gaz ($\varnothing = 0,22 \mu\text{m}$) est posé entre l'arrivée de CO₂ et le circuit d'écoulement afin d'éviter une éventuelle contamination. C'est donc une fois la saturation de la cellule avec du CO₂ obtenue, que l'eau est injectée dans le système. On fait ensuite circuler plusieurs volume de pore de fluide jusqu'à complète disparition des bulles dans la cellule d'écoulement. En outre, deux pièges à bulles sont installés à l'entrée (avant l'arrivée au manifold) et à la sortie (après le manifold) du système d'injection. Cela permet de prévenir l'arrivée de nouvelles bulles d'air dans le milieu poreux après sa saturation en eau. Une fois la cellule parfaitement saturée, et avant de procéder à l'inoculation des bactéries, des essais de traçage sont réalisés en conditions abiotiques afin de caractériser le comportement hydrodynamique initial du milieu. Le suivi de ces essais est réalisé à l'aide de la caméra CCD. L'interprétation des courbes de percée, basée sur les propriétés d'absorption de la lumière par le traceur, implique évidemment un étalonnage préalable.

3.4.2. Calibration

L'étalonnage effectué est basé sur la loi de Beer-Lambert. La gamme de linéarité du traceur utilisé a été préalablement déterminée à l'aide du spectrophotomètre DR2000 à la longueur d'onde d'absorption maximum de l'Erioglaurine ($\lambda_{\text{max}} = 625 \text{ nm}$). Cette gamme varie de 0 à 10^{-5} mol/L. Dix solutions d'Erioglaurine de concentration comprises dans cette gamme de linéarité sont ensuite préparées. En vue d'une comparaison entre les essais de traçage en l'absence et en présence de biofilm, toutes les solutions sont prévues avec 0,9% de NaCl afin d'éviter tout éclatement des cellules bactériennes. L'étalonnage est mené en saturant la cellule en solution d'Erioglaurine par ordre croissant de concentration. Avant l'injection, le réservoir amont est préalablement saturé à la concentration désirée. Un manifold (Fisherbrand® 8761H) comportant 5 vannes trois voies permet, en effet, de connecter les trois ports d'entrée à deux tuyaux d'évacuation ou « *bras morts* » (idem pour la

sortie). Le rôle de ces tuyaux d'évacuation est de permettre d'isoler le réservoir amont de la cellule (Figure 8).

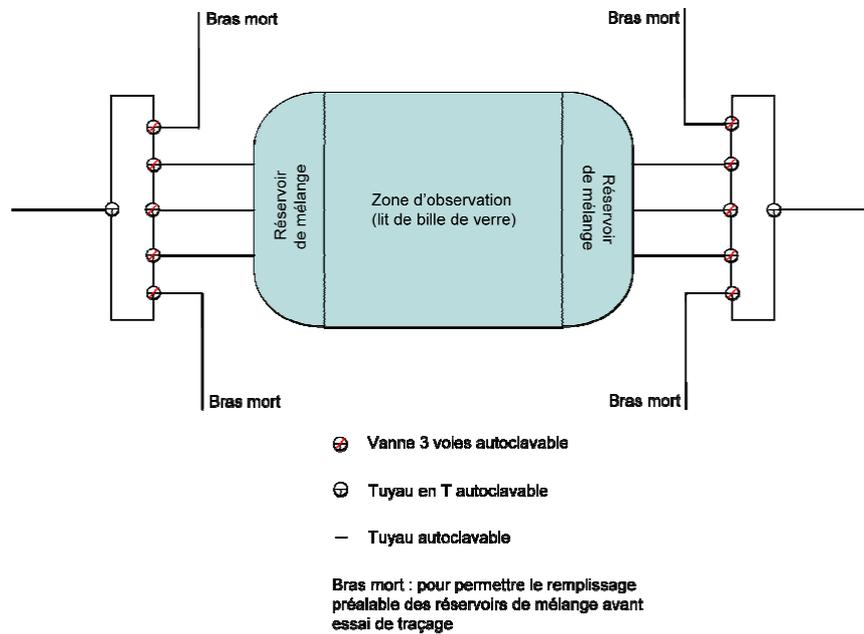


Figure 8 : Système de vannes de la cellule d'écoulement (Orgogozo, 2009).

Pour homogénéiser la concentration en soluté dans le réservoir, les trois ports en sortie de colonne sont tout d'abord fermés de manière à isoler le milieu poreux de toute circulation de liquide. Un à deux ports d'entrée sont ensuite utilisés pour injecter le soluté dans le réservoir en maintenant un ou deux port(s) connectés au tuyau d'évacuation. En alternant les opérations d'entrée et de sortie pour les différents ports, la solution initiale du réservoir est remplacée par la solution d'Erioglaurine de concentration fixée. L'homogénéité de la nouvelle solution est vérifiée par une mesure de l'absorbance de la solution en sortie de réservoir (par un bras mort). Le même protocole de remplissage du réservoir amont est appliqué lors des essais de traçage. Lorsque la concentration de la solution dans le réservoir amont de la cellule d'écoulement et donc à l'entrée du milieu poreux est supposée homogène, les trois ports à la sortie de la cellule sont ouverts et un volume de solution équivalent à quatre volumes de pore est circulé dans le milieu poreux. La cellule est alors saturée en solution d'Erioglaurine à la concentration désirée.

Après cette saturation du milieu poreux avec la solution d'Erioglaurine à concentration connue, dix images de la zone d'étude sont acquises avec la caméra CCD PI-MAX3. L'information fournie par la caméra est exprimée en images sous forme d'une

matrice de niveau de gris dont les valeurs par pixel sont comprises entre 0 et 65000 (Figure 9). Le même processus est répété pour les différentes concentrations. Comme le flux lumineux absorbé varie linéairement en fonction de la concentration dans la gamme choisie (loi de Beer-Lambert), il est alors possible de relier l'intensité de chaque pixel à la valeur locale de la concentration. Notons que le développement du biofilm modifiant les propriétés optiques du milieu, il sera nécessaire de refaire une calibration préalable avant chaque essai de traçage.

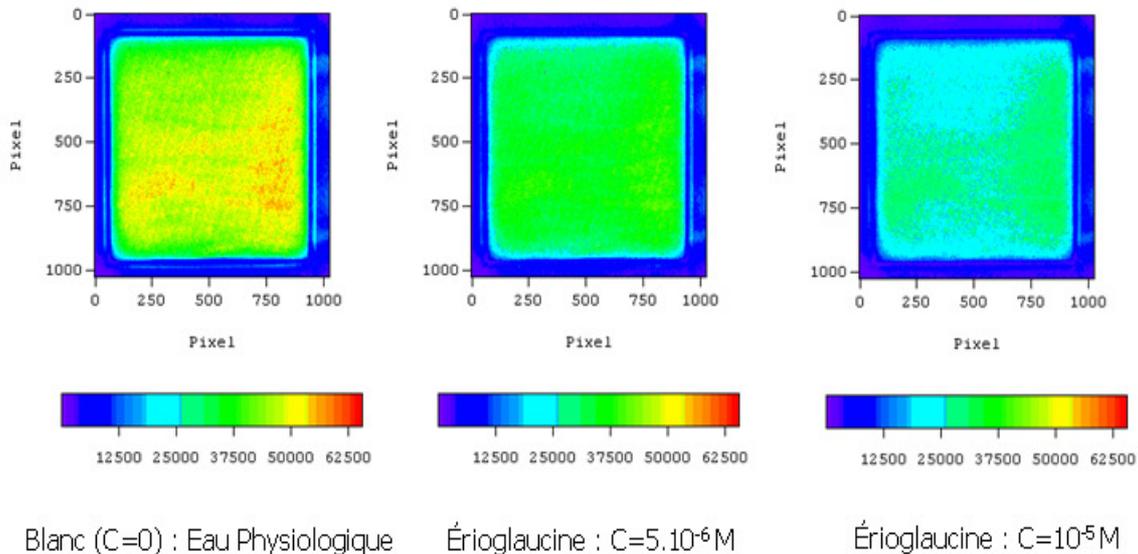


Figure 9 : Images de calibration de la cellule avec les billes de verre Retsch®.

Images de la cellule d'écoulement saturée en solution d'Erioglaucine à différentes concentrations. La saturation se fait dans l'ordre croissant des concentrations. Le contour bleu à violet correspond au cadre métallique de la zone de mesure. Ce cadre peut engendrer des reflets conduisant à une erreur d'estimation des concentrations près des parois de la cellule. Un rognage des images sera donc opéré pour éviter les effets de bord.

Après cet étalonnage, la cellule est lavée en faisant circuler de l'eau physiologique (0,9% de NaCl). Des essais de traçage sont ensuite effectués en procédant à la saturation préalable du réservoir amont (suivant le protocole décrit plus haut) par la solution de traçage. La concentration de cette solution de traçage est prise dans la gamme de concentration des points de calibration. Elle correspond à une valeur intermédiaire entre deux points de calibration (*e.g.* : $7,5 \cdot 10^{-6} \text{ mol.L}^{-1}$). Trois régimes hydrodynamiques de la pompe Ismatec sont testés. Ces régimes correspondent à des nombres de tours par minutes (rpm) soit : 120 rpm, 300 rpm et 600 rpm ce qui correspond à des vitesses de Darcy de $6,09 (\pm 0,11) \cdot 10^{-5} \text{ m/s}$, $1,44 (\pm 0,07) \cdot 10^{-4} \text{ m/s}$ et $2,84 (\pm 0,06) \cdot 10^{-4} \text{ m/s}$, respectivement. Pour chaque essai de traçage, 420 images sont acquises à intervalles de temps réguliers. Le pas de temps diffère en fonction du régime de la pompe. La cellule est bien sûr lavée entre deux traçages afin d'éviter toute effet de rémanence qui pourraient venir perturber les mesures. Ces images sont ensuite

traitées à l'aide d'un programme informatique (Fortran 90) afin de convertir les niveaux de gris en champs de concentrations.

3.4.3. Conversion des niveaux de gris en champs de concentration

L'idée est de transformer la matrice de niveaux de gris en une matrice correspondant à un champ spatial bidimensionnel de concentration. Le niveau de gris $CCD(i, j)$ du pixel (i, j) est relié au flux lumineux incident $I(i, j)$ par la relation :

$$CCD(i, j) = B(i, j)I(i, j)^{\gamma(i, j)} \quad (2)$$

où les champs $B(i, j)$ et $\gamma(i, j)$ sont des constantes fonctions de l'éclairage, de la cellule et du capteur de la caméra.

La loi de Beer-Lambert permet d'écrire la relation entre le flux lumineux incident et la concentration moyenne $c(i, j)$ en colorant dans la phase fluide :

$$I(i, j) = I_0(i, j)e^{-\alpha_{BL}l(i, j)C(i, j)} \quad (3)$$

Où :

$I_0(i, j)$ est le flux lumineux obtenu pour une concentration nulle de colorant dans la cellule d'écoulement [cd.m^{-2}] ;

α_{BL} est le coefficient d'absorption molaire du colorant considéré [$\text{m}^2.\text{mol}^{-1}$] ;

$l(i, j)$ est la longueur du trajet optique passant dans la phase fluide [m].

Ainsi, pour chaque pixel (i, j) , la concentration moyenne $c(i, j)$ en colorant dans la phase fluide peut s'écrire comme suit :

$$c(i, j) = -\frac{1}{\alpha_{BL}l(i, j)\gamma(i, j)} \ln\left(\frac{CCD(i, j)}{CCD_0(i, j)}\right) \quad [\text{mol.m}^{-3}] \quad (4)$$

Où :

$CCD_0(i, j)$ est le niveau de gris du pixel (i, j) pour la solution à concentration nulle en colorant, *i.e.* : pour le milieu saturé en eau physiologique.

Plus de détails sur ces méthodes de conversion peuvent être trouvés dans la thèse de Felder (2003).

Dans notre étude, pour chaque point de calibration les dix images sont moyennées pixel par pixel pour donner une matrice de valeurs moyennes de niveaux de gris par pixel. Ensuite pour les dix points de calibration, un étalonnage pixel par pixel est effectué en appliquant la régression linéaire par la méthode des moindres carrés. Une équation de régression linéaire est ainsi obtenue pour chaque pixel (Figure 10).

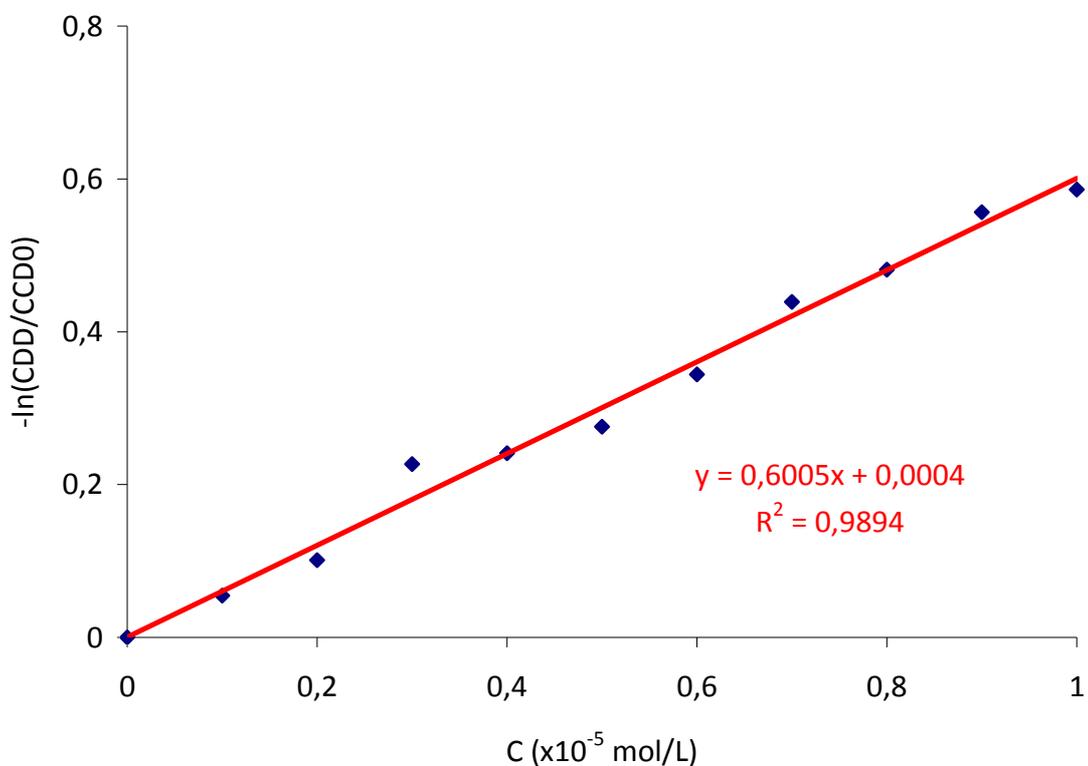


Figure 10 : Exemple de régression linéaire pour un pixel quelconque.

Le processus de calibration pixel par pixel permet de traiter les images des essais de traçage selon la procédure décrite sur la Figure 11.

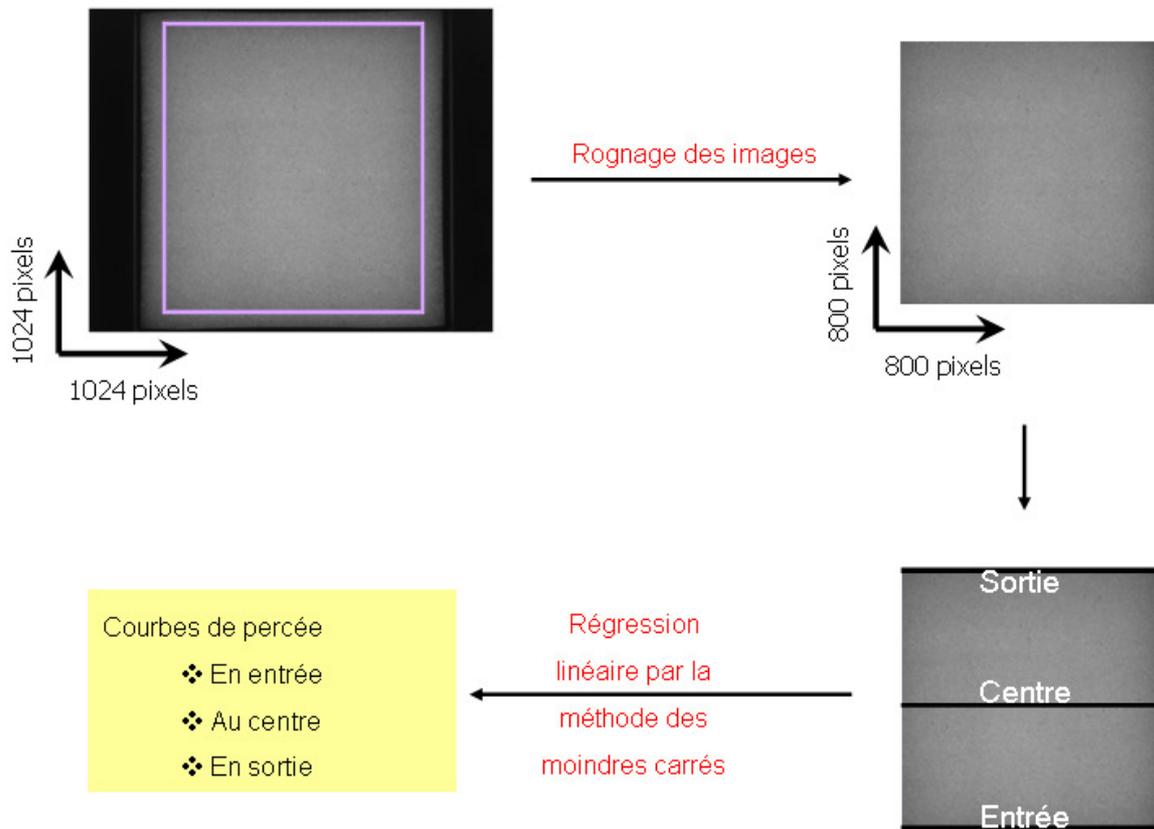


Figure 11 : Procédure de traitement des images de traçage.

Les images sont rognées pour avoir une zone d'intérêt où l'éclairage est supposé homogène. Le panache de solution peut alors être suivi sur une section transversale à l'entrée, au centre et à la sortie de la zone d'intérêt. Les données traitées permettent de construire les courbes de percée en ces différentes sections.

Le rognage des images permet d'éviter les effets de bords mal éclairés de la cellule. En dépit de nos efforts pour obtenir un éclairage quasi-uniforme, des zones d'ombre subsistent en bordure du cadre métallique. Or, ces pixels proches des parois de la cellule présentent des coefficients de régression faibles et trop fluctuants ce qui entraîne des sous-estimations de la concentration en soluté. Nous avons donc réduit la zone de mesure afin de nous affranchir de ces effets.

3.4.4. Résultats des essais de traçage avec l'Erioglaurine

Deux types d'essais de traçage ont été réalisés, soit pour une injection créneau consistant en l'injection d'un pulse de soluté dans le milieu, soit pour une injection échelon jusqu'à complète saturation du milieu par le traceur. L'évolution de la quantité de soluté au niveau d'une section d'observation (en milieu ou en sortie de colonne) est mesurée au cours du temps. La concentration est moyennée sur la section transversale.

3.4.4.1. Injection créneau

Après la procédure d'étalonnage le milieu poreux est lavé avec de l'eau physiologique. Un essai de traçage est effectué en injectant durant un temps donné une concentration connue de soluté dans le circuit. La solution injectée est ensuite chassée avec de l'eau physiologique. Pour ce test, aucun remplacement du contenu initial du réservoir (eau physiologique) n'est opéré. La courbe de percée obtenue au niveau de la section d'observation au centre de la cellule est présentée sur la Figure 12.

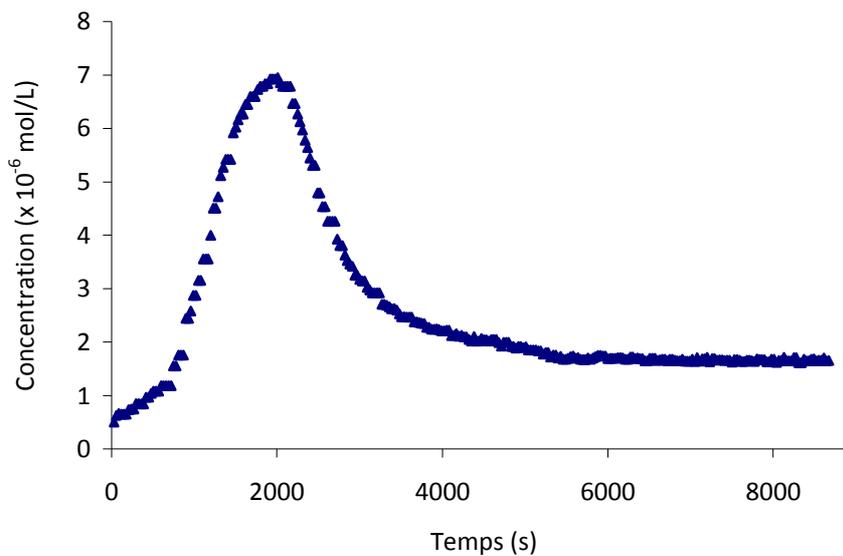


Figure 12 : Courbe de percée au centre pour une injection impulsion.

La pompe utilisée est une pompe péristaltique à un débit de $1,72 \cdot 10^{-8} \text{ m}^3/\text{s}$. La concentration de la solution d'Erioglauricine est $7,5 \cdot 10^{-6} \text{ mol.L}^{-1}$.

Bien que la courbe de percée corresponde à une dispersion classique du créneau de concentration injecté, cet essai de traçage fait toutefois apparaître deux problèmes :

- la concentration initiale du milieu à $t = 0 \text{ s}$ n'est pas nulle ($c = 0,5 \cdot 10^{-6} \text{ mol.L}^{-1}$) et la queue de la courbe présente un effet de trainée avec un palier horizontal de concentration à une valeur non nulle et même supérieure à la concentration initiale ($c = 1,61 \cdot 10^{-6} \text{ mol.L}^{-1}$ au lieu de $0,5 \cdot 10^{-6} \text{ mol.L}^{-1}$) ;
- un effet de rampe avec une forte montée de la concentration sur les 720 premières secondes.

Ces différents biais de mesure ont été analysés séparément. Une observation attentive des profils de concentration à l'entrée du domaine a confirmé la présence d'un « effet de rampe ». En d'autres termes, la concentration ne passe pas instantanément de 0 à la valeur injectée mais augmente graduellement. Ce phénomène qui vient perturber la condition limite du type

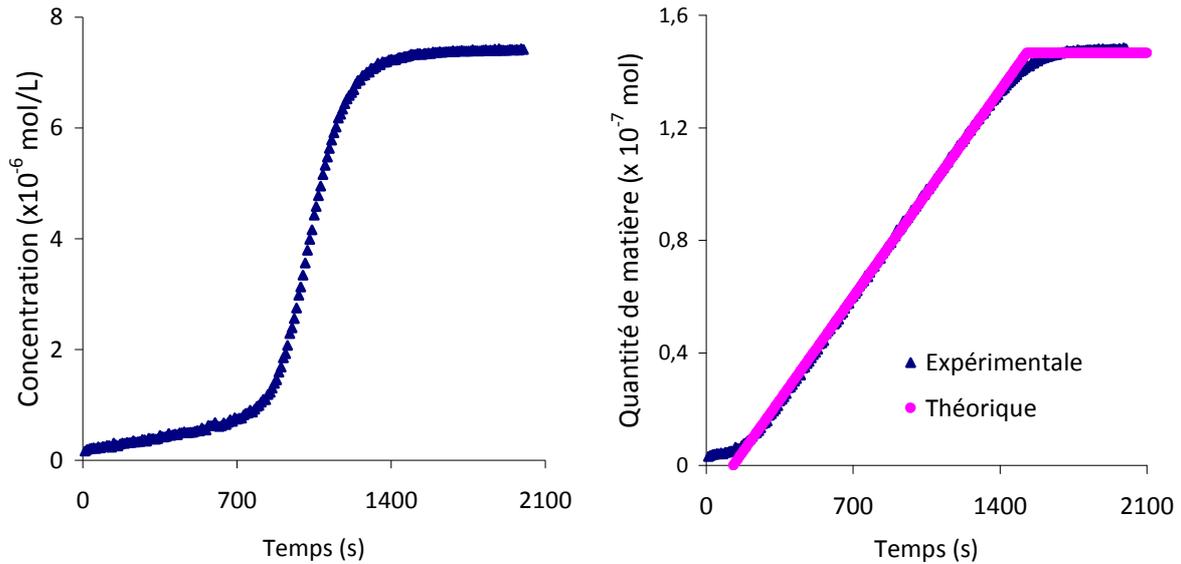
Dirichlet que nous souhaitons imposer en entrée devra être pris en compte dans nos interprétations et la modélisation.

Concernant la concentration rémanente observée avant et surtout après la percée du front de concentration, un problème d'adsorption de l'Erioglaucine sur les billes de verre a été identifié. En augmentant la vitesse d'écoulement de l'eau physiologique après l'essai de traçage et le délai entre deux traçages consécutifs, nous avons pu diminuer la concentration piégée dans le milieu (et récupérer par exemple en sortie la concentration aux temps initiaux, voire pratiquement zéro) mais le risque pour de telles vitesses est d'arracher une partie de la biomasse en conditions biotiques. Afin de limiter ces effets d'arrachement, la croissance bactérienne s'effectuera aux plus fortes vitesses d'écoulement de manière à accoutumer le biofilm à de tels taux de cisaillement.

Nous verrons maintenant l'impact de ces modifications en adoptant une injection échelon, plus représentative des essais en conditions biotiques prévus pour la suite de l'étude.

3.4.4.2. Injection échelon

Ce mode d'injection diffère de l'injection créneau par les conditions initiales sur la concentration dans le réservoir. En effet, lors de l'injection créneau, le soluté arrive dans le milieu poreux après avoir traversé le réservoir initialement rempli d'eau. Dans l'injection échelon, la concentration initiale du réservoir est identique à la concentration nominale. Pour obtenir cela, avant le démarrage de l'essai de traçage, l'eau du réservoir est remplacée par la solution de traçage par la technique décrite dans le protocole d'étalonnage (§3.4.2). Une fois le réservoir rempli de la solution d'Erioglaucine à la concentration désirée, le test de traçage peut débuter. La Figure 13 illustre les résultats pour la section centrale de la cellule.



(a) Concentration en fonction du temps

(b) Quantité de matière en fonction du temps

Figure 13 : Courbe de percée au centre de la cellule pour une injection continue de soluté.

La pompe utilisée est la pompe péristaltique à un débit de $1,4 \cdot 10^{-8} \text{ m}^3/\text{s}$. La quantité totale injectée est de $1,47 \cdot 10^{-7} \text{ mol}$ pour une solution d'Erioglaurine de concentration $7,5 \cdot 10^{-6} \text{ mol.L}^{-1}$.

La courbe de percée (Figure 13a) montre que la concentration initiale est maintenant pratiquement nulle bien qu'un léger effet de rémanence subsiste encore. Cette valeur de concentration aux temps initiaux pourrait aussi être due à un artéfact expérimental lié à une mauvaise calibration pour de très faibles valeurs de concentration. En revanche, en dépit de nos efforts pour assurer un mélange homogène au sein du réservoir amont, l'entrée du soluté dans la zone de mesure présente toujours une rampe. Ce résultat suggère que des zones mortes d'eau résiduelles doivent subsister dans le réservoir. L'échelon imposé n'est donc pas constant. Néanmoins, en corrigeant le temps, *i.e.*: en prenant en compte la rampe d'injection, nous retrouvons parfaitement la quantité de matière de soluté initialement injectée (Figure 13b). Cela confirme la faible implication de l'adsorption dans le retard.

En conclusion, ces résultats de traçage montrent que l'Erioglaurine peut être utilisée comme traceur pour la suite à condition de ne pas être biodégradé par la bactérie *Shewanella oneidensis* MR-1 retenue pour les futurs tests de formation de biofilm. Pour vérifier cette dernière hypothèse nous avons réalisé une culture bactérienne dans du milieu minéral avec de l'Erioglaurine comme source primaire de carbone. Les résultats ont montré qu'il n'y avait pas de dégradation du colorant pour la durée de nos essais. Pour la suite de nos expériences, nous retiendrons donc l'Erioglaurine comme traceur conservatif.

Le choix de la bactérie et du traceur conservatif étant fait, il ne reste plus qu'à confirmer ou infirmer le choix des billes de verre Retsch® comme matrice solide pour le milieu poreux. Ces billes ont déjà montré leur faible interaction avec l'Erioglaurine comme nous venons de le voir. En outre, dans les essais préliminaires elles ont montré un potentiel à abriter un biofilm de *S. oneidensis* MR-1. Mais les tests préliminaires de formation du biofilm ont été menés sur une cellule de faible taille et n'étaient que qualitatifs et sur une courte période. Nous verrons par la suite comment le système biofilm/billes de verre évolue dans le temps et dans quelle mesure nous pouvons caractériser le biofilm et le transport de l'Erioglaurine en présence du biofilm formé.

3.5. Formation d'un biofilm sur les billes de verre et essais de transport conservatif en présence du biofilm

3.5.1. Préparation de l'inoculation et inoculation du milieu poreux

Des cultures de *Shewanella oneidensis* MR-1 sont réalisées dans plusieurs flacons de 250 mL contenant chacun 100 mL de LML+F stérile. Ces flacons sont placés dans le bain-marie agité et à 30°C. Lorsque la densité optique à 600 nm ($DO_{600\text{ nm}}$) des cultures atteint 0,23 *i.e.* : lorsque la concentration en bactérienne est d'environ 10^8 bactéries par millilitre (généralement au bout de 3-4h de culture), la culture est arrêtée. Les suspensions bactériennes sont alors en phase de croissance exponentielle à la fin de la culture. Les différentes suspensions sont mélangées dans un flacon stérile de plus grand volume (*e.g.* : 1L). L'inoculation est alors réalisée de manière stérile par circulation de la suspension dans la cellule d'écoulement saturée avec de l'eau physiologique stérile. Avant la circulation de l'inoculum dans le milieu poreux, l'eau du réservoir amont de la cellule est remplacée par la suspension d'inoculum par le protocole déjà décrit plus haut. Afin de s'assurer de l'uniformité de l'inoculation, gage d'une distribution spatiale homogène du futur biofilm, un volume d'inoculum équivalent à quatre volumes de pores circule dans la cellule. Ensuite, la circulation est interrompue pour laisser reposer le système durant environ une heure. Cela permet une adhésion initiale des bactéries aux grains de la matrice solide. Durant cette phase d'arrêt de la circulation, le processus d'adhésion devient irréversible et le développement du biofilm peut commencer à travers la formation de micro-colonies. Pour parfaire la maturation du biofilm, du milieu de culture est injecté en continu pour favoriser la croissance

microbienne. Dans la conception initiale du montage, nous avons prévu deux pompes pour la circulation de fluides : une pompe péristaltique à faible débit pour l'apport de nutriments et la pompe Ismatec[®] pour assurer des débits importants. Cette dernière était utilisée pour apporter de l'eau physiologique. Le but de ce montage était d'assurer une contrainte de cisaillement suffisante sur le biofilm avec la pompe à fort débit afin d'éviter la bio-obstruction des premières strates du milieu poreux. Nous avons aussi utilisé du milieu minimum LML+F comme substrat. Ce système s'est avéré très inefficace probablement à cause d'un effet de dilution de la solution nutritive dû au débit important d'eau physiologique. Pour corriger cette dilution éventuelle et approvisionner toute la cellule en milieu nutritif susceptible d'entretenir la croissance du biofilm, nous avons opté finalement pour un milieu nutritif riche (LB-Miller) dilué au 1/10. En gardant le système des deux pompes, la formation du biofilm était toujours lente à cause probablement de l'arrachement des bactéries adhérees sous l'effet des forts débits. L'idée des deux pompes a donc été abandonnée et seule la pompe Ismatec[®] a été conservée mais à sa plus petite vitesse de rotation. Ce débit est toutefois supérieur au débit maximum de la pompe péristaltique. La vitesse de rotation de la pompe est augmentée graduellement au fur et à mesure que le biofilm occupe les strates successives du milieu poreux et que des effets d'obstruction se font sentir. Cela permet de contrer l'augmentation des pertes de charge et maintenir un débit constant. Afin d'anticiper la limitation éventuelle en oxygène dans le milieu poreux, nous avons ajouté au LB-Miller dilué au 1/10 du fumarate comme accepteur d'électrons. La circulation de la solution nutritive est alternée (ascendante ou descendante) toutes les 24 h pour favoriser la formation du biofilm des deux côtés (inférieure et supérieure) de la cellule. La formation du biofilm a ensuite été suivie au cours du temps.

3.5.2. Suivi de la formation du biofilm dans le milieu poreux

Le développement du biofilm a été suivi par acquisition d'images avec la caméra CCD intensifiée PI-MAX3 (pour voir la répartition spatiale du biofilm) et avec le microscope (pour voir l'évolution locale du biofilm autour des grains individuels). Quelques résultats de l'évolution spatiale du biofilm dans le milieu poreux sont présentés sur la Figure 14. Notons que ces images correspondent, pour l'instant, aux résultats bruts, *i.e.* : sans aucun processus de post-traitement.

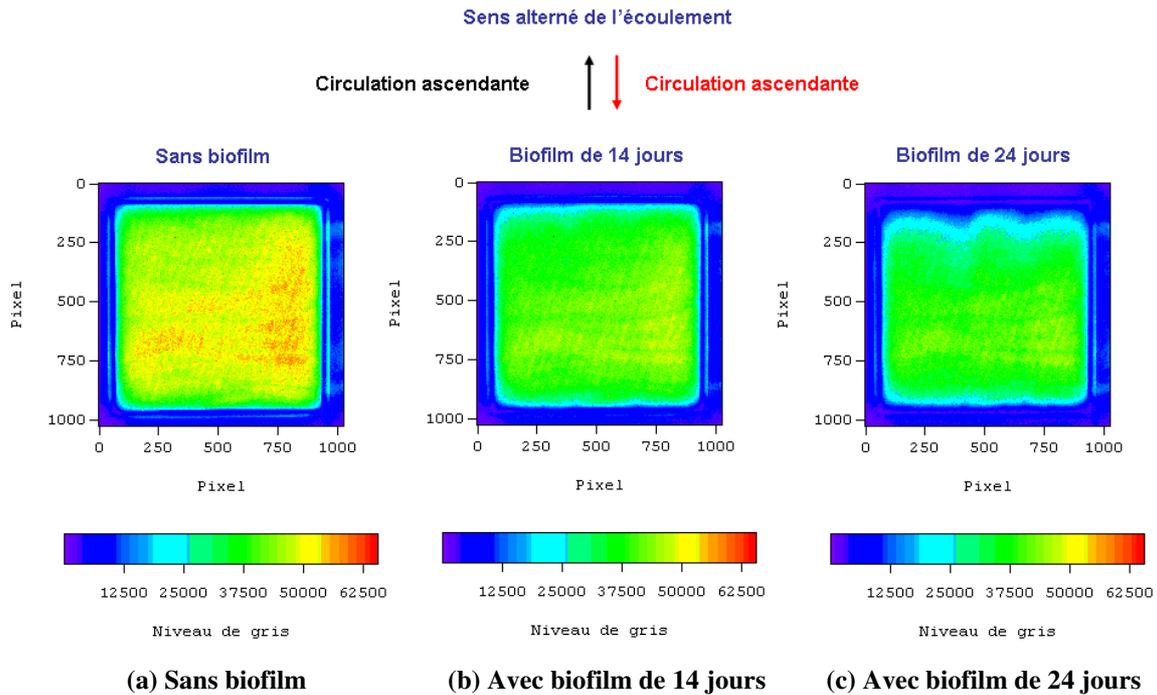


Figure 14 : Suivi de la croissance du biofilm sur billes de verre Retsch®.

