



AVERTISSEMENT

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

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

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

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

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

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

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

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



Nancy-Université
INPL



Institut National Polytechnique de Lorraine

Ecole doctorale : Ressources Procédés Produits Environnement (RP2E)

THESE

Présentée et soutenue publiquement le 08/12/2010
pour l'obtention du grade de Docteur de l'INPL
(Spécialité Génie des Procédés et des Produits)

Par

Muatasem ALNNASOURI

Etude du développement de biofilms dans des réacteurs de traitement d'eau

Composition du jury:

Président du jury :	Michel SARDIN	Prof. Laboratoire Réactions et Génie des Procédés- Nancy
Rapporteurs :	Hervé VIVIER Alain GRASMICK	Prof. Université Jean Monnet- Saint-Étienne Prof. Université Montpellier II
Examineurs :	Kim MILFERSTEDT Francis GARRIDO Marie-Noëlle PONS Christophe DAGOT	Dr. Laboratoire Biotechnologie de l'Environnement -Narbonne Dr. BRGM d'Orléans Dr. LRGP. CNRS- Nancy (directeur de thèse) Prof. Université de Limoges (co-directeur de thèse)

REMERCIEMENTS

Remerciements

J'exprime mes profonds remerciements à **Marie-Noëlle PONS** d'avoir accepté d'encadrer cette thèse. Votre gentillesse et qualité humaine, votre efficacité, capacité et votre activité, vos réponses e-mails éclairés sont tous exceptionnelles. J'apprécie beaucoup votre effort pour faire réussir ce travail.

A **Christophe DAGOT** de m'avoir accueilli dans son groupe en tant que co-directeur de thèse. J'apprécie la liberté et la confiance que tu m'as accordées. Merci pour tes encouragements, ta présence à tous les moments à travers tes idées et tes mots en or.

Je remercie le gouvernement syrien, le laboratoire Groupement de Recherche Eau Sol Environnement (GRESE) et l'institut Carnot de m'avoir financé pendant 3 ans d'étude en France. J'exprime mes profonds remerciements aux directeurs des laboratoires : M. Michel SARDIN « Laboratoire des Sciences du Génie Chimique (LSGC) » et ses discours inoubliables, M. Michel BAUDU directeur de laboratoire « Groupement de Recherche Eau Sol Environnement (GRESE) » à Limoges avec sa gentillesse considérable et Mr. Gabriel WILD « Laboratoire de Réactions et Génie des Procédés » pour m'avoir accueilli dans leurs laboratoires. J'adresse mes sincères sentiments à Michel FICK, le directeur de l'ENSAIA, pour son soutien permanent et pour m'avoir consacré un temps précieux pour me mettre sur la route de la recherche.

Je tiens également à remercier chacun des membres du jury de thèse d'avoir accepté de la juger et de s'être déplacé pour assister à la présentation de ce travail.

J'exprime ma gratitude aux différents organismes qui ont aidé à réaliser ce travail au cours de ces trois ans : la Zone Atelier Moselle (ZAM) et le Groupement Evaluation Mesures Composants Eaux Assainissement (GEMCEA).

Mes remerciements aux techniciens : Corinne Maftah, Martine Casteignau et David Chaisemartin à Limoges et à Xavier France et à Steve Pontvianne à Nancy : Steve, j'apprécie ton aide et tes rendez-vous à l'heure. Les directeurs, les dirigeants et tous les services administratifs de l'Ecole Nationale Supérieure des Industries Chimique (ENSIC) et de l'école nationale supérieure d'ingénieurs de Limoges (ENSIL).

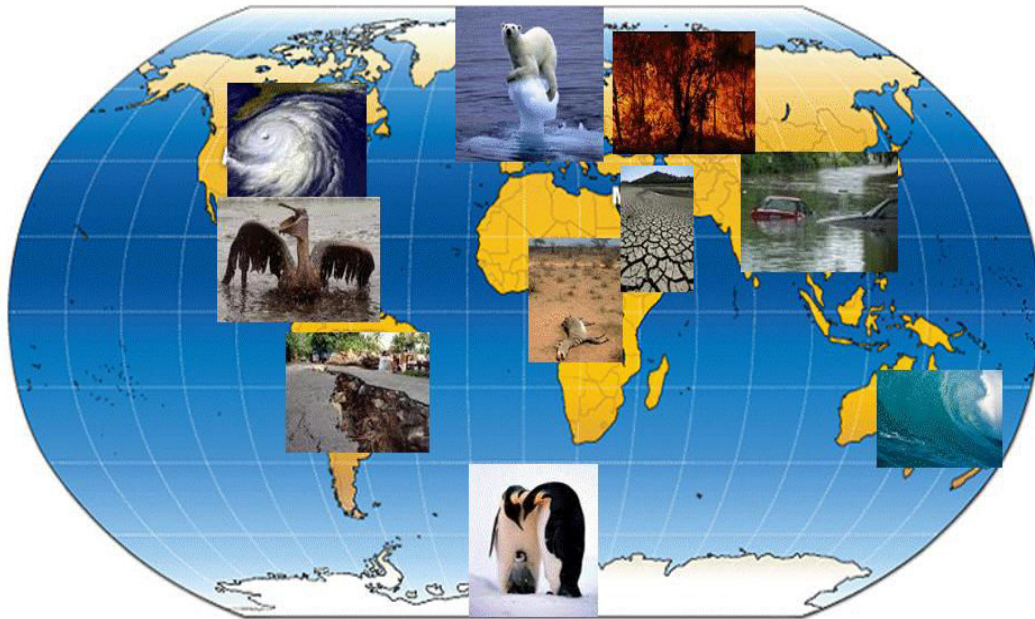
J'ai gardé un très bon souvenir de mes collègues et mes amis: Clemence, Salim (iz a7), J. Noël (la vie nous sourit), Ali, Aziz, Dinh, Mann, Taher, Nouceiba, Rania, Jean François, François,

REMERCIEMENTS

Michel, Razzak à Nancy et Julien (la courgette kidnappée), Brahim, Kais, Audrey, Virginie, Cecilia, Serge, Geneviève, Magali et Matejka (belle soirée) à Limoges.

Je remercie Rada ma chère femme pour sa patience et son aide pendant ces années en France avec notre limogienne "Judy" qui adore la touche Espace !, ma famille en Syrie pour son soutien sans limite au cours de mes études.

Les Français, la fraternité, l'égalité et la liberté,La France et ... « Tahya Fransa ».



Incendies, sécheresse, pluies acides, tornades, inondations, ...de plus en plus forts et fréquents. Ce ne sont pas des catastrophes, encore moins naturelles !

C'est la réponse évidente à vos activités nucléaires, à votre soif de pétrole, à votre cupidité et à votre égoïsme sans penser aux générations futures. Les fontes des glaces des pôles, de l'Himalaya, des Alpes et des Andes sont mes larmes, les tremblements de terre et les éruptions volcaniques sont mes alarmes et les catastrophes naturelles sont mes futures armes...

Ne tentez pas de protéger les animaux ! L'extinction est l'équilibre naturel de l'écosystème. Les biodiversités sont saines et sauvées loin de votre curiosité. Vos usines, vos voitures et vos déchets ont pollué la mer, les rivières et même vos nourritures. La promesse de 192 pays réunis pour réduire l'émission de gaz polluants est oubliée. Je suis votre bateau de sauvetage, ne laissez pas les autres le couler. Vous n'êtes que des passagers pour une courte durée.

Faites votre devoir avant de demander vos droits, plantez un arbre où vous en arrachez un, déposez vos armes, elles sont nulles face à mon arme naturelle... face à l'eau.

La planète bleue

Sommaire

I. CHAPITRE I	1
I.1. Historique.....	2
I.2. Définition du biofilm.....	3
I.3. Pourquoi un biofilm?.....	3
I.4. Les impacts du biofilm.....	4
I.4.1. Rôle négatif.....	4
I.4.2. Rôle positif.....	5
I.5. Physiologie du biofilm.....	7
I.5.1. Quorum Sensing.....	7
I.5.2. Activité biologique du biofilm.....	9
I.6. Morphologie du biofilm.....	9
I.6.1. Microstructure et Macrostructure du biofilm.....	9
I.6.2. Les exopolymères (EPS).....	11
I.7. Formation du biofilm.....	12
I.7.1. Conditionnement du film sur la surface.....	13
I.7.2. Le positionnement des micro-organismes à proximité de la surface.....	13
I.7.3. Adhésion réversible et irréversible.....	14
I.7.4. Croissance et développement du biofilm.....	15
I.7.5. Émigration et déplacement.....	15
I.8. Détachement du biofilm.....	16
I.8.1. Détachement superficiel.....	16
I.8.2. Erosion.....	17
I.8.3. Décrochement.....	18
I.8.4. Abrasion (frottement).....	19
I.8.5. Consommation par les prédateurs.....	20
I.9. Effet de la topographie de la surface.....	21
I.10. Méthodes d'analyse des biofilms.....	24
I.10.1. Techniques destructives.....	24
I.10.2. Techniques non destructives.....	25
I.11. Analyse d'images.....	29
I.11.1. Analyse d'images par binarisation.....	30
I.11.2. Notions de texture visuelle.....	31
I.11.3. Modélisation.....	38
I.12. Conclusion de la recherche bibliographique.....	42
I.13. Objectifs.....	43
II. CHAPITRE II	45
II.1. Réacteurs.....	46
II.1.1. Réacteur à disque tournant.....	46
II.1.2. Réacteur « moulin ».....	47
II.1.3. Réacteur à lit fixe multi étagés.....	49
II.1.4. Réacteurs à lit fixe.....	52
II.2. Analyses physico-chimiques.....	54
II.2.1. Matières sèches (MS).....	54
II.2.2. Dosage de la Demande Chimique en Oxygène (DCO).....	55
II.2.3. Dosage de l'ammonium.....	55
II.2.4. Spectrophotométrie d'absorbance UV-Visible.....	56
II.2.5. Spectrofluorimétrie.....	56
II.2.6. Chromatographie ionique.....	56

SOMMAIRE

II.2.7.	Méthode « cristal violet ».....	57
II.2.8.	Analyse de l'arsenic	59
II.2.9.	Mesure de l'épaisseur du biofilm	60
II.2.10.	Systèmes d'acquisition des images (scanner)	60
III.	Chapitre III.....	65
	Résumé	66
III.1.	Article I: Comparison of four methods to assess biofilm development.....	69
III.2.	Article II:Influence of structured surfaces on biofilm development: experiment and modelling	81
III.3.	Article III:Long-term biofilm monitoring of a rotating biological contactor.....	97
III.4.	Article IV:Effect of erythromycin on biofilm activity and macrostructure	117
III.5.	Article V:Development of biofilm in a multistage fixed-bed reactor	135
III.6.	Résultats complémentaires	148
III.6.1.	Formation d'un biofilm pour la bio-oxydation de l'arsenic	149
IV.	Conclusion générale et perspectives	157
V.	Références bibliographiques	161

Contact : muat320@hotmail.fr

Figures

Figure I. 1 Stromatolithes en forme de biofilm (Allwood <i>et al.</i> , 2006).	3
Figure I. 2 Réacteur à disques tournants (RBC).	6
Figure I. 3 Réacteur RBC à cages.	6
Figure I. 4 Réacteur à lit fixe à contre courant.	7
Figure I. 5 Mécanisme de Quorum Sensing chez les microorganismes.	8
Figure I. 6 Microstructure (a) et Macrostructure (b) du biofilm de <i>S. epidermidis</i> (Costerton, 2007).	10
Figure I. 7 Les interactions entre les molécules d'EPS qui garantissent la forme du biofilm (1) répulsion de deux groupes carboxyliques, (2) attraction de deux groupes carboxyliques par un cation divalent, (3) liaisons hydrogène, (4) attraction électrostatique, (5) forces de London (Allison <i>et al.</i> , 2000).	12
Figure I. 8 Etapes de la formation du biofilm	12
Figure I. 9 Le flux laminaire (a) et le flux turbulent (b) dans un milieu aquatique.	13
Figure I. 10 Immigration et déplacement du biofilm Réf [1].	16
Figure I. 11 Détachement superficiel du biofilm	17
Figure I. 12 Mécanisme de l'érosion du biofilm	18
Figure I. 13 Décrochement du biofilm sur une surface verticale.	19
Figure I. 14 Mécanisme de l'abrasion du biofilm	20
Figure I. 15 Deux protozoaires <i>Litonotus sp</i> (a) et <i>Opercularia sp</i> (b) dans un biofilm obtenu à partir d'eau usée ; grossissement (x 40).	21
Figure I. 16 Rôle de la topographie face aux forces hydrodynamiques.	21
Figure I. 17 Rôle de la structuration dans le détachement/décrochement du biofilm.	23
Figure I. 18 Surface physique et géométrique.	23
Figure I. 19 Principe de l'étude du biofilm par MCBL. Le biofilm est scanné verticalement en tranches et chaque une est composée des points focaux. L'ensemble forme une image 3D. .	27
Figure I. 20 Exemples de l'application de microscopie confocale sur l'étude des biofilms (a, b, c) (Lewandowski et Beyenal, 2007).	28
Figure I. 21 Les 256 niveaux de gris dans l'image.	30
Figure I. 22 Image _1' en niveaux de gris, images _2, 3, et 4' sont des images binarisées selon les seuils de niveau de gris « b, d et f » respectivement.	31
Figure I. 23 Deux mini images de 25 pixels blanc et noir mais répartis différemment	32
Figure I. 24 Définition de la méthode de co-occurrence de niveaux de gris, deux pixels ont le même niveau de gris séparés par une distance d et orientés par l'angle θ .	34
Figure I. 25 La construction de la matrice selon le positionnement des pixels et ses niveaux de gris dans l'image dans deux directions.	35
Figure I. 26 Les segments selon des niveaux de gris dans l'image avec la direction $\theta = 0^\circ$.	37
Figure I. 27 L'image du biofilm à gauche est transformée en matrice codée par des chiffres (à droite) qui montrent le niveaux de gris de l'image du biofilm présenté (Beyenal <i>et al.</i> , 2004).	40
Figure I. 28 Principe de la modélisation par analyse d'images par la méthode de seuillage (A) et la méthode de variation de niveaux de gris (B).	40
Figure I. 29 Trois possibilités pour un modèle du biofilm.	41
Figure II. 1 Réacteur à disques tournants (vue latérale et vue du dessus) et structuration des disques.	46
Figure II. 2 Réacteur à disque tournant avec cinq disques structurés sur lesquels le biofilm se développe.	47

FIGURES

Figure II. 3 Réacteur « moulin » avec le positionnement des lames, les mesures et l'ordre d'échantillonnage.	48
Figure II. 4 Vue latérale et du dessus du réacteur « moulin ».	49
Figure II. 5 Schéma du réacteur à lit fixe multi étagés	50
Figure II. 6 Photo du réacteur muté étagé avant le développement du biofilm.	51
Figure II. 7 Positionnement des lames de verre dans chaque étage avec l'ordre suivi pour les prélèvements des lames.	51
Figure II. 8 Réacteurs utilisés dans l'expérience d'oxydation de l'arsenic As^{III} : R_{fr} (sable), R_0 et R_1 (pouzzolane) et R_2 (verre).	53
Figure II. 9 Séchage de biofilm sur une plaque de verre dans l'étuve à 105°C.	55
Figure II. 10 Exemple de chromatogramme ionique.	57
Figure II. 11 Courbe d'étalonnage Ab CV avec la matière sèche du biofilm	58
Figure II. 12 La différence des niveaux de la couleur bleue dans la méthode CV développée. La biomasse augmente du gauche vers la droite.	59
Figure II. 13 La mesure de l'épaisseur du biofilm sur le microscope KL 1500 Stemi SV6 Zeiss.	60
Figure II. 14 Protocole utilisé pour faire le scan des lames et des disques par le scanner à plat.	61
Figure II. 15 Image de la lame avant (a) et après (b) le prétraitement des photos pour éliminer les bords.	62
Figure II. 16 Le prétraitement d'image des disques pour éliminer les bords et le transférer en rectangulaire.	63

TABLEAUX

Tableaux

Tableau II. 1 Liste des expériences réalisées avec les réacteurs à disques tournants.....	47
Tableau II. 2 Liste des expériences réalisées avec le réacteur multi étagés.....	52
Tableau II. 3 Série de dilutions pour préparer la courbe d'étalonnage de la méthode cristal violet.....	58

LISTE DES ABREVIATIONS

LISTE DES ABREVIATIONS

AHL	Acyl Homoserine Lactones
AI	Auto-Inducteur
CAsO1	Chéni Arsenic Oxydante 1
COR	Corrélation
CONT	Contraste
CV	Cristal violet
DCO	Demande Chimique en Oxygène (mg O ₂ /L)
DLVO	théorie de Derjaguin et Landau, 1941 & Verwey et Overbeek, 1948.
EPS	Exo-Polymère Substance
ENG	Energie
HOM	Homogénéité
GLRLM	Gray Level Run Length Method
GRN	Gray level Nonuniformity
IN	Inertie locale
LRE	Long Run Emphasis
MS	matières sèches (g)
QS	Quorum Sensing
RLN	Length Non-uniformity
RP	Run Pourcentage
Run	Expérience, il indique également au segment dans l'analyse d'images.
rpm	Rotation par minute
SGLDM	Spatial Gray Level Dependence Matrices
SRE	Short Run Emphasis
TDS	Temps de séjour
TE	Texte Entropie

INTRODUCTION GENERALE

« Le hasard peut créer un phénomène, mais pas un système »

M.Alnnasouri

INTRODUCTION GENERALE

Les microorganismes ont été la première forme de vie sur notre planète. Ils rassemblent les bactéries (procaryotes) les levures, les algues, les champignons et les protozoaires. Ces êtres vivants sont ubiquitaires, colonisant sols, eaux douces et marines et atmosphère, et sont associés les uns aux autres par des relations adaptées à leurs besoins biologiques. Ils sont indispensables à l'Homme et à l'environnement en contribuant aux grands cycles de la matière et en jouant un rôle essentiel dans presque tous les écosystèmes, naturels et humains.

Dans les eaux (douces, de mer et eaux résiduaires), les microorganismes se trouvent sous forme « planctonique », mais dès qu'une surface entre en jeu, ils changent leur stratégie de comportement et adoptent un nouveau mode de vie. Ce système, appelé « biofilm », s'avère une structure complexe formée grâce à l'agglomération des microorganismes facilitée par les matières polymériques qu'ils excrètent. Les biofilms offrent de nombreux avantages pour la survie et la multiplication de l'écosystème bactérien mais posent également de gros problèmes pour l'Homme et ses activités industrielles.

Depuis leur découverte et jusqu'à ce jour, les biofilms livrent en permanence de nouveaux secrets. De nombreuses hypothèses ont été proposées pour expliquer certains phénomènes comme les processus d'adhésion, le Quorum Sensing et même la formation du biofilm lui-même comme avantage pour les microorganismes. La composition du milieu liquide (nature et concentration des matières organiques), le type de microorganismes (autotrophe ou hétérotrophe) et la surface servant de support au biofilm (toxique ou non toxique, vivante ou non) affectent, plus ou moins, la formation d'un biofilm. Une fois le biofilm formé, il commence à se développer (à maturer) en fonction de contraintes environnementales auxquelles il est soumis. Celles-ci peuvent être de nature chimique (substances antimicrobiennes par exemple), physiques (champ magnétique, lumière, etc.) et hydrodynamiques (vitesse de la phase liquide, vitesse de la surface, structuration de la surface, etc.). La maturation du biofilm est fonction du temps ; il évolue de manière cyclique : plus le biofilm est âgé, plus la biomasse, le nombre de microorganismes et l'épaisseur du biofilm sont importants jusqu'au décrochement et au renouvellement du biofilm.

Une des thématiques de recherche sur les biofilms concerne sa caractérisation. Les méthodes d'analyse doivent non seulement quantifier les caractéristiques principales du biofilm (la biomasse, le nombre de microorganismes, l'épaisseur, etc.), mais elles doivent également caractériser la structure tridimensionnelle du biofilm, exprimer l'évolution de la biomasse et donc la vitesse du développement et les phénomènes de détachements s'ils y ont lieu. Cela devient plus complexe lorsque l'étude est envisagée sur une longue période (quelque mois ou quelques années). De nombreuses études sont menées sur de courtes durées (quelques heures

INTRODUCTION GENERALE

à quelques semaines). De plus, elles impliquent soient des techniques analytiques exigeant la destruction du biofilm soient des techniques non destructives mais coûteuses.

Toutefois, de nouvelles approches d'exploitation de données microscopiques fondées sur l'analyse d'images permettent de quantifier et de qualifier la macrostructure du biofilm, ses microorganismes et leurs colonies selon la résolution choisie. Un des intérêts principaux de ces techniques est qu'elles peuvent être non intrusives et que le biofilm, selon les protocoles expérimentaux et analytiques utilisés, peut reprendre son activité dans son milieu et donc pouvoir être étudié sur une longue durée. Ces méthodes ont été initialement proposées par Milferstedt *et al*, dans le cas d'un réacteur annulaire (de type Couette) alimenté par un substrat synthétique. Puis la faisabilité au suivi du développement sur des disques biologiques tournants alimentés par de l'eau usée a été démontrée.

Le travail présenté dans ce document propose une extension de ces travaux par une évaluation de la formation du biofilm, un suivi de son développement, la caractérisation des phénomènes de détachement et de l'activité biologique de l'ensemble d'un biofilm, pendant de longues durées (3-7 mois), dans plusieurs types de réacteurs biologiques, alimentés par différents types de substrat.

Les travaux sont présentés au travers de trois chapitres :

Le chapitre I présente une synthèse bibliographique sur la physiologie du biofilm, sa macrostructure et son activité biologique. Une vision au niveau de la micro échelle est nécessaire pour comprendre les différents mécanismes comme les phénomènes d'adhésion, de détachement et de résistance aux antibiotiques. Différentes techniques d'analyse destructives et non destructives du biofilm sont identifiées avec une focalisation sur l'analyse d'images, appliqué préférentiellement dans ce travail.

Le chapitre II détaille les matériels et les méthodes mis en œuvre. Il y est décrit principalement les réacteurs utilisés, les conditions expérimentales ainsi que les techniques analytiques et les protocoles de mesures. Deux réacteurs, spécifiquement conçus afin d'explorer nos différentes hypothèses de travail et une méthode analytique modifiée pour être adaptée aux biofilms maturés et être plus écologique sont présentés.

Le chapitre III présente les résultats obtenus sous forme d'articles acceptés, soumis ou à soumettre. Une conclusion générale synthétise l'ensemble des résultats.

Enfin, ce travail a été réalisé dans deux laboratoires : le Laboratoire de Réactions et Génie des Procédés (LRGP) à Nancy et le Groupement de Recherche Eau Sol Environnement (GRESE) à Limoges dans le cadre d'une collaboration scientifique. D'autres organismes ont participé

INTRODUCTION GENERALE

d'une manière directe ou indirecte comme la Zone Atelier Moselle (ZAM), le Groupement Evaluation Mesures Composants Eaux Assainissement (GEMCEA) et l'Institut Carnot.

I. CHAPITRE I

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

La synthèse bibliographique s'attache à présenter les généralités sur les biofilms à travers leur définition, leurs propriétés physico-chimiques, leur formation et leur rôle. Les réacteurs biologiques classiques utilisés dans le traitement biologique de l'eau à partir de biofilm sont ainsi présentés. Nous résumons également les techniques analytiques référencées dans les travaux de recherche sur les biofilms.

Une conclusion présentant les objectifs de notre travail clôt ce chapitre.

I.1. Historique

D'après les recherches les plus récentes, les bactéries seraient apparues sur Terre il y a environ 3,6 milliards d'années, soit bien avant l'apparition de l'Homme lui-même, il y a environ 100 000 années (Graves, 2004). L'homme ne se doutait pas de l'existence même des micro-organismes jusqu'au 17^{ème} siècle, lorsqu'Antonie van Leeuwenhoek (1632-1723) a développé le premier microscope. Il a visualisé et illustré graphiquement des «animalcules» (bactéries) trouvées dans sa propre plaque dentaire. En 1884, Robert Koch a décrit une méthode pour identifier un micro-organisme en tant que cause de maladie (Munch, 2003). Les micro-organismes ont été beaucoup étudiés en suspension dans un liquide homogène ou par culture sur un milieu de culture solide (en boîte de Pétri), ce qui offre une vue très partielle de la vie microbienne dans la nature. En 1972 Wuhrmann, a indiqué que 90 à 99% des microorganismes existent sous une forme d'agglomérats à 1.5 m de profondeur dans les rivières (Wuhrmann *et al.*, 1972). Le nombre de bactéries attachées sur les surfaces immergées dans un milieu aquatique est estimé être entre 1000 et 10000 fois plus grand que le nombre de bactéries libres dites «planctoniques» (Watkins et Costerton, 1984). Plus récemment, des observations microscopiques quantitatives démontrent que plus de 99,9% des micro-organismes se développent sous forme de communautés agrégées "sessiles", c'est-à-dire, attachée à une surface, plutôt que comme "planctoniques" ou flottant dans le milieu (Costerton *et al.*, 1999).

Les micro-organismes se fixent sur des surfaces (vivantes ou non vivantes), forment des « tapis » qui conduisent à la colonisation totale de la surface. Ces tapis bactériens constituent des « *biofilms* ». Cette notion a été proposée en 1976 par William Costerton, directeur du « Center for Biofilm Engineering » de l'Université d'État du Montana.

Depuis cette époque, les biofilms sont considérés comme le mode de vie normal des micro-organismes ; étudier uniquement ces derniers sous forme planctonique signifie qu'on laisse de côté une partie énorme de la population bactérienne. En 2006, Allwood *et al.*, ont annoncé dans le journal « Nature » que les stromatolithes, qui résultent de l'activité biologique de cyanobactéries, sont une forme de biofilm composés de micro-organismes, et qu'ils ont été à l'origine de la création de structures de pierre depuis des milliards d'années. Ces « pierres vivantes » étaient, à cette époque, la source unique d'oxygène dans l'atmosphère et donc source de vie sur notre planète (Figure I.1) (Allwood *et al.*, 2006).

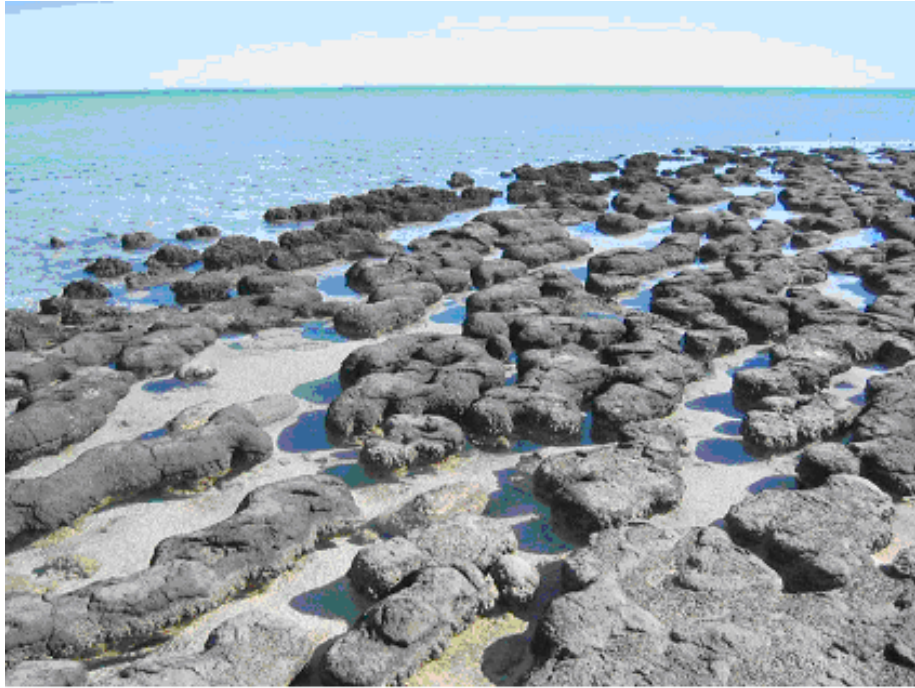


Figure I. 1 Stromatolithes en forme de biofilm (Allwood *et al.*, 2006).

I.2. Définition du biofilm

Un biofilm est une communauté de différents micro-organismes aérobies ou anaérobies (bactéries, champignons, algues, protozoaires, etc.) qui se caractérisent par des cellules fixées les unes aux autres, l'ensemble ainsi formé étant lui-même fixé à une surface non toxique (bois, verre, plastique, métal sauf cuivre, poisson, etc.), dans toutes les positions d'orientation de la surface, dans un milieu où l'humidité est au-dessus du point de saturation ou bien dans un milieu aquatique. Les micro-organismes sécrètent une matrice complexe de substances exopolymériques appelés classiquement EPS, sécrétion dans laquelle serait impliquée le système de « Quorum Sensing ». La matrice est composée essentiellement de polysaccharides et poly-protéines qui se regroupent et facilitent l'adhésion à la surface. L'ensemble de micro-organismes et les exopolymères forment souvent une couche protectrice visqueuse et développent une résistance aux méthodes de désinfection chimique, physique et parfois de détachement mécanique.

I.3. Pourquoi un biofilm?

Dans la nature, tout tend vers la stabilité pour économiser le maximum d'énergie. Les microorganismes tendent à accéder aux matières nutritives nécessaires pour la croissance et la multiplication via le minimum d'énergie dépensée. La production d'exopolymères dans la

formation du biofilm va dans ce sens et procure à la bactérie un certain nombre d'avantages. Nous en présentons quelques uns:

1. Renforcement des forces de cohésion dans le biofilm et de l'ensemble sur la surface (Characklis *et al.*, 1983).
2. Absorption/adsorption de nutriments organiques et inorganiques et des produits microbiens secondaires (Byers, 1984 ; Marshall, 1992) grâce à leurs charges électriques ou par d'autres forces physico-chimiques locales (Hermansson *et al.*, 1985).
3. Protection des cellules immobilisées contre les modifications rapides de l'environnement comme la température, le séchage et le pH, grâce à la phase liquide qui peut circuler dans les canaux d'exopolymères, l'eau ayant une grande valeur de capacité calorifique. (Costerton *et al.*, 1987).
4. Stockage d'énergie et communication intercellulaire (Characklis et Cooksey, 1983).
5. Maintien à proximité de cellules avec lesquels elles ont des relations de type mutualisme, commensalisme, amensalisme, proies - prédateurs ou concurrence.
6. Protection envers plusieurs mécanismes antimicrobiens, comme l'application de biocides, d'antibiotiques et l'action de prédateurs (Costerton *et al.*, 1984 ; Costerton *et al.*, 1989 ; Anwar *et al.*, 1992).

I.4. Les impacts du biofilm

Les biofilms peuvent avoir des effets positifs ou négatifs pour l'homme ou ses activités selon leur existence dans l'environnement et les installations.

I.4.1. Rôle négatif

Les biofilms peuvent entraîner de sévères problèmes de santé lorsqu'ils induisent l'apparition d'espèces pathogènes. Malgré les procédures de nettoyage et de désinfection, les biofilms posent des problèmes divers en médecine : biofilm de bactéries pathogènes se développant dans des systèmes digestifs, urinaire et respiratoire ou contamination d'implants ou de tubulures lors des opérations médicales. L'implantation des biofilms dans les réseaux de distribution d'eau est également un des problèmes importants rencontrés dans le maintien de la qualité de l'eau potable (contamination, mauvais goût) (Block *et al.*, 1993).

Les biofilms sont responsables de la dégradation de la qualité des aliments et de contamination dans les équipements de l'industrie agro-alimentaire (Fournaud *et al.*, 1978). La formation de biofilms sur les plaques de certains échangeurs de chaleur à température base, dans l'industrie alimentaire, peut diminuer leur capacité de transfert thermique

(Characklis *et al.*, 1980) et entraîner l'augmentation de pression sur les pompes à cause de la diminution de diamètres dans ses tuyaux (Hamilton, 1987).

I.4.2. Rôle positif

Les biofilms peuvent se révéler très utiles dans le domaine agroalimentaire. La production d'éthanol dans des réacteurs disposés verticalement et dans lesquels des levures *Saccharomyces cerevisiae* sont immobilisées sous forme de biofilm (bien qu'elles produisent peu d'EPS par rapport aux autres microorganismes) a été décrite par plusieurs auteurs (Chung et Park 1983 ; Demirci *et al.*, 1997 ; Todd et Gerald, 2001). Les biofilms sont utilisés également dans la production du vinaigre (acide acétique) : un mode de fabrication utilise un réacteur en mode percolation dans lequel une solution alcoolique coule à travers un biofilm d'*Acetobacter* développé sur un lit de bois (Bailey et Ollis 1986). L'utilisation de certains microorganismes en forme de biofilm dans les réacteurs à lit fixe a été proposée pour la dégradation des mycotoxines par voie biologique (Alnnasouri *et al.*, 2007). Les réacteurs à biofilm ont également été utilisés dans la production d'antibiotiques. Par exemple, un réacteur à biofilm à lit fluidisé a donné de meilleurs résultats lors de la production de pénicilline (Park et Wallis 1984).

Les biofilms sont également utilisés pour le traitement biologique des eaux résiduaires. Les différents microorganismes qui jouent un rôle essentiel dans l'épuration des eaux via leur capacité à dégrader les polluants (de nature C, N et P) dissous dans les effluents ont la capacité à se développer sous forme de biofilm. Différents types de réacteurs ont été développés pour mettre à profit ce type de développement microbien : les réacteurs à lit fixe, à disques tournants, à lit fluidisé et à biofilm membranaire en sont les principaux exemples. Mais parmi ces réacteurs, le réacteur à disques tournants qui est connu sous le nom anglais « Rotating Biological Contactor (RBC) » et le réacteur à lit fixe sont les plus utilisés.

I.4.2.1. Réacteurs à disques tournants (RBC)

Le réacteur à disques tournants est un procédé utilisé après un traitement primaire dans le traitement des eaux usées (Banerjee, 1997). La Figure I.2 montre les différentes parties d'un RBC. Des disques sont placés sur un axe tournant dans un réservoir de manière à ce qu'ils soient immergés à environ 40% de leur diamètre. Les disques sont espacés de telle façon que lors de la submersion, les eaux usées puissent s'écouler dans les espaces entre les disques. Cela permet d'assurer un contact permanent entre le biofilm et le substrat d'un côté et le biofilm et l'air d'un autre grâce à la rotation des disques. Les disques tournent entre 2 à

8 tours par minute. Les surfaces (ou les supports) sont généralement en plastique (polyéthylène, PVC et polystyrène). Les performances des RBC dépendent de plusieurs paramètres importants qui sont: la vitesse de rotation (Cortez et al., 2008 ; Ramsay et al. 2006), le temps de séjour (Najafpour *et al.*, 2006), la forme et la surface des supports (Patwardhan, 2005), la température (Rodgers et Zhan, 2003), la quantité et la qualité des eaux usées (Brazil, 2006), le taux de charge hydraulique, l'oxygène dissous (Patwardhan, 2005), la surface submergée (Schwingle *et al.* 2005), le nombre d'étages lorsque plusieurs RBC sont montés en série (Tawfik *et al.*, 2002).

D'autres systèmes de réacteurs RBC ont été proposés. C'est le cas du dispositif présenté dans la Figure I.3 dans lequel des petits supports en forme de roue sont maintenus prisonniers dans des cages en rotation dans un bassin.

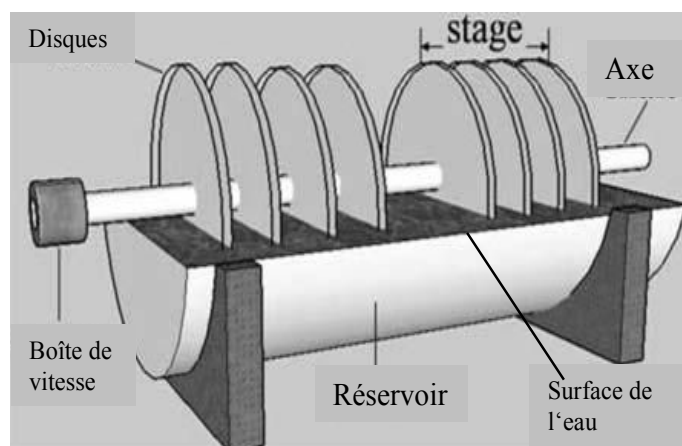


Figure I. 2 Réacteur à disques tournants (RBC).



Figure I. 3 Réacteur RBC à cages.

I.4.2.2. Réacteur à lit fixe

Les supports sont placés dans une colonne verticale (peuvent être garnissage vrac, garnissage ordonné) qui fonctionne à contre-courant (Figure I.4) ou à co-courant. A contre courant, l'effluent à traiter percole du haut vers le bas pour rencontrer en permanence l'air qui traverse la colonne dans le sens inverse (Park *et al.*, 2004).

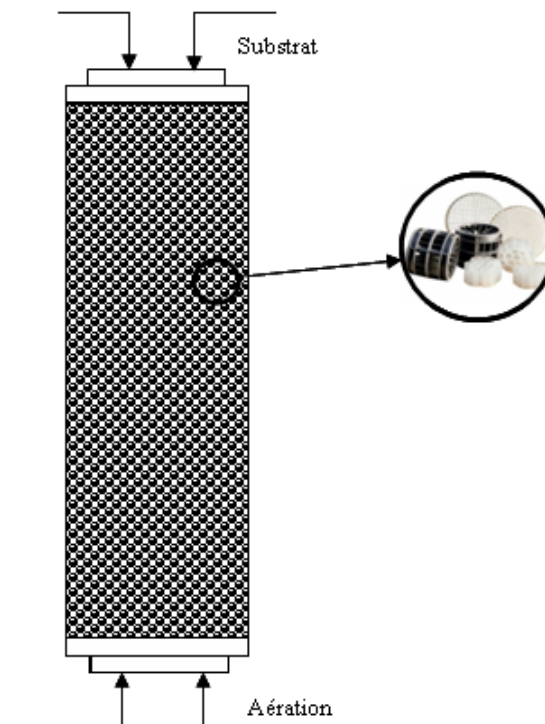


Figure I. 4 Réacteur à lit fixe à contre courant.

Les supports sont soit naturels (pierre, argile, charbon actif...), soit de nature synthétique afin d'augmenter les surfaces spécifiques pour permettre le développement d'un maximum de biofilm comme cela est montré dans la Figure I.4.

I.5. Physiologie du biofilm

Pour comprendre la physiologie du biofilm les processus du fonctionnement des microorganismes qui le composent, la notion de Quorum Sensing (QS), le rôle de la matrice d'exopolymères et l'activité biologique de l'ensemble du biofilm sont examinés.

I.5.1. Quorum Sensing

Ce système est une stratégie de communication entre les microorganismes. Il a été découvert chez des bactéries marines bioluminescentes appelée *Vibrio fischeri* (Nealson, 1977 ; Fuqua *et al.*, 2002). Ce mécanisme a été retrouvé aussi chez d'autres bactéries Gram négatif comme *Pseudomonas aeruginosa* (Whitehead *et al.*, 2001).

La formation du biofilm est régulée par une « communication » de cellule à cellule fondée sur une détection de la densité cellulaire. L'amplitude du signal est fonction de la taille de la population et, en fonction d'un certain seuil, le signal active un régulateur transformationnel inducteur de gènes spécifiques (mécanisme d'auto induction). Le mécanisme de QS

commence par une signalisation par une molécule connue sous le nom auto-inducteur (AI) et un activateur ou R-protéine. Dans le cas d'une faible densité de microorganismes, c'est-à-dire quand la distance entre deux microorganismes est grande, l'auto-inducteur est produit à un niveau faible. En cas de forte densité de microorganismes (la distance entre les deux microorganismes est alors petite) le niveau de l'auto-inducteur augmente jusqu'à un seuil de concentration pour lequel l'auto-inducteur est capable d'activer la production des gènes cibles. Cela induit la réponse correspondante aux signaux comme la production d'exopolymères par exemple. La Figure I.5 montre les deux cas (Ronald *et al.*, 1999).

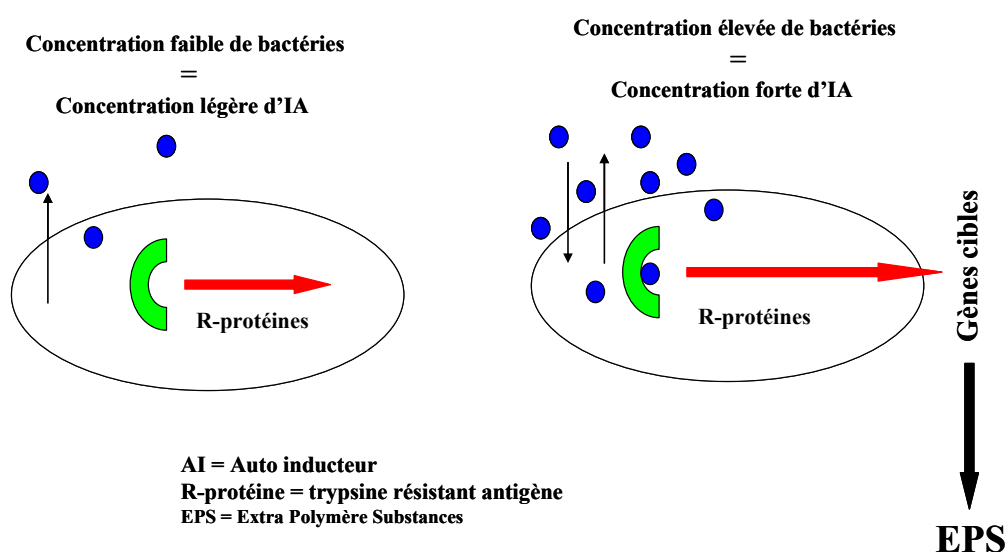


Figure I. 5 Mécanisme de Quorum Sensing chez les microorganismes

Il existe plusieurs molécules de signalisation intercellulaire chez les microorganismes (Miller *et al.*, 2004; Ronald *et al.*, 1999; John *et al.*, 2006):

Acyl Homoserine Lactones (AHL)

Le premier système de QS a été décrit chez *Vibrio fischeri* (Nealson, 1977). AHL est trouvé uniquement chez les bactéries Gram-négatif.

Peptides Auto-inducteurs

Chez de nombreuses espèces de bactéries Gram-positif, la sécrétion de ces peptides en tant que molécules de signalisation a été mise en évidence. Ce sont des molécules fréquemment produites par les bactéries de type *Streptocoques* (Steinmoen *et al.*, 2002).

Auto- inducteur 2 (AI-2)

C'est un signal de QS produites par certaines bactéries Gram-positif et Gram-négatif. Seules deux structures d'AI-2 ont été distinguées : celles de *Vibrio harveyi* (Chen *et al.*, 2002) et de *Salmonella enterica* (Miller *et al.*, 2004).

Un système Fongique

Le système QS des eucaryotes a été récemment découvert et caractérisé chez *Candida albicans* et *Saccharomyces cerevisiae*. Plusieurs molécules ont été identifiées, telles que le farnesol (Hornby *et al.*, 2001), le tyrosol (Chen *et al.*, 2004), le phényléthanol et le tryptophol (Chen et Fink 2006).

I.5.2. Activité biologique du biofilm

L'activité biologique du biofilm est caractérisée par la vitesse de la consommation des matières nutritives par unité de surface du biofilm au cours du temps. Le principe de son évaluation est de mesurer la concentration d'une substance qui est consommée par les bactéries du biofilm et qui ne doit pas précipiter, se transformer, ni s'évaporer au cours du traitement biologique. La concentration de la substance en question est mesurée à l'entrée et la sortie du réacteur, et la différence est multipliée par le débit du substrat et puis divisée par la surface active du biofilm dans le réacteur (équation 1):

$$AB = (C_E - C_S) \cdot \frac{Q}{A} \quad (1)$$

Avec :

AB : Activité Biologique du biofilm (en Kg. j-1. m-2)

CE, CS : Concentration de la substance à l'entrée et à la sortie respectivement (Kg/L).

Q : Débit du substrat (L.j-1).

A : Surface active du biofilm (m2).

Cette activité peut être normée par la concentration initiale pour définir l'activité biologique spécifique (ABS (L. j-1. m-2)) qui peut être calculée via l'équation 2 :

$$ABS = \frac{(C_E - C_S)}{C_E} \cdot \frac{Q}{A} \quad (2)$$

I.6. Morphologie du biofilm

I.6.1. Microstructure et Macrostructure du biofilm

Un biofilm peut s'étendre sur quelques mm² ou coloniser des milliers de m² de surface sur des épaisseurs pouvant varier de quelques μm à quelques mm d'épaisseur. La microstructure et la macrostructure sont des notions complémentaires qui dépendent de

l'échelle à laquelle on se place. Dans le cas des biofilms, la microstructure se focalise sur les éléments individuels des composants du biofilm notamment les cellules microbiennes. La macrostructure du biofilm est la structure générale de l'ensemble observable à l'œil nu sans objectif. La forme, la topographie, les plis et les formes induites par les phénomènes de développement, détachement et décrochement etc., sont observés sur la surface de biofilm à l'œil nu ou avec un faible grossissement.

Les biofilms montrent un degré élevé de complexité spatiale. Grâce à l'utilisation de la microscopie confocale laser équipée d'une microélectrode, il a été démontré que le biofilm est traversé de canaux (Costerton *et al.*, 1994 ; Debeer *et al.*, 1994 ; Gjaltema *et al.*, 1994). Ces canaux conduisent le milieu de culture et facilitent le transfert, l'échange des nutriments, des métabolites et des sous-produits cellulaires de l'intérieur à l'extérieur et de l'extérieur à l'intérieur des différentes parties du biofilm qui contient les cellules microbiennes. Les canaux permettent au milieu d'être en contact avec les microorganismes du biofilm grâce aux grandes surfaces formées par sa structuration (Costerton, 2007).

L'utilisation de microscopie électronique à balayage montre qu'un biofilm de *S. epidermidis* est composé des groupes de cellules et des agrégats séparés par des trous bordés par les exopolymères (Geesey *et al.*, 1992 ; Lewandowski *et al.*, 1995). Les cellules bactériennes forment des structures semblables à un nid d'abeille comme cela est montré dans la Figure I.6.

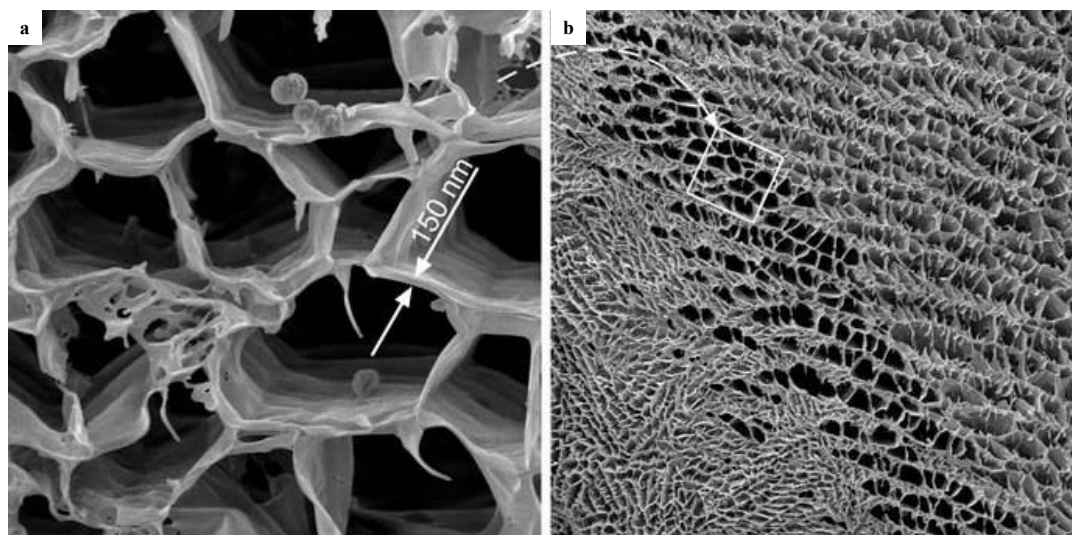


Figure I. 6 Microstructure (a) et Macrostructure (b) du biofilm de *S. epidermidis* (Costerton, 2007).

La microstructure du biofilm peut fortement influencer les propriétés physiques telles que la résistance mécanique, la flexibilité, la dureté, la résistance chimique ou aux contraintes hydrodynamiques.

I.6.2. Les exopolymères (EPS)

Les biofilms ont généralement des teneurs élevées en exopolymères qui les composent de 50 à 90% (Characklis *et al.*, 1983 ; Christensen *et al.*, 1990; Nielsen *et al.*, 1997). Le contenu de la matrice peut varier d'un organisme à un autre, mais ce sont généralement des polysaccharides et des protéines (Sutherland, 2001), ainsi que leurs combinaisons (glycoprotéines) (Humphrey *et al.*, 1979) qui sont majoritaires. On y trouve également des acides nucléiques et des alginates comme dans les biofilms de *P. aeruginosa* (Mai *et al.*, 1993). Les teneurs en protéines dans les biofilms provenant de réseaux d'assainissement sont beaucoup plus élevées que celles en polysaccharides (Miqueleto *et al.*, 2010). La composition des EPS en sucres et en protéines dépend de l'alimentation (Comte *et al.*, 2007 ; Alnnasouri *et al.*, 2010a).

Les exopolymères jouent un rôle majeur dans la résistance du biofilm aux biocides grâce aux canaux dans la matrice. Des mécanismes ont été suggérés pour expliquer la formation des canaux et la construction des ponts polymériques dans la matrice et ses composants. Trois types de force sont mis en oeuvre (Mayer *et al.*, 1999; Flemming, 1999) :

- **Les forces de London (dispersion):** Elles se produisent principalement dans les zones hydrophobes et ne sont pas localisées sur des groupes fonctionnels précis.
- **Les interactions électrostatiques :** Elles sont actives entre les ions et les dipôles permanents et sont relativement fortes. Elles sont principalement dues à des ions bivalents liés aux groupes carboxyles dans les EPS du biofilm comme ceux du calcium. Les forces électrostatiques peuvent aussi agir répulsivement et elles contribuent à maintenir la structure de la matrice d'exopolymères gonflée comme dans une éponge pour former des pores et des canaux.
- **Les liaisons hydrogène :** Elles sont principalement actives entre les groupes hydroxyles particulièrement fréquents dans les polysaccharides, et les molécules d'eau. Elles soutiennent également les structures de polyprotéines dans la matrice. Les forces de ces deux liaisons sont plus importantes sur de courtes distances.

Ces trois types de liaisons contribuent à la stabilité de l'ensemble des matrices du biofilm. Le résultat est la formation d'une matrice tridimensionnelle d'exopolymères. Figure I.7 montre les interactions entre les molécules d'exopolymères : (1) répulsion de deux groupes carboxyliques, (2) attraction de deux groupes carboxyliques par un cation divalent, (3) liaisons hydrogène, (4) l'attraction électrostatique, (5) forces de London (Allison *et al.*, 2000).

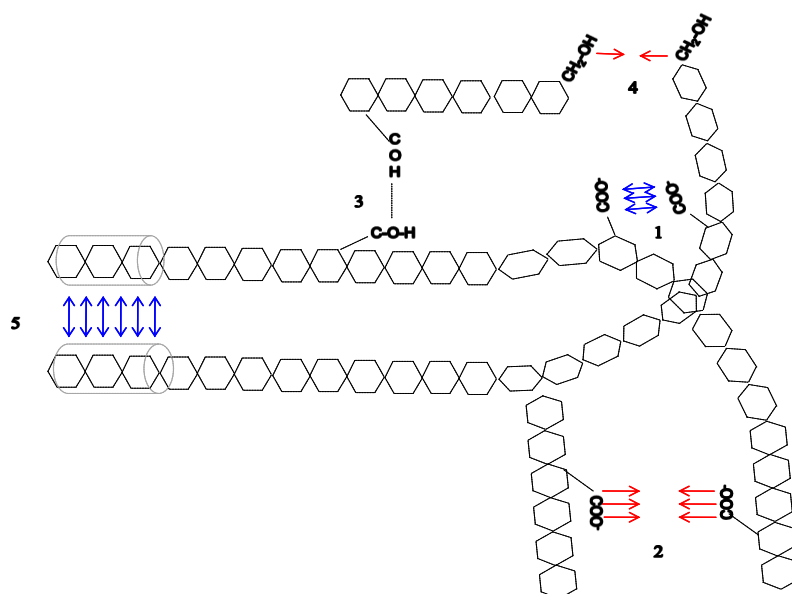


Figure I. 7 Les interactions entre les molécules d'EPS qui garantissent la forme du biofilm (1) répulsion de deux groupes carboxyliques, (2) attraction de deux groupes carboxyliques par un cation divalent, (3) liaisons hydrogène, (4) attraction électrostatique, (5) forces de London (Allison *et al.*, 2000).

I.7. Formation du biofilm

Les différentes études montrent que les biofilms se forment de la même manière quel que soit l'environnement qu'ils colonisent (John *et al.*, 2006 ; Costerton *et al.*, 1987). La formation du biofilm est composée de cinq étapes (Steven *et al.*, 2000 ; John *et al.*, 2006 ; Characklis *et al.*, 1990 ; Lappin-Scott et Costerton, 1995) qui sont les suivantes (Figure I.8):

1. Le conditionnement d'un film de nutriments sur la surface.
2. Le positionnement des micro-organismes à la proximité de la surface.
3. L'adhésion réversible et irréversible des microorganismes sur la surface conditionnée.
4. La croissance, la colonisation et la maturation sur la surface.
5. La migration et le déplacement des agrégats.

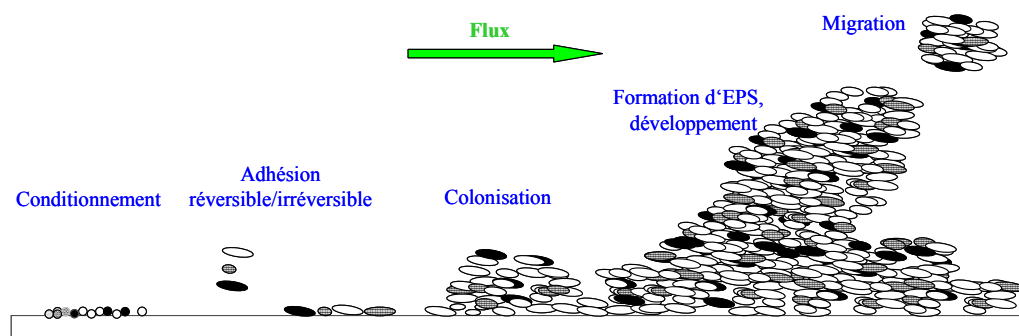


Figure I. 8 Etapes de la formation du biofilm

I.7.1. Conditionnement du film sur la surface

Toute surface immergée dans un milieu liquide se modifie spontanément grâce à des molécules qui existent dans son environnement et qui couvrent *in fine* la surface par un film de matières organiques et non organiques (Dunne *et al.*, 2002). Le phénomène est rapide (15 min) mais il faut plus de temps pour atteindre l'équilibre total avec l'environnement (Bryers, 1987 ; Characklis, 1990). Avant qu'une surface ne soit exposée dans un milieu liquide, elle est chargée soit négativement ou positivement. Après l'exposition au milieu, la surface acquiert des molécules de charges différentes. Elle adsorbe également des molécules de faible poids moléculaire, des molécules hydrophobes, des polysaccharides complexes, des glycoprotéines, des lipides, des composés humiques (Rittle *et al.*, 1990; Chamberlain, 1992).

I.7.2. Le positionnement des micro-organismes à proximité de la surface

Dans les milieux aquatiques, les écoulements sont qualifiés de nul, laminaire ou turbulent et l'écoulement nul (Munson *et al.*, 1990). Un flux laminaire est un écoulement parallèle avec peu ou pas de mélange latéral avec le flux le plus rapide au centre (Figure I.9 a) (Lappin *et al.*, 1993). L'écoulement turbulent est un flux aléatoire et désordonné qui permet aux bactéries et des nutriments d'être mélangés et transportés plus près de la surface que dans un flux laminaire (Figure I.9 b).

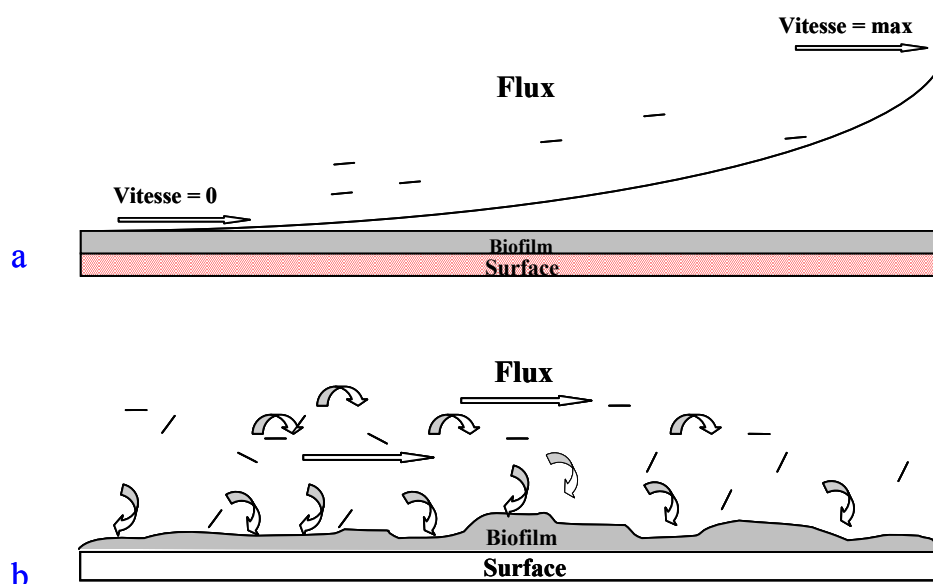


Figure I. 9 Le flux laminaire (a) et le flux turbulent (b) dans un milieu aquatique.

