



## 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](mailto: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.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php)

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

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

**Thèse**  
Présentée à  
L'Institut National Polytechnique de Lorraine  
Pour obtenir le grade de  
**Docteur de l'INPL**  
*Spécialité: Géosciences*

Par  
Jamil HOUHOU

---

**Le réseau d'assainissement urbain : du collecteur  
au réacteur bio-physico-chimique**

---

Soutenue publiquement le 12 Novembre 2008 devant la commission d'examen

Markus BOLLER	<u>Rapporteurs</u>	EAWAG (Suisse)
Ghassan CHEBBO	Professeur ETH	CEREVE (ENPC/Marne la Vallée)
	DR MEDDAT	
	<u>Examineurs</u>	
Cécile DELOLME	IDTPE (HDR) ENTPE	LSE (Vaulx-en-Velin)
Christian MUSTIN	CR CNRS	LIMOS (UHP/Vandoeuvre)
Marie-Noëlle PONS	DR CNRS	LSGC (INPL/Nancy)
	<u>Directeur de thèse</u>	
Bruno LARTIGES	MC (HRD) INPL	LEM (Vandoeuvre)
	<u>Invité</u>	
Antoine EL SAMRANI	MC USEK	Liban

*A mes parents  
A mon grand père  
A mes frères*

# Remerciements

Ce travail a été réalisé entre octobre 2004 et septembre 2008 au Laboratoire Environnement et Minéralurgie, UMR CNRS-INPL 7569. Cette étude a été financée par le programme Ecotoxicologie et Ecodynamique des Contaminants (ECODYN / CNRS-INSU), la Région Lorraine, et la Communauté Urbaine de Grand Nancy (CUGN).

Mes premiers remerciements s'adressent à Monsieur Jacques Yvon, directeur du laboratoire pour m'avoir accueilli dans son unité de recherche et pour m'avoir fait profiter de ses connaissances encyclopédiques en minéralogie.

Mes plus vifs remerciements vont à mon directeur de thèse, Bruno Lartiges, Enseignant-Chercheur à l'ENSG, pour m'avoir guidé tout au long de ce travail. Des compagnes de prélèvements sur le terrain, surtout les prélèvements de 24 heures en plein hiver glacial Nancéien, aux réunions scientifiques précieuses, son aide, ses conseils, ses capacités à me remonter le moral pendant les périodes difficiles et ses corrections me témoignent de ses grandes qualités scientifiques et humaines. *Un immense MERCI !*

Je remercie également Monsieur Christian Mustin, co-directeur de cette thèse, Chargé de recherche au CNRS, pour sa grande disponibilité lors des études des biofilms modèles et pour ses discussions scientifiques enrichissantes.

Un grand merci à Monsieur Guillaume Caumon, Directeur du Consortium GOCAD, pour m'avoir formé au logiciel GOCAD<sup>®</sup>, pour sa grande disponibilité et pour m'avoir ouvert les portes de son laboratoire pour réaliser les traitements d'images.

Mes sincères remerciements à Monsieur Ghassan Chebbo, Directeur de recherche au CEREVER-ENPC et à Monsieur Markus Boller, Professeur à l'EAWAG, pour avoir accepté la lourde charge de rapporter mes travaux. J'exprime également mes remerciements à Madame Cécile Delolme, Enseignant-Chercheur à l'ENTPE, à Madame Marie-Noëlle Pons, Directeur de recherche au CNRS, et à Monsieur Antoine El Samrani, Enseignant-Chercheur à l'USEK-Liban, qui ont accepté de participer au jury de cette thèse.

Je remercie également le personnel du service hydraulique de la CUGN, et plus particulièrement Madame Maïten Villeroy de Galhau et Monsieur Michel Piquet, pour leur aide précieuse à l'organisation et au bon déroulement des campagnes de prélèvement.

Je tiens aussi à remercier Monsieur Salaheddine Skali-Lami, Enseignant-Chercheur à l'ENSEM et Monsieur Pierre Levitz, Directeur de recherche au CNRS, pour avoir participé de près à la réalisation de cette thèse.

Un grand Merci à tous ceux qui ont contribué d'une manière symbolique ou significative, aux résultats expérimentaux de cette thèse. Je pense particulièrement à Madame Odile Barrès pour son aide en spectroscopie infrarouge et pour son extrême gentillesse, à Madame Isabelle Bihannic pour son aide en diffraction des rayons X et à Monsieur Patrick Billard, Enseignant-Chercheur à l'université de Nancy, pour m'avoir fourni les souches bactériennes pour développer le biofilm modèle et pour ses conseils scientifiques. Je remercie l'équipe du Service d'Analyse des Roches et des Minéraux (SARM-CRPG) du Nancy et particulièrement Madame Laure Sevin. Je remercie Madame Caroline Guilemette (CRPG) pour les analyses des isotopes stables. Je remercie Monsieur Denis Mangin et Monsieur Michel Champenois (CRPG) pour leur aide précieuse dans la réalisation des analyses à la sonde ioniques. Je remercie Madame Joëlle Gérard, pour m'avoir formé aux techniques de découpage de résine par microtomie et de coloration. Je remercie également Monsieur Denis Merlet et Monsieur David Billet de l'équipe de Chromatographie Ionique du Laboratoire des Interactions Microorganismes-Minéraux-Matière organique dans les sols (LIMOS). Je n'oublie pas de remercier l'équipe du Service Commun de Microscopies Electroniques et de Microsondes (SCMEM) de la faculté des sciences, et en particulier Monsieur Jaafar Ghanbaja et Monsieur Alain Kohler.

C'est avec grand plaisir que je remercie Madame Emmanuelle Montarges-Pelletier, Chargé de recherche au CNRS, Monsieur Guillaume Frappier et Monsieur Joseph Sielliechi pour leur aide précieuse pendant les campagnes de prélèvements.

Sincèrement, je remercie profondément mes collègues de bureaux pour m'avoir supporté ces quatre années, Estelle Sorrenti, Caroline Duriez, Erwan Paineau.

Un grand merci à tous les membres du laboratoire, sans lesquels les quatre années passées ici n'auraient pas été aussi agréables, et plus particulièrement Solange Maddi, Laurent

Michot, Christian Blachier, Cristelle Cailteau, Jean Pierre Sagou, Catalina Avela, Camille Rivard, Marie-ève Kraph, Karine Devineau, Manuel Pelletier, Angéline Razafitianamaharavo, Philippe Marion, Mukendi Kongolo, Tatiana Gerner, Frederic Villieras, Jérôme Duval, Elisabeth Schuller, Delphine Martin, et Yves Waldvogel.

Un grand merci à tous les membres du LIMOS pour m'avoir accueilli chaleureusement dans leur unité de recherche, et plus particulièrement Geneviève Mangin et Christine Friry pour la préparation des milieux de culture et à Thierry Beguiristain pour m'avoir fourni un échantillon d'urine fraîche pour les analyses isotopiques !

Je tiens à remercier mes amis, qui directement ou indirectement ont su me soutenir dans les moments difficiles particulièrement Rimond, Toufic, Farah, Mohamad, Amel et Hachem.

Pour terminer, je voudrais exprimer ma plus profonde reconnaissance à ma famille. Le mérite de ce travail leur revient en grande partie.

# TABLE DES MATIERES

<b>Abréviations.....</b>	<b>5</b>
<b>Introduction générale.....</b>	<b>10</b>
<b>REFERENCES.....</b>	<b>15</b>
<b>CHAPITRE I.....</b>	<b>17</b>
<b>ARTICLE .....</b>	<b>18</b>

**Isotopic tracing of water sources in an urban sewer:  
a multiple D,  $^{18}\text{O}_{\text{H}_2\text{O}}$ ,  $^{34}\text{S}$ ,  $^{18}\text{O}_{\text{SO}_4}$  stable isotope approach**

**INTRODUCTION**

**EXPERIMENTAL SECTION**

*1. Study area*

*2. Sample collection and analysis*

**RESULTS AND DISCUSSION**

*1. Suitability of isotopic systems*

*2. Stability of water and sulfate isotopic signatures in the sewer*

*3. Tracing parasitic sewer infiltration*

*4. Isotopic tracing in the sewer system at the city scale*

**CONCLUSION**

**REFERENCES**

<b>CHAPITRE II.....</b>	<b>42</b>
<b>ARTICLE .....</b>	<b>43</b>

**Phosphate dynamics in an urban sewer: a case study of Nancy, France**

**ABSTRACT**

**INTRODUCTION**

**EXPERIMENTAL SECTION**

*1. Study area*

*2. Sampling and chemical analyses*

*3. Mineral phosphate speciation*

**RESULTS**

*1. Phosphate content in sewage, biofilms and sewer sediments*

*2. Nature of mineral phosphate phases*

*3. Spatial and temporal evolution of phosphate species in the sewer network*

*4. Chemical extraction results*

**DISCUSSION**

*1. Origin of phosphate mineral species*

*2. Phosphate geochemistry in the urban sewer*

**CONCLUSION**

**REFERENCES**

**CHAPITRE III ..... 76**

**ARTICLE .....77**

**Dynamics of heavy metals and trace element carriers in sewer system during dry weather**

**ABSTRACT**

**INTRODUCTION**

**EXPERIMENTAL SECTION**

- 1. Study area*
- 2. Samples collection and preparation*
- 3. Chemical analyses of dissolved and particulate heavy metals*
- 4. Identification of mineral phases by X-ray diffraction*
- 5. Pollutant speciation by electron microscopy*

**RESULTS AND DISCUSSION**

- 1. Soluble heavy metals in wastewater, tap water and groundwater*
- 2. Particulate heavy metals in suspended matter (SM) and sewer sediments*
- 3. Speciation of trace elements carriers at different stages*

*Sewage*

*Bacterial biofilms*

*Sewer sediments*

*Washbasin siphon deposits*

*Sump pit deposits*

**CONCLUSION**

**REFERENCES**

**CHAPITRE IV ..... 112**

**ARTICLE .....113**

**Biofilm and suspended matter in the sewer system: examination at various scales**

**ABSTRACT**

**INTRODUCTION**

**EXPERIMENTAL SECTION**

- 1. Study area*
- 2. Sample collection and preparation*
- 3. Total bacteria enumeration*
- 4. Suspended matter size measurements*
- 5. Suspended matter and biofilm structure investigations*

**RESULTS AND DISCUSSION**

- 1. Enumeration of total bacteria*
- 2. Spatial evolution of suspended and organic matter*
- 3. Temporal evolution of suspended and organic matter*
- 4. Suspended matter size distribution*
- 5. Microscopy speciation of suspended matter*
- 6. Microscopy speciation of sewer biofilms*

**CONCLUSION**

**REFERENCES**



**CHAPITRE V ..... 141**

**ARTICLE .....142**

<b>Investigation of Biofilm growth in a Couette-Poiseuille reactor: new tools confocal laser microscopy observation</b>
<b>ABSTRACT</b>
<b>INTRODUCTION</b>
<b>EXPERIMENTAL SECTION</b>
<i>1. Bacterial strains</i>
<i>2. Biofilm reactor system</i>
<i>3. Sterilization and start-up procedure</i>
<i>4. Preparation of biofilm for microscopy investigation</i>
<i>5. Scanning confocal laser microscopy (SCLM) and image acquisition</i>
<i>6. Image processing and enhancement</i>
<i>7. 3D reconstruction</i>
<i>8. Statistical analyses</i>
<b>RESULTS AND DISCUSSION</b>
<i>1. Advantage of deconvolution</i>
<i>2. 3D reconstruction</i>
<i>3. Biofilm thickness</i>
<i>4. EPS bacteria relationship</i>
<i>5. Fractal dimension</i>
<b>CONCLUSION</b>
<b>REFERENCES</b>

**Conclusions et perspectives ..... 176**

<b>CONCLUSIONS.....</b>	<b>177</b>
<b>PERSPECTIVES.....</b>	<b>179</b>

---

**ANNEXES ..... 181**

**Annexe A ..... 182**

**I.1 SITE DE PRELEVEMENT..... 182**

**I.1-1 Localisation des sites de prélèvements.....182**

**I.1-2 Modalités des prélèvements .....187**

**I.1-3 Préparation et caractérisation globale des échantillons.....190**

**I.2 SPECIATION DES ECHANTILLONS ..... 196**

**I.2-1 Nature et origine des phases minérales.....197**

**I.2-1-1 Diffraction des rayons X ..... 197**

**I.2-1-2 Spectroscopie infrarouge ..... 198**

**I.2-1-3 Microscopie électronique à transmission (MET) ..... 199**

I.2-1-4 Microscopie électronique à balayage (MEB) .....	200
I.2-1-5 Sonde Ionique.....	201
I.2-1-6 Analyse des roches totales.....	203
I.2-1-7 Spéciation indirecte des phases phosphatées .....	204
<b>I.2-2 Spéciation de la phase soluble.....</b>	<b>210</b>
I.2-2-1 Dosage des éléments majeurs et traces .....	210
I.2-2-2 Détermination du carbone organique dissous .....	210
I.2-2-3 Spéciation géochimique.....	210
I.2-2-3-1 Détermination des isotopes stables de l'oxygène de l'eau ...	212
I.2-2-3-2 Détermination des isotopes stables du deutérium de l'eau .	213
I.2-2-3-3 Détermination des isotopes stables du soufre des sulfates dissous.....	213
I.2-2-3-4 Détermination des isotopes stables de l'oxygène des sulfates dissous.....	214
I.2-2-4 Spéciation microbiologique.....	215
I.2-2-4-1 Dénombrement de la microflore bactérienne totale .....	215
I.2-2-4-2 Dénombrement des bactéries sulfato- et ferri-réductrices..	216
<b>I.3 CARACTERISATION DES BIOFILMS .....</b>	<b>217</b>
<b>I.3-1 Biofilms naturels .....</b>	<b>217</b>
I.3-1-1 Inclusion en résine .....	217
I.3-1-2 Coloration à l'acridine orange .....	219
<b>I.3-2 Biofilms modèles.....</b>	<b>219</b>
I.3-2-1 Réacteur AirLift : RAL.....	219
I.3-2-2 Réacteur Couette-Poiseuille : RCP .....	221
I.3-2-3 Milieu de culture.....	222
I.3-2-4 Préparation de l'inoculum .....	223
I.3-2-5 Couplage RAL-RCP et opération du système .....	224
I.3-2-6 Microscope Confocal à Balayage Laser: CLSM.....	227
I.3-2-6-1 Principe et acquisition d'images au CLSM .....	227
I.3-2-6-2 Dispositif utilisé .....	231
I.3-2-6-3 Méthodologie du traitement d'images .....	233
I.3-2-6-3-1 Réattribution spectrale des signaux de fluorescence.....	234
I.3-2-6-3-2 Amélioration du seuillage et restauration des piles d'images .....	234
I.3-2-6-3-3 Seuillage et binarisation des piles d'images .....	236
I.3-2-6-3-4 Caractérisations morphométriques et analyses statistiques de biofilms .....	237
<b>REFERENCES .....</b>	<b>242</b>
<b>Annexe B.....</b>	<b>245</b>
<b>Annexe C .....</b>	<b>247</b>
<b>Annexe D .....</b>	<b>249</b>

# Abréviations

## **Sites de Prélèvement**

**BL** : Blanchisserie

**CHAR** : Parc du Charmois

**CHU** : Centre Hospitalier Universitaire

**CL** : Station de relevage à Clairelieu

**CM** : Château de Montaigut

**JB** : Jardin Botanique

**JV** : Jarville

**LE3** : Parc Charles III

**LO** : Rue Lion d'Or

**PAL** : Rue Palissot

**PR** : Place de la République

**PV** : Place des Vosges

**PVP** : Porte Verte Pulnoy

**RA** : Rue Alexandre

**RG** : Rue Roland Garros

**RM** : Rue de la Mothe

**SFN** : Station de relevage à Fleville Nord

**SLU** : Station de relevage à Ludres

**SP** : Sapeur Pompier, Rue pasteur à Ludres

**STD** : Stade Victor

**STEP** : Station d'Épuration de Malzéville

**UGC** : UGC Ludres

**VOI** : Rue frères voirin

## **Acronymes divers**

**ADN** : Acide Désoxyribonucléique  
**AO** : Acridine-Orange  
**ARN** : Acide Ribonucléique  
**ASTM** : American Society for Testing and Materials  
**BE** : Backscattered Electrons  
**BEI** : Backscattered Electrons Imaging  
**BH** : Milieu de culture Bushnell-Hass  
**BRGM** : Bureau de Recherches Géologiques et Minières  
**CAD** : Computer Aided Design  
**CDB** : Citrate-Dithionite-Bicarbonate  
**CDT** : Canon Dioblo Troilite  
**CF** : Flux Continu  
**Ch.I** : Chromatographie Ionique  
**CLSM** : Microscope Confocale à Balayage Lazer  
**CRPG** : Centre des Recherches Pétrographiques et Géochimiques  
**CSO** : Combined Sewer Overflow  
**CUGN** : Communauté Urbaine du Grand Nancy  
**DDSA** : Anhydride Dodécenylsuccinique  
**Df** : Dimension Fractal  
**Dfp** : Dimension Fractale de Périmètre  
**Dfs** : Dimension Fractale de Surface  
**DI** : Dual Inlet  
**DIA** : Digital Image Analysis  
**DMP 30** : 2-4-6-Tridiméthylaminométhylphénol  
**DO** : Dissolved Oxygen  
**DOC** : Dissolved Organic Carbon  
**DRX** : Diffraction des Rayons X  
**DSI** : Discrete Smooth interplotation  
**DTGS** : Sulfate de Triglycine Deutééré  
**E.Ch.** : Extraction Chimique des phosphates  
**EDTA** : Acide Ethylène-Diamine-Tétraacétique

**EDXS** : Energy-Dispersive X-ray Spectrometry

**EELS** : Electron Energy Loss Spectroscopy

**EPS** : Exopolymères

**GISP** : Greenland Ice Sheet Precipitation

**GPS** : Géo-Positionnement par Satellite

**GWS** : Groundwater Sampling

**ICP-AES** : Inductively Coupled Plasma - Atomic Emission Spectrometry

**ICP-MS** : Inductively Coupled Plasma - Mass Spectrometry

**IR** : Spectroscopie InfraRouge

**IRMS** : Spectromètre de Masse de Rapports Isotopiques

**K<sub>AB</sub>** : Facteurs de Kliff-Lorimer

**LB** : Milieu de culture Luria Bertani

**LEM** : Laboratoire Environnement et Minéralurgie

**LIMOS** : Laboratoire des Interactions Microorganismes-Minéraux-Matière Organique dans les Sols

**LMWL** : Local Meteoric Water Line

**LP** : Long Pass

**LSM** : Microscopie à Balayage Laser

**MCT** : Tellure de Mercure et de Cadmium

**MEB** : Microscopie Electronique à Balayage

**MES** : Matières En Suspension

**MET** : Microscopie Electronique à Transmission

**MNA** : Anhydride Méthyladique

**MPN** : Most Probable Number

**MV** : Matières Volatiles

**NA** : Numerical Aperture

**NIH** : National Institutes of Health

**NPP** : Nombre le Plus Probable

**OM** : Organic Matter

**ON** : Ouverture Numérique

**P** : Périmètre

**PBMF** : Primary Beam Mass Filter

**PDF** : Powder Diffraction File

**PMT** : Phot-Multiplicateurs

**PSD** : Position Sensitive Detector

**PSF** : Point Spread Function

**RAL** : Réacteur de type AirLift

**RCP** : Réacteur de type Couette-Poiseuille

**Re** : Reynold Number

**S** : Surface

**SARM** : Service d'Analyse des Roches et des Minéraux

**SCLM** : Scanning Confocal Laser Microscopy

**SCMEM** : Service Commun de Microscopie Electronique et de Microsonde

**SE** : Secondary Electrons

**SEI** : Secondary Electrons Imaging

**SI** : Sonde Ionique

**SLAP** : Standard Light Antarctic Precipitation

**SMOW** : Standard Mean Ocean Water

**SP** : Sump Pits

**SRB** : Sulfate-Reducing-Bacteria

**TSS** : Total Suspended Solid

**UV** : Ultra-Violet

**V** : Volume

**VS** : Volatile Solids

**V-SMOW** : Vienne-Standard Mean Ocean Water

**WWS** : Wastewater Sampling

**ZAM** : Zone Atelier du bassin de la Moselle

# Introduction générale



Dans sa forme la plus restreinte, le cycle urbain de l'eau recouvre le prélèvement d'une eau brute (eau de surface et/ou eau de nappe), sa potabilisation, sa distribution via le réseau d'adduction, la collecte des eaux usées dans le réseau d'assainissement, ainsi que leur épuration à la station de traitement avant leur rejet dans le milieu naturel. Le réseau d'assainissement se décline selon deux modes, le réseau unitaire qui évacue à la fois les eaux usées domestiques et une grande partie des eaux pluviales tombées en milieu urbain, et le réseau séparatif qui collecte les eaux usées domestiques séparément des eaux pluviales. En France, 80% des réseaux sont de type unitaire (Valiron et Tabuchi, 1992; Adler, 1992).

La majorité des travaux scientifiques concernant le cycle urbain de l'eau se sont focalisés sur les problèmes liés à la potabilisation de l'eau de surface, et à la distribution de l'eau traitée. Plus confidentielle, la recherche concernant l'amélioration des procédés d'épuration et le fonctionnement des réseaux d'assainissement n'est sortie de l'anonymat que récemment à la faveur des objectifs de gestion durable des eaux urbaines et de protection accrue des milieux récepteurs. En particulier, le statut du réseau d'assainissement a profondément évolué: considéré autrefois comme un simple système d'évacuation des eaux usées des villes, il est maintenant représenté en tant que véritable réacteur bio-physico-chimique participant au système de traitement des eaux usées (Hvitved-Jacobsen et al., 1995; Warith et al., 1998; Tangi et al., 2006).

Dans ce contexte, les matières en suspension, les biofilms, et les sédiments du réseau d'assainissement sont impliqués dans l'auto-épuration des eaux usées au cours de leur transport. Ainsi, une diminution des teneurs en carbone organique dissous, oxygène dissous, carbohydate et acétate, a été observée le long de portions de réseaux d'assainissement (Raunkjær et al., 1995; Chen et al., 2001; Huisman et al., 2004). Une partie de la matière organique dissoute et particulaire est donc assimilée par les bactéries en suspension ou les biofilms des parois (Warith et al., 1998). La production de gaz tel que le sulfure de dihydrogène dans les portions anaérobiques du réseau (eaux usées stagnantes, biofilms et sédiments), témoigne également de l'activité de celui-ci en tant que réacteur bio-physico-chimique. Ce gaz, provenant de la respiration des bactéries sulfato-reductrices, est impliqué dans la corrosion des conduites (Zhang et al., 2008) et la précipitation des métaux chalcophiles sous forme de sulfures augmentant ainsi la concentration en polluants métalliques des sédiments et des biofilms du réseau (El Samrani et al., 2004; Nielsen et al., 2005).

Ce mémoire de thèse contribue à décrire à l'échelle des matières en suspension, des biofilms et des sédiments, certains aspects du réseau d'assainissement en tant que réacteur bio-physico-chimique. Une première difficulté de cette approche provient de la signification à donner à une concentration en un élément donné et à son évolution au cours du transport des eaux usées. En effet, le réseau d'assainissement est un réacteur ouvert dans lequel toutes les entrées et les sorties ne sont pas maîtrisées. C'est le cas de l'intrusion des eaux parasites et de la perte des eaux usées par infiltration dans la nappe phréatique (Rutsch et al., 2008), résultant de défauts de conception et de fissures dans les collecteurs. Les entrées d'eaux claires impliquent une dilution des teneurs en polluants (Boller et al., 1997), et faussent le suivi de l'évolution des polluants le long du réseau.

Le premier chapitre de cette thèse cherche donc à identifier et à quantifier les apports d'eau au sein du réseau d'assainissement en période de temps sec. Une combinaison d'outils isotopiques,  $\delta^{18}\text{O}_{\text{H}_2\text{O}}$  et  $\delta\text{D}$  dans la molécule d'eau et  $\delta^{34}\text{S}$  et  $\delta^{18}\text{O}_{\text{SO}_4}$  dans les sulfates dissous, est utilisée pour estimer l'importance de ces différentes contributions. Le contraste géochimique entre les eaux usées et les infiltrations d'eaux claires dans le réseau, est assuré par l'alimentation en eau potable de la communauté urbaine de Nancy réalisée à partir de l'eau de Moselle traitée. Au contraire de l'eau, la concentration en sulfate n'est pas nécessairement conservative et un fractionnement isotopique supplémentaire peut résulter de l'action des bactéries sulfato-réductrices. L'applicabilité de cet outil dans le réseau nancéien est donc également discutée dans ce chapitre.

Un des objectifs initiaux de cette thèse était de déterminer la nature des phases porteuses de métaux lourds dans les matières en suspension, biofilms, et sédiments du réseau. Pour cela, des techniques de spéciation directe, les microscopies électroniques à transmission et à balayage couplées à la spectroscopie d'énergie dispersive des rayons X, ont été mises en œuvre. En fait, 40% des particules analysées se sont révélées être des phases phosphatées. Comme la nature minéralogique de ces minéraux est susceptible d'influer sur leur assimilation par les bactéries lors de la purification des eaux usées, nous avons cherché à préciser leur nature et l'évolution de celle-ci au sein du réseau d'assainissement. Une spéciation indirecte effectuée par une extraction séquentielle des différentes phases porteuses du phosphate, a également été tentée. Ces deux études portant sur la nature des phases phosphatées dans le réseau d'assainissement font l'objet du chapitre 2 de ce mémoire.

Le cycle géochimique des métaux lourds dans le réseau d'assainissement reste en grande partie méconnu. Si la néoformation de phases sulfurées au sein du réseau semble bien établie (El Samrani et al. 2004), l'importance de ce phénomène et les lieux de formation des sulfures restent à déterminer. En particulier, l'implication des biofilms bactériens dans le piégeage des métaux lourds et leur contribution à la charge totale des polluants transportés dans le réseau sont contradictoires (Chebbo et al., 2001; Rocher et al., 2004). Cette accumulation de phases sulfurées au sein du réseau prend pourtant une importance toute particulière lors des événements orageux. Dans ce cas, les eaux de ruissellement des surfaces urbaines s'ajoutent aux eaux usées dans le réseau unitaire pour donner un flot d'eaux pluviales qui lessive les sédiments déposés en temps sec (Boller et al., 1997; Chebbo et al., 2001). Ces dépôts représentent environ 50% des métaux lourds dans les rejets urbains de temps de pluie (Gromaire et al., 2001), les phases sulfurées représentant les porteurs majoritaires des éléments chalcophiles au pic de débit (El Samrani et al., 2004). Le chapitre 3 de la thèse fait donc le point sur la spéciation des métaux lourds dans les matières en suspension, biofilms, et sédiments du réseau en étendant celui-ci jusqu'au siphon d'évier des habitations individuelles. Les contributions relatives du réseau d'eau potable, de la nappe, et des apports anthropiques en éléments métalliques solubles dans les eaux usées sont également évaluées.

Les résultats concernant la matière organique dans le réseau, et en particulier les observations microscopiques à transmission et confocale effectuées sur les biofilms et matières en suspension des eaux usées sont rassemblés dans le chapitre 4. Bien que le petit nombre des échantillons étudiés ne permette pas d'assurer la représentativité de l'ensemble du réseau, les observations microscopiques révèlent les échanges de matière entre biofilms et eaux usées, notamment par la présence de cellulose participant à la géométrie du biofilm, et par la mise en évidence de morceaux de biofilms détachés dans les eaux usées. La microscopie électronique à transmission sur échantillons inclus en résine confirme également une biodégradation active au sein du réseau d'assainissement.

Préciser les conditions hydrodynamiques du détachement des biofilms du réseau, éventuellement en présence de phases sulfures, représentait un des axes de recherche de cette thèse. Pour cela, nous avons développé un réacteur de croissance des biofilms qui permet d'étudier l'architecture de ceux-ci sous conditions hydrodynamiques contrôlées. Le chapitre 5 présente la description du montage expérimental correspondant, ainsi que les protocoles

d'observation des biofilms obtenus en microscopie confocale, d'amélioration de la résolution spatiale des images, de reconstruction 3D des biofilms, ainsi que la quantification géométrique de ceux-ci (épaisseur, profil de profondeur, dimension fractale, hétérogénéité, connexité, co-localisation bactéries-polymère...). Seule la croissance d'un biofilm modèle en l'absence de phases sulfures a pu être étudiée dans le cadre de cette thèse, la mise au point de l'ensemble des procédures expérimentales s'étant révélée plus longue que prévue.

Ce mémoire est présenté sous forme de publications scientifiques. Comme la partie «Matériels et méthodes» de ces articles ne permet pas de transmettre l'ensemble du savoir-faire acquis au cours de ce doctorat, une présentation plus détaillée des techniques et des protocoles analytiques développés est reportée en annexe.

## REFERENCES

Adler, E. (1992) Aperçu des techniques de traitement des eaux pluviales. Actes des troisièmes journées du Diploma d'Etudes Approfondies. Sciences et techniques de l'environnement. Ecole Nationale des Ponts et chaussées. 209-227.

Boller, M. (1997) Tracking heavy metals reveals sustainability deficits of urban drainage systems. *Wat. Sci. Technol.* 35(9), 77-87.

Chebbo, G., Gromaire, M.C., Ahyerre, M., Garnaud, S. (2001) Production and transport of urban wet weather pollution in combined sewer systems: the "Marais" experimental urban catchment in Paris. *Urban Water.* 3, 3-15.

Chen, G.H., Leung, D.H.W., and Huang, J.C. (2001) Removal of dissolved organic carbon in sanitary gravity sewer. *J. Environ. Eng.* 127(4), 295-301.

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

Gromaire, M.C., Garnaud, S., Saad, M., Chebbo, G. (2001) Contribution of different sources to the pollution of wet weather flows in combined sewers. *Water Res.* 35 (2), 521-533.

Hvitved-Jacobsen, T., Raunkjaer, K., Nielsen, P.H. (1995) Volatile fatty acids and sulfide in pressure mains. *Wat. Sci. Tech.* 31(7), 169-179.

Huisman, J.L., Gasser, T., Gienal, C., Kühni, M., Krebs, P., Gujer, W. (2004) Quantification of oxygen fluxes in a long gravity sewer. *Water Res.* 38, 1237-1247.

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

Raunkjær K., Hvitved-Jacobsen T., Nielsen P.H. (1995) Transformation of organic matter in a gravity sewer. *Water Environ. Res.* 67(2), 181-188.

Rocher, V., Azimi, S., Moilleron, R., Chebbo, G. (2004) Hydrocarbons and heavy metals in the different sewer deposits in the 'Le Marais' catchment (Paris, France): stocks, distributions and origins. *Sci. Total Environ.* 323, 107-122.

Rutsch, M., Rieckermann, J., Cullmann, J., Ellis, J.B., Vollertsen, J., Krebs, P., 2008. Towards a better understanding of sewer exfiltration. *Water Res.* 42, 2385-2394.

Tanji Y., Sakai R., Miyanaga K., Unno, H. (2006) Estimation of self-purification capacity of biofilm formed in domestic sewer pipes. *Biochem. Eng. J.* 31, 96-101.

Valiron, F., Tabushi J-P (1992) Maîtrise de la pollution urbaine par temps de pluie- Etat de l'art. Lavoisier, TEC&DOC. p564.

Warith, M.A., Kennedy, K., Reitsma, R. (1998) Use of sanitary sewers as wastewater pre-treatment systems. *Waste Mang.* 18, 235-247.

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

# *CHAPITRE*

## *(I)*

Identification et  
quantification des apports  
d'eau au sein du réseau  
d'assainissement

**Isotopic tracing of water sources in an urban sewer: a multiple  
D,  $^{18}\text{O}_{\text{H}_2\text{O}}$ ,  $^{34}\text{S}$ ,  $^{18}\text{O}_{\text{SO}_4}$  stable isotope approach**

J. Houhou<sup>1\*</sup>, B.S. Lartiges<sup>1\*</sup>, C. France-Lanord<sup>2</sup>, C. Guilmette<sup>2</sup>, S. Poix<sup>1,2</sup>, C. Mustin<sup>3</sup>

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

<sup>2</sup>*Nancy University - CRPG-CNRS, 15 rue notre dame des pauvres, BP20, 54501 Vandoeuvre  
Cedex, France*

<sup>3</sup>*Nancy-University - LIMOS-FST / UHP-CNRS 7137 boulevard des Aiguillettes, BP 239-  
54506 Vandoeuvre Cedex, France*

E-mail : [jamil.houhou@hotmail.fr](mailto:jamil.houhou@hotmail.fr), [bruno.lartiges@ensg.inpl-nancy.fr](mailto:bruno.lartiges@ensg.inpl-nancy.fr)

(\*) To whom correspondence should be addressed

Soumis au journal **Water Research**



## **INTRODUCTION**

The infiltration of clear water into sanitary sewers is a major concern in urban water management. Estimates of the parasitic discharge reported in the literature range from 30 to 72 % (Valliron and Tabuchi, 1992; Verbanck, 1993; Kracht and Gujer, 2005; Kracht et al., 2007). This leads to a significant increase in sewage flow reaching the wastewater treatment plant, and hence in the cost of treatment. The infiltrating water also modifies the sewage chemistry not only by simple dilution of major wastewater components, but also by addition of supplementary pollutants (Houhou et al., in preparation), or by precipitation of phosphate solid phases (Houhou et al., accepted). Therefore, such parasitic discharges further complicate any attempt to evaluate the role of the sewer system as a pre-treatment stage of wastewater (Hvitved-Jacobsen et al., 1995; Warith et al., 1998).

The amount of infiltrating water is usually inferred from the minimal nocturnal flow of wastewater. Closed circuit television and walk-through inspections can then provide a direct survey of defectuous sewer lines (Madryas and Szot, 2003). The fraction of clear water can also be obtained more accurately by following both the wastewater flow and the concentration of specific sewage components such as borates (Verbanck, 1993), or chemical oxygen demand (Kracht and Gujer, 2005). In recent years, stable isotopes of water have been increasingly used in the context of urban hydrological cycle essentially to investigate groundwater recharge from leaking sewers and water mains (Butler and Verhagen, 1997; Barret et al., 1999; Navarro et al., 2007). Such approach also shows promise for monitoring both the origin and the amount of extraneous waters in the sewer system (Kracht et al., 2007). The method only requires that the isotopic signature of sewage is distinct from that of infiltrating water, which is the case in most cities where drinking water (a proxy for sewage) is imported from outside the urban catchment area.

In contrast, the potential of stable sulfate isotopes as tracers of water sources is still under-exploited (Barret et al., 1999; Osenbrück et al., 2007). The wide range of sulfate isotopic signatures suggests that they might be sensitive indicators provided that possible microbially mediated sulfate reduction does not alter the isotopic content of dissolved sulfate (Knöller et al., 2008). In this study, we used both stable isotopes of water and dissolved sulfate, and hydrochemistry data to describe hydrological processes occurring in Greater Nancy sewer system. Such approach, by allowing the identification and the quantification of

various water sources that enter the sewer, is a pre-requisite to an improved understanding of sewer functioning.

## **EXPERIMENTAL SECTION**

### ***1. Study area***

This study was conducted in the Greater Nancy urban catchment between Novembre 2004 and December 2006. Nancy, a city of about 270 000 inhabitants located in north-eastern France, lies on both banks of Meurthe river with a total catchment area of 193 Km<sup>2</sup> (144 km<sup>2</sup> on left bank) (Fig. 1). As the Meurthe river water is brackish, the municipal water system is supplied with treated surface water originating from Moselle river. The source of Moselle river is located in the Vosges mountains, 250 km southeast of Nancy. Moselle river mainly drains silicate formations in the upper part of the catchment, whereas it flows on carbonate and evaporite sediments downstream of Epinal (Brenot et al., 2007). The imported water is pumped at Messein and conveyed to the drinking water treatment plant through two 11 km aqueducts. Three reservoirs with a total storage capacity of 2.5 10<sup>6</sup> m<sup>3</sup> secures the water supply in case of pollution or high turbidity level in the Moselle river. The drinking water distribution system delivers daily about 67600 m<sup>3</sup> via 950 km of pipes and 33 storage facilities (Total capacity of 600 000 m<sup>3</sup>). Approximately 26% of drinking water is lost through leakage.

The sewer system comprises about 1200 km of pipes, 250 km of them man-entry sewer (pipe diameter  $\geq$  1.2 m). As Nancy is established in a hill basin with hills dominating the Meurthe valley by about 200 m, the slope of the gravity sewer pipe may reach 5%. The central core of Nancy urban community is served by a combined sewer, whereas the peripheral areas are drained by separate systems. 25 detention basins (180 000 m<sup>3</sup> storage capacity) have been constructed to limit discharges from combined sewer overflows in the Meurthe river.

As depicted in figure 1, the geological subsurface of Nancy area is composed of three main units: the downtown area is underlain by Meurthe river alluvial deposits, Toarcian shales extend to the hillsides, whereas Bajocian recifal limestone caps the surrounding hills. Shallow aquifers are found in the three geological units, their hydraulic head being monitored from 40 piezometers spread over the catchment area. However, the rather narrow diameter of

most piezometers prevented groundwater sampling with the submersible pump in the vicinity of sewage sampling sites. Groundwater recharge occurs mainly from rainfall infiltration, leakage from water mains being negligible (< 4% over the catchment area).

The local climate is continental with an average annual precipitation of 760 mm occurring mostly during summer. Temperature and precipitation data were obtained from Nancy-Essey meteorological weather station, whereas Moselle river flow discharge data were measured at nearby gauge Tonnoy (Hydro Bank, Moselle Tonnoy Station, A5110610).

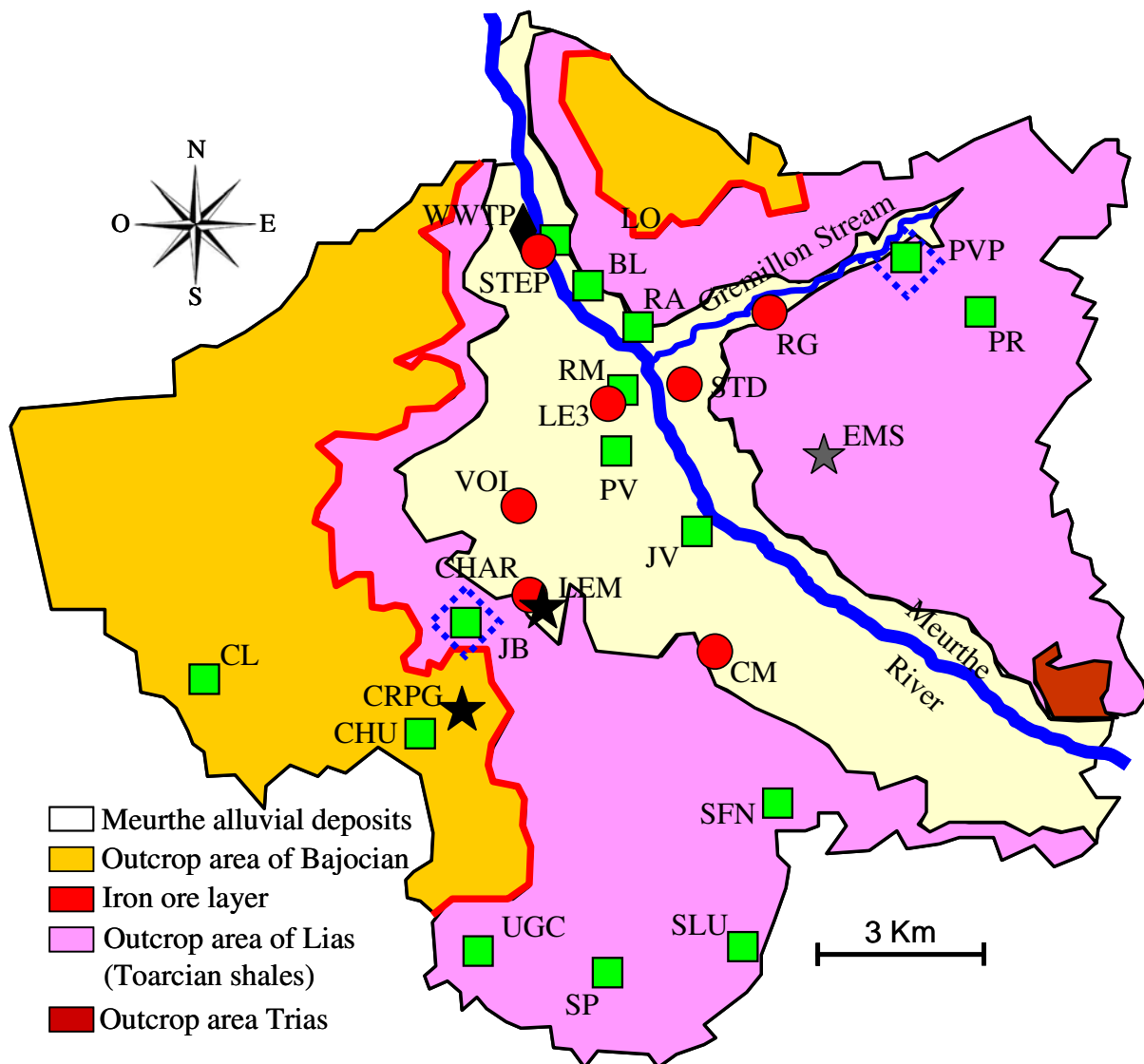
## ***2. Sample collection and analysis***

Three sampling campaigns (29-30 march 2005, 4-5 april 2006, 25-26 october 2006) are reported in this paper. The location of sampling sites for sewage, drinking water, rainwater, and groundwater is shown in figure 1. A detailed description of those sampling sites has been provided in a previous publication (Houhou et al., accepted). Supplementary information on piezometers location and characteristics are given in table 1. Figure 2 shows the temporal evolution of rainfall amounts and Moselle river flow discharge, during the month preceding each of three sampling campaigns. Sampling was generally conducted in dry weather, the minor precipitation event on March 29 not generating surface runoff. It should be noted that snowfalls occurred during the last two weeks of February 2005, which then led to the application of deicing salts on the roads.

Grab-samples of sewage were taken from the sewer through open manholes using a polyethylene bucket, whereas groundwater was collected from piezometers using a portable submersible pump (Mini-Twister, 9.5 L/min). The piezometer was first purged for at least three well volumes before being sampled. Integrated rainwater samples were collected between september 2006 and november 2006 using a labmade sampler placed on the roof of LEM laboratory. Tap water was sampled at CRPG and LEM laboratories before and after the sewage sampling campaigns. Prior to sampling, the faucet was left open for 15 min.

Sample characteristics such as temperature, pH, conductivity, dissolved oxygen concentration, redox potential (WTW, Multiline F/SET) were measured immediately after collection. The water sample was then filtered on-site through pre-washed 0.22 µm pore size cellulose-acetate membranes (Chromafil CA-20/25) and split into five aliquots for cations, anions, dissolved organic carbon (DOC), and isotopic analyses. The filtrates were stored in

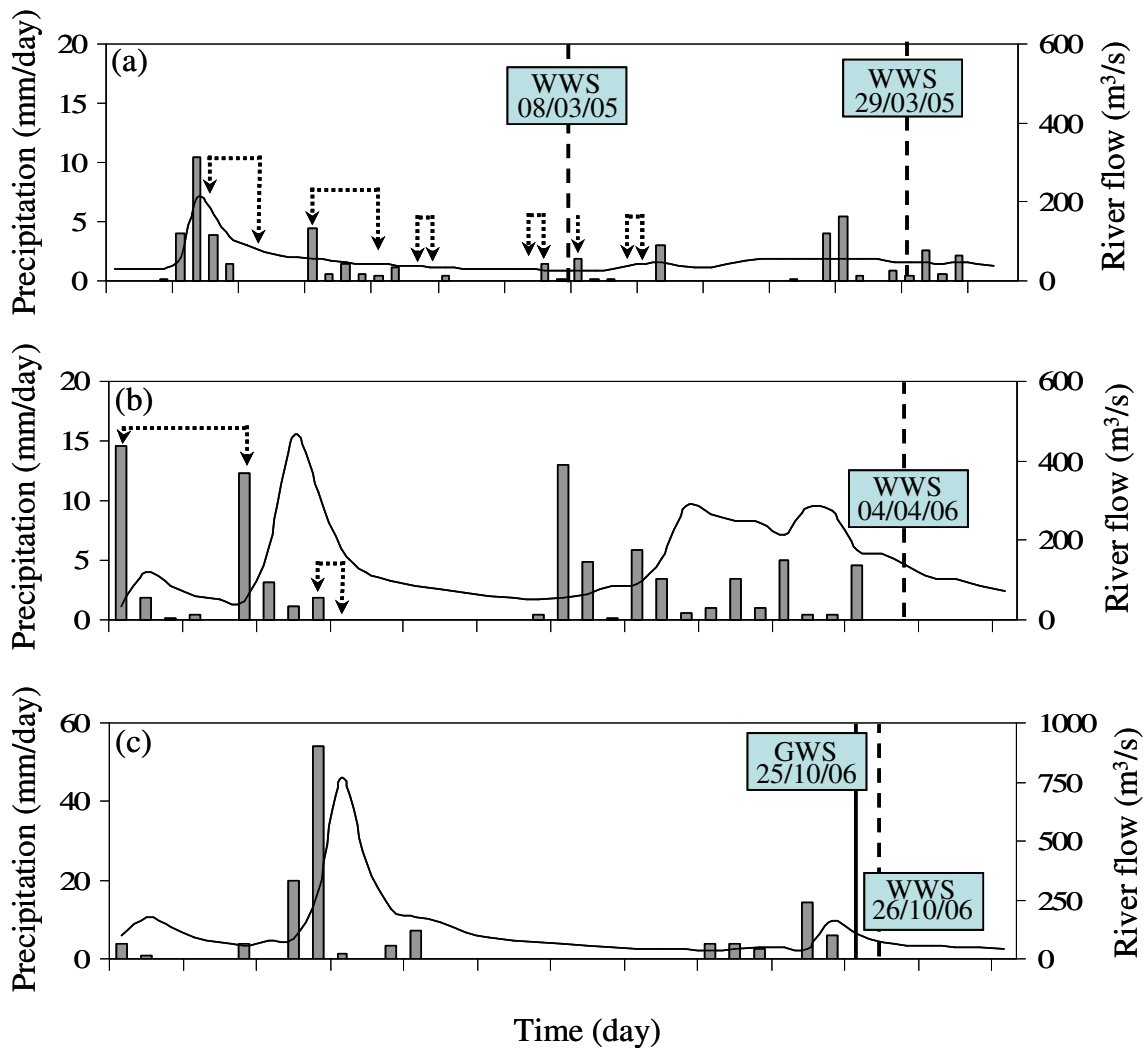
65 mL polyethylene or glass bottles at 4°C until analysis. Soluble cation and trace element concentrations were measured on HNO<sub>3</sub> acidified samples using a Jobin-Yvon JY70 ICP-AES (Inductively Coupled Plasma Atomic Emission Spectrometry) and Perkin-Elmer ELAN 6000 ICP-MS (Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry), respectively. Uncertainties were better than 2% for major cations and 5% for trace elements. Sulfate, chloride, nitrate, and phosphate anions were determined by ion chromatography using a Dionex ICS-3000 (AS9-HC column). The lower detection limits were 50 ppb for PO<sub>4</sub> and 20 ppb for the other anions. DOC was measured with a Dohrman 190 analyzer.



**Figure 1.** Geological map of Nancy city and sampling sites in studied sewer sections (green square), groundwater (circle), tap water (black star). The two dashed rhombus represent the diurnal cycle sampling sites. Meteoric water was sampled at LEM site. Precipitation level was collected from Essey-lès-Nancy Meteoric Station (gray star).

**Table 1.** Sampling characteristics of piezometer sites.

Sampling site	GPS coordinates			Diameter (cm)	Depth to groundwater (m)
	48° --,---N	006 --,---E	Altitude (m)		
CHAR	40.065	10.414	242	5	0.88
VOI	40.654	10.230	242	5	7.63
LE3	41.341	11.487	238	5	3
STD	41.334	12.104	216	11.5	-
RG	41.998	13.209	206	5	1.12
STEP	42.641	10.509	185	100	4.7
CM	39.816	12.977	232	100	-



**Figure 2.** Precipitation level (gray column) and river flow profile (black line) preceding, during and after wastewater (WWS) and groundwater sampling (GWS). Fig. 2a: wastewater sampling along the sewer (section 2; 08 March 2005) and during one diurnal cycle (29 March 2005); Fig. 2b: second diurnal cycle (04 April 2006). Fig. 2c: groundwater (25 October 2005) and wastewater sampling (section 1: 26 October 2006; section 2: 26bis October 2006). Dashed arrows indicate the snow event.

Total and sulfate-reducing-bacteria (SRB) were enumerated in 35 mL and 20 mL sewage samples, respectively, using the most-probable-number technique. A Luria Bertani medium (LB Sigma) sterilized by autoclaving at 120°C during 20 min, was used to grow cultivable bacteria. SRB were grown from a laboratory made medium composed of 900 mL solution A (yeast extract 1 g, peptone 1.5 g,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.5 g, NaCl 0.5 g,  $\text{CaCl}_2$  0.1 g,  $\text{NaHCO}_3$  2.5 g,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  0.225 g, sodium lactate 1 g, oligoelements solution and vitamin solution 10 mL), and 100 mL solution B ( $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  4g and  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$  1g). Solution A was sterilized by autoclaving at 120°C for 20 min, whereas solution B was filtrated on a sterile 0.22  $\mu\text{m}$  pore size cellulose-acetate filter. Both solutions were mixed just before bacteria inoculation. 10 mL sewage aliquots were taken and 10-fold serial dilutions were made in sterile NaCl 8%. 25 $\mu\text{L}$  of each dilution were then inoculated in 200  $\mu\text{L}$  of culture medium placed in sterile microplaque wells. 40 replicates were carried out for each dilution. Microplaques were incubated at 24°C for 48 hours and at 28°C for 5 days for total bacteria and SRB, respectively. It should be pointed out that all 10-fold serial dilutions, medium preparation, and incubation for SRB enumeration, were carried out under anoxic conditions ( $\text{N}_2$  80%,  $\text{CO}_2$  10%,  $\text{H}_2$  10% - Anoxomat TTO, France). After incubation, the optical density of inoculated wells was measured at 620 nm (BioTek Instrument), and the most-probable-number was determined using MPN calculator software 4.04 (EPA).

The oxygen isotope composition of water was measured by the conventional  $\text{H}_2\text{O}-\text{CO}_2$  equilibration method (Epstein and Mayeda, 1953), using a modified VG 602D dual-inlet mass spectrometer (Brenot, 2006). D/H isotopic ratio was obtained with a Isoprime mass spectrometer (GV Instruments, Manchester, UK) coupled with an elemental analyzer EA3000 after reducing the water to hydrogen gas on chromium at 1050°C (Morrison et al., 2001). The dissolved sulfate in water samples and aluminum coagulant used at the drinking water plant, was precipitated as  $\text{BaSO}_4$  by adding a 5%  $\text{BaCl}_2$  solution (Brenot et al., 2007). In order to prevent  $\text{BaCO}_3$  co-precipitation, the water samples were first acidified with HCl to pH 4.2 and then heated to boiling point to ensure a complete removal of  $\text{CO}_2$ .  $\text{BaSO}_4$  precipitates were carefully washed and dried, and purity was checked by X-ray Diffraction (Bruker D8 diffractometer). The sulfur isotopic composition was analyzed from the  $\text{SO}_2$  released from  $\text{BaSO}_4$  at 1100°C in presence of Sn and tungsten oxide (Giesemann et al., 1994), whereas the  $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$  of  $\text{SO}_4$  was determined from the CO generated by mixtures of  $\text{BaSO}_4$  and glassy carbon at 1270°C in presence of Ni catalyst (Koziet, 1997).  $^{34}\text{S}/^{32}\text{S}$  and  $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$  isotopic ratios

of sulfate were measured using a GV Instruments Isoprime mass spectrometer coupled in continuous flow mode with a EuroVector elemental analyzer.

The results are reported in  $\delta$ -notation ( $\delta^{18}\text{O}_{\text{H}_2\text{O}}$ ,  $\delta\text{D}$ ,  $\delta^{34}\text{S}$ ,  $\delta^{18}\text{O}_{\text{SO}_4}$ ), i.e. the permil deviation of the measured isotopic ratio ( $R_{\text{sample}}$ ) relative to a reference material ( $R_{\text{ref.mat.}}$ ):

$$\delta = \left( \frac{R_{\text{sample}}}{R_{\text{ref.mat.}}} - 1 \right) * 1000$$

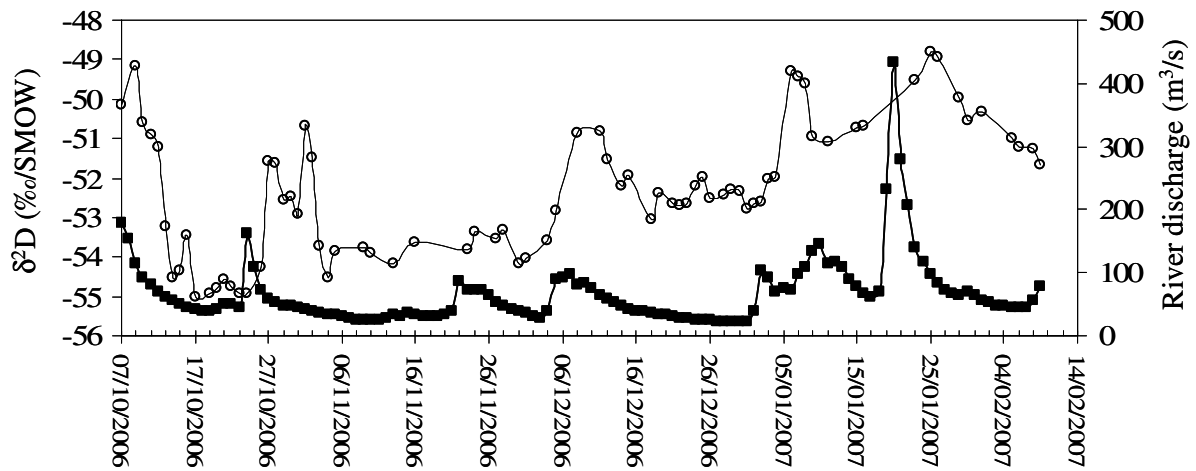
The standards materials are V-SMOW (Vienna Standard Mean Ocean Water) for  $\delta^{18}\text{O}_{\text{H}_2\text{O}}$ ,  $\delta^{18}\text{O}_{\text{SO}_4}$  and  $\delta\text{D}$ , and CDT (Canyon Diablo Troilite) for  $\delta^{34}\text{S}$ . The accuracy of isotopic analyses was estimated by replicate analyses of internal-standards along with the sample series. Data presented in this study are given with uncertainty of  $\pm 0.2\text{‰}$  and  $\pm 1\text{‰}$  for  $\delta^{18}\text{O}_{\text{H}_2\text{O}}$  and  $\delta\text{D}$  respectively, and the overall reproducibility ( $2\sigma$  level) of  $\delta^{18}\text{O}_{\text{SO}_4}$  and  $\delta^{34}\text{S}$  analyses is better than  $0.3\text{‰}$  using the barium sulfate NBS 127 international reference.

## **RESULTS AND DISCUSSION**

### ***1. Suitability of isotopic systems***

The identification of various water sources that may contribute to the flow of sewage requires, to the least, measurable isotopic differences between them. Previous successful studies using stable isotopes of water in an urban context relied on quasi-constant hydrological differences between the source of water supply (i.e. reservoir or lake water) and the local groundwater (Butler and Verhagen, 1997; Kracht et al., 2007). In our case, the water supply comes from treated Moselle river water, which ensures that drinking water, and hence domestic sewage, possesses a distinct isotope composition from local rainwater and groundwater. Indeed, the isotopic signature of meteoric waters depends on local geographic and climatic factors, whereas that of groundwater integrates over time the composition of water inputs (precipitation, mains and sewer leaks...) that recharge the aquifer. However, the hydrological regime of a river may strongly influence the isotopic signal of the surface water, and accordingly that of the corresponding treated water. As illustrated in figure 3, the temporal evolution of  $\delta\text{D}$  values from tap water collected at CRPG over a four month period, clearly follows the discharge of Moselle river with a temporal shift of about 4 days. A decrease in  $\delta\text{D}$  that ranges from 2 to  $5\text{‰}$ , can be measured after each peak in flow discharge.

The temporal shift between the two curves includes both the transport of surface water from the pumping facility to the treatment plant, the treatment of raw water, and the residence time within the drinking water distribution system. As a result, a drinking water of slightly varying isotopic composition may be served simultaneously in the urban community. Nevertheless, the deviation in  $\delta D$  was not observed to exceed 2‰ over two consecutive days, which is of the order of analytical uncertainty for  $\delta D$ .

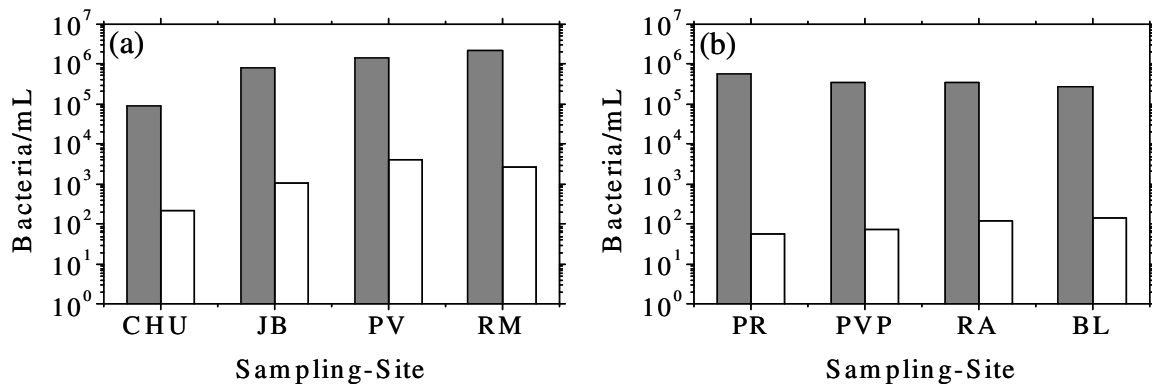


**Figure 3.** Temporal evolution of Moselle river flow rate and  $\delta D$  of drinking water collected at CRPG laboratory.

The applicability of stable sulfate isotopes to differentiate water inputs in the sewer system is more arguable. On the one hand, dissolved sulfate may be derived from a variety of sources (evaporite dissolution, sulfide minerals oxidation, atmospheric precipitation,...), whose distinct isotopic signatures make  $\delta^{34}S$  and  $\delta^{18}O_{H_2O}$  effective indicators for investigating hydrological processes (Berner et al., 2002; Osenbrück et al., 2007). On the other hand, dissolved sulfate rarely behaves as a conservative tracer, both its concentration and its isotopic composition being most often affected by a combination of redox reactions and physico-chemical processes such as  $H_2S$  release and mineral sulfide precipitation (van Everdingen and Krouse, 1985; Knöller et al., 2008). In the sewer system, microbially mediated sulfate reduction is likely to occur (Zhang et al., 2008). This would induce significant, but not easily predictable, isotopic fractionations (Rudnicki et al., 2001), essentially characterized by an enrichment in heavier isotopes in the remaining dissolved sulfate (Chambers and Trudinger, 1979). Such fractionation could then drastically alter the initial isotopic composition of sulfate.



In the present study, the isotopic signatures of local water sources should allow a ready discrimination: the  $\delta^{34}\text{S}$  values of dissolved sulfate in Moselle river water vary from 12.1‰ to 13.4‰ with little seasonal variation (Brenot et al., 2007), that of rainwater are about 5.8‰ (Brenot et al. 2007) which is consistent with the range of published values for atmospheric sulfate derived from anthropogenic sources (Yu et al., 2007), whereas groundwater from Toarcian aquifers should display a negative isotopic signal as dissolved sulfate originates in that case from sulfide oxidation (Goldhaber and Kaplan, 1980). Furthermore, the sloped catchment maintains relatively high oxygen contents ( $4.06 \pm 3.29$  mg/L) in most sewer pipes, and as a result, the number of sulfate-reducing bacteria in sewage was found rather limited (counts lower than 4033 per mL) (Fig. 4).

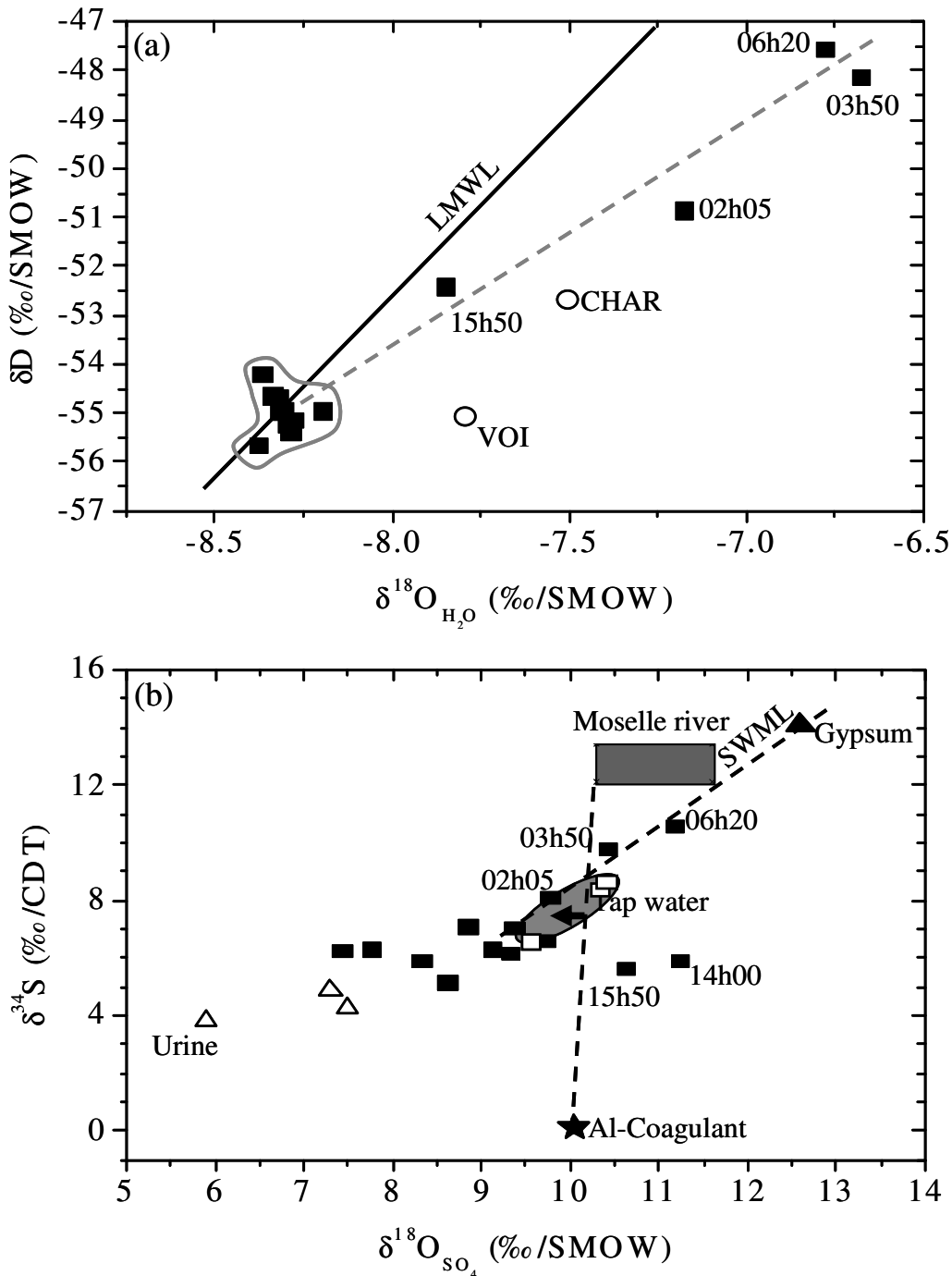


**Figure 4.** Evolution of total bacteria number (gray column) and sulfate-reducing bacteria number (white column) along sewer sections 1 (a) and 2 (b).

## 2. Stability of water and sulfate isotopic signatures in the sewer

Figure 5a shows the  $\delta\text{D} - \delta^{18}\text{O}_{\text{H}_2\text{O}}$  plot of sewage samples collected during a diurnal investigation (29 March 2005) in a trunk from the separate domestic sewer that was unlikely to undergo groundwater infiltration. In that context, the temporal evolution of isotope signals is expected to be limited. Indeed, for stable isotopes of water, most of  $\delta^{18}\text{O}_{\text{H}_2\text{O}} - \delta\text{D}$  values fall into a small range close to the local meteoric water line. However, four samples (sewage taken at 15h50, 02h05, 03h50, and 06h20) clearly diverge to the right of LMWL and show a fair correlation between  $\delta\text{D}$  and  $\delta^{18}\text{O}_{\text{H}_2\text{O}}$  values. Such linear trend is reminiscent of a local evaporation line, the observed slope of about 4 being typical of waters undergoing secondary evaporative isotopic enrichment (Gibson et al., 2008). However, a significant increase in sewage flow rate was noted at these particular sampling times. This suggests that the observed correlation would rather correspond to a binary mixing line between two water sources.

Groundwaters collected from two piezometers located nearby the study site show a distinct isotopic composition (Fig. 5a) and can not identify the unknown end-member source.



**Figure 5.** Water signature isotopic distribution ( $\delta D$  as function of  $\delta^{18}O_{H_2O}$ ) of the first wastewater (black square) diurnal cycle sampled in 29 Mars 2005 (Fig. 5a); Black line is the local meteoric water line (LMWL) of rainwater collected from September to November 2006 in Nancy city; Dashed gray line show the trend of after night wastewater samples. Fig. 5b:  $\delta^{34}S$  and  $\delta^{18}O_{SO_4}$  of dissolved sulfate in the same wastewater (black square), urine (white triangle), Moselle river water (gray rectangle), sulfate from Al-coagulant (black star) used in the tap water treatment plant and gypsum (black triangle).

The distribution of stable sulfate isotopes ( $\delta^{18}\text{O}_{\text{SO}_4}$  and  $\delta^{34}\text{S}$ ) reveals a slightly different pattern (Fig. 5b). If the four previous samples are again characterized by a distinct trajectory denoted SWML hereafter, the other  $\delta^{18}\text{O}_{\text{SO}_4}$  values vary from 7.4‰ to 11.2‰ with an almost constant  $\delta^{34}\text{S}$  at 6.3‰. Interestingly, the isotopic signature of gypsum from evaporite layers ( $\delta^{34}\text{S} = 14.1\text{‰}$  and  $\delta^{18}\text{O}_{\text{SO}_4} = 12.6\text{‰}$ ) (Brenot et al., 2007), is situated on SWML, suggesting that this sulfate source contributes to the isotopic composition of four samples. In that case, the unknown end-member water source could correspond to surface runoff, since some gypsum is present in the deicing salt used for melting snow and ice on roadways (Legret and Pagotto, 1999). Moreover, as shown in table 2, the concentrations in anions and trace elements of samples collected at 3h50 and 06h20 are remarkably close to the median compositions of filtered runoff waters collected by Legret (1999). Indeed, Greater Nancy Hydraulic Departement later confirmed that a retention basin was emptied in that section of separate domestic sewer during low-flow periods. Assuming that the 6h20 sample represents the end-member source, the deviation from LMWL observed for water isotopes suggests that the amount of rainwater evaporated during surface runoff was about 6% for that particular rain event (Craig and Gordon, 1965).

**Table 2.** Anion and trace element concentrations of samples collected at 15h50 and after midnight, compared to Legret results.

	$\text{NO}_3^-$ (mg/L)	$\text{Cl}^-$ (mg/L)	$\text{SO}_4^{2-}$ (mg/L)	Pb ( $\mu\text{g/L}$ )	Cu ( $\mu\text{g/L}$ )	Cd ( $\mu\text{g/L}$ )	Zn ( $\mu\text{g/L}$ )
15h50	5.7	44.1	25.2	0.6	7.3	<dl	188
02h05	3.7	44.7	64.2	1.1	12.9	0.06	38.9
03h50	3.5	38.3	43.6	0.5	11.0	<dl	39.0
06h20	2.6	30.5	25.1	0.2	15.6	<dl	22.1
Legret (1999)	4	18	34	2.6	19	0.33	147

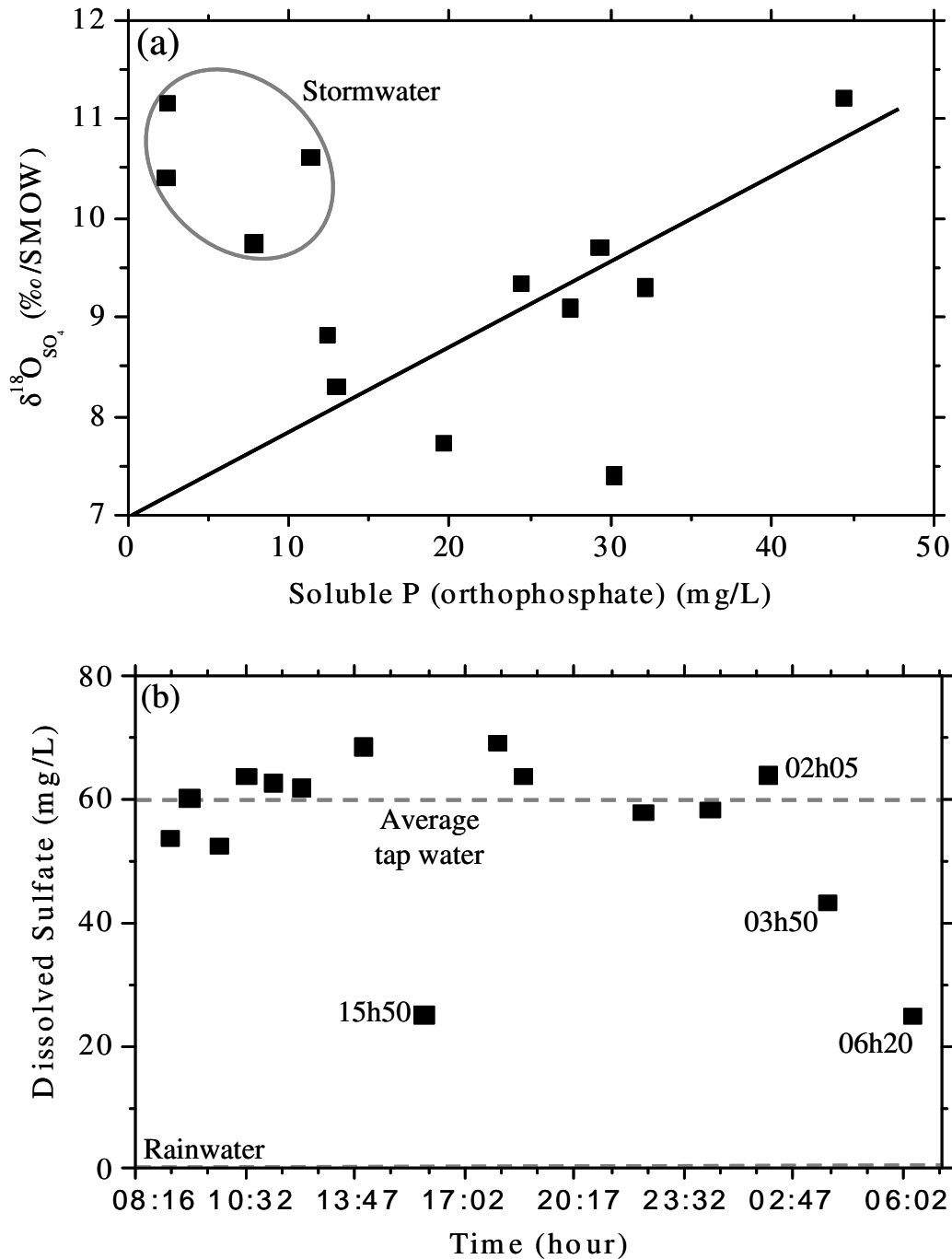
Figure 5b also reveals that the isotopic composition of sulfur in drinking water ( $\delta^{34}\text{S} = 6.70\text{‰}$ ) has undergone a significant depletion in  $^{34}\text{S}$  compared with that of Moselle river water (from 12.1‰ to 13.4‰). Such variation is primarily due to the addition of aluminum sulfate ( $\delta^{34}\text{S} \sim 0\text{‰}$ ) during the coagulation stage of raw water treatment. Furthermore, as indicated by the arrow in figure 5b, the measured  $\delta^{18}\text{O}_{\text{SO}_4}$  is generally slightly shifted to the left of possible mixing lines between the aluminum coagulant and the Moselle river water end-member sources. This presumably originates from the oxidation of carbon-bonded sulfur contained in natural organic matter (Brenot et al., 2007), the raw water being chlorinated at the pumping facility. The  $\delta^{34}\text{S}$  value of carbon-bonded sulfur is generally similar to that of

initial sulfate contained in rainwater, i.e. about 5.8‰ in the present study (Brenot et al., 2007), and it does not significantly change upon re-oxidation (Krouse and Grinenko, 1991).

The isotopic signal of sulfur remains relatively constant in sewage samples during the diurnal investigation, whereas that of oxygen presents a slight enrichment in lighter  $^{16}\text{O}$  for most of them (Fig. 5b). Such variation in oxygen isotopic composition suggests that a supplementary source may contribute to the dissolved sulfate pool in sewage. The fair correlation obtained between  $\delta^{18}\text{O}_{\text{SO}_4}$  and phosphate concentration (Fig. 6a) identifies sulfate from human excreta as a potential source. Inorganic sulfate represents the main end-product of sulfur metabolism in the human body, though other forms such as ester sulfate represent a 9-15% fraction of urinary sulfate (Hoffer et al., 2005). Sulfate excreted in urine derives from the oxidation of aminoacids such as cysteine and methionine. To our knowledge, the  $\delta^{18}\text{O}_{\text{SO}_4}$  value generated by such a process has not been documented in the literature. Our own measurements obtained from the urine of three healthy people drinking only tap water, gave values around 4.5‰ for  $\delta^{34}\text{S}$  and between 5.9‰ to 7.5‰ for  $\delta^{18}\text{O}_{\text{SO}_4}$  (Fig. 5b). A rough estimate of urine content in sewage may be calculated from the dissolved Rb/Sr ratio of sewage samples (Nirel and Revaclier, 1999):

$$\left(\frac{\text{Rb}}{\text{Sr}}\right)_{\text{sewage}} = x_{\text{DW}} \left(\frac{\text{Rb}}{\text{Sr}}\right)_{\text{DW}} + x_{\text{urine}} \left(\frac{\text{Rb}}{\text{Sr}}\right)_{\text{urine}} \quad (1)$$

where  $x_{\text{DW}}$  and  $x_{\text{urine}}$  represent the percentages in drinking water and urine contained in sewage. In our case,  $(\text{Rb}/\text{Sr})_{\text{DW}}$  is about 0.016 whereas  $(\text{Rb}/\text{Sr})_{\text{urine}}$  equals 5.84 (Nirel and Revaclier, 1999). According to equation (1),  $x_{\text{urine}}$  ranges from 0.1 to 2% in those sewage samples. Assuming an  $x_{\text{urine}}$  of 1% and a sulfate concentration of 0.016 mol/L in urine (Udert et al., 2003), it can be calculated that about 25% of inorganic sulfate contained in sewage comes from urine. The lowest  $\delta^{18}\text{O}_{\text{SO}_4}$  value measured for urinary sulfate (5.9%) yields a 0.7‰ offset which is too low to account for the observed deviation. It should be pointed out that sulfate esters are not precipitated upon  $\text{BaCl}_2$  addition (Lundquist et al., 1980), and that the oxygen isotopic composition of such compounds is not taken account in the  $\delta^{18}\text{O}_{\text{SO}_4}$  of urinary sulfate. The fate of sulfate esters in the sewer has not been described in the literature, but they are likely to generate inorganic sulfate upon microbial hydrolysis (Fitzgerald, 1976). The involvement of inorganic sulfate from personal care products and detergents in the  $\delta^{18}\text{O}_{\text{SO}_4}$  of sewage is not known either.



**Figure 6.** Relationship between  $\delta^{18}\text{O}_{\text{SO}_4}$  and orthophosphate concentration (a). Temporal evolution of dissolved sulfate (b). Wastewater sampled the 29 March 2005.

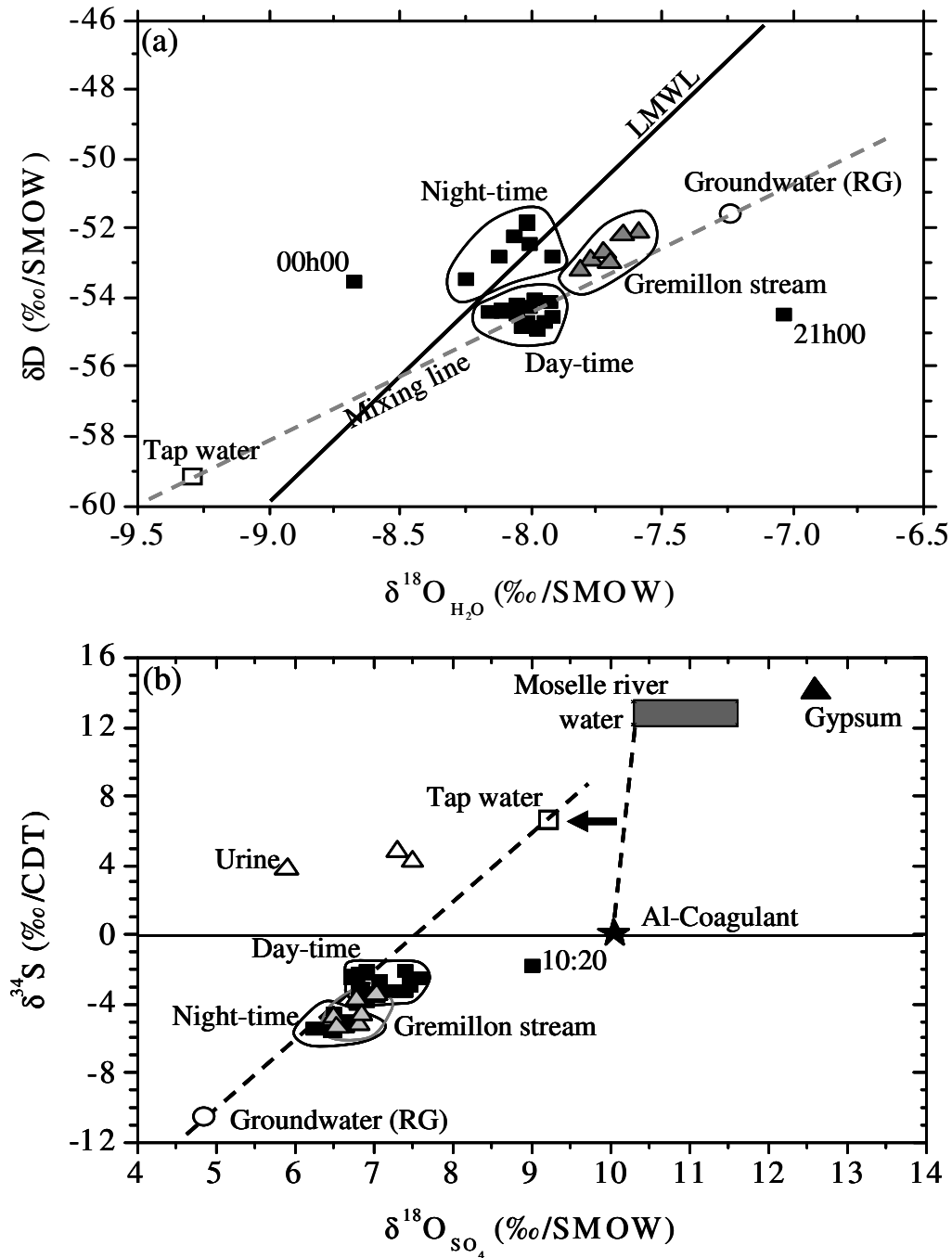
The highest two  $\delta^{18}\text{O}_{\text{SO}_4}$  values at 10.6‰ and 11.2‰ might be explained by abiotic re-oxidation of hydrogen sulfide generated during the low-flow period around 14h00. JB sampling site is located downhill and shows an average dissolved oxygen concentration of 8 mg/L. In abiotic re-oxidation, the sulfur isotope composition is conserved whereas that of oxygen comes from free oxygen incorporated in sulfate ( $\delta^{18}\text{O} = 23.5\text{‰}$  – Kroopnick and

Craig, 1972). This yields a pronounced shift in the oxygen isotope composition even with a small amount of  $\text{SO}_4$  added to the sulfate pool. In that particular case, such isotope effect remains limited and does not prevent the use of dissolved sulfate stable isotopes for tracing water sources in the sewer system.

### **3. Tracing parasitic sewer infiltration**

Figure 7a shows the  $\delta^{18}\text{O}_{\text{H}_2\text{O}} - \delta\text{D}$  values of (i) sewage grab-samples collected over a 24 hour sampling period at PVP, (ii) water samples taken the same day from the Gremillon urban stream which is adjacent to the sewer pipe, (iii) groundwater sampled at a nearby piezometer located at about 3 km downstream of the sampling site, and (iv) drinking water. The isotopic compositions of groundwater and drinking water differ by about 10 times the standard deviation of measurement, which ensures the detection of about 10% of infiltrated groundwater in sewage. Two outliers (sewage samples collected at 21h00 and 24h00) are shown in figure 7a but excluded from the discussion.

Three main fields can be distinguished on the graph. Sewage samples taken during day-time are clustered around  $\delta^{18}\text{O}_{\text{H}_2\text{O}} = -8\text{‰} - \delta\text{D} = -54.5\text{‰}$ , whereas Gremillon water samples occupy a field around  $\delta^{18}\text{O}_{\text{H}_2\text{O}} = -7.7\text{‰} - \delta\text{D} = -52.8\text{‰}$ . Both groups are located near a mixing line between drinking water and groundwater. Assuming binary mixing, this suggests that about 63% of wastewater is composed of infiltrated groundwater, and that the urban stream contains approximately 20% of mains water. Gremillon stream may receive sewage, i.e. drinking water, from leaks of the adjacent separate sanitary sewer. However, as several storm drains empty into the urban stream, it may also be contaminated through cross-connections to storm sewer pipes. Interestingly, sewage samples collected during night-time and at 14h15 are characterized by  $\delta\text{D}$  values slightly lighter than those of day-time sewage. This indicates that a third end-member source contributes to the flow of sewage in this area. As these water isotope data plot close to the local meteoric water line, they might identify recently infiltrated rainwater.