Bien que ces images soient qualitatives, on peut constater une diminution de la transparence du milieu. Cette baisse de transparence est due à la croissance bactérienne dans le milieu.

Le développement de la biomasse a été aussi caractérisée au travers de la mesure de la perméabilité du milieu poreux avec et sans biofilm. Cette perméabilité a été mesurée par la technique de charge variable. Brièvement, une solution d'eau physiologique stérile circule dans la cellule d'écoulement à l'aide d'une burette dont le niveau d'eau est plus élevé à l'entrée qu'à la sortie de la cellule. Le volume d'eau écoulée est mesuré en fonction du temps. Ces volumes sont convertis en charge hydraulique par palier et utilisés pour calculer les coefficients de perméabilité. Les résultats sont présentés dans le Tableau 2.

Tableau 2 : Evolution de la conductivité hydraulique avec la croissance du biofilm.

Conductivité hydraulique K (m/s)	
Sans biofilm	2.10^{-4}
Après 8 jours de culture	$1,9.10^{-4}$
Après 14 jours de culture	8.10^{-5}
Après 24 jours de culture	2.10^{-5}

Ces résultats confirment bien une obstruction du milieu due à la croissance du biofilm avec une diminution d'un facteur 10 de la conductivité hydraulique du milieu après 24 jours de culture. Toutefois, la mesure de conductivité peut comporter un biais dû à la non-uniformité de la croissance microbienne dans le milieu poreux. Tout d'abord, en dépit de nos efforts, la cellule a subi une colonisation plus forte dans sa partie inférieure (*i.e.* : plus près de la source d'alimentation en nutriments). En fait, des problèmes de stabilité du milieu poreux ont été mis à jour lors de l'alternance du sens de circulation. Non seulement des bulles d'air se formaient dans le système - malgré la présence des deux pièges à bulles en entrée et en sortie -, mais un arrachement important du biofilm survenait lors de l'inversion du sens d'écoulement sous l'effet de la modification brutale des conditions d'injection en limite du domaine. Les couches les plus éloignées de l'alimentation en nutriment devenaient plus vulnérables aux variations du taux de cisaillement par manque conséquent d'alimentation. Ces variations de densité du biofilm d'une circulation à l'autre ont conduit à une erreur d'estimation de la conductivité hydraulique. Nous avons finalement décidé de nous limiter à un seul sens de circulation mais en contrepartie le biofilm s'est formé de manière plus dense en début de la cellule (Figure 14c). Nous verrons par la suite l'impact du développement du biofilm (bien que reparti de manière hétérogène dans l'espace) sur les propriétés de transport du milieu poreux.

3.5.3. Etude du transport conservatif de l'Erioglaurine en présence du biofilm

3.5.3.1. Etude qualitative de l'influence de la croissance du biofilm sur le panache de soluté

Les trois régimes hydrodynamiques de la pompe, respectivement $6,09 (\pm 0,11) \cdot 10^{-5}$ m/s, $1,44 (\pm 0,07) \cdot 10^{-4}$ m/s et $2,84 (\pm 0,06) \cdot 10^{-4}$ m/s, ont été testés en l'absence et en présence de biofilm dans le milieu poreux. Notons que pour chaque régime hydrodynamique, environ une journée d'expérimentation est nécessaire. En effet, la procédure de calibration est longue et la circulation dans le milieu poreux ne peut se faire à des vitesses trop élevées (risque de perturbation du massif et d'arrachement du biofilm lorsqu'il est présent). L'idéal est de mener l'essai de traçage le jour même de l'étalonnage afin d'être dans les mêmes conditions opérationnelles entre les deux expériences que sont calibration et essai de traçage. Ainsi, avant chaque essai de traçage (s'ils ne sont pas effectués le même jour), un nouvel étalonnage est effectué. Les résultats des traçages sont présentés sur la Figure 15.

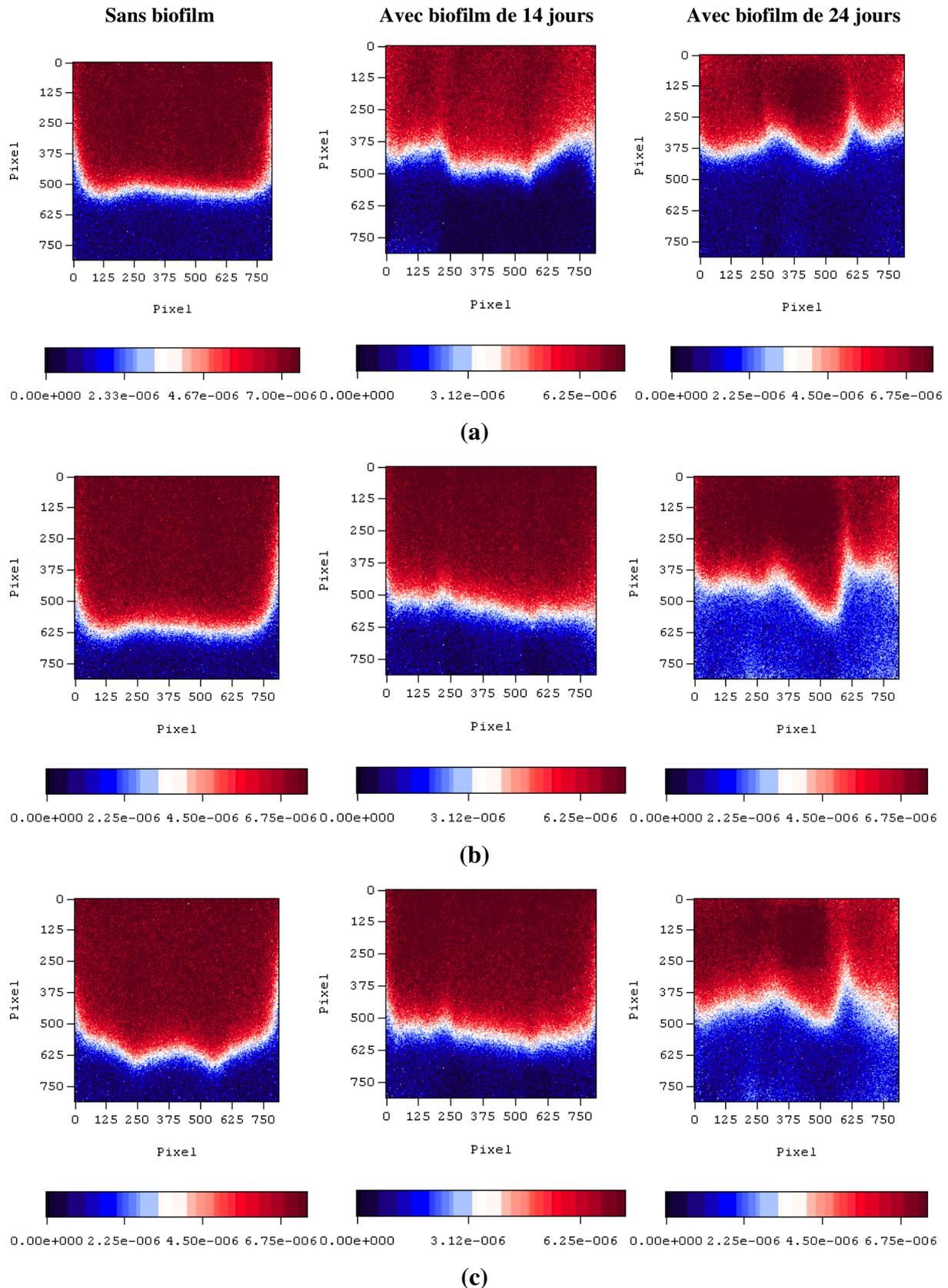
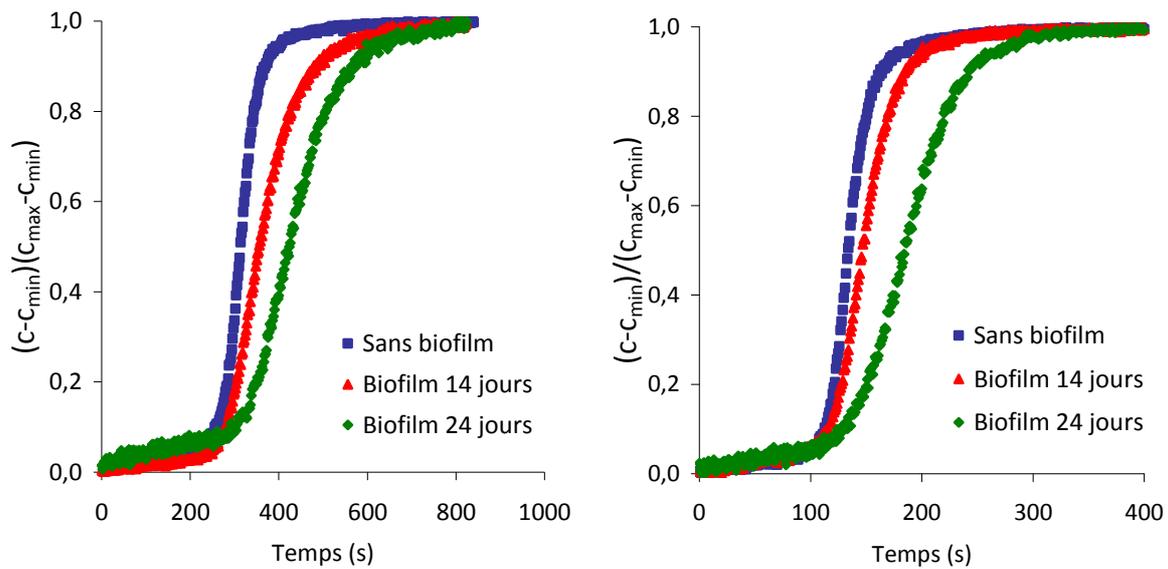
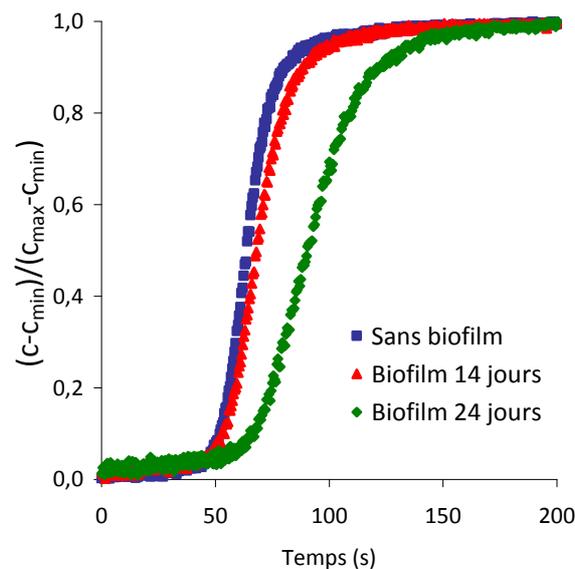


Figure 15 : Panache de soluté en l'absence et en présence de biofilm à trois régime d'écoulement (a) $6,09 (\pm 0,11) \cdot 10^{-5}$ m/s, (b) $1,44 (\pm 0,07) \cdot 10^{-4}$ m/s et (c) $2,84 (\pm 0,06) \cdot 10^{-4}$ m/s. La solution de traceur (*i.e.* : d'Erioglaucine a une concentration de $7,5 \cdot 10^{-5}$ mol.L⁻¹).

Ces résultats montrent que la présence du biofilm modifie le chemin d'écoulement du soluté dans le milieu poreux. En effet, en l'absence du biofilm (images de gauche sur chaque ligne) et pour une très faible épaisseur de biofilm (images au centre sur chaque ligne), nous observons globalement un écoulement du type piston (front raide en l'absence de biofilm) en dépit d'une influence des parois. En présence du biofilm de 24 jours, le front d'Erioglaucine est perturbé. Toutefois, l'observation des images des autres traçages permet de constater que les modifications du front de soluté sont surtout dues à la zone inférieure du milieu qui est obstruée par le biofilm. On observe en effet sur la Figure 14c que le 1/5 du milieu poreux présente des niveaux de gris largement inférieurs à ceux du reste du domaine. La partie supérieure du milieu poreux présente un développement peu significatif de biofilm car la baisse de niveau de gris est relativement faible dans cette zone. Ces observations suggèrent donc la présence d'hétérogénéités locales due à une croissance non-uniforme du biofilm dans le milieu poreux. La section suivante donne une première approche de caractérisation du transport du soluté.

3.5.3.2. Etude quantitative : évolution spatio-temporelle du champ de concentration

La Figure 16 illustre les courbes d'élution obtenues au niveau de la section centrale de la zone de mesure. L'adimensionnement des courbes de percée par rapport à la concentration maximale mesurée permet de les comparer pour différents régimes hydrodynamiques. L'analyse des courbes montre que pour les trois régimes hydrodynamiques imposés par la pompe à tête magnétique, le début des courbes de percée présente le même comportement que celui révélé dans le paragraphe 3.4.4.2. En outre, pour une vitesse d'injection donnée, le front de concentration est de plus en plus étalé au fur et à mesure de la croissance du biofilm. Autrement dit, le coefficient de dispersion longitudinale apparent du milieu augmente avec la croissance du biofilm, *i.e.* : au cours du temps. Ces résultats confirment l'influence du développement du biofilm sur les propriétés de transport du milieu poreux, en particulier sur la dispersion hydrodynamique. Nous nous appliquerons par la suite à évaluer précisément l'intensité de ces effets

(a) Courbes de percée à $6,09 (\pm 0,11) \cdot 10^{-5}$ m/s(b) Courbes de percée à $1,44 (\pm 0,07) \cdot 10^{-4}$ m/s(c) Courbes de percée à $2,84 (\pm 0,06) \cdot 10^{-4}$ m/s**Figure 16 : Mise en évidence de la croissance du biofilm sur les billes de verre Retsch®.**

c est la concentration mesurée à l'instant t , c_{\min} et c_{\max} sont les concentrations minimale et maximale respectivement mesurées sur la durée de l'expérience.

3.6. Conclusion partielle et perspectives expérimentales

Les travaux préliminaires ont permis de tester deux matrices solides pour l'étude du transport non réactif en l'absence et en présence de biofilm. Les billes de verre Retsch® ont

montré un comportement favorable comme matrice solide pour notre milieu poreux. En effet, elles ont montré une faible interaction avec l'Erioglaucone utilisée comme traceur conservatif. En outre, elles sont capables d'abriter un biofilm de *Shewanella oneidensis* MR-1. Toutefois, non seulement l'épaisseur du biofilm formé semble trop faible pour être caractérisée (faible diminution de transparence du milieu *i.e.* : faible diminution du niveau de gris) mais aussi, ce biofilm est essentiellement abrité par une faible portion (1/5) du milieu poreux localisée près de la source d'alimentation. Dans ces travaux préliminaires, nous avons aussi mis au point une méthode de caractérisation du transport non réactif en présence et en l'absence du biofilm. Le choix d'une matrice plus favorable à l'adhésion bactérienne permettra d'avancer vers le développement d'un modèle expérimental fiable pour la validation des modèles numériques du transport réactif.

CHAPITRE IV

RESULTATS EXPERIMENTAUX

Dans le chapitre III, nous avons décrit le dispositif expérimental permettant d'étudier l'influence de la croissance du biofilm sur les paramètres hydrodynamiques et hydrodispersifs d'un milieu poreux artificiel. Une méthodologie expérimentale de mesure des concentrations *in situ* a été mise en place et validée. Il faut cependant noter que, malgré les soins apportés, ce modèle n'a pas répondu entièrement à nos exigences, le support solide ne présentant pas une bioadhérence suffisante. En particulier, la distribution spatiale du biofilm formé sur les billes de verre Retsch était essentiellement localisée sur la partie (1/5) inférieure de la cellule et son épaisseur était plus réduite que celle escomptée. Un suivi expérimental des fractions volumiques de biofilm en parallèle des essais de traçage devenait alors impossible.

C'est dans ce contexte que le remplacement de la matrice poreuse artificielle par un milieu naturel, constituée par du sable de quartz, s'est opéré. Dans un premier temps, nous mettrons en évidence le gain apporté par l'utilisation de ce nouveau substratum à la croissance bactérienne. Puis, nous présenterons la méthodologie originale développée permettant l'estimation de la fraction volumique du biofilm en milieu poreux. *In fine*, nous étudierons l'influence de la croissance du biofilm sur les paramètres d'écoulement et du transport.

4.1. Formation du biofilm dans le milieu poreux

La nouvelle matrice solide retenue est un sable d'aquifère (CAS 14808-60-7), de classe granulométrique 210-297 μm . Avant la culture du biofilm, nous avons déterminé les propriétés hydrodynamiques (porosité, perméabilité) de la matrice poreuse mise en place dans le compartiment du dispositif expérimental.

4.1.1. Caractérisation hydrodynamique du milieu poreux

Le protocole de remplissage de la cellule est décrit dans l'Annexe 1. La conductivité hydraulique a été déterminée par la méthode à charge variable et une valeur moyenne de 4.10^{-4} m/s a été retenue. La porosité initiale ε , a été mesurée de deux manières. D'une part, par pesée en utilisant la formule classique, *i.e.* :

$$\varepsilon = 1 - \frac{M_s}{\rho_s V} \quad (5)$$

Où :

M_S est la masse de sable nécessaire pour remplir la cellule ($M_S = 78,32\text{g}$) ;

V le volume du compartiment ($V = 6.10^{-7} \text{ m}^3$) ;

ρ_S la masse volumique du sable déterminée à l'aide d'un pycnomètre ($\rho_S = 2,6393.10^6 \text{ g/m}^3$).

Ce qui a conduit à une valeur moyenne de $0,40 \pm 0,01$. D'autre part, à partir de l'interprétation d'essais de traçage par la méthode des moments. Cette seconde méthode a conduit à des valeurs de porosité similaires, bien que légèrement inférieures, de l'ordre de $0,37 \pm 0,01$ (cf. §4.3.2). Compte tenu du biais de mesure engendré par l'effet de rampe sur la méthode des moments, nous avons opté pour la première estimation.

4.1.2. Suivi de la croissance du biofilm

Le biofilm a été cultivé dans les mêmes conditions expérimentales que celles décrites dans le Chapitre III. La distribution spatiale du biofilm dans le milieu poreux a été observée tout d'abord de manière qualitative à l'aide de la caméra CCD. Une série d'images a ainsi été acquise au cours du temps. L'augmentation graduelle de l'opacité de la zone de mesure est alors directement connectée à la production de biomasse au sein du milieu. La Figure 17 résume l'évolution de cette croissance sur la durée de l'expérience. Ces images montrent une colonisation progressive du milieu poreux par le biofilm jusqu'à son occupation totale. On constate aussi une apparition de chemins préférentiels d'écoulement et une stratification de la distribution du biofilm dans le milieu poreux. L'expérience a été menée sur une période de 29 jours et la diminution progressive mais constante de la porosité (nous y reviendrons au paragraphe 4.2.) laisse suggérer qu'il n'y a pas eu de contamination éventuelle par des protozoaires. À la fin de l'expérience ($T = 29$ jours), bien que le biofilm occupe l'ensemble du milieu poreux, le premier tiers inférieur de la cellule semble abriter un biofilm plus épais. Bien que l'information apportée par ces observations reste purement qualitatives, on peut déjà noter par rapport au milieu précédent constitué de billes de verre Retsch® une bien plus forte variation de la transparence du milieu sur la durée de l'expérience (après 29 jours, on obtient une diminution allant jusqu'à 40 000 niveau de gris pour le sable de quartz alors que celle-ci ne dépassait pas 7000 niveaux de gris en moyenne pour le premier milieu).

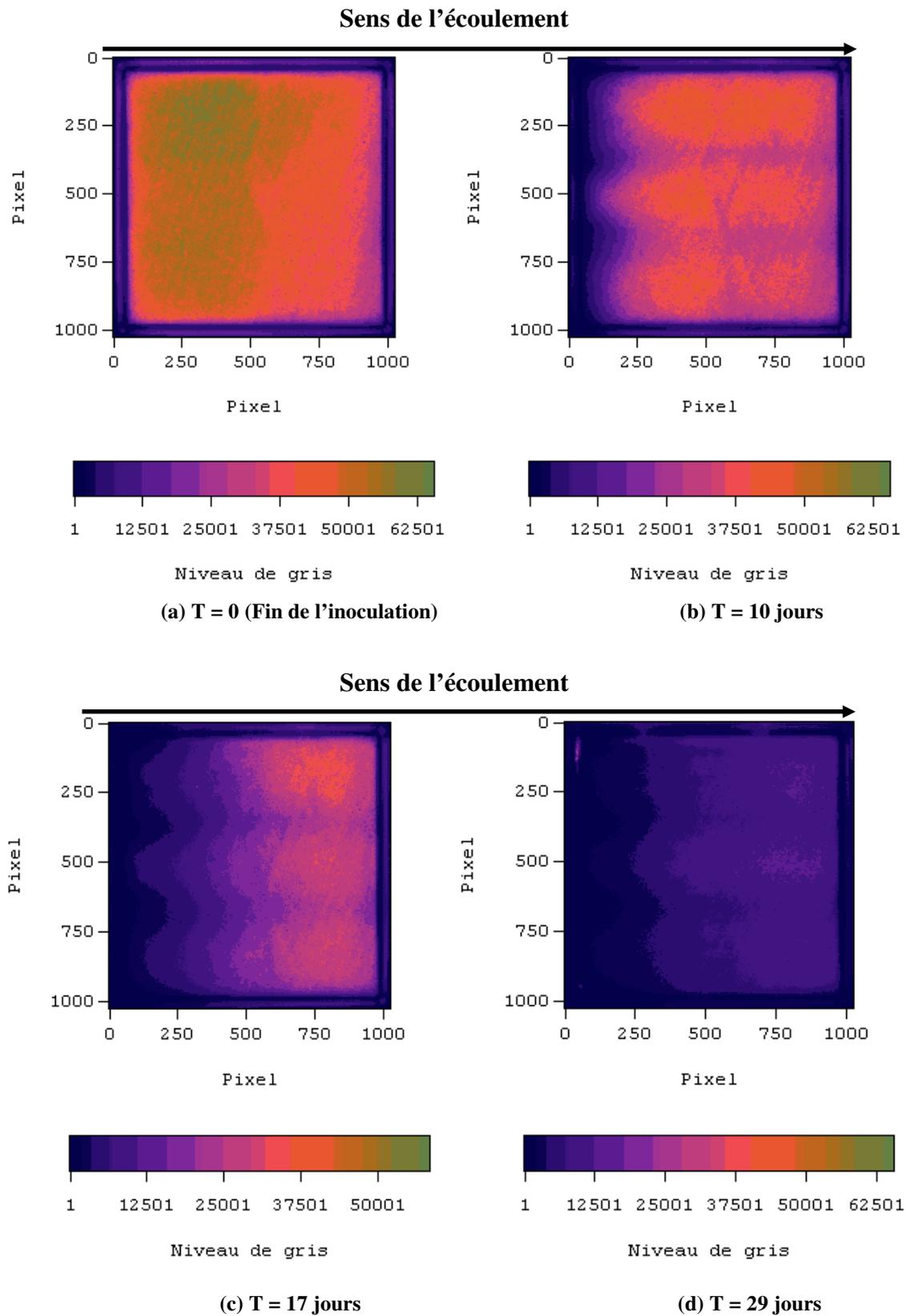


Figure 17 : Suivi de la croissance du biofilm dans le milieu poreux.

Afin de confirmer cette analyse, nous avons effectué des observations du milieu poreux avec le microscope AZ100. Les images de la cellule avec biofilm après 29 jours de culture sont présentées sur la Figure 18.

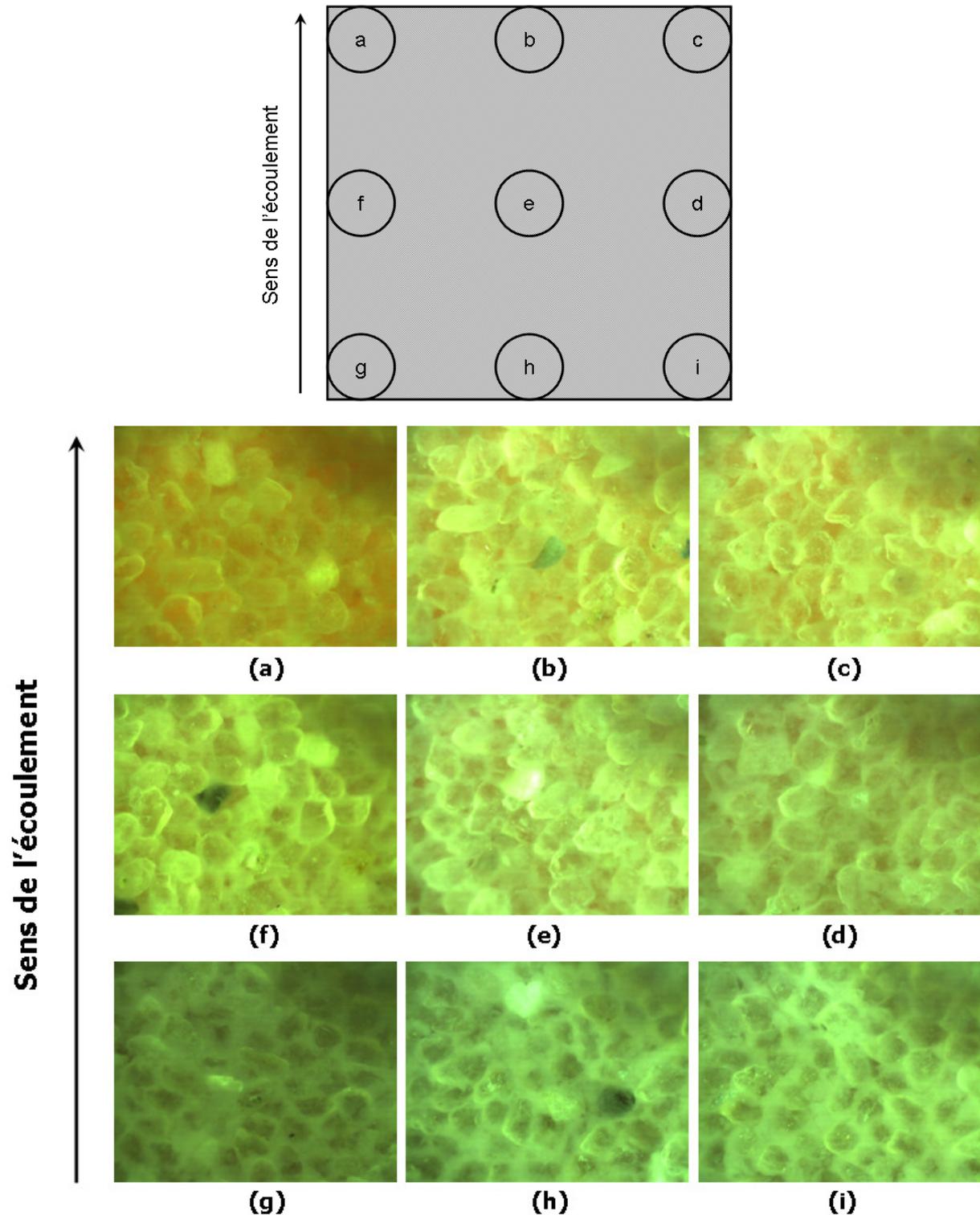


Figure 18 : Images de la cellule avec biofilm prises avec le microscope AZ100.

Sur cette figure, les lettres (de *a* jusqu'à *i*) incluses dans les cercles représentent les points d'observation.

Sur les différentes images, nous constatons que les grains de sable sont quasiment tous recouverts de matières biologiques (la précision de nos appareils ne nous a pas permis de distinguer la nature de ces recouvrements en condition *in situ*). Les images confirment aussi l'hypothèse d'une colonisation plus importante dans la zone inférieure de la cellule (*i.e.* : à proximité de la source d'alimentation). Dans cette zone inférieure, on distingue difficilement la géométrie des grains individuels. *A contrario*, malgré la présence des matières biologiques sur les grains, nous distinguons encore assez nettement leur contour dans la zone supérieure de la cellule (*i.e.* : près de la sortie). Bien que la croissance du biofilm ne soit pas homogène, nous pouvons cependant noter que l'objectif initialement affiché, *i.e.* : une distribution du biofilm sur l'ensemble du domaine, a été globalement atteint.

La variation significative de la densité optique et les observations effectuées au microscope laissent supposer que le biofilm est suffisamment épais maintenant pour permettre une mesure quantitative. Dans la section suivante, nous présenterons la méthode expérimentale développée afin d'estimer la fraction volumique du biofilm dans le milieu poreux. Cette estimation sera par la suite utilisée afin de quantifier les variations de colonisations entre l'entrée et la sortie de la cellule.

4.2. Proposition d'une méthode pour l'estimation in situ du biovolume

L'état de l'art sur les méthodologies expérimentales dans le Chapitre II a souligné l'absence actuelle de suivi précis du biovolume en colonne ou en cellule d'écoulement. L'approche originale que nous avons développée est basée sur l'utilisation d'un traceur coloré ne pénétrant pas dans le biofilm. Sur la base de cette hypothèse, il est ainsi possible, à partir des courbes d'élution mesurées à différentes sections, de calculer la vitesse de pore v_γ (*i.e.* : la vitesse de propagation du front de concentration) entre deux sections, et par là même la porosité efficace ε_γ participant à l'écoulement telle que :

$$v_\gamma = \frac{Q}{\varepsilon_\gamma S} \quad (6)$$

Avec Q le débit et S la surface de la veine d'écoulement au niveau de la section d'observation, et :

$$\varepsilon_\gamma = \varepsilon - \varepsilon_\omega \quad (7)$$

Où ε représente la porosité initiale du milieu poreux (avant colonisation) et ε_ω le biovolume présent.

On peut ainsi théoriquement remonter à une cartographie de la répartition du biovolume par section. Une recherche bibliographique sur les traceurs pouvant répondre à nos critères, nous a conduits à porter notre choix sur le Bleu Dextran (Viet *et al.*, 2008) conditionné par Sigma-Aldrich (CAS 87915-38-6). Cette molécule est composée d'un polymère d'ose, le Dextran, de masse molaire supérieure à $2 \cdot 10^6$ Da (à titre de comparaison, la masse molaire de l'Erioglauoine est de 749 Da) et d'un traceur coloré, le Reactive Blue 2, rattaché aux groupes hydroxyles de la chaîne du Dextran (Figure 19).

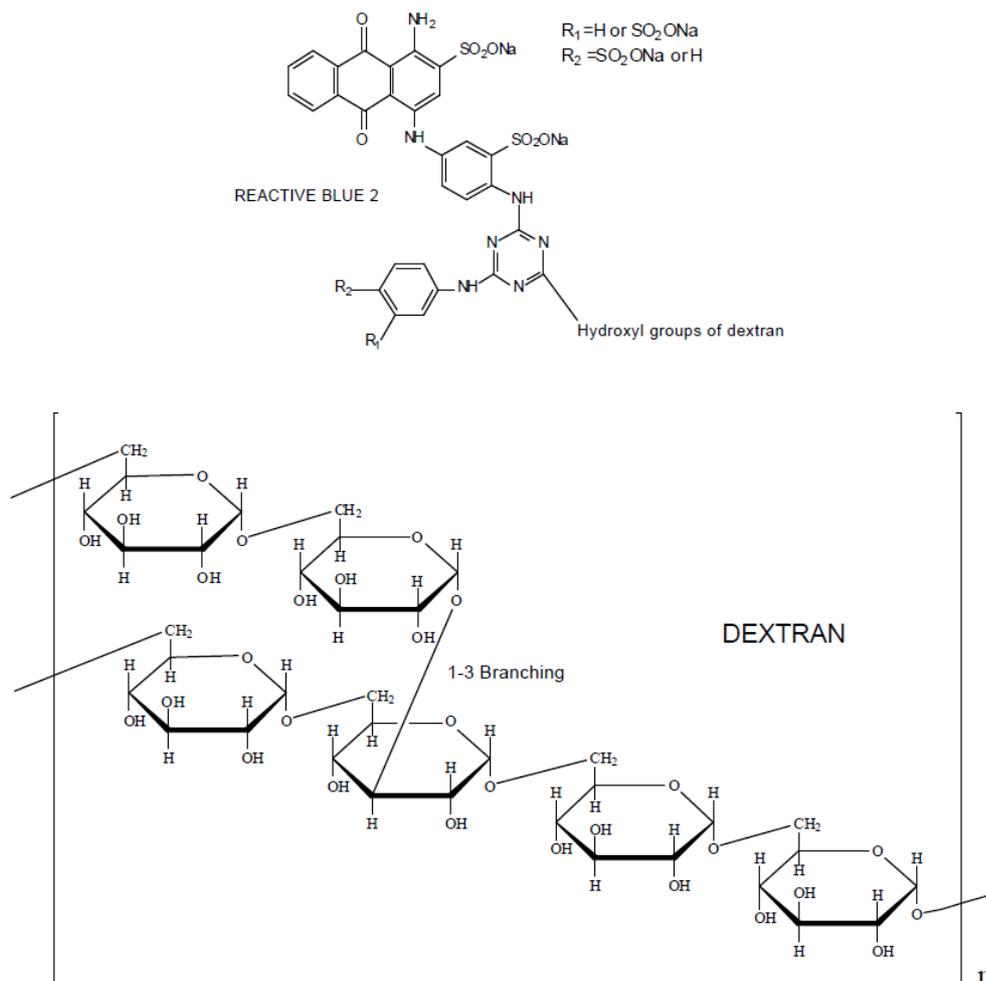
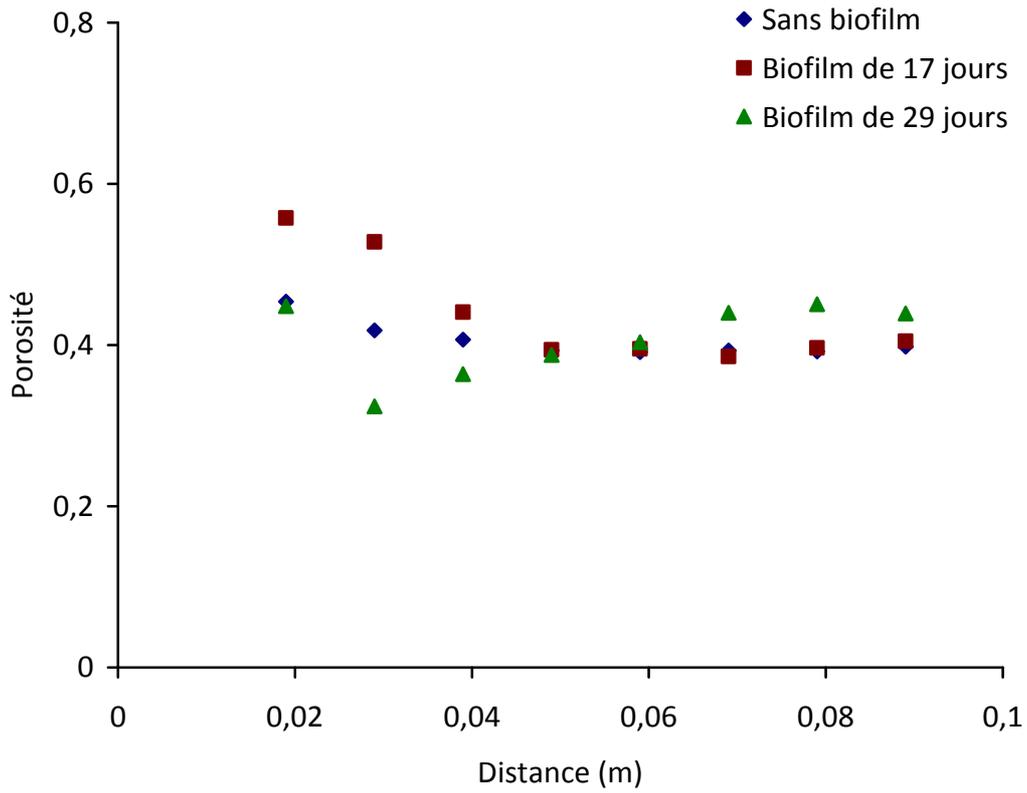


Figure 19 : Structure de la molécule de Bleu Dextran.