Parce que ce type de flux est complexe et difficile à prévoir, la plupart des recherches dans le domaine de l'adhérence et les mécanismes de transport a été réalisées dans un flux laminaire. A partir d'un flux laminaire, le mouvement du fluide à proximité du centre du courant est plus rapide que près de la surface à cause de la traînée causée par la viscosité. Le système d'écoulement près de la surface commence à former une couche frontière dans laquelle les forces de viscosité sont plus importantes que les forces de l'accélération du courant. Le fluide en contact avec la surface a une vitesse nulle. De ce fait, lorsque la couche à proximité de la surface devient turbulente, la circulation dans la couche frontière juste près de la surface ne l'est pas. Par conséquent, dans les trois cas d'écoulement, la couche mince frontière à côté de la surface solide a une turbulence négligeable (Brading *et al.*, 1995). S'il y a un courant, cela contribue à propulser les bactéries à une courte distance de la surface, leur permettant une plus grande chance de l'adhérence. Si les microorganismes se déplacent plus rapidement que le fluide dans le milieu, une force supplémentaire dirige les microorganismes vers la surface (Characklis *et al.*, 1981). Les microorganismes s'approchent spontanément des surfaces grâce à différents appendices tels que flagelles, cils (Gavin *et al.*, 2003) et pilis (McBride, 2001). Le mouvement du courant, le mouvement brownien et les gradients thermiques contribuent également à transporter les cellules microbiennes jusqu'à la surface conditionnée.

I.7.3. Adhésion réversible et irréversible

Une fois que les microorganismes sont installés, le processus d'adhésion microbienne aux surfaces est conditionné par un certain nombre de facteurs, y compris les espèces de bactéries, la composition de la surface des cellules, la nature des surfaces, la disponibilité des éléments nutritifs, les conditions hydrodynamiques, la communication Quorum Sensing (Davey *et al.*, 2000 ; Costerton *et al.*, 1995; Kumar et Anand, 1998; Stoodley *et al.*, 2002; Shirtliff *et al.*, 2002). Il y a plusieurs hypothèses proposées pour décrire le mécanisme d'adhésion et qui ont le même axe d'interprétation :

Zobell montre que l'adhésion est composée de deux étapes alternatives: l'adhésion réversible et l'adhésion irréversible. La première est considérée comme un attachement faible des cellules microbiennes à la surface, le lien surface-cellule pouvant facilement être brisé par une faible force (Rittman, 1989). L'adhésion irréversible est supportée par les exopolymères qui établissent un lien surface-cellule permanent. Ces liens nécessitent une action mécanique ou chimique pour être brisés (Zobell, 1943).

La théorie DLVO (de Derjaguin et Landau, 1941 ; Verwey et Overbeek, 1948) exprime l'adhésion comme la résultante des forces qui égalent les forces électrostatiques et de Van

der Waals sur les surfaces (van Loosdrecht *et al.*, 1987). Selon cette théorie, l'attraction de particules peut se faire lorsque de petites distances de moins de 1 nm (minimum primaire) séparent les particules d'une surface ou lorsqu'une distance de 5 à 10 nm (minimum secondaire) sépare la particule de la surface (Bowen et Epstein 1979 ; Characklis *et al.*, 1990). Les flagelles et les pili sont nécessaires pour l'adhésion (Dalton et March, 1998 ; Santos *et al.* 1991). A ce stade, les microorganismes peuvent commencer leur activité comme leurs homologues planctoniques et sont prêts à passer à l'étape suivante pour la croissance et la multiplication.

I.7.4. Croissance et développement du biofilm

C'est l'étape clé de la formation du biofilm. Une fois que les cellules microbiennes sont fixées irréversiblement sur la surface, elles commencent à croître et à se multiplier. Ces activités biologiques sont fonction de la carence ou l'abondance des facteurs essentiels tels que l'eau, la teneur en oxygène et de paramètres physico-chimiques comme la température, le pH, la lumière etc. Le nombre de cellules microbiennes augmente et donc la distance entre deux cellules diminue. Cela provoque la sécrétion d'exopolymères qui contribuent à la forte adhésion des cellules les unes aux autres d'un côté et de l'ensemble à la surface d'un autre côté. Les microorganismes peuvent échanger des métabolites avec leurs voisins par des relations physiologiques (Blenkinsopp *et al.*, 1991). Les organismes supérieurs tels que les protozoaires et les métazoaires s'installent également dans le biofilm.

Il a été estimé que le biofilm mature ne contient que 10% ou moins de son poids sec sous forme de cellules (Hamilton *et al.*, 1985). En général, lorsque le biofilm atteint une certaine épaisseur, les conditions à sa base deviennent anaérobies. Cela indique que le biofilm est proche d'un état de maturité, avec une grande diversité d'espèces (Hamilton, 1987).

I.7.5. Émigration et déplacement

Grâce à l'abondance des matières nutritives dans l'environnement, les bactéries se multiplient, augmentant le nombre de microorganismes et la quantité d'exopolymères. En conséquence le biofilm devient de plus en plus épais. Les petits agrégats du biofilm commencent à se détacher de la surface superficielle, s'étaler pour remplir les vides, migrer et se déplacer sous l'influence du courant et en conséquence le biofilm s'agrandit. Ces agrégats ainsi que les microorganismes libres peuvent s'éloigner de la surface en étant entraînés par le courant liquide. Ils retombent sur la surface un peu plus loin et

recommencent de nouvelles colonies et en conséquence un nouveau biofilm comme le montre la Figure I. 10.

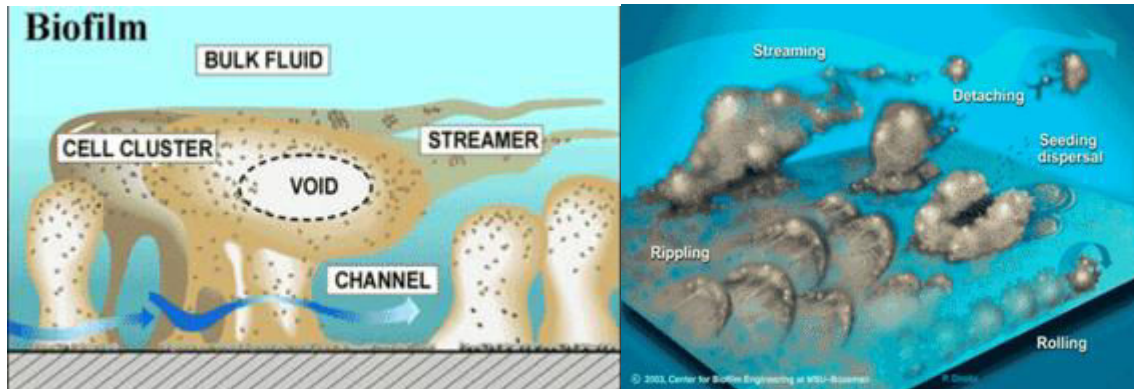


Figure I. 10 Immigation et déplacement du biofilm Réf [1].

I.8. Détachement du biofilm

Il peut être défini comme une perte de grands ou de petits agrégats du biofilm. Globalement, le développement d'un biofilm est le résultat de la production de biomasse et d'événements au cours desquels le biofilm est éliminé. L'évolution se poursuit jusqu'à ce que le biofilm atteigne un état d'équilibre c'est-à-dire lorsque la production de la biomasse est égale à son détachement. L'égalité donnée par Trulear et Characklis (1982) exprime ce phénomène :

$$\text{Taux de développement du biofilm} = \text{Taux de la production de biomasse} - \text{Taux du détachement des agrégats}$$

Il y a plusieurs types du détachement:

1. Détachement superficiel.
2. Érosion.
3. Décrochement.
4. Abrasion (frottement)
5. Consommation par les prédateurs

I.8.1. Détachement superficiel

Ce phénomène se fait spontanément et ne provoque pas l'enlèvement des parties du biofilm à partir de la surface. Lorsque l'épaisseur du biofilm dépasse une certaine limite, des agrégats de biofilm qui se développent au dessus de la couche laminaire commencent à se détacher de la partie superficielle du biofilm (Figure I.11) influencés par les conditions

hydrodynamiques comme les contraintes de cisaillement du milieu (Brading *et al.*, 1995). Ces agrégats peuvent provoquer un détachement lors d'une collision avec un autre biofilm.

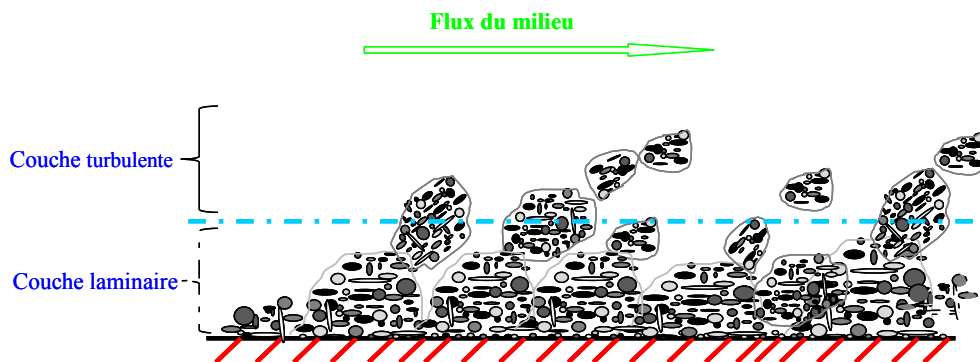


Figure I. 11 Détachement superficiel du biofilm

I.8.2. Erosion

L'érosion est un phénomène où le biofilm se détache partiellement en forme d'agrégats à partir de la surface (Bryers, 1987). L'érosion est provoquée souvent par des facteurs intérieurs et peut se faire lorsque les conditions environnementales deviennent défavorables comme la limitation en oxygène, le manque des matières nutritives ou parfois le changement de substrat (Stoodley *et al.*, 1999b; Hall-Stoodley *et al.*, 2004). Sous certaines conditions comme l'anoxie et l'anaérobiose, les microorganismes voisins de la surface du biofilm peuvent produire des gaz qui en s'échappant provoquent la séparation du biofilm de la surface (Chang *et al.*, 1991). Des enzymes produits par certains microorganismes peuvent provoquer également la destruction des liaisons biofilm-surface (Allison *et al.*, 2000). Ces facteurs augmentent les possibilités d'érosion. Les liaisons entre l'agrégat et la matrice voisine doivent être suffisamment faibles pour que n'importe quelle force externe enlève la partie du biofilm à partir de la surface comme cela est montré dans la Figure I.12. Le poids de l'agrégat joue un rôle stimulant si la surface est positionnée verticalement et un rôle inhibant si elle est positionnée horizontalement. Ce phénomène est aussi induit par l'augmentation des forces de cisaillement à l'interface biofilm-liquide (Characklis, 1990).

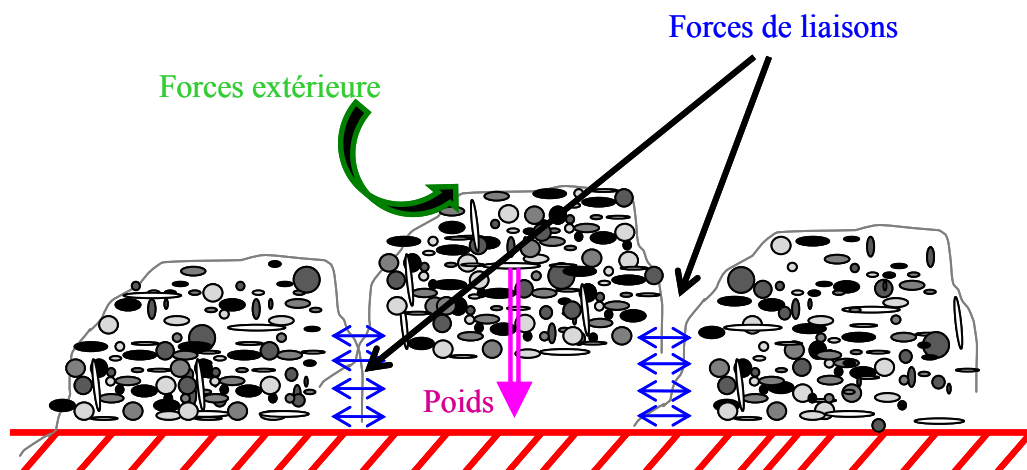


Figure I. 12 Mécanisme de l'érosion du biofilm

I.8.3. Décrochement

Le décrochement est défini comme l'érosion d'une grande partie ou la totalité du biofilm à partir de la surface (Allison *et al.*, 2000). Il est souvent évident dans les biofilms les plus épais, anciens et en particulier dans les environnements riches en éléments nutritifs. (Characklis *et al.*, 1983; Applegate *et al.*, 1991). Le décrochement est lié à l'épuisement des nutriments ou de l'oxygène et à certains changements dans l'environnement autour du biofilm (Applegate *et al.*, 1991 ; McEldowney *et al.*, 1988). Il est également possible que le décrochement (comme l'érosion) puisse être physiologiquement favorisé par l'activation ou l'induction de certaines enzymes (Boyd *et al.*, 1994).

La limitation du substrat réduit le taux de décrochement dans un biofilm de *Pseudomonas aeruginosa* en limitant le taux de croissance des cellules dans le biofilm (Peyton et Characklis, 1993) : cela réduit l'épaisseur du biofilm ce qui permet une meilleure accessibilité des nutriments au fond du biofilm.

En revanche, une forte disponibilité de nutriments conduit à l'augmentation de l'épaisseur ce qui limite la diffusion des nutriments dans toute l'épaisseur du biofilm (Sawyer et Hermanowicz, 1998) et cause le décrochement, favorisé par les forces de cisaillement et par le poids excessif de la biomasse si le biofilm est vertical ou orienté vers le bas. Le décrochement nécessite une liaison forte entre les fragments du biofilm et une faible liaison de l'ensemble avec la surface. Souvent le biofilm positionné verticalement se replie sur l'autre partie du biofilm qui n'a pas subi de décrochement (Figure I.13). Entre deux événements de type décrochement, le biofilm peut avoir la possibilité de se réparer, ce qu'on appelle le « redéveloppement » (Stoodley *et al.* 1999a ; Rittmann, 1989).

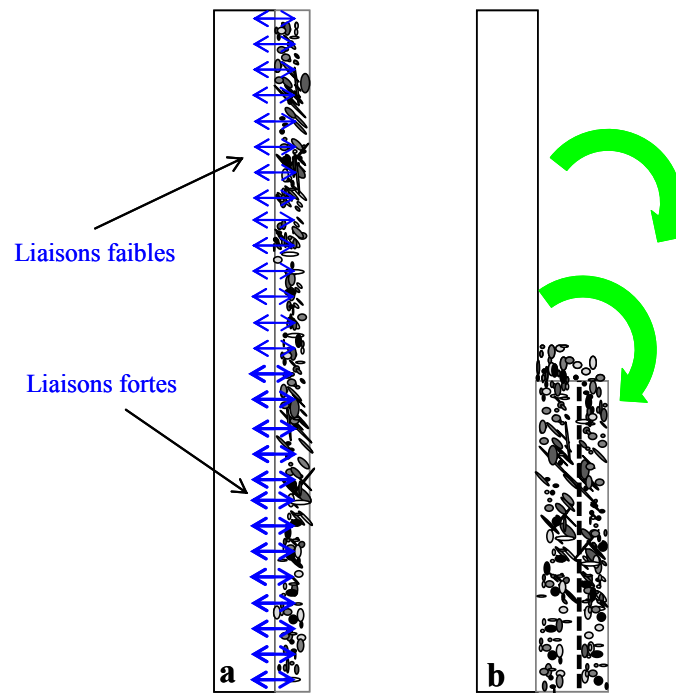


Figure I. 13 Décollement du biofilm sur une surface verticale.

I.8.4. Abrasion (frottement)

Elle est réalisée mécaniquement par la collision des particules solides suspendues dans le milieu du biofilm (Figure I.14) ou par l'intervention humaine qui provoque le détachement de biofilm à partir de la surface du substrat en petits ou gros agrégats. Ce détachement est stimulé par les forces hydrodynamiques (Chang *et al.*, 1991). L'effet d'abrasion est important dans les réacteurs biologiques à lit mobile car il affecte la performance et le rendement du réacteur.

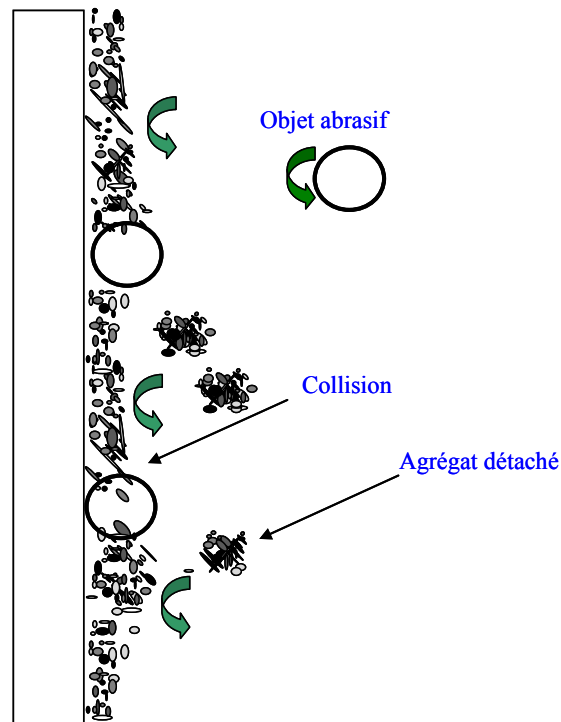


Figure I. 14 Mécanisme de l'abrasion du biofilm

I.8.5. Consommation par les prédateurs

Un biofilm présente une cible attrayante pour les prédateurs notamment les protozoaires, les escargots, les vers et les amibes. Ils sont généralement présents dans les biofilms, quand le sol, l'eau usée ou l'eau naturelle sont utilisés comme inoculum. Ils peuvent avoir un impact significatif sur la structure des biofilms et la composition des espèces. (Møller *et al.*, 1997 ; Kadouri *et al.*, 2007).

La Figure I.15 montres deux exemples des prédateurs existants dans un biofilm développé à partir d'eau usée (grossissement x 40).

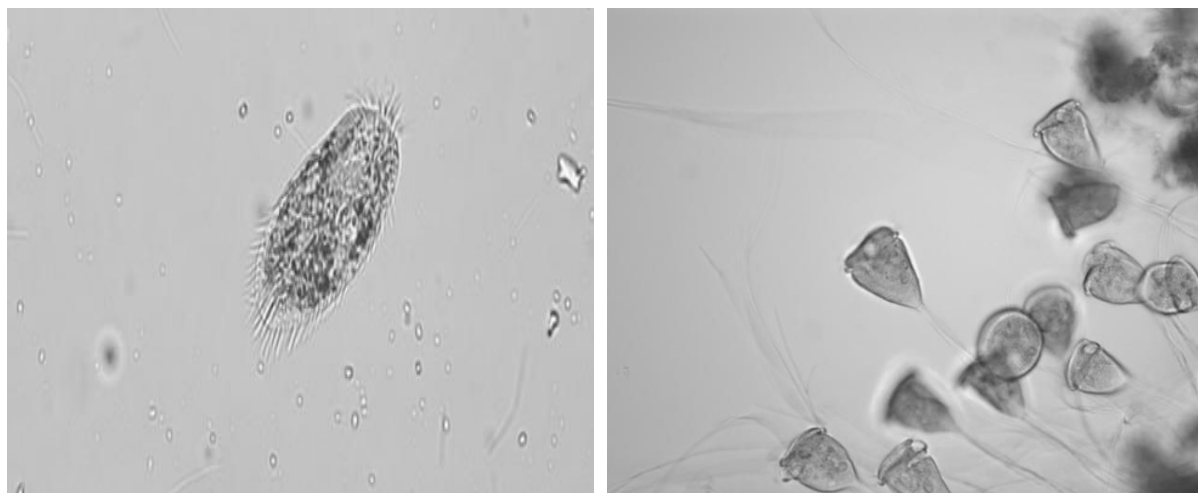
(a) *Litonotus sp*(b) *Opercularia sp*

Figure I. 15 Deux protozoaires *Litonotus sp* (a) et *Opercularia sp* (b) dans un biofilm obtenu à partir d'eau usée ; grossissement (x 40).

I.9. Effet de la topographie de la surface

Tous les types de détachement sont influencés par la structuration et la topographie de la surface.

Au niveau de la micro échelle, la structuration de la surface protège les bactéries dans les plis de la rugosité de surface (Whitehead et Verran, 2006) où elles sont plus protégées contre les forces de cisaillement. Au niveau de la macro échelle la structuration de la surface et la topographie jouent plusieurs rôles dans la formation et le détachement du biofilm :

1- Les topographies de la surface (Figure I.16) protègent le biofilm en formant des barrières face aux forces hydrodynamiques. Lorsque les forces de cisaillement augmentent dans un milieu, la macro-structuration peut diminuer de manière significative les taux de détachement du biofilm (Powell *et al.*, 1982).

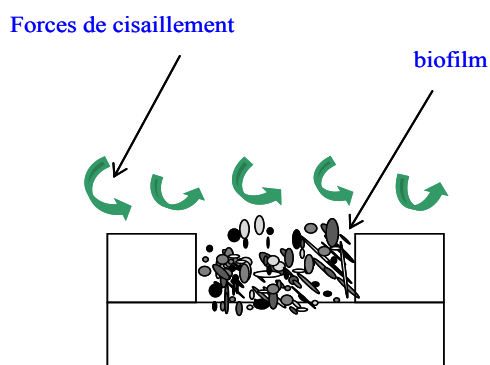


Figure I. 16 Rôle de la topographie face aux forces hydrodynamiques.

2- Les structurations horizontales diminuent l'effet du poids partiel P_n et donc total P du biofilm qui joue un rôle inverse par rapport aux forces d'adhésion partielle F_n et totale F respectivement sur la surface montrée dans la Figure I.16. La force F_n est le résultat d'une force tangentielle F_{tan} qui est parallèle à la surface et une force F_{perp} qui lui est perpendiculaire. Sur une surface lisse verticale (Figure I.17, A), la force F_{tan} a un angle de 90° avec la force F_{perp} , tandis que les deux forces F_{tan} et F_{perp} sont dans la même direction sur la structuration horizontale (l'angle est de 0°). Pour que le biofilm reste attaché sur la surface, la force F_n sur la surface lisse verticale doit être $F_n \geq P_n$.

Le poids partiel est donné par l'équation (1) :

$$P_n = \frac{P_{total}}{n} \quad (1)$$

n = nombre de points sur la surface

Lorsqu'il y a un détachement partiel sur un point n causé par un stress hydrodynamique, chimique ou mécanique, la force d'adhésion F_n est égale à $F_n = 0$. Le poids P_n dans ce point se divise sur les autres points pour avoir un nouveau poids P'_n (équations 2):

$$P'_n = \frac{P_{total}}{n-1} \quad (2)$$

Si cette action se répète, on arrive à un poids $P^{m'}$ donné par l'équation (3) :

$$P^{m'}_n = \frac{P_{total}}{n-m} \quad (3)$$

Le nombre $(n-m)$, est le nombre de points qui ont une force globale d'adhésion $F_{(n-m)}$ égale au poids total du biofilm P_{total} . On appelle ce cas le cas critique. Dès qu'un point supplémentaire perd sa force d'adhésion, la valeur P_{total} devient supérieure ou égale à $F_{globale}$. Le biofilm se détache soit partiellement (détachement) soit totalement (décrochement).

Dans le cas où la surface est structurée (Figure I.17, B), une partie des forces F_n ont une résultante perpendiculaire sur la structuration horizontale. Cette résultante est toujours supérieure ou égale au poids de biofilm adhérent sur cette surface et donc même si la force F_n est inférieure à P_n , le biofilm ne détache pas à cet endroit. Grâce à la cohésion entre les parties du biofilm par les matières polymériques, le biofilm de cet endroit peut porter une partie de poids du biofilm plus loin. Cela retarde au maximum le détachement ou le décrochement du biofilm.

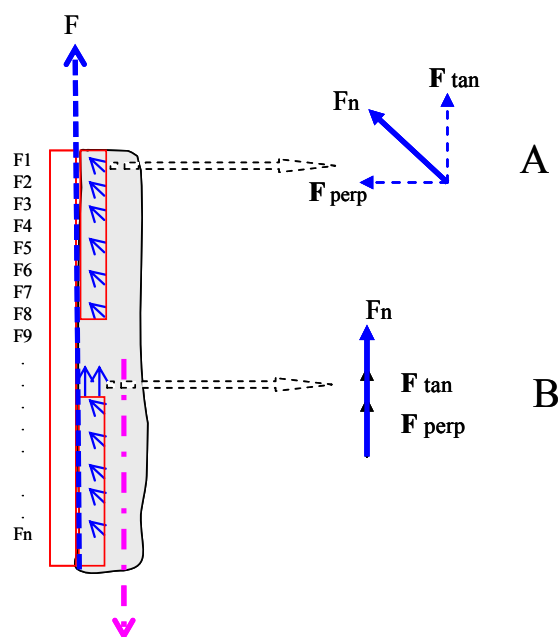


Figure I. 17 Rôle de la structuration dans le détachement/décrochement du biofilm.

3- La surface supplémentaire offerte par la structuration. La surface géométrique d'une surface égale à la surface physique du substrat plus les surfaces des structurations S_1 , S_2 , etc. (Figure I.18). Cela offre une grande surface disponible aux microorganismes pour adhérer à la matrice dans un volume disponible inférieur et, en conséquence, une cohésion plus forte du biofilm.

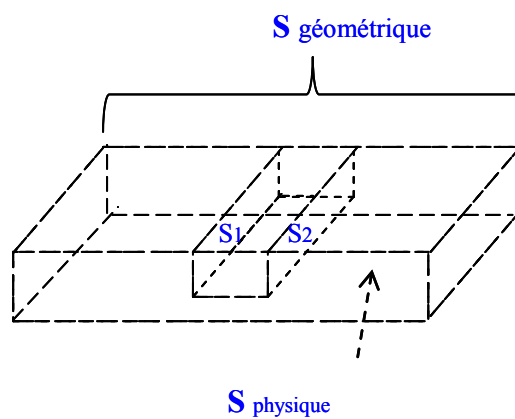


Figure I. 18 Surface physique et géométrique

I.10. Méthodes d'analyse des biofilms

Il y a plusieurs méthodes pour analyser les biofilms. Ces méthodes sont groupées en techniques destructives avec lesquelles le biofilm est détruit après l'application de ces techniques et d'autres qui sont non destructives avec lesquelles le biofilm peut continuer son développement après l'application de ces techniques. Nous présentons quelques méthodes de chaque groupe (Steven *et al.*, 2000) :

I.10.1. Techniques destructives

I.10.1.1. Le comptage direct

C'est la méthode classique, fondée sur la séparation des bactéries associées sur une surface, puis l'évaluation du nombre et le type de microorganismes présents. Pour cela, plusieurs méthodes ont été proposées :

- 1- Sur une cellule de comptage sous un microscope avec ou sans coloration (Rogers *et al.*, 1994).
- 2- La cellule de Malassez (Hématimètre) : Il s'agit d'une lame dont l'une des faces est creusée en carrés avec des dimensions connues. La suspension bactérienne est placée dans la cuvette puis recouverte d'une lamelle. Des volumes précis est donc délimités au niveau des quadrillages dans lesquels les microorganismes sont comptés au microscope avec ou sans coloration. Le nombre compté est rapporté au volume délimité.
- 3- L'ensemencement d'un volume défini d'échantillon sur milieu de culture gélosé (boîte de Pétri) permet, après incubation, de calculer la quantité de microorganismes viables cultivables des bactéries présentes dans l'échantillon analysé. Le résultat est exprimé en Unités Formant Colonie par millilitre (UFC/ml).

Plusieurs procédés peuvent être appliqués pour désagréger les microorganismes de leur biofilm comme la sonication et l'agitation avec des billes de verre.

I.10.1.2. Analyse d'ATP

Tous les microorganismes vivants contiennent de l'Adénosine TriPhosphate (ATP) qui peut être extrait et ensuite dosé avec l'enzyme Firefly-luciférase. La quantité de lumière produite par cette réaction enzymatique peut être mesurée et est liée directement à la quantité d'ATP et donc au nombre des cellules microbiennes (Blackburn *et al.*, 1989). Cependant,

l'usage de cette technique pour la quantification des biofilms dans les systèmes aquatiques peut être influencé par les métaux et les acides humiques qui interfèrent dans la réaction et qui perturbent l'interprétation des résultats. De plus, elle nécessite un prétraitement des cellules comme l'extraction au DMSO diméthylsulfoxyde.

I.10.1.3. Cristal Violet

Le cristal violet (CV) est un colorant basique qui se lie sur les bactéries et les exopolysaccharides dans la matrice extracellulaire du biofilm (Peeters *et al.*, 2008). La coloration au CV a été initialement décrite par Christensen *et al.* (1985) et a été modifiée par Stepanovic *et al.*, (2000) pour permettre la quantification de la biomasse de biofilm de faible épaisseur (âgés de quelques heures ou quelques jours). Du fait de la difficulté de la pénétration du CV dans un biofilm épais (quelques semaines voire quelques mois), cette méthode doit être modifiée pour être adaptée aux biofilms épais.

I.10.2. Techniques non destructives

I.10.2.1. Microscope optique

Le microscope est un instrument permettant d'observer visuellement les petits objets généralement invisibles à l'œil nu. L'agrandissement angulaire et la résolution optique et numérique sont des propriétés qui influencent la performance du microscope (Herman *et al.*, 1993). Le microscope a fourni une vaste gamme de méthodologies permettant de visualiser la morphologie de biofilm avec de nombreux objectifs (Henrici *et al.*, 1932). Sous le microscope il y a deux modes d'observations : la microscopie à fond clair permet d'observer des échantillons colorés. En microscopie à fond noir, l'image est créée par la diffraction de la lumière. Le microscope optique en mode fond noir a été utilisé par Lawrence *et al.*, (1989), en combinaison avec de l'analyse d'image pour quantifier la cinétique de croissance, la mobilité et le comportement des micro-organismes sur les surfaces.

I.10.2.2. Microscope confocal à balayage laser (MCBL)

Pour résoudre les défauts du microscope optique (notamment la difficulté de mise au point dans le cas d'objets épais), la surface est éclairée par un rayon laser qui balaye la surface en positionnant un diaphragme (« pinhole en anglais») devant le détecteur. Ici il n'y a pas une image complète de l'échantillon. A chaque instant donné un seul point de

l'échantillon est observé et seuls les photons provenant du plan focal passent le diaphragme et participent à la formation de l'image, d'où le nom confocal (mono focal).

La Figure I.19 montre le principe du microscope confocal à balayage laser. A chaque niveau horizontal à travers l'épaisseur du biofilm, l'appareil prend les informations et les regroupe pour former une image.

Le microscope confocal a une résolution un peu meilleure à l'horizontale qu'en vertical. Pratiquement, la meilleure résolution horizontale d'un microscope confocal est d'environ 0,2 microns, et la meilleure résolution verticale est d'environ 0,5 microns (Prasad *et al.*, 2007).

Le microscope confocal à balayage laser offre plusieurs avantages par rapport aux microscopes optiques conventionnels. Il permet de (Caldwell *et al.*, 1988):

- visualiser des structures complexes à fort grossissement.
- réaliser des coupes optiques à travers l'épaisseur de l'échantillon dans les cas où les applications de microscopie traditionnelle sont limitées, ce qui permet des reconstructions en trois dimensions.
- visualiser simultanément plusieurs marqueurs fluorescents.

Des produits fluorescents ont été adaptés à la visualisation des microorganismes des biofilms : l'acridine orange (AO) (Daley *et al.*, 1975), l'iodure de propidium, (Jones *et al.*, 1985), la rhodamine Rh 123 (Kaprelyants *et al.*, 1992) et le chlorure de 5-cyano-2',3'-ditoyl (CTC) (Rodriguez *et al.*, 1992) sont souvent utilisés. Les couleurs de fluorescence obtenues avec l'AO sont un reflet de la viabilité des cellules. Lors de la croissance, la quantité d'ADN des microorganismes est supérieure à la quantité d'ARN et la fluorescence des cellules est verte. En revanche, les cellules mortes ont peu d'ADN et un haut contenu d'ARN ; la fluorescence est dans la partie jaune/orange de la gamme.

L'ensemble des images permet de représenter la macrostructure du biofilm. Le traitement des images obtenues donne accès à la composition du biofilm en microorganismes et d'autres composants intéressants.

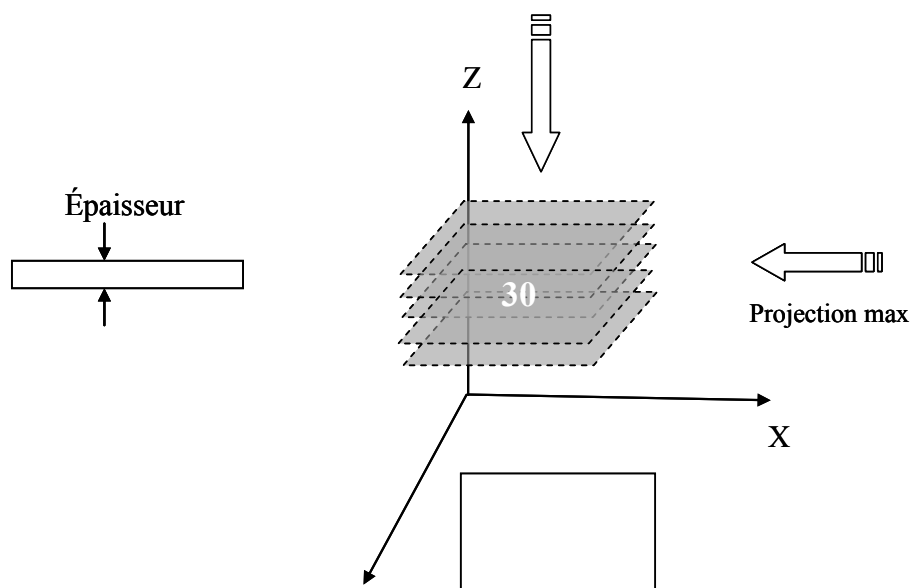
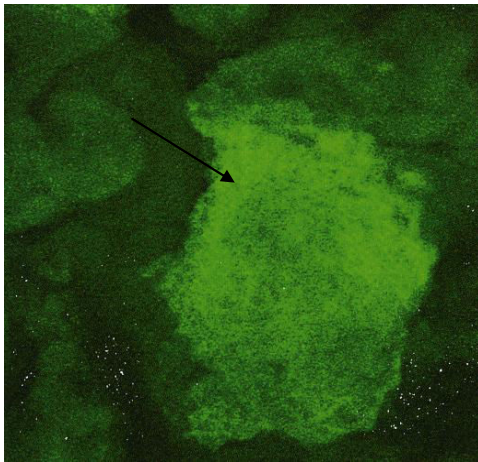


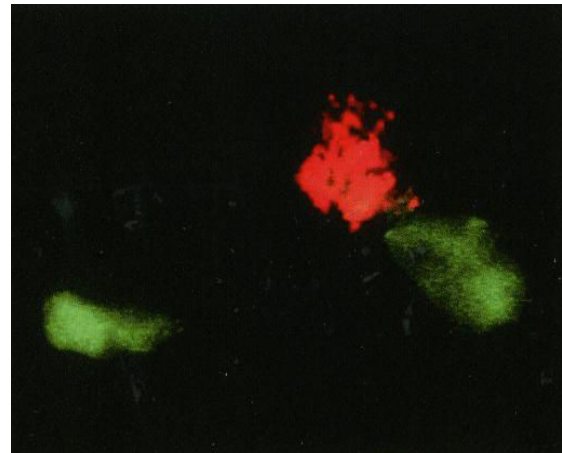
Figure I. 19 Principe de l'étude du biofilm par MCBL. Le biofilm est scanné verticalement en tranches et chaque une est composée des points focaux. L'ensemble forme une image 3D.

Il y a beaucoup d'applications du microscope confocal dans le domaine des biofilms. Mohle *et al.*, (2007) ont montré que l'épaisseur du biofilm dans les réacteurs RBC dépend de la concentration du substrat. D'autres études sont orientées vers l'identification des microorganismes et leur activité biologique (Lewandowski and Beyenal, 2007).

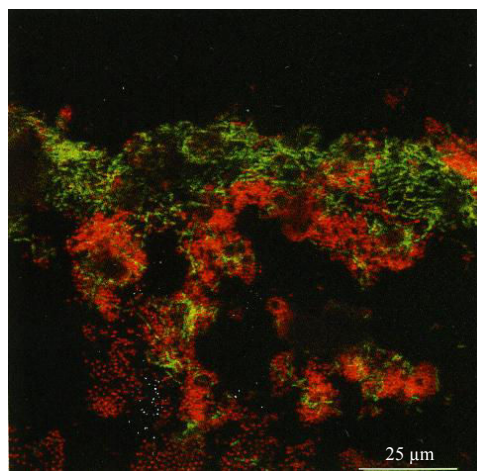
La location des microorganismes du même groupe physiologique peut être détectée par la technique d'Hybridation Fluorescente In Situ (FISH). Cette technique utilise les sondes oligonucleotides pour l'hybridation des cellules et permet de visualiser les composants dans le corps de la cellule en liant avec les ribosomes et elle est considérée comme une méthode destructive. La Figure I. 20 montre des exemples (a) : les colonies de *Staphylococcus aureus* grâce à la fluorescence de sa propre protéine (YFP ou « yellow fluorescent Protein »). (b) : la distribution de bactéries oxydant l'ammoniac et de bactéries oxydant le nitrite dans un biofilm nitrifiant en utilisant la technique FISH (c) : l'identification de bactéries *Leptothrix discophora* en couleur verte dans un biofilm comportant plusieurs espèces bactériennes.



(a) : les colonies de *Staphylococcus aureus* en couleur jeune (verte claire).



(b) : deux types des colonies des bactéries rouges (oxydant l'ammoniac) et vertes (oxydant le nitrite) montrés par la techniques FISH dans un biofilm nitrifiante.



(C) : l'identification de bactéries *Leptothrix discophora* en couleur verte dans un biofilm

Figure I. 20 Exemples de l'application de microscopie confocale sur l'étude des biofilms (a, b, c)
(Lewandowski et Beyenal, 2007).

I.10.2.3. Microscopie à Force Atomique (MFA)

C'est une forme de scanner utilisant une sonde fine (« pointe » de 10 nanomètres) pour suivre la topographie d'un échantillon et retranscrire les profils de la surface étudiée au niveau de l'atome (Goddard *et al.*, 1993). La pointe produit soit une attraction causée par la force de Van des Waals, soit une répulsion. Ces forces provoquent des déplacements de la pointe, entraînant des déviations du levier qui sont enregistrées et traitées par ordinateur pour donner le relief à la surface. Il n'est pas limité en résolution comme le microscope optique (Hyde *et al.*, 1997).

I.10.2.4. Microscopie électronique à balayage (MEB)

Elle est basée sur les interactions électrons-matière et consiste à envoyer un faisceau d'électrons et balayer la surface de l'échantillon. La réponse est la réémission de certaines particules (électrons secondaires, électrons rétrodiffusés) qui seront analysées par un détecteur permettant de reconstruire une image en haute résolution en trois dimensions (Woldringh *et al.*, 1977 ; Chang *et al.*, 1986). Les deux principaux inconvénients sont de devoir rendre l'échantillon conducteur par dépôt d'une fine couche d'or (le plus souvent) et d'opérer sous vide. Les microscopes électroniques à balayage les plus récents, dits « environnementaux » ne nécessitent pas de vide poussé (Danilatos, 1988).

I.10.2.5. Analyse d'images

L'analyse d'image est l'extraction d'informations à partir des photos prises pour l'objet étudié. C'est un outil complémentaire des méthodes de visualisation par microscopie qui permet une quantification des informations que les images contiennent. Cette méthode est largement utilisée dans notre étude et nous consacrons plus d'explications sur celle-ci.

I.11. Analyse d'images

Une image est composée de pixels (du terme anglais « **picture element** ») le plus souvent arrangés suivant des lignes et des colonnes. Le pixel est l'unité minimale d'information d'une image numérique. C'est une unité de surface permettant de définir la base d'une image. Une image numérique est définie en nombre de **points par pouce (ppp)** ou en anglais, « **dots per inch** » (**dpi**). La valeur numérique affectée au pixel est caractéristique de l'intensité lumineuse qu'il reçoit. Pour une image en niveaux de gris codée sur 8 bits, le niveau de gris varie du blanc (255) au noir (0) comme le montre la Figure I.21.

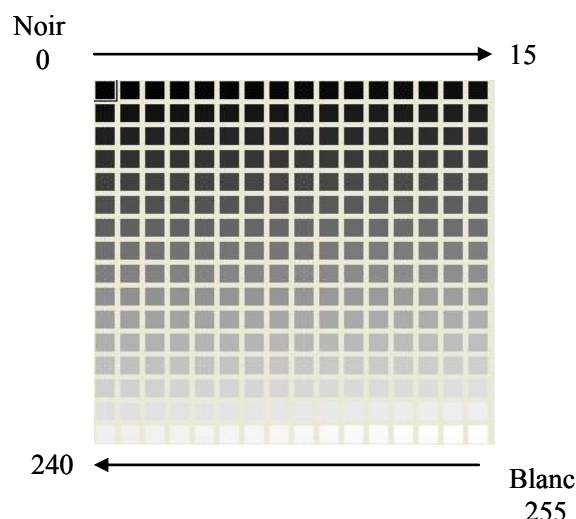


Figure I. 21 Les 256 niveaux de gris dans l'image.

L'information contenue dans une image est très riche. Pour pouvoir l'utiliser de façon simple, par exemple pour comparer deux images entre elles, pour suivre une cinétique, pour mesurer la taille et la forme d'objets particuliers sur l'image, un traitement de l'information destiné en quelque sorte à la résumer est nécessaire.

L'image est prise par un appareil avec une résolution adaptée à l'application. Par exemple un appareil photo fixé sur un microscope, un scanner ou un microscope confocal sont des moyens fréquemment utilisés (Glasbey *et al.*, 1994). Ensuite, l'image peut être binarisée et/ou traitée sans binarisation pour l'extraction d'informations quantitatives. Un traitement sans binarisation est un traitement direct reposant sur une analyse globale des niveaux de gris (analyse de texture).

I.11.1. Analyse d'images par binarisation

Cette technique repose sur la notion du seuillage. Chaque pixel de l'image est transformé en un pixel noir ou blanc suivant sa valeur de départ. Par exemple, si la valeur de niveau de gris d'un pixel est supérieure à un certain seuil on lui donne la nouvelle valeur 255 (blanc). Dans le cas contraire on lui associera 0 (noir). La valeur est déterminée selon l'importance du niveau de gris des objets d'intérêt. Avec la binarisation on perd beaucoup d'informations selon le seuil choisi. Par exemple l'image '1' dans la Figure I.22 est composée de 6 objets. Si les objets intéressants ont un niveau de gris inférieur au niveau « a » (seuil de la binarisation) on obtient l'image '2', et les images '3' et '4' de même façon si le seuil est de niveau de gris « d et e » respectivement.

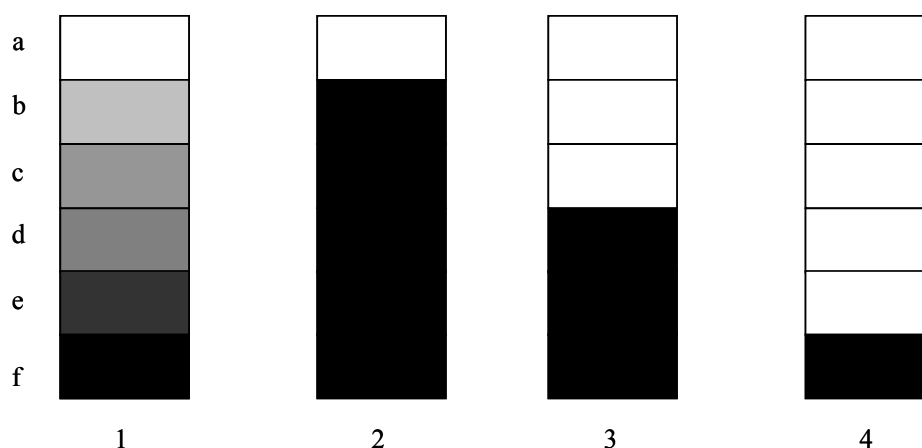


Figure I. 22 Image „1’ en niveaux de gris, images „2,3, et 4’ sont des images binarisées selon les seuils de niveau de gris « b, d et f » respectivement.

Le traitement par la binarisation a plusieurs applications, dont voici quelques exemples. Dans le domaine médical, Horgan *et al.* (1992) ont identifié la souche du paludisme en analysant les photos de gels de deux souches de parasites de la malaria (*Plasmodium falciparum*) prises par un scanner à plat puis elles ont été binarisées pour identifier la variation des spots. En microbiologie la porosité, la distribution et la taille des pores dans un échantillon d'agrégats du sol et ses caractéristiques d'activité microbienne à l'intérieur et l'extérieur des agrégats ont été identifiées à travers la binarisation des images prises à l'aide d'un microscope électronique à balayage (Glasbey *et al.*, 1991 ; Holden *et al.*, 1997). La structure spatiale des hyphes fongiques de *Trichoderma viride* se développant sur un milieu gélosé nutritif est caractérisée par la géométrie fractale à partir des images prises pour leurs milieux gélosés (Ritz et Crawford, 1990).

La biomasse, la taille, la forme des agglomérats à l'intérieur des biofilms et la distribution de ces paramètres dans l'épaisseur du biofilm lors de prises d'images à différentes hauteurs avec un microscope à balayage laser peuvent être déterminées avec ou sans binarisation (Yang et Lewandowski, 1995; Beyenal *et al.*, 1998 ; Lewandowski et Beyenal, 2007).

I.11.2. Notions de texture visuelle

Le moyen le plus simple d'une étude globale des niveaux de gris d'une image repose sur la notion d'histogramme. L'histogramme est une fonction permettant de donner la fréquence d'apparition des différents niveaux de gris qui composent l'image. Moyenne, écart-type, mode, etc. sont des grandeurs statistiques classiques qui peuvent être extraites de cet histogramme. Cependant ces paramètres ne tiennent pas compte de la localisation des

pixels. Or comme le montre la Figure I.23, deux images ayant les mêmes histogrammes peuvent présenter une apparence visuelle différente.

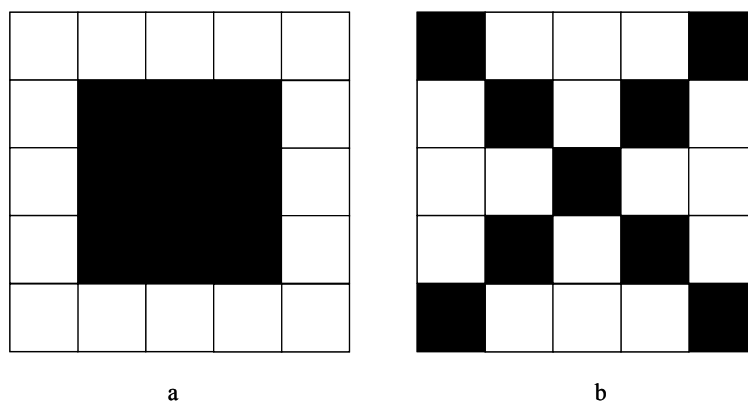


Figure I. 23 Deux mini images de 25 pixels blanc et noir mais répartis différemment

Le positionnement et la relation entre deux pixels peuvent donner des informations importantes pour étudier la texture visuelle et donc dans notre cas la structure (macro ou micro suivant la résolution de l'image) du biofilm à partir de matrices mathématiques créées en fonction des pixels. Plusieurs méthodes ont été proposées pour l'analyse d'images utilisées dans différents domaines : différence des niveaux de gris ou «Grey Level Difference Method (GLDM)», transformée de Fourier et puissance spectrale («Power Spectral Method (PSM)»), cooccurrence des niveaux de gris ou «Spatial Gray Level Dependence Matrix (SGLDM)», longueur des segments ou «Gray Level Run Length Method (GLRLM)».

L'analyse texturale d'images a beaucoup d'applications notamment dans le domaine de l'espace et de la géographie (distinction entre terres et eau dans les images satellitaires (Karina *et al.*, 2000)) et détection d'éléments linaires (comme les vallées) existants dans les zones à faible contraste par la méthode de longueur de segment (Katsuaki *et al.*, 1995). Historiquement c'est d'ailleurs pour des applications militaires d'analyse d'images aériennes que les premières méthodes ont été développées. Tuominen et Pekkarinen (2005) ont utilisé des paramètres comme l'entropie, le contraste, la corrélation, etc. calculés par la méthode SGLDM pour détecter et classifier les forêts à travers les images multi sources (proche-infrarouge, vert et rouge) de satellites. Avec les descripteurs de la méthode SGLDM comme l'entropie, l'homogénéité et la corrélation il est possible de séparer automatiquement les cristaux de quartz provenant de trois types de sable (Williams *et al.*, 1998). Les fibres de muscles d'animaux peuvent être catégorisées comme dans l'étude faite sur le rat afin de démontrer l'activité de Ca^{2+} et de classer trois types de fibres dans la section transversale de la patte selon la variation de niveau de gris des segments et de leurs longueurs (Martin et

Falloweld, 1989). Dans le domaine agroalimentaire Olivier *et al.* (2000) ont appliqué l'analyse d'images pour l'évaluation et l'identification d'échantillons de viande bovine. Ces auteurs ont appliqué les méthodes de dépendance de niveaux de gris voisins (NGLDM), GLRLM et SGLDM sur des photos prises par un appareil photo connecté à un ordinateur sous une lumière visible ou ultra visible.

A partir d'une image prise en niveaux de gris, la biomasse des bactéries se développant sur une surface est corrélée avec la densité optique. Christensen *et al.*, 1985 a confirmé que la densité optique des bactéries de type *staphylocoque* développé sur une surface lisse en plastique est fortement corrélée avec sa biomasse (coefficient corrélation = 0.9). L'opacité obtenue à partir de l'histogramme des niveaux de gris de l'image est égale à la différence de niveau de gris des images à chaque temps et le niveau de gris au temps zéro pour une biomasse développée sur une surface transparente dans un réacteur annulaire et les images sont prises par un scanner à plat (Milferstedt *et al.*, 2006).

Ces méthodes donnent accès à des informations qualitatives à travers les paramètres texturaux (comme l'entropie) et spatiaux (comme la porosité et la longueur des segments) qui permettent d'utiliser directement l'image sans passer par une binarisation (Beyenal *et al.*, 2004).

L'analyse des textures d'images permet de qualifier les caractéristiques de la structure et la morphologie du biofilm (Yang *et al.*, 2000). Milferstedt *et al.* (2007) ont précisé, à l'aide du paramètre de corrélation de la méthode SGLDM quelle devait être la surface de biofilm couverte par une image pour estimer, avec confiance, les caractéristiques structurelles. Cependant ces auteurs ont également montré que si la taille de l'image est un élément critique pour des descripteurs comme la corrélation, ce ne l'est pas pour d'autres comme le niveau de gris, car la zone des images est trop petite pour évaluer la variabilité de l'image originale du biofilm.

Les descripteurs de SGLDM ont été utiles pour qualifier la structure du biofilm sur des supports rectangulaires pendant une durée de 10 semaines. Les photographies ont été prises par un scanner à plat au lieu d'un microscope confocal (Milferstedt *et al.*, 2008). Plus récemment la méthode a été appliquée pour une plus longue période (14 semaines), sur un biofilm développé sur de disques dans un réacteur de type RBC. A partir des images acquises, les phénomènes des détachements, le développement et redéveloppement après le détachement peuvent être également montrés. Les descripteurs de SGLDM et GLRLM semblent appropriés pour évaluer quantitativement et qualitativement un changement dans la topographie de surface des médias. Compte tenu du nombre de paramètres, une analyse en

composantes principales est souvent intéressantes pour réduire le nombre de descripteurs de ces méthodes (Pons *et al.*, 2004 ; 2008 ; 2009).

Vu l'importance des méthodes SGLDM et GLRLM dans l'étude des biofilms, nous allons les détailler par la suite.

1.11.2.1. Spatial Gray Level Dependence Matrices (SGLDM)

Cette méthode est également nommée méthode de co-occurrence de niveaux de gris. Elle est basée sur l'occurrence et la probabilité de l'existence de deux pixels avec les niveaux de gris i, j séparés par une distance d avec une orientation θ : $P(i, j, d, \theta)$ (Figure I.24). En comptant la fréquence à laquelle chaque paire de niveaux de gris se produit, une matrice peut être calculée à partir d'une image numérique (Haralick *et al.*, 1973).

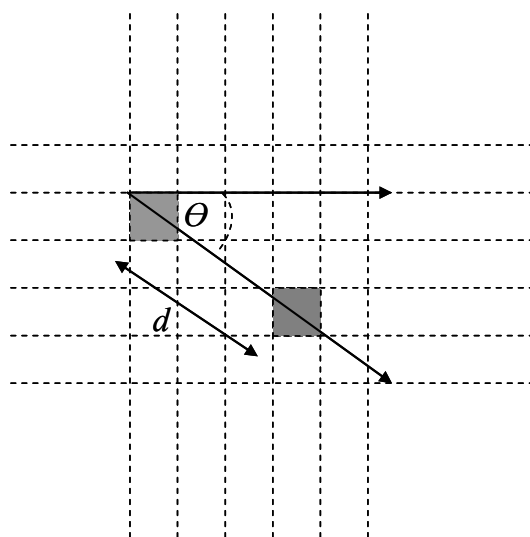


Figure I. 24 Définition de la méthode de co-occurrence de niveaux de gris, deux pixels ont le même niveau de gris séparés par une distance d et orientés par l'angle θ .

La Figure I.25 montre le principe de la construction de la matrice à partir d'une image J de dimensions 3×3 pixels. Les pixels blancs ont un niveau de gris \underline{j} et les pixels foncés ont le niveau de gris $'i'$. La flèche commence d'un pixel et finit à l'autre voisin ($d=1$ pixel) dans la direction horizontale $\theta=0^\circ$ et verticale $\theta=90^\circ$. Dans le cas où $\theta=0^\circ$ nous avons une paire de pixels qui commencent au niveau de gris \underline{j} et finit au niveau de gris $'i'$; 3 paires qui commencent de $'j'$ et finissent au $'i'$; 2 paires commencent de $'i'$ et finissent au $'j'$ et 0 paire qui commence de $'j'$ et finissent au $'j'$ etc. De même façon, une deuxième matrice peut être construite pour la direction $\theta=90^\circ$.

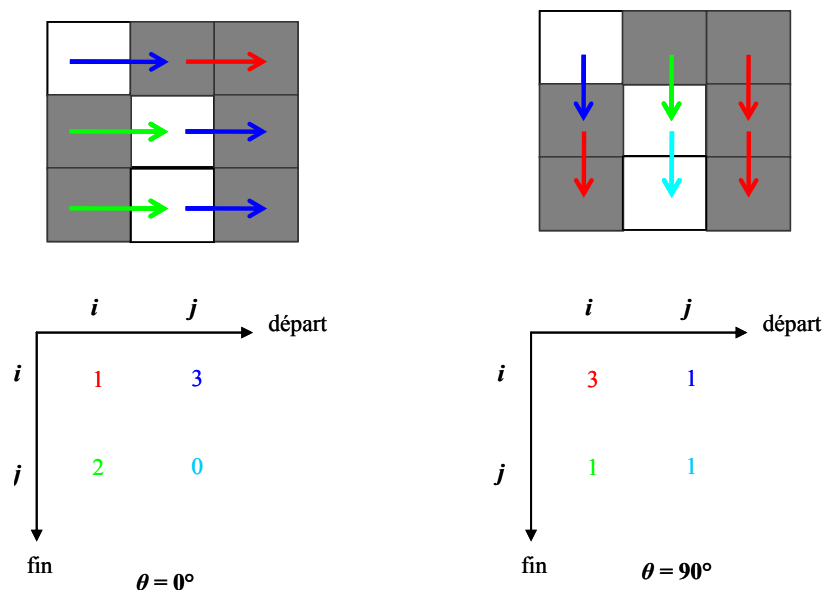


Figure I. 25 La construction de la matrice selon le positionnement des pixels et ses niveaux de gris dans l'image dans deux directions.

La matrice est normalisée par le nombre total d'occurrences par l'équation (1):

$$p(i, j, d, \theta) = \frac{P(i, j, d, \theta)}{\sum_{i=1}^{Ng} \sum_{j=1}^{Ng} P(i, j, d, \theta)} \quad (1)$$

A partir de cette équation, des descripteurs ont été proposés par Haralick *et al.*, (1973). Nous en présentons quelques uns :

- *Energie (ENG)*

Selon Beyenal *et al.*, 2004, l'énergie mesure la régularité des pixels et elle est sensible à l'orientation des pixels et de la similitude de leurs formes. Les valeurs les plus petites d'énergie indiquent des modes de regroupements de pixels fréquents et répétés. Par contre, une énergie plus grande indique que l'image a une structure plus homogène. L'énergie est calculée par l'équation (2) :

$$Energie = \sum_{i=1}^{Ng} \sum_{j=1}^{Ng} p(i, j)^2 \quad (2)$$

- *Homogénéité (HOM)*

L'homogénéité mesure la similitude des clusters spatiaux des pixels dans l'image. Une homogénéité plus grande indique une image à structure plus homogène. L'homogénéité est donnée par l'équation (3):

$$\text{Homogénéité} = \sum_{i=1}^{Ng} \sum_{j=1}^{Ng} \frac{P(i, j)}{1 + (i - j)^2} \quad (3)$$

- *Texte Entropie (TE)*

$$\text{Entropie Texturale} = - \sum_{i=1}^{Ng} \sum_{j=1}^{Ng} p(i, j) \text{Ln}(p(i, j)) \quad (4)$$

- *Corrélation (COR)*

La corrélation évalue la similarité de niveaux de gris des pixels étudiés dans chaque matrice. Le coefficient de corrélation est compris entre 0 et +1. Plus il augmente plus la corrélation est meilleure.

$r = +1$: corrélation positive parfaite (les niveaux de gris des pixels sont similaires)

$r = 0$: absence totale de corrélation (les niveaux de gris des pixels ne sont pas corrélés).