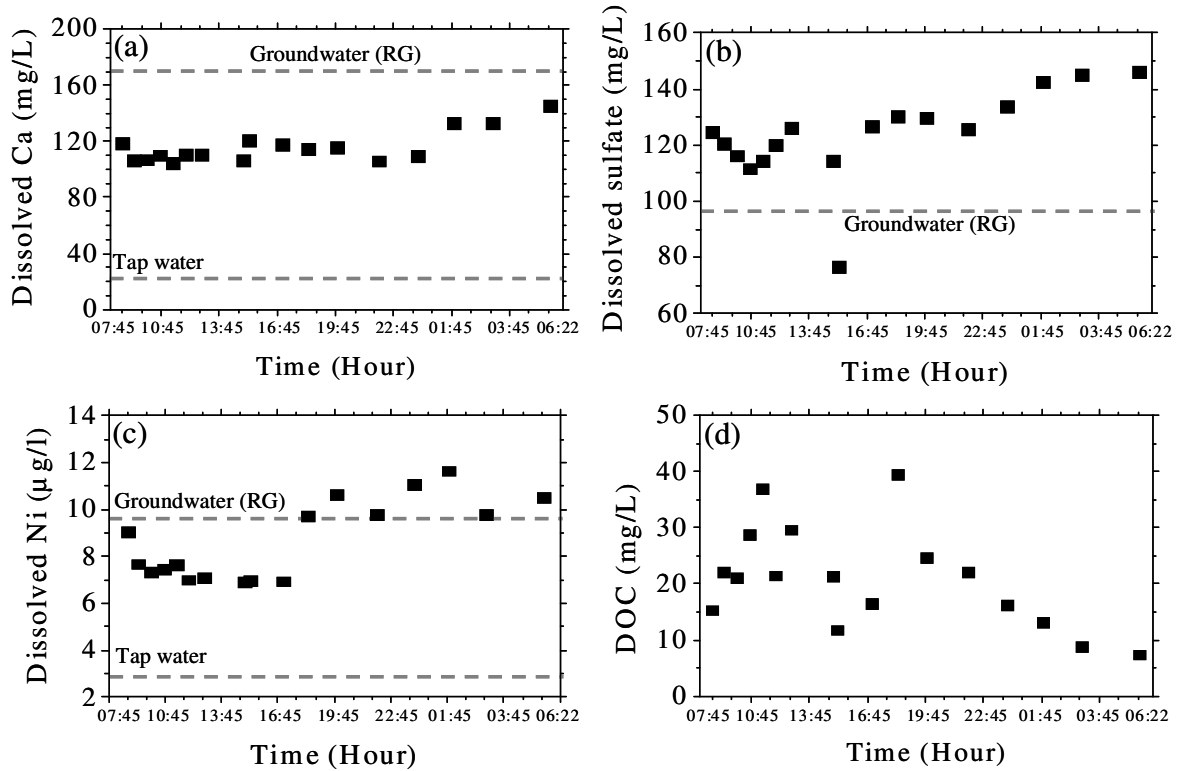


**Figure 7.** Water signature isotopic distribution ( $\delta D$  as function of  $\delta^{18}O_{H_2O}$ ) (Fig. 7a) of the second wastewater (black square) diurnal cycle sampled in 04 April 2006, corresponding tap water (white square), groundwater (white circle) and Gremillon stream (gray triangle). Black line is the local meteoric water line (LMWL) of rainwater collected from September to November 2006 in Nancy city. Fig 7b: Isotopic signature of soluble sulfates ( $\delta^{34}S$  as function of  $\delta^{18}O_{SO_4}$ ) in the same wastewater samples (black square), urine (white triangle), corresponding groundwater (white circle) and tap water (white square), Gremillon stream, Moselle river water (gray rectangle), Al-coagulant (black star) and gypsum (black triangle). Dashed lines in Fig 7a and 7b indicate the mixing line between tap water, wastewater and groundwater.

The  $\delta^{34}\text{S} - \delta^{18}\text{O}_{\text{SO}_4}$  diagram shows that samples from Gremillon stream, day-time and night-time sewage, occupy three fields that clearly overlap (Fig. 7b). The isotopic composition of those sulfates is intermediate between that of drinking water and groundwater. The relatively low  $\delta^{34}\text{S}$  value at  $-10.50\text{‰}$  for sulfate in groundwater may be attributed in part to the oxidation of sulfide minerals contained in the Toarcian shales that form the shallow aquifer at PVP sampling site (Berner et al., 2002). The calculated contribution of groundwater to day-time isotopic values suggests a 57% parasitic discharge in the sanitary sewer, which is in accordance with the water isotopes data. Night-time sewage samples, though slightly distinct from day-time ones, almost coincide with Gremillon stream values, thus implying a common origin of dissolved sulfate. However, the fraction of drinking water obtained from sulfate isotopes for both Gremillon stream and night-time sewage is around 37 %. Such result is neither consistent with the quantification determined from water isotopes nor with the concentrations in major ions and trace elements measured in sewage during the night (Fig. 8). In particular, both soluble Ca and Ni indicate a major amount of groundwater in those samples, whereas the content in dissolved sulfate found in sewage largely exceeds that measured in RG groundwater.

This discrepancy likely results from an incorrect characterization of end-member sources. Assuming that the same groundwater recharges Gremillon stream and infiltrates the sewer during day-time, a similar 20% fraction of drinking water in sewage can be calculated from both water and sulfate isotopes. It is nevertheless surprising that all day-time isotopic values are in the same close range. This implies that the relative volumes of sewage and groundwater remain almost constant in those samples, even though the amount of discharged wastewater obviously varies during the day. Furthermore, it is not clear why such a large amount of infiltrated groundwater becomes much lesser at night, the additional extraneous flow evidenced at that time being obviously minor during day-time. In their study of Rümmlang sewer system, Kracht (2007) had noted "certain diurnal variations of the infiltration discharge" that were explained by the presence of water pools and backwater zones. A similar phenomenon might be invoked here, the groundwater infiltrating at night originating from a different sewer section. However, the presence of a nearby inverted siphon used to convey the sewage underneath a roadway, suggests a different scenario. In April, the water table of local aquifer certainly lies above the depressed sewer: a venturi effect could then entrain a flow of groundwater related to the sewage flux, a decreased head at the upstream end of the siphon stopping its functioning during low-flow periods and more particularly at night.

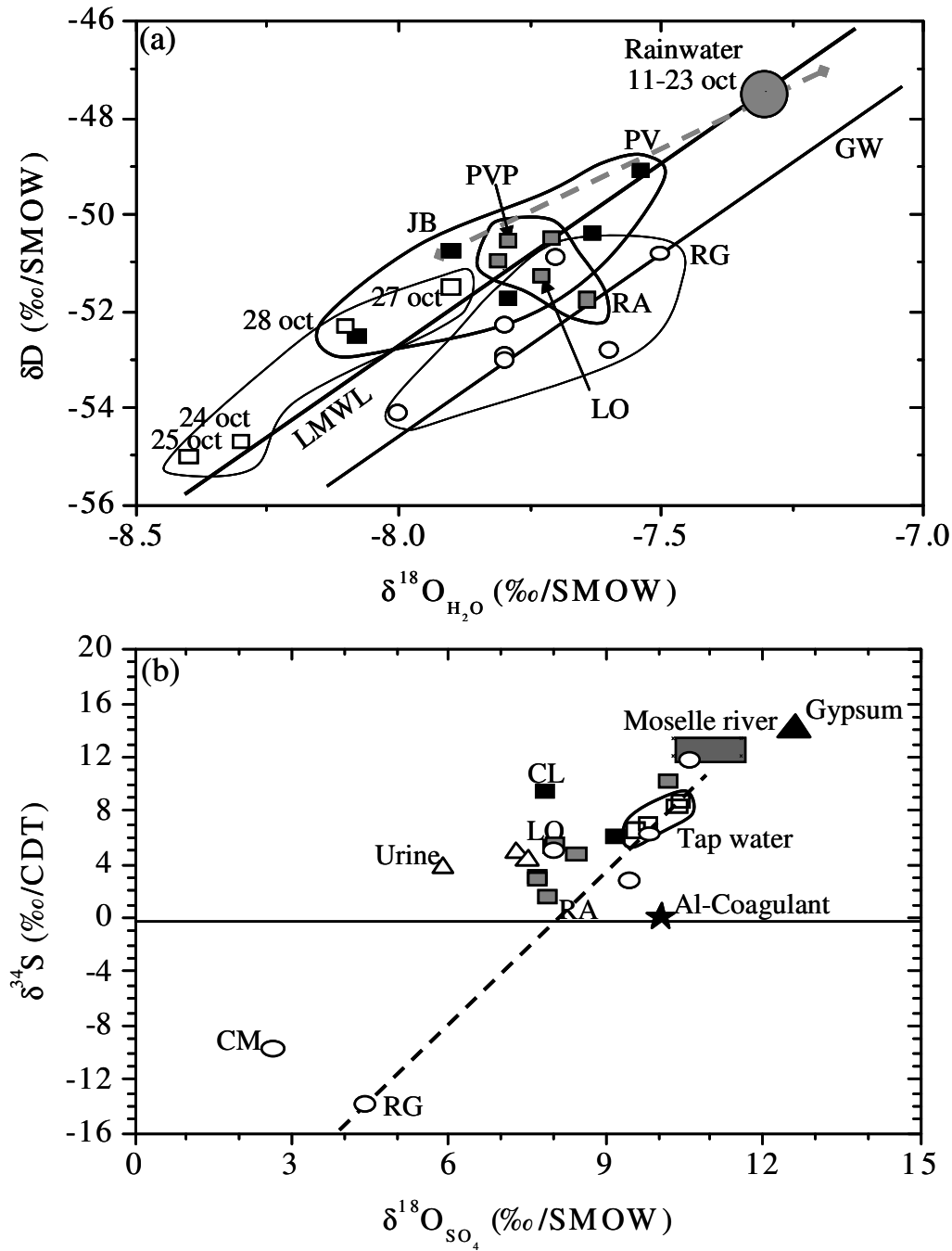




**Figure 8.** Temporal evolution of dissolved calcium, (Fig. 8a), sulfate (Fig. 8b), Ni (Fig. 8c) and organic carbon (Fig. 8d) in wastewater. Wastewater sampled the 04 April 2006.

#### 4. Isotopic tracing in the sewer system at the city scale

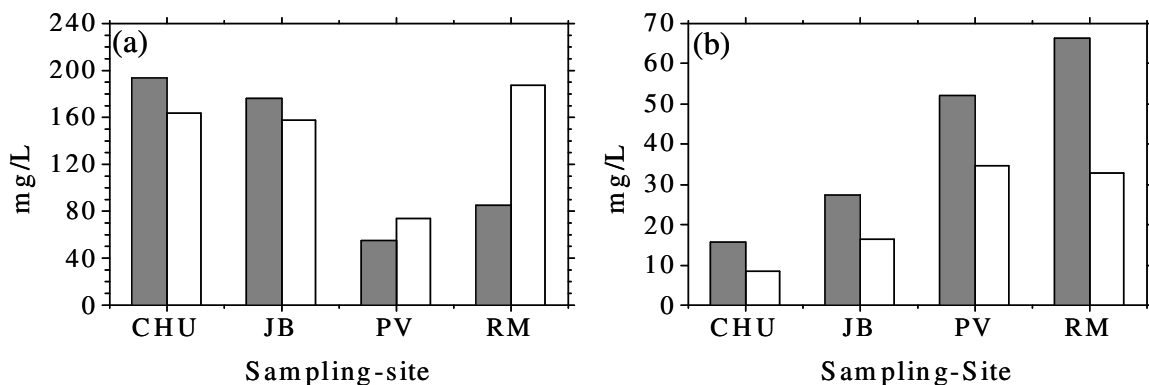
Figure 9a shows the water isotopic compositions of samples collected during the October 2006 campaign in Greater Nancy catchment area. Drinking water and the majority of sewage samples plot close to the LMWL, whereas most groundwater samples define a straight line parallel but slightly offset to the right of LMWL. Unfortunately, the isotopic content of drinking water varied significantly during this sampling campaign, which may account for part of the scattering in sewage samples. Furthermore, as drinking water was not collected the day of sewage sampling (26 Oct.), quantified conclusions can not be drawn. Nevertheless, it is clear that most sewage samples are influenced by rainwater, their position being roughly intermediate between drinking water samples and the 11-23 October integrated rainwater end-member source. Such influence is also revealed by the change in sewage hydrochemistry at downstream sampling sites. Figure 10 indicates that while sodium and chloride concentrations have been halved between JB and PV sampling sites, the sewage has acquired calcium and barium, the solute concentrations of those increasing by a factor of 2. Indeed, PV is positioned approximately halfway between rainwater and JB in the  $\delta\text{D} - \delta^{18}\text{O}_{\text{H}_2\text{O}}$  space.



**Figure 9.** Stable isotopes signature of water ( $\delta D$  as function of  $\delta^{18}O_{H_2O}$ ) (Fig. 9a) in two wastewater sampling campaign (26/10/06: black square and 26bis/10/06: gray square), tap water (white square), groundwater (white circle). Black line is the local meteoric water line (LMWL) of rainwater collected from September to November 2006 in Nancy city. Dashed gray line corresponds to the mixing line between rainwater (from 11 and 23 November 2006), wastewater at PV sampling site and wastewater at JB sampling site. Fig 9b: stable isotopic distribution of dissolved sulfates ( $\delta^{34}S$  as function of  $\delta^{18}O_{SO_4}$ ) in the same wastewater, tap water (white square), groundwater (white circle), urine (white triangle), Al-coagulant (black star), Moselle river water (gray rectangle), and gypsum (black triangle). Dashed black line corresponds to the mixing line between groundwater (RG) and tap water.

The increase in calcium concentration can not be related to a release of stormwater from a detention basin. Instead, as rainwater infiltrates through the vadose zone, the weak acid formed from the solubilization of CO<sub>2</sub> gas promotes the dissolution of minerals and the release of Ca ions when the ground is dominated by carbonates. The change in isotopic composition of sewage is then consistent with a significant rainwater infiltration in the sewer system. Groundwater infiltration may however dominate at RA and LO sampling sites, the isotopic characteristics of these sewage samples being located close to the groundwater line.

The isotopic compositions of sulfur and oxygen in dissolved sulfate are presented in figure 9b. Drinking water shows a slight depletion in both <sup>34</sup>S and <sup>18</sup>O between 24-25 oct. and 27-28 oct that can be interpreted as an intensification of treatment processes applied to purify Moselle river water. Most isotopic values of dissolved sulfate in sewage are clustered between drinking water and urine pools. Unlike water isotopes, rainwater infiltration in the sewer system can not be easily detected from the sulfate isotopic signature of sewage since the sulfate concentration in precipitations is quite low (Brenot et al., 2007). However, two sewage samples show a drastically different behavior: CL sewage is characterized by a dissolved sulfate enriched in <sup>34</sup>S, which can be attributed to bacterially mediated SO<sub>4</sub> reduction with removal of lighter H<sub>2</sub>S species. The relatively low  $\delta^{34}\text{S}_{\text{SO}_4}$  value of RA sewage supports a significant groundwater infiltration at this sampling site. Incidentally, the estimate of parasitic discharge at PVP from dissolved sulfate isotopic values indicates a 10-15% of groundwater infiltration. A similar range of extraneous flow can be calculated from water isotopes values assuming that JB sewage is representative of mains water at the sampling date. Groundwater infiltration at PVP is then of lesser magnitude during that period.



**Figure 10.** Spatial evolution of dissolved Na (a, gray column), Cl (a, white column), Ca (b, gray column), and Ba (b, white column) along the sewer section 1 (26 October 2006). Ba concentrations are multiply by 100.

## CONCLUSION

This study confirms the interest of a multi-component approach - stable isotopes and water-chemistry - to unravel the complex nature of hydrologic processes that may occur in an urban sewer. In our case, water isotopes can readily be applied to quantify the contributions of infiltration waters to the sewage flow, since municipal water supply is imported from outside the urban catchment. The stable isotopes of dissolved sulfate were also found appropriate to trace the origin of water inputs in the sewer system, provided that microbially-mediated sulfate reduction does not alter the isotopic composition of sewage.

The sewer system may interact with the urban hydrological cycle in a very complicated manner: thus, typical groundwater parasitic infiltration would become less obvious to evaluate if significant sewer exfiltration contaminates the shallow aquifer upstream the sampling site. The eventual formation of temporary backwater zones in the sewer system, unintended cross-connections between storm and sanitary sewers, or the infiltration of clear water from distinct aquifers, also introduce supplementary difficulties in the quantification of infiltrating waters. Therefore, any spatial sampling conducted at the urban catchment scale, that necessarily integrates a number of those specific cases, is unlikely to succeed. In contrast, diurnal sampling campaigns at a given sampling site, should always provide valuable information about the local functioning of the sewer system.

**Acknowledgements :** This study was mainly supported by a grant from CNRS-INSU (ECODYN). Lorraine Region also provided part of the funding through Zone Atelier Moselle. We are grateful to M. Piqué and M. Villeroy (Service hydraulique CUGN) for logistical support during all field studies. We thank S. Bouly (ASGA) for providing hydrogeological information on CUGN piezometers. G. Frappier, J. Sieliechi, A. de Carvalho, and E. Montargès-Pelletier conducted sampling in the field, and this project would not have been possible without their precious help. We also wish to thank the staff of SARM (CRPG-UPR 80) where ICP analyses were carried out.

## REFERENCES

- Andreo, B., Liñán, C., Carrasco, F., Jiménez de Cisneros, C., Caballero, F., Mudry, J. (2004) Influence of rainfall quantity on the isotopic composition ( $^{18}\text{O}$  and D) of water in mountainous areas. Application for groundwater research in the Yunquera-Nieves karst aquifers (S Spain). *Appl. Geochem.* 19, 561-574.
- Barrett, M.K., Hiscock, K.M., Pedley, S., Lerner, D.N., Tellam, J.H., French, M.J. (1999) Marker species for identifying urban groundwater recharge sources: a review and case study in Nottingham, UK. *Water Res.* 33 (14), 3083-3097.
- Barth, S. (1998) Application of boron isotopes for tracing sources of anthropic contamination in groundwater. *Water Res.* 32 (3), 685-690.
- Berner, Z.A., Stüben, D., Leosson, M.A., Klinge, H. (2002) S- and O-isotopic character of dissolved sulphate in the cover rock aquifers of Zechstein salt dome. *Appl. Geochem.* 17, 1515-1528.
- Brenot, A. (2006) Origine de l'eau et des éléments dissous par traçage isotopique (H, O, S, Mg, Sr) sur le bassin amont de la Moselle. PhD thesis, Nancy University.
- Brenot, A., Carignan, J., France-Lanord, C., Benoît, M. (2007) Geological and land use control on  $\delta^{34}\text{S}$  and  $\delta^{18}\text{O}$  of river dissolved sulphate: the Moselle river basin, France. *Chem. Geol.* 244, 25-41.
- Butler, M.J., Verhagen, B.T. (1997) Environmental isotopic tracing of water in the urban environment of Pretoria, South Africa. In *Problems, Processes and Management*, eds. P. J. Chilton, *et al.*, *Groundwater in the Urban Environment*, Vol 1. Balkema, pp. 101-106.
- Chambers, L.A., Trudinger, P.A. (1979) Microbial fractionation of stable sulfur isotopes: a review and critique. *Geomicrobiology Journal* 1, 64-71.
- Craig H., Gordon L.I. (1965) Deuterium and oxygen 18 variations in the ocean and the marine atmosphere. In: Togiorgi E. (Ed.), *Stable isotope in oceanographic studies and paleotemperatures*. Laboratorio di Geologia Nucleare, Pisa, Italy, pp 9-130.
- El Samrani, A.G., Lartiges, B.S., Ghanbaja, J., Yvon, J., Kohler, A. (2004) Trace element carriers in combined sewer during dry and wet weather: an electron microscope investigation. *Water Res.* 38, 2063-2076.
- Epstein, S., Mayeda, T. (1953) Variation of  $\delta^{18}\text{O}$  content of waters from natural sources. *Geochim. Cosmochim. Acta.* 4, 213-224.
- Fitzgerald, J.W. (1976) Sulfate ester formation and hydrolysis: a potentially important yet often ignored aspect of the sulfur cycle of aerobic soils. *Bacteriological Rev.* 40(3) 698-721.
- Gibson, J.J., Birks, S.J., Edwards, T.W.D. (2008) Global prediction of  $d_a$  and  $d^{18}\text{O}$ - $d^2\text{H}$  evaporation slopes for lakes and soil water accounting for seasonality. *Global Biogeochemical Cycles* 22, GB2031.

Goldhaber, M.B., Kaplan, I.R. (1980) Mechanisms of sulfur incorporation and isotopic fractionation during early diagenesis in sediments of the Gulf of California. *Mar. Chem.* 9, 95-143.

Hoffer, L.J., Hamadeh, M.J., Robitaille, L., Norwich, K.H. (2005) Human sulfate kinetics. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 289, R1372-R1380.

Houhou, J., Lartiges, B.S., Hofmann, A., Frappier, G., Ghanbaja, J., Temgoua, A. (accepted) Phosphate dynamics in an urban sewer: a case study of Nancy, France. *Water Res.*

Houhou, J., Lartiges, B.S., Montarges-Pelletier, M., Ghanbaja, J., Kohler, A. (in preparation) Dynamics of heavy metals and trace element carriers in sewer system during dry weather.

Knöller, K., Vogt, C., Feisthauer, S., Weise, S., Weiss, H., Richnow, H.H. (2008) Sulfur cycling and biodegradation in contaminated aquifers: insights from stable isotope investigations. *Environ. Sci. Technol.* (in press).

Kracht, O., Gujer, W. (2005) Quantification of infiltration into sewers based on time series of pollutant loads. *Wat. Sci. Technol.* 52 (3), 209-218.

Kracht, O., Gresch, M., Gujer, W. (2007) A stable isotope approach for the quantification of sewer infiltration. *Environ. Sci. Technol.* 41 (16), 5839-5845.

Kroopnick, P., Craig, H. (1972) Atmospheric oxygen: isotopic composition and solubility fractionation. *Science* 174, 54-55.

Krouse, H.R., Grinenko, V.A. (1991) Stable Isotopes. Natural and anthropogenic sulfur in the environment. *SCOPE*, 43, Wiley Chichester, U.K., 267-306.

Lundquist, P., Martensson, J., Sörbo, B., Ohman, S. (1980) Turbidimetry of inorganic sulfate, ester sulfate, and total sulfur in urine. *Clin. Chem.* 26(8), 1178-1181.

Madryas, C., Szot, A. (2003). Structural sensitivity of circular sewer liners to geometrical imperfections. *Tunn. Undergr. Sp. Tech.* 18, 412-434.

Morrison, J., Brockwell, T., Merren, T., Fourel, F., Phillips, A.M., (2001) On-line high-precision stable hydrogen isotopic analyses on nanoliter water samples. *Anal. Chem.* 73 (15), 3570-3575.

Navarro, A., Carbonell, M. (2007) Evaluation of groundwater contamination beneath an urban environment: the Besòs river basin (Barcelona, Spain). *J. Environ. Manag.* 85, 259-269.

Osenbrück, K., Gläser, H., Knöller, K., Weise, S.M., Möder, M., Wennrich, R., Schirmer, M., Reinstorf, F., Busch, W., Strauch, G. (2007) Sources and transport of selected organic micropollutants in urban groundwater underlying the city of Halle (Saale), Germany. *Water Res.* 41, 3259-3270.

Rozanski, K., Araguás- Araguás, L., Gonfiantini, R. (1993) Isotopic patterns in modern global precipitation, Geophysical Monograph 78. In *Climate change in continental isotopic records*, American Geophysical Union, pp. 1-36.

Rudnicki, M.D., Elderfield, H., Spiro, B. (2001) Fractionation of sulfur isotopes during bacterial sulfate reduction in deep ocean sediments at elevated temperatures. *Geoch. Cosmochim. Acta* 65, 777-789.

Rutsch, M., Rieckermann, J., Cullmann, J., Ellis, J.B., Vollertsen, J., Krebs, P. (2008) Towards a better understanding of sewer exfiltration. *Water Res.* 42, 2385-2394.

Schroth, M.H., Kleikemper, J., Bollinger, C., Bernasconi, S.M., Spence, K.H., Zeyer, J. (2001) In-situ assessment of microbial sulfate reduction in a petroleum-contaminated aquifer using push-pull tests and stable sulfur isotope analyses. *J. Contam. Hydrol.* 51, 179-195.

Udert, K.M., Larsen, T.A., Gujer, W. (2003) Estimating the precipitation potential in urine-collecting systems. *Water Res.* 37, 2667-2677.

Valiron, F. and Tabuchi, J.P. (1992) *Maîtrise de la pollution urbaine par temps de pluie – Etat de l'art*. Agence de l'Eau Seine-Normandie / AGHTM. Tech & Doc, Lavoisier, 564p.

Van Everdingen, R.O., Krouse, H.R. (1985) Isotope composition of sulphates generated by bacterial and abiological oxidation. *Nature*, 315, 395-396.

Verbanck, M.A. (1993) A new method for the identification of infiltration waters in sanitary flows. *Wat. Sci. Technol.* 27 (12), 227-230.

Yu, J-Y., Park, Y., Mielke, R.E., Coleman, M.L. (2007) Sulfur and oxygen isotopic compositions of the dissolved sulphate in the meteoric water in Chuncheon, Korea. *Geosciences Journal* 11(4), 357-367.

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

***CHAPITRE***  
***(II)***

Spéciation des phosphates  
dans le réseau  
d'assainissement urbain



## **Phosphate dynamics in an urban sewer: a case study of Nancy, France**

J. Houhou<sup>1</sup>, B.S. Lartiges<sup>1\*</sup>, A. Hofmann<sup>2</sup>, G. Frappier<sup>1</sup>, J. Ghanbaja<sup>3</sup>, A. Temgoua<sup>1</sup>

<sup>1</sup> *Nancy University – LEM-ENSG/INPL-CNRS, Pôle de l'Eau 15 Avenue du Charmois  
- BP 40 54501 Vandœuvre Cedex, France*

<sup>2</sup> *Lille University-Géosystèmes 8157 UMR-CNRS, Cité scientifique, 59655 Villeneuve  
d'Ascq, France*

<sup>3</sup> *Nancy University – Service Commun de Microscopie - BP 239 - 54 500 Vandœuvre  
Cedex, France*

E-mail: bruno.lartiges@ensg.inpl-nancy.fr

(\*) To whom correspondence should be addressed

Article accepté au journal **Water Research**

## **ABSTRACT**

The nature of phosphate phases present in suspended matter, biofilm, and sediment of Greater Nancy sewer system, was investigated over a period of two years. The phosphate speciation was determined by two approaches: a direct identification of phosphorus mineral phases was conducted by Transmission Electron Microscopy (TEM) coupled with Energy Dispersive X-ray Spectroscopy (EDXS), whereas a chemical extraction of samples provided an estimate of phosphorus pools defined by the fractionation scheme. Quantitative analysis of 1340 individual particles by TEM-EDXS allowed to draw a picture of phosphate species distributions along the sewer system and over time. Amorphous Ca-phosphates (brushite, whitlockite, octacalcium phosphate, Mg-brushite, hydroxyapatite and carbapatite) were ubiquitous although brushite dominated upstream, and octacalcium phosphate and apatite prevailed downstream and in sediments. Al-Ca-phosphate minerals such as foggite, bearthite, gatumbaite, and crandallite appeared downstream and in biofilms. Ca-phosphate phase assemblages in the different locations of the sewer system were dependent on phase transformations from brushite to hydroxyapatite that were shown to be kinetically driven. The restriction of Al-Ca-phosphates to downstream of the sewer system was most probably related to the lower pHs measured at these sites. The pH dependency was confirmed by stability calculations. Chemical extractions were not reliable. TEM examination of extraction residues revealed the presence of neoformed Al-Ca-phosphate species that invalidated the fractionation scheme. Nonetheless, it confirmed that phosphate phases may undergo significant geochemical changes over a short time scale.

**Keywords:** Phosphate, chemical extraction, sewer system, TEM-EDXS, brushite, hydroxyapatite, foggite, crandallite.

## **INTRODUCTION**

Traditionally designed to be a simple drainage system for wastewater, the sewer network is now recognized as a true biophysicochemical reactor, or in other terms, as an integrated part of the wastewater treatment system (Hvitved-Jacobsen et al., 1995; Warith et al., 1998). Hydrogen sulfide production (Yongsiri et al., 2004; Zhang et al., 2008) and methane emission (Guisasola et al., 2008) readily illustrate such a role. In addition, the nature of organic matter contained in sewage has been shown to evolve during transport (Raunkjaer et al., 1994; Chen et al., 2001).

Phosphorus, mainly present in sewage as orthophosphate (Butler et al., 1995), is also likely to participate in the dynamics of such a reactor. Indeed, orthophosphate is known to quickly interact - uptake and release - with a wide variety of natural surfaces (Froelich, 1988; House, 2003), the composition of phosphate minerals precipitated from supersaturated solutions is kinetically controlled (Nancollas and Tomazic, 1974), and as an essential nutrient, phosphate can be utilized by microorganisms (Mulkerrins et al., 2004). Such complex dynamics have for instance been evidenced in urine-collecting systems (Udert et al., 2003a).

The main objective of this study was to describe the fate of orthophosphate along the sewer system. This involved the speciation of phosphate mineral species encountered in suspended matter, biofilms, and sediments of the sewer, by transmission electron microscopy combined with energy-dispersive X-ray spectrometry. Such a technique provides a direct identification of phosphate carriers at the nanoscale (El Samrani et al., 2004). A chemical extraction was also conducted to assess the various pools of particulate phosphorus, although these extractions must be interpreted with caution due to re-adsorption or re-precipitation phenomena. Solution composition, in particular phosphate, dissolved organic matter, and pH, as well as the redox potential, were systematically determined. In combination with the data on mineral phases, this allowed to elaborate on the thermodynamic (non)equilibrium state of the system.

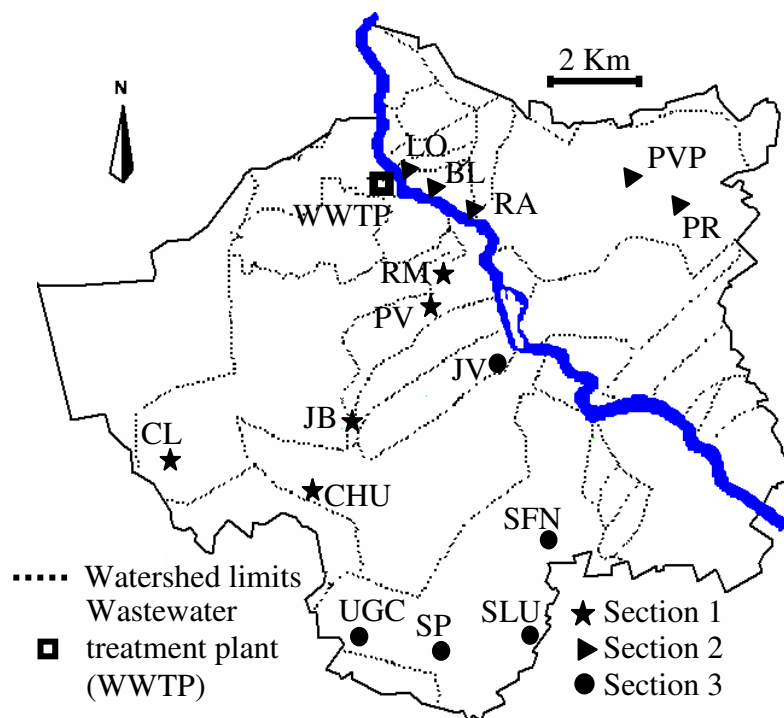
## **EXPERIMENTAL SECTION**

### ***1. Study area***

Samples were collected from the sewer network of Greater Nancy urban community. Nancy, a city of about 270 000 inhabitants located in north-eastern France, lies on both banks of

Meurthe river with a total catchment area of 193 Km<sup>2</sup> (144 km<sup>2</sup> on left bank). The sewage collecting system comprises 950 km of pipes, 250 km of them being man-entry sewer (pipe diameter  $\geq 1.2$  m). As Nancy is established in basin position, surrounded by hills dominating the Meurthe valley by about 200 m, the slope of the gravity sewer pipe may reach 5%. The central part of Nancy urban community is served by a combined sewer, whereas the peripheral areas are drained by separate systems. 25 retention basins (180 000 m<sup>3</sup> storage capacity) have been constructed to limit discharge of sewer overflows into the Meurthe river.

As illustrated in figure 1, three sewer sections, each with 5 sampling sites from upstream to downstream of the sewer network, were selected for this study. They represent the various land uses in the urban community (residential, commercial, industrial, high school, and hospital).



**Figure 1.** Map of the Greater Nancy urban catchment area showing the location of sampling sites.

Table 1 provides a summary of sampling site characteristics. On a general basis, the upstream sampling sites only receive domestic wastewater from a separated sewer, the following sampling sites are impacted either by hospital or industrial wastewaters, whereas

the downstream sampling sites mainly convey sewage from high density residential areas and small businesses through a combined sewer.

**Table 1.** *Sampling site characteristics. The mean transit time between two consecutive sampling sites was calculated from dye dilution. NR not relevant (CL is not connected with CHU=>RM sewer section). ND: not determined.*

Sampling site	GPS coordinates			Sewer Type	Land use	Transit time
	48° --,---N	006 --,---E	Altitude (±) (m)			
CL	39.471	07.262	343 (2)	Separated	Residential (MD)	NR
CHU	39.084	08.966	393 (1)	Separated	Residential (MD) + Hospital	-
JB	39.813	09.396	294 (3)	Separated	Residential (MD) + High School	18 min
PV	41.167	11.301	226 (6)	Combined	Residential (HD) + Small businesses	1h 10min
RM	41.737	11.732	211 (5)	Combined	Residential (HD)	39 mn
PR	42.208	15.562	222 (2)	Separated	Residential (HD)	-
PVP	42.552	14.676	212 (3)	Separated + Combined	Commercial (MD)	49 min
RA	42.094	12.068	207 (2)	Separated	Residential (MD) + Commercial	2 h 45 min
BL	42.445	11.038	178 (10)	Combined	Residential (MD) + Industrial	1 h 29 min
LO	42.748	10.782	189 (2)	Combined	Residential (MD) + Commercial	ND
UGC	37.220	10.507	212 (2)	Separated	Residential (LD) + Commercial	-
SP	36.992	11.048	250 (1)	Separated	Residential (LD) + Commercial	30 min
SLU	37.008	12.067	232 (4)	Separated	Industrial (LD)	1h 45 min
SFN	38.290	12.782	202 (4)	Separated	Commercial	53 min
JV	40.379	12.710	193 (3)	Combined	Residential (HD) + Commercial	2h 45 min

## 2. Sampling and chemical analyses

Eight sampling campaigns were conducted in dry weather conditions between November 2004 and October 2006. Grab-samples of sewage, and whenever possible biofilms and sediments, were collected from the sewer. Various categories of sewer sediment have been described in the literature: according to Crabtree (1989), the collected sediments correspond to type A coarse granular deposits. Sewage characteristics such as temperature, pH, conductivity, dissolved oxygen concentration, redox potential (WTW, Multiline F/SET)

and turbidity (Hach 2100P), were measured immediately upon sampling. Part of the sewage was filtered on site through a pre-washed 0.22  $\mu\text{m}$  pore size cellulose-acetate membrane (Chromafil<sup>®</sup> CA-20/25) and split into three aliquots for analyses of metals, anions, and dissolved organic carbon (DOC). The filtrates were stored at 4°C in 65 mL polyethylene or glass bottles until analysis. As such on-site sample preparation usually exceeded the mean transit time of sewage between two consecutive sampling sites (cf. Table 1), it was not possible to follow the evolution of the same body of sewage within the sewer network. The purpose of two 24h campaigns was then to investigate the variations in wastewater characteristics at a given sampling site as a function of time.

About 20 L of sewage were brought back to the laboratory in polyethylene jerrycans, and processed within four hours of sampling. After gentle end-over-end mixing of the jerrycans, the sewage was centrifuged in 1 L polyethylene bottles at 15000 g for 30 min (Sorvall<sup>®</sup> Evolution RC). Total Suspended Solids (TSS) mass was determined by drying an aliquote of centrifuged sewage at 105°C for 12 hours, and Volatile Solids (VS) mass was obtained by further heating the same samples at 550°C for 4 hours. All samples were analysed in duplicate. The sediments were sieved at 2 mm, 250  $\mu\text{m}$ , and 50  $\mu\text{m}$ , and the fractions collected were freeze-dried.

Table 2 summarizes the main physico-chemical characteristics of sewage collected during the eight sampling campaigns. DOC was measured with a Dohrman 190 analyzer. Phosphate, nitrate, and sulfate anions were determined by ion chromatography using a Dionex ICS-3000 (AS9-HC) column. The lower detection limits were 50 ppb for  $\text{PO}_4$  and 20 ppb for the other anions. Total soluble P, Ca, Al, and Fe, were obtained using a Jobin-Yvon JY70 ICP-AES. For total contents of these elements in the freeze-dried solid fractions, a 200 mg aliquot was first melted with 600 mg  $\text{LiBO}_3$  in a Pt-Au crucible, and then dissolved with 1N  $\text{HNO}_3$ . The resulting solution was analyzed by ICP-AES (Carignan et al., 2001).

**Table 2.** Selected physicochemical characteristics of sewage sampled along the three sewer sections: range, means and standard deviations.

Variable	Number of samples	Range	Avg $\pm$ SD
pH	30	7.70 - 9.80	8.38 $\pm$ 0.55
Eh (mV)	20	-186 - +122	-4 $\pm$ 94
Ec ( $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$ )	30	711 - 1644	1196 $\pm$ 248
DO ( $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ )	15	0.15 - 12.92	4.06 $\pm$ 3.29
T ( $^{\circ}\text{C}$ )	30	8.60 - 26.20	18.12 $\pm$ 4.49
Turbidity (NTU)	25	78 - 671	232 $\pm$ 161
DOC ( $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ )	20	18.16 - 141.20	70.77 $\pm$ 38.23
TSS ( $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ )	20	49 - 450	170 $\pm$ 123
VS ( $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ )	15	50 - 340	141 $\pm$ 89

### 3. Mineral phosphate speciation

Direct speciation of phosphate phases was mainly obtained by Transmission Electron Microscopy (TEM) combined with energy-dispersive X-ray spectrometry (EDXS). EDXS yields an elemental analysis of individual particles from freeze-dried solids. Stoichiometric ratios can be calculated and compared with known mineralogical compositions. Electron diffraction patterns provided by TEM, characterising the crystal structure of particles, can also be used for identification. In this study, transmission electron microscopy observations were carried out with a Philips CM20 TEM (200 kV) coupled with an EDAX energy dispersive X-ray spectrometer. The freeze-dried powder was re-suspended in 2 mL ethanol under ultrasonication, and a drop of suspension was evaporated on a carbon-coated copper grid (EuroMEDEX Mesh200-Car#CF200CU) placed on filter paper. A spot size of about 70 nm and a counting time of 40 seconds were used to record EDX spectra. EDX calibration standards were run to obtain quantitative analyses of major and trace elements with a detection limit of about 100 ppm. In addition, a few samples were examined with a S-2500 Hitachi scanning electron microscope equipped with a Kevex 4850 EDX. In that case, freeze-dried powders were sprinkled onto 2 cm<sup>2</sup> plates and carbon coated. The SEM microscope was generally operated with a beam current of 3 pA and an accelerating voltage of 20 kV (analysed microvolume of about 6  $\mu\text{m}^3$ ).

An exploratory parallel extraction procedure was carried out to provide a chemical partitioning of phosphorus among various chemical forms. The extraction scheme originally developed for activated sludge by Moreau (1997), is summarized in Table 3. It allows to discriminate loosely sorbed phosphorus [L-P], inorganic phosphorus associated with

aluminum [Al-P], inorganic phosphorus bonded to carbonates [Ca-P], inorganic phosphorus associated with Fe ([Fe-P], and phosphorus bonded to organic matter [OM-P]. Each sample was extracted in triplicate: 100 mg of freeze-dried material (suspended matter, biofilm, or sediment) was treated with the reactant for a given time (Table 3). The extracts were centrifuged for 15 minutes at 4000 RPM (1613 g) and the supernatants were filtered with membranes of 0.22  $\mu\text{m}$  pore size. Phosphate concentrations in the supernatant solutions were determined by conventional molybdate colorimetry (Murphy and Riley 1962). To avoid any interference from fluoride ion during phosphorus determination, 5 mL of boric acid 0.5 M was added to supernatants from Al-P extractions (Chang and Jackson, 1957). In order to control the colorimetric procedure, phosphorus contained in extracts of labile P, aluminum and calcium bound fractions, was also analyzed by ICP-AES. The extraction residues were rinsed with 30 mL NaCl 0.3 M (20 min agitation), and centrifuged at 4000 rotations/min for 15 min. Samples were then rinsed with ultra pure water (18.5 m $\Omega$  - MilliQ-plus), again centrifuged and finally freeze-dried. The dry residues were examined by TEM-EDXS to check the selectivity and specificity of various extractants.

**Table 3.** Summarized phosphate chemical extraction procedure (Moreau, 1997) with reaction mechanisms.

PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> bonded to	Extractant	Reaction	Time (h)
Labile (L-P)	30 mL H <sub>2</sub> O	Desorption of loosely sorbed P	2
Organic matter (OM-P)	10 mL H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (1/5)	OM oxidation and release of associated P	24
Ca (Ca-P)	30 mL H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (0.5 N)	Acid dissolution of calcium phosphate species	12
Al (Al-P)	30 mL NH <sub>4</sub> F (0.3 N, pH 8.2)	Exchange of hydroxyl groups versus fluoride anions in aluminum oxhydroxides and release of phosphate ligands	6
Fe (Fe-P)	30 mL NaOH (1 N)	Exchange of phosphate ligands (H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> <sup>-</sup> /HPO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> ) adsorbed on iron oxhydroxides versus OH <sup>-</sup>	6
Total P	1 mL H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (18 M) + 9 mL H <sub>2</sub> O + 1g K <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>8</sub>	Acid digestion at 120 °C of mineral particles and OM	1

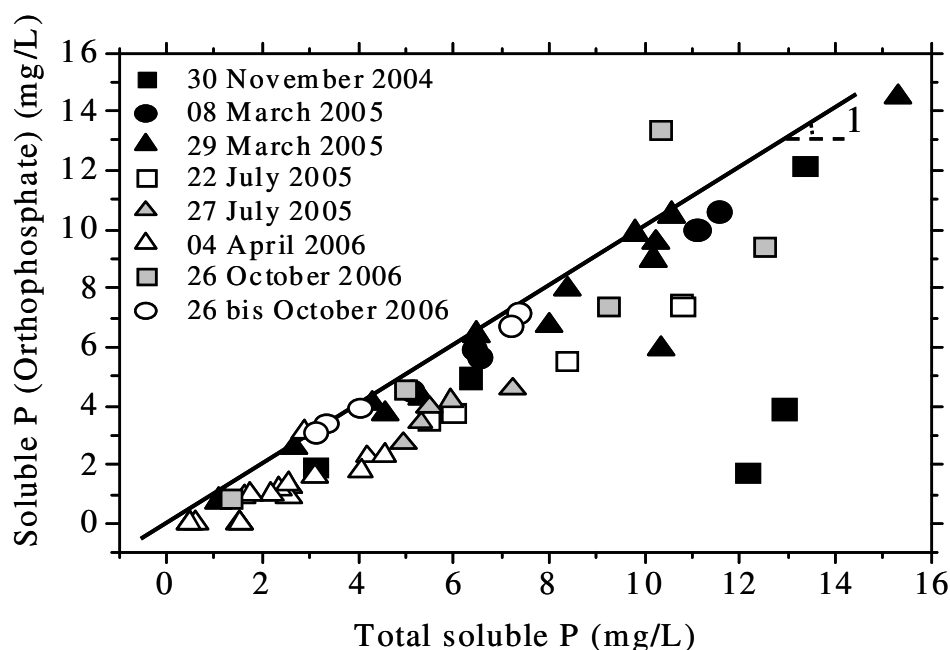
## RESULTS

### *1. Phosphate content in sewage, biofilms and sewer sediments*

The average concentrations and the ranges in soluble phosphorus, orthophosphate, and total solid phosphorus in suspended matter and sediment, are compiled in Table 4. Total soluble phosphorus varied considerably between 1.32 and 13.35 mg/L with an average



concentration of 7.11 mg/L. The highest P levels were obtained in areas served by a separate sewer system, whereas the lowest P concentrations were observed at night in a sewer section characterized by a high influx of groundwater (Houhou et al., in preparation). All phosphorus values fall within the range of dissolved P concentrations typically reported for sewer systems (Jolley et al., 1998; Halliwell et al., 2001; Tchobanoglous et al., 2003). A plot of orthophosphate concentration versus total soluble P (Fig. 2) indicated that orthophosphate largely dominated the dissolved P component in most samples, which is again in accordance with previous studies (Butler et al., 1995; Jolley et al., 1998).



**Figure 2.** Scatter plot of orthophosphate concentration versus Total soluble phosphorus in sewage samples. The data correspond to an aggregate of all campaigns.

About 20% of the total phosphorus content in sewage was in the particulate form. This corresponds to a particulate phosphorus load in the 4.34-13.55 mg P/g range with an average value of 6.8 mg/g (Table 4). The average phosphorus content in sediments ranges from 0.9-7.5 mg/g, the < 50  $\mu\text{m}$  sediment fraction showing the highest P concentration. Similar values have been reported for urban freshwater sediments (Taylor and Boulton, 2007), and fluvial sediments impacted by sewage discharges (Owens and Walling, 2002).

Using the average daily water use for France of 137 L, the average concentration of total phosphorus in sewage (10.13 mg/L) yields a per capita phosphorus loading of 1.38 g day<sup>-1</sup> which is slightly lower than the values 1.8-2 g day<sup>-1</sup> reported in the literature for

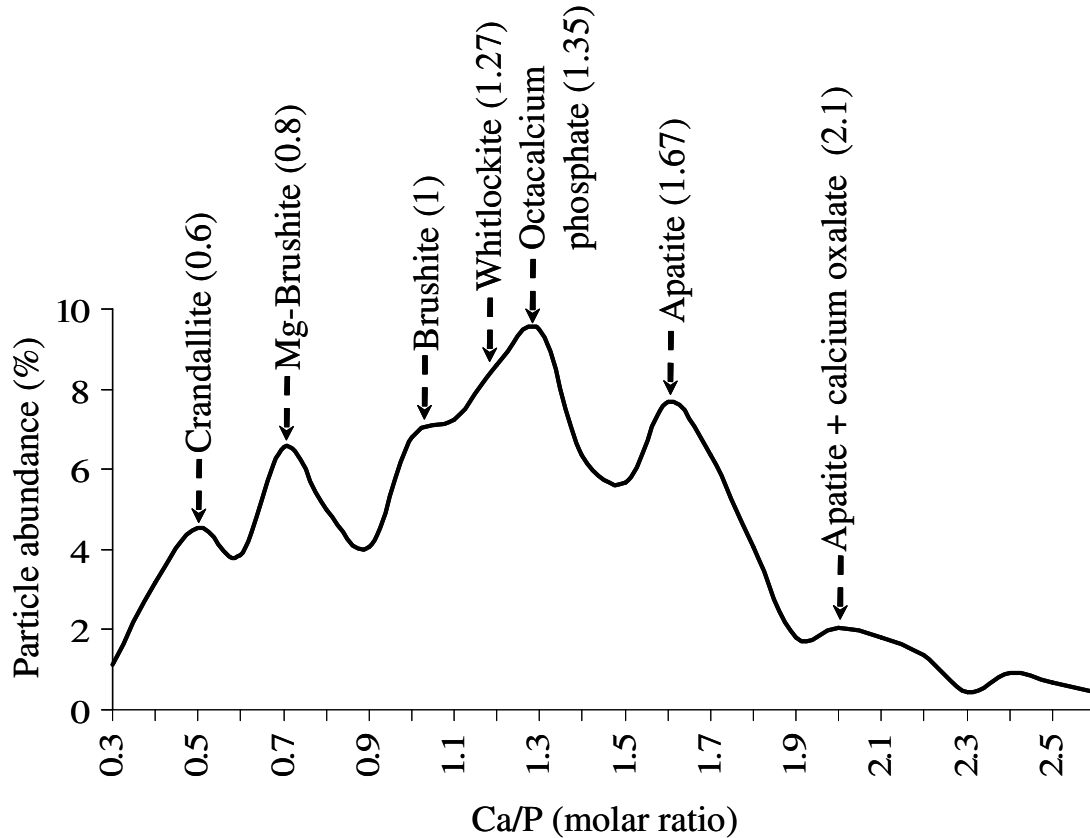
domestic sewage (Alexander and Steven, 1976; Palmquist and Hanaeus, 2005). The lower value may be achieved because of groundwater infiltration into the sewer network, causing dilution.

**Table 4.** Concentrations in Total soluble phosphorus, soluble orthophosphate, Total phosphorus in suspended matter, particulate phosphorus as a fraction of total P in the sewage, and Total phosphorus in sediment fractions. Results are reported on the basis of freeze-dried material weight for Total solid phosphorus concentrations.

	Number of samples	Range	Avg ± SD
Soluble total P (mg/L)	30	1.32 - 13.35	7.11 ± 3.40
Soluble orthophosphate (mg PO <sub>4</sub> /L)	30	2.26 - 41.11	16.50 ± 9.74
TSS P (mg/g)	15	4.34 - 13.55	6.79 ± 2.09
% particulate P	15	4.54 - 42.27	21.20 ± 10.77
Sediment P (mg/g)	0-50 µm	3.40 - 7.49	5.42 ± 1.75
	50-250 µm	1.42 - 3.06	2.09 ± 0.86
	250 µm-2 mm	0.91 - 2.72	1.67 ± 0.76

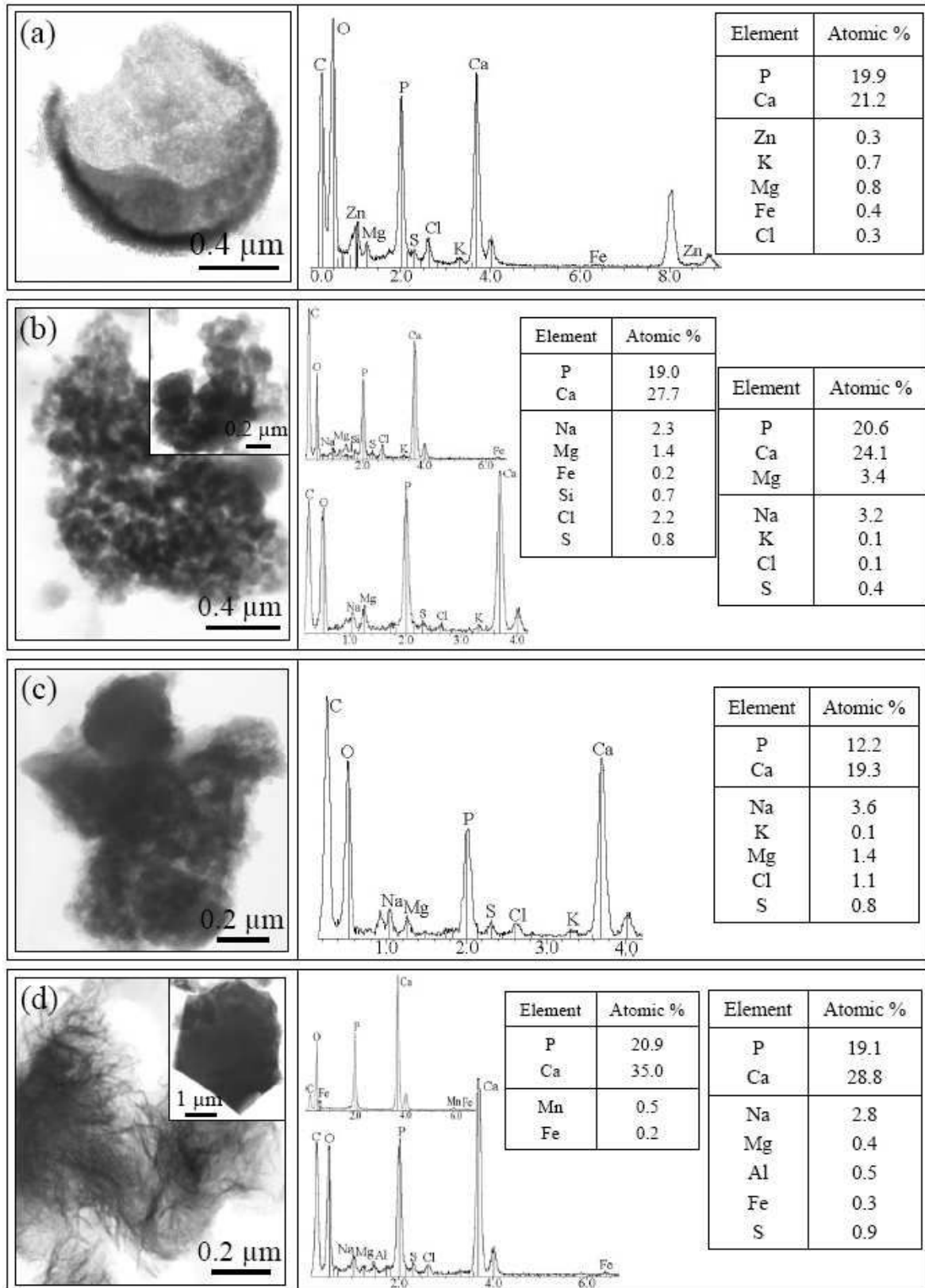
## 2. Nature of mineral phosphate phases

The elemental composition of about 1340 mineral particles of freeze-dried samples from sewage, biofilm, and sewer sediment, was analyzed by TEM-EDXS. About 40% of these particles were described as phosphate phases. Most of the time, these phosphate minerals are amorphous and do not yield a workable electron diffraction pattern. As illustrated in figure 3, the distribution of Ca/P molar ratios of phosphate particles reveals obvious maxima at Ca/P equal to 0.6, 0.8, 1, 1.27, 1.35, and 1.6. Such atomic ratios likely identify occurrences of hydroxyapatite (Ca<sub>10</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>6</sub>(OH)<sub>2</sub> - Ca/P = 1.6), octacalcium phosphate (Ca<sub>8</sub>H<sub>2</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>6</sub> - Ca/P = 1.33), whitlockite (Ca<sub>9</sub>Mg(PO<sub>4</sub>)<sub>6</sub>(PO<sub>3</sub>OH)), brushite (CaHPO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O - Ca/P = 1), and crandallite (CaAl<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> - Ca/P = 0.6). According to EDX spectra, the Ca/P ratio of 0.8 may be attributed to a Mg-brushite species (Ca<sub>0.8</sub>Mg<sub>0.2</sub>HPO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O), whereas the bump around Ca/P = 2.1 may correspond to carbapatite (Ca<sub>10</sub>(PO<sub>4</sub>, CO<sub>3</sub>)<sub>6</sub>(OH, CO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>) and/or co-precipitates of apatite and calcium oxalate.



**Figure 3.** Distribution of Ca/P atomic ratios for all P-containing particles analyzed by TEM-EDXS. Each mode characterizes a given phosphate mineral phase.

As illustrated in figure 4, EDX microanalyses can be related to specific morphologies of phosphate particles. Thus, brushite and Mg-brushite particles typically appear as isolated 0.4-0.7  $\mu\text{m}$  porous spheres (Fig. 4a). Brushite usually contains little Mg and S ( $\text{Mg}/\text{Ca} < 0.05$  and  $\text{S}/\text{P}$  between 0 and 0.15). Whitlockite and octacalcium phosphate particles (Fig. 4b) are both formed by micron-size aggregates, the varying size of subunits (20-100 nm) resulting in granulous structures. Various morphological aspects are found for apatite: in addition to frequent compact aggregates with subunits of about 200 nm (Fig. 4c), a hairy-type species (Fig. 4d) and a few well crystallized particles were observed (inset of Fig. 4d). Tricalcium phosphate ( $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ ), which also occurs as small aggregates, was rarely identified in the sewer network. Small spheres, 0.2  $\mu\text{m}$  in diameter, strongly deficient in calcium ( $\text{Ca}/\text{P} \sim 0.5$ ) were found in biofilms (Fig. 4e). They may have been formed in acidic conditions and may correspond to calcium dihydrogen phosphate. However, the O/P ratio of those phases is sometimes close to 2; as reduced inorganic phosphorus has been evidenced in sewage works (Hanrahan et al., 2005 and references herein), it is suspected that phosphite or even hypophosphite calcium species might form within biofilms.



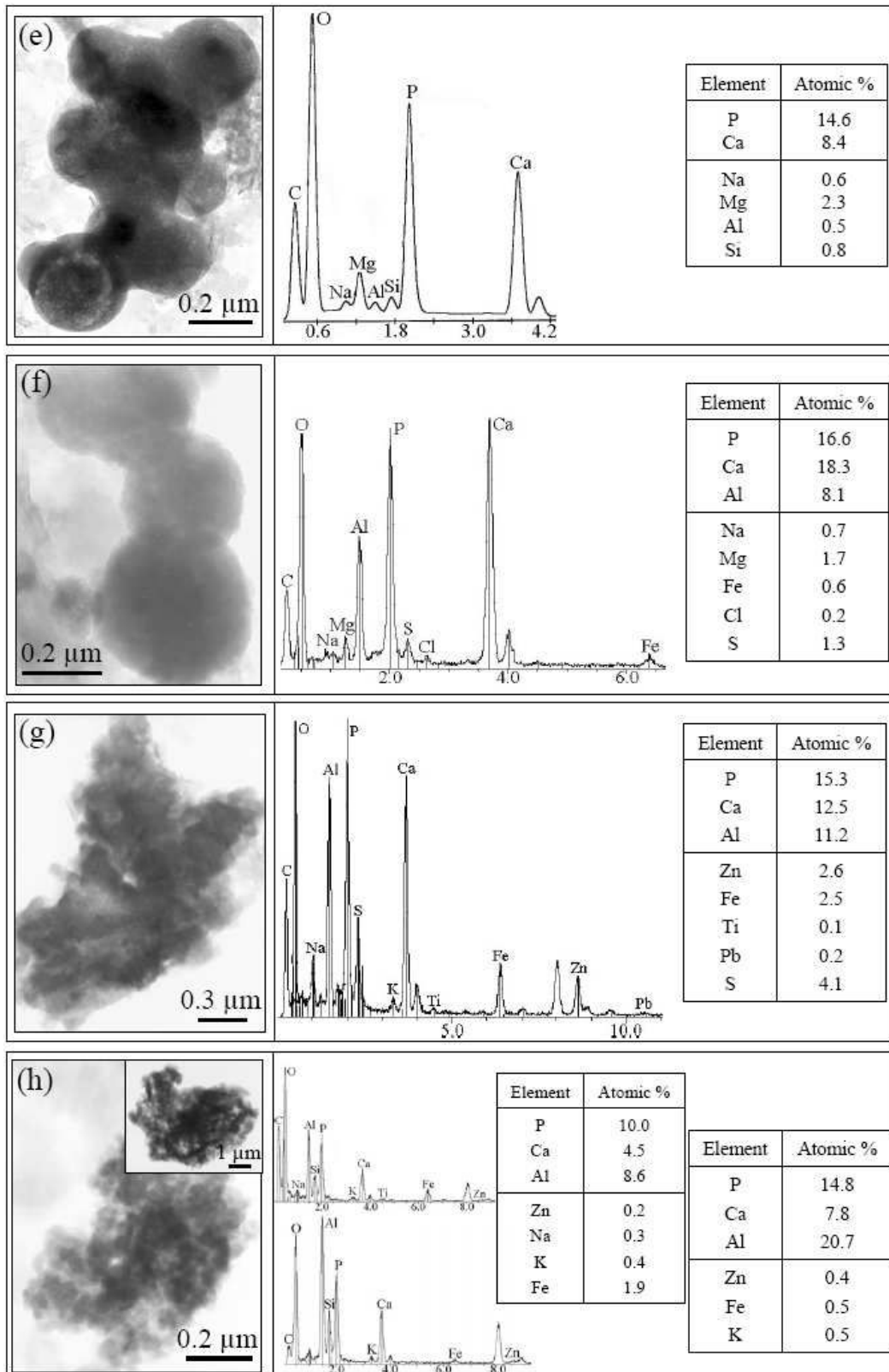
**Figure 4.** Electron micrographs and corresponding EDX spectra of typical phosphate phases. All the particles shown were found in sewage. (a) brushite, (b) whitlockite and octacalcium phosphate (inset of 4b), (c) hydroxyapatite, (d) hairy-type apatite and crystallized apatite (inset of 4d).

Various aluminum-containing phosphate phases also occur in the sewage. They are tentatively attributed to bearthite ( $(\text{Ca}_2\text{Al}(\text{PO}_4)_2(\text{OH}))$  Ca/P = 1, Al/Ca = 0.5) (Fig. 4f), foggite ( $(\text{CaAl}(\text{PO}_4)(\text{OH}_2\cdot\text{H}_2\text{O}))$  Ca/P = 1, Al/Ca = 1) (Fig. 4g), gatumbaite ( $(\text{CaAl}_2(\text{PO}_4)_2(\text{OH})_2\cdot\text{H}_2\text{O})$  Ca/P = 0.5, Al/Ca = 2) (inset of Fig. 4h), and crandallite ( $(\text{CaAl}_3(\text{PO}_4)_2(\text{OH})_5\cdot\text{H}_2\text{O})$  Ca/P = 0.6, Al/Ca = 3) (Fig. 4h). The Al-Ca phosphates do not present a definite morphological aspect and rather appear as either spheres or aggregates similar in size and shape to the previously described calcium phosphate minerals. Their elemental composition frequently comprises S (i.e.  $\text{SO}_4^{2-}$ ) as compensating anion and small amounts of metals such as Fe, Zn, and Pb.

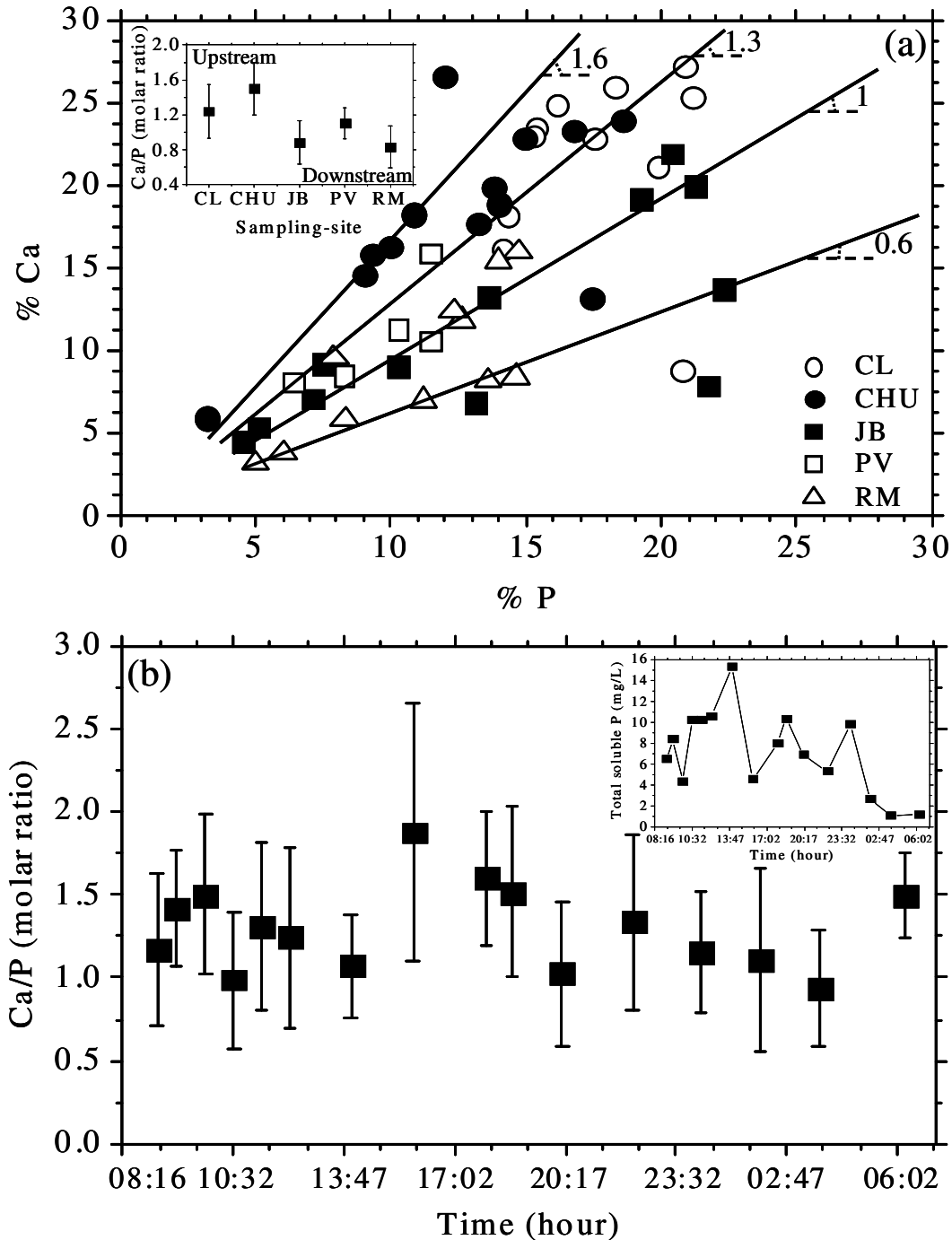
Phosphate species containing iron were rarely found within the sewer network. Single occurrences of strengite ( $\text{FePO}_4\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ), anapaite ( $\text{Ca}_2\text{Fe}(\text{PO}_4)_2\cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ), probably melonjosephite ( $\text{CaFe}(\text{II})\text{Fe}(\text{III})(\text{PO}_4)_2(\text{OH})$ ), and even more anecdotic, iron phosphide ( $\text{Fe}_3\text{P}$ ) – most likely eroded from cast-iron distribution pipes - were identified in suspended matter, biofilm, and sediment, respectively. Vivianite ( $\text{Fe}_3(\text{PO}_4)_2\cdot 8\text{H}_2\text{O}$ ), a common iron phosphate mineral in freshwater sediments (Nriagu and Dell, 1974; Taylor et al., in press), biological sludges treated with ferrous sulfate (Frossard et al., 1997), and known to control phosphorus availability in septic system plumes (Robertson et al., 1998), was not detected in any of our samples.

### ***3. Spatial and temporal evolution of phosphate species in the sewer network***

As illustrated in figure 5a, the composition of phosphate minerals slightly evolves along the sewer network. Upstream, the average Ca/P elemental ratio is close to 1.3, the phosphate phases most frequently identified being apatite, octacalcium phosphate, whitlockite, and brushite. Conversely, aluminum-calcium phosphate species are more abundant at downstream sampling sites, while Ca/P ratios decrease to about 0.8. The temporal evolution of Ca/P ratio within suspended matter collected at an upstream sampling site (Fig. 5b), indicates that the average Ca/P remains close to 1.3 even though soluble phosphate concentration fluctuates markedly during the day. Interestingly, biofilms and sediments taken at a given sampling site, were found to be slightly enriched in hydroxyapatite and calcium-aluminum phosphate phases compared with the associated suspended matter. This suggests that an increased residence time in the sewer network induces a change in phosphate mineralogy.



**Figure 4.** Electron micrographs and corresponding EDX spectra of typical phosphate phases. All the particles shown were found in sewage samples except for 4e detected in biofilms. (e) unidentified phosphorus species, (f) bearthite, (g) foggite, (h) crandallite and gatumbaite (inset of 4h).



**Figure 5.** (a) Relationship between Ca and P atomic percentages (EDXS) of phosphate particles detected in sewage samples along a sewer section (CHU => RM). The straightlines indicate the stoichiometric ratio of apatite, whitlockite, brushite, and crandallite. The inset shows the evolution of mean Ca/P molar ratio along the sewer section.

(b) Temporal evolution of Ca/P atomic ratio of phosphate particles contained in sewage collected at JB (29 March 2005). The inset shows the evolution of Total soluble P as a function of time.

#### **4. Chemical extraction results**

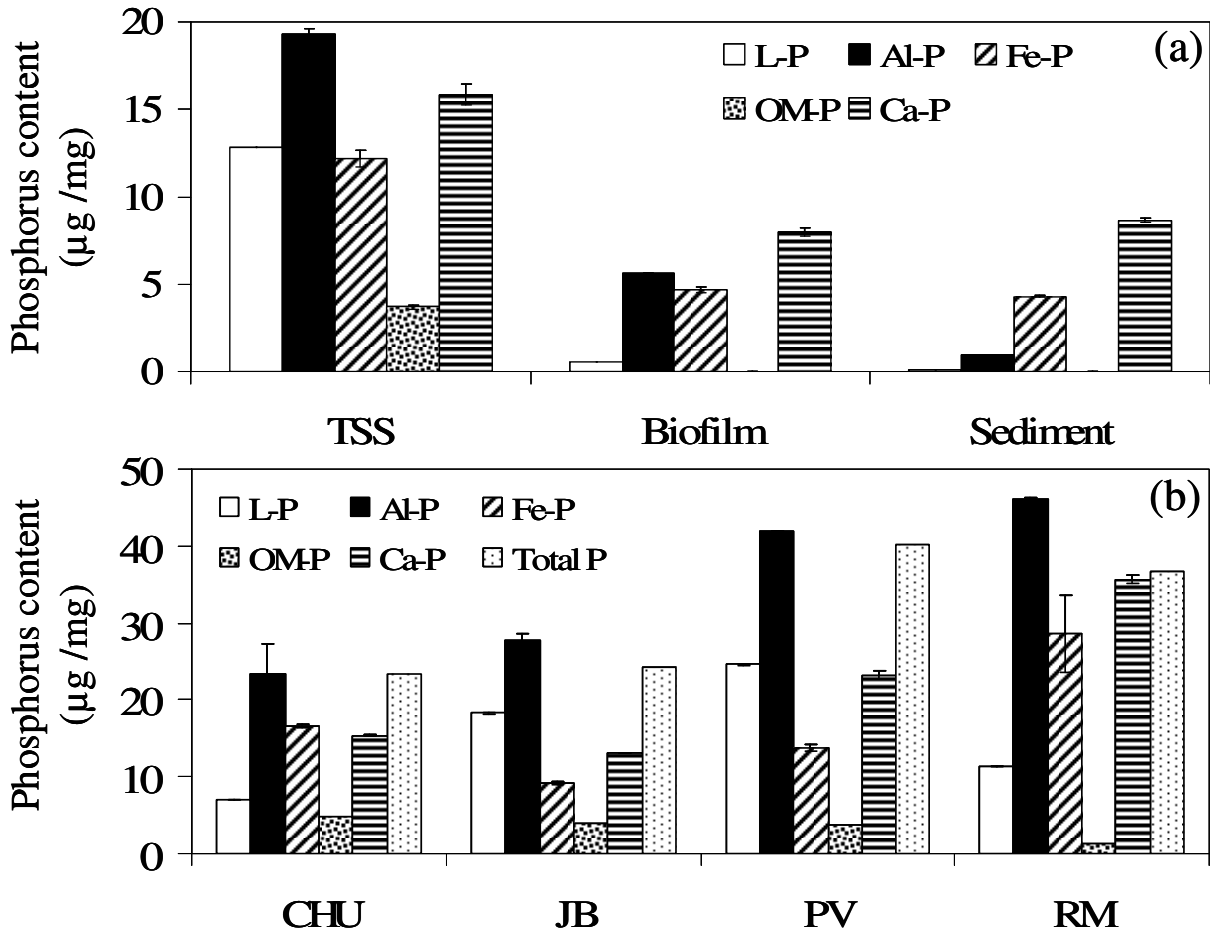
Typical partitioning of phosphorus among the extracted chemical forms in sewage suspended matter, biofilm, and sediment collected at a given sampling site, is shown in figure 6a. Results are given on the basis of dry weight material after heating at 550°C for [L-P], [Al-P], [Fe-P], [Ca-P], and on the basis of volatile solid weight (VS) for [OM-P]. Obvious differences between the three types of samples can be observed. Labile phosphorus and organic phosphorus account for a significant amount of phosphorus in sewage suspended matter, whereas these two geochemical phases are virtually absent in biofilm and sediment. Such results seem consistent with the lower solubility of phosphate carriers identified by TEM-EDXS in the latter samples. The spatial evolution of phosphorus distribution in suspended matter is also in line with TEM-EDXS speciation results (Fig. 6b) as aluminum bound phosphate gradually increases downstream. In addition, the amount of phosphorus associated with organic matter slightly decreases. However, the phosphorus fraction bound to Fe seems disproportionate in comparison with TEM observations. Figure 6b also indicates that phosphorus associated with aluminum is systematically equivalent or higher to the total amount of phosphorus contained in the samples. In fact both [Al-P], [Fe-P], are correlated with [Ca-P] (Fig. 7), which implies a non-specific dissolution of mineral phases during the chemical extraction procedure, and hence, a poor estimate of the actual phosphorus amount associated with the targeted phase.

TEM examination of phosphate species contained in each extracted residue further invalidates the extraction scheme (Table 5). Drastic changes in P chemical forms occur during the water extraction step of labile phosphate: aluminum-calcium phosphates which were not initially present in upstream samples (e.g. crandallite) are found among the residual solids after the water extraction. Similarly, aluminum-containing phosphate phases with small amounts of Fe, are formed upon extraction of organic P. Extraction of [Ca-P] and [Al-P] with H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and NH<sub>4</sub>F, respectively, removed all phosphate species except those associated with organic matter. The extraction of P associated with Fe induced the precipitation of iron-calcium phosphate aggregates. Eventually, solely the organic P extraction seemed to respect the initially present calcium-phosphate phases.

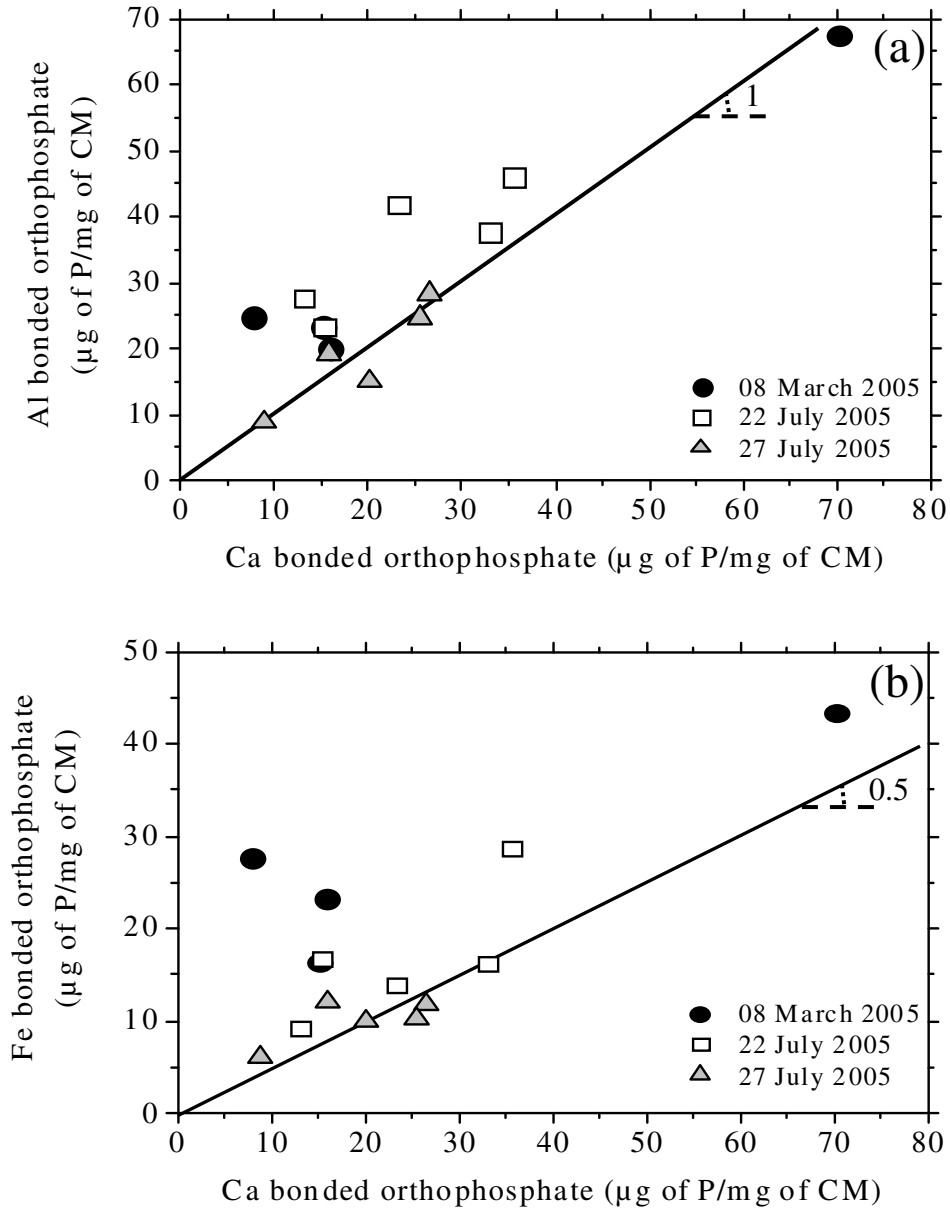
The identification of the neoformed species throws serious doubts on the validity of most sequential extraction schemes used to assess phosphorus chemical fractions in the presence of amorphous phosphate phases. Poorly-ordered wavellite (Al<sub>3</sub>(OH)<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>·5H<sub>2</sub>O)



was also reported by Frossard (1994) using  $^{31}\text{P}$  NMR after HCl extraction of anaerobically-digested and biological sludges. In that case, the authors could not conclude whether wavellite was initially present or precipitated during sequential extraction.



**Figure 6.** (a) Comparison of phosphorus fractions in sewage suspended matter, biofilm, and sediment for UGC sampling site (27 July 2005). (b) Phosphorus content in each chemical fraction for sewage suspended matter collected along CHU => RM sewer section on July 22, 2005. The content was calculated according to the quantity of 550° C heated matter, except for [OM-P] which was calculated according to the quantity of volatile matter.



**Figure 7.** Relationships between [Al-P] and [Ca-P] fractions (a) [Fe-P] and [Ca-P] fractions (b) for samples of sewage suspended matter collected at PR => LO sewer section (08 March 2005), CHU => RM sewer section (22 July 2005), and UGC => JV sewer section (27 July 2005). CM indicates that the content was calculated according to the quantity of 550° C heated matter.

**Table 5.** Nature of phosphate phases identified by TEM-EDX analysis before and after chemical extraction. Neoformed phases are indicated in bold. No phosphate species was detected in [Ca-P] and [Al-P] extraction residues. Upstream sampling site: CHU, downstream sampling site: RM.

	Initial phosphate phases	Phases detected in extraction residue				
		L-P	OM-P	Ca-P	Al-P	Fe-P
Upstream	Brushite	Brushite	Brushite			Whitlockite
	Whitlockite	Whitlockite	Whitlockite			Apatite
	Octacalcium phosphate	<b>Ca and Al phosphate</b>	Octacalcium phosphate	-	-	<b>Mg-Brushite</b>
	Apatite		Apatite			<b>Ca and Al phosphate</b> <b>Ca and Mg phosphate</b>
Downstream	Brushite	Brushite	Foggite			Brushite
	Whitlockite	Whitlockite	<b>Ca and Al phosphate</b>			Foggite
	Foggite	<b>Octacalcium phosphate</b>	<b>Ca, Fe and Al phosphate</b>	-	-	<b>Apatite</b>
	Crandallite	<b>Apatite</b>				<b>Ca and Al phosphate</b>

## DISCUSSION

### 1. Origin of phosphate mineral species

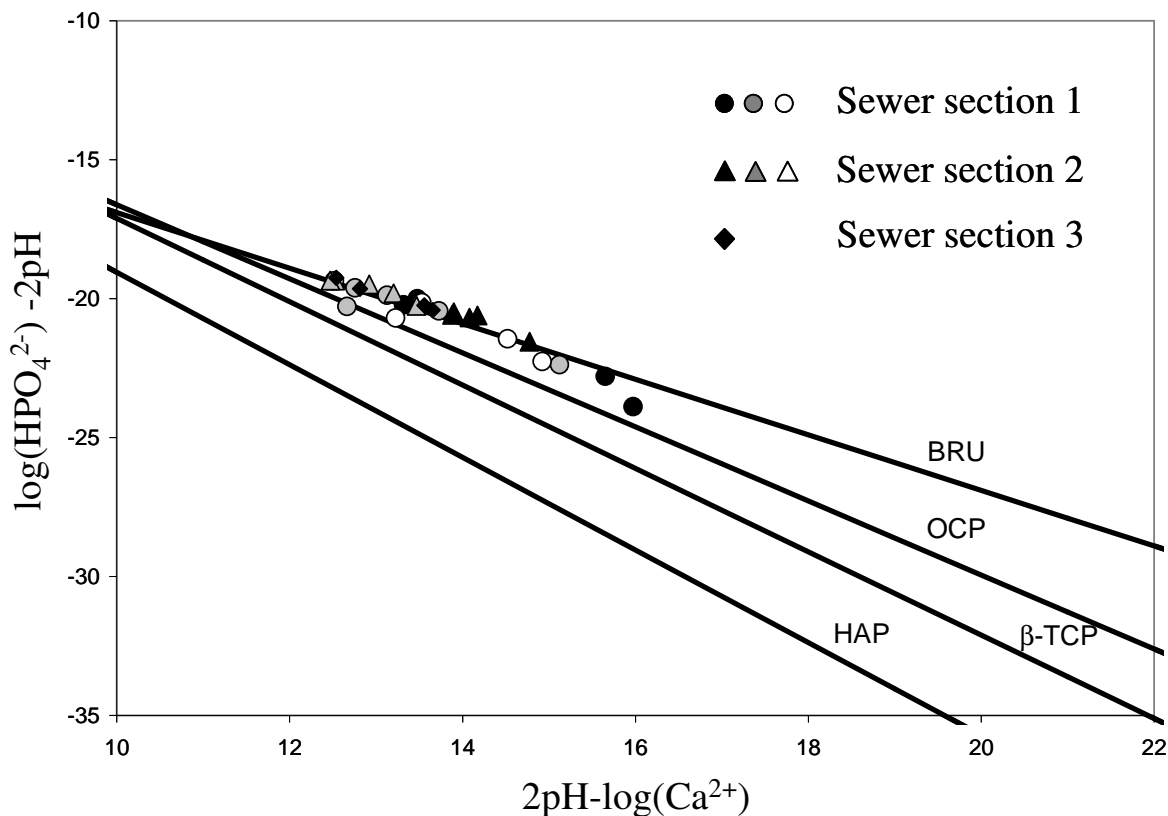
It seems quite trivial to identify biogenic phosphates such as apatite, brushite, octacalcium phosphate, or whitlockite in domestic sewage. Indeed, such phosphate phases are commonly described, though in a pathological context, in human urinary stones (brushite, octacalcium phosphate, whitlockite, carbapatite) (Bazin et al., 2007), salivary stones (apatite, brushite, and whitlockite) (Zelentsov et al., 2001), and human guts (brushite) (Gomez-Morilla et al., 2006). However, to our knowledge, such release of micron-size phosphate particles from healthy subjects has not been documented. Chemical modeling of most probable phosphate phases in cow manure suggested the presence of brushite, octacalcium phosphate,  $\beta$ -tricalcium phosphate, and struvite ( $\text{MgNH}_4\text{PO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ) (Güngör and Karthikeyan 2005). Likewise, solubility equilibria suggest the formation of hydroxyapatite in urine diluted with tap water, mineral which was indeed identified in samples taken from urine-collecting systems (Udert et al., 2003b). Our own control experiments were consistent with the previous report: SEM examination of particles retained onto a 0.2  $\mu\text{m}$  filter after filtration of fresh human urine, only revealed the presence of well-crystallized calcium oxalate. However, upon a ten-fold dilution in tap water of the same urine samples, small aggregates of hydroxyapatite

nanocrystals and ferric-calcium phosphate precipitates of varying composition, were observed. The ferric-calcium aggregates may correspond to the association of phosphate anions with iron oxyhydroxide colloids initially present in tap water. Taking into account these dynamic aspects, it is possible that most phosphate minerals entering the sewer are eventually formed upon dilution of human excretion products by flushing.