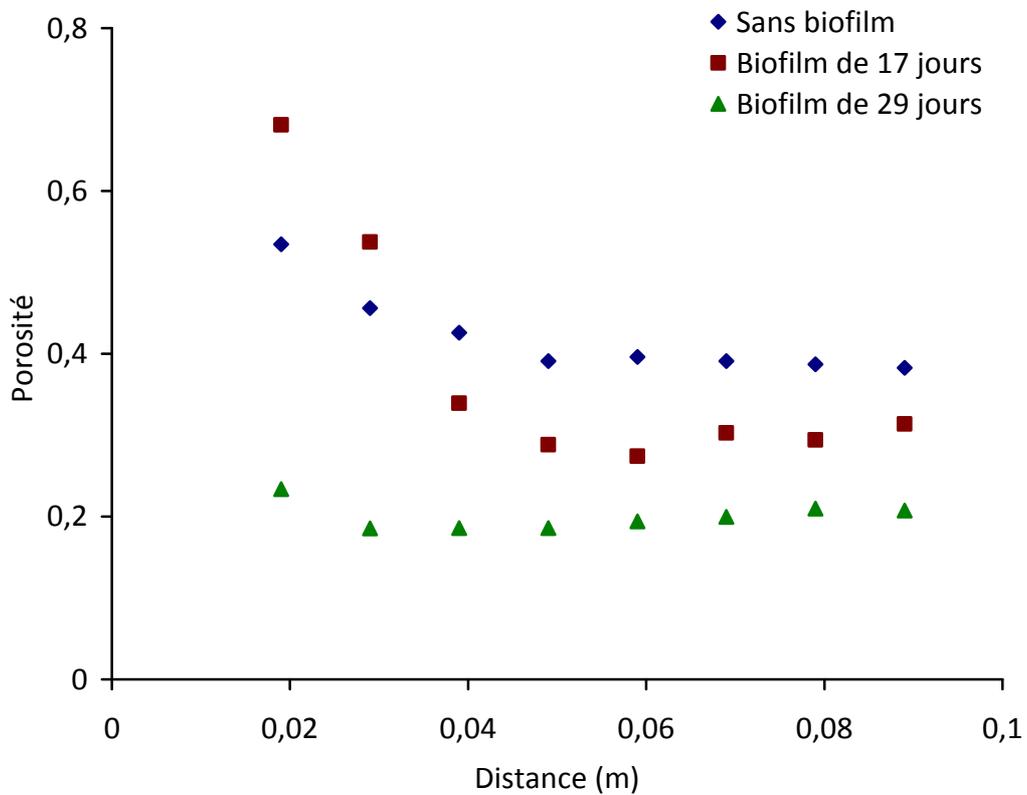
Le Bleu Dextran est souvent utilisé pour l'estimation du volume de vide des colonnes de chromatographie d'exclusion, de filtration sur gel ou de perméation de gel (*e.g.* : Persson *et al.*, 2006). Le principe de la chromatographie de filtration sur gel est le suivant : la colonne est remplie des billes d'un gel microporeux minéral ou organique ; lorsqu'un soluté en solution est en présence d'un milieu poreux non adsorbant, ses molécules diffusent dans ce milieu, établissant un équilibre entre sa concentration en solution dans les pores et à l'extérieur. Les molécules dont le volume est supérieur à celui des billes (*e.g.* : le Bleu Dextran) ne peuvent pas pénétrer dans les billes et sont éluées rapidement alors que les molécules dont le volume est inférieur à celui des billes pénètrent dans celle-ci et sont retardées ; le volume d'exclusion du gel est le volume d'élution d'une molécule non retardée, c'est-à-dire une molécule de taille supérieure à celle des billes et qui ne diffuse pas. Les billes utilisées peuvent être des polysaccharides, l'un des constituants essentiels des substances polymériques extracellulaires du biofilm. Ainsi, par analogie, on peut supposer que le Bleu Dextran se comporte en présence du biofilm de la même manière qu'en présence d'un gel de filtration. A la différence toutefois des gels utilisés en chromatographie qui présente une microporosité parfaitement calibrée, les biofilms peuvent présenter différentes échelles de porosité dont certaines peuvent être supérieures à la taille du Bleu Dextran. Cependant, même en présence d'éventuelles macroporosités au sein du biofilm, le très faible coefficient de diffusion de cette macromolécule, $D = 8,3 \cdot 10^{-12} \text{ m}^2 \cdot \text{s}$ (Kommedal *et al.*, 2006) conduit à un temps caractéristique de diffusion dans la phase microbienne très grand devant le temps de séjour ce qui ne devrait donc pas perturber nos mesures. La molécule de Dextran est aussi potentiellement biodégradable par les bactéries ce qui pourrait venir perturber nos interprétations. Toutefois, les cinétiques de biodégradation observées pour ce polymère sont inversement proportionnelles à sa masse molaire (Kommedal *et al.*, 2006). Compte tenu de la taille de cette macromolécule, une rapide comparaison des temps de réaction et des temps de séjour ont confirmé que cet effet était dans notre cas négligeable. Di Iaconi *et al.* (2004) ont d'ailleurs utilisé ce traceur pour cette propriété de non adsorption et de non pénétration dans la structure du biofilm. Ils ont pu ainsi déterminer le biovolume d'échantillons issus d'un réacteur biologique en mesurant dans une éprouvette la variation de volume avec et sans le Bleu Dextran. Nous appliquerons ici ce traceur à la caractérisation *in situ* de la biomasse présente au sein de notre cellule. À notre connaissance, le Bleu Dextran n'a jamais été utilisé pour quantifier le biovolume en milieu poreux. Nous tenterons de mettre en œuvre cette technique afin de la valider sur notre système.

En se basant sur les propriétés du Bleu Dextran mentionnées ci-dessus (pas d'adsorption ni de pénétration dans le biofilm), nous devrions observer une diminution de la porosité due au développement du biofilm dans le milieu poreux. Trois essais de traçage ont été pratiqués sur des supports : (i) sans biofilm, (ii) avec biofilm de 17 jours et (iii) avec biofilm de 29 jours. La solution utilisée comporte 1g/L de Bleu Dextran. La calibration et le traçage sont menés selon le protocole décrit dans le Chapitre III. Afin de valider notre approche expérimentale et vérifier la non-réactivité du Bleu Dextran avec le biofilm, nous avons effectué en parallèle des essais de traçage avec l'Erioglauoine dans les mêmes conditions. Afin de caractériser l'évolution longitudinale de la colonisation du milieu poreux par le biofilm, nous avons subdivisé la cellule selon huit sections transversales à la direction principale de l'écoulement. Pour chacun des essais de traçage, en utilisant la définition classique du temps de séjour pour un signal d'entrée du type échelon (*e.g.* : Luckner et Reissig, 1975), nous avons ensuite interprété les courbes de percée aux différentes sections d'observation de manière à déterminer la porosité effective moyenne entre deux sections adjacentes. Les résultats pour les deux colorants (Erioglauoine et Bleu Dextran) sont présentés sur la Figure 20.

Tout d'abord, on peut noter que quel que soit le colorant utilisé, les porosités mesurées dans les sections situées à proximité de l'entrée, présentent des valeurs plus élevées que celles mesurées plus en aval. Ces valeurs sont mêmes supérieures parfois à la porosité initiale. Ainsi, si l'attention est portée sur les sections situées à des distances inférieures à 0,04 m par rapport à la section d'injection, les porosités déterminées en présence du biofilm à 17 jours sont plus élevées que celles mesurées en l'absence du biofilm et en présence du biofilm de 29 jours. Ce résultat est d'autant plus surprenant que le biofilm est supposé plus abondant dans les premières sections du milieu poreux. En fait, cette interprétation nécessite que le transport de nutriment entre deux sections suive un comportement fickien pour que la mesure des porosités efficaces soit correcte. Dans le cas contraire, la vitesse moyenne entre deux sections ne peut être directement reliée à la valeur moyenne de la porosité du milieu. Or, l'influence des conditions aux limites et les perturbations générées par la forte bio-obstruction du milieu à l'entrée de la cellule peuvent expliquer un tel comportement sur les premiers centimètres.



(a)



(b)

Figure 20 : Estimation de l'évolution de la porosité : (a) avec l'Erioglucine et (b) avec le Bleu Dextran.

Au-delà d'une certaine distance critique (distance supérieure à 0,04 m), l'interprétation des courbes de percée conduit à des résultats physiquement réalistes dont nous pouvons retirer plusieurs faits marquants :

- Tout d'abord, avec l'Erioglaucine (Figure 20a), les valeurs de porosité semblent converger vers une valeur unique, quel que soit le type de traçage (sans biofilm, avec biofilm de 17 jours et/ou 29 jours). Comme cette valeur est relativement proche de la porosité totale ε mesurée avant inoculation ($0,40 \pm 0,01$) nous pouvons conclure que la totalité du volume de pore participe à l'écoulement dans le cas de l'Erioglaucine. Ce résultat est en accord avec nos hypothèses car (i) ce traceur, à la différence du Bleu Dextran, est supposé diffuser à l'intérieur du biofilm, et, (ii) pour de faibles vitesses d'injection, un comportement d'équilibre local (*i.e.* : un comportement fickien) est prévisible.
- En revanche, pour le Bleu Dextran (Figure 20b), les mesures présentent 3 paliers de porosité distincte pour les différents stades de maturation du biofilm. La diminution de porosité observée au fur et à mesure de la croissance bactérienne est cohérente avec nos prévisions théoriques. D'une part, ces variations suggèrent une formation significative de biomasse au sein du milieu avec des valeurs de biovolume ε_w de 0,11 et 0,2 (soit 50% du volume de pore initial) après 17 et 29 jours respectivement. Ces résultats confortent *a posteriori* notre choix du sable de quartz en tant que substratum et la très bonne bioadhérence de celui-ci. D'autre part, les différents paliers de porosité restent pratiquement constants jusqu'à l'extrémité de la zone d'étude. Ces observations suggèrent une relative homogénéité de la colonisation du milieu poreux par le biofilm, du moins dans la direction de l'écoulement. Il n'est pas impossible, en effet, que des chemins d'écoulement préférentiel subsistent au niveau de chaque section (cf. section 4.3). Une comparaison avec les mesures faites en présence de l'Erioglaucine confirme que les variations de porosité mesurées avec le Bleu Dextran ne sont pas dues à un artefact expérimental.

En conclusion, la méthodologie que nous avons développée s'avère être tout à fait applicable à un milieu poreux en colonne ou en cellule d'écoulement et nous permet d'accéder à l'évolution spatiale de la biomasse. Ces mesures devraient nous conduire à une

meilleure interprétation des effets de couplage entre croissance microbienne et transport de soluté.

4.3. Etude du transport de l'Erioglaucine dans le milieu poreux avec et sans biofilm

Une des difficultés soulevées par la mise en place d'essais de traçage en conditions biotiques – difficulté déjà évoquée lors des tests préliminaires réalisés avec les billes de verre – est liée à la mise en œuvre de ces mesures ainsi que de la calibration associée sur une durée de temps relativement courte. En effet, la croissance du biofilm modifiant les propriétés optiques du milieu poreux, il est nécessaire d'effectuer une nouvelle calibration pour chaque série d'essai de traçage et ce, dans un laps de temps suffisamment proche. Sur la base des mesures de biovolume présent à 17 et 29 jours et des variations d'intensité lumineuse au sein de la zone d'étude (cf. 4.1.2), la durée maximale admissible a été estimée à 1 jour (soit moins de 1% de variation du biovolume). D'autre part, un essai de traçage supplémentaire au Bleu Dextran (et la calibration associée) doit maintenant être effectué en parallèle des mesures à l'Erioglaucine afin de caractériser la porosité cinématique du milieu poreux. Afin de pallier ces difficultés, nous avons décidé de limiter l'étude du transport à deux régimes d'écoulement (*i.e.* : $v = 2,22 (\pm 0,13) \cdot 10^{-5}$ m/s et $v = 1,33 (\pm 0,02) \cdot 10^{-4}$ m/s). En outre, le nombre de points de calibration a été réduit de 10 à 5. Des essais préliminaires ont montré que l'efficacité d'une calibration linéaire n'est pas modifiée par cette diminution du nombre de points. Ce protocole de mesure nous a permis de mener à bien à la fois la calibration et les essais de traçage (pour un même colorant) dans la même journée. Ainsi, pour chaque stade de croissance du biofilm, la fraction volumique a été déterminée (traçage au Bleu Dextran) le premier jour et le transport de l'Erioglaucine (pour les deux régimes hydrodynamiques) a été étudié le jour suivant. La différence d'une journée entre la caractérisation des propriétés hydrodynamiques et la biomasse présente correspondante a été jugée négligeable dans l'interprétation des effets de couplage.

Une seconde difficulté à laquelle nous devons faire face concerne l'impact de la forte biocolonisation sur la qualité de la calibration obtenue pixel par pixel. En effet, si les premiers tests préliminaires effectués dans le Chapitre III n'ont pas montré un impact sensible de la biomasse sur cette courbe de calibration – en accord avec les résultats obtenus par Rockhold *et al.* (2006) par exemple – le biovolume est ici beaucoup plus significatif conduisant à des

variations d'intensité lumineuse de plusieurs milliers de niveaux de gris sur quelques dizaines de pixel (cf. Figure 17a). En dépit de nos efforts pour homogénéiser l'éclairage de la zone de mesure, la baisse globale de transparence du milieu conjuguée à la variabilité observée a conduit à une diminution du coefficient de régression des calibrations pour certains pixels au fur et à mesure de la croissance du biofilm. Les champs de concentration obtenus initialement présentaient ainsi une forte pixélisation due à ces fortes hétérogénéités d'un pixel à l'autre. Pour réduire ces effets, un lissage du champ de concentration des images a été effectué. Les images ont été post-traitées en appliquant aux valeurs brutes de concentration des moyennes glissantes sur des fenêtres de 16 pixels (Figure 21).

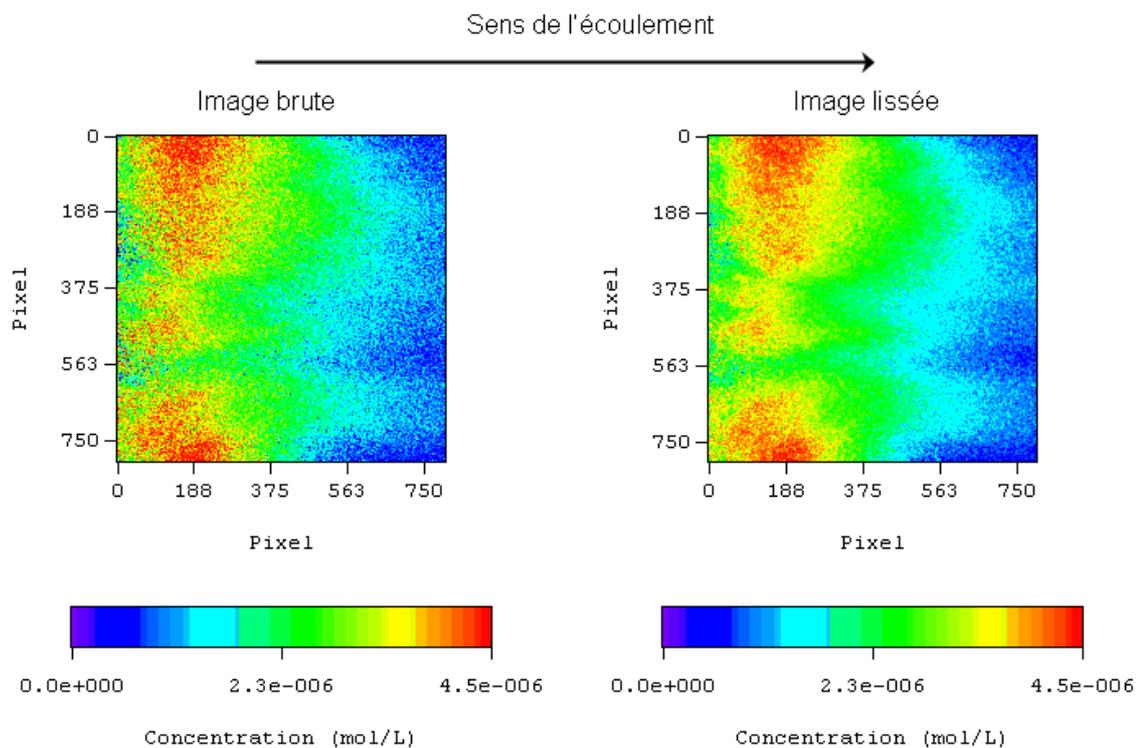


Figure 21 : Lissage du champ de concentration (29 jours).

Ceci n'a toutefois pas été suffisant sur les zones à proximité de l'entrée où l'interprétation en concentration devient faussée après 17 et 29 jours. On peut le voir sur la Figure 22a où l'image post-traité (*i.e.* : lissée) montre une concentration à 3 cm de l'entrée qui semble plus importante que celle en sortie. Un rognage supplémentaire a donc été appliqué à la zone de mesure (cf. Figure 22b) afin de pouvoir analyser avec exactitude les comportements physiques étudiés.

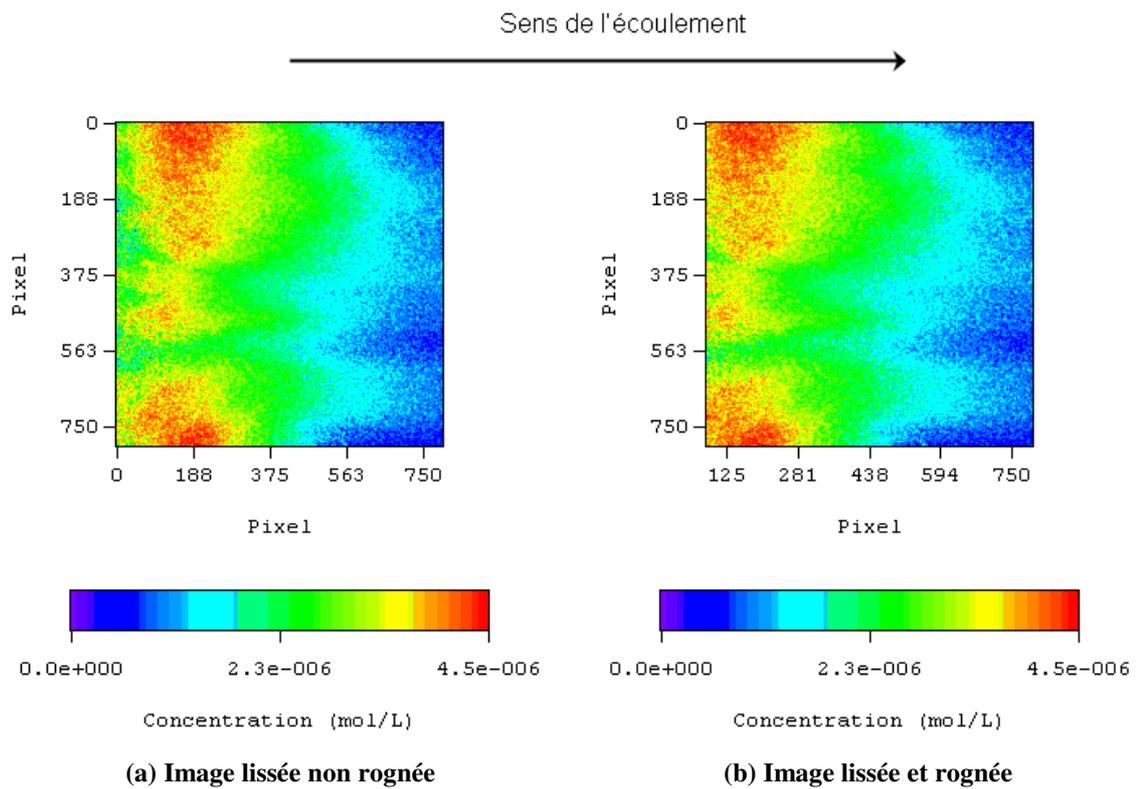


Figure 22 : Deuxième rognage des images lissées.

Dans ce qui suit, nous présenterons les résultats des différents essais de traçage avec l'Erioglaucine (les mesures de biovolume associées ont été présentées sur la Figure 20).

4.3.1. Influence de la croissance du biofilm sur la dispersion du soluté

La Figure 23 montre l'évolution du champ de concentration de l'Erioglaucine dans le milieu poreux sans biofilm, avec biofilm de 17 jours et de 29 jours respectivement pour les deux débits choisis.

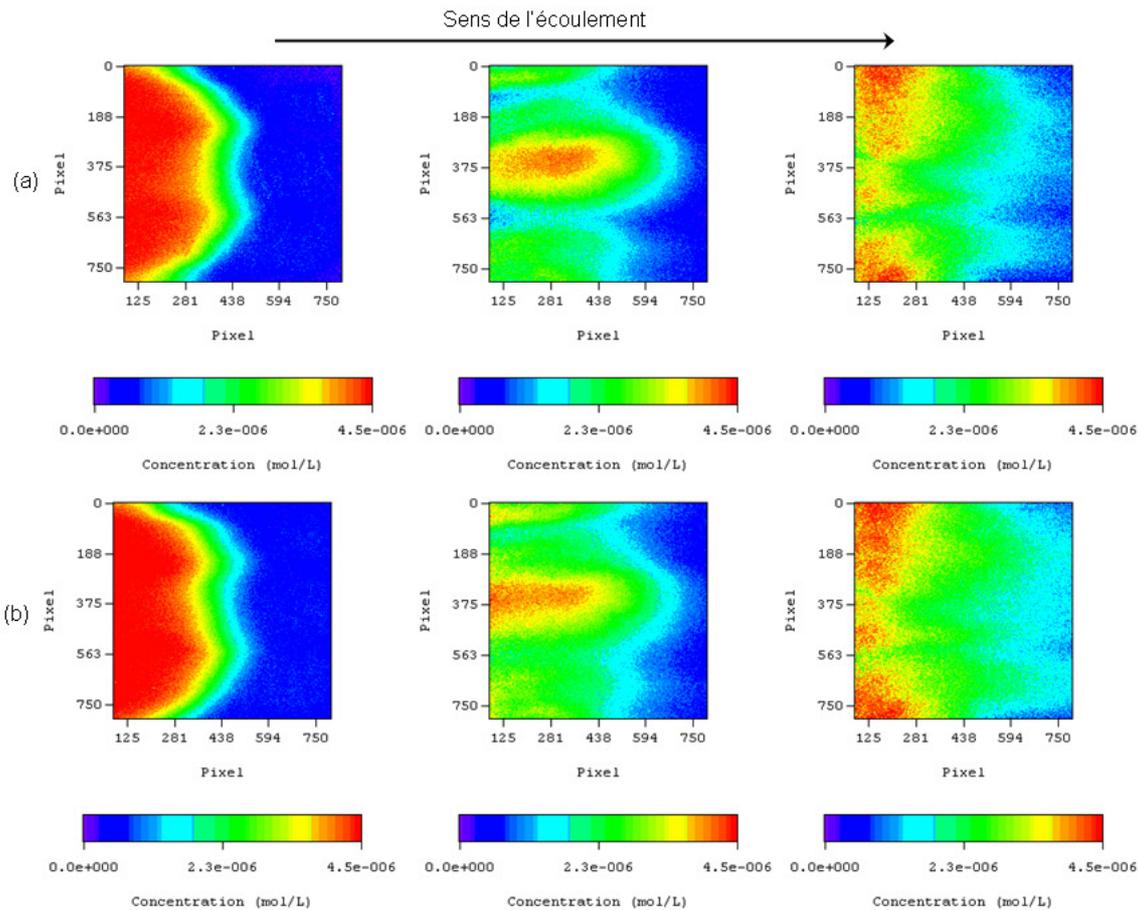


Figure 23 : Panaches d'Erioglaucine à (a) $v = 2,22 (\pm 0,13) \cdot 10^{-5}$ m/s et à (b) $v = 1,33 (\pm 0,02) \cdot 10^{-4}$ m/s.

Les images présentées sont celles pour lesquelles le front de soluté a atteint le centre de la zone de mesure. La colonne de gauche représente les images de traçage en l'absence de biofilm, la colonne au centre celles en présence du biofilm de 17 jours et la colonne de droite, celles en présence du biofilm de 29 jours.

Dans l'ensemble, le comportement observé est similaire à celui observé en présence des billes de verre mais avec un impact beaucoup plus marqué (et visible) du biofilm.

Pour les deux valeurs de vitesse, on observe, pour le front de soluté en l'absence de biofilm, une évolution globalement plane marquée, néanmoins, par la position des ports d'injection. Comme nous l'avons déjà souligné dans le Chapitre III, ce phénomène est vraisemblablement lié au dispositif d'injection (défaut de mélange dans le réservoir situé à l'entrée du milieu poreux). En revanche, les essais de traçage à 17 et 29 jours font apparaître de très fortes hétérogénéités. Ainsi, pour le biofilm de 17 jours, la distribution de concentration est essentiellement localisée sur la partie centrale de la cellule avec deux panaches secondaires près des parois (concentrations plus fortes dans la zone centrale qu'au voisinage des bords latéraux). Cette observation laisse envisager l'apparition de chemins préférentiels correspondant aux zones de fortes concentrations en biomasse. Ce phénomène pourrait être dû à un colmatage disparate de la section d'entrée du milieu poreux et/ou du

tamis en acier. L'analyse de l'image sur la Figure 17c présentant le suivi de la croissance du biofilm dans le milieu poreux à 17 jours semble corroborer cette hypothèse. En effet, une analyse juxtaposée de ces deux figures, Figure 17c et Figure 4a, met clairement en évidence la présence de deux zones de plus forte bio-obstruction entre les chenaux de concentration.

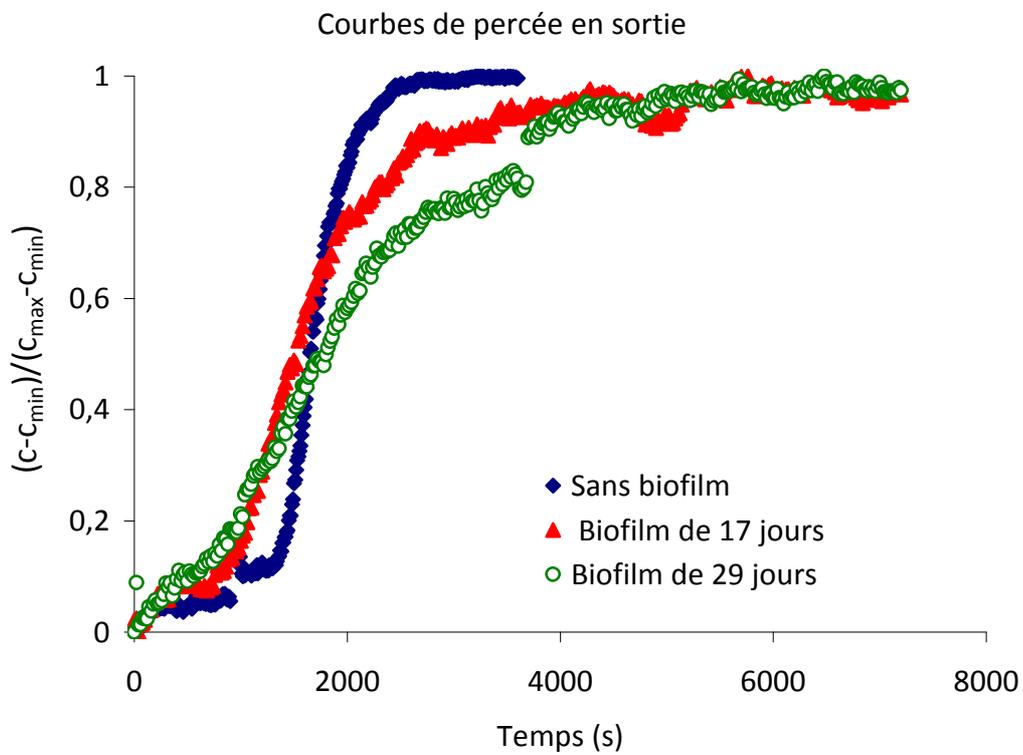
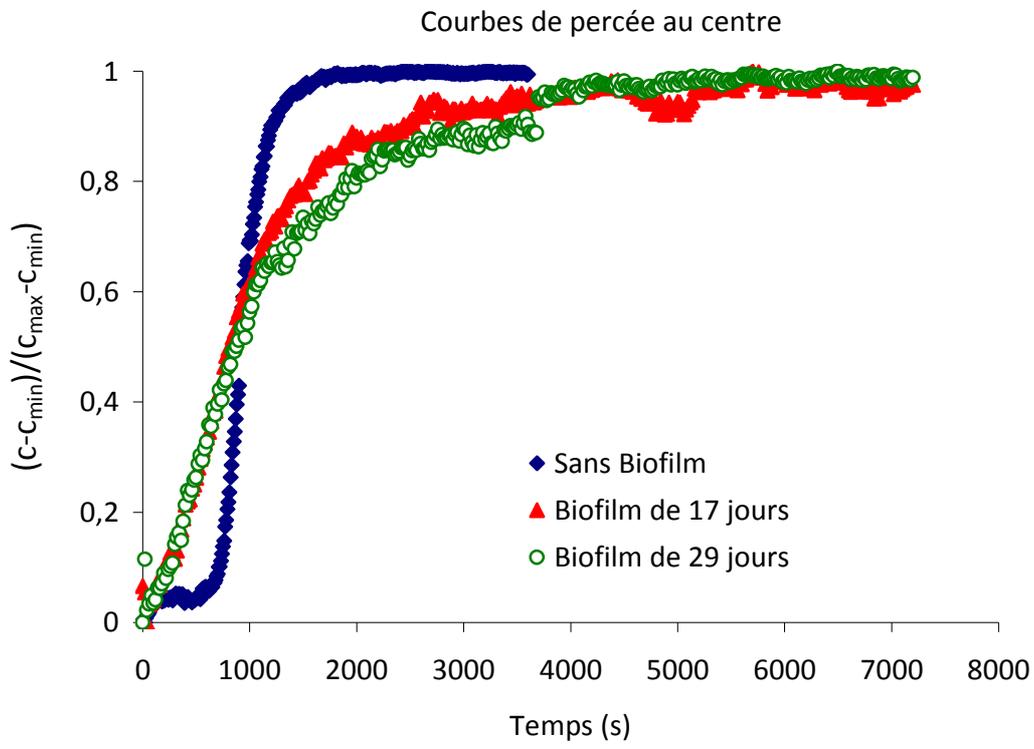
Concernant le biofilm à 29 jours, si les hétérogénéités de concentration sont toujours notables, la trajectoire parcourue par le soluté semble complètement différente de celle décrite précédemment. On observe maintenant une propagation plus homogène de la concentration avec des pics de concentration situés plutôt vers les bords latéraux que dans la section centrale. En utilisant une interprétation identique à celle évoquée pour le biofilm de 17 jours, cette nouvelle répartition de concentration pourrait être due à une modification du colmatage au niveau de la zone d'entrée par rapport au 17^{ème} jour. Ce phénomène est caractéristique des problématiques de croissance d'agrégats (biologique ou non – on retrouve les mêmes problèmes dans les processus de précipitation par exemple) en milieu poreux. Le développement initial de zones plus denses en biofilm conduit à des cheminements préférentiels de part et d'autre que parcourt le traceur (comportement à 17 jours). Le milieu nutritif injecté suit bien évidemment les mêmes trajectoires conduisant ainsi à faire croître le biofilm dans les zones où initialement il était moins développé tandis que les régions initialement colmatées stagnent voire décroissent en l'absence de nutriment.

Enfin, à forte vitesse ($v = 1,33 \cdot 10^{-4}$ m/s), nous retrouvons globalement le même comportement observé que précédemment aussi bien à 17 jours qu'à 29 jours. On peut cependant noter une distribution légèrement plus homogène de la concentration à cette vitesse ce qui pourrait laisser suggérer un léger processus d'arrachement ou d'érosion du biofilm dans les zones les plus fortement colmatées. Ce processus reste toutefois de faible intensité d'autant plus qu'entre deux phases de traçage, nous faisons circuler la solution nutritive à la vitesse la plus forte de sorte que le biofilm est accoutumé à ce fort taux de cisaillement.