La corrélation est donnée par l'équation suivante (5):

$$\text{Correlation} = \frac{\sum_{i=1}^{Ng} \sum_{j=1}^{Ng} (ij)P(i, j) - \mu_i \mu_j}{\sigma_i \sigma_j} \quad (5)$$

- *Contraste (CONT)*

Le contraste est une propriété essentielle d'une image qui indique la différence entre les parties claires et foncées d'une image. Dans ce cas présent, il mesure l'intensité relative entre un pixel et son voisin ou le fond d'image. La valeur du contraste varie de zéro (0) jusqu'à q^2 , où q est la longueur de la diagonale de la matrice de co-occurrence. Le contraste pour une image qui a un seul pixel est égale à zéro (Chris *et al.*, 2008). Il est donné par l'équation (6):

$$\text{Contraste} = \sum_{k=0}^{Ng-1} k^2 \sum_{i=1}^{Ng} \sum_{j=1}^{Ng} P(i, j) \quad (6)$$

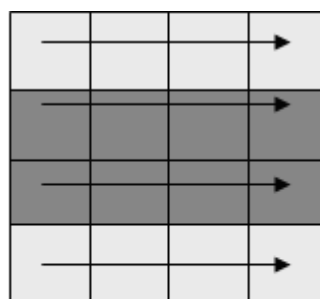
- *Inertie locale (IN)*

Ce paramètre donne une idée sur le niveau du regroupement de la surface et l'intensité de l'image. Une valeur maximale est obtenue lorsque la matrice a de grandes valeurs situées loin de la diagonale principale, et une valeur minimale lorsqu'ils situent sur ou près de la diagonale principale (Aldrich et Desai, 1994). L'inertie est donnée par l'équation (7):

$$Inertie(IN) = \sum_{i=1}^{Ng} \sum_{j=1}^{Ng} p(i-j)^2 \cdot p(i, j) \quad (7)$$

I.11.2.2. Gray Level Run Length Method (GLRLM)

Cette méthode qui est également nommée la méthode de longueurs des segments est une approche statistique basée sur le calcul de nombre de segments de pixels ayant le même niveau gris (Galloway, 1975). Les éléments de la matrice $R(i, j | \theta)$ sont le nombre de pixels j dans un segment orienté suivant la direction θ avec le niveau de gris i . Comme dans la méthode SGLDM, on obtient une matrice de texture selon l'angle θ comme le montre la Figure I.26 avec l'orientation ($\theta = 0^\circ$).



$\theta = 0^\circ$

Figure I. 26 Les segments selon des niveaux de gris dans l'image avec la direction $\theta = 0^\circ$.

Galloway (1975) a proposé plusieurs paramètres pour chaque possibilité de la matrice $R(\theta) = [r'(i, j | \theta)]$, nous en présentons quelques uns :

- Short Run Emphasis SRE:

Il indique le nombre de petits segments par rapport au nombre total de segments (équation 1).

$$SRE(f(\theta)) = \frac{1}{TR} \sum_{i=0}^{Ng-1} \sum_{j=1}^{NR} \frac{r'(i, j | \theta)}{j^2} \quad (1)$$

- Long Run Emphasis LRE:

Il indique le nombre de longs segments par rapport aux nombre total des segments (équation 2).

$$LRE(f(\theta)) = \frac{1}{TR} \sum_{i=0}^{Ng-1} \sum_{j=1}^{NR} j^2 r'(i, j | \theta) \quad (2)$$

- Gray level Nonuniformity GRN: (équation 3).

$$GRN(f(\theta)) = \frac{1}{TR} \sum_{i=0}^{Ng-1} \left[\sum_{j=1}^{NR} r'(i, j | \theta) \right]^2 \quad (3)$$

- Run Length Nonuniformity RLN: (équation 4).

$$RLN(f(\theta)) = \frac{1}{TR} \sum_{j=1}^{NR} \left[\sum_{i=0}^{Ng-1} r'(i, j | \theta) \right]^2 \quad (4)$$

- Run Pourcentage RP: le pourcentage des segments totaux : (équation 5).

$$RP(f(\theta)) = \frac{TR}{TP} = \frac{1}{TP} \sum_{i=0}^{Ng-1} \sum_{j=1}^{NR} r'(i, j | \theta) \quad (5)$$

TR est donné par l'équation 6 :

$$TR = \sum_{i=0}^{Ng-1} \sum_{j=1}^{NR} r'(i, j | \theta) \quad (6)$$

Où :

TR= Le nombre total de segments dans l'image

Ng = Le nombre de niveau gris.

NR= Le nombre maximal de segments (Run Length) dans la matrice étudiée.

TP= Le nombre de pixel dans la photo.

Les paramètres récoltés avec l'analyse de texture comme les méthodes présentées (SGLDM et GLRLM) peuvent être simplement utilisés comme des indicateurs qualitatifs pour la caractérisation du biofilm. Chaque paramètre représente un aspect de la texture visuelle sans donner une idée complète. Comme ils sont nombreux (même si leur calcul permet de résumer en quelque sorte la grande quantité d'informations contenue dans une image) avoir une idée d'ensemble, par exemple pour comparer deux textures, reste parfois difficile. Une combinaison de l'ensemble des paramètres par analyse en composantes principales est souvent proposée.

I.11.3. Modélisation

L'étude de biofilms a conduit à avoir une vision générale sur sa macrostructure et sa microstructure et a servi finalement pour construire des modèles qui représentent les différents phénomènes décrits lors du développement des biofilms.

Des modèles de biofilm ont été proposés pour simuler l'évolution des paramètres comme l'oxygène, l'ammonium, les nitrates, pH, etc. (Rittmann and McCarty 1980) et pour comprendre les différents phénomènes (Wanner *et al.*, 2006). Comme il est difficile de regrouper tout les variables du biofilm dans un seul modèle, des suppositions et des hypothèses sont proposées pour chaque modèle afin de réduire ou éliminer certains problèmes. Par exemple le modèle proposé par Morgenroth (2000) est basé sur un état d'épaisseur fixe au cours du temps.

Le modèle empirique sert à caractériser les variables hydrodynamiques, les vitesses de transfert de matière, les canaux et les vides, l'activité microbienne, la concentration et la distribution de biomasse, les agglomérations et la morphologie du biofilm. Le modèle mathématique nécessite la compréhension du model empirique, les variables et ses équations, les paramètres et ses effets, les propriétés de son environnement, etc. Il sert à prédire comment favoriser les biofilms quand ceux-ci sont utiles ou comment, à l'inverse, les défavoriser. Le modèle conceptuel (pris de la réalité) du biofilm sert à interpréter les résultats empiriques et à valider le model mathématique (Lewandowski et Beyenal, 2007).

Pour construire un modèle conceptuel, le biofilm en 3D doit être découpé en tranches, le nombre de tranches (stack) exprimant l'épaisseur du biofilm. Cela est réalisable à l'aide de microscopes confocaux. Heydorn *et al.*, (2000) ont calculé les paramètres nécessaires en utilisant le logiciel COMSTAT qui exige le seuillage des photographies et donc la perte d'informations ce qui peut amener à des conclusions différentes suivant le seuil choisi (Figure 28, A). Beyenal *et al.*, (2004) ont développé ce modèle à travers l'analyse des paramètres de textures d'images (homogénéité, énergie, contraste, etc.) en se basant sur la variation de niveaux de gris de l'image comme le symbolise la Figure I. 27. A partir des matrices obtenues pour chaque image sur différents niveaux de profondeur, une vision spatiale peut être construite (Figure I. 28, B).

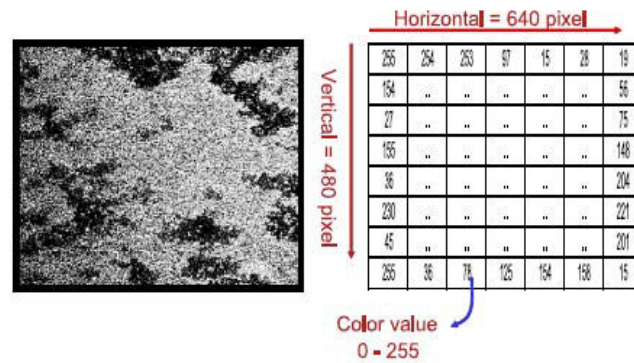


Figure I. 27 L'image du biofilm à gauche est transformée en matrice codée par des chiffres (à droite) qui montrent le niveaux de gris de l'image du biofilm présenté (Beyenal *et al.*, 2004).

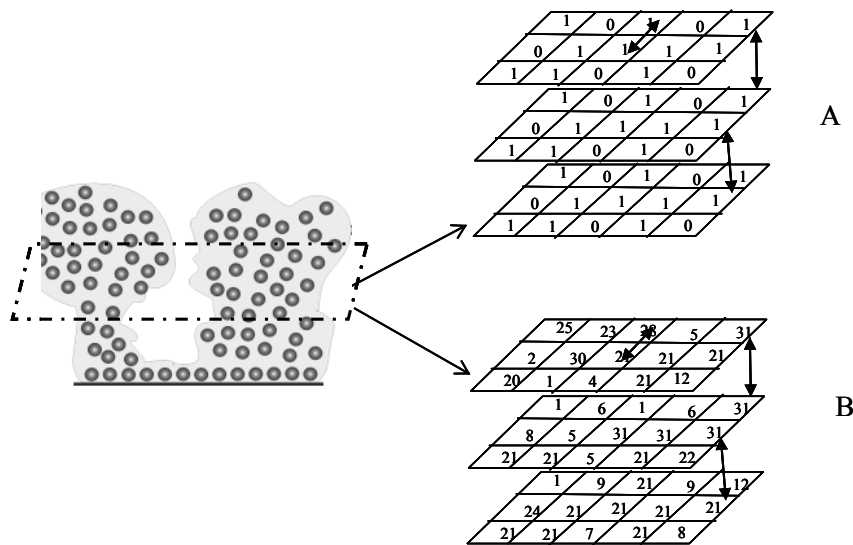


Figure I. 28 Principe de la modélisation par analyse d'images par la méthode de seuillage (A) et la méthode de variation de niveaux de gris (B).

La complexité des modèles du biofilm dépend de la dimension prise en compte:

- modèle mono-dimensionnel (1D) :

Dans ce modèle, le biofilm est représenté comme une barrière (ligne) parallèle au substrat. Tous les paramètres mesurés sont considérés comme deux concentrations hors et dans le biofilm, les gradients des concentrations étant perpendiculaires au substrat (Figure I 29, a) (Wanner et Reichert, 1996). Le modèle AQUASIM est un exemple de ce type des modèles pour l'identification et la simulation des systèmes aquatiques avec un ou plusieurs substrats et un ou multi espèces (Reichert, 1998 ; Wanner et Morgenroth, 2004). Rittmann et McCarty (1980) ont introduit le développement et la perte de la biomasse du biofilm dans leur modèle 1D en se basant sur l'équation de bilan de la biomasse détachée et de la biomasse produite (Rittmann et McCarty 1980).

– modèle bidimensionnel (2D):

Le biofilm peut être étudié avec deux de ses trois dimensions : la longueur et la largeur permettent de représenter la répartition des composants du biofilm et ses évolutions comme les bactéries, les EPS, le phénomène de Quorum Sensing et les forces hydrodynamiques au cours du temps et pour une ou de différentes espèces. Le modèle peut être également basé sur la longueur ou la largeur et l'épaisseur pour étudier l'effet hydrodynamique, la diffusion et l'évolution de l'épaisseur au cours du temps (Eberl *et al.*, 2001 ; Laspidou et Rittmann, 2004) (Figure I 29, b). Par exemple, Wanner et Gujer, (1986) a proposé le modèle classique du biofilm appelé « BIOSIM ». Plus tard Kreft *et al.*, ont développé un modèle 2D de biofilms nitrifiants pour prédire les structures du biofilm et la distance de diffusion (Kreft *et al.*, 2001).

– Modèle tridimensionnel (3D):

Le biofilm est modélisé selon ses trois dimensions (Figure I 29, c). Toutes les composantes peuvent varier dans l'espace multidimensionnel, ainsi que le temps. Ces modèles peuvent générer des structures complexes et évaluer l'ensemble des paramètres biologiques (concentration des matières organiques et la diffusion par exemple) et la répartition des particules comme les microorganismes et les EPS et donc la biomasse au cours du temps.

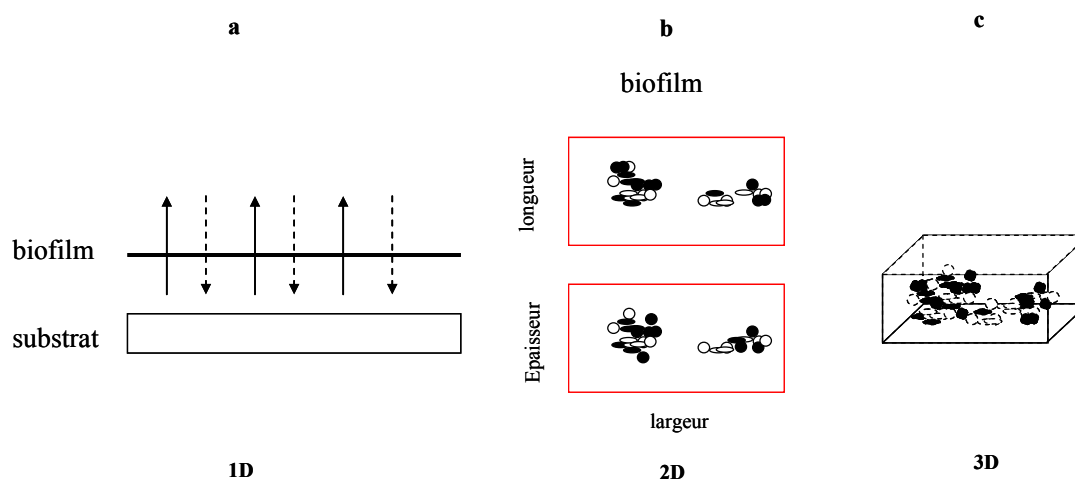


Figure I. 29 Trois possibilités pour un modèle du biofilm

Picioreanu (1998, 2000b, 2001) a été le premier à développer un modèle quantitatif pour le développement du biofilm et l'évolution de la structure. Il a été le premier également à intégrer le détachement aux forces hydrodynamiques dans le modèle. Plus récemment, Laspidou et Rittmann (2004) ont estimé la distribution spatiale des particules grâce à des automates cellulaires représentant un type de modèle discret adapté à la modélisation des systèmes hétérogènes (Laspidou et Rittmann, 2004). Le modèle automate de type UMCCA

décrit plusieurs paramètres: la concentration et la diffusion des produits organiques, la biomasse et sa répartition en bas et en surface du biofilm, la densité microbienne et l'hétérogénéité dans la direction verticales et latérale, l'épaisseur et l'identification des espèces au fond du biofilm (Chrysi *et al.*, 2004).

Le suivi de la biomasse du biofilm par une méthode non destructive permet de quantifier l'évolution de la biomasse au cours du temps et donc construire un modèle. Par la mesure de l'opacité, il est possible de mesurer la biomasse sur une longue période de temps. Les courbes de développement produites distinguent quatre phases : la phase de latence, la phase de développement, la phase stationnaire et la phase du détachement dans les réacteurs de type RBC. L'intérêt de cette méthode est que l'écart-type de l'opacité donne accès à l'hétérogénéité de la surface du biofilm (plus le biofilm est mature plus la surface du biofilm est hétérogène) et que les détachements peuvent être facilement détectés via l'augmentation massive de l'écart-type de l'opacité (Pons *et al.*, 2009). L'analyse des textures offre un avantage supplémentaire à partir des images prises par le scanner à plat, les paramètres d'homogénéité, l'énergie, le contraste, la corrélation, l'inertie, etc. (extraits de la méthode SGLDM) et les paramètres de SRE, LRE, RP, etc. (extraits de la méthode GLRLM) peuvent apporter des informations sur la macrostructure du biofilm et détecter les vides du biofilm sur la surface du substrat et visualiser le développement et le redéveloppement après le détachement du biofilm. Ces paramètres peuvent être réduits en deux composantes principales par une simple transformation (Pons *et al.*, 2008 ; 2009). Dans ce cas un modèle 3D quantitatif (par l'opacité) et qualitatif (par SGLDM et GLRLM) pourrait devenir possible.

I.12. Conclusion de la recherche bibliographique

Les biofilms se développent de la même façon quelque soit leur environnement et leur communauté microbienne. Si leur présence est souvent source de dysfonctionnement ou de problèmes sanitaires, leurs avantages sont exploités dans différents domaines industriels et notamment le traitement biologique des eaux résiduaires.

L'analyse de la bibliographie montre que le développement du biofilm est souvent étudié sur des durées courtes (de quelques heures à quelques dizaines de jours). Les biofilms étudiés ne sont pas assez matures pour avoir une vision complète sur leur développement, leur activité biologique et les phénomènes de détachement.

Les techniques destructives utilisées pour étudier les biofilms apportent peu d'informations sur leur formation et ne permettent pas d'étudier le même biofilm sur une longue durée.

Quant aux techniques non destructives basées sur la microscopie confocale ou électronique, elles sont majoritairement qualitatives, coûteuses et exigent des appareils très performants. Cela rend l'étude du biofilm dans les réacteurs biologiques limitée et notamment dans les réacteurs à supports.

L'analyse d'images apporte à la fois des informations quantitatives et qualitatives, faciles à réaliser avec d'appareils et de logiciels simples. De plus, avec l'analyse de la texture on estime obtenir plus d'information concernant la topographie et les phénomènes des détachements.

I.13. Objectifs

A partir de l'examen de la bibliographie, notre recherche s'est axée sur les objectifs suivants :

- 1- Valider la méthode de mesure d'opacité pour le suivi de la cinétique de développement du biofilm avec d'autres méthodes destructives et non destructives.
- 2- Etudier le développement et les phénomènes de détachements du biofilm dans les réacteurs à disque tournants et à lit fixe sur de longues durées.
- 3- Etudier l'effet de stress sur la formation, le détachement et l'activité du biofilm. Deux types de stress ont été étudiés :
 - a- stress chimique : l'effet d'un antibiotique (érythromycine).
 - b- stress physique : vitesse de la rotation.
- 4- Etudier l'effet de la structuration sur le développement du biofilm dans les réacteurs à disques tournants.
- 5- Etudier la capacité de certaines bactéries autotrophes à former un biofilm dans un milieu d'eau synthétique.

II. CHAPITRE II

MATERIELS ET METHODES

Ce chapitre est divisé en deux parties. Dans la première partie nous présenterons les différents réacteurs utilisés dans cette étude. Un réacteur a été spécifiquement conçu pour l'étude du développement du biofilm dans les réacteurs à lit fixe. Un deuxième est une modification du réacteur RBC pour comparer les méthodes d'étude du biofilm.

La deuxième partie décrit les méthodes analytiques mises en œuvre pour analyser les échantillons et les protocoles, le mode de préparation des échantillons adaptés à chaque type de mesure.

II.1. Réacteurs

II.1.1. Réacteur à disque tournant

Deux réacteurs à disques tournants ont été utilisés, l'un pour les vitesses lentes (< 10 rpm) et le second pour les vitesses rapides (> 30 rpm) (Figure II.1). Dans les deux cas un moteur à vitesse variable est connecté à un réducteur de vitesse. La cuve a un volume de 2.5 litres et elle possède une sortie permettant de conserver un volume de liquide constant. L'axe de rotation comporte au maximum 10 disques, d'un diamètre maximal de 150 mm, d'épaisseur 0.4 mm et espacés de 0.5 cm. Le démontage de l'axe est suffisamment aisé pour que les disques puissent être retirés de l'axe sans problème chaque jour. Des espaceurs sont mis en place si nécessaire lorsque qu'un nombre plus réduit de disques est mis en œuvre. Les disques de 100 mm sont immergés verticalement dans le milieu à 33 % alors que les disques de diamètre 150 mm le sont à 42% de leur diamètre. Chaque réacteur possède un couvercle dans lequel des orifices ont été disposés pour permettre l'alimentation en air et milieu nutritif. L'aération de surface est fournie grâce à une pompe à air (débit = 1 L/min). Une pompe péristaltique permet l'alimentation en milieu nutritif. Le débit d'alimentation a été fixé à 2.5 L/jour (temps de passage (τ) est estimé à 1 jour). Les disques utilisés sont en Plexiglas. Ils sont lisses ou structurés. Pour structurer la surface, des rainures d'une profondeur de 2 mm ont été creusées grâce à une fraiseuse. Deux types de rainures ont été testés: des rainures en forme de cercles concentriques ou en forme de toile d'araignée. Figure II. 2 montre une photo du réacteur à disque tournant avec cinq disques structurés sur lesquels le biofilm se développe.

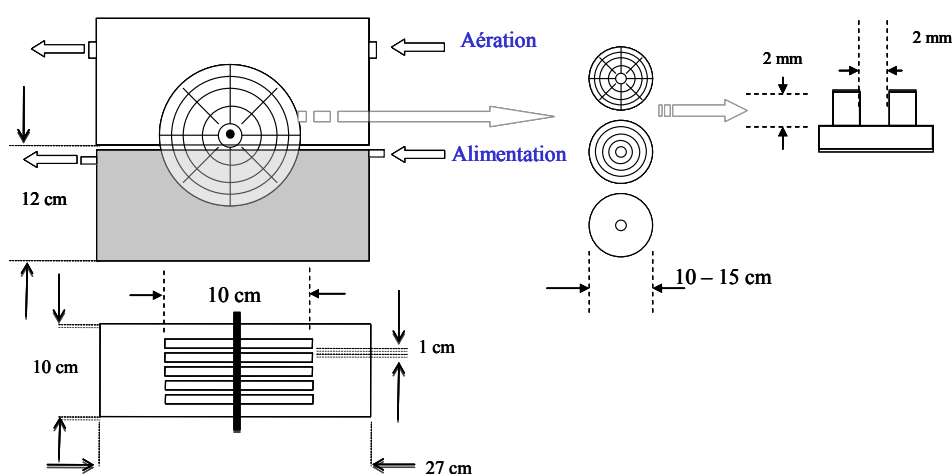


Figure II. 1 Réacteur à disques tournants (vue latérale et vue du dessus) et structuration des disques.

Tableau II. 1 Liste des expériences réalisées avec les réacteurs à disques tournants

Expérience	Mode opératoire
Run 10	Cinq disques (D = 100 mm) à structure « araignée » mis en place l'un après l'autre (avec un décalage de huit jours). Ecartement des disques : 10 mm ; alimentation en eau usée ; vitesse $V_1=4$ rpm, débit : 2.5L/ jour ($\tau=1$), température = 20 °C.
Run 11	Cinq disques (D = 100 mm) lisses mis en place simultanément. Ecartement des disques : 10 mm ; alimentation en eau usée ; vitesse $V_1= 4$ rpm ; débit : 2.5 L/ jour ($\tau=1$); température = 20 °C.
Run 12	Cinq disques (D = 100 mm) mis en place simultanément : 1 lisse, 2 à structure « araignée », 2 à structure concentrique. Ecartement des disques : 10 mm ; alimentation en eau usée ; vitesse V_1
Run 14	Quatre disques (D = 150 mm) mis en place simultanément : 2 lisses, 2 à structure concentrique. Ecartement des disques : 10 mm ; alimentation en eau usée; vitesse $V_1 = 4$ rpm
Run 16	Réacteur 1 (vitesse V_1 puis V_2 à partir du jour 55) : cinq disques (D = 100 mm) mis en place simultanément (2 lisses, 1 à structure araignée, 2 à structure concentrique), écartement des disques : 10 mm ; Réacteur 2 (vitesse V_2 puis V_1 à partir du jour 55 : même configuration de disques ; alimentation en eau usée jusqu'au jour 17 puis en substrat synthétique
Run 19	vitesse $V= 40$ rpm : dix disques lisses (D = 100 mm) mis en place simultanément, écartement des disques : 5 mm ; Alimentation en substrat synthétique : (200 g Viandox, 10 g NH_4Cl , 0.5 g Na_2HPO_4 , 12 g Saccharose et 20 g sang séché)/L.

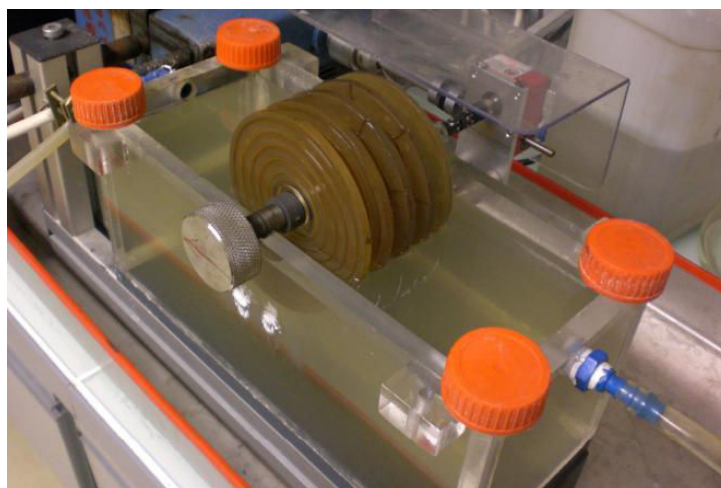


Figure II. 2 Réacteur à disque tournant avec cinq disques structurés sur lesquels le biofilm se développe.

II.1.2. Réacteur « moulin »

Ce réacteur a une forme de moulin à vent et comporte 32 lames de verre. Il a été conçu spécialement pour étudier la cinétique de développement du biofilm dans un réacteur à disque tournant. Le système permet de suivre chaque jour le niveau de gris, la biomasse, le

nombre des microorganismes et l'épaisseur de biofilm en prélevant une lame de verre. Le remplacement des lames permet de ne pas diminuer la surface disponible pour le développement du biofilm ni de diminuer le biofilm dans le réacteur ($1/32 = 3\%$ maximum) ce qui présente un avantage par rapport au réacteur avec les disques.

Le réacteur a un volume de 2.5 litres et est présenté dans la Figure II.4. Un moteur à vitesse fixe à 2 rpm assure la rotation du système de lames dans le réacteur. L'axe peut porter jusqu'à 32 lames de verre par groupe de huit lames. Les lames utilisées ont une surface lisse (26 mm x 76 mm x 1 mm). L'espacement entre les lames dans chaque groupe est de 2 mm comme cela est montré dans la Figure II. 3. Le système est alimenté avec un substrat synthétique par une pompe péristaltique réglée à 2.5 L/ jour ($\tau=1$).

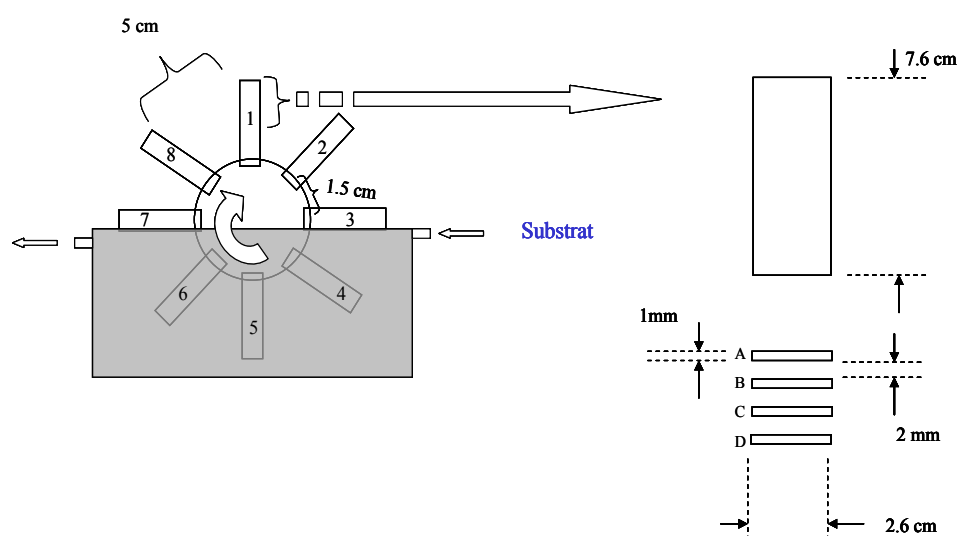


Figure II. 3 Réacteur « moulin » avec le positionnement des lames, les mesures et l'ordre d'échantillonnage.

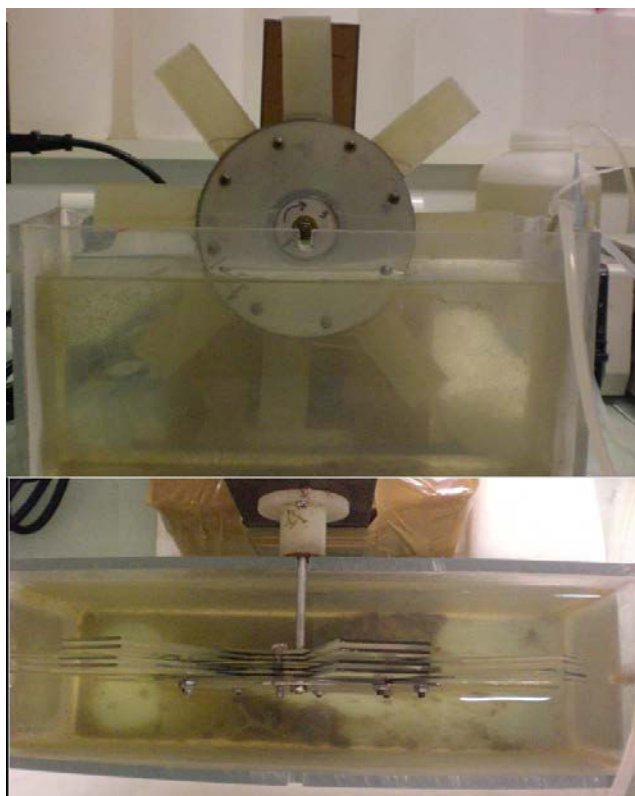


Figure II. 4 Vue latérale et du dessus du réacteur « moulin ».

II.1.3. Réacteur à lit fixe multi étagés

Pour contrecarrer les difficultés rencontrées lors de l'étude du biofilm dans les réacteurs à lit fixe, un réacteur a été spécialement conçu pour faciliter le problème du démontage des supports dans le réacteur lors du prélèvement. La diminution de la surface totale disponible du réacteur dû à l'échantillonnage des supports et la destruction de biofilm développé sur les supports ont également été minimisés.

Le réacteur est composé de deux parties : le corps principal et le réservoir secondaire. Le corps principal est fabriqué en polyéthylène transparent avec les dimensions suivantes: 120 mm de diamètre, 550 mm de hauteur et 4 mm d'épaisseur. Deux entrées en bas et deux sorties en haut sont disponibles. Dans le haut un couvercle circulaire fixé par des vis et étanchéifié par un joint ferme le réacteur. Il permet un démontage et un remontage aisée à chaque fois que l'échantillonnage est fait.

Dans le corps principal, se trouve un système à étages permettant de maintenir en place les supports à biofilm. Ce système est composé de sept étages montés en série l'un sur l'autre d'une façon fixe et maintenus sur un axe au centre des étages. Chaque étage peut contenir 40 supports (lames de verre ou autre) qui glissent dans des rainures. Cela permet de les enlever et de les remplacer facilement lors du prélèvement de l'échantillon. Les lames de chaque

étage sont placées parallèlement l'une avec l'autre et perpendiculairement avec celles de l'étage suivant pour éviter au maximum des court-circuits dans l'alimentation. L'ensemble des étages peut être enlevé totalement du réacteur par le haut de celui-ci. Le réservoir annexe est un cylindre de 1 litre en polyéthylène ouvert dans sa partie supérieure dans lequel l'aération, l'alimentation en milieu frais, la recirculation du milieu de culture ont lieu. Une surverse permet l'évacuation du liquide. Ce réacteur peut être thermostaté grâce à une double enveloppe autour du corps principal. Les supports à biofilm sont des lames de 76 mm x 26 mm x 1 mm ce qui correspond à une surface de 39.5 cm² par lame, de 1581 cm² par étage et à une surface active globale du réacteur de 1.1 m².

Le volume interstitiel du corps principal avec les supports est de 3,7 L ce qui donne un volume utile de 80 % du volume total. Le volume accessible total avec les deux corps du réacteur est 4.6 litres. La Figure II.5 montre le réacteur avec ses éléments et la Figure II.6 en présente une photographie.

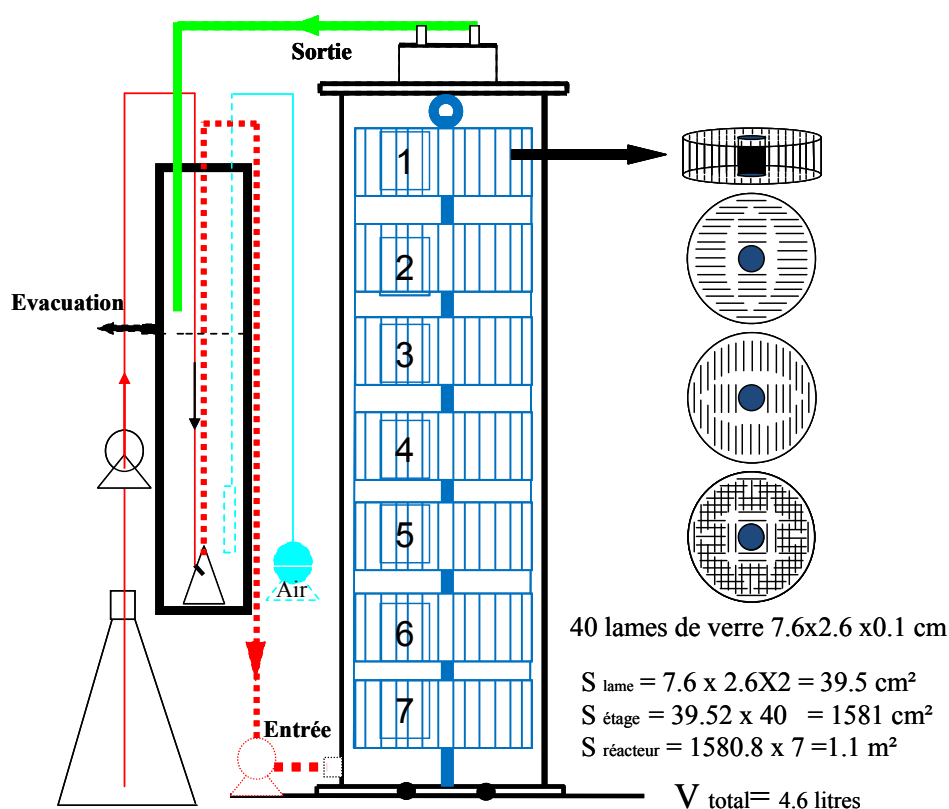


Figure II. 5 Schéma du réacteur à lit fixe multi étages

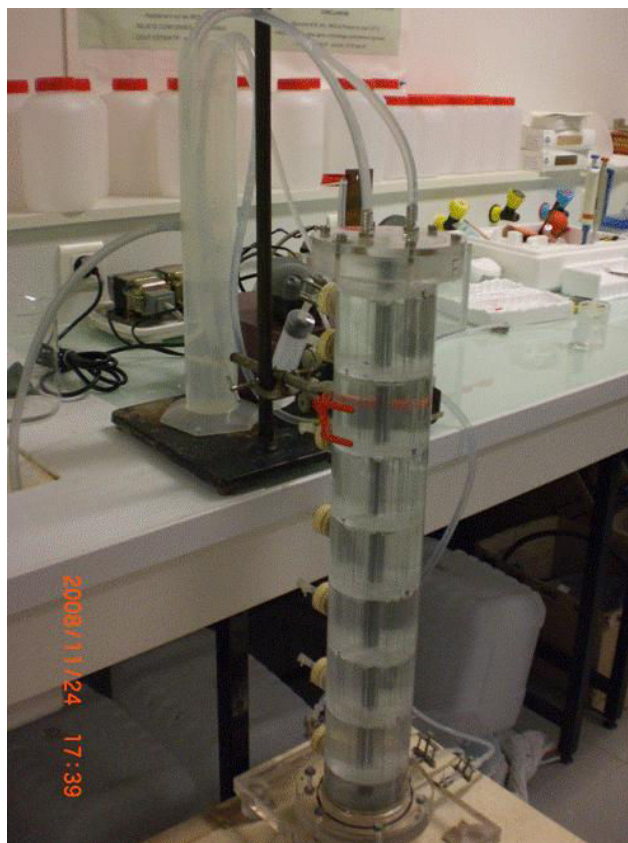


Figure II. 6 Photo du réacteur muté étagé avant le développement du biofilm.

Le système de prélèvement dans chaque étage est présenté dans la Figure II.7: (1, A), (2, A), (2, B), (3, A), (3, B), (4, A), (4, B), (4, C), (5, A),... (17, A).

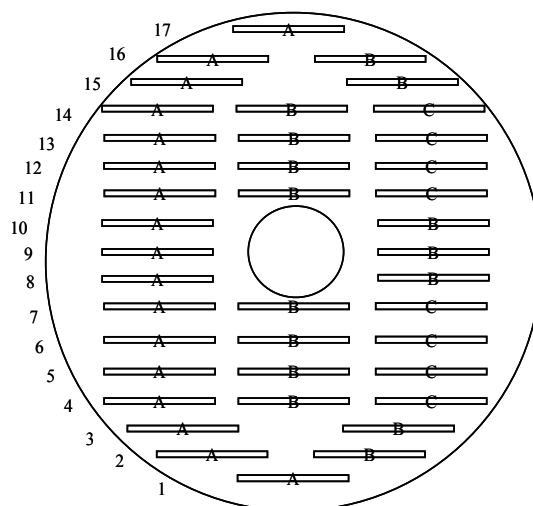


Figure II. 7 Positionnement des lames de verre dans chaque étage avec l'ordre suivi pour les prélèvements des lames.

Le temps de séjour a été calculé en injectant 10 ml d'une solution de 2 g/l NaCl. L'expérience a été réalisée pour trois débits d'alimentation de l'eau déminéralisée : 1.45 ; 0.98 et 0.45 l/h.

Deux conductimètres ont été utilisés. Trois expériences ont été réalisées avec ce réacteur et les détails sont donnés dans le Tableau II. 2.

Tableau II. 2 Liste des expériences réalisées avec le réacteur multi étagés.

Expérience	Mode opératoire
Run 1	Débit d'alimentation = 4.6 L/jour (0.2 l/h) ($\tau = 1$), débit de circulation = 20 L/h (temps moyen de séjour $R=100$), l'inoculation est faite par de l'eau usée (prélevée à la station d'épuration de Limoges) en mode discontinu pendant 48h. L'alimentation s'est poursuivie avec une dilution d'un milieu synthétique concentrée avec la composition (Viadox 6.5 g/l, saccharose 350 mg/l, chlorure d'ammonium 280 mg/l, acide phosphorique 85%: 0.038 ml/l) à une température de 20°C. 150 ml du milieu est dilués dans un 10 L de l'eau potable.
Run 3	Débit d'alimentation = 0.45 L/h pendant 25 jours puis 0.98 L/h pendant 15 jour et 2 L/h jusqu'à la fin de l'expérience. L'inoculation est faite en culture discontinue pendant 48h. L'alimentation s'est poursuivie avec un milieu synthétique. Pour cette expérience l'aération a été faite directement dans le réacteur et non pas dans le réservoir annexe. La température a été maintenue à 12°C.
Run 4	Débit d'alimentation = 4.6 L/jour, débit de circulation = 10 L/h (temps moyen de séjour $R=50$), L'inoculation a été faite par de l'eau usée (station d'épuration de Maxéville-Nancy) en culture discontinue pendant 48h. L'alimentation a ensuite été poursuivie en milieu synthétique concentré (200 g Viadox, 10g NH_4Cl , 0.5 g Na_2HPO_4 , 12 g Saccharose)/ L. 12 ml du milieu est ajouté à 10 L de l'eau potable à une température de 20°C.

Les avantages de ce réacteur sont : une surface disponible fixe, un échantillonnage facile à effectuer sans détruire le biofilm, le remplacement d'une lame par une autre ne réduisant le biofilm que d'un faible pourcentage (0.3% seulement) et des supports permettant d'étudier les microorganismes et les colonies directement sous le microscope. Le seul inconvénient est la surface modeste par rapport au volume (0.24 m²/L).

II.1.4. Réacteurs à lit fixe

Trois réacteurs sont mis en marche en parallèle. Deux d'entre eux (R_0 et R_1) utilisent de la pouzzolane (pierre volcanique de diamètre moyen 0.53 mm) comme garnissage. Ce garnissage occupe 43% du volume des réacteurs. Le troisième réacteur (R_2) est le réacteur de détoxification de l'arsenic à lit fixe multi-étagés et présenté précédemment. Un réservoir principal alimente deux réservoirs thermostatés à 12 C° qui alimentent eux-mêmes les trois réacteurs. Le consortium bactérien (CAS01) utilisé dans ce système a été sélectionné par le BRGM dans une ancienne mine en France et est capable d'oxyder l'As^{III} en As^V (Battaglia *et al.*, 2002). Ces trois réacteurs sont complétés par un réacteur fixant l'arsenic As^V (R_{fr}) sur un

mélange de sable et de limaille de fer. La Figure II.8 montre les différents réacteurs avec leur mode de connexion.

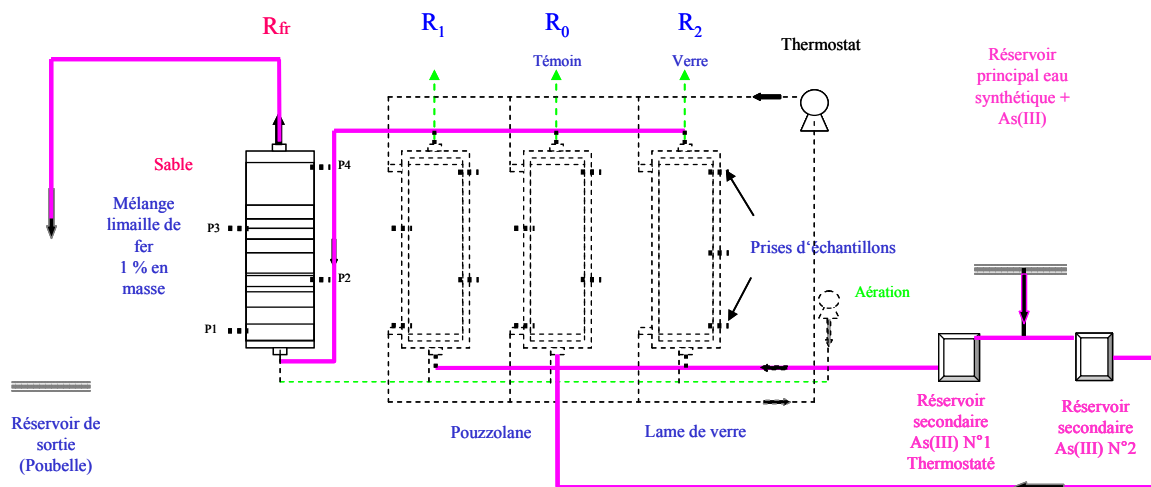


Figure II. 8 Réacteurs utilisés dans l'expérience d'oxydation de l'arsenic As^{III} : R_{fr} (sable), R_0 et R_1 (pouzzolane) et R_2 (verre).

Un protocole particulier est utilisé pour le remplissage du réacteur de détoxification. La colonne est tout d'abord remplie d'eau pour une répartition homogène du sable et de la limaille. Le sable n'est pas mélangé préalablement à la limaille car il est difficile d'obtenir un mélange homogène avec deux matériaux de densités très différentes (1,4 pour le sable et 7,5 g/cm^3 pour la limaille de fer). La colonne est remplie par des couches successives de sable et de limaille, en répartissant de façon la plus homogène possible 1,8 g de limaille de fer tous les 2 cm sur la 2/3 de la colonne R_{Fr} . La concentration totale en fer est de 1 % en masse par rapport au sable, ce qui correspond à 18,9 g de Fe^0 réparti sur la 2/3 de la colonne. Le volume utile de sable pour R_{Fr} est 35 %.

Mode opératoire pour l'ensemencement en $CAsoI$

La solution d'oligo-éléments (S_0) contient (pour 1 litre): HCl 25%, 6.5 ml; $FeCl_2$, 1.5 g; H_3BO_3 , 60 mg; $MnSO_4 \cdot H_2O$, 117 mg; $CoCl_2 \cdot 6 H_2O$, 25 mg; $ZnCl_2$, 70 mg; $NiCl_2 \cdot 6 H_2O$, 25 mg; $CuCl_2 \cdot 2 H_2O$, 15 mg; $Na_2MoO_4 \cdot 2 H_2O$, 25 mg.

La solution S_{As} d' As^{III} à 10 g/L est préparée de la façon suivante:

- on dissout dans 200 mL 13 g d' As_2O_3 avec 0,55 g de NaOH et on porte le tout à ébullition jusqu'à dissolution totale des réactifs.
- le volume est ensuite ajusté à 1L avec de l'eau milli-q après refroidissement.

La solution A (S_A) est préparée de la façon suivante (pour 1 litre): K_2HPO_4 , 1 g; KH_2PO_4 , 1 g; NaCl, 1 g; $(NH_4)_2SO_4$, 0.1 g; Solution S_0 , 2 ml. Le pH est ajusté à 6 par ajout d'acide sulfurique.

La solution B (S_B) est préparé de la façon suivante (pour 1 litre): $CaCl_2$, 0.2 g; $MgSO_4$, 7 H_2O , 0.2 g. Solution S_{As} , 20 ml.

Les solutions S_A et S_B sont autoclavées à 120 °C pendant 20 min. On autoclave également les récipients de 2L nécessaires au mélange lors de l'étape suivante qui doit être effectuée en milieu stérile. Après refroidissement à température ambiante, on mélange les solutions S_A et S_B dans un récipient de 2 L préalablement autoclavé. On ajoute 100 ml du milieu contenant CAS01 sont ajoutés dans le mélange et le tout est stocké à température ambiante avec un bouchon en coton cardé.

II.2. Analyses physico-chimiques

II.2.1. Matières sèches (MS)

La détermination des matières sèches est réalisée par pesée et séchage des échantillons, selon la méthode normalisée NF T 90 105. Pour déterminer la teneur en matière sèche totale (MS), un volume connu d'échantillon est introduit dans un creuset en porcelaine, préalablement séché, de masse connue. Le creuset est placé à l'étuve à 105°C pendant 24 heures de sorte que l'eau s'évapore entièrement. Le creuset est pesé après refroidissement dans un dessiccateur. La différence de masses correspond donc à la matière sèche contenue. En considérant le volume d'échantillon introduit, le résultat est alors exprimé en g/L ou en mg/ml.

Dans le réacteur à lames de verre, la lame de verre est séchée avec le biofilm à 105°C pendant 24h. Elle est pesée puis nettoyée à l'eau distillée et séchée dans les mêmes conditions pour avoir le poids sans le biofilm. La différence entre les deux poids est donc la matière sèche. La Figure II.9 montre l'évolution du séchage de biofilm sur une lame de verre dans l'étuve à 105°C pendant 24h : la matière sèche du biofilm se stabilise après une heure après la mise dans l'étuve car l'eau libre, représentant la partie majeure de la masse du biofilm s'évapore facilement.

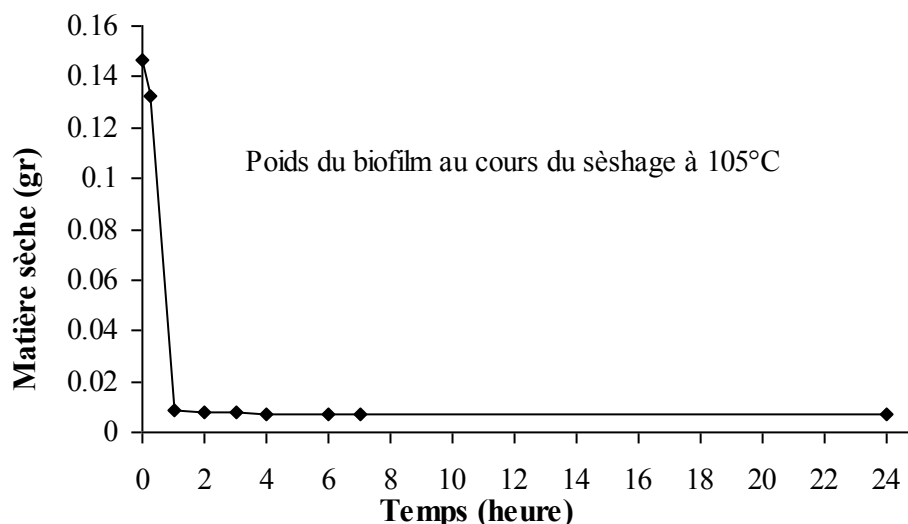


Figure II. 9 Séchage de biofilm sur une plaque de verre dans l'étuve à 105°C.

II.2.2. Dosage de la Demande Chimique en Oxygène (DCO)

La DCO correspond à la quantité d'oxygène nécessaire pour oxyder chimiquement les substances réductrices contenues dans une solution. L'oxydant utilisé est le bichromate de potassium. Pour effectuer le dosage, la méthode HACH (1996-2000) a été utilisée: 2 ml d'échantillon sont introduits dans le tube contenant les réactifs. Le blanc est réalisé de manière identique, mais l'échantillon est remplacé par de l'eau distillée. Les tubes sont ensuite chauffés à 150°C pendant 2 heures puis laissés à refroidir pendant environ 20 minutes. La valeur de l'absorbance de l'échantillon est lue au spectrophotomètre après avoir fait le zéro avec un blanc (gamme de concentration de 0 mg/L à 1500 mg/L) à la longueur d'onde de 620 nm.

II.2.3. Dosage de l'ammonium

Les ions ammonium sont mesurés par colorimétrie selon la méthode de Nessler sur un spectrophotomètre Hach DR2400. La méthode Hach® n° 380 a été adaptée pour une utilisation sur des petits volumes pour une gamme de 0 à 2,5 mg N-NH₄/L et un volume de 10 mL. Les échantillons ont été dilués au 20ème après filtration sur filtre en papier de 1.5µm de taille de pore. Un diluteur automatique Hamilton® est utilisé. Le réactif de Nessler (iodo-mercure de potassium alcalin) est décomposé en présence d'ions ammonium avec formation d'iodure de dimercuri-ammonium produisant une couleur jaune. Sa concentration est mesurée par absorbance à 425 nm puis à l'aide de la courbe d'étalonnage réalisée avec une solution de chlorure d'ammonium. Les résultats sont exprimés en mg N-NH₄/L.

II.2.4. Spectrophotométrie d'absorbance UV-Visible

Cet appareil a été utilisé pour évaluer la concentration en nitrates à 220 nm et la DCO soluble à 254 nm. Les spectres ont été obtenus dans une gamme de 200 à 600 nm (pas de 1 nm) avec un spectrophotomètre SECOMAN Anthélie Light®. Une cellule en quartz avec un trajet optique 10 mm a été employée. Ses parois ont été nettoyées avant chaque mesure. Deux sources de lumières sont utilisées : une lampe visible tungstène halogène et une lampe UV au deutérium. La vitesse de balayage a été fixée à 1200 nm/min. Le blanc est réalisé avec de l'eau déminéralisée. L'absorbance à 254 nm est corrélable avec la DCO soluble dans les milieux (Mrkva, 1983). La dérivée seconde de l'absorbance à 220 nm est corrélée à la concentration de nitrate selon (Ferrée et Shannon, 2001).

II.2.5. Spectrofluorimétrie

Afin de mesurer la présence de résidus protéiniques dans les milieux, nous avons suivi la concentration de substances de type tryptophane par fluorescence synchrone. L'analyse est effectuée avec un spectrophotomètre de fluorescence (F-2500; Digilab, Hitachi®), avec une lampe d'xénon (Xe), en utilisant le logiciel de « FL Solutions 2.0 ». Le décalage entre la longueur d'onde de l'émission ($\lambda_{\text{ém}}$) et la longueur d'onde de l'excitation (λ_{ex}) était de 50 nm. La bande (excitation ; émission) à ($\lambda_{\text{ém}} = 284 - 334$) correspond à des substances azotées organiques de type tryptophane (Baker, 2002) du type de celle que l'on trouve dans l'urine (humaine et animale). Deux autres bandes (vers des longueurs d'excitation de 325 nm et vers 350 nm) correspondent à des substances de type acides humiques et fulviques. Nous avons suivi l'émission à $\lambda_{\text{ém}} = 282$ nm qui permet de suivre la fluorescence de type tryptophane dans les substrats et les réacteurs en fonction de temps. Celle-ci peut être associée à la teneur en azote organique.

II.2.6. Chromatographie ionique

L'analyse par chromatographie ionique est réalisée à l'aide d'un appareil DIONEX® en utilisant le logiciel « AI-450 Version 3.31 ». Les ions ou composés polaires sont entraînés par la phase mobile et séparés par effet de leurs interactions avec les sites ioniques de la phase stationnaire. Plus la densité de charge d'un soluté est grande, plus il est retenu par la phase stationnaire et plus il met de temps pour traverser la colonne. La détection est basée sur la mesure de la conductivité de la phase mobile (témoin) et la conductivité de chaque composant à la sortie de la colonne. L'éluant utilisé (phase mobile) est l'hydroxyde de potassium KOH 28 mM. Le volume d'injection est de 25 μL . La température de la colonne

est 20 C°, celle du détecteur est 25 C°. Le débit de la phase mobile est de 1 ml/min. La durée d'analyse est de 16 min. La figure II.10 montre les différents composants séparés par la colonne.

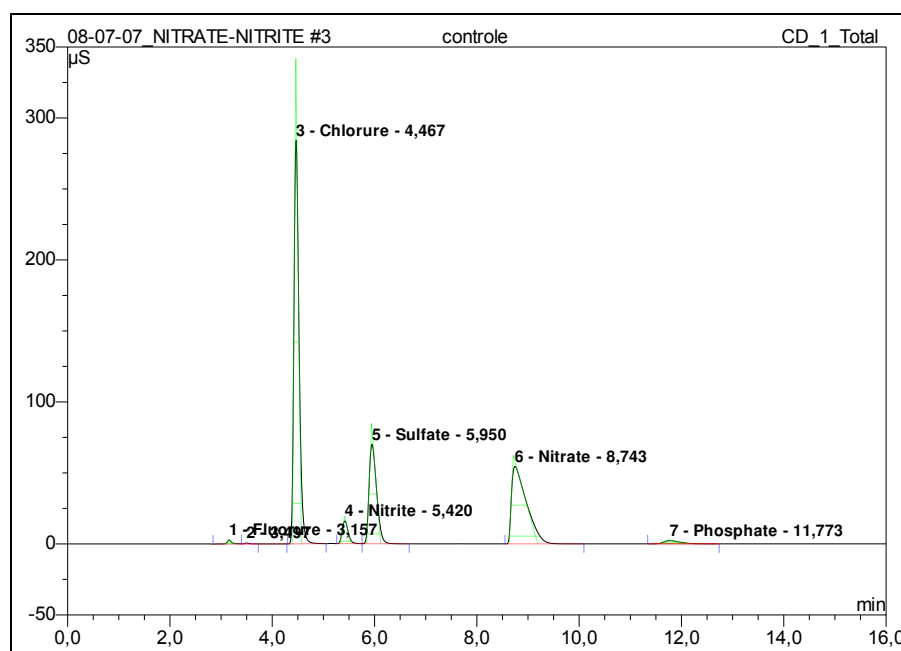


Figure II. 10 Exemple de chromatogramme ionique.

II.2.7. Méthode « cristal violet »

Cette méthode a été utilisée pour caractériser les biofilms par (Musk *et al.*, 2005), et a été modifiée pour être plus rapide, plus économique, plus fiable et être adaptée au cas d'un biofilm épais sur les lames de verre (Alnmasouri *et al.*, 2010b). La solution de cristal violet (CV) utilisée est 0.1% (v/v) (Cristal Violet en solution selon Gram, chez VWR, réf 1.09218.0500 -2008/2010, France). La méthode est basée sur la quantité de colorant absorbée et adsorbée par les cellules de biofilm et les substances exopolymériques (Li *et al.*, 2003).

Les différentes étapes du protocole sont les suivantes :

1. Préparation de la solution de cristal violet avec de l'eau déminéralisée 0.1 v/v.
2. Préparation de la suspension du biofilm développé sur une lame de verre :
 - le biofilm est décroché mécaniquement par une autre lame de verre nettoyée à l'eau déminéralisée et la lame est lavée à l'eau stérile.
 - le biofilm et l'eau du lavage sont récupérés dans une éprouvette stérilisée et le volume est complété à 15 ml.
 - 2 ml de billes de verre (D= 1 mm) stérilisées sont ajoutées à la suspension dans un flacon avec un fil de métal.

- L'ensemble est passé sur vortex pendant environ 20-30 minutes pour disperser et casser la matrice de biofilm et avoir le maximum de cellules séparées.
- 15 tubes sont préparés pour préparer une courbe d'étalonnage (9 ml dans chaque tube) à partir d'une dilution de la solution mère de cristal violet suivant le tableau II.3.

Un volume de la solution du biofilm a été prélevé pour mesurer la matière sèche (1000 µl contiennent 200 µg matière sèche).

Tableau II. 3 Série de dilutions pour préparer la courbe d'étalonnage de la méthode cristal violet.

Tube N°	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
Solution CV ml	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9
Solution biofilm (µL)	1000	900	800	700	600	500	400	350	300	250	200	150	100	50	0
Eau stérilisé (µL)	0	100	200	300	400	500	600	650	700	750	800	850	900	950	1000
Matière sèche estimée (µg)	200	180	160	140	120	100	80	70	60	50	40	30	20	10	0

3. On homogénéise par vortex pendant 45 min puis on laisse reposer pendant 45 minutes.
4. Le témoin se fait automatiquement par l'échantillon N° 15 (eau sans la suspension de biofilm).
5. Les 10 ml contenus dans chaque tube sont filtrés par un filtre stérilisé de porosité 0.22 µm (impérativement un filtre pour chaque tube).
6. L'absorbance du filtrat est mesurée à 550 nm.