The presence of aluminum-calcium phosphate compounds seems more unusual. Until now, bearthite and gatumbaite have only been described in pegmatites, metamorphic rocks, and hydrothermally altered andesites (Duggan et al., 1990; Jambor and Vanko, 1993). In contrast, crandallite and foggite have been found in sedimentary environments with physicochemical characteristics comparable to those of the sewer network. Thus, crandallite occurs in coal seams (Ward et al., 1996; Rao and Walsh, 1999), in lateritic weathering profiles in which it is formed from the alteration of clay minerals in presence of apatite (Vieillard et al., 1979), or as a secondary precipitate in the presence of Al-hydroxides (Schwab et al., 1989). Foggite is also recognized as a secondary mineral in phosphate deposits and seems to result from the decomposition of crandallite (Onac et al., 2002). It is therefore likely that, in the sewer network, those aluminum-calcium phosphate minerals correspond to neoformed phases. TEM-EDXS observation of these aluminum-containing phosphate species after water-extraction of labile P strongly supports the neoformation hypothesis. In addition, the time scale associated with the various leaching steps is equivalent to the transit time of sewage within the sewer network.

## ***2. Phosphate geochemistry in the urban sewer***

The variety of phosphate minerals that occur simultaneously in a single sample of sewage, suggests that the thermodynamic equilibrium between phosphate phases and solution is not reached within the sewer system. Thermodynamic non-equilibria are indeed typical of phosphate mineral associations. For instance Nancollas (1974) show that up to four different calcium phosphate phases can be formed in the early stages of precipitation in highly supersaturated solutions seeded with thermodynamically stable hydroxyapatite. Kinetic phenomena are shown to be predominant in controlling the stoichiometry of the species precipitated initially. In our case, the sewage is supersaturated with respect to the more stable phases octacalcium phosphate and hydroxyapatite, but is close to equilibrium with brushite, the most soluble phase (Fig. 8)



**Figure 8.** Theoretical solubility isotherms for brushite (BRU), octacalcium phosphate (OCP),  $\beta$ -tricalcium phosphate ( $\beta$ -TCP) and hydroxyapatite (HAP) at 25°C and 1 atmosphere pressure. The solubility constants are given in the appendix 1. Measured data come from the 3 sewer sections (see Fig. 1) and from 1, 2 or 3 sampling periods (black, grey and white symbols). The species activities in each sample were calculated with the raw data using ECOSAT (Keizer & Van Riemsdijk 1998).

From a kinetic point of view, this strongly suggests that brushite is formed first, before transforming to apatite and octacalcium phosphate. The hypothesis is supported by the increase in apatite observed between fresh suspended particles and deposited particles (“sediment”) that have had time to age. Along the sewer system, transformation of metastable Ca-phosphate species is further supported by the evolving solution chemistry. If alkaline conditions initially prevail (pH ~ 8.5-9), the pH tends to decrease to about 7.9 at downstream sampling sites. In addition, groundwater infiltrations dilute soluble phosphate contents and increase calcium concentration during sewage transportation (Fig. 9a) (Le Bonte et al., in press; Houhou et al., in preparation). These changes may accelerate the formation of octacalcium-phosphate and apatite by partial dissolution of the more soluble species. Interestingly, the characteristic size of the Ca-phosphate phases in the effluent appears to be

related to the degree of their supersaturation in solution. The critical nucleation size  $r^*$  is related to saturation by the following equation (Wu and Nancollas, 1999):

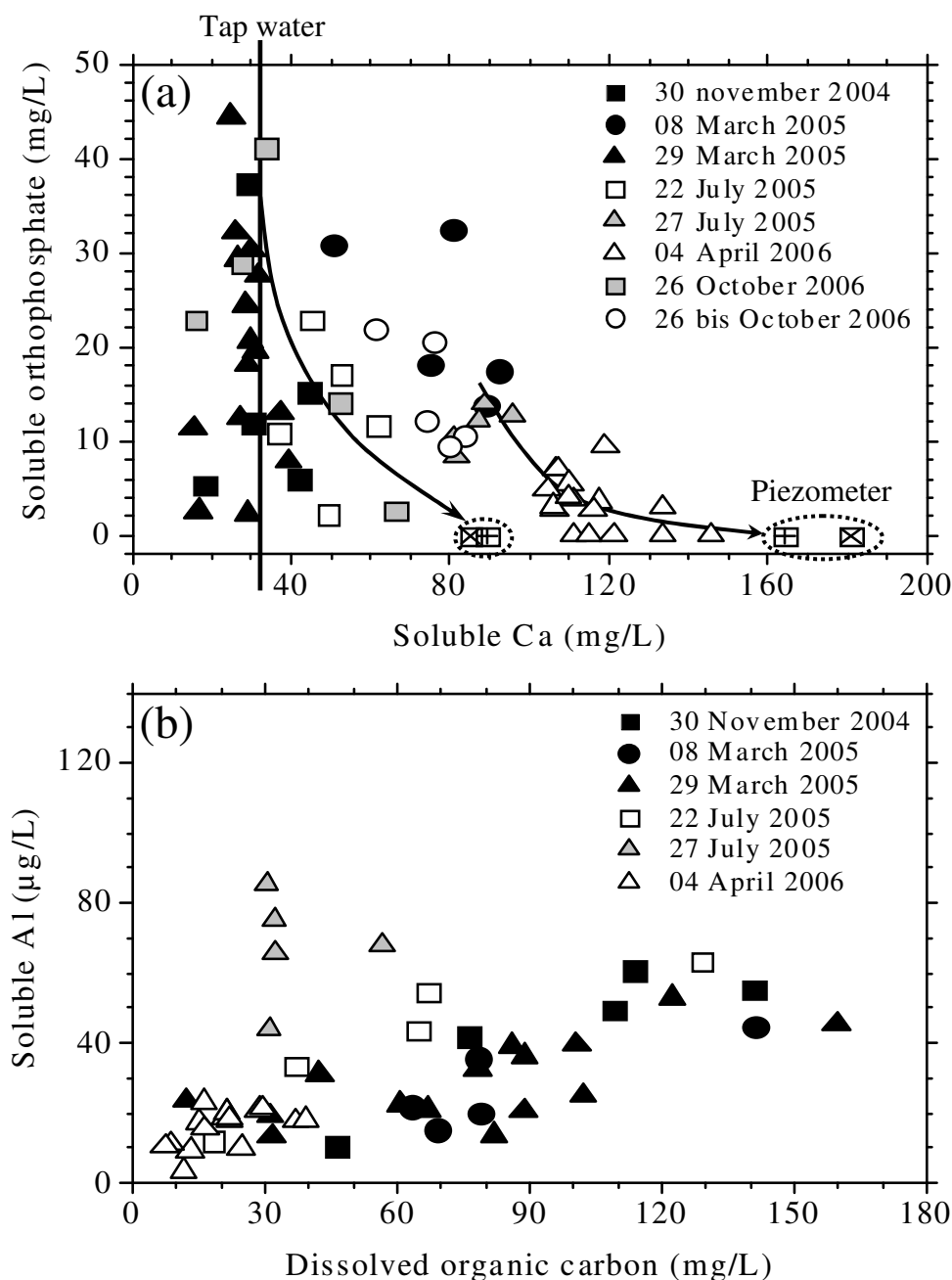
$$r^* = \frac{2\gamma_{SL}\Omega_V}{kT\ln S}$$

where  $\gamma_{SL}$  is the solid-liquid interfacial energy,  $\Omega_V$  the molecular volume,  $k$  the Boltzman's constant,  $T$  the temperature, and  $S$  the supersaturation. Using  $\gamma_{SL}$  and  $\Omega_V$  data from Wu (1999),  $r^*$  should fall in the range 1-3 nm, 6-174 nm, and 23-110 nm, for brushite, octacalcium phosphate, and apatite, respectively. This is fairly close to the 2-3 nm, 20-100 nm, and 200 nm values frequently determined by TEM. It illustrates the essential role of reaction kinetics on the texture of the mineral phases in the sewer system.

The behaviour of aluminum in the sewer system is more difficult to assess due to less available data. The source of aluminum in the sewer system is not known precisely to date. At first approach, the dissolved Al was considered to be dominated by Al-hydroxy ions. Based on this hypothesis, solubility calculations indicated that the solutions should be in equilibrium with an Al-hydroxide phase. Average saturation indices are  $0.91 \pm 0.06$  for amorphous  $\text{Al}(\text{OH})_3$ ,  $1.09 \pm 0.062$  for gibbsite and  $1.11 \pm 0.063$  for diaspore when only hydroxy-ions are considered for calculation. However no Al-hydroxides have been identified in any particulate fraction of the sewer, and at any collection time. Although close to saturation, Al-hydroxides do not precipitate. This inhibition may be due to complexation of dissolved Al with organic ligands. Indeed correlation between dissolved Al and dissolved organic carbon in the effluents (Fig. 9b) suggests that aluminum may be partly complexed to organic ligands. Natural organic matter and in particular dicarboxylic acids have been show to very effectively favor depolymerization, retard the precipitation and modify the structure of Al-hydroxide colloids (Thomas et al., 1991; Masion et al., 1994; Masion et al., 2000). However, in the present case, blockage of the  $\text{Al}(\text{O},\text{OH})_6$  polymerisation process may also be provoked by phosphate. Phosphate ions largely exceed the aluminum concentration in solution (average  $\text{P}/\text{Al} = 400$ ) in the sewer system. Inhibition or retardation of hydroxide formation by phosphate has been recognized previously for iron (Rose et al., 1996; Rose et al., 1997; El Samrani et al., 2004b) and shown to be effective at  $\text{P}/\text{Fe}$  ratios as low as 1. If Al-hydroxy-phosphate complexes do form in solution, it is straightforward to expect the formation of Al-phosphate minerals. Indeed TEM-EDXS analyses confirmed the presence of bearthite, gatumbaite and especially crandallite (Fig. 3). In figure 10 the crandallite solubility curve was plotted against  $\text{Al}(\text{OH})_4^-$ , the dominating Al-hydroxy ion at the pHs of the sewer. The equilibrium reaction and the

solubility constants used are given in appendix 2. In the absence of known values for the formation of Al-hydroxy-phosphate complexes, the reaction was built to implicitly take them into account by considering  $\text{Al}(\text{OH})_4^-$  and  $\text{HPO}_4^{2-}$  species. Figure 10 reveals that the sewer solution is undersaturated with respect to crandallite. However the solubility limit is closely approached for pHs below 8.5, which corresponds with the samples from downstream stations, where indeed the mineral has been identified by TEM.

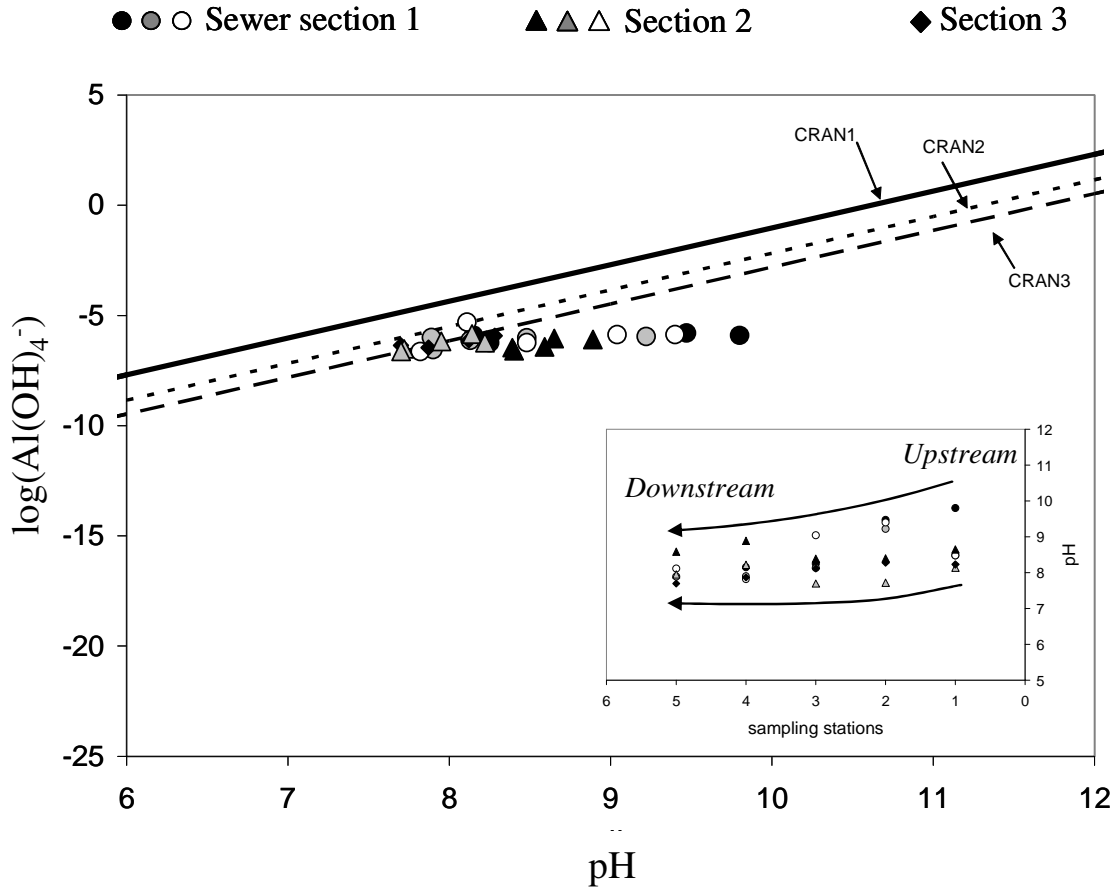
To our knowledge, no solubility constants have yet been determined for minerals such as bearthite or gatumbaite, so that it is not possible to suggest a kinetic sequence for the formation of Al-Ca-phosphates as we did it for the Ca-phosphates. Nonetheless, TEM images show that the morphology of bearthite is alike brushite and crandallite resembles whitlockite or octacalcium phosphate. These similarities suggest that bearthite may form first, and then transform to whitlockite or crandallite.



**Figure 9.** (a) Scatter plot of  $PO_4^{3-}$  versus soluble Ca. Data for all sampling campaigns are represented. The Ca concentrations in groundwater were obtained from water samples taken from piezometers (Houhou et al., in preparation). The vertical bar indicates the mean soluble Ca concentration in tap water; the two arrows show the evolution of orthophosphate concentration along a given sewer section.

(b) Scatter plot of soluble Al versus dissolved organic carbon. Except for samples collected in the UGC -> JV sewer section (27 July 2005), these two variables are linearly correlated.





**Figure 10.** Solubility isotherm of crandallite expressed as a function of aqueous Al-hydroxide. The solubility constant was calculated for reaction:  $\text{CaAl}_3(\text{PO}_4)_2(\text{OH})_5 \cdot \text{H}_2\text{O} + 6\text{H}_2\text{O} \Leftrightarrow \text{Ca}^{2+} + 3\text{Al}(\text{OH})_4^- + 2\text{HPO}_4^{2-} + 5\text{H}^+$ , using the Gibb's free energies of formation given in appendix 2. The exact position of the line strongly depends on the accuracy of the  $\Delta G^\circ_f$ . The three lines cran1, cran2 and cran3 were constructed using different values of  $\Delta G^\circ_f$  as cited in appendix 2. For the field samples (symbols), the solubility limit is approached when pH values  $< 8.5$  prevail, which is the case for stations located at downstream positions of the respective sewer sections (inset).

## CONCLUSION

In anthropogenic aquatic systems, phosphorus speciation has often been limited to a simple classification between soluble P and particulate P. This study clearly demonstrates that electron microscopy coupled with EDX spectroscopy provides some useful information on the nature of phosphate amorphous phases that are present in an urban sewer. In particular, this technique reveals the formation of aluminum-calcium phosphate species during sewage transit that could not be derived from particulate phosphorus analyses. The phase evolution observed in the present case study can not readily be generalized to any sewer system as the ionic content of sewage, and especially the presence of Mg (Nancollas et al., 1976), influence the mineral phases that are formed. Nevertheless, a study conducted on sewer composition at Levenmouth (Scotland), also showed the presence of foggite, bearthite, gatumbaite, and crandallite at the inlet of the wastewater treatment plant (Lartiges, unpublished results).

The knowledge on phosphorus speciation and its evolution in the sewer system allows a better understanding of the urban sewer as a biophysicochemical reactor. It may help to adjust the functioning of the downstream wastewater treatment plant to the characteristics of the sewer system, which is particularly important when biological phosphate removal methods are used. In the case of combined sewer overflows, the knowledge of species composition in the sewer will be helpful in predicting the forms of phosphorus exported to the local waterways.

**Acknowledgements :** This work was mainly funded through a CNRS-INSU (ECODYN) grant which is gratefully acknowledged. Region Lorraine also provided funding through Zone Atelier Moselle. We are grateful to M. Piqué and M. Villeroy (Service hydraulique CUGN) for technical assistance during all field studies. We also wish to thank the staff of SARM (CRPG-UPR 80) where ICP analyses were carried out.

## REFERENCES

- Alexander G.C., Stevens, R.J. (1976) Per capita phosphorus loading from domestic sewage. *Wat. Res.* 10(9), 757-764.
- Bedrock, C.N.; Cheshire, M.V.; Shand, C.A. (1997) The involvement of iron and aluminum in the bonding of phosphorus to soil humic acid. *Commun. Soil. Sci. Plant Anal.* 28, 961-971.
- Butler, D., Fnedier, E., Gatt, K. (1995) Characterising the quantity and quality of domestic wastewater inflows. *Wat. Sci. Technol.* 31(7), 13-24.
- Duggan, M.B., Jones, M.T., Richards, D.N.G., Kamprad, J.L. (1990) Phosphate minerals in altered andesite from Mount Perry, Queensland, Australia. *Can. Mineral.* 28, 125-131.
- Carignan, J., Hild, P., Mevelle, G., Morel, J., Yeghicheyan, D. (2001) Routine analysis of trace elements in geological samples using flow injection and low pressure on-line liquid chromatography coupled to ICP-MS: a study of geochemical reference materials BR, DR-N, UB-N, AN-G, and GH. *Geostandards Newsletter* 25, 187-198.
- Chang, S.G., Jackson, M.L. (1957) Fractionation of soil phosphorus. *Soil. Sci.* 84, 133-144.
- Chen, G.H., Leung, D.H.W., Hung, J.C. (2001) Removal of dissolved organic carbon in sanitary gravity sewer. *J. Environ. Eng.* 127, 1-7.
- Crabtree, R.W. (1989) Sediments in sewers. *J. Inst. Water Environ. Manag.*, 3(3), 569-578.
- Eggers, E. (1986) Full-scale experiences with phosphate crystallisation in a crystalreactor. *Wat. Sci. Tech.* 23, 819-824.
- El Samrani, A.G., Lartiges, B.S., Ghanbaja, J., Yvon, J., Kohler, A. (2004) Trace element carriers in combined sewer during dry and wet weather: an electron microscope investigation. *Wat. Res.* 38, 2063-2076.
- El Samrani, A.G., Lartiges, B.S., Montargès-Pelletier, E., Kazpard, V., Barrès, O., Ghanbaja, J. (2004b) Clarification of municipal sewage with ferric chloride: the nature of coagulant species. *Wat. Res.* 38, 756-768.
- Froelich, P.N. (1988) Kinetic control of dissolved phosphate in natural rivers and estuaries: a primer on the phosphate buffer mechanism. *Limnol. Oceanogr.* 33(4) 649-668.
- Frossard, E., Tekely, P., Grimal, J.Y. (1994) Characterization of phosphate species in urban sewage sludges by high-resolution solid-state <sup>31</sup>P NMR. *Eur. J. Soil Sci.* 45, 403-408.
- Frossard, E., Bauer, J.P., Lothe, F. (1997) Evidence of vivianite in FeSO<sub>4</sub>-floculated sludges. *Wat. Res.* 31(10), 2429-2454.

Gaboreau, S., Vieillard, P. (2004) Prediction of Gibbs free energies of formation of minerals of the alunite supergroup. *Geochim. Cosmochim. Acta* 68, 3307-3316

Gomez-Morilla, I., Thoree, V., Powell, J.J., Kirkby, K.J., Grime, G.W. (2006) Identification and quantitative analysis of calcium phosphate microparticles in intestinal tissue by nuclear microscopy. *Nucl. Instr. and Meth. B* 249, 665-669.

Guisasola, A., de Haas, D., Keller, J., Yuan, Z. (2008) Methane formation in sewer systems. *Wat. Res.* 42, 1421-1430.

Güngör, K., Karthikeyan, K.G. (2005) Probable phosphorus solid phases and their stability in anaerobically digested dairy manure. *Trans. ASABE* 48(4), 1509-1520.

Halliwell, D.J., McKelvie, I.D., Hart, B.T., Dunhill, R.H. (2001) Hydrolysis of triphosphate from detergents in a rural waste water system. *Wat. Res.* 35(2), 448-454.

Hanrahan, G., Salmassi, T.M., Khachikian, C.S., Foster, K.L. (2005) Reduced inorganic phosphorus in the natural environment: significance, speciation and determination. *Talanta* 66, 435-444.

Houhou, J., Lartiges, B.S., France-Lanord, C., Guilmette, C., Poix, S., Mustin, C. (d, in preparation) Isotopic tracing of water sources in an urban sewer: a multiple D, <sup>18</sup>O<sub>H2O</sub>, <sup>34</sup>S, <sup>18</sup>O<sub>SO4</sub> stable isotope approach.

Hvitved-Jacobsen, T., Raunkjaer, K., Nielsen, P.H. (1995) Volatile fatty acids and sulfide in pressure mains. *Wat. Sci. Tech.* 31(7), 169-179.

Jambor, J.L., Vanko, D.A. (1993) New mineral names. *Am. Mineral.* 78, 1314-1319.

Jolley, D., Maher, W., Cullen, P. (1998) Rapid method for separating and quantifying orthophosphate and polyphosphates: application to sewage samples. *Wat. Res.* 32(3) 711-716.

Keizer, M.G., Van Riemsdijk, W.H. (1998) ECOSAT. Department Environmental Sciences, Sub department Soil Sciences and Plant Nutrition, Wageningen University. Version 4.7, 76 p.

Kittrick, J.A. (1966) *Soil. Sci. Soc. Am. Proc.* 30, 595-698.

Le Bonté, S., Pons, M.N., Potier, O., Rocklin, P. Relation between conductivity and ion content in urban wastewater. *Revue des Sciences de l'Eau* (in press).

Lindsay, W.L. (1979) *Chemical equilibria in soils*. Wiley Interscience New York, 449p.

Masion, A., Thomas, F., Tchoubar, D., Bottero, J.-Y. & Tekely, P. (1994) Chemistry and structure of Al(OH)/organic precipitates. A small angle X-ray scattering study. 3. Depolymerization of the Al13 polycation by organic ligands. *Langmuir* 10, 4353-4356.

Masion, A., Vilgé-Ritter, A., Rose, J., Stone, W.E.E., Teppen, B.J., Rybacki, D., Bottero, J.Y. (2000) Coagulation-flocculation of natural organic matter with Al salts: speciation and structure of the aggregates. *Environ. Sci. Technol.* 34, 3242-3246.

McKelvie, I.D. (2005) Separation, preconcentration and speciation of organic phosphorus in environmental samples. In *Organic Phosphorus in the Environment*; Turner, B.L., Frossard, E., Bladwin, D.S., Eds; CAB International: Wallingford, 2005; pp 1-20.

Mesmer, R.E, Base, C.F. Jr. (1974) *J. Soln. Chem.* 3, 307-321.

Michard, G. (1989) *Equilibres chimiques dans les eaux naturelles.* 357 p. Publisud

Moreau, S (1997) Investigation of Vilaine watershed. PhD thesis, Rennes I University.

Mulkerrins, D., Dobson, A.D.W., Colleran, E. (2004) Parameters affecting biological phosphate removal from wastewaters. *Environment International* 30, 249-259.

Murphy, J., Riley, J.P. A modified single solution method for the determination of phosphate in natural waters. *Anal. Chim. Acta* 1962, 27, 31-36.

Nancollas, G.H., Tomazic, B. (1974) Growth of calcium phosphate on hydroxyapatite crystals. Effect of supersaturation and ionic medium. *J. Phys. Chem.* 78(22), 2218-2224.

Nancollas, G.H., Tomazic, B., Tomson, M. (1976) The precipitation of calcium phosphates in presence of magnesium. *Croat. Chem. Acta* 48, 431-438.

Nriagu, J.O., Dell, C.I. (1974) Diagenetic formation of iron phosphates in recent lake sediments. *Am. Min.* 59, 934-946.

Nriagu, J.O. (1976) Phosphate-clay mineral relations in soils and sediments. *Canadian J. Earth Sci.* 13, p.717.

Onac, B.P. Breban, R., Kearns, J., Tamas, T. (2002) Unusual minerals related to phosphate deposits in Cioclovina Cave, Sureanu Mts (Romania). *Theoretical and Appl. Karst.* 15, 27-34.

Owens, P.N., Walling, D.E. (2002) The phosphorus content of fluvial sediment in rural and industrialized river basins. *Wat. Res.* 36, 685-701.

Palmquist, H., Hanaeus, J. (2005) Hazardous substances in separately collected grey- and blackwater from ordinary Swedish households. *Sci. Total Env.* 348, 151-163.

Raunkjaer, K., Hvitved-Jacobsen, T., Nielsen, P.H. (1995) Transformation of organic matter in a gravity sewer. *Wat. Environ. Res.* 67(2), 181-188.

Rao, P.D., Walsh, D.E. (1999) Influence of environments of coal deposition on phosphorous accumulation in a high latitude, northern Alaska, coal seam. *Int. J. Coal Geol.* 38, 261-284.

Robertson, W.D., Schiff, S.L., Ptacek, C.J. (1998) Review of phosphate mobility and persistence in 10 septic system plumes. *Ground Wat.* 36, 1000-1010.

Schwab, R.G., Herold, H., Da Costa, M.L., De Oliveira, N.P. (1989) The formation of aluminous phosphates through lateritic weathering of rocks. *Weathering.* 2, 369-386.

Shock, E.L., Helgeson, H.C. (1988) Calculation of the thermodynamic properties and transport properties of aqueous species and equation of state predictions to 5kb and 1000°C. *Geochim. Cosmochim. Acta* 52, 2009-2036.

Robie, R.A., Hemingway, B.S. (1995) Thermodynamic properties of minerals and related substances at 298.15 K and 1bar ( $10^5$  pascals) pressure and higher temperatures. Bulletin 2131 U.S. Geological Survey. Taylor, K.G., Boulton, S. (2007) The role of grain dissolution and diagenetic mineral precipitation in the cycling of metals and phosphorus: A study of a contaminated urban freshwater sediment. *Appl. Geochem.* 22, 1344-1358.

Taylor, K.G., Hudson-Edwards, K.A., Bennett, A.J., Vishnyakov, V. (in press) Early diagenetic vivianite [ $\text{Fe}_3(\text{PO}_4)_2 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$ ] in a contaminated freshwater sediment and insights into zinc uptake: a  $\mu$ -EXAFS,  $\mu$ -XANES and Raman study. *Appl. Geoch.*

Tchobanoglous, G., Burton, F.L., Stensel, H.D. (2003) *Wastewater Engineering. Treatment and Reuse.* 4<sup>th</sup> ed. (Int. Ed). Metcalf and Eddy, McGraw-Hill, New York, 181-191.

Thomas, F., Masion, A., Bottero, J.Y., Rouiller, J., Genevrier, F., Boudot, D. (1991) Aluminum(III) speciation with acetate and oxalate. A potentiometric and  $^{27}\text{Al}$  NMR study. *Environ. Sci. Technol.* 25, 1553-1559.

Udert, K.M., Larsen, T.A., Biebow, M., Gujer, W. (2003a) Precipitation dynamics in a urine-collecting system. *Wat. Res.* 37(11), 2571-2582.

Udert, K.M., Larsen, T.A., Gujer, W. (2003b) Estimating the precipitation potential in urine-collecting systems. *Wat. Res.* 37, 2667-2677.

Vieillard, P., Tardy, Y., Nahon, D. (1979) Stability fields of clays and aluminum phosphates: parageneses in lateritic weathering of argillaceous phosphatic sediments. *Am. Mineral.* 64, 626-634.

Ward, C.R., Corcoran, J.F., Saxby, J.D., Read, H.W. (1996) Occurrence of phosphorus minerals in Australian coal seams. *Int. J. Coal Geol.* 30, 185-210.

Warith, M.A., Kennedy, K., Reitsma, R. (1998) Use of sanitary sewer as wastewater pre-treatment systems. *Waste Manag.* 18, 235-247.

Wu, W., Nancollas, G.H. (1999) Determination of interfacial tension from crystallisation and dissolution data: a comparison with other methods. *Adv. Colloid Interface Sci.* 79, 229-279.

Yongsiri, C., Vollertsen, J., Hvitved-Jacobsen, T. (2004) Hydrogen sulfide emission in sewer networks: a two-phase modeling approach to the sulfide cycle. *Wat. Sci. Technol.* 50(4), 161-168.

Zelentsov, E.L., Moroz, T.N., Kolmogorov, Y.P., Tolmachev, V.E., Dragun, G.N., Palchik, N.A., Grigorieva, T.N. (2001) The elemental SRXRF analysis and mineral composition of human salivary stones. Nucl. Instr. and Meth. A 470, 417-421.

**APPENDIX 1.**

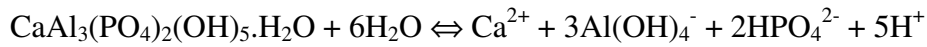
Ca-phosphate Solubility constants (25 °C, 1 atm) (Lindsay, 1979)

<b>Mineral phase / reaction</b>	<b>Log(K°)</b>
Octacalciumphosphate: $\text{Ca}_8\text{H}(\text{PO}_4)_3 \cdot 2.5\text{H}_2\text{O} \Leftrightarrow 4\text{Ca}^{2+} + 2.5\text{H}_2\text{O} + 3\text{HPO}_4^{2-}$	-9.84
Brushite $\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O} + \text{H}^+ \Leftrightarrow \text{Ca}^{2+} + \text{H}^+ + \text{HPO}_4^{2-} + 2\text{H}_2\text{O}$	-6.57
Hydroxyapatite $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH} + 4\text{H}^+ \Leftrightarrow 5\text{Ca}^{2+} + 3\text{HPO}_4^{2-} + \text{H}_2\text{O}$	-7.14
$\beta$ -tricalciumphosphate (whitlockite) $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2 + 2\text{H}^+ \Leftrightarrow 3\text{Ca}^{2+} + 2\text{HPO}_4^{2-}$	-4.22
Crandallite $\text{CaAl}_3(\text{PO}_4)_2(\text{OH})_5 \cdot \text{H}_2\text{O} + 7\text{H}^+ \Leftrightarrow \text{Ca}^{2+} + 3\text{Al}^{3+} + 2\text{HPO}_4^{2-} + 6\text{H}_2\text{O}$	1.5
Al(OH) <sub>3</sub> amorphous $\text{Al}(\text{OH})_3 + 3\text{H}^+ \Leftrightarrow \text{Al}^{3+} + 3\text{H}_2\text{O}$	9.66
Gibbsite $\text{Al}(\text{OH})_3 + 3\text{H}^+ \Leftrightarrow \text{Al}^{3+} + 3\text{H}_2\text{O}$	8.04
Diaspore $\text{Al}(\text{OH})_3 + 3\text{H}^+ \Leftrightarrow \text{Al}^{3+} + 3\text{H}_2\text{O}$	7.92



**APPENDIX 2.**

The solubility constant of crandallite was calculated for the reaction:



using  $\Delta G^\circ_f$  values listed below.  $\text{Log}(K^\circ)$  values vary from -63 to -69 when alternate  $\Delta G^\circ_f$  values for  $\text{Al}(\text{OH})_4^-$ ,  $\text{HPO}_4^{2-}$  and crandallite are used.

SPECIES	$\Delta G^\circ_f$ (kJ/mol)	REFERENCE
$\text{Ca}^{2+}$	-552.79	1
$\text{Al}(\text{OH})_4^-$	-1307.33	2
	-1305.4	3
$\text{HPO}_4^{2-}$	-1097.07	4
	-1089.3	3
$\text{H}_2\text{O liq}$	-237.18	5
Crandallite	-5608.64	6
	-5596.5	7
	-5618.69	8

1. Shock and Helgeson (1988) cited in Gaboreau and Vieillard (1993).
2. Kittrick (1966) cited in Lindsay (1979).
3. Michard (1989).
4. Mesmer and Base (1974) cited in Lindsay (1979).
5. Robie and Hemingway (1995) cited in Gaboreau and Vieillard (1993),
6. Schwab et al. (1989).
7. Vieillard et al. (1979) cited in Schwab et al. (1989).
8. Nriagu (1976) cited in Schwab et al. (1989).

# ***CHAPITRE*** ***(III)***

Spéciation des éléments  
traces dans le réseau  
d'assainissement en  
temps sec

**Dynamics of heavy metals and trace element carriers in sewer system  
during dry weather**

J. Houhou<sup>1\*</sup>, B.S. Lartiges<sup>1\*</sup>, E. Montarges-Pelletier<sup>1</sup>, J. Ghanbaja<sup>2</sup>, A. Kohler<sup>2</sup>

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

<sup>2</sup>*Nancy University - SCMEM-FST/UHP, 7137 boulevard des Aiguillettes, BP 239  
54506 Vandœuvre Cedex, France*

E-mail : [jamil.houhou@hotmail.fr](mailto:jamil.houhou@hotmail.fr), [bruno.lartiges@ensg.inpl-nancy.fr](mailto:bruno.lartiges@ensg.inpl-nancy.fr)

(\*) To whom correspondence should be addressed

En préparation pour le journal **Science of the Total Environment**

## **ABSTRACT**

The distribution of heavy metals between soluble and solid phases and the mineralogical nature of trace element carriers contained in Nancy sewer system were investigated in dry weather using ICP-MS, TEM-EDX, SEM-EDX and XRD. The results show that wastewater from household represent the main source of dissolved heavy metals, even though the water supply system is a significant source of Cu, and groundwater infiltration a source of Ni and Co. TEM and SEM-EDX analyses indicated that suspended matter (SM), biofilms and sewer sediments contain similar heavy metal carriers including alloys and metal fragments, oxidized metals and sulfides. SM mainly contains organic phases with a lesser concentration in heavy metals. In contrast, sewer sediments are mainly composed of mineral phases and heavy metals are concentrated in the fractions < 250  $\mu\text{m}$  which are found to accumulate in sediments during dry weather. Chalcophile phases were found to be neoformed and accumulated in sewer sediments and bacterial biofilms under anaerobic conditions. Their presence in SM comes from the erosion of sediments and the detachment of biofilms.

In order to identify the initial location of sulfide formation, deposits from washbasin siphons and sump pits were analyzed. Sulfide phases in washbasin siphons were identified as small monosulfide phases (2  $\mu\text{m}$ ) and adsorbed at the wall of bacterial cells as mono and binary sulfides. Chalcophile phases were also evidenced in sump pits but were more complex in chemical composition and larger in size. Most sulfide neoformation and metal sulfurization seem to occur upstream the sewer system.

**Keywords:** Heavy metals, speciation, sulfide, SEM, TEM, EDX.

## **INTRODUCTION**

During dry weather, household, drainage water and businesses are the main sources of heavy metals in wastewater (Sörme and Lagerkvist, 2002). Once in sewer, soluble and particulate heavy metals undergo physicochemical modifications of their mineral nature such as adsorption and accumulation of soluble heavy metals in sewer sediments (Chebbo et al., 2001), precipitation of soluble heavy metals as sulfide minerals and sulfurization of heavy metal alloys in anaerobic conditions (El samarani et al., 2004). Thus, accumulation of neoformed heavy metal sulfides in sewer sediments turns out to be of major importance during combined sewer overflow (CSO). Hence, dry weather deposits are eroded (Vollertsen and Hvitved-Jacobsen, 2000; Rocher et al., 2004) and may contribute to 50% of the total load of heavy metals in CSO (Gromaire et al., 2001). Sulfide minerals represent the main carrier phases of trace elements at peak flow (El Samrani, 2004). CSOs exceed generally wastewater treatment plant capacity and effluents are directly discharged in receiving aquatic system, and the pollution issued from one rain event may represent 25 to 80% of the annual discharge from sewage plants (Valiron and Tabuchi, 1992). Thus, the ultimate solution to inhibit heavy metals input into the aquatic system, is their cut at the source (Boller, 1997).

The main objective of this study was to determine the sources of heavy metals in dry weather wastewater and to describe metals fate in sewer system. This involved the speciation of particulate heavy metals at different stages: sewer system (sewage, biofilms and sediments), tap water, washbasin siphons and sump pits. Quantification of soluble and particulate heavy metals was carried out using an Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry (Carignan et al., 2001). Speciation of heavy metals mineral phases was made by Transmission (TEM) and Scanning (SEM) electron microscopies combined with energy-dispersive X-ray spectrometry. Such techniques provide combined data on both direct identification of the mineralogy and the texture of heavy metal carriers at the nanoscale (El Samrani et al. 2004; Houhou et al., accepted).

## **EXPERIMENTAL SECTION**

### ***1. Study area***

Samples were collected from the sewer network of Greater Nancy urban community. Nancy, a city of about 270 000 inhabitants located in north-eastern France, lies on both banks of Meurthe river with a total catchment area of 193 Km<sup>2</sup> (144 km<sup>2</sup> on left bank). The sewage collecting system comprises 950 km of pipes, 250 km of them being man-entry sewer (pipe diameter  $\geq$  1.2 m). The central core of Nancy urban community is served by a combined sewer, whereas the peripheral areas are drained by separate systems. Three sewer sections, each with 5 sampling sites from upstream to downstream of the sewer network, were selected because they represent the various land uses in the urban community (residential, commercial, industrial, high school, and hospital). Details of sampling and sampling-site were detailed in a previous work (Houhou et al., accepted). On a general basis, the upstream sampling sites only receive domestic wastewater from a separated sewer, the following sampling sites are impacted either by hospital or industrial wastewaters, whereas the downstream sampling sites mainly convey sewage from high density residential areas and small businesses through a combined sewer.

### ***2. Samples collection and preparation***

In order to identify the sources of heavy metals pollutants and to characterize their loads and their evolution in sewer network, sampling was carried out at different scales: tap water, groundwater, washbasin siphons, household manholes (connector linking household sewer to public one) and sewer network.

Eight sampling campaigns were conducted in dry weather conditions between November 2004 and October 2006. Grab-samples of sewage, and whenever possible bacterial biofilms and sediments, were collected from the sewer. Physicochemical (temperature, pH, conductivity, dissolved oxygen concentration, redox potential and turbidity) characteristics of sewage were cited in previous work (Houhou et al., accepted):

- (1) Sewage: sixty five samples of wastewater were collected. Water was field-filtered through a pre-washed 0.22  $\mu$ m pore size cellulose acetate membrane (Chromafil CA-20/25) in order to analyze dissolved heavy metals (Pb, Cu, Zn, Cd, Cr, Ni,...) concentration. The filtrate was then stored at 4°C in 65 mL polyethylene bottles. The

purpose of two 24h campaigns was to investigate the variations in wastewater characteristics at a given sampling site as a function of time.

About 20 L of sewage were brought back to the laboratory in polyethylene jerrycans, and processed within four hours of sampling. After gentle over-end agitation of jerrycans, the sewage was centrifuged in 1L polyethylene bottles at 15000 g for 30 min (Sorvall<sup>®</sup> Evolution RC), and the suspended matter thus obtained was retrieved and freeze-dried (Vitric-Sentry).

(2) Sediments: Four sediments were collected from sewer network. They were sieved at 2 mm (fraction III:  $250\ \mu\text{m} \ll 2\ \text{mm}$ ),  $250\ \mu\text{m}$  (fraction II:  $50\ \mu\text{m} \ll 250\ \mu\text{m}$ ), and  $50\ \mu\text{m}$  (fraction I:  $< 50\ \mu\text{m}$ ), and fractions were freeze-dried. In order to concentrate heavy metals and their carriers, a separation using bromoform (density = 2.9) as dense liquor was carried out. A few milligrams of sediment were deposited at the surface of 50 mL of bromoform in a teflon eppendorf tube. The separation was done by centrifuging at 4000 rpm (eppendorf centrifuge 5804) for 20 min. After concentration, the settleable fraction was recovered, and dried under hood.

(3) Bacterial biofilms: Ten biofilm samples were collected by gentle scratching of collector walls from upstream and downstream of sewer, and then freeze-dried.

Slime deposits were also collected from washbasin siphons and household sump pits (SP), and then freeze-dried. Eight washbasin siphons from six different houses were sampled by scratching, and three SP deposits were sampled from a residential area and processed like sewer sediments.

In addition, to study the contribution of tap water network in the load of heavy metals in sewer system, dissolved and heavy metal carriers were characterized in tap water. 15 L of tap water, collected from three different houses, were filtrated immediately through a pre-washed  $0.2\ \mu\text{m}$  pore size cellulose acetate membrane (Porafil<sup>®</sup> CA). Water was allowed to stay over night in the drinking water network, and was collected in the morning from a faucet at maximal flow. After filtration, filters were freeze-dried, and then used to characterize heavy metal carriers. After wards, ten tap water samples were collected and filtrated at  $0.22\ \mu\text{m}$  pore size cellulose acetate membrane, and filtrates were then stored at  $4^\circ\text{C}$  in 65 mL polyethylene bottles.

The contribution of groundwater in the total load of soluble heavy metals in sewage was studied during two sampling campaigns (25 December 2005 and 01 October 2006). Seven piezometers (various depths from 1 to 8 m below ground) were selected to characterize the aquifers that represent a potentially source of sewer groundwater infiltration (Houhou et al., a, in preparation). Samples were taken using a submersible portable pump, after exchanging the water column in the piezometer at last three times. Samples were then physico-chemical characterized, field-filtrated and stored following the same procedure than sewage.

### ***3. Chemical analyses of dissolved and particulate heavy metals***

The load of heavy metals in dissolved (tap water, groundwater and wastewater) and particle (sediments and suspended solid) compartments was analyzed using a Perkin-Elmer ELAN 6000 ICP-MS (Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry). Soluble samples were acidified with HNO<sub>3</sub> at 2% before analyze. Solid phases were ground with an agate microcrusher to reach a particle size less than 50 µm. Thus, 200 mg aliquot was first melted with 600 mg of LiBO<sub>3</sub> in Pt-Au crucibles, and then dissolved within HNO<sub>3</sub> 1 N. The resulting solution was then analyzed using an ICP-MS (Carignan et al., 2001).

### ***4. Identification of mineral phases by X-ray diffraction***

A D8 Bruker diffractometer with Co K<sub>α1</sub> radiation ( $\lambda = 17.902$  nm) was used to obtain X-ray diffraction (XRD) data from SM, biofilm and sediments. The diffractometer is equipped with a ( $\theta$ ,  $2\theta$ ) goniometer and a position sensitive detector (PSD). X-ray diffractogramms were collected on powder samples in ambient conditions, within the  $2\theta$  range [3, 65°], with 0.036° step and 3s collecting time.

### ***5. Pollutant speciation by electron microscopy***

Direct speciation of heavy metals and their carriers was carried out using a Philips CM20 Transmission Electron Microscopy (TEM) (200 kV) and a Hitachi 54800 Scanning Electron Microscopy (SEM) combined with an Energy-Dispersive X-ray Spectrometry (EDXS). EDXS yields an elemental analysis of individual particles from freeze-dried solids. Stoichiometric ratios can then be calculated and compared with known mineralogical compositions. Moreover, Electron diffraction patterns provided by TEM can be used to



specify the crystal structure of particles. For TEM imaging and microanalysis, sample preparation was detailed in previous work (Houhou et al., submitted). A spot size of about 70 nm and a counting time of 40 seconds were used to record EDX spectra. EDX calibration standards were run to obtain quantitative analyses of major and trace elements with a detection limit of about 100 ppm.

During SEM-EDX examinations, Secondary Electrons (SE) and Backscattered Electrons (BE) result from the interaction between incidental electrons and particles. SE collection allows a Secondary Electrons Imaging (SEI) which is the most common imaging mode. It monitors the low energy secondary electron (<50eV), and gives an idea of the particles morphology and shape. BE are the high-energy electrons reflected or backscattered out the specimen interaction volume. Their collection allows Backscattered Electrons Imaging (BEI), and a direct determination of heavy metal occurrences and provides combined data on both mineralogy and texture of heavy metal carriers. During SEM observations, BEI was used to locate the particles of interest, since brightness is related to the average atomic number of minerals. Heavy metals and their carriers appear as bright spots within the organic matrix in samples. The relative abundance of a given heavy metal can be assessed by systematic microanalyses of bright spots. Nevertheless, it should be noted that this procedure largely overlooks mineral phases with low-atomic-number elements such as clays and carbonates. In order to increase the emission of BE, SEM microanalysis was generally operated with a beam current of 3 pA and an acceleration voltage of 20 kV (analyzed microvolume of about 6  $\mu\text{m}^3$ ).

Freeze-dried samples for SEM characterizations were scattered and sprinkled onto 2  $\text{cm}^2$  of scotch carbon plates, while tap water filtration membranes were directly placed on the scotch carbon. Samples were then coated with a thin carbon layer.

## **RESULTS AND DISCUSSION**

### ***1. Soluble heavy metals in wastewater, tap water and groundwater***

Table 1 presents the concentration of dissolved heavy metals (Cu, Pb, Zn, Cd, Cr, Ni, Co) determined in Nancy city sewage. Except Lesage (2007), table 1 clearly reveals strong differences with wastewater sampled at different locations in the world. The concordance with Lesage (2007) may result from his sample filtrations at 0.45  $\mu\text{m}$ . Thus, colloids smaller than 0.45  $\mu\text{m}$ , carrying heavy metals, may percolate through the filter, leading to an overestimation

of dissolved heavy metal concentrations. Household, drainage water and businesses are the main sources of heavy metals in wastewater during dry weather (Sörme and Lagerkvist, 2002). In the past last years many industrial operations moved out of the cities while European legislations have obliged industries to pre-treat their effluents before discharge in sewer network. Such evolution has resulted in a decrease of the amount of heavy metals in wastewater. This is confirmed in a recent study by Thevenot (2007) who showed that the heavy metal load in industrial wastewater effluents was 23 to 92 times (depending on the metal considered) less than that in domestic wastewater.

Figure 1 displays the concentration of soluble Cu, Zn, Ni, Al, Cr and Pb in wastewater, domestic sewage, tap water and groundwater. Heavy metal concentrations in domestic sewage were obtained by taking into account the separatif portions of studied sewers in which no infiltration of groundwater was evidenced (Houhou et al., a, in preparation). It appears that for most heavy metals, except Ni, concentrations are higher in domestic sewage than wastewater than tap and groundwater. This increase may be due, in addition to the anthropic discharge, to the higher pH in sewage (around 8.5) than tap water and groundwater (around 7), leading to an increase in the solubility of particulate heavy metals in sewer. Al, Cr and Pb concentrations are lightly higher in domestic sewage than wastewater. While, Zn and Cu concentrations are 1.6 times higher in domestic sewage, indicating the household domination source of these two heavy metals. Contribution of urine discharges in sewer can not explain the higher concentrations in domestic sewage. In fact, referring to the heavy metal concentrations in urine (extreme values) measured by Heitland (2006), urine contributes to 0.1%, 1.2%, 1.6%, 3% and 9% of total concentrations of dissolved Cr, Cu, Pb, Ni and Zn in domestic sewage.

The decrease of heavy metal concentrations in wastewater versus domestic sewage was due to their dilution by the infiltrated groundwater within sewer system. Nickel and cobalt with concentrations in groundwater ( $11.90 \pm 5.45 \mu\text{g/L}$  and  $1.35 \pm 1.12 \mu\text{g/L}$  respectively) and wastewater higher than those encountered in domestic sewage, may be considered as a fingerprint of this infiltration. It can then be proposed that the content of these elements in wastewater results from a mixing between groundwater and tap water. Groundwater infiltration had been evidenced referring to stable isotopic data, in an another study Houhou (a, in preparation). We measured the stable isotopes signatures for  $\text{H}_2\text{O}$  ( $\delta^{18}\text{O}$  and  $^2\text{H}$ ) and dissolved sulfates ( $\delta^{18}\text{O}_{\text{sulfate}}$  and  $\delta^{34}\text{S}$ ) in wastewater tap water and groundwater

during two diurnal wastewater cycles and at two different collectors locations. The combination of isotopic analyses and trace elements dosage showed that one of the two collectors was impermeable whereas the other one clearly revealed infiltration of groundwater. Wastewater circulating during day-time is then a mix of tap water and groundwater, this latter contributing 57% of the total amount of wastewater. In that framework, the concentrations of Ni and Co in wastewater can be calculated on the basis of their concentration in groundwater, taking into account the dilution factor. The values thus obtained are very close to the values obtained by chemical measurement and then showing that these metals are not of anthropic origin.

In contrast, depending on the metal considered, various situations can be encountered for the other heavy metals. In the case of copper, tap water contains a significant amount of dissolved copper which certainly contributes to the high copper content observed in domestic sewage ( $33.20 \pm 22.21 \mu\text{g/l}$ ). The high copper concentration in tap water ( $14.22 \pm 6.06 \mu\text{g/l}$ ) can be assigned to the corrosion and dissolution of the alloys used in the pipes of the drinking water network as already shown by Tamasi and Cini (2004). In their study, dealing with water supply in Tuscany Italy, they observed copper contents higher than those measured at the sources strongly suggesting Cu leaching from the metal pipes of the network. Similarly, Wilkie (1997) estimated that 40% of the copper load in sewage water in Melbourne city (Australia) could be due to corrosion of the drinking network.

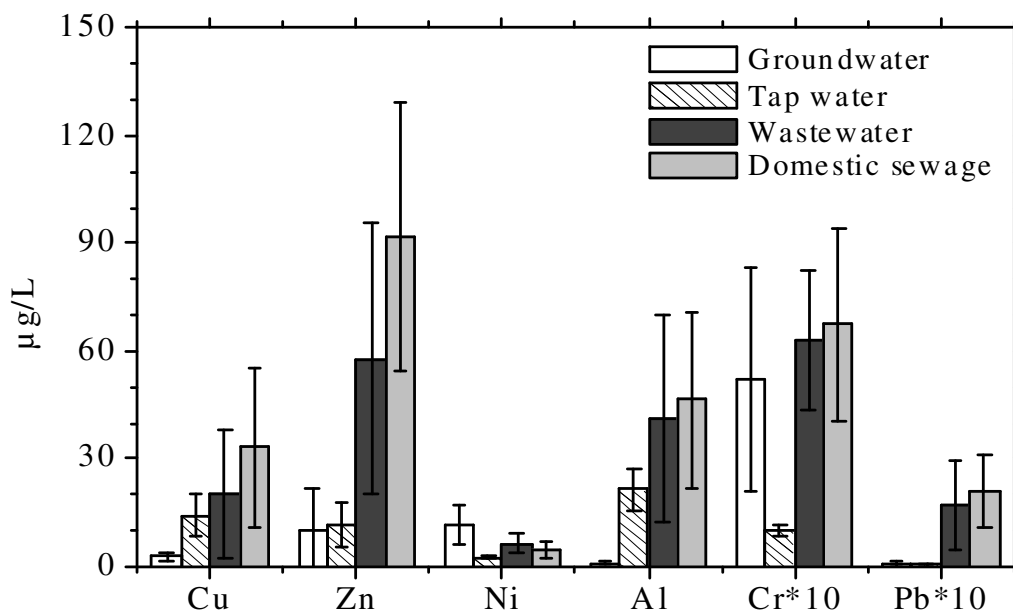
The situation is different for Zn and Pb whose average concentrations in domestic sewage are  $92.21 \pm 37.36 \mu\text{g/L}$  and  $2.11 \pm 1.04 \mu\text{g/L}$ , respectively, i.e. values significantly larger than those observed in tap or groundwater. In the case of lead, the value obtained here is close to that obtained by Moon (1994) and Lesage (2007) in domestic wastewater. In the case of Zn and Pb, it clearly appears that the contribution of tap and groundwater to the total load of dissolved Zn and Pb in domestic sewage is minor. Consequently, anthropic heavy metals are the main sources of both these metals. In the case of Zn, various origins can be proposed to explain its high content in domestic sewage. First, as showed by Sörme and Lagerkvist (2002), household agents (food, tap water, laundry detergent) could represent up to 30% of the total loads of Zn in wastewater. The remaining part of Zn may result from cosmetic products (Tsuji-Naito et al., 2007), toothpastes and shampoos (Sörme and Lagerkvist, 2002). Indeed, according to Gray and Becker (2002), bathroom can contribute to 73.3% (0.11 Kg/house/year) of Zn load in household wastewater.

**Table 1.** Values of dissolved heavy metals in Nancy sewage and comparison with those obtained in some European and other international cities.

Pollutant	This work (n=60)		Lesage (2007)		Soonthornnonda (2008)	Moon (1994)		Chebbo (2001)	Gasperi (2006)
µg/L	Nancy sewage		Domestic wastewater		Sanitary sewage	Domestic effluent		Dry weather wastewater	Dry weather wastewater
	Range	Avg ± SD	Range	Avg ± SD	Avg	Range	Avg	Avg	Median
Cu	1.58-109.99	20.12 ± 17.83	2-32	7 ± 9	70	4-53	13	70	81
Pb	0.14-6.38	1.72 ± 1.24	2-5	2 ± 1	9	1-4	1	9	22
Zn	8.13-151.57	57.95 ± 37.99	10-115	36 ± 28	102	60-510	200	102	172
Cd	0.00-0.25	0.07 ± 0.06	0.1-0.2	0.1 ± 0.0	0.3			0.3	0.5
Ni	3.00-13.42	6.38 ± 2.54	2-6	3 ± 1	11.10 ± 0.41				
Cr	2.74-14.96	6.32 ± 1.92	1-1	1 ± 0	43.60 ± 2.71				

**Table 2.** Values of heavy metal contents in suspended matter (SM) and sediment and sump pit deposits in Nancy sewer system. Comparison with the results obtained in Paris (France) and in Bad Mergentheim (Germany).

Pollutant	SM (n=15)		Sediment I (n=4) <50µm		Sediment II (n= 3) 50µm<<250µm		Sediment III (n=4) 250µm<<2mm		SP deposit (n=2)		Chebbo (2001) Sediment <400 µm	Michelbach (1993) Sediment
µg/g	Range	Avg ± SD	Range	Avg	Range	Avg	Range	Avg	Range	Avg	Median	average
Cu	83-254	170 ± 47	382-773	578.2	287 -1031	603	40-337	148	135-506	320	870	26
Pb	9-48	28 ± 14	241-887	468.9	192-590	330	40-130	73	49-58	53.4	1870	14
Zn	127-864	439 ± 172	934-1906	1591	429-686	523	109-389	257	232-1203	717.5	4047	327
Cd	0-0.7	0.3±0.2	1-3	1.7	0.6-0.8	0.7	0.3-1.3	0.7	0.5-0.9	0.7	3.9	0.3
Ni	6-19	10 ± 4	68-135	88.5	41-78	55	16-28	25	20-27	23		14
Cr	10-33	20 ± 9	139-265	205.1	97-154	134	53-115	71	26-31	28.5		
Co	1-3	2 ± 0.6	8-18	14.0	5-10	8	3.7-6.7	4.9	1.5-5.2	3.3		



**Figure 1.** Mean of heavy metal concentrations in ground and tap water, wastewater and domestic sewage in Nancy city. Heavy metals in domestic sewage are considered as the initial concentration of dissolved heavy metals in wastewater circulating in impervious sewers in which no groundwater infiltration is observed.

In the case of lead, water from washing activities (household and industrial laundry) may be a significant Pb source as suggested by Gray and Becker (2002) who showed that laundry greywater accounts for 81% ( $39 \times 10^{-4}$  Kg/house/year) of Pb load in household wastewater. Oxidation and dissolution of Pb from Vinyl PolyChloride evacuation pipes can be another source of Pb. In fact, SEM-EDX analyses of different types of Vinyl Polychloride pipes indicate the presence of large amount of PbO (data not shown). Organic acids produced by anaerobic bacteria may dissolve PbO and release Pb (Francis and Dodge, 1986).

Concentrations in dissolved Cd in domestic sewage are rather low ( $0.1 \pm 0.05$  µg/L) and are only slightly higher than those found in groundwater by a factor of 1.26. A similar pattern is obtained in the case of chromium with higher concentrations ( $5.20 \pm 3.14$  µg/L and  $6.74 \pm 2.69$  µg/l for groundwater and domestic sewage, respectively) In the case of Cd, the potential sources are rather diffuse and remain rather ill-defined. According to Aonghusa and Gray (2002) detergents account for 32% of the Cd load in Irish municipal wastewater whereas Gray and Becker (2002) indicate that dissolved cadmium can result from different household activities, kitchen, laundry, bathroom and toilet contributing to 27.5 %, 16.5%, 39.5% and 16.5%, respectively. The case of chromium which displays the same pattern as Cd is even less

well documented in terms of potential sources and, according to Rule (2006), chromium is used in a variety of household appliances such as washing machines and dishwashers.

Finally, the pattern displayed by Aluminum is rather peculiar as its concentration in tap water is 22 times higher than that in groundwater. This feature can be explained by the fact that drinking water treatment procedures in Nancy use Al-sulfate as a coagulant agent at a concentration of  $1.2 \times 10^4$   $\mu\text{g/l}$  mainly for organic matter removal. Some dissolved aluminum can then be released in tap water. Still, the concentration of Al in wastewater cannot be explained only by this factor. Some other sources must then exist, the origin of which has not been studied anywhere so far.

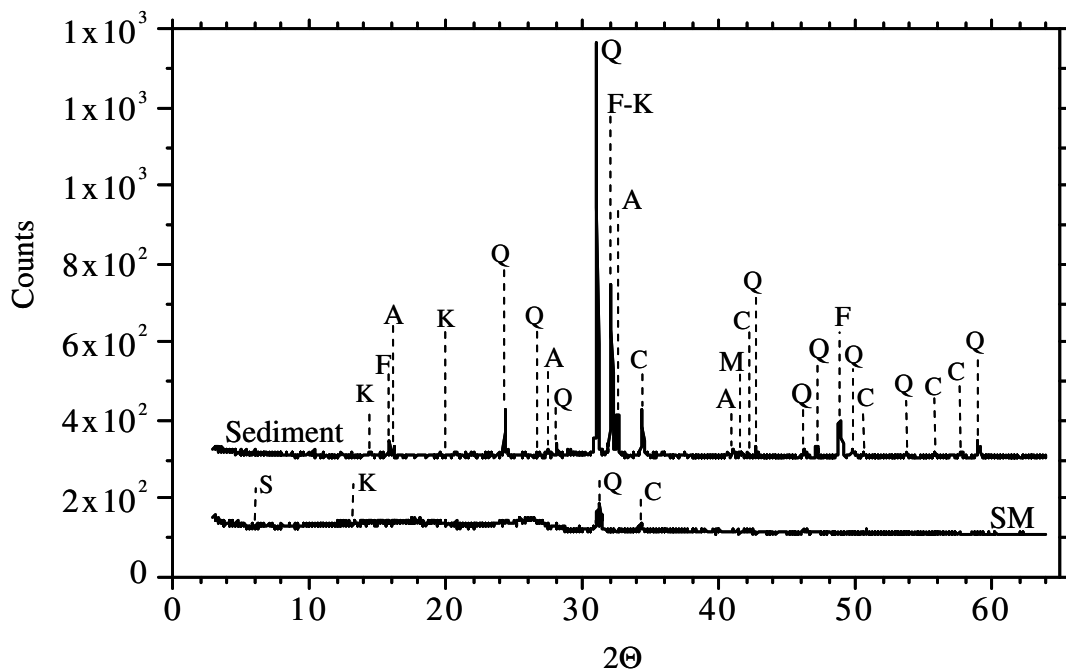
## ***2. Particulate heavy metals in suspended matter (SM) and sewer sediments***

Typical XRD diffractogram of crystallized minerals in SM and sewer sediments is shown in figure 2. Samples were collected from separatif sewers. SM diffractogram reveals weakly the presence of quartz, calcite, kaolinite and smectite, with maximum pick intensity for quartz (85). Weak intensities of minerals from SM may be due to their precipitations during transport, giving a SM mainly composed of amorphous matter (mainly organic matter). While, sediment diffractogram clearly identifies quartz, calcite, kaolinite and feldspars (Albite, K-feldspars), with maximum pick intensity for quartz (1070). Diffractograms give a fingerprint of domestic activities. In households, quartz and feldspars are used as scour powder to clean ceramics and kitchen utensils. Calcite and smectite come from cosmetics and drugs (Castela-Papin et al., 1999), respectively.

Typical biofilm diffractograms not shown in the figure 2 are generally intermediate between those of SM and sediments, with some crystallized minerals which have been entrapped within biofilm matrix, as indicated later.

Sediments collected in sewer and SP deposits were granular, very dark and had a high mineral content. Such types of sediments were identified by Crabtree (1989) and Chebbo (2001) as type A coarse granular deposits whereas according to Rocher (2004), such materials can be classified as gross bed sediments. No organic layer was found at the water sediment interface at our sampling sites, in contrast with sediments sampled in Marais sewer (Paris). In that latter case, the sediment collected upstream the collector where local shear stresses are weak ( $0.1 \text{ N/m}^2$ ) (Chebbo et al., 2001; Rocher et al., 2004) was covered by an organic layer

(2-15 cm thick). Table 2 displays the results obtained for the main heavy metals found in SM, sewer sediments (fraction I, II and III) and SP deposits. Except for Zn, no significant differences in heavy metals are observed between sediments I and II. While, except Cd, sediments I are clearly enriched in heavy metals than sediments III, with metals content 2.8 to 6 times higher, depending on the element considered. Heavy metal concentrations are thus higher in sediment <250  $\mu\text{m}$ . Such observation has already been observed. Indeed, Chebbo (2001) and Rocher (2004) observed higher heavy metal contents in the finer sediment fractions.



**Figure 2.** Typical XRD diffractogram of sediments and suspended matter (SM). *K* kaolinite; *F* feldspars; *A* albite, *Q* quartz; *F-K* K-feldspars; *C* calcite; *M* mica; *S* smectite.

Heavy metal profile is similar in SM and SP deposits, with content slightly higher in SP deposits. Concentration ratios range between 1.4 and 2 times, depending on the metal considered. The concentration in copper is significantly lower in SM, which confirms that copper originated from the corrosion of drinking network pipes is the main Cu source in dry weather wastewater.

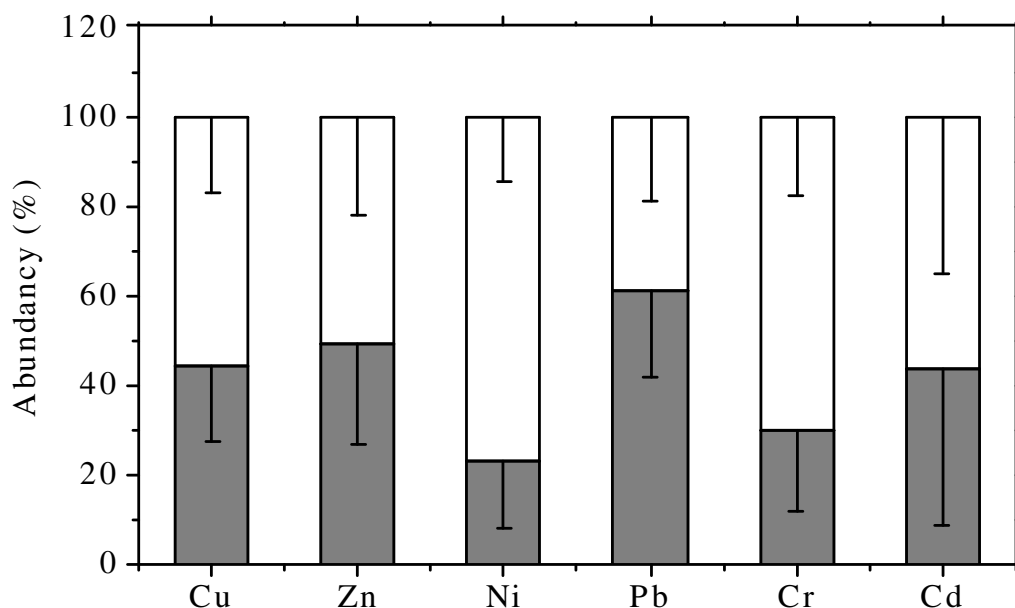
Significant differences in heavy metal contents are observed between sediments I and SM. In this latter, concentrations of Zn, Cu, Pb, Cr, Ni, Co and Cd were  $439 \pm 172 \mu\text{g/g}$ ,  $170 \pm 47 \mu\text{g/g}$ ,  $28 \pm 14 \mu\text{g/g}$ ,  $20 \pm 9 \mu\text{g/g}$ ,  $10 \pm 4 \mu\text{g/g}$ ,  $2 \pm 0.6 \mu\text{g/g}$  and  $0.3 \pm 0.2 \mu\text{g/g}$ ,

respectively. Thus, depending on the element considered, heavy metals contents are 3.4 to 16.8 times smaller than those measured in sediments I. This enrichment of sewer sediments in heavy metals may be due to the precipitation and change in metal speciation within the sewer system during transport. Such interpretation is consistent with Gromaire's (2001) and El Samrani's (2004) observations. Gromaire observed that dissolved Zn, Cd, Cu and Pb are drastically reduced between the inlet and the outlet of the combined sewer. El samrani suggests that dissolved heavy metals precipitate as sulfide minerals by microbe-mediated reaction and accumulate in sewer sediments during dry weather.

The comparison of our sediment heavy metal loads with literature data appears rather difficult. In fact, metals can be deposit in both separatif and combined sewers and sediment builds up in sewer over many years. Thus, sediment metal contents depend on the time deposit and heavy metal concentrations at the collector inlet. These concentrations are strongly related to domestic activities and drained surface (building architecture characteristics) in dry and wet weather, respectively. Copper and lead concentrations thus measured by Michelbach (1993) in the combined sewer sediment of Bad Mergentheim city (Germany), were 23 times lower than those measured in our sediments II. In the case of copper, this difference may be due to the higher use of Cu domestic plumbing tubes in Nancy drinking network than in Bad Mergentheim one. In the 'Marais' experimental site (Paris), Chebbo (2001) found lead and zinc concentrations 5.6 and 7.7 times higher than those measured in our samples (sediment II). These higher concentrations are linked to the intensive use of these two metals for roof covering in Paris, with 80% of Pb and Zn loads in the runoff attributed to roof runoff (Gromaire, 2001).

Figure 3 illustrates the distribution of heavy metals between soluble and particulate phases. Cu, Zn and Cd had a nearly similar distribution between the two compartments. The Ni and Cr were dominant in dissolved phase, with an abundance of 77% and 70%, contrary to Pb with 61% in SM. These results are in agreement with Karvelas (2003) only for Ni. Karvelas (2003) has studied the repartition of heavy metals between dissolved and particulate phases in the influent of the wastewater treatment plant of Thessaloniki city (Greece). He found that 80% of the Ni was in the dissolved phase. In contrast, Cu, Zn, Pb and Cr were dominantly in SM (90%). Chebbo (2001) indicated that Zn and Pb are mainly bound to particles (80%) in wastewater.





**Figure 3.** Distribution of heavy metals (%) in solid (gray column) and soluble (white column) phases in Nancy sewage.

### 3. Speciation of trace element carriers at different stages

#### Sewage

1330 particles from SM samples were examined (1020 TEM-EDX spectra and 310 SEM-EDX spectra). Numerous mineral particles devoid of heavy metals were observed: zeolites, phosphates, clay minerals (montmorillonite, berthierine, kaolin, smectite, sepiolite, muscovite, illite, biotite), feldspars (albite, orthose), gibbsite, dolomite, spinel, lime, cement, barite, calcium and sodium sulfate, silicate, amorphous silica, magnesium oxihydroxides, iron carbonate (siderite), and asbestos fibers.

The main classes of heavy metal carriers are in the order of particle abundance, iron oxides and oxihydroxides (1.8% of the total number of particles analyzed by SEM-EDX), metal particles (1.8%), sulfates (2.1%) phosphates (3.9%), oxides (6.1%), alloys (9.6%) and sulfides (11.5%) whereas other minor forms include carbonates (e.g.  $\text{ZnCO}_3$ ), hydroxides (e.g. botallackite,  $\text{Cu}_2\text{Cl}(\text{OH})_3$ ), silicates such as Zircon ( $\text{ZrSiO}_4$ ) or metals adsorbed on other minerals (clays, zeolites, etc..) or entrapped in organic matter.

Iron oxides and oxihydroxides (goethite, wustite, hematite and magnetite) appear as important traps for heavy metals as one fourth of these materials was shown by EDX to

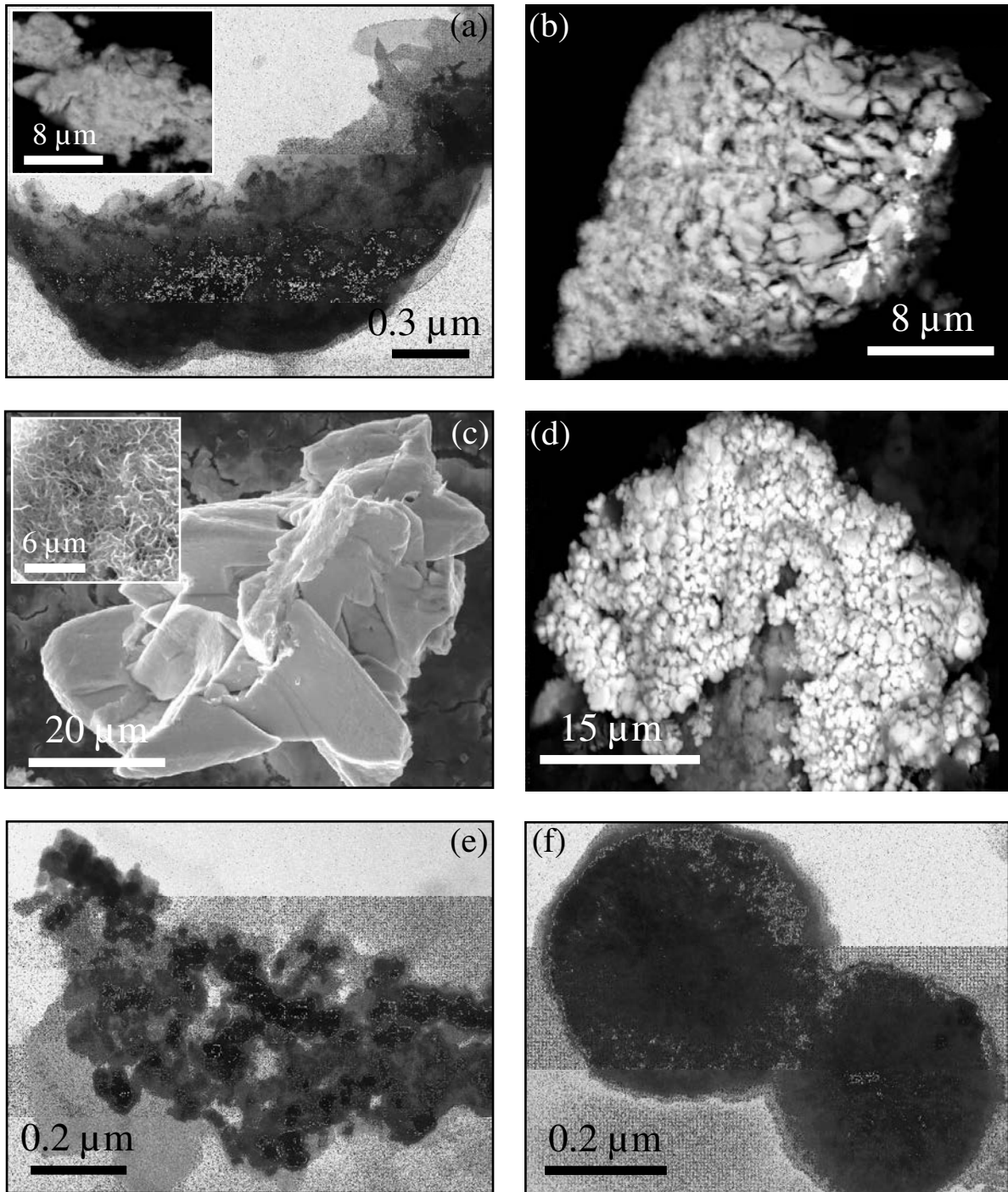
contain various elements such as Zn (0.1-8.4%), Cu (0.2%), Cd (1.1-1.6%) and Cr (0.13-0.17%). Such high affinity of iron oxides and hydroxides (especially  $\beta$ -FeOOH) for heavy metals was previously reported by Boller (2004) in his study of drainage systems from storm water. Phosphate phases were also found to be a potential sinks for Zn, such as brushite, whitlockite, octacalcium phosphate, apatite, bearthite, foggite, gatumbaite, and crandallite (Houhou et al., accepted). Heavy metals sulfates were mainly encountered as celestite ( $\text{SrSO}_4$ ), chalcantite ( $\text{CuSO}_4$ ) and barite ( $\text{BaSO}_4$ ) that contains insignificant amounts of Sr.

Metallic oxides represent around 15% of the whole heavy metal load. According to the determined stoichiometric ratios, they can be identified as bunsenite (NiO), lead oxide (PbO), plattnerite ( $\text{PbO}_2$ ), zincite (ZnO), montroydite (HgO), rutile ( $\text{TiO}_2$ ) and  $\text{Ti}_2\text{O}_3$ . Zinc and titanium oxides likely correspond to pigments contained in personal care products (Nohynek et al., 2008). Rare earth containing oxides such as La-Ce-Fe oxide (0.7  $\mu\text{m}$ ) were also observed.

Various alloy particles accounting for roughly 45% of the whole content of heavy metal in sewage were also identified, 15% of them containing minor amounts of sulfur (1-5%). Many particles with ternary chemical compositions FeCrNi or FeCrMn were evidenced. Such compositions correspond to stainless steel, which is used in various indoor and outdoor materials such as cooking utensils and cutlery (El Samrani et al., 2004; Herting et al., 2008). In some cases, additional elements were found in stainless steel. One common case was molybdenum, which is often added in kitchenware to increase its hardness (Tsuji-kawa et al., 2007). Antimony and tin were also evidenced as additional elements in stainless steel, the presence of these two metals being typical of the composition of alimentary cans. Apart from these ternary alloys, various binary alloys were observed: (i) Fe-Cr alloys with Cr contents ranging between 5.66 and 11.29%, generally used in razorblade processing; (ii) Fe-Ni alloys (Ni 21.76%) mainly used in clock-making and magnetic armor plating; (iii) Fe-Mn alloys with Mn contents ranging between 3.40 and 8.90% entrapping Zn (0-0.54%) and Cr (0.24-1.32%); (iv) Fe-Cu alloys with Cu contents ranging between 1.53% and 5.72%; (v) Sn-Sb alloys (Sn 25.39% and Sb 17.44%) generally used for high temperature welding (Chen et al., 2008) and (vi) Cu-Al with 4.1% of Cu. Finally, one quaternary alloy containing Fe (2.70%), Cu (3.32%), Ni (8.58%) and Al (49.94%) was evidenced.

Sewage contains metallic particles in particular Cu with sizes ranging between 0.5 and 3.75  $\mu\text{m}$  (Fig. 4a) as well as particles containing Fe (41.47%), Cu (7.93-12.08%) and Sn (0.17-0.84%). These particles may be originated from the wear/soldering debris of drinking network. In addition, fragments of Zn (1  $\mu\text{m}$ ) and Pb were observed. They most likely come from galvanized goods (Sörme and Lagerkvist, 2002).

SEM-EDX analyses of particulates phases (40 particles) in drinking water indicate that drinking network is a potential source of some heavy metal carriers circulating in sewage. Identified minerals are dominated by oxidized (57%) and carbonated (32%) phases. Iron oxihydroxides are often encountered. They represent 22% of the particles identified, with average sizes ranging between 7 and 20  $\mu\text{m}$ . They contain heavy metals such as Pb (0.5-5%), Zn (0.5-1.8%), Cu (1-3%) and Ni (0.25%). These oxides and oxihydroxides are likely coming from the river water used as drinking water supply in Nancy. Gauthier (2001) found iron oxides to represent 19% of mineral deposits in tap water reservoirs supplied with tap water from the CUGN distribution system. Apart from these iron species SEM-EDX analyses revealed the presence of pure metal particles such as Cu (inset Fig. 4a) and of oxidized particles (5-20  $\mu\text{m}$ ) containing Pb (1.9-2.6%), Cu (2.1-16.7%), Zn (0-0.5%), Sn (0-24.4%), and Fe (0-10.2%). This particle class represents 16% of the particles identified. The morphology and EDX spectra of these particles (Fig. 4b) suggest that they may correspond to wear or soldering debris. Furthermore, stoichiometry of some heavy metals carriers analyzed is close to those of chrysocolla ( $\text{CuSiO}_3$ ) tenorite ( $\text{CuO}$ ), cassiterite ( $\text{SnO}_2$ ) and cuprite ( $\text{Cu}_2\text{O}$ ). The latter being already evidenced as a light-brown color film at the surface of drinking pipes (Merkel et al., 2002). Carbonate phases are identified as the mainly carriers of Pb and Zn. 70% of the carbonates thus determined occurred as crystallized particles with single compositions such as cerussite ( $\text{PbCO}_3$ ) (Fig. 4c) and smithsonite ( $\text{ZnCO}_3$ ) (inset Fig. 4c) with sizes ranging between 15 and 50  $\mu\text{m}$ . Additionally, other small-sized carbonates (around 10 $\mu\text{m}$ ) carrying heavy metals were observed such as limestone (Zn: 1.2%) or ankerite ( $\text{CaFe}(\text{CO}_3)_2$ ) (Cu: 0.35%, Pb: 0.1% and Zn: 0.1%). The importance of carbonated phases in the tap water deposits may be explained by the fact that calcium carbonate is added in tapwater in Nancy to reduce hardness and the associated pipe corrosion problems. The carbonate thus introduced can then react with cations to form a wide range of carbonate precipitates. Finally, we also found two diatoms. They could either be river diatoms that went through the filter treatments or be diatoms developing in storage tanks.



**Figure 4.** Electron micrographs of heavy metal carriers found in sewage (a, d, e and f) and tap water (inset a, b, c, inset c and d). (a) TEM and BE (inset) images of copper fragments; (b) BEI of wear debris; (c) SEI of cerussite and BEI of smithonite (inset); (d) BEI of chalcocite particle; (e) TEM image of  $\text{Cu}_3\text{S}_2$  particle; (f) TEM image of sphalerite particle.

Heavy metals containing sulfide particles are the most commonly observed heavy metals carriers in sewage. Sulfide identification is then carried out through the determination

of the metal/sulfur ratios, taking into account that EDX analyses often provide atomic percentages characterized by a deficiency in S due to possible sulfur release under electron beam during analyses. In the case of copper, different Cu/S ratios were obtained for copper sulfides. A ratio of 2 corresponds to chalcocite ( $\text{Cu}_2\text{S}$ ) (Fig. 4d) which usually displays an agglomerated granular shape with  $1.2 \pm 0.4 \mu\text{m}$  in size elementary particles, suggesting that this mineral was formed by precipitation. A ratio around 1.5 can be assigned to  $\text{Cu}_3\text{S}_2$  (Fig. 4e) whereas a ratio of 1 corresponds to covellite ( $\text{CuS}$ ). These two latter minerals are usually found as much larger particles (2.3 to  $45 \mu\text{m}$ ) whose shapes appear more regular. However, it must be pointed out that a ratio of 1.5 could also be interpreted as resulting from a mixture between  $\text{Cu}_2\text{S}$  and  $\text{CuS}$ . In the case of Zn, only sphalerite ( $\text{ZnS}$ ) was observed often as isolated granular phases with average diameters around  $0.4 \mu\text{m}$  (Fig. 4f). In other cases, sphalerite occurred as small grains grown on barite surfaces which may come from paint, brake wear or medical applications (El Samrani et al., 2004). Numerous iron sulfides were observed with Fe/S ratios close to 1,  $2/3$ , and  $1/2$ . The two extreme ratios can be assigned to mackinawite ( $\text{FeS}$ ), and pyrite ( $\text{FeS}_2$ ) respectively whereas the intermediate ration could correspond to  $\text{Fe}_2\text{S}_3$  which is a transitory phase in the formation of pyrite from mackinawite. Other monosulfide phases such as argentite ( $\text{Ag}_2\text{S}$ ) or millerite ( $\text{NiS}$ ) were also observed. Apart from these dominant monosulfides, binary sulfides with compositions close to  $\text{Cu}_3\text{FeS}_4$  and  $\text{Hg}_2\text{FeS}_2$  were also determined occasionally. Finally, some particles display EDX spectra with complex compositions of Hg, Ag, Cu, Sn, and S. In view of their agglomerated aspect, these particles could be interpreted as fragments of dental amalgams (Acciari et al., 2001), that are known to have a strong affinity for sulfur (Hesterberg, 2001) and have been observed in Nancy sewage (El Samrani, 2004).

The numerous sulfides species found in sewage should correspond to neoformed minerals. Indeed, sulfide formation is related to anoxic conditions, sulfide genesis being usually associated to the activity of sulfate-reducing bacteria (SRB) (Norsker et al., 1995; Herbert Jr. et al., 1998; Jong and Parry, 2003). Dissolved and particulate sulfates are assimilated by SRB, and the  $\text{H}_2\text{S}$  thus produced reacts with dissolved heavy metals to yield sulfide precipitates. Such a reaction pathway is widely used for the remediation of water polluted with heavy metals and sulfates (Neculita et al., 2008). However, taking into account the average sulfate concentration ( $95.5 \pm 32.6 \text{ mg/L}$ ), pH and Eh conditions in all the sewers studied in Nancy (Houhou et al., accepted), a plot of the sulfate Pourbaix diagram shows that Nancy sewage is in oxic conditions. Furthermore, SRB enumeration experiments revealed

rather weak bacterial concentrations ranging between 59 and 4033 bacteria/mL. It then appears that the conditions encountered in Nancy sewage are not favorable to sulfide formation. Consequently, the sulfides observed must have been transported from anaerobic portions of the sewer network (Hvitved-Jacobsen et al., 1995; Zhang et al., 2008).