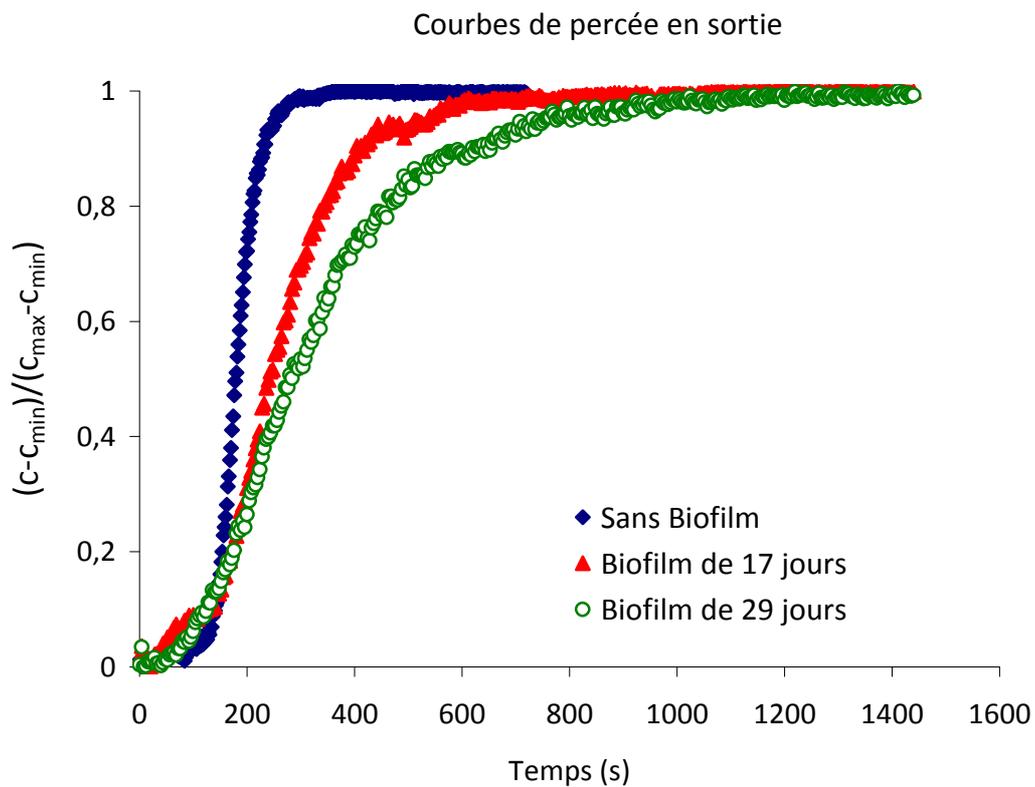
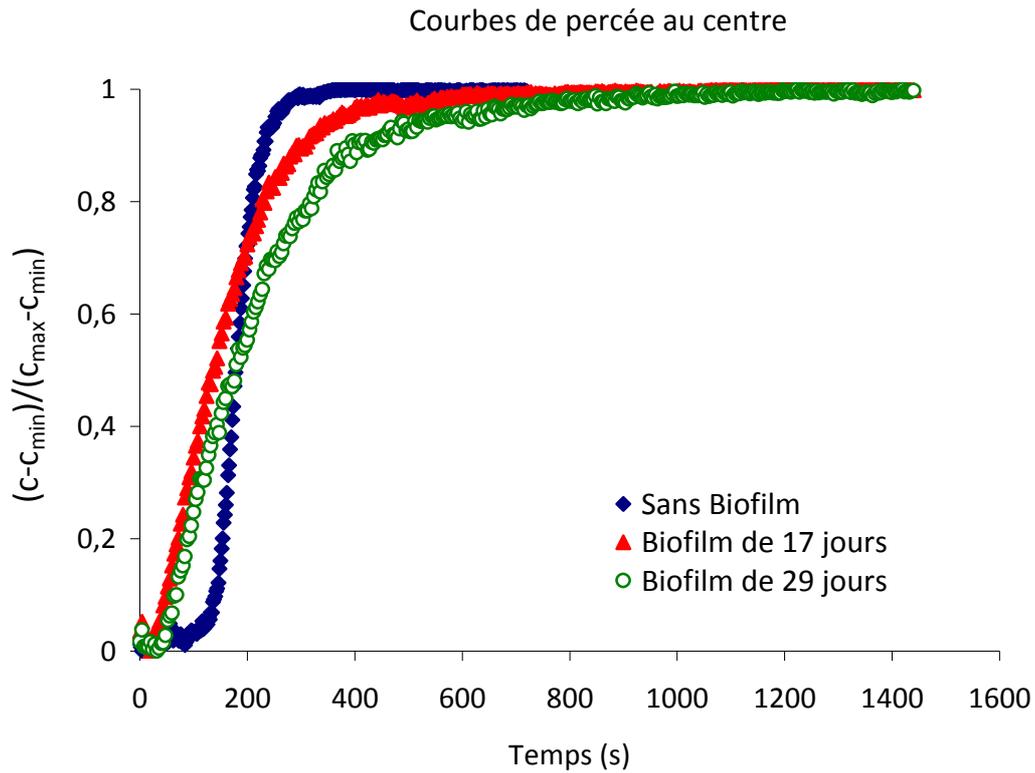
4.3.2. Détermination des paramètres de transport

Les trois essais de traçage (milieu initial et après 17 et 29 jours respectivement de culture) aux deux valeurs de vitesse d'injection ont ensuite été interprétés au travers des courbes de percée calculées à deux sections représentatives, *i.e.* : en milieu et en sortie du domaine. La procédure utilisée ici est similaire à celle déjà décrite dans le Chapitre III. Les résultats sont présentés sous forme de courbes de percée (Figure 24) exprimées en variables

réduites $(c - c_{min}) / (c_{max} - c_{min})$ et t , où c_{min} et c_{max} représente respectivement les concentrations expérimentales moyennes minimales et maximales dans la section d'analyse et t est le temps.



(a)



(b)

Figure 24 : Courbes de percée du traceur à (a) $v = 2,22 (\pm 0,13) \cdot 10^{-5}$ m/s et à (b) $v = 1,33 (\pm 0,02) \cdot 10^{-4}$ m/s.

L'analyse de cette figure confirme l'influence de la croissance du biofilm sur les propriétés dispersives du milieu. En fait, quelle que soit la section prise en compte et/ou le débit d'injection, le phénomène de dispersion est amplifié par le développement de la biomasse. Afin d'analyser plus en détail ce comportement, les paramètres hydrodynamiques associés à ces courbes ont été identifiés. Ainsi, les différentes grandeurs comme la vitesse de pore, la porosité apparente et les coefficients de macrodispersion sont présentés dans le Tableau 3. Les données sont fournies pour les deux régimes de la pompe 60 rpm et 300 rpm (tours par minute) correspondant aux vitesses de Darcy $v = 2,22 (\pm 0,13) \cdot 10^{-5}$ m/s et $v = 1,33 (\pm 0,02) \cdot 10^{-4}$ m/s respectivement (pour les traçages sans biofilm).

Tableau 3 : Paramètre expérimentaux des expériences de traçages.

(a) Vitesses de pore

	Vitesse de pore (m/s)	
	60 rpm	300 rpm
Sans biofilm	$5,76 \cdot 10^{-5}$	$3,53 \cdot 10^{-4}$
Biofilm de 17 jours	$7,29 \cdot 10^{-5}$	$3,95 \cdot 10^{-4}$
Biofilm de 29 jours	$5,94 \cdot 10^{-5}$	$3,65 \cdot 10^{-4}$

(b) Porosités apparentes

	Porosité	
	60 rpm	300 rpm
Sans biofilm	0,37	0,37
Biofilm de 17 jours	0,29	0,33
Biofilm de 29 jours	0,36	0,36

(c) Macrodispersion et dispersivité

	Dispersion longitudinale			
	60 rpm		300 rpm	
	D_L (m ² /s)	α_L (m)	D_L (m ² /s)	α_L (m)
Sans biofilm	$4,04 \cdot 10^{-7}$	$1,91 \cdot 10^{-2}$	$2,02 \cdot 10^{-6}$	$1,53 \cdot 10^{-2}$
Biofilm de 17 jours	$4,04 \cdot 10^{-7}$	$1,91 \cdot 10^{-2}$	$3,94 \cdot 10^{-6}$	$2,99 \cdot 10^{-2}$
Biofilm de 29 jours	$7,07 \cdot 10^{-7}$	$3,32 \cdot 10^{-2}$	$5,90 \cdot 10^{-6}$	$4,47 \cdot 10^{-2}$

La vitesse de pore (U), le coefficient de dispersion longitudinal (D_L) et sa dispersivité intrinsèque (α_L) ainsi que la porosité ont été déterminés en utilisant la *méthode de deux mesures* (Buès et Zilliox, 1990), procédure dérivée de la méthode des moments temporels (Aris, 1958). En fait, la *méthode de deux mesures* consiste, dans une première étape, à

remplacer au sens de distributions les deux signaux mesurés et normés, *i.e.* : le signal d'entrée $e(t)$ et le signal sortant $s(t)$ tel que :

$$\int_0^{\infty} e(t) dt = \int_0^{\infty} s(t) dt = 1 \quad (8)$$

par leurs dérivées $e'(t) = d[e(t)]/dt$ et $s'(t) = d[s(t)]/dt$.

Si les dérivées sont nulles en dehors d'un intervalle fermé $[0, A]$, le problème revient alors à calculer les moments d'ordre 1 et 2 de $e'(t)$ (respectivement $s'(t)$) :

$$M_1[e'(t)] = Ae(A) - \int_0^A t e(t) dt \quad (9)$$

$$M_2[e'(t)] = A^2 e(A) - 2 \int_0^A t e(t) dt \quad (10)$$

afin de déterminer les paramètres recherchés, *i.e.* :

$$U = \frac{L}{t_{0,5}} = \frac{L}{\{M_1[s'(t)] - M_1[e'(t)]\}} \quad (11)$$

$$\alpha_L = \frac{\sigma^2 U^2}{2L} = \frac{\{M_2[s'(t)] - M_1^2[s'(t)]\} - \{M_2[e'(t)] - M_1^2[e'(t)]\}}{2L} U^2 \quad (12)$$

$$D_L = U \alpha_L \quad (13)$$

$$\varepsilon = \frac{v}{U} \quad (14)$$

Où L représente la distance entre les signaux entrant et sortant, $t_{0,5}$ le temps de séjour, σ^2 la variance et v la vitesse de Darcy.

En absence d'un signal échelon parfait en entrée, nous avons appliqué cette méthode entre les deux sections d'observation considérées (centre - $x = 4,9 \cdot 10^{-2}$ m et sortie - $x = 8,9 \cdot 10^{-2}$ m) de telle sorte que les propriétés hydrodynamiques identifiées correspondent à la deuxième moitié de la zone d'étude.

Les propriétés du milieu poreux initial ont déjà analysés précédemment. On obtient pour la porosité une valeur ($0,37\pm 0,01$) légèrement plus faible que celle mesurée directement par pesée ou celle obtenue dans le paragraphe 4.2. par la méthode du $t_{0,5}$ (e.g. : Luckner et Reissig, 1975) qui conduisait à une valeur de $0,4\pm 0,01$. Ce résultat a aussi été validé *a posteriori* à partir des simulations numériques (cf. Chapitre V). Nous avons donc supposé que cette différence était à imputer à une imprécision de la méthode sur un signal expérimental légèrement bruité. Les dispersions mesurées aux deux vitesses, quant à elles, conduisent à une valeur pratiquement identique de la dispersivité intrinsèque, de l'ordre du centimètre, ce qui semble cohérent avec une étude expérimentale à l'échelle du laboratoire.

En revanche, le développement du biofilm conduit à des interprétations significativement différentes pour 17 et 29 jours. A 29 jours, les porosités apparentes calculées sont très proches des valeurs initiales ce qui suggère que toute la porosité participe à l'écoulement. Un modèle fickien devrait vraisemblablement pouvoir prétendre à reproduire ce comportement. En revanche, à 17 jours, le front de concentration se propage beaucoup plus rapidement ce qui conduit à une porosité beaucoup plus faible. Ce phénomène, plus marqué à 60 rpm est à relier aux cheminements préférentiels générés par la bio-obstruction. Comme nous l'avons constaté sur la Figure 23, en effet, ce processus est beaucoup plus notable après 17 jours avec une propagation du soluté essentiellement localisé au niveau du port d'injection médian. D'un point de vue hydrodynamique, le comportement observé est ainsi proche de celui d'un milieu très hétérogène. La pertinence d'une équation de convection-dispersion classique pour modéliser le transport au sein d'un tel milieu méritera d'être analysée en détail. Nous reviendrons plus longuement sur ces points dans le Chapitre V.

Les mesures de dispersion suggèrent globalement une augmentation de l'étalement du front avec la croissance microbienne ce qui est en accord avec les résultats de Taylor et Jaffé (1990b) ou de Seifert et Engesgaard (2007) notamment. Notons que la dispersion à 17 jours à 60 rpm n'a pu être quantifiée (la méthodologie conduisait à une valeur non-physique), la macro-dispersion ne suivant plus une loi normale. Ceci vient confirmer le constat évoqué précédemment du comportement non-fickien du milieu à 17 jours.

4.4. Discussion

La croissance du biofilm sur le nouveau milieu de culture, *i.e.* : sable de quartz, a été suivie à l'aide de deux méthodes : (i) mesure de la perméabilité et (ii) acquisition d'images avec une caméra CCD. Initialement, nous avons choisi de mesurer la perméabilité par la technique de charge variable comme décrite dans le chapitre III. Cependant, l'épaisseur du biofilm a rapidement augmenté et cette technique s'est avérée non-applicable par la suite de notre étude. Par conséquent, la seule méthode fiable permettant d'analyser et d'interpréter l'évolution spatio-temporelle de la croissance du biofilm était la méthode d'acquisition d'images. Selon la Figure 17, les images enregistrées par la caméra CCD intensifiée PI-MAX3 montrent une diminution progressive de la transparence du milieu (baisse du niveau de gris) au fur et à mesure que le biofilm se développe dans le milieu poreux. Il faut cependant noter que, malgré une inoculation uniforme en début d'expérience (cf. méthode d'inoculation décrite dans le chapitre III), le biofilm est caractérisé par un développement hétérogène. Avant d'occuper progressivement le milieu poreux, il croît d'abord à proximité de la source d'alimentation (partie inférieure de la cellule d'écoulement). Ainsi, à 17 jours de culture, la colonisation du biofilm est surtout observée dans la moitié inférieure du milieu poreux (Figure 17c). Par ailleurs, l'existence de plusieurs bandes de niveaux de gris différents montre une certaine hiérarchisation dans la colonisation du milieu. Cela est probablement dû à la production de biomasse fortement liée à la disponibilité des nutriments. En fait, nos résultats sont en accord avec ceux obtenus par Taylor et Jaffé (1990a) qui ont souligné une consommation quasi complète du substrat dans les 5 à 10 premiers centimètres de leur colonne de sable. Ils montrent ensuite que la pénétration du substrat en profondeur dans la colonne augmente avec le temps. Ils attribuent cette pénétration progressive à une différence de cinétique de consommation du substrat, à la croissance du biofilm ou à une augmentation du transport convectif et dispersif. La colonisation progressive du milieu dans notre étude pourrait donc être expliquée par le fait que lorsqu'une partie du milieu poreux est obstruée, les nutriments sont transportés dans les zones non obstruées au travers des chemins préférentiels d'écoulement. Ces aspects ont été d'ailleurs mis en évidence par Thullner *et al.* (2002a) qui ont saturé leur milieu avec une solution colorée. En faisant circuler de l'eau dans le milieu après saturation en solution colorée, ils ont observé que l'eau contournait la zone obstruée par le biofilm (zone centrale du milieu devenue imperméable). Ces chemins préférentiels d'écoulement permettent donc d'assurer la colonisation progressive des parties du milieu non encore occupées par le biofilm. Ainsi, à la fin de notre expérience de culture, *i.e.* : après 29

jours de culture (cf. figure 17d) nous observons une occupation totale du milieu poreux par le biofilm qui se traduit par une baisse considérable en niveaux de gris sur l'ensemble de la cellule. A première vue, ces effets de chenalisation et d'hétérogénéité observés pourraient sembler en contradiction avec les mesures de porosité par la technique du Bleu Dextran (Figure 20) qui suggèrent une porosité évoluant de manière uniforme. Ainsi, si la porosité sans biofilm est d'environ 0,4, elle diminue à environ 0,3 pour le biofilm à 17 jours et à 0,2 pour le biofilm à 29 jours ce qui correspondrait à un biofilm occupant 50% du volume poral. Toutefois, rappelons que ces mesures de biovolume ne sont valides qu'à une certaine distance de l'entrée. En d'autres termes, si nous pouvons supposer une certaine homogénéité du milieu en termes de distribution spatiale du biofilm sur les 2/3 supérieurs du domaine, cette homogénéité est loin d'être assurée pour les sections localisées au voisinage de la section d'injection (environ 1/3 du milieu poreux). Une caractérisation pixel par pixel du biovolume serait ici nécessaire afin de mieux interpréter les comportements observés. Une tentative en ce sens a été effectuée mais n'a pas eu le succès escompté. Nous avons ainsi essayé de mesurer les variations de densité optique du milieu à l'aide de la caméra CCD de manière à remonter aux valeurs de ε_o mais l'incertitude était trop forte. Notons également que nous n'avons pas pu estimer la part réelle de chaque constituant du biofilm (cellules bactériennes et EPS). Des études plus approfondies mériteraient d'être menées à ce sujet.

L'analyse des courbes de percée et la caractérisation des paramètres hydrodynamiques associés au travers de la méthode des moments confirment que la croissance du biofilm dans le milieu poreux influe sur les propriétés hydrodispersives du milieu. Ces résultats sont en accord avec les données expérimentales de la littérature. Ces mesures nous ont aussi permis d'observer une modification importante du comportement hydrodynamique du milieu entre 17 et 29 jours avec une transition d'un régime fickien classique à un régime non-fickien. Ce phénomène est supposé relié aux modifications des hétérogénéités du milieu sous l'effet de la bio-obstruction. Dans le chapitre V, une modélisation numérique du phénomène de transport ayant conduit à ces courbes de percée sera menée afin d'explorer plus en détail ces effets de couplage.

4.5. Conclusion

Dans ce chapitre, nous avons réussi à former un biofilm occupant tout l'espace du milieu poreux. Cependant, il subsiste des hétérogénéités dans la distribution spatiale du biofilm. En effet, la zone inférieure (proche de la source de nutriments) abrite un biofilm plus dense et moins uniforme que le reste du milieu. A la différence des résultats présentés par Rockhold *et al.* (2006) ou Oates *et al.* (2005) pour de plus faibles fractions volumiques de biofilm, nous avons observé dans notre cas un très net impact de la présence de la biomasse sur le suivi de la concentration par méthode optique. Nous avons ainsi dû modifier notre méthodologie initiale en appliquant un post-traitement des images brutes acquises afin de réussir à les interpréter. Nous avons également présenté une méthode de caractérisation *in situ* du biofilm dans le milieu poreux.

Cette étude expérimentale approfondie a permis aussi de mettre en évidence l'influence de la croissance du biofilm sur les propriétés hydrodynamiques du milieu et sur le transport conservatif de l'Erioglaucone.

Dans le chapitre suivant, nous comparerons ces résultats expérimentaux avec les prédictions issues de simulations numériques afin de mieux comprendre l'impact du développement du biofilm sur le régime de transport.

CHAPITRE V

MODELISATION DU TRANSPORT DE SOLUTE EN PRESENCE DE BIOFILM

Ce chapitre sera consacré à la comparaison entre les résultats expérimentaux et les prédictions numériques. Les modèles utilisés reposent sur les formulations à une ou à deux équations (modèle fickien classique ou modèle à double porosité) permettant de prendre en compte le transport d'espèces dans un système complexe solide-biofilm-fluide. Afin de mettre en évidence les apports de la modélisation dans l'interprétation de nos résultats expérimentaux, ce chapitre est organisé en quatre parties. Dans les deux premières parties, nous présenterons l'état de l'art sur la modélisation du transport des solutés en milieu poreux en présence d'un biofilm. Cet état de l'art sera axé sur les méthodes de changement d'échelle et, en particulier, sur le changement d'échelle par prise de moyenne volumique. Dans la troisième partie, nous verrons les différentes formulations issues de cette technique. *In fine*, la quatrième partie portera sur l'étude comparative des modèles ciblés avec nos données expérimentales.

5.1. Etat de l'art

5.1.1. Notion d'échelle

La modélisation du transport des espèces chimiques en présence des bactéries doit être envisagée comme la résolution d'un problème multi-échelle. Si l'impact de certains phénomènes physiques peut être traité à l'échelle macroscopique, les processus biochimiques impliqués dans le métabolisme microbien se déroulent à des échelles bien inférieures. Selon Sturman (1995), les processus biologiques impliqués dans la bioremédiation peuvent être observés selon trois échelles :

- **microscopique** : permet de caractériser les espèces et les réactions chimiques et microbiologiques, *e.g.* : la composition des consortia microbiens, les cinétiques et la stœchiométrie des réactions de transformation indépendamment de tout phénomène de transport. Cette échelle est de l'ordre de la cellule microbienne, *i.e.* : 10^{-6} - 10^{-5} m ;
- **mésoscopique (ou échelle du pore)** : de l'ordre de 10^{-5} - 10^{-2} m, elle permet de caractériser le réseau de pores ou les particules du sol, la longueur caractéristique de diffusion ou la dimension des agrégats microbiens ;
- **macroscopique (ou échelle de Darcy)** : à cette échelle on peut approcher le domaine d'étude par un milieu continu caractérisé par des propriétés locales qui peuvent varier dans l'espace, *e.g.* : porosité, perméabilité, advection, dispersion.... Cette échelle d'observation est de l'ordre de 10^{-2} à environ 10^1 m voire plus.

À ces échelles, on peut ajouter l'échelle mégascopique qui est l'échelle du champ (réservoir, bassin versant, ...).

La notion d'échelle de mesure est donc d'autant plus importante qu'une matrice poreuse peut paraître homogène à une échelle donnée alors qu'elle est hétérogène à une autre (Cushman *et al.*, 2002). La prise en compte de toutes ces hétérogénéités microscopiques conduit souvent à des équations macroscopiques de transport très complexes dont la résolution nécessite l'utilisation de méthodes numériques plus ou moins sophistiquées. Globalement, deux grandes approches sont usuellement mises en œuvre pour le développement de modèles macroscopiques de transport en conditions biotiques (Weiss et Cozzarelli, 2008) :

- La première comprend deux étapes : (i) l'identification des processus principaux de réaction et de transfert de masse qui peuvent être impliqués dans le système étudié et (ii) la formulation du modèle mathématique à l'échelle de Darcy ou du volume élémentaire représentatif (VER) à partir du bilan de masse des processus pris en compte. Bien que la plupart de ces modèles soient mécanistiques dans le sens où ils essaient d'identifier les processus importants mis en jeu (*e.g.* : limitation du transfert de masse entre la phase aqueuse et la phase biofilm), ils ne sont pas obtenus à partir d'un formalisme rigoureux qui moyenne les équations à l'échelle inférieure. Cela signifie que les paramètres à l'échelle macroscopique sont supposés exister *a priori* et ne sont pas reliés d'une quelconque manière à la structure microscopique du milieu poreux. Les coefficients effectifs, tels que le tenseur de dispersion, apparaissant dans l'équation macroscopique de transport, doivent être soit calés soit mesurés directement avec les difficultés expérimentales inhérentes aux systèmes biologiques. Ainsi, de nombreuses études (*e.g.* : Cirpka *et al.*, 1999) ont souligné l'importance d'une caractérisation fine de la dispersion dans les méthodes de bioremédiation *in situ* (le développement du biofilm étant lié à l'importance de la zone de mélange) en suggérant que la surestimation de la biodégradation simulée par la plupart des modèles numériques est due à une mauvaise évaluation de ce coefficient.
- La seconde approche, qui permet de conserver à l'échelle d'observation certains mécanismes développés souvent à une échelle inférieure, repose sur les méthodes de changement d'échelle. Cette méthodologie consiste à décrire les processus à une échelle donnée (*e.g.* : l'échelle macroscopique ou échelle de Darcy) en se basant sur les données disponibles à une autre échelle, le plus souvent inférieure (*e.g.* : l'échelle microscopique). Bien que les résultats obtenus soient prometteurs (*e.g.* : Wood *et al.*,

2002 ; Golfier *et al.*, 2009) et aient apporté de réelles avancées théoriques dans la compréhension de ces effets de couplage, les prédictions de ces modèles n'ont toujours pas été confrontées à des données expérimentales (complexité des résolutions numériques nécessaires, difficulté à caractériser la géométrie du réseau poral et à estimer expérimentalement les valeurs des paramètres à petite échelle).

Ces deux approches ont conduit finalement à des formulations similaires sur la description macroscopiques des processus de transport réactif que l'on peut schématiquement classer comme suit :

- Les modèles basés sur l'hypothèse d'une concentration globalement homogène aussi bien dans la phase fluide que dans la phase biofilm (Baveye et Valocchi, 1989 ; Clément *et al.*, 1997). Cette catégorie correspond au modèle d'équilibre de masse local (Golfier *et al.*, 2009) dérivée à partir des méthodes de changement d'échelle ;
- Les modèles où les phénomènes de limitation de transfert entre les deux phases sont considérés (Orgogozo *et al.*, 2009, 2010 ; Davit *et al.*, 2010). Ceci peut s'effectuer soit : (i) au travers d'un coefficient d'échange reliant l'évolution des concentrations dans chacune des phases (modèle double milieu) ou (ii) par le biais d'un facteur d'efficacité traduisant l'influence du biofilm sur la concentration au sein du milieu fluide. Cette classe de modèles est à relier aux modèles de non-équilibre local d'un point de vue du changement d'échelle (modèle à 2 équations, modèle *Reaction Rate Limited Consumption* (RRLC), *i.e.* : le modèle de biodégradation limitée par la cinétique de la réaction ou modèle *Mass Transfert Limited Consumption* (MTLC), *i.e.* : le modèle de biodégradation limitée par le taux de transfert de la masse de la phase fluide vers la phase biofilm).

Focalisons nous maintenant plus en détails sur les principes des méthodes de changement d'échelle et sur les modèles macroscopiques obtenus à partir de cette approche.

5.1.2. Changement d'échelle

Le changement d'échelle appliqué au transport de soluté consiste à décrire le phénomène de transport (caractérisation des paramètres) à l'échelle macroscopique en prenant en compte, par exemple, des données disponibles à l'échelle microscopique ou à une échelle inférieure (*e.g.* : échelle de la cellule bactérienne). Les travaux qui ont tenté de modéliser la dispersion à l'échelle macroscopique ont abouti à deux types d'approches : l'approche

stochastique et l'approche déterministe. L'approche stochastique considère les données relatives aux propriétés du milieu comme des variables aléatoires. Ces données sont traitées statistiquement afin de caractériser le phénomène de transport. Des détails sur ces méthodes peuvent être trouvés dans de nombreux travaux (Matheron et De Marsily, 1980 ; Dagan, 1984 ; Gelhar *et al.*, 1992 ; Miller *et al.*, 1998). L'approche déterministe, quant-à-elle, repose sur : (i) l'hypothèse de séparation des échelles (les longueurs caractéristiques des hétérogénéités microscopiques sont petites devant les longueurs caractéristiques des phénomènes à l'échelle supérieure) et (ii) la périodicité du milieu ou, du moins, que toute la complexité microscopique du milieu puisse être contenue dans une cellule unitaire représentée par le Volume Élémentaire Représentatif - VER (Cushman *et al.*, 2002). Parmi les méthodes déterministes, on peut citer la méthode d'homogénéisation (Auriault et Sanchez-Palencia, 1986 ; Hornung, 1997 ; Royer, 2002 ; Sanchez, 2009) ou la méthode de prise de moyenne volumique que nous utiliserons par la suite et dont quelques uns des travaux pionniers sont ceux de Anderson and Jackson (1967), Marle (1967), Slattery (1967) et Whitaker (1967). Le maintien du couplage avec les processus aux échelles inférieures s'effectue par la résolution des problèmes de fermeture définis sur une cellule unitaire représentative du milieu. Par la suite, nous ne nous intéresserons qu'à cette technique de changement d'échelle.

5.2. Méthode de changement d'échelle par la prise de moyenne volumique

5.2.1. Principe

La technique de prise de moyenne volumique est une méthode permettant de dériver les équations de transport (dans l'approche du continuum) pour des systèmes multiphasiques à travers le développement d'équations macroscopiques de conservation exprimées en termes de moyennes spatiales (ou d'ensemble) des processus eux-mêmes (Whitaker, 1999). Dans ces équations moyennées, les paramètres effectifs interviennent sous la forme de coefficients dont la détermination nécessite une résolution numérique supplémentaire. Il s'agit de la résolution des problèmes de valeurs aux limites locales, appelés problèmes de fermeture (Nøttinger, 1994). Comme dans tout problème de changement d'échelle, l'utilisation de cette méthode fait intervenir la notion de séparation des échelles de longueurs caractéristiques (Figure 25).

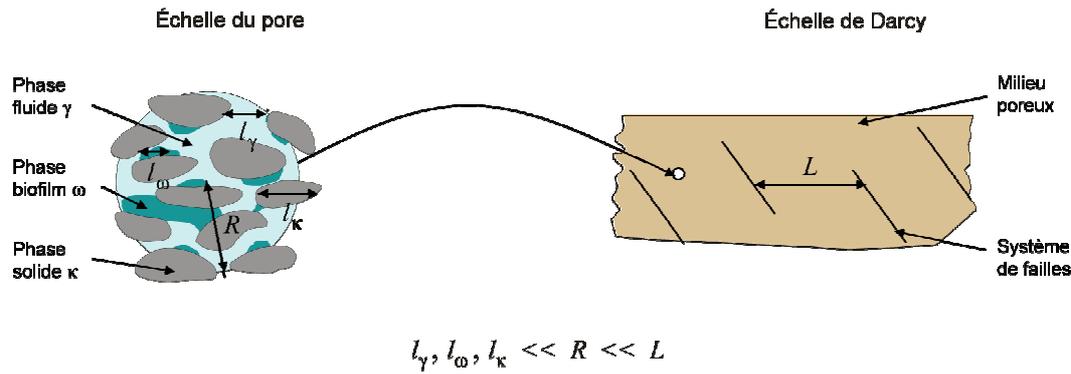


Figure 25 : Contrainte sur les longueurs caractéristiques (d'après Orgogozo, 2009).

La démarche globale peut être résumée en trois étapes : (i) le développement des équations spatialement lissées et l'inventaire des conditions de validité de ces équations, (ii) la dérivation des problèmes de fermeture nécessaires pour prédire la valeur des coefficients effectifs du transport apparaissant dans les équations de transport spatialement lissées et (iii) la comparaison entre la théorie et l'expérience (Whitaker, 1999). Cela nécessite l'utilisation des outils mathématiques largement décrits par de nombreux travaux (*e.g.* : Whitaker, 1981 ; Howes and Whitaker, 1985 ; Gray *et al.*, 1993 ; Whitaker, 1999). Il s'agit notamment de l'opérateur de prise de moyenne volumique, du théorème de prise de moyenne spatiale et du théorème général de transport.

Considérons ainsi le cas d'un soluté A transporté dans le milieu poreux décrit sur la Figure 25 et soit $c_{A\gamma}$ et $c_{A\omega}$ les concentrations à l'échelle microscopique de ce soluté dans les phases fluide et biofilm respectivement. L'opérateur de prise de moyenne volumique permet alors d'écrire :

$$\langle c_{A\gamma} \rangle = \frac{1}{V} \int_{V_\gamma} c_{A\gamma} dV \quad (15)$$

$$\langle c_{A\omega} \rangle = \frac{1}{V} \int_{V_\omega} c_{A\omega} dV \quad (16)$$

Où :

$\langle c_{A\gamma} \rangle$ et $\langle c_{A\omega} \rangle$ sont les concentrations moyennes globales dans les phases fluide et biofilm.

Ici, V représente le volume de prise de moyenne associé à l'échelle du pore, et V_ω et V_γ les sous-volumes associés à chacune des phases.

On peut introduire de manière similaire les concentrations moyennes intrinsèques $\langle c_{A\omega} \rangle^\omega$ et $\langle c_{A\gamma} \rangle^\gamma$ qui sont définies sur l'espace poral plutôt que sur le volume total du milieu poreux V . Celles-ci sont reliées aux moyennes précédentes de la manière suivante :

$$\langle c_{A\omega} \rangle = \varepsilon_\omega \langle c_{A\omega} \rangle^\omega \quad (17)$$

$$\langle c_{A\gamma} \rangle = \varepsilon_\gamma \langle c_{A\gamma} \rangle^\gamma \quad (18)$$

Où :

ε_ω et ε_γ représentent les fractions volumiques de chacune des deux phases.

L'application de l'opérateur de moyenne aux équations gouvernant le phénomène considéré à l'échelle microscopique, associée à l'utilisation de différents théorèmes régissant les relations entre l'opérateur de prise de moyenne volumique et les opérateurs classiques utilisés en physique (gradient spatial, divergence, dérivée temporelle) permet d'aboutir à l'expression générale des équations de conservation à l'échelle d'observation considérée.

À la différence des modèles empiriques classiques évoqués précédemment, les coefficients effectifs (tenseur de dispersion, coefficient effectif de réaction, coefficient de transfert de masse), qui interviennent dans les modèles issus du changement d'échelle, peuvent être déterminés à travers la résolution de problèmes de fermeture appliqués aux informations disponibles à l'échelle du pore (longueur de corrélation, géométrie du milieu, valeurs des paramètres à petite échelle). En fonction du degré de précision requis, les calculs sont effectués sur des cellules unitaires plus ou moins complexes, représentatives de la géométrie d'un milieu poreux à l'échelle microscopique (cf. Figure 26 pour un exemple de la complexité des cellules unitaires utilisées). Si les solutions numériques ont été validées jusqu'à présent en les comparant aux solutions analytiques obtenues dans des cas simplifiés (*e.g.* : Orgogozo *et al.*, 2010), leurs confrontations avec des mesures expérimentales en conditions réelles restent encore à accomplir.