La Figure II.11 montre la corrélation entre l'absorbance à 550 nm de chaque dilution avec la biomasse correspondante, corrélation satisfaisante.

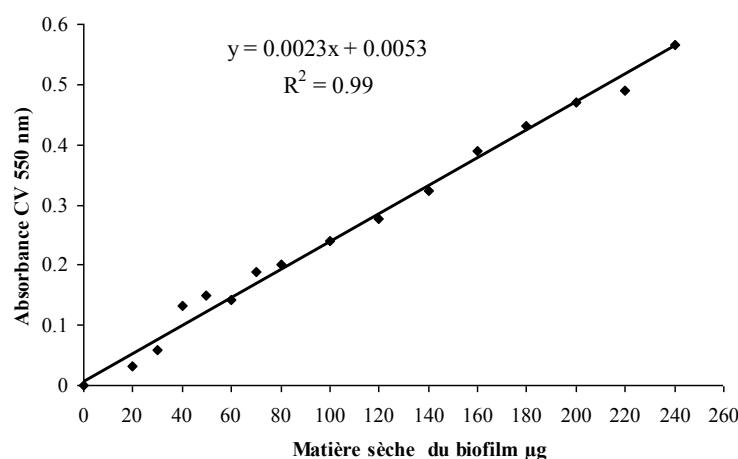


Figure II. 11 Courbe d'étalonnage Ab CV avec la matière sèche du biofilm

La Figure II.12 présente une photo pour les 15 échantillons étudiés avec les numéros correspondants après la filtration à 0.22 μm .

Plus la quantité de la solution du biofilm est grande dans l'échantillon, plus le cristal violet est ab/adsorbé par le biofilm : une petite quantité passe à travers le filtre vers la tube (N°1) et l'absorbance détecté dans le filtrat est donc moindre. Par conséquent on observe une couleur plus foncée dans le gâteau du filtre utilisé (filtre 1). À l'inverse, dans le témoin comme il n'y a pas de biofilm, toute la quantité de cristal violet passe vers le tube (N15) sans être retenue par le filtre sauf une petite quantité adsorbée sur le filtre lui-même (filtre 15).

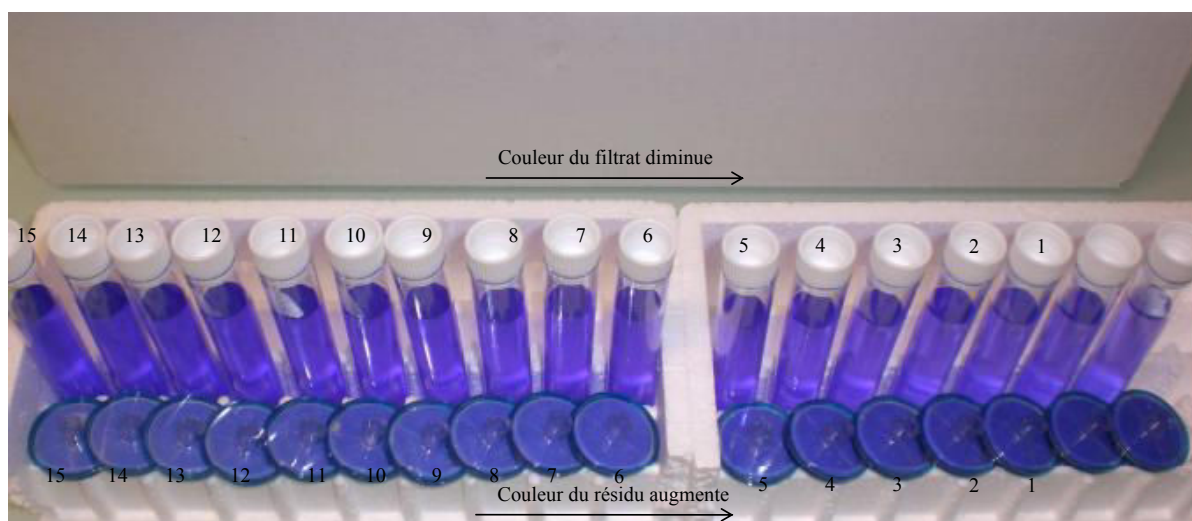


Figure II. 12 La différence des niveaux de la couleur bleue dans la méthode CV développée. La biomasse augmente du gauche vers la droite.

La méthode a été validée par le dénombrement de microorganismes cultivables sur boîtes de Pétri dans chaque quantité testée pour lier l'absorbance avec le nombre de cellules cultivables dans le biofilm. Le milieu utilisé pour le dénombrement est la gélose pour dénombrement PCA (5 g Tryptone, 2.5 g Extrait de levure, 1 g Glucose, 12 g Agar) / litre.

II.2.8. Analyse de l'arsenic

La spéciation de l'arsenic est mesurée par la HPLC-HG-AFS (séparation par chromatographie- génération des hydrures couplés par spectroscopie de fluorescence atomique). La partie HPLC est constituée d'une colonne Hamilton PRP-X100 alimentée à un débit de 1 ml/min avec une phase mobile constituée d'une solution de $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ à 30 mM tamponnée à pH 6,9 à l'aide d'une solution de NH_3 concentrée. Les composants sont volatilisés par une réaction chimique en milieu acide en présence d'un réducteur, le plus souvent le borohydrure de sodium (NaBH_4) qui se décompose rapidement pour donner de

l'hydrogène naissant, qui réduit les composants à analyser. L'avantage de la génération d'hydrures est de libérer l'arsenic de leurs matrices lors de la détection, et donc de minimiser les effets dus aux interférences. La concentration de NaBH_4 est 14 g/L et d'HCl à 3 M injectées à un débit de 0,8 ml/min. La détection est assurée par un spectromètre de fluorescence atomique de marque PSA Analytical EXCALIBUR®.

II.2.9. Mesure de l'épaisseur du biofilm

L'épaisseur du biofilm est mesurée par un microscope KL 1500 Stemi SV6 Zeiss, équipé d'un objectif 1.6 x10 à l'aide d'un logiciel Vidiomet Microvision version 5.4.6. Ce logiciel permet de visualiser la lame de verre avec le biofilm d'une façon perpendiculaire à l'aide d'une caméra connectée au microscope. Cela permet de focaliser sur la lame de verre et d'avoir une visualisation nette de son bord supérieur comme cela est montré dans la Figure II.13. A l'aide de la souris, on choisit deux points de part et d'autre du biofilm, de façon perpendiculaire à la lame de verre. La longueur du segment ainsi défini est déterminée par le logiciel à partir d'une calibration pixel/ μm . Plusieurs segments sont mesurés pour chaque lame de verre. Le logiciel cumule les mesures faites et détermine les valeurs maximales et minimales, ainsi que la moyenne et l'écart-type. La précision est du centième de μm .



Figure II. 13 La mesure de l'épaisseur du biofilm sur le microscope KL 1500 Stemi SV6 Zeiss.

II.2.10. Systèmes d'acquisition des images (scanner)

Les photographies du biofilm sur son support ont été prises par un scanner à plat de marque Epson perfection™ 4490 Photo. La surface scannée est nettoyée avec soin du côté

qui sera la face mise sur la fenêtre du scanner. De ce fait la face de biofilm sera vers le haut. Les paramètres d'acquisition (réglage de la gamme de niveaux de gris et de la taille et de la position de la fenêtre d'acquisition) sont figés et mémorisés pour chaque expérience. La fenêtre de visualisation est toujours un peu plus grande que la surface de biofilm, ce qui nécessitera un prétraitement. L'acquisition dure moins d'une minute. Une fois celle-ci terminée, le support est replacé dans le milieu de culture sauf s'il est remplacé par un autre (cas des lames de verre ou de certains disques pour l'établissement d'une courbe d'étalonnage opacité versus matières sèches). La Figure II.14 montre le protocole utilisé lors de l'acquisition des photographies des surfaces étudiées. La résolution est de 800 dpi pour les disques et de 1200 dpi pour les lames de verre sur 256 niveaux de gris. Les photos scannées sont stockées en format TIFF.

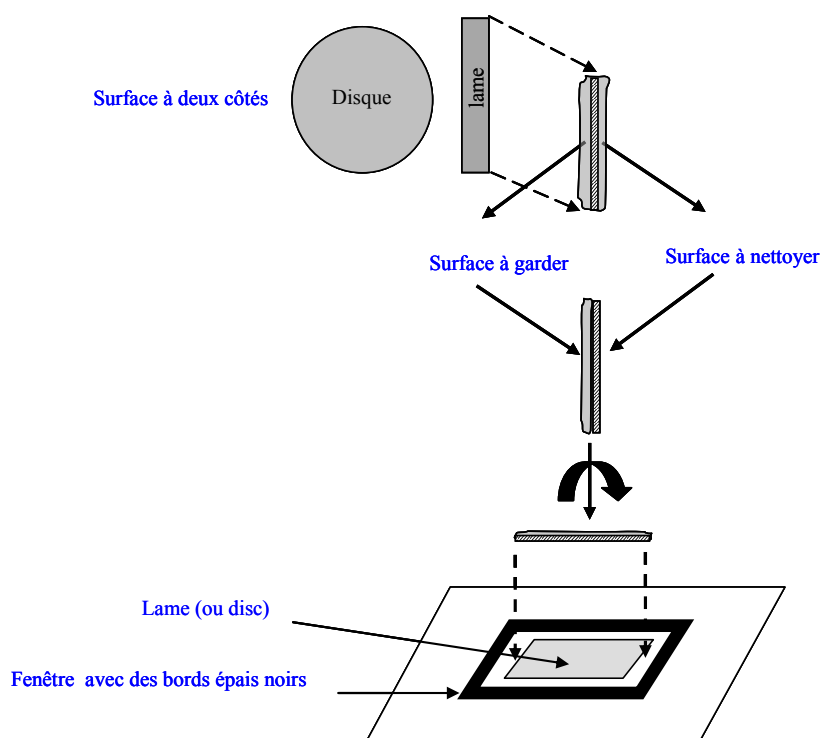


Figure II. 14 Protocole utilisé pour faire le scan des lames et des disques par le scanner à plat.

Avant l'étape de quantification un prétraitement est nécessaire. Il diffère suivant la forme du support: rectangulaire pour les lames ou circulaire pour les disques.

Dans le cas des lames chaque photographie est prétraitée par le logiciel « Image J » (NIH, USA). La photographie est découpée autour des bords de la lame comme cela est indiqué dans la Figure II.15 (a). Ensuite une nouvelle image est créée sans les bords noirs de la fenêtre Figure II.15 (b). La nouvelle image est sauvegardée en format TIFF.

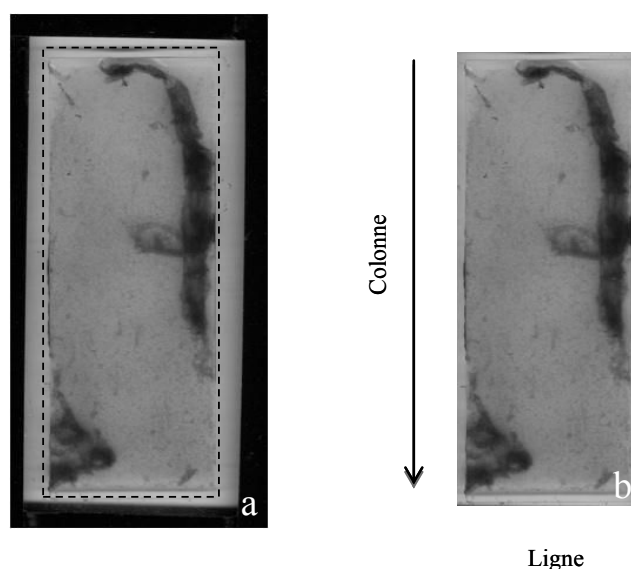


Figure II. 15 Image de la lame avant (a) et après (b) le prétraitement des photos pour éliminer les bords.

Pour les disques la procédure décrite par (Pons *et al.*, 2009) est utilisée: le but est de déterminer la position du disque dans la fenêtre de mesure en pointant trois points à l'aide de la souris, puis de transformer la forme circulaire en une forme rectangulaire sur laquelle les algorithmes d'analyse de texture visuelle sont applicables (Figure II.16 (a)).

La localisation des trois points (X1, X2 et X3) définissant le contour du disque est réalisée à l'aide du logiciel Visilog 6.3. Chaque point X est identifié par les coordonnées (x_i, y_i) . Les noms et les coordonnées sont sauvegardés dans un fichier Excel et stockés en format texte. Ce fichier sert à la préparation de deux fichiers de données (liste des noms d'image et coordonnées des trois points) qui seront utilisés pour l'analyse des images.

Toutes les photographies (disques et lames) sont traitées de la même manière par deux programmes développés au laboratoire LRGP en FORTRAN. Ces programmes utilisables en mode MS-DOS (ligne de commande) réalisent les tâches suivantes :

- localisation du cercle et de la zone de biofilm (entre la ligne d'eau et le bord externe du disque) pour les photographies de disques
- transformation de la zone circulaire en image rectangulaire pour les disques
- analyse des images. Les tâches suivantes sont communes
 - o analyse de l'histogramme : minimum, maximum, mode, moyenne et écart-type
 - o méthode SGLDM
 - o méthode GRLM

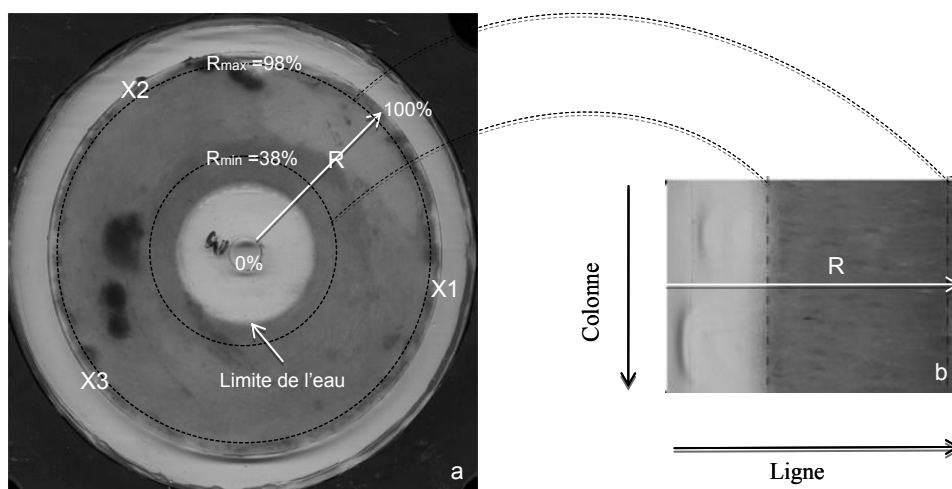


Figure II. 16 Le prétraitement d'image des disques pour éliminer les bords et le transférer en rectangulaire.

Les résultats sont disponibles sous forme de plusieurs fichiers:

Fichier « STAT » contient des informations détaillées y compris les niveaux de gris de chaque photo avec le témoin (disc intact sans le biofilm) et l'écart-type. Pour avoir l'opacité, le niveau de gris pour chaque photo doit être déduit de celui du témoin.

Fichier « SGLDM » contient les quatorze paramètres de spatial **Gray Level Dependence Matrices** comme l'homogénéité (HOM), l'énergie (ENG), l'inertie (IN), etc.

Fichier « GLRLM » contient les paramètres de **Gray Level Run Length Method** comme LRE, SRE, etc.

III. CHAPITRE III

RESULTATS & DISCUSSION

Dans le présent chapitre, les résultats des différentes études menées lors du travail de thèse seront discutés. Les résultats sont présentés en forme d'articles acceptés, soumis ou à soumettre.

Chaque article traite d'un ou plusieurs objectifs selon l'expérience réalisée. Il se compose d'une introduction bibliographique qui se focalise directement sur l'objectif principal du travail. Ensuite, les matériels et méthodes mises en œuvre, les résultats et discussions sont présentés.

Résumé

Nous définissons brièvement chaque article avant d'entrer dans les détails :

Article I

“Comparison of four methods for biofilm development assessment”

Cette étude a pour but de valider la méthode d'opacité comme une méthode non destructive pour le suivi du développement d'un biofilm sur longue durée. La méthode est comparée à deux méthodes destructives (poids sec, développement de colonies) et une troisième non destructive (mesure d'épaisseur).

Article II

“Influence of structured surfaces on biofilm development: experiment and modelling”

Le développement du biofilm et les différents phénomènes de détachement sont étudiés sur des disques lisses et structurés dans les réacteurs à disques tournants sur des longues durées. Les stress physiques, la vitesse de rotation sont également étudiés.

Article III

“Long-term biofilm monitoring of a rotating biological contactor”

Le développement du biofilm dans le réacteur à disques tournants est étudié sur environ 7 mois. Le redéveloppement du biofilm est montré après plusieurs phénomènes de détachement/ décrochement au cours de l'expérience. La difficulté d'obtenir un état stationnaire et le problème de la reproductibilité des expériences est abordé. La méthode de GLRLM est également utilisée pour caractériser la macrostructure du biofilm.

Article IV

“Effect of Erythromycin on the biofilm activity in a rotating biological contactor”

Les stations de traitement des eaux résiduaires urbaines sont de plus en plus confrontées à la présence de micropolluants émergents, notamment des composés pharmaceutiques. Les antibiotiques en sont une classe particulière puisqu'ils sont conçus pour combattre le développement bactérien. L'érythromycine est un des antibiotiques les plus utilisés en France et dans le monde. L'effet de cet antibiotique sur l'activité biologique du biofilm et sur les phénomènes du détachement/décrochement dans un réacteur à disques tournants est étudié. L'analyse d'images et la macroscopie confocale laser comme nouvelle technique de visualisation ont été utilisés.

Article V**“Development of biofilm in a multistage fixed-bed reactor”**

Dans les réacteurs à lit fixe, est-ce que le biofilm se développe d'une façon homogène sur tous les supports aux différentes hauteurs dans le réacteur? Pour répondre à cette question et vu la difficulté de l'étude dans un réacteur classique, un réacteur à lit fixe multi-étages avec des lames de verre utilisées comme supports de développement de biofilm a été spécifiquement conçu dans ce but. La méthode de l'opacité est utilisée comme une méthode non destructive avec une validation par la matière sèche.

Résultats complémentaires

Après validation du mode de fonctionnement du réacteur, il a été utilisé pour tester la capacité de bactéries appelées CAsO1 à former un biofilm à partir de carbone inorganique et à transformer l'arsenic As^{III} en arsenic As^V . Ces processus ont été étudiés à la fois dans les réacteurs à lit fixe en utilisant la pouzzolane comme support et dans le réacteur à lit fixe multi-étages. La répartition de la biomasse est également étudiée dans cette étude par la mesure d'opacité, cette fois-ci sur des images provenant d'un microscope optique

III.1. Article I: Comparison of four methods to assess biofilm development

Muatasem ALNNASOURI^{1,2}, Christophe DAGOT², Marie-Noëlle PONS^{1*}

¹. Laboratoire Réactions et Génie des Procédés, CNRS, Nancy Université, INPL
1, rue Grandville, BP 20451, Nancy cedex, France

². Groupement de Recherches Eau Sol Environnement, ENSIL
1, rue Atlantis, Parc ESTER Technopôle, BP 6804, 87068 Limoges cedex, France

* Corresponding author: tel : +33 3 83175277 ; fax : +33 383175326,

E-mail: marie-noelle.pons@ensic.inpl-nancy.fr

Abstract

Two nondestructive methods of biofilm quantification (optical density via a flatbed scanner and biofilm thickness) have been evaluated and compared to two destructive methods (Crystal Violet staining after biofilm disintegration and dry weight). The methods were tested on biofilms that developed on a modified rotating biological contactor (RBC) that was inoculated with urban wastewater and fed with a synthetic media that mimicked slaughterhouse wastewater. The results of the different methods were highly correlated (coefficient of correlation greater than 0.8). This validation experiment confirms the ability of the scanning method to easily monitor the biofilm's development over large surfaces without destruction of the biofilm.

Keywords: Crystal Violet, opacity, thickness, total solids

1. Introduction

Biofilms are complex systems of microorganisms that are embedded in an extracellular polymeric matrix and that develop on a surface in an aqueous environment (Donlan and Costerton, 2002). The advantages to maintaining bacteria as a biofilm have led to various commercial developments in the last decades. In the environmental field, biofilm reactors were developed for municipal and industrial wastewater treatment and then extended to drinking water production (Rittman and McCarty, 2001). Different designs of biofilm reactors have been investigated for the biodegradation of organic substances. Rotating biological contactors (RBC) have been widely used because of their advantages, such as low energy consumption and simple operation and maintenance (Andreadakis, 1987; Pan and Hartman, 1992; Wilson, 1993). In any case, quantification of biomass developing as a biofilm remains an issue and several techniques have been proposed. Microscopy was probably the first technique used to study the biofilm structure (Henrici, 1933). The complexity of the structural heterogeneity of biofilms has been revealed further by techniques such as scanning electron microscopy, confocal laser microscopy (CSLM) (Stewart et al., 1995; Lawrence et al., 1998; Lewandowski et al., 1999; Delatolla et al., 2009; Seneviratne et al., 2009) and multiple photon laser scanning microscopy (Bryers, 2001; Neu et al., 2004; Neu and Lawrence, 2005; Möhle et al., 2007). However, with laser-based techniques, fluorochromes, which might be toxic to cells, need to be added to the image cells (Aoi, 2002; Thurnheer et al., 2004) and exopolysaccharides (Lawrence et al., 1998; Böckelmann et al., 2002; Strathmann et al., 2002; Wagner et al., 2009). Embedding in a resin and sectioning has been tested (Zahid and Ganczarczyk, 1994), but it is definitely a destructive technique. Identification of bacterial species that develop in the biofilms on opaque coupons has been demonstrated by using hyperspectral fluorescence imaging (Jun et al., 2009), which is based on the natural fluorescence properties of the bacteria and does not require staining.

The main difficulty with electron microscopy, either SEM or TEM, is that sample preparation might induce shrinkage and therefore structural changes due to dehydration. Specific preparation protocols have been developed (Reese and Guggenheim, 2007) and new devices, such as environmental scanning electron microscopes, preserve the biofilm's appearance (Priester et al., 2007) because the wet mode under moderate vacuum prevents the biofilm from drying.

With SEM, TEM or CLSM, the biofilm is not removed from its substratum but the biofilm+substratum assembly generally needs to be removed from the cultivation system,

except when flow chambers are used. However, biofilm development in flow chambers is limited and clogging problems reduce the duration of cultivation.

Electrochemical quartz crystal microbalance (EQCM) has been used to investigate the early development of biofilms on metallic surfaces by detecting thin layers of bacteria (Bressel et al., 2003). A QCM technique was described by Reipa et al. (2006) that used light reflectance to measure the thickness of a *P. aeruginosa* biofilm, which developed on a gold electrode in a microbalance for three weeks. Some practical difficulties occurred due to the turbid growth medium and the surface inhomogeneity of the biofilm. Atomic Force Microscopy (AFM) has been tested on an opaque substratum (stainless steel by Bachmann and Edyvean (2006), uranium ore by Pradhan et al. (2008)) under “hydrated dry” conditions. Although the sample treatment is less drastic in comparison to the SEM or TEM, it is still destructive because the samples have to be dried and removed from the cultivation system. Episcopic Nomarski differential interference contrast microscopy has been proposed to monitor the iron biomineralization in biofilms that develop on an opaque mineral surface (Brown et al., 1998). Bakke and Olsson (1986) have proposed a method that is based on light microscopy to measure the thickness of a transparent biofilm by the difference in focusing distances between the biofilm-liquid interface and the biofilm-substratum. Based on this technique, Bakke et al. (2001) have noninvasively monitored *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development over three weeks by measuring the optical density and the thickness with light microscopy in a rectangular duct. Laser triangulation has been tested to monitor the thickness and surface roughness of a biofilm that developed on a wetted-wall column (Okkerse et al., 2000). The electrical capacitance was satisfactorily used for an on-line thickness measurement (Maurício et al., 2006).

Soft X-ray microscopy has been proposed (Gilbert et al., 1999) but synchrotron facilities are rare. Magnetic resonance microscopy (Manz et al., 2003; Seymour et al., 2004; Gjersing et al., 2005; Majors et al., 2005) as well as low-cost ultrasound imaging (Shemesh et al., 2007) has also been tested for noninvasive investigation. These techniques are generally used to study transport phenomena and shear stress effects on biofilms.

Recently Milferstedt et al. (2006) proposed a nondestructive method to evaluate biomass that developed on transparent surfaces and to quantify the large-scale (over several cm²) biofilm structure in long-term experiments in an annular reactor. The rectangular coupons were rapidly imaged by using a flatbed scanner and can be put back into the cultivation device

without damage. The optical data were well correlated with the total solids. The method has been extended to discs from a rotating biological contactor (Pons et al., 2009).

The purpose of the present work is to further validate the scanner method. In Milferstedt et al., (2006) the biofilm's thickness was tentatively measured by using the procedure of Bakke and Olsson (1986) but the number of data points was limited: it is often not easy to get a correct focus on the biofilm-substratum and the biofilm-liquid interfaces, especially in the case of dense biofilms. A direct thickness measurement technique is used here. The results are compared to data from destructive methods: Crystal Violet staining and total solids. The validation is done on biofilms of different ages.

2. Materials and Methods

2.1. Cultivation device

A rotating biological contactor was modified to simplify the biofilm's analysis (Figure 1). Each of the four discs was replaced by a waterwheel that hosted eight glass slides (7.6 x 2.6 x 0.1 cm). The distance between the waterline and the rotation axis was equal to 35% of the distance between the glass slide's outer tip and the axis. For biofilm development, 80% of the surface of each slide is accessible, while 20% is masked by the attachment system. The rotation speed was set to 2 rpm.

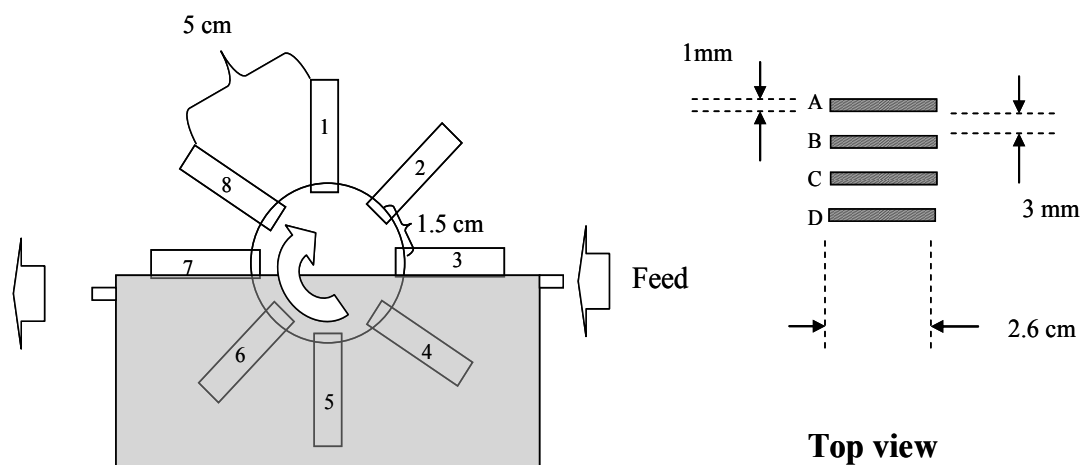


Figure 1: Experimental set-up

The tank has a volume of 2.5 L. Inoculation was carried out in batch mode for 48 hours by using municipal wastewater. The feeding rate was maintained at 2.5 L/day during the whole experiment. The feeding solution mimicked slaughterhouse wastewater. A stock solution was prepared by dilution of approximately 20 g of cattle dried blood granules (purchased in a local garden center) in 1 L of hot tap water, which was mixed for 2 hours and filtrated (pore size = 1.2 μm). Between day 3 and day 28, 100 mL of the stock solution was mixed with 2.5

L of tap water. Between day 29 and 58, the added volume of stock solution was doubled. After day 58, only tap water was fed to the reactor. The reactor feed and effluent were sampled daily to monitor the global behavior of the RBC.

2.2. Biofilm analytical procedure

Every two days, a glass slide was taken out of the system and replaced by a clean slide to maintain constant the surface accessible to the biofilm. The biofilm developed on both faces (A and B) of the glass slides. The biofilm was carefully sloughed mechanically from side A of the glass slide, which was rinsed with sterile deionized water and dried. The detached biofilm was transferred into a sterile tube for Crystal Violet staining. The biofilm from the side B of the glass slide was used to measure the thickness, opacity and amount of total solids. The biofilm growing on the replacement slides is never considered in the study.

2.3. Crystal Violet staining

The procedure was adapted from Stepanović et al. (2000). The tube was filled up to 15 mL with sterile deionized water. A small piece of stainless steel wire (to improve mixing) and 2 mL of sterile glass beads (diameter = 1 mm) were added to the tube. The suspension was vortexed for 30 min to break down the biofilm matrix. To 9 mL of a 0.1% Crystal Violet solution (VWR, Fontenay-sous-Bois, France), 1 mL of the obtained bacterial suspension was added in a sterile tube. After 15 min of vortexing, the suspension was rested for 15 min. The blank was prepared by using 1 mL of sterile deionized water instead of the bacterial suspension. The content of the tube was filtered (0.2- μ m pore size). After vortexing, the filtrate's absorbance at 550 nm was measured with a Shimadzu UV-1700 spectrophotometer. The absorbance due to microorganisms (A_{μ}) was obtained by subtracting the biofilm filtrate absorbance from the blank absorbance. The correlation between the A_{μ} and bacterial counts was validated by viable plate counts (Figure 2). For that purpose, 17 primary dilutions of a unique vortexed biofilm sample were prepared. For each primary diluted sample, five secondary dilutions (ranging from 1/10 to 1/100 000) were cultivated on Plate Count Agar (Biokar Diagnostics) for 24 hours at 25°C. The number of colony forming units (CFU) was obtained as the average between two secondary dilutions (1/100 and 1/1000) after correction by the dilution factor. The minimum and maximum numbers of CFU in the secondary dilution Pétri dishes were used to evaluate the standard deviation of each primary dilution.

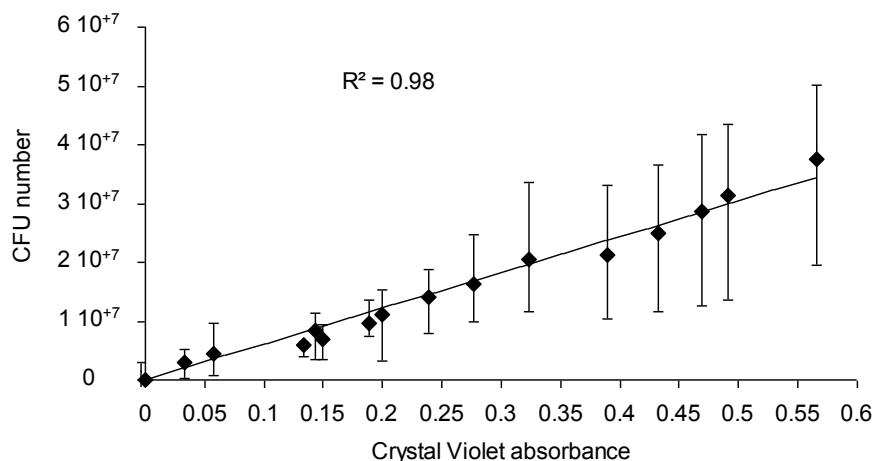


Figure 2: Validation of the Crystal Violet method. Vertical bars = \pm standard deviation

2.4. Thickness measurement

The biofilm's thickness was measured on a Stemi SV6 Zeiss microscope (Le Pecq, France) with a 1.6×10 magnification. The device was operated under Videomet (version 5.4.6) (Microvision Instruments (Evry, France) (Figure 3). The glass slide was placed on one of its longer edges. The optical system was focused to get a precise view of the upper edge. The alignment was such that no distortion was observed. By using the mouse, the operator selected two points on a line that was perpendicular to the edge of the glass slide: one at the substratum-biofilm interface and the second at the air-biofilm interface. The length of the segment defined by this couple of points was given in microns ($\pm 0.01 \mu\text{m}$) by the software after calibration. Preliminary tests indicated that seven thickness measurements equally spaced along the slide were sufficient: additional points did not change the mean thickness. The mean thickness (T) and the standard deviation of the thickness were computed for each slide.

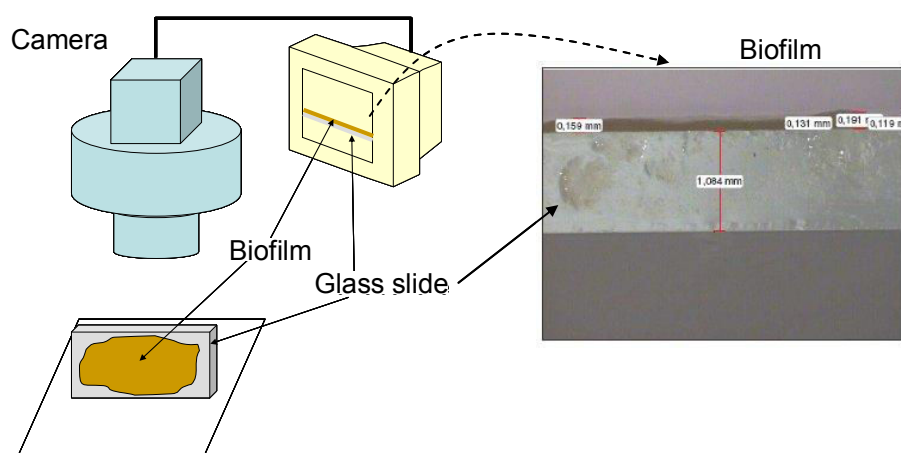


Figure 3: Biofilm thickness measurement

2.5. Opacity measurements

The slides were imaged on a flatbed scanner (Epson perfection Photo 4490) on 256 grey levels with a spatial resolution of 1200 dpi (1 pixel = 21 μm) (Figure 4) according to the procedure described by Pons *et al.* (2009). The images were saved in TIFF format and analyzed by an in-house software written in FORTRAN (Pons *et al.*, 2009). The grey-level distribution of each image was determined, from which the average grey-level was obtained. Initially, the grey-level distribution of each blank slide that was used in the cultivation system was determined. At any time t , the biofilm's opacity (O) is the difference between the slide's average grey-level at time t and its initial average grey-level. Scanning of a slide takes less than one minute.

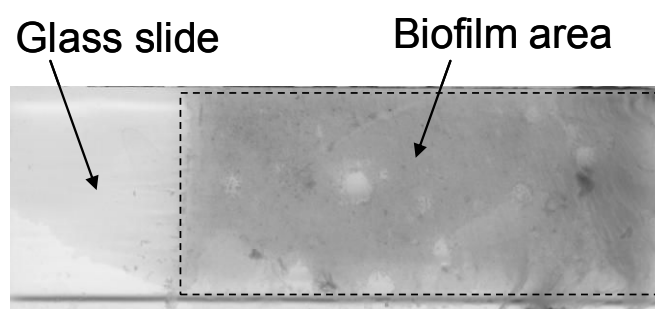


Figure 4: Biofilm opacity measurement, Definition of the area of interest where the biofilm development takes place

2.6. Total solids

Once the thickness and opacity were measured, the slide was dried for 24 h at 105°C. After cooling, it was weighed (weight W_1 at ± 0.0001 g). Then, the slide was washed with sterile deionized water and dried again for 24 h at 105°C. After weighing (weight W_2), the biofilm's mass was determined by the difference between W_1 and W_2 .

2.7. Chemical analyses

After filtration (1.2- μm pore size), the UV-visible spectrum was collected on a Shimadzu UV-1700 spectrophotometer by using a quartz cuvette (path length = 1 cm). The absorbance at 254 nm (A_{254}) was used as a surrogate measurement of the soluble organic matter (Howard *et al.*, 2004). Nitrate, nitrite and ammonium were determined by ion chromatography (Dionex).

3. Results and discussion

3.1. Biological parameters

Figure 5 describes the general behavior of the reactor. The variations in the carbon (Figure 5a) and nitrogen (Figure 5b) contents of the feed are due to the heterogeneity of the dry blood granules. Nitritation was detected around day 20 (decrease in ammonium and increase in nitrites in the reactor) (Figure 5c), while nitrification was installed around day 45 (decrease

in nitrites and increase in nitrates in the reactor) (Figure 5d). A mixed biofilm ecosystem was therefore developing on the glass slides.

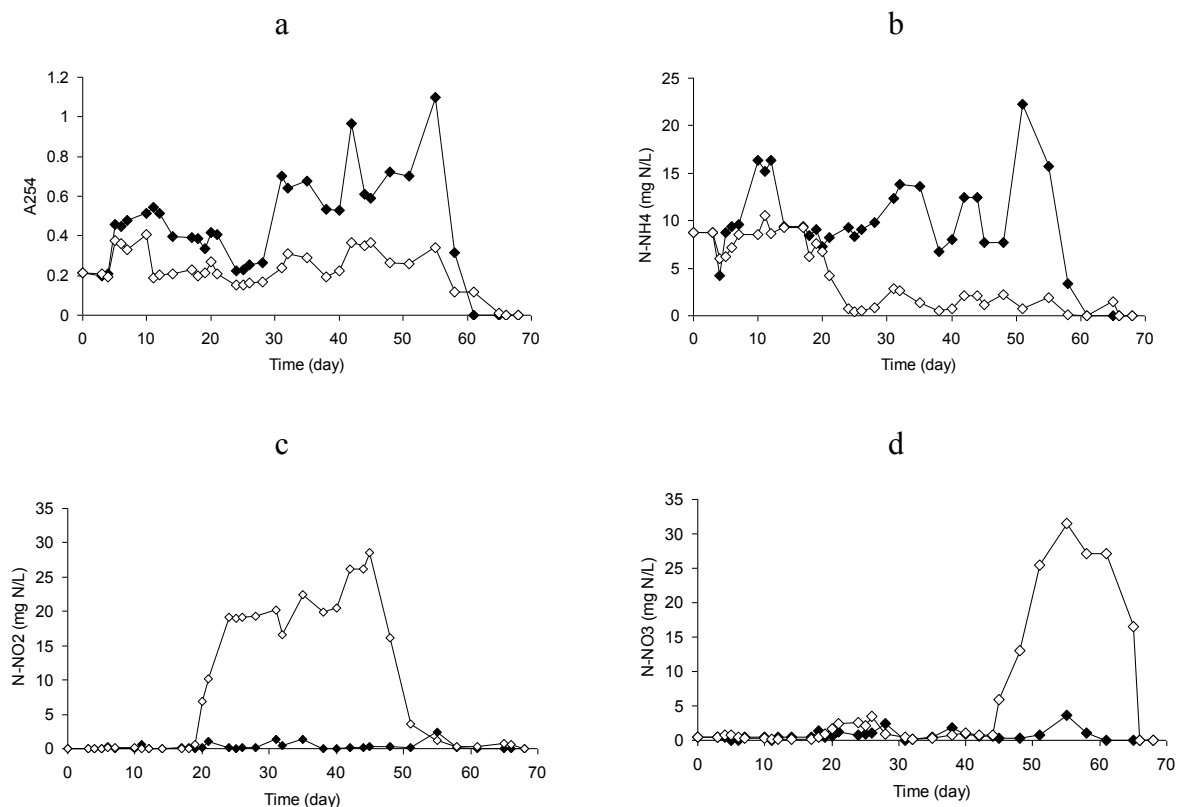


Figure 5: General behavior: A254 (a), ammonium (b), nitrites (c) and nitrates (d). Closed symbols = feed, open symbols = reactor

3.2. Biofilm development

Figure 6 compares the monitoring of the biofilm development based on the four studied parameters. Based on the Crystal Violet method, four development phases can be observed: a first phase between day 2 and day 10, where no apparent biofilm development is observed; a second phase between day 10 and day 40 with a rapid accumulation of the biofilm; between day 40 and day 60 the biofilm is globally stable (phase 3); finally after day 60, phase 4 is characterized by an important biomass loss. The standard deviation was evaluated from the Crystal Violet validation test. During the second phase, the accumulation appears to be exponential with a rate μ_{CV} equal to 0.07 d^{-1} (coefficient of correlation equal to 0.91).

Four development phases were also observed by the total solids method, but the timing was different from what was observed with the Crystal Violet method. The biofilm accumulation seems to be slow between day 2 and day 30, and fast between day 30 and 52. The stationary phase was much shorter. The total solids could not be reliably measured on the last day of the experiment. The standard deviation (5% of the measured value) was evaluated from the weighing device's characteristics. The average accumulation rate, μ_{DW} , during the second

phase was 0.07 d^{-1} ; however, it had a coefficient of correlation equal to 0.71, which is much lower than in the Crystal Violet method.

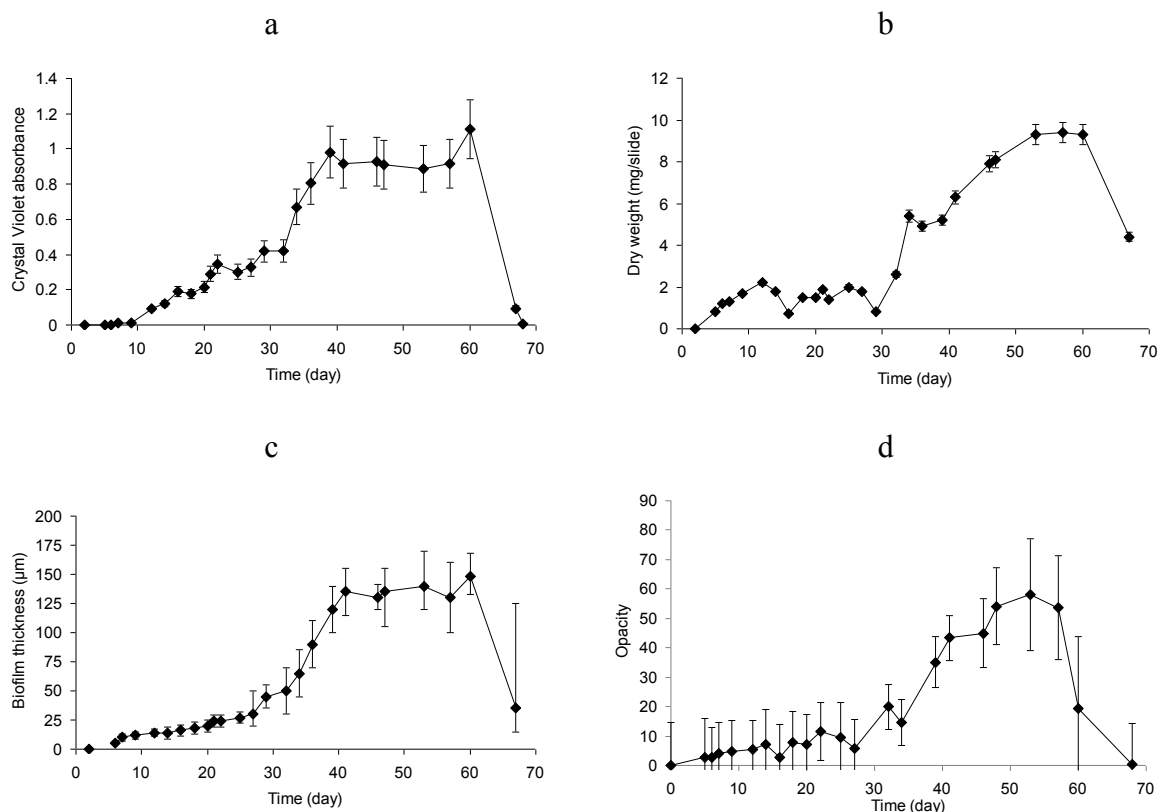


Figure 6: Time course of the biofilm characteristics: Crystal Violet absorbance (a), dry weight (b), thickness (c) and opacity (d). Vertical bars = \pm standard deviation

Four phases were seen by measuring the biofilm's thickness. Before day 5, the biofilm accumulation was too limited to enable any thickness measurement. The second phase between day 5 and day 42 corresponds to an average accumulation rate (μ_T) of 0.09 d^{-1} , with a coefficient of correlation of 0.97. The maximum thickness (140 μm) was reached at day 42. The biofilm thickness could not be reliably measured on the last day of the experiment. The standard deviation increased between day 28 and day 40, and remained large during the stationary phase: it is an indication of the heterogeneity of the biofilm.

Finally, the changes in the opacity reveal a phase of exponential accumulation ($\mu_O = 0.09 \text{ d}^{-1}$) with a coefficient of correlation of 0.87 until day 48, which was followed by both a stationary phase (between day 48 and day 58) and a decay phase (biofilm loss). During the stationary and decay phases, the standard deviation increased, which revealed the heterogeneity of the biofilm. The heterogeneity is due to holes in the biofilm that were caused by sloughing. This heterogeneity is translated in terms of grey level distribution by lighter (in case of holes) and darker (in case of biofilm folding) grey levels. In Figure 7 the slide sampled on day 32 has

opacity equal to 19.9 with a standard deviation equal to 8. The slide sampled on day 60 has a similar opacity (19.2) but a much higher standard deviation (24), due to areas with thick biofilm and areas without any biofilm.



Day 32, opacity = 19.9 (\pm 8)



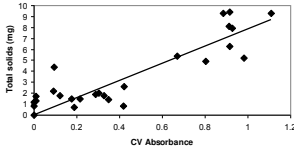
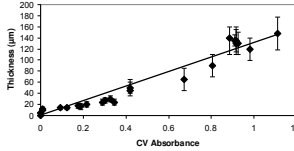
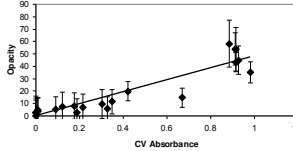
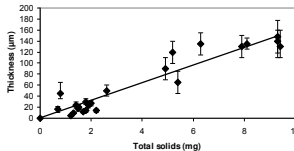
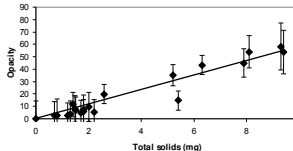
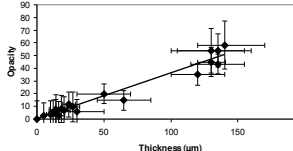
Day 60, opacity = 19.2 (\pm 24)

Figure 7 Comparison of two slides with similar opacity but different standard deviations

3.3. Comparison between the methods

Table 1 compares the different techniques. A good agreement is observed, as reflected by the coefficients of correlation, which were calculated between days 0 and 57 (last day of substrate feeding). The data points are slightly more spread out during the stationary phase, during which a competition between loss by detachment and regrowth occurs. The heterogeneity of the biofilm during this period is expressed by the larger standard deviations observed for opacity and thickness. This additional information is not provided neither by the Crystal Violet method or the total solids method. The biofilm used for the Crystal Violet method is not strictly identical to the biofilm used for the three other methods as the former is growing on side A and the later on side B. As both sides have been cultivated for the same period of time it is assumed that the difference is small. The growth rates that were calculated during the exponential accumulation phase are also in agreement: 0.07 d⁻¹ for the Crystal Violet method and the total solids methods, and 0.09 d⁻¹ for the thickness and the opacity methods. However, the number of points that can be considered for the thickness measurement is limited. Furthermore, it is difficult to measure the thickness of biofilm supports with any shape. The glass slides were perfect for the present experiment but dealing with discs as in Pons et al., (2009) with the same set-up will be more difficult. Theoretically the maximal opacity which can be measured with the scanning parameters used in the present study is 255, which means a maximal thickness around 700 μ m. This is only an order of magnitude as the color of the biofilm, related to the nature of the substrate, can interfere with these calculations.

Table 1: Correlation matrix between the different techniques. For thickness the bars reflect the minimal and the maximal values measured for the slide under consideration. For opacity, the bars reflect \pm the standard deviation of the opacity distribution for the slide under consideration.

	Total solids	Thickness	Opacity
Crystal violet	$R^2 = 0.84$ 	$R^2 = 0.89$ 	$R^2 = 0.88$ 
Total solids		$R^2 = 0.89$ 	$R^2 = 0.92$ 
Thickness			$R^2 = 0.95$ 

4. Conclusion

The nondestructive method of biofilm development monitoring based on a flatbed scanner has been compared to two destructive methods (Crystal Violet staining after biofilm disintegration and total solids measurement) and to another nondestructive method (thickness measurement). The opacity measurement gives more comprehensive information about the biofilm because the standard deviation can be used as a first indicator of the homogeneity of the macrostructure. It is fast (less than one minute per scan), inexpensive and the coupons, which can be as large as the scanner surface, can be put back into the cultivation device without damaging the biofilm. The method can be applied to structured surfaces (Alnnaoui *et al.*, 2008). Long-term experiments, in which competition between loss by detachment and regrowth, can be easily observed over several months as well as the effect of stresses (hydrodynamics, toxicants, etc).

4. Acknowledgements

The authors wish to thank Zone Atelier Moselle, Région Lorraine (CPER) and Institut Carnot ICEEL for their financial support.

III.2. Article II: Influence of structured surfaces on biofilm development: experiment and modelling

Muatasem ALNNASOURI^{1,2}, Cécile LEMAITRE¹, Caroline GENTRIC^{1,+}, Christophe DAGOT², Marie-Noëlle PONS^{1*}

¹. Laboratoire Réactions et Génie des Procédés, CNRS, Nancy Université, INPL
1, rue Grandville, BP 20451, Nancy cedex, France

². Groupement de Recherches Eau Sol Environnement, ENSIL
1, rue Atlantis, Parc ESTER Technopôle, BP 6804, 87068 Limoges cedex, France

* Corresponding author: tel : +33 3 83175277 ; fax : +33 383175326,

E-mail: marie-noelle.pons@ensic.inpl-nancy.fr

+ Present address: GEPEA, CRTT, 37 boulevard de l'Université, BP 406, 44602 Saint-Nazaire

Abstract: A long-term monitoring method based on images produced by a flat-bed scanner and initially developed for smooth surfaces has been extended to the case of transparent structured surfaces. The method was then applied to monitor the effect of rotation speed changes in lab-scale rotating biological contactors (RBCs). Two RBC bearing each five discs (two with a smooth surface and three with a structured surface) were run initially at two different rotation speeds: 4 rpm for reactor I and 40 rpm for reactor II. After 47 days the rotation speed was increased in reactor I to 40 rpm and decreased in reactor II to 4 rpm. Prior to the rotation speed change the biofilm on smooth discs suffered large detachments in both reactors but the biofilm on structured discs was less damaged. The increase of the rotation speed induced a large detachment of the biofilm in reactor I on all discs but the biofilm on the structured discs recovered better with a faster regrowth. On reactor II, the decrease of the rotation speed favored the development of the biofilm. The analysis of the wall stress distribution obtained by CFD simulations on smooth and structured discs at different rotation speeds could be correlated to the experimental observations.

Keywords: Biofilm, RBC, Structured discs, Image analysis, Wastewater.

1. Introduction

Biofilms grow spontaneously wherever water is found in both natural environments and industrial installations (Donlan et al., 2002). Many biological reactors have been developed in order to treat wastewaters and reach satisfactory purification levels. Rotating biological contactors (RBC) are biological treatment systems (Benefield et al., 1980; Antonie, 1987) in which biofilm develops on the surface of discs or on carriers in cages rotating around an axis to treat domestic (Eddy et al., 2003; Hiras et al., 2004) and industrial wastewater (Tyagi et al., 1993; Banerjee et al., 1996; Costley and Wallis, 2001; Guimarães et al., 2005; Najafpour et al., 2006; Sahinkaya and Dilek, 2006). In such systems the microorganisms are exposed successively to gas (air) and liquid (wastewater) phases. These systems are popular because of their resistance to high hydraulic and organic loads, easiness of operation and low operating cost.

The main objective of the surface is to help the adhesion of the microorganisms. The development of biofilm in RBC is subject to several factors. Surface topography and roughness are two of the important factors affecting cellular attachment on surfaces (Characklis et al., 1990; Bryers et al., 1994; Apilfinez et al., 1998; Boyd et al., 2002). The adhesion of bacteria on scratched or rough surfaces is stronger than on flat ones (Tebbs et al., 1994; Flint et al., 2000; Medilanski et al., 2002; Whitehead and Verran, 2006). Mark et al. (2001) confirmed that biofilms of *P. aeruginosa* developed better on rough surfaces than on smooth ones. Thinner biofilms develop on smooth surfaces than on structured and rough surfaces (Shams et al., 2003; Mervyn et al., 2007). It seems also that biofilm initiation is slower on a smooth surface (Pasmore et al., 2001). Structured surfaces provide more niches for microorganisms to attach (Geesey et al., 1996) and the biofilm density is increased (Li et al., 2004; Dimitar et al., 2007). They create zones of low shear stress where attached bacteria are protected from the forces that could remove them away.

Biofilm thickness depends on applied shear forces and therefore on disc speed (Griffin and Findlay 2000). When the rotation speed is high, biofilm will detach or slough from the surface more easily, which affects immediately the effluent quality in the reactor (Cortez et al., 2008). Tchobanoglous and Burton (1991) suggested that to enhance the sloughing of biofilm, the variable rotational rate or the ability to reverse shaft rotation must be applied to RBC units.

In order to study the biofilm itself on discs during a long time period (3 months), the image analysis method proposed by (Milferstedt et al., 2006) has been used. The method was

adapted to be applied on circular supports for analyzing biofilms on discs by Pons et al. (2009). Its applicability to structured surfaces is hereby tested. The analysis of image texture by the method of Spatial Gray Level Dependence Matrix (SGLDM) (Haralick et al., 1973) gives supplementary information about the biofilm macrostructure (Yang et al., 2000; Milferstedt et al., 2007, 2008). This method characterizes visual texture based on the grey-level distribution of pixel pairs. CFD modelling of the stress on the disc surface was conducted in order to have a better insight of the differences between smooth and structured surfaces. Vikhansky et al. (2004) and Fei et al. (2000) have modeled the flow pattern in rotating disc contactor but at a much higher rotation speed (up to 1500 rpm), in presence of baffles and with a vertical shaft. In general the focus of such modelling has been on mass transfer (Zanfir et al., 2007) and not on wall stress.

2. Materials and Methods

2.1. Experimental setup

Two laboratory rotating biological contactors (I and II) with a tank volume of 2.5 L were used (Figure 1). All used discs (diameter = 100 mm) were made out of Plexiglas. Waterline was situated at 38%. Structured discs B and D have grooves with dimensions (2x2 mm) as illustrated on Figure 2. Discs B have a spider net pattern and concentric grooves have been made on discs D. Structured disc C was obtained by gluing rises (made of PVC thread of 2mm in diameter) on the disc following the same spider net pattern than on disc B. Experimental rotation speeds were $V_1=4$ and $V_2=40$ rpm.

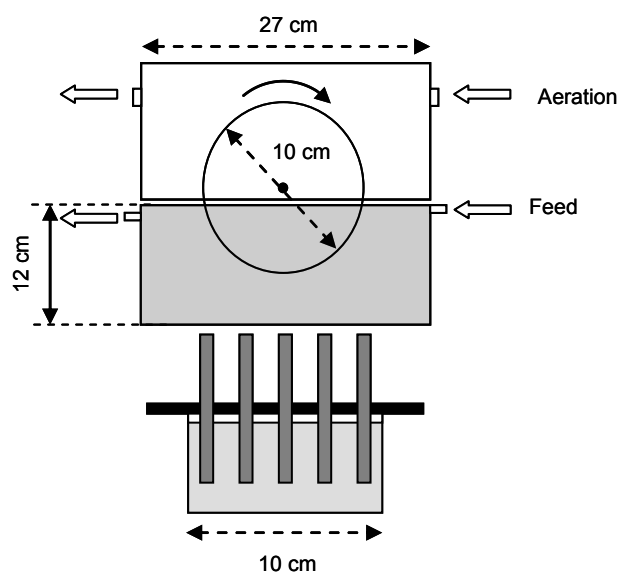


Figure 1: Lab-scale rotating biological contactor: top and side views.

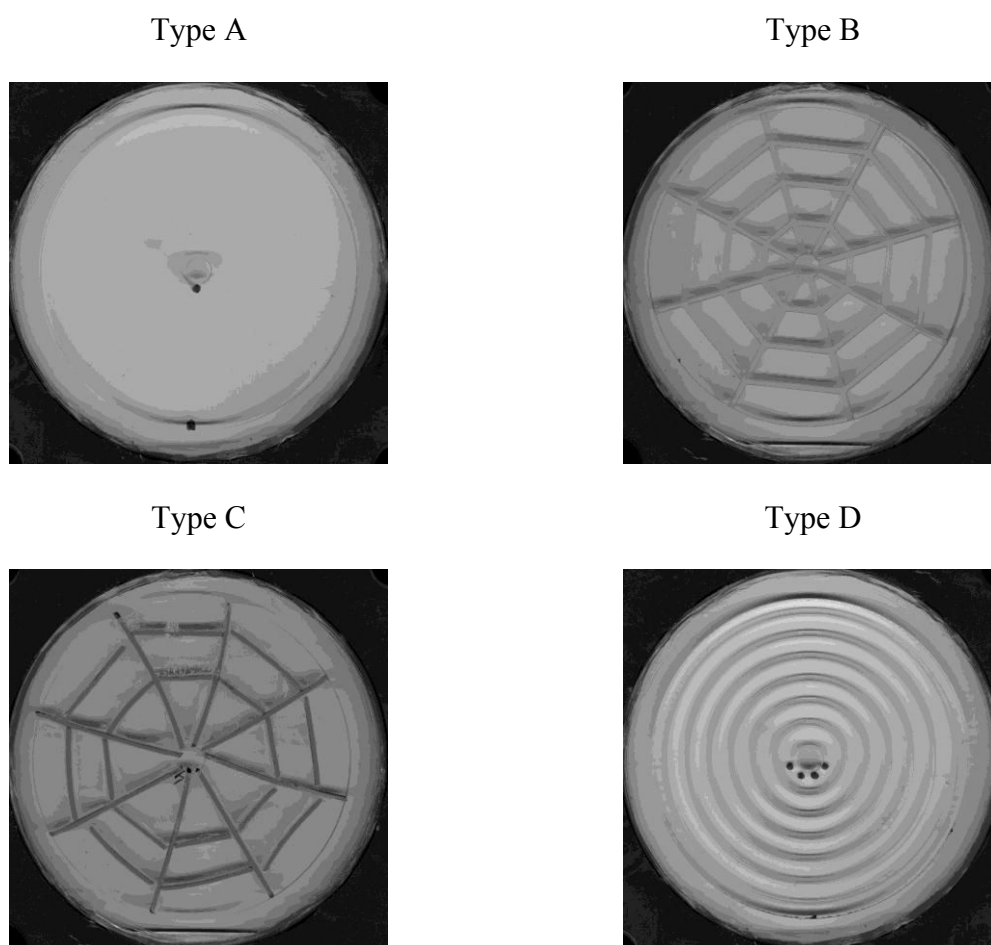


Figure 2: The different types of discs before inoculation

In all runs, urban wastewater (sampled at Greater Nancy wastewater treatment plant, Maxville, France) was fed at a constant flowrate of 2.5 L/day. In Run 2, the feeding was switched to a synthetic substrate on day 17. Synthetic substrate was prepared by dilution of a stock solution (50 ml/L) composed of (100 g of meat extract (Viandox®, Amora, Dijon, France), 5 g NH_4Cl , 0.25 g Na_2HPO_4 , 5.7 g/L sucrose) stored at 4°C. Inoculation was carried out in batch mode for 48 hours using municipal wastewater from Maxéville (France) wastewater treatment plant. Surface aeration was provided by an air pump at 1 L/min.. The schedule of each run is summarized in Table 1.