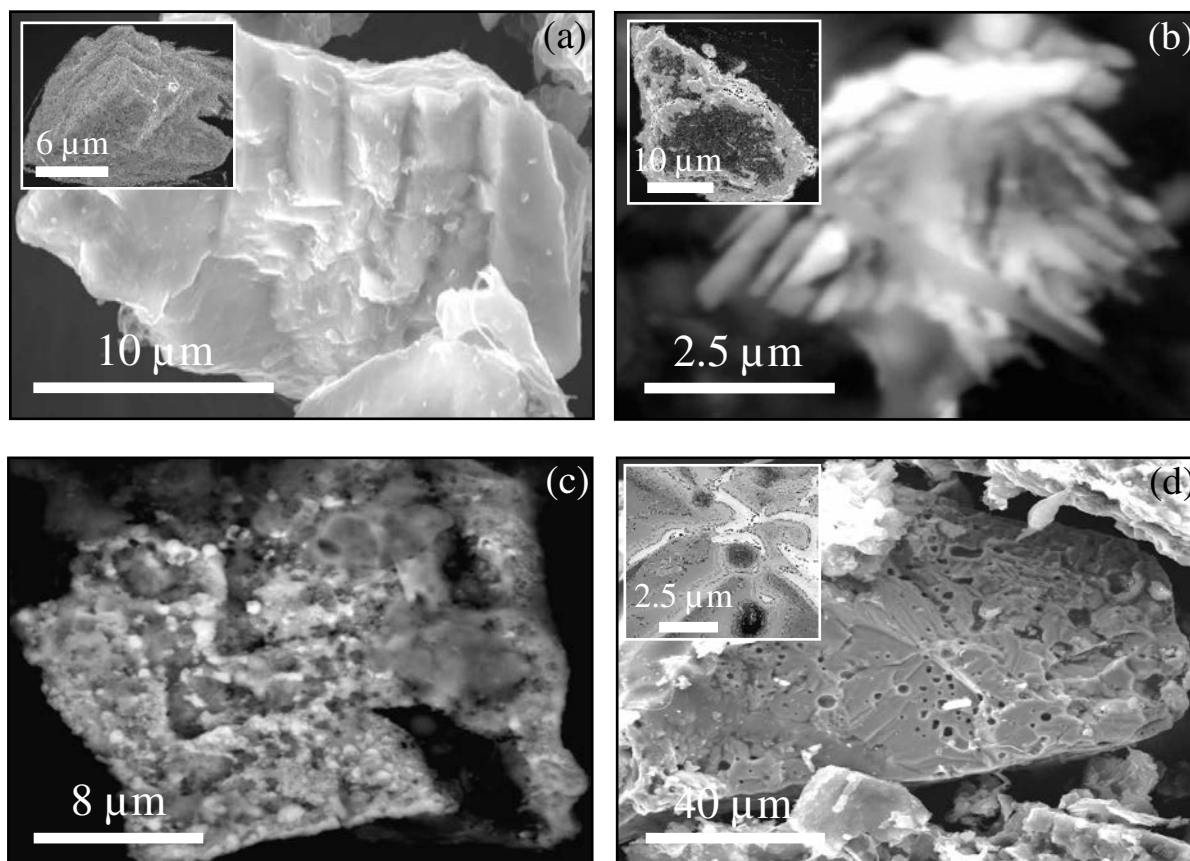
In order to better identify the potential portions of the sewer network where sulfide formation could have occurred, further samples taken from suspected anoxic points such as biofilms, sewer sediments, SP and washbasin siphon deposits were analyzed for their mineralogy with particular emphasis on sulfide species.

### Bacterial biofilms

A total of 480 particles from bacterial biofilms were characterized by TEM-EDX (250) and SEM-EDX (230). This high number of particles agrees with previous conclusions by Rocher (2003) who found that sewer biofilms entrap mineral fragments in their organic matrix. Sulfate phases (mainly BaSO<sub>4</sub>), oxide and oxihydroxide phases (mainly iron phases) and sulfides represent 30%, 17% and 12% of analyzed particles, respectively. The majority of the analyzed mineral particles were present in sewer wastewater, and have diffused throughout water channels within biofilms in which they undergo physico-chemical and bacterial transformations. Particles diffusion are underlined by the identification within biofilm of mineral particles already encountered in SM such as heavy metals oxides (ZnO, SnO<sub>2</sub>, TiO<sub>2</sub>, Ti<sub>2</sub>O<sub>3</sub> and PbO), heavy metal alloys, clays, phosphates, iron oxides and oxihydroxides and organic carriers enriched in Zn. Diffusion phenomena have already been evidenced in numerous lab-scale studies, which revealed matter and particles diffusion from bulk water towards biofilms (de Beer and Stoodley, 1994; Stoodley et al., 1999; Wäsche et al., 2002). Still, these phenomena are not the only ones occurring and a fraction of the identified particles may be neofomed within biofilms (Nielsen et al., 1992; Remoudaki et al., 2003).

EDX microanalyses reveal that 50% of all the heavy metals are present as sulfide phases, mainly monosulfides such as ZnS (Fig. 5a), PbS (inset Fig. 5a), CuS, or MoS<sub>2</sub> (molybdenite). Such minerals may result from neofomation processes within biofilms. Indeed, Nielsen (1998) showed that in sewer systems, sulfides in biofilms and sediments were mainly formed through the anaerobic reduction of sulfates, sulfate-reducing bacteria assimilating dissolved sulfate, integrating it in their respiration cycle, thus producing

hydrogen sulfide (Vollertsen et al., 1998) that can then react with dissolved metals from wastewater circulating in biofilm channels, to form metal sulfide precipitates. A similar conclusion was reached by Jong and Parry (2003) who found that the large decrease of sulfide in anaerobic packed bed reactors was due to the precipitation of insoluble metal sulfides. Iron sulfides encountered in SM were also evidenced in biofilms, under both amorphous and crystallized forms. As an example, figure 5b shows a 7  $\mu\text{m}$  crystallized pyrite particle displaying a growth rod and an amorphous 30  $\mu\text{m}$  mackinawite particle (inset Fig. 5b). The precipitation of amorphous mackinawite in anaerobic media containing sulfate reducing bacteria was already reported (Herbert Jr. et al., 1998), while the formation of crystallized pyrite at the surface of iron oxide ( $\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$ ) through dissolution by sulfate reducing bacteria was evidenced by Neal (2001).



**Figure 5.** Electron micrographs of heavy metal carriers in sewer biofilms. (a) SEI of sphalerite particle and galena one (inset); (b) BEI of pyrite particle and SEI of mackinawite one (inset); (c) BEI of sulfurized Fe-Mn alloy; (d) SEI of iron oxihydroxide particle corroded by bacteria with presence of corrosion holes and bacteria at particle surface (inset).

Remaining part of sulfide phases corresponds to sulfur-containing heavy metal alloys, as among the numerous alloys found in bacterial biofilms, 53% of heavy metal alloys contain between 1 and 10% of sulfur. Figure 5c is a BE micrograph of sulfurized Fe-Mn alloy (S 1.5%). It can be suggested that all these alloys are enriched in sulfur in the anaerobic conditions present in sewer biofilms.

In the present study, we also found evidence for bacterially mediated degradation of iron oxides and oxihydroxides in biofilm sewers. As an illustration, figure 5d shows the bacterial attack of one iron rich particle. Holes at the particle surface are clearly observed, bacteria being found behind and within these holes (inset Fig. 5d). Bacterial corrosion of iron-containing particles such as pyrite was already reported by Mustin (1991). He indicated the oxidation of pyrite by *Thiobacillus ferrooxidans* bacteria and the formation of hexagonal or square etched pits tunnels through pyrite particles after 45 days of biolixiviatiion.

The relatively high concentration of heavy metal carriers present in the biofilms, either allogenic or neoformed can certainly contribute to the polluting load in sewer systems as upon increasing shear stress: sewer biofilms can detach (Nielsen et al., 1992; Warith et al., 1998; Houhou et al., b, in preparation) and release their charge in heavy metals into the sewer system.

### Sewer sediments

Around 220 particles from the raw sediments I and from the bromoform concentrated sediments I and II, were analyzed by EDX. As previously, various metal oxides ( $ZnO_2$ ,  $PbO_2$ ,  $PbSiO_4$ ,  $ZrSiO_4$ ,  $TiO$ ,  $TiO_2$ ,  $Ti_2O_3$ , La-Ce-Fe) and numerous stainless fragments were evidenced in the raw fractions of the sediment. Still, this fraction is characterized by a significant enrichment in sulfide phases, which account for 37% of the analyzed particles. Such an increase in sulfide phases was already reported by different authors (El Samrani, 2004; Zhang et al., 2008). This enrichment in sulfur is also apparent from the high sulfur content (7.30%-13.22%) of the iron oxides and oxihydroxides observed in the sediment.

The sulfide species present in the raw sediments I display a wide compositional variability. As far as iron sulfides are concerned, pyrite ( $FeS_2$ ), greigite ( $Fe_3S_4$ ) and mackinawite ( $FeS$ ) were observed in agreement with El Samrani (2004). In contrast with the particles found in bacterial biofilms, mackinawite in raw sediments appears as relatively large



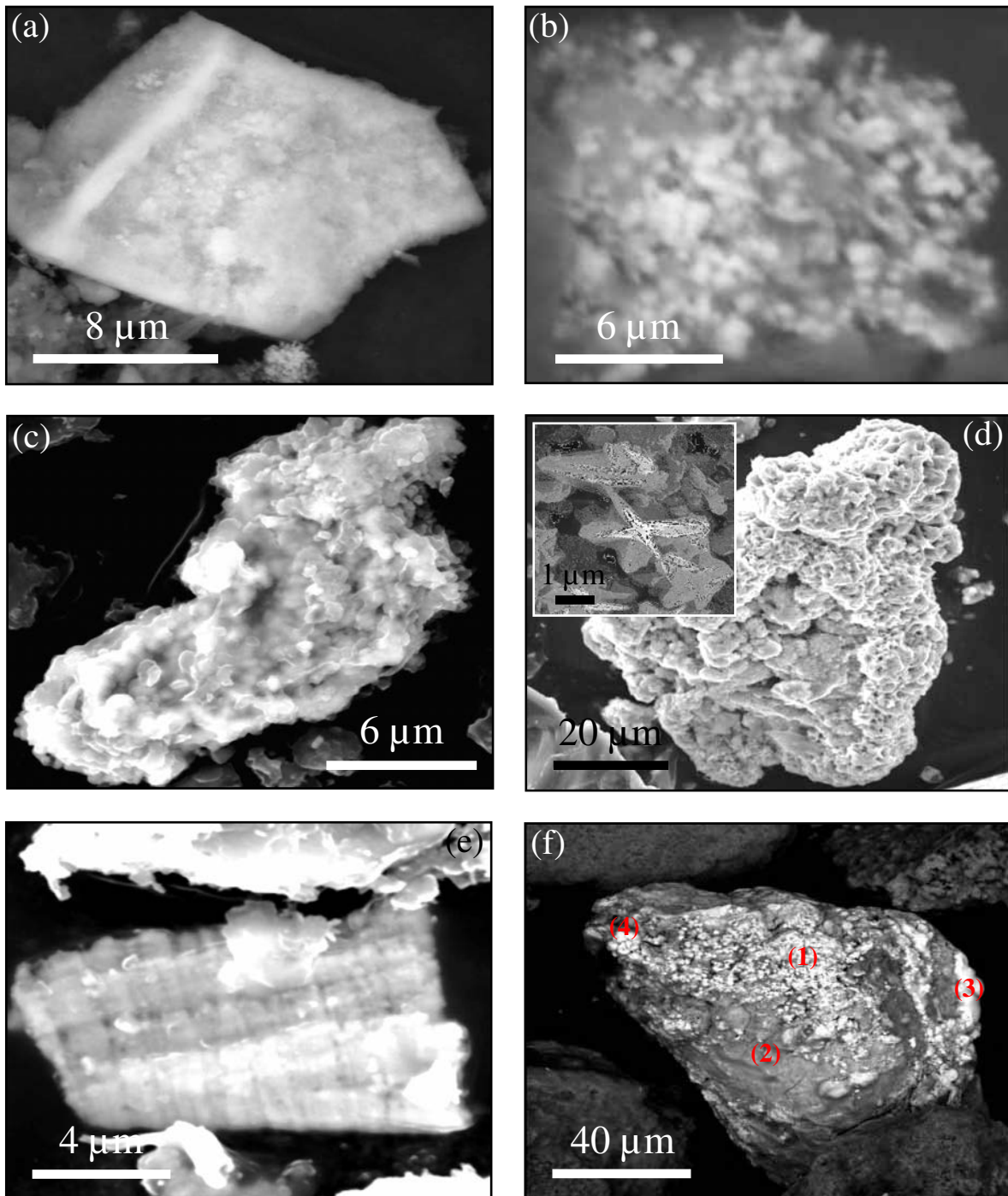
(20  $\mu\text{m}$ ) crystallized textured particles (Fig. 6a) and contains heavy metals such as Zn (1.21%) and Cu (0.45%). This is not surprising, as mackinawite was shown to be a potential sink for trace metals during early diagenesis in anoxic seawater sediments (Morse and Arakaki, 1993). The presence of greigite can be interpreted as resulting from the oxidation of mackinawite (El Samrani et al., 2004). Zinc sulfides with different compositions and textural forms were observed in the raw sediments I. As an illustration, figure 6b displays a 1  $\mu\text{m}$  sphalerite grains grown on barite surfaces. In addition, zinc sulfides were also found entrapped in zeolite, phosphate phases,  $\text{BiS}_2$  and iron sulfides. Additional monosulfides of copper ( $\text{CuS}$ ), lead ( $\text{PbS}$ ), and bismuth ( $\text{Bi}_3\text{S}_4$ ) were also identified. Finally, various binary sulfides containing Cu and Fe were observed as well as sulfurized dental amalgams (Fig. 6c) and sulfurized alloys. The numerous sulfides found in the raw sediments I are likely neofomed as consequence of physic-chemical and microbiological reactions as reported above.

In order to obtain more detailed information about the sulfide phases in the sediments, the bromoform concentrates of sediments I and II were thoroughly characterized by MEB-EDX microanalyses. In these materials, copper is mainly present as 15  $\mu\text{m}$  to 150  $\mu\text{m}$  mixed Cu-Fe sulfides with highly variable compositions ( $\text{Cu}_x\text{Fe}_y\text{S}_z$ ). Such mixed Cu-Fe sulfide minerals were observed in anaerobic river sediments (Sutherland et al., 2007; Marcussen et al., 2008), where Cu accumulates as authigenic sulfide by co-precipitation with iron sulfides. Detailed investigations of the textures of these particles reveal significant differences between particles and sometimes within one particle. As an illustration, figure 6d shows a particle of Cu-Fe-S with a very heterogeneous surface that appears to be divided into amorphous and crystallized regions (inset Fig. 6d). The local EDX spectra of the amorphous region corresponds to  $\text{Cu}_4\text{FeS}_4$ , whereas the composition of the crystallized regions corresponds to  $\text{CuS}$ , i.e. covellite whose typical hexagonal crystal shape clearly appears in the inset figure 6d.

In the bromoform concentrated sediments, lead is found under both oxidized ( $\text{PbO}$ ) and sulfurized ( $\text{PbS}$ ) forms, these two species being either found in separated or mixed particles. This latter case was especially common in wear particles. Figure 6e clearly shows a neofomed  $\text{PbS}$  particle, which displays growth marks all along the particle. Zinc is present under various forms: sulfides entrapped within Cu-Fe sulfides, sulfur-rich Zn-Cu alloys (180  $\mu\text{m}$ ) and monosulfides such as sphalerite and  $\text{Zn}_2\text{S}$ . This latter species were only found under the form of nanoclusters (0.4  $\mu\text{m}$ ) and could then correspond to intermediate phases in the formation of  $\text{ZnS}$  mineral. Other sulfide minerals such as mackinawite (20  $\mu\text{m}$ ),  $\text{Bi}_2\text{S}_3$

(8-12  $\mu\text{m}$ ) and pyrite entrapped within  $\text{Bi}_2\text{S}_3$ . In addition, numerous heterogeneous particles 100 to 250  $\mu\text{m}$  in size containing Sn, Pb, Fe, Cu and Zn were observed. These species have likely evolved from pipe wear fragments. Figure 6f displays the backscattered electron image of one such particle. Variations in the intensity of backscattering clearly reveal the strong mineralogical heterogeneity inside these particles, which is confirmed by EDX microanalyses, the large bright and dark parts corresponding to lead oxide and Sn-Pb-Fe-Cu alloy, respectively and the small white parts to the right and left of the particle corresponding to  $\text{SnSO}_4$  and  $\text{PbS}$ , respectively.

The detailed analyses of the mineralogy of sewer sediments have clearly revealed the evolution of the nature of heavy metal carriers in sewer sediments. Still, such evolutions may either occur in situ in the sediments or have been initiated upstream. In order to discriminate between these two assumptions, it is relevant to study as well the mineralogy of the deposits found in washbasin siphons and household sump pits.



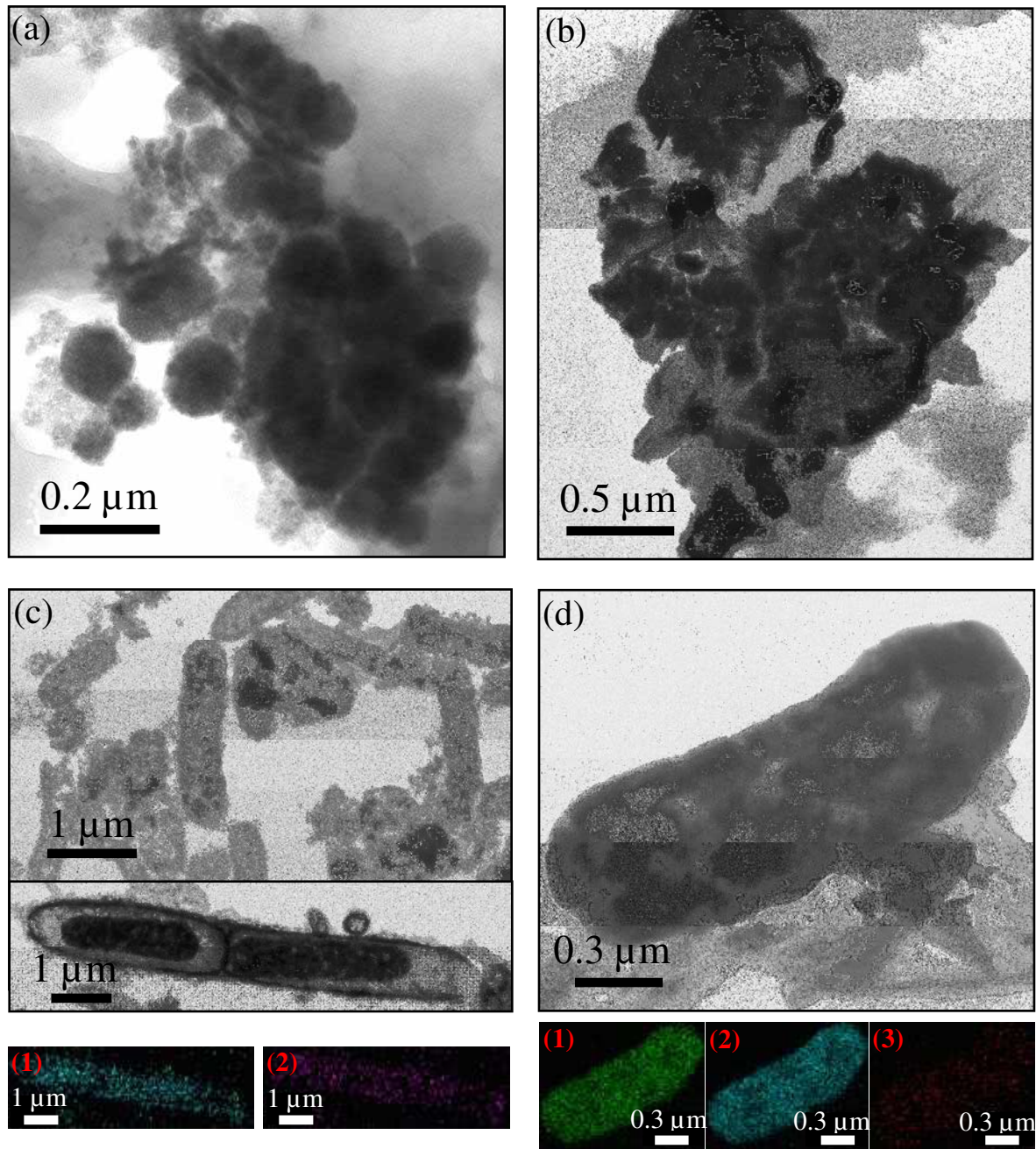
**Figure 6.** Electron micrographs of heavy metal carriers in sewer sediments. (a) BEI of mackinawite particle; (b) BEI of Zn-sulfide grains precipitate at the surface of barite particle; (c) BEI of sulfurized dental amalgame particle; (d) SEI of heterogeneous Cu-Fe-S particle and BEI of hexagonal crystal shape of covellite (inset); (e) BEI of neofomed galena particle, displaying growth marks all along the particle; (f) BEI of mixed heavy metal carrier contains Pb, Sn, Fe, Cu and S with different mineral composition: (1) lead oxide, (2) Sn-Pb-Fe-Cu alloy, (3) SnSO<sub>4</sub>, (4) galena.

Washbasin siphon deposits

160 particles from eight washbasin siphons deposits were analyzed. In average, amorphous silica and corundum ( $\text{Al}_2\text{O}_3$ ) represent 15% and 17% of analyzed particles, respectively; though in two of the seven deposits, these proportions raise to 78% and 65%. Amorphous silica and corundum likely originates from household where they are used as abrasive particles in soap and as scrub powder, respectively.

In contrast with the observations carried out in tap water, numerous sulfides of heavy metals (9% of the observed particles) were found in addition to oxides (30% of the observed particles). Some of these oxides particles are equivalent to those found in tap water, i.e., CuO and Zn-containing iron oxyhydroxides, and their presence in washbasin siphons can then be interpreted as resulting from the sedimentation of suspended particles from tap water. Supplementary oxide phases were encountered, i.e., PbO, PbO<sub>2</sub>, TiO<sub>2</sub>, Ti<sub>2</sub>O<sub>3</sub>. Titanium and lead oxides correspond to pigments contained in personal care products ((Nohynek et al., 2008) and to the corrosion of Vinyl PolyChloride evacuation pipes, respectively.

Sulfide particles containing Cu, Zn, Pb and Sn representing 89%, 58%, 16% and 8% of all sulfide particles observed, respectively, were found in siphon deposits. The high percentage of Cu and Zn sulfides corresponds to the fact that these two metals are often co-existing with other metal sulfides. As far as copper is concerned, Cu<sub>2</sub>S and CuS particles were identified, the latter usually being found as agglomerated granules (Fig. 7a). Particles with intermediate (3/2) Cu/S ratios that may correspond to intermediary sulfide phases between Cu<sub>2</sub>S and CuS were also observed. Electron micrographs of these intermediate phases (Fig. 7b) reveal the crystallized nature of such particles. It then appears that in washbasins siphons Cu<sub>2</sub>S could precipitate under anoxic conditions and then evolve towards CuS through crystallization and sulfurization cycles to give CuS. The sulfur enrichment in washbasin siphons is also illustrated by the fact that heavy metal alloys found in these samples display a significant enrichment in sulfur.



**Figure 7.** TEM images of heavy metal carriers in washbasin siphon deposits. (a) covellite grains; (b) intermediary crystallized copper sulfide between chalcocite and covellite; (c) bacterial cells entrapping berndtite at their wall. (1) and (2) TEM mapping of S and Sn of two bacterial (inset c); (d) bacteria coated by Zn-Pb sulfide and TEM mapping of S (1), Zn (2) and Pb (3).

Sulfide formation in washbasin siphons is likely bacterially mediated, as 33% of the sulfides observed are associated with bacteria. Further evidence for the role of bacteria is provided by figures 7c and 7d. Figure 7c shows bacteria rich in berndtite ( $\text{SnS}_2$ ). TEM maps of S (Fig. 7c bottom left) and Sn (Fig. 7c bottom right) in two bacteria (inset Fig. 7c) reveal

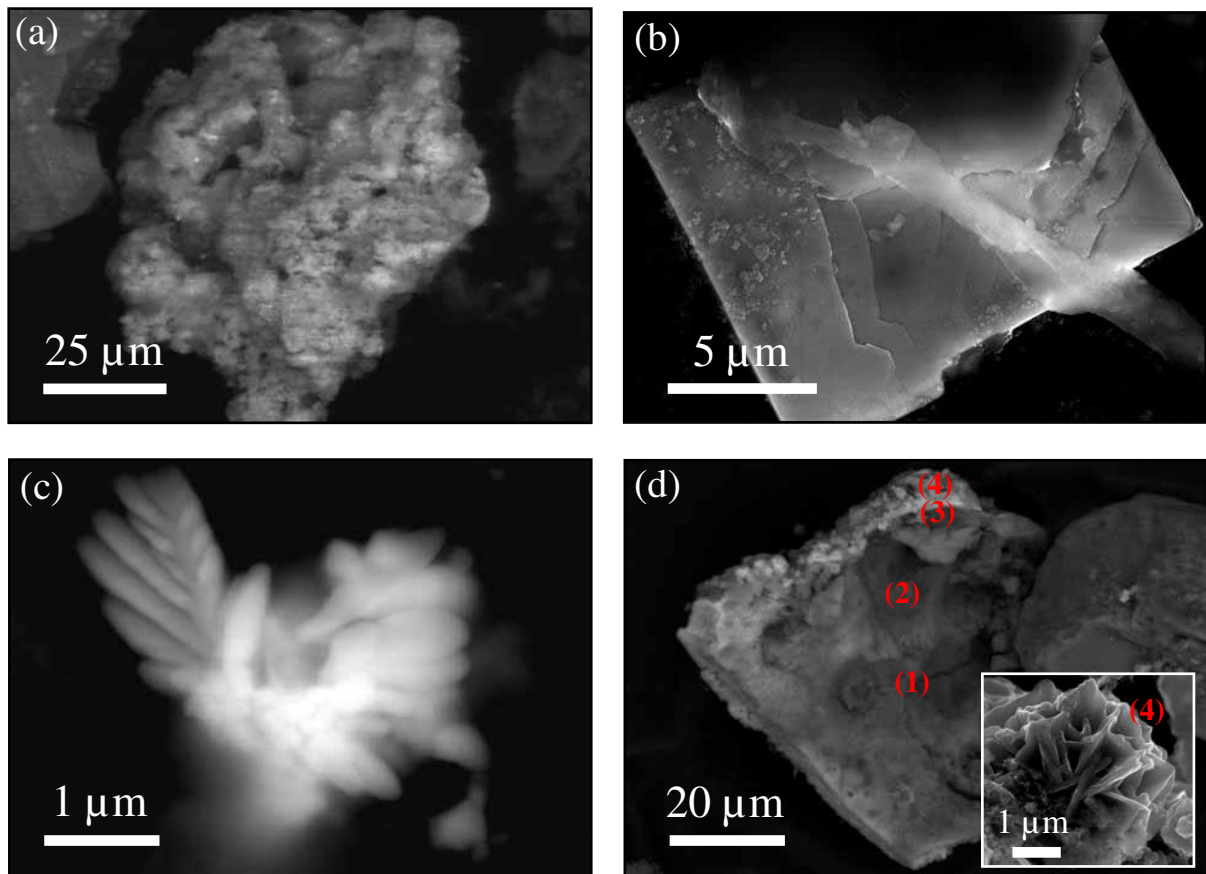
that S and Sn are colocalized in the bacteria and present in the whole microorganism. Other bacteria coated with Cu, Pb and Zn sulfides were also observed. As an illustration, figure 7d shows a Zn-Pb sulfide (Zn 30.8%, Pb1.78%, S 30.8 %) coating a bacteria. The associated elemental maps for S (Fig. 7d bottom left), Zn (Fig. 7d bottom middle), and Pb (Fig. 7d bottom right) reveal an homogeneous distribution of these 3 elements. Metal precipitation at bacterial surfaces has already been studied by numerous researchers.

The analysis of washbasins siphons thus carried out clearly shows that sulfur enrichment of heavy metals starts early in the wastewater cycle within households. Part of the heavy metal sulfides circulating in sewage systems can then be assigned to resuspended particles from washbasin siphons. Still, the lower size of the sulfide minerals observed in washbasin siphons as well as their dominant monosulfide character proves that they do not directly correspond to the sulfide species found in sewer sediments. It is then relevant to examine in addition the mineralogy of particles found in sump pit deposits.

#### Sump pit deposits

115 particles from SP deposits were analyzed. Figure 8 shows some examples of the particles found that are significantly enriched in sulfur in comparison with tap water, as 85% of the particles observed in SP deposits contain sulfur. This strong sulfur enrichment is well illustrated by the case of carbonates of heavy metals such as  $\text{PbCO}_3$  (Fig. 8a) and  $\text{ZnCO}_3$  which are surface coated with  $\text{PbS}$  and  $\text{ZnS}$ . Many of the heavy metal sulfides identified in sewer sediments and SM ( $\text{CuS}$ ,  $\text{Cu}_2\text{S}$ ,  $\text{ZnS}$ ,  $\text{FeS}$ ,  $\text{FeS}_2$ ,  $\text{PbS}$ ,  $\text{ZnS}$  and grains grown on barite surface) are also found in SP deposits. In the case of SP deposits though, sulfides appear more evolved as small well crystallized particles such as  $\text{PbS}$  (Fig. 8b) and  $\text{Cu}_2\text{S}$  (Fig. 8c). These particles display growth layers and growth steps at their surfaces, which strongly suggest that such particles have been neoformed. As observed in sewer sediments, many particles (heavy metal alloys, copper fragments and dental amalgams) appear enriched in sulfur. In addition, other S-rich alloys, such as Ti-Hg and Ni-Sb-As appear to be typical of SP deposits. The presence of Ti-Hg alloys could result from the interaction between Ti prostheses (Ho et al., 2008) and classical dental amalgams. One particularly interesting case for comparing the evolution of particles in SP deposits with that in sewer sediments is provided by mixed Cu-Fe sulfides. Figure 8d shows such a particle found in SP deposits displaying an amorphous core surrounded by a well-crystallized ring. In the amorphous part, the chemical composition of the core corresponds to an average formula of  $\text{Cu}_2\text{FeS}_2$  that evolves towards a composition

closer to  $\text{Cu}_2\text{FeS}_3$  when moving away from the core. The base of the external ring displays a composition of  $\text{Cu}_2\text{S}_3$  whereas the composition of the ring is close to  $\text{CuS}$  (inset Fig. 8d). Such a radial heterogeneity observed in the mixed Cu-Fe sulfides of sewer sediments is less pronounced in SP deposits. This suggests that the strong sulfur enrichment observed in sewer sediments may be initiated in SP through physical and/or microbial reactions. Materials from SP deposits may then be eroded, resuspended and transported within sewer system where they can settle depending on the flow conditions. Once settled in anaerobic sewer sediments, particles from household manholes are subjected to different physico-chemical conditions (Vollertsen and Hvitved-Jacobsen, 2000), and can then undergo additional sulfurization cycles, the duration and intensity of which, depends on the time repartition of dry weather periods.



**Figure 8.** SEM-BEI of heavy metal carriers in sump pit deposits, illustrating sulfurized cerussite (a); crystallized galena with growth layers (b); crystallized chalcocite with growth steps (c); and heterogeneous Fe-Cu sulfide (d): (1)  $\text{Cu}_2\text{FeS}_2$ , (2)  $\text{Cu}_2\text{FeS}_3$ , (3)  $\text{Cu}_2\text{S}_3$ , (4)  $\text{CuS}$  (inset).

## **CONCLUSION**

Chemical analyses of soluble and particulate heavy metals indicate that household activities are the main sources of pollutants in wastewater and that particulate metals are found to accumulate in sewer sediments. It then appears obvious that the best solution to reduce metal loads in wastewater would be to diminish their production at the source.

This study provides a global identification of the mineralogical nature of particulate phases in sewer system at the household scale (washbasin siphon and sump pit deposits) as well as at the domestic sewer scale (suspended matter, sediments and biofilms). Even if a large number of particles were investigated using electron microscopy, the number of investigated heavy metal carriers remains infinitesimally small compared to the total amount of particles transported in sewer systems. Still, our results suggest that (i) tap water contributes to the load of particulate heavy metals in sewage due to the corrosion of drinking network pipes. (ii) In sewer system, metals are mainly encountered under oxidized and sulfurized phases. (iii) These latter species are found to be neoformed under anaerobic conditions in sewer biofilms and sump pit deposits. (iv) Sump pit sulfides are transported in sewer sediments under flow, where their sulfurization proceeds to yield complex phases. (v) Most sulfide elements in suspended matter originate from the erosion of sewer sediments and the detachment of biofilms.



## REFERENCES

- Acciari, H.A., Guastaldi, A.C., Brett C.M.A. (2001) Corrosion of dental amalgams: electrochemical study of Ag-Hg, Ag-Sn and Sn-Hg phases. *Electrochim. Acta.* 46, 3887-3893.
- Aonghusa, C.N., Gray, N.F. (2002) Laundry detergents as a source of heavy metals in Irish domestic wastewater. *J. Environ. Sci. Health A Tox. Hazard. Subst. Environ. Eng.* 37(1), 1-6.
- Boller, M. (1997) Tracking heavy metals reveals sustainability deficits of urban drainage systems. *Wat. Sci. Technol.* 35(9), 77-87.
- Boller, M. (2004) Towards sustainable urban stormwater management. *Wat. Sci. Technol.* 4(1), 55-65.
- Carignan, J., Hild, P., Meville, G., Morel, J., Yeghicheyan, D. (2001) Routine analysis of trace elements in geological samples using flow injection and low pressure on-line liquid chromatography coupled to ICP-MS: a study of geochemical reference materials BR, DR-N, UB-N, AN-G, and GH. *Geostandards Newsletter* 25, 187-198.
- Castela-Papin, N., Cai, S., Vatiez, J., Keller, F., Souleau, C.H., Farinotti, R. (1999) Drug interactions with diosmectite: a study using the artificial stomach-duodenum model. *Int. J. Pharm.* 182, 111-119.
- Chebbo, G., Gromaire, M.C., Ahyerre, M., Garnaud, S. (2001) Production and transport of urban wet weather pollution in combined sewer systems: the "Marais" experimental urban catchment in Paris. *Urban Water.* 3, 3-15.
- Chen, S-W., Zi, A-R., Chen, P-Y., Wu, H-J., Chen, Y-K., Wang, C-H. (2008) Interfacial reactions in the Sn-Sb/Ag and Sn-Sb/Cu couples. *Mater. Chem. Phys.* 111, 17-19.
- de Beer, D., Stoodley, P. (1995) Relation between the structure of an aerobic biofilm and transport phenomena. *Wat. Sci. Technol.* 32(8), 11-18.
- El Samrani, A.G., Lartiges, B.S., Ghanbaja, J., Yvon, J., Kohler, A. (2004) Trace element carriers in combined sewer during dry and wet weather: an electron microscope investigation. *Water Res.* 38, 2063-2076.
- Francis, A.J., Dodge, C.J. (1986) Anaerobic bacterial dissolution of lead oxide. *Arch. Environ. Conatm. Toxicol.* 15, 611-616.
- Gasperi, J., Kafi-Benyehia, M., Lorgeoux, C., Moilleron, R., Grommaire, M.C. (2006) Variabilité spatiale des caractéristiques des polluants transitant par temps sec dans le réseau d'assainissement unitaire parisien. *Techniques Sciences Méthodes.* 11, 23-30.
- Gauthier, V., Portal, J.M., Yvon, J., Rosin, C., Block, J.C., Lahoussine, V., Benabdalla, S., Cavard, J., Gatel, D., Fass, S. (2001) Characterization of suspended particles and deposits in drinking water reservoirs. *Wat. Sci. Technol.* 1(4), 89-94.

Grabtree, R.W. (1989) Sediments in sewers. *J. Inst. Water Environ. Manage.* 3, 569-578.

Gray, S.R., Becker, N.S.C. (2002) Contaminant flows in urban residential water systems. *Urban water.* 4, 331-346.

Gromaire, M.C., Garnaud S., Saad, M., Chebbo, G. (2001) Contribution of different sources to the pollution of wet weather flows in combined sewers. *Water Res.* 35(2), 521-533.

Heitland, P., Köster H.D. (2006) Biomonitoring of 30 trace elements in urine of children and adults by ICP-MS. *Clin. Chim. Acta.* 365, 310-318.

Herbert Jr., R.B., Benner, S.G., Pratt, A.R., Blowes D.W. (1998) Surface chemistry and morphology of poorly crystalline iron sulfides precipitated in media containing sulfate-reducing bacteria. *Chem. Geol.* 144, 87-97.

Herting, G., Odnewall Wallinder, I., Leygraf, C. (2008) Corrosion-induced release of chromium and iron from ferritic stainless steel grade AISI 430 in simulated food contact. *J. Food Eng.* 87, 291-300.

Hesterberg, D., Chou, J., Hutchison, K., Sayers, D. (2001) Bonding of Hg(II) to reduced organic sulfur in humic acid as affected by S/Hg ratio. *Environ. Sci. Technol.* 35, 2741-5.

Hvitved-Jacobsen, T. Raunkjær, K., Nielsen, P.H. (1995) Volatile fatty acids and sulfide in pressure mains. *Wat. Sci. Technol.* 31(7), 169, 179.

Ho, W-F., Chiang, T-Y., Wu, S-C., Hsu, H-C. (2008) Evaluation of low-fusing porcelain bonded to dental cast Ti-Cr alloys. *J. Alloys. Compd.* doi:10.1016/j.jallcom.2008.06.152

Houhou, J., Lartiges, B.S., Hofmann, A., Frappier, G., Ghanbaja, J., Temgoua, A. (accepted) Phosphate dynamics in an urban sewer: a case study of Nancy, France. *Water Res.*

Houhou, J., Lartiges, B.S., France-Lanord, C., Guilmette, C., Poix, S., Mustin, C. (a, in preparation) Isotopic tracing of water sources in an urban sewer: a multiple D,  $^{18}\text{O}_{\text{H}_2\text{O}}$ ,  $^{34}\text{S}$ ,  $^{18}\text{O}_{\text{SO}_4}$  stable isotope approach.

Houhou, J., Mustin, C., Lartiges, B.S., Skali-Lami, S., Caumon, G., Levitz, P. (b, in preparation). Investigation of biofilm growth in a Couette-Poiseuille reactor: new tools confocal laser scanning microscopy observation.

Jong, T., Parry, D.L. (2003) Removal of sulfate and heavy metals by sulfate reducing bacteria in short-term bench scale upflow anaerobic packed bed reactor runs. *Water Res.* 37, 3379-3389.

Karvelas, M., Katsoyiannis, A., Samara, C. (2003) Occurrence and fate of heavy metals in the wastewater treatment process. *Chemosphere.* 53, 1201-1210.

Lesage, E., Rousseau, D.P.L., Meers, E., Tack, F.M.G., De Pauw, N. (2007) Accumulation of metals in a horizontal subsurface flow constructed wetland treating domestic wastewater in Flanders, Belgium. *Sci. Total Environ.* 380, 102-115.

Marcussen, H., Dalsgaard, A., Holm, P.E. (2008) Content, distribution and fate of 33 elements in sediments of rivers receiving wastewater in Hanoi, Vietnam. *Environ. Pollut.* 155, 41-51.

Merkel, T.H., Groß, H-J., Werner, W., Dahlke, T., Reicherter, S., Beuchle, G., Eberle, S.H. (2002) Copper corrosion by-product release in long-term stagnation experiments. *Water Res.* 36, 1547-1555.

Michelbach S., Wöhrle, C. (1993) Settleable solids in a combined sewer system, settling characteristics, heavy metals, efficiency of storm water tanks. *Wat. Sci. Technol.* 27 (5-6), 153-164.

Moon, C.H., Lee, Y.S., Yoon, T.H. (1994) Variation of trace Cu, Pb and Zn in sediment and water of an urban stream resulting from domestic effluents. *Water Res.* 28(4), 985-991.

Morse, J.W., Arakaki, T. (1993) Adsorption and coprecipitation of divalent metals with mackinawite (FeS). *Geochim. Cosmochim. Ac.* 57(15), 3635-3640.

Mustin, C., Berthelin, J., Marion, P., de Donato, P., (1992) Corrosion and electrochemical oxidation of a pyrite by *Thiobacillus ferrooxidans*. *Appl. Environ. Microbiol.* 58(4), 1175-1182.

Neal, A.L., Techkarnjanaruk, S., Dohnalkova, A., McCready, D., Peyton, B.M., Geesey, G.G. (2001) Iron sulfides and sulfur species produced at hematite surfaces in the presence of sulfate-reducing bacteria. *Geochim. Cosmochim. Ac.* 65(2), 223-235.

Nielsen, P.H., Raunkjær, K., Norsker, N.H., Jensen, N.A., Hvitved-Jacobsen, T. (1992) Transformation of wastewater in sewers systems – A review. *Wat. Sci. Technol.* 25(6), 17-31.

Nielsen, P.H., Raunkjær, Hvitved-Jacobsen, T. (1998) Sulfide production and wastewater quality in pressure mains. *Wat. Sci. Technol.* 37(1), 97-104.

Nohynek, G.J., Dufour, E.K., Roberts, M.S. (2008) Nanotechnology, cosmetics and the skin: is there a health risk? *Skin Pharmacol. Physiom.* 21(3), 136-149.

Norsker, N.H., Nielsen, P.H., Hvitved-Jacobsen, T. (1995) Influence of oxygen on biofilm growth and potential sulfate reducing in gravity sewer biofilm. *Wat. Sci. Technol.* 31(7), 159-167.

Neculita, C.M., Zagury, G.J. (2008) Biological treatment of highly contaminated acid mine drainage in batch reactors: Long-term treatment and reactive mixture characterization. *J. Hazard. Mater.* 157(2-3), 358-366.

Remoudaki, E., Hatzikioseyan, A., Kousi, P., Tsezos, M. (2003) The mechanism of metals precipitation by biologically generated alkalinity in biofilm reactors. *Water Res.* 37(16), 3843-3854.

Rocher, V., Azimi, S., Moilleron, R., Chebbo, G. (2003) Biofilm in combined sewers: wet weather pollution source and/or dry weather pollution indicator? *Wat. Sci. Technol.* 47(4), 35-43.

Rocher, V., Azimi, S., Moilleron, R., Chebbo, G. (2004) Hydrocarbons and heavy metals in the different sewer deposits in the 'Le Marais' catchment (Paris, France): stocks, distributions and origins. *Sci. Total Environ.* 323, 107-122.

Rule, K.L., Comber, S.D.W., Ross, D., Thornton, A., Makropoulos, C.K., Rautiu, R. (2006) Diffuse sources of heavy metals entering an urban wastewater catchment. *Chemosphere.* 63, 64-72.

Sörme, L., Lagerkvist, R. (2002) Sources of heavy metals in urban wastewater in Stockholm. *Sc. Total Environ.* 298, 131-145.

Stoodley, P., I. Dodds, J.D. Boyle, and H. M. Lappin-Scott. 1999. Influence of hydrodynamics and nutrients on biofilm structure. *J. Appl. Microbiol.* 85:19S-28S.

Sutherland, T.F., Petersen, S.A., Levings, C.D., Martin, A.J. (2007) Distinguishing between natural and aquaculture-derived sediment concentrations of heavy metals in the Broughton Archipelago, British Columbia. *Mar. Pollut. Bull.* 54, 1451-1460.

Tamasi, G., Cini, R. (2004) Heavy metals in drinking waters from Mount Amiata (Tuscany, Italy). Possible risks from arsenic for public health in the Province of Siena. *Sci. Total Environ.* 327, 41-51.

Thevenot, D.R., Moilleron, R., Lestel, L., Gromaire, M.C., Rocher, V., Cambier, P., Bonte, P., Colin, J-L., de Ponteves, C., Meybeck, M. (2007) Critical budget of metal sources and pathways in the sceine River basin (1994-2003) for Cd, Cr, Cu, Hg, Ni, Pb and Zn. *Sci. Total Environ.* 375, 180-203.

Tsuji-Naito, K., Hatani, T., Okada, T., Tehara, T. (2007) Modulating effects of a novel skin-lightening agent,  $\alpha$ -lipoic acid derivative, on melanin production by the formation of DOPA conjugative products. *Bioorgan. Med. Chem.* 15, 1967-1975.

Tsujikawa, M., Noguchi, S., Yamauchi, N., Ueda, N., Sone, T. (2007) Effect of molybdenum on hardness of low-temperature plasma carburized austenitic stainless steel. *Surf. Coat. Tech.* 201, 5102-5107.

Valiron, F., Tabushi J-P (1992) Maîtrise de la pollution urbaine par temps de pluie- Etat de l'art. Lavoisier, TEC&DOC. p564.

Vollertsen, J., Hvitved-Jacobsen, T. (2000) Resuspension and oxygen uptake of sediments in combined sewers. *Urban Water.* 2, 21-27.

Vollertsen, J., Hvitved-Jacobsen, T., McGregor, I., Ashley, R. (A998) Aerobic microbial transformations of pipe and silt trap sediments from combined sewers. *Wat. Sci. Technol.* 38, 249-256.

Warith, M.A., Kennedy, K., Reitsma, R. (1998) Use of sanitary sewers as wastewater pre-treatment systems. *Waste Manage.* 18, 235-247.

Wäsche, S., H. Horan, and D. C. Hempel. 2002. Influence of growth conditions on biofilm development and mass transfer at the bulk/biofilm interface. *Water Res.* 36:4775-4784.

Wilkie, P.J., Koutoufides, P., Hatzimhalis, G., Connor, M.A. (1997) Pollutant levels in sewage from Melbourne's residential areas. AWWA 17 Federal convention, Melbourne, pp. 122-129.

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

# *CHAPITRE* *(IV)*

Caractérisations  
microscopiques des biofilms  
et des matières en suspension  
du réseau d'assainissement

**Biofilm and suspended matter in the sewer system: examination at various scales**

J. Houhou<sup>1\*</sup>, B.S. Lartiges<sup>1\*</sup>, C. Mustin<sup>2</sup>, J. Ghanbaja<sup>3</sup>

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

<sup>2</sup>*Nancy-University - LIMOS-FST / UHP-CNRS 7137 boulevard des Aiguillettes, BP 239-54506 Vandœuvre Cedex, France*

<sup>3</sup>*Nancy University – Service Commun de Microscopie - BP 239 - 54 500 Vandœuvre Cedex, France*

E-mail: [jamil.houhou@hotmail.fr](mailto:jamil.houhou@hotmail.fr), [bruno.lartiges@ensg.inpl-nancy.fr](mailto:bruno.lartiges@ensg.inpl-nancy.fr)

(\*) To whom correspondence should be addressed

## **ABSTRACT**

The nature and architecture of suspended matter (SM) and biofilms collected in Greater Nancy sewer system were investigated over a period of two years. Characterizations were conducted at millimetric scale using Confocal Laser Scanning Microscope (CLSM) and nanometric scale using Transmission Electron Microscopy (TEM). The evolution of dissolved organic carbon (DOC), total bacteria, total suspended solid (TSS), volatile matter (VM) and SM particle size distribution from upstream to downstream in three sewer sections and for one diurnal campaign were studied.

DOC was higher and lower in upstream and downstream, respectively. No clear evolution was found in total bacteria number along sewer. TSS was mainly composed of VM, and was found to decrease along the sewer. The temporal evolution of wastewater quality at a given sampling site shows no obvious change in total bacteria number. DOC was higher at midday, and decreases to reach its lower value at 6h20. TSS follows the same trend. The volume size distribution of SM was multimodal upstream and monomodal downstream the sewer system. Decrease of particle size along sewer is likely due to the settling of SM and not to the degradation of suspended organic matter.

Microscopic investigations indicated that SM and biofilm have similar composition: bacterial cells, extracellular polymeric substances (EPS), cellulose fibers, cell lyses matter, organo-mineral detritus and mineral particles. Nevertheless, they have different architectures. In SM, cellulose fibers form a skeleton for bacterial aggregates and biomass formation, within which bacteria may biodegrade fibers. The quantification of structure reveals an open and weak SM structure with a 0.8 porosity and a 45% coverage surface. Whereas, biofilms were more compact and denser than SM (porosity 0.55, coverage surface 92%), with the presence of water channels. Cellulose fibers were found embedded in EPS matrix and the participation of bacterial division to biofilm growth was evidenced. Viruses including bacteriophages were encountered within biofilms which may be considered as a potential reservoir of pathogenic viruses, especially during combined sewer overflows. Exchanges between SM and biofilms were evidenced by the presence of cellulose fibers within biofilm and compact SM presenting a similar structure as that of biofilms.

**Keywords:** Suspended matter, sewer biofilm, TEM, CLSM, cellulose fiber, sedimentation.



## INTRODUCTION

Until recently, the sewer system was considered as a drainage system used essentially to evacuate wastewater from the city. It is now considered as a biophysicochemical reactor (Warith et al., 1998; Hvitved-Jacobsen et al., 2002; Tangi et al., 2006) in which sewage, bacterial biofilms and sediments may interact to provide a primary stage of wastewater treatment system (Raunkjær et al., 1995). Thus, the concentrations in organic matter (OM), chemical oxygen demand (COD), and dissolved oxygen (DO) of sewage were found to evolve during transport (Raunkjær et al., 1995; Chen et al., 2001; Huisman et al., 2004). In addition, hydrogen sulfide is also known to form in sewer anaerobic sediments, and to precipitate dissolved heavy metals from bulk water as sulfide species (El Samrani et al., 2004; Zhang et al., 2008; Houhou et al., a, in preparation).

Sewer biofilms were also demonstrated to evolve and to be involved in the wastewater treatment (Jahn and Nielsen, 1998). Bacterial biofilms are responsible in the uptake of DO, OM,  $\text{NH}_4^+$  and  $\text{NO}_3^-$  from bulk sewage (Tanaka and Hvitved-Jacobsen, 1998; Özer and Kasirga, 1995; Marjaka et al., 2003; Tanji et al., 2006). These solutes are converted to biomass (Warith et al., 1998), leading to biofilms growth (Raunkjær et al., 1995) thus inducing a change in their structure. Hence, biofilms may be detached and resuspended into sewage, increasing the amount of suspended matter (SM) in wastewater (Cao and Alaerts, 1995). In addition, the physic-chemical conditions in the sewer (flow velocity, anoxic and septic conditions) may influence the biofilm structure as shown by Æsøy (1997).

In addition, suspended matter was also found to evolve in sewer network. Suspended organic matter may undergo fermentation and hydrolysis to give dissolved matter (Raunkjær et al., 1995), and the mineralogical nature of suspended minerals evolves along sewer (Houhou et al., b, accepted). SM may also be adsorbed to sewer biofilms or settle as sediments (Warith et al., 1998). Until now, SM is studied as a function of its particle size distribution and settled velocity as shown by Nielsen (1992).

A few studies have been carried out to characterize the OM uptake from wastewater and their transformation to solid biomass within biofilms, and some research has been made to evidence the interdependence between dissolved matter and SM (Raunkjær et al., 1995; Æsøy et al., 1997). However, it is still unclear how these OM are structured as biomass within biofilm and transported by SM. The main objective of this work was to characterize the

architecture of sewer biofilms and suspended matter, in order to improve the knowledge in their component relationships and to underline the exchange between biofilms and SM. Thus, transmission electron microscopy (TEM) on resin-embedded samples and confocal laser scanning microscopy (CLSM) were used. TEM imaging at nanoscale gave information about the spatial relationships of microorganisms within biofilm matrix. In addition, CLSM allows sample detailed observations at the microscale under hydrated conditions, and thus accurate a non-destructive optical sectioning within sample (Solé et al., 2001); it also and decreases the interference from out-of-focus objects by the selection of optical thin sections and the reconstruction of xz-sagittal sections and 3-D images of biofilms (Surman et al., 1996).

## **EXPERIMENTAL SECTION**

### ***1. Study area***

Samples were collected from the sewer network of Greater Nancy urban community. Nancy, a city of about 270 000 inhabitants located in north-eastern France, lies on both banks of Meurthe river with a total catchment area of 193 Km<sup>2</sup> (144 km<sup>2</sup> on left bank). The sewage collecting system comprises 950 km of pipes, 250 km of them being man-entry sewer (pipe diameter  $\geq$  1.2 m). As Nancy is established in a hill basin with hills dominating the Meurthe valley by about 200 m, the slope of the gravity sewer pipe may reach 5%. The average flow velocity is 0.4 m/s and the flow is turbulent ( $Re = 4 \times 10^5$ ). The central core of Nancy urban community is served by a combined sewer, whereas the peripheral areas are drained by separate systems. Three sewer sections, each with 5 sampling sites from upstream to downstream of the sewer network, were selected because they represent the various land uses in the urban community (residential, commercial, industrial, high school, and hospital). Details of sampling and site characteristics have been reported in a previous work (Houhou et al., b, accepted). On a general basis, the upstream sampling sites only receive domestic wastewater from a separated sewer, the following sampling sites are impacted either by hospital or industrial wastewaters, whereas the downstream sampling sites mainly convey sewage from high density residential areas and small businesses through a combined sewer.

### ***2. Sample collection and preparation***

Eight sampling campaigns were conducted in dry weather conditions between November 2004 and October 2006. Grab-samples of sewage and biofilms were collected from

the sewer. Sewage characteristics such as temperature, pH, conductivity, dissolved oxygen concentration, redox potential and turbidity were measured immediately upon sampling. Part of the sewage was filtered on site through a pre-washed 0.22 µm pore size cellulose-acetate membrane (Chromafil® CA-20/25), and the filtrate was stored at 4°C in 65 mL glass bottles until dissolved organic carbon (DOC) analysis using a Dohrman 190 analyzer. 100 mL of wastewater were stored in a sterile bottle at 4°C to enumerate the number of total bacteria. About 1 L of sewage was taken to measure the SM size distributions. Five biofilm samples were collected from different manholes by gentle scraping of collector inner walls, splitted into two aliquots in hermetic tubes and stored at 4°C for microscope investigations. As such on-site sample preparation usually exceeded the mean transit time of sewage between two consecutive sampling sites (Houhou et al., b, accepted), it was not possible to follow the evolution of the same body of sewage within the sewer network. Two 24h campaigns were then undertaken to investigate the variations in wastewater characteristics at a given sampling site as a function of time.

About 20 L of sewage were brought back to the laboratory in polyethylene jerrycans, and processed within four hours of sampling. After gentle end-over-end mixing of the jerrycans, 20 mL of sewage corresponding to biofilm sampling points were taken and allowed to settle in a test tube for 2 h, settleable fractions were then aliquoted in close hermetic tubes and stored at 4°C for microscope observations. Total Suspended Solid (TSS) mass was determined by drying sediment of centrifuged sewage (4000 RPM / 1613 g) at 105°C for 12 hours, and Volatile Matter (VM) mass was obtained by further heating the same samples at 550°C for 4 hours. All samples were analyzed in triplicate.

### ***3. Total bacteria enumeration***

Total bacteria were enumerated in 35 wastewater samples using the most probable number (MNP) technique. The Luria bertani (LB, Sigma®) medium sterilized by autoclaving at 120°C during 20 min was used as growth medium. A 10-fold serial dilutions in sterile NaCl 8‰ were applied to 10 mL aliquots taken from wastewater. 25 µL aliquots of each dilution were then inoculated in 200 µL of culture medium which were introduced in sterile microplaques wells. The number of replicates was 40 for each dilution. After inoculation, MNP microplaques were incubated at 24°C during 48 hours. After incubation, the optical density of inoculated wells was measured at 620 nm (BioTek Instrument Inc.) and the MNP

was determined using the software Most Probable Number Calculator Version 4.04-United States EPA.

#### **4. Suspended matter size measurements**

SM size measurements were carried out immediately after the return to the laboratory using a Malvern MasterSizer particle size analyzer with a 1.2-600  $\mu\text{m}$  particle size detection range. To avoid multiple scattering in the measurement cell, SM was diluted with the supernatant of centrifuged wastewater (15000g for 30 min, Sorvall<sup>®</sup> Evolution RC) to yield suspended solid concentrations varying from 1 to 9 mg/L. The dilution was obtained in a standard 1 L baffled reactor (90 mm in diameter, 150 mm high), and the suspension was stirred with a 15 mm  $\times$  54 mm blade positioned at 1/3 of the height of the reactor. An adjustable-speed motor (Janke & Kundel RW 20 DZM) was used to provide stirring rates of 100 rpm, with corresponds to spatially averaged velocity gradient  $G$  of  $135 \text{ s}^{-1}$  (Chaignon et al., 2002).

The agitated suspension was continuously withdrawn from the bottom of the reactor, and passed through the analyzer beam with a peristaltic pump located downstream the measurement cell, before being recycled to the reactor. A pumping flow rate of 35 mL/min, and a plastic tubing of 4.6 mm internal diameter, were selected. Size measurements were averaged over 1 s and taken every 2 s to allow a complete renewal of matter present in laser beam. Results obtained are given in percentage of particle volume versus floc diameter ( $\mu\text{m}$ ).

#### **5. Suspended matter and biofilm structure investigations**

The geometrical structures of bacterial biofilms and SM were characterized using a CLSM and TEM.

Confocal microscopy is a non destructive method, allowing *in situ* three-dimensional observation of hydrated samples at microscale. It allows the examination of the complex interior-structure of stained samples with digital two-dimension image acquisitions in z-axis (optical sections), with a high resolution. Before observations, samples were stained with an Acridine-Orange buffered solution (Sigma-Aldrich, 22  $\mu\text{M}$  AO, 5 mM EDTA, 0.15 M NaCl, 0.1 M phosphate-citrate buffer [pH 6]). Acridine-Orange dye stains nucleic acid of bacteria and the extracellular polymeric substances (EPS) (Wirtanen et al., 2001; Jana-Sur and Chakraborty, 2005). Sample aliquots were stained with 30  $\mu\text{L}$  of Acridine-Orange during

20 min at room temperature in the dark, and then washed 3 times with ultra pure water for 18.2 mΩ (MilliQ-plus) to remove dye excess. The samples were then placed onto microscopic slides having a dished spherical depression to avoid sample crushes and structural alterations. Microscopic slides were then covered with a cover slides.

Optical sections stacks were collected using an inverted light microscope (NIKON TE 2000 U) equipped with a confocal head (Radiance 2100 Rainbow, Biorad). Objectives with magnification  $\times 4$ ,  $\times 20$ ,  $\times 40$  and  $\times 60$  were used to explore samples at different scales. The 488 nm and 457 nm lines of a 4 lines argon ion laser were used as excitation light to locate and map stained bacteria and bio-polymers, respectively. Fluorescence was split into several channels each with its own bandwidth. Fluorescence signal of stained bacteria (excitation: 488 nm) was recorded in the frequencies range of 530-560 nm, while EPS (excitation: 457 nm) was detected over 600 nm. Optical sections stack ( $512 \times 512$  pixel<sup>2</sup>) were carried out using LaserSharp2000<sup>TM</sup> software (Bio-Rad Cell Science Division). To reduce bleed-through, the line by line excitation mode (Lambda-Strobing) was used for optical sectioning. Detailed CLSM observation protocol and image restoration process (haze and blur remove) were mentioned in a previous work (Houhou et al., c, in preparation).

Furthermore, MacBiophotonics ImageJ software (NIH, Bethesda, Maryland, USA) was used to calculate the areal porosity, the average porosity and the coverage rate (%) of SM and bacterial biofilm. Optical sections were thresholded and transformed to binary images before structural parameter determinations (Houhou et al., c, in preparation). Areal porosity along optical sections was calculated as the ratio of combined area of the voids to the total area of the image for each section. The depth profiles of areal porosity are directly related to the sample porosity which was determined as the average areal porosity across the sample. In addition, coverage rate of sample to the CLSM field view was determined after z projection of all optical sections, as the ratio of full pixels to the total area of field view.

Bacterial biofilm and SM structures were also characterized at the nanoscale using a Philips CM20 TEM. Microscopic observations were carried out on resin ultrathin sections embedded samples. Samples were first chemically fixed in 2.5% glutaraldehyde (v/v) for 4 h, and then in 2% osmium tetroxide (v/v) for 2 h. Both reagents were diluted in ultra-pure water (18.2 mΩ). Excess fixative was removed by washing in ultra-pure water between each stabilization step. Samples were then subsequently dehydrated in a graded series of acetone

solutions (5 min at 10, 20, 40, and 60%, 15 min at 80%, 2 × 15 min at 90%, and 3 × 20 min at 100% acetone) (Lartiges et al., 2001). Acetone was then exchanged with graded series of epoxy resin monomers (Kit Embed-812, Euromedex) (1/3, 2/3, and 3/3) for 12 h under vacuum, and the resin-impregnated samples were polymerized in molds at 60°C for 12 h.

An ultramicrotome (Reichert OM U2, diamond knife) was used to slice the embedded samples into ultrathin sections (100 nm) which were placed on copper grids (EuroMEDEX, Mesh200-Car#CF200CU). The thin sections were stained with uranyl acetate and lead citrate (Reynolds et al., 1963) to enhance the resolution of natural organic matter (Lartiges et al., 2001). They were then observed with TEM with an acceleration voltage of 80 kV.

## **RESULTS AND DISCUSSION**

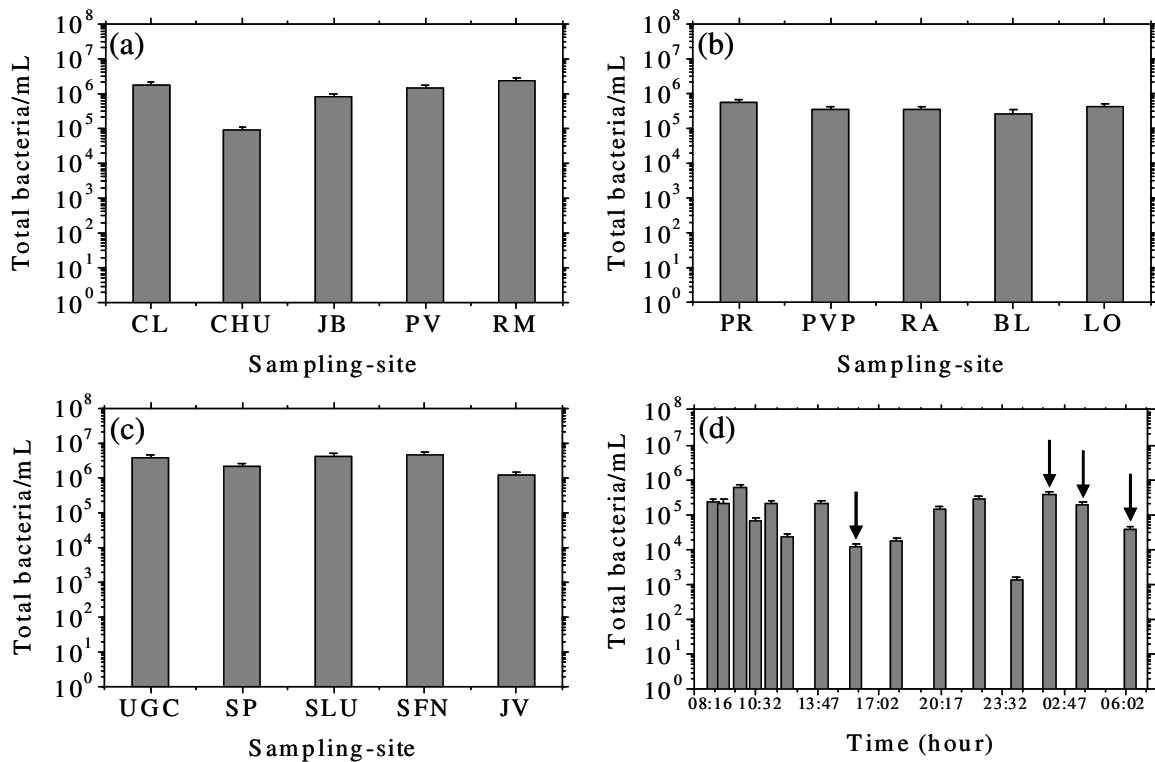
### ***1. Enumeration of total bacteria***

Total bacteria in sewage were enumerated using the MPN method. Figure 1 illustrates the evolution of the total bacterial number along the three sewer sections investigated (Fig. 1a, 1b and 1c) and for one diurnal cycle (Fig. 1d). Interestingly, no significant evolution of microbial cell number was found between upstream and downstream in all sewers studied. It may be due to the absence of limiting factor of bacterial growth within wastewater. Thus, several studies showed that the food/microorganisms ratio is relatively high in wastewater and the load of both OM and DOC does not influence the growth of bacteria (Warith et al., 1998; Marjaka et al., 2003; Tanji et al., 2006).

The total number of bacteria along the sewers ranges between  $10^5$  and  $10^7$  bacteria/mL, with a lower value at the CHU sampling site (hospital area). It may be attributed to bacterial lyses by the antibiotic added in the sewer system from the hospital. Total bacterial number obtained agrees with literature values. Thus, Sayed (2007) (Netherlands) and Wand (2007) (Langenreichenbach-Germany) found that the number of total bacteria in domestic wastewater was  $5.6 \times 10^6$  unit/mL and  $2.8 \pm 1.8 \times 10^7$  bacteria/mL, respectively.

In addition, monitoring of total bacteria for one diurnal cycle (Fig. 1d) showed a weak evolution. Total bacterial number was  $2 \times 10^5$  bacteria/mL at 08h16. It decreases to reach  $2 \times 10^4$  bacteria/mL at midday. Thus, total bacterial number increases to reach the initial value

at 14h00. After that, it decreases to reach  $1.6 \times 10^4$  bacteria/mL at 18h00. In the evening, the total bacterial number increases to reach  $2.7 \times 10^5$  bacteria/mL at 22h00, and then decrease to reach the lesser value of  $1.3 \times 10^3$  bacteria/mL at 00h20. Increasing of total bacterial number after midday and in the evening may correspond to the increase of faecal matter load in sewer after lunch and dinner, respectively. Thus, Wand (2007) found that the average number of *Coliforms* bacteria in domestic wastewater was  $1.4 \pm 0.9 \times 10^6$  bacteria/mL. Afterwards, the increase of total bacterial number after midnight corresponds to the discharge of storm water from retention basin located upstream of sampling site (Houhou et al., d, in preparation).

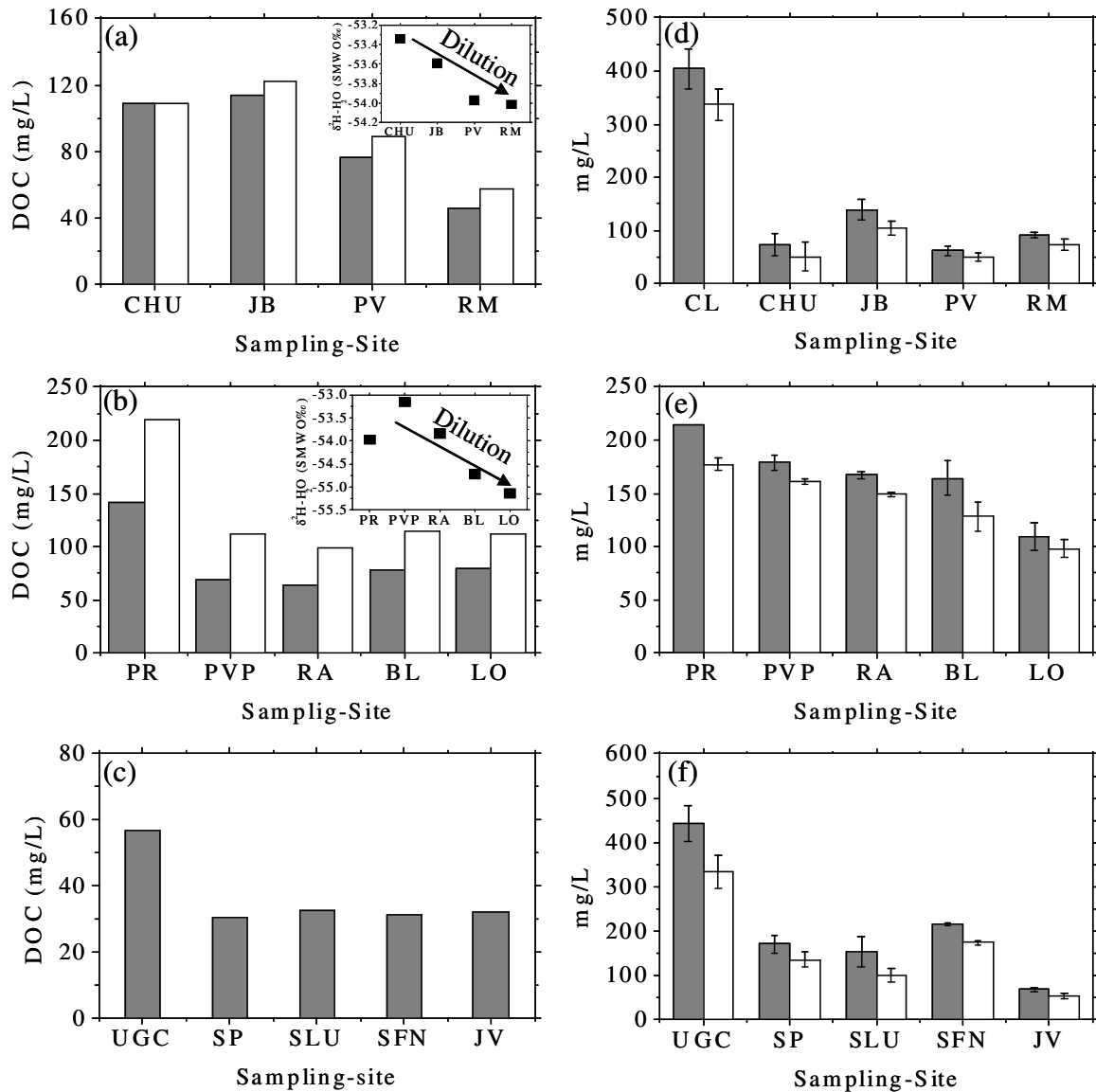


**Figure 1.** (a, b and c) evolution of bacterial number along the sewer in the studied section 1, 2 and 3 respectively. (d) evolution of bacterial number during a diurnal cycle. Black arrows indicate the release of stormwater

## 2. Spatial evolution of suspended and organic matter

Figure 2 illustrates the spatial evolution of DOC (Fig. 2a, 2b and 2c), TSS and VM (Fig. 2d, 2e and 2f) from upstream to downstream in the three studied sewer sections. Measured values showed that DOC concentration (gray column) was higher in the upstream of sewer and lower in the downstream, with a single clear decrease along sewer in the section 1 (Fig. 2a). Several studies have revealed a decrease in DOC concentration along sewer. In

sanitary gravity sewer, Chen (2001) indicated that the removal of DOC is function of retention time (14% removed after 18 min of retention) and showed that the specific DOC removal rate by suspended biomass and sewer sediment was 0.6 mg DOC/mg SM/day and 2.6 DOC/mg dry sediment/day, respectively. Thus, Raunkjær (1995) and Warith (1998) evoked the uptake of DOC by bacterial biofilms, resulting in attached biomass growth. Afterwards, our results indicate that  $32 \pm 14\%$  of total OM were in the dissolved phases.



**Figure 2.** (a, b and c) evolution of dissolved organic carbon (DOC) along the sewer in the studied section 1, 2 and 3 respectively. Insets in Fig. a and b show the evolution of  $\delta^2\text{H-H}_2\text{O}$  and the dilution of wastewater along the sewer by groundwater infiltration (Houhou et al., d, in preparation). Gray column: measured DOC, white column: corrected DOC by dilution factors. (d, e and f) evolution of total suspended solid (TSS: gray column) and volatile matter (VM: white column) along sewer.



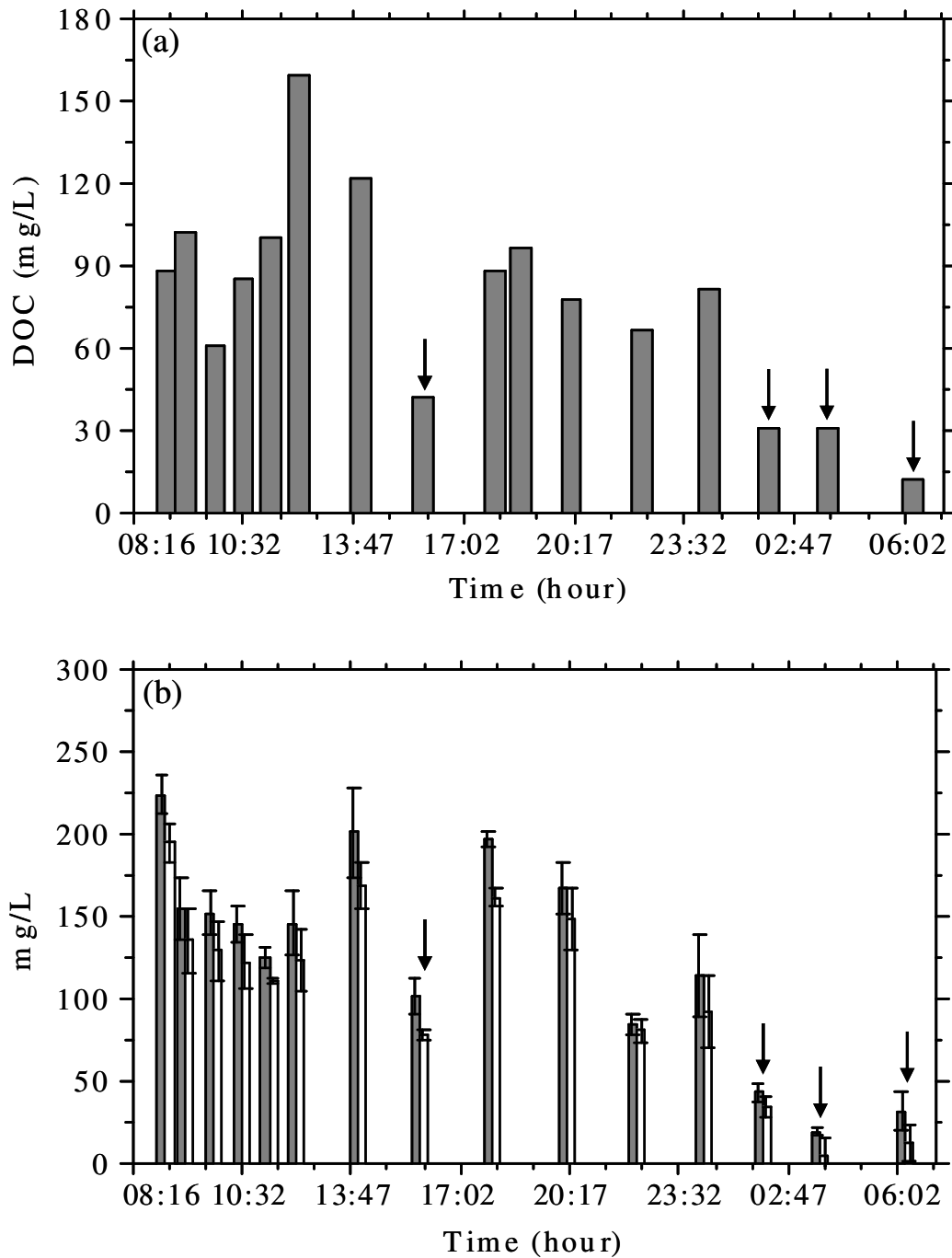
In our case, in a previous study, we have reported the identification and the quantification of water sources in sewer using signature of water stable isotopes ( $\delta^{18}\text{O}$  and  $\delta\text{D}$ ). We thus evidenced infiltration of clear water (shallow aquifer) and percolation of rainwater within the sewer system (Houhou et al., d, in preparation). Thus, the infiltration of unpolluted water may decrease the concentration of DOC along sewer. Impoverishment of stable isotopes in wastewater (inset Fig. 2a and 2b) appears clearly along sewer and gives a dilution factor between each point (Houhou et al., d, in preparation). Thus, dilution factors may be used to correct the measured concentration of DOC (Fig. 2a and 2b) white column). In some cases, when sewer system is not impervious, the decrease of DOC along sewer may be due only to a dilution by clear water, and not to a biophysicochemical process.

Furthermore, TSS and VM concentrations were higher in the upstream. While, they are lesser in the downstream. In all sampling sites, VM presents  $80 \pm 9\%$  of TSS, in agreement with Michelbach (1995) evoking that most of the solids in dry weather have a high content in OM. The decrease of TSS and VM along sewer appears clearly only in the second portion (Fig. 2d). On one hand, it may be due to the degradation of particulate OM along sewer. While, Raunkjær (1995) found no net removal of wastewater particulate OM along sewer and an increase of suspended biomass, in agreement with Nielsen (1992). On the other hand, the decrease in TSS and VM concentrations may be due to the sampling protocol. In fact, grab-samples were taken from the wastewater system. SM may settle along sewer thus yielding a decrease in TSS and VM concentrations. Thus, Michelbach (1995) indicated that, in dry weather at low flow (14 L/s) velocity, organic solids will settle giving muddy sediments, and found at a laboratory-scale that more than 80% of suspended particles had a settling velocity higher than 0.28 cm/s.

### ***3. Temporal evolution of suspended and organic matter***

Figure 3 illustrates the temporal evolution of DOC (Fig. 3a), TSS and VM (Fig. 3b) in wastewater for one diurnal cycle. DOC concentration increases from morning to midday to reach 160 mg/L, contrary to TSS and VM. After 14h00, DOC concentration decreases to reach 12 mg/L at 06h20. TSS and VM had the same trend than DOC. Lower concentrations of DOC, TSS and VM were measured at 15h50 and after midnight. These weak values were due to the discharge of storm water in the sewer system (Houhou et al., d, in preparation) from

retention basin, as mentioned above. SM in stored rainwater was allowed to settle leading to the decrease in TSS and VM concentrations.



**Figure 3.** Temporal evolution of dissolved organic carbon (DOC) (a) total suspended solid (TSS: column gray) (b) and volatile matter (VM: while column) (b) for one diurnal cycle. Black arrows indicate the release of stormwater.

#### **4. Suspended matter size distribution**

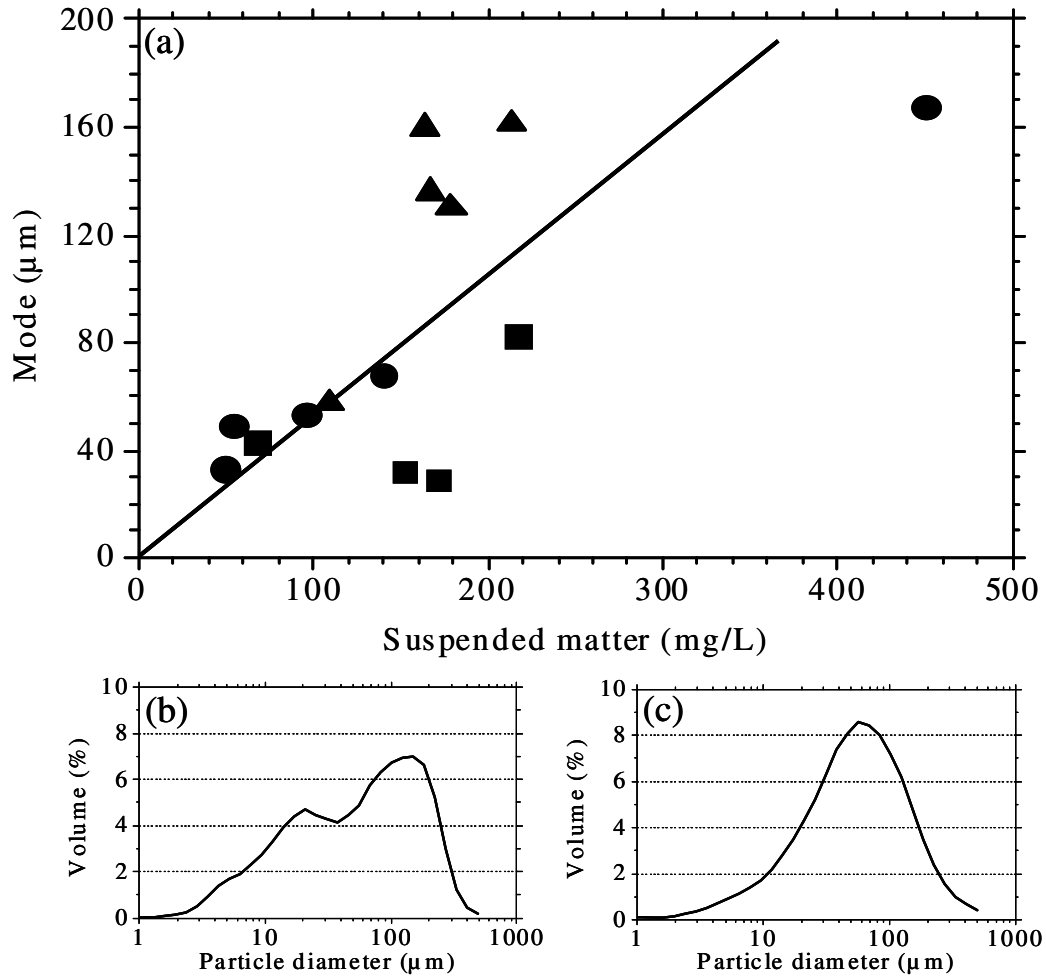
SM sizes along the three sewer portions were measured using Malvern MasterSizer particle size analyzer. Table 1 shows the mode of particle size distribution measured at each sampling site. The values range between 29 and 167  $\mu\text{m}$ . The average values obtained at each sewer portion were  $47 \pm 27$ ,  $74 \pm 53$ , and  $129 \pm 42$   $\mu\text{m}$ . Similarly size distribution ranges were found by Guan (2005) (48-200  $\mu\text{m}$ ) and Fugate (30-300  $\mu\text{m}$ ) (2006), studying the effect of alum sludge to remove SM from raw sewage in the inlet of a primary sedimentation tank in wastewater treatment plant (China) and the fate and the transport of material in combined sewer overflow (NY, USA), respectively.

**Table 1.** *Size of larger particle at each sampling-site along the three sewer sections.*

Sampling site	Mode ( $\mu\text{m}$ )	Sampling site	Mode ( $\mu\text{m}$ )	Sampling site	Mode ( $\mu\text{m}$ )
CL	167	PR	161	UGC	-
CHU	33	PVP	130	SP	29
JB	68	RA	136	SLU	32
PV	54	BL	160	SFN	82
RM	49	LO	57	JV	43

Plotting the size of larger particles (Mode), encountered at each sampling site versus corresponding TSS amount (mg/L) for the three sewer portions (Fig. 4a), showed that their size increases with the TSS amount.

The size distribution of SM evolves along the sewer system. Figures 4b and 4c show typical size distributions of SM. Upstream (Fig. 4b), the volume size distribution is multimodal and suspended particles present different size ranges (3-6, 20-30, and 130-160  $\mu\text{m}$ ), corresponding to different kinds of discharged matters in the upstream of sewer. These matters have a high content of organic mass such as toilet paper, excrement, pieces of vegetables (Michelbach, 1995), and may have different decomposition degrees. Bimodal volume size distributions are then found (30-50 and 100-140  $\mu\text{m}$ ). Downstream, the volume size distribution becomes monomodal (40-60  $\mu\text{m}$ ), and shows a slight skewness towards smaller particle sizes (Fig. 4c). Thus, SM size distribution evolves along the sewer to give smaller aggregates. This evolution may be due to the physical disaggregation, chemical and bacterial decomposition of SM during transport, and to the sedimentation of larger particles yielding smaller homogeneous suspended particles in the remaining sewage.