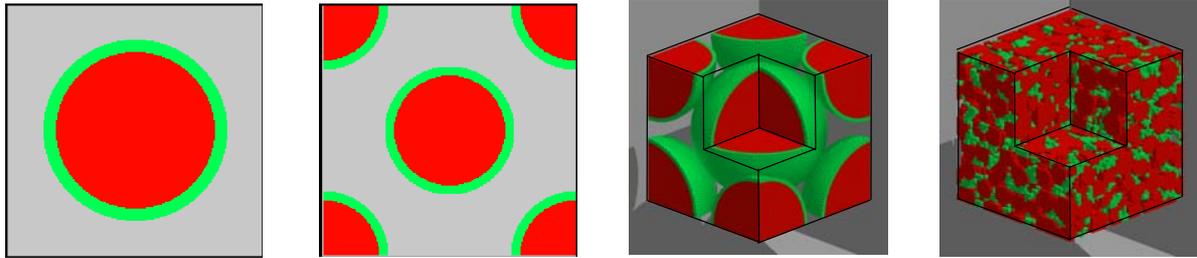


Figure 26 : Exemple de cellules unitaires (Golfier, 2011 depuis un réseau 2D à une caractérisation 3D d'un milieu réel par micro-tomographie (le biofilm est en vert, les grains sont en rouge)

5.2.2. Formulation des modèles macroscopiques issus de la méthode de prise de moyenne volumique

5.2.2.1. Etat de l'art

La méthode de prise de moyenne volumique appliquée à la modélisation du transport dans les systèmes multiphasiques tels que les milieux poreux abritant une phase biofilm a été largement étudiée ces dernières années, et ce, à différentes échelles (Dykaar et Kitandis, 1996 ; Mysliwiec *et al.*, 2001 ; Wood *et al.*, 2002 ; Charbonneau *et al.*, 2006 ; Golfier *et al.*, 2009 ; Orgogozo *et al.*, 2009 ; 2010 ; Davit *et al.*, 2010 ; Wood *et al.*, 2011 ; Aspa *et al.*, 2011 ; Golfier *et al.*, 2011). L'ensemble de ces études se décompose en deux approches : (i) l'hypothèse d'équilibre de masse local basée sur l'existence d'un état d'équilibre entre les concentrations moyennées correspondant à chaque phase et (ii) le cas, plus général, de non-équilibre local où les gradients de concentration à petite échelle ne sont plus négligeables. En conditions d'équilibre, un modèle d'équilibre de masse local ou *Local Equilibrium Assumption* (LEA) permet de décrire le transport d'espèce dans le système complexe solide-biofilm-fluide (Golfier *et al.*, 2009). C'est un modèle du type fickien, *i.e.* : à une équation, dont le domaine de validité/applicabilité reste toutefois relativement limité. Ce désavantage peut être pallié par le développement des modèles dits de non-équilibre local. Ces modèles peuvent décrire le transport en présence des deux phases avec une ou deux équations. Pour les modèles de non-équilibre à une équation, on peut citer : (i) le modèle MTLC (*Mass Transfer Limited Consumption*) - la biodégradation est limitée par le taux de transfert de masse de la phase fluide vers la phase biofilm et (ii) le modèle RRLC (*Reaction Rate Limited Consumption*) - la biodégradation est limitée par la cinétique de réaction (Orgogozo *et al.*, 2009, 2010). Pour le cas général où le transport est décrit par une équation pour chacune des phases fluide et biofilm, on parle de modèle à deux équations ou *Two Equation Model* (TEM) (Orgogozo *et al.*, soumis). Notons enfin, qu'un dernier modèle a été développé récemment par

Davit *et al.* (2010) présentant un formalisme similaire à celui du modèle d'équilibre (seule l'expression du tenseur de dispersion effective est différente), mais décrivant le comportement asymptotique du système en conditions de non équilibre local.

Par la suite, nous présenterons brièvement les modèles LEA, RRLC, MTLC et TEM en nous concentrant sur la forme générale des équations macroscopiques obtenues et leur domaine respectif de validité. Le lecteur intéressé par les développements mathématiques ayant conduit à ces formulations ainsi qu'à l'expression détaillée des problèmes de fermeture associés à ces modèles pourra se rapporter au travail de thèse de Orgogozo (2009).

Dans le cadre de notre étude, nous nous limiterons plus particulièrement aux modèles à une équation de type fickien (équilibre local ou asymptotique) et au modèle à deux équations ou double milieu en vue de comparer nos résultats expérimentaux à ces modèles numériques. Nous démarrerons cette analyse par un exposé détaillé du modèle conceptuel considéré et des hypothèses simplificatrices nécessaires à l'établissement de ces modèles numériques.

5.2.2.2. Modèle conceptuel du système fluide/biofilm et choix des hypothèses simplificatrices

La biodégradation est un processus très complexe faisant intervenir de nombreux paramètres physicochimiques (pH, température, pression, oxygène, substrat de croissance, ...) et biologiques (adhésion/détachement, métabolisme, prédation, compétition, inhibition, ...). En termes de transport, la biodégradation peut être assimilée au transport réactif d'un soluté dont les mécanismes microscopiques ont des répercussions macroscopiques importantes. Cela rend la modélisation du processus difficile si bien que des hypothèses simplificatrices sont nécessaires. Nous résumons ici les principales hypothèses adoptées par Golfier *et al.* (2009) et Orgogozo (2009) :

- 1- À l'échelle du pore ne sont considérés que les phénomènes de convection et de diffusion dans la phase fluide, et les phénomènes de diffusion et de réaction de biodégradation dans la phase biofilm ;
- 2- La phase solide est supposée passive vis-à-vis du transport du soluté ;
- 3- Le biofilm est assimilé à une phase continue localement homogène, bien qu'en réalité celui-ci soit un système multiphasique complexe (cellule bactériennes, substances polymériques extracellulaires, porosité, ...)

- 4- La macroporosité du biofilm peut être assimilée à la phase fluide environnante (pas de transport convectif dans le biofilm – cf. Aspa *et al.*, (2011) pour la prise en compte d'un tel mécanisme) ;
- 5- Les bactéries sont supposées présentes uniquement sous forme de biofilm, *i.e.* : il n'y a pas de bactéries mobiles et donc pas de réaction dans la phase fluide ;
- 6- La cinétique de biodégradation est fortement simplifiée ; les effets complexes qui peuvent être associés au métabolisme bactérien tel que les effets d'inhibition ne sont ainsi pas pris en compte. Le modèle réactif considéré se limite à un seul substrat (à la fois source de carbone et d'énergie) noté *A* et un seul accepteur d'électron (tel que l'oxygène) noté *B*. Une cinétique de Michaelis-Menten à deux substrats a ainsi été adoptée pour décrire le métabolisme bactérien, soit :

$$R_{A\omega} = \mu_{A\omega} \rho_{\omega} \frac{C_{A\omega}}{C_{A\omega} + K_{A\omega}} \frac{C_{B\omega}}{C_{B\omega} + K_{B\omega}} \quad (19)$$

où $\mu_{A\omega}$, ρ_{ω} , $K_{i\omega}$, représentent respectivement la vitesse de réaction, la densité bactérienne ainsi que la constante de demi-saturation, avec $i = A$ ou B ;

- 7- Les interactions chimiques entre les solutés *A* (*e.g.* : le substrat) et *B* (*e.g.* : le dioxygène ou le nitrate) et les autres espèces chimiques présentes en solution sont supposées négligeables ;
- 8- L'étude se place aussi dans des conditions d'un milieu saturé, alors que dans le cas d'une biodégradation aérobie, la disponibilité maximale de l'oxygène est localisée dans la zone non saturée où le taux de biodégradation est maximal ;
- 9- L'hypothèse sur la séparation des temps caractéristiques des différents processus mis en jeu est adoptée. Ainsi, la croissance du biofilm est supposée très lente par rapport à l'établissement du régime stationnaire de transport ;
- 10- L'écoulement, régi par la loi de Stokes, est considéré en régime stationnaire (très faible temps de relaxation du champ de pression) ;

Nous présenterons dans la section suivante le développement des modèles de transport basés sur ces hypothèses simplificatrices.

5.2.3. Modèles simplifiés de transport

5.2.3.1. Modèle d'équilibre de masse local (LEA)

L'hypothèse de base du modèle LEA est qu'un équilibre de masse local est établi entre les phases fluide et biofilm, *i.e.* : la réaction est suffisamment lente comparée à la diffusion et le contraste de diffusivité entre les deux phases est assez faible (Golfier *et al.*, 2009). En d'autres termes, il n'y a pas de gradients de concentration à l'échelle microscopique entre les deux phases.

Après résolution des problèmes de fermeture, l'équation macroscopique résultante pour le transport du soluté A au sein du milieu est donnée par :

$$\begin{aligned} \frac{\partial}{\partial t} (\varepsilon_\gamma + \varepsilon_\omega) \langle c_{A\gamma} \rangle^\gamma &= -\nabla \cdot (\varepsilon_\gamma \langle \mathbf{v}_\gamma \rangle^\gamma \langle c_{A\gamma} \rangle^\gamma) + \nabla \cdot (\mathbf{D}_{A,LEA}^* \cdot \nabla \langle c_{A\gamma} \rangle^\gamma) \\ &- \varepsilon_\omega \mu_{A\omega} \rho_\omega \frac{\langle c_{A\gamma} \rangle^\gamma}{\langle c_{A\gamma} \rangle^\gamma + K_{A\omega}} \frac{\langle c_{B\gamma} \rangle^\gamma}{\langle c_{B\gamma} \rangle^\gamma + K_{B\omega}}. \end{aligned} \quad (20)$$

Où :

$\mathbf{D}_{A,LEA}^*$ est le tenseur de dispersion effectif pour le modèle LEA.

Bien que le formalisme de ce modèle soit simple, il nécessite toutefois des hypothèses de validité contraignantes. Les travaux de Golfier *et al.* (2009) ont montré que le modèle LEA reste valide en général pour des faibles valeurs du nombre de Péclet ($Pe_A < 1$) et du nombre de Damköhler ($Da_A < 1$).

Comme les systèmes biologiques sont plutôt soumis à des effets de non-équilibre, le modèle LEA est souvent non-applicable. En fait, dans ces systèmes, la consommation microbienne des substances chimiques peut créer un non-équilibre si le taux de réaction est assez rapide par rapport aux vitesses de transport diffusif et convectif de masse, ce qui conduit à l'apparition des gradients de concentration (Dykaar et Kitandis, 1996).

5.2.3.2. Modèle de biodégradation limitée par la cinétique de réaction (Reaction Rate Limited Consumption - RRLC)

Si la réaction chimique est limitée par la cinétique ce qui entraîne, au sein de la phase γ , des gradients relativement faibles (gradient de concentration diffus ou *shallow mass transfer gradient*, selon la terminologie de Rittmann et McCarty (1980)), le processus de prise de moyenne volumique peut conduire à un modèle macroscopique de transport hors équilibre à une équation. Ceci revient à considérer que la déviation en concentration $\tilde{c}_{A\gamma} = c_{A\gamma} - \langle c_{A\gamma} \rangle^\gamma$ est négligeable par rapport à la concentration moyenne intrinsèque dans la phase γ . Autrement dit, nous avons $\langle c_{A\gamma} \rangle^\gamma \gg \tilde{c}_{A\gamma}$ et la condition limite à l'interface $A_{\gamma\omega}$ peut alors être réécrite sous la forme :

$$c_{A\omega} = c_{A\gamma} \approx \langle c_{A\gamma} \rangle^\gamma \quad (21)$$

Ce type de modèle hors équilibre à une équation qui est couramment employé en génie des procédés (voir par exemple une introduction générale sur cette approche dans Fogler, 1999) est basé sur l'introduction d'un facteur d'efficacité permettant de relier le taux réel de réaction (généralement difficile à mesurer) au sein du biofilm avec la concentration macroscopique dans la phase fluide. En d'autres termes, nous cherchons à réécrire la formulation de la réaction de Monod sous la forme :

$$\varepsilon_\omega \mu_{A\omega} \rho_\omega \frac{\langle c_{A\omega} \rangle^\omega}{\langle c_{A\omega} \rangle^\omega + K_{A\omega}} \frac{\langle c_{B\omega} \rangle^\omega}{\langle c_{B\omega} \rangle^\omega + K_{B\omega}} = \eta \varepsilon_\omega \mu_{A\omega} \rho_\omega \frac{\langle c_{A\gamma} \rangle^\gamma}{\langle c_{A\gamma} \rangle^\gamma + K_{A\omega}} \frac{\langle c_{B\gamma} \rangle^\gamma}{\langle c_{B\gamma} \rangle^\gamma + K_{B\omega}} \quad (22)$$

Où η est le facteur d'efficacité de la réaction.

Ce développement mathématique, obtenu par l'utilisation de la méthode de prise de moyenne volumique, conduit finalement à l'expression suivante :

$$\begin{aligned}
\underbrace{\frac{\partial (\varepsilon_\gamma \langle c_{A\gamma} \rangle^\gamma)}{\partial t}}_{\text{Accumulation}} + \underbrace{\nabla \cdot (\varepsilon_\gamma \langle \mathbf{v}_\gamma \rangle^\gamma \langle c_{A\gamma} \rangle^\gamma)}_{\text{Convection}} &= \underbrace{\nabla \cdot (\mathbf{D}_{A, RRLC}^* \cdot \nabla \langle c_{A\gamma} \rangle^\gamma)}_{\text{Dispersion}} \\
- \underbrace{\eta \varepsilon_\omega \mu_{A\omega} \rho_\omega \frac{\langle c_{A\gamma} \rangle^\gamma}{\langle c_{A\gamma} \rangle^\gamma + K_{A\omega}} \frac{\langle c_{B\gamma} \rangle^\gamma}{\langle c_{B\gamma} \rangle^\gamma + K_{B\omega}}}_{\text{Flux interfacial}} &
\end{aligned} \tag{23}$$

Où $\mathbf{D}_{A, RRLC}^*$ est le tenseur de dispersion effectif pour le modèle RRLC.

5.2.3.3. Modèle de biodégradation limitée par le transfert de masse ou Mass Transfer Limited Consumption (MTLC)

Si la réaction de biodégradation est limitée par le transfert de masse externe, un modèle de transfert de masse limitant peut être développé. Sous cette hypothèse, la concentration de substrat à l'interface fluide/biofilm $A_{\gamma\omega}$ est pratiquement négligeable et nous avons :

$$c_{A\gamma} = c_{A\omega} = 0, \text{ sur } A_{\gamma\omega} \tag{24}$$

La concentration de soluté est alors définie uniquement dans la phase fluide ce qui conduit, après changement d'échelle, au modèle suivant :

$$\begin{aligned}
\frac{\partial (\varepsilon_\gamma \langle c_{A\gamma} \rangle^\gamma)}{\partial t} + \nabla \cdot (\varepsilon_\gamma \langle \mathbf{v}_\gamma \rangle^\gamma \langle c_{A\gamma} \rangle^\gamma) &= \\
\nabla \cdot (\mathbf{D}_{A, MTLC}^* \cdot \nabla \langle c_{A\gamma} \rangle^\gamma) - \alpha \langle c_{A\gamma} \rangle^\gamma + \nabla \cdot (\mathbf{d}_\gamma^* \langle c_{A\gamma} \rangle^\gamma) + (\mathbf{u}_\gamma^* - \mathbf{D}_{A\gamma} \nabla \varepsilon_\gamma) \cdot \nabla \langle c_{A\gamma} \rangle^\gamma &
\end{aligned} \tag{25}$$

Où α représente le coefficient de transfert de masse, $\mathbf{D}_{A, MTLC}^*$ le tenseur de dispersion pour le modèle MTLC et \mathbf{d}_γ^* , \mathbf{u}_γ^* des termes non-classiques de convection.

Nous pouvons constater que ce modèle introduit la notion de coefficient d'échange entre les deux phases (on ne considère les interactions entre les deux phases qu'à travers l'estimation du flux de soluté à l'interface biofilm-fluide). Ce coefficient noté α correspond à une approximation au premier ordre des phénomènes transitoires de transfert de masse dans le système. Ce coefficient d'échange doit être déterminé lors de la résolution de l'équation pour le calcul des coefficients effectifs de l'équation macroscopique de transport.

5.2.3.4. Modèle à deux équations (TEM)

Enfin, afin de décrire correctement le transport d'espèces au sein du système dans le cas le plus général, un modèle à deux équations ou modèle à double porosité a été proposé. Ce modèle implique l'utilisation d'une équation de conservation de masse par phase. L'échange de masse entre les deux régions est contrôlé par un processus diffusif décrit par une cinétique du premier ordre. Le transport dispersif et convectif intervient ainsi dans la région la plus perméable, *i.e.* : la phase fluide. Au sein du biofilm, l'eau est supposée immobile et les échanges se font uniquement par diffusion. Notons que ce type de modèle, similaire dans l'esprit aux modèles « mobile-immobile » classiquement employés pour décrire les comportements non-fickiens en milieux hétérogènes (*e.g.* : Coats et Smith, 1964 ; Brusseau *et al.*, 1989 ; Ahmadi *et al.*, 1998), a rarement été appliqué aux systèmes biologiques (*e.g.* : Baveye et Valocchi, 1989 ; Seifert et Engesgaard, 2007 ; Chatelier, 2010) et du moins, jamais à partir d'une procédure rigoureuse de changement d'échelle. Les équations afférentes à ce modèle sont :

Pour la phase biofilm (phase ω) :

$$\begin{aligned} \varepsilon_{\omega} \frac{\partial \langle c_{A\omega} \rangle^{\omega}}{\partial t} + \varepsilon_{\omega} \mu_{A\omega} \rho_{\omega} c_{B\omega}^* \frac{\langle c_{A\omega} \rangle^{\omega}}{\langle c_{A\omega} \rangle^{\omega} + K_{A\omega}} &= \nabla \cdot (\mathbf{D}_{A\omega\omega}^* \cdot \nabla \langle c_{A\omega} \rangle^{\omega}) - \alpha_A^* (\langle c_{A\omega} \rangle^{\omega} - \langle c_{A\gamma} \rangle^{\gamma}) \\ &+ \nabla \cdot (\mathbf{D}_{A\omega\gamma}^* \cdot \nabla \langle c_{A\gamma} \rangle^{\gamma}) + \nabla \cdot (\mathbf{d}_{A\omega}^* (\langle c_{A\omega} \rangle^{\omega} - \langle c_{A\gamma} \rangle^{\gamma})) \\ &+ \mathbf{u}_{A\omega}^* \cdot \nabla \langle c_{A\omega} \rangle^{\omega} - (\mathbf{u}_{A\gamma}^* + \mathbf{D}_{A\gamma} \nabla \varepsilon_{\gamma}) \cdot \nabla \langle c_{A\gamma} \rangle^{\gamma} \end{aligned} \quad (26)$$

Pour la phase fluide (phase γ) :

$$\begin{aligned}
\varepsilon_\gamma \frac{\partial \langle c_{A\gamma} \rangle^\gamma}{\partial t} + \nabla \cdot (\varepsilon_\gamma \langle \mathbf{v}_\gamma \rangle^\gamma \langle c_{A\gamma} \rangle^\gamma) &= \nabla \cdot (\mathbf{D}_{A\gamma\gamma}^* \cdot \nabla \langle c_{A\gamma} \rangle^\gamma) + \alpha_A^* (\langle c_{A\omega} \rangle^\omega - \langle c_{A\gamma} \rangle^\gamma) \\
&+ \nabla \cdot (\mathbf{D}_{A\gamma\omega}^* \cdot \nabla \langle c_{A\omega} \rangle^\omega) + \nabla \cdot (\mathbf{d}_{A\gamma}^* (\langle c_{A\omega} \rangle^\omega - \langle c_{A\gamma} \rangle^\gamma)) \\
&+ \mathbf{u}_{A\gamma}^* \cdot \nabla \langle c_{A\gamma} \rangle^\gamma - (\mathbf{u}_{A\omega}^* + \nabla \varepsilon_\omega \cdot \mathbf{D}_{A\omega}^*) \cdot \nabla \langle c_{A\omega} \rangle^\omega
\end{aligned} \tag{27}$$

Où :

$\mathbf{D}_{A\gamma\gamma}^*$, $\mathbf{D}_{A\gamma\omega}^*$, $\mathbf{D}_{A\omega\gamma}^*$ et $\mathbf{D}_{A\omega\omega}^*$ représentent les tenseurs de dispersion effectifs associés aux concentrations $\langle c_{A\gamma} \rangle^\gamma$ et $\langle c_{A\omega} \rangle^\omega$ dans les phases γ et ω ;

α_A^* est le coefficient d'échange entre les phases γ et ω ;

$\mathbf{d}_{A\gamma}^*$, $\mathbf{u}_{A\gamma}^*$, $\mathbf{d}_{A\omega}^*$, $\mathbf{u}_{A\omega}^*$ sont des termes convectifs non classiques.

Afin de simplifier l'écriture du problème, la concentration en accepteur d'électrons B est supposée ici en excès de sorte que la partie du terme de Monod dépendant de $c_{B\omega}$ est assimilée à une constante notée $c_{B\omega}^*$.

Le modèle double-milieu, qui peut être vu comme une formulation généralisée des précédents développements (LEA, RRLC et MTLC) étend considérablement leur domaine de validité mais au prix, bien entendu, d'une complexité supérieure (nombre significatif de coefficients effectifs à caler ou à déterminer, difficultés à les mesurer expérimentalement). Dans le cas où les termes additionnels (tenseurs de dispersion croisés $\mathbf{D}_{A\gamma\omega}^*$ et $\mathbf{D}_{A\omega\gamma}^*$, termes convectifs $\mathbf{d}_{A\gamma}^*$, $\mathbf{u}_{A\gamma}^*$, $\mathbf{d}_{A\omega}^*$, $\mathbf{u}_{A\omega}^*$) peuvent être négligés, on retrouve une formulation plus classique, similaire à celle utilisée dans les modèles « *mobile-mobile* » :

Pour la phase biofilm (phase ω) :

$$\varepsilon_{\omega} \frac{\partial \langle c_{A\omega} \rangle^{\omega}}{\partial t} + \varepsilon_{\omega} \mu_{A\omega} \rho_{\omega} c_{B\omega}^* \frac{\langle c_{A\omega} \rangle^{\omega}}{\langle c_{A\omega} \rangle^{\omega} + K_{A\omega}} = \nabla \cdot (\mathbf{D}_{A\omega\omega}^* \cdot \nabla \langle c_{A\omega} \rangle^{\omega}) - \alpha_A^* (\langle c_{A\omega} \rangle^{\omega} - \langle c_{A\gamma} \rangle^{\gamma}) \quad (28)$$

Pour la phase fluide (phase γ) :

$$\varepsilon_{\gamma} \frac{\partial \langle c_{A\gamma} \rangle^{\gamma}}{\partial t} + \nabla \cdot (\varepsilon_{\gamma} \langle \mathbf{v}_{\gamma} \rangle^{\gamma} \langle c_{A\gamma} \rangle^{\gamma}) = \nabla \cdot (\mathbf{D}_{A\gamma\gamma}^* \cdot \nabla \langle c_{A\gamma} \rangle^{\gamma}) + \alpha_A^* (\langle c_{A\omega} \rangle^{\omega} - \langle c_{A\gamma} \rangle^{\gamma}) \quad (29)$$

La capacité de ce modèle à décrire le comportement d'un soluté biodégradé sur une large gamme de conditions hydrodynamiques et biochimiques est illustrée sur la Figure 27 (Orgogozo *et al.*, soumis) :

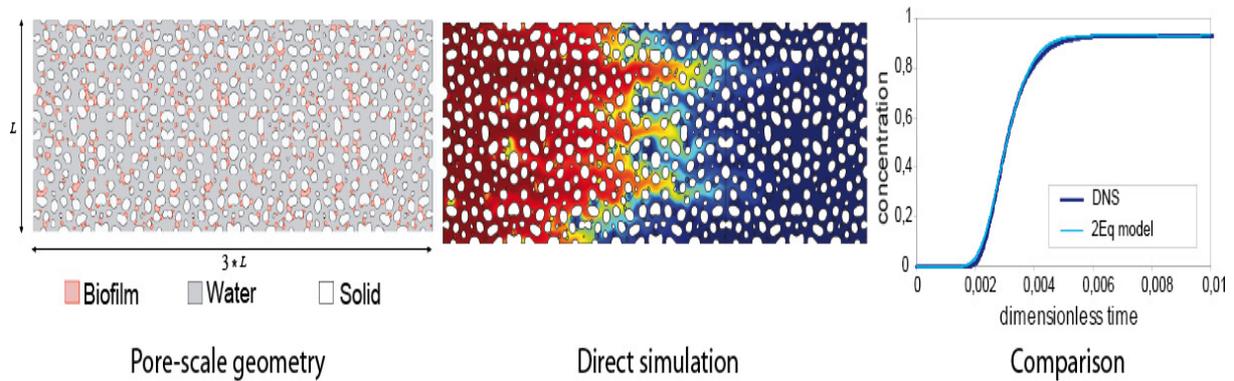


Figure 27 : Comparaison entre simulations numériques directes (DNS) et modèle à 2 équations pour Péclet = 100 et Damköhler = 10 sur un milieu poreux 2D complexe (Orgogozo *et al.*, soumis).

Les études théoriques et numériques que nous venons de décrire constituent une réelle avancée dans la prédiction des mécanismes de bioremédiation et de biotransformation de la pollution dissoute dans le sol. Cependant, leur application sur site pilote (voire sur site industriel) doit nécessairement passer par une validation expérimentale en laboratoire. La suite de ce chapitre donnera un aperçu de nos investigations sur ce sujet.

5.3. Comparaison entre résultats numériques et résultats expérimentaux

5.3.1. Démarche de modélisation

Dans le chapitre IV, nous avons présenté les résultats de notre étude expérimentale et nous venons de décrire différents modèles numériques issus du changement d'échelle par prise de moyenne volumique. L'objectif affiché, maintenant, est de comparer les résultats expérimentaux aux solutions numériques.

Comme les essais expérimentaux de traçage étaient conservatifs — l'Erioglaurine n'étant pas biodégradable par *Shewanella oneidensis* MR-1— nous ne considérerons pour nos simulations que les modèles LEA (modèle d'équilibre de masse locale) et TEM (modèle à deux équations) décrits respectivement par l'Eq. (20) et les Eqs. (28)-(29). Ainsi, pour chaque courbe de percée (mesurée au centre et en sortie du domaine), le modèle LEA (modèle fickien) est d'abord utilisé pour simuler les résultats expérimentaux. Lorsque ce modèle ne reproduit pas les résultats expérimentaux de manière satisfaisante, le modèle TEM est testé. A l'issue des deux comparaisons, le régime de transport est déterminé par le modèle présentant le meilleur résultat. Les simulations ont été menées avec le code commercial COMSOL MULTIPHYSICS®. Le domaine d'étude considéré, les conditions aux limites ainsi que la détermination des valeurs des paramètres nécessaires pour mener à bien cette comparaison sont décrites dans les sections suivantes.

5.3.1.1. Domaine d'étude

Sur la base des profils expérimentaux (courbes de percée moyennées par sections perpendiculaires à la direction principale de l'écoulement) qui ont fait l'objet du Chapitre IV, le domaine d'étude a été assimilé à une colonne monodimensionnelle de longueur $L = 7.10^{-1}$ m (longueur définie après rognage – cf. Figure 28).

Notons qu'aucune comparaison n'a été effectuée dans les sections proches de la section d'injection. En fait, comme nous avons pu le constater lors de l'interprétation des résultats expérimentaux, les courbes de percée dans le premier tiers du milieu poreux présentent des incohérences/artéfacts (colmatage, répartition hétérogène du biofilm, calibration déficiente, ...). Pour ces différentes raisons, nous avons limité notre comparaison à deux sections d'observation : la première, localisée au centre de la zone d'intérêt (*i.e.* : la zone obtenue après rognage des images brutes), et la seconde en sortie de colonne (Figure 28).

Comme l'injection se fait sur toute la section du milieu poreux, l'écoulement est supposé monodimensionnel.

Comme précédemment, les simulations sont réalisées pour trois stades de maturation du biofilm : milieu initial non colonisé, après 17 jours et après 29 jours. Deux vitesses d'injection sont aussi considérées : $v = 2,22 \pm 0,13 \cdot 10^{-5}$ m/s et $v = 1,33 \pm 0,02 \cdot 10^{-4}$ m/s.

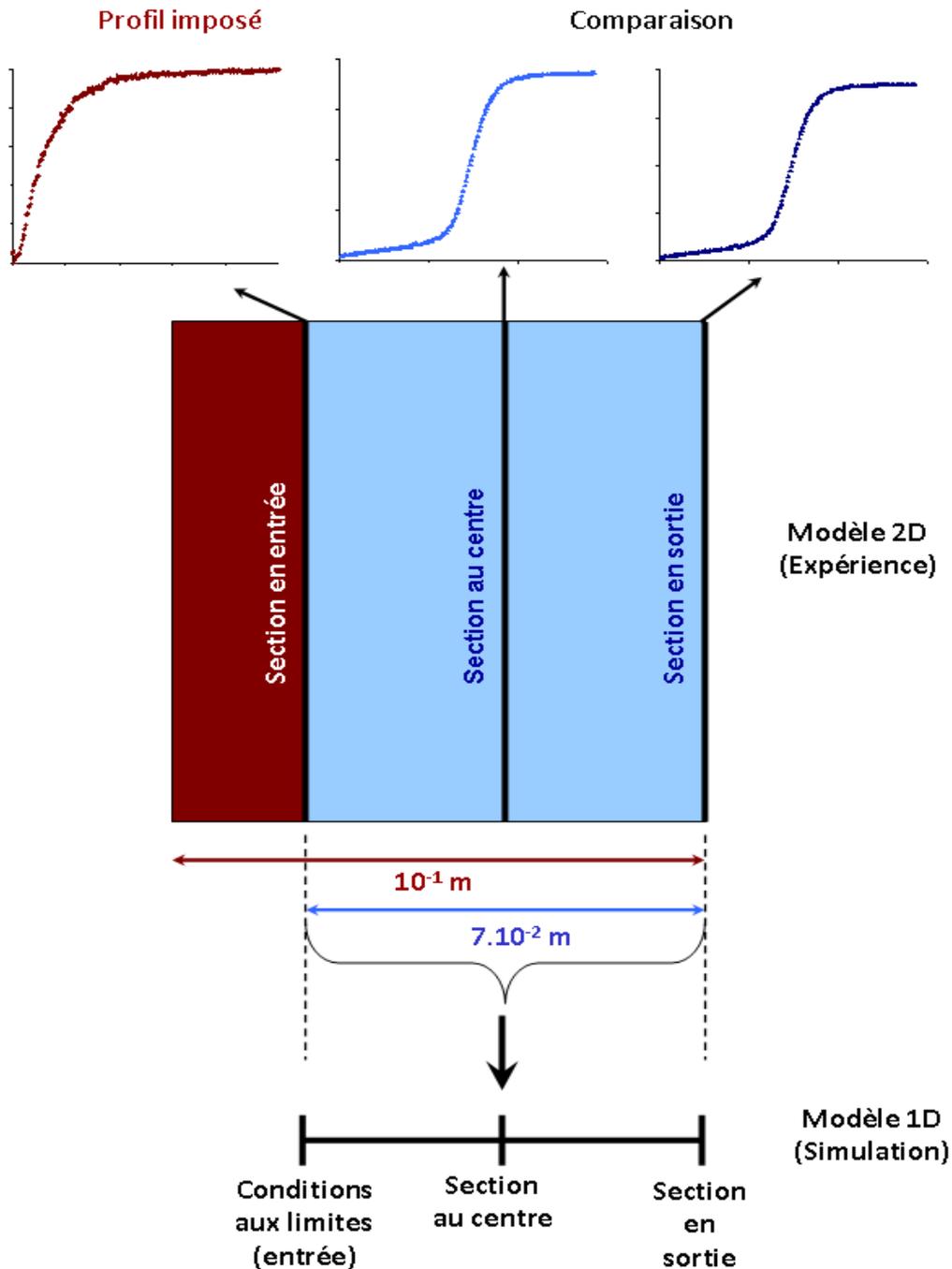


Figure 28 : Domaine d'étude 1D et section d'observation.

Afin de caractériser plus précisément les régimes hydrodynamiques associés à ces vitesses, nous définirons les valeurs du nombre adimensionnel de Péclet de pore associées à ces différentes simulations tel que :

$$Pe = \frac{\langle \mathbf{v}_\gamma \rangle^\gamma l_\gamma}{D_{A,mol}} \quad (30)$$

Où :

$\langle \mathbf{v}_\gamma \rangle^\gamma$ est la vitesse moyenne de pore ;

l_γ représente la longueur caractéristique de la phase (ici le diamètre moyen des grains - $l_\gamma = 2,97 \cdot 10^{-4} \text{ m}$) ;

$D_{A,mol}$ est le coefficient de diffusion moléculaire de l'Erioglaurine ($D_{A,mol} = 0,6 \cdot 10^{-9} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$).

Bien que les débits d'injection soient conservés identiques aux différentes stades de croissance du biofilm, il faut préciser que les valeurs du nombre de Péclet de pore seront évidemment distinctes. En fait, la variation du nombre de Péclet est due à la variation de la vitesse interstitielle $\langle \mathbf{v}_\gamma \rangle^\gamma$ qui diminue au fur et à mesure du développement de colmatage. Les différentes valeurs calculées pour Pe (Eq. 30) sont données dans le tableau ci-dessous :

Tableau 4 : Valeurs du nombre de Péclet de pore associées aux différentes simulations.

	Injection 1 $v = 2,22 \pm 0,13 \cdot 10^{-5} \text{ m/s}$	Injection 2 $v = 1,33 \pm 0,02 \cdot 10^{-4} \text{ m/s}$
Milieu initial	26	165
Milieu après 17 jours	40	213
Milieu après 29 jours	51	316

Les conditions initiales et aux limites sont détaillées dans la suite.

5.3.1.2. Conditions aux limites

Le champ de vitesses unidirectionnel, tout d'abord, est considéré connu. Les injections étant réalisées à débit constant, la vitesse de filtration est supposée constante sur l'ensemble du domaine et pendant tout l'essai de traçage (les fluctuations de débit de la pompe sont négligées). Quant au transport, il est régi par les conditions aux limites suivantes (données ici pour le modèle LEA mais des conditions similaires sont utilisées pour le modèle TEM) :

- La concentration est imposée à l'entrée : $\langle c_{Ay} \rangle^y = C_0(t)$;
- Le flux dispersif en sortie est nul : $D_{A,LEA}^* \nabla \langle c_{Ay} \rangle^y \cdot \mathbf{n} = 0$;

Notons que la condition limite imposée en entrée correspond ici à une condition de Dirichlet non homogène en temps. La concentration injectée ne respectant pas un signal de type échelon et afin de s'affranchir des difficultés rencontrées sur les premiers centimètres de la zone d'étude (effet de rampe, biais de mesure lié à la calibration), nous avons introduit une pseudo-condition limite situé à $1,9 \cdot 10^{-2}$ m de l'entrée de la cellule expérimentale. Cette condition limite en entrée, correspondant à un profil de concentration variable en temps $C_0(t)$, a été mesurée expérimentalement sur la section d'observation correspondante. Le profil expérimental ainsi mesuré a ensuite été imposé au niveau de notre simulation sous la forme d'une fonction linéaire continue par morceaux. La condition limite en entrée utilisé pour l'essai de traçage à 29 jours et pour $v = 1,33 \cdot 10^{-4}$ m/s est présenté à titre d'exemple sur la Figure 29.

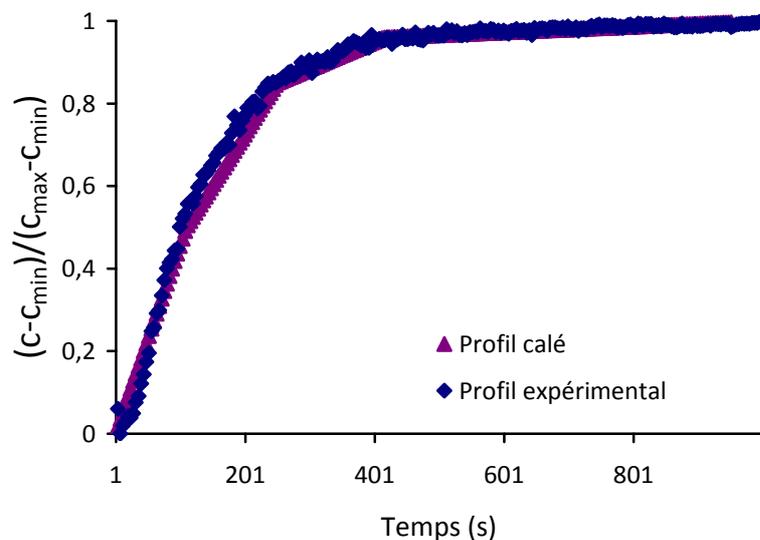


Figure 29 : Condition limite en entrée pour l'essai de traçage à 29 jours ($v = 1,33 \cdot 10^{-4}$ m/s).