Table.1: Summary of experimental conditions

N° Experience	Setup
Run 1	Reactor I; Five discs; 3 discs A, 1 disc B and 1 disc C. Space between two discs: 1 cm; speed V_1 . One disc A was definitively removed from the reactor after 22 days for biofilm weight measurement and replaced by a new disc A
Run 2	The two reactors were run in parallel. Reactor I: speed V_1 then V_2 starting from day 55, five discs (2 discs A, 1 disc B, 2 discs D); space between two discs: 1 cm; Reactor II: speed V_2 then V_1 starting from day 55: same disc configuration; feed: waste water till day 17 then synthetic substrate.

Liquid samples from substrate and reactors were collected and filtered (pore size = 1.2 μm) to evaluate the global biological activity of biofilm with respect to time. After filtration, the samples were analyzed for N-NH_4 using Nessler method with a Hach DR2000 spectrophotometer. The UV-visible spectra were collected on a SECOMAN Anthélie Light UV-1700 spectrophotometer using a quartz cell (path length = 1 cm). The absorbance at 254 nm (A_{254}) was used as a surrogate measurement of the soluble organic matter (Howard et al., 2004). Nitrate were determined by ion chromatography (Dionex) with the following parameters: mobile phase: KOH 30 mM, injection volume 15 μl , run time 13 min, column temperature 20 $^\circ\text{C}$, detection temperature 25 $^\circ\text{C}$, mobile phase flow 1ml/min. Deionized water was used as blank for all analyses. Biofilm dry weight was determined by detaching carefully with a clean spatula the biofilm from each disc, drying it in an oven at 105 $^\circ\text{C}$ for 24h and weighting.

2.2. Image acquisition and analysis

The discs were removed approximately every two days and imaged on an Epson 4490 flatbed scanner at a resolution of 800 dpi (corresponding to a spatial resolution of $\Delta x = \Delta y = 0.0317$ mm/pixel) and 256 gray levels. The backside of the disc was cleaned before observation. Scanning of a disc takes less than 1 minute. The images were saved in TIFF format and analyzed by an in-house program developed in FORTRAN (Pons et al., 2009). For each disc, opacity and its standard deviation are calculated. Opacity is the difference between the average gray level at any time and the average gray level of the discs at $t=0$. It is used to estimate the total amount of biomass on the discs. Among the 13 parameters usually calculated to assess visual texture by the SGLDM method, energy and homogeneity were more specifically used to monitor the macrostructure. The application of the SGLDM method requires rectangular areas of interest. A geometric transformation is therefore applied to

create these images (Figure 3). The texture parameters were calculated along the lines of the modified images, for a distance of 50 pixels (= 2.44 mm). Full details are available in (Pons et al., 2009).

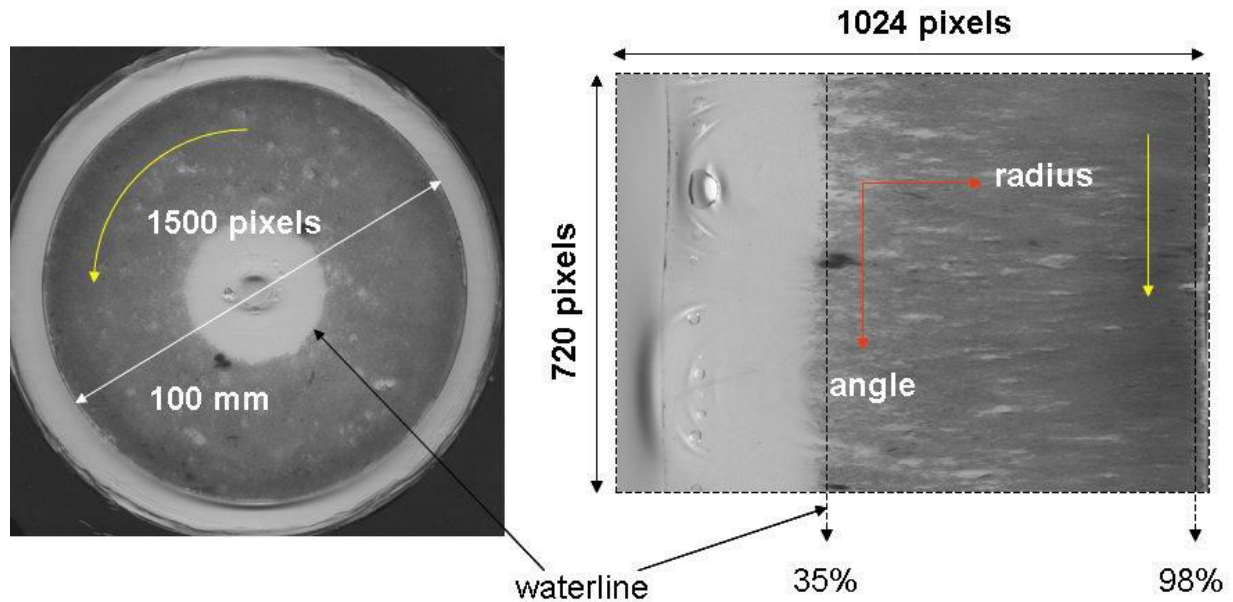


Figure 3: Transformation of the disc (left) into a rectangular image (right)

2.3. Modeling

A three-dimensional modeling study was conducted using Fluent 6.3 (ANSYS France SAS, Montigny-le-Bretonneux, France) for a smooth disc and a disc with concentric grooves. According to the geometry of the system and in order to reduce computational cost, only one half of the domain was modeled: one disk partially immersed in the tank with a symmetric boundary. The grid was generated with the pre-processor Gambit 2.4 and was made of 895 362 cells for the smooth geometry (Figure 4) and 937 344 cells for the disc with concentric grooves. Three rotation speeds were tested: 4, 20 and 50 rpm. For 4 rpm ($Re_{\phi}=6 \cdot 10^5$) and 20 rpm ($Re_{\phi}=3 \cdot 10^6$) a laminar model was considered and 1st order upwind discretization schemes were used. For 50 rpm ($Re_{\phi}=8 \cdot 10^6$), a standard k-omega turbulence model was implemented, assuming transitional flow. 1st order upwind and QUICK discretization schemes were used. Convergence was achieved when all residuals fell below 10^{-4} and when the local velocity in four different points was stabilized. In the turbulent case, the dimensionless wall distances were checked to be smaller than 5.

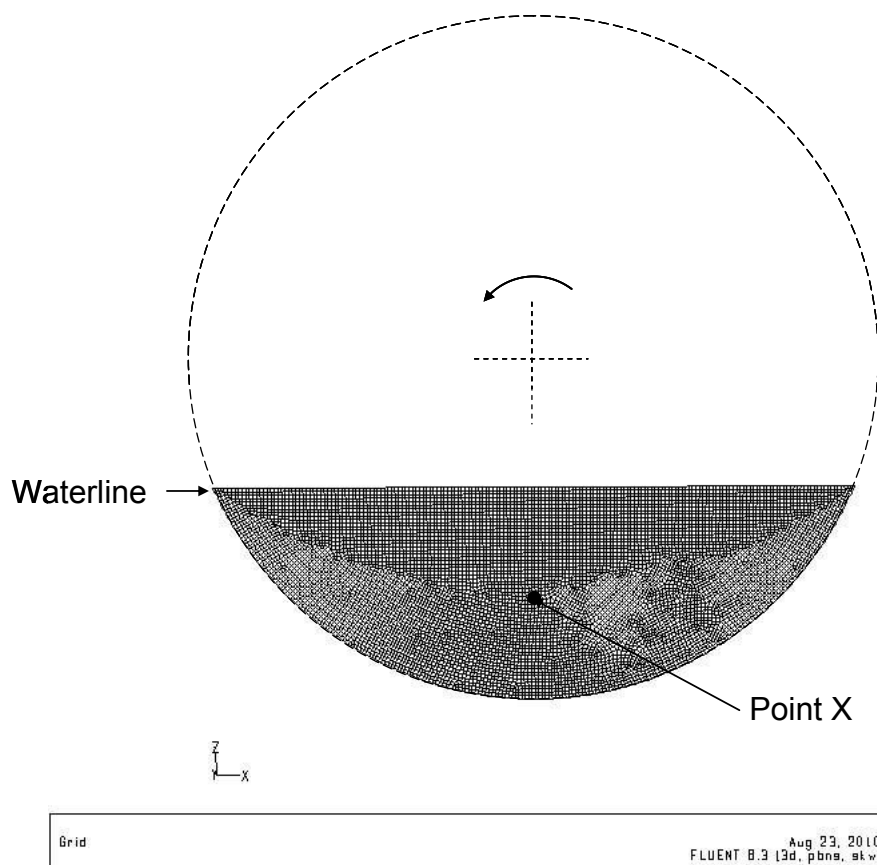
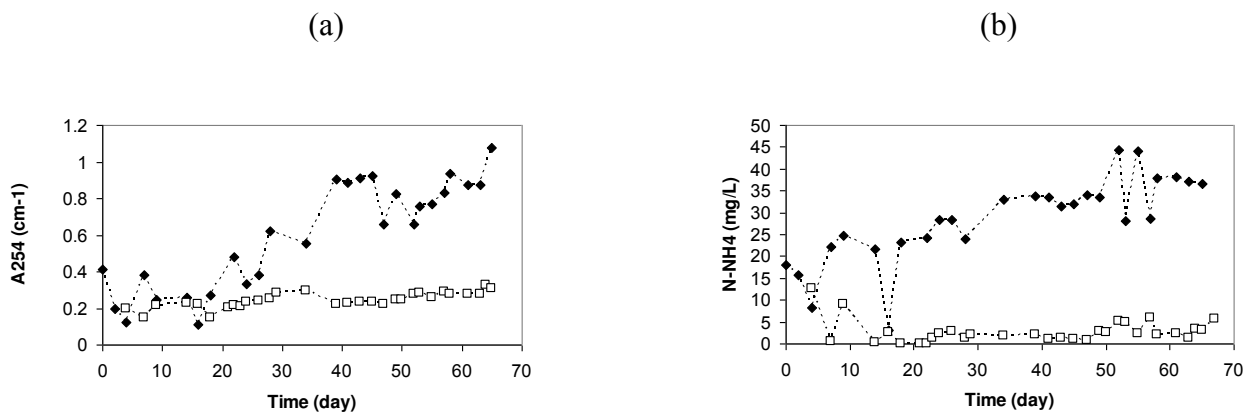


Figure 4: CFD grid for the smooth disc case

3. RESULTS

Figure 5 summarizes the global behavior in terms of soluble COD via A_{254} (a) (Mrkva, 1983) and inorganic nitrogen species (b) for Run 1. Due to the use of real wastewater, there is a high variability of the soluble COD and $N-NH_4$ at the inlet of the reactor. Full nitrification was achieved on day 15 (Figure 3 b) which indicates the development of nitrifying biomass in the system. In Run 2, $N-NH_4$ in the synthetic feed was 20 mgN/L and the residual $N-NH_4$ in both reactors was 5 mgN/L, with a $N-NO_3$ concentration of 10 mgN/L.



**Figure 5: Global biological behavior of biofilm reactor in Run 1: (a) A_{254} , (b) $N-NH_4$,
 (◆) inlet and (□) outlet.**

Figure 6 describes the variations of opacity and its standard deviation during Run 1. After 22 days disc R1-A2 was destroyed and replaced by a new disc (R1-A4). Between inoculation and 30 days, the average maximal development rate of the biofilm on the three smooth discs initially set in the reactor was 0.24 d^{-1} . It was higher for disc R1-A4: 0.72 d^{-1} . The opacity standard deviation started to increase on these discs after 30 days for discs R1-A3 and R1-A4, which indicates the presence of void zones on the discs. These void zones are due to biofilm detachment. Very severe detachment events occurred on discs R1-A1 and R1-A4 at 50 and 45 days respectively. Immediate regrowth was observed on these discs as well as on discs R1-A3. But the biofilm remained patchy, which is translated by high opacity standard deviations. Concerning the structured discs, the opacity increased steadily until day 60 for disc R1-B and until the end of the experiment for disc R1-C. The maximal development rate was slightly lower than on the smooth discs: 0.16 d^{-1} for R1-B and 0.18 d^{-1} for R1-C. Biofilm detachment occurred on disc R1-B only on day 60, so much later than on smooth discs. The initial opacity standard deviation was higher on these discs than on the A-type discs due to the presence of grooves or rises. But this structuration was not hindering the monitoring of biofilm development using the scanner technique.

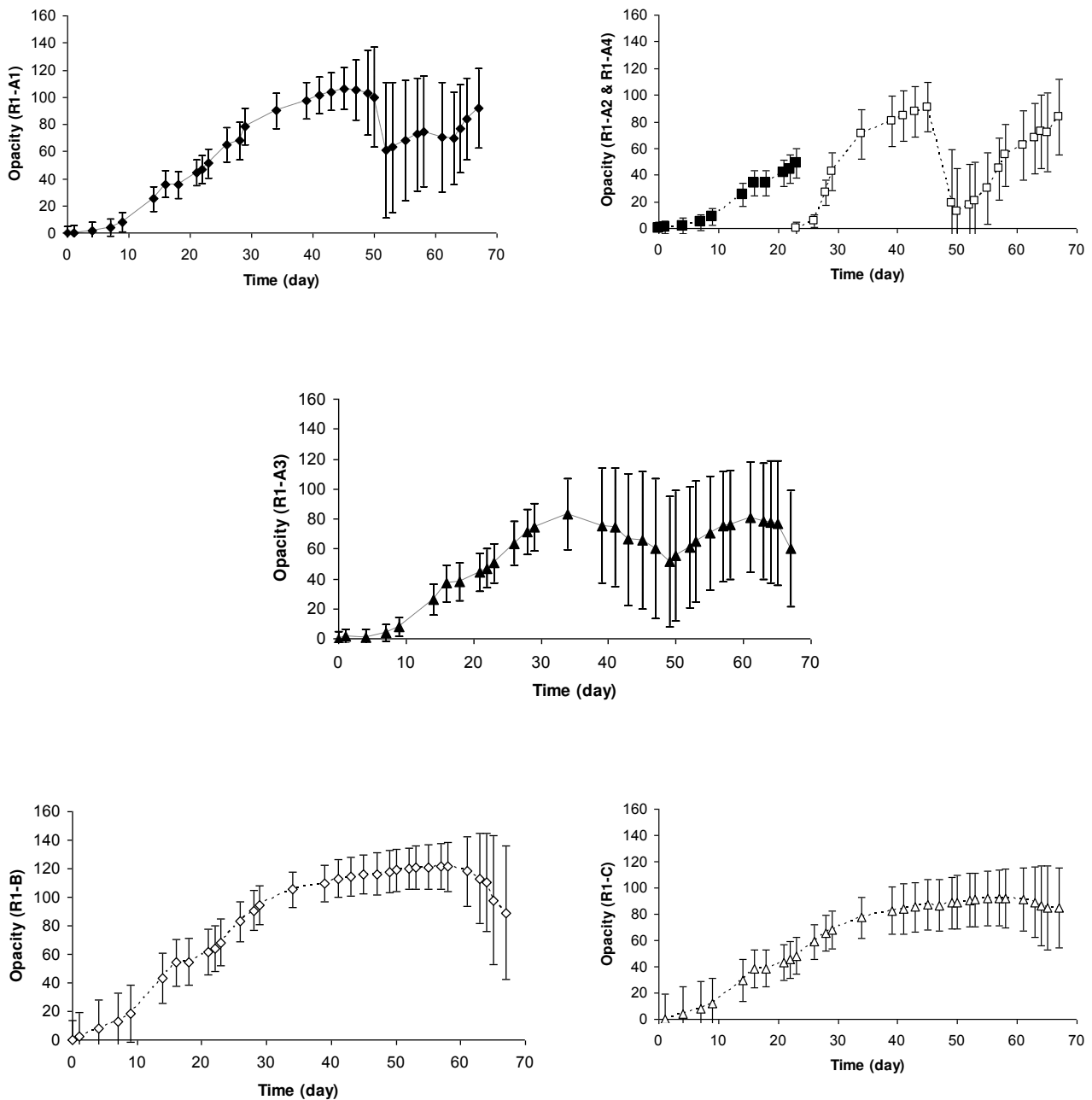


Figure 6: Opacity and its standard deviation for Run 1. (◆) A1, (■) A2, (▲) A3, (□) A4, (◇) B and (Δ) C.

The initial visual texture is very different between the smooth and the structured discs. Homogeneity and energy (Figure 7) are much higher for smooth discs than for structured ones. This is related to the fact that on structured discs, the grooves and rises are visible on the images. Between days 20 and 50 the textural descriptors are similar for all discs (except R1-A4 introduced on day 23). Between 30 and 40 days, the intra-disc coefficients of variation of homogeneity are 5.3% and 12% for discs R1-A1 and R1-A3 respectively, 4.9%

for disc R1-B and 3.7% for disc R1-C. They are higher for energy (7.8%, 24%, 14.1% and 8.9% respectively). Concerning the inter-disc coefficients of variation, they are 3.7% for homogeneity and 21.2% for energy, in the same range as the intra-discs coefficients. The bias induced initially by the disc structuration has disappeared. Unfortunately it was not possible to measure the biofilm thickness without damaging the biomass. A rough estimate of the thickness is that it was of the order of 1000 μm before the sloughing events. The top surface of the biofilm was smooth; the grooves were not visible and were therefore filled by biomass.

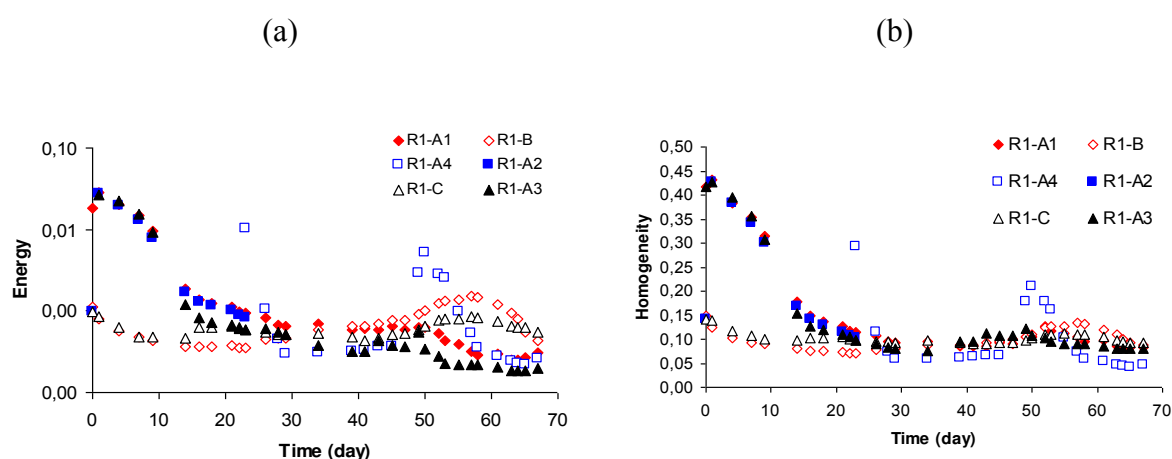


Figure 7: Energy (a) and homogeneity (b) for Run 1

Figure 8 shows the development of biofilm on two type-A discs (R2-A1 and R2-A5), one type-B disc (R2-B) and two type-D discs (R2-D1 and R2-D2) during Run 2 in both reactors. In reactor I, which was started at low rotation speed, there is more biomass developing on the structured discs than on smooth ones until day 32. This confirms the results obtained in Run 1. The biofilm on the smooth discs was sloughed off on day 32. A slight detachment is noticed on disc R^I2-B, which could be due to collision with fragments detached from the smooth discs, which lost most of their biomass. Regrowth is observed on discs R^I2-A1, R^I2-A2 and R^I2-B. When the rotation rate was increased to 40 rpm, after 47 days, all discs experienced immediately a large sloughing event. Smooth discs lost almost all their biomass. Biofilm redeveloped again later on all discs, although to a smaller extent on the smooth discs. In reactor II, which was started at high rotation speed, the biofilm developed initially well on the five discs but there is more difference between these discs than between the discs in reactor I. A very large sloughing event occurred on disc R^{II}2-A1 and R^{II}2-B at 32 days. The second smooth disc (R^{II}2-A2) suffered from a similar event on day 38. Some biofilm was destroyed on discs R^{II}2-D1 and R^{II}2-D2 on day 32, but the biofilm on these discs remained

intact later on. After the switching to a lower rotation speed on day 47, the biofilm on the structured discs exhibited a higher development than on the smooth discs.

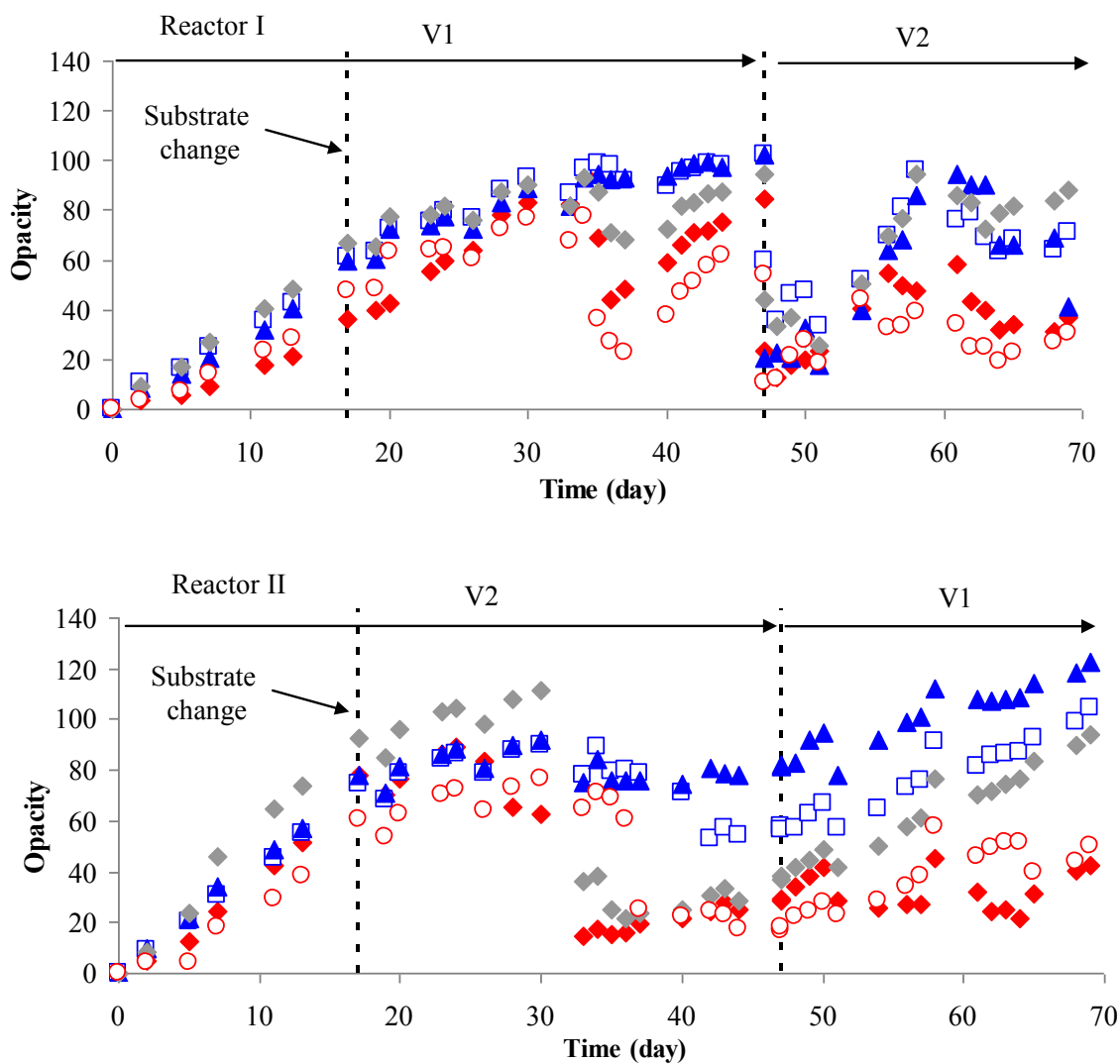


Figure 8: The development of biofilm in Run 2 for reactors I and II. R^{II}2-B (◆), R^{II}2-D1 (□), R^{II}2-D2 (▲), R^{II}2-A1 (◆) and R^{II}2-A2 (○); V1 = 4 rpm and V2 = 40 rpm

Figure 9 illustrates the fate of the biofilm on three discs of reactor I before (a) and after (b) increasing the rotation speed. In the structured discs biofilm in the grooves is protected from the increased shear. Large biofilm fragments remain trapped without suffering from detachment/sloughing. On the smooth disc the biofilm suffers from a total sloughing because of shear force. In this run the biofilm was highly filamentous and the filament entanglements enhanced the mechanical strength to the biofilm itself. The biofilm tends to fold around the shaft. However these filaments facilitated also the detachment as the biofilm could be more easily peeled off of the surface.

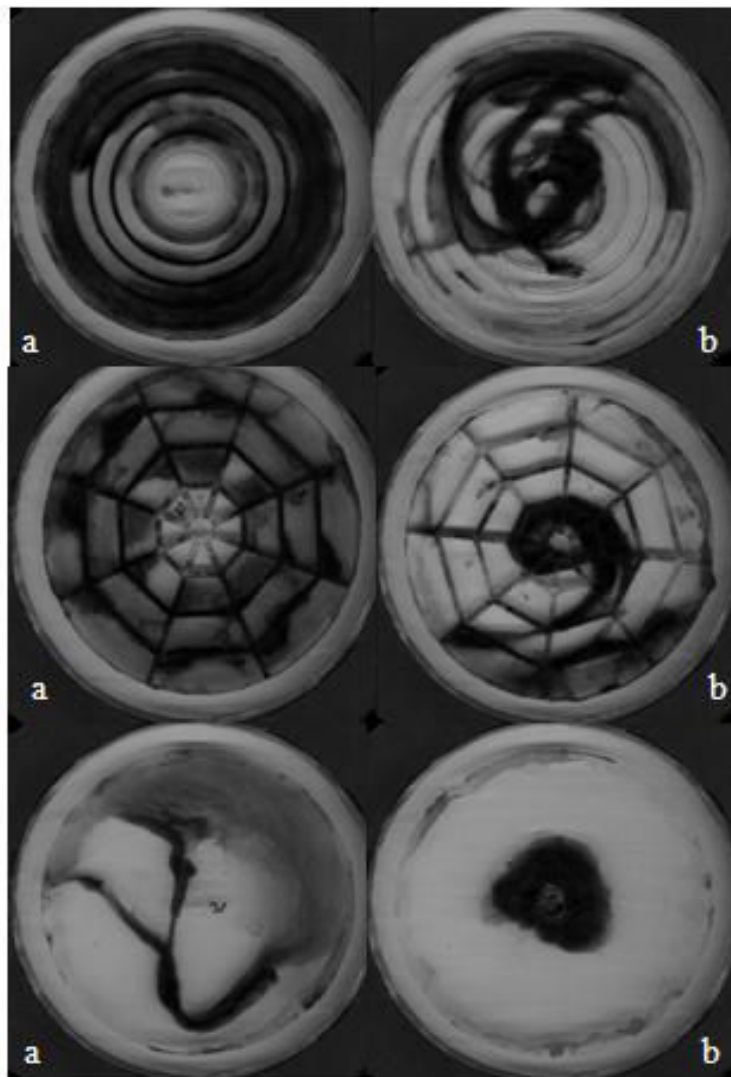


Figure 9: R₂-D, B and A1 (from top to bottom) before (a) and after (b) changing rotation from V1 to V2 at day 47.

In Figure 10, the relations between opacity and dry weight obtained in Run 1 and in Run 2 are compared. A satisfactory regression coefficient is obtained for both runs but obviously the relations are different between the runs. Indeed different biomass developed in Run 1 (fed with wastewater) and in Run 2 (fed with synthetic substrate after day 17). In Run 2, the biofilm was highly filamentous, which was not the case in Run 1.

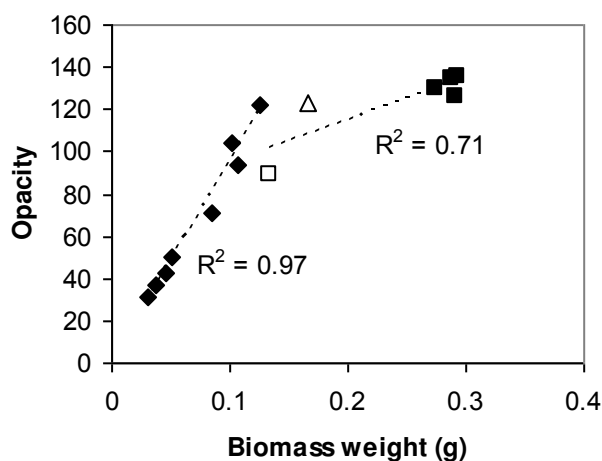


Figure 10: Comparison of the opacity-dry weight relation for Run 1 (■ for all discs except R1-A2 (□) and R1-A3 (Δ)) and Run 2 (◆)

Based on the CFD simulations, Figure 11 presents the distribution of wall stress over the discs surface for the three tested rotation speed: 4, 20 and 50 rpm. Figure 12a summarizes the wall stress distribution over the immersed surfaces. The largest differences are obtained for the lowest wall stresses. In average the wall stress is higher on the flat surface (total disc in the case of a smooth disc and between grooves in the case of structured discs). When the rotation speed is multiplied by 12.5 (from 4 to 50 rpm), the maximal wall stress is multiplied by 31. The average wall stress on the flat surfaces is also multiplied by 30. In any case the highest wall stress is located at the level of the waterline, when the biofilm enters the liquid phase (Figure 13). Figure 12b compares the velocity profiles in the liquid phase away from the discs, along a line in the Y direction originating from point X (Figure 3). There is no effect of the structuration at 4 rpm and 20 rpm and a slight effect at 50 rpm. The flow pattern around the discs will affect the access probability of bacteria, protozoa and metazoa available in the bulk in their efforts to colonize the disc surface.

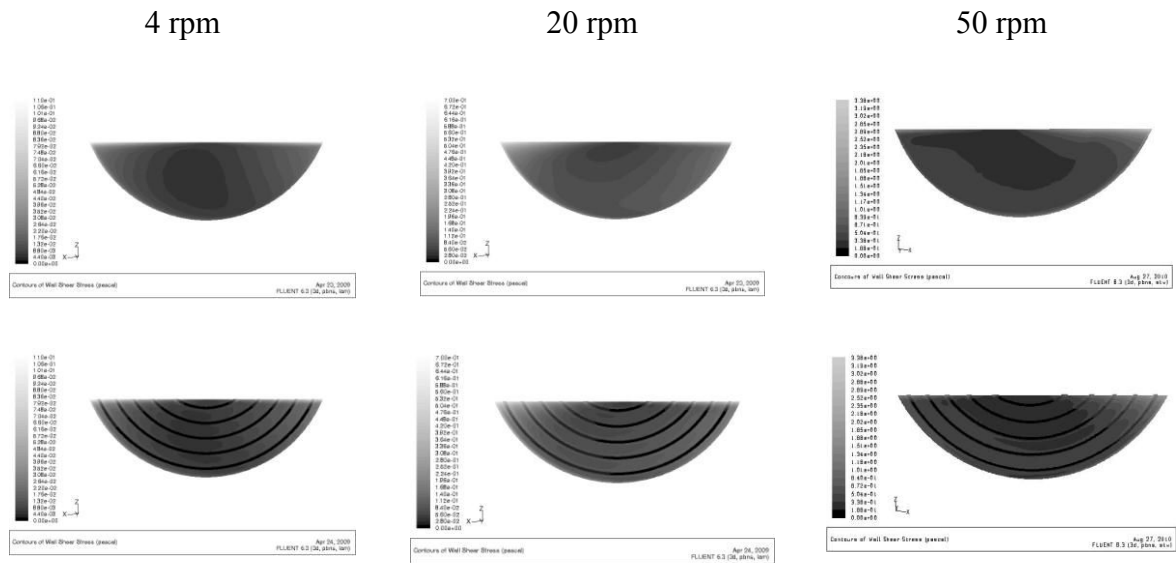


Figure 11: Wall stress distribution at three rotation speeds for smooth and structured discs.

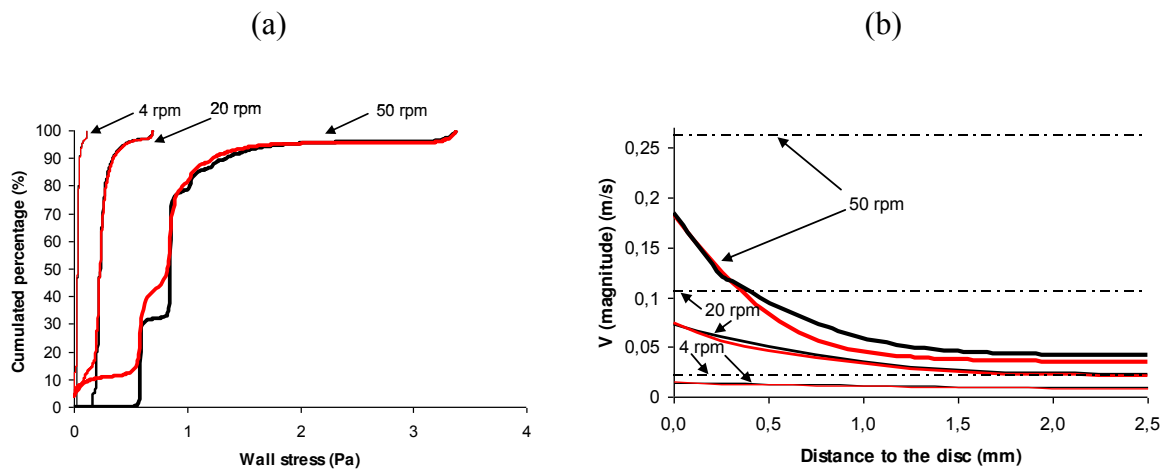


Figure 12: (a) Wall stress distribution and (b) velocity magnitude along a line in the Y direction originating from point X (Figure 4). Black line = concentric grooves, red line = smooth surfaces. Dotted lines = maximal velocity

In Figure 13, the wall stress profiles along a vertical line joining the center of rotation to the disc outer edge are compared for the three rotation speeds. It can be seen that at 4 rpm and 20 rpm the wall stress is null in the grooves. However at 50 rpm, some non-zero stress can be seen at the entrance of the grooves. This explains the shape of the wall stress distribution (Figure 12a) at the highest rotation speed.

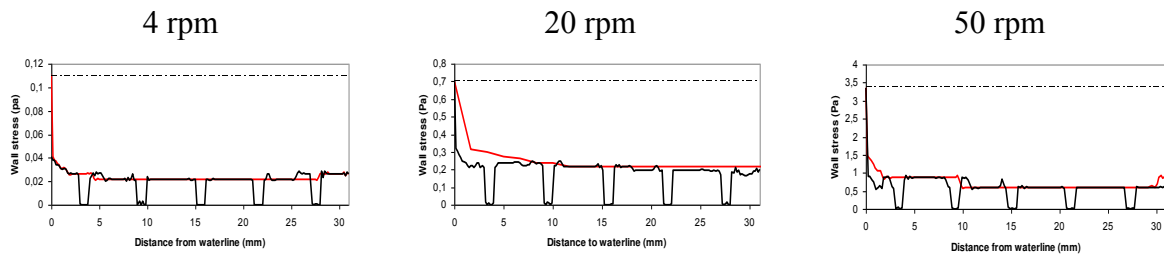


Figure 13: Wall stress profile along a vertical line. Red line = smooth disc, black line = structured disc, dotted line = maximal stress

5. CONCLUSIONS

The scanning method that has been initially developed for monitoring biofilm development over long period of time on smooth surfaces could be extended without problem to structured discs. It was used to compare the behavior of biofilms subject to hydrodynamical stress caused by a variation of the rotation speed. On structured discs, biofilm tends to fill the grooves where the microorganisms are protected from shear stress. Whatever the shape of the disc surface important biofilm detachment was observed when the rotation speed was increased. The biofilm trapped in the grooves, where the wall stress is lower as demonstrated by CFD simulations, remained and might play a role of seed to favor the regrowth of the biofilm.

6. ACKNOWLEDGEMENTS

The authors would like to thank, the Government of Syria and ICEEL for financial support and J. Hickman and S. Rockowitz for their help in biofilm monitoring.

III.3. Article III: Long-term biofilm monitoring of a rotating biological contactor

Muatasem ALNNASOURI^{1,2}, Christophe DAGOT², Marie-Noëlle PONS^{1*}

¹Laboratoire Réactions et Génie des Procédés, CNRS, Nancy Université, INPL

1, rue Grandville, BP 20451, Nancy cedex, France

²Groupement de Recherches Eau Sol Environnement, ENSIL

1, rue Atlantis, Parc ESTER Technopôle, BP 6804, 87068 Limoges cedex, France

*Corresponding author; tel: +33 3 83175277; fax: +33 383175326

E-mail: marie-noelle.pons@ensic.inpl-nancy.fr

Abstract

The long-term monitoring (200 days) of biofilm development on transparent Plexiglas discs in a rotating biological contactor (RBC) was conducted to observe the growth/regrowth phases and detachment/sloughing phenomena. An image analysis technique was applied to monitor these events by using an opacity index (directly related to the amount of biomass) and visual texture descriptors related to the biofilm macrostructure and were assessed via the Gray Level Run Length method (GLRL method). The initial growth phase and the two subsequent regrowth phases were very similar in terms of opacity and macrostructure for the ten rotating discs. A sloughing period of 40 days was observed after the initial development phase, during which all the discs suffered from biofilm detachment at different dates. On the contrary, the biofilm detachment observed between the first and the second regrowth phases occurred on all discs simultaneously. A dynamic steady-state was therefore observed with series of detachment and re-growth phases. The image analysis method confirms that it is possible to monitor biofilm development over long periods to investigate the reaction of the biofilm to various operation conditions.

Keywords: biofilm; image analysis; Gray Level Run Length method; rotating biological contactor

1. Introduction

Rotating biological contactors (RBC) are biological treatment systems (Benefield et al., 1980; Antonie, 1987) in which biofilms, i.e. an agglomeration of micro-organisms embedded in an extracellular polymeric matrix; develop on the surface of discs or cages rotating around an axis. They are widely used configurations to treat domestic (Hiras et al., 2004) and industrial (Tyagi et al., 1993; Costley and Wallis, 2001; Guimarães et al., 2005; Najafpour et al., 2006; Sahinkaya and Dilek, 2006) wastewater because of their resistance to high hydraulic and organic loads, ease of operation and low operating cost. RBC's can be run aerobically, anoxically (Teixeira and Oliveira, 2001) or anaerobically (Lu et al., 1997; Castillo et al., 1999). Groundwater remediation using this technique has also been proposed (Mohseni-Bandpi and Elliott, 1996).

Biofilm development is a combination growth and regrowth phase, alternating with phenomena of erosion, detachment and sloughing. Earlier studies have examined biofilm formation in various ecosystems and concluded that bacteria form biofilms fundamentally in the same manner regardless of which environment they occupy (Costerton et al., 1987). Most studies monitor only the initial development of biofilms (i.e., over a few weeks) (Trulear and Characklis, 1982; Tolker-Nielsen et al., 2000; Telgmann et al., 2004). Experiments on young biofilms have revealed the significance of growth conditions on biofilm development. However, these results may not be applicable to biofilms in industrial systems that develop over months or even years. Van Loosdrecht et al. (1987) suggested a general mechanism for the development of biofilm structures that is based on a balance of growth and detachment. Biofilms detach partly (erosion or abrasion) as a result of insufficient internal cohesive links (Rittmann, 1989). However, if the binding between the biofilm and the substratum surface is weak, biofilms may entirely detach (slough) under high shear conditions. The type of detachment has a significant effect on the biofilm morphology (Picioreanu et al., 2001). Detachment and sloughing increase the heterogeneity of the biofilm morphology (Telgmann et al., 2004). It is suggested that even small sloughing events could disorder a smooth biofilm and cause further and more severe sloughing events.

The influence of growth history and dynamic detachment events on biofilm morphology and stability are currently not well understood (Morgenroth, 2003). It is suggested that the growth history significantly influences the biofilm structure (Telgmann et al., 2004). According to Rittmann (1980), the non-uniformity in many biofilms is uni-directional and perpendicular to

the surface. Heterogeneity may be defined as spatial differences in biofilm thickness, surface roughness, porosity, etc.

Monitoring biofilm development over long periods is difficult because a highly performing, non-destructive method is needed to preserve the biofilm over a long experiment. Recently, an image analysis procedure based on images obtained via a flatbed scanner has been developed (Milferstedt et al., 2006) and applied on laboratory rotating disc reactors without destruction of the biofilm after 14 weeks (Pons et al., 2009). Biomass weight and biofilm thickness are correlated with the average biofilm opacity calculated from the images' gray-level histogram (Milferstedt et al., 2006). In (Milferstedt et al., 2006) the biofilm macrostructure is characterized on the same images by visual texture assessment using the Spatial Gray-Level Dependence Matrix (SGLDM). One difficulty of the SGLDM method, which is one of the best methods for visual texture assessment, is that the descriptors used to characterize the visual texture are not easy to understand. Yang et al. (2000) tested also the SGLDM method but indicated that it might be necessary to investigate other visual texture assessment method. The Gray Level Run Length method (GLRL) (Galloway, 1975) is another method of texture characterization, which is based on the distribution of the pixel segment lengths having the same gray levels. This method is used less frequently than the SGLDM method, but the descriptor interpretation is simpler.

The objective of this paper is to demonstrate the usefulness and ease of image analysis as a non-destructive technique to monitor the evolution of biofilms in an RBC over a very long time period (200 days) containing different growth/regrowth phases and to evaluate the GLRL method to characterize the biofilm macrostructure.

2. Materials and Methods

2.1. Experimental setup

A laboratory rotating biological contactor with a tank volume of 2.5 L was used (Figure 1). Ten transparent discs (diameter = 100 mm) made out of Plexiglas were simultaneously set in the contactor fed with a synthetic substrate. The waterline was situated at 40% of the radius, as in industrial systems. The total disc surface available for biofilm development is 672 cm², as the back side of each disc is cleaned at each scanning sequence. The reactor was inoculated for eight days with urban wastewater from a local wastewater treatment plant before switching to a semi-synthetic growth medium. The semi-synthetic growth medium was prepared by dilution of a stock solution. For the stock solution preparation, 200 g of meat extract (Viandox®, Amora, Dijon, France), 20 g of dry bovine blood (12 %w N) (ref.

466724, Botanic, Archamps, France), 10 g NH_4Cl (Fluka, France), 0.5 g Na_2HPO_4 (Fluka, France), 12 g sucrose (Fluka, France) were dissolved in 1 L of tap water and stored at 4°C. Inoculation was carried out in batch mode for 48 hours using municipal wastewater from the Maxéville (France) wastewater treatment plant. The discs rotated at a relatively high speed (40 rpm) to promote detachment events induced by hydrodynamic shear forces. The reactor walls (surface = 780 cm²) were regularly cleaned to remove any biofilm, and any settled biofilm fragment was removed from the bottom of the tank (surface = 324 cm²). The feeding rate was maintained at 2.5 L/day during the experiment, but the concentration of the feeding solution was varied to achieve loads between 400 and 800 mg COD/d. The C/N/P ratio was maintained at a constant level. Liquid samples from both the feeding solution and reactor were collected and filtered (pore size = 1.2 µm) to evaluate the global biological activity of the biofilm with respect to time.

After filtration (1.2 µm pore size), the samples were analyzed for ammonia using the Nessler method with a Hach DR2000 spectrophotometer. The biofilm dry weight was determined at the end of the experiment. The biofilm was carefully detached from each disc and dried in an oven at 105°C for 24 h and weighted (standard deviation = ±0.001 g).

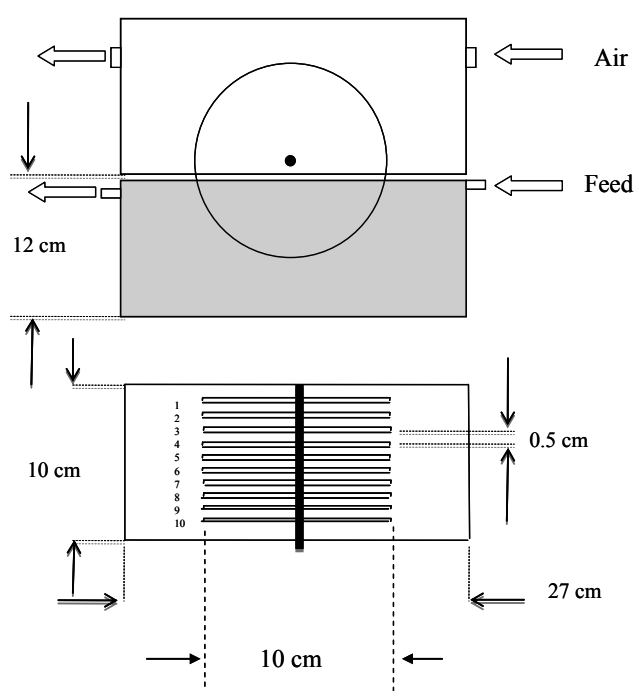


Figure 1: Experimental set-up

2.2. Image acquisition and analysis

The discs were removed every two days and imaged on an Epson 4490 flatbed scanner at a resolution of 800 dpi with 256 gray levels. Scanning of a disc takes less than one minute. The images were saved in TIFF format and analyzed by an in-house program developed in

FORTTRAN (Pons et al., 2009). The biofilm occupies a ring-shape zone on the disc, which is first mapped into a (1024 x 720) rectangular image (Figure 2). This transformation is necessary as the GLRL method should be applied to rectangular areas of interest (i.e. images). For each disc, the opacity and standard deviation were calculated, and the visual texture was assessed using the GLRL method on the sub-image corresponding to the biofilm that was developing above the waterline. The opacity is the difference between the average gray level at any time and the average gray level at t=0 and is used to estimate the amount of biomass.

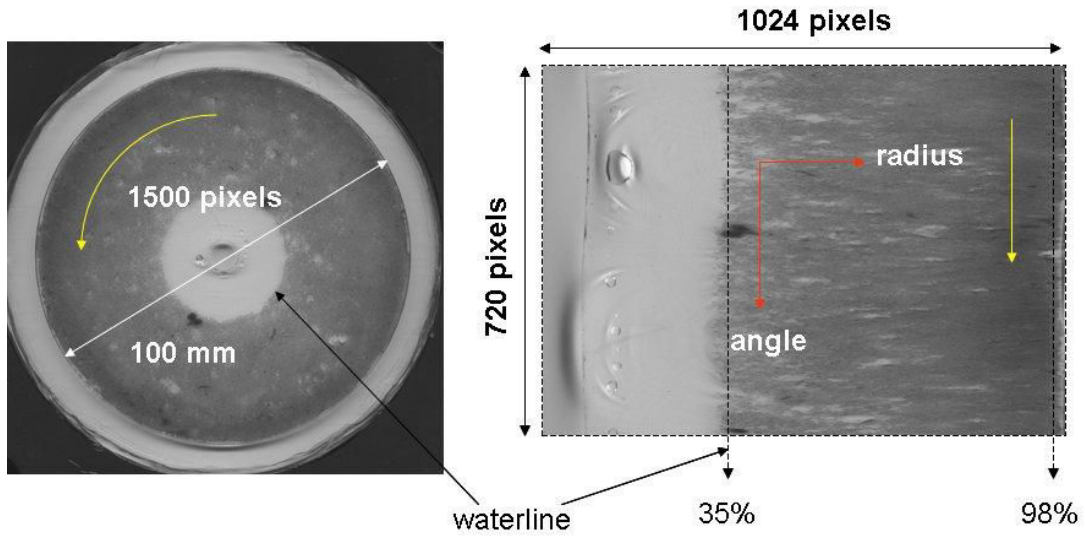


Figure 2: Transformation of the disc (left) into a rectangular image (right)

2.3. Gray Level Run Length Method

By definition, the GLRL method is based on the computation of the lengths (j) of runs of various gray levels (i) along a specific direction (θ). The length of a run is the number of contiguous pixels having the same gray level. A gray level run length matrix, $p(i, j)$, is obtained on which various descriptors are calculated. According to Tang (1998), the most frequently used descriptors are as follows:

Run Percentage: $RP = n_r / n_p$;

Gray-Level Non-uniformity: $GLN = \frac{1}{n_r} \sum_{i=1}^G \left(\sum_{j=1}^R p(i, j|\theta) \right)^2$;

Run Length Non-uniformity: $RLN = \frac{1}{n_r} \sum_{j=1}^R \left(\sum_{i=1}^G p(i, j|\theta) \right)^2$;

Short Run Emphasis: $SRE = \frac{1}{n_r} \sum_{i=1}^G \sum_{j=1}^R \frac{p(i, j|\theta)}{j^2}$;

Long Run Emphasis: $LRE = \frac{1}{n_r} \sum_{i=1}^G \sum_{j=1}^R p(i, j|\theta) \cdot j^2$;

Low Gray-Level Emphasis: $LGRE = \frac{1}{n_r} \sum_{i=1}^G \sum_{j=1}^R \frac{p(i, j|\theta)}{i^2}$;

High Gray-Level Emphasis: $HGRE = \frac{1}{n_r} \sum_{i=1}^G \sum_{j=1}^R p(i, j|\theta) \cdot i^2$;

Short Run Low Gray-Level Emphasis $SRLGE = \frac{1}{n_r} \sum_{i=1}^G \sum_{j=1}^R \frac{p(i, j|\theta)}{i^2 \cdot j^2}$;

Short Run High Gray-Level Emphasis $SRHGE = \frac{1}{n_r} \sum_{i=1}^G \sum_{j=1}^R \frac{p(i, j|\theta) \cdot i^2}{j^2}$;

Long Run Low Gray-Level Emphasis $LRLGE = \frac{1}{n_r} \sum_{i=1}^G \sum_{j=1}^R \frac{p(i, j|\theta) \cdot j^2}{i^2}$;

Long Run High Gray-Level Emphasis: $LRHGE = \frac{1}{n_r} \sum_{i=1}^G \sum_{j=1}^R p(i, j|\theta) \cdot i^2 \cdot j^2$

where G is the number of gray levels (i.e., 256); R is the maximum run length; n_r is the total number of runs; and n_p is the total number of pixels in the image. In the present paper, the texture is assessed along the lines of the rectangular image, i.e., $\theta = 0^\circ$. These descriptors highlight various aspects of the GLRL matrix, as illustrated in Figure 3.

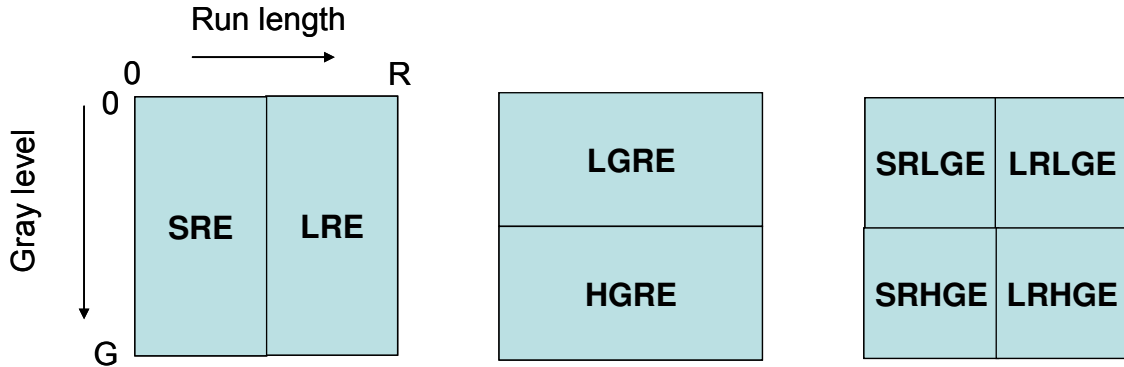


Figure 3: Representation of the characteristics of the Gray Level Run Length matrix highlighted by the emphasis-related descriptors

Some examples are provided in the Additional Information Section, with squares representing void zones that would result from biofilm detachment. Table SM1 and Fig SM1 show that a doubling of the surface (patterns 1 to 2 and 3 to 4) increases the Short Run Emphasis (SRE) and decreases the Long Run Emphasis (LRE). A fragmentation (patterns 1 to 3 and 2 to 4) at equal surfaces drastically increases the SRE and the SRHGE. Similar

trends are illustrated in Table SM2, where more subtle variations in the fragmentation at a constant total white area induce variations in the descriptors related to short runs lengths. Variations in the gray level values also induce changes in the descriptors, as seen in Figure SM3. A decrease in the gray level simulates an increase in the opacity due to the development of the biofilm.

Principal Components Analysis (PCA) was performed using a routine developed under Scilab (Inria, Rocquencourt, France).

3. Results and discussion

3.1. Biological parameters

The use of a semi-synthetic growth medium seemed to promote the growth of filamentous micro-organisms. After 95 days of feeding at a constant load (400 mg COD/d), the bulk phase became very viscous, with a high amount of suspended filamentous biomass (Figure 4). Therefore, the liquid phase was discarded and exchanged for a fresh medium based on the stock solution. An increase of the load up to 800 mg COD/d was attempted twice, but each attempt was followed by an onset of filamentous growth, and the load was reduced to 400 mg COD/d. After 20 days, some nitrification was noticeable by a decrease in the residual ammonia in the liquid phase. However, full nitrification was never obtained, as the residual N-NH₄ concentration remained around 30 mg N/L.

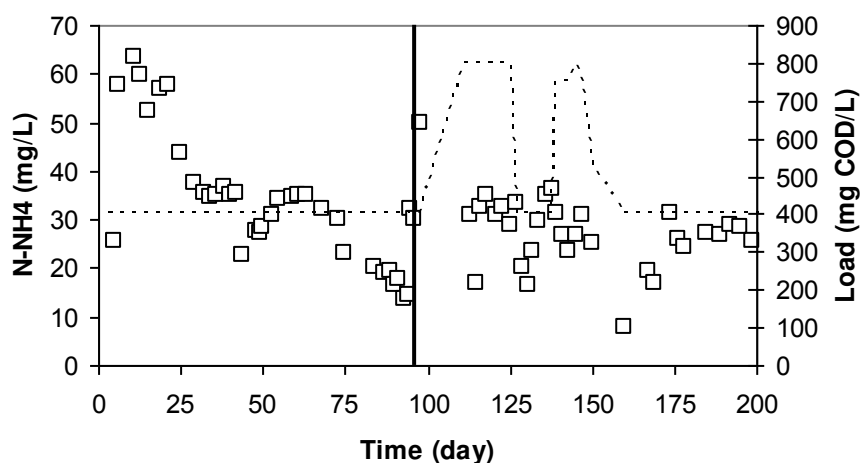


Figure 4: Residual N-NH₄ in the reactor (open symbols) and load (dotted line) versus time. The vertical line indicates the time of the liquid phase exchange.

3.2. Biofilm development

The opacity of the biofilm on disc D1 and its standard deviation versus time are plotted with respect to time in Figure 5. Figure 6 summarizes the opacity for the ten discs. After an initial

growth phase of about 60 days, several detachment events were followed by regrowth phases over the 200-day duration of the experiment. The detachment observed after eight days could be due to the biofilm's response to the switch to the semi-synthetic growth medium after the reactor inoculation with urban wastewater. The initial development of the biofilm on the ten discs was rather similar, except for disc D6, where the development was slower. There is no clear explanation for the decrease in biofilm development around day 30. After 60 days, sloughing events occurred on all discs, with the period between day 60 and day 100 having a succession of short regrowth phases and detachment events. This observation could be due to the presence of biofilm fragments that were kept in motion by the disc rotation, causing a succession of detachment events by shock on the different discs. The opacity standard deviation was large, indicating the presence of zones with biofilm (high opacity) and without biofilm (low opacity). We also observed that the biofilm could partly detach partly, with some refolding of the loose biofilm onto the biofilm still attached to the disc. This phenomenon increases the opacity and contributes to the increase in the standard deviation. After day 100, similar regrowth was observed on all discs, although the standard deviation of the opacity was larger than during the initial growth phase, prior to day 60. A sudden major detachment event occurred on all discs at day 155. At that date, the opacity was just a bit lower than on day 60 (120 and 129 respectively) and the detachment might have been due to the biofilm weight. As the biofilm was not homogenous on the discs, a local excess of weight can trigger of the detachment on one disc and the loose fragments can then trigger further detachment on the other discs. After these events, a new regrowth phase occurred, which was observed on all the discs simultaneously.