**Figure 4.** (a) Relationship between larger particle sizes (mode  $\mu\text{m}$ ) and the concentration in suspended matter for samples collected at sewer section 1 (●) (30 November 2004), sewer section 2 (■) (08 March 2005) and sewer section 3 (▲) (27 July 2006). (b and c) Examples of floc size distribution of suspended matter in upstream (b) and downstream (c) of sewer system.

SM was mainly composed of OM (around 80%) as shown above. This particulate OM is mainly composed of cellulose fibers originated from toilet paper. Referring to a quantification of toilet paper amount used by capita (86.8 sheets/capita/week) in London (Friedler et al., 1996), a city like Nancy evacuates 3.6 t/day of toilet paper in sewer network. Based on the available literature, there is no clear degradation of cellulose fibers in sewage. Nielsen (1992) showed that under aerobic and anaerobic conditions, the removal rate of particulate carbohydrate is negligible during the 20 hours of study, and the removal of dissolved cellulose is slowly degradable. Thus, implication of bacterial and chemical mechanisms into the SM size distribution is arguable.

## **5. Microscopy speciation of suspended matter**

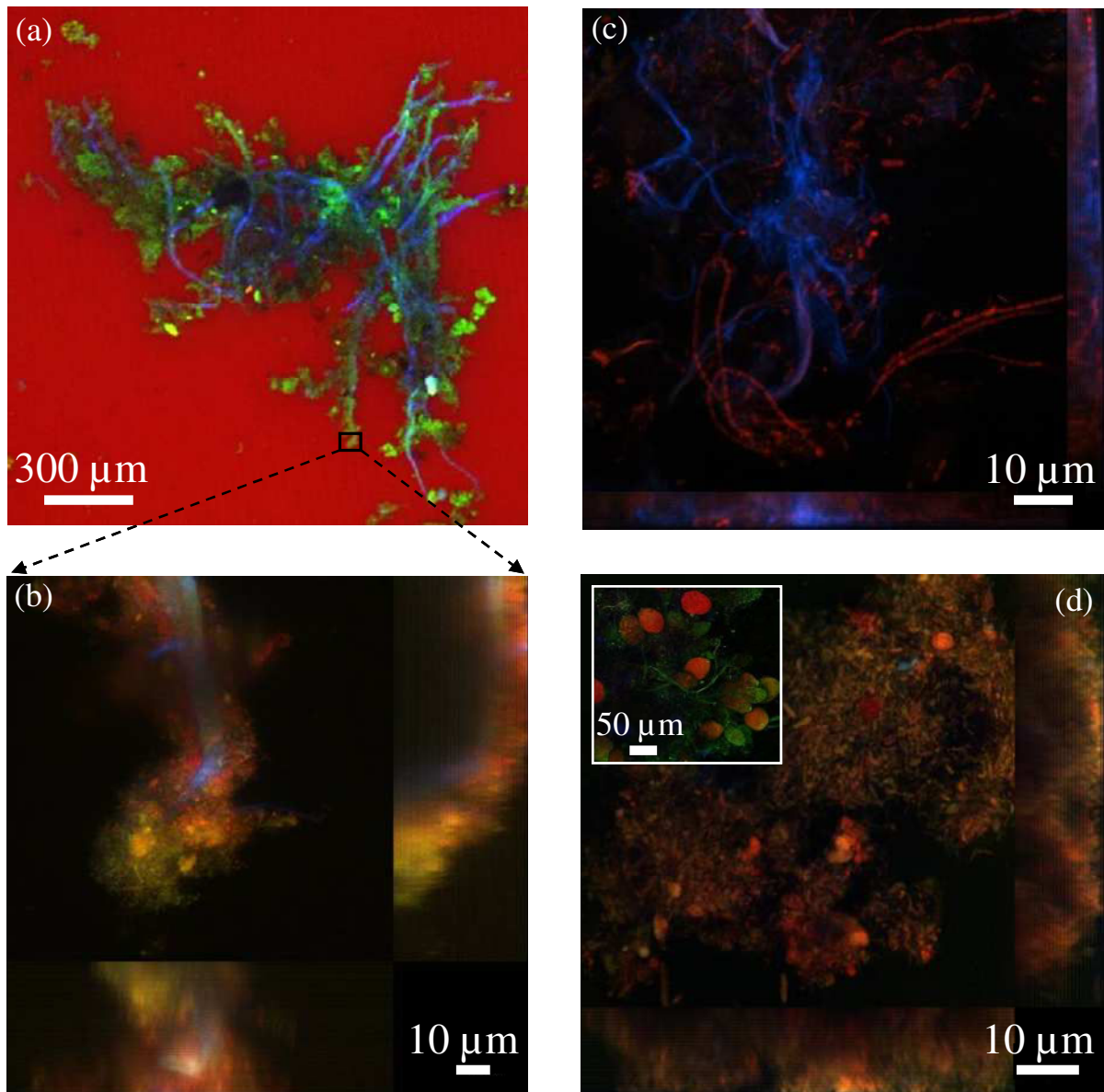
The architectures of three suspended matter from downstream were explored at micrometer and nanometer scales using CLSM and TEM.

The structure of 9 aggregates was characterized by CLSM. Figure 5a is a 2D image of a SM floc (objective  $\times 4$ , zoom 1.5). While, figures 5b (objective  $\times 60$ , zoom 1.7), 5c and 5d (objective  $\times 60$ , zoom 3) are projections along z-axis (central image), y-axis (bottom image), and x-axis (right image) of stack optical sections recorded by the confocal microscope. Fluorescences recorded from EPS and bacteria were combined together before projection. The red colour corresponds to the EPS and the green one represents bacterial cells. Consequently, yellow indicates co-localization between microbial cells and EPS.

Figure 5a shows a typical 2D observation of SM. This later is composed with elongated fibers (in blue) with a diameter range between 10  $\mu\text{m}$  and 20  $\mu\text{m}$ , forming a skeleton-like structure in which bacterial clusters (in green) were aggregated. Cluster diameters range from 20  $\mu\text{m}$  to 250  $\mu\text{m}$ . Observation of disaggregated toilet paper using optical microscope, showed fibers (10-25  $\mu\text{m}$  in diameter) similar to those found in SM. Thus, fibers in SM correspond to cellulose fibers from toilet paper. Furthermore, figure 5b shows a detailed characterization of a cluster from figure 5a. This cluster is composed by bacterial cells (green), embedded in an EPS matrix (red), forming a biomass using cellulose fiber as substratum.

Some SM contains filamentous bacteria (Fig. 5c) which had a rod shape of 1.5-2  $\mu\text{m}$  diameter and 2-4  $\mu\text{m}$  length. This result agrees with Cao and Alaerts (1995), they showed that suspended biomass in a synthetic wastewater is dominated by filamentous bacteria (*sphaerotilus natans*). Structure quantification of SM (Fig. 5c) gives a coverage surface of 45% and a SM porosity of 0.8.

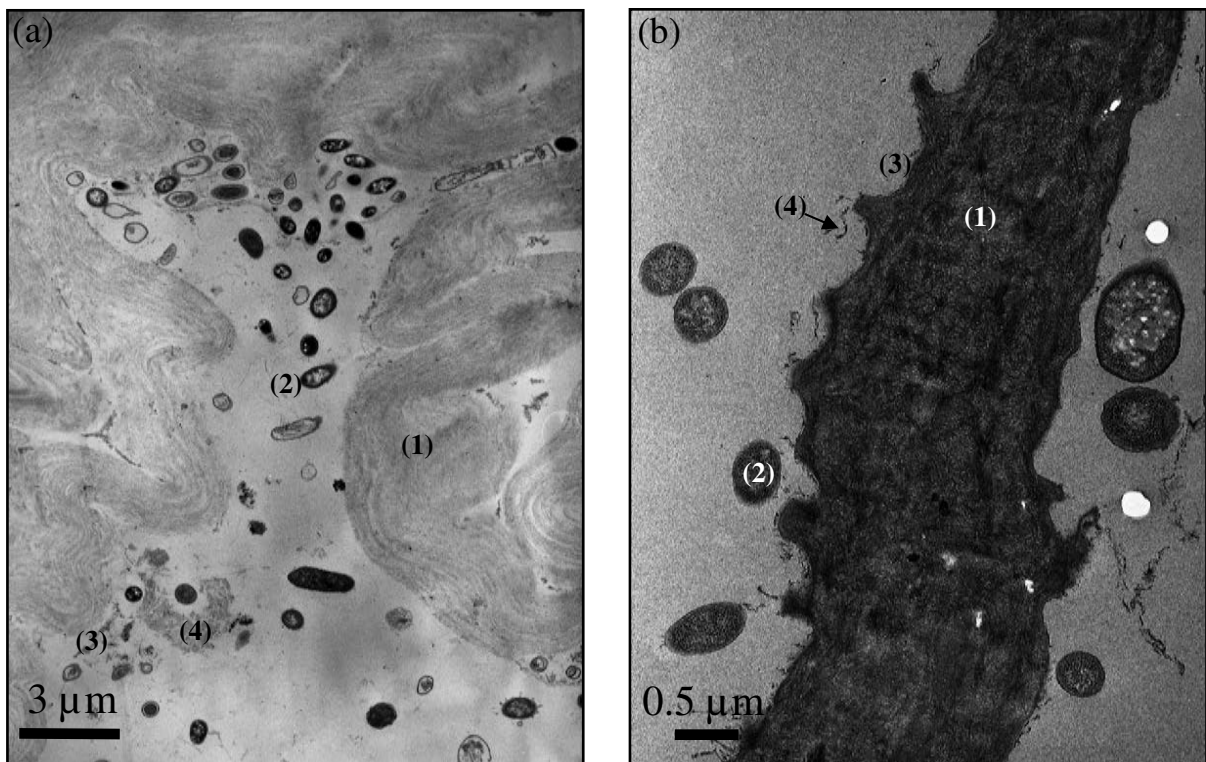
Figure 5d shows a SM aggregate with a completely different structure compared to those observed. It appears more compact than that illustrated in figure 5c, with a surface coverage of 78% and a SM porosity of 0.5. Moreover, this SM contains fungi within their structure (inset Fig. 5d), thus suggesting a detachment from bacterial biofilm, in agreement with Rocher (2003) which found that biofilm in the “Le Marais” study site contains fungi. Thus, detachment of biofilm may contribute to the load of SM in wastewater.



**Figure 5.** (a) 2D optical image of a suspended matter floc (objective  $\times 4$ , zoom 1.5). (b) detailed investigation of a zone from figure a. xy, xz and yz projections of CLSM stack optical sections (objective  $\times 60$ , zoom 1.7). Blue: cellulose fiber, green: bacteria and red: extracellular polymeric substances (EPS). (c) xy, xz and yz projections of CLSM stack optical sections (objective  $\times 60$ , zoom 3), showing cellulose fibers (blue) surrounded by filamentous bacteria (red). (d) xy, xz and yz projections of CLSM stack optical sections (objective  $\times 60$ , zoom 3). Detached and suspended fragment from bacterial biofilm contains bacteria, EPS and fungi (inset Fig. d).

Structural characterizations of resin-embedded SM by TEM (25 observations) confirm and complete CLSM investigations. Figure 6 illustrates a typical example of obtained micrographs. At the micron scale, SM mainly contains cellulose fibers and microbial biomass

(Fig. 6a). The cellulose matrix trapped dead and live bacteria, cell lyses material and detritus organo-mineral particles. Some inorganic matter was also encountered such as clays and phosphate phases as already indicated by Houhou (b, accepted). Detailed observations at nanometric scale showed an interaction between microorganisms and cellulose fibers (Fig. 6b). Bacteria degrade cellulose and detritus resulting from the biodegradation are spread in the bacteria/cellulose interaction zones. Thus, in addition to their role as skeleton, cellulose fibers can be used as carbon source with adherent bacterial cells to ensure their growth. Still to know if this degradation can give a sufficient removal rate of suspended OM within the sewer.



**Figure 6.** TEM micrographs of thin stained sections of resin-embedded suspended matter. (a) Non-altered cellulose fibers (1), bacterial cells (2), cell lyses material (3) and inorganic matter (4). (b) Biodegraded cellulose fiber (1), bacteria (2), bacteria/cellulose interaction zones (3) and biodegradation detritus (4).

## **6. Microscopy speciation of sewer biofilms**

TEM and CLSM observations of bacterial biofilms showed that, even if they have the same composition as SM (EPS, bacteria, cellulose fibers), they have a very different 3D architecture and structure.

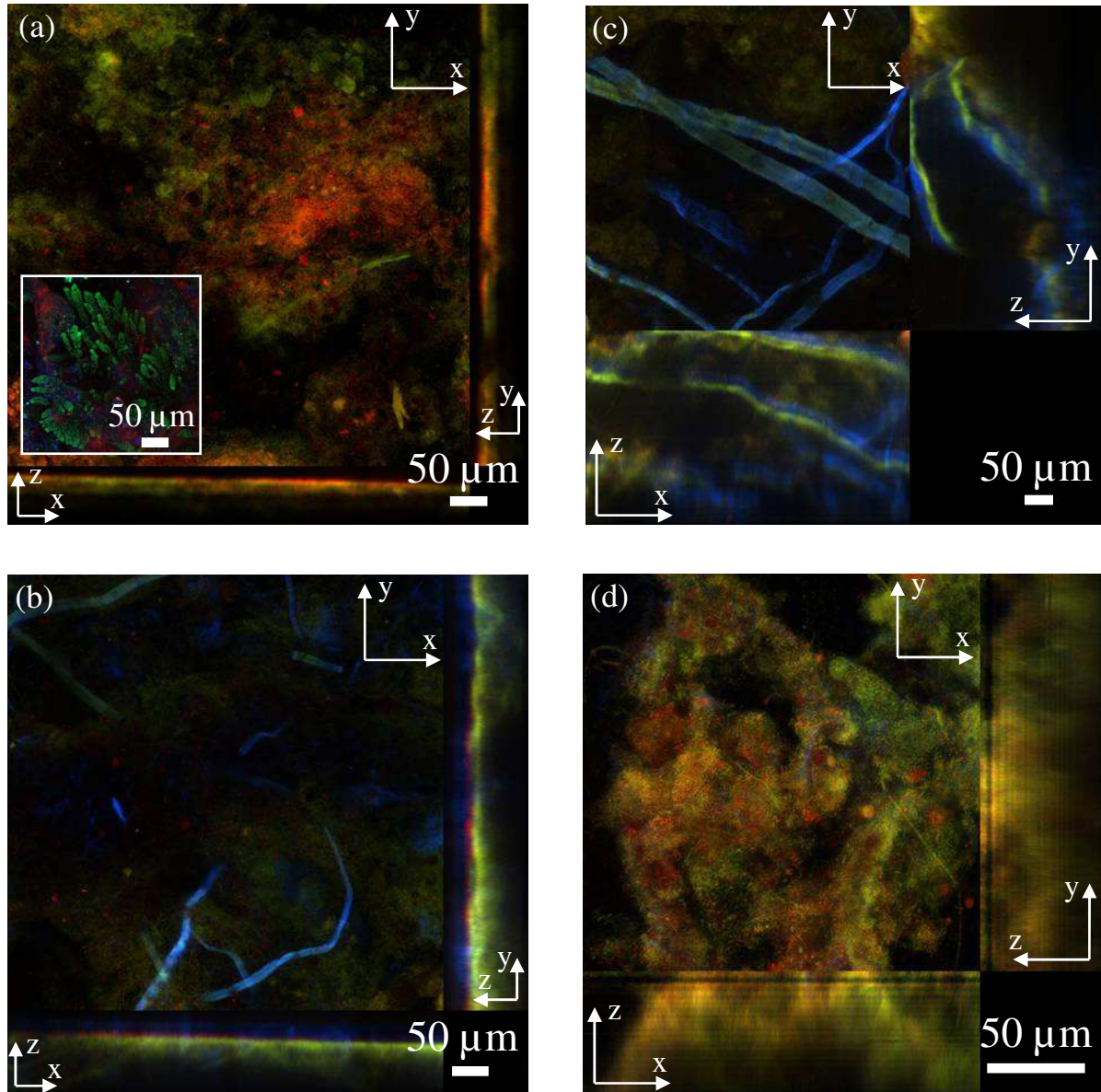
The structures of three bacterial biofilms were characterized by 12 CLSM observations. Figures 7a, 7b, 7c (objective  $\times 40$ , zoom 1) and 7d (objective  $\times 40$ , zoom 1.5) illustrate typical projections at z-axis (central image), y-axis (bottom image), and x-axis (right image) of stack optical sections. CLSM observations (Fig. 7a) showed that bacterial biofilms were composed mainly with a large amount of EPS matrix (in red) and enclosed bacterial cells (in green). Biofilms stained with a specific fluorochrome (Live/dead) which dyes especially bacteria (live in green/dead in red) (Hope et al., 2002), showed that biofilm surface was covered with filamentous cells (inset Fig. 7a). This result agrees with Cao (1995) founding that the surface of biofilm in channel reactor feed with synthetic wastewater was dominated by filamentous bacteria (*Sphaerotilus natans*), contrary to Rocher (2003) showing that sewer biofilm surface was covered with a monolayer of bacteria. Structure quantification of sewer biofilm gives a coverage surface of 92% and biofilm porosity of 0.55. Thus, biofilm was more compact and denser than suspended matter (coverage surface 45%, SM porosity 0.79).

In addition, a large amount of cellulose fibers was identified within the sewer biofilm. They were found to be deposited at the surface of biofilm (Fig. 7b) and may enter in its composition. Figure 7c (x and y projections) shows fibers in the depth of biofilm. Thus, fibers may contribute to the formation of biofilm. This result agrees with Rocher (2003), showing that matrix present between cell layer and trunk wall in biofilm sewer, was mainly composed of vegetal fibers and organic matter. Thus, we can suggest that cellulose fibers settle from sewage at the surface of biofilms, and are then embedded in the EPS matrix with biofilm growth

Detailed CLSM investigations (Fig. 7d) showed the presence of holes within the biofilm. They may correspond to water channels with an average width of  $30 \pm 15 \mu\text{m}$  at the top of biofilm which decreases with depth. These channels are involved in the nutrient and matter transfer within the biofilm. Massol-Deyá (1995) indicated the presence of a large number of vertical and horizontal water channels in a fluidized bed-reactor biofilm with a



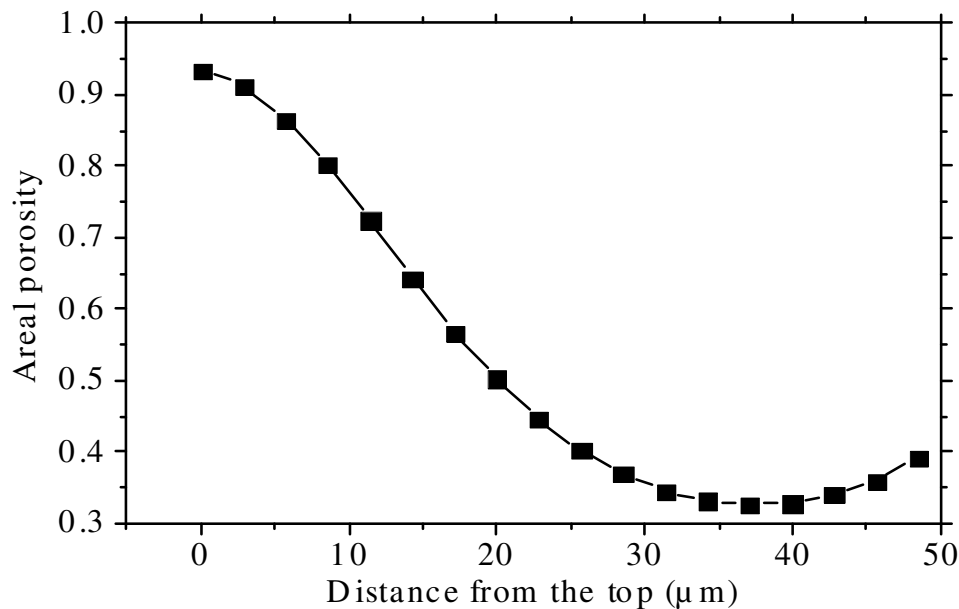
wide range between 2 and 25  $\mu\text{m}$  after 4 to 6 weeks of growth. They extend from the surface into at least one-half of the depth of biofilm. Open channels connect to the bulk liquid, and can enhance the rate of substrate diffusion by facilitating convection when the mass transfer boundary layer closely follows the irregular biofilm surface (De Beer et al., 1996).



**Figure 7.** Typical  $xy$ ,  $xz$  and  $yz$  projections of CLSM stack optical sections of bacterial biofilm stained with Acridine-Orange. Green: bacteria, red: EPS and blue: cellulose fibers. (a) Observation using objective  $\times 20$  and zoom 1. Biofilm surface covered by filamentous cells (inset Fig. a, biofilm stained by live/dead fluorochrome). (b) objective  $\times 20$ , zoom 1. Cellulose fibers deposit at biofilm surface. (c) objective  $\times 20$ , zoom 1. Cellulose fibers embedded in EPS matrix. (d) objective  $\times 40$ , zoom 1.5. Figure evidences the top of water channels.

Furthermore, figure 8 illustrates the depth profile of biofilm areal porosity. In the top, areal porosity is around 0.8, giving a patchy layer at the contact of wastewater. This layer corresponds to the exchange zone with bulk water. Thus, areal porosity decreases to reach 0.35, giving a denser biofilm with depth. Marjaka (2003) has found that bacterial biofilm was composed of four layers: the bulk water phase, the heterogeneous non-dense layer, the dense layer and the porous bed (substratum). Several factors may influence the structure of biofilm in sewer system such as  $Po_2$  and flow velocity. Studying the nitrification capacity of sewer system, *Æsøy* (1998) showed that biofilm grown under anoxic condition was brownish, fluffy, porous, uneven and contained gas bubbles. While, in septic condition biofilm was black, grainy, compact and thin. In addition, an increase in flow velocity from 0.002 m/s to 0.5 m/s gave a thinner and a denser biofilm.

The similar composition of SM and sewer biofilms suggests that there is an equilibrated exchange between these two compartments in sewer. SM may deposit at the surface of biofilms, thus contributing to the biofilm development. Whereas, under shear stress and at mature state, some part of biofilms may subsequently be detached and resuspended into wastewater.



**Figure 8.** Areal porosity profile from the top to the bottom of bacterial biofilm.

Afterwards, a total of 45 TEM micrographs were carried out on five resin-embedded biofilm. Figure 9a illustrates a typical micrometer scale observation. Bacterial cells distribution was heterogeneous, with the presence of much denser bacterial zone in the left of micrograph. Some bacteria had an elongated shape, with 1-3.5  $\mu\text{m}$  of length and 0.5-1.5 of diameter. Circular shape bacteria were also observed, but they may correspond to a vertical slice of elongated bacteria. Several microorganisms with division septum were evidenced, showing the presence of bacterial cells in division phase, and the contribution of cell division to the biofilm growth. This result agrees with Wanner and Gujer (1985), showing that bacterial cells grow within the biofilm and displace other biofilm components perpendicularly to the substratum. In addition, Chen (2003) showed that biofilm in gravity sewer contained a high ATP level and was very active.

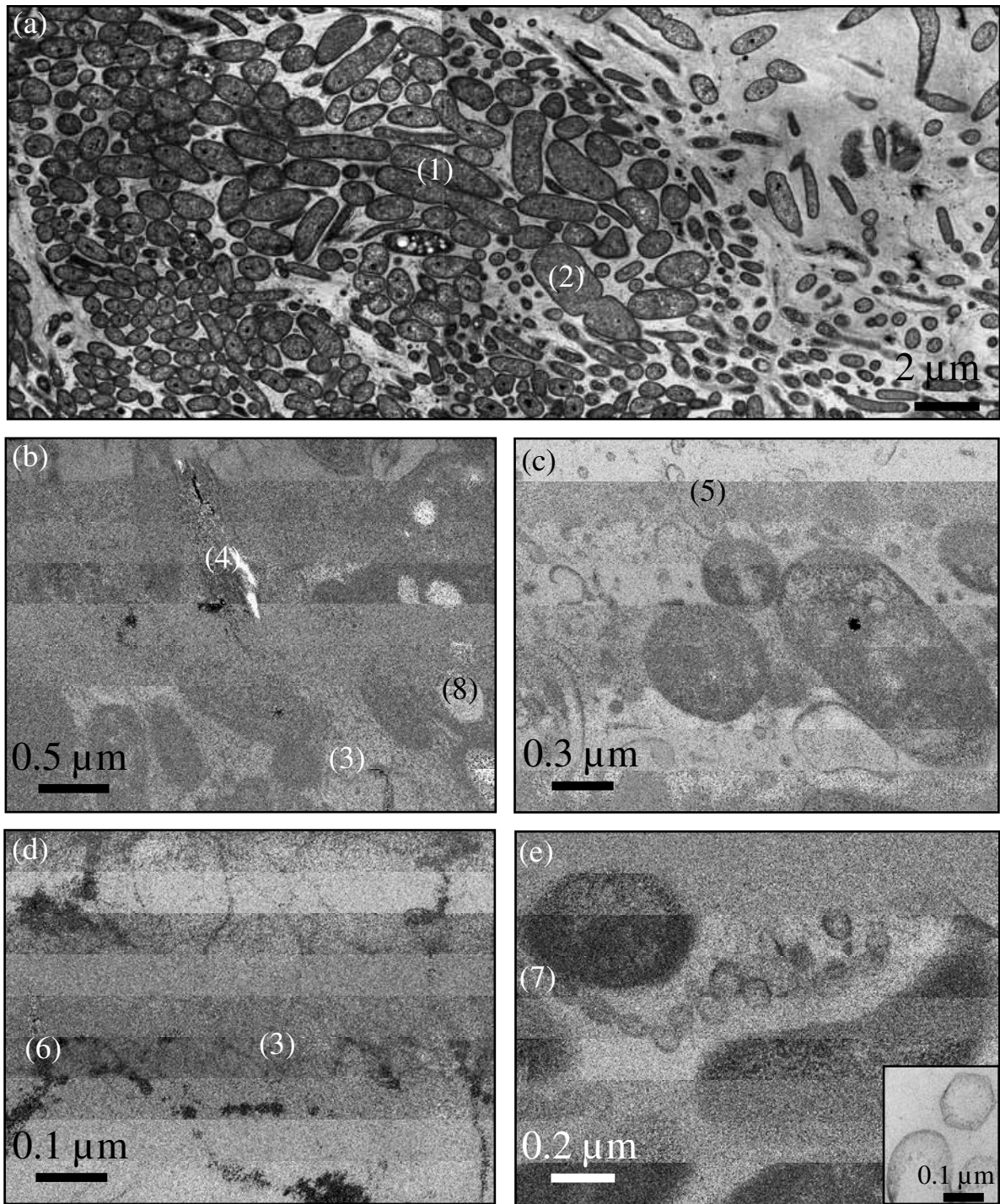
TEM observations at the nanometric scale (Fig. 9b) showed that the space between bacterial cells contained EPS matrix and some mineral particles (clays). Biofilm EPS matrix is defined as organic polymers originated from microbial excretion and composed of carbohydrates (65%), proteins, lipids and nucleic acids (Lazarova and Manem, 1995). EPS is considered as a key component responsible for the morphology, architecture, cell cohesiveness, biofilm activity and physicochemical properties of biofilm (Flemming and Wingender, 2001). Identification of mineral phases within biofilm agrees with Rocher (2003) and Houhou (a, in preparation), showing that sewer biofilm contained mineral fragments such as quartz, heavy metals, and sulfides. TEM investigations of bacterial cytoplasm indicate the presence of polyphosphate grains and ovoid white bubbles that may be lipid reserves (Fig. 9b).

Furthermore, EPS matrix was also found to contain microbial detritus (wall cell) spread between cells (Fig. 9c). These detritus may result from cell lyses within the biofilm. In fact, viruses were frequently evidenced entrapped within EPS network under chain shapes (Fig. 9d). They have an average size of 80 nm and diffuse between bacteria (Fig. 9e). Some of these viruses are bacteriophage-like (hexagonal capsid) and are able to infect and destroy bacterial cells (inset Fig. 9e).

Viruses observed in sewers biofilms contribute to the destruction of biofilm bacteria, leading to the presence of microbial detritus in biofilm matrix. Few studies have been carried out to examine the colocalisation of microorganisms and viruses in sewer biofilms. These later may be considered as a biological barrier to remove viruses from wastewater, approving

with Ueda (2000), studying the removal of *T-even-like* phage (mean size 200 nm, identified with TEM after staining with uranyl acetate) from settled sewage in a membrane bioreactor. He showed that phages removal rises up to 5.9 log when a biofilm accumulate on the surface of membrane, contrary to the membrane alone, and suggested that this removal may be due to the adsorption of phages to bacterial cells and EPS. Moreover, Skrabber (2005) showed that  $\phi$ X174, MS2 and B40-8, and poliovirus-1 phages (mean size 24-30 nm) are able to attach to artificial biofilm in a drinking-water distribution system (pilot-scale). Some phages possess polysaccharide-degrading enzymes, they can cause cells lysis and the biofilm may rapidly be destroyed (Sutherland et al., 2004).

Thus, bacterial biofilm may be considered as a micro-niche in which viruses are concentrated. In our case, sewer biofilm may concentrate viruses originated from human excretion such as *Levivirus* and *Allolevivirus* (Ogorzaly and Gantzer, 2006) and may be considered as a potential source of river pollution by pathogenic viruses, especially during combined sewer overflows.



**Figure 9.** Typical TEM micrographs of thin stained sections of resin-embedded bacterial biofilm. (a) micron scale showing a heterogeneous bacteria distribution (1) and presence of microorganisms in division phase (2). Nanometer scale: space between cells contains EPS (3), mineral particles (4), cell detritus (5) and chain viruses (6). (e) Viruses in contact with bacteria wall. Some of these viruses are hexagonal bacteriophages (inset Fig. e). Bacteria cytoplasm contains lipid reserves (8).

## CONCLUSION

This work enters in the endorsing idea considering sewer system as a biophysicochemical reactor in which transported wastewater may evolve and interact with deposits within collector. However, the determination of the total bacteria number in sewage showed no evolution along sewer due to a high food/microorganisms ratio in wastewater. Decrease of DOC concentration between upstream and downstream may be due to the oxidation of dissolved carbon during transport or their dilution by infiltration of unpolluted water (groundwater or rainwater percolation) throughout collector walls. Decrease of TSS, VM and particle size distribution along sewer originated mainly from the sedimentation of SM towards downstream, even if cellulose biodegradation by attached clusters was evidenced by TEM.

TEM and CLSM observations of SM and bacterial biofilms showed that, even if they have the same composition (EPS, bacteria, cellulose fibers), they have a very different 3D architecture and structure. SM is a really patchy biological aggregates (SM porosity 0.8) in which cellulose fibers are considered as skeleton to bacterial adhesion and cluster formations. In contrast, sewer biofilm structure appears more compact and denser (biofilm porosity 0.55) than SM, and cellulose fibers are embedded within biofilm EPS matrix. Nevertheless, microscopic observations suggest exchange dynamics between these two compartments. SM may deposit at the surface of biofilms and contribute to the biofilm development. Likewise, under shear stress and at mature state, some part of biofilms may be detached and resuspended into wastewater.

Furthermore TEM investigations of sewer biofilm showed that they entrap and concentrate viruses circulating in sewage and may be considered as a potential source of river pollution by pathogenic viruses, especially during combined sewer overflow.

**Acknowledgements:** This work was mainly funded through a CNRS-INSU (ECODYN) grant which is gratefully acknowledged. Region Lorraine also provided funding through Zone Atelier Moselle. We are grateful to M. Piqué and M. Villeroy (Service hydraulique CUGN) for technical assistance during all field studies.

## REFERENCES

- Æsøy, A., Storfjell, M., Mellgren, L., Helness, H., Thorvaldsen, G., Ødegaard, H., Bentzen, G. (1997) A comparison of biofilm growth and water quality changes in sewer with anoxic and anaerobic (septic) conditions. *Wat. Sci. Technol.* 36(1), 303-310
- Cao, Y.S., Alaerts, G.J. (1995) Aerobic biodegradation and microbial population of a synthetic wastewater in a channel with suspended and attached biomass. *Wat. Sci. Technol.* 31(7), 181-189.
- Chaignon, V., Lartiges, B.S., El Samrani, A.G., Mustin, C. (2002) Evolution of size distribution and transfer of mineral particles between flocs in activated sludges: an insight into floc exchange dynamics. *Water Res.* 36, 676-684.
- Chen, G.H., Leung, D.H.W., and Huang, J.C. (2001) Removal of dissolved organic carbon in sanitary gravity sewer. *J. Environ. Eng.* 127(4), 295-301.
- Chen, G.H., Leung, D.H.W., and Huang, J.C. (2003) Biofilm in the sediment phase of a sanitary gravity sewer. *Water Res.* 37, 2784-2788.
- De Beer, D., Stoodley, P., and Lewandowski, Z. (1996) Liquid flow and mass transport in heterogeneous biofilms. *Water Res.* 30(11), 2761-2765.
- El Samrani, A.G., Lartiges, B.S., Ghanbaja, J., Yvon, J., Kohler, A. (2004) Trace element carriers in combined sewer during dry and wet weather: an electron microscope investigation. *Water Res.* 38, 2063-2076.
- Flemming, H.C., Wingender, J. (2001) Relevance of microbial extracellular polymeric substances (EPSs) – Part I: structural and ecology aspects. *Wat. Sci. Technol.* 43(6), 1-8.
- Friedler, E., Brown, D.M., Butler, D. (1996) A study of WC derived sewer solids. *Wat. Sci. Technol.* 33(9), 17-24.
- Fugate, D., Chant, B. (2006) Aggregate settling velocity of combined sewage overflow. *Mar. Pollut. Bull.* 52(4), 427-432.
- Guan, X-Y., Chen, G-H., Shang, C. (2005) Re-use of water treatment works sludge to enhance particulate pollutant removal from sewage. *Water Res.* 39, 3433-3440.
- Hope, C.K., Clements, D., Wilson, M. (2002) Determining the spatial distribution of viable and nonviable bacteria in hydrated microcosm dental plaques by viability profiling. *J. Appl. Microbiol.* 93, 448-455.
- Houhou, J., Lartiges, B.S., Pelletier-Montarges, E., Ghanbaja, J., Kohler, A. (a, in preparation) Dynamics of heavy metals and trace element carriers in sewer system during dry weather.
- Houhou, J., Lartiges, B.S., Hofmann, A., Frappier, G., Ghanbaja, J., Temgoua, A. (b, accepted) Phosphate dynamics in an urban sewer: a case study of Nancy, France. *Water Res.*

Houhou, J., Mustin, C., Lartiges, B.S., Skali-Lami, S., Caumon, G., Levitz, P. (c, in preparation). Investigation of biofilm growth in a Couette-Poiseuille reactor: new tools confocal laser scanning microscopy observation.

Houhou, J., Lartiges, B.S., France-Lanord, C., Guilmette, C., Poix, S., Mustin, C. (d, in preparation) Isotopic tracing of water sources in an urban sewer: a multiple D,  $^{18}\text{O}_{\text{H}_2\text{O}}$ ,  $^{34}\text{S}$ ,  $^{18}\text{O}_{\text{SO}_4}$  stable isotope approach.

Hvitved-Jacobsen, T., Vollertsen, J., Matos, J.S. (2002) The sewer as a bioreactor – A dry weather approach. *Wat. Sci. Technol.* 45(3), 11-24.

Huisman, J.L., Gasser, T., Gienal, C., Kühni, M., Krebs, P., Gujer, W. (2004) Quantification of oxygen fluxes in a long gravity sewer. *Water Res.* 38, 1237-1247.

Jahn, A., Nielsen, P.H. (1998) Cell biomass and exopolymer composition in sewer biofilm. *Wat. Sci. Technol.* 37(1), 17-24.

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

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

Lazarova, V., Manem, J. (1995) Biofilm characterization and activity analysis in water and wastewater treatment. *Water Res.* 29, 2227-2245.

Marjaka, I.W., Miyanaga, K., Hori, K., Tanji, Y., Unno, H. (2003) Augmentation of self-purification capacity of sewer pipe by immobilizing microbes in the pipe surface. *Biochem. Eng. J.* 15, 69-75.

Massol-deyá, A.A., Whallon J., Hickey R.F., Tiedje J.M. (1995) Channels structures in Aerobic biofilms of fixed-film reactors treating contaminated groundwater. *Appl. Environ. Microbiol.* 61(2), 769-777.

Michelbach, S. (1995) Origin, resuspension and settling characteristics of solids transported in combined sewage. *Wat. Sci. Technol.* 31(7), 69-76.

Nielsen P.H., Raunkjær K., Norsker N.H., Jensen N.A., and Hvitved-Jacobsen, T. (1992) Transformation of wastewater in sewer systems – a review. *Wat. Sci. Technol.* 25(6), 17-31.

Ogorzaly, L., Gantzer, C. (2006) Development of real-time RT-PCR methods for septic detection of F-specific RNA bacteriophage genogroups: Application to urban raw wastewater. *J. Virol. Methods* 138, 131-139.

Özer A., Kasirga E. (1995) Substrate removal in long sewer lines. *Wat. Sci. Technol.* 31(7), 213-218.



Raunkjær K., Hvitved-Jacobsen T., Nielsen P.H. (1995) Transformation of organic matter in a gravity sewer. *Water Environ. Res.* 67(2), 181-188.

Reynolds E. (1963) The use of lead acetate at high pH as an electron opaque stain in electron microscopy. *J. Cell. Biol.* 17, 176-191.

Rocher, V., Azimi, S., Moilleron, R., Chebbo, G. (2003) Biofilm in combined sewers: wet weather pollution source and/or dry weather pollution indicator? *Wat. Sci. Technol.* 47(4), 35-43.

Sayed, S., Tarek, S., Dijkstra, I., Moerman, C. (2007) Optimum operation conditions of direct capillary nanofiltration of wastewater treatment. *Desalination.* 214, 215-226.

Skraber, S., Schijven, J., Gantzer, C., de Roda Husman, A.M. (2005) Pathogenic viruses in drinking-water biofilms: a public health risk? *Biofilms.* 2, 1-13.

Solé, A., Gaju, N., Méndez-Álvarez, S., Esteve, I., (2001) Confocal laser scanning microscopy as a tool to determine cyanobacteria biomass in microbial mats. *J. Microsc.* 204(3), 258-262.

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

Sutherland, I.W., Hughes, K.A., Skillman, L.C., Trait, K. (2004) The interaction of phage and biofilms. *FEMS Microbiol. Lett.* 232, 1-6.

Tanaka N., Hvitved-Jacobsen, T. (1998) Transformations of wastewater organic matter in sewers under changing aerobic/anaerobic conditions. *Wat. Sci. Technol.* 37 (1), 105-113.

Tanji Y., Sakai R., Miyanaga K., Unno, H. (2006) Estimation of self-purification capacity of biofilm formed in domestic sewer pipes. *Biochem. Eng. J.* 31, 96-101.

Ueda, T., Horan, N.J. (2000) Fate of indigenous bacteriophage in a membrane bioreactor. *Water Res.* 34(7), 2151-2159.

Wand, H., Vacca, G., Kusch, P., Krüger, M., Kästner, M. (2007) Removal of bacteria by filtration in planted and non planted sand columns. *Water Res.* 41, 159-167.

Wanner, O., Gujer, W. (1985) Competition in biofilms. *Wat. Sci. Technol.* 17(2-3), 27-44.

Warith, M.A., Kennedy, K., Reitsma, R. (1998) Use of sanitary sewers as wastewater pre-treatment systems. *Waste Mang.* 18, 235-247.

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

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

***CHAPITRE***  
***(V)***

Biofilm modèle et calculs  
morphométriques

**Investigation of biofilm growth in a Couette-Poiseuille reactor: new tools  
confocal laser scanning microscopy observation**

J. Houhou<sup>1\*</sup>, C. Mustin<sup>2\*</sup>, B.S. Lartiges<sup>1\*</sup>, S. Skali-Lami<sup>3</sup>, G. Caumon<sup>4</sup>, P. Levitz<sup>5</sup>

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

<sup>2</sup>*Nancy-University - LIMOS / UHP-CNRS UMR 7137 boulevard des Aiguillettes, BP 239-  
54506 Vandoeuvre Cedex, France*

<sup>3</sup>*Nancy-University - LEMTA-ENSEM / INPL-CNRS, 2 avenue de la forêt de Haye-BP 160-  
54504 Vandoeuvre, France*

<sup>4</sup>*Nancy-University - CRPG / CNRS-INSU, 15 rue Notre Dame des Pauvres-54501  
Vandoeuvre, France*

<sup>5</sup>*Ecole polytechnique-LPMC / CNRS-91128 Palaiseau Cedex, France*

E-mail: [jamil.houhou@hotmail.fr](mailto:jamil.houhou@hotmail.fr), [bruno.lartiges@ensg.inpl-nancy.fr](mailto:bruno.lartiges@ensg.inpl-nancy.fr)  
[christian.mustin@limos.uhp-nancy.fr](mailto:christian.mustin@limos.uhp-nancy.fr)

(\*) To whom correspondence should be addressed

En préparation pour le journal **Biotechnology and Bioengineering**

## **ABSTRACT**

This paper presents an original methodology to study the effect of shear rate on the different steps of biofilm growth. An original lab-made twin-reactor set-up (Airlift reactor coupled to Couette-Poiseuille reactor) was used in combination with confocal microscopy, digital image analysis (DIA) and full 3D reconstruction in order to study structural variations of biofilm during growing under well-controlled hydrodynamic conditions. Biofilms were grown for 7 days at 26°C under a laminar shear rate of 6 s<sup>-1</sup> and a continuous flow of a mixed culture of three bacterial strains (*P. aeruginosa*, *P. fluorescens* and *S. maltophilia*). The 3D structural heterogeneity of biofilm was monitored and investigated using a Scanning Confocal Laser Microscopy allowing simultaneous acquisition of fluorescence signals of bacteria and extra-cellular polymeric substances (EPS) stained by an Acridine-Orange (AO) without overlapping. Prior full 3D reconstruction, resolution was improved by removing the haze and blur from images using a 3D iterative blind deconvolution algorithm (software AutoQuantX).

The effect of shear rate was revealed by full 3D reconstruction. At 2 h, biofilm was porous and heterogeneous with a thickness of 27 µm. While, at 24 h, biofilm was denser with a compact basal layer in which were attached filamentous streamers oscillating in the flow. Afterwards, biofilm reaches its mature phase after 36 h of growth with a thickness of 320 µm. Thus, increase of biofilm density and thickness leads to an increase of shear stress of 10% at the biofilm surface, leading to the detachment of large or small aggregates from biofilm. The whole structure became heterogeneous and reached the initial growing phase at 72 h. Since, a new growth cycle took place. Moreover, Biofilm remains roughness along growth. Surface of biofilms are fractal with fractal dimensions of 2.6. In addition, biofilm 3D reconstructions showed that shear stress induce some orientation in the biofilm structure as shown after 24 h of growth with a 45° of orientation in the flow direction.

Rug and uneven structure of nascent biofilms seems to indicate that pristine cell attachment governed the further spatial organisation of the mature biofilm. The chosen imaging and reconstruction procedures allowed both a well definition of biofilm contours and contributed to reveal fine morphologic details. Thus, deconvolution images appear to be crucial for accurate structural quantifications by morphometrical calculations.

**Keywords:** Biofilm, CLSM, deconvolution, 3D reconstruction, shear stress, fractal dimension, connectivity, structure quantification.

## INTRODUCTION

Bacterial biofilms have been found to colonize different kinds of substratum, such as drinking network (Delille et al., 2007; Paris et al., 2007), sewer network (Houhou et al., in preparation) industrial pipelines (Stoodley et al., 1998), and implanted medical devices (Silverstein et al., 2006). In addition, they are used in different applications, such as biological barrier to decontaminate groundwater (Massol-Deyá et al., 1995), municipal wastewater (Celmer et al., 2008), and electricity generation (Hu, 2008). Biofilms growth begins with the adhesion of a small number of cells to a given surface. The cell-surface contact triggers the activation of genes promoter which are necessary to regulate expression of specific adhesion genes (Davies et al., 1993; Vandevivere et al., 1993). Usually, exopolymer matrix is synthesized by attached bacteria in order to strengthen their adhesion to the surface, and to the adjacent bacteria. The grown-up biofilm passed from reversible attachment phase to irreversible one (Costerton, 1999). In natural environments, complex bacterial communities participate to develop biofilms, leading to various microhabitats with a species-specific architecture (Lawrence et al., 1991). In first approximation, resulting biofilm can be described as microaggregates or colonies of cells separated by interstitial voids and channels in which water can flow (Massol-Deyá et al., 1994; Stoodley et al., 1994; Møller et al., 1998).

Bacterial biofilms and surrounding environment have been found to cross-talk together. On one hand, physico-chemical properties of bulk medium such as hydrodynamic conditions, nutrient transfer, bacterial strains used, morphology of bacterial populations and initial concentration and type of substrate available (Vieira et al., 1993; Lazarova and Manem, 1995; Lewandowski and Stoodley 1995; Stoodley et al., 1998; Abrahamson et al., 1996; Stoodley et al., 1999b; Beyenal and Lewandowski, 2000; Purevdorj et al., 2002; Wäsche et al., 2002; Pereira et al., 2002; Venugopalan et al., 2005), were found to influence biofilm development and structure. On the other hand, biofilm structure also affects some physico-chemical properties of their environment. Lewandowski and Stoodly (1995) showed that in pipes with a flow velocity above  $0.6 \text{ m}\cdot\text{s}^{-1}$ , the growth of microcolonies biofilm with oscillating streamers dissipates kinetic energy from the bulk liquid, and decreases the pressure drop and the capacity of materials to convey water. Celmer (2008) found that in a hollow-fiber membrane biofilm reactor, the increase of shear stress from 100 to 150 rpm led to twofold decrease in biofilm thickness and 60% increase in denitrification rate of bulk

medium, resulting from the increase of nitrate diffusion within biofilm. Tsai (2006) proved that, increasing chlorine concentration has a positive inhibition effect on biofilm formation.

Until now, hydrodynamics and nutrient transfer was considered by researchers as the main parameters controlling biofilm development and architecture (Characklis, 1990). At steady shear rate, biofilm thickness increases as a function of nutrient load but decreases in function of shear at constant load of nutrient. Higher flow velocity brings more cells at the surface of biofilm, while higher shear increases biofilm detachment (Stoodley et al., 1999a). Moreover, biofilms growing under laminar and turbulent flow can behave and look very different. Using flow cells, Stoodley (1999a) has shown that a 9 days old biofilm grown in laminar flow was made of rough and circular cell clusters, having a mean diameter of 100  $\mu\text{m}$ . In turbulent flow, ripple-like shape was present, in addition to cell clusters which are forming oscillated and attached streamers (700  $\mu\text{m}$  in length) in downstream direction. Moreover, hydrodynamics play a crucial role in the tortuosity (erosion) and sloughing of mature bacterial biofilms, leading to a drastic change in their morphology (Telgmann et al., 2004).

It appears clearly that the description of biofilms development and structure under all growth steps, is a crucial point to understand the cross-talk between biofilms and their environment. Several kinds of *in vitro* model systems have been used to carry out these studies, they include: (i) open channel reactors to quantify biofilm structure and to study the reproducibility of biofilm growth (Lewandowski et al., 1999, 2004); (ii) annular reactors (Applegate et al., 1991; Camper et al., 1996; Peyton, 1996); (iii) flow cells (Vieira et al., 1993; Lewandowski and Stoodley, 1995; Stoodley et al., 1999a, 2001, 2002; Pereira et al., 2002; Purevdorj et al., 2002; Venugopalan et al., 2005; Delille et al., 2007); (iv) CDC biofilm reactors (Donlan et al., 2004; Goeres et al., 2005) to determine the effect of shear conditions, mass transfer and substrate concentrations in biofilm structure; and (v) tubular reactors to simulate the growth and detachment in biofilms (Horn et al., 2003; Telgmann et al., 2004). Furthermore, in order to investigate biofilms structure and to make evidence modifications in their architecture, a wide variety of microscopic techniques were used. They include light, confocal laser scanning, bright-field, scanning electron, and atomic force microscopy (Lewandowski and Stoodley, 1995; Stewart et al., 1995; Silyn-Roberts and Lewis, 1997; Stoodley et al., 1999a, 2001, 2002; Jackson et al., 2001; Pereira et al., 2002; Venugopalan et al., 2005; Paris et al., 2007). Until now, scanning confocal laser microscopy (SCLM) and sophisticated computer image acquisition and analysis tools are considered as the best way to

prove the structural heterogeneity of biofilm. It is a no destructive method, allowing three-dimensional observation *in situ* of hydrated and attached (to substratum) bacterial biofilm (Stewart et al., 1995; Silyn-Roberts and Lewis, 1997). SCLM allows the examination of the complex interior-structure of biofilm, thanks to sagittal optical sections and digital imaging. In addition, digital image analysis allows quantitative approaches of biofilm structures, that appear crucial to understand and model structural changes in biofilm geometry under different growth conditions (flow and shear rate). Such analysis produce a lot of areal, textural and volumetric parameters such as biofilm density, thickness, roughness, porosity, fractal dimension, areal coverage, textural entropy, average and maximum diffusion distance and average run lengths, using binary thresholded two-dimensional images (Zahid and Ganczarczyk, 1994; Hermanowicz et al., 1996; Lewandowski et al., 1999, 2004; Yang et al., 2000; Jackson et al., 2001; Beyenal et al., 2004).

This work aims to: (1) present a lab-made twin-reactor used to study the effect of shear stress on biofilm structure. (2) apply 3D deconvolution methods to SLCM image stacks in order to sharpen up biofilm geometry through mathematical removal of out-of-focus information, (3) implement an original three-dimensional image processing used to quantify biofilm structural parameters, (4) outline new structural parameters to study the connection between bacteria and exopolymers (5) underline the interest of the combination of such experimental set up system with an efficient digital image analysis method to explore biofilm growing under various hydrodynamic conditions.



## EXPERIMENTAL SECTION

### 1. Bacterial strains

Biofilms were grown from three bacterial strains, *Pseudomonas aeruginosa* (PA01, Yoon et al., 2002), *Pseudomonas fluorescens* (DF57, Kragelund and Nybroe, 1994), and *Stenotrophomonas maltophilia* isolated from a polluted soil (P. Billard, LIMOS Nancy-University). Frozen stock samples were previously cultivated (two days at 28°C) on Luria-Bertoni-Agar sterile media (Sigma®) before production of active growing culture in Luria-Bertani liquid media (overnight incubation at 28°C onto a rotary shaker at 120 rpm).

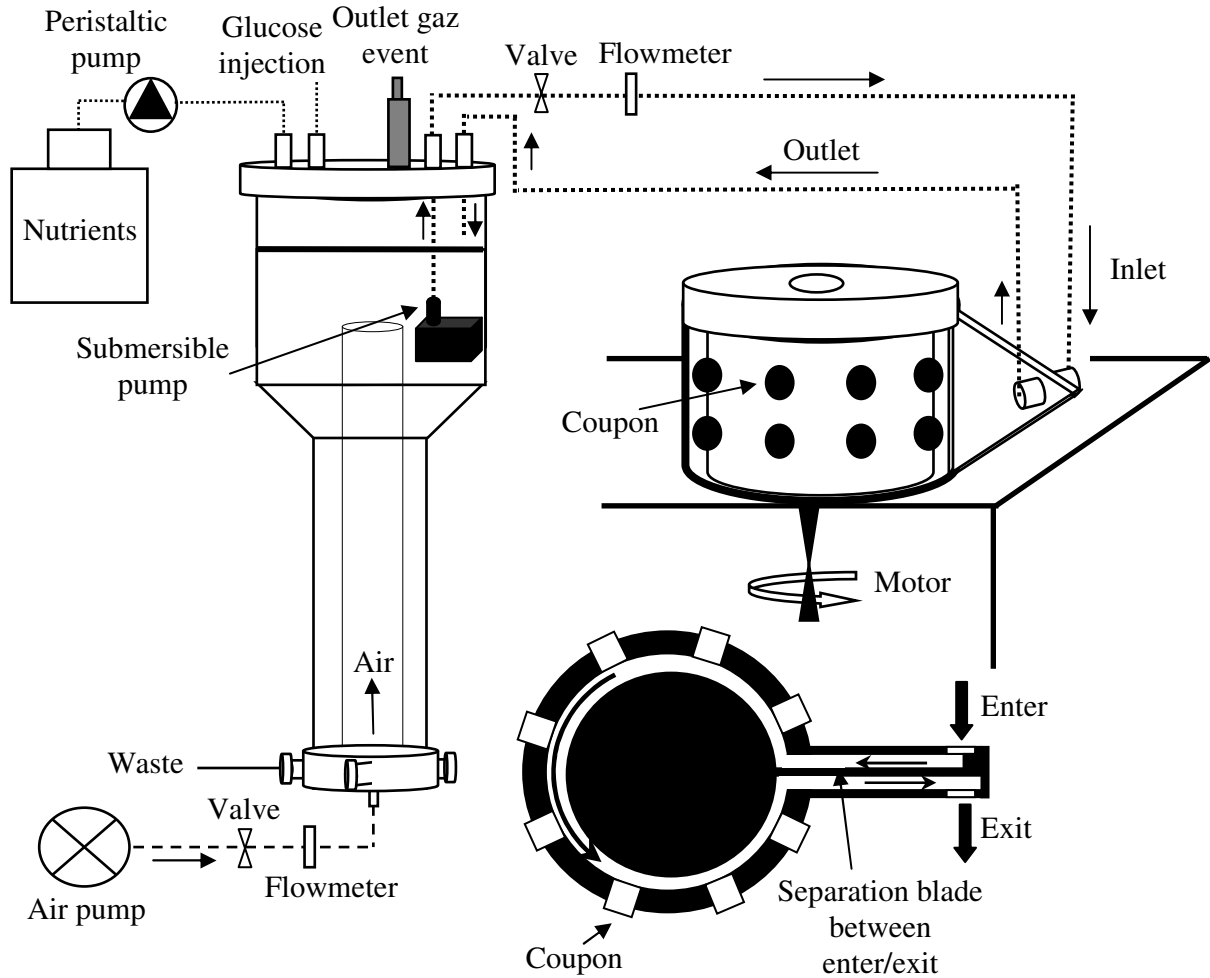
### 2. Biofilm reactor system

The experimental set-up, based on the combination of two original reactors, is depicted in figure 1. Biofilms are grown in a Couette-Poiseuille Reactor incorporated in a recycle loop with an Airlift Reactor devoted to produce continuously a suspension of active bacteria. The CPR consists of two co-axial Plexiglas® cylinders, 10 cm in height. The rotating inner cylinder and stationary outer cylinder have radius  $R_1$  and  $R_2$  equal to 5 cm and 5.6 cm, respectively. The gap spacing between the cylinders is  $e = 3$  mm, and the dead volume is 97 mL. Such a design yields a  $e/R_2$  ratio of 0.05 that ensures that the shear profile obtained between the two concentric cylinders is similar to that generated between two parallel plates. A stable laminar flow is created in the gap providing a Taylor number  $Ta$  less than 41:

$$Ta = \frac{\rho \omega e^{3/2} R_1^{1/2}}{\mu}$$

where  $\rho$  and  $\mu$  are the density and the dynamic viscosity of the suspension, respectively, and  $\omega$  the rotation rate of the inner cylinder. In the experiment described hereafter, laminar flow conditions are achieved as  $\omega = 3.75$  rpm and hence  $Ta = 12$ . The shear rate  $g(r)$  at a given radial distance  $r$  in the gap can then be calculated from:

$$g(r) = \frac{2\omega R_1^2 R_2^2}{(R_2^2 - R_1^2)r^2}$$



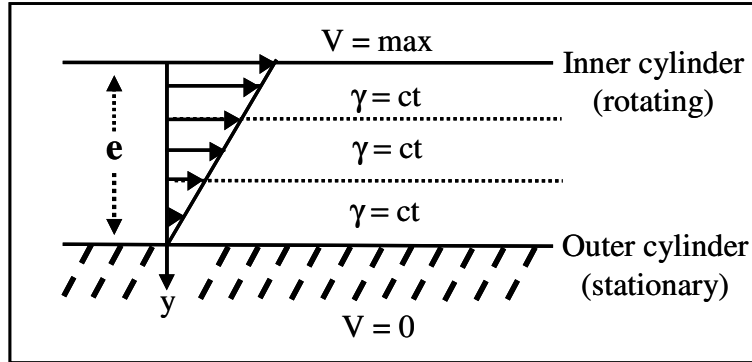
**Figure 1.** Schematic representation of the experimental setup, including the continuous bacterial culture Airlift-reactor (left) and the biofilm growth Couette-Poiseuille reactor (right). The longitudinal section of the CPR shows the position of each replaceable coupon at the surface of the outer cylinder and the sense of bulk medium circulation within the gap.

The theoretical shear profile obtained for  $\omega = 3.75$  rpm is illustrated in figure 2. It shows that, at least initially, the growing biofilm is exposed to both a uniform shear rate and a constant mass transfer profile. The spatial mean shear rate  $\dot{\gamma}$  in the annular gap is defined as:

$$\dot{\gamma} = \frac{1}{R_2 - R_1} \int_{R_1}^{R_2} g(r) dr = \frac{2\omega R_1 R_2}{R_2^2 - R_1^2}$$

$\dot{\gamma}$  is equal to  $6 \text{ s}^{-1}$  in our experiment. Actually, a wide range of shear rate - 1 to  $120 \text{ s}^{-1}$  - can be investigated using such a reactor. Experiments carried out under various shear conditions, laminar or turbulent, will be reported in a follow-up paper. The inner cylinder is rotated by a

precision motor connected with a digital controller. The stationary outer cylinder is equipped with 16 removable coupons to collect the biofilms formed on the cylinder wall (Fig. 1). Coupons are carefully fit in the cylinder wall in order to avoid any disturbance of the shear profile in the gap spacing. The coupon surface was render hydrophilic by gluing a thin polyethylene-fluoride film (BioFOLIE™, Sartorius Vivascience).



**Figure 2.** Schematic illustration of the flow velocity and the shear rate inside the Couette-Poiseuille reactor.

The Airlift reactor is a low shear, gas impelled bioreactor (Applikon Airlift). It consists of a cylindrical transparent borosilicate glass vessel, 60 cm in height and 8.5-13.5 cm in diameter (Fig. 1), with a concentric stainless steel pipe, 35 cm in height and 4.45 cm in diameter, in the lower section of the reactor. The internal column divides the reactor volume into riser and downcomer zones, while the upper section of the reactor is used as a gas-liquid separator. Air bubbles sparged through the riser induce the circulation of the aqueous medium, the difference in liquid density between riser and downcomer sections after gas separation, driving the flow back into the bottom of the riser. The agitation is driven by the air flow rate ( $0.015 \text{ L}\cdot\text{s}^{-1}$ ) into the reactor. The Airlift reactor was fitted with ports for nutrient injection, air sparger, and recirculation of the bacteria suspension through the Couette-Poiseuille reactor. The Airlift reactor has a working volume of 3 L and the temperature was maintained at  $26^\circ\text{C}$  with a 1 L water-jacket connected to a thermoregulated bath. In addition, the top of the reactor was equipped with a condenser to avoid water losses by evaporation.

### **3. Sterilization and start-up procedure**

A typical biofilm growth experiment lasts one week. A careful sterilization of various parts of the reactor system was therefore conducted with respect to the respective thermal and

chemical properties of materials used (glass, plexiglas, PTFE junction tubing,...). The Airlift reactor and tubes were autoclaved twice at 120°C for 20 min. The Plexiglass Couette-Poiseuille reactor and the Airlift reactor were connected under sterile flow. A chlorocyanide solution (ELGA LABWATER, CT1) was then passed twice through the reactor system for 6 hours, before rinsing it four times with sterile ultra pure water (18.2 mΩ - MilliQ-plus). The submersible pump, previously sterilized with a bactericide, was then placed within the Airlift reactor to circulate the aqueous medium in the Couette-Poiseuille reactor.

The sterile water was replaced with 3 L of fresh sterile mineral growth medium (Busnell-Hass-BH, Sigma®) which consisted of glucose (2 g.L<sup>-1</sup>), NaCl (8.5 g.L<sup>-1</sup>), MgSO<sub>4</sub> (0.2 g.L<sup>-1</sup>), CaCl<sub>2</sub> (0.02 g.L<sup>-1</sup>), KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (1 g.L<sup>-1</sup>), K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (1 g.L<sup>-1</sup>), NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> (1 g.L<sup>-1</sup>), FeCl<sub>3</sub> (0.05 g.L<sup>-1</sup>), with a final pH of 7.4. The glucose solution was autoclaved and injected separately. A cycloheximid solution (Roth®), filtered aseptically (0.22 μm, Millipore®GP), was added at a final concentration of 100 mg.L<sup>-1</sup> to inhibit protozoa growth. Control experiments indicated that such cycloheximid concentration is the minimal inhibitive concentration for each bacteria strain used in this study. (Petropoulos et al., 2005; Chabaud et al., 2006).

The Airlift reactor was inoculated with a 5 mL syringe of each actively growing cultures ( $3.7 \times 10^9$  bacteria.mL<sup>-1</sup>) through a septum-sealed port. The bacteria were then allowed to grow for further 24 h in the Airlift reactor. Nutrient mixing and aeration were controlled by injection of sterile air (60 L.hour<sup>-1</sup>) at the bottom of riser using an air pump (KnFLAB, LABOPORT). The air was first passed through a hydrophobic sterile filter (0.2 μm pore size, Sartorius, Minisart SRP25, PTFE membrane). The circulation in the Airlift reactor was laminar (1 L.min<sup>-1</sup>), thus avoiding both the aggregation of planktonic cells and the break-up of circulating aggregates arising from biofilm detached from the surface of Couette-Poiseuille reactor.

After 24 hours, the bacteria culture ( $3 \times 10^8$  bacteria.mL<sup>-1</sup>) was injected in the Couette-Poiseuille reactor. The reactor system then operated as a batch culture for 12 h to allow attachment of bacteria at the surface of Couette-Poiseuille reactor. After this initial attachment phase, the growth medium was completely renewed, and the system was switched to the normal operating mode. In the experiment described hereafter, the bacterial biofilm was allowed to grow for 7 days. During that time, the growth medium was renewed twice and the

bacterial cell growth within the Airlift reactor was daily monitored by an optical density measurement at 600 nm using a UV-Vis spectrophotometer (SHIMADZU, UV-1205).

At the end of biofilm growth, samples were taken from the Airlift reactor to check the non-contamination of the reactor device by allochthonous strains. Ten fold standard dilutions on LB-Agar plates of an inoculum from bulk medium were incubated at 30°C over night.

#### ***4. Preparation of biofilm for microscopy investigation***

Biofilm development was monitored by coupon sampling over time. Coupons were sampled in the inverted direction of flow, from the outlet to the inlet of Couette-Poiseuille reactor, in order to avoid changing of liquid flow profile and shear stress at the top of remaining growth biofilm. After sampling, coupons were stocked at 4°C before characterization using inverted SCLM. Furthermore, coupons were stained with Acridine-Orange (AO) buffered solution (Sigma-Aldrich, 22 µM AO, 5 mM EDTA, 0.15 M NaCl, 0.1 M phosphate-citrate buffer [pH 6]). AO dye stained nucleic acid of bacteria and the extracellular polymeric substances (EPS) (Wirtanen et al., 2001; Jana-Sur and Chakraborty, 2005). Samples were stained with 30 µL of AO buffered solution during 20 min at room temperature in the dark, and then washed 3 times with ultra pure water for 18.2 mΩ (MilliQ-plus) to remove dye excess before microscope observations. Coupons were small enough to be placed upside-down in glass-bottom dishes (WillCo-Dish<sup>®</sup>, Ø 22 mm)

#### ***5. Scanning Confocal laser microscopy (SCLSM) and image acquisition***

Optical sections stacks and fluorescent mapping were carried out on an inverted light microscope (NIKON TE 2000 U) equipped with a confocal head (Radiance 2100 Rainbow, Biorad). Due to the concavity of the coupons and the thickness of biofilms, objectives with long working distance up to 1mm were used (magnification × 4 or × 20). The 488 nm and 457 nm lines of a 4 lines argon ion laser were used as excitation light to locate and map stained bacteria and bio-polymers, respectively. Fluorescence was split into several channels each with its own bandwidth. Fluorescence signal of stained bacteria (excitation: 488 nm) was recorded in the frequency range of 530-560 nm, while EPS (excitation: 457 nm) were detected over 600 nm. Image stacks (512×512 pixel<sup>2</sup>) were carried out using LaserSharp2000<sup>™</sup> software (Bio-Rad Cell Science Division). To reduce bleed-through, the line by line excitation mode (Lambda-Strobing) was used for optical sectioning. It should be

noted that CLSM was installed on a pneumatic vibration-proof table to reduce motion of biofilms appendices.

## **6. Image processing and enhancement**

Deconvolution of image stacks. Generally, an optical microscope is characterized by its Point Spread Function (PSF). PSF is considered as unique for each imaging procedure and determined for each wavelength used by optical characteristics of objective lenses, immersion media and coverslip and sample depth (Haeberlé et al., 2001). For an arbitrary object, acquired image corresponds to the sum of collected PSFs, and each one was centered and scaled in the intensity, according to the position of the corresponding light sources within the sample. Thus, obtained images are an overlap of PSFs, with hazy and blurry aspect, corresponding to the mathematical convolution. It is necessary to restore images before any quantification process.

Several mathematical deconvolution algorithms have been developed in order to invert the undesirable effect of convolution such as *Iterative Constrained*, *Maximum Likelihood Deconvolution*, *Blind Deconvolution* and *linear least-squares* (Holmes, 1988; Chomik et al., 1997). Except *Blind Deconvolution*, all three-dimensional deconvolution requires the knowledge of the PSF of imaging system (Haeberlé et al., 2001). PSF can be measured by imaging small fluorescent latex beads. Nevertheless, this calculation method can overestimate the PSF size. On the other hand, *Blind Deconvolution* does not require PSF to be known. This algorithm can adaptively estimate the PSF from stack optical sections, in order to obtain the best fitting for data (Holmes, 1995). *Iterative Blind deconvolution* can adapt to PSF changes within sample and sharpen efficiently 2D images or 3D stacks.

In this study, a three dimensional iterative blind deconvolution was applied to SCLM images stack (AutoQuant X v1.4.1 software, MediaCybernetics). 30 iterations were needed to deblur separately fluorescence images of bacteria and EPS and enhance signal data. Afterwards, stacks of optical sections were saved as 32 bit digital images (*ipl* format).

Images segmentation (thresholding and binarisation). After image enhancement through the deconvolution procedure, objects of interest must be defined through thresholding before 3D reconstruction. Prior to segmentation, 32 bit grey-scale images were converted in 8-bit images (256 gray levels). Contrast enhancement and brightness histogram analysis help to define

accurately the limit between biomass (foreground pixels) and interstitial space (background pixels). Afterwards, gray-scale images were binarized (Yang et al., 2001) using MacBiophotonics ImageJ software (NIH, Bethesda, Maryland, USA). Note, at this stage erosion or dilation procedure was not started.

### **7. 3D Reconstruction**

Although, it is quite easy to obtain quantitative 3D informations with a laser microscopy, it may be more difficult to present them in an appropriate form. One way to study the spatial arrangement of biofilms is to build a three-dimensional model. Thus, in this work biofilms 3D reconstruction was performed using Gocad® software (Earth Decision, version 2.1.6). Gocad® software was developed in the nineties at the National Graduate School of Geology (Nancy-France) and was applied to model the complex geometry of geological objects. It has been already used to study the spatial arrangement of activated sludge flocs (Zartarian et al. 1997). It is based on a discrete representation of objects through regular grid or irregular meshes (points, polygonal curves, triangulated surface, tetrahedralized solids) and a representation of relationships (constraints) between objects (Mallet, 2002), in which the discrete smooth interpolation (DSI) modeling method was based.

In this study, 3D reconstruction was carried out on biofilm after 2, 12, 24, and 168 h of growth, using image stack of sagittal sections. Thus, voxet (meshed volume containing 2D optical sections) was created from gridded images, and the 3D model of biofilm skins was carried out using the iso-surface algorithms operating under the DSI environment (Mallet, 1989).

Furthermore, using Computer Aided Design (CAD) tools, the reconstructed biofilm could then be manipulated: rotated, magnified, measured, isolation of external and internal contours could be partially or totally shown, animation and new sections could be generated.

It should be noted that before 3D reconstruction, binary data in the voxet, corresponding to the biofilm, undergoes dilatation and erosion cycles, which correspond respectively to adding and removing pixels from binary images, depending on the pattern of neighboring pixels (Russ, 2006), in order to better define the biofilm outline and eliminate the isolated voxels. Dilatation transforms background pixels that touch biofilm pixels, into biofilm one. Instead, erosion removes isolated biofilm pixels that have been selected by

thresholding. Furthermore, there are different rules to choose which voxels to add or remove and the order for the combination of dilatation and erosion (Russ, 2006).

Commonly, dilatation and erosion were carried out into 2D images, taking into account adjacent 8 pixels. Therefore, we have developed a procedure using Gocad® scripts in C language, to carry out a 3D dilatation or erosion by taking into account the 26 adjacent voxels. Different rules of dilatation/erosion combinations have been tested (data not shown) and best results have been obtained for a dilatation followed by 2 erosion cycles (equivalent of closing and erosion). Dilatation was carried out by turning on background voxel in contact with 20 biofilm voxels, while, erosion was made by turning off biofilm voxel in contact with 22 background voxels.

## **8. Statistical analyses**

In order to quantify biofilm structure, binary stacks of optical sections were used to calculate biofilm thickness, volume (biofilm, EPS, bacteria), EPS/bacteria co-localisation, and fractal dimension (Df):

- 1- Thickness: Binary data of optical section stacks was tacked to determine the thickness of the biofilm. Using Gocad® scripts, each upper voxels was projected on the basal plane (substratum), and the number of voxels between each top voxel and the substratum was quantified. A histogram plots the number of top voxels having the same distance to the substratum and tacking into account the interstitial void, was created. The average thickness of biofilm was considered as the median point of the Gaussian curve fitting the histogram. Furthermore, the same histogram without void voxels was used to define the thickness profile of biomass within biofilm: monomodal, pseudomodal, bimodal....
- 2- Volume and co-localization: Volume estimation takes advantage of the well separation of EPS and bacteria fluorescence and of 3D reconstruction procedure. CAD tools allows to perform easily quantitative studies, one of them is to calculate directly the volume, surface, number of parts of the biofilm and the subsequent bacterial cells and EPS abundances in the overall of biofilm and the percentage of co-localization between bacteria and EPS within the biofilm. Discret co-localization is satisfied when



bacteria and ESP share the same voxels. Thus, the percentage of co-localized voxels to the total number of voxels constituting the biofilm was calculated.

Moreover, the EPS and bacteria ratios from upstream to downstream (flow direction) and from top to bottom of biofilm were carried out using capabilities of Gocad® script.

- 3- Fractal dimension: Perimeter (P) versus area (A) and Surface (S) versus Volume (V) relations were studied on cross-sections and on reconstructed biofilm aggregates respectively. Df is considered as an indication of the ruggedness of the biofilm skin (Zahid and Ganczarczyk, 1994; Hermanowicz et al. 1995; Lewandowski et al., 1999; Yang et al., 2000; Jackson et al., 2001; Beyenal et al., 2004; Chen and Chai, 2006). Df varies between 1 and 2 in 2D, it is named perimeter fractal dimension (D<sub>fp</sub>). The higher D<sub>fp</sub> value, the more irregular the perimeter of the biofilm. In addition, Df can vary also between 1 and 3 in 3D, it is considered as surface fractal dimension (D<sub>fs</sub>). The higher D<sub>fs</sub> value, the more irregular aggregates surface (Beyenal et al., 2004). Increasing of Df allows a greater interaction and matter transfer with surrounding bulk fluid. However Df can not be used as the unique characteristic to analyze biofilm structure, Hermanowicz (1995) has found that two objects that vary largely may have the same Df.

Two mathematical functions were used to determine the D<sub>fp</sub> and D<sub>fs</sub>. Biofilm surface (S) and perimeter (P) of each binary optical section (objective × 4) were calculated using MacBiophonics Image J software. Plotting log<sub>10</sub>(S) in function of log<sub>10</sub>(P) gives a straight line with D<sub>fp</sub> = 2/slope (Zartarian et al., 1997).

Furthermore, using aggregates, D<sub>fs</sub> of biofilm was determined with the help of Gocad® software. In fact, aggregate was defined as the set of all neighbored face connected voxels. Volumes (V) of the higher 400 aggregates and their corresponding surface (S) were calculated. Plotting log<sub>10</sub>(V) in function of log<sub>10</sub>(S) gives a straight line, with the D<sub>fs</sub> = 3/slope.

- 4- Shear stress modification: In order to study the effect of biofilm growth in the modification of shear stress ( $\tau$ ) at the surface of biofilm, the following equation was used:

$$\tau = \tau_0 \left( 1 + \frac{\Delta e}{e} \right)$$

With  $\tau_0$  the shear stress into the flow at the beginning of the experiment, and  $\Delta e$  the difference between the gap ( $e$ ) and the thickness of biofilm.

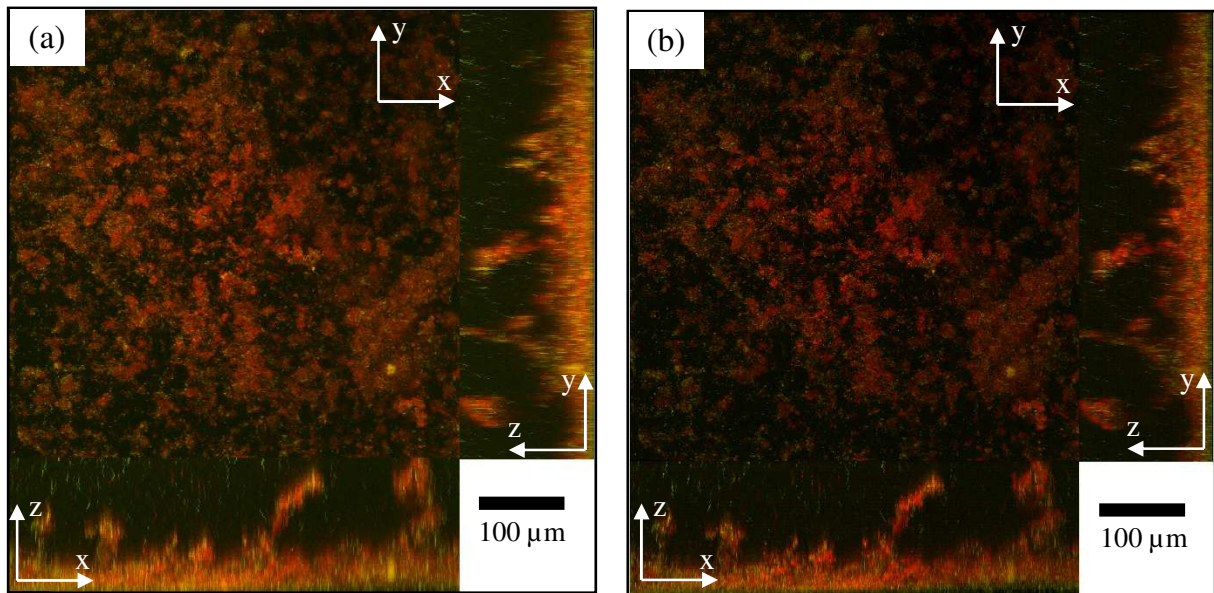
$$\tau_0 = \mu * \dot{\gamma}$$

With  $\mu$ , the viscosity of bulk medium

## RESULTS AND DISCUSSION

### 1. Advantage of deconvolution

Image enhancement of stack optical sections, using spectral reassignment and blind deconvolution method, is shown in figure 3. Optical sections were obtained by CLSM (objective  $\times 20$ ) imaging of a bacterial biofilm after 24 hours of growth. Figure 3a and 3b are projections a long z-axis (central image), y-axis (bottom image), and x-axis (right image) of stack optical sections for the same biofilm before and after image analysis, respectively.



**Figure 3.** *x, y and z projections of sagittal optical sections before (a) and after (b) deconvolution; Biofilm stained with acridine orange. Fig. 3a projection of optical sections carried out with CLSM using objectif  $\times 20$ ; field size  $600 \times 600 \times 177 \mu\text{m}^3$  (64 slices); bacteria fluoresce in green, EPS in red. Fig. 3b projection of background subtracted and deconvoluted optical sections.*

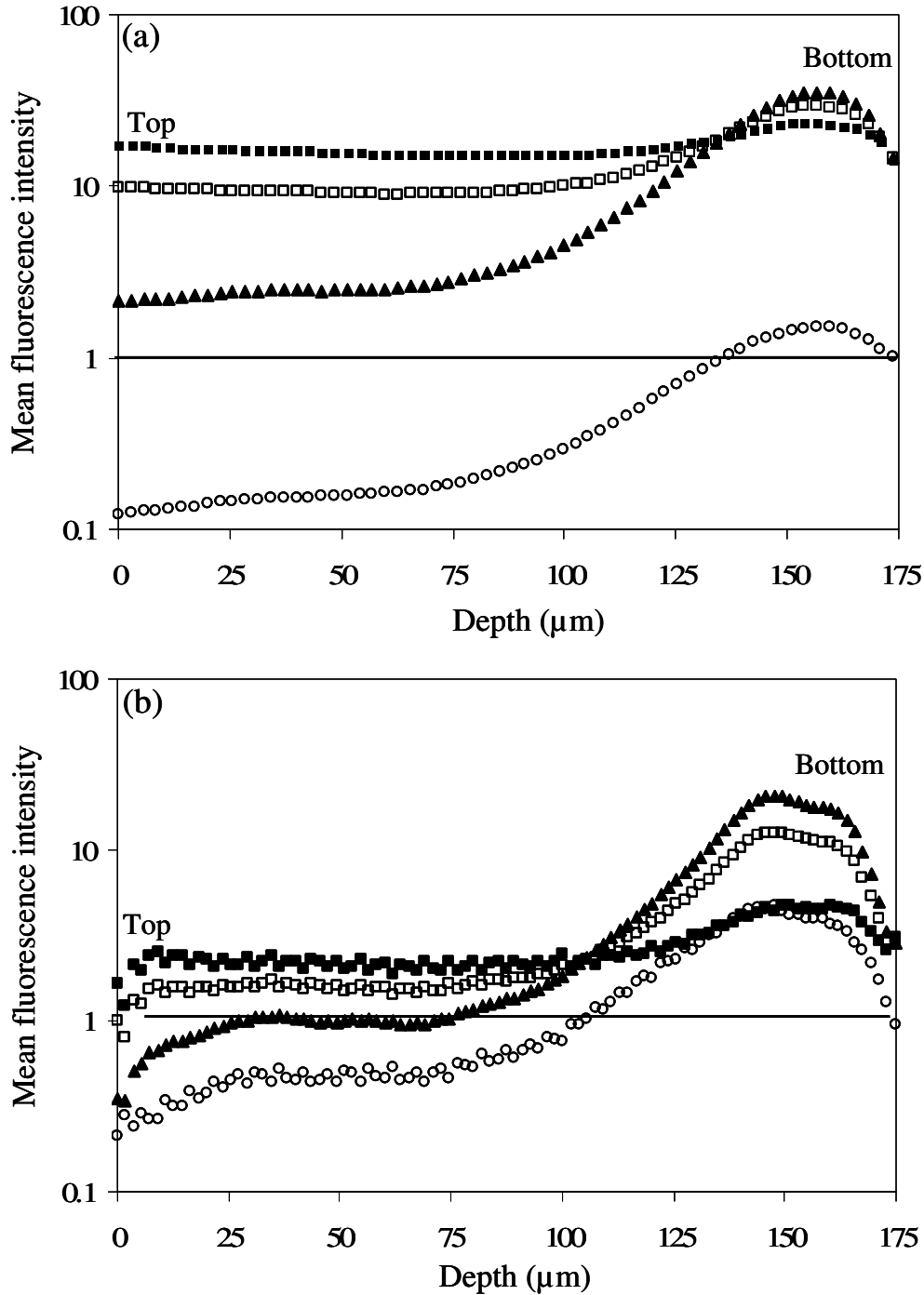
Fluorescence recorded from EPS and bacteria was combined together before projection. Red corresponds to the EPS, whereas green represents bacterial cells. Consequently, yellow indicates co-localization between microbial cells and EPS. The deconvolution procedure clearly improves image quality. It removes a significant part of background noise, facilitates thresholding of the biofilm structure and provides a better definition of aggregates contours. As a consequence, it reveals fine details that were invisible before deconvolution. x and y axis projections also reveal an improved axial resolution, and restoration of both sharpness and clarity of stack optical sections. In accordance, Holmes (1995) and Schaefer (2001) showed that the application of 3D deconvolution algorithm on image stacks improves the structural resolution and reduces the residual out-of-focus haze and the axial smearing.

Figures 4a and 4b present the depth profile of fluorescence intensity as function of biofilm depth. The intensity of mixed fluorescence before deconvolution is double (Fig. 4a) than after deconvolution (Fig. 4b). Therefore, the maximum EPS fluorescence and bacterial one were 1.6 and 6 times more intense, respectively. Such a decrease in fluorescence intensity after deconvolution is likely due to background subtraction, and to haze and blur removing. In accordance, Holmes (1995) and Zhu (2005) showed that deconvolution improves clearly the signal-to-noise ratio in the restored images.

Moreover, for depths between 0 and 80  $\mu\text{m}$ , corresponding to the zone where streamers are observed (Fig. 3a, x and y projections), the fluorescence intensity of all channels is relatively constant before deconvolution (Fig. 4a). In contrast, after deconvolution (Fig. 4b), variation in the fluorescence intensity is clearly observed close to biofilm surface. Indeed, the intensity corresponding to EPS increases significantly from 0 to 25  $\mu\text{m}$  in depth, revealing an increase of EPS density. Such an increase is much less observed for the fluorescence corresponding to bacterial cells. Thus, from 25 to 80  $\mu\text{m}$ , fluorescence intensity of all channels was relatively constant, but curves were rough. This roughness in curves corresponds to a variation of EPS and bacteria density with depth. Deconvolution highlights then the presence of thin details in streamer structures of biofilm that do not appear in the biofilm structure reconstructed from untreated stack optical sections.

In the basal structure of deconvoluted biofilm, two peaks of fluorescence were present in all channels, while before devonvolution, there was only one peak. Thus, deconvolution highlights the presence of two structures in the base of biofilm unlike to non-deconvolution.

However, deconvolution can't clearly reveal the fine details in the structure of the denser part of biofilm.