5.3.1.3. Données d'entrée des modèles

Il est important tout d'abord de souligner que les vitesses d'injection et la porosité totale (ou les fractions volumiques de fluide et de biofilm dans le cas du modèle TEM) utilisées dans nos simulations **sont tirés directement des données expérimentales et n'ont donc pas subi de calage**. Les valeurs des données du modèle sont listées dans le tableau 5 (les fractions volumiques de chacune des phases ne sont précisées que lorsque le modèle à 2 équations a été requis).

Tableau 5 : Valeurs des données d'entrée des modèles.

	Péclet de pore	Vitesse d'injection (m/s)	Porosité totale ε	Fraction fluide ε_γ	Fraction biofilm ε_ω
Milieu avant inoculation	26 165	$2,16 \cdot 10^{-5}$ $1,25 \cdot 10^{-4}$	0,40 0,40		
Biofilm à 17 jours	40 213	$2,35 \cdot 10^{-5}$ $1,35 \cdot 10^{-4}$	0,40 0,40	0,29 0,29	0,11 0,11
Biofilm à 29 jours	51 316	$2,18 \cdot 10^{-5}$ $1,32 \cdot 10^{-4}$	0,40 0,40		

Notons que les fractions volumiques de fluide et de biofilm ont été fixées spatialement constantes sur les 0,07 m de longueur du domaine, en accord avec les mesures au Bleu Dextran.

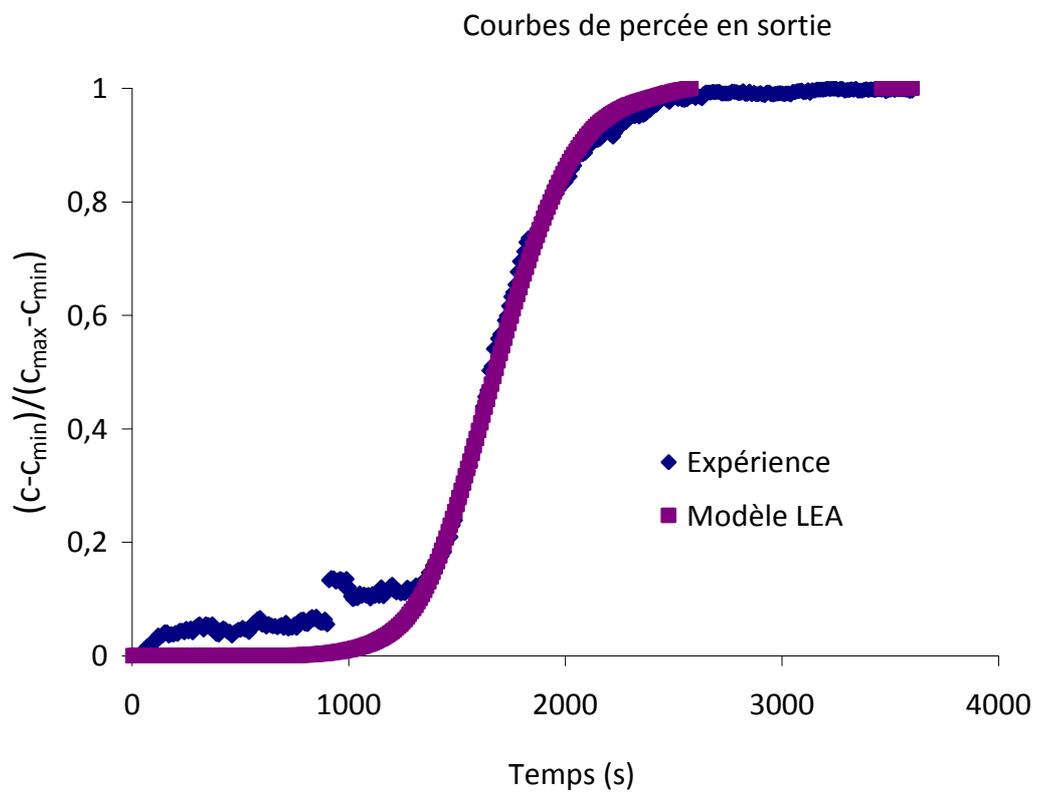
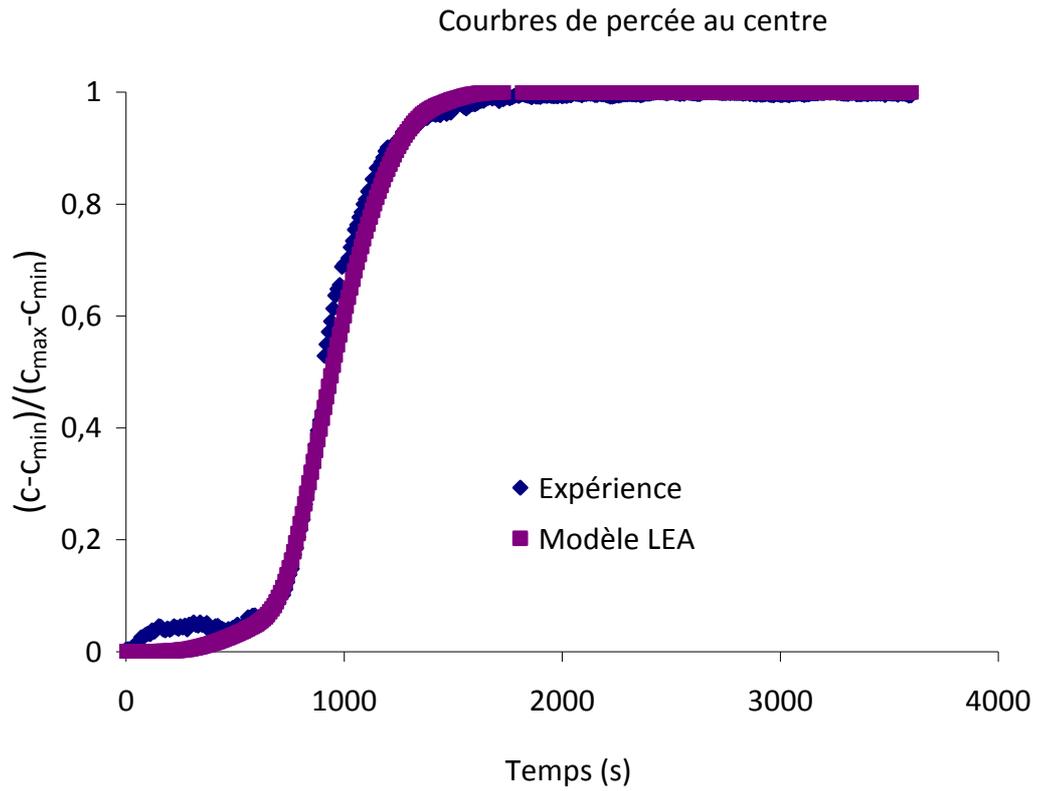
Les paramètres restant à définir sont les coefficients effectifs des deux modèles, soit le coefficient de dispersion longitudinal $D_{A,LEA}^*$ pour le modèle LEA et le coefficient de dispersion longitudinal dans la phase fluide $D_{A\gamma\gamma}^*$ ainsi que le coefficient de transfert de masse α_A^* pour le modèle TEM. Pour ce dernier, la valeur du coefficient de dispersion longitudinale dans la phase biofilm $D_{A\omega\omega}^*$ a été conservée constante et égale au coefficient de diffusion intrinsèque du traceur (Erioglaurine) dans le fluide, *i.e.* : $D_{A\gamma\gamma}^* = D_{A,mol} = 0,6 \cdot 10^{-9} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$. En effet, les simulations réalisées ont montré une faible influence de ce paramètre sur la courbe de percée résultante. Pour chacun des deux modèles, les coefficients effectifs listés ci-dessus ont été déterminés de deux manières différentes :

- Soit par calage direct des paramètres macroscopiques en cherchant à obtenir le meilleur accord entre les courbes d'éluion numérique et expérimentale.
- Soit de manière théorique, à partir des problèmes de fermeture associés aux deux modèles de transport. Les coefficients effectifs sont alors calculés sur une géométrie à l'échelle du pore, représentative *a priori* du milieu poreux réel.

Les résultats des comparaisons issues du calage sont présentés dans les sections suivantes. Nous commencerons par étudier le comportement du milieu avant l'inoculation des bactéries.

5.3.2. Comportement hydrodynamique en condition abiotique

Avant d'étudier l'influence de la croissance du biofilm sur le régime de transport, les premières simulations ont été menées en l'absence du biofilm. Leur rôle consistait à valider les simulations sous COMSOL et déterminer plus précisément les paramètres hydrodynamiques initiaux du système. Les courbes de percée du traceur pour les deux sections d'observation et pour les deux régimes hydrodynamiques, $v = 2,22 \cdot 10^{-5}$ m/s et $v = 1,33 \cdot 10^{-4}$ m/s, respectivement sont présentées sur la Figure 30.



(a) Courbes de percée à $Pe = 26$

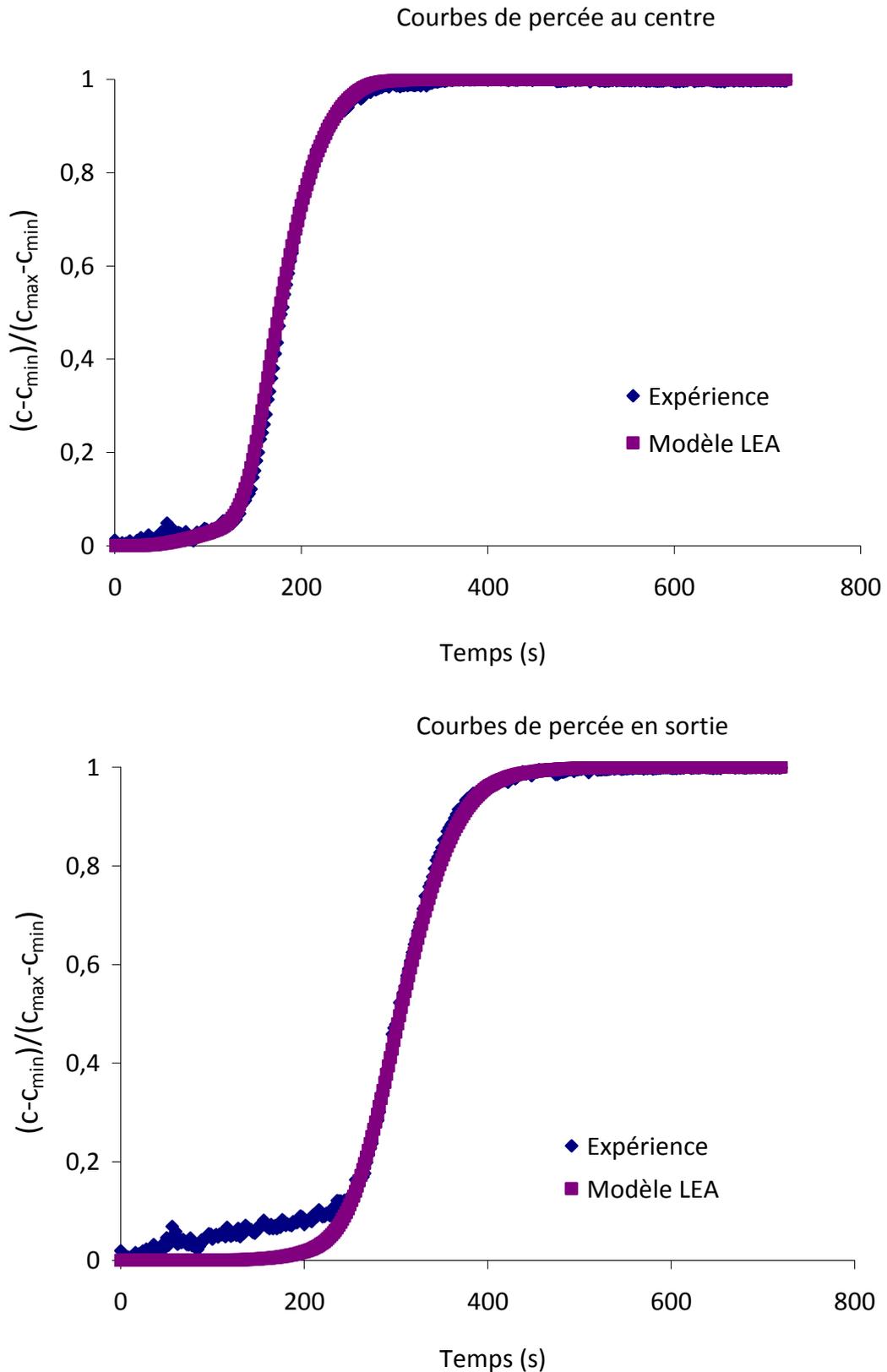
(b) Courbes de percée à $Pe=165$

Figure 30 : Comparaison entre expérience et simulation en l'absence de biofilm.

Avant inoculation, le milieu poreux étant bien homogène, nous constatons qu'une équation de convection-dispersion classique capture parfaitement le comportement expérimental observé. Toutefois, on peut toujours noter un « artefact » expérimental aux temps courts, plus évident au niveau de la section de sortie, qui n'est pas reproduit par les simulations. Ce comportement que nous jugeons « anormal » de la courbe de percée expérimental n'a été que partiellement pris en compte au niveau du modèle au travers de l'introduction d'une condition en entrée d'injection progressive de concentration. Un biais au niveau de la calibration aux faibles valeurs de concentration pourrait expliquer ce comportement.

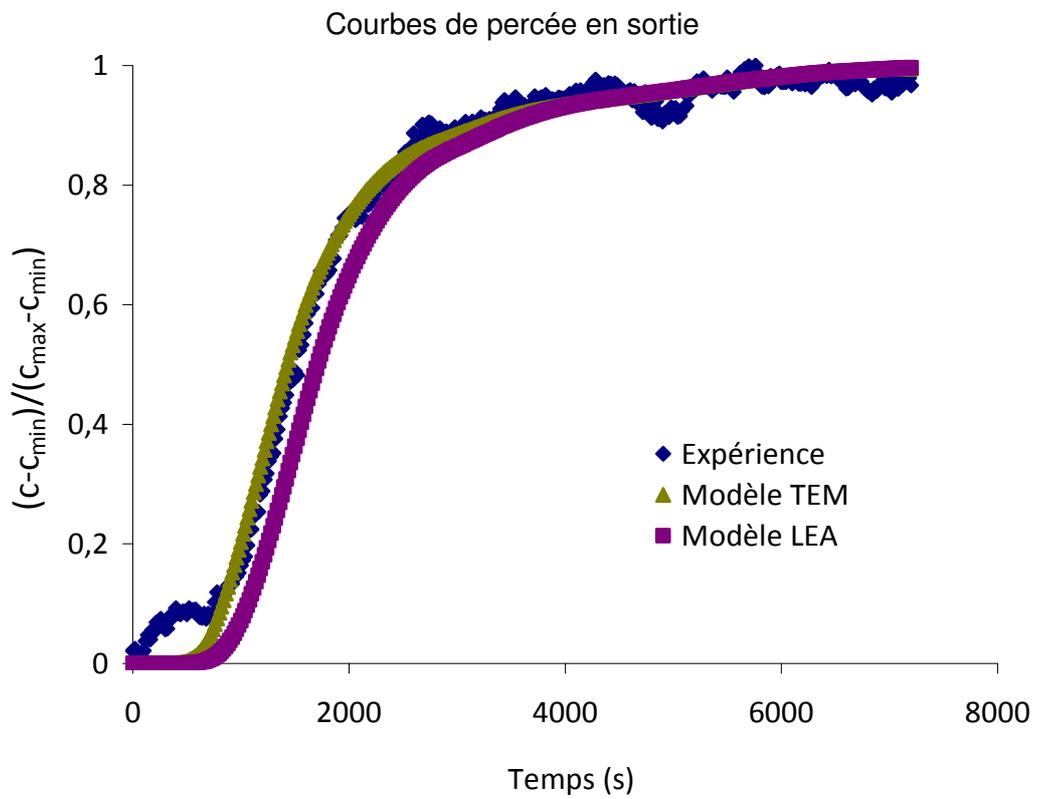
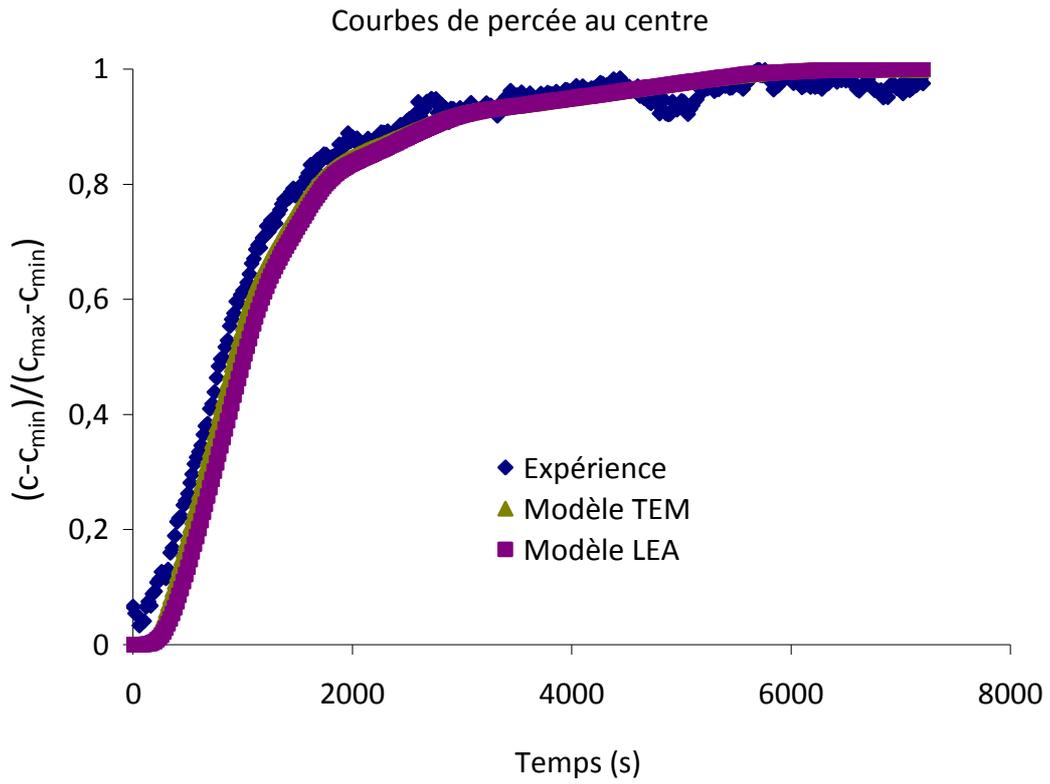
Comme nous l'avons déjà évoqué dans le Chapitre IV, ces résultats confirment aussi *a posteriori* la détermination correcte de la porosité initiale du système qui a été prise égale à 0,4 sur tout le domaine. Les valeurs calées du coefficient longitudinal de dispersion sont aussi plus faibles que celles directement obtenus par la méthode des moments des courbes expérimentales dans le Chapitre IV ($2.10^{-8} \text{ m}^2.\text{s}^{-1}$ et $1.10^{-7} \text{ m}^2.\text{s}^{-1}$ au lieu de $4,04.10^{-7} \text{ m}^2.\text{s}^{-1}$ et $2,02.10^{-6} \text{ m}^2.\text{s}^{-1}$ pour $Pe = 26$ et 165 , respectivement).

Il faut cependant noter que, pour l'essai de traçage à haut Péclet ($Pe = 165$) la vitesse d'injection a du être légèrement modifiée afin de capturer le déplacement du front de concentration. Cette variation reste toutefois faible ($v = 1,25.10^{-4} \text{ m.s}^{-1}$ au lieu de $v = 1,33 \pm 0,02.10^{-4} \text{ m.s}^{-1}$) et s'inscrit dans l'erreur générée par les fluctuations du débit d'injection (5 à 6 %).

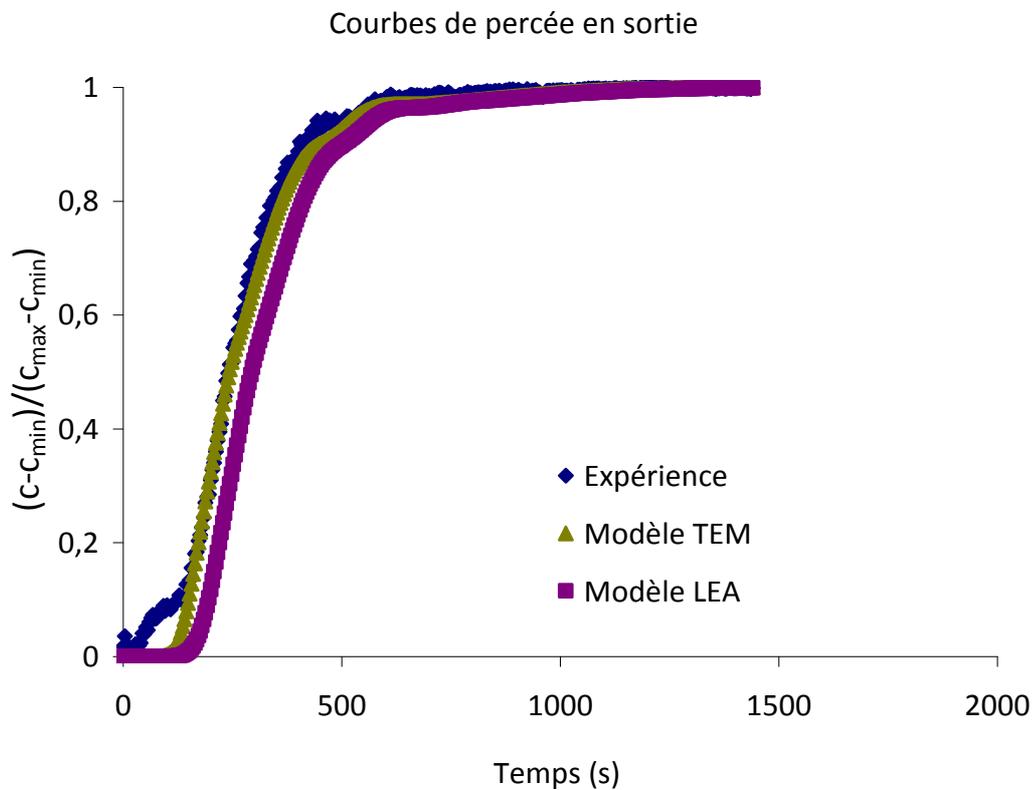
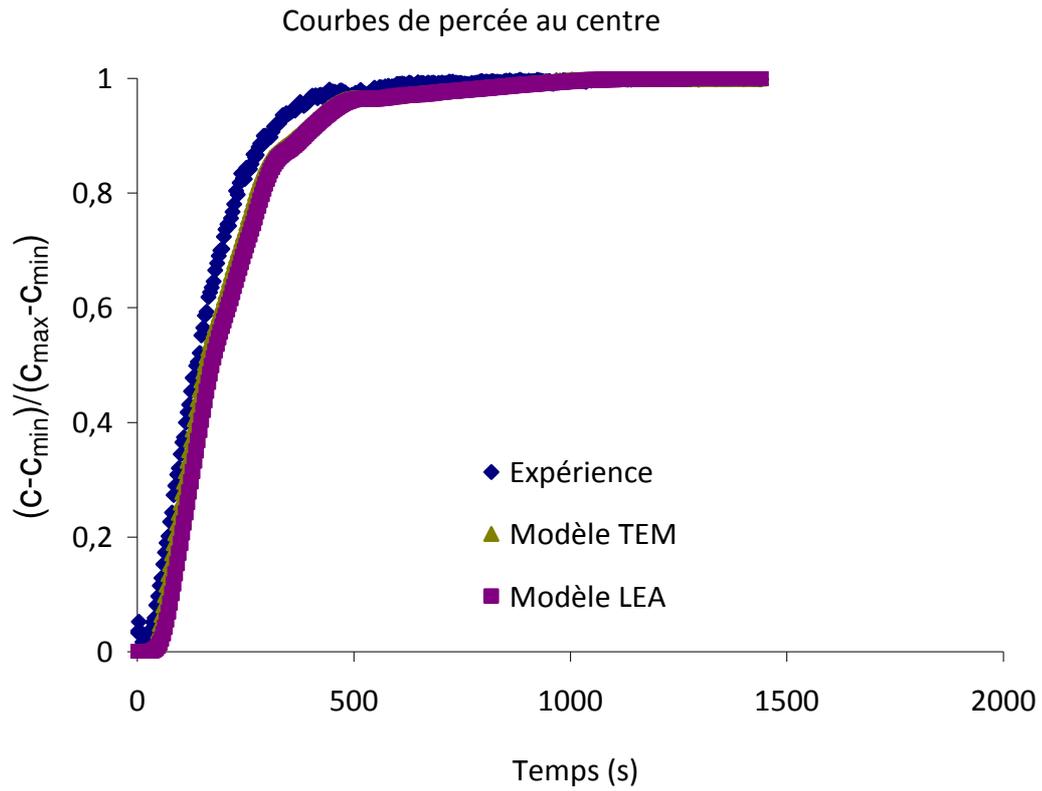
5.3.3. Comportement hydrodynamique en condition biotique

5.3.3.1. En présence du biofilm de 17 jours

La Figure 31 illustre la comparaison des courbes de percées expérimentales et prédites par le modèle TEM, aux deux vitesses d'écoulement, en présence du biofilm à 17 jours. Un modèle fickien classique n'a en effet pas suffi à reproduire la vitesse de propagation du front comme nous pouvons le voir Figure 31. Cette arrivée prématurée de la concentration est caractéristique d'un comportement non fickien (*e.g.* : Golfier *et al.*, 2007).



(a) Courbes de percée à $Pe = 40$



(b) Courbes de percée à $Pe = 213$

Figure 31 : Comparaison entre expérience et simulation en présence du biofilm de 17 jours.

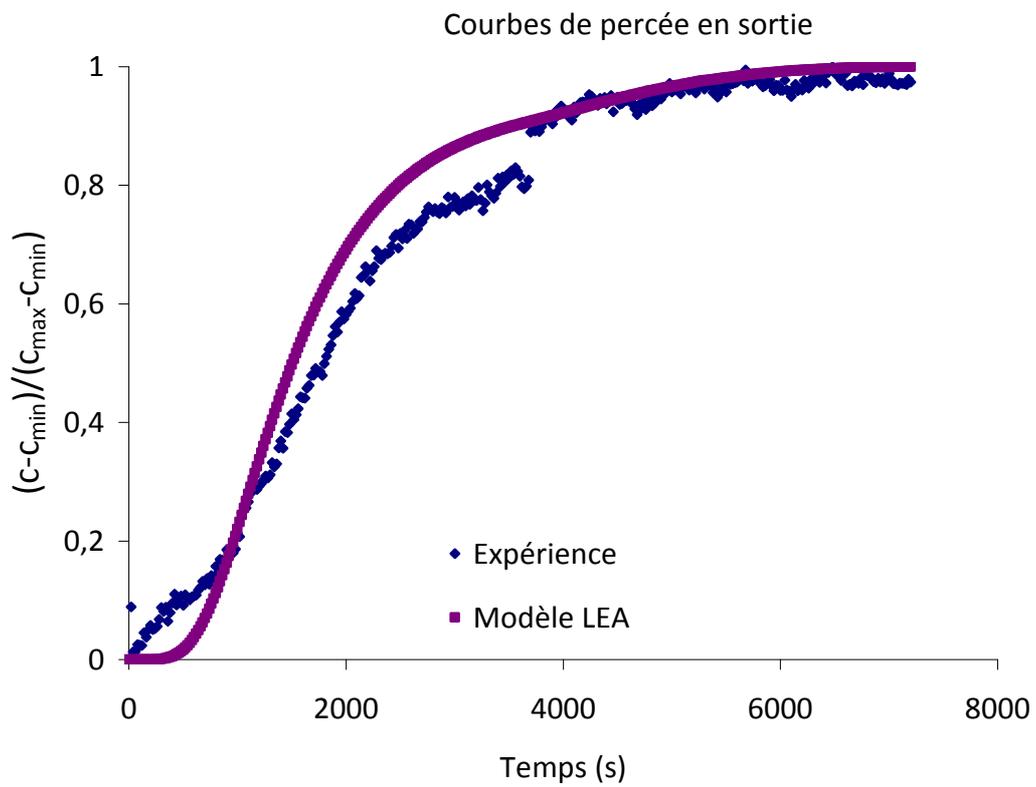
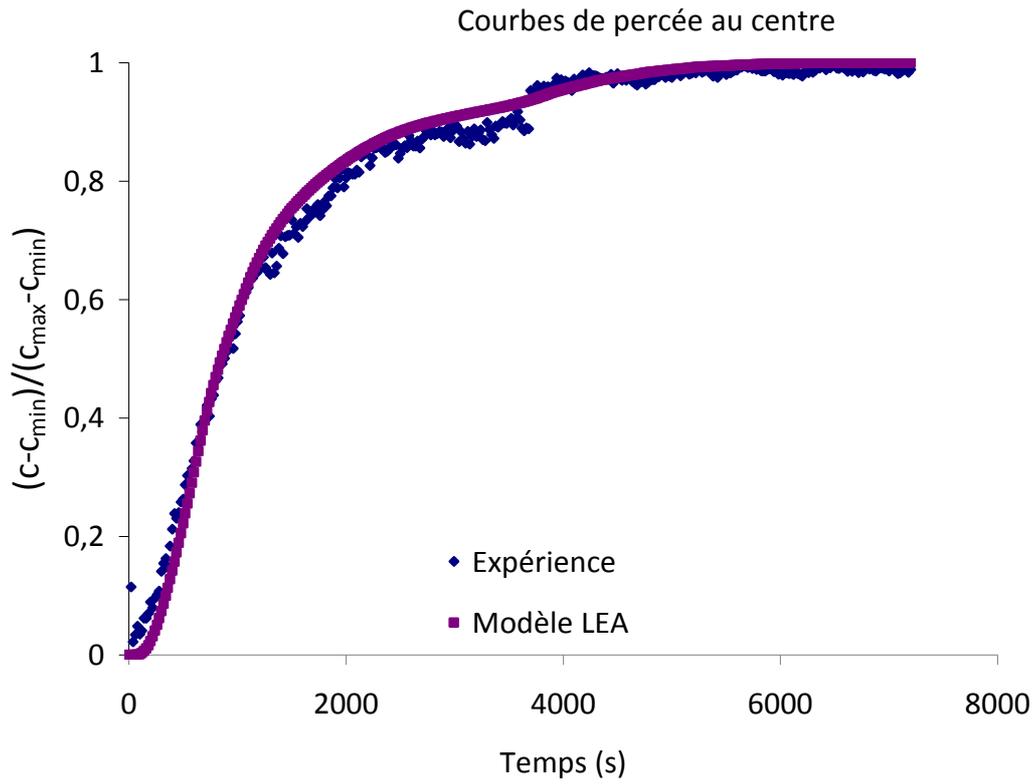
Un comportement similaire avait été observé par Seymour *et al.* (2004) qui avaient constaté par Résonance Magnétique Nucléaire (RMN) l'apparition de dispersion anormale due à l'activité biologique et avaient utilisé des équations fractionnaires de convection-diffusion pour caractériser ce phénomène. Une observation analogue avait aussi été établie par Chatelier (2010) qui avait dû utiliser un modèle à 2 équations pour simuler le comportement d'un pilote de dénitrification *in situ*.

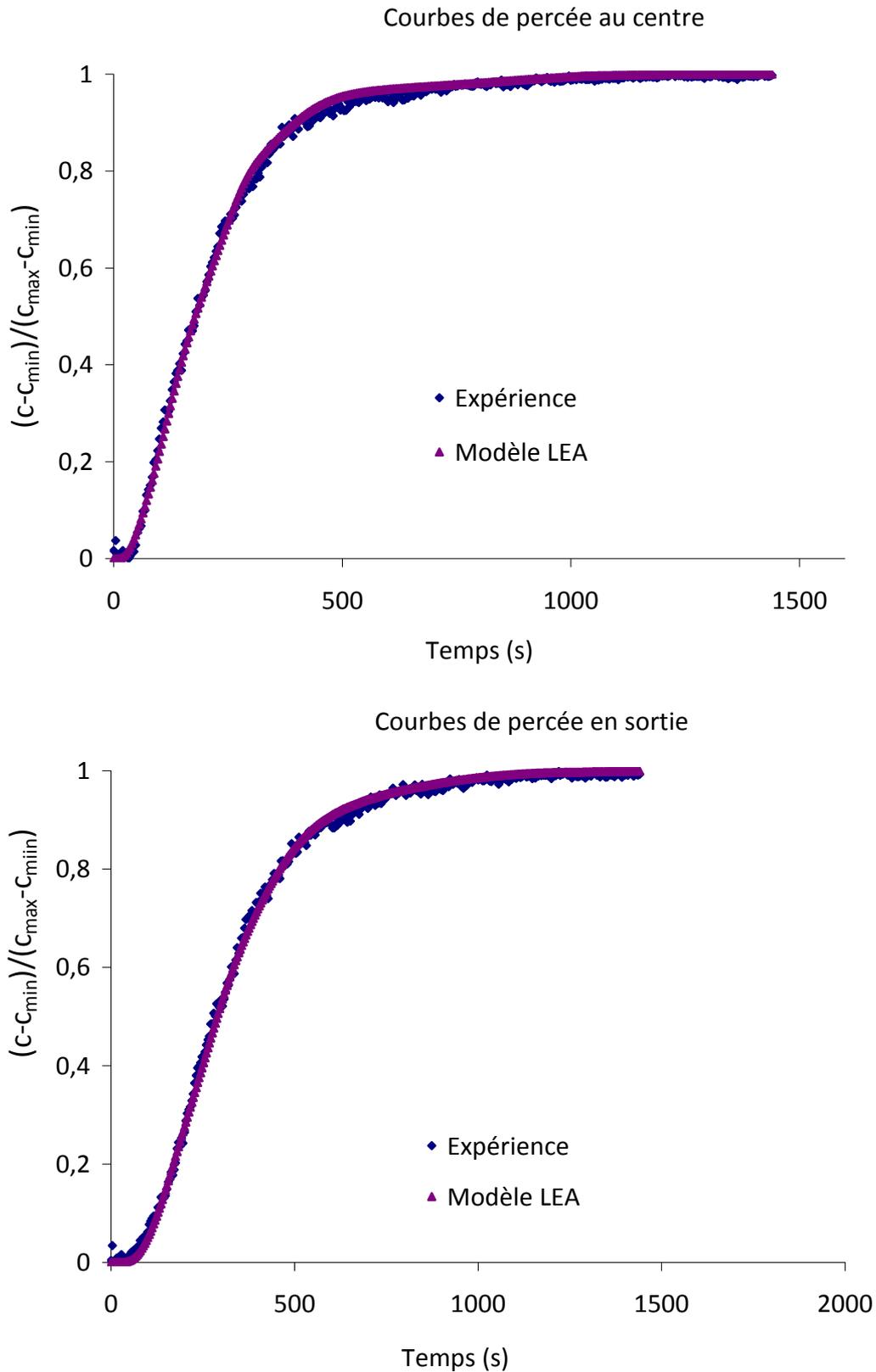
Il est remarquable en revanche de constater ici à quel point le modèle à double porosité suit la vitesse d'avancement de la courbe d'élution expérimentale. Cette remarque est à nuancer au niveau de la section médiane (en particulier pour $Pe = 213$) mais ceci est lié au choix initial de fixer une valeur de biovolume constante sur tout le domaine (une variation de 0.1 entre l'amont et l'aval, cohérente avec les mesures expérimentales, permettrait de corriger ce retard). Ce bon accord souligne la détermination précise des fractions volumiques au travers de la méthode au Bleu Dextran, qui contrôlent cette vitesse de front. Toutefois, on ne note pas un significatif effet de trainée comme l'indique les faibles valeurs du coefficient de transfert de masse (inférieures à 10^{-6} s^{-1}).