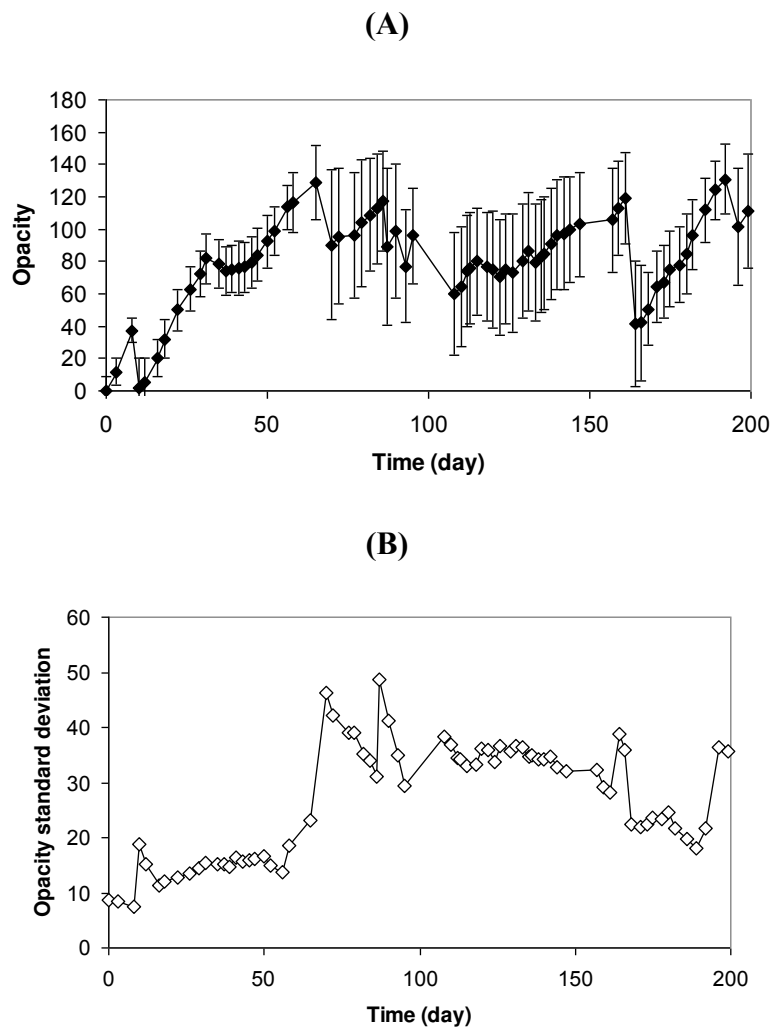


Figure 5: Biofilm development with respect to time for disc D1. (A) Opacity versus time with vertical bars = \pm standard deviation, (B) standard deviation versus time.

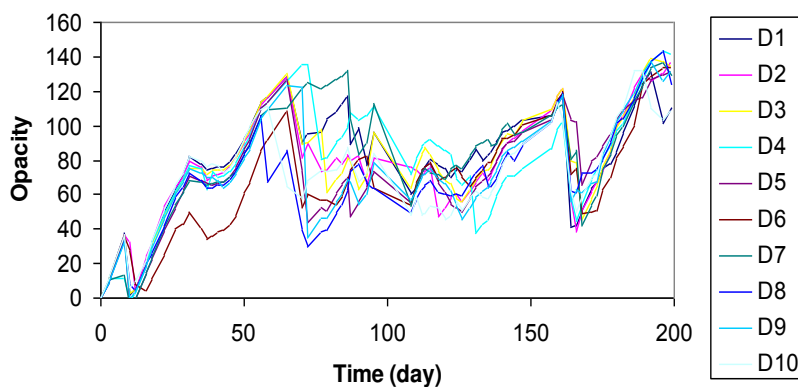


Figure 6: Opacity with respect to time for the ten discs

Table 1 compares the biomass dry weight collected on each disc and the corresponding opacity at the end of the experiment. A meaningful correlation is difficult to establish between opacity and dry weight because nine of the discs had a very similar amount of biomass. A rough estimate leads to a value of 27 μg of dry biofilm per opacity unit.

Table 1: Biofilm dry weight and opacity at the end of the experiment

Disc	Biofilm dry weight (g)	Final opacity	
		Average	St. Dev.
D1	0.371	111	38
D2	0.338	137	17
D3	0.315	134	17
D4	0.347	141	16
D5	0.387	131	17
D6	0.320	134	17
D7	0.409	128	24
D8	0.329	123	20
D9	0.358	132	24
D10	0.247	109	32

In Table 2, the growth/regrowth rates (expressed in opacity unit/day) and the coefficient correlation (R^2) were calculated for the initial growth (between days 10 and 62), the first regrowth (between days 104 and 155) and the second regrowth (between days 158 and 188) phases.

Table 2: Rates and coefficient of correlation for the ten discs for the initial growth, 1st regrowth and 2nd regrowth phases.

Disc	Growth		1 st regrowth		2 nd regrowth	
	rate (opacity unit/day)	R ²	rate (opacity unit/day)	R ²	rate (opacity unit/day)	R ²
1	2.14	0.91	0.96	0.9	3.3	0.99
2	1.99	0.88	1.64	0.97	3.25	0.93
3	2.1	0.91	1.83	0.96	3.5	0.97
4	2.03	0.91	2.1	0.96	3.1	0.98
5	2.1	0.91	1.84	0.97	2.5	0.98
6	1.7	0.8	1.61	0.96	3.8	0.99
7	1.95	0.94	0.97	0.93	3.93	0.99
8	1.83	0.88	2.05	0.97	2.72	0.98
9	1.95	0.87	2.03	0.98	3.1	0.97
10	1.95	0.89	1.66	0.94	3.1	0.97
Mean	1.97	0.89	1.67	0.95	3.23	0.97
Standard deviation	0.13		0.41		0.44	

The average growth rate for the ten discs was 1.97 (opacity unit/day), with a standard deviation of 0.13. As expected, the rate was slightly lower for disc D6. The average first regrowth rate decreased to 1.67 (opacity unit/day) with a larger standard deviation between the discs (0.41). Finally, the average second regrowth rate increased to 3.23 (opacity unit/day) with a standard deviation of 0.44. The coefficient of variation (standard deviation / average) was 23% for the first regrowth and 13% for the second regrowth.

3.3 Biofilm macrostructure

Eleven descriptors are available in the GLRL method. Figure 7 summarizes the variation with respect to time of the visual texture descriptors for disc D1. The large detachment event occurring at 155 days was observed on all the texture descriptors. The RLN increased slightly during the run, with marked drops observed around 100 days and 155 days. The GLN decreased globally during the run. An increase was observed between days 30 and 60.

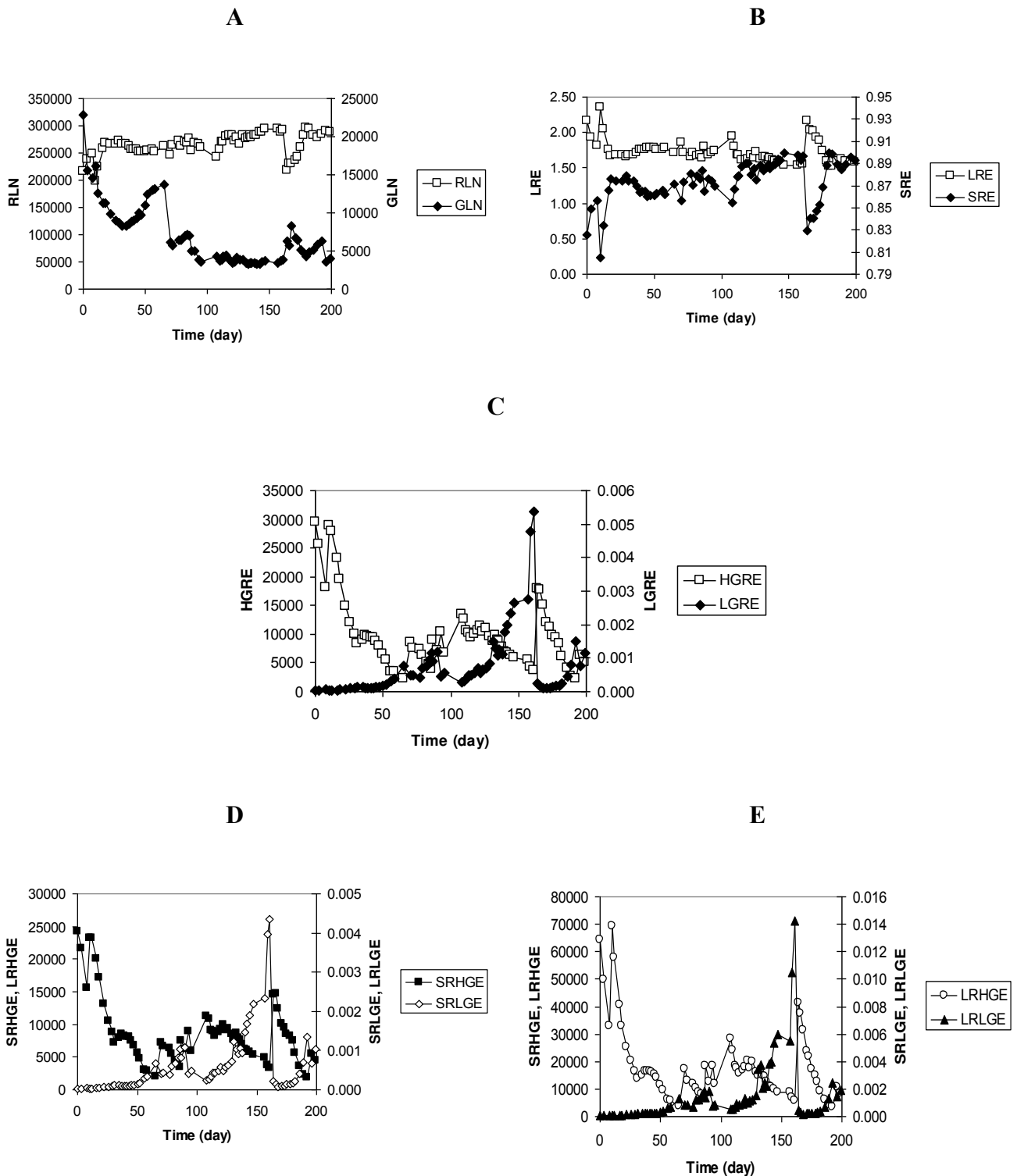


Figure 7: Variations of the GLRL descriptors (A: RLN and GLN; B: SRE and LGRE; C: HGRE and LGRE, D: SRHGE and SRLGE, E: LRHGE and LRLGE) with respect to time for disc D1

Day 30 corresponded to the break in biofilm development during the first growth phase (Figure 5A). A sharp decrease in the GLN was observed for the first large detachment at 60 days. Globally, the RLN was not correlated with the opacity standard deviation (Figure 8A),

but the GLN decreased as the opacity standard deviation increased (Figure 8B). The descriptors related to the run lengths (Figure 3) show more variations depending upon the degree of refinement of the texture characteristics: fewer variations are seen in the LRE and SRE plots than in the HGRE, LGRE, SRHGE, SRLGE, LRHGE and LRLGE.

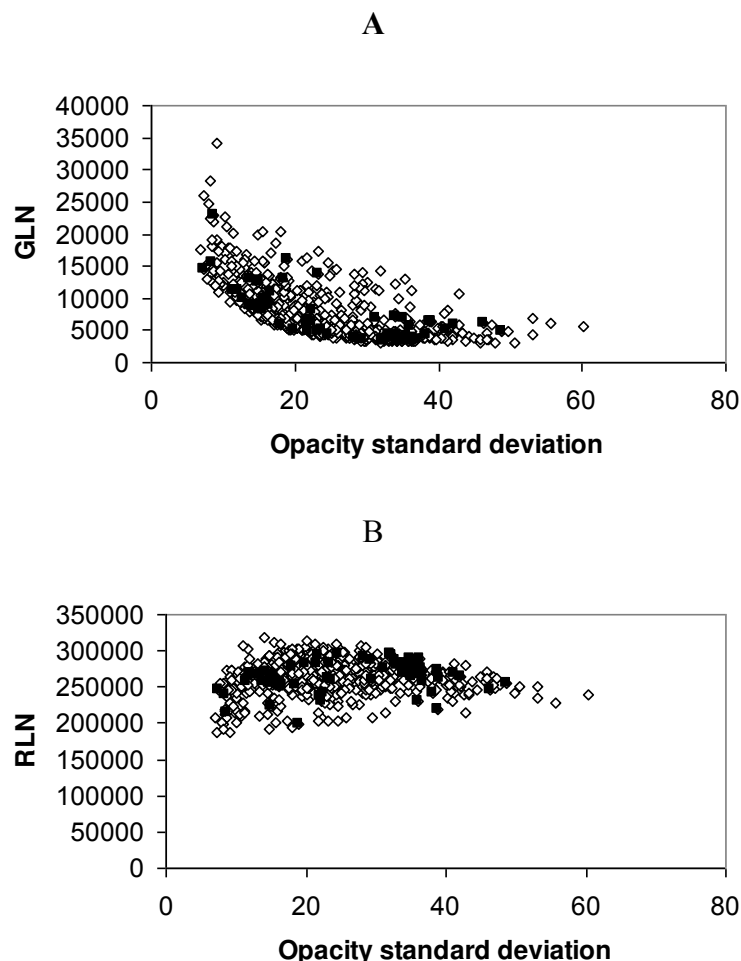
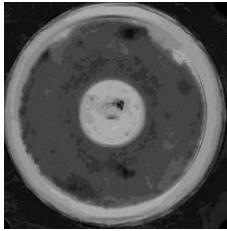
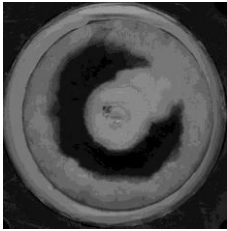
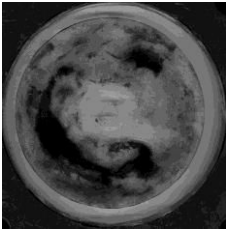
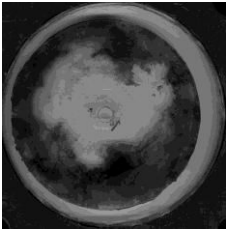


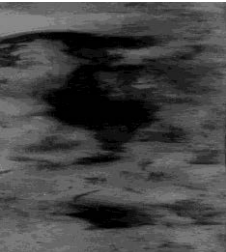



Figure 8: Relation between opacity standard deviation and GLN (A) and RLN (B). Open symbols: all the discs, closed symbols = disc D1

Table 3 compares the texture descriptors for disc D1 at four specific times exhibiting the same opacity (opacity = 100). The SRE increased and the LRE decreased when detachment occurred. Large pieces of biofilm and large void zones were seen at 90 days, which resulted in larger SRE and lower LRE values than at 52 days. However, these values are respectively lower and larger than for longer times when the texture appears visually more fragmented. The LGRE increased at 90 days as the biofilm detached from the outer part of the disc and accumulated in the inner part. Such accumulation was still noticeable at 144 days. The HGRE was higher at 90 days, 144 days and 196 days due to the high gray levels induced by void zones or zones with a thin biofilm.

Table 3: GLRL descriptors for disc D1 at four different times with same opacity (100)

	52	90	144	196
Time (day)				
Corresponding rectangular images				
Opacity standard deviation	$1.48 \cdot 10^1$	$4.11 \cdot 10^1$	$3.27 \cdot 10^1$	$3.63 \cdot 10^1$
SRE	$8.63 \cdot 10^{-1}$	$8.77 \cdot 10^{-1}$	$8.93 \cdot 10^{-1}$	$8.96 \cdot 10^{-1}$
LRE	1.76	1.68	1.57	1.57
GLN	$1.24 \cdot 10^4$	$5.01 \cdot 10^3$	$3.58 \cdot 10^3$	$3.59 \cdot 10^3$
RLN	$2.55 \cdot 10^5$	$2.69 \cdot 10^5$	$2.87 \cdot 10^5$	$2.90 \cdot 10^5$
LGRE	$2.06 \cdot 10^{-4}$	$1.20 \cdot 10^{-3}$	$2.33 \cdot 10^{-3}$	$7.84 \cdot 10^{-4}$
HGRE	$5.48 \cdot 10^3$	$7.09 \cdot 10^3$	$6.37 \cdot 10^3$	$6.27 \cdot 10^3$
SRLGE	$1.78 \cdot 10^{-4}$	$1.07 \cdot 10^{-3}$	$1.91 \cdot 10^{-3}$	$6.82 \cdot 10^{-4}$
SRHGE	$4.75 \cdot 10^3$	$6.14 \cdot 10^3$	$5.70 \cdot 10^3$	$5.50 \cdot 10^3$
LRLGE	$3.66 \cdot 10^{-4}$	$1.84 \cdot 10^{-3}$	$5.33 \cdot 10^{-3}$	$1.47 \cdot 10^{-3}$
LRHGE	$9.54 \cdot 10^3$	$1.25 \cdot 10^4$	$9.94 \cdot 10^3$	$1.08 \cdot 10^4$

To summarize the textural information contained by the set of descriptors, it is common in visual textural analysis to apply methods such as Principal Components Analysis. Two principal components were sufficient to represent more than 86% of the total variability contained in the textural descriptors. Consistently with what was observed with opacity, similar texture was observed for all the discs between inoculation and 60 days, as well as after 155 days. Strong variations of PCA1 and PCA2 were seen at the onset of biofilm detachment ($t = 60$ days and $t = 155$ days). The period between those days was more difficult to analyze, and each disc exhibited a specific behavior. For example, the PCA2 value for disc D4 departed strongly from the PCA2 values of the other discs between 90 days and 130 days.

This difference was due to a piece of biofilm that detached partially and refolded itself, as seen in Figure 10. This piece of biofilm detached completely on day 130, and the texture of disc D4 again resembled the other discs.

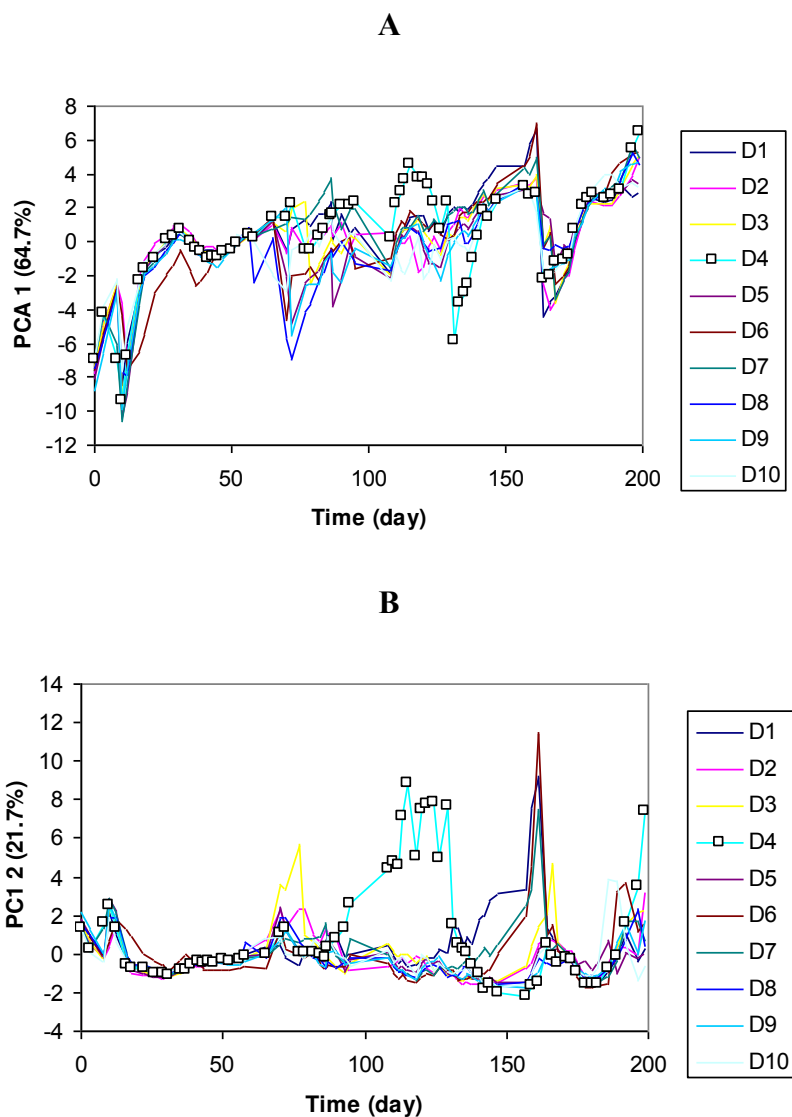


Figure 9: Global assessment of macrostructure variations based on the first two principal components.

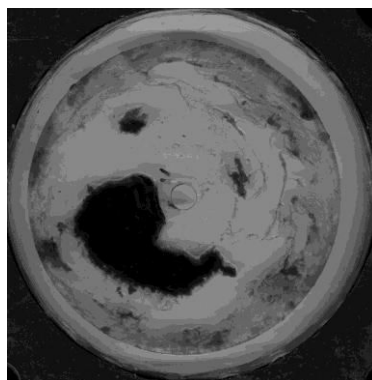


Figure 10: Disc D4 at day 130

3.4 Reproducibility and steady-state

Reproducibility and steady-state are two key issues in biofilm studies. In terms of reproducibility of biofilm development, biofilm growth was highly similar in terms of biomass amount and macrostructure until the first large sloughing event at day 60. Afterwards, each disc seems to behave differently in terms of partial sloughing and small re-growth until the discs are sufficiently void of biofilm (day 155). Similar behavior was observed by Lewandowski et al. (2004). After day 155, biofilm develops again similarly on all the discs until day 185 when sloughing started again. Obviously the biofilm never reached steady-state during this long-term experiment, although the global reactor behavior in terms of pollution removal was stable. In spite of the fact that the ten discs were immersed in the same reactor, which limits potential problems due to slight differences in set-ups and feeding which can be encountered with running parallel reactors, the biofilms were similar only prior to the first massive sloughing event and after the last one.

4. Conclusion

A scanner-based image analysis method was tested to monitor biofilm development in terms of opacity (related to biofilm thickness or biomass mass) and macrostructure (related to visual texture) over a long period of time (200 days) without destroying the biofilm.

The main conclusions are as follows:

- The textural descriptors provided by the GLRL method were easy to use for interpreting the variations in the macrostructure.
- The semi-synthetic growth medium favored the development of filamentous species, which might have increased the biofilm folding, especially at the high rotation speed used.
- Only dynamic steady-state was observed, with similar biofilm growth occurring only when the substratum was new or became void of biofilm due to large detachment events. This leads to a sort of synchronized development on the ten discs in terms of opacity and texture. The extensive database can be used to test biofilm development models over long periods.

Nomenclature

COD	Chemical Oxygen Demand
G	number of available gray levels (= 256)
GLN	Gray-Level Nonuniformity
GLRL	Gray Level Run Length
HGRE	High gray-Level Emphasis
i	gray level
j	run length
LGRE	Low Gray-level Emphasis
LRE	Long Run Emphasis
LRHGE	Long Run High Gray-level Emphasis
LRLGE	Long Run Low Gray-level Emphasis
n_p	total number of pixels in the image
n_r	total number of runs
$p(i,j)$	gray level run length matrix
R	maximum run length
R^2	coefficient of correlation
RLN	Gray-Level Nonuniformity
RP	Run Percentage
SGLDM	Spatial Grey-Level Dependence Matrix
SRE	Short Run Emphasis
SRLGE	Short Run Low Gray-Level Emphasis
SRHGE	Short Run High Gray-Level Emphasis
θ	Orientation angle

Supplementary material

Table SM1: Variation of some RLM descriptors in function of the size of the white area



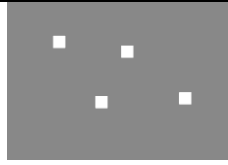
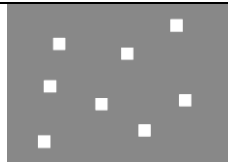
Pattern	Total white surface (a.u.)	SRE	LRE	SRLGE	SRHGE	LRLGE	LRHGE
1 	1	$4.10 \cdot 10^{-3}$	$1.99 \cdot 10^5$	$7.63 \cdot 10^{-8}$	$2.21 \cdot 10^2$	12	$3.34 \cdot 10^9$
2 	2	$8.30 \cdot 10^{-3}$	$1.51 \cdot 10^5$	$2.15 \cdot 10^{-7}$	$4.11 \cdot 10^2$	9.04	$2.54 \cdot 10^9$
3 	1	$1.00 \cdot 10^{-2}$	$1.54 \cdot 10^5$	$2.43 \cdot 10^{-7}$	$5.19 \cdot 10^2$	9.22	$2.56 \cdot 10^9$
4 	2	$2.24 \cdot 10^{-2}$	$9.32 \cdot 10^4$	$3.86 \cdot 10^{-7}$	$1.31 \cdot 10^3$	5.59	$1.56 \cdot 10^9$

Fig SM1: Variation of some RLM descriptors in function of pattern

(see Table SM1 for details). The relative values are calculated with respect to pattern 1.

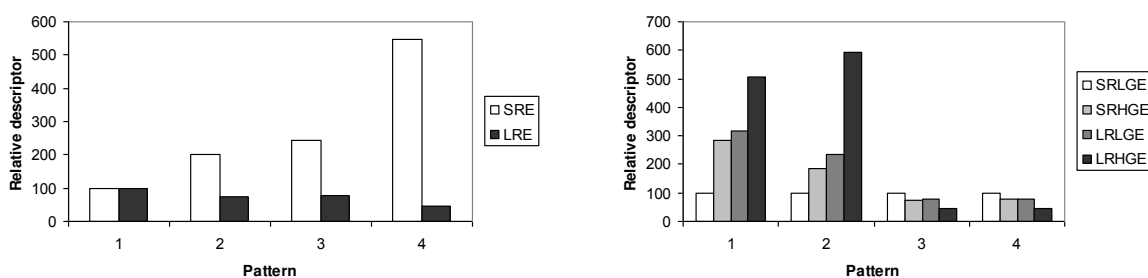


Table SM2: Effect of the pattern type on some RLM descriptors. The total white surface is the same for the three patterns

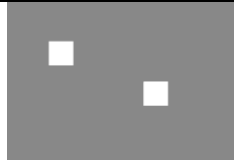



Pattern	SRE	LRE	SRLGE	SRHGE	LRLGE	LRHGE
2 	$8.30 \cdot 10^{-3}$	$1.51 \cdot 10^5$	$2.15 \cdot 10^{-7}$	$4.11 \cdot 10^2$	9.04	$2.54 \cdot 10^9$
5 	$2.06 \cdot 10^{-2}$	$1.19 \cdot 10^5$	$5.66 \cdot 10^{-7}$	$9.81 \cdot 10^2$	7.13	$2.00 \cdot 10^9$
6 	$1.53 \cdot 10^{-2}$	$1.58 \cdot 10^5$	$4.82 \cdot 10^{-7}$	$6.75 \cdot 10^2$	9.44	$2.66 \cdot 10^9$
7 	$1.00 \cdot 10^{-2}$	$1.54 \cdot 10^5$	$2.43 \cdot 10^{-7}$	$5.19 \cdot 10^2$	9.22	$2.56 \cdot 10^9$

Table SM3: Effect of the pattern size on some RLM descriptors for a square of different sizes





Pattern	SRE	LRE	SRLGE	SRHGE	LRLGE	LRHGE
10 	$4.44 \cdot 10^{-3}$	$6.62 \cdot 10^4$	$2.47 \cdot 10^{-7}$	$8.15 \cdot 10^1$	3.06	$2.09 \cdot 10^9$
9 	$9.21 \cdot 10^{-3}$	$9.40 \cdot 10^4$	$3.64 \cdot 10^{-7}$	$3.19 \cdot 10^2$	5.25	$2.00 \cdot 10^9$
8 	$1.31 \cdot 10^{-2}$	$1.42 \cdot 10^5$	$4.78 \cdot 10^{-7}$	$4.97 \cdot 10^2$	8.40	$2.47 \cdot 10^9$
1 	$1.41 \cdot 10^{-2}$	$1.97 \cdot 10^5$	$5.56 \cdot 10^{-7}$	$4.89 \cdot 10^2$	11.8	$3.30 \cdot 10^9$

Figure. SM2: Effect of the pattern size on some RLM descriptors for a square of different sizes

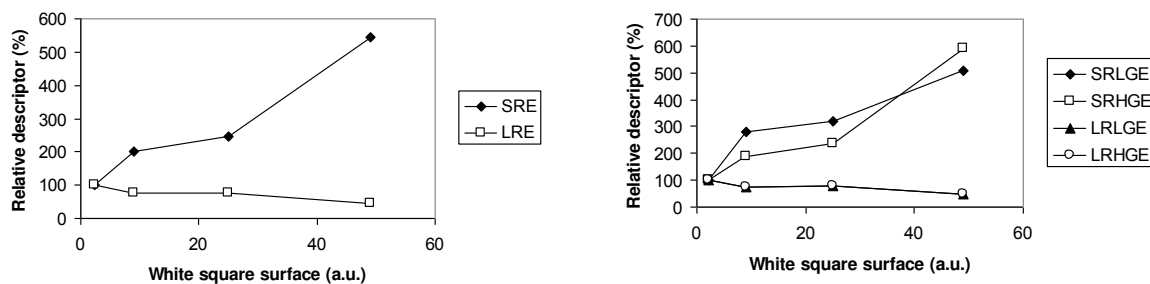
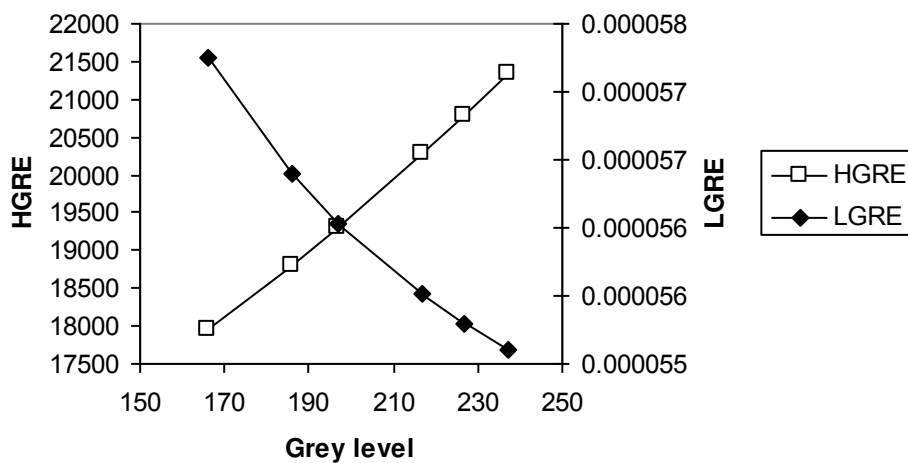


Figure. SM3: Effect of the central square grey level



III.4. Article IV: Effect of erythromycin on biofilm activity and macrostructure

Muatasem ALNNASOURI^{1,2}, Jean-Noël LOUVET¹, Ghania ATTIK^{1,2}, Dominique DUMAS², Christophe DAGOT³, Marie-Noëlle PONS¹

¹ Laboratoire Réactions et Génie des Procédés, CNRS, Nancy Université, INPL
1, rue Grandville, BP 20451, Nancy cedex, France

² Imaging Facility, FR3209, 7561 CNRS, Faculty of Medecine, , Nancy Université, 54500
Vandœuvre-lès-Nancy, France

³ Groupement de Recherches Eau Sol Environnement, ENSIL
1, rue Atlantis, Parc ESTER Technopôle, BP 6804, 87068 Limoges cedex, France

Corresponding author: phone: +33 3 83175277; fax: +33 383175326,

E-mail: marie-noelle.pons@ensic.inpl-nancy.fr

Abstract

The effect of high doses of erythromycin (in the range of 0.5 mg/L to 40 mg/L applied during 24 hours) on mature biofilms has been investigated. The biofilms had been developed in a rotating biological contactor using real wastewater as a growth medium for several weeks before being exposed to the antibiotic. Erythromycin might have an effect on the macrostructure by facilitating biofilm detachment and/or sloughing as such phenomena were observed on smooth surfaces, a few days after exposure. However regrowth took place once the antibiotic was washed out of the contactor. There was no clear effect on nitrifiers as the N-NH₄ removal rates were similar before and after the antibiotic addition and as the general behavior with respect to N-NH₄ removal was similar in the control test (without erythromycin) and in the tests with erythromycin. Visualization of the microstructure using a confocal microscope and a mixture of BacLight viability stain and DAPI after a pulse of erythromycin did not reveal a specific damage of the bacteria in spite of the high doses used. These results indicate that the bacteria embedded in a mature biofilm used for wastewater treatment are less sensitive to erythromycin than activated sludge flocs.

Keywords: erythromycin, biofilm, image analysis, confocal microscopy, removal rate, rotating biological contactor

1. Introduction

Erythromycin is largely used in human and animal food production to fight bacterial diseases and promote animal growth (Kolpin et al., 2002; Yong-Hak et al., 2004). It has been detected at different concentrations in several environments such as 6.1 µg/L in hospital effluents (Lin and Tsai, 2009), 1.2 µg/L in sewers and 0.3 µg/L in wastewater treatment plants influent (Karthikeyan and Meyer, 2006) in which biofilm is used for the biological treatment. Biofilm is a complex community of microorganisms growing on surfaces (Donlan and Costerton, 2002) undesirably on medical devices (An et al., 2000; Eijer et al., 2001) or desirably in food manufacturing (Chung et al., 1983) and wastewater treatment plants. Rotating Biological Contactor (RBC) (Banerjee 1997) is one of the most important systems using biofilm in biological treatment plants (Andreadakis, 1987; Wilson, 1993).

During the first stage of biofilm formation, bacteria are free-living and should be more accessible to antibacterial substances such as biocides or antibiotics. Therefore, when an antibiotic is applied to biofilms *in vitro*, it can kill bacteria which are close to the biofilm-liquid interface and are not yet associated to the matrix (Stewart and al, 2003). The matrix is composed at 50 to 90% of extracellular polymeric substances (EPS) (Characklis et al., 1983). It is essentially composed of polymers of saccharides, proteins and nucleic acids (Sutherland, 2001). It provides robustness to the biofilm (Anwar et al, 1992) and protects microorganisms from the external stresses such as temperature, pH, predators and chemical agents by preventing the penetration of antimicrobial agents and the function of phagocytic immune cells (Stewart et al, 1996; Stewart et al, 1998).

Several studies describe how microorganisms entrapped in biofilms are resistant to antibiotics at concentrations levels which are 10 to 1000 fold higher than their planktonic or free suspended homologs (Grobe et al, 2002; Hamilton et al, 2002; Drenkard et al, 2002; Monroe, 2007). This resistance can be mechanical, the EPS matrix offering a protection against antibacterial agents or due to changes in the bacterial genome or DNA. The corresponding resistance genes can eventually be transferred to other bacteria which can be pathogenic (Martins et al., 2006). The mechanism of the resistance is not yet well understood at the micro-scale level, but at the macro-scale level, it is suggested that biofilm architecture and biochemical properties can play a role (Donlan et al., 2002; Jefferson et al., 2004). Besides microorganism resistance (Donlan et al., 2002) and inactivation of antibiotics by the EPS matrix components (Duguid and al., 1990, Nichols, 1991), microbial physiology (Hoyle et al., 1991; Prince et al., 2002), biofilm age (Tré-Hardy et al., 2009) and higher mutability

(Driffield et al., 2008) are additional factors which increase the resistance of biofilm to antibiotics.

Research is very active in the medical field concerning the effect of antibiotics on biofilm due to the health problems related to the development of multi-antibiotic resistance (Coenye et al, 2007; Arciola et al, 2008 for example). The effect of erythromycin on biofilm activities in wastewater treatment is more seldom studied because of the long-term operation of this type of process and the lack of suitable nondestructive method to quantify and qualify biofilm development. However, Louvet et al. (2010) confirmed that erythromycin, at concentration higher than 1 mg/L, is able to destroy activated sludge flocs, which can be considered as a 3D biofilm structure, and reduces Chemical Oxygen Demand (COD) and ammonium (N-NH_4^+) removal rates.

Our objective has been to study the effect of erythromycin on the biofilm activity in a lab-scale Rotating Biological Contactor fed by real wastewater over several months in order to examine the effect of the antibiotic on a mature biofilm (i.e. several weeks old). At a macro-scale automated analysis of biofilm images obtained with a scanner (Pons et al., 2009) was used to monitor biofilm development as a new non destructive method. At a micro-scale Confocal Laser Scanning Macroscopy (CLSM) was used to assess bacterial mortality due to erythromycin.

2. Materials and Methods

2.1. Experimental setup

A laboratory rotating biological contactor (RBC) with a tank volume of 2.5 L was used (Figure1). Transparent disks (diameter = 100 mm) made out of Plexiglas were used. Four experiments were realized. Run 1 was a control experiment with no addition of erythromycin. Two discs were sacrificed and replaced by new ones at day 38 and day 55 in order to build the calibration curve between opacity and biofilm dry weight. Runs 2 and 3 are long term experiments with addition of erythromycin at increasing concentration. The goal of Run 4 was to obtain biofilm for confocal macroscopic observations and received no addition of erythromycin. In Runs 1, 2 and 4 all discs had a flat surface. In Run 3, one smooth surface disc and four discs with grooves (2mm deep and 2mm wide) were used. The space between two disks was 1 cm. The rotation speed was set at 6 rpm. Waterline was situated at 40% of the disk radius, as on industrial systems. The RBC was fed with municipal wastewater obtained from Maxéville (France) wastewater treatment plant. The wastewater was collected weekly on the plant (in the sand removal unit for Run 1 and prior to grit removal for the other

runs) around midday and stored at 4°C in 5L tanks until use. Its composition is changing with time due to different weather conditions prior to collection. Inoculation was carried out in batch mode for 48 hours by the same wastewater. The feeding rate was maintained at 2.5 L/day during the experiment. The reactor walls and bottom was regularly cleaned to avoid solid accumulation. At given time a 24hr pulse of antibiotic was delivered. For that purpose erythromycin (erythromycin-hydrate from Sigma Aldrich, purity = 96%) was dissolved in wastewater to the desired final concentration. Liquid samples from both feed and reactor were collected and filtered (pore size = 1.2 µm) to evaluate the biological activity of the reactor with respect to time.

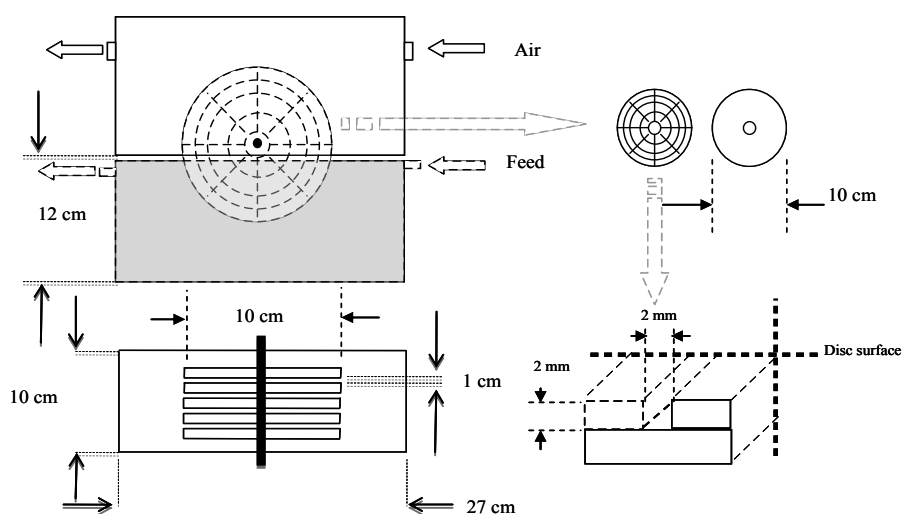


Figure1: Description of the RBC reactor.

2.2. Analytical procedures

UV-visible spectra were collected on a SECOMAN Anthélie Light UV-1700 spectrophotometer using a quartz cell (path length = 1 cm). The absorbance at 254 nm (A_{254}) was used as a surrogate measurement of the soluble organic matter evaluated by Chemical Oxygen Demand (COD) (Howard et al., 2004) and the second derivative of the spectra at 220 nm was correlated with nitrates (Ferree and Shannon, 2001). Ammonia was analyzed using the Nessler method on a Hach DR2000 spectrophotometer after dilution with a Hamilton auto-diluter. Nitrates were also determined by ion chromatography (Dionex) with the following parameters: mobile phase: KOH 30 mM, injection volume 15 µL, run time 13 min, column temperature 20 °C, detection temperature 25 °C, mobile phase flow 1 mL/min. Deionized water was used as blank for all analyses. To estimate biofilm dry weight (DW), the biofilm was carefully detached with a spatula from the disk, dried in an oven at 105 °C for 24h and weighted. Separate correlations were built for Run 1 on one hand and Run 2 and 3 on the other to take into account the different feeds. Furthermore, separate correlations

were built for Run2 and Run 3 between smooth and structured discs, to take into account the effect of grooves on the opacity.

2.3. Image acquisition and analysis

The discs were imaged on a flatbed scanner (Epson perfection Photo 4490) with 256 grey levels and a spatial resolution of 800 dpi (1 pixel = 14 μm). Images were saved in TIFF format and analyzed by an in-house program developed in FORTRAN (Pons and al 2009). The biofilm developed within a ring defined by the outer edge of the disc and the waterline. The average grey-level and its standard deviation within the biofilm ring are determined from the grey-level distribution. At any time, the biofilm opacity is the difference between ring average grey-level at time t and its initial average grey-level (disk scanned before being placed into the reactor). Scanning of a disc takes less than 1 minute.

2.4. Biofilm activity assessment

The biofilm global activity was assessed by calculating the substrate removal rates (Wanner et al., 2006). The notations of Figure 2 were used.

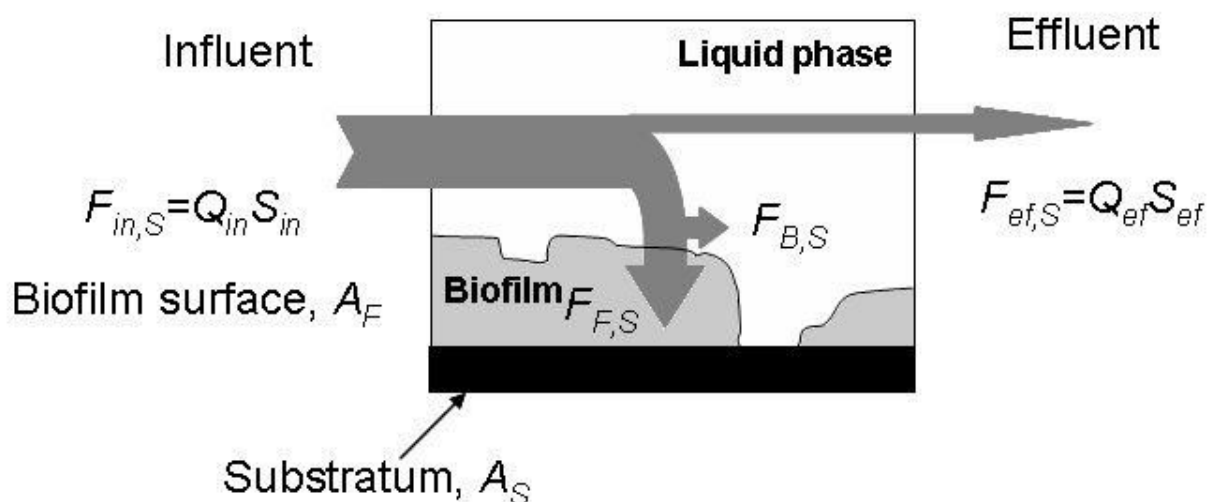


Figure 2: Steady state mass balance over the biofilm system

The substrate mass removed per unit time in the whole system is:

$$F_{rem,S} = Q_{in} S_{in} - Q_{ef} S_{ef} = Q_{in} (S_{in} - S_{ef})$$

where Q_{in} and Q_{ef} are the influent and effluent feed rates respectively and S_{in} and S_{ef} the substrate concentrations in the influent and effluent, respectively. Three substrate removal rates can be defined:

- a volumic substrate removal rate ($R_{rem,v,S}$), based on the total system volume (V):

$$R_{rem,v,S} = \frac{F_{rem,S}}{V}$$

- a surfacic substrate removal rate ($R_{rem,a,S}$), based on the biofilm area (Wanner et al., 2006):, where the biofilm area (A_F) is considered to be equivalent to the substratum area (A_S):

$$R_{rem,a,S} = \frac{F_{rem,S}}{A_F} = \frac{F_{rem,S}}{A_S}$$

- a specific substrate removal rate ($R_{rem,b,S}$), based on the total biofilm biomass (B_T):

$$R_{rem,b,S} = \frac{F_{rem,S}}{B_T}$$

where B_T is calculated from the sum of the opacities and the opacity-dry weight relationship.

2.5 Fluorescence staining

The Live/Dead® *BacLight*TM bacterial viability staining was used according to the manufacturer's instructions (Invitrogen, Cergy-Pontoise, France). The kit provides a two-color fluorescence assay of bacterial viability relying on membrane integrity: live bacteria are stained by SYTO® 9 and fluoresce green, while damaged and dead bacteria are stained by propidium iodide and fluoresce red. DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) (Invitrogen, Cergy-Pontoise, France) binds to nucleic acids. The staining was performed by adaptation of the method described by Lopez *et al* (2005). In brief, a solution prepared by 3 µl of a mixture of equal parts of SYTO®9 and propidium iodide is diluted in 1 ml of an erythromycin solution, prepared in deionized water at the desired erythromycin concentration. 200 µl of this solution and 1 µl of DAPI (10 mg/L) were added to a selected area of about 1 cm² of biofilm on the disk. This short staining protocol allowed a direct observation of the original biofilm structure and the time-lapse macroscopy. Macroscopic observations started 15 min after staining. Excitation and emission wavelengths for SYTO®9, propidium iodide and DAPI are 480/500, 490/635 and 350/460 nm respectively.

2.6 Confocal Laser Scanning Macroscopy

Confocal macroscopy was used to study the response of the biofilm to a pulse of antibiotic. A Nikon AZ-C1 100 confocal macroscope (Nikon Instruments Europe B.V/ France) equipped with 405 nm, 457-476-488-514 nm, 561 nm and 648 nm laser diodes was used with two HCX x2/0.2 and x5/0.5 lenses. This system allows a magnification ranging from 5x to 400x depending on the lens and on the optical zoom used. The bandwidth of the detected fluorescence has been optimized for each channel, to avoid potential cross-talking. Moreover, the scans were performed using sequential mode (Photomultipliers: 450/50 PMT1, 515/30 PMT2, 590/50 PMT3 and 670LP PMT4). Fluorescence emissions were recorded within 1

Airy disk confocal pinhole opening and a spectral detection of 32 channels. The system combines speed acquisition and high sensitivity for fluorescence imaging with high resolution. The motorization was controlled by the EZ-C1 software. Instead of selecting a constant step size in the vertical direction, the step size was determined by choosing start and end points in the Z-direction (the depth of the biofilm) and therefore selecting a number of optical sections. The resulting voxel depths for the biofilm analyzed was at 2 μm .

2.7 Analysis of Confocal Laser Scanning Macroscopy Images

The procedure developed by Lopez et al., (2005) was used. The percentage of viable cells and damaged cells was calculated with the percentage of green or red pixels contained in the area defined by the biomass silhouette, respectively. A pixel was considered as green when $\epsilon \leq R < G$ or as red when $\epsilon \leq G < R$, where G: green, R: red and ϵ : the color level of the photo background. CLSM images were stored as TIFF files and analyzed using Visilog 6.2 software (Noésis, Les Ulis, France).

3. Results and discussion

3.1. Biofilm activity and development

Figure 3 summarizes the biofilm development and activity during Run 1, which serves as a control experiment without erythromycin addition. No detachment or sloughing was observed during the 85 days of cultivation. The decrease in total biomass at days 30 and 55 corresponds to the removal and replacement of one disc.

Unfortunately the wastewater composition was highly variable during the experiment (Figure 3a). This is the inconvenient of using real wastewater. However, with such feed, the biofilm bacterial community is closer to what can be found in a full scale plant than when a synthetic growth medium is used. Nitrification starts to take place visibly on day 10 and full nitrification is obtained at day 20, with residual N-NH_4 lower than 3 mgN/L. This was confirmed by nitrates analyses (data not shown). In spite of the large variations of N-NH_4 concentration in the influent, ammonia removal is fully achieved. The N-NH_4 removal rates vary in function of the N-NH_4 concentration in the influent. There is an apparent change in behavior at day 40, without a clear explanation of the reason.

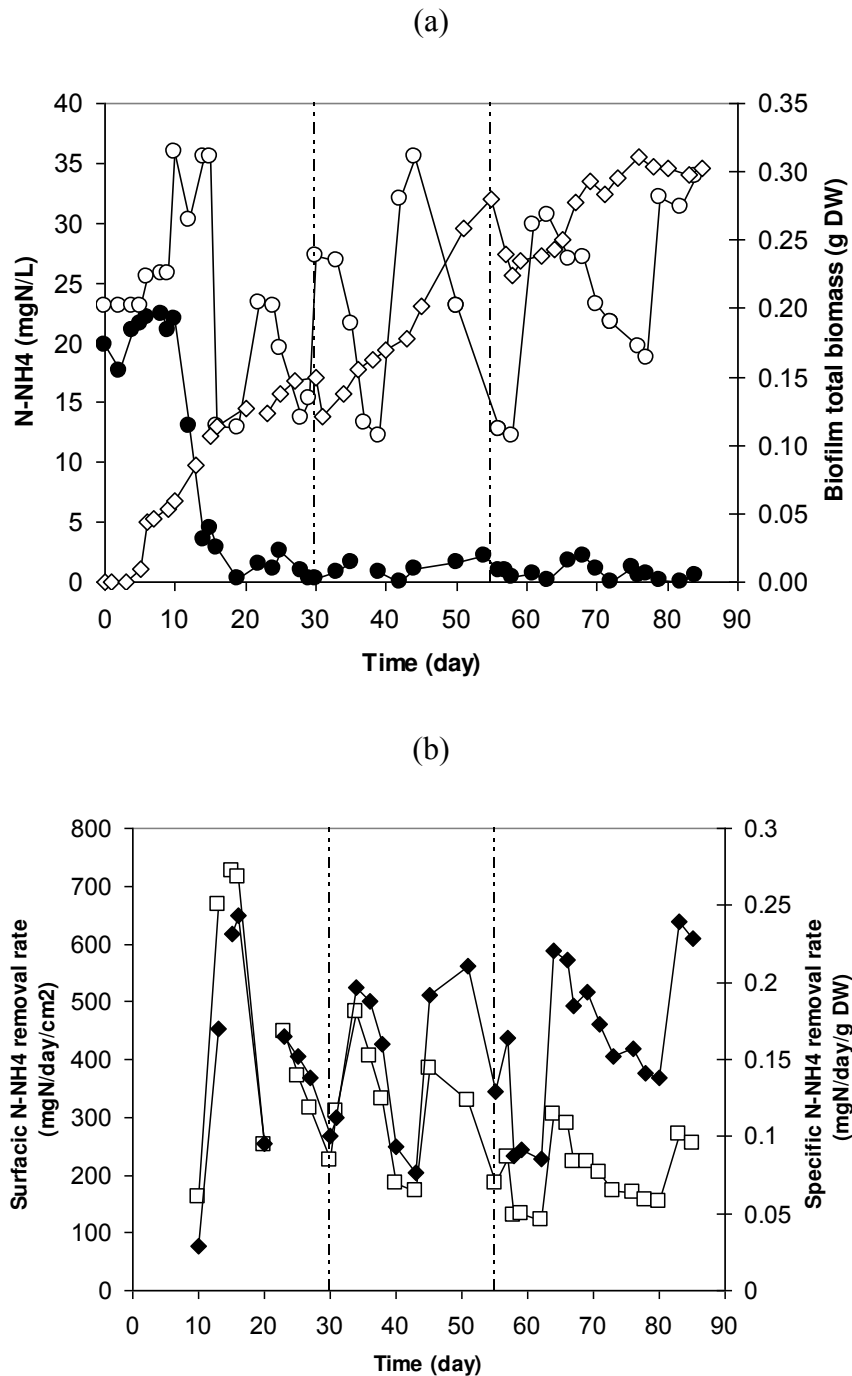
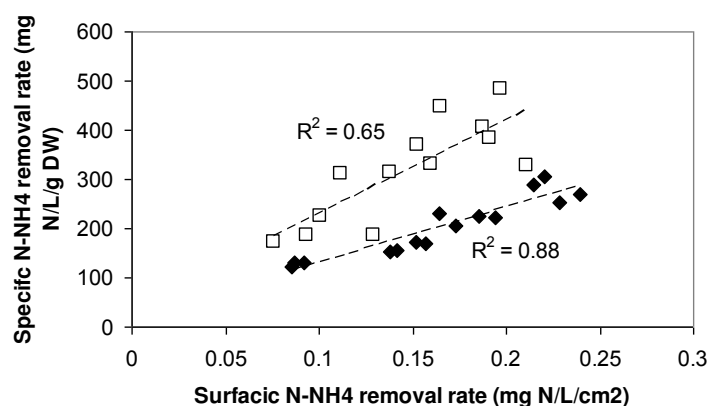


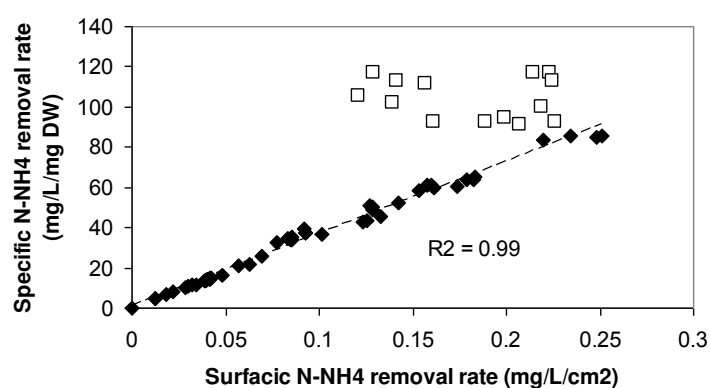
Figure 3: Run 1 (control without erythromycin addition: (a) Total biomass (\diamond), N-NH₄ in feed (\circ) and in reactor (\bullet); (b) N-NH₄ surfacic removal rate (\blacklozenge) and specific removal rate (\square). The vertical dotted lines represent the days of disc sacrifice and exchange.

Two linear correlations can be found between $R_{rem,a,S}$ and $R_{rem,b,S}$ (Figure 4a) before and after that date.

(a)



(b)



(c)

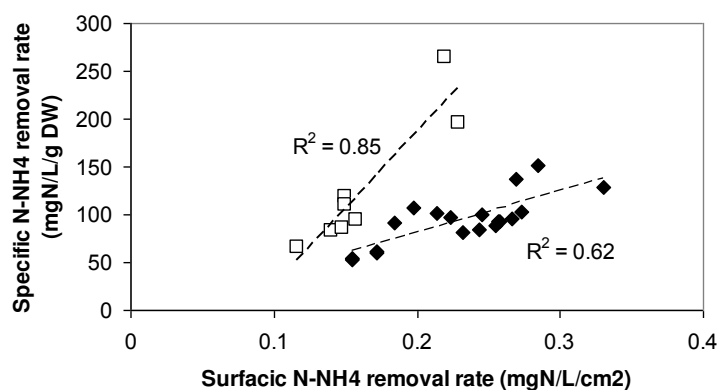


Figure 4: Linear correlations between surfacic and specific N-NH4 removal rates. (a) Run 1 (□) before day 40 (◆) after day 40; (b) Run 2: (□) before day 30 (◆) after day 30 ; (c) Run 3 : (□) before day 20 (◆) after day 20.

In Run 2 the erythromycin pulses were added at increasing concentrations: 0.5, 1, 5, 15, 20, 20 and 30 mg/L during 24h in continuous mode on day 35; 48; 55; 63; 66; 69 and 87 respectively. The biofilm opacity on the five discs is plotted with respect to time in Figure 5. Prior to the first addition of erythromycin the biofilm developed similarly on the five disks.

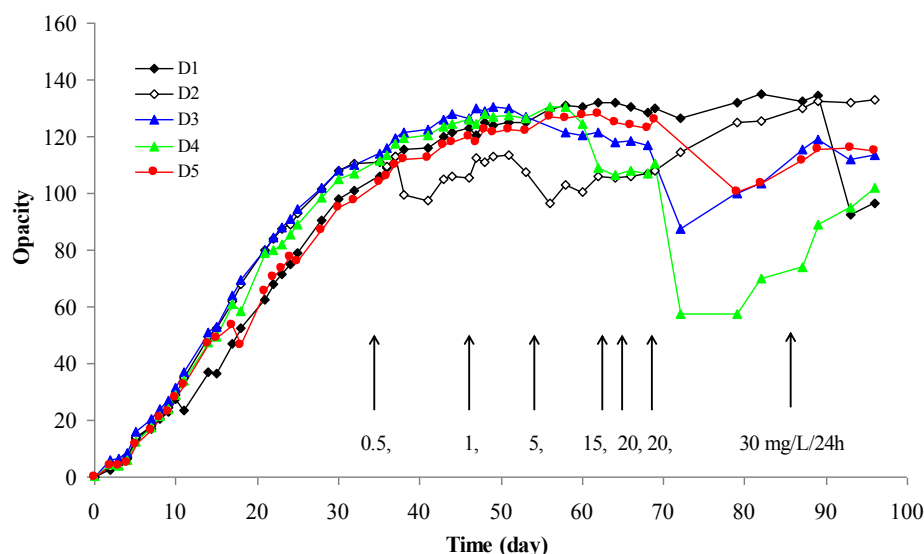


Figure 5: Biofilm development in Run 2

Table 1 shows the doses of erythromycin, the day of their injection and the apparent effect of the antibiotic represented by the detachment and sloughing according to the disk and the day of the phenomenon. For every addition of erythromycin a detachment was observed on one or more of disks two or three days after the addition. Moreover, for the larger doses (20 and 30 mg/L during 24h) large detachments occurred.