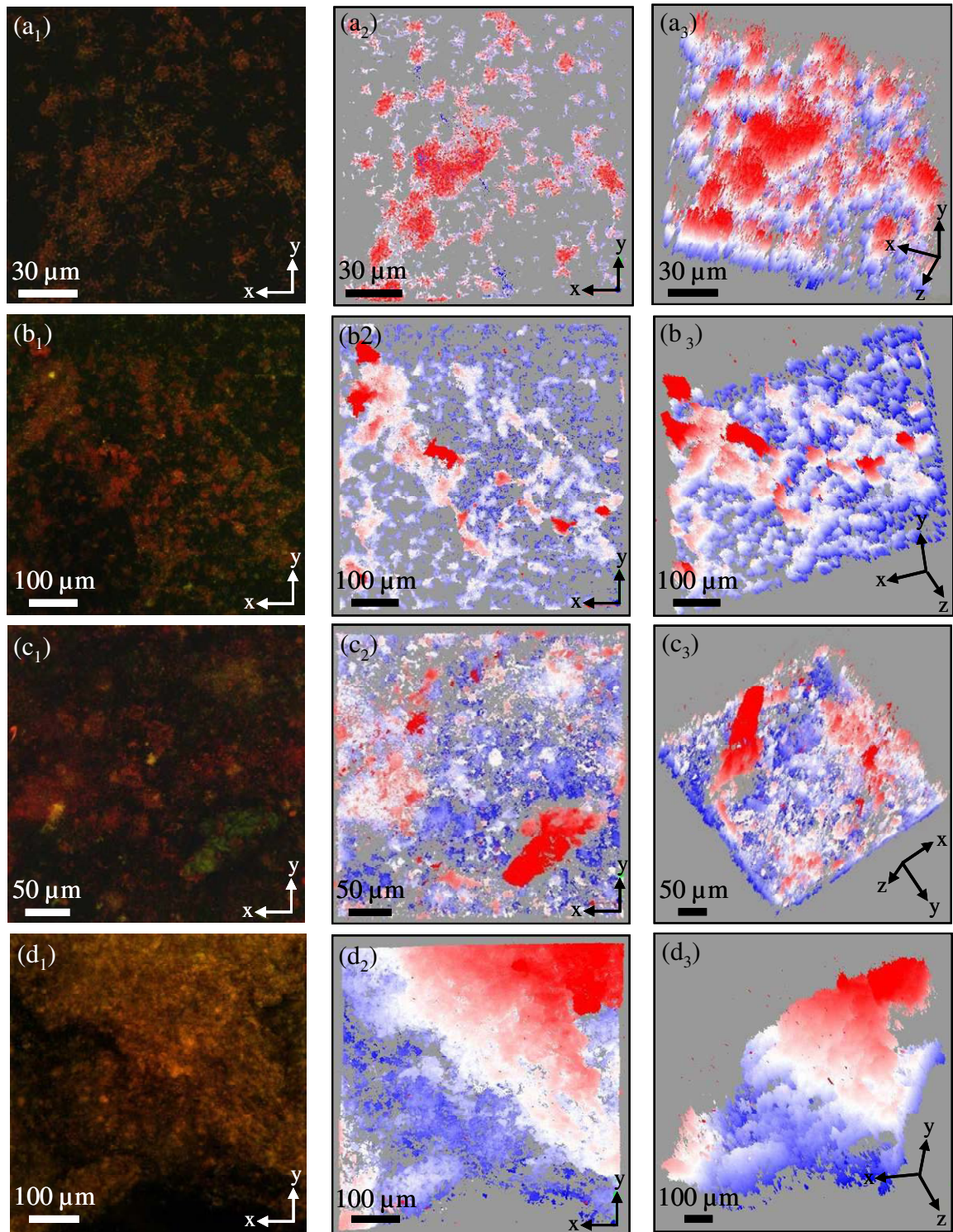
**Figure 4.** Mean graph of fluorescence intensity in confocal image stack versus depth before (a) and after (b) deconvolution; bacteria (■) (and EPS (▲)) presents the fluorescence recorded from bacterial (respectively EPS) channel after excitation; mixed intensity (□) shows the distribution of the mean fluorescence of bacteria and EPS after merging the two channels; EPS/Bacteria (o) is the ratio of EPS fluorescence versus bacterial one along biofilm depth.

## **2. 3D reconstruction**

In order to obtain spatial information on biofilm structures, many series of image stacks have been recorded. Digital images were carried out with CLSM using objective  $\times 20$ , and are the basis of further 3D reconstruction of biofilm architecture at different growth stages. Figure 5 illustrates the spatial arrangement of a biofilm presented as a gallery of z-projection or 3D surfaces visualization (top or perspective view)

After 2 h of growth, the projection of deconvoluted image stack (Fig. 5a<sub>1</sub>) shows that biofilm was very porous and heterogeneous. It is made of small clusters and dispersed bacterial cells attached to the substratum. The maximum volume of a cluster was estimated around  $9400 \mu\text{m}^3$ . Such pristine stage was approved by a lot of researchers and plays a crucial role in development of mature biofilm (Lazarova and Manem, 1995). Costerton (1999) showed, that after exploration of the surface, bacterial cells adhere to form a monolayer of cells, and synthesize new exopolysaccharide polymer to consolidate their attachment to the surface and to surrounding cells (irreversible adhesion phase). In addition, using CLSM, Pereira (2002) found that after one day of growth, under both laminar and turbulent flow, biofilm was very heterogeneous and formed with bacteria and colonies.

Furthermore, figures 5a<sub>2</sub> and 5a<sub>3</sub> present a 3D reconstruction of biofilm (2 h) by Gocad® software using the digital optical sections collected by CLSM. In fact, this step allows the replacement of real biofilm by its digital analog, which can be restored in computer memory and compared with other experiments. Figure 5a<sub>2</sub> is a z-projection of reconstructed biofilm, it is a very similar reconstruction of real biofilm, and clearly dominated with red color. This domination of unique color corresponds to the homogenous thickness of biofilm.



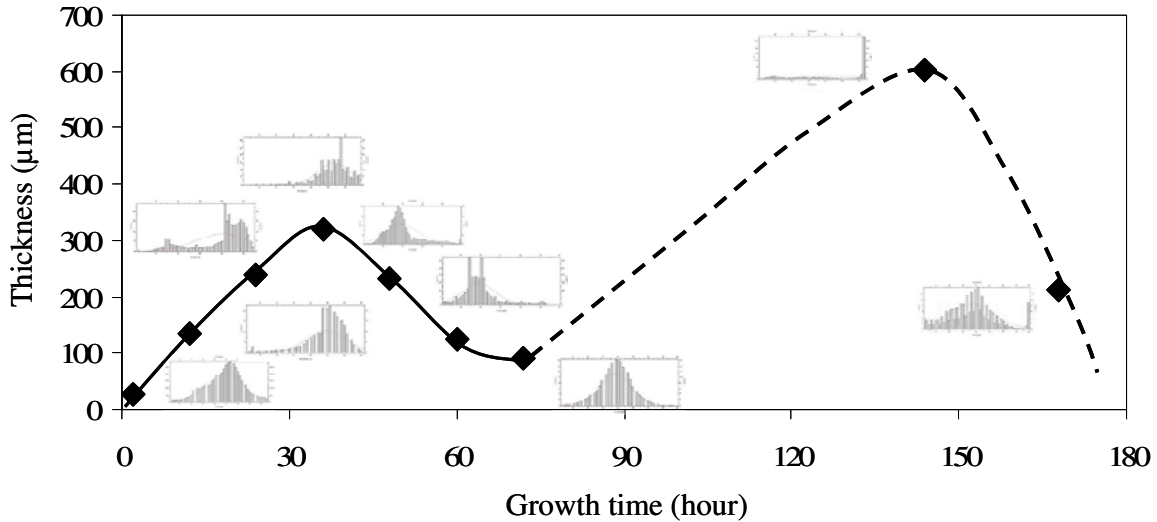
**Figure 5.** Structural changes during biofilm growth. Galleries of z-projections of deconvoluted sagittal sections (first column) and corresponding 3D models with time. Biofilm sample was stained with acridine orange (bacteria fluoresce in green, EPS in red). Top and perspective views of 3D reconstruction (Gocad® software) are showed in the two right columns. Blue-white-red color table was selected to paint height on the model (red = top, blue = bottom). x axis indicates the flow direction  
 Row 1:  $t = 2$  h; field  $150 \times 150 \times 44 \mu\text{m}^3$  (24 slices). Row 2:  $t = 24$  h; field  $600 \times 600 \times 177 \mu\text{m}$  (97 slices). Row 3:  $t = 60$  h; field  $330 \times 330 \times 210 \mu\text{m}$  (116 slices). Row 4:  $t = 168$  h; field  $600 \times 600 \times 340 \mu\text{m}$  (188 slices).

Z-axis top view at 24 h (Fig. 5b<sub>1</sub>) and 60 h (Fig. 5c<sub>1</sub>) proved the presence of a denser biofilm. Thus, reconstructed top view (Fig. 5b<sub>2</sub> and 5c<sub>2</sub>) indicates the presence of a basal structure (blue) surmounted by different structures (red). These later appear like streamers with different sizes and orientations (Fig. 5b<sub>3</sub> and 5c<sub>3</sub>). Indeed, during CLSM observations, biofilm architecture was composed of a denser layer, in contact with substratum, constituting the base of biofilm in which pretty elongated filamentous streamers were found to oscillate in the bulk medium. Thus, Stoodley (1998) found that the largest cell clusters (thick: 85  $\mu\text{m}$ ) in the biofilm develop roughly conical streamers of 3 mm length, oscillating (sinusoidal curve) from side to side in the bulk water with a frequency directly proportional to the flow velocity. Afterwards, some orientation ( $45^\circ$ ) of biofilms was found in the direction (Fig. 5b<sub>2</sub>) and the opposite direction (Fig. 5a<sub>2</sub>) of flow. This kind of orientation has been identified by Paris (2007) during studying the effect of wall shear rate on biofilm deposition in drinking water flow cells.

Afterwards, at 168 h of growth, z-projection of CLSM optical sections (Fig. 5d<sub>1</sub>) showed a denser biofilm. 3D reconstruction (Fig. 5d<sub>2</sub> and 5d<sub>3</sub>) displays 2 different density zones within biofilm, a very denser and a weak one. This large difference in density came from the detachment of biofilm under shear conditions as shown later in this paper. It should be indicated, that at 168 h, 3D reconstruction was carried out by reducing the number of slices per 2 and increasing the z step twice times. This modification duplicates the volume of voxels, leading to a hard decrease in z-axis resolution. In fact, the cached memory of the computer (8 Gigabit) could not deal with the file sizes.

### **3. Biofilm thickness**

The biofilm thickness changes as function of biofilm age (Fig. 6). It increases significantly from 27 to 320  $\mu\text{m}$  for a 2 to 36 h of growth, corresponding to the exponential phase. This high thickness obtained after 2 h can result of large amount of substrate (glucose) used during experiment. Telgmann (2004) found that under laminar flow (500  $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ ; glucose: 0.15  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ), biofilm average thickness reached 50  $\mu\text{m}$  after 1 day. Thus, under turbulent flow (5.46  $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ , Reynolds number, Re: 1192) and using 0.04  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  of glucose, Stoodley (1998) showed that after 7 days of development, biofilm was rough with 85  $\mu\text{m}$  of thickness.



**Figure 6.** Evolution of biofilm (♦) depth as function of time. Histograms are plots of the number of top voxels of the biofilm having the same distance to the surface, without considering void voxels.

Determination of depth profile shows that the distribution of biofilm, at the substratum, was pseudo-bi-modal until 12 h, indicating that at this step biofilm was composed of 2 very close structures, that can be dispersed bacteria and small clusters, and proving the result obtained by 3D reconstruction after 2 h of growth. Therefore, depth profile became clearly bi-modal at 24 h and average thickness reached 240 µm, showing that biofilm was composed of two different structures at this state of growth. This bi-mode corresponds to the dense basal layers of biofilm (80 µm) in contact with substratum and to the oscillating streamers that was already observed by CLSM and proved by 3D reconstruction.

Furthermore, after 36 h, depth profile became again mono-modal with 320 µm of thickness and without streamers. In fact, bacterial cells from bulk medium adhere at the surface of biofilm between streamers, then the synthesis of EPS increases (discussed later), leading to the filling up of void spaces causing eventually the merge of many aggregates and streamers together. Thus, biofilm became very dense and less heterogeneous. A lot of researchers have studied factors implicated in the changing of biofilm architecture. Picioreanu (1998) modeled the effect of mass transport limitation and found that an heterogeneous porous biofilm (channels, void spaces), with a fingerlike morphology, was obtained under a substrate-transfer-limit regime and fast growing bacteria. While, more homogeneous biofilm (dense and compact) was obtained under high substrate-transfer-rate and slow growing bacterial cells. In addition, Stoodley (1999a) showed that increasing glucose amount from



0.04 g.l<sup>-1</sup> to 0.4 g.l<sup>-1</sup> under turbulent flow (flow velocity: 1 m.s<sup>-1</sup>, Re: 3600) makeover biofilm structure from a cell clusters, streamers and patchy to a dense, thick and smooth biofilm.

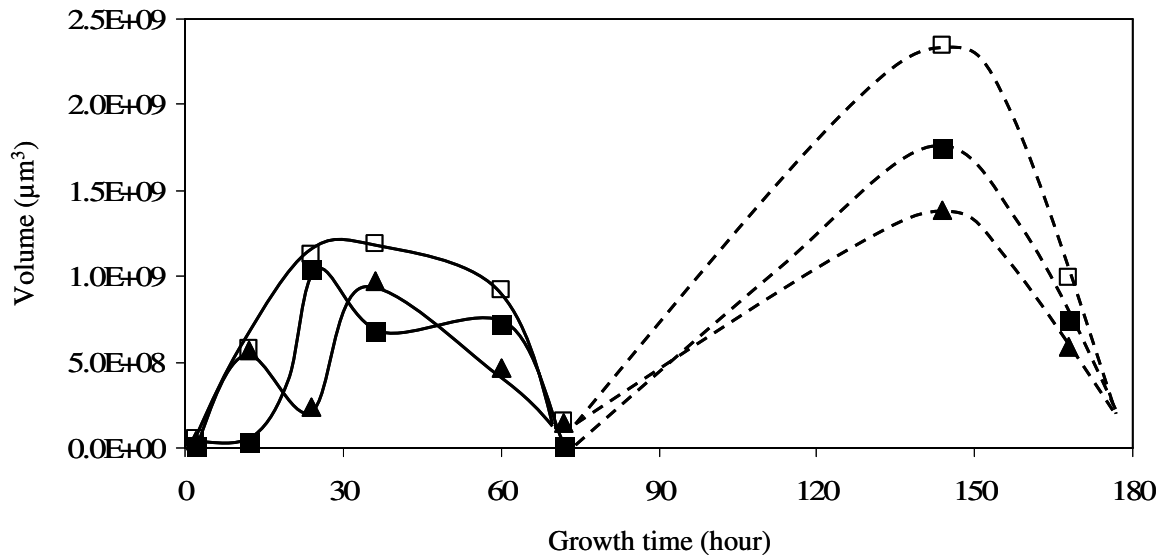
After 36 h of development, mature bacterial biofilm became weak and detachment process took place under shear stress. Indeed, with increasing in the thickness of biofilm, the gap within the reactor decreases, increasing 10% in the shear stress at the surface of biofilm. Thus, detachment is a function of both flow rate and biofilm morphology (EPS cohesive strength), and is considered as a combination of erosion and sloughing that corresponds to the removal of small and large aggregates, respectively (Characklis, 1990; Telgmann et al., 2004). Thus, discrete clusters were detached and depth profile was pseudo-bi-modal at 48 h (235 µm), showing that bacterial biofilm was a combination of broad fine elementary structure, leading to an heterogeneous biofilm. Small structures correspond to the remaining parts of detached portions of biofilm. The increasing of heterogeneity results from the dominance of sloughing process during detachment (Telgmann et al., 2004). Furthermore, detachment was increasing with time until 72 h, thickness reached the initial growing phase of biofilm (90 µm), and profile depth became mono-modal. This behavior can be explained by the breaking of part of biofilm structure, leading to changes in the local flow circulation and keeping the remaining structures exposed to strong liquid shear. Thereof, these structures can be extensively sloughed under shear stress (Stoodley et al., 1999b; Picioreanu et al., 2001).

Afterwards, a new phase of exponential growth took place with maximal thickness around 600 µm. Thus, shear stress at the surface of biofilm increased of 20%, leading to a succeeded detachment phase at 168 h as showed in figure 6. It should be noted that development between 72 and 144 h was not characterized because biofilm was detached during the staining for CLSM observations.

These successive cycles of growth and detachment of biofilm have been already reported by van Loosdrecht (1995), Stoodley (2001) and Horn (2003). Stoodley showed that under turbulent flow (flow velocity: 1 m.s<sup>-1</sup>, Re: 3600), cell clusters were continually growing and detaching, and 90% of detached aggregates were composed of small clusters (10<sup>2</sup>-10<sup>3</sup> µm<sup>2</sup>) and the 10% remaining correspond to large clusters (10<sup>3</sup>-10<sup>6</sup> µm<sup>2</sup>). Therefore, these later contribute over 60% of the total detached biomass.

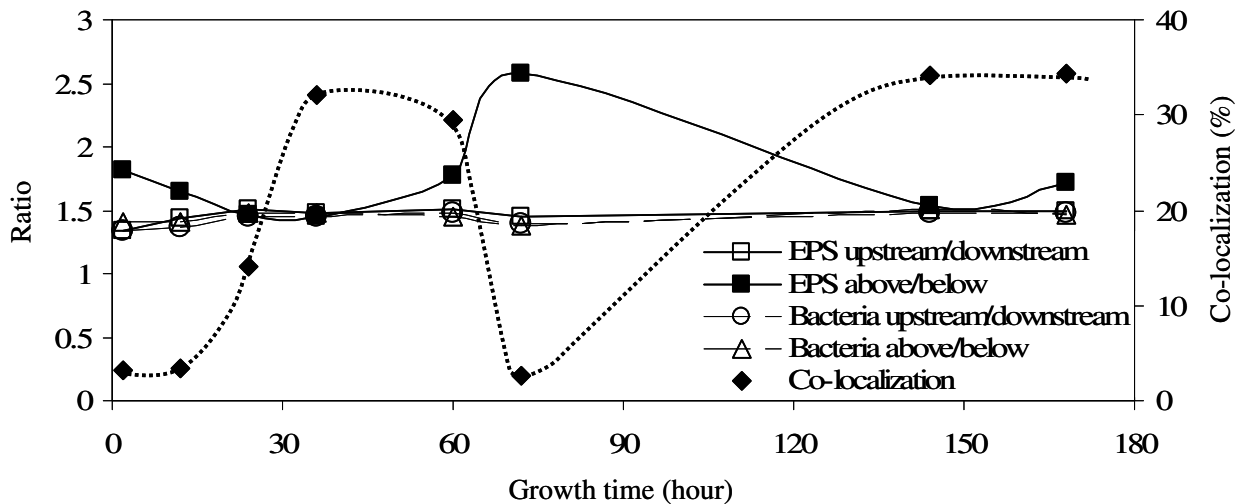
#### 4. EPS bacteria relationship

Figure 7 illustrates bacterial, EPS, and biofilm volumes as functions of growth time. The EPS volume was 3 times higher than bacteria one ( $1.3 \times 10^7 \mu\text{m}^3 \equiv 1.3 \times 10^8$  bacterial cells. $\text{cm}^{-2}$ ) after 2 h. CLSM observation of biofilm at this stage showed that it was composed with small aggregates and dispersed cells, fixed at the substratum, in which the largest cell clusters were approximately  $10^6 \mu\text{m}^3$  of volume. Similarly, Purevdorj (2002) found that biofilm was composed of circular microcolonies (thick:  $15 \mu\text{m}$ ) and a monolayer of cells, under laminar flow after 3 days of growth. Moreover, the ratio of EPS volume versus bacterial one ( $2.6 \times 10^8$  bacteria. $\text{cm}^{-2}$ ) increased 6.5 times after 12 h of development, and biofilm volume increased to  $5.7 \times 10^8 \mu\text{m}^3$ . This increase in ratio can correspond to enhancement of EPS production by bacterial cells, per unit volume in order to cement their adhesion to the substratum and to reduce the void spaces in the biofilm (Vandevivere and Kirchman, 1993; Flemming and Wingender, 2003; Costerton, 1999). Furthermore, CLSM observation showed that biofilm was composed with bigger aggregates (2-4 times) than those observed previously. Moreover, the co-localization between EPS and bacteria within biofilm was around 3% along the first 12 h (Fig. 8).



**Figure 7.** Biofilm (□), bacteria (■) and EPS (▲) densities curves plotted as functions of biofilm age.

Whereas, after 24 h, the EPS and bacteria volume ( $10^{10}$  bacteria.cm<sup>-2</sup>) decreased and increased, respectively. Thus, biofilm volume increased to  $1.1 \times 10^9$  μm<sup>3</sup>, structure became complex as shown previously and EPS/bacteria co-localization increased to 14% (Fig. 8). In fact, bacterial cells in the bulk medium adhere at the EPS matrix, leading to these modifications in biofilm composition. Similarly, Pereira (2001) reported the increasing of bacterial cells density to the great rate of substrate transported from bulk medium to the biofilm surface.



**Figure 8.** Percentage of EPS and bacteria colocalization (♦) within biofilm as a function of growth. EPS (and bacteria) ratios from upstream to downstream (□) (respectively (○)) and from top to bottom (■) (respectively (Δ)) as functions of biofilm age.

EPS synthesis increased strongly after 36 h of growth, while bacterial volume decreased lightly with a weak increasing of biofilm volume ( $1.2 \times 10^9$  μm<sup>3</sup>). Examination of biofilm using CLSM revealed a more compact biofilm. Thus, attached bacterial cells produce more EPS to create an efficient adhesion together, in order to consolidate their cohesion within the biofilm and to be protected from shear conditions. Thereby, biofilm reach the final maturation phase with a 32% of EPS/bacteria co-localization (Fig. 8). Evenly, Venugopalan (2005) showed that EPS production has a low level during the first 3 days and a sudden increase on the day 4 under laminar flow, for a *Sphingomonas sp.* biofilm.

As a consequence of detachment process, biofilm volume decreased ( $9.1 \times 10^8$  μm<sup>3</sup>) after 60 h, followed by a strong decrease in EPS volume, in contrast to bacterial one ( $7.1 \times 10^9$  bacteria.cm<sup>-2</sup>) which remained stationary. In fact, biofilms grown under luminary

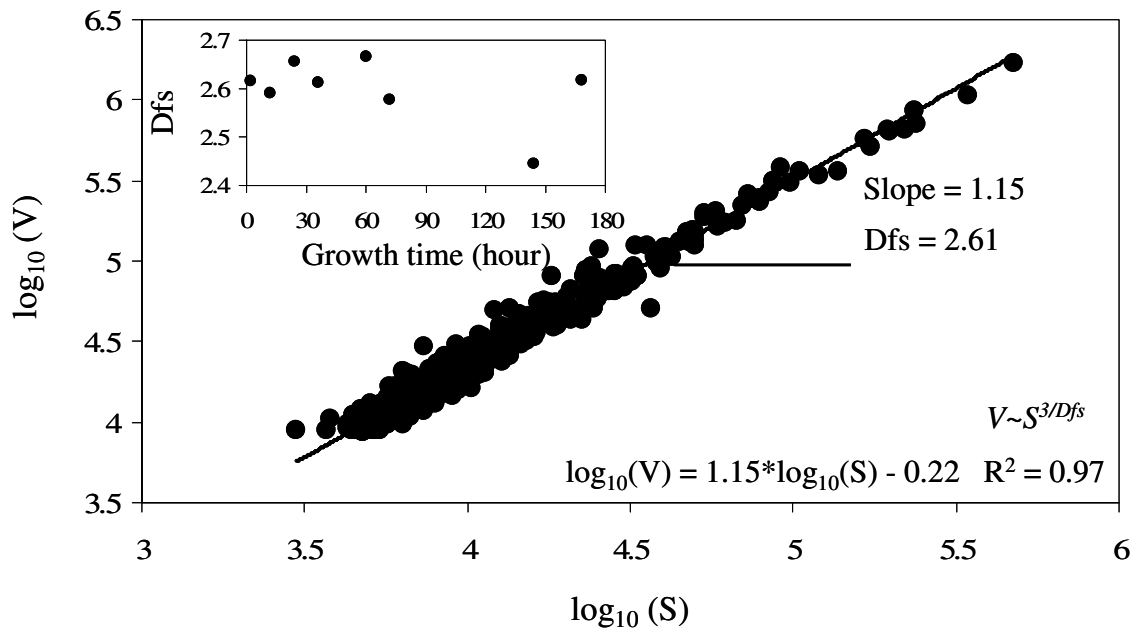
flow are patchy, fluffy with streamers oscillating in bulk medium and less dense than those grown under turbulent flow (Characklis, 1990; Stoodley et al., 1999a; Wijekoon et al., 2000). Thereof, biofilm was less resistant to detachment, leading to the decreasing of biofilm density. Thus, Vieira (1993) found that biofilm density was directly related to the shear conditions throughout growth. Despite detachment, co-localization percentage decreased lightly (29.5%), showing that detached portions were mainly composed of EPS at this stage of growth (Fig. 8). Thus, after massively sloughing (72 h), biofilm and bacterial densities decreased drastically to  $1.6 \times 10^8 \mu\text{m}^3$  and  $1.5 \times 10^7 \mu\text{m}^3$  ( $4.2 \times 10^8 \text{ bacteria.cm}^{-2}$ ), respectively. Therefore, EPS/bacteria co-localization decreased to the initial growth phase (2h) (Fig. 8). Eventually, a new growth cycle took place: the optimal biofilm volume was doubled just before detachment ( $1.7 \times 10^{10} \text{ bacteria.cm}^{-2}$ ). Nevertheless, the co-localization percentage remained approximately the same (34%) (Fig. 8).

Furthermore, the distribution of EPS and bacteria ratios within biofilm is illustrated in figure 8. Thus, the amount of EPS in the upstream and in the top of biofilm was higher than those in downstream (1.5 times) and in the bottom (1.5-2.5 times), respectively, along growth. In fact, this behavior shows that bacterial cells synthesis EPS in order to protect from shear condition imposed by physical environment. Thus, Stoodley (2002) suggested that differences in biofilm strength can correspond to a different physical arrangement of EPS matrix; Applegate and Bryers (1991) showed that bacterial cells increase their EPS synthesis under turbulent flow in order to regulate their strength.

On the other hand, the bacteria ratios followed those of EPS: the number of bacteria in the upstream and in the top of biofilm was 1.5 times higher than those in downstream and in the bottom, respectively, along growth. This manner of bacteria localization within biofilm can be explained by their trend to be near of nutrient and oxygen sources, in order to overcome limitations of mass transfer from bulk medium. Thus, Beyenal (1998) showed that nutrient effective diffusivity decreases towered the bottom to reach  $1.8 \times 10^{-10} \text{ m}^2.\text{s}^{-1}$ . Pereira (2001) found that under laminar flow, the cell density per unit area is higher in the upper regions of biofilm at day 7.

### 5. Fractal dimension

The volume (V) versus surface (S) relation was studied on reconstructed aggregates of biofilm. As shown in figure 9, results indicate that the volume follow a power law. The determination of Dfs for the biofilm after 168 h of growth was 2.61. This value is consistent with mass or volume fractal dimension previously reported in literature for bacterial biofilm after 24 h of growth (Hermanowicz et al., 1996). Further, this value was encountered during the determination of mass fractal dimension for environmental samples (Li and Ganczarczyk, 1989; Lee et al., 1996; Zartarian et al., 1997; Chaignon et al., 2002). Chaignon (2002) has found a close value ( $2.45 \pm 0.05$ ) in studying the floc fragmentation and re-growth of activated sludge aggregates under different shear conditions.



**Figure 9.**  $\log_{10}/\log_{10}$  plot of volume versus surface of biofilm aggregates. Fractal dimension  $Dfs = 3/\text{slope}$ . Inset show changes of fractal dimension as a function of biofilm age.

In addition, Dfs remained stationary along growth (inset Fig. 9) with  $2.60 \pm 0.07$  as average, indicating that biofilm roughness does not change with growth under laminar flow. Nevertheless, Zahid (1994) founded that Dfs ranges between 2.43 and 2.73 for a RBC biofilm growth from day 5 to 27, indicating that the roughness increases lightly with growth.

Nowadays, rare studies have carried out to determine mass or volume (3D) fractal dimension for bacterial biofilm. Therefore, major researches determine a 2D fractal dimension

(Df), based usually in the specification of a correlation between area and perimeter of biofilm in 2D images. Thus, for 2D images the Df ranges between 1 and 2 (Zartanian et al., 1996; Lewandowski et al., 1999; Yang et al., 2000; Chen and Chai, 2006), where the higher number corresponds to the rougher perimeter. Furthermore, Chen (2006) has classed Df in three subintervals [1, 1.5], [1.5, 1.8], [1.8, 2], in correlation with flow velocity and mass transfer which largely depend on intrinsic (biofilm growth, cells division, inhibition and death of bacteria, microbial strains) and extrinsic (concentration of substrate in bulk medium, hydrodynamic condition, and surface of substratum) factors. Thus, velocity flow and mass transfer can influence strongly the Df and the biofilm structure. According to that, high Df and high density of cell clusters were found under high mass flux and violent turbulent flow. Whereas, low Df and low cell clusters density were encountered under low mass flux and laminar flow.

Determination of 2D Df in different scales of growth showed that it remained almost the same ( $1.40 \pm 0.03$ ) indicating that biofilm surface remained constant in 2D scales (data not shown in this work). This Df correlates perfectly with the literature (Zartarian et al., 1996; Lewandowski et al., 1999; Yang et al., 2000; Jackson et al., 2001). For example, Yang (2000) showed that 2D Df of biofilm remains stable (1.372-1.365) from day 3 to 7, Jackson (2001) obtained a Df which increases from 1.3 to 1.5 until 4 day of growth, and Purevdorj (2002) indicated that Df was  $1.53 \pm 0.12$  on days 4 and 5 under a laminar flow.

## CONCLUSION

This work presents the biofilm reactor system and the structural quantification protocol, in order to study the effect of shear stress in the architecture of biofilm. Laboratory made Couette-Poiseuille reactor may be operated under laminar and turbulent flow by adjusting the inner cylinder rotation speed. At initial growth phase, biofilm is exposed to both a uniform shear rate and a constant mass transfer profile, and then shear rate may increase at biofilm surface with growth and with reduction of the thickness of annular gap.

CLSM acquisition using line by line excitation mode (Lambda-Strobing) of CLSM allows a separately collect of EPS and bacteria fluorescence signals from biofilm. In addition to the global biofilm characterization which is obtained with classic CLSM acquisitions, this kind of collect enables an advanced characterization of biofilm component.

Application of 3D deconvolution algorithm on CLSM optical sections increases the spatial resolution of signals and reduces the haze and blur from images, leading to a better definition of biofilm structure, evidencing fine structures and restoring the both sharpness and clarity of stack optical sections. Thus, this treatment is crucial before any morphometrique characterization of biofilm structure. Biofilm 3D reconstruction and structural parameters quantified in this paper appear to be sufficient and efficacy to evidence the effect of shear stress on biofilm growth.

Finally, it should be noted that this paper will be followed with a companion paper, comparing the effect of different shear stress conditions in the architecture of bacterial biofilms

## REFERENCES

- Abrahamson, M., Lewandowski, Z., Geesey, G., Skjåk-Bræk, G., Strand, W., Christensen, E. (1996) Development of an artificial biofilm to study the effects of a single microcolony on mass transport. *J. Microbiol. Methods.* 26, 161-169.
- Applegate, D.H., Bryers, J.D. (1991) Effects of carbon and oxygen limitations and calcium concentrations on biofilm removal processes. *Biotechnol. Bioeng.* 37, 17-25.
- Beyenal, H., Tanyolaç, A., Lewandowski, Z. (1998) Measurement of local effective diffusivity in Heterogeneous biofilms. *Water Sci. Technol.* 38, 171-178.
- Beynal, H., Lewandowski, Z. (2000) Combined effect of substrate concentration and flow velocity on effective diffusivity in biofilms. *Water Res.* 34, 528-538.
- Beyenal, H., Donovan, C., Lewandowski, Z., Harkin, G. (2004) Three-dimensional biofilm structure quantification. *J. Microbiol. Methods.* 59, 395-413.
- Camper, A.K., Jones, W.L., Hayes, J.T. (1996) Effect of growth conditions and substratum composition on the resistance of coliforms in mixed-population biofilms. *Appl. Environ. Microbiol.* 62, 4014-4018.
- Celmer, D., Oleszkiewicz, J.A., Cicek, N. (2008) Impact of shear force on the biofilm structure and performance of a membrane biofilm reactor for tertiary hydrogen-driven denitrification of municipal wastewater. *Water Res.* 42(12), 3057-3065.
- Chabaud, S., Andres, Y., Lakel, A., Le Cloirec, P. (2006) Bacteria removal in septic effluent: influence of biofilm and protozoa. *Water Res.* 40, 3109-3114.
- Chaignon, V., Lartiges, B.S., El Samrani, A., Mustin, C. (2002) Evolution of size distribution and transfer of mineral particles between flocs in activated sludges: an insight into floc exchange dynamics. *Water Res.* 36, 676-684.
- Characklis, W.G. (1990) Biofilm processes. *In: Characklis, W. G. & K. C. Marshall. Eds. Biofilms.* John Willey & Sons, Inc., New York, N.C. 195-231.
- Chen, L.M., Chai, L.H. (2006) A theoretical analysis on self-organized formation of microbial biofilms. *Physica A.* 370, 793-807.
- Chomik A., Dieterlen, A., Xu, C., Haeberlé, O., Meyer, J.J., Jacquy, S. (1997) Quantification in optical sectioning of some deconvolution algorithms in view of 3D image segmentation. *J. Opt.* 28, 225-233.
- Costerton, J.W. (1999) Introduction to biofilm. *Int. J. Antimicrob Agents.* 11, 217-221.
- Donlan, R.M., Piede, J.A., Heyes, C.D., Sani, L., Murga, R., Edmonds, P., El-Sayed, I., EL-Sayed, M.A. (2004) Model system of growing and quantifying *Streptococcus pneumoniae* biofilms in situ and in real time. *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 4980-4988.



Davies, D.G., Chakrabarty, A.M., Geesey, G.G. (1993). Exopolysaccharide production in biofilms: substratum activation of alginate gene expression by *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl. Environ. Microbiol.* 59, 1181-1186.

Dellile A., Quilès, F., Humbert, F. (2007) In situ monitoring of the Nascent *Pseudomonas fluorescens* biofilm response to variations in the dissolved organic carbon level in low-nutrient water by attenuated total reflectance-fourier transformation infrared spectroscopy. *Appl. Environ. Microbiol.* 73, 5782-5788.

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

Goeres, D.M., Loetterle, L.R., Hamilton, M.A., Murga, R., Kirby, D.W., Donlan, R.M. (2005) Statistical assessment of a laboratory method for growing biofilms. *Microbiology.* 151,757-762.

Haeberlé, O., Bicha, F., Simler, C., Dieterlen, A., Xu, C., Colicchio, B., Jacquy, S., Gramain, M.P. (2001) Identification of acquisition parameters from the point spread function of a fluorescent microscope. *Opt. Commun.* 196, 109-117.

Hermanowicz, S.W., Schindler, U., Wilderer, P. (1995) Fractal structure of biofilm: new tools for investigation of morphology. *Water Sci. technol.* 32,99-105.

Hermanowicz, S.W., Schindler, U., Wilderer, P. (1996) Anisotropic morphology and fractal dimensions of biofilms. *Water Res.* 30, 753-755.

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

Holmes T.J., Bhattacharyya, S., Copper, J.A., Hanzel, D., Krishnamurthi, V., Lin, W., Roysam, B., Szarowski, D.H., Turner, J.N. (1995) Light Microscopic images reconstructed by maximum likelihood deconvolution. *In*: J. B. Pawley. *Handbook of biological confocal microscopy*. Plenum Press, N.Y. 389-402.

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

Houhou, J., Lartiges, B.S., Mustin, C., Ghanbaja, J. (in preparation) Biofilm and suspended matter in the sewer system: Examination at various scales.

Hu, Z. (2008) Electricity generation by a baffle-chamber membraneless microbial fuel cell. *J. Power Sources.* 179, 27-33.

Jackson, G., Beyenal, H., Ress, W.M., Lewandowski, Z. (2001) Growing reproducible biofilms with respect to structure and viable cell counts. *J. Microbiol. Methods.* 47, 1-10.

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

Kragelund L., Nybroe, O. (1994) Culturability and Expression of Outer Membrane Proteins during Carbon, Nitrogen, or Phosphorus Starvation of *Pseudomonas fluorescens* DF57 and *Pseudomonas putida* DF14. *Appl. Environ. Microbiol.* 60, 2944-2948.

Lawrence, J.R., Korber, D.R., Hoyle, B.D., Costerton, J.W., Caldwell, D.E. (1991) Optical sectioning of microbial biofilms. *J. bacterial.* 173, 6558-6567.

Lazarova V., Manem, J. (1995) Biofilm characterization and activity analysis in water and wastewater treatment. *Water Res.* 29, 2227-2245.

Lee, D.J., Chen, G.W, Liao, Y.C., Hsieh, C.C. (1996) On the free-settling test for estimating activated sludge floc density. *Water Res.* 30, 541-550.

Lewandowski Z., Stoodley, P. (1995) Flow induced vibrations, drag force, and pressure drop in conduits covered with biofilm. *Wat. Sci. Technol.* 32, 19-26.

Lewandowski, Z., Webb, D., Hamilton, M., Harkin, G. (1999) Quantifying biofilm structure. *Wat. Sci. Technol.* 39, 71-76.

Lewandowski Z., Beyenal, H., stookey, D. (2004) Reproducibility of biofilm processes and the meaning of steady state in biofilm reactors. *Wat. Sci. Technol.* 49, 359-364.

Li, D.H., Ganczarczyk, J.J. (1989) Fractal geometry of particle aggregates generated in water and wastewater treatment processes. *Environ. Sci. Technol.* 23, 1385-1389.

Mallet, J.L. (1989) Discrete smooth interpolation. *Assoc. Computer Machinery, Transaction Graphics.* 8, 121-144.

Mallet, J.L. (2002) *Geomodeling.* Oxford University Press, New York, 624pp.

Massol-Deyá A.A., Whallon, J., Hickey, R.F., Tiedje, J.M. (1995) Channel structures in aerobic biofilms of fixed-film reactors treating contaminated groundwater. *Appl. Environ. Microbiol.* 61, 769-777.

Møller S., Sternberg, C., Andersen, J.B., Christensen, B.B., Romos, J.L., Givskov, M., Molin, S. (1998) In situ gene expression in mixed-culture biofilms: evidence of metabolic interactions between community members. *Appl. Environ. Microbiol.* 64, 721-732.

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

Pereira, M.O., Kuehn, M., Wuertz, S., Neu, T., Melo, L.F. (2002) Effect of flow regime on the architecture of a *Pseudomonas fluorescens* biofilm. *Biotechnol. Bioeng.* 78, 164-171.

Petropoulos P., Gilbride, K.A. (2005) Nitrification in activated sludge batch reactors is linked to protozoan grazing of the bacterial population. *Can. J. Microbiol.* 51, 791-799.

Petyon, M.B. 1996. Effects of shear stress and substrate loading rate on *Pseudomonas aeruginosa* biofilm thickness and density. *Water Res.* 30, 29-36.

Picioreanu, C., van Loosdrecht, M.C.M., Heijnen, J.J. (1998) Mathematical modeling of biofilm structure with a hybrid differential discrete cellular automaton approach. *Biotechnol. Bioeng.* 58, 101-116.

Picioreanu, C., van Loosdrecht, M.C.M., Heijnen, J.J. (2001) Two-dimensional model of biofilm detachment caused by internal stress from liquid flow. *Biotechnol. Bioeng.* 72, 205-218.

Purevdorj, B., Costerton, J.W., Stoodley, P. (2002) Influence of hydrodynamics and cell signaling on the structure and behavior of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 4457-4464.

Russ, J.C. (2007) *The image processing handbook. Fifth edition.* CRC Press, Taylor and Francis Group. p. 468-476.

Schaefer, L.H., Schuster, D., Herz, H. (2001) Generalized approach for accelerated maximum likelihood based image restoration applied to three-dimensional fluorescence microscopy. *J. Microsc.* 204, 99-107.

Silverstein, A.D., Henry, G.D., Evans, B., Pasmore, M., Simmons, C.J., Donatucci, C.F. (2006) Biofilm formation on clinically noninfected penile prostheses. *J. Urol.* 176, 1008-1011.

Silyn-Roberts, G., Lewis, G. (1997) A technique in confocal laser microscopy for establishing biofilm coverage and thickness. *Wat. Sci. Technol.* 36, 117-124.

Stewart, P.S., Murga, R., Srinivasan, R., de Beer, D. (1995) Biofilm structural heterogeneity visualized by three microscopic methods. *Water Res.* 29, 2006-2009.

Stoodly, P., de Beer, D., Lewandowski, Z. (1994) Liquid flow in biofilm systems. *Appl. Environ. Microbiol.* 60, 2711-2716.

Stoodley, P., Lewandowski, Z., Boyle, J.D., Lappin-Scott, H.M. (1998) Oscillation characteristics of biofilm streamers in turbulent flowing water as related to drag and pressure drop. *Biotechnol. Bioeng.* 57, 536-544.

Stoodley, P., Dodds, I., Boyle, J.D., Lappin-Scott, H.M. (1999a). Influence of hydrodynamics and nutrients on biofilm structure. *J. Appl. Microbiol.* 85, 19S-28S.

Stoodley, P., Boyle, J.D., de Beer, D., Lappin-Scott, H.M. (1999b) Evolving perspectives of biofilm structure. *Biofouling.* 14, 75-90.

Stoodly, P., Wilson, S., Haul-Stroudly, L., Boyle, J.D., Lappin-Scott, H.M., Costerton, J.W. (2001) Growth and detachment of cell clusters from mature mixed-species biofilms. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 5608-5613.

Stoodly, P., Cargo, R., Rupp, C.J., Wilson, S., Klapper, I. (2002) Biofilm material properties as related to shear-induced deformation and detachment phenomena. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 29, 361-367.

Tsai, Y.P. (2006) Interaction of chlorine concentration and shear stress on chlorine consumption, biofilm growth rate and particle number. *Bioresource Technol.* 97, 1912-1919.

Telgmann, U., Horan, H., Morgenroth, E. (2004) Influence of growth history on sloughing and erosion from biofilms. *Water Res.* 38, 3671-3684.

van Loosdrecht, M.C.M., Eikelboom, D., Gjaltema, A., Mulder, A., Tjihuis, L., Heijnen, J.J. (1995) Biofilm structures. *Wat. Sci. Technol.* 32, 35-43

Vandevivere, P., Kirchman, D.L. (1993) Attachment stimulates Exopolysaccharide synthesis by a bacterium. *App. Environ. Microbiol.* 59, 3280-3286.

Vieira, M.J., Melo, L.F., Pinheiro, M.M. (1993) Biofilm Formation: hydrodynamic effects on internal diffusion and structure. *Biofouling.* 7, 67-80.

Venugopalan, V.P., Kuehen, M., Hausner, M., Springael, D., Wilderer, P.A., Wuertz, S. (2005) Architecture of a nascent *Sphingomonas sp.* Biofilm under varied hydrodynamic conditions. *App. Environ. Microbiol.* 71, 2677-2686.

Wäsche, S., Horan, H., Hempel, D.C. (2002) Influence of growth conditions on biofilm development and mass transfer at the bulk/biofilm interface. *Water Res.* 36, 4775-4784.

Wijeyekoon, S., Mino, T., Satoh, H., Matsuo, T. (2000). Growth and novel structural features of tubular biofilms produced under different hydrodynamic conditions. *Wat. Sic. Technol.* 41, 129-138.

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

Yang, X., Beyenal, H., Harkin, G., Lewandowski, Z. (2000) Quantifying biofilm structure using image analysis. *J. Microbiol. Methods.* 39, 109-119.

Yang, X., Beyenal, H., Harkin, G., Lewandowski, Z. (2001) Evaluation of biofilm image thresholding methods. *Water Res.* 35, 1149-1158.

Yoon, S.S., Hennigan, R.F., Hilliard, G.M., Ochsner, U.A., Parvatiyar, K., Kamani, M.C., Allen, H.M., Dekievit, T.R., Gardner, P.R., Schwab, U., Rowe, J.J., Iglewski, B.H., McDermott, T.R., Mason, R.P., Wozniak, D.J., Hancock, R.E.W., Parsek, M.R., Noah, T.L., Boucher, R.C., Hassett, D.J. (2002) *Pseudomonas aeruginosa* anaerobic respiration in biofilms: relationships to cystic fibrosis pathogenesis. *Dev. Cell.* 3, 593-603.

Zahid, W., Ganczarczyk, J. (1994) A technique for a characterization of RBC biofilm surface. *Water Res.* 28, 2229-2231.

Zartarian, F., Mustin, C, Villemin, G., Ait-Ettager, T., Thill, A., Bottero, J.Y., Mallet, J.L., Snidaro, D. (1997). Three-dimensional modeling of an activated sludge floc. *Langmuir*. 13, 35-40.

Zhu D., Razaz, M., Lee, R. (2005). Adaptive penalty likelihood for reconstruction of multidimensional confocal microscopy images. *Comput. Med. Imaging Graph.* 29, 319-331.

# Conclusions et perspectives

## CONCLUSIONS

Ce doctorat s'articule autour de trois problématiques principales: quantification des apports d'eau au sein du réseau d'assainissement en période de temps sec, spéciation des minéraux phosphatés et des phases porteuses des métaux lourds dans les différents compartiments du réseau, dynamique d'échange de matières entre biofilms et matières en suspension des eaux usées. L'identification et la quantification des sources d'eau alimentant le réseau d'assainissement s'avère indispensable avant toute démarche d'analyse et d'étude de l'évolution des paramètres physicochimiques et microbiologiques au sein du réseau, de façon à prendre en compte l'effet de la dilution provenant de l'infiltration des eaux parasites non ou peu polluées (eau de nappe, eau de percolation). Cette démarche est basée sur l'étude des signatures isotopiques stables  $\delta^{18}\text{O}_{\text{H}_2\text{O}}$  et  $\delta\text{D}$  de la molécule d'eau et  $\delta^{34}\text{S}$  et  $\delta^{18}\text{O}_{\text{SO}_4}$  du sulfate dissous. Elle a permis de mettre en évidence la présence de réseaux étanches qui ne collectent que des eaux usées et la présence de réseaux perméables à travers lesquels les eaux parasites s'infiltrent et les eaux usées s'exfiltrent. Cette évaluation géochimique de l'étanchéité du système d'assainissement est à développer car elle pourrait remplacer les techniques usuelles de surveillance du réseau que sont les caméras télescopiques ou bien les visualisations à l'œil dans les collecteurs visitables.

Dans ce mémoire de thèse, le rôle de réacteur bio-physico-chimique du réseau d'assainissement apparaît dans l'évolution de la nature minéralogique des phases phosphatées et des phases porteuses des métaux lourds dans les matières en suspension, les biofilms et les sédiments. Les phases phosphatées évoluent pendant leur transport dans les eaux usées pour donner des phosphates d'aluminium et de calcium vers l'aval du réseau d'assainissement. Ces phosphates sont moins assimilables par les bactéries ce qui devrait influencer le fonctionnement des stations d'épuration s'appuyant sur une élimination biologique des phosphates. La spéciation des phases porteuses de métaux lourds a permis d'améliorer notre compréhension du cycle géochimique de ces éléments dans le réseau d'assainissement urbain. Les activités domestiques sont considérées comme la principale source des polluants métalliques véhiculés dans le réseau en période de temps sec. Dans le réseau d'assainissement les métaux lourds sont transportés par des phases de différentes natures minéralogiques d'origine anthropique ou néoformées. Les sulfures se forment principalement dans les portions anaérobiques du réseau par précipitation des métaux lourds solubles et par sulfurisation d'alliage de métaux lourds suite à leur interaction avec le sulfure d'hydrogène

libéré par la respiration des bactéries sulfato-reductrices. Cette diagenèse précoce démarre dans les dépôts des regards de façade et au niveau des biofilms bactériens développés sur les parois des collecteurs.

Ces dépôts sulfurés sont ensuite mobilisés et transportés sous effet de l'écoulement dans le réseau d'assainissement où ils sédimentent, la formation des sulfures pouvant se poursuivre au niveau des sédiments. Les biofilms bactériens sont à leur tour soumis au détachement sous l'effet des cisaillements d'origine hydrodynamique et sont transportés avec les matières en suspension. La mise en évidence par microscopie confocale de la présence de fibres de cellulose dans la structure des biofilms et l'identification des morceaux de biofilms dans les eaux usées, témoignent d'une dynamique d'échange de matières entre biofilms et eaux usées. Ces matrices évoluent également durant leur transport dans le réseau d'assainissement suite à la biodégradation de la matière organique particulaire par les bactéries.

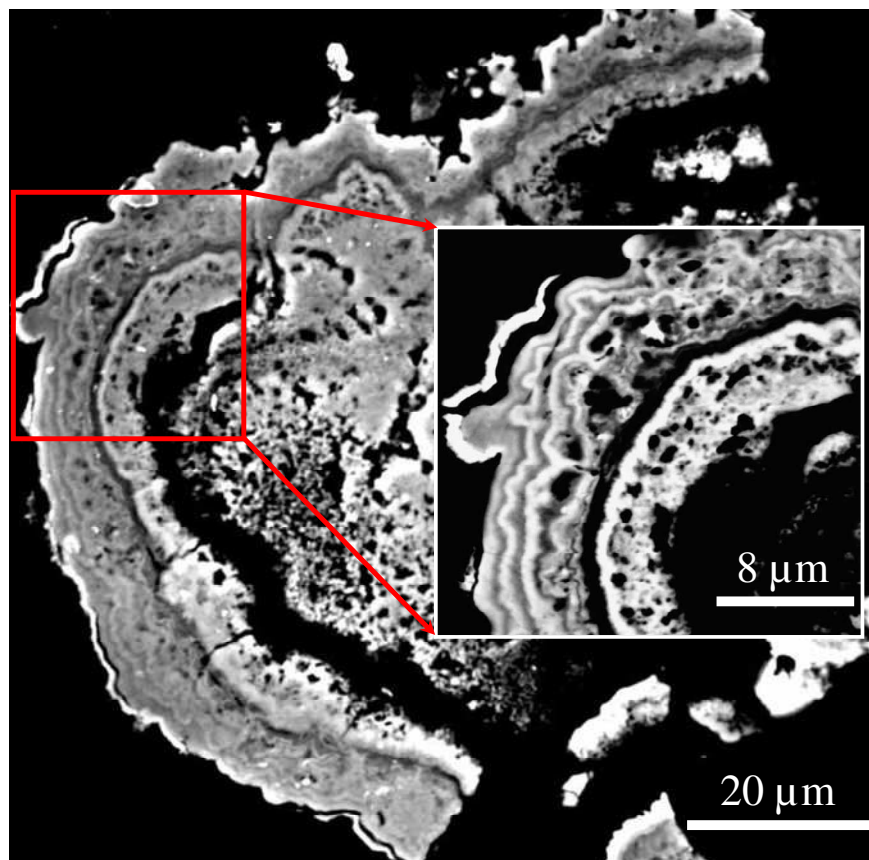
L'effet de l'hydrodynamisme sur la croissance et le détachement des biofilms bactériens a été simulé au sein d'un réacteur pilote, observé par microscopie confocale et analysé structurellement par le développement d'un protocole de quantification architecturale des biofilms par traitement d'images.



## **PERSPECTIVES**

Plusieurs pistes restent à explorer. Si l'étude de la composition isotopique des sulfates dissous s'est révélée appropriée pour tracer les sources d'eau circulant dans les parties oxygénées du réseau, il serait maintenant intéressant d'étudier l'évolution de ces mêmes isotopes ( $^{32}\text{S}/^{34}\text{S}$ ) dans les portions plus stagnantes afin de quantifier l'implication des bactéries sulfato-réductrices dans la précipitation des sulfures de métaux lourds,

La caractérisation de la surface des phases sulfurées porteuses de métaux lourds par microscopie électronique à balayage a montré que ces particules possèdent une composition chimique complexe. L'observation en microscopie électronique à balayage de l'intérieur de ces particules après inclusion en résine et polissage montre la présence de stries de croissance (Fig. 1). Ces stries de croissance peuvent correspondre à une signature saisonnière et donner une information sur l'âge des particules. Une série d'observations a été réalisée sur une cinquantaine de particules de sédiments du réseau pré-concentrés par séparation au bromoforme. L'analyse et l'interprétation des résultats sont à effectuer et devraient donner une information sur les conditions de néoformation de ces phases sulfurées.



**Figure 1.** Image en électron rétrodiffusé d'une particule de sulfure obtenu par séparation au bromoforme. Présence d'une série de stries de croissance entourant la particule (insert Fig.1)

Un dispositif expérimental a été également mis en place afin d'étudier les conditions de formation des phases sulfures. Pour cela, des particules métalliques et des sulfures de métaux lourds (Cu, Pb, Zn, FeS<sub>2</sub>, CuFeS<sub>2</sub>, PbS, ZnS) de 50 à 80 µm en taille ont été placés dans des sachets filtres en nylon de porosité de 0,2 µm et 0,45 µm. Une partie de ces sachets a été mise en suspension dans les eaux usées et l'autre partie a été enterrée dans les sédiments d'une station de relevage. Après un mois d'expérience, les minéraux ont été récupérés, inclus en résine, polis et ensuite analysés au microscope électronique à balayage. L'exploitation de ces résultats et la réalisation d'expériences supplémentaires avec une durée d'incubation plus longue devrait donner un historique complet sur la néoformation des sulfures et l'âge des sédiments dans le réseau d'assainissement urbain.

L'utilisation du réacteur pilote afin d'étudier l'effet de l'hydrodynamisme sur la croissance et le détachement du biofilm bactérien semble encore plus prometteuse. Trois expériences supplémentaires avec des gradients de cisaillement de 1, 6 et 60 s<sup>-1</sup> ont été effectuées durant ce doctorat, mais la lourdeur du traitement des images n'a pas permis d'exploiter les données dans le cadre de ce mémoire. Outre la possibilité de simuler les différents types d'écoulement auquel le biofilm peut être soumis - flux laminaire ou turbulent - la nature des souches bactériennes ainsi que leur fonctionnement en présence de quantités variables de métaux lourds permettront de simuler la néoformation des phases sulfures au sein des biofilms ainsi que les conditions de leur détachement et remise en suspension dans les eaux usées. Des bactéries sensibles aux métaux (Cd, Pb et Zn) pourront être également employées pour développer les biofilms. Ces bactéries contiennent des gènes fluorescents dont l'expression est déclenchée par une concentration seuil de métaux dans le cytoplasme. L'évaluation de la fluorescence en fonction de la profondeur par microscopie confocale à balayage laser renseignera sur les mécanismes de diffusion des métaux lourds au sein du biofilm.

# **ANNEXES**

Dans ce mémoire de thèse, les résultats sont rédigés sous forme d'articles scientifiques afin de faciliter leurs publications dans les journaux scientifiques. En conséquence, et en raison de la limitation du nombre de pages par les éditeurs, la partie «Matériels et méthodes» est souvent réduite. Ainsi, ultérieurement, il est possible que certains chercheurs et étudiants éprouvent des difficultés à reproduire les expériences ou bien à appliquer les protocoles analytiques sur leurs échantillons. Pour éviter ce problème, Ce chapitre vient présenter une étude détaillée des techniques et des protocoles analytiques développés et suivis au cours de cette thèse.

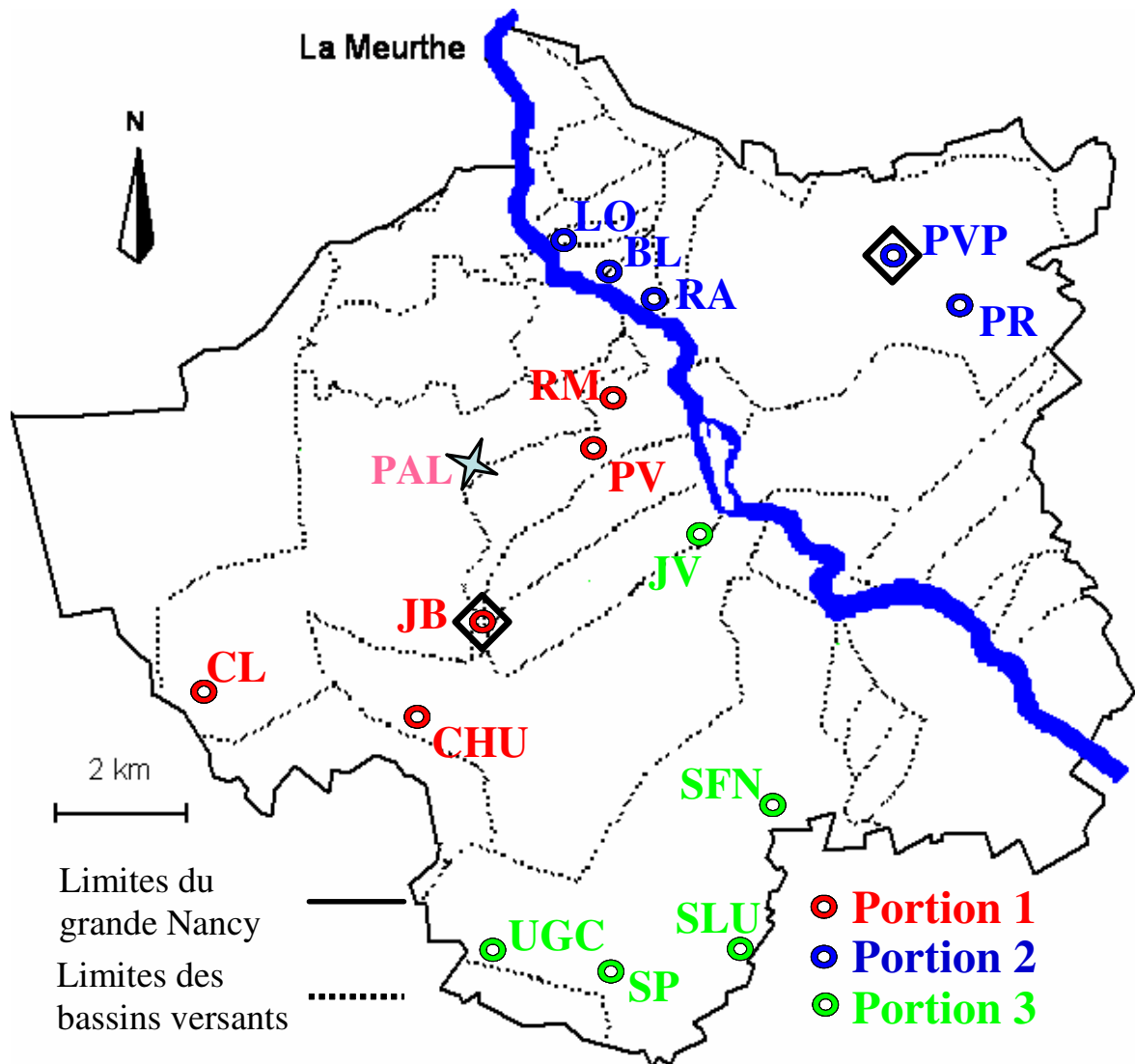
## **I.1 SITE DE PRELEVEMENT**

### **I.1-1 Localisation des sites de prélèvements**

La Communauté Urbaine du Grand Nancy (CUGN) a été choisie comme site d'étude. Ce choix est dû à l'implantation du laboratoire au sein de cette collectivité territoriale, ce qui facilite les campagnes de prélèvement. De plus, le réseau d'assainissement de cette communauté est représentatif pour 40% des villes françaises. La CUGN est située dans le département de Meurthe et Moselle, faisant partie de la région Lorraine, au nord-est de la France. La CUGN est répartie sur les 2 côtes de la Meurthe, rivière qui traverse la ville du Sud-Est au Nord-Ouest. Ceci implique des températures contrastées entre les saisons: gel en hiver avec des températures inférieure à 0°C et chutes de neige intenses, été chaud avec des événements orageux et pluviaux. Les précipitations annuelles moyennes sont de l'ordre de 760 mm. Les vents sont généralement faibles sans direction dominante, avec une vitesse moyenne qui ne dépasse pas les 35 Km/h (données 2005 de la station météo localisée à Essey-Lès-nancy).

Créée en décembre 1995, la CUGN est composée de 20 communes, regroupant environ 270 000 habitants (60000 sur la rive droite et 210000 sur la rive gauche), et s'étend sur 19300 hectares dont 14400 forment la rive gauche de la commune (Figure I-1). La ville est approvisionnée en eau potable par un captage d'eau superficielle dans les alluvions de la Moselle à Mesein (localisée Sud de Nancy). L'eau est acheminée à la station de potabilisation par l'intermédiaire de deux aqueducs de 11 Km de longueur. En cas de pollution ou d'augmentation de la turbidité de la Moselle, le prélèvement est assuré dans une réserve de secours de 3 bassins d'une capacité totale de  $2,5 \times 10^6 \text{ m}^3$ . La station assure une distribution

journalière de 67600 m<sup>3</sup>, par l'intermédiaire de 950 Km de conduites et 33 réservoirs de stockage. Une étude faite par le service de gestion du réseau de distribution a montré qu'en moyenne 350 fuites sont détectées par an. Il en résulte une perte de 26% des eaux distribuées par infiltration dans la nappe phréatique.



**Figure I-1:** Carte géographique de la communauté urbaine du Grand Nancy (CUGN). Les lignes pointillées représentent les limites des bassins versants de la CUGN. Les points en rouge, bleu et vert correspondent aux sites de prélèvements sélectionnés le long des trois portions choisies (5 sites par portions). Les deux losanges noirs indiquent les points de prélèvements de 24 heures. L'étoile bleu ciel correspond à la fosse de dessablage à la rue Palissot (prélèvement des sédiments).

D'un autre côté, le réseau d'assainissement urbain de la communauté comprend environ 1200 Km de collecteurs dont 250 Km visitables, le diamètre des collecteurs varie de 20 cm à 250 cm. Suite à la localisation géographique de la CUGN dans la côte de la vallée du

département de la Meurthe, le réseau d'assainissement est conçu avec une pente moyenne de 5%. Ce réseau est divisé en deux parties: un réseau unitaire dans la partie centrale de la commune qui collecte les eaux usées domestiques, industrielles et pluviales, et un réseau séparatif généralement situé dans les communes périphériques de la CUGN qui collecte les eaux usées domestiques. Les collecteurs sont construits à 60% en béton et 40% en pierre de taille (surtout dans la commune de Nancy). Le réseau est équipé de 45 déversoirs d'orage afin de protéger la station d'épuration des inondations causées par les forts événements pluviaux, ainsi que de 25 bassins de rétentions d'eau d'une capacité de 180000 m<sup>3</sup> permettant de limiter les rejets d'eaux polluées du réseau unitaire (eaux usées et pluviales) dans la Meurthe.

Une visite de surface du réseau d'assainissement a été effectuée grâce à l'aide précieuse du personnels du service hydraulique de la CUGN, suivie d'une étude des installations municipales (stations d'alertes, déversoirs d'orages, ...) et des travaux réalisés (nature des eaux collectées, temps de résidence, débits, ...) au sein du réseau.

Enfin, trois portions principales, représentatives du réseau d'assainissement de la CUGN, ont été sélectionnées afin de réaliser notre étude. Le nombre de points de prélèvements a été déterminé par la capacité à traiter les échantillons. La figure I-1 illustre la localisation géographique des points de prélèvements réalisés dans les trois portions du réseau. Le premier réseau est représenté en rouge: il est équipé par une station d'alerte (mesure du débit, pH, conductivité, température, potentiel d'oxydoréduction) au point Jardin Botanique (JB) afin de détecter les pollutions accidentelles. Le deuxième réseau est indexé en bleu: il dispose d'un déversoir d'orage afin d'éviter l'inondation de la station d'épuration lors des événements orageux et d'une station d'alerte. Enfin, le troisième réseau est indiqué en vert. Deux protocoles de prélèvements ont été suivis au cours de cette étude, un prélèvement en allant de l'amont vers l'aval du réseau afin d'étudier l'évolution de la qualité des eaux en fonction du temps de séjour dans le réseau, et un prélèvement ponctuel pendant 24 heures afin de suivre l'évolution locale de la qualité des eaux en fonction du temps. Les sites de prélèvements de 24 heures sont indiqués par des losanges noirs sur la carte (Figure I-1). Au total, 8 campagnes de prélèvement ont été effectuées, 6 selon la première méthode et 2 selon la deuxième. Un dernier point de prélèvement (PAL) a été choisi afin de prélever des sédiments (Figure I-1). Ce point correspond à une fosse de dessablage située dans la rue Palissot à Nancy ville. Le tableau I-1 illustre les dates de prélèvement, les références et les localisations GPS des sites, la nature des collecteurs (séparatif, unitaire), la nature des eaux collectées et le temps de résidence des eaux usées dans les collecteurs. Enfin, afin d'avoir une caractérisation physico-chimique globale des sédiments du

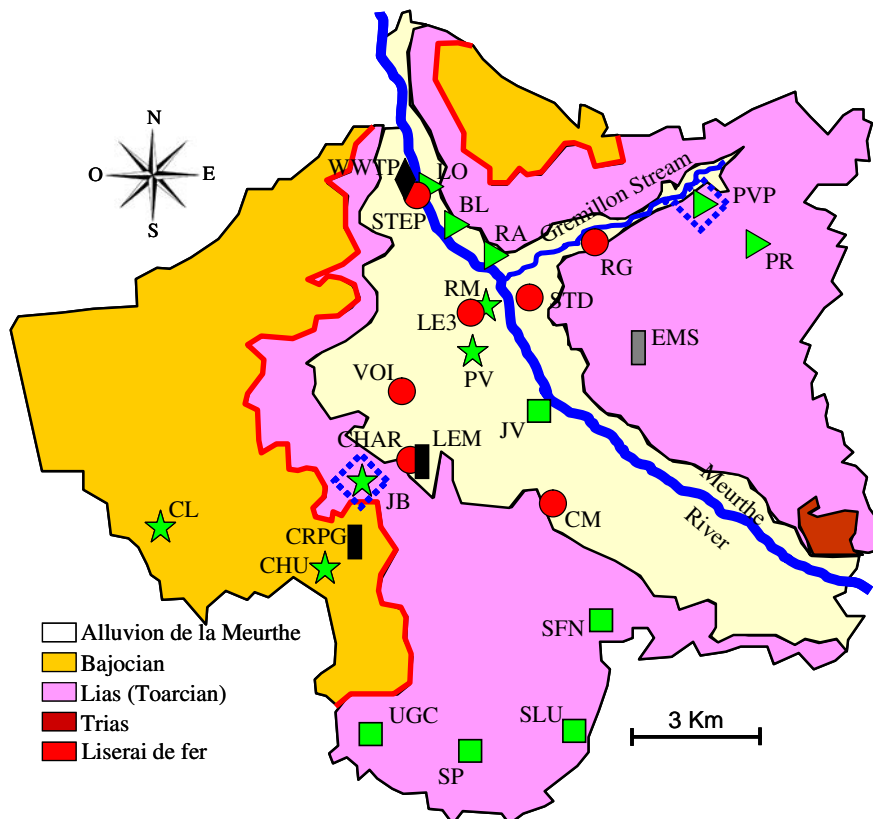
réseau d'assainissement de l'amont vers l'aval, des échantillons ont été prélevés dans des trois regards de façade (connecteur qui relie le réseau privé au réseau municipal). Des dépôts dans sept siphons d'évier ont été également raclés dans sept maisons différentes.

**Tableau I-1:** Illustration des dates et des caractéristiques des sites de prélèvement sélectionnés au sein de trois portions du réseau : références, localisations GPS, nature des collecteurs et types des eaux collectées et leurs temps de transfert. Ce dernier est déterminé par traçage à la fluorescéine par le personnel du service hydraulique de la CUGN.

Réseau et date (jj-mm-aaaa)	Point de prélèvement	Référence	Coordonnées GPS	Nature du réseau	Type d'eau collectée	Temps de transfert
1 30-11-2004 26-07-2005 26-10-2006	Clairlieu	CL	48° 39.471N 006° 07.262E A : 343	Séparatif	Résidentiel	-
	Centre Hospitalier Universitaire	CHU	48° 39.084N 006° 08.966E A : 393	Séparatif	Hospitalier et résidentiel	-
	Jardin Botanique	JB	48° 39.813N 006° 09.396E A : 294	Séparatif	Résidentiel + Lycée +IUT	18 min
	Place des Vosges	PV	48° 41.167N 006° 11.301E A : 226	Unitaire	Résidentiel et commercial	1h 05min
	Rue de la Mothe	RM	48° 41.737N 006° 11.732E A : 211	Unitaire	Petit résidence	45 min
2 08-03-2005 26-10-2006	Place de la République	PR	48° 42.208N 006° 15.562E A : 222 m	Séparatif	Résidentiel + Village	-
	Porte Verte Pulnoy	PVP	48° 42.552N 006° 14.676E A : 212 m	Séparatif	Commercial et industriel	49 min
	Rue Alexandre	RA	48° 42.094N 006° 12.068E A : 207 m	Séparatif	Résidentiel et commercial	2h 45min
	Blanchisserie	BL	48° 42.445N 006° 11.038E A : 178 m	Unitaire	Résidentiel et industriel	1h 29min
	Lion d'Or	LO	48° 42.748N 006° 10.782E A : 189 m	Unitaire	Résidentiel et commercial	-
3 27-07-2005	UGC Ludres	UGC	48° 37.220N 006° 10.507E A : 212 m	Séparatif	Résidentiel et commercial	-
	Rue Pasteur, Caserne des pompiers	SP	48° 36.992N 006° 11.048E A : 250 m	Séparatif	Résidentiel et commercial	30 min
	Station de relevage de Ludres	SLU	48° 37.008N 006° 12.067E A : 232 m	Unitaire	Industriel	1h 45min
	Station de Fleville Nord	SFN	48° 38.290N 006° 12.782E A : 202 m	Unitaire	Résidentiel et commercial	53 min
	Jarville	JV	48° 40.379N 006° 12.710E A : 193 m	Unitaire		2h 45min

En plus, une caractérisation physico-chimique et géochimique des nappes aquifères de la CUGN a été également réalisée afin d'obtenir des références des eaux de nappe et d'étudier l'infiltration de la nappe phréatique dans le réseau d'assainissement. En effet, la nappe des alluvions anciennes et récentes de la communauté est surveillée grâce à 44 piézomètres répartis sur les deux rives de la Meurthe. Une étude préliminaire de ces piézomètres a été faite (localisation par rapport aux 3 portions du réseau d'assainissement, accessibilité, diamètre, profondeur, niveau d'eau) en se basant sur le rapport du Service Hydrogéologique et Géotechnique de la CUGN (octobre 2000), et 7 piézomètres ont ensuite été sélectionnés (Figure I-2) afin de réaliser notre étude, suite à 2 campagnes de prélèvement (01 décembre 2005 et 25 octobre 2006). Le tableau I-2 récapitule les dates de prélèvement, les références et les localisations GPS des 7 piézomètres sélectionnés et leurs caractéristiques (diamètre, profondeur et niveau d'eau par rapport au sol).

Des eaux de robinet (dix échantillons) ont également subi une analyse physico-chimique et géochimique afin d'avoir une référence sur les eaux de robinet déchargées dans le réseau d'assainissement après utilisation dans les résidences, les commerces et les industries.



**Figure I-2 :** Carte géologique de la CUGN (BRGM). Sites de prélèvements des eaux usées indiqués en vert, des piézomètres en rouge et de l'eau potable en rectangle noir. Le site LEM correspond également à la suivie du signal isotopique des eaux météoriques. Le rectangle gris indique la station météo à Essey-Lès-Nancy



**Tableau I-2:** Récapitulation des localisations (GPS) et des caractéristiques des piézomètres choisis (diamètre, profondeur et niveau d'eau par rapport au sol) selon le réseau de surveillance piézométrique de la CUGN, fiches d'actualisation des ouvrages (Service Hydrologique et Géotechnique, octobre 2000)

Date (jj-mm-aaaa)	Point de prélèvement	Référence	Coordonnées GPS	Diamètre du piézomètre (cm)	Profondeur du piézomètre (m)	Profondeur eau/sol (m)
01-12-2005 25-10-2006	Parc du Charmois	CHAR	48° 40.065N 006° 10.414E A: 242m	5	5	0,88
	Nancy thermal	VOI	48° 40.654N 006° 10.23E A: 242m	5	11,5	7,63
	Parc Charles III	LE3	48 °41.341N 006° 11.487E A: 238m	5	7	3
	Stade Victor	STD	48° 41.334N 006° 12.104E A: 216m	11.5	3,67	-
	Rue Roland Garros	RG	48° 41.998N 006° 13.209 E A: 206m	5	5,5	1,12
	Station d'épuration de Malzéville	STEP	48° 42.641N 006° 10.509E A: 185m	100 (puits)	6,55	4,7
	Château Montaigut	CM	48° 39.816N 006° 12.977E A: 232m	100 (puits)	9,20	-

## I.1-2 Modalités des prélèvements

Les campagnes de prélèvement dans le réseau d'assainissement ont été effectuées en collaboration avec le personnel du service hydraulique de la CUGN. L'accès aux collecteurs est effectué par l'ouverture de tampons d'égouts. Différents compartiments ont été prélevés: eaux usées, biofilms bactériens et sédiments. Cependant, tous ces compartiments n'ont pas pu être collectés à chaque site en raison de la difficulté d'accès. En amont du réseau d'assainissement, les collecteurs ne sont pas profonds (1-2 m), facilitant le prélèvement des différents compartiments, quand ils sont présents. Par contre, sur certains sites, surtout en aval, le réseau est très profond (7-9 m), empêchant l'accès aux biofilms bactériens et aux sédiments. Le tableau I-3 résume les échantillons prélevés à chaque site. De plus, certains sites sont situés au milieu des rues, ce qui gêne la circulation et rend le prélèvement délicat.

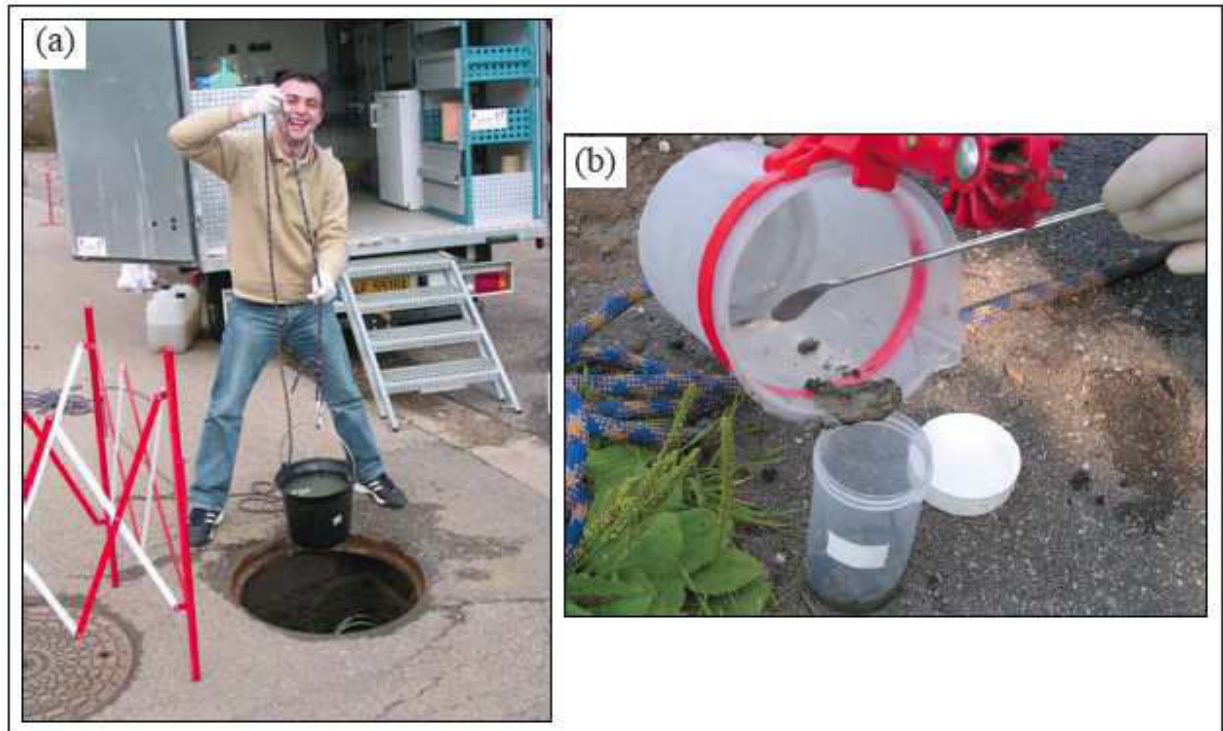
**Tableau I-3:** Illustration des différents compartiments (eau usée, biofilms et sédiments) échantillonnés à chaque site de prélèvement.

Site de prélèvement	Eaux usées	Biofilm	Sédiment
CL	✓		✓
CHU	✓	✓	
JB	✓	✓	
PV	✓		
RM	✓	✓	
PR	✓	✓	
PVP	✓		
RA	✓		
BL	✓		
LO	✓	✓	
UGC	✓		✓
SP	✓	✓	
SLU	✓		
SFN	✓	✓	
JV	✓		
PAL			✓

Les campagnes de prélèvements ont été réalisées en utilisant le laboratoire amovible de la ZAM (Zone Atelier du bassin de la Moselle). Les échantillons ont été prélevés selon différentes méthodes en fonction de leur nature:

- Les eaux usées ont été prélevées en surface à l'aide d'un seau et d'une corde (interdiction de descendre dans les collecteurs). Un prélèvement d'eaux de surface a été réalisé dans une couche d'eau inférieure à 50 cm (Figure I-3-a).
- Les biofilms et les sédiments ont été prélevés à l'aide d'une gamelle télescopique (VWR International, 331-2142), un manche télescopique de 3 m de longueur au bout duquel est fixé un béccher en polyéthylène de 1 L (Figure I-3-b). Les biofilms sont prélevés par léger grattage de la paroi du collecteur par la gamelle de façon à ne pas altérer la structure du biofilm. Par contre, les sédiments sont collectés au fond du réseau. Ce sont des sédiments

granuleux qui ne sont pas surmontés par une couche organique, comme ceux prélevés par Grommaire (2001) dans le réseau unitaire du site « le Marais » à Paris.



**Figure I-3:** Modalités de prélèvements des échantillons. (a) prélèvement des eaux usées, (b) prélèvement des biofilms et des sédiments.

De plus, les eaux des piézomètres ont été prélevées à l'aide d'une pompe immergée (Mini-Twister 12V-Hauteur manométrique: 13 m-Débit maximal: 9,5 L/min). La pompe est introduite dans le piézomètre, l'eau est pompée pendant 15-20 minutes afin de renouveler l'eau du piézomètre, et les échantillons sont ensuite prélevés.

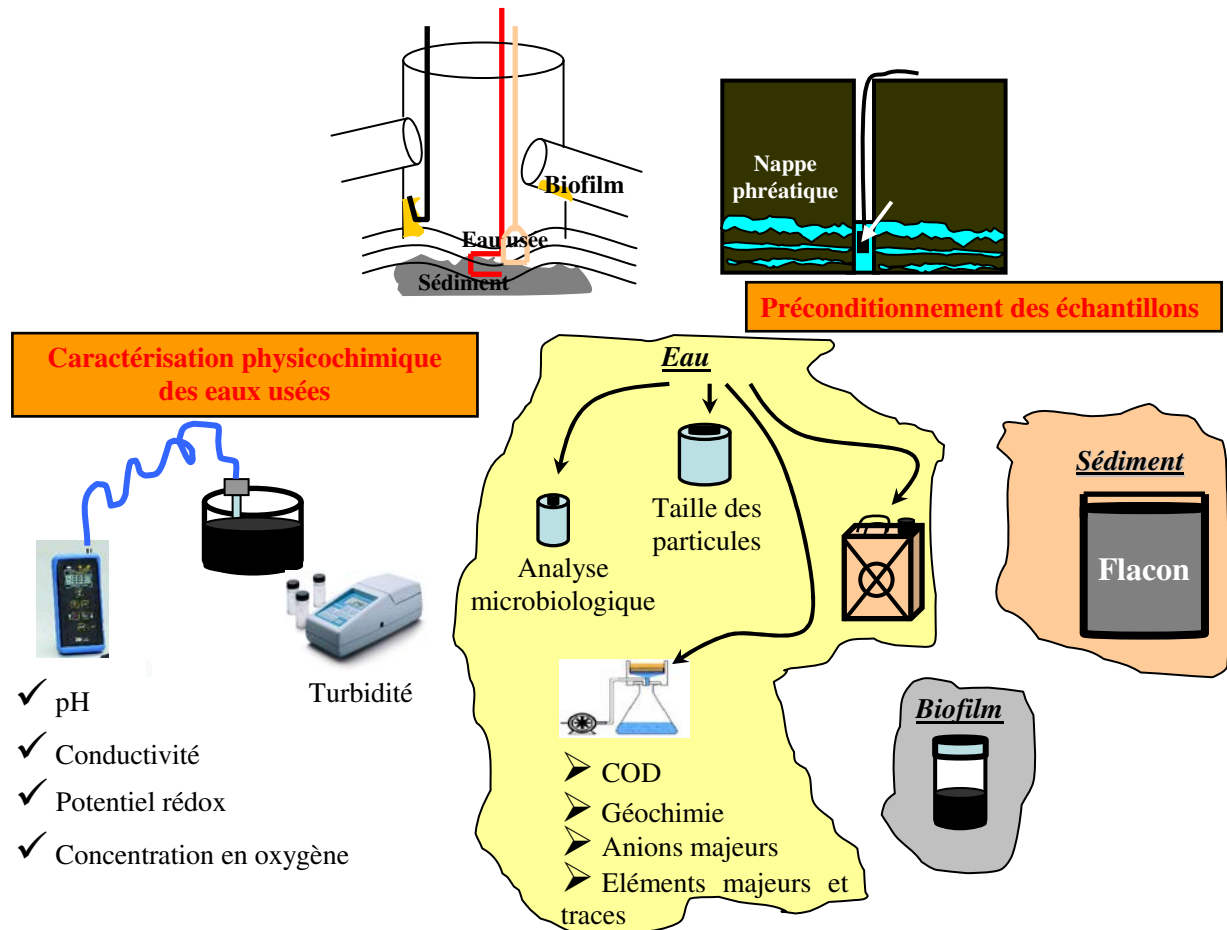
Les eaux de robinet ont été prélevées selon deux méthodes différentes. Les échantillons (n=10) destinés au dosage des éléments solubles ont été collectés (1 L) après une purge du réseau d'eau potable pendant 20 minutes. Par contre, les échantillons (n=3) réservés à la caractérisation de la phase particulaire ont été prélevés le matin sans purger le réseau (15 L).