La nécessité d'un modèle double milieu confirme aussi les observations expérimentales sur les fortes hétérogénéités de développement du biofilm dans la cellule après 17 jours de croissance. Bien que la biomasse n'occupe que 11% du volume total du milieu, elle est répartie de manière suffisamment hétérogène pour générer des effets de « non-équilibre » qui viennent perturber le comportement hydrodynamique du milieu. Le transport préférentiel se produit dans les macropores (la phase fluide) avec des interactions avec les agrégats microbiens qui contribuent à la propagation du soluté dans les conditions de non équilibre local.

5.3.3.2. En présence du biofilm de 29 jours

Enfin, la comparaison entre résultats numériques et expérimentaux pour les courbes de percée du traceur en présence du biofilm de 29 jours est représentée sur la Figure 32.

(a) Courbes de percée à $Pe = 51$



(b) Courbes de percée à $Pe = 316$

Figure 32 : Comparaison entre expérience et simulation en présence du biofilm de 29 jours.

Nous retrouvons ici un comportement de transport globalement fickien. La courbe de percée simulée ne reproduit pas très bien le comportement au niveau de la section de sortie à $Pe = 51$. Toutefois, le saut brutal de concentration autour de 3800 s laisse suggérer une modification durant l'essai des conditions expérimentales (e.g., modification du débit, décolmatage..), non prise en compte dans le modèle, ce qui pourrait expliquer ce comportement.

Il est surprenant au premier abord de constater, que la porosité totale participe ici à l'écoulement alors que la biomasse occupe un volume poral plus important qu'à 17 jours. En fait, ces résultats confirment l'observation expérimentale concernant la distribution spatiale quasi-homogène du biofilm après 29 jours de culture. La biomasse a continué à croître mais est répartie de manière plus uniforme. En revanche, la dispersion a aussi augmenté comme une interprétation plus quantitative le confirmera dans la section suivante.

5.3.4. Evaluation de la dispersion en fonction du biovolume et de la vitesse d'injection

Nous avons représenté sur la Figure 33 l'évolution des coefficients de dispersion longitudinal obtenus par calage manuel en fonction de la fraction volumique et ce, pour les deux vitesses d'injection. Une comparaison avec les dispersions obtenues précédemment directement à partir des mesures expérimentales (cf. Chapitre IV) met en évidence une surestimation des résultats par la méthode des moments ce qui confirme la nécessité de passer par une étape de modélisation.

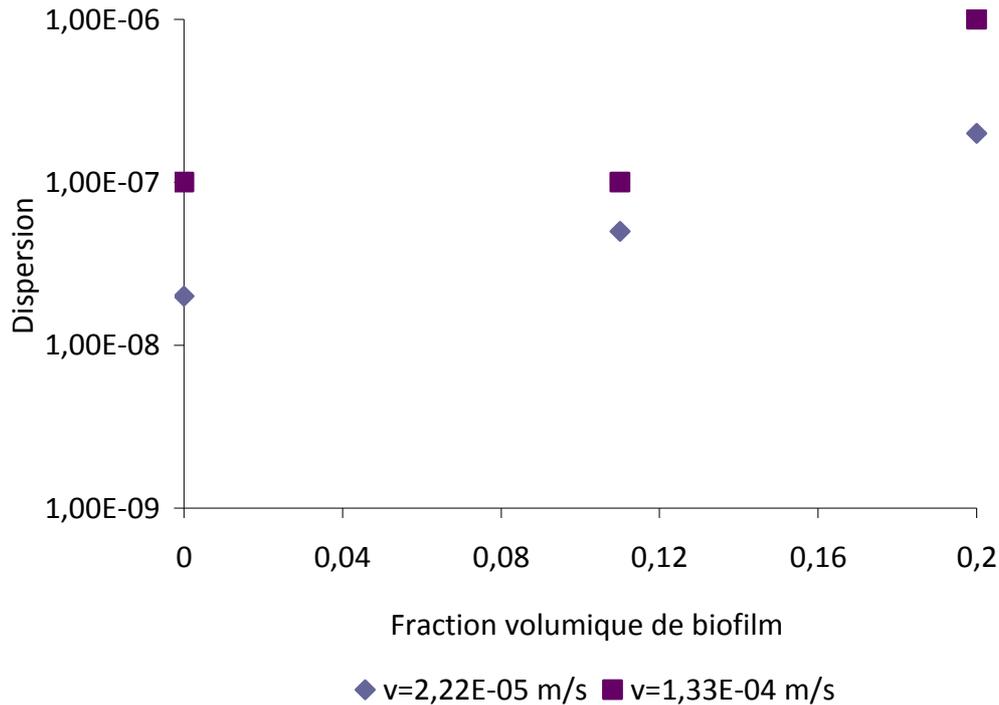


Figure 33 : Influence de la croissance du biofilm sur la dispersion hydrodynamique.

Nous observons tout d'abord de manière classique une augmentation de la dispersion avec la vitesse, à fraction volumique de biofilm constante. Nous constatons d'autre part, une augmentation de la dispersion en fonction du biovolume présent, pour une vitesse donnée. En se développant sur les grains du milieu poreux, la formation de biofilm conduit à un épaissement local des grains et par là même, un accroissement de la tortuosité du milieu et de son hétérogénéité, ce qui à l'échelle macroscopique se traduit par une augmentation de la dispersion. L'augmentation observée est significative et correspond à un ordre de grandeur environ. Un calcul des dispersivités conduit à des variations similaires avec un accroissement de $8 \cdot 10^{-4}$ m à $8,5 \cdot 10^{-3}$ m environ sur 29 jours. Ces résultats sont en parfait accord avec les données issues de la Littérature. Sharp *et al.* (1999) ont constaté des augmentations de dispersivités de 35-288% dues à la formation de biofilm de *Pseudomonas aeruginosa* sur des billes de verre. Bielefeldt *et al.* (2002) ont noté le même comportement pour le développement de biofilm multi-espèces sur du sable de quartz avec des augmentations allant là aussi jusqu'à un ordre de grandeur. Seul Taylor et Jaffe (1990b) ont observé sur des colonnes de sable des variations plus importantes de l'ordre 100 à 1000 fois la valeur initiale.

5.3.5. Comparaison avec les solutions théoriques issues du changement d'échelle

Nous avons déterminé dans une deuxième approche les valeurs des coefficients effectifs directement prédits par la méthode de prise de moyenne volumique, *i.e.* : en utilisant les calculs théoriques développés par Golfier *et al.* (2009) et Orogogozo (2009). Nous nous sommes limités ici au calcul des coefficients de dispersion longitudinale prédits par le modèle LEA dans le but de les comparer aux valeurs obtenues par calage.

Afin de résoudre le problème de fermeture qui gouverne ce paramètre, il a été nécessaire de construire une cellule unitaire représentative de la géométrie du milieu à l'échelle granulaire.

L'échantillon considéré correspond à une cellule périodique de $297 \times 297 \times 389 \mu\text{m}^3$ dont les caractéristiques géométriques sont rassemblées dans le Tableau 6.

Tableau 6. Caractéristiques géométriques des cellules unitaires

	Rayon grain 1 (μm)	Rayon grain 2 (μm)	Epaisseur biofilm 1 (μm)	Epaisseur biofilm 2 (μm)	Porosité équivalente
Milieu avant inoculation	149	119	0	0	0,40
Biofilm à 17 jours	149	119	9	6	0,29
Biofilm à 29 jours	149	119	15	12	0,20

En absence de données supplémentaires sur la répartition des grains au sein de la colonne, nous avons considéré un treillis de sphères assemblé selon un réseau centré tétragonal. Deux tailles de grains ont été prises en compte, de rayon respectif 119 et 149 microns (la sphère la plus petite est située au centre de la cellule), afin de représenter la distribution granulométrique des grains de quartz constituant le milieu, soit 210-297 microns de diamètre. Ne disposant que d'une information moyennée sur la biomasse présente, nous avons aussi supposé une distribution uniforme de la biomasse sur les grains. La cellule unitaire correspondant au développement de notre milieu après 17 jours est illustrée à titre d'exemple sur la Figure 34.

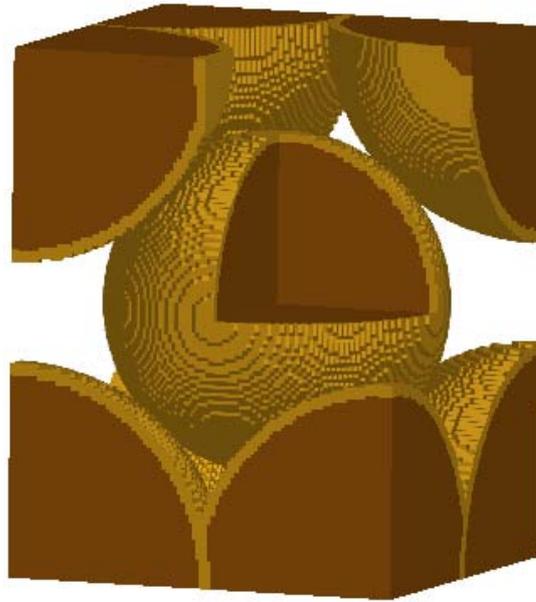


Figure 34 : Image tridimensionnelle du réseau de billes (représentées en marron) et de la biomasse qui les recouvre (en jaune) à l'échelle du pore après 17 jours de culture.

Les calculs ont été effectués à partir des codes développés dans la thèse de Orgogozo (2009). Nous renvoyons le lecteur à ce travail pour des informations complémentaires sur le détail du problème mathématique ainsi que sur les méthodes mathématiques employées pour le résoudre. Le maillage retenu est de $200 \times 200 \times 262$. Les résultats obtenus sont illustrés sur la Figure 35.

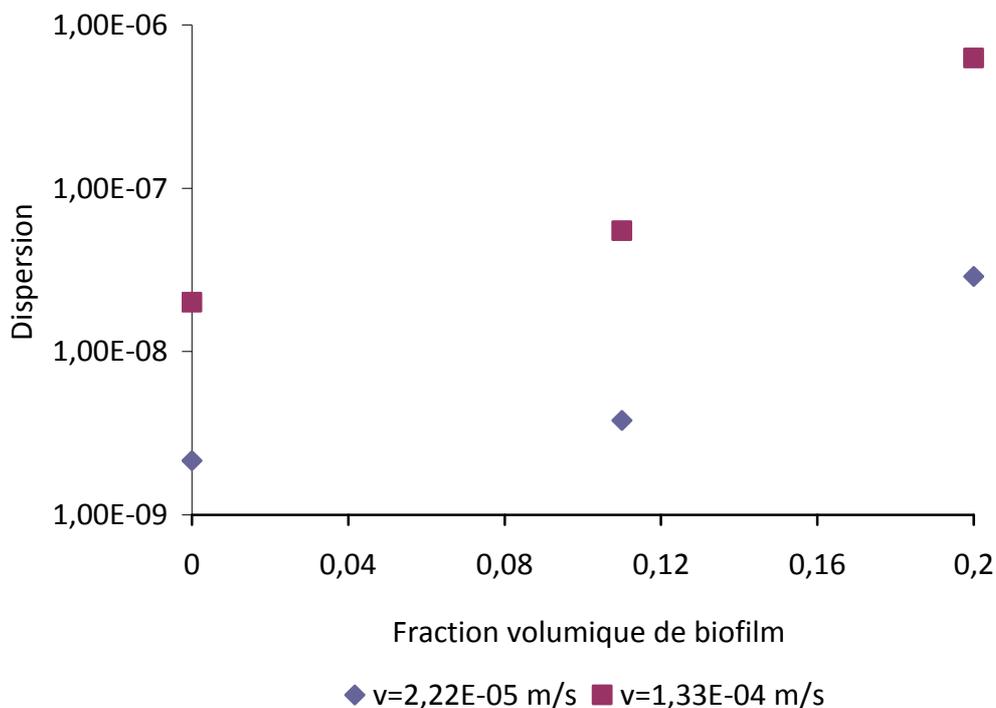


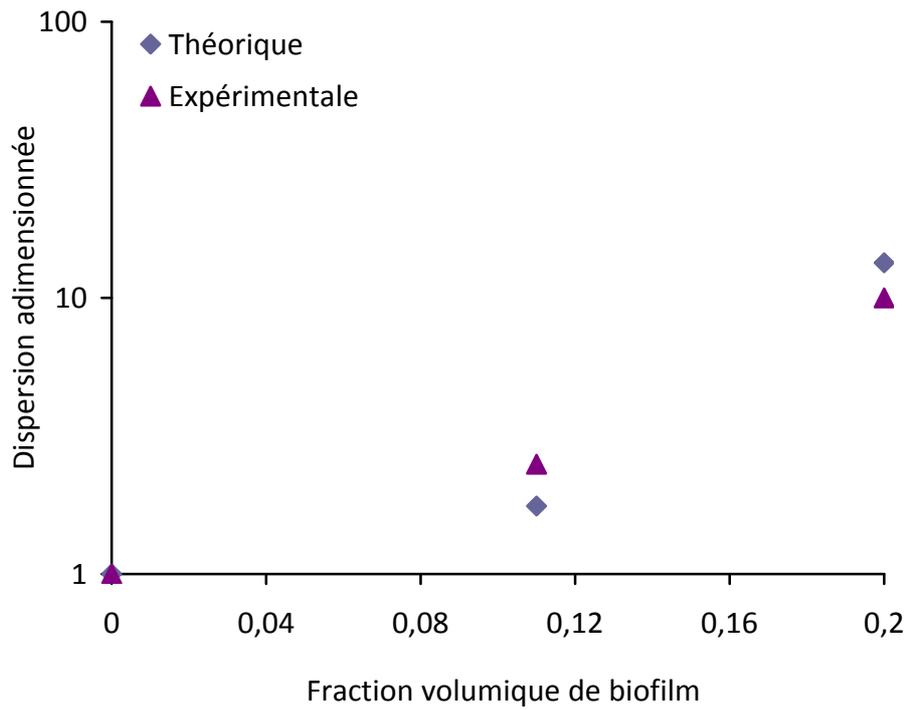
Figure 35 : Influence de la croissance du biofilm sur la dispersion hydrodynamique (solution théorique).

Nous constatons tout d'abord que la théorie reproduit parfaitement bien le comportement attendu avec une augmentation de la dispersion fonction à la fois de la vitesse et du biovolume présent. D'un point de vue quantitatif, néanmoins, il y a globalement un écart d'un facteur 10 environ entre les valeurs théoriques et les valeurs « expérimentales » dès l'estimation du milieu poreux initial (pour une valeur de Péclet de 26, nous obtenons avant inoculation une dispersion théorique de $2.10^{-9} \text{ m}^2.\text{s}^{-1}$ au lieu de $2.10^{-8} \text{ m}^2.\text{s}^{-1}$ environ). Cet écart est tout à fait logique compte tenu de l'absence d'informations complémentaires sur la microstructure du milieu.

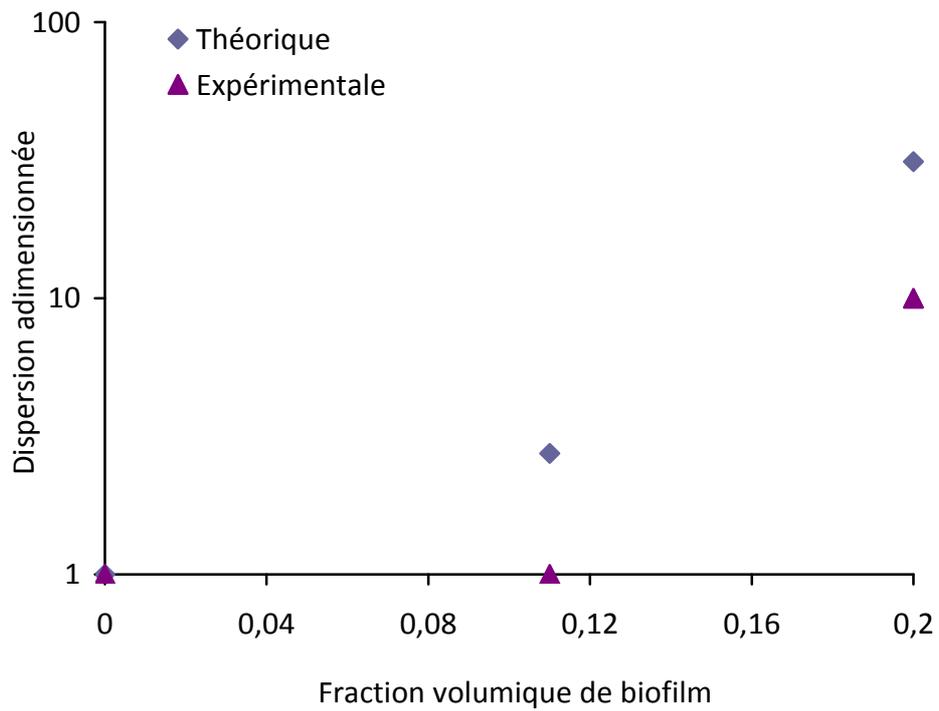
Néanmoins, si l'on s'affranchit de cette disparité initiale, on constate que la théorie prédit dans l'ensemble correctement l'impact de l'augmentation de biomasse sur la dispersion. Nous avons ainsi un accroissement de la dispersion d'un facteur 1,76 (au lieu de 2.5 expérimentalement) de 0 à 17 jours à faible vitesse et d'un facteur 11,4 (au lieu d'un facteur 10 expérimentalement) de 17 à 29 jours à forte vitesse. La (b) $v=1,33.10^{-4} \text{ m/s}$

Figure 36 qui présente la comparaison des dispersions expérimentales et théoriques, après adimensionnement par rapport aux valeurs de dispersion avant inoculation, confirme cette observation.

On note un meilleur accord des résultats à faibles nombres de Péclet ce qui peut s'expliquer d'un point de vue théorique. En effet, il est bien connu qu'en régime diffusif ($Pe < 1$), les informations sur les fractions volumiques présentes suffisent pour déterminer la dispersion (*e.g.* : Quintard, 1993 ; Golfier *et al.*, 2009) ; en revanche, au fur et à mesure que le Péclet augmente, l'influence de la tortuosité du milieu s'accroît et donc la nécessité de caractériser avec plus de précision la microstructure (chemins préférentiels, pores obstrués...).



(a) $v = 2,22 \cdot 10^{-5} \text{ m/s}$



(b) $v = 1,33 \cdot 10^{-4} \text{ m/s}$

Figure 36 : Comparaison entre valeurs de dispersion déterminées théoriquement et expérimentalement.

5.4. Discussion Générale

La démarche de modélisation du transport de l'Erioglaurine dans le milieu poreux a été menée sans hypothèses particulières sur le mode de développement du biofilm. Deux formalismes macroscopiques ont été considérés : un modèle fickien classique et un modèle à double milieu. D'une manière générale, l'ensemble des résultats numériques sont en accord avec les observations expérimentales.

Tout d'abord, la modélisation de l'essai de traçage à 29 jours vient confirmer les mesures de porosité à l'aide de la méthode des moments temporels qui montrent que toute la porosité du milieu (celle de la phase fluide et celle de la phase biofilm) participe à l'écoulement. Ce résultat est en accord avec le résultat de Thullner et Baveye (2008). Le transport suit un comportement fickien au terme de l'expérience (29 jours de culture) bien que les résultats expérimentaux ont montré un biofilm quasi-homogène occupant pratiquement 50% du volume poral.

Toutefois, nos résultats montrent aussi que l'hypothèse de modélisation d'une croissance microbienne en milieu poreux sous forme d'un biofilm spatialement homogène est à prendre avec précaution. En effet, nous avons observé à 17 jours de culture l'influence de fortes hétérogénéités locales sur les propriétés de transport. Ces hétérogénéités sont présentes malgré une colonisation du milieu moins importante qu'à 29 jours. Les résultats de la modélisation du transport ont été obtenus avec les valeurs de fractions volumiques expérimentales fournies par la méthode de mesure au Bleu Dextran (cf Chapitre IV). Le bon accord entre les courbes de percée expérimentales et numériques souligne la validité de cette technique et montre que l'arrivée précoce de la concentration ne peut plus être expliquée par un modèle de convection-dispersion classique. Ces résultats vont dans le sens des observations réalisées par Seymour *et al.* (2004) et Chatelier (2010) qui ont constaté l'effet d'un comportement non-fickien due à l'activité bactérienne. Toutefois, les raisons (formation du biofilm, épaisseur locale de la biomasse, répartition des hétérogénéités) qui expliquent ce passage entre 17 et 29 jours d'un comportement de type « double milieu » à un régime fickien restent encore à éclaircir.

Nous avons ensuite comparé les valeurs de dispersion prédites par la méthode de changement d'échelle avec celles calées sur les mesures expérimentales. Cette comparaison révèle que la théorie reproduit plus qu'acceptable le comportement physique et l'impact du développement de la biomasse sur le processus dispersif au sein du milieu. Toutefois, une analyse quantitative plus détaillée échoue en particulier en raison de l'absence de données

précises sur la microstructure du milieu. Les observations sur la géométrie du milieu *in situ* menées par exemple par Davit *et al.* (2011) par micro-tomographie ou par Itis *et al.* (2011) au synchrotron pourrait représenter une possibilité de pallier ce manque et feront l'objet de travaux futurs.

CHAPITRE VI

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

6.1. Conclusions

Ce travail avait pour but : (i) de rechercher une meilleure compréhension des processus de croissance du biofilm dans le milieu poreux, (ii) de caractériser le transport d'un soluté organique en présence de biofilm et (iii) d'explorer les effets couplés reliant hydrodynamique du milieu et activité microbienne afin de comparer les résultats expérimentaux obtenus aux modèles macroscopiques de transport issus de la littérature et, en particulier, à ceux établis par Golfier *et al.* (2009) et Orgogozo (2009). La poursuite de ce triple objectif a nécessité la mise en place d'un dispositif expérimental performant et une démarche expérimentale et numérique rigoureuse. D'un point de vue expérimental, il s'agissait de coupler la croissance bactérienne avec les processus de transport d'un traceur conservatif. La notion de traceur conservatif a imposé des contraintes sur le choix de la matrice poreuse en relation avec le choix du traceur lui-même. D'un point de vue numérique, nous avons à utiliser les modèles développés par Orgogozo (2009). Ces modèles ont été conçus par la méthode de changement d'échelle par prise de moyenne volumique. Notre objectif était de comparer les solutions numériques issues de ces modèles avec nos données expérimentales. Cette tâche a induit des contraintes expérimentales supplémentaires dans le sens qu'elle nécessitait de contrôler avec exactitude les conditions aux limites imposées et les différents paramètres d'entrée du modèle.

Nous avons démarré notre étude par la mise en place du dispositif expérimental. Les différents éléments constitutifs (système d'injection, matrice solide, traceur, souche bactérienne) du dispositif ont dû être spécifiés. Une première série d'études a été menée sur des billes de verre. Ce système de billes de verre présentait le double avantage d'être facilement observable par des outils optiques en condition de saturation en eau et d'avoir une faible interaction avec l'Erioglaurine, utilisée comme traceur conservatif. Cependant, le système de billes de verre ne présentait pas une capacité de bio-adhésion suffisante pour permettre le développement d'un biofilm homogène dans le milieu poreux. Pour corriger ce défaut, nous avons opté pour un nouveau substratum tout en gardant le protocole expérimental développé avec les billes de verre. Du sable de quartz a donc été utilisé dans la seconde série d'expériences.

Sur cette nouvelle matrice solide, nous avons réussi à former un biofilm occupant tout l'espace du milieu poreux. Cependant, des hétérogénéités dans la distribution spatiale du biofilm subsistaient. En effet, la zone inférieure (proche de la source de nutriments) abritait un

biofilm plus dense et moins uniforme que le reste du milieu. Ce développement de biomasse s'est révélé très important et a perturbé la méthode de suivi de concentration par mesure optique que nous avons mise en place. Il a été nécessaire de retraiter les images et de réduire la zone d'étude afin de parvenir à une interprétation correcte du transport de soluté dans le milieu. Nous avons présenté en parallèle une méthode de caractérisation *in situ* du biofilm dans le milieu poreux. Cette méthode originale nous a permis d'estimer la distribution du biovolume dans la direction longitudinale de l'écoulement. À la fin de l'expérience, après 29 jours de croissance, la fraction volumique du biofilm représentait environ 50% de l'espace poral. Les informations précieuses issues de ces deux mesures ont apporté un éclairage nouveau sur les couplages existants.

Ainsi, une étude expérimentale approfondie sur une période de 29 jours a permis de mettre en évidence l'influence de la croissance du biofilm sur les propriétés hydrodynamiques du milieu et sur le transport conservatif de l'Erioglauoine. En effet, le développement du biofilm réduit la porosité et la perméabilité du milieu poreux. *A contrario*, la dispersion augmente avec la croissance du biofilm. Nous avons ainsi pu relier l'augmentation du coefficient de dispersion avec le biovolume présent.

Dans une seconde étape, une modélisation du transport de soluté au sein de la cellule a été réalisée. Deux approches ont été considérées : un modèle fickien classique et un modèle double milieu ou à deux équations. La comparaison entre les résultats expérimentaux de l'étude et les prédictions issues de simulations numériques a permis : (i) de mieux comprendre l'impact du développement du biofilm sur le régime de transport et (ii) de caractériser avec précision les valeurs du coefficient de dispersion.

- Lorsque le biofilm occupe principalement la moitié inférieure du milieu poreux (à 17 jours de culture) de fortes hétérogénéités subsistent et une arrivée précoce du front de concentration a été observée. Un comportement de type non équilibre local ou non fickien a été clairement identifié.
- En revanche, à 29 jours de culture, où le biofilm est quasi-homogène sur la majeure partie du milieu poreux, nous retrouvons de nouveau un modèle fickien avec la totalité de la porosité (phases fluide et biofilm) qui participe au transport.

Bien que ces résultats soient cohérents avec d'autres travaux issus de la littérature (*e.g.* : Seymour *et al.*, 2004, Thullner et Baveye, 2008), ils ne sont pas suffisants pour permettre d'expliquer une telle modification du comportement hydrodynamique. Intuitivement, nous nous attendrions plutôt à une augmentation des hétérogénéités au sein du milieu au fur et à

mesure de la croissance du biofilm. La réponse est vraisemblablement à chercher dans une variation entre 17 et 29 jours des temps caractéristiques de diffusion du soluté dans le biofilm liée à une modification de l'épaisseur locale de la biomasse autour des grains. Ceci reste toutefois une hypothèse en absence d'information supplémentaire sur la géométrie du milieu à petite échelle.

Les paramètres effectifs du transport ont ensuite été estimés et comparés avec les solutions théoriques. Une cellule unitaire représentative de la microstructure du milieu mais basée sur une hypothèse de distribution uniforme du biofilm a été construite afin de calculer ces coefficients. Les résultats présentent la même tendance et nous avons pu montrer que la théorie réussit à prédire l'impact global de la croissance bactérienne sur la dispersion. Toutefois, les valeurs théoriques calculées sous-estiment d'un facteur dix environ les valeurs calées sur les résultats expérimentaux. Ces différences sont principalement liées au manque d'informations disponibles sur la microstructure du milieu : répartition et arrangement des grains, épaisseur et distribution du biofilm autour des grains. Ce manque constaté nous emmène aux perspectives expérimentales en vue de l'optimisation du dispositif mis en place.

6.2. Perspectives

Pour parfaire l'étude du transport conservatif de l'Erioglaucone en présence du biofilm dans la matrice de sable, de nouveaux outils analytiques seront nécessaires. En effet, une caractérisation fine du biofilm devrait permettre d'obtenir les informations locales (*e.g.* : géométrie des pores, épaisseur du biofilm autour des grains, valeur du coefficient de diffusion dans le biofilm, voire estimation des fractions EPS et bactériennes dans le biofilm, ...) nécessaires pour une bonne modélisation des données expérimentales. Pour ce faire, des techniques de tomographie et/ou de résonance magnétique nucléaire peuvent être pertinentes. Des travaux récents ont montré la faisabilité de ces approches sur des milieux poreux (Leis *et al.*, 2005 ; Davit *et al.*, 2011 ; Iltis *et al.*, 2011 ; M'baye, 2011). Pour une meilleure caractérisation *in situ* du biofilm, des observations à l'aide d'un microscope à balayage laser pourraient être effectuées. Ces observations pourraient être couplées avec des techniques de marquage cellulaire pour la détermination des fractions volumiques du biofilm, de bactéries actives, informations qui seront nécessaires pour étendre ce travail aux processus de biodégradation.

Afin de compléter cette étude, le transport réactif, *i.e.* : le transport d'un soluté biodégradable, devra être considéré. L'objectif serait de pouvoir suivre la biodégradabilité d'un soluté en utilisant les mêmes méthodes de suivi optique que celles que nous avons développées. Nous avons mené des travaux préliminaires à ce propos. Différentes souches bactériennes ont été testées pour la biodégradation de colorants alimentaires. Ces tests préliminaires ont permis de sélectionner une molécule (le rouge de méthyle) et une bactérie (*Aliivibrio logei* ou *Photobacterium logei* ou *Vibrio logei*). Ce choix est basé sur les travaux de Adedayo *et al.* (2004). Une étude approfondie de la biodégradation du rouge de méthyle par *V. logei* dans nos conditions expérimentales ainsi qu'un test de formation d'un biofilm de cette souche sur notre matrice de sable, constitueront la première étape de l'étude du transport réactif. Pour ces futurs tests les améliorations proposées ci-dessus devraient être prises en compte.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Référence bibliographiques

- Adedayo O., Javadpour S., Taylor C., Anderson W.A., Moo-Young M., 2004. Decolourization and detoxification of methyl red by aerobic bacteria from a wastewater treatment plant. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, Vol. 20, p. 545–550.
- Allison D.G., Ruiz B., SanJose C., Jaspe A., Gilbert Pr., 1998. Extracellular products as mediators of the formation and detachment of *Pseudomonas fluorescens* biofilms. *FEMS Microbiology Letters*, Vol. 167, p. 179–184.
- Anceaux C., 2008. Construction de Biofilms : études en chambre d'écoulement. *Rapport de Master, Université Henry Poincaré, Nancy 1*, 44P.
- Anderl J.N., Franklin M.J., Stewart P.S., 2000. Role of Antibiotic Penetration Limitation in *Klebsiella pneumoniae* Biofilm Resistance to Ampicillin and Ciprofloxacin. *Antimicrobial Agent and Chemotherapy*, Vol. 44, N° 7 p. 1818–1824.
- Anderson T.B., et Jackson R. (1967) A fluid mechanical description of fluidized beds. *Industrial & Engineering Chemistry Fundamentals*, Vol. 6, p. 527–538.
- Anwar H., Dasgupta M.K., Costerton J.W., 1990. Testing the Susceptibility of Bacteria in Biofilms to Antibacterial Agents. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, Vol. 34, N° 11, p. 2043–2046.
- Aspa Y., Debenest G., Quintard M., 2011. Effective dispersion in channelled biofilms. *International Journal of Environment and Waste Management*, Vol. 7, N°. 1/2, p. 112-131.
- Auriault J.L., Sanchez-Palencia E., 1986. Remarques sur la loi de Darcy pour les écoulements biphasiques en milieu poreux : Remarks on the Darcy law for the two-phase flows in porous medium. *Journal de mécanique théorique et appliquée*, N° spéc., p. 141–156, ISSN 0750-7240.
- Baker J.S., Dudley L.Y., 1998. Biofouling in membrane systems - A review. *Desalination*, Vol. 118, p. 81–90.
- Baveye P., Valocchi A., 1989. An evaluation of mathematic models of the transport of biologically reacting solutes in saturated soils and aquifers. *Water Resources Research*, Vol. 25, N° 6, p. 1421–1439.
- Baveye P., Vandevivere P., Hoyle B.L., DeLeo P.C., Sanchez de Lozada, D., 1998. Environmental impact and mechanisms of the biological clogging of saturated soils and aquifer materials. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, Vol. 28 (2), 123– 191.
- Bielefeldt A. R., McEachern C., Illangasekare T., 2002. Hydrodynamic changes in sand due to biogrowth on naphthalene and decane. *Journal Of Environmental Engineering-Asce*, Vol. 128(1), p. 51–59.
- Boks N.P., Norde W., van der Mei H.C., Busscher H.J., 2008. Forces involved in bacterial adhesion to hydrophilic and hydrophobic surfaces. *Microbiology*, Vol. 154, p. 3122–3133.
- Bos R., van der Mei H.C., Busscher H.J., 1999. Physico-chemistry of initial microbial adhesive interaction its mechanisms and methods for study. *FEMS Microbiology Reviews*, Vol. 23, p. 179–230.
- Boyd A., Chakrabarty A.M., 1994. Role of Alginate Lyase in Cell Detachment of *Pseudomonas aeruginosa*. *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 60, N° 7, p. 2355–2359.
- Brusseau M. L., Jessup R. E., Rao P.S.C., 1989. Modeling the transport of solutes influenced by multiprocess non-equilibrium, *Water Resources Research*, Vol. 25, p. 1971–1988.