Table1. Erythromycin doses, number of detachment/ sloughing according to the disc and time.

Dose of the Erythromycin (mg/L/24h)	0.5	1	5	15	20	20	30
Time (day)	35	48	55	63	66	69	87
Detachment: (Disk/day)	D ₂ /37	D ₂ /53 D ₃ /53	D ₃ /58 D ₄ /60 D ₄ /62	D ₃ /64 D ₅ /64	D ₃ /68	D ₃ /89 D ₅ /72	D ₃ /93
Sloughing (Disk/day)						D ₃ /72 D ₄ /72	D ₁ /93

However it seems that erythromycin did not really affect the bacterial growth on the long term because regrowth occurred after the detachments: on D₂ starting from day 41 to day 50 and then from 56 to the end of the experiment, on D₃ and D₄ starting from day 72 to the end and on D₅ from day 79 to the end of the experiment.

In terms of N-NH₄ removal rates, two phases can be observed as for the control experiment (Figure 6).

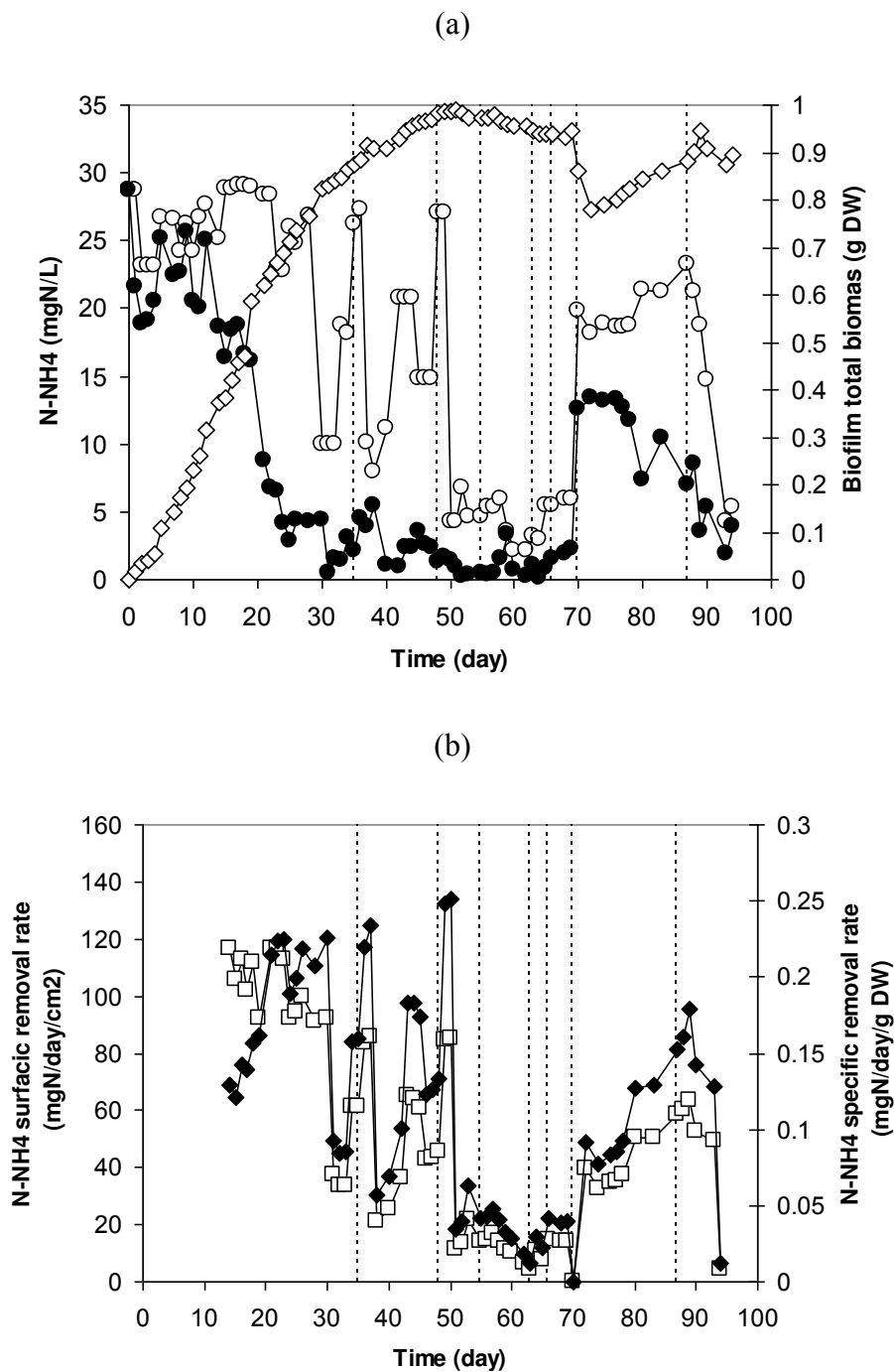


Figure 6: Run 2: (a) Total biomass (◇), N-NH₄ in feed (○) and in reactor (●); (b) N-NH₄ surfacic removal rate (◆) and specific removal rate (□). The vertical dotted lines represent the days of erythromycin addition.

The critical date was day 30, which was prior to any erythromycin addition or biofilm detachment (Figure 4b). No correlation was found prior to day 30, for the remaining part, a high coefficient of correlation was observed in spite of erythromycin repeated additions at high concentration. It has to be reminded that similar concentrations had a drastic effect on activated sludge biomass in the experiments described by Louvet et al. (2010a, 2010b) both on the total biomass (floc disintegration) and N-NH₄ removal (inhibition).

Run 3 was realized to test the effect of erythromycin on biofilm developing on structured disks and only high erythromycin concentrations were used, to avoid any possible adaptation of the bacteria to the antibiotic. Figure 7 shows the development of the biofilm on the five discs with time. A mechanical detachment at day 16 occurred when taking down the disks assembly from reactor. In terms of N-NH₄ removal rates, the critical date was day 20, again before any possible disturbance due to erythromycin addition (Figure 8 and Figure 4c). It seems to coincide with the time where full ammonia removal from the bulk phase was achieved. Erythromycin was added at the concentration 20 and 30 mg/L/24h at days 39 and 49 respectively. The biofilm development was not affected by erythromycin and no detachment or sloughing was detected. At the end of the experiment the smooth surface disc had 72% less biomass than the structured discs.

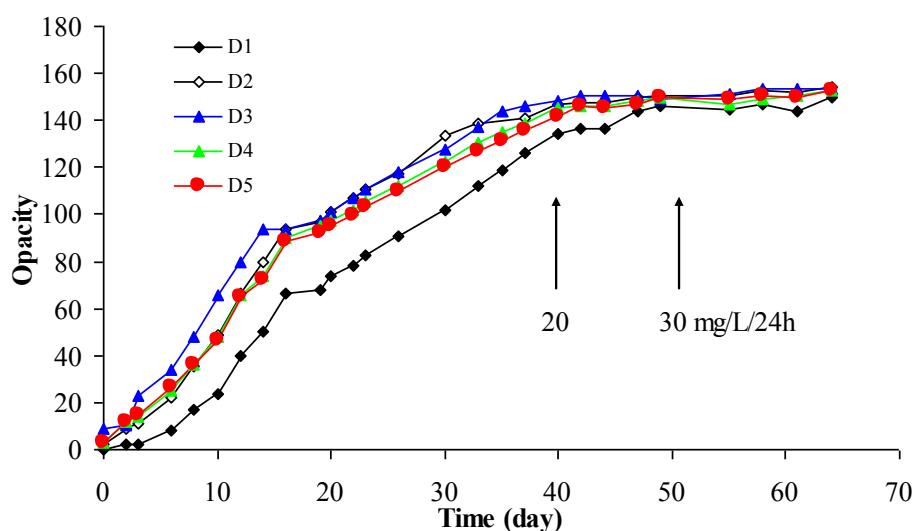


Figure 7: Biofilm development in Run 3

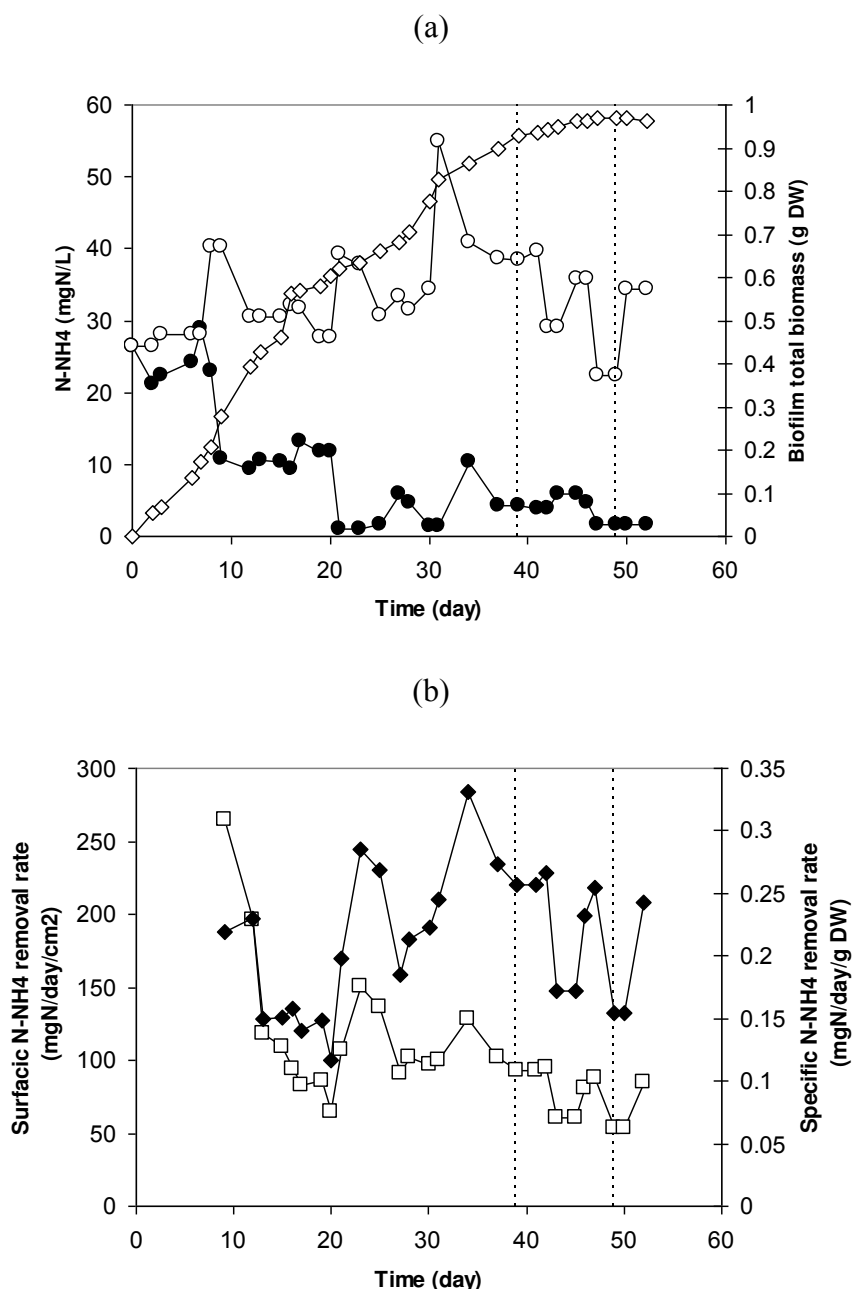


Figure 8: Run 3: (a) Total biomass (◇), N-NH₄ in feed (○) and in reactor (●); (b) N-NH₄ surfacic removal rate (◆) and specific removal rate (□). The vertical dotted lines represent the days of erythromycin addition.

2.2 Confocal Laser Scanning Macroscopy.

Two series of images were grabbed with the confocal microscope following additions of erythromycin on the biofilm. The first series was obtained by adding 1 mL of a 10 mg/L erythromycin solution on a 11 days old biofilm and the second one by adding a drop of 40 mg erythromycin/l on a 14 days old biofilm.

Figure 9 shows a global view of the biofilm taken on x2 lens before erythromycin addition which illustrates the macrostructure of biofilm in which channels (in black), bacterial alive aggregates (in green), damaged bacteria (in red) and the biofilm matrix (in blue).

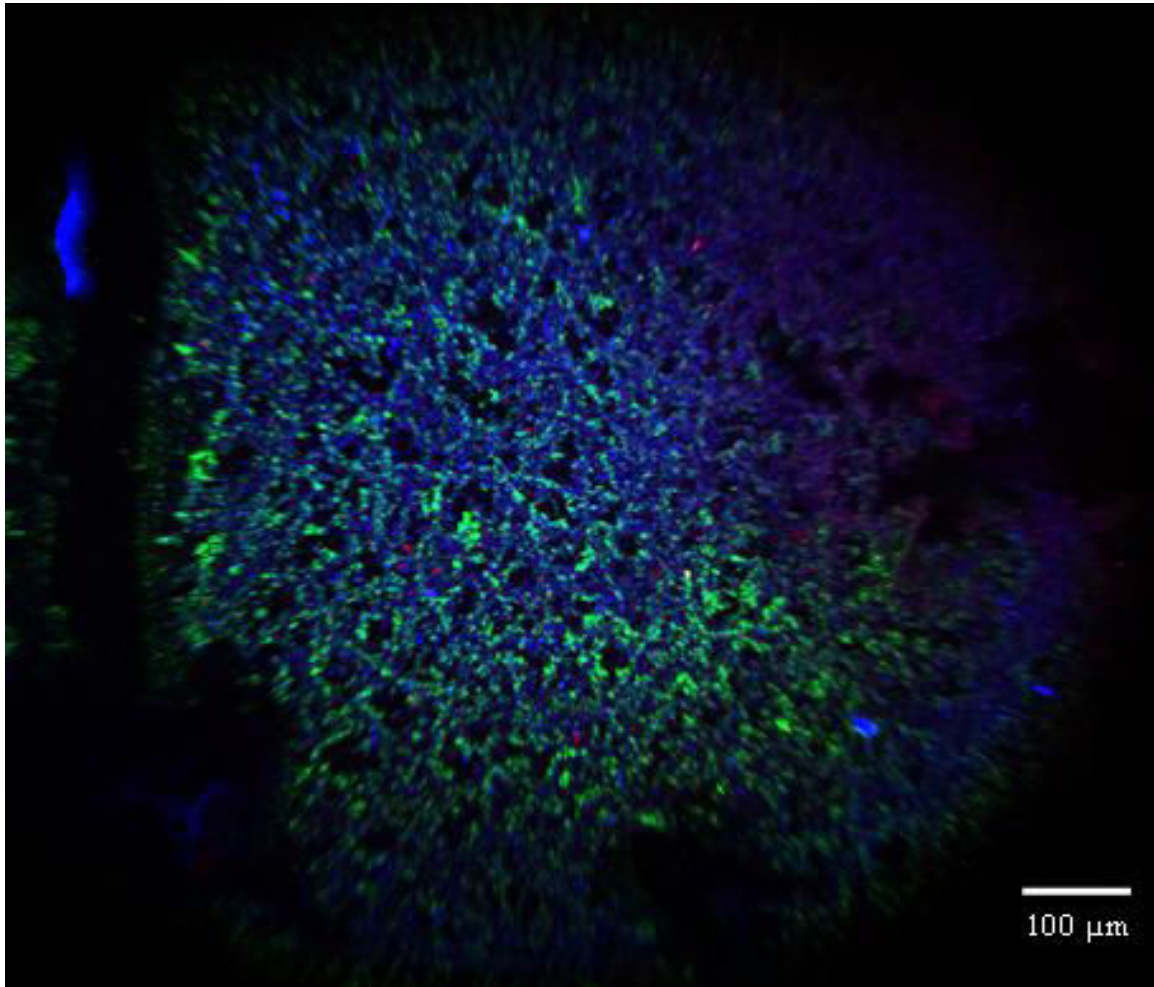


Figure 9: Biofilm macrostructure with a x 2 lens.

Similar results were obtained for both additions and only those obtained with the highest concentration of erythromycin are shown in details. Figure 10 shows the variations, in terms of number of pixels) of the green fluorescence intensity monitors the number of dead and damaged bacteria (red) and live ones (green) at time 0 and 45 min and 90 min after the pulse of erythromycin. The green fluorescence is larger than damaged ones and damaged bacteria increased with the time, but also live bacteria increased either. This variation not seems to be coherent because live bacteria are largely increased in spite of the increasing of damaged ones during a small time period.

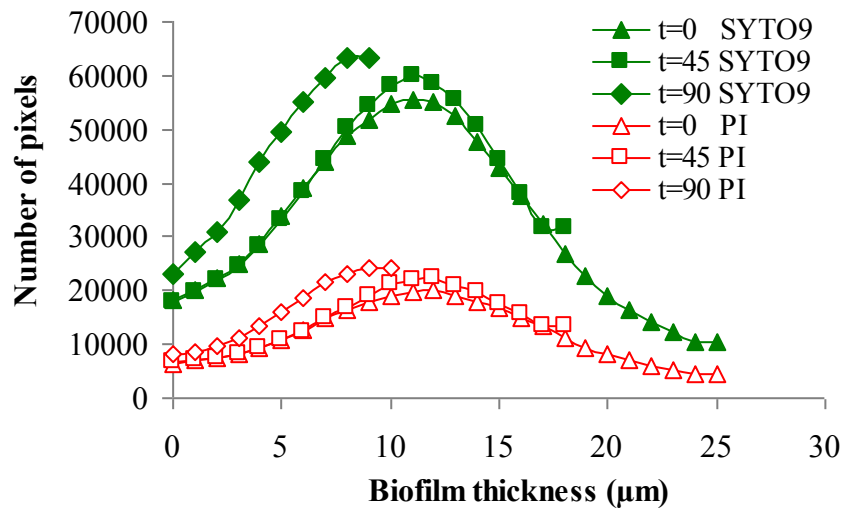


Figure 10: The number of damaged (red) and live (green) bacteria in function of the depth of the biofilm during 90 min.

For that reason, variations of damaged and live bacteria were calculated as a percentage of their initial value ($t = 0$) with respect to the time. In Figure 11, the variations of both damaged and live bacteria are plotted with respect to time. No real difference can be observed

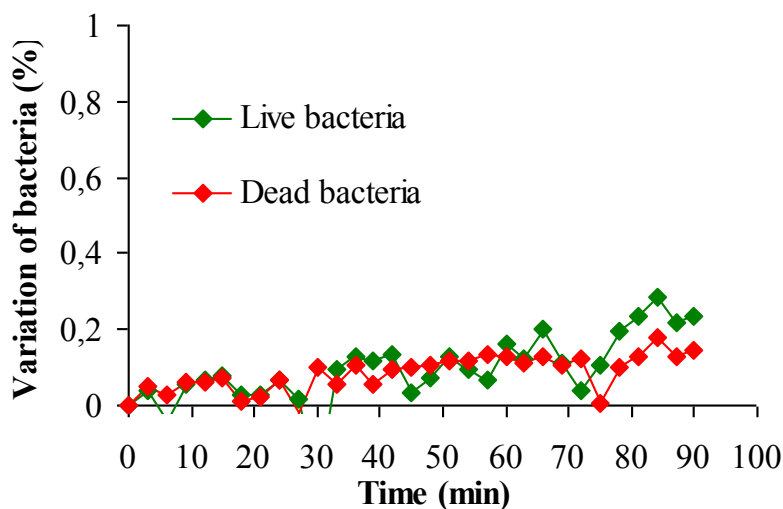


Figure11: variations of damaged (red) and live (green) bacteria in function with the time.

This suggestion was proved by visualizing biofilm images on three dimensional projections. When the maximal projection is vertically done, we obtain a photo which illustrates how bacteria are positioning in the biofilm surface. But when the maximal projection is horizontally done, the positioning of the bacterial agglomerations could be seen within the depth of the biofilm. Results are monitored in Figure 12 (a) which shows live bacterial

agglomerations (green) before (blank) and after adding the erythromycin (40 mg/L) starting from time $t=0$ to $t=90$ min, the number of live bacteria did not change with the time, damaged bacteria did not increase either at time 90 min as it is shown. Matrix is marked with blue color because of nucleic acids involved in its composition as it is previously mentioned. Adding to this, in Figure 12 (b) bacterial agglomerations in the biofilm depth seem to migrate from the bottom toward the up of the image. This observation affirms that biofilm shrinks with the time and reject water out of its canals which causes structural changes due to dehydration and in consequence thickness decrease.

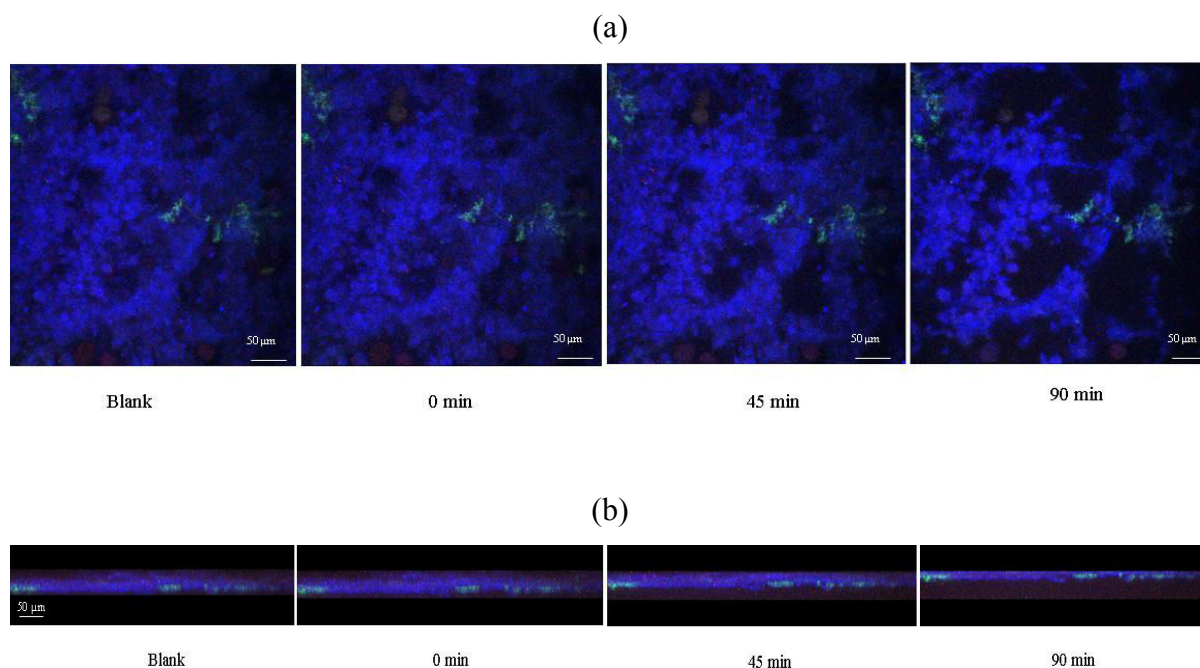


Figure 12: Vertical maximal projection (a) and horizontal maximal projection (b).

Images in Figure 13 show the biofilm and their live and damaged bacteria before (A) ($t=0$ min) and after (B) ($t=32$ min) adding 10 mg/L of erythromycin. No variation was observed in the number of live and damaged bacteria.

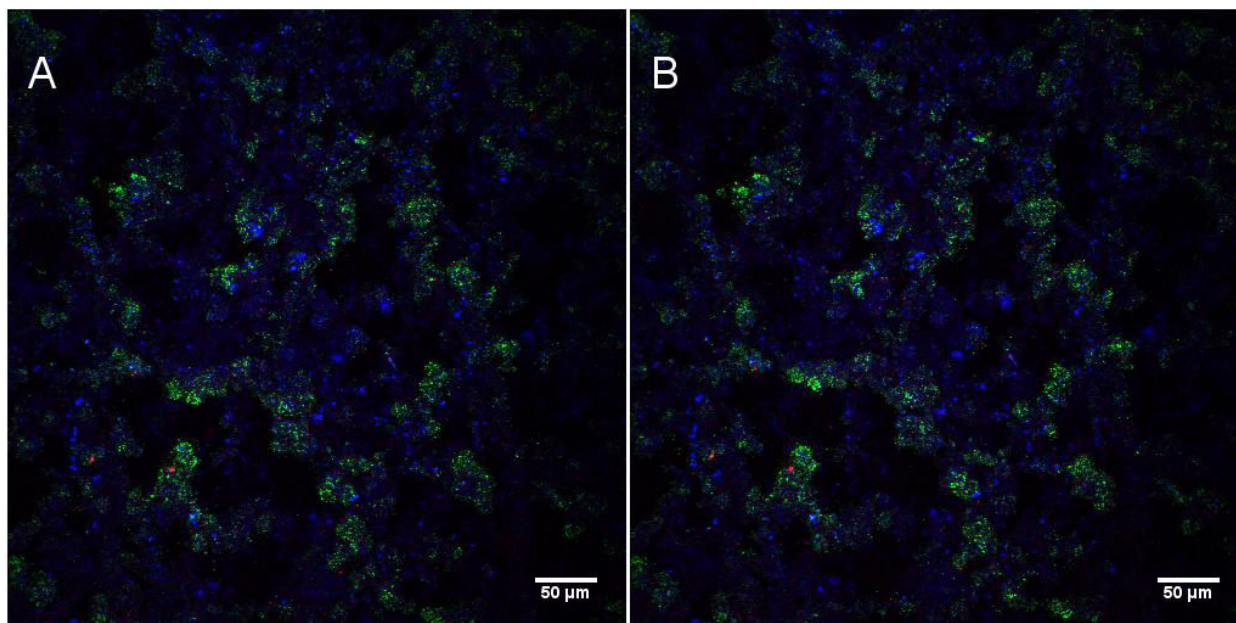


Figure13: Biofilm with 10mg/l erythromycin at $t=0$ (A) and $t=32$ minutes (B).

4. Conclusions

High doses of erythromycin have been applied on mature biofilms (i.e. several weeks old) developing on discs in a Rotating Biological Contactor has been observed. Mitigate effects were observed:

- The lowest dose of erythromycin (0.5 mg/L during 24 hrs) seems to induce small detachments and the highest ones (20 to 30 mg/L during 24 hrs) seem to cause biofilm sloughing. In such a case bacteria are capable to re-grow once the antibiotic has been washed out of the cultivation system. However when using discs with a three-dimensional structuration which offers shelter to bacteria no detachment or sloughing was observed.
- No definite effect was seen concerning the activity of nitrifiers, on the contrary to what has been observed with activated sludge flocs. There was no difference in terms of ammonia removal between a biofilm exposed to erythromycin and a control biofilm not exposed to the antibiotic. Furthermore no effect was seen between the ammonia removal rates observed prior or after exposure to erythromycin.
- Visualization with a confocal microscope using the BacLight viability stain was attempted but it did not reveal either a toxic effect of the antibiotic on the bacteria.

In conclusion bacteria embedded in a mature biofilms are more resistant to high doses of erythromycin than activated sludge bacteria aggregated in flocs. This can be due to the physical protection offered by the exopolymeric matrix or to reaction between the antibiotic and these substances.

Acknowledgements

The project was financially supported by ICEEL Carnot Institute, ANR (ANTIBI-EAU), Zone Atelier Moselle and Région Lorraine (CPER).

III.5. Article V: Development of biofilm in a multistage fixed-bed reactor

Muatasem ALNNASOURI^{1,2}, Christophe DAGOT², Marie-Noëlle PONS^{1*}

1 Laboratoire Réactions et Génie des Procédés, CNRS, Nancy Université, INPL

1, rue Grandville, BP 20451, Nancy cedex, France

2 Groupement de Recherches Eau Sol Environnement, ENSIL

1, rue Atlantis, Parc ESTER Technopôle,

BP 6804, 87068 Limoges cedex, France

Abstract:

A fixed-bed biofilm reactor has been designed to facilitate the monitoring of the biofilm development in experiments of pollution removal in water and wastewater. The reactor is built as a succession of stages containing flat slides that can be easily temporarily or permanently removed (and replaced in the later case). The biofilm development on these slides has been monitored by non destructive methods (imaging on a scanner and biofilm thickness) and a destructive method (dry weight). The non destructive method based on image analysis could be applied both on smooth and structured slides. Monitoring results obtained with the three methods are agreed very well. A gradient was observed along the column in terms of biomass amount and specific growth rate, which both decrease at the biofilm carrier is far from the feeding point. Carrier structuration promotes the stability of the biofilm.

Keywords: Biofilm, image analyse, multi-stage reactor, fixed bed reactor.

1. Introduction

Fixed-bed reactors are largely applied in many biological applications based on biofilms development on static media. They have several advantages, which distinguish them from other used types, such as low construction and maintenance costs (Lim et al, 1992). The carriers are able to attain high biomass concentrations of immobilized micro-organisms and keep its activity in form of biofilms (Ma et al., 1990). They are requiring less volume compared to conventional reactors to achieve the same performance (Park et al., 2004).

One of the most used is the submerged bed, in which the biofilm is completely immersed in the liquid. It was usefully applied in ethanol production achieved by immobilizing *Saccharomyces cerevisiae* on ceramic carriers (Chung and Park, 1983) and in calcium alginate beads (Rota et al., 1996).

They have also applications in industrial and domestic biological waste (water and gas) treatment. Bing et al. (2007) proposed it for treating low-concentration SO₂ gas by a adaptation of a *Thiobacillus* strain collected from a factory for the treatment of sewage (Bing et al., 2007). Very different biofilm carriers have been tested: plastic tubes for slaughterhouse wastewater treatment, (Del Pozo, 2003), foam sponge cubes (Yen-Hui, 2008), pumice stones carriers (Eike et al., 2010).

Since keeping the biofilm fixed on the carriers is the main objective of these reactors, detachment as well as sloughing of biofilm can seriously affect the performance of the reactors (Chang et al., 1991) because detached biofilm will be evacuated by the liquid flow out of the reactor, which will consequently minimize the biofilm activity (Lewandowski et al., 2008). This technology is faced with the difficulty of the characterization and monitoring of this biofilm on its carriers along the height of the reactor during a long time period. The sampling from several heights of the fixed-bed supports is always made difficult by the shape of these carriers and the lack of a suitable method of biofilm quantification. In order to study the development of biofilm in this type of reactors, these obstacles must be resolved. For this purpose, a lab-scale fixed-bed multi stage reactor has been especially designed to investigate the biodegradation of micropollutants, the biomass distribution and development rates on the carriers. Image analysis was used for biofilm development quantification over long periods of time as a nondestructive method (Milferstedt et al. 2006; Pons et al., 2009).

2. Materials and Methods

2.1. Experimental setup

The reactor is composed of two sections (Figure. 1). The main section is a cylinder ($\text{Ø} = 10 \text{ cm}$, $H = 64 \text{ cm}$) made of transparent polyethylene with a removable top cover. This cylinder includes seven stages fixed one above the other to a central axis in the center of the stages. Each stage contains 40 vertical transparent slides ($0.1 \times 2.5 \times 7.5 \text{ cm}$) horizontally sliding in grooves so the slides can be removed and replaced during the experiment. The slides in each stage are perpendicular with those in the next stage to maximize the turbulence of the liquid phase and to avoid short-circuits. The space between two slides in the stage is 0.5 cm. The whole set of stages could be removed from the cylinder from the top. The liquid circulates from the bottom to the top of the column. The second section is a cylindrical reservoir made from polyethylene in which the aeration, degassing and medium replacement take place. The total working volume of the reactor is 4.6L with a surface of 1.1 m². Two peristaltic pumps were used for both feeding and circulation. Two experiences were done with different recycle flowrates: 20 L/h for Run 1 and 10 L/h for Run 2. The reactors have been inoculated batchwise for 48h with domestic wastewater (from Limoges, France for Run 1 and Nancy, France for Run 4). Slides in Run 1 were made out of glass with a smooth surface. In Run 2 all slides were made out of glass except one per stage: it was made out of Plexiglass and structured. Smooth slides in both runs were replaced with new ones when sampling was done. Structured slides in Run 2 were scanned and returned back to their places. After inoculation, reactors were fed by synthetic alimentation. The feed is obtained by adequate dilution of concentrated solution. The dilution rate was varied along the experiments. For Run 1 the concentrated solution is composed of: Viandox (Amora, Dijon, France) 6.5 g/l, sucrose 350 mg/l, ammonium chloride 280 mg/l, phosphoric acid 85%: 0.038 ml/l. For Run 2 it is composed of: Viandox (Amora, Dijon, France) 200 g/l, sucrose 12 g/l, ammonium chloride 10 g/l, phosphoric acid 0.5g/l. For both reactors, the feed rate was fixed at 4.6 L / day and the air flow rate at 2 L/min. A frequent cleaning of tubes and reservoir was done to remove any detached biofilm that could clog the system.

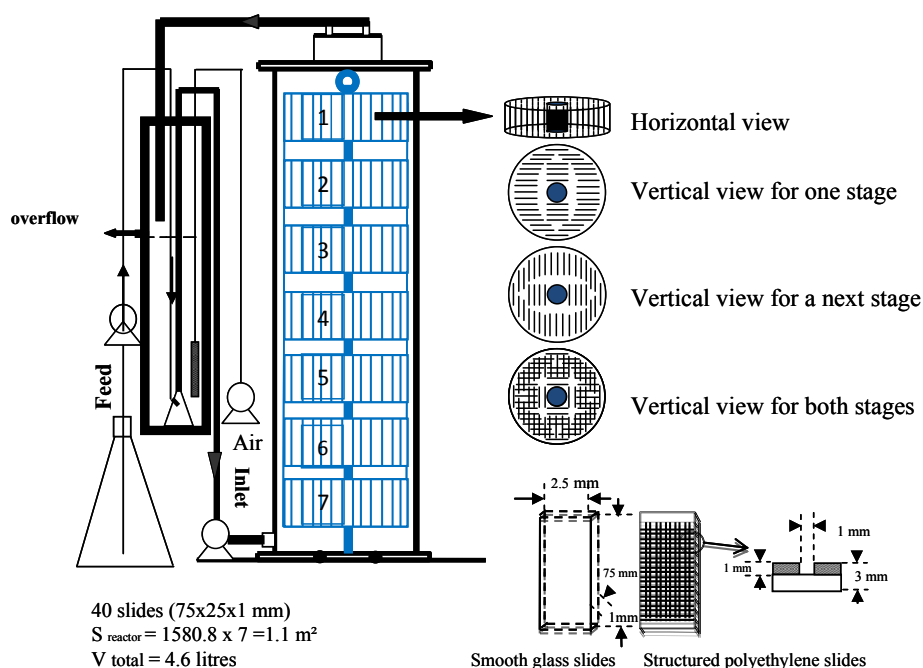


Figure1: Experimental set-up

2.2 Analyses

Liquid samples were regularly taken to verify the overall biofilm activity. After filtration (1.2 μm pore size), the UV-visible spectrum was collected on a Shimadzu UV-1700 spectrophotometer for Run 1 and on a SECOMAN Anthélie Light UV-1700 spectrophotometer for Run 2 using a quartz cell (path length = 1 cm). The absorbance at 254 nm (A_{254}) was used as a surrogate measurement of the soluble organic matter (Howard et al., 2004). Nitrate, nitrite and ammonium were determined by ion chromatography (Dionex) with the following parameters for Run 1, mobile phase KOH 28 mM, injection volume 25 μL , total run time 16 min, column temperature 20 $^{\circ}\text{C}$, detection temperature 25 $^{\circ}\text{C}$, mobile phase flow 1mL/min), and for Run 2, mobile phase: KOH 30 mM, injection volume 15 μl , total run time 13 min, column temperature 20 $^{\circ}\text{C}$, detection temperature 25 $^{\circ}\text{C}$, mobile phase flow 1mL/min). Deionized water was used as blank for all analyses.

2.3. Image acquisition

After cleaning of their backside, slides were imaged on a flatbed scanner (Epson perfection Photo 4490) on 256 grey levels with a spatial resolution of 1200 dpi for Run 1 (1 pixel = 21 μm) and 800 dpi (1 pixel = 31.8 μm) for Run 2. Images were saved in TIFF format and analyzed by an in-house software written in FORTRAN. The grey-level distribution of each image is determined, from which the average grey-level is obtained. Initially the grey-level distribution of each blank slide used in the cultivation system is determined. At any time, the

biofilm opacity is the difference between the slide average grey-level at time t and its initial average grey-level. Scanning of a slide takes less than 1 minute

During Run 1 the biofilm thickness was measured on a KL 1500 Stem SV6 Zeiss microscope (Le Pecq, France) with a 1.6 x 10 objective operated under Videomet (version 5.4.6) (Micro-vision Instruments, Evry, France). The glass slide was placed vertically on one of its longer edges. The optical system was focused to get a precise view of the biofilm edge. The alignment was such that no distortion was observed. Using the mouse two points were selected on a line perpendicular to the glass edge, one at the substratum-biofilm interface and the second one at the air-biofilm interface. The length of the segment is given in microns ($\pm 0.01 \mu\text{m}$) by the software after calibration. Up to 7 measurements were done along the slide. The mean thickness (T) as well as thickness standard deviation were computed for each slide. After slide scanning and eventual measurement of the biofilm thickness, the slide was dried at 105°C for 24 h. After cooling, it was weighted (weight W_1 at $\pm 0.0001 \text{ g}$), washed with sterile de-ionized water and dried again at 105°C for 24h. After weighting (weight W_2), the difference between W_1 and W_2 gave the mass of biofilm on the slide.

3. Results and discussion

3.1 Biological parameters

Figure.2 describes the general behavior of organic matter in both reactors explained by the absorbance at 254 nm ($A_{254 \text{ nm}}$), surrogate measurement of the dissolved oxygen demand. Biofilm communities in both reactors were capable to consume the majority of organic matters which indicates the viability of their populations.

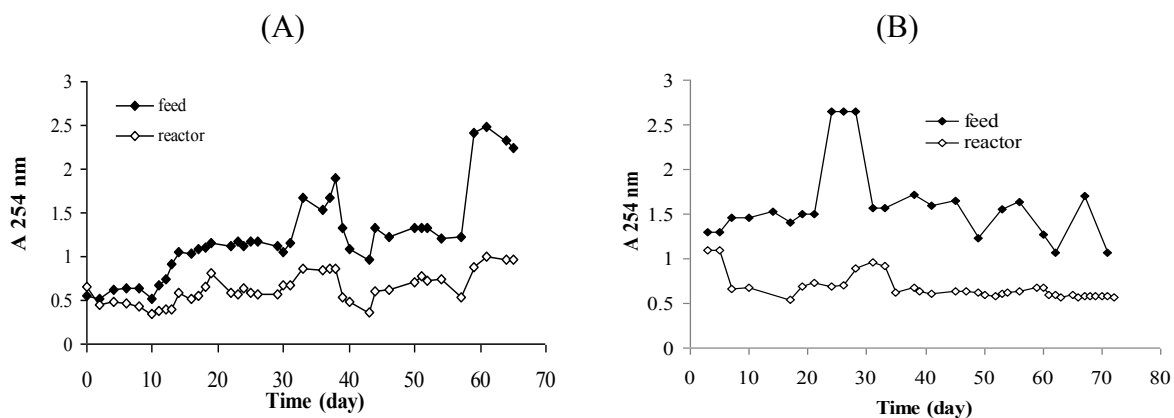


Figure 2: A_{254} in both reactor and feed for Run 1 (A) and Run 2 (B).

The changes in the nitrogen species in the feed and effluent is shown in Figure.3 for Run 1. Nitrification is installed around day 35 as it is seen by the decrease of ammonium and the increase of nitrates in the reactor. At day 57, due to major loss of biofilm by detachment and sloughing, nitrification was stopped and N-NH₄ began to increase in the reactor starting from day 55. This indicates to a great biodiversity in the biofilm and a full biological activity in the system. No nitrification was observed in Run 2 which could be because of little concentration of nitrifying bacteria in the inoculation substrate.

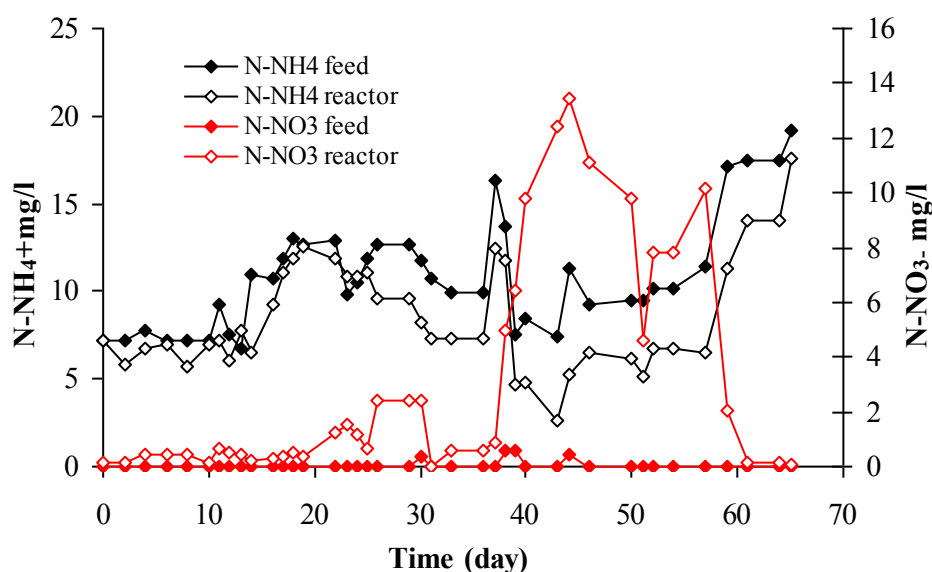


Figure 3: Residual N-NH₄ and N-NO₃ in the reactor and feed for Run 1.

3.2 Biofilm development

Figure 4 summarizes the biofilm development using the opacity in Run 1 for three stages: stage 1 at the top (outlet), stage 4 in the middle and stage 7 at the bottom of reactor (inlet). Two phases can be observed: a latency phase between day 0 and day 16, where the development was limited, followed by a phase with increased biofilm development but during which sloughing took place: stage 7 started to be sloughed on day 26, stage 4 on day 29 and stage 1 on day 32. After these sloughing events biofilm redeveloped in each stage but further sloughing took place later on. The points which have a high opacity value after the first sloughing represent the biofilm which have not yet sloughed (each point represents a different slide and therefore a different biofilm). It was verified visually than the slides were sloughed simultaneously in the same stage.

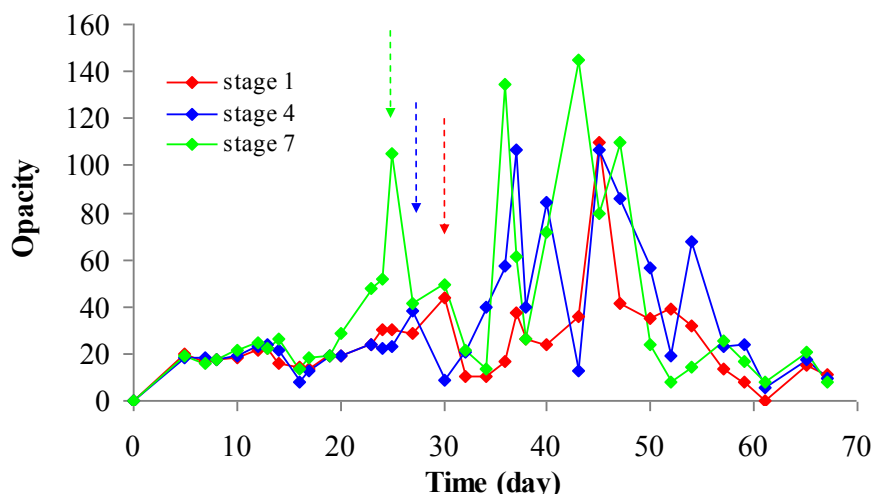


Figure 4: Opacity with respect to time in the three stages in Run 1. Arrows refer to the initiation of sloughing in each stage.

The standard deviation (SD) calculated by opacity indicates the homogeneity of the biofilm (Table 1). The mean of SD calculated in the development phases increases from stage 1 toward stage 7 indicating the heterogeneity of the biofilms in this direction.

Table1. Standard deviations calculated in the development phases in stages 1, 4 and 7 in Run 1.

	Mean of SD ± its standard deviation
Stage 1 (from day 0- 32)	12.35 ±12.6
Stage 4 (from day 0- 30)	14.29 ±18.27
Stage 7 (from day 0- 25)	17.53 ±18.35

Similar information was obtained by measuring the biofilm thickness. In Figure 5 the variations of the biofilm thickness in stage 1 (a) and stage 7 (b) are shown. The biofilm thickness increases with the time in each stage until the biofilm started to be sloughed. It also decreases when slides are far from the feed point. A sudden decrease of thickness (at the same days previously mentioned in the opacity) is noticed for the three stages. Prior to sloughing the thickness standard deviation is larger in stage 7 than in stages 4 and 1: this indicates also that the biofilm in stage 1 is more homogenous than in stage 4 and 7 respectively and that the biofilm surface irregularity decreased from the bottom to the top of the reactor in the same direction.

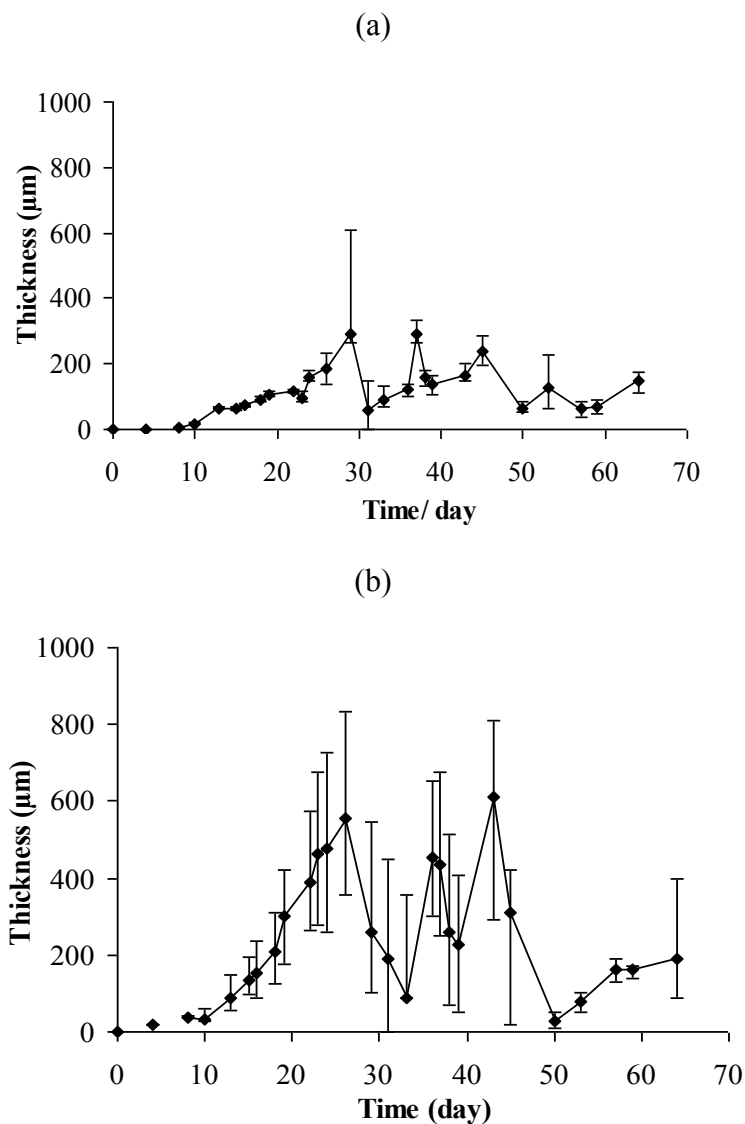


Figure 5: Thickness with respect to time for the stage 1 (a) and stage 7 (b) in Run 1, vertical bars = \pm standard deviation.

The growth rates in the initial development phase (i.e. prior to the first sloughing event sloughing) were calculated for each stage for each biofilm quantification method (thickness, dry weight and opacity). The coefficients of correlation were higher than 0.8 in all cases. Biofilm rates in the three studied stages in Run 1 are shown in Figure 6 in function of stage height by three methods: thickness (a), dry weight (b) and opacity (c).

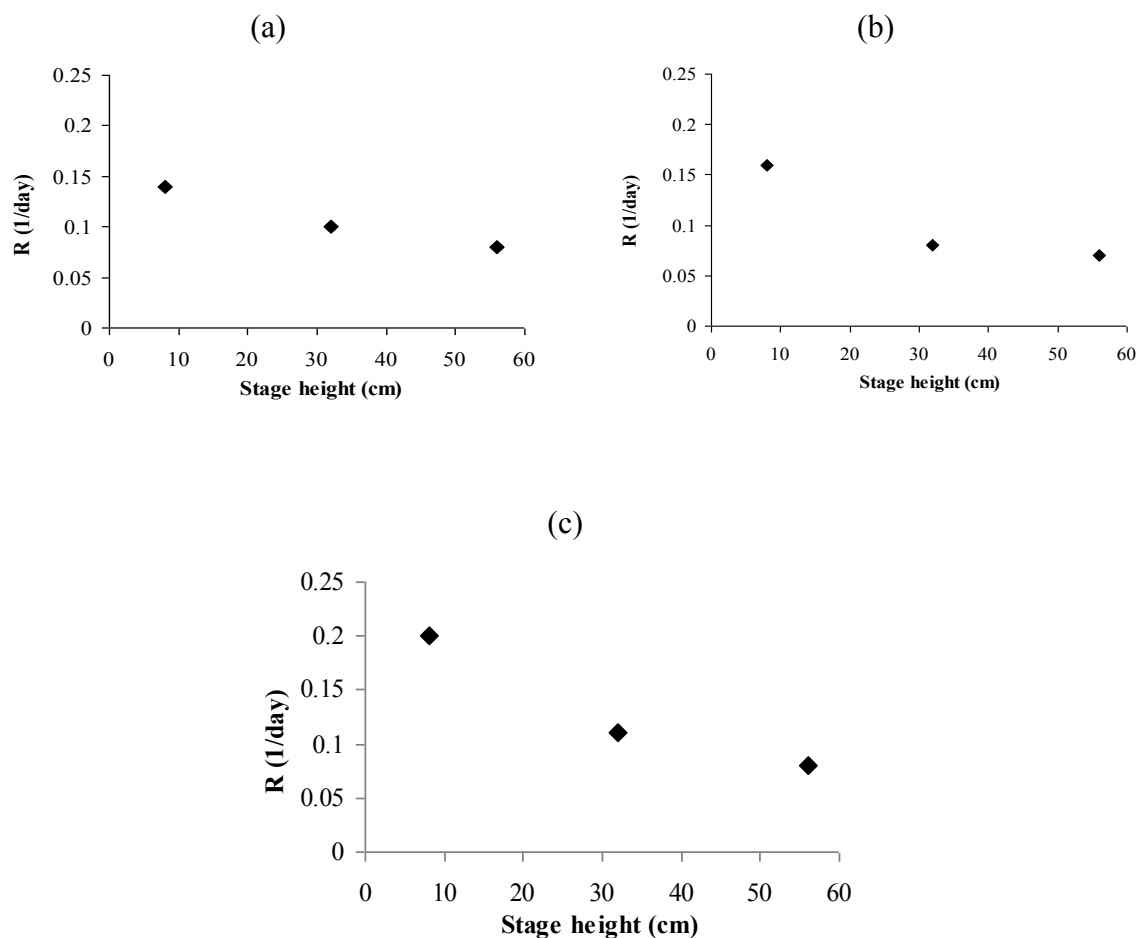


Figure 6: Relation between biofilm rate and stage height in the reactor obtained by thickness (a), dry weight (b) and opacity (c) in Run 1.

In Run 2 the biofilm development was monitored for the seven stages by both dry weight and opacity on smooth and structured slides. Figure 7 shows the biofilm development along the seven stages, based on opacity method for structured slides. The biofilm develops progressively with time in the seven stages with a decreasing gradient from the bottom (stage 7) to the top of the reactor (stage 1). A latency phase could be distinguished before day 8 where no development was detected.

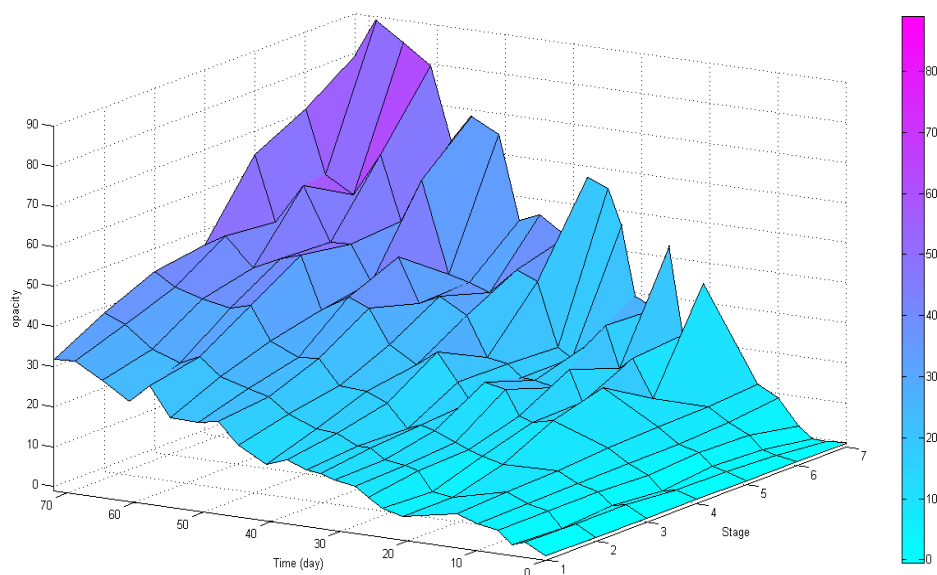


Figure 7: Biofilm monitoring in the seven stages on structured slides measured by the opacity.

The same results could be seen with the opacity on the smooth slides in the seven stages with the time in Figure 8. No sloughing was observed during this experiment. This might be due to the low recycling flow rate applied (10 L/h instead of 20 L/h in Run 1) and less variations in the feed composition. In terms of opacity a stationary phase in stage 7 seems to be detected after day 55. But opacity continued to vary for the other stages.

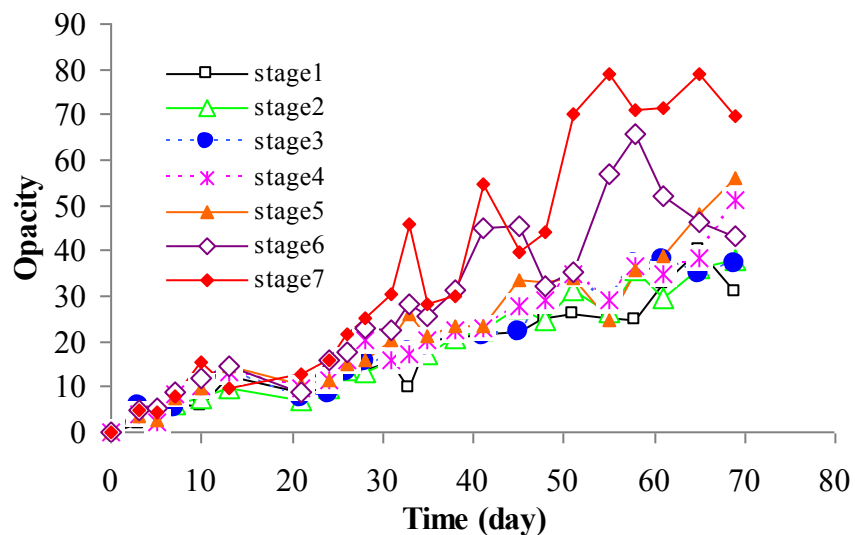


Figure 8: Biofilm monitoring in the seven stages on the smooth slides measured by opacity during Run 2.

Biofilm homogeneity increases from stage 7 to stage 1 as it is shown by the opacity standard deviation in Table 2.

Table 2. Mean of opacity standard deviation (SD) during Run 2.

	Mean of SD \pm its standard deviation
Stage 1	6.5 \pm 1.1
Stage 2	7.1 \pm 1.3
Stage 3	7.0 \pm 1.9
Stage 4	8.4 \pm 3.4
Stage 5	9.5 \pm 5.6
Stage 6	14.0 \pm 9.3
Stage 7	17.5 \pm 13.2

The development phase is longer than in Run 1. Table 3 shows the development rates obtained by opacity and dry weight on smooth slides and their coefficient correlation R^2 . Rates calculated in both methods have nearly the same values, but it seems the results obtained by opacity have higher R^2 .

Table 3. Development rates and their coefficient correlation R^2 calculated by the dry weight and opacity methods on smooth slides in Run 2.

Rate (day ⁻¹)/ R^2	Dry weight	R^2	Opacity	R^2
Stage 1	0.022	0.65	0.022	0.87
Stage 2	0.023	0.69	0.025	0.91
Stage 3	0.025	0.68	0.025	0.92
Stage 4	0.029	0.86	0.029	0.87
Stage 5	0.034	0.79	0.029	0.87
Stage 6	0.034	0.87	0.035	0.84
Stage 7	0.037	0.95	0.04	0.85

A linearly relationship between the biofilm development rates and the stage height in the reactor can be established with high coefficients of correlation for smooth slides measured by opacity (Figure 9a), structured slides measured by opacity (Figure 9b) and smooth slides measured by dry weight (Figure 9c).