### I.1-3 Préparation et caractérisation globale des échantillons

Sur le terrain, les eaux usées et les eaux de nappe ont été caractérisées et préconditionnées tout de suite après prélèvement. La figure I-4 présente de façon schématique les modes de caractérisation physico-chimique et de préconditionnement des échantillons. Le pH, la conductivité, le potentiel rédox et la concentration en oxygène sont mesurés à l'aide d'un multiparamètre de terrain préalablement calibré (WTW, Multiline F/SET, Best-Nr. 400 324), la turbidité est mesurée en utilisant un turbidimètre de terrain (HACH, 2100P Turbidimeter). La mesure de turbidité est une moyenne de 10 mesures à cause des fluctuations due à la sédimentation. 1 L d'eaux usées est stocké dans un flacon en polyéthylène pour déterminer la granulométrie des particules en suspension, 100 mL sont stockés dans un flacon stérile en verre pour dénombrer la microflore bactérienne totale et anaérobie. Les échantillons ont été conservés à 4°C dans le réfrigérateur du laboratoire amovible. Enfin 20 L sont stockés dans un jerrycan en polyéthylène, et traités au laboratoire dans les heures qui suivent le prélèvement. Les biofilms bactériens et les sédiments prélevés sont placés respectivement dans des flacons en plastique et dans des bocaux en verre.

Le préconditionnement sur le terrain est fonction des caractérisations qui doivent être effectuées au laboratoire :

➤ Analyse chimique: deux dispositifs de filtration ont été utilisés : les filtres seringues et les filtres membranes en acétate de cellulose avec une porosité de 0,20 µm. Au début de cette étude, des filtres seringues (MACHEREY–NAGEL, Chromaphil® CA-20/25 Art.-Nr. 729026) ont été utilisés pour filtrer les eaux usées, et ils ont été rincés par filtration de quelques mL d'eau usée avant de récupérer l'échantillon. Mais, vu le colmatage rapide de ces filtres et leurs coût élevé (1 € le filtre), ils ont été remplacés par des systèmes de filtration sous vide équipés par des filtres membranes (MACHEREY–NAGEL, Porafil® CA/68000020050-5 mm) (Figure I-4). Les échantillons destinés à l'analyse des anions majeurs et des éléments majeurs et traces sont stockés dans des flacons en polyéthylène de 60 mL (3 flacons) à 4°C. Par contre, les échantillons destinés au dosage du carbone organique dissous (COD) sont stockés dans des flacons en verre de 100 mL à 4°C. Les eaux de nappe et les eaux de robinet ont subi également le même préconditionnement.



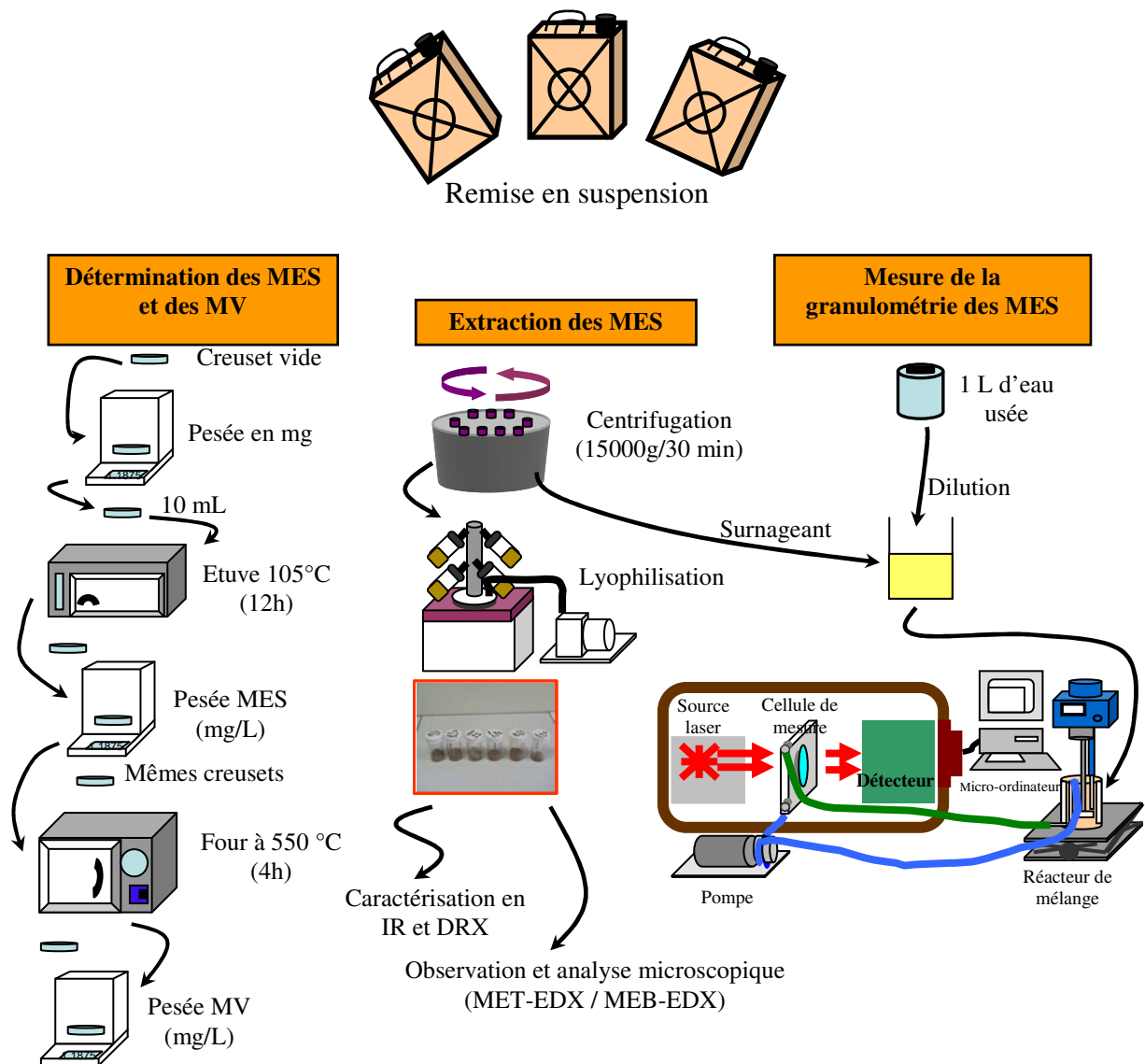
**Figure I-4:** Schéma récapitulatif des mesures et des préconditionnements effectués à chaque point de prélèvement.

➤ Analyse géochimique des isotopes stables des eaux usées: afin de déterminer les rapports isotopiques de l'oxygène ( $\delta^{18}\text{O}/\delta^{16}\text{O}$ ), du soufre ( $\delta^{34}\text{S}/\delta^{32}\text{S}$ ) et de l'hydrogène (D/H), les eaux usées, les eaux de nappe et les eaux de robinet sont filtrées à  $0.20\ \mu\text{m}$  comme mentionné au dessus. Le filtrat est ensuite stocké dans des flacons en polyéthylène de 60 mL (2 flacons) à  $4^\circ\text{C}$ .

Une fois au laboratoire, les échantillons sont stockés dans une chambre froide à  $4^\circ\text{C}$ , ils sont traités dans les 4 heures qui suivent le prélèvement (Figure I-5):

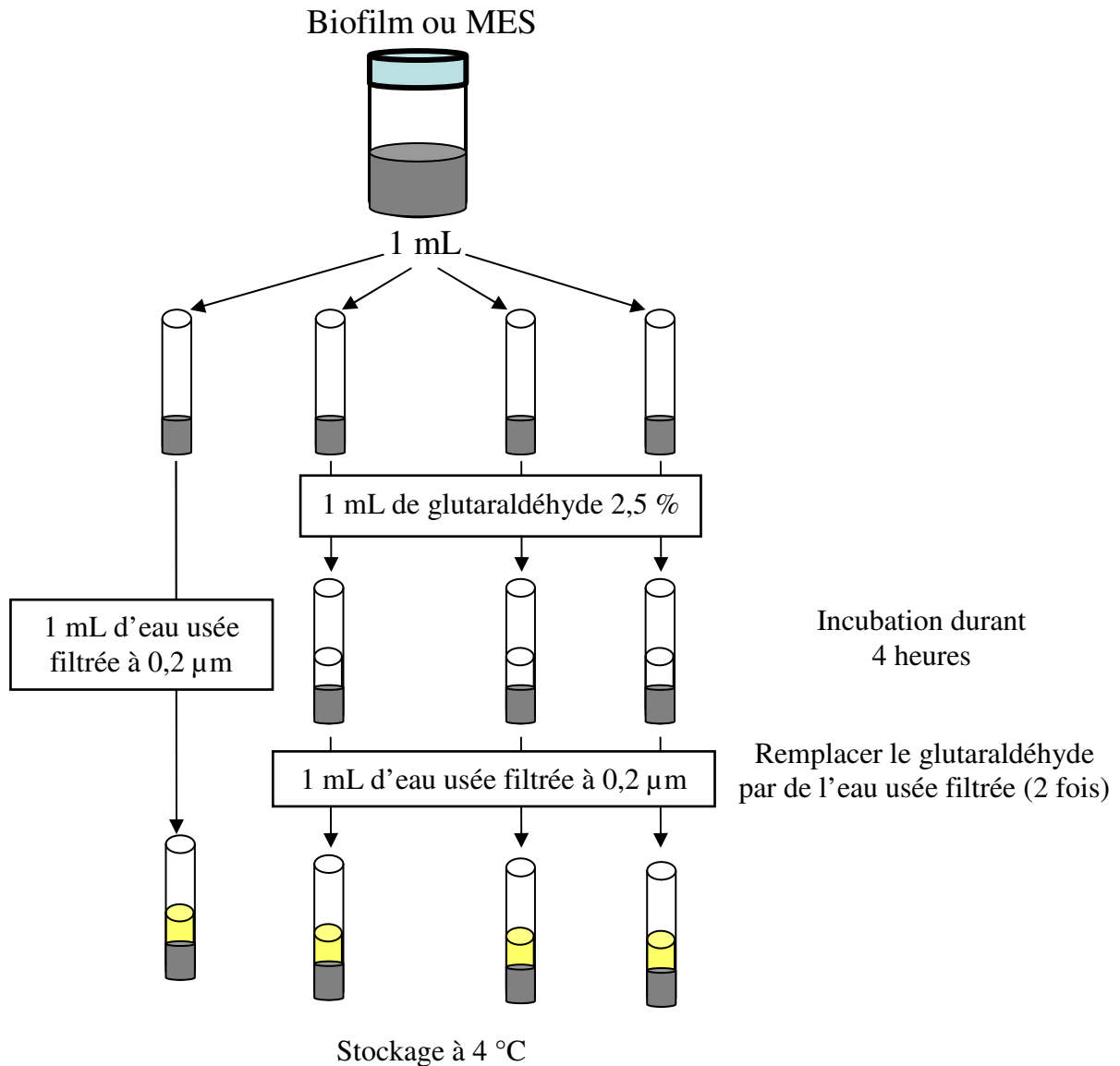
➤ Détermination des matières en suspension (MES) et des matières volatiles (MV) : le jerricane est tout d'abord retourné manuellement 4 à 5 fois de façon à homogénéiser la suspension. Ensuite  $3 \times 50\ \text{mL}$  sont prélevés et mis dans des tubes Eppendorf (le jerricane étant agité entre chaque prélèvement). Les tubes sont centrifugés à 4000 trs/min (Eppendorf

centrifuge 5804) pendant 20 minutes. Après centrifugation, les culots sont récupérés et placés dans des creusets en aluminium pré-pesés. Les creusets sont mis dans une étuve à 105°C pendant 12 heures. La quantité de MES rapportée en mg/L, est obtenue par différence entre la masse des creusets après séchage et la masse des creusets vides. Les mêmes creusets sont ensuite chauffés dans un four à 550°C pendant 4 heures. La différence de masse entre les matières séchées à 105°C et les matières calcinées permet de déterminer la quantité de la MV rapportée en mg/L.



**Figure I-5:** Schéma récapitulatif des caractérisations effectuées au laboratoire dans les heures qui suivent le prélèvement.

- Extraction des MES des eaux usées: le jerricane est tout d'abord retourné manuellement pour remettre en suspension les MES. Les eaux usées sont ensuite centrifugées à 15000 g (7000 t/min) (SORVALL<sup>®</sup> Evolution<sub>RC</sub>) pendant 30 minutes. Après centrifugation, le culot est mis dans un pot en plastique. Ce dernier est congelé et l'échantillon est ensuite lyophilisé (El Samrani et al., 2004). 1 L de surnageant est conservé pour diluer l'échantillon destiné à l'étude granulométrique. Une fraction des MES lyophilisées est ensuite broyée finement afin de doser les cations majeurs et les éléments traces.
- Mesure de la granulométrie des MES: la distribution en taille des MES est étudiée à l'aide d'un granulomètre laser Mastersizer (Malvern Instruments Ltd). L'échantillon à analyser est dilué dans le surnageant récupéré lors de l'extraction des MES des eaux usées afin d'obtenir une concentration varie entre 1 et 9 mg/L. La suspension est agitée dans un réacteur de mélange de type pale-bécher. Ce réacteur est composé d'un bécher de 1L (diamètre : 9 cm, hauteur : 15 cm) sur lequel quatre baffles en plexiglass (1,2 cm × 15 cm) ont été fixées afin d'éviter la formation d'un vortex à forte vitesse d'agitation. Le réacteur est muni d'une pale d'agitation rectangulaire (1,5 cm × 5,4 cm) située au niveau tiers inférieur du bécher. Cette pale est entraînée par un moteur (Janke & Kunkel RW20 DZM) d'une vitesse de rotation de l'ordre de 100 trs/min. Le réacteur est relié à la cellule de mesure du granulomètre par l'intermédiaire des tuyaux de transport (Tygon Flexible Tubing) de 4,6 mm de diamètre intérieur. Une pompe péristaltique (Cole Palmer Instruments Co) placée en aval de la cellule de mesure permet la circulation de la suspension.
- Traitement des biofilms et des MES: 4 échantillons d'1 mL de biofilm sont mis dans des tubes en verre (Figure I-6). Le premier tube est destiné à la caractérisation des échantillons par microscopie confocale à balayage laser (SCLM), les trois échantillons restants sont fixés chacun par 1 mL de glutaraldéhyde à 2,5% en poids. Après 4 heures, le surnageant est enlevé et remplacé par de l'eau usée filtrée à 0,2 µm pour éliminer l'excès du glutaraldéhyde (l'échantillon ne doit jamais être en contact avec l'air), l'opération étant répétée 2 fois. Ces biofilms fixés sont stockés à 4°C. Ils sont caractérisés après inclusion en résine par microscopie électronique à transmission (MET). La fraction restante des biofilms est congelée et ensuite lyophilisée. Une partie des MES subit le même traitement après décantation dans des tubes à essais.



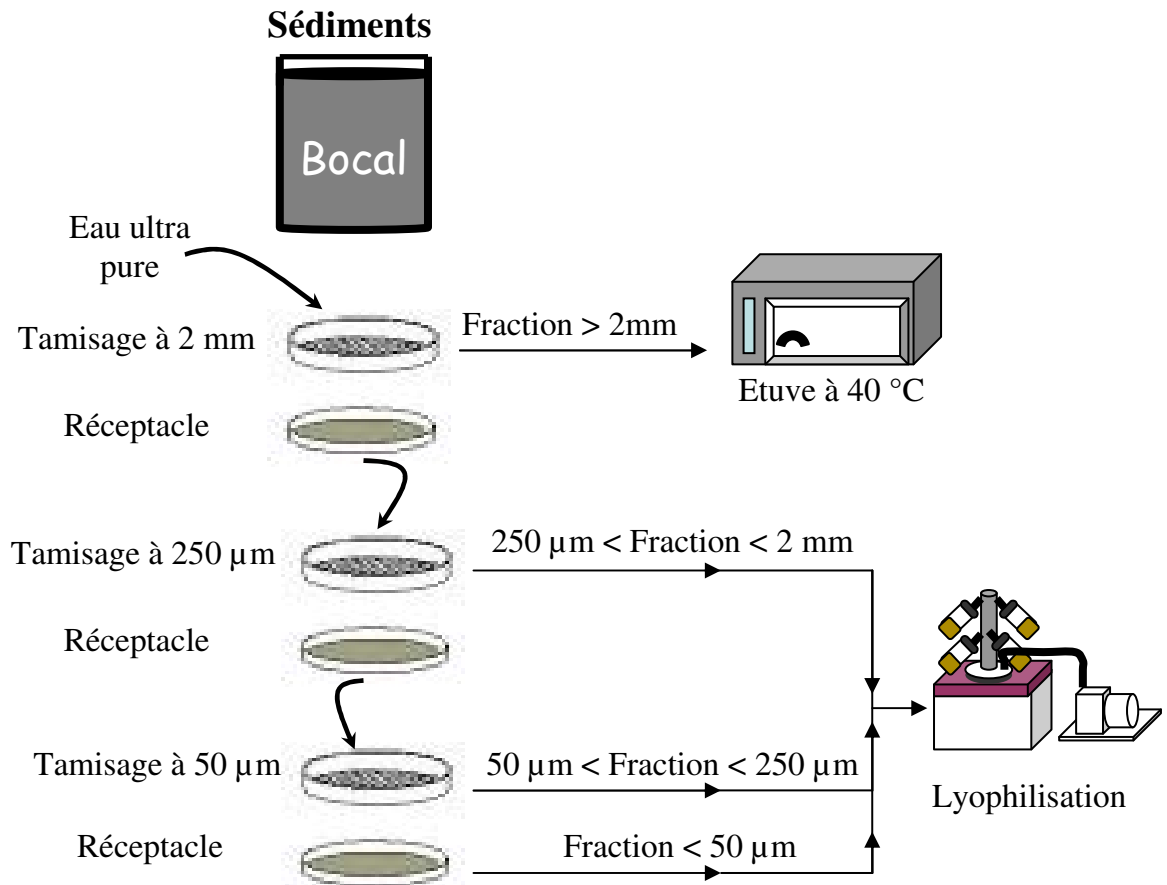
**Figure I-6:** Protocole de conditionnement des biofilms, fixation par glutaraldéhyde.

➤ Traitement des sédiments: les sédiments du réseau municipal sont fractionnés par tamisage humide (par ajout d'eau ultra-pure) successivement sur un tamis de 2 mm, de 250 µm et de 50 µm (Figure I-7). La fraction supérieure à 2 mm est séchée dans une étuve à 40 °C. Les fractions entre 250 µm-2 mm, entre 50-250 µm et entre 0-50 µm sont congelées et ensuite lyophilisées. Par contre les sédiments récupérés dans les regards de façade et les siphons d'évier ont été seulement congelés et lyophilisés

Après fractionnement et lyophilisation, une partie de ces fractions et une partie des sédiments des regards de façade ont subi une séparation au bromoforme (densité = 2,9) afin



d'extraire les phases sulfurées. Quelques milligrammes de sédiments sont déposés à la surface de 50 mL de bromoforme dans des tubes à centrifugation en téflon. Ensuite, la séparation a été par centrifugation à 4000 trs/min (Eppendorf centrifuge 5804) pendant 20 minutes. Après centrifugation, les culots sont récupérés et séchés sous hotte.



**Figure I-7:** Protocole de fractionnement des sédiments par tamisage.

Une partie des phases sulfurées extraites au bromoforme est incluse dans des bagues de résine afin de déterminer leur nature et leur lieu de formation. Un ruban adhésif double face est appliqué soigneusement sur une lame en verre afin d'éviter les bulles d'air et les aspérités de surface. Une bague en aluminium (2,5 cm de diamètre extérieur ; 5 mm de hauteur) est ensuite appliquée fortement sur le ruban adhésif. La face interne de la bague est au préalable fileté afin que la résine adhère de façon optimale aux parois. Les grains sont alors dispersés à l'intérieur de la bague en partant du centre et en minimisant l'espace entre eux. Les grains doivent avoir une granulométrie voisine pour éviter que les gros empêchent les plus petits d'affleurer. Les grains sont bien fixés sur l'adhésif par forte pression sur chacun d'eux.

Une fois tous les grains disposés dans la bague, la résine est préparée : il s'agit d'un mélange d'Araldite D et d'un durcisseur HY956 (ZUNDEL-KOHLER) dans le rapport des volumes est de 4 pour 1. L'ensemble est homogénéisé sur une platine chauffante pendant 5 min. La résine est ensuite versée dans la bague d'aluminium. La préparation est alors placée dans une étuve à environ 50°C pendant 2 heures minimum. Après polymérisation, la bague est décollée de la lame de verre, les résidus de colle de l'adhésif sont enlevés avec de l'éthanol. La bague est maintenant prête pour le polissage. En premier lieu, elle a subi une abrasion sous éthanol avec des abrasifs plus ou moins grossiers (papier de verre) en fonction de la taille des grains, puis en deux étapes avec des granulométries de plus en plus fines. Cette abrasion permet de faire affleurer les grains. La bague est ensuite polie par deux passages sur des feutres avec de la pâte diamantée de 3 puis de 1 micron afin d'obtenir une surface lisse. Les sédiments sont alors prêts pour la caractérisation au microscope électronique à balayage (MEB) et à la sonde ionique.

Une autre partie des sédiments lyophilisés a été broyée finement afin de doser les éléments majeures et traces. La partie restante a été conservée pour la caractérisation en microscopie électronique et pour l'extraction des phosphates

➤ Extraction de la phase particulaire des eaux de robinet: Les 15 L d'eau stockés dans les jerricanes en polyéthylène ont été filtrés avec les mêmes systèmes de filtration mentionnés au dessus. Les filtres sont ensuite récupérés, congelés et puis lyophilisés.

## I.2 SPECIATION DES ECHANTILLONS

La caractérisation physico-chimique des phases minérales, des éléments dissous et de la phase biologique dans le réseau d'assainissement a été réalisée suite à des spéciations directes et indirectes. La spéciation directe a été mise en évidence en couplant des techniques de microscopies (microscopie électronique à transmission et à balayage couplées à la spectroscopie d'énergie dispersive des rayons X, microscopie confocale) aux techniques de diffraction des rayons X, de spectroscopie infrarouge, de chromatographie et de spectrométrie de masse et d'émission atomique. D'autre part, la spéciation indirecte a été mise en œuvre suite à une méthode d'extraction chimique des phases phosphatées permettant une quantification de ceux-ci dans chacun des compartiments ciblés par les réactifs appropriés. Le tableau I-4 illustre les différentes techniques de spéciation appliquées sur les différents types d'échantillons prélevés.

**Tableau I-4 :** Récapitulatif des différentes techniques et des méthodes de spéciation utilisées lors de cette étude. MET : Microscope Electronique à Transmission ; MEB : Microscope Electronique à Balayage ; CLSM : Microscope Confocal à Balayage Laser ; IR : Spectroscopie InfraRouge ; DRX : Diffraction des Rayons X ; SI : Sonde Ionique ; Ch.I : Chromatographie Ionique ; ICP-MS/AES : Spectrométrie de Masse et d'Emission Atomique ; Géoch. : Géochimie ; E.Ch : Extraction chimique des phosphates. Les chiffres indiqués dans les cases correspondent au nombre d'échantillons analysés.

Echantillon	MET	MEB	CLSM	IR	DRX	SI	Ch.I	ICP-MS/AES	Géoch.	E.Ch.
Eau usée							63	63	66	
Eau de nappe							14	14	14	
Eau de robinet							10	10	10	
MES	36	13	4	36	15			15		15
Biofilm	8	8	4	8	8					4
Sédiment	7	7		4	7	3		6		4
Dépôt évier	7									

## I.2-1 Nature et origine des phases minérales

### I.2-1-1 Diffraction des rayons X

La DRX est une méthode qui permet la détermination des phases minérales micro et poly-cristallines des matériaux. Cette méthode n'est applicable qu'à des matériaux composés d'un nombre relativement important de cristaux aux orientations non préférentielles (céramiques, roches et monocristaux). L'identification des phases cristallines est obtenue par comparaison des diffractogrammes expérimentaux avec des diagrammes de référence de toutes les espèces cristallines connues et référencées dans la base de données PDF (Powder Diffraction File-International Center for Diffraction Data). Le premier critère de comparaison entre les diagrammes expérimentaux et les références est la position des pics de diffraction, le second critère étant les intensités de ces pics. Ceci implique que l'on identifie essentiellement des réseaux cristallins, c'est à dire des arrangements tri-périodiques d'atomes: deux phases cristallines composées d'atomes de nature différente, mais dont les atomes sont disposés selon le même réseau tri-dimensionnel, peuvent présenter des raies de diffraction aux mêmes positions. Par ailleurs, tout écart de composition chimique (par exemple substitution dans des solutions solides,) peut entraîner une variation des paramètres du réseau et un déplacement de certaines raies.

Les analyses ont été effectuées au sein de notre laboratoire sur un diffractomètre D8 Bruker muni d'une anticathode au cobalt ( $\lambda_{\text{CoK}\alpha} = 1.788965 \text{ \AA}$ ) grâce à l'aide précieuse de *Madame Isabelle Bihannic* et *Monsieur Guirec Ollivier*. Le détecteur est un détecteur linéaire. La puissance du générateur est fixée à 35 kV et 45 mA. Les conditions de mesure sont les suivantes : domaine de mesure en  $2\theta$  :  $3-63.5^\circ$ , pas :  $0.036^\circ$  en  $2\theta$ , et durée d'acquisition par point égale à 3 secondes. Avant analyse, l'échantillon est broyé dans un mortier en agate, et la poudre est placée dans une coupelle en plastique. Le niveau doit être bien plan. La coupelle est ensuite posée dans le porte échantillon, le tube à rayons X restant fixe, il n'y a que l'échantillon et le détecteur qui bougent. Un enregistreur lié au détecteur trace la courbe (diffractogramme) de l'intensité des rayons X diffractés en fonction de l'angle de diffraction. Le traitement des diffractogrammes est effectué à l'aide d'un logiciel basé sur les données des fiches ASTM (American Society for Testing and Materials).

### I.2-1-2 Spectroscopie infrarouge

Les analyses en spectroscopie infrarouge à Transformée de Fourier, ont été utilisées dans cette étude dans le but d'identifier la nature des différents groupements fonctionnels des composés présents dans l'échantillon. Cette technique est basée sur l'absorption d'un rayonnement électromagnétique infrarouge par les composés analysés. Elle est applicable aux solides cristallisés et amorphes, aux liquides, au gaz, et est sensible aux éléments de faible masse atomique. Le spectromètre utilisé est un interféromètre à Transformée de Fourier **BRUKER IFS 55**.

Les échantillons sont analysés en transmission et en réflexion diffuse au sein de notre laboratoire grâce à l'aide précieuse de *Madame Odile Barrès*. Pour l'analyse en transmission, les rayons infrarouges sont collectés par un détecteur DTGS (Sulfate de triglycine deutéré) avec une résolution spectrale de  $2 \text{ cm}^{-1}$ . L'échantillon est mélangé avec une matrice de bromure de potassium (KBr) (0,1 à 1,5% poids d'échantillon avec 150 mg de KBr) et broyé dans un mortier en agate. Ce mélange est ensuite déposé dans un moule à pastiller de 13 mm de diamètre que l'on place dans une presse à pastiller. La pression appliquée est de  $15 \text{ T/cm}^2$ . La référence est une pastille de KBr.

Pour l'analyse en réflexion diffuse, les rayons infrarouges sont détectés avec un détecteur large bande de type MCT (tellure de mercure et de cadmium) refroidi à 77K et d'un accessoire de réflexion diffuse (Harrick Corporation). Les échantillons sont préparés en

mélangeant 60 mg de produit avec 340 mg de KBr (bromure de potassium), on obtient donc une dilution de 15% en poids. Les unités d'absorbance correspondent au logarithme décimal du rapport  $R_{\text{KBr}}/R_s$  où  $R_{\text{KBr}}$  est la réflectance de la poudre de KBr utilisée comme référence et  $R_s$  la réflectance de l'échantillon. L'acquisition est effectuée sur 200 scans (environ 1 min 30 s) et la résolution spectrale est de  $2 \text{ cm}^{-1}$ . Les contributions de l'eau et du dioxyde de carbone atmosphérique sont soustraites des spectres. Les acquisitions et traitements des spectres IR (calcul d'aire, correction de ligne de base et décomposition spectrale) se font à partir du logiciel OPUS (BRUKER).

### I.2-1-3 Microscopie électronique à transmission (MET)

Au cours de cette étude, le MET a été utilisé afin de déterminer la composition atomique et la formule chimique des phases minérales dans les échantillons lyophilisés et inclus en résine. Plus de 45 séances d'observations (environ 2000 particules analysées) ont été réalisées au Service Commun de Microscopie Electronique et de Microsonde (SCMEM) de la faculté des sciences de Nancy, sous la direction du *Dr. Jafaar Ghanbaja*. Le microscope est un MET Phillips CM20 opérant avec un voltage de 200 kV (imagerie à haute résolution), équipé d'une lentille Ultra-Twin de type condenseur-objectif permettant en fonctionnant en mode "nanoprobe", d'éclairer une très faible surface de l'échantillon (sur un diamètre de quelques nanomètres). Cela donne ainsi accès soit à la diffraction en faisceau convergent, soit à l'analyse chimique très localisée. Ce microscope est également équipé d'un analyseur de pertes d'énergie des électrons transmis (EELS, Gatan) et d'un spectromètre à dispersion d'énergie des rayons X (EDXS) permettant d'obtenir une analyse élémentaire des particules avec une sensibilité voisine de 1% (fraction de masse limite détectable entre  $5 \times 10^{-3}$  et  $10^{-2}$ ). L'EDXS permet d'effectuer des analyses avec des tailles de sonde de l'ordre de quelques nanomètres, ce qui permet de mettre en évidence des hétérogénéités dans des zones paraissant homogènes à l'échelle macroscopique. Le MET a l'avantage de pouvoir coupler une analyse chimique de l'échantillon avec son observation.

Le micro-analyseur EDXS permet la détection des éléments de numéro atomique supérieur à 6 et l'étude de leur répartition dans l'échantillon. Cette méthode d'analyse quantitative détermine les concentrations élémentaires d'une zone bombardée par le faisceau d'électron. Les particules ont été analysées avec un temps de comptage de 40 secondes et un diamètre de faisceau de 20 nm. Les spectres EDX ont été traités par le logiciel SPIRIT, de façon à quantifier les pourcentages atomiques des éléments dans la particule analysée. Pour

l'analyse quantitative, on se base souvent sur la détermination des facteurs de Kliff-Lorimer ( $K_{AB}$ ), Ces facteurs dépendent de la tension du microscope, mais pas de la composition de l'échantillon :

$$K_{AB} = \left( \frac{[A]}{[B]} \right) * \left( \frac{I_B}{I_A} \right)$$

*A et B éléments à quantifier*

*$I_A$  et  $I_B$  les intensités des pics A et B*

Les rapports stoechiométriques des éléments majeurs sont calculés à partir de l'analyse élémentaire des particules. Après excitation par le faisceau d'électrons, chaque atome émet de l'énergie sous forme de photons X caractéristique de l'atome bombardé. Ces photons sont collectés par un système qui détecte les photons X émis par le volume irradié et détermine ainsi, pour chaque atome présent dans la particule analysée, les intensités des raies caractéristiques. La surface de ces raies est calculée en pourcentage atomique, ce qui permet de calculer les rapports stoechiométriques des différents éléments constituant la particule. Ce calcul permet de remonter à la formule chimique de la particule étudiée à partir d'une base de données minéralogiques.

Pour préparer l'échantillon, quelques milligrammes de matières lyophilisées sont broyées dans un mortier en agate et remis en suspension dans 2-3 mL d'éthanol et placés dans une cuve à ultrasons pendant quelques minutes. Une goutte de la suspension est ensuite déposée sur une grille en cuivre recouverte d'un dépôt de carbone amorphe (Grille E.M. Sciences-Cat N°71150) puis séchée à l'air. Pour les biofilms et les MES inclus en résine, des coupes fines de l'ordre de 100 nm sont effectuées à l'aide d'un ultra microtome. Les coupes sont ensuite déposées sur une grille en cuivre et colorées au citrate de plomb et à l'acétate d'uranyle (Deneux-Mustin et al., 2001) avant observation au microscope (voir paragraphe I.3-1-1).

### **I.2-1-4 Microscopie électronique à balayage (MEB)**

Les observations au MEB viennent compléter celles faites au MET. Les caractérisations ont été effectuées à l'aide d'un microscope Hitachi 2500LB (35 séances d'analyse-environ 1250 particules analysées). Ce microscope est équipé d'un détecteur d'électrons rétrodiffusés, associé à un dispositif de microanalyse par spectromètre de dispersion des rayons X (EDX KeveX Delta). Les analyses ont également été effectuées au SCMEM avec l'aide précieuse du

*Monsieur Alain Kohler*. Elles ont été généralement réalisées à une intensité de 20 kV, avec une distance analytique de 25 mm entre l'échantillon et la lentille objectif. Cette dernière permet de focaliser le faisceau d'électron sur la particule ciblée. Le principe de l'analyse consiste à balayer l'échantillon par un faisceau électronique. L'interaction électron-matière donne naissance à divers rayonnements émis dont des électrons secondaires et rétrodiffusés. Les électrons secondaires ont une énergie faible, ils proviennent des couches superficielles de la particule balayée et donnent une idée sur sa morphologie. Par contre, les électrons rétrodiffusés sont des électrons qui ressortent de l'échantillon. Ils sont caractérisés en sortie de la cible par une large zone d'émission ce qui diminue la résolution, d'une énergie cinétique élevée, et d'une bonne sensibilité à la composition chimique de la cible. L'émission des électrons rétrodiffusés est plus importante lorsque les atomes ont un numéro atomique élevé.

Afin d'obtenir une image en MEB, la surface de l'échantillon doit être conductrice. Plusieurs modes de préparation des échantillons ont été utilisés. Les particules lyophilisées sont dispersées sur un scotch de carbone double face fixé sur un disque de carbone vitreux. Les filtres membranes, piégeant la phase particulaire des eaux potables, sont collés directement sur le scotch de carbone. Par contre les bagues de résine incluant les sédiments ne nécessitent aucun traitement. Enfin, l'ensemble des préparations est recouvert d'une couche de carbone par pulvérisation cathodique, rendant la surface des échantillons conductrice.

### **I.2-1-5 Sonde Ionique**

La sonde ionique permet de mesurer directement *in situ* les répartitions élémentaires et isotopiques dans des échantillons solides suite à des analyses ponctuelles légèrement destructives. Elle donne une idée précise sur l'origine (biologique ou physico-chimique) et la date de formation des particules analysées. C'est une technique spectrométrique basée sur le bombardement d'une particule d'intérêt par un faisceau d'ion primaire ( $\text{Cs}^+$  ou  $\text{O}^-$ ), les ions secondaires émis ensuite sont collectés et analysés.

Lors de cette étude, des analyses de la composition isotopique en soufre ( $^{34}\text{S}/^{32}\text{S}$ ) des particules de pyrite (19 particules) ont été effectuées à l'aide de la sonde ionique Caméca IMS 1270 du Centre des Recherches Pétrographiques et Géochimiques (CRPG). Les analyses ont été réalisées grâce à l'aide précieuse de *Monsieur Michelle Champenois et Denis Mangin*.

La source à Césium (pastille de chromate de césium) a été choisie comme faisceau d'ionisation primaire. Les ions  $\text{Cs}^+$  sont obtenus après sublimation et ionisation de la pastille de chromate de césium respectivement par un filament et une plaque de tungstène (chauffée à  $1100^\circ\text{C}$ ). Ces ions sont ensuite envoyés dans la colonne primaire de la sonde où ils sont purifiés des ions parasites, focalisés et réglés par un secteur magnétique (PBMF pour Primary Beam Mass Filter) et par un système de lentilles optiques. Le faisceau d'analyse obtenu a une dizaine de microns de diamètre.

L'échantillon à analyser doit présenter une surface plane et conductrice, monté dans un porte échantillon perpendiculairement à l'axe optique de la machine. L'échantillon est bombardé par les ions  $\text{Cs}^+$ , conduisant à des collisions en cascades qui éjectent les atomes de surface de la particule ciblée. Cette dernière émet ensuite une partie des éléments qui la constitue sous forme d'ions secondaires. La profondeur affectée par ces collisions est de l'ordre de quelques couches atomiques et la durée d'une collision engendrée par un ion primaire est d'environ  $10^{-14}$  à  $10^{-12}$  s. Après production, les électrons secondaires sont accélérés par un champ électrique situé entre l'échantillon et la première lentille. Ils entrent ensuite dans le spectromètre de masse où ils sont filtrés par énergie et par masse. Les ions de même masse focalisent en un même point quelque soit leur énergie alors que les ions de masse différente sont déviés à la faveur d'une différence d'énergie, ce qui permet également de séparer certains ions primaires qui ont été accélérés avec les ions secondaires.

Afin de quantifier les rapports isotopiques  $^{34}\text{S}/^{32}\text{S}$  du soufre, les ions secondaires sont séparés selon leur masse par le spectromètre de masse. L'aimant du spectromètre définit en général la résolution de la machine pour séparer deux masses très proches comme par exemple  $^{34}\text{S}$  et  $\text{Fe}^{32}\text{S}_2$ .

Les ions sélectionnés sont alors envoyés sur un système de comptage afin d'effectuer l'analyse. Le détecteur est composé de cages de Faraday pour la détection des signaux intenses. Le système de détection est calibré avant chacune des séries d'analyses suite à un calibrage du bruit de fond et du gain des cages de Faraday.

Lors de l'ionisation de l'échantillon, une partie seulement de la surface est éjectée. Le rapport des isotopes mesurés n'est pas directement représentatif du rapport réel : c'est ce qu'on appelle le fractionnement instrumental. Il est défini comme le rapport entre le rapport des



isotopes mesurés à la sonde et le rapport vrai. Il peut être également exprimé en ‰ et représente alors la différence entre le  $\delta$  mesuré à la sonde et le  $\delta$  vrai :  $\delta_{\text{inst}} = \delta_{\text{mesuré}} - \delta_{\text{réel}}$ .

Afin de déterminer le fractionnement isotopique réel des particules de pyrite analysées, une série de calibrages a eu lieu au début et en cours de la session d'analyses sur un échantillon de pyrite standard (CAR123-Colombie), de composition isotopique connue et de même réseau cristallin que les échantillons analysés. Ce standard est analysé dans les mêmes conditions que les échantillons (intensité primaire, balayage, ouverture de la fente d'entrée,...)

En globale, trois sédiments ayant une fraction entre 50  $\mu\text{m}$  et 250  $\mu\text{m}$  ont été analysés à la sonde ionique pour déterminer le rapport isotopique des particules des pyrites. Ces sédiments ont été au préalable inclus dans des bagues de résine, abrasés, polis et ensuite analysés au MEB.

### **I.2-1-6 Analyse des roches totales**

Les analyses élémentaires des solides ont été réalisées au CRPG dans le Service d'Analyse des Roches et des Minéraux (SARM). 15 échantillons de MES et 13 échantillons de sédiments ont été analysés. La détermination des éléments majeurs et des traces a été effectuée respectivement par ICP-AES (Inductively Coupled Plasma Atomic Emission, Jobin Yvon JY70) et ICP-MS (Spectromètre de Masse Perkin Elmer 6000). La limite de détermination et les incertitudes pour chaque élément sont données dans l'annexe B.

Les échantillons solides sont broyés finement à l'aide d'un mortier en agate afin d'obtenir une granulométrie entre 70 et 80  $\mu\text{m}$ . Une difficulté remarquable a été rencontrée lors du broyage des matières en suspension suite à leurs fortes teneurs en fibre de cellulose provenant du papier toilette, sachant qu'une ville à l'échelle de Nancy en relargue 7 tonnes par semaine dans le réseau d'assainissement urbain. Après broyage, 200 mg d'aliquote d'échantillon ont été digérés par fusion alcaline avec 600 mg métaborate de Lithium ( $\text{LiBO}_2$ ) et mis en solution dans de l'acide nitrique ( $\text{HNO}_3$ ) 1N. Les échantillons sont ensuite prêts pour l'analyse.

Les mesures en ICP-MS ont été effectuées selon les méthodes reportées par Carignan (2001). L'échantillon est introduit dans l'appareil par un nébuliseur qui le transforme en un aérosol liquide composé de micro-gouttelettes de quelques  $\mu\text{m}$  à l'aide d'argon gazeux. L'aérosol ainsi formé est envoyé dans une torche à plasma d'argon à très haute température

(entre 6000 et 10000 °C), suffisante pour vaporiser, dissocier, atomiser et ioniser complètement la plupart des éléments. Les ions sont ensuite accélérés, filtrés et transmis vers un détecteur où leur nombre est quantifié. Un programme informatique permet alors de calculer directement la concentration de l'élément analysé grâce à un module permettant le traitement quantitatif et qualitatif pendant l'enregistrement

Par ailleurs, les analyses en ICP-AES ont été réalisées selon la méthode de Govindaraju et Mevelle (1987). L'échantillon est pulvérisé au sein du plasma d'argon à une température proche de 7000° C. Cette température très élevée permet de dissocier la matière en atomes et ions libres. Ces derniers sont alors excités et leur retour à l'état fondamental s'accompagne d'une émission de photons dans l'ultraviolet et le visible. Les photons sont ensuite détectés par un spectromètre d'émission atomique et comparés à un signal mesuré pour un échantillon de référence interne au CRPG (Carignan et al., 2001).

### **I.2-1-7 Spéciation indirecte des phases phosphatées**

La spéciation consiste à identifier les différentes espèces chimiques d'un élément donné. Dans notre cas, la spéciation indirecte du phosphore vise à déterminer les différents compartiments avec lesquels le phosphore est associé. On cherche donc à identifier le phosphore lié au fer, au calcium, à l'aluminium, à la matière organique, le phosphore labile et total. Les différents compartiments peuvent être obtenus par extraction chimique séquentielle ou parallèle.

L'extraction séquentielle consiste à attaquer quelques grammes d'un même échantillon par plusieurs extractants chimiques (Tessier et al., 1979). Un des inconvénients majeurs de cette extraction est que son résultat dépend fortement de l'ordre de l'extraction, de la cinétique des attaques chimiques, et du rapport solide-réactifs (Tessier et Campbell, 1988 ; Martin et al., 1987). De plus, il est probable qu'une part des phosphates libérés dans la solution s'adsorbe sur les surfaces réactives qui ne sont pas affectées par l'extractant (Vanden Bossche, 1999). Elle sera ensuite comptabilisée dans le phosphore lié à d'autres compartiments.

L'extraction parallèle, quant à elle, consiste à attaquer chimiquement plusieurs aliquotes d'un échantillon donné par différents extractants, ce qui permet d'atteindre chaque compartiment par un extractant compatible (Moreau, 1997; Quantin, 2001). Dans cette étude, l'extraction parallèle a été adoptée. Les culots résiduels sont récupérés après extraction,

lyophilisés, et ensuite analysés au MET. L'observation des culots après extraction permet de vérifier si les extractants utilisés attaquent les phases visées, ce qui permet de valider ou d'invalider le protocole d'extraction.

De nombreux protocoles d'extractions chimiques ont été développés pour extraire le phosphore lié aux différents compartiments. Ces protocoles sont basés sur les travaux de Chang et Jackson (1957). Les réactifs utilisés pour individualiser un compartiment donné diffèrent d'un auteur à l'autre (Tableau I-5).

Notre protocole correspond à celui utilisé par Moreau en 1997 au cours de sa thèse. En fait, les différents protocoles d'extraction et les extractants mentionnés dans le tableau I-5 ont été développés pour extraire les phosphates des échantillons de sol et des sédiments. Par contre, Vanden Bossche (1999) a utilisé le protocole suivi par Moreau (1997) pour extraire les orthophosphates des échantillons provenant des boues biologiques. Ces derniers ont des caractéristiques physico-chimiques et microbiologiques proches de nos échantillons qui sont prélevés dans le réseau d'assainissement urbain.

**Tableau I-5:** Principaux réactifs utilisés pour l'extraction des phosphates liés aux différents compartiments

Fraction phosphatée	Extractant	Nature de l'échantillon	Références
Phosphate labile	NH <sub>4</sub> Cl	Sédiment	Bozongo, 1990
	MgSO <sub>4</sub>	Sédiment	Lebo, 1991
	H <sub>2</sub> O	Sédiment	Psenner, 1984
		Sédiment	Moreau, 1997
	NaHCO <sub>3</sub>	Sol	Hedley et al., 1982
Liée à l'Al	NaOH (0,1 N)	Sol	Hedley et al., 1982 ; Tiessen et al., 1984 ; Bozongo, 1990.
		Sol	
		Sédiment	
	NH <sub>4</sub> F	Sédiment	Lebo, 1991
Sédiment		Moreau, 1997	
Sol		Chang et Jackson 1957	
Liée au Fe	NaOH	Sédiment	Bozongo, 1990 ; Chang et Jackson 1957 Lebo, 1991 Moreau, 1997
		Sol	
		Sédiment	
		Sédiment	
Liée au Ca	HCl	Sol	Tiessen et al., 1984 Bozongo, 1990 Psenner, 1984
		Sédiment	
		Sédiment	
	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Sol	Chang et Jackson 1957 Lebo, 1991 Moreau, 1997
		Sédiment	
		Sédiment	
	EDTA	Sol	Ruiz et al., 1997
Liée à la matière organique	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Sédiment	Bozongo, 1990 ; Moreau, 1997
		Sédiment	
	NaClO	MES	Lebo, 1991
Posphate total	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> /K <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>8</sub>	Sédiment	Bozongo, 1990
		Sédiment	Moreau, 1997

Après adaptation du protocole de Moreau (1997) à nos échantillons, le phosphate lié aux différents compartiments a été extrait: (a) le phosphore labile, (b) le phosphore lié au fer, (c) le phosphore lié à l'aluminium, (d) le phosphore lié au calcium, (e) le phosphore lié à la matière organique et (f) le phosphore total (Figure I-8) :

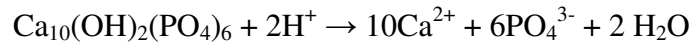
(a) Le phosphore labile: il s'agit du phosphate faiblement lié aux particules. L'approche la plus simple préconisée pour estimer le phosphore labile consiste à mesurer le phosphore dissous dans une quantité importante d'eau bi-distillée amenée à l'équilibre avec le matériau étudié (Psenner, 1984).

(b) Le phosphore lié au fer: le réactif employé dans cette méthode d'extraction du phosphore lié au fer est la soude 1 N (Moreau, 1997). Un échange de ligands a lieu en remplaçant les anions  $\text{OH}^-$  par les anions  $\text{H}_2\text{PO}_4^-/\text{HPO}_4^{2-}$ . Cette réaction permet de libérer dans la solution les anions phosphates adsorbés de manière spécifique sur les oxy(-hydro)xydes de fer ou d'aluminium. A pH supérieur à 8 une partie des groupement hydroxydes, à la surface de ces oxy(-hydro)xydes est déprotonée (Vanden Bossche, 1999). Ces minéraux présentent alors une charge négative. L'utilisation de la soude a donc pour effet de libérer les anions adsorbés de manière non spécifique à la surface de ces composants y compris le phosphore labile. Certains auteurs utilisent le Citrate-Dithionite-Bicarbonate (CDB) pour identifier le phosphore lié au fer cristallisé. Selon Moreau (1997), l'extraction au CDB provoque des interférences au cours du dosage du phosphore par le molybdate. Les résultats obtenus par MET sur les MES et les sédiments du réseau d'assainissement ont montré la présence d'une faible quantité de fer toujours liée au phosphate de Ca.

(c) Le phosphore lié à l'aluminium: l'extractant utilisé est le fluorure d'ammonium. Cette méthode figure déjà dans le protocole de Chang et Jackson (1957). Elle est basée sur une observation de Fife (1959) selon laquelle les ions fluorures ne complexent pas le fer à pH supérieur à 8, alors qu'ils complexent l'aluminium. Un des inconvénients du  $\text{NH}_4\text{F}$  c'est qu'il provoque une dissolution des argiles et une libération des phosphates adsorbés en bordure de feuillets (Vanden Bossche, 1999). L'extraction à un pH légèrement basique favorise aussi la libération du phosphore adsorbé sur les oxy(-hydro)xydes de fer. La fraction liée à l'aluminium sera alors surestimée si la quantité de ces oxy(-hydro)xydes est importante.

(d) Le phosphore lié au calcium: la méthode utilisée pour libérer le phosphore lié au calcium est une attaque acide via l'acide sulfurique 0,5 N. Ce phosphore est essentiellement présent

dans les sols sous forme d'apatite. L'apatite est solubilisée en milieu acide selon la réaction suivante :

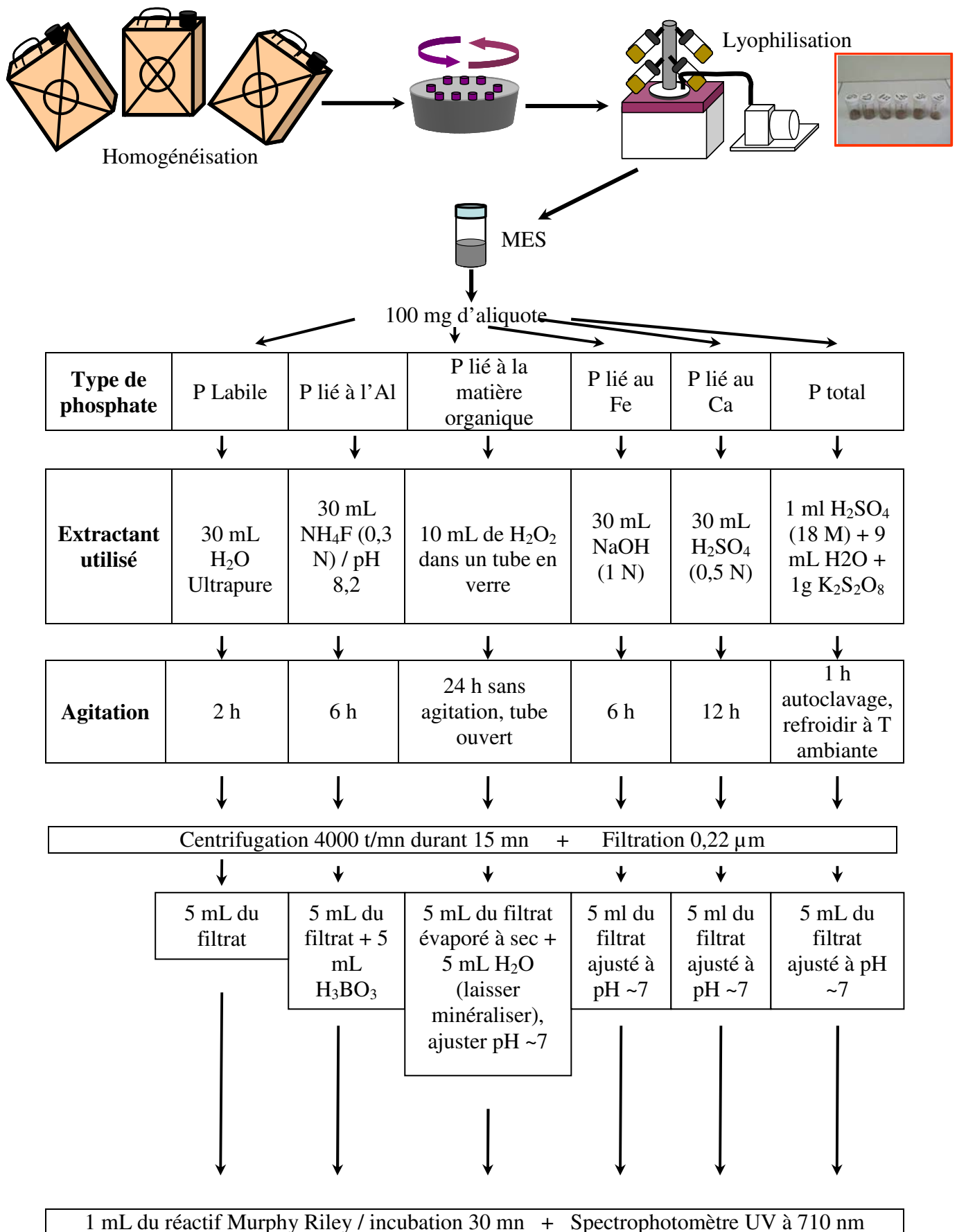


*(e) Le phosphore lié à la matière organique:* généralement, le phosphore lié à la matière organique est obtenu par une oxydation poussée avec du peroxyde d'hydrogène à 30% (Moreau, 1997). Le problème de cette extraction est l'interférence de l'agent oxydant avec le réactif de Murphy et Riley (1962), d'où la nécessité de neutraliser cet oxydant avant le dosage. Après extraction, le surnageant est évaporé à sec sur plaque chauffante sous la hotte. Ensuite, il est remplacé par un volume égal d'eau ultra-pure.

*(f) Le phosphore total:* il est généralement extrait par minéralisation de l'échantillon suite à une digestion acide (Bonzongo, 1990).

Les phosphates extraits sont dosés selon la méthode de Murphy Riley (1962) par dosage colorimétrique. En milieu acide et en présence de molybdate d'ammonium, les orthophosphates donnent un complexe phosphomolybdique. Réduit par l'acide ascorbique, Celui-ci développe une coloration bleue que l'on peut doser par spectrométrie. Certaines formes organiques pouvant être hydrolysées au cours de l'établissement de la coloration et donnant des orthophosphates, le développement de la coloration est alors accéléré par l'utilisation d'un catalyseur, le tartrate double d'antimoine et de potassium. Le dosage se fait par un spectrophotomètre ultra-violet (UV-2501P, SHIMADZU). Les échantillons sont placés dans des cellules en quartz, et l'absorbance est mesurée contre un blanc. De plus, les orthophosphates extraits ont été également dosés par Spectrométrie d'Emission Atomique (voir paragraphe I.2-1-6) afin de valider le dosage obtenu selon la méthode de Murphy Riley.

Les résidus des extractions (culot de centrifugation) ont été également récupérés, congelés, lyophilisés, puis analysés au MET afin de valider la spécificité de chaque extractant utilisé.



**Figure II-8:** Protocole suivi pour l'extraction et le dosage des phosphates dans les matières en suspension, les biofilms, et les sédiments du réseau d'assainissement urbain.

## I.2-2 Spéciation de la phase soluble

### I.2-2-1 Dosage des éléments majeurs et traces

Les anions minéraux de 85 échantillons ( $F^-$ ,  $Cl^-$ ,  $NO_3^-$ ,  $NO_2^-$ ,  $SO_4^{2-}$ ,  $PO_4^{3-}$ ) ont été mesurés par chromatographie ionique d'échange anionique (Dionex ICS-3000) grâce à l'aide précieuse de *MM Denis Merlet et David Billet*. Une colonne AS9-HC, précédée d'une pré-colonne (AG9-HC), a été utilisée pour effectuer l'échange anionique avec une solution éluant de carbonate de sodium à 9 mmole/L. Les anions majeurs sont dosés par conductimétrie avec un système d'autosuppression, une membrane ASRS ultra-II étant associée à une production de proton permettant la transformation de  $Na_2CO_3$  conducteur en  $H_2CO_3$  non conducteur.

Les concentrations en cations majeurs et éléments traces ont été mesurées sur 85 échantillons d'eau, respectivement par ICP-AES et ICP-MS au SARM. Les protocoles d'analyses sont détaillés dans le paragraphe I.2-1-6. Les échantillons sont acidifiés avant analyse par ajout de  $HNO_3$  à 2%. La validité des mesures est contrôlée par l'analyse répétée de l'échantillon de référence d'eau de rivière SLRS-4 (NRC-CNRC, Canada). La limite de détermination et les incertitudes pour chaque élément sont données dans l'annexe B.

### I.2-2-2 Détermination du carbone organique dissous

Le carbone organique dissous a été dosé au SARM dans 50 échantillons d'eau usée au SARM. Un analyseur TCM Dohrmann DC 190 Total organic carbon Analyzer (Tekmar-Dohrmann, Mason, Ohio, USA) a été utilisé. L'échantillon est acidifié par ajout de l'acide chlorhydrique (HCl) 1N. Il est ensuite introduit dans un tube chauffé à 680°C contenant un catalyseur agissant comme oxydant. Ce dernier oxyde les composés carbonylés et la réaction de combustion est accompagnée par un dégagement du gaz carbonique. Le  $CO_2$  est ensuite détecté et quantifié par spectrométrie infrarouge et comparé à une courbe d'étalonnage.

### I.2-2-3 Spéciation géochimique

Afin de déterminer l'origine des eaux collectées dans le réseau d'assainissement urbain, des analyses isotopiques des éléments composant l'eau ( $^{18}O/^{16}O$  et D/H) et des sulfates dissous ( $^{18}O_{\text{sulfate}}/^{16}O_{\text{sulfate}}$  et  $^{34}S/^{32}S$ ) ont été effectuées sur plus de 90 échantillons d'eau d'origine



différente (eau usée, eau de robinet, eau de nappe). Les analyses ont été faites au service de spectrométrie du CRPG par *Mme Caroline Guillemette*.

La composition isotopique en oxygène, deutérium et soufre est donnée en (‰) par rapport à un matériel de référence dit «delta zéro» selon l'équation suivante :

$$\delta = \left( \frac{R_{\text{échantillon}}}{R_{\text{référence}}} - 1 \right) * 1000$$

$R_{\text{échantillon}}$  et  $R_{\text{référence}}$  représentent les rapports isotopiques (D/H,  $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ ,  $^{34}\text{S}/^{32}\text{S}$ ) respectivement dans l'échantillon et le matériel de référence. Le standard de référence pour la détermination du rapport isotopique de l'O et du D est l'eau Standard Mean Ocean Water (SMOW), et Canon Dioblo Troilite (CDT) pour le rapport isotopique du S.

Les mesures des isotopes stables du deutérium de l'eau ( $\delta\text{D}$ ) et des sulfates dissous ( $\delta^{18}\text{O}_{\text{sulfate}}$  et  $\delta^{34}\text{S}$ ) ont été réalisées à l'état gazeux suivant la méthode CF-IRMS. L'évaporation et la sublimation respectivement de l'eau et des sulfates ont été effectuées par un analyseur élémentaire EA3028 (Euro Vector, Milan, Italie). Les analyses sont ensuite réalisées en flux continu (CF) de ces gaz par un spectromètre de masse de rapports isotopiques (IRMS) Isoprime (GV Instruments, Manchester, Royaume Unis). Par contre, les isotopes stables de l'oxygène de l'eau ( $\delta^{18}\text{O}$ ) ont été mesurés en suivant la méthode DI-IRMS. L'isotope  $^{18}\text{O}$  de l'oxygène est échangé contre l'isotope  $^{16}\text{O}$  du  $\text{CO}_2$ . Le  $\text{CO}_2$  est ensuite extrait, purifié, analysé en « dual-Inlet » (DI) alternativement avec un échantillon de référence par un spectromètre IRMS.

Les gaz produits sont ionisés dans la source du spectromètre. Les cations ainsi formés sont accélérés, focalisés par un champ électrostatique, puis séparés en masse par champ magnétique selon le rapport masse sur charge ( $m/Z$ ). Ainsi, les gaz ainsi analysés induisent des pics simultanés sur les collecteurs (cage de Faraday) pour les différentes isotoprèmes. Les aires de ces pics sont intégrées et directement comparées à celle d'un gaz de référence injecté au début et pendant de chaque analyse.

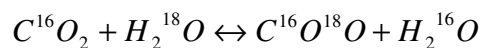
Des références internes au CRPG ont été utilisées afin de déterminer les valeurs isotopiques de l'eau, des sulfates dissous et également pour vérifier la linéarité des analyses par le spectromètre de masse. Les références ED3 (eau distillée) et Thalassa (Eau de la mer Méditerranée après distillation) ont été utilisées pour les analyses en  $\delta^{18}\text{O}$  et  $\delta\text{D}$ . Leurs valeurs

sont calibrées par rapport aux références internationales V-SMOW (Vienne-Standard Mean Ocean Water), SLAP (Standard Light Antarctic Precipitation) et GISP (Greenland Ice Sheet Precipitation), et reportées ensuite par rapport à la référence «delta zéro». Pour les mesures en  $\delta^{18}\text{O}_{\text{sulfate}}$  et  $\delta^{34}\text{S}$ , du sulfate de barium d'origine industrielle (Analyapur) et des sulfates précipités à partir de l'eau minérale Contrex ont été utilisés comme référence. Les valeurs sont ensuite calibrées pour  $\delta^{18}\text{O}_{\text{sulfate}}$  et  $\delta^{34}\text{S}$  respectivement par rapport aux références internationales V-SMOW et CDT

Les quatre paragraphes suivants montrent les démarches suivies afin de produire les gaz nécessaires pour réaliser l'analyse des valeurs isotopiques.

### I.2-2-3-1 Détermination des isotopes stables de l'oxygène de l'eau

L'oxygène comporte trois isotopes stables,  $^{16}\text{O}$ ,  $^{17}\text{O}$  et  $^{18}\text{O}$ , ayant respectivement une abondance de 99,763%, 0,0375%, et 0,1995% (Hoefs, 1997). Les analyses isotopiques de l'oxygène sont réalisées en utilisant la méthode classique de l'échange isotopique entre l'eau et le  $\text{CO}_2$ . Pour cela, 1 mL d'eau est équilibrée avec du  $\text{CO}_2$  dont la composition isotopique est connue, dans un tube en verre après avoir fait le vide. Les tubes sont maintenus sous une pression de 700 mbar, puis placés dans un bain thermostaté à 25°C pendant une semaine pour que la réaction d'échange isotopique entre l'eau et le  $\text{CO}_2$  atteigne un équilibre :

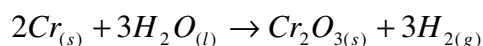


Le  $\text{CO}_2$  est ensuite extrait sous vide (lignes d'extraction sous vide du CRPG) avec séparation des gaz parasites et de l'eau par pièges à l'azote liquide. Un premier piège à -173°C permet de fixer le  $\text{CO}_2$  ainsi que l'eau pour extraire les gaz parasites par pompage, Après réchauffement, un piège à -90°C permet de fixer uniquement le  $\text{CO}_2$  et de pomper l' $\text{H}_2\text{O}$  pour ne récupérer en fin de ligne que le  $\text{CO}_2$ . Ce dernier est analysé selon la méthode hors ligne classique de «dual-inlet» (DI). Cette méthode consiste à mesurer alternativement un gaz de référence et celui de l'échantillon, maintenus à des pressions identiques, par un IRMS. Ainsi, la détermination du rapport isotopique du  $\text{CO}_2$  après équilibre permet de revenir, par calcul, à la composition isotopique de l'oxygène de l'échantillon.

### I.2-2-3-2 Détermination des isotopes stables du deutérium de l'eau

Selon Hoefs (1980), l'hydrogène comporte 2 isotopes stables, H et D, ayant respectivement une abondance de 99,9844% et 0,0156%. Dans cette étude, une nouvelle méthode appliquée par Morrison (2001) a été utilisée pour déterminer le rapport isotopique du deutérium. Elle utilise du chrome métal comme agent réducteur des molécules d'eau.

Les échantillons sont placés sur le carrousel du passeur automatique. La seringue servant à l'injection est rincée au préalable avec 1 µl de l'échantillon d'eau. 0,3 µL de l'échantillon sont ensuite injectés dans une chambre maintenue à 140°C. La vapeur d'eau formée est entraînée par un flux d'hélium de haute pureté (130 mL/min) vers un réacteur en quartz. Dans le réacteur, la vapeur d'eau est instantanément réduite par du chrome métal porté à une température de 1050°C et convertie quantitativement en dihydrogène gazeux selon la réaction :



Le chrome est mélangé avec des copeaux de quartz (1:1 V/V) afin d'éviter le colmatage rapide du réacteur. Le dihydrogène produit dans le réacteur passe ensuite à travers une colonne chromatographique (GC, 1,5 m de longueur, 50 nm de tamis moléculaire) permettant d'augmenter la largeur du pic du d'hydrogène. Cette augmentation sert à éviter qu'un pic étroit vienne saturer les détecteurs du spectromètre de masse.

### I.2-2-3-3 Détermination des isotopes stables du soufre des sulfates dissous

Le soufre comporte quatre isotopes stables,  $^{34}\text{S}$ ,  $^{33}\text{S}$ ,  $^{34}\text{S}$  et  $^{36}\text{S}$ , ayant respectivement une abondance de 95,02%, 0,75%, 4,21% et 0,02% (Hoefs, 1980). La spéciation géochimique des isotopes stables des sulfates dissous nécessite au préalable une séparation des sulfates par précipitation sous forme de sulfate de barium  $\text{BaSO}_4$ . Pour cela, l'échantillon d'eau est acidifié avec du HCl dilué jusqu'à un pH de 4,2 afin de sortir de la zone de prédominance des espèces  $\text{HCO}_3^-$  et  $\text{CO}_3^{2-}$ . Il est ensuite porté à ébullition pour réduire le  $\text{CO}_2$  dissous et empêcher la co-précipitation du  $\text{BaCO}_3$ . Les sulfates sont précipités en  $\text{BaSO}_4$  par l'ajout d'une solution de  $\text{BaCl}_2$  à 5%. Dans les échantillons provenant des eaux usées, un dépôt noir est apparu, après précipitation, au fond des tubes avec les cristaux du  $\text{BaSO}_4$ . Ce dépôt est dû à la concentration élevée du carbone organique dissous dans ces échantillons. La pureté du précipité a été validée par une analyse en diffraction des rayons X au sein de notre laboratoire. Enfin, le précipité

formé est rincé avec de l'eau distillée chaude et séché à l'étuve (100°C) pendant 30 minutes (Krouse et Grinenko, 1991).

Après précipitation, le BaSO<sub>4</sub> a été converti en SO<sub>2</sub> suivant une méthode semblable à celle de Giesemann (1994). 1 mg de BaSO<sub>4</sub> est déposé dans une capsule en étain et introduit dans un réacteur en quartz maintenu à 1100°C. L'échantillon est brûlé dans une atmosphère enrichie temporairement en oxygène (pulse de 10 mL). Les gaz (SO<sub>2</sub>, SO<sub>3</sub>, N<sub>x</sub>O<sub>x</sub>, CO<sub>2</sub>) produits sont ensuite transportés par un flux d'hélium de haute pureté (100 mL/min) sur un niveau d'oxyde de tungstène où ils sont convertis en SO<sub>2</sub>. L'excès d'oxygène et la vapeur d'eau sont éliminés respectivement par fixation sur du cuivre réduit et par piégeage dans une eau contenant du perchlorate de magnésium. Les gaz restants (CO<sub>2</sub> et SO<sub>2</sub>) sont ensuite séparés par chromatographie (colonne PorapakQ, 0,8 m) à 100°C. Les valeurs isotopiques δ<sup>34</sup>S du soufre des sulfates dissous sont ensuite mesurées par le spectromètre Isoprime. Le SO<sub>2</sub> produit des pics simultanés sur les collecteurs permettant de calculer la déviation des rapports <sup>66</sup>SO<sub>2</sub>/<sup>64</sup>SO<sub>2</sub> de l'échantillon par rapport au gaz de référence afin d'obtenir la composition isotopique δ<sup>34</sup>S des sulfates de l'échantillon.

Pour chaque échantillon, l'expérience est réalisée trois fois. Ainsi, la quantité de BaSO<sub>4</sub> récupérée doit être suffisante. Etant donné l'origine des eaux usées, elles sont suffisamment riches en sulfates, et les volumes nécessaires sont de l'ordre de 60 mL. Par contre, un volume double est requis pour analyser les échantillons d'eau du robinet et de la nappe phréatique.

#### **I.2-2-3-4 Détermination des isotopes stables de l'oxygène des sulfates dissous**

Les valeurs isotopiques du δ<sup>18</sup>O des sulfates dissous ont été également mesurées par le spectromètre de masse Isoprime couplé à l'analyseur élémentaire EA3028. La méthode suivie est basée sur la conversion du BaSO<sub>4</sub> en monoxyde de carbone (CO), en suivant la méthode modifiée de celle de Koziat (1997) pour la matière organique. 1 mg de BaSO<sub>4</sub> est chargé dans une capsule en argent. Cette dernière est ensuite placée dans un réacteur tubulaire (tube interne : carbone vitreux / tube externe : céramique), et la combustion est maintenue à 1270 °C sous une atmosphère dépourvue d'oxygène. Tous les gaz produits sont ensuite transportés par un courant d'hélium de haute pureté (100 mL/min) vers un niveau de carbone contenant 30% de nickel et un niveau de copeaux de carbone vitreux permettant de convertir tout le CO<sub>2</sub> en CO. Le nickel favorise la production de CO par rapport au CO<sub>2</sub>. Après réaction, les gaz restants

(CO et N<sub>2</sub>) sont ensuite séparés par chromatographie (colonne 1,5 m de longueur, tamis moléculaire de 50 nm) à 75°C.

Le CO produit des pics simultanés sur les collecteurs permettant de calculer la déviation des rapports <sup>30</sup>CO/<sup>28</sup>CO de l'échantillon par rapport au gaz de référence afin d'obtenir la composition isotopique δ<sup>18</sup>O des sulfates de l'échantillon. Les références utilisées sont identiques à celles utilisées pour la mesure du δ<sup>34</sup>S.

### **I.2-2-4 Spéciation microbiologique**

Afin d'étudier la qualité microbiologique des eaux usées, le nombre des bactéries totales, sulfato-réductrices et ferri-réductrices a été déterminé dans des échantillons d'eau usées. Les échantillons ont été prélevés d'une manière à étudier l'évolution de la qualité microbiologique des eaux de l'amont vers l'aval du réseau et en fonction du temps.

Les méthodes adoptées sont celles des suspensions-dilutions en cascade en milieu liquide dans des microplaques stériles de 96 puits, afin de déterminer le nombre le plus probable (NPP) de bactéries cultivables. 1 mL de suspension est prélevé après agitation du flacon, puis dilué en cascade par puissances de dix dans une solution de NaCl à 8,5 g/L (10<sup>-1</sup> à 10<sup>-6</sup>). 25 µL de chaque suspension ainsi obtenu sont ensuite introduites dans 40 puits de la microplaque contenant 200 µL de milieu de culture. Les plaques sont ensuite incubées à une température et pour une durée donnée en fonction de la nature des bactéries à cultiver. Après incubation, un lecteur de microplaques (BioTek Instrument Inc.) est utilisé pour lire la densité optique des puits à 620 nm en fonction d'un blanc (milieu de culture non inoculé) afin de déterminer les puits dans lesquels une croissance bactérienne a eu lieu. Le dénombrement de la microflore bactérienne a été estimé statistiquement par la méthode du NPP au moyen d'un logiciel de calcul basé sur le nombre de puits positifs par dilution (Most Probable Number Calculator Version 4.04-United States EPA).

#### **I.2-2-4-1 Dénombrement de la microflore bactérienne totale**

Trente cinq échantillons ont été collectés afin de déterminer le nombre de la microflore bactérienne totale. Un milieu Luria Bertani (LB, Sigma<sup>®</sup>) a été utilisé comme milieu de culture. Ce dernier a été stérilisé par autoclavage à 120 °C pendant 20 min. Après inoculation, les microplaques ont été incubées à 24°C pendant 48 heures.

### **I.2-2-4-2 Dénombrement des bactéries sulfato- et ferri-réductrices**

Des milieux de cultures développés au sein du Laboratoire des Interactions Microorganismes-Minéraux-Matière Organique dans les Sols (LIMOS) ont été utilisés afin de cultiver et dénombrer les bactéries sulfato- et ferri-réductrices présentes dans 20 échantillons d'eau usée. La composition et le protocole de préparation de ces milieux sont détaillés dans l'annexe C.

Les bactéries sulfato- et ferri-reductrices sont des microflores anaérobiques. Leur dénombrement exige ainsi des précautions lors de la préparation des microplaques et de l'incubation. La solution de NaCl utilisée pour la préparation des dilutions en cascades et les milieux de cultures doivent être dégazés dans les minutes qui précèdent l'expérience. Les tubes de dilution et les flacons des milieux sont dégazés dans une jarre hermétique suite à l'aspiration de l'air de la jarre et de l'oxygène dissous dans les solutions à l'aide d'un Anoxomat (TTO France SARL). L'anaérobiose dans la jarre est maintenue par l'injection par le même appareil d'un mélange de N<sub>2</sub> 80%, CO<sub>2</sub> 10% et H<sub>2</sub> 10% en présence d'un catalyseur au palladium afin d'éliminer les dernières traces d'oxygène présentes par combinaison avec H<sub>2</sub>.

Après dégazage, les dilutions en cascade ont été réalisées, puis les puits remplis par le milieu de culture adéquat et inoculés. Ensuite, les microplaques sont dégazées selon la même méthode mentionnée ci-dessus et incubé en anaérobiose dans la jarre à 28°C pendant 5 jours.

## I.3 CARACTERISATION DES BIOFILMS

### I.3-1 Biofilms naturels

Les caractéristiques chimiques et morphologiques des biofilms du réseau d'assainissement ont été étudiées en microscopie électronique à transmission (MET) et en microscopie confocale à balayage laser (SCLM). Pour les analyses au MET, une fraction des biofilms a été analysée sous forme de poudre après lyophilisation, et une autre a été caractérisée sous forme de coupe mince (100 nm) après inclusion en résine et coloration.

#### I.3-1-1 Inclusion en résine

Avant leur inclusion en résine, les échantillons ont reçus un double traitement : une fixation au glutaraldéhyde suivie d'une post-fixation osmiée.

1 ml d'échantillon (MES et biofilms) est introduit dans un tube à essai avec une fermeture en septum. La fixation est réalisée en ajoutant 1 ml d'une solution de glutaraldéhyde à 2,5% (en poids) dans l'eau ultra pure. Après 4 heures, le surnageant est remplacé par de l'eau ultra pure pour éliminer l'excès du glutaraldéhyde (l'échantillon devant jamais être en contact avec l'air, une fine couche de surnageant est laissée à la surface de l'échantillon). Le lavage est répété 2 fois. Le glutaraldéhyde permet de consolider les édifices cellulaires en créant des liaisons entre les groupes amines des protéines.

L'eau est ensuite remplacée par une solution de tétrioxide d'osmium  $\text{OsO}_4$  à 2% (en poids) et on laisse agir pendant une heure. On procède ensuite comme pour le glutaraldéhyde. L'osmium est un fixateur et un agent de contraste. Il immobilise les doubles liaisons éthyléniques (-HC=CH-) en créant des ponts osmiés (-C-O-Os-O-C) entre les carbones voisins. Cette seconde fixation permet surtout de rigidifier les structures moléculaires et de maintenir leur intégrité pour la suite des manipulations.

L'excès d'eau ultra pure est éliminé et remplacé par une solution d'acétone à 10% pendant 5 min. On répète l'opération pour des concentrations d'acétone à 20%, 40% et 60%. On complète ensuite la déshydratation avec de l'acétone à 80% pendant 15 min, à 90% pendant 15 min (2 fois) et enfin à 100% pendant 20 min (3 fois).

Les échantillons déshydratés sont imprégnés dans un mélange contenant une résine de type Epoxy, l'Embed 812. Ce mélange contient pour 40 ml : 18,2 mL d'Embed 812, 12,4 mL d'anhydride dodécenylsuccinique (DDSA), 9,4 mL d'anhydride méthylnadique (MNA) et 0,7 mL d'un catalyseur, le 2-4-6-tridiméthylaminométhylphénol (DMP 30). On agite avec un barreau aimanté pendant une heure en veillant à ce qu'il ne se forme pas de bulles d'air. Cette solution de résine fraîche doit être préparée tous les jours.

L'imprégnation est réalisée en remplaçant progressivement l'acétone par la résine à raison d'un tiers toutes les 12 heures. Celle-ci est ajoutée et homogénéisée délicatement avec l'échantillon à l'aide d'une pipette pasteur en verre à pointe cassée. Après homogénéisation, chaque tube d'imprégnation est bouché et laissé 12 heures sous vide suite à l'aspiration de l'air par une seringue et une aiguille. Dans la dernière phase, la totalité du surnageant (acétone + résine) est remplacée par de la résine pure et laissée une douzaine d'heures à l'air libre. Une fois l'imprégnation terminée, les échantillons sont prélevés à l'aide d'une pipette pasteur à pointe cassée et placés dans des moules (Euromedex 70900). Le reste du moule est ensuite rempli par de la résine pure. La polymérisation de la résine est effectuée en étuve à 60 °C pendant 12 heures.

Après polymérisation, les petits blocs de résine sont fixés sur un porte-foret sous une loupe binoculaire et puis taillés en pointe par une lame de rasoir afin d'obtenir une surface de coupe trapézoïdale de 0,75 mm de haut sur  $\pm 0,5$  mm de large. Des coupes ultrafines de l'ordre de 100 nm, obtenues à l'aide d'un ultra microtome (Reichert OM U2) équipé d'un couteau en diamant, sont déposées sur des grilles en cuivre (Grille E.M. Sciences-Cat N°71150). Afin d'augmenter le contraste pour les observations au MET, les coupes sont colorées au citrate de plomb et à l'acétate d'uranyle (Deneux-Mustin et al., 2001). Cette technique d'inclusion en résine et de traitement des blocs a été introduite dans les compétences de notre équipe de recherche grâce à la formation donnée par *Madame Joëlle Gérard*. Enfin, il reste à noter qu'une partie des blocs a été confié à *Madame Jacqueline Channel* pour réaliser les coupes et les colorations.



### I.3-1-2 Coloration à l'acridine orange

Les biofilms naturels ont été colorés à l'acridine orange avant observation au microscope confocal à balayage laser (CLSM). Une fraction du biofilm a été déposée sur une lame en verre creuse, puis colorée par 30 mL d'acridine orange (Sigma-Aldrich, 22  $\mu\text{M}$  acridine orange, 5 mM EDTA, 0,15 M NaCl, 0,1 M Tampon phosphate-citrate, pH 6) dilué au  $\frac{1}{2}$ . Après 20 min de contact à l'obscurité et à température ambiante, l'excès du colorant a été éliminé par un cycle de trois lavages à l'eau ultra-pure stérile (autoclavée à 120°C pendant 20 min). Ensuite, la lame creuse a été recouverte par une lamelle dont les bords ont été vernis pour éviter le dessèchement du biofilm. L'utilisation d'une lame creuse permet d'éviter l'écrasement du biofilm par la lamelle. Les caractéristiques du CLSM utilisé et du fluorochrome sont détaillées dans le paragraphe I.3-2-6-2.

### I.3-2 Biofilms modèles

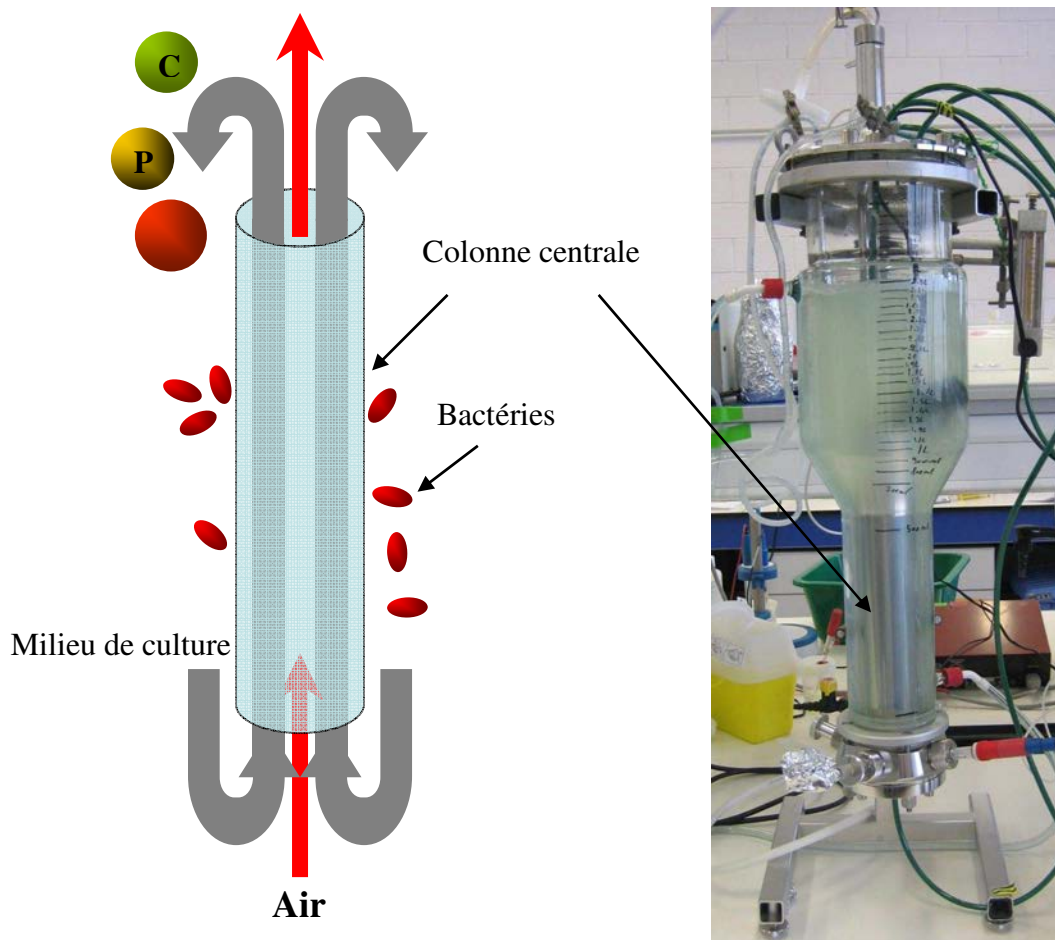
Un biofilm modèle a été développé en réacteur au sein du laboratoire afin de mettre en évidence l'effet de l'écoulement sur la croissance et la géométrie des biofilms bactériens. Le réacteur simule l'effet de l'hydrodynamique sur la croissance des biofilms sur les parois des collecteurs du réseau, et permet ainsi d'étudier l'impact des gradients de cisaillement sur les différentes étapes de croissance du biofilm bactérien. Cet impact a été caractérisé morphométriquement par SCLM.

Trois souches bactériennes ont été utilisées pour produire (faire croître) le biofilm modèle et étudier sa croissance sous trois gradients de cisaillement différents ( $\dot{\gamma} = 1, 6$  et  $60 \text{ s}^{-1}$ ). Pour cela, un couplage expérimental entre un réacteur de type **AirLift** (RAL) et un réacteur de type **Couette-Poiseuille** (RCP) a été réalisé. Le RAL a été utilisé pour cultiver les bactéries. Il permet un contrôle précis de la croissance bactérienne et de la concentration en nutriments. Le RCP permet quant à lui le développement du biofilm modèle dans des conditions hydrodynamiques optimales bien contrôlées.

#### I.3-2-1 Réacteur AirLift: RAL

Le RAL est un fermenteur de 3 L thermorégulé (Applikon). Il est constitué (i) d'une double enveloppe (jaquette) en verre borosilicaté, (60 cm de hauteur et de 13,5 et 8,5 cm de diamètre) et (ii) d'un cylindre central en inox (hauteur = 35 cm, diamètre = 4,45 cm). Ce

réacteur est ainsi composé de trois compartiments principaux : l'intérieur du cylindre central (riser), le compartiment de séparation de gaz (la partie haute du réacteur ; gaz-separator) et l'espace entre la paroi du réacteur et le cylindre central (down-commer). L'agitation et le fonctionnement sont assurés par l'injection d'air stérile dans le cylindre central (Figure I-9). Le flux d'air injecté à la base du cylindre central, fait circuler le milieu de culture de bas en haut. Ensuite, la quasi totalité du gaz est séparé du milieu de culture, dans le compartiment de séparation de gaz, ce qui crée une différence de pression ( $\Delta P$ ) entre l'intérieur du cylindre central et l'espace séparant le cylindre de la paroi du réacteur. Cette différence force le milieu de culture à circuler du haut vers le bas à l'extérieur du cylindre central, suivant un écoulement laminaire préservant les cellules bactériennes et les agrégats sous un très faible gradient de cisaillement.