- Buès M.A., Zilliox L., 1990. Déplacement miscible avec contraste de densité et de viscosité en milieu poreux. Identification des paramètres de déplacement et stabilité en régime de dispersion mécanique. *Journal of Hydrology*, Vol. 120, p. 125–141.
- Busscher H.J., Van Der Mei H.C., 1997. Physico-Chemical Interactions in Initial Microbial Adhesion and Relevance for Biofilm Formation. *Advances in Dental Research*, Vol. 11, N° 1, p. 24–32.
- Carpentier B., Cerf O., 1993. Biofilms and their consequences, with particular reference to hygiene in the food industry. *Journal of Applied Bacteriology*, Vol. 75, p. 499–511.
- Cerca N., Pier G. B., Vilanova M., Oliveira R., Azeredo J., 2005. Quantitative analysis of adhesion and biofilm formation on hydrophilic and hydrophobic surfaces of clinical isolates of *Staphylococcus epidermidis*. *Research Journal of Microbiology*, Vol. 156(4), p. 506–514.
- Charbonneau A., Novakowski K., Ross N., 2006. The effect of a biofilm on solute diffusion in fractured porous media. *Journal of Contaminant Hydrology*, Vol. 85, p. 212–228.
- Chatelier M. Faisabilité d'un pilote de dénitrification in situ dans un aquifère karstifié (2010). Doctorat de l'Université de Poitiers.
- Chen-Charpentier B., 1999. Numerical simulation of biofilm growth in porous media. *Journal of Computational and Applied Mathematics*, Vol. 103 p. 55–66.
- Clement T.P., Hooker B.S., Skeen R.S., 1996. Macroscopic models for predicting changes in saturated porous media properties caused by microbial growth. *Ground Water*, Vol. 34 (5), p. 934–942.
- Coats K.H., Smith B.D., 1964. Dead-end pore volume and dispersion in porous media. *Society of petroleum Engineers Journal*, Vol. 4, p. 78–84.
- Costerton J.W., Marrie T.J., Cheng K.-J., 1985. Phenomena of Bacterial Adhesion p. 3-43. In Savage D.C., Fletcher M., 1985. *Bacterial Adhesion: Mechanisms and Physiological Significance*. Plenum Press, New York, 476p., ISBN 0-306-41941-6.
- Cunningham A.B., Characklls W.G., Abedeen F., Crawford D., 1991. Influence of Biofilm Accumulation on Porous Media Hydrodynamics. *Environmental Science & Technology*, Vol. 25, p. 1305-1311.
- Cushman J.H., Bennethum L.S., Hu B.X., 2002. A primer on upscaling tools for porous media. *Advances in Water Resources*, Vol. 25, p. 1043–1067.
- Dagan G., 1984. Solute transport in heterogeneous porous formations. *Journal of Fluid Mechanics*, Vol. 145, p. 151–177.
- Dagan G., 1989. Flow and Transport in Porous Formations. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, Berlin, 465 p., ISBN 3-540-51098-2.
- Davey M.E., O'Toole G.A., 2000. Microbial Biofilms: from Ecology to Molecular Genetics. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, Vol. 64, N° 4, p. 847–867.
- Davit Y., Debenest G., Wood B.D., Quintard M., 2010. Modeling non-equilibrium mass transport in biologically reactive porous media. *Advances in Water Resources*, Vol. 33, p. 1075–1093.
- Davit Y., Iltis G., Debenest G., Veran-Tissoires S., Wildenschild D., Gerino M., Quintard M. (2011), Imaging biofilm in porous media using X-ray computed microtomography. *Journal of Microscopy*, Vol. 242, p. 15–25.
- De Kerchove A.J., Elimelech M., 2008. Calcium and Magnesium Cations Enhance the Adhesion of Motile and Nonmotile *Pseudomonas aeruginosa* on Alginate Films. *Langmuir* 2008, Vol. 24, p. 3392–3399.
- De Marsily G., 1986. Quatitative Hdrogeology. Academic Press , Inc. Orlando, Florida, 440p. ISBN 0-12-208915-4.

- Derjaguin B., Landau L., 1941. Theory of the stability of strongly charged lyophobic sols and of the adhesion of strongly charged particles in solutions of electrolytes. *Acta Physico Chemica URSS*, Vol. 14, p. 633.
- Di Iaconi C., Ramadori R., Lopez A., Passino R., 2004. Preliminary biomass characterization in a sequencing batch biofilm reactor. *Annali di Chimica*, Vol. 94, p. 889-898.
- Donlan R.M., 2002. Biofilms: Microbial Life on Surfaces. *Emerging Infectious Diseases*, Vol. 8, N° 9, p. 881–890.
- Donlan R.M., Costerton J.W., 2002. Biofilms survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clinical Microbiology Reviews*, Vol. 15, N° 2, p. 167-193.
- Dunne W.M. Jr., 2002. Bacterial adhesion: Seen any good biofilms lately? *Clinical Microbiology Reviews*, Vol. 15, N° 2, p. 155–166.
- Duval J.F.L., Merlin J., Narayana P.A.L., 2011. Electrostatic interactions between diffuse soft multi-layered (bio)particles: beyond Debye Hückel approximation and Deryagin formulation. *Physical Chemistry Chemical Physics*, Vol. 13, p. 1037-1053.
- Duval J.F.L., Ohshima H., 2006. Electrophoresis of diffuse soft particles, *Langmuir*, Vol. 22, p. 3533-3546.
- Dykaar B.B., Kitandis P.K., 1996. Macrotransport of a biologically reacting solute through porous media. *Water Resources Research*, Vol.32, N°2, p. 307-320.
- Engesgaard P., Seifert D., Herrera P., 2006. Bioclogging in porous media: Tracer studies. *Chapter 5 in Riverbank filtration hydrology – Impacts on system capacity and water quality*, ed. S. A. Hubbs, *Nato Science Series, IV. Earth and Environmental Sciences*, Vol. 60, p. 93-118.
- Felder C., 2003. Transport d'une solution saline en cellule de Hele-Shaw – Expériences et simulations numériques. Thèse de doctorat, Institut National Polytechnique de Lorraine.
- Feyen J., Jacques D., Timmerman A., Vanderborght J., 1998. Modelling water flow and solute transport in heterogeneous soils: A review of recent approaches. *Journal of Agricultural Engineerig Research*, Vol. 70, p. 231–256.
- Flemming H.-C., 2002. Biofouling in water systems – cases, causes and countermeasures. *Applied Microbiology and Biotechnology*, Vol. 59, p. 629-640.
- Fridjonsson E.O., Seymour J.D., Schultz L.N., Gerlach R., Cunningham A.B., Codd S.L., 2011. NMR measurement of hydrodynamic dispersion in porous media subject to biofilm mediated precipitation reactions. *Journal of Contaminant Hydrology*, Vol. 120–121, p. 79-88.
- Frippiat C.C., Holeyman A.E., 2008. A comparative review of upscaling methods for solute transport in heterogeneous porous media. *Journal of Hydrology*, Vol. 362, p. 150-176.
- Fux C.A., Costerton J.W., Stewart P.S., Stoodley P., 2005. Survival strategies of infectious Biofilms. *TRENDS in Microbiology*, Vol.13 N° 1 p. 34-40.
- Gelhar L.W., Welty C., Rehfeldt K.R., 1992. A critical Review of Data on Field-Scale Dispersion in Aquifers. *Water Resources Research*, Vol. 28, N° 7, p. 1955-1974.
- Golfier F., Quintard M., Cherblanc F., Zinn B., Wood B., 2007. Comparison of theory and experiment for solute transport in highly heterogeneous porous medium. *Advances in Water Resources*, Vol. 30, p. 2235-2261.
- Golfier F., Quintard M., Wood B.D., 2011. Comparison of theory and experiment for solute transport in weakly heterogeneous bimodal porous media. *Advances in Water Resources*, Vol. 34, p. 899–914.
- Golfier F., Wood B., Orgogozo L., Quintard M., Buès M.A., 2009. Biofilms in porous media: Development of macroscopic transport equations via volume averaging with closure for local mass equilibrium conditions. *Advances in Water Resources*, Vol. 32(3), p. 463-485.

- Gwo J., Jardine P., Wilson G., Yeh G., 1996. Using a multiregion model to study the effects of advective and diffusive mass transfer on local physical non-equilibrium and solute mobility in a structured soil. *Water Resources Research*, Vol. 32, p. 561-570.
- Hall-Stoodley L., Stoodley P., 2002. Developmental regulation of microbial biofilms. *Current Opinion in Biotechnology*, Vol. 13, p. 228-233.
- Hammer B.K., Bassler B.L., 2003. Quorum sensing controls biofilm formation in *Vibrio cholerae*. *Molecular Microbiology*, Vol. 50(1), p. 101-114.
- Harbron R.S., Kent C.A., 1988. Aspects of cell adhesion. In Melo L.F., Bott T. R., Bernado C. A. *Fouling Science and Technology*. Kluwer Academic Publishers, p. 125-140.
- Holms W.H., 1986. The central metabolic pathway of *Escherichia coli*: relationship between flux and control at a branch point, efficiency of conversion to biomass, and excretion of acetate. *Current Topics in Cellular Regulation*, Vol. 28, p. 69-105
- Hori K., Matsumoto S., 2010. Bacterial adhesion: From mechanism to control. *Biochemical Engineering Journal*, Vol. 48, p. 424-434.
- Hornung U., 1997. Homogenization and porous media. *Springer, New York*, 279p. ISBN 0-387-94786-8.
- Harremoës, P. (1977) Half-order reactions in biofilm and filter kinetics. *Vatten*, 33, 122–143.
- Iltis G.C., Armstrong R. T., Jansik D. P., Wood B. D., and Wildenschild D., 2011. Imaging biofilm architecture within porous media using synchrotron-based X-ray computed microtomography, *Water Resources Research*, Vol. 47, W02601, 5PP, doi:10.1029/2010WR009410.
- Johnson G.R., Gupta K., Putz D.K., Huc Q., Brusseau M.L., 2003. The effect of local-scale physical heterogeneity and nonlinear, rate-limited sorption/desorption on contaminant transport in porous media. *Journal of Contaminant Hydrology*, Vol. 64, p. 35-58.
- Karrabi M., Séchet P., Morra Ch., Cartellier A., Geindreau Ch., 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*, Vol. 66, p.1765-1782.
- Kim D.-S., Fogler H.S., 2000. Biomass evolution in porous media and its effects on permeability under starvation conditions. *Biotechnology and bioengineering*, Vol. 69, N° 1, p. 47–56.
- Kumar C.G., Anand S.K., 1998. Significance of microbial biofilms in food industry: a review. *International Journal of Food Microbiology*, Vol. 42, p. 9-27.
- Le Pape P., 2009. Tests préliminaires pour une expérience de transport réactif en milieu poreux. Rapport de Master « Géosciences et Génie Civil » Spécialité Hydro-Géo-Mécanique/ Hydrodynamique. Institut National Polytechnique de Lorraine.
- Leis A.P., Schlicher S., Franke H., Strathmann M., 2005. Optically Transparent Porous Medium for Nondestructive Studies of Microbial Biofilm Architecture and Transport Dynamics, *Appl.Env. Microbiol.* Vol. 71(8), p. 4801-4808.
- Liu Y., Tay J.-H., 2002. The essential role of hydrodynamic shear force in the formation of biofilm and granular sludge. *Water Research*, Vol. 36, p. 1653-1665.
- Luckner L., Reissig H., 1979. Estimation of the longitudinal dispersion and sorption coefficients in saturated soils by straight-line methods. *Hydrological Sciences Bulletin*, Vol. 24(2), p. 229-238.
- M'Baye S., 2011. Couplage Hydrodynamique/Biomasse dans les Procédés de dépollution – Approche locale des mécanismes d'adhésion, de détachement et de croissance de microorganismes sur substrats solides. Doctorat de Mécanique des Fluides – Energétique et Procédés. Université de Grenoble.

- Mackay D.M., Freyberga D.L., Roberts P.V., Cherry J.A., 1986. A natural gradient experiment on solute transport in a sand aquifer : 1. Approach and overview of plume Mmovement. *Water Resources Research*, Vol. 22, N° 13, p. 2017-2029.
- MacLeod F.A., Lappin-Scott H M., Costerton J.W., 1988. Plugging of a model rock system by using starved bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*. Vol. 54, N°. 6, p. 1365-1372.
- Mainhagu J., Oltéan C., Golfier F., Buès M.A., 2007. Measurement by laser induced fluorescence on miscible density driven flows in a Hele-Shaw cell: settings and preliminary results. *Comptes-Rendus Mécanique*, Vol. 335(2), p. 105-112.
- Marle C.M., 1967. Ecoulements monophasiques en milieu poreux. *Revue de l'Institut Français du Pétrole*, Vol. 22 (10), p. 1471–1509.
- Matheron G., De Marsily G., 1980. Is transport in porous media always diffusive? A counterexample. *Water Resources Research*, Vol.16, N°5, p. 901-917.
- McLandsborough L., Rodriguez A., Pérez-Conesa D., Weiss J., 2006. Biofilms: At the interface between biophysics and microbiology. *Food Biophysics*, Vol. 1, p. 94-114.
- Meile C., Tuncay K., 2006. Scale dependence of reaction rates in porous media. *Advances in Water Resources*, Vol. 29, p. 62–71.
- Miller C.T., Christakos G., Imhoff P.T., McBride J.F., Pedit J.A., Trangenstein J.A., 1998. Multiphase flow and transport modelling in heterogeneous porous media: challenges and approaches. *Advances in Water Resources*, Vol. 21, N°. 2, p.77-120.
- Mitchell R., Nevo Z., 1964. Effect of bacterial polysaccharide accumulation on infiltration of water through sand. *Applied Microbiology*, Vol. 12, N°. 3, p. 219-223.
- Mysliwicz M.J., VanderGheynst J.S., Rashid M.M., Schroeder E.D., 2001. Dynamic volume-averaged model of heat and mass transport within a compost biofilter: I. Model development. *Biotechnology and Bioengineering*, Vol. 73, N°. 4, p. 282–294.
- Nealson H.K, Myers C.R., 1990. Iron reduction by bacteria: A potential role in the genesis of banded iron formations. *American Journal of Science*, Vol. 290-A, p. 35-45.
- Nealson K.H., Scott J., 2006. Ecophysiology of the Genus *Shewanella*. *Prokaryotes*, Vol. 6, p. 1133-1151.
- Noëtinger B., 1994. The effective permeability of a heterogeneous porous medium. *Transport in Porous Media*, Vol. 15, p. 99-127.
- O'Toole G.A., Kolter R., 1998. Flagellar and twitching motility are necessary for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *Molecular Microbiology*, Vol.30, N°2, p. 295-304.
- O'Toole G.A., Kolter R., 1998. Initiation of biofilm formation in *Pseudomonas fluorescens* WSC365 proceeds via multiple, convergent signalling pathways: a genetic analysis. *Molecular Microbiology*, Vol. 28, N°3, p. 449-461.
- Oates P.M., Castenson C., Harvey C.F., Polz M., Culligan P., 2005. Illuminating reactive microbial transport in saturated porous media: Demonstration of a visualization method and conceptual transport model. *Journal of Contaminant Hydrology*, Vol. 77, p. 233-245.
- Ohshima H., 2008. Electrostatic interaction between soft particles *Journal of Colloid and Interface Science*, Vol. 328 (1), p. 3–9.
- Orgogozo L., 2009. Transport de soluté biologiquement actif en milieu poreux incluant une phase biofilm : de la modélisation numérique aux perspectives expérimentales, Doctorat de Mécanique-Génie, Institut National Polytechnique de Lorraine.
- Orgogozo L., Golfier F., Buès M., Quintard M., 2010. Upscaling of transport processes in porous media with biofilms in non-equilibrium conditions. *Advances in Water Resources*, Vol. 33, p. 585–600.

- Orgogozo L., Golfier F., Buès M.A., 2009. Upscaling of transport processes in porous media with biofilms in equilibrium and non-equilibrium conditions, *Applicable Analysis*, Vol. 88(10-11), p. 1579-1588. doi: 10.1080/00036810902913862.
- Orgogozo L., Golfier F., Buès M.A., 2010. Modèles de transport d'espèces chimiques en solution dans des conduites colonisées par un biofilm : perspective d'applications en système d'eau potable, *European Journal of Water Quality*, Vol. 41(2), 77. doi:10.1051/water/2010006.
- Orgogozo L., Golfier F., Buès M.A., Quintard M., Kone T., 2012. A double medium theory for solute transport in biofilm-coated porous media, *Biotechnology and Bioengineering*, (soumis).
- Pachepsky Y., Benson D., Rawls W., 2000. Simulating Scale-Dependent Solute Transport in Soils with the Fractional Advective–Dispersive Equation. *Soil Science Society of America Journal*, Vol. 64, p. 1234–1243.
- Palmer J., Flint S., Brooks J., 2007. Bacterial cell attachment, the beginning of a biofilm. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, Vol. 34, p. 577-588.
- Persson P., Gustavsson P.E., Zacchi G., Nilsson B., 2006. Aspects of estimating parameter dependencies in a detailed chromatography model based on frontal experiments. *Process Biochemistry*, Vol. 41(8), p. 1812-1821.
- Pinchuk G.E., Ammons C., Culley D.E., Li S.-M.W., McLean J.S., Romine M.F., Nealon K.H., Fredrickson J.K., Beliaev A.S., 2008. Utilization of DNA as a sole source of Phosphorus, Carbon, and Energy by *Shewanella* spp.: Ecological and Physiological Implications for Dissimilatory Metal Reduction. *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 74, N° 4, p. 1198–1208.
- Pratt L.A., Kolter R., 1998. Genetic analysis of *Escherichia coli* biofilm formation: roles of flagella, motility, chemotaxis and type I pili. *Molecular Microbiology*, Vol. 30 N°2, p. 285-293.
- Pratt L.A., Kolter R., 1999. Genetic analyses of bacterial biofilm formation. *Current Opinion in Microbiology*, Vol. 2, p. 598-603.
- Ptak T., Piepenbrink M., Martac E., 2004. Tracer tests for the investigation of heterogeneous porous media and stochastic modelling of flow and transport—a review of some recent developments. *Journal of Hydrology*, Vol. 294, p. 122-163.
- Quintard M., 1993. Diffusion in isotropic and anisotropic porous systems: three dimensional calculations. *Transport in Porous Media*, Vol. 11, p. 187–99.
- Reisner A., Haagensen J.A.J., Schembri M.A., Zechner E.L., Molin S., 2003. Development and maturation of *Escherichia coli* K-12 biofilms. *Molecular Microbiology*, Vol.48, N°4, p. 933-946.
- Rittmann B.E., McCarty P.L.,(1980. Evaluation of steady-state biofilm kinetics. *Biotechnology and Bioengineering*. Vol. 22, p. 2359-2373.
- Rockhold M.L., Yarwood R.R., Niemet M.R., Bottomley, P.J., Selker, J.S., 2005. Experimental observations and numerical modeling of coupled microbial and transport processes in variably saturated sand. *Vadose Zone Journal*, Vol. 4(2), p. 407-417.
- Royer P., Auriault J.-L., Lewandowska J., Serres C., 2002. Continuum Modelling of Contaminant Transport in Fractured Porous Media. *Transport in Porous Media*, Vol. 49, p. 333-359.
- Sanchez R. Assembly homogenization techniques for core calculations. *Progress in Nuclear Energy* 51 (2009) 14–31.
- Sauer K., Camper A.K., Ehrlich G.D., Costerton J.W., Davies D.G., 2002. *Pseudomonas aeruginosa* displays multiple phenotypes during development as a biofilm. *Journal of Bacteriology*, Vol. 184, N° 4, p. 1140-1154.

- Savage D.C., Fletcher M., 1985. Bacterial adhesion: Mechanisms and physiological significance. *Plenum Press, New York*, 476p. ISBN 0-306-41941-6.
- Scheidegger A., 1957. The physics of flow through porous media. 3rd edition, University of Toronto Press, Toronto and Buffalo, 1974, ISBN 0-8020-1849-1.
- Seifert D., Engesgaard P., 2007. Use of tracer tests to investigate changes in flow and transport properties due to bio-obstruction of porous media. *Journal of Contaminant Hydrology*, Vol. 93, p. 58–71.
- Seymour J.D., Gage J.P., Codd S.L., Gerlach R., 2004. Anomalous fluid transport in porous media induced by biofilm growth. *Physical Review Letters*, Vol. 93, p.198103.
- Seymour J.D., Gage J.P., Codd S.L., Gerlach R., 2007. Magnetic resonance microscopy of biofouling induced scale dependent transport in porous media. *Advances in Water Resources*, Vol. 30, p. 1408-1420.
- Sharp R.P., Cunningham A.B., Komlos J., Billmeyer J., 1999. Observation of thick biofilm accumulation and structure in porous media and corresponding hydrodynamic and mass transfer effects. *Water Science and Technology*, Vol. 39 (7), p. 195- 201.
- Sharp R.R., Stoodley P., Gerlach R., Cunningham, A., 2005. Visualization and characterization of dynamic patterns of flow, growth and activity of biofilms growing in porous media. *Water Science and Technology*, Vol. 52(7), p. 85-90.
- Slattery J.C., 1967. Flow of viscoelastic fluids through porous media. *AIChE Journal*, Vol. 13, p. 1066-1071.
- Stewart P.S., 2003. Diffusion in biofilms. *Journal of Bacteriology*, Vol. 185, N°5, p. 1485-1491.
- Stoodley P., Debeer D., Lewandowski Z., 1994. Liquid flow in biofilm systems. *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 60, N° 8, p. 2711-2716.
- Stoodley P., Wilson S., Hall-Stoodley L, Boyle J.D., Lappin-Scott H.M., Costerton J.W., 2001. Growth and detachment of cell clusters from mature mixed-species biofilms. *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 67, N° 12, p. 5608-5613.
- Strevett K.A., Chen G., 2003. Microbial surface thermodynamics and applications. *Research in Microbiology*, Vol. 154, p. 329–335.
- Sturman P.J., Stewart P.S., Cunningham A.B., Bouwer E.J., Wolfram J.H., 1995. Engineering scale-up of in situ bioremediation processes: a review. *Journal of Contaminant Hydrology*, Vol. 19, p. 171-203.
- Taylor S.W., Jaffé P.R. Biofilm growth and the related changes in the physical properties of a porous medium 3. Dispersivity and Model Verification. *Water Resources Research*, 1990b, 26 (9), 2153–2159.
- Taylor S.W., Jaffé P.R., 1990. Biofilm growth and the related changes in the physical properties of a porous medium 1. Experimental investigations. *Water Resources Research*, Vol. 26 (9), p. 2153-2159.
- Taylor S.W., Milly P.C.D., Jaffé P.R., 1990. Biofilm growth and the related changes in the physical properties of a porous medium: 2. Permeability. *Water Resources Research*, Vol. 26 (9), p. 2161-2169.
- Teal T.K., Lies D.P., Wold B.J., Newman D.K., 2006. Spatiometabolic stratification of *Shewanella oneidensis* biofilms. *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 72, N° 11, p. 7324-7330
- Thullner M., Baveye P., 2008. Computational pore network modeling of the influence of biofilm permeability on bio-obstruction in porous media. *Biotechnology and Bioengineering*, Vol. 99, N° 6, p. 1337-1351.
- Thullner M., Mauclair L., Schroth M.H., Kinzelbach W., Zeyer J., 2002. Interaction between water flow and spatial distribution of microbial growth in a twodimensional flow field in saturated porous media. *Journal of Contaminant Hydrology*, Vol. 58, p. 169-189.

- Thullner M., Zeyer J., Kinzelbach W., 2002. Influence of microbial growth on hydraulic properties of pore networks. *Transport in Porous Media*, Vol. 49, p. 99-122.
- Torbati H.M., Raiders R.A., Donaldson E.C., McInerney M.J., Jenneman, G.E., Knapp R.M., 1986. Biofilm accumulation in sandstone. *Journal of Industrial Microbiology*, Vol. 1, p. 227-234.
- Travkin V.S., Catton I., 2001. Transport phenomena in heterogeneous media based on volume averaging theory. *Advances in Heat Transfer*, Vol. 34, p. 1-144, ISBN: 0-12-020034-1.
- van Loosdrecht M.C.M., Lyklema J., Norde W., Zehnder A.J.B., 1989. Bacterial adhesion: A physicochemical approach. *Microbial Ecology*, Vol. 17, p. 1-15.
- Vandervivere P., Baveye P., 1992. Effect of bacterial extracellular polymers on the saturated hydraulic conductivity of sand columns. *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 58, N° 5, p. 1690-1698.
- Vandevivere P., Baveye P., 1992. Saturated hydraulic conductivity reduction caused by aerobic bacteria in sand columns. *Soil Science Society of America Journal*, Vol. 56 (1), p. 1-13.
- Vayenas D.V., Michalopoulou E., Constantinides G.N., Pavlou S., Payatakes A.C., 2002. Visualization experiments of biodegradation in porous media and calculation of the biodegradation rate. *Advances in Water Resources*, Vol. 25, p. 203-219
- Venkateswaran K., Moser D.P., Dollhopf M.E., Lies D.P., Saffarini D.A., MacGregor B.J., Ringelberg D.B., White D.C., Nishijima M., Sano J.H., Burghardt J., Stackebrandt E., Nealson K.H., 1999. Polyphasic taxonomy of the genus *Shewanella* and description of *Shewanella oneidensis* sp. Nov. *International Journal of Systematic Bacteriology*, Vol. 49, p. 705-724.
- Verwey E.J.W., Overbeek J.Th.G., 1948. Theory of the stability of lyophobic colloids, Amsterdam, Elsevier.
- Videla H.A., 2002. Prevention and control of biocorrosion. *International Biodeterioration & Biodegradation*, Vol. 49, p.259- 270.
- Viet D., Beck-Candanedo S., Gray D.G., 2008. Synthesis and characterization of Blue Dextran. *Carbohydrate Polymers*, Vol.74(3), p. 372-378.
- Wahl M., 1989. Marine epibiosis. I. Fouling and antifouling: some basic aspects. *Marine Ecology Progress Series*, Vol. 58, p. 175-189.
- Walker J.T., Marsh P.D., 2004. A review of biofilms and their role in microbial contamination of dental unit water systems (DUWS). *International Biodeterioration & Biodegradation*, Vol. 54, p. 87- 98.
- Walker J.T., Marsh P.D., 2007. Microbial biofilm formation in DUWS and their control using disinfectants. *Journal of Dentistry*, Vol. 35, N° 9, p. 721-730. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0300571207001327> - aff1
- Wanner O, Cunningham A.B., Lundman R., 1995. Modeling biofilm accumulation and mass transport in a porous medium under high substrate loading. *Biotechnology and Bioengineering*, Vol. 47, p. 703-12.
- Watnick P., Kolter R., 2000. Biofilm, City of Microbes. *Journal of Bacteriology*, Vol. 182, N° 10, p. 2675-2679.
- Weiss J.V., Cozzarelli I.M., 2008. Biodegradation in contaminated aquifers: Incorporating microbial/molecular methods. *Ground Water*, Vol. 46, N° 2, p. 305-322.
- Werner E., Roe F., Bugnicourt A., Franklin M.J., Heydorn A., Molin S., Pitts B., Stewart P.S., 2004. Stratified Growth in *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms. *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 70, N° 10, p. 6188-6196.
- Whitaker S., 1967. Diffusion and dispersion in porous media. *AIChE Journal*, Vol. 13, p. 420-427.

- Whitaker S., 1999. The method of volume averaging. *Kluwer Academic Publishers*, Dordrecht, 219p., ISBN 0-7923-5486-9.
- Wood B.D., Quintard M., Whitaker S., 2002. Calculation of effective diffusivities for Biofilms and Tissues. *Biotechnology and Bioengineering*, Vol. 77, N° 5, p. 495-516.
- Wood B.D., Golfier F., Quintard M., 2011. Dispersive transport in porous media with biofilms: local mass equilibrium in simple unit cells. *International Journal of Environment and Waste Management*, Vol. 7, N° 1/2, p. 24-48.
- Zobell Z.E., 1943. The effect of solid surfaces upon bacterial activity. *Journal of Bacteriology*, Vol. 46, p. 39-56.

ANNEXES

Annexe 1 : Protocole de remplissage de la cellule d'écoulement

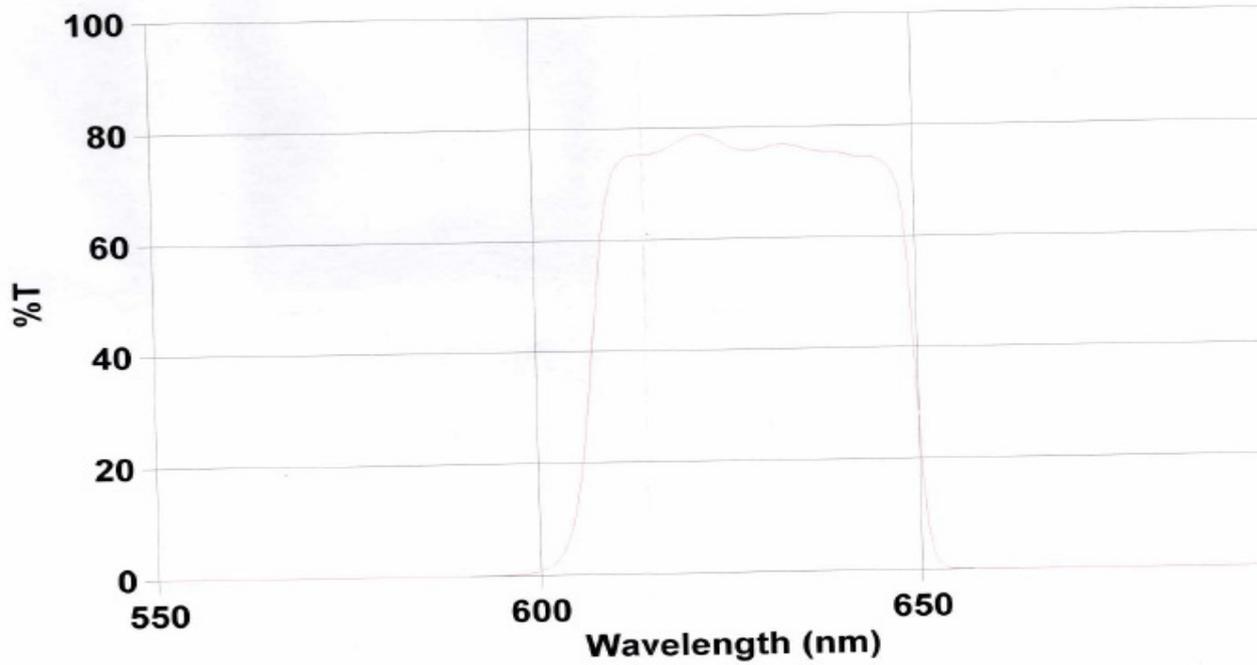
1. Peser la cellule vide contenant avec le tamis en acier inoxydable à l'intérieur de la cellule
2. Placer le tamis au fond de la cellule de manière à empêcher toute perte de grains solides (billes de verre ou grains de sable)
3. Remplir la cellule par sa fente jusqu'à ras-le bord puis tasser comme suit :
 - a) Effectuer un tassage global en soulevant la cellule à hauteur de 10 cm environ et en la lâchant tout en la maintenant verticale. Répéter cette opération 100 fois.
 - b) Inverser les côtés gauche et droit de la cellule et répéter les opérations décrites en a).
 - c) Effectuer un tassage des côtés : l'un des côtés (gauche ou droit) est maintenu posé sur le plan de travail et l'autre côté est soulevé à 2-3 cm environ puis lâché 5 fois de suite. Faire la même chose pour l'autre côté. Répéter ces deux opérations 5 fois.
 - d) Inverser les côtés gauche et droit de la cellule et répéter les opérations décrites en c).
 - e) Répéter les opérations a) et b).
 - f) Répéter les opérations c) et d).
 - g) Répéter les opérations a) et b).
- 4) Vérifier que la masse de la matrice solide (*i.e.* : la différence entre la masse de la cellule avec tamis et matrice solide tassée et la masse de la cellule vide avec tamis) est de 78,32g. Entre deux.
- 5) Poser une fine couche de limaille d'acier inoxydable, bien tassée, pour empêcher toute fuite du massif.

Annexe 2 : Courbe de transmission du filtre passe-bande

4/2/2010 1:02:11 PM Page 1 of 1

LASER COMPONENTS SAS
45 Bis Route des Gardes
92190 MEUDON - FRANCE
Tél. (0)1 3959 5225 - Fax (0)1 3959 5350

Omega Optical Inc
Instrument Serial Number EL 05084038



Laser Components SAS 628BP50 SHO/128571 G.F.

Etude expérimentale du couplage entre croissance bactérienne et transport d'un polluant organique en milieu poreux

Résumé :

Un dispositif expérimental a été développé pour l'étude du couplage de la croissance d'un biofilm de *Shewanella oneidensis* MR-1 et du transport conservatif de l'Erioglaucine. La croissance du biofilm a été suivie par mesure de conductivité hydraulique et par acquisition d'images à l'aide d'une caméra digitale. La fraction volumique du biofilm a été caractérisée par des essais d'élution d'une macromolécule (i.e. : le Bleu Dextran) par analogie avec les méthodes de chromatographie d'exclusion ou de filtration sur gel. Ainsi au bout de 29 jours, un biofilm quasi-homogène sur l'ensemble de la cellule d'écoulement ($0,1 \times 0,1 \times 0,05 \text{m}^3$) et équivalent à 50% du volume poral a été formé. L'influence de la croissance du biofilm sur les propriétés de transport du milieu a été évaluée. Les essais de transport conservatif de l'Erioglaucine effectués pour deux vitesses d'injection et à deux stades de croissance du biofilm (17 et 29 jours) ont montré l'influence d'hétérogénéités locales sur les paramètres de transport (i.e. : la porosité, la perméabilité et la dispersion hydrodynamique). Ainsi après 17 jours de culture quand le biofilm occupe partiellement le milieu poreux (moitié inférieure) un modèle à deux équations ou double milieu permet de caractériser le transport conservatif. *A contrario* après 29 jours de culture où le biofilm occupe tout le milieu poreux, un comportement fickien classique caractérise le transport. Les valeurs théoriques du coefficient de dispersion longitudinale prédites par la méthode de prise de moyenne volumique ont permis de reproduire de manière satisfaisante le comportement observé expérimentalement.

Mots clés : Biofilm, *Shawenella oneidensis*, Milieu Poreux, Transport Conservatif, Erioglaucine, Bleu Dextran, Prise de moyenne volumique.

Experimental study of coupling between bacterial growth and transport of an organic pollutant in a porous medium

Abstract:

An experimental device was performed for the study of coupling the growth of a *Shewanella oneidensis* MR-1 bacterial biofilm and the non reactive transport of Brilliant Blue FCF. The biofilm growth was monitored by hydraulic conductivity measurements and by image acquisition with a digital camera. The biofilm volume fraction was estimated through tracer experiments with a macromolecular tracer (i.e., Dextran Blue) as in size-exclusion chromatography or gel filtration chromatography. Then after 29 days of bacterial culture a quasi-homogenous biofilm was grown in the whole flow cell ($0,1 \times 0,1 \times 0,05 \text{m}^3$) occupying about 50% of void space volume. The influence of biofilm growth on porous media transport properties was evaluated. Conservative tracer experiments with Brilliant Blue FCF run at two hydrodynamic conditions and at two growth steps of biofilm (17 and 29 days) showed the influence of local heterogeneities on transport parameters (i.e., porosity, permeability and hydrodynamic dispersion). Then at 17 days of growth when the biofilm partially covers the porous medium (bottom half of the flow cell) a two-equation model or double-layer model was suitable to characterize the conservative transport. *A contrario* after 29 days of growth, when the biofilm covers the whole porous medium, a classical fickian model was convenient. Numerical values of longitudinal dispersion coefficient from volume averaging well fitted experimental results.

Keywords: Biofilm, *Shawenella oneidensis*, Porous media, Conservative Transport, Brilliant Blue FCF, Dextran Blue, Volume Averaging.