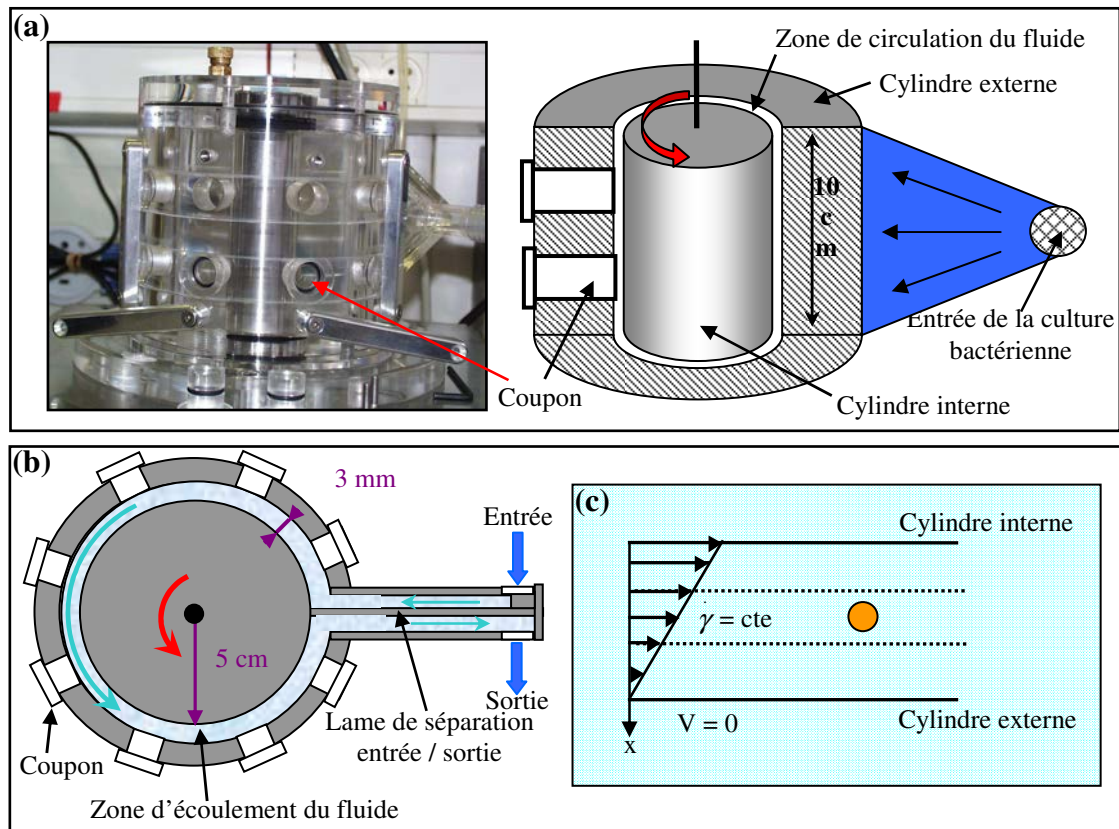


**Figure I-9:** Représentation schématique de la circulation des bactéries et du milieu de culture dans le réacteur AirLift.

L'évent du réacteur est équipé d'un condenseur évitant toute perte d'eau par évaporation. Le réacteur est aussi équipé d'une sonde de pH permettant de contrôler la variation d'alcalinité du milieu de culture tout au long des expériences.

### **I.3-2-2 Réacteur Couette-Poiseuille : RCP**

Le RCP est constitué de 2 cylindres concentriques en plexiglass espacés de 3 mm. Le volume vide séparant les 2 cylindres est de 97 mL, la hauteur du réacteur étant de 10 cm (Figure I-10-a). Le cylindre externe est creux, immobile et percé de seize coupons de prélèvements de 16 mm de diamètre (Figure I-10-b). Pendant les expériences, les coupons sont régulièrement prélevés et remplacés par des coupons neufs afin de suivre la croissance du biofilm en fonction du temps. Le cylindre interne est plein (10 cm de diamètre) et tourne autour de son axe grâce à un moteur. Sa rotation assure un gradient de cisaillement ( $\dot{\gamma}$ ) constant dans le milieu de culture, ce dernier circulant dans l'espace entre les deux cylindres. Dans le RCP, la vitesse d'écoulement est maximale à la surface du cylindre interne, et décroît tout au long de la zone de circulation pour être nulle à la surface du cylindre externe (Figure I-10-c). Ce profil de vitesse donne un écoulement laminaire et un  $\dot{\gamma}$  constant. Ce dernier peut varier dans une gamme de 1 à 120 s<sup>-1</sup> (nombre de Reynolds variant de 9 à 1114) en ajustant la vitesse de rotation du cylindre interne et le débit d'injection du liquide dans le réacteur. Le principal avantage du RCP est d'assurer un  $\dot{\gamma}$  uniforme sur toutes ses surfaces permettant une croissance uniforme du biofilm sur les coupons de prélèvements.



**Figure I-10:** Représentation schématique d'une coupe longitudinale (a) et transversale (b) du réacteur Couette-Poiseuille, et profil d'écoulement dans l'entrefer de croissance (c).

### I.3-2-3 Milieu de culture

Un milieu minéral BH (Bushnell-Hass, Sigma<sup>®</sup>) enrichi en glucose a été utilisé comme milieu nutritif au cours des différentes expériences. Le BH contient : NaCl (8,5 g/L), MgSO<sub>4</sub> (0,2 g/L), CaCl<sub>2</sub> (0,02 g/L), KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (1 g/L), K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (1 g/L), NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> (1 g/L), et du FeCl<sub>3</sub> (0,05 g/L). Le pH du milieu de culture a été ajusté à 7,4 par ajout de NaOH. Le milieu a été ensuite stérilisé par autoclavage à 120°C pendant 20 min.

Parallèlement, une solution mère de glucose à 20 g/L a été préparée et stérilisée par autoclavage (110°C pendant 30 min), avant d'être ajoutée au milieu BH pour obtenir une concentration finale à 0,5 g/L. Le glucose a été utilisé comme source de carbone et d'énergie pour les bactéries.

Toutefois, bien que l'ensemble du dispositif ait été entièrement stérilisé soit par voie thermique (120°C, 20 min), soit par voie chimique (chlorocyanide) (voir paragraphe II.3-2-5), les contaminations par des protozoaires (eucaryotes unicellulaires) ont plusieurs fois fait

échouer les expériences au bout de quelques jours. Leur prédation par phagocytose affecte fortement la croissance bactérienne et leurs kystes peuvent coloniser rapidement les surfaces des coupons. Afin de résoudre ce problème, du cycloheximide  $C_{15}H_{23}NO_4$  (Roth<sup>®</sup>, Cycloheximid 5g) stérilisé par filtration (MILLIPORE, MILLEX<sup>®</sup>GP, acétate de cellulose, porosité 0,22  $\mu$ m) a été ajouté au milieu BH.

Ce produit est un inhibiteur de la synthèse des protéines chez les eucaryotes. En effet, le cycloheximide interfère avec l'action peptidyle transférase du ribosome 60S, bloquant la transcription des ADN en ARN. Le cycloheximide inhibe donc la croissance des protozoaires, sans altérer celles des bactéries ( Petropoulos P. et al., 2005 ; Chabaud S. et al., 2006).

D'après Petropoulos, une concentration de 100 mg/L en cycloheximide inhibe efficacement la croissance des protozoaires dans le milieu de culture sans réduire l'activité bactérienne. Néanmoins, afin de vérifier l'innocuité de ce produit sur les bactéries utilisées, une gamme de concentration en cycloheximide allant de 1,6 à 100 mg/L a été testée sur des cultures séparées des trois souches dans un milieu de culture BH (+glucose 0,5 g/L) ou du milieu LB. Après 24 heures d'incubation à 28°C, des croissances bactériennes similaires ont été observées quelle que soit la concentration en cycloheximide et la nature du milieu de culture utilisées. A 100 mg/L, le cycloheximide n'affecte donc pas la croissance des souches employées.

### **I.3-2-4 Préparation de l'inoculum**

Trois espèces bactériennes ont été utilisées pour produire le biofilm bactérien : *Pseudomonas aeruginosas*, *Pseudomonas fluorescens*, et *Stenotrophomonas maltophilia*. Ces trois souches sont souvent utilisées dans la littérature pour étudier le développement, la morphologie, et la diffusion de matières dans des biofilms bactériens modèles (Vieria et al., 1993; Lewandowski et al., 1999; Stoodley et al., 1999). Des aliquotes glycérolisés stockés à -80°C, ont été décongelés, et inoculés à l'aide d'une œse stérile (BioMérieux, F2354) sur un milieu de culture gélosé (LB, stérilisé par autoclavage à 120°C pendant 20 min). Après inoculation, les souches ont été incubées à 28°C pendant 48 heures. Une colonie de chaque souche a été ensuite inoculée séparément à l'aide d'une œse stérile dans 5 mL de milieu LB liquide stérile (n= 3), et cultivée pendant une nuit à 28°C, sous agitation rotative (120 trs/min).

Les bactéries ont été ensuite dénombrées par comptage direct à l'aide d'une cellule de Thomas afin de déterminer la concentration en bactéries de l'inoculum. La profondeur de la

cellule est de 0,1 mm, la surface élémentaire de chaque zone de comptage est de  $25 \times 10^{-4} \text{ mm}^2$  (1 bactérie par champ  $\equiv 4 \times 10^6$  bact/mL). Avant le comptage, la suspension bactérienne a été bien homogénéisée par un vortex. Le comptage des bactéries a été effectué sur 15 à 20 zones différentes en utilisant un objectif  $\times 40$ . Idéalement, il faut avoir entre 5 et 20 cellules bactériennes par champ de comptage pour obtenir une numération correcte. La densité  $N$  de l'inoculum (bactéries/ mL) est ensuite obtenue en appliquant l'équation suivante:

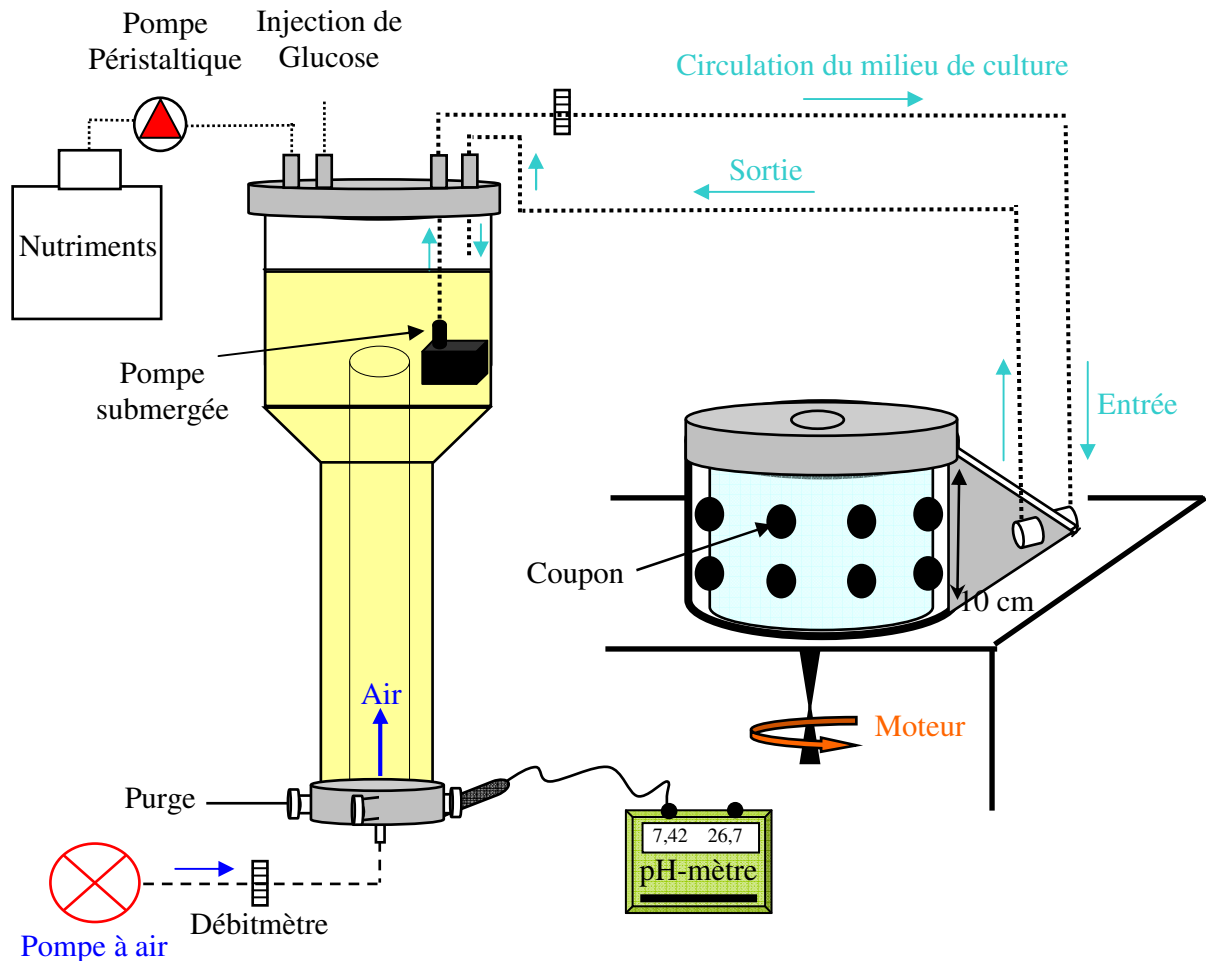
$$N = \frac{n}{x} \times (4 \times 10^6) = \bar{n} \times (4 \times 10^6)$$

$n$  : nombre de bactéries comptées

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

### I.3-2-5 Couplage RAL-RCP et opération du système

Avant de réaliser les expériences, les différentes composantes du système sont stérilisées séparément. Le RAL et les conduites ont été stérilisés 2 fois par autoclavage à  $120^\circ\text{C}$ , pendant 20 min. Le RCP étant en plexiglass, il a été lavé à l'éther de pétrole afin d'éliminer les billes de polissage utilisé lors de l'usinage du réacteur, puis stérilisé par rinçage à l'eau ultra-pure, elle-même stérilisée au préalable par autoclavage à  $120^\circ\text{C}$  pendant 20 min. Ensuite, le système a été assemblé sous une hotte stérile à flux laminaire pour éviter tout risque de contaminations (Figure I-11). Les deux réacteurs sont reliés l'un à l'autre grâce à une pompe submergée dans le RAL qui injecte le fluide dans le RCP, et assure ainsi la circulation entre les 2 réacteurs. Après montage, le système a été rempli par de l'eau ultra-pure stérile (autoclavage à  $120^\circ\text{C}$  pendant 20 min) afin d'ajuster le débit d'injection dans le RCP en fonction de la vitesse de rotation du cylindre interne du RCP. Ce réglage a pour objectif d'obtenir le gradient de cisaillement constant souhaité ( $\gamma$ ).



**Figure I-11:** Schéma récapitulatif du couplage du réacteur de culture bactérienne (Airlift à gauche) avec le réacteur de croissance du biofilm (Couette-Poiseuille à droite)

Le système a été ensuite stérilisé chimiquement par deux cycles de rinçage au chlorocyanide (ELGA LABWATER, CT1, Tablettes de désinfection). Le chlorocyanide est généralement utilisé dans la désinfection des systèmes d'osmose inverse employés pour la production d'eau ultra-pure dans les laboratoires. La désinfection a été réalisée en circuit fermé par circulation de la solution de chlorocyanide pendant 3 heures. Enfin, le système a été rincé par 20 L d'eau ultra-pure stérile en circuit ouvert. Il s'avère important de noter que malgré toutes les procédures de stérilisation, quelques kystes de protozoaires sont apparus durant les deux derniers jours d'une expérience. Ces kystes peuvent être logés dans des régions difficiles à stériliser comme les joints en caoutchouc et les zones de contact du plexiglass dans le RCP.

Après stérilisation, le RAL a été rempli par du milieu BH, injecté à l'aide d'une pompe péristaltique. Le glucose quant à lui a été introduit par un injecteur (Figure I-11). Ensuite,

5 mL de chaque inoculum ( $3 \times 10^8$  bactéries/mL) ont été injectés à l'aide d'une seringue stérile pour ensemercer le RAL et la culture bactérienne a été cultivée pendant 24 heures à 26-27°C. La température de culture a été contrôlée par circulation d'eau thermostatée dans la jaquette du RAL. Le milieu de culture a été oxygéné et agité par injection d'air stérile (60 L/heure) dans le cylindre central du RAL. L'air, stérilisé par filtration sur double filtre autoclavable (porosité 0,20  $\mu\text{m}$ , PTFE membrane, Sartorius, Minisart SRP25), a été injecté à l'aide d'une pompe à air (KnFLAB, LABOPOINT). Le premier filtre est situé à l'entrée de la pompe et le deuxième à la sortie du débitmètre. La vitesse globale de croissance des bactéries est la résultante du couplage entre leur vitesse propre de croissance et la vitesse de transfert de la phase gazeuse dispersée dans le milieu. Après 24 heures, lorsque la culture bactérienne atteint sa phase stationnaire de croissance ( $3 \times 10^8$  bactéries/mL), le RCP est connecté au système. L'ensemble fonctionne en circuit fermé à l'aide de la pompe immergée. Au cours de l'expérience, toutes les 24 heures, le RAL est à moitié purgé et complété par 1,5 L de milieu de culture neuf enrichi en glucose 0,5 g/L. Ce renouvellement du milieu permet d'avoir une croissance bactérienne soutenue et une densité bactérienne quasiment stable durant les trois semaines d'expérience. Cette dernière a été suivie à l'entrée du RCP tout au long de l'expérience par spectrophotométrie à une longueur d'onde de 600 nm (SHIMADZU, UV-VIS Spectrophotometer, UV-1205). Les variations de température et de pH ont été également suivies grâce à des sondes implantées dans le RAL.

Le développement temporel du biofilm sur les parois du RCP a été étudié pendant trois semaines grâce au prélèvement séquentiel des 16 coupons d'échantillonnages. Lors du prélèvement des coupons, la circulation est interrompue brièvement. Le prélèvement a été effectué dans le sens inverse de l'écoulement c'est-à-dire, du coupon le plus proche de la sortie vers le coupon le plus proche de l'entrée. Ce protocole d'échantillonnage évite de modifier le régime d'écoulement à la surface des coupons qui doivent être prélevés ultérieurement. Une fois prélevé, le coupon est remplacé par un autre coupon stérile et la circulation est réactivée. Les coupons échantillonnés sont préservés avant observation en microscopie confocale dans des piluliers stériles contenant un fond d'eau ultra-pure stérile également, assurant ainsi une atmosphère humide pour éviter le séchage du biofilm. Le stockage se fait à 4°C dans une chambre froide.

Au cours de cette étude, 3 gradients de cisaillement ont été utilisés : 1, 6, et 60  $\text{s}^{-1}$  correspondant respectivement à 27 mL/min, 162 mL/min et 1620 mL/min en débit de culture



bactérienne et à 0,6 trs/min, 3,65 trs/min, et 36,5 trs/min en vitesse de rotation du cylindre interne du RCP.

### **I.3-2-6 Microscope Confocal à Balayage Laser : CLSM**

#### **I.3-2-6-1 Principe et acquisition d'images au CLSM**

La microscopie à balayage laser (LSM) permet l'acquisition d'images 2D (x,y), 3D (x,y,z) ou 4D (x,y,z,t) sur des objets millimétriques à micrométriques. En mode confocal, elle permet, par sa résolution (qui peut atteindre 0,1  $\mu\text{m}$  en résolution latérale et 0,5  $\mu\text{m}$  en résolution axiale), d'être complémentaire à l'échelle micrométrique des microscopies électroniques à balayage ou à transmission et d'améliorer considérablement les performances de la microscopie de fluorescence. Les systèmes confocaux à balayage laser sont composés d'une ou plusieurs sources laser, d'un système de balayage, d'un microscope optique, d'un ou plusieurs détecteurs (photomultiplicateur) et d'une unité informatique dédiée à l'acquisition et au traitement d'images. En raison de leur bonne résolution spectrale et spatiale, ils permettent de préciser la distribution spatiale d'un corps fluorescent (bactéries, minéral, molécules...) au sein d'un objet complexe (biofilms par exemple)

La microscopie optique classique (épi-fluorescence), délivre des images de résolution limitée et peu contrastées. Le champ d'observation est fortement éclairé sur toute l'épaisseur de l'échantillon et l'image obtenue est contaminée par la lumière provenant de points situés en dehors du plan focal. De plus, lorsqu'un échantillon est épais, il présente un relief important. Par ailleurs, lorsqu'il est incliné par rapport à l'objectif, seule une partie de l'objet est nette dans l'image. Cette perte de résolution, en particulier dans la direction de l'axe optique (Z), provient de la collection par l'objectif de photons émis par les plans sous- et sus-jacents au plan focal.

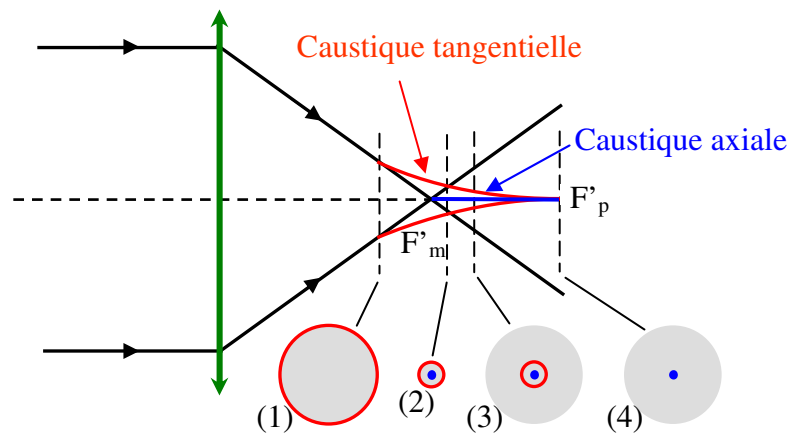
Lors de sa formation, la résolution de l'image obtenue résulte de la composition de deux fonctions de répartition de la lumière : la fonction d'étalement dans le plan focal (plan XY) et la fonction de défocalisation axiale (axe Z). Elles conditionnent respectivement la résolution latérale et la résolution axiale. Ces fonctions dépendent de la résolution optique des lentilles du microscope. Le microscope agit comme un filtre possédant une réponse impulsionnelle (Point Spread Function PSF).

La résolution d'un objectif provient des interférences, au niveau du plan image, des ondes lumineuses diffractées le long du trajet des rayons et est limitée en diffraction.

L'image d'un point A situé à l'infini sur l'axe optique n'est plus un point, mais une tâche dont l'aspect dépend du plan focal sélectionné (Figure I-12). Le cône de lumière entre le foyer et la lentille définit l'ouverture numérique (O.N.) notée souvent NA (numerical aperture en anglais) dont la valeur est fonction de l'indice de réfraction et de l'angle d'ouverture de l'objectif :

$$NA = n \sin \alpha$$

où  $\alpha$  : demi-angle d'ouverture de l'objectif (cône) et  $n$  : indice de réfraction du milieu

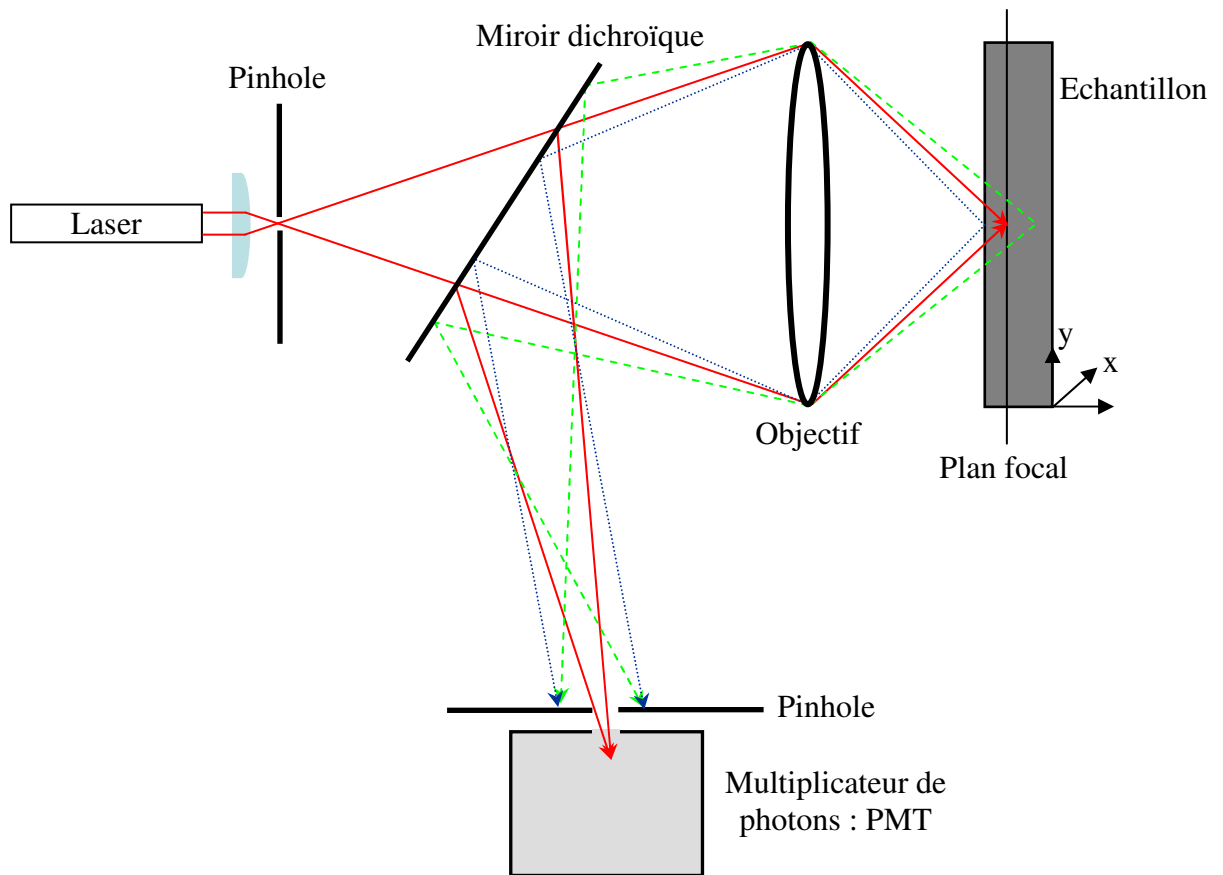


**Figure I-12 :** Représentation de l'aberration sphérique due à la non convergence dans le point focal des rayons marginaux et paraxiaux. Il y a accumulation de lumière sur une surface de révolution (cône de lumière) composée des deux caustiques : la caustique axiale  $F'_p$  et la caustique tangentielle ou sagittale  $F'_m$ .

Ainsi, l'image classiquement obtenue est composée d'un point d'intensité maximum, entouré d'anneaux de plus en plus sombres (disques d'Airy) résultant de l'incapacité de la lentille à collecter la lumière dispersée au-delà d'un angle donné  $\alpha$ . Plus  $\alpha$  augmente, plus l'objet est détaillé et plus la résolution augmente.

L'amélioration majeure de la microscopie à balayage laser par rapport à la microscopie optique conventionnelle utilisant des sources lumineuses non cohérentes et polychromatiques réside avant tout dans leur aptitude à fournir une information optique confocale: celle-ci provient exclusivement d'un volume défini à l'intérieur du volume éclairé par le laser. La lumière parasite (hors focale) est éliminée (i) en illuminant la préparation au moyen d'un point lumineux (point de focalisation du laser) dont le diamètre est limité et (ii) par un diaphragme

ajustable (appelé pinhole) placé devant le détecteur (PM) au niveau du foyer arrière de l'objectif (plan focal conjugué au plan focal). Ainsi, seuls les photons provenant du plan focal traversent le diaphragme et participent à la formation de l'image (Figure I-13). L'optimisation du diamètre d'ouverture du pinhole permet de limiter l'acquisition du signal à la première tâche du disque d'Airy (premier minimum de la PSF).



**Figure I-13** : Principe de la microscopie confocale à balayage laser

À partir de la déviation d'un rayon lumineux par un prisme d'indice  $n$  ( $D = (n-1)\alpha$ ), de faible angle au sommet  $\alpha$ , il est possible de définir la résolution des objectifs au sens de Rayleigh. Elle correspond au pouvoir séparateur, c'est-à-dire à la capacité d'un système optique à distinguer deux points distincts.

La résolution latérale ( $\Delta_{xy}$ ) est inversement proportionnelle à l'ouverture numérique (NA),

$$\Delta_{xy} = 1.22 \lambda / (NA_{\text{objectif}} + NA_{\text{condenseur}})$$

en épifluorescence  $NA_{\text{objectif}} = NA_{\text{condenseur}}$

$$\Delta_{xy} = 0.61 \lambda / NA$$

où  $\lambda$  désigne la longueur d'onde du faisceau incident

L'optimisation du pinhole en fonction de la longueur d'onde et de l'objectif employé permet d'obtenir une résolution latérale optimale  $\Delta_{xy} = 0.46 \lambda / NA$ . La résolution augmente si  $R_{xy}$  est faible, c'est à dire si  $\lambda$  est faible ou si NA est grand.

La résolution axiale ou profondeur de champ ( $\Delta_{axial}$ ) est définie comme la largeur à mi-hauteur du profil d'intensité le long de l'axe Z. En microscopie classique, elle est définie par :

$$\Delta_{axial} = 2 n \lambda / NA^2$$

En microscopie confocale et avec un pinhole d'ouverture adaptée, la résolution axiale devient:

$$\Delta_{axial} = 1,4 n \lambda / NA^2$$

Soit une amélioration de l'ordre de 30% de la résolution. La résolution axiale étant inversement proportionnelle au carré de l'ouverture numérique de l'objectif, seuls les objectifs à grande ouverture numérique permettent d'obtenir un sectionnement optique correct ou assez fin.

De ce fait, en rejetant la lumière parasite émis en dehors du plan focal, ce dispositif optique particulier augmente le rapport signal/bruit, accroît la résolution optique du microscope et offre aussi la possibilité d'opérer des coupes optiques dans les échantillons par déplacement du point de focalisation du laser. Le déplacement vertical est ajusté en fonction de la finesse de la structure à caractériser et de la résolution de l'objectif utilisé.

Par ailleurs, les photons traversant le diaphragme peuvent être filtrés en fonction de leur longueur d'onde, collectés et amplifiés dans des tubes de photo-multiplieurs (PMT). Le

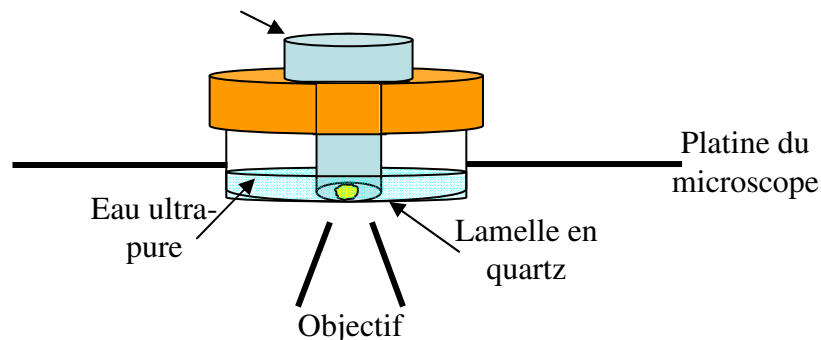
signal électrique obtenu est ensuite numérisé en niveaux de gris et une image du plan focal balayé est reconstruite pixel par pixel.

Le CLSM permet l'observation *in vivo* des objets minéraux (grains,...) et organiques (cellules bactériennes, cellules eucaryotes,...) réfléchissants, auto-fluorescents ou marqués par des fluorochromes spécifiques possédant une longueur d'onde d'excitation et d'émission spécifique. En biologie, ces fluorochromes sont généralement utilisées pour le marquage sélectif des composants cellulaires (acides nucléiques, des lipides, des glucides, des protéines,...) ou pour quantifier les ions présents ( $H^+$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$  ...).

Les CLSM récents sont généralement équipés de différentes sources laser (différentes longueur d'onde d'excitation) de photo-multiplicateurs optimisés et d'une série de filtres ou de prismes permettant de sélectionner les longueurs d'onde d'émission. Ces systèmes permettent de récupérer simultanément, tout en les séparant, les signaux de fluorescences correspondant à différentes longueurs d'onde d'excitation et d'émission.

### I.3-2-6-2 Dispositif utilisé

Dans cette étude, les observations confocales ont été réalisées à l'aide d'un microscope inversé Nikon TE 2000 U Eclipse équipé d'une tête confocal Radiance 2100 AGR-3Q Biorad, et des objectifs à sec ( $\times 4$  – ON : 0,13 ;  $\times 20$  – ON : 0,5) et à immersion huile ( $\times 40$  – ON : 1,4 et  $\times 60$  – ON : 1,4). Un système de porte échantillon a été adapté sur la platine du microscope permettant de fixer les biofilms au-dessus des objectifs (Figure I-14). Le coupon a été retourné dans une coupelle contenant un fond d'eau ultra-pure afin d'éviter le dessèchement du biofilm. La base de la coupelle est une lamelle en quartz de qualité microscopique (Electron Microscopy Sciences, WillCo-Dish<sup>®</sup>, glass bottom dish,  $\varnothing$  22 mm). Les objectifs  $\times 4$  et  $\times 20$  ont été utilisés pour réaliser les acquisitions.



**Figure I-14 :** Schéma descriptif du dispositif d'installation de l'échantillon sur la platine du microscope. Le biofilm est submergé dans l'eau.

Le microscope est installé sur une table anti-vibration à suspension pneumatique. Cette table filtre parfaitement toutes les vibrations générées dans le bâtiment (déplacement des personnes, vent,...). Ce dispositif a été particulièrement efficace pour garantir l'immobilité des diverticules des biofilms (i.e. pédoncules) lors de l'acquisition des sections optiques ; la position inversée du coupon est très favorable à leur déplacement.

La tête de balayage du microscope est reliée, par une série de fibres optiques, aux 4 sources lasers fournissant 7 longueurs d'onde d'excitation différentes, réparties entre le proche UV et le rouge :

- une diode violette à 405 nm (BLD)
- un laser Argon à 457, 476, 488 et 514 nm
- un laser He-Ne à 543 nm
- une diode rouge à 637 nm

En détection, le système Rainbow permet l'alignement de deux roues concentriques munies de filtres interférentiels : passe-haut (Long Pass : LP) et passe-bas (Short Pass : SP) et de définir des fenêtres spectrales par pas de 10 nm de très hautes qualités. Les signaux de fluorescences peuvent ainsi être récupérés entre 420 et 660 nm et au delà de 660 nm. Ces associations de filtres «pseudo-Band Pass» ont une transmission supérieure à 80% pour une largeur de bande passante de 10 nm. L'acquisition de la fluorescence est répartie sur trois photomultiplicateurs, équipés de prismes optiques destinés à amplifier par réflexion multiple le signal. Un détecteur en transmission permet d'obtenir une image en niveaux de gris du champ observé.

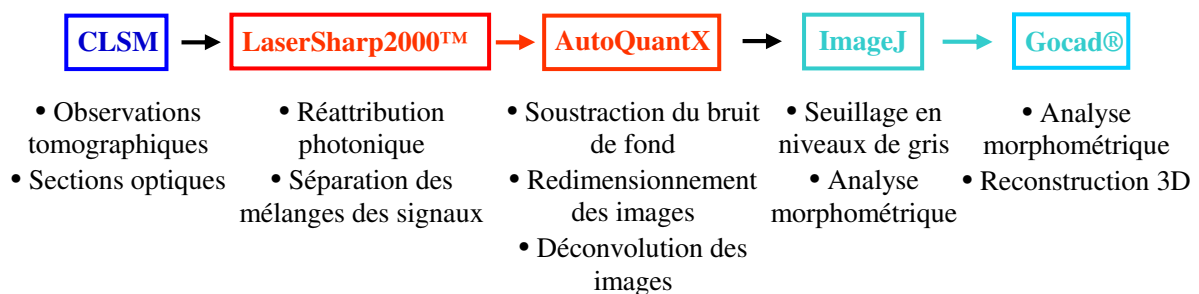
L'acridine orange a été utilisé comme sonde fluorescente pour marquer les biofilms bactériens. Cette sonde marque les acides nucléiques (ADN, ARN) et les exopolymères extracellulaires (Wirtanen et al., 2001; Jana-Sur and Chakraborty, 2005). Les fluorescences émises par cette sonde après excitation sont récupérées dans 3 canaux. Le canal «vert» collecte la fluorescence émise par les ADN et les ARN (bactéries) dans une bande de 530-560 nm après une excitation à une longueur d'onde de 514 nm. Le canal «rouge» collecte la fluorescence émise par l'acridine piégée dans les exopolymères extracellulaires dans une bande de longueur d'onde supérieure à 600 nm après une excitation à une longueur d'onde de

457 nm. Enfin, le canal «bleu» collecte la réflexion du faisceau laser sur le support (coupon) dans une bande de 420-450 nm. Les observations sont stockées sous forme de piles d'images (3D).

Durant l'acquisition des données par le microscope confocal, la fonction Lambda-Strobing a été activée. Les acquisitions sont alors basées sur une excitation séquentielle ligne par ligne au sein de chaque coupe au lieu d'un balayage coupe par coupe. Cette méthode a l'avantage de réduire significativement le bruit de fond associé au balayage simultané et de bien séparer les photons émis après chaque excitation et de les collecter séparément.

### I.3-2-6-3 Méthodologie du traitement d'images

L'effet du gradient de cisaillement sur la croissance des biofilms bactériens a été déterminé par une caractérisation morphométrique des observations faites au CLSM. Les piles de coupes optiques obtenues par CLSM ont été traitées par une série de logiciels de traitement d'images afin d'améliorer la résolution spatiale des coupes (suppression du bruit de fond) et par des logiciels d'analyses statistiques, géométriques et morphologiques permettant de déterminer la rugosité externe, la distribution en taille, l'hétérogénéité et l'arrangement des éléments constitutifs du biofilm bactérien. La reconstruction tridimensionnelle représente l'étape ultime de la modélisation géométrique du biofilm et permet d'obtenir les caractéristiques structurales (dimension fractale de périmètre et de surface, taux de recouvrement, .....). La figure I-15 présente un schéma récapitulatif des différentes étapes suivies pour la caractérisation morphométrique du biofilm bactérien.



**Figure I-15 :** Méthodologie suivie pour le traitement des piles des coupes optiques

### I.3-2-6-3-1 Réattribution spectrale des signaux de fluorescence

Les piles d'images obtenues par CLSM sont tout d'abord traitées par le logiciel de pilotage du microscope **LaserSharp2000™**. Un algorithme de calcul (Reassignment) a été appliqué sur l'ensemble des images tomographiques. Cette procédure de calcul post-acquisition opère une réattribution spectrale qui réduit les mélanges accidentels entre les signaux de fluorescences émis par les différentes sondes (Bleedthrough). Il s'avère très efficace pour les acquisitions effectuées en mode simultané. Ce traitement mathématique permet par exemple d'améliorer significativement la séparation entre la fluorescence émise par les bactéries et celle émise par les exopolymères, ainsi que le contraste des images obtenues sans perte de signal.

### I.3-2-6-3-2 Amélioration du seuillage et restauration des piles d'images

Même en microscopie confocale, les données issues des acquisitions ne sont donc pas directement exploitables en vue de mesures quantitatives telles que la distribution spatiale des intensités ou les volumes des objets fluorescents car ces données subissent toujours des distorsions lors du processus d'acquisition. L'image obtenue après acquisition au CLSM correspond à la somme des PSFs élémentaires. Chaque PSF est centré et son intensité est fonction de la localisation du point objet dans l'échantillon. Mathématiquement, cette opération est appelée la *convolution*.

Même si l'élongation axiale en z des objets observés est moins prononcée en microscopie confocale, le bruit peut demeurer important. Pour obtenir des images améliorées, exemptes de distorsions, la déconvolution est un moyen de restauration couramment utilisé, sous différentes formes (Holmes et al., 1988; Chomik et al., 1997). En raison de l'épaisseur des biofilms, la réponse impulsionnelle n'est pas invariante dans l'espace: l'échantillon observé possède un indice de réfraction différent de celui du milieu dans lequel il est imprégné (comme l'eau). Dans ce cas, chaque plan image de cet objet subira des distorsions différentes. L'effet est d'autant plus visible que la profondeur d'acquisition est grande. Pour répondre à ce problème, nous avons choisi une méthode de déconvolution auto-adaptative (*Blind deconvolution*).

La déconvolution, aussi connue sous le nom de « restauration 3D des images », est une technique informatique permettant d'inverser les effets de la convolution (suppression de l'effet de voile et de trouble), de restaurer la forme et la clarté des images (améliorer la résolution dans les axes x, y et z et réduire le bruit de fond). L'algorithme choisi a permis une amélioration de la résolution des images obtenues par différentes techniques d'observations :



microscopes confocaux, microscopes à fond clair, «spinning disk» microscopes et microscopes multiphotoniques (Holmes, 1995). Chaque image  $g(x)$  peut être décrite par l'équation de convolution suivante:

$$g(x) = f(x) * h(x) + n(x)$$

$x$  représente la coordination spatiale en 3D

$f(x)$  représente la pile d'images idéale (fidèle)

$h(x)$  représente la fonction de diffusion de point (PSF)

$n(x)$  représente le bruit due à l'électronique (formation de l'image et acquisition)

$g(x)$  représente la pile d'images obtenue

La déconvolution représente alors une estimation  $\hat{f}(x)$  de  $f(x)$  à partir de  $g(x)$ . Plusieurs méthodes de déconvolution ont été développées : *Iterative Constrained*, *Maximum Likelihood deconvolution*, *Blind deconvolution*, et *Linear methods*.

Dans cette étude, les piles d'images ont été restaurées par la méthode *Blind deconvolution* qui reprend des algorithmes itératifs et contraints (Iterative Constrained algorithms) afin de produire une estimation  $\hat{h}(x)$  de  $h(x)$  concurremment avec  $f(x)$ . L'algorithme est contraint dans le sens où il ne déconvolue que les images qui ont des propriétés mathématiques correctes (valeurs positives) et itératif dans le sens où il répète plusieurs fois la même itération de déconvolution.

La méthode *Blind deconvolution* utilisée ne requière pas de mesure du PSF ( $h(x)$ ) du système, contrairement aux autres méthodes de déconvolution. Cet algorithme à l'avantage de s'adapter au PSF réel du microscope qui peut être significativement différent du PSF théorique et du PSF mesuré. Cette différence est due à des aberrations optiques de l'échantillon en soi. Ainsi, cette technique est capable de s'adapter au changement du PSF au sein de l'échantillon. Ainsi, la déconvolution est nettement plus importante qu'avec les autres méthodes qui utilisent un PSF théorique ou mesuré au préalable. Cette méthode présente un avantage très important : elle permet de réduire le bruit de fond dans les images de microscope confocal. L'algorithme de déconvolution reconnaît automatiquement les fluorescences parasites et les supprime. Ainsi, les images restaurées n'ont que des valeurs positives (data values).

La déconvolution d'une pile d'images est mieux réalisée quand le pas en z (espacement entre les coupes optiques) est plus petit que le pas résolu, fixé par le CLSM (suréchantillonnage). Quand le pas en z fixé avant déconvolution est inférieur à ½ du pas réel, on obtient une meilleure résolution spatiale et la restauration des coupes optiques est améliorée. Ainsi, la pile d'images peut être redimensionnée par ré-échantillonnage (Resize), et de nouvelles images intermédiaires sont créées. Le bruit de fond est soustrait avant de re-échantillonner les piles d'images.

Par ailleurs, le logiciel **AutoQuantX** (MediaCybernetics, Version X1.4.1) a été employé pour déconvoluer séparément en 3D les piles d'images correspondant aux bactéries et aux EPS (Exopolymères). Il a permis :

- D'éliminer le bruit de fond par sélection d'une région d'intérêt (3D) dans laquelle le bruit de fond est estimé.
- De ré-échantillonner les piles d'images: les images intermédiaires sont réinterpolées (mode idéal) du pas en z recommandé par le logiciel.
- De déconvoluer les piles d'images par «*Blind déconvolution*» utilisant une PSF adaptative: 30 itérations de déconvolution avec une suppression moyenne du bruit, traitement bloc à bloc activé (*Z montage*) si le nombre de coupes optiques est supérieur à 100.
- D'enregistrer les blocs d'images 32 bits déconvolués au format *.raw* et *.ipl* pour les traitements ultérieurs.

#### I.3-2-6-3-3 Seuillage et binarisation des piles d'images

Après réattribution spectrale et déconvolution, les piles d'images ont été seuillées (thresholding) et binarisées afin de supprimer le bruit de fond restant après déconvolution. Le logiciel **ImageJ (version MacBiophotonics)** a été utilisé. C'est un logiciel de traitement et d'analyse d'images développé en langage *Java* par le National Institute of Health (NIH, Bethesda, Maryland, USA, <http://rsb.info.nih.gov/ij/>). Il est utilisé pour traiter des images provenant de domaines variés, incluant la médecine, l'astronomie, les sciences des matériaux, la biologie,....

Le seuillage d'une image en niveaux de gris (256 niveaux) correspond à la fixation d'une valeur seuil entre 0 et 255. Tous les pixels qui ont une intensité en niveaux de gris inférieure à ce seuil sont remis à 0 donc soustraient de l'image et considérés comme le fond de l'image (pixels négatifs). Par contre, les pixels ayant une intensité supérieure sont conservés et considérés comme des pixels composant l'image (pixels positifs). Pour choisir manuellement cette valeur de seuillage, on s'est basé sur l'histogramme de distribution des intensités des pixels de l'image. Cet histogramme représente le nombre de pixels en fonction de leur intensité en niveaux de gris. Ainsi, l'histogramme d'une image en 256 niveaux de gris sera représenté par un graphique possédant 256 valeurs en abscisse et le nombre de pixels de l'image en ordonnée. Mais le problème principal de toute méthode de seuillage est le choix du seuil. Par exemple, pour une valeur de seuillage faible, on obtient des *faux positifs*, conduisant à une image seuillée contenant des pixels qui ne font pas partie des objets d'intérêt; généralement il s'agit de bruit ou des structures d'une autre nature, qui ont un niveau de gris proche de celui des objets recherchés. Par contre, pour une valeur de seuillage élevée, on obtient des *faux négatifs*, et certains objets d'intérêt n'apparaissent pas ou que partiellement dans l'image seuillée. D'autre part, la binarisation d'une image est une opération de classification simple où les pixels sont toujours séparés en deux groupes représentés en noir et blanc: ceux qui appartiennent au fond de l'image et ceux qui appartiennent à l'objet.

Dans cette étude, les piles d'images ont été ouvertes sous format de niveaux de gris avec **ImageJ**, et les propriétés en x, y, et z des piles d'images ont été ajustées. Ensuite, une méthode de seuillage binaire (blanc/noir) a été appliquée. Cette technique combine le seuillage et la binarisation, elle unifie séparément tous les pixels inférieurs et supérieurs au seuil et les donnent respectivement un niveau de grille 0 (fond de l'image) et 255 (biofilm). Les nouvelles piles d'images ont été ensuite comparées avec les données brutes afin d'éviter la suppression accidentelle des pixels correspondants au biofilm lors du seuillage. Après validation du traitement, les piles d'images ont été divisées en  $n$  fichiers dont  $n$  est égal au nombre de coupes composant chaque pile, puis enregistrées sous format *.tif*. Enfin, les coupes ont été réenregistrées sous format *.pgn ASCII* (8-bit) par le logiciel **XnView** afin de les rendre compatible avec le logiciel de calcul morphométrique et de reconstruction 3D.

#### I.3-2-6-3-4 Caractérisations morphométriques et analyses statistiques de biofilms

Les biofilms bactériens ont été caractérisés morphométriquement suite à une reconstruction 3D et à une analyse géométrique de la structure externe et interne du biofilm

(hétérogénéité, la rugosité de surface, l'épaisseur, la densité, la granulométrie) par le logiciel **Gocad®**. Ce dernier est principalement utilisé par les compagnies pétrolières pour reconstruire en 3D les forages et les puits de pétrole à l'échelle du mètre. Dans cette étude, il est appliqué à des données micrométriques.

**Gocad®** est développé à l'Ecole Nationale Supérieure de géologie à Nancy (ENSG-France). Il est programmé en langage C et basé sur la modélisation des objets sur des réseaux irréguliers. Par exemple, une ligne est modélisée par un ensemble de segments de droite, une surface par un ensemble de facettes triangulaires planes, un volume par un ensemble de tétraèdres. Ces représentations sont largement flexibles pour permettre de modéliser tout type d'objet. La modélisation est basée sur une méthode d'interpolation en trois dimensions (Discrete Smooth interpolation-DSI) et sur deux niveaux de connectivités (Mallet, 2002): les connectivités entre nœuds et les connectivités entre simplexes. Le premier niveau est un modèle atomique où un nœud ou un atome est connecté directement à l'ensemble des nœuds qui lui sont voisins, ce type de connectivité est absolument indépendant du type d'objet étudié et il est symétrique. Le deuxième niveau concerne les objets géométriques complexes qui sont constitués d'un certain nombre de simplexes ou objets élémentaires. Ces simplexes sont : les segments d'une ligne connectés par leurs sommets ; les triangles d'une surface connectés par leurs arêtes ; les tétraèdres d'un volume connectés par leurs faces.....

La version **Gocad® 2.1.6** opérant sous **Windows-Vista®** a été utilisée pour réaliser la reconstruction 3D et les calculs structuraux. Les coupes d'une pile d'images ont été ouvertes sous format ASCII par le plugin **VISILAB** (développé au sein du Consortium Gocad de l'ENSG) et les coordonnées en x, y, et z ont été ensuite ajustées. Ainsi, un voxel (volume dans lequel les coupes 2D sont classées) a été créé à partir des grilles des coupes 2D. Il représente le volume dans lequel les coupes 2D sont classées et l'unité de base pour effectuer le traitement. Dans ce cas, la notion voxel remplace le pixel. Le voxel correspond à l'unité volumique du pixel.

Afin d'éliminer les voxels isolés (bruit de fond) qui apparaissent dans les images binaires comme les voxels appartenant au biofilm et pour mieux définir le contours et les structures du biofilm, les données binaires dans le voxel ont subi un filtrage avec des cycles de dilatation et d'érosion. Ces cycles correspondent respectivement à l'ajout ou à la suppression d'un voxel donné en se basant sur le nombre de ces voisins (Russ, 2006). La dilatation transforme un voxel du fond de l'image (en contact avec les voxels du biofilm) en un voxel du

biofilm (foreground). Au contraire l'érosion transforme un voxel du biofilm (en contact avec les voxels du fond de l'image) en un voxel du fond de l'image. La difficulté dans ce filtrage réside dans l'ordre de l'application de la dilatation et de l'érosion et le choix des voxels à ajouter ou à supprimer.

Jusqu'à maintenant, les filtres de dilatation et d'érosion ont été appliqués sur des images 2D, en prenant en considération les 8 pixels voisins du pixel d'intérêt. De ce fait, le filtrage d'une pile d'images se faisait séparément, coupe par coupe. Par contre, dans cette étude un programme en langage C (annexe D) a été développé pour effectuer le filtrage en 3D, en prenant en compte les 26 voxels entourant le voxel d'intérêt. Ainsi, le filtrage prend en compte la connexion 3D entre les coupes d'images d'une pile donnée. Enfin et après avoir testé plusieurs combinaisons de dilatation et d'érosion et plusieurs gammes de voxels de voisinage, un cycle de dilatation suivi par deux cycles d'érosion (*closing filter + erosion*) ont été appliqués. La dilatation et l'érosion, ont été appliquées en prenant en compte, respectivement au moins 20 et 22 voxels de voisinage. Avec ces critères, le voxel est prêt pour la reconstruction 3D et les calculs de structures du biofilm en fonction du temps:

- Reconstruction 3D: Les piles optiques obtenues par l'objectif  $\times 20$  ont été utilisées pour effectuer la reconstruction tridimensionnelle du biofilm. La reconstruction a été réalisée par l'algorithme d'*Isosurface* basé sur la méthode d'interpolation en trois dimensions.
- Détermination de la densité du biofilm et du co-localisation bactéries/EPS: la collecte séparée des fluorescences émises par les bactéries et les EPS lors de l'acquisition au CLSM permet d'avoir des piles d'images différenciées pour les bactéries et les EPS au sein du même biofilm. Ainsi, des voxels séparés peuvent être créés. Le volume des bactéries et des EPS ont été calculés séparément par multiplication du nombre des voxels par le volume unitaire du voxel.

Afin de calculer le volume global du biofilm, un programme a été développé en langage C (annexe D) afin de fusionner les voxels des bactéries et des EPS. La fusion a eu lieu dans un nouveau voxel en *or logique*, en combinant les voxels appartenant aux bactéries ou aux EPS et aussi les voxels correspondant au deux. Le volume du biofilm a été ensuite calculé comme mentionné précédemment.

Le pourcentage de co-localisation entre les bactéries et les EPS au sein du biofilm a été déterminé par un programme a été développé en langage C (annexe D). Il permet de déterminer

le nombre de voxels qui ont les mêmes coordonnées en x, y et z dans les voxets des bactéries et des EPS, de les compter, et ensuite de calculer leur pourcentage par rapport au nombre total des voxels dans le voxet du biofilm.

Un programme a été également développé (annexe D) afin d'étudier la distribution des bactéries et des EPS au sein du biofilm par rapport aux bactéries. Il permet de déterminer la proportion moyenne des bactéries et des EPS en amont, en aval, au dessus et au dessous des bactéries, en chaque point du biofilm.

➤ Détermination de la dimension fractale: Ce facteur est considéré comme indicateur de la rugosité du biofilm. En 2D, il varie entre 1 et 2 et correspond à la dimension fractale de périmètre (Dfp). L'augmentation de la valeur du Dfp signifie l'augmentation de la rugosité du périmètre du biofilm. En 3D, cette dimension varie de 1 à 3: il s'agit de la dimension fractale de surface (Dfs). L'augmentation de sa valeur signifie l'augmentation de la rugosité de la surface du biofilm (Beyenal et al., 2004).

Les dimensions fractales ont été déterminées sur les piles d'images acquises par l'objectif  $\times 4$  du microscope. La Dfp a été calculée par le logiciel **MacBiophonics ImageJ**. La surface (S) et le périmètre (P) de chaque coupe optique ont été déterminés afin de tracer le  $\log(S)$  en fonction du  $\log(P)$ . Ainsi, la Dfp a été obtenue comme le ratio:  $2/\text{pente}$  (Zartanion et al., 1997).

D'un autre côté, la Dfs a été obtenue par le logiciel **Gocad®**. Le volume et la surface de chaque agrégat composant le biofilm ont été calculés par l'algorithme des *Geobodies* du logiciel. Un agrégat est défini comme l'ensemble des voxels connectés par les faces. Le  $\log(V)$  a été ensuite tracé en fonction du  $\log(S)$  et la Dfs est déterminée par l'équation suivante :

$$Dfs = \frac{3}{\text{pente}}$$

➤ Détermination de l'épaisseur du biofilm: les données binaires des piles d'images acquises par l'objectif  $\times 4$  ont été utilisées afin de suivre l'évolution de l'épaisseur du biofilm en fonction du temps. Un programme développé en langage C a été utilisé pour déterminer l'épaisseur. Les voxels les plus hauts ont été projetés sur la base du biofilm (plan basal inférieur du voxet), et le nombre de voxels entre chaque voxel haut et la base a été déterminé. Ensuite, l'histogramme représentant le nombre de voxels hauts en fonction de leur hauteur a été

tracé. Ainsi, l'épaisseur moyenne du biofilm correspond à la médiane de la courbe gaussienne ajustée de l'histogramme. Enfin, le profil d'épaisseur du biofilm (mono-, pseudo-, bi-, poly-modal,...) a été déterminé en utilisant le même histogramme, mais en soustrayant le nombre de voxels 0.

D'un autre côté, l'effet du croissance du biofilm sur la modification du taux de cisaillement ( $\tau$ ) au sein de la lame de milieu de culture circulant de le réacteur a été déterminé:

$$\tau = \tau_0 \left( 1 + \frac{\Delta e}{e} \right)$$

$\tau_0 = \mu * \dot{\gamma}$ , est le taux de cisaillement à  $t_0$

$\mu$  est la viscosité du milieu de culture

$\Delta e$  est la difference entre l'épaisseur de l'entrefer du réacteur et celle du biofilm

$e$  est l'épaisseur de l'entrefer du réacteur

## REFERENCES

- Beyenal, H., Donovan, C., Lewandowski, Z., Harkin, G. (2004) Three-dimensional biofilm structure quantification. *J. Microbiol. Methods*. 59, 395-413.
- Bozongo, J.C. (1990) Phosphore et sédiments: Méthodes d'analyse-stockage-relargage-biodisponibilité. Thèse de doctorat, Université de Rennes 1.
- Carignan, J., Hild, P., Mevelle, G., Morel, J., Yeghicheyan, D. (2001) Routine analysis of trace elements in geological samples using flow injection and low pressure on-line liquid chromatography coupled to ICP-MS: a study of geochemical reference materials BR, DR-N, UB-N, AN-G, and GH. *Geostandards Newsletter* 25, 187-198.
- Chabaud, S., Andres, Y., Lakel, A., Le Cloirec, P. (2006) Bacterial removal in septic effluent: Influence of biofilm and protozoa. *Water Res.* 40(16), 3109-3114.
- Chang, S.G., Jackson, M.L. (1957) Fractionation of soil phosphorus. *Soil. Sci.* 84, 133-144.
- Chomik A., Dieterlen, A., Xu, C., Haeberlé, O., Meyer, J.J., Jacquy, S. (1997) Quantification in optical sectioning of some deconvolution algorithms in view of 3D image segmentation. *J. Opt.* 28, 225-233.
- Deneux-Mustin, S., Lartiges, B.S., Villemin, G., Thomas, F., Yvon, J., Bersillon, J.L., Snidaro, D. (2001) Ferric Chloride and Lime conditioning of activated sludges: An electron microscopic study on resin-embedded samples. *Water Res.* 35(12), 3018-3024.
- Fife, C.V. (1959) An evaluation of ammonium fluoride as a selective extractant for aluminium-bound soil phosphate. *Soil Sci.* 87, 83-88.
- Govindaraju, K., Mevelle, G. (1987) Fully automated dissolution and separation methods for inductively coupled plasma atomic emission spectrometry rock analysis. Application to the determination of Rare Earth Elements. *J. Anal. Atom Spectrom.* 2, 615-612.
- Heldey, M.J., Stewart, J.W. (1982) Method to measure microbial phosphate in soils. *Soil. Biol. Biochem.* 14, 377-385.
- Hoefs, J. (1980) Stable isotope geochemistry. *Minerals and Rocks*. Springer Verlag, Berlin, 208p.
- Holmes, T.J. (1988) Maximum-Likelihood image restoration adapted for noncoherent optical imaging. *J. Opt. Soc. Am.* 5, 666-673.
- Holmes T.J., Bhattacharyya, S., Copper, J.A., Hanzel, D., Krishnamurthi, V., Lin, W., Roysam, B., Szarowski, D.H., Turner, J.N. (1995) Light Microscopic images reconstructed by maximum likelihood deconvolution. In: J. B. Pawley. *Handbook of biological confocal microscopy*. Plenum Press, N.Y. 389-402.
- Jana-Sur, P., Chakraborty, A.K. (2005) Studies on the interaction of bacterial capsular polysaccharide-*Klebsiella* K16 with cationic dyes. *J. Photochem. Photobiol. Chem.* 173, 64-69.



Koziet, J. (1997) Isotope ratio mass spectrometric method for on-line determination of oxygen 18 in organic matter. *J. Mass. Spectrom.* 32, 103-108.

Krouse, H.R., Grinrko, V.A. (1991) Stable isotopes. Natural and anthropogenic sulphur in the environment. *SCOPE 43*, Wiley, Chichester, U.K., 440p.

Lebo, M.E. (1999) Particle-bound phosphorus along an urbanized coastal plain estuary. *Mar. Chem.* 34, 225-246.

Lewandowski, Z., Webb, D., Hamilton, M., Harkin, G. (1999) Quantifying biofilm structure. *Wat. Sci. Technol.* 39, 71-76.

Mallet, J.L. (2002) *Geomodeling*. Oxford University Press, New York, 624pp.

Martin, J.M., Niriél, P., Thomas, A.J. (1987) Sequential extraction techniques: promises and problems. *Mar. Chem.* 22, 313-341.

Moreau, S (1997). Bassin de la Haute VILAINE: Dynamique de l'azote et du phosphore des eaux superficielles et des sédiments. Thèse de doctorat, Université de Rennes 1.

Morrison, J., Brockwell, T., Merren, T., Fourel, F., Phillips, A.M. (2001) On-line high-precision stable hydrogen isotopic analyses on nanoliter water samples. *Anal. Chem.* 73, 3570-3575.

Murphy, J., Riley, J.P. A modified single solution method for the determination of phosphate in natural waters. *Anal. Chim. Acta* 1962, 27, 31-36.

Petropoulos P., Gilbride, K.A. (2005) Nitrification in activated sludge batch reactors is linked to protozoan grazing of the bacterial population. *Can. J. Microbiol.* 51, 791-799.

Psenner, V.R., Puscko, R., Sager, M. (1984) Die fraktionierung organischer und anorganischer phosphorverbindungen von sedimenten. *Arch. Hydrobiol.* 1, 111-155.

Quantin, C. (2001) Indice de la biodegradation des matières organiques sur le devenir des métaux lourds et des contaminants organiques dans un sol nikellifère et un sédiment de rivière. Thèse de doctorat, Université de Nancy 1.

Ruiz, J.M., Delgado, A., Torrent, J. (1997) Iron-related phosphorus in overfertilized european soils. *J. Environ. Qual.* 26, 1548-1554.

Russ, J.C. (2007) *The image processing handbook. Fifth edition*. CRC Press, Taylor and Francis Group. p. 468-476.

Stoodley, P., Dodds, I., Boyle, J.D., Lappin-Scott, H.M. (1999a). Influence of hydrodynamics and nutrients on biofilm structure. *J. Appl. Microbiol.* 85, 19S-28S.

Tessier, A., Campbell, P.G.C., Bisson, M. (1979) Sequential extraction procedure for the speciation of particulate trace metals. *Anal. Chem.* 7, 844-841.

Tessier, A., Campbell, P.G.C. (1988) Comment on the testing of the accuracy of an extraction procedure for determining the partitioning of trace metals in sediments. *Anal. Chem.* 60, 1475-1476.

Tiessen, H., Stewart, J.W.B., Cole, C.V. (1984) Pathways of phosphorus transformations in soils of differing pedogenesis. *Soil. Sci. Soc. Am. J.* 48, 853-858.

Vanden Bossche, H. (1999) Devenir du phosphore apporté sur les sols et risques de contamination des eaux de surface. Thèse de doctorat, Université de Rennes 1.

Vieira, M.J., Melo, L.F., Pinheiro, M.M. (1993) Biofilm Formation: hydrodynamic effects on internal diffusion and structure. *Biofouling.* 7, 67-80.

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

Zartarian, F., Mustin, C, Villemin, G., Ait-Ettager, T., Thill, A., Bottero, J.Y., Mallet, J.L., Snidaro, D. (1997). Three-dimensional modeling of an activated sludge floc. *Langmuir.* 13, 35-40.

## Dosage des éléments traces

	>50 ppm	>10 ppm	>1 ppm	>0,1 ppm	>0,01 ppm	*Limites déterm. ppm
<b>Ba</b>	<8%	<15%				2,00
<b>Be</b>	<5%	<10%	<15%			0,20
<b>Bi</b>			<5%	<15%		0,10
<b>Cd</b>		<5%	<15%			0,15
<b>Ce</b>		<5%	<10%			0,12
<b>Co</b>	<5%	<10%	<15%			0,50
<b>Cr</b>	<5%	<15%				3,00
<b>Cs</b>	<5%		<10%			0,10
<b>Cu</b>	<5%	<10%				3,00
<b>Dy</b>			<5%	<10%	<15%	0,01
<b>Er</b>			<5%	<10%		0,005
<b>Eu</b>				<5%	<10%	0,005
<b>Ga</b>		<5%	<8%			0,10
<b>Gd</b>				<5%	<10%	0,01
<b>Hf</b>		<5%	<10%	<15%		0,03
<b>Ho</b>			<5%	<15%		0,005
<b>In</b>			<5%	<15%		0,06
<b>La</b>				<5%	<15%	0,07
<b>Lu</b>				<5%	<10%	0,005
<b>As</b>	<5%	<10%	<15%			1,80
<b>Mo</b>		<5%	<10%			0,40
<b>Nd</b>			<5%	<10%	<20%	0,06
<b>Ni</b>	<5%					2,00
<b>Pb</b>		<5%	<10%			0,90
<b>Pr</b>			<5%	<15%		0,01
<b>Rb</b>	<5%	<10%	<15%			0,30
<b>Sb</b>		<5%	<10%			0,10
<b>Sm</b>			<5%	<10%		0,015
<b>Sn</b>		<5%	<10%			0,20
<b>Sr</b>	<5%	<15%				1,70
<b>Ta</b>		<5%		<10%		0,01
<b>Tb</b>				<5%	10%	0,005
<b>Th</b>		<5%	<10%	<15%		0,05
<b>Tm</b>			<5%	<10%		0,005
<b>U</b>				<8%		0,05
<b>V</b>	<5%	<10%				0,60
<b>W</b>	<5%	<10%	<15%			0,15
<b>Y</b>		<5%	<10%	<15%		0,15
<b>Zn</b>	<8%	<15%				6,00
<b>Zr</b>	<8%	<15%				1,50

Dosage des éléments majeurs

Oxydes %	>10%	>5%	>1%	>0,5%	>0,1%	>0,05%	>0,01%	>0,005%	*Limites déterm. %
SiO <sub>2</sub>	<1%				<10%				0,05
Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	<1%			<10%					0,015
Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub>			<2%		<5%	<15%			0,04
MnO			<2%		<5%		<10%		0,001
MgO		<2%	<5%			<10%			0,01
CaO		<2%		<5%	<10%				0,02
Na <sub>2</sub> O		<2%			<15%				0,07
K <sub>2</sub> O		<2%		<5%	<15%				0,05
TiO <sub>2</sub>				<5%		<10%			0,005
P <sub>2</sub> O <sub>5</sub>			<5%		<10%	<20%			0,015

\* La limite de détermination est calculée comme étant 6 fois l'écart type relatif sur 100 mesures de blancs de préparation.

Calculs effectués pour 5 matériaux géochimiques de référence en analyse de routine sur une période de 6 mois (n = 180 par matériau).

Bactéries ferri-réductrices

Extrait de levure	1,00 g
Peptone	1,50 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,50 g
NaCl	0,10 g
CaCl <sub>2</sub>	0,10 g
NaHCO <sub>3</sub>	2,50 g
Acétate de sodium	1,00 g
Solution d'oligoéléments	10,00 ml
Solution vitaminée (x1)	10,00 ml
Citrate de fer(III)	13,70 g
Eau distillée	1000,00 ml

Dissoudre en premier les cristaux de citrate de fer dans 400 ml d'eau distillée. Pour améliorer la dissolution et réduire le caractère abrasif des cristaux de citrate, il est préférable de les broyer finement à l'aide d'un mortier en agate. Laisser dissoudre lentement le citrate en chauffant légèrement à 60°C pour favoriser la dissolution. Agiter doucement pour ne pas user le barreau aimanté (risque de libération de téflon). Maintenir le pH à 7 durant la dissolution avec une solution NaOH (1N). Cette étape est longue (3 à 4 heures). Au final, la solution obtenue doit être parfaitement limpide.

Dissoudre les autres composés dans 500 ml d'eau.

Mélanger les deux solutions après dissolution du citrate. Ajuster le pH final à 7 avec NaOH (1N).

Bactéries sulfato-réductricesSolution A

Extrait de levure	1,00 g
Peptone	1,50 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,50 g
NaCl	0,10 g
CaCl <sub>2</sub>	0,10 g
NaHCO <sub>3</sub>	2,50 g
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0,225 g
Lactate de sodium	1,00 g ou 1,5 ml de DL-Lactate Na (50%)
Solution d'oligoéléments	10,00 ml
Solution vitaminée (x1)	10,00 ml
Eau distillée	900,00 ml

Solution B

FeSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	4,0 g
Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>4</sub> (Dithionite)	1,0 g
Eau distillée (dégazée)	100,00 ml

- Préparer la solution A en premier dans 900 ml d'eau distillée. Ajuster le pH à 7,8 avec NaOH (1N). Dégazer la solution avant l'autoclavage
- Ajouter la solution de vitamines stérile après l'autoclavage. Si la solution « prête à l'emploi » est utilisée, ajouter 1ml de la solution fille (x10) à la solution A.
- Préparer au dernier moment la solution B . Stériliser rapidement la solution B par filtration. Ne jamais autoclaver, sous peine d'oxyder le fer(II). Remplir le récipient utilisé au maximum pour retarder l'oxydation et dégazé rapidement.
- Mélanger les deux solutions avant l'innoculation et dégazer le mélange obtenu.

La solution A dégazée peut être stockée en chambre froide à 5°C durant plusieurs semaines. Pour les microplaques, mélanger les deux solutions directement dans le rack en proportion *ad hoc* (10 :1)

Dilatation des voxels

```

BEGIN {
max_nb = 20;
}
{
x_dilat = 1;
if( x < 0.5 ) {
  nb = 0;
  if( neigh( x, 0, 0, 1 ) > 0.5 ) { nb++; }
  if( neigh( x, 0, 0, -1 ) > 0.5 ) { nb++; }
  if( neigh( x, 0, 1, 0 ) > 0.5 ) { nb++; }
  if( neigh( x, 0, -1, 0 ) > 0.5 ) { nb++; }
  if( neigh( x, 1, 0, 0 ) > 0.5 ) { nb++; }
  if( neigh( x, -1, 0, 0 ) > 0.5 ) { nb++; }

  if( neigh( x, 1, 0, 1 ) > 0.5 ) { nb++; }
  if( neigh( x, -1, 0, 1 ) > 0.5 ) { nb++; }
  if( neigh( x, 1, 0, -1 ) > 0.5 ) { nb++; }
  if( neigh( x, -1, 0, -1 ) > 0.5 ) { nb++; }
  if( neigh( x, 0, 1, 1 ) > 0.5 ) { nb++; }
  if( neigh( x, 0, 1, -1 ) > 0.5 ) { nb++; }
  if( neigh( x, 0, -1, 1 ) > 0.5 ) { nb++; }
  if( neigh( x, 0, -1, -1 ) > 0.5 ) { nb++; }
  if( neigh( x, 1, 1, 0 ) > 0.5 ) { nb++; }
  if( neigh( x, -1, 1, 0 ) > 0.5 ) { nb++; }
  if( neigh( x, 1, -1, 0 ) > 0.5 ) { nb++; }
  if( neigh( x, -1, -1, 0 ) > 0.5 ) { nb++; }

  if( neigh( x, 1, 1, 1 ) > 0.5 ) { nb++; }
  if( neigh( x, -1, 1, 1 ) > 0.5 ) { nb++; }
  if( neigh( x, -1, -1, 1 ) > 0.5 ) { nb++; }
  if( neigh( x, -1, 1, -1 ) > 0.5 ) { nb++; }
  if( neigh( x, -1, -1, -1 ) > 0.5 ) { nb++; }
  if( neigh( x, 1, -1, 1 ) > 0.5 ) { nb++; }
  if( neigh( x, 1, -1, -1 ) > 0.5 ) { nb++; }
  if( neigh( x, 1, 1, -1 ) > 0.5 ) { nb++; }

  if( nb < max_nb ) {
    x_dilat = 0;
  }
}
}

```

Avec x: la propriété à dilater (bactéries ou EPS) et x\_dilat: la nouvelle propriété obtenue après dilatation

Erosion des voxels

```

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

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

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

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

```

Avec x\_erod: la nouvelle propriété obtenue après érosion



Fusionnement des voxels bactéries/EPS

```
If(bacteria>0 || EPS>0) biofilm=255;  
Else biofilm=0;
```

Colocalisation bactéries/EPS

```
BEGIN {  
nb_bacteria = 0;  
nb_EPS = 0;  
nb_bacteria_et_EPS = 0;  
nb_bacteria_et_EPS = 0;  
nb_bacteria_et_noEPS = 0;  
  
}  
{  
if( EPS > 0.5 ) {  
  nb_EPS++;  
  if( bacteria > 0.5 ) {  
    nb_bacteria ++;  
    nb_bacteria_et_EPS++;  
  } else {  
    nb_nobacteria_et_EPS++;  
  }  
} else {  
  if( bacteria > 0.5 ) {  
    nb_bacteria ++;  
    nb_bacteria_et_noEPS++;  
  }  
}  
  
}  
END {  
print "Nombre de bacteries ", nb_bacteria;  
print "Nombre d'EPS ", nb_EPS;  
print "Nombre de bacteries et d'EPS", nb_bacteria_et_EPS;  
print "Nombre d'EPS sans bacteries ", nb_nobacteria_et_EPS;  
print "Nombre de bacteries sans EPS ", nb_bacteria_et_noEPS;  
print "Prob(bacteries | EPS) = ", nb_bacteria_et_EPS / nb_EPS;  
print "Prob(EPS | bacteries) = ", nb_bacteria_et_EPS / nb_bacteria;  
  
}
```

Distribution des bactéries et des EPS au sein du biofilm par rapport aux bactéries

```

BEGIN {
size_neighborhood = 2;
nb_bacteria = 0;
nb_EPS_downstream = 0;
nb_EPS_upstream = 0;
nb_EPS_below = 0;
nb_EPS_above = 0;
nb_bacteria_downstream = 0;
nb_bacteria_upstream = 0;
nb_bacteria_below = 0;
nb_bacteria_above = 0;
}
{
if(
  U > size_neighborhood && U < NU-size_neighborhood &&
  V > size_neighborhood && V < NV-size_neighborhood &&
  W > size_neighborhood && W < NW-size_neighborhood
){
if( bacteria > 0.5 ) {
nb_bacteria ++;
for( di = 0 ; di < size_neighborhood; di++ ) {
for( dj = -size_neighborhood ; dj < size_neighborhood; dj++ ) {
for( dk = -size_neighborhood ; dk < size_neighborhood; dk++ ) {
if( neigh( EPS, di, dj, dk ) > 0.5 ) nb_EPS_downstream++;
if( neigh( bacteria, di, dj, dk ) > 0.5 ) nb_bacteria_downstream++;
}
}
}
}
for( di = -size_neighborhood ; di < 1; di++ ) {
for( dj = -size_neighborhood ; dj < size_neighborhood; dj++ ) {
for( dk = -size_neighborhood ; dk < size_neighborhood; dk++ ) {
if( neigh( EPS, di, dj, dk ) > 0.5 ) nb_EPS_upstream++;
if( neigh( bacteria, di, dj, dk ) > 0.5 ) nb_bacteria_upstream++;
}
}
}
}
for( di = -size_neighborhood ; di < size_neighborhood; di++ ) {
for( dj = -size_neighborhood ; dj < size_neighborhood; dj++ ) {
for( dk = 0 ; dk < size_neighborhood; dk++ ) {
if( neigh( EPS, di, dj, dk ) > 0.5 ) nb_EPS_below++;
if( neigh( bacteria, di, dj, dk ) > 0.5 ) nb_bacteria_below++;
}
}
}
}
for( di = -size_neighborhood ; di < size_neighborhood; di++ ) {
for( dj = -size_neighborhood ; dj < size_neighborhood; dj++ ) {
for( dk = -size_neighborhood ; dk < 1; dk++ ) {
if( neigh( EPS, di, dj, dk ) > 0.5 ) nb_EPS_above++;
}
}
}
}
}

```

```
        if( neigh( bacteria, di, dj, dk ) > 0.5 ) nb_bacteria_above++;
    }
}
}

}
}

}
END {
print > "stats.txt" "***** Taille du voisinage ", size_neighborhood;
print > "stats.txt" "Nombre moyen de polymeres dans le voisinage aval des bacteries ",
nb_EPS_downstream / nb_bacteria;
print >> "stats.txt" "Nombre moyen de polymeres dans le voisinage amont des bacteries ",
nb_EPS_upstream / nb_bacteria;
print >> "stats.txt" "Nombre moyen de polymeres dans le voisinage au dessus des bacteries ",
nb_EPS_above / nb_bacteria;
print >> "stats.txt" "Nombre moyen de polymeres dans le voisinage au dessous des bacteries ",
nb_EPS_below / nb_bacteria;
print >> "stats.txt" "Nombre moyen de bacteries dans le voisinage aval des bacteries ",
nb_bacteria_downstream / nb_bacteria;
print >> "stats.txt" "Nombre moyen de bacteries dans le voisinage amont des bacteries ",
nb_bacteria_upstream / nb_bacteria;
print >> "stats.txt" "Nombre moyen de bacteries dans le voisinage au dessus des bacteries ",
nb_bacteria_above / nb_bacteria;
print >> "stats.txt" "Nombre moyen de bacteries dans le voisinage au dessous des bacteries ",
nb_bacteria_below / nb_bacteria;
}
```

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

o0o

VU LES RAPPORTS ETABLIS PAR :

**Monsieur Ghassan CHEBBO, Directeur de Recherche, CEREVE, ENPC, Marne-la-Vallée**

**Monsieur Markus BOLLER, Professeur, EAWAR, Switzerland**

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

**Monsieur HOUHOU Jamil**

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

**"Le réseau d'assainissement urbain : du collecteur au réacteur bio-physico-chimique"**

NANCY BRABOIS  
2, AVENUE DE LA  
FORET-DE-HAYE  
BOITE POSTALE 3  
F - 5 4 5 0 1  
VANDŒUVRE CEDEX

en vue de l'obtention du titre de :

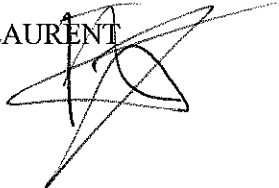
DOCTEUR DE L'INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE LORRAINE

Spécialité : « Géosciences »

Fait à Vandoeuvre, le 03 novembre 2008

Le Président de l'IN.P.L.,

F. LAURENT



## Résumé

Ce mémoire de thèse contribue à décrire à l'échelle des matières en suspension, des biofilms et des sédiments, certains aspects du réseau d'assainissement en tant que réacteur bio-physico-chimique. Les objectifs principaux sont : (i) d'identifier les sources des eaux circulant dans les collecteurs et de quantifier ces apports en se basant sur les signatures isotopiques des eaux ( $\delta^{18}\text{O}_{\text{H}_2\text{O}}$  et  $\delta\text{D}$ ) et des sulfates dissous ( $\delta^{34}\text{S}$  et  $\delta^{18}\text{O}_{\text{SO}_4}$ ); (ii) de déterminer la nature minéralogique des phases porteuses des métaux lourds et d'étudier leur cycle géochimique en utilisant la microscopie électronique à transmission (TEM) et à balayage (SEM) couplées à la spectroscopie d'énergie dispersive des rayons X; (iii) de mettre en évidence la présence d'échange de matière entre les eaux usées et les biofilms bactériens en utilisant la microscopie confocale à balayage laser (SCLM) et la TEM sur échantillons inclus en résine et d'étudier les conditions hydrodynamiques impliquées dans cet échange dans un réacteur pilote de type Couette-Poiseuille. On montre que les données isotopiques peuvent être utilisées pour étudier l'étanchéité du réseau d'assainissement, et permettent d'évaluer la présence des évolutions de concentration des éléments transportés dans le réseau. Le rôle du réseau en tant que réacteur bio-physico-chimique apparaît dans l'évolution de la nature minéralogique des phases phosphatées vers l'aval du réseau (formation des phosphates de Ca et d'Al) et dans la précipitation des métaux lourds dans les compartiments anaérobiques sous forme de phases sulfurées néoformées. Les dépôts des regards de façade et les biofilms bactériens sont les lieux de cette néoformation. A l'échelle de la matière organique, l'auto-épuration est révélée par les échanges entre les biofilms et les matières en suspension suite à la présence des fibres de cellulose dans la structure des biofilms et de morceaux de biofilms au sein de la matière en suspension. Cette dernière subit également une biodégradation par les bactéries. La majeure partie de ces évolutions se situe en amont du réseau où les contrastes physicochimiques sont les plus importants. Finalement, les expériences modèles au sein du réacteur ont montré l'implication de l'hydrodynamisme dans le détachement des biofilms et l'avantage des reconstructions 3D et des quantifications structurales des biofilms dans l'évaluation de l'impact des gradients de cisaillement sur leur croissance.

---

**Mots Clés:** réseau d'assainissement, géochimie isotopique, spéciation, métaux lourds, phosphates, biofilms bactériens, 3D reconstruction, quantifications structurales.

---

## Abstract

This work describes the sewer system as an integrated part of the wastewater treatment system. The main objectives of this study were: (i) identification of water sources collected in sewer system and quantification of their relative contribution, referring to isotopic signatures of water ( $\delta^{18}\text{O}_{\text{H}_2\text{O}}$  and  $\delta\text{D}$ ) and dissolved sulfates ( $\delta^{34}\text{S}$  and  $\delta^{18}\text{O}_{\text{SO}_4}$ ); (ii) identification of the mineralogical nature of trace element carriers and determination of their geochemical evolution within the sewer system, using transmission (TEM) and Scanning (SEM) electron microscopy coupled with energy-dispersive X-ray spectrometry; (iii) Evidencing exchanges between sewage and bacterial biofilms, using scanning confocal laser microscopy (SCLM) and TEM examination of resin embedded samples, and investigating hydrodynamic conditions controlling this exchange in an experimental set-up (Couette-Poiseuille reactor). The results indicate that isotopic data may be used to study the tightness of sewer lines and to evaluate the evolution of element concentrations along sewer. Implication of the sewer system as a true biophysicochemical reactor, is evidenced in our study by the evolution of the mineralogical nature of phosphate phases downstream of the sewer (formation of Al-Ca-phosphates) and by heavy metal precipitations in anaerobic conditions as neoformed sulfide phases. Sump pit deposits and bacterial biofilms represent the earlier stage of this neoformation. Organic matter biodegradation was revealed by TEM examination of SM whereas the exchange between bacterial biofilms and SM was shown by confocal microscopy. Cellulose fibers from SM were found embedded in exopolymer biofilm matrices and detached fragments from biofilms were identified in sewage. The majority of these evolutions are located upstream of sewer system in which the contrast in physicochemical properties are the most significant. Finally, biofilm model investigations and image processing showed that hydrodynamic conditions are largely implicated in biofilm detachment and that 3D reconstructions and biofilm structure quantifications provide an effective evaluation of shear rate impact on biofilms growth.

---

**Keywords:** Sewer system, stable isotopes, speciation, heavy metals, phosphates, bacterial biofilms, 3D reconstruction, structural quantifications.

---