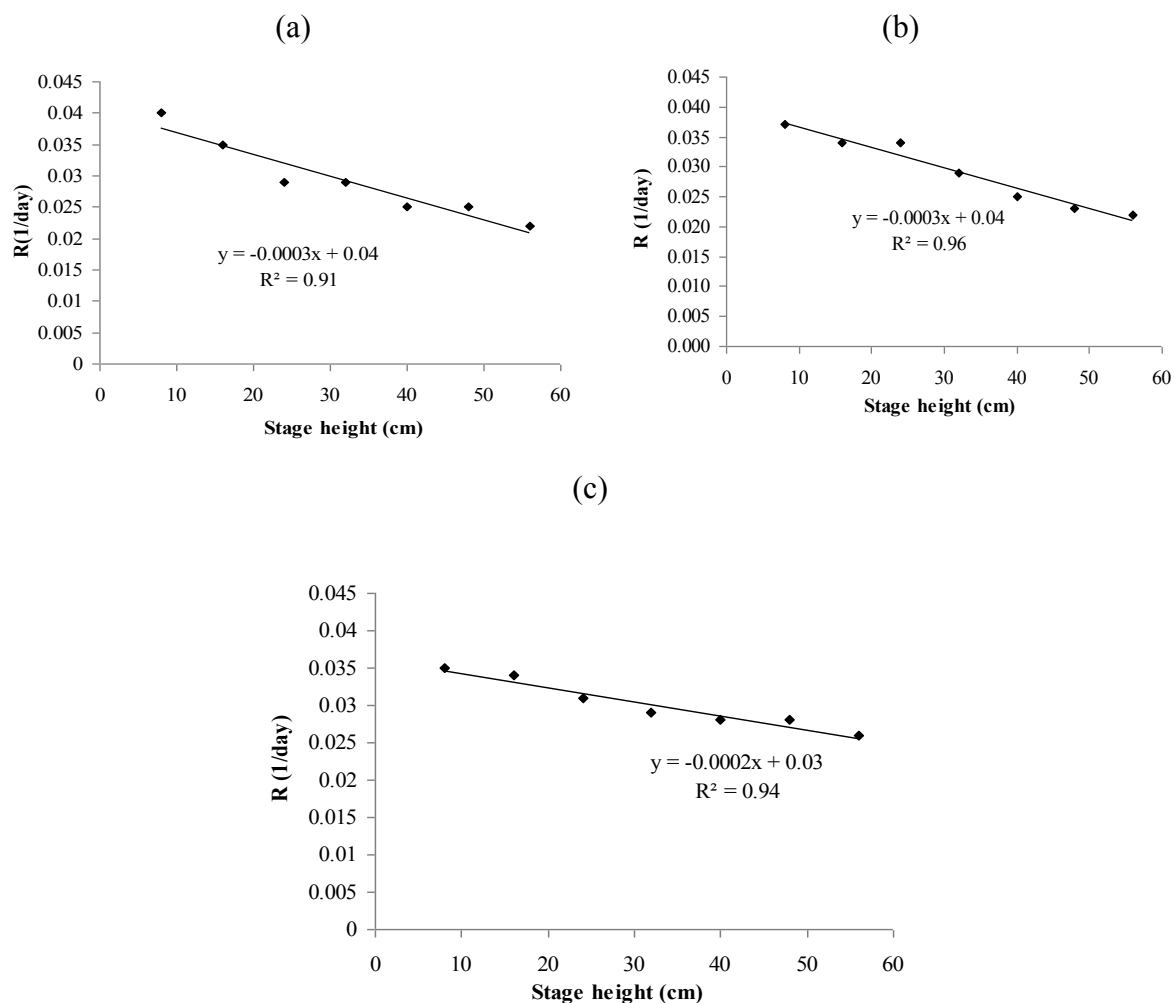


Figure 9: Relationship between biofilm development rates and position of the stage in the reactor obtained by opacity on smooth slides (a), dry weight on smooth slides (b) and opacity on structured slides (c) in Run 2.

The rates relationship for smooth slides measured by opacity and dry weight are identical with a high coefficient of correlation. The slope absolute value measured by opacity is smaller for the structure slides than for smooth. This indicates that the effect of the stage height on the structured slides might be smaller than on the smooth ones.

4. Conclusion

A lab-scale multi-stage fixed bed biofilm reactor was designed in order to facilitate the monitoring of the biofilm development on structured and smooth slides. Biofilm development rates increase when the biofilm carriers are near the feeding (bottom of the reactor in our case) and decrease toward the top. Biomass distribution follows the same tendency in the reactor. Results obtained by opacity, as a non-destructive method, are identical with those obtained by dry weight as a destructive method. Sloughing is promoted by a higher liquid phase flow rate in the column as it induces larger hydrodynamic stresses. The structuration of the carrier improves the stability of the biofilm, the grooves offering a shelter to the bacteria against hydrodynamic stresses. Further experiments include the application of the reactor for specific pollutant removal studies and the total replacement of the smooth glass slides by structured carriers.

Acknowledgements

The project was financially supported by ICEEL Carnot Institute, ANR (ANTIBI-EAU), Zone Atelier Moselle and Région Lorraine (CPER).

III.6. Résultats complémentaires

Les résultats de l'étude de la formation du biofilm par un consortium bactérien nommé CAsO1, qui a la capacité à oxyder l'As^{III} en As^V, sont discutés. Cette évolution a été étudiée à la fois dans les réacteurs à lit fixe en utilisant la pouzzolane comme support et dans le réacteur à lit fixe multi étages. La répartition de la biomasse est également étudiée dans cette étude par la méthode opacité et d'autres techniques d'analyse d'images.

III.6.1. Formation d'un biofilm pour la bio-oxydation de l'arsenic

Une fois le réacteur multi-étagé à lames de verre testé et son fonctionnement validé, il a été utilisé en parallèle avec des colonnes remplies de pouzzolane pour l'étude de la bio-oxydation de l'arsenic. Seules des lames de verre ont été utilisées dans cette expérience. Les réacteurs R_0 et R_1 (Figure II.8) ont été mis en œuvre avec des temps de séjour de 4h (entre les jours 0 et 18), de 2h (entre les jours 18 et 49) et finalement de 1h. Le temps de séjour initial dans le réacteur R_2 était de 4h et a été fixé à 2h à partir du jour 33.

La Figure III.1 présente les résultats obtenus dans les trois colonnes concernant le devenir de l'arsenic. Pendant les premiers jours de l'expérience, la transformation d' As^{III} en As^V a été observée dans le réacteur R_1 rempli de pouzzolane etensemencé mais pas dans le réacteur R_2 à lames de verre. Comme on peut le voir sur la Figure III.1, à par l'augmentation de la teneur en As^V à l'entrée, le réacteur R_0 a été contaminé le jour 14, du fait d'une contamination de la cuve de stockage. La cuve a été nettoyée et l'expérience s'est poursuivie. Une nouvelle contamination est apparue entre les jours 19 et 31. Entre les jours 31 et 44 (nouvelle contamination) la transformation d' As^{III} et As^V a été obtenue à la fois dans le réacteur R_1 et dans le réacteur R_2 . Cependant la transformation n'était que de 57% dans le réacteur R_2 alors qu'elle était totale dans le réacteur R_1 . Cela est sans doute dû à la faible surface déployée dans le réacteur R_2 par rapport au réacteur rempli de pouzzolane. Le biofilm se développant sur les lames de verre lisse est également plus soumis aux contraintes hydrodynamiques.

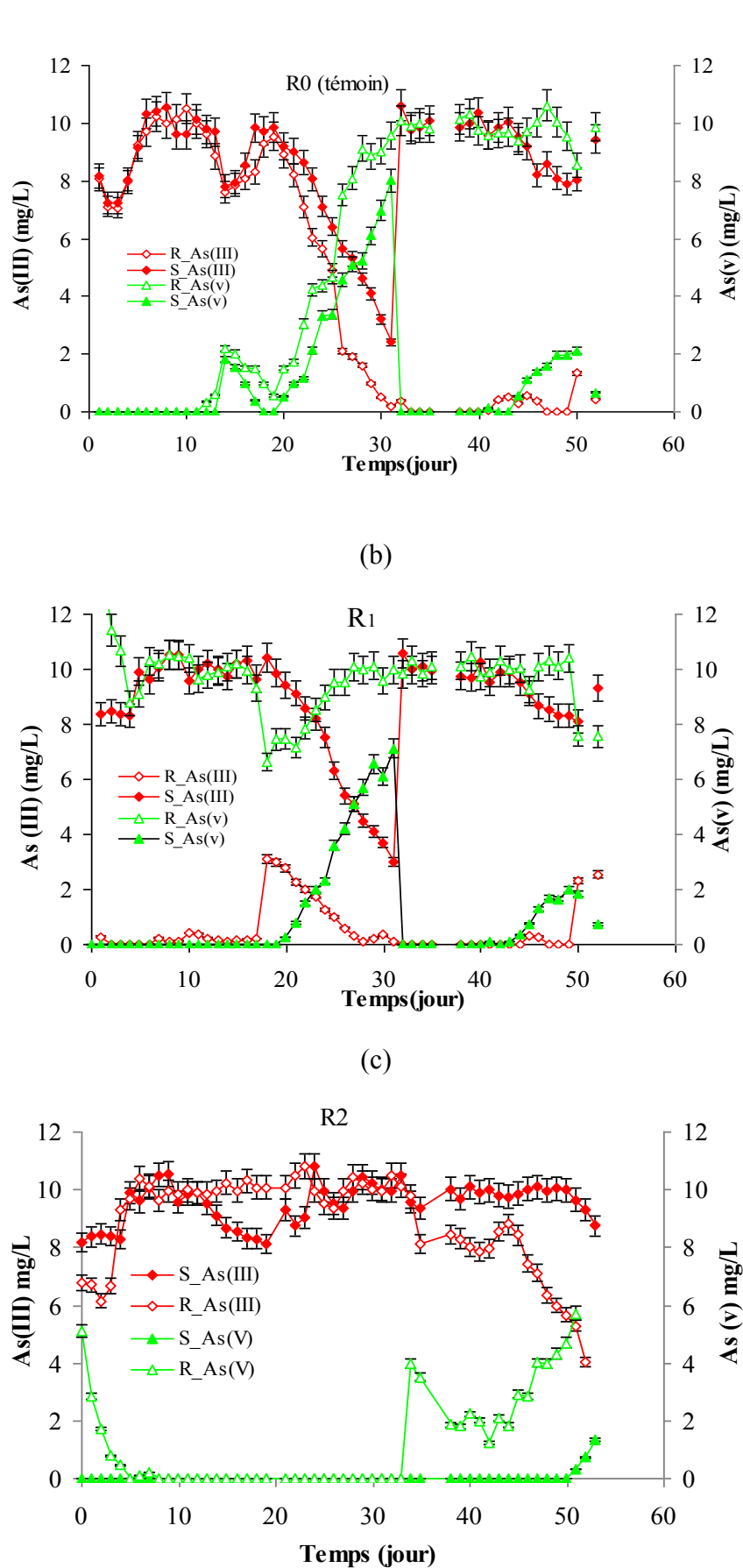


Figure III. 1: Suivi des espèces d'arsenic à l'entrée et à la sortie des réacteurs : R₀ (a), R₁ (b) et R₂ (c).

Le faible développement de biofilm dans le réacteur R₂ a été confirmé par l'analyse des images des lames de verre obtenues à l'aide du scanner. L'opacité est restée nulle. Outre l'hypothèse de l'absence de présence de bactéries, il faut aussi noter que le milieu de culture utilisé est minéral, sans aucune impuretés colorées. Les bactéries sont transparentes et seul leur accumulation dans un biofilm épais permet de les «voir», du fait des phénomènes de réfraction, de réfléchissement et d'adsorption de la lumière. La visualisation est d'autre part facilitée en cas de présence de substances colorantes ou de particules qui peuvent être incorporées dans le biofilm, le rendant ainsi plus visible. Dans le cas présent ni les mesures de poids sec de lame, ni les essais de détermination de la teneur en substances exopolymériques ou de comptage au Crystal Violet n'ont été probants. Cela ne veut pas dire qu'il n'y avait pas de biofilm, mais que les mesures obtenues étaient en dessous des seuils de détection. D'ailleurs des observations plus fines effectuées en fin d'expérience à l'aide d'un microscope optique ont montrées la présence d'amas (Figure III. 2).

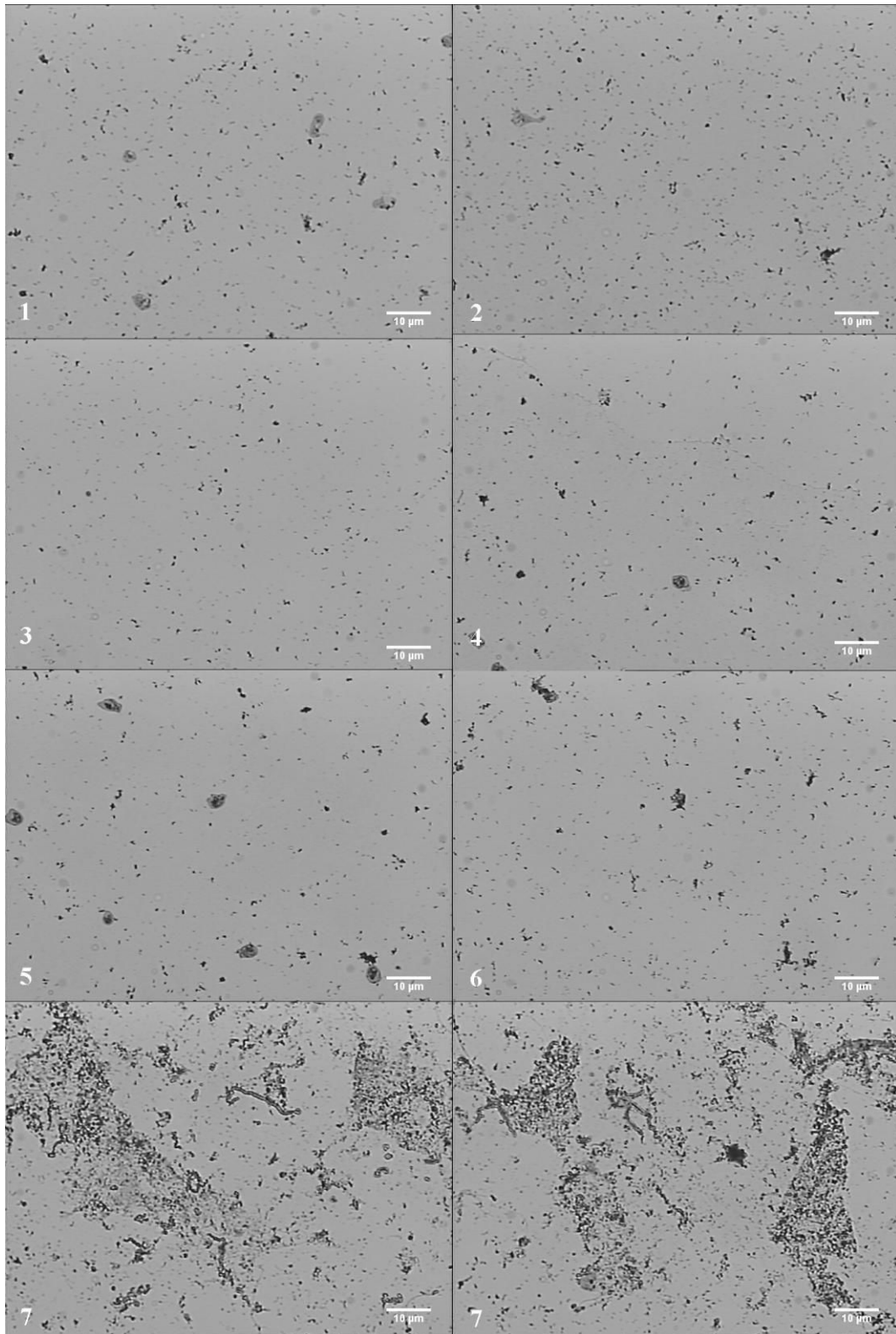


Figure III. 2: Observation en microscopie optique de lames de verre prélevées dans les différents étages du réacteur R_2 en fin d'expérience. L'alimentation en bas de la colonne se trouve au niveau 7 et le niveau 1 correspond au haut de la colonne.

Une analyse d'images a donc été tentée sur ces clichés de microscopie optique. Elle montre une diminution de l'opacité et de son écart-type (calculé sur les 5 lames de chaque étage) lorsque l'on passe de l'étage 7 (en bas de la colonne et près du point d'alimentation) à l'étage 1 (en haut de la colonne) (Figure III 3).

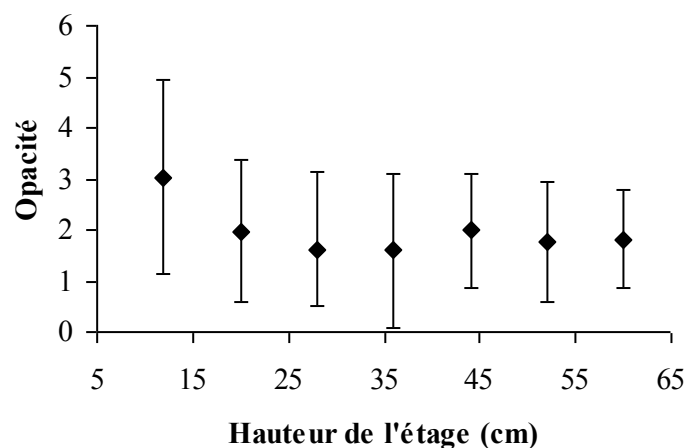


Figure III. 3 : Evolution de l'opacité selon la hauteur dans la colonne pour le réacteur R2. La barre d'erreur verticale correspond à \pm un écart-type, calculé sur les 5 lames de chaque étage.

D'autre part une analyse de la taille des objets présents sur les lames a confirmé le gradient observé par la mesure d'opacité.

La Figure III. 4 montre l'évolution de la surface totale des objets aperçus sur les lames de verre. On remarque le même gradient observé par l'opacité (la surface occupée par les objets diminue du bas vers le haut).

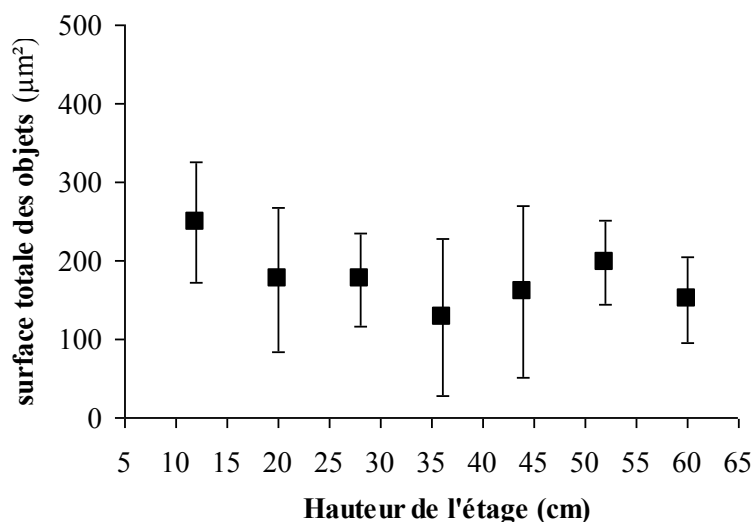


Figure III. 4: Biomasse totale évaluée à partir de la surface totale des objets détectés sur les lames de verre.

En ce qui concerne la distribution de taille, aucune différence entre les étages n'a été observée pour les objets de taille inférieure à $0.13\ \mu\text{m}$ ou pour les classes] $0.13\ \mu\text{m}$ $0.65\ \mu\text{m}$],] $0.65\ \mu\text{m}$ $1.3\ \mu\text{m}$],] $1.3\ \mu\text{m}$ $6.5\ \mu\text{m}$] ou] $6.5\ \mu\text{m}$ $13\ \mu\text{m}$]. Le nombre de gros objets (] $13\ \mu\text{m}$ $65\ \mu\text{m}$] et $> 65\ \mu\text{m}$) est supérieur dans l'étage 7, près de l'alimentation (Figure III. 5).

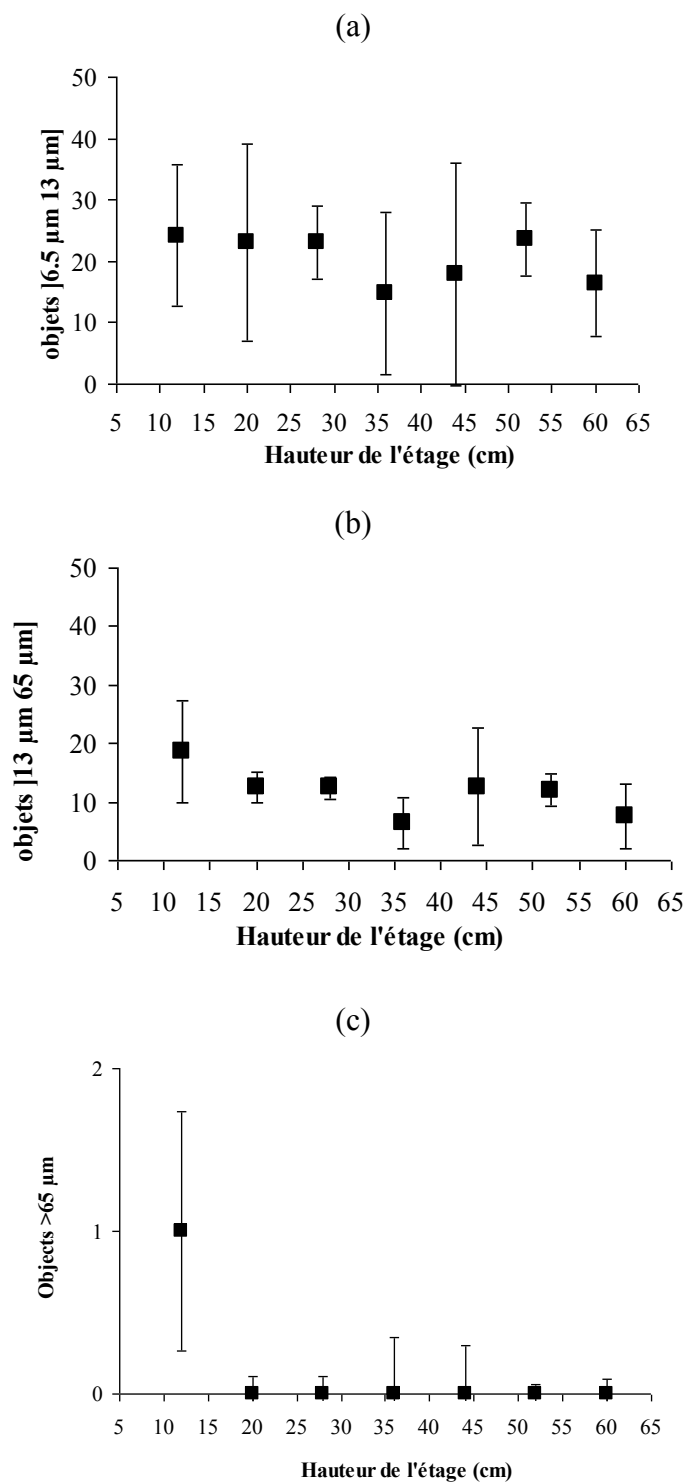


Figure III. 5: Exemples de gradient de classes de taille le long du réacteur R2

III.6.2. Conclusion

Un réacteur multi-étagé à lames de verre a été conçu pour permettre le suivi du développement de biofilm dans des systèmes à lit submergé et à biofilm immobilisé. L'utilisation de ce réacteur a été validée par deux expériences réalisées avec un milieu de culture synthétique, de nature organique. Le suivi par analyse d'images issues d'un scanner à plat de l'opacité liée à la présence du biofilm s'est déroulé de façon correcte et a donné des résultats cohérents avec ceux obtenus par une méthode destructrice (poids sec). L'utilisation de supports structurés permettrait d'accroître la quantité de biomasse retenue dans le système, tout comme dans le cas de l'utilisation de disques structurés dans le réacteur à biodisques. Dans ce type de réacteur, un gradient de concentration de biofilm s'établit, avec un biofilm plus important près de l'alimentation du réacteur.

Une fois le réacteur validé, il a été décidé de l'utiliser pour l'étude de la détoxification biologique de l'As^{III} et As^V. L'utilisation de supports structurés aurait sans doute facilité le développement du biofilm, en rapprochant la rugosité des supports de celle des grains de pouzzolane. Il s'est cependant avéré que la transparence du biofilm était une autre difficulté, la résolution spatiale (1200 pixels par pouce) ne permettant pas d'observer une variation d'opacité sur un biofilm très jeune. Il est certes possible d'utiliser une résolution spatiale plus grande. Par exemple une résolution de 9600 pixels par pouce conduirait à des pixels de taille 2.6 μm x 2.6 μm , ce qui est encore élevé pour la détection de bactéries. L'utilisation de clichés obtenus sur un microscope optique en fin d'expérience a montré qu'il pouvait être possible d'utiliser cette technique pour visualiser de tels biofilms.

IV. Conclusion générale et perspectives

La méthode de quantification de biofilms de plusieurs cm^2 de surface à partir d'images obtenues par un scanner à plat a été validée en tant que méthode non destructive et a été comparée avec la méthode au cristal violet modifiée et la méthode de la détermination de la matière sèche (méthodes destructives) et avec la méthode de mesure de l'épaisseur (méthode non destructive). La matière sèche peut seulement quantifier la biomasse, la méthode cristal violet peut estimer la biomasse et le nombre des microorganismes, mais ces deux méthodes destructives ne peuvent pas fournir d'informations sur la macrostructure du biofilm ni la répartition de la biomasse sur la surface. Quant aux méthodes non destructives, l'épaisseur peut estimer le volume du biofilm (en sachant la surface occupée) et donc estimer la biomasse d'une façon indirecte à travers la densité. L'écart-type de l'épaisseur peut donner une idée sur hétérogénéité du biofilm mais il est difficile de détecter un détachement sur la surface notamment si le détachement se trouve au centre de la lame par exemple. Au contraire, la méthode d'opacité est capable d'estimer la biomasse, l'hétérogénéité de la surface et de détecter les phénomènes du détachement grâce à son écart-type. La méthode de mesure d'opacité n'est pas coûteuse, écologique (aucun rejet dans l'environnement), facile à réaliser sans endommager le biofilm pour qu'il reprenne son activité après remise en place dans son milieu. En terme de caractérisation de la macrostructure par des méthodes de quantification de la texture visuelle, la méthode GLRLM a été testée. Les paramètres qu'elle fournit ont une interprétation plus facile que ceux de la méthode SGLDM, notamment par rapport aux phénomènes de détachement.

Les fragments détachés de biofilms dans le réacteur RBC semblent entraîner d'autres détachements sur les biofilms voisins notamment si le biofilm est soumis à un stress hydraulique important. Cela conduit les biofilms à réagir, quasiment, de la même façon lors du développement, du décrochement et du redéveloppement. Le résultat est qu'il est difficile d'obtenir un état stationnaire au sens propre et que l'on est plutôt en face d'un état stationnaire « dynamique ».

Les biofilms se développant sur les surfaces structurées souffrent moins de détachement/décrochement et se développent mieux que ceux sur des surfaces lisses. Sur les surfaces structurées, le biofilm tend à remplir les creux. Cela est expliqué par les contraintes

Conclusion générale et perspectives

moindres auxquels sont soumis les micro-organismes dans les structurations. Les disques structurés portent plus de biomasse par rapport à leurs homologues lisses. Une vitesse de rotation élevée favorise les phénomènes de détachement. Les biofilms se développant avec une vitesse lente de rotation sont sensibles à l'augmentation de la vitesse quelle que soit la nature de leurs surfaces.

Le développement de biofilms dans les réacteurs à lit fixe n'est pas homogène. La biomasse est plus concentrée à l'entrée du réacteur (près de l'alimentation) qu'à la sortie. On estime que la concentration de matières nutritives et l'abondance en oxygène à l'entrée sont à l'origine de ce gradient. La vitesse du développement de biofilms diminue du bas vers le haut du réacteur. Lorsque les conditions deviennent défavorables (carence d'oxygène ou de matière nutritives) les biofilms dans chaque étage commencent à se décrocher de leurs surfaces l'un après l'autre du bas vers le haut du réacteur. L'écart-type de l'épaisseur de biofilms diminue du bas vers le haut ce qui indique que l'homogénéité des biofilms augmente du bas vers le haut. Ces informations peuvent être modélisées en fonction de la position du support de biofilm dans le réacteur ce qui peut permettre à prévoir la biomasse, l'épaisseur, l'homogénéité ou les vitesses de développement dans ce type de réacteur.

Bien que la surface du réacteur multi-étagé conçu soit modeste, il a été possible d'identifier le développement du biofilm et ses activités biologiques pour simuler son développement dans les réacteurs à lit fixe. Nous avons pu identifier la formation d'un biofilm de bactéries autotrophes sur des supports transparents où la biomasse n'est détectable que par l'analyse d'images.

De nombreux micropolluants peuvent se révéler toxiques pour les bactéries. C'est notamment le cas des antibiotiques. Des tests ont été conduits avec l'érythromycine, un macrolide fréquemment employé en thérapeutique humaine et dont les effets délétères sur les flocs de boues activées ont déjà été mis en évidence. Il semble que de petites doses de l'érythromycine stimulent de petits détachements de biofilm et que des doses importantes stimulent des décrochements. Mais l'effet est transitoire et les microorganismes sont même capables de continuer leur croissance et donc redévelopper leur biofilm même dans le cas de très fortes concentrations en antibiotiques. L'activité des bactéries nitrifiantes, qui sont pourtant très sensibles à ces antibiotiques lorsqu'elles sont dans des flocs, n'a pas été affectée. Il semble que l'eau interstitielle dans les canaux du biofilm joue un rôle principal dans l'inhibition de l'activité biologique, car la diffusion de l'érythromycine dans ces canaux retarde l'arrivée de l'érythromycine jusqu'aux microorganismes et donc diminue son effet.

Conclusion générale et perspectives

D'autres hypothèses sont la possible réaction de l'antibiotique avec les substances exopolymériques ou la barrière représentée par ces mêmes substances.

Ce travail ouvre plusieurs types de perspectives :

- la méthode de visualisation mise en œuvre et les traitements d'images associés ont été testés sur des supports transparents, lisses ou structurés. Il est possible de tester d'autres supports avec des structures différentes et de comparer leur efficacité. Il est aussi possible d'améliorer la méthode de visualisation notamment pour les supports non transparents.

- en terme de compréhension des phénomènes de réponse des biofilms aux stress d'autres modes de perturbation peuvent être étudiés. En terme de stress chimique seul un antibiotique a été testé, mais il serait intéressant de regarder l'effet de biocides. L'effet de la présence des protozoaires devrait aussi être mieux analysé, notamment au cours des phases de redevéloppement après un détachement.

- les systèmes mis en œuvre dans le cadre de ce travail ont concerné des cultures artificielles de biofilms, en laboratoire. Or les biofilms se rencontrent également dans les systèmes aquatiques. La méthode développée va d'ailleurs être utilisée dans le cadre d'un projet ANR sur l'épuration en eau courante dans des noues spécialement aménagées pour comprendre les phénomènes biologiques se produisant aux différentes interfaces solide / liquide (projet EPEC).

- il est possible de construire des modèles permettant de mieux tenir compte de l'évolution de la macrostructure des biofilms, notamment des phases successives de détachement et de redevéloppement et de comparer ces modèles à des données acquises sur de longues durées et pour des surfaces de plusieurs cm². Les systèmes peuvent être des contacteurs à disques rotatifs, ou des réacteurs à lit fixe comme dans notre travail mais aussi des systèmes naturels.

- enfin en ce qui concerne les dispositifs à disques rotatifs largement utilisés dans ce mémoire ils peuvent encore connaître des développements, par exemple sous forme de petits moulins dans les systèmes d'épuration naturelle (ils vont être testés dans le projet EPEC) ou pour le traitement d'eaux de surface fortement polluées dans des canaux urbains.

Les biofilms demeurent des objets dont nous ne comprenons pas tous les secrets. Ce travail n'est qu'une pierre à l'édifice qui aura contribué à fournir des outils pour mieux les percer.

V. Références bibliographiques

- Aldrich B and Desai M. 1994. Application of Spatial Grey Level Dependence Methods to Digitized Mammograms. IEEE, University of Texas at San Antonio.
- Allison DG, Gilbert P, Lappin-Scott HM and Wilson M. 2000. Community structure and co-operation in biofilms. Cambridge University Press, p265.
- Allison DG, Gilbert P, Lappin-Scott HM and Wilson M. 2000. Community structure and co-operation in biofilms. Cambridge University Press, p111.
- Allison DG, Gilbert P, Lappin-Scott HM. and Wilson M. 2000. Community structure and co-operation in biofilms. Cambridge university press, p 96.
- Allwood A C, Malcolm R Walter, Balz S Kamber, Marshall Craig P and Burch Ian W. 2006. Stromatolite reef from the Early Archaean era of Australia. *Nature*, 441(June 8): 714-718.
- Alnnasouri M, Dagot C, Pons MN. 2010a. Les polysaccharides et les polyprotéines de biofilm. Séminaire de l'école doctorale Ressources Procédés Produits (RP2E)-Nancy, France.
- Alnnasouri M, Dagot C, Pons MN. 2010b. Comparison of four methods to assess biofilm development. *Water Science and Technology*. In press.
- Alnnasouri M., Dagot C., Pons M.N. 2008. Development of biofilm on structured biodiscs, Proc. Cobeq, Recife, Brazil.
- Alnnasouri Muatasem, Rondags Emmanuel, Fick Michel. 2007. Dégradation des mycotoxines par voie biologiques. Rapport Master2 recherche. ENSAIA ; INPL Nancy- France.
- An YH, Dickinson R B and Doyle RJ. 2000. Mechanisms of bacterial adhesion pathogenesis of implant and tissue infections. In *Handbook of Bacterial Adhesion – Principles, Methods, and Applications* (Eds. An, YH and Friedman, RJ). Humana Press, Totowa, NJ, pp. 1–28.
- Andreadakis AD. 1987. Design of multistage rotating biological contactors. *Journal of Environmental Engineering (ASCE)* 113(1): 199–205.
- Antonie RL. 1987. Fixed biological surface-wastewater treatment, the rotating biological contactor. CRC Press, Ohio, Cleveland.
- Anwar H, Dasgupta M, Lam K and Costerton JW. 1992. Establishment of aging biofilms: possible mechanism of bacterial resistance to antimicrobial therapy, *Antimicrob Agents Chemother.* 36: 1347.
- Aoi Y. 2002. In situ identification of microorganisms in biofilm communities. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 94: 552-556.
- Apilánéz I, Gutiérrez A, Díaz M. 1998. Effect of surface materials on initial biofilm development. *Biores. Technol.* 66: 225-230.

Références bibliographiques

- Applegate DH and Bryers JD. 1991. Effects of carbon and oxygen limitations and calcium concentrations on biofilm removal processes, *Biotechnol. Bioeng.* 37: 17.
- Arciola CR, Baldassari L, Campoccia D, Creti R., Pirini V, Huebner J, Montanaro L. 2008. Strong biofilm production, antibiotic multi-resistance and high *gelE* expression in epidemic clones of *Enterococcus faecalis* from orthopaedic implant infections. *Biomaterials*, 29: 580-586.
- Atlas RM. 1984. Diversity of microbial communities, *Adv. Microb. Ecol.*, 7: 1.
- Bachmann RT and Edyvean RGJ. 2006. AFM study of the colonization of stainless steel by *Aquabacterium commune*. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 58: 112-118.
- Bailey JE, Ollis D. 1986. *Biochemical Engineering Fundamentals*, 2nd Edition, McGraw-Hill Book Company, New York.
- Baker A. 2002. Fluorescence of some farm wastes: implication of water quality monitoring. *Water researches*, 36: 189-195.
- Bakke R and Olsson PQ. 1986. Biofilm thickness measurements by light microscopy. *Journal of Microbiological Methods*, 5: 93-98.
- Bakke R, Kommedal R and Kalvenes S. 2001. Quantification of biofilm accumulation by an optical approach. *Journal of Microbiological Methods*, 44: 13-26.
- Banerjee G. 1996. Treatment of phenolic wastewater in RBC reactor, *Water Res.* 31: 705–714.
- Banerjee G. 1997. Hydraulics of bench-scale rotating biological contactor. *Water Res* 31: 2500–2510.
- Battaglia-Brunet F, Dictor MC, Garrido F, Cruzet C, Morin D, Dekeyser K, Clarens M and Baranger P. 2002. An arsenic(III)-oxidizing bacterial population: selection, characterization, and performance in reactors, *Journal of Applied Microbiology*. 93: 656–667.
- Benfield LD and Randall CW. 1980. *Attached growth biological treatment processes, biological process design for wastewater treatment*. Prentice-Hall Inc., Englewood Cliffs, NJ, pp. 410–412.
- Bernard-Michel B, Pons MN, Vivier H. 2002. Quantification, by image analysis, of effect of operational conditions on size and shape of precipitated barium sulphate. *Chemical Engineering Journal* 87: 135–147.
- Beyenal Haluk, Donovan Conrad, Lewandowski Zbigniew, Harkin Gary. 2004. Three-dimensional biofilm structure quantification. *Journal of Microbiological Methods* 59: 95– 413.
- Beyenal Haluk, Lewandowski Zbigniew. 2005. Modeling mass transport and microbial activity in stratified biofilms. *Chemical Engineering Science* 60: 4337 – 4348.
- Bing Huang, Yanyan Wang, Shiling Zhang, Yong Ao. 2007. Kinetic Model of Fixed Bed Reactor with Immobilized Microorganisms for Removing Low-Concentration SO₂. *Journal of Natural Gas Chemistry* 16:86-91.
- Blackburn CW, Gibbs PA, Roller SD and Johal S. 1989. Use of ATP in microbial adhesion studies, in *ATP Luminescence—Rapid Methods in Microbiology*, Stanley PE,

Références bibliographiques

- McCarthy BJ and Smither R, Eds., Technical Series 23, Society for Applied Bacteriology, Blackwell Scientific, Oxford, 145.
- Blenkinsopp SA and Costerton, JW. 1991. Understanding bacterial biofilms, Trends Biotechnol. 9: 138.
- Block JC, Haudidier K, Paquin JL, Miazga J and Levi Y. 1993. Biofilm accumulation in drinking water distribution systems, Biofouling, 6: 333-343.
- Böckelmann U, Manz W, Neu TR and Szewzyk U. 2002. Investigation of lotic microbial aggregates by a combined technique of fluorescent *in situ* hybridization and lectin-binding analysis, Journal of Microbiological Methods, 49: 75-87.
- Bowen BD and Epstein N. 1979. Fine particle deposition in smooth parallel-plate channels, J. Colloid Interface Sci. 72: 81.
- Boyd A and Chakrabarty AM. 1994. Role of alginate lyase in cell detachment of *Pseudomonas aeruginosa*. Appl Environ Microbiol 60: 2355–2359.
- Boyd R, Verran J, Jones M and Bhakoo M. 2002. Langmuir 18: 2343.
- Brading MG, Boyle JD and Lappin-Scott HM. 1995. Biofilm formation in laminar flow using *Pseudomonas fluorescens* EX101. J Ind Microbiol 15: 297–304.
- Brading MG, Jass J, and Lappin-Scott H M. 1995. Dynamics of bacterial biofilm formation, in Microbial Biofilms, Lappin-Scott H M and Costerton J W, Eds., Cambridge University Press, London.
- Brazil BL. 2006. Performance and operation of a rotating biological contactor in a tilapia recirculating aquaculture system. Aquac Eng 34: 261–274.
- Bressel A, Schultze JW, Khan W, Wolfaardt GM, Rohns HP, Irmischer R and Schöning M.J. 2003. High resolution gravimetric, optical and electrochemical investigations of microbial biofilm formation in aqueous systems. Electrochimica Acta, 48: 3363-3372.
- Brown DA, Beveridge TJ, Keevil CW and Sherriff BL. 1998. Evaluation of microscopic techniques to observe iron precipitation in a natural microbial biofilm. FEMS Microbiology Ecology, 26: 297-310.
- Bryers JD. 1984. Biofilm formation and chemostat dynamics: pure and mixed culture considerations, Biotechnol. Bioeng. 26: 948.
- Bryers JD. 1987. Biologically active surfaces: processes governing the formation and persistence of biofilms, Biotechnology. 3: 57.
- Bryers JD. 2001. Two-photon excitation microscopy for analyses of biofilm processes. Methods in Enzymology, 337: 259-269.
- Bryers JD. 1994. Biofilms and the technological implications of microbial cell adhesion, Colloids Surf. B: Biointerfaces 29–23.
- Butterfield CT, Wattie E, Megregian S and Chambers CW. 1943. Influence of pH and temperature on the survival of coliforms and enteric pathogens when exposed to free chlorine. Public Health Rep. 58: 1837.
- Caldwell D E and Lawrence J R. 1988. Study of attached cells to continuous-flow slide culture, in A Handbook of a Laboratory Model System for Microbial Ecosystem Research, Wimpenny, W T, Ed., CRC Press, Boca Raton, FL, 117.

Références bibliographiques

- Castillo A, Iabres P and Mata-Alvarez J. 1999. A kinetic study of a combined anaerobic-aerobic system for treatment of domestic sludge. *Water Research* 33: 1742-1747.
- Chamberlain AHL. 1992. The role of adsorbed layers in bacterial adhesion, in *Biofilms — Science and Technology*, Melo, L. F., Bott, T. R., Fletcher, M., and Capdeville, B., Eds., Alvor, Portugal, May 18–29, Kluwer Academic Publishers, London, 59.
- Chang HT and Rittman BE. 1986. Biofilm loss during sample preparation for scanning electron microscopy, *Water Res.*, 20: 1451.
- Chang H T, Rittman BE, Amar D Heim, R Ehlinger O and Lesty Y. 1991. Biofilm detachment mechanisms in a liquid-fluidized bed. *Biotechnol Bioeng* 38:499–506.
- Characklis WG and Cooksey KE. 1983. Biofilms and microbial fouling, *Adv. Appl. Microbiol.*, 29: 93-138.
- Characklis WG, Bryers JD, Trulear M G and Zilver N. 1980. Biofouling film development and its effects on energy losses: a laboratory study. In *Condenser Biofouling Control* (Edited by Garey J F et al) Ann Arbor Science, Ann Arbor, Mich.
- Characklis WG, Marshall KC. 1990. *Biofilms*. John Wiley & Sons, Inc., New York, NY.
- Characklis WG, McFeters GA and Marshall KC. 1990. Physiological ecology of biofilm systems, in *Biofilms*, Characklis WG. and Marshall KC, John Wiley & Sons, New York, 341.
- Characklis WG, Turakhia MH and Zilver N. 1990. Transfer and interfacial transport phenomena, in *Biofilms*, Characklis, WG. and Marshall, KC., Eds., John Wiley & Sons, New York, 265.
- Characklis WG. 1981. Fouling biofilm development: A process analysis, *Biotechnol. Bioeng.* 23: 1923.
- Characklis WG. 1990. Biofilm process. In *Biofilms* Edited by Characklis W G & Marshall K C. New York: Wiley pp. 195–231.
- Chen H, Fink GR .2006. Feedback control of morphogenesis in fungi by aromatic alcohols. *GenesDev* 20: 1150-1161.
- Chen H, Fujita M, Feng Q, Clardy J, Fink GR .2004. Tyrosol is a quorum-sensing model in *Candida albicans*. *Proc Natl Acad Sci USA* 101: 5048-5052.
- Chen X, Schauder S, Potier N, Van Dorselaer A, Pelczer I, Bassler BL and Hughson FM. 2002. Structural identification of a bacterial quorum sensing signal containing boron. *Nature* 415 : 545-549.
- Chris Ebey Honeycutt, Roy Plotnick, 2008. Image analysis techniques and gray-level co-occurrence matrices (GLCM) for calculating bioturbation indices and characterizing biogenic sedimentary structures, *journal Computers & Geosciences* 34: 1461-1472.
- Christensen BE and Characklis WG. 1990. Physical and chemical properties of biofilms. In *Biofilms*. Edited by WG. Characklis & KC. Marshall. New York, Wiley, pp. 93–130.
- Christensen GD, Simpson WA, Younger JJ, Baddour LM, Barrett FF, Melton DM, Beachey, EH. 1985. Adherence of coagulase-negative *staphylococci* to plastic tissue culture plates: a quantitative model for the adherence of *staphylococci* to medical devices. *J. Clin. Microbiol.* 22: 996–1006.
- Chrysi Laspidou, Bruce E Rittmann. 2004. Evaluating trends in biofilm density using the UMCCA model. *Water Research* 38: 3362–3372.

Références bibliographiques

- Chung IJ, Park YS. 1983. Ethanol fermentation by *S. cerevisiae* in a bioreactor packed vertically with ceramic rods. In Proc.-Pac. Chem. Eng. Congr., 3rd, Korean Institute of Chemical Engineering, Seoul, Korea, 4: 174–179.
- Coenye T, Peeters E, Nelis HJ. 2007. Biofilm formation by *Propionibacterium acnes* is associated with increased resistance to antimicrobial agents and increased production of putative virulence factors. *Research in Microbiology*, 158: 386-392
- Colin RT and Gopal CP. 1996. Applications of image analysis in cell technology. *Biotechnology*. 7:35-45.
- Comte Sophie, Guibaud Gilles, Baudu Michel. 2007. Effect of extraction method on EPS from activated sludge: An HPSEC investigation. *Journal of Hazardous Materials* 140: 129–137.
- Cortez S, Teixeira P, Oliveira R, Mota M. 2008. Rotating biological contactors: a review on main factors affecting performance *Rev Environ Sci Biotechnol*, 7: 155–172.
- Costerton JW and Lashen ES. 1984. The influence of biofilm efficacy of biocides on corrosion-causing bacteria, *Mat. Perform.* 23: 34.
- Costerton JW, Cheng KJ, Geesey GG, Ladd TIM, Nickel JC, Dasgupta M and Marie TJ. 1987. Bacterial biofilms in nature and disease, *Ann. Rev. Microbiol.*, 41: 435.
- Costerton JW, Lewandowski Z, De Beer D, Calwell D, Korber DR and James G. 1994. Biofilms, the customised microniches, *J. Bacteriol.*, 176: 2137.
- Costerton J W. 2007. The biofilm primer. ISSN 1863-9607, P32.
- Costerton JW and Lappin-Scott HM. 1989. Behaviour of bacterial biofilms, *Am. Soc. Microbiol. News*, 55: 650.
- Costerton JW, Cheng KJ, Geesey GG, Ladd TI, Nickel JC, Dasgupta M and Marrie TJ. 1987. Bacterial biofilms in nature and disease. *Ann. Rev. Microbiol.* 41: 435–464.
- Costerton JW, Geesey GG, Cheng GK. 1978. How bacteria stick? *Scientific American*. 238: 86-95.
- Costerton JW, Khoury AE, Ward KH, Anwar H. 1993. Practical measures to control device-related bacterial infections. *IntJ ArtifOrg* 16: 765-770.
- Costerton JW, Lashen ES. 1984. Influence of biofilm on the efficacy of biocides on corrosion-causing bacteria. *Mat Performance* 23:34-37.
- Costerton JW, Lewandowski Z, Caldwell DE, Korber DR and Lappin-Scott HM. 1995. Microbial biofilms. *Annu. Rev. Microbiol.* 49: 711–745.
- Costerton JW, Lewandowski Z, De Beer D, Caldwell D, Korber D, James, G. 1994. Biofilms, the customized microniche. *J Bacteriol* 176:2137–2142.
- Costerton JW, Stewart PS and Greenberg EP. 1999. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science* 284: 318–322.
- Costley SC, Wallis FM. 2001. Bioremediation of heavy metals in a synthetic wastewater using a rotating biological contactor, *Wat. Res.* 35(15): 3715-3723.
- Daley RJ and Hobbie J E. 1975. Direct counts of aquatic bacteria by a modified epifluorescent technique, *Limnol. Oceanogr.*, 20: 875.
- Dalton H M and March PE. 1998. Molecular genetics of bacterial attachment and biofouling. *Curr Opin Biotechnol* 9: 252–255.

Références bibliographiques

- Danilatos GD. 1988. Foundations of Environmental Scanning Electron Microscopy. Advances in Electronics and Electron Physics, Academic Press. 71:109-250.
- Davey ME and O'Toole GA. 2000. Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 64: 847–867.
- DeBeer D, Stoodley P and Lewandowski Z. 1994. Liquid flow in heterogeneous biofilms. Biotech. Bioeng. 44: 636.
- DeBeer D, Stoodley P, Lewandowski Z. 1997. Measurement of local diffusion coefficients in biofilms by microinjection and confocal microscopy. Biotechnol Bioeng. 53:151–158.
- DeBeer D, Stoodley P, Roe F and Lewandowski Z. 1994. Effects of biofilm structures on oxygen distribution and mass transfer, Biotechnol Bioeng., 43: 1131.
- Del Pozo R, Diez V. 2003. Organic matter removal in combined anaerobic–aerobic fixed-film bioreactors. Water Res; 37: 3561–8.
- Delatolla R, Tufenjki N, Comeau Y, Lamarre D, Gadbois A and Berk D. 2009. *In situ* characterization of nitrifying biofilm: minimizing biomass loss and preserving perspective. Water Research, 43: 1775-1787.
- Demirci A, Pometto III AL and K-LG Ho. 1997. Ethanol production by *Saccharomyces cerevisiae* in biofilm Reactors. Industrial Microbiology & Biotechnology 19: 299–304.
- Derjaguin BV and Landau L. 1941. Theory of the stability of strongly charged lyophobic sols and of adhesion of strongly charged particles in solution of electrolytes, Acta Physiochim. URSS, 14: 633.
- Dimitar Dimitrov, Dimiter Hadjiev, Jordan Nikov. 2007. Optimisation of support medium for particle-based biofilm reactors. Biochemical Engineering Journal 37: 238–245.
- Donlan RM and Costerton JW. 2002. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. Clinical Microbiology Reviews 15: 167–193.
- Donlan RM, and Costerton JW. 2004. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. Clin. Microbiol. Rev. 15, 167–193, 2002. 8. Jefferson, KK., What drives bacteria to produce a biofilm? FEMS Microbiol.Lett. 236: 163–173.
- Drenkard E and Ausubel FM. 2002. *Pseudomonas* biofilm formation and antibiotic resistance are linked to phenotypic variation. Nature 416: 740–743.
- Driffield K, Miller K, Bostock M, O'Neill AJ, Chopra I. 2008. Increased mutability of *Pseudomonas aeruginosa* in biofilms. J Antimicrob Chemother. 61: 1053–6.
- Dubois MG, Gilles KA, Hamilton JA, Rebers PA, Smith F. 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. Anal. Chem. 28: 330–356.
- DuGuid IG, Evans E, Brown MRW and Gilbert P. 1990. Growth-rate-dependent killing by ciprofloxacin of biofilm-derived *Staphylococcus epidermidis*; evidence for cell-cycle dependency. J. Antimicrob. Chemother. 30: 791–802.
- Dunne WM. 2002. Bacterial adhesion: seen any good biofilm lately? Clin. Microbiol. Rev. 15: 155–166.
- Eberl HJ, Parker DF and van Loosdrecht MCM. 2001. A new deterministic spatio-temporal continuum model for biofilm development. J. Theor. Med. 3: 161-175.
- Eddy M. 2003. Wastewater engineering, treatment, in: Disposal and Reuse, 4th ed., McGraw-Hill, New York pp. 930–939.

Références bibliographiques

- Eijer H, Hauke C, Arens S, Printzen G, Schlegel U and Perren S M. 2001. PC-Fix and local infection resistance – influence of implant design on postoperative infection development, clinical and experimental results. *Injury*, 32 (Suppl. 2): S-B38–43.
- Eike ter Haseborg, Talia Mateu Zamora, Jörn Fröhlich, Fritz H. Frimmel. 2010. Nitrifying microorganisms in fixed-bed biofilm reactors fed with different nitrite and ammonia concentrations. *Bioresource Technology* 101: 1701–1706.
- Evans E, Brown MRW, Gilbert P. 1994. Iron chelator, exopolysaccharide and protease production in *Staphylococcus epidermidis*—a comparative-study of the effects of specific growth-rate in biofilm and planktonic culture, *Microbiology* 140: 153–157.
- Favero MS, Bond WW, Peterson NJ, Cook EH. 1983. Scanning electron microscopic observations of bacteria resistant to iodophor solutions. *Proceedings of the International Symposium on Povidone*, April 17-29. Lexington, KY: University of Kentucky.
- Fei WY, Wang YD, Wan YK. 2000. Physical modelling and numerical simulation of velocity fields in rotating disc contactor via CFD simulation and LDV measurement, *Chemical Engineering Journal* 78: 131–139.
- Ferree M, Shannon R.D. 2001. Evaluation of a second derivative UV/visible spectroscopy technique for nitrate and total nitrogen analysis of wastewater samples. *Water Res.*, 35: 327-332.
- Flemming HC. 1999. The forces that keep biofilms together. In *Biofilms in Aquatic Systems*, Edited by W. Keevil A F, Godfree D M Holt & C S Dow. Cambridge: Royal Society of Chemistry, pp. 1–12.
- Flint SH, Brooks JD and Bremer PJ. 2000. Properties of the stainless steel substrate influencing the adhesion of thermo resistant Streptococci, *J Food Eng*, 43: 235–242.
- Fournaud J, Graffino G, Rosset R, Jacque R. 1978. *I nd. Alim. Agric.* 273-282.
- Fredrickson AG. 1977. Behaviour of mixed cultures of microorganisms, *Ann. Rev. Microbiol.*, 33: 63.
- Frolund B, Griebe T, Nielsen PH, 1995. Enzymatique activity in the activated-sludge floc matrix. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 43: 755-761.
- Fuqua C, Greenberg EP. 2002. Listening in on bacteria: acyl-homoserine lactone signaling. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 3: 685–695.
- Fux CA, Stoodley P, Hall-Stoodley L, Costerton JW. 2003. Bacterial biofilms: a diagnostic and therapeutic challenge. *Expert Rev. Anti-Infect. Ther.* 1: 667–683.
- Galloway MM. 1975. Texture analysis using grey level run lengths. *Computer Graphics and Image Processing.* 4: 172–179.
- Gary Jackson, Haluk Beyenal, Wayne M. Rees, Zbigniew Lewandowski. 2001. Growing reproducible biofilms with respect to structure and viable cell counts. *Journal of Microbiological Methods* 47: 1–10.
- Gavin R, Merino S, Altarriba M, Canals R, Shaw JG, Tomás JM. 2003. Lateral flagella are required for increased cell adherence, invasion and biofilm formation by *Aeromonas* spp. *FEMS Microbiol. Lett.* 224: 77-83.
- Geesey GG, Characklis WG and Costerton JW. 1992. Centers, new technologies focus on biofilm heterogeneity, *ASM News*, 58(10): 546.

Références bibliographiques

- Geesey GG, Gillis RJ, Avci R, Daly D, Hamilton M, Shope P, Harkin G. 1996. The influence of surface features on bacterial colonization and subsequent substratum chemical changes of 316L stainless steel, *Corrosion Sci.* 38 (1): 73–95.
- Gilbert ES, Khlebnikov A, Meyer-Ilse W and Keasling JD. 1999. Use of soft x-ray microscopy for analysis of early-stage biofilm formation. *Water Science and Technology*, 39(7): 269-272.
- Gjaltema A, Arts PAM, van Loosdrecht MCM, Kuenen JG and Heijnen JJ. 1994. Heterogeneity of biofilms in rotating annual reactors: occurrence, structure and consequences, *Biotechnol. Bioeng.*, 44: 194.
- Gjersing EL, Codd SL, Seymour JD and Stewart PS. 2005. Magnetic resonance microscopy analysis of advective transport in a biofilm reactor. *Biotechnology and Bioengineering*, 89: 822 – 834.
- Glasbey, CA, Horgan, GW and Darbyshire JF. 1991. Image analysis and three-dimensional modelling of pores in soil aggregates. *Journal of Soil Science*, 42: 479-486.
- Glasbey CA, Horgan GW and Hitchcock D. 1994. A note on the greyscale response and sampling properties of a desktop scanner. *Pattern Recognition Letters*, 5: 705-711.
- Goddard D T. 1993. Imaging soft and delicate materials, *Mat. World*, 1: 616.
- Graves N. 2004. Economics and preventing hospital-acquired infection. *Emerg Infect Dis.*10:561-566.
- Griffin P, Findlay GE. 2000. Process and engineering improvements to rotating biological contactor design. *Water Sci Technol* 41(1):137–144.
- Grobe KJ, Zahller J and Stewart PS. 2002. Role of dose concentration in biocide efficacy against *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 29: 10–15.
- Guimarães C, Porto P, Oliveira R, Mota M. 2005. Continuous decolourization of a sugar refinery wastewater in a modified rotating biological contactor with *Phanerochaete chrysosporium* immobilized on polyurethane foam disks, *Proc. Biochem.* 40(2): 535-540.
- Hall-Stoodley L, Costerton JW, Stoodley P. 2004. Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. *Nat Rev Microbiol* 2: 95–108.
- Hamilton MA. 2002. Testing antimicrobials against biofilm bacteria. *J. AOAC Int.* 85: 479–485.
- Hamilton WA. 1987. Biofilms: microbial interactions and metabolic activities, in *Ecology of Microbial Communities*, Fletcher M, Gray TR, and Jones JG, Eds., Oxford University Press, Oxford, 361.
- Hamilton WA. 1985. Sulphate-reducing bacteria and anaerobic corrosion, *Ann.Rev. Microbiol.*, 39: 195.
- Haralik RM, Shanmugan KS and Dinstein I. 1973. Textural features for image classification. *IEEE Trans. Syst. Man, Cybern.* SMC-3: 610-621.
- Hatch RA and Schiller NL.1998. Alginate lyase promotes diffusion of aminoglycosides through the extracellular polysaccharide of mucoid *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 42: 974–977.
- Henrici A T. 1932. *Jornal Bacteriol.*, 25: 277.

Références bibliographiques

- Henrici AT. 1933. Studies of freshwater bacteria. I. A direct microscopic technique. *Journal of Bacteriology*, 25: 277-286.
- Herman B and Lemasters JJ (eds.). 1993. *Optical Microscopy: Emerging Methods and Applications*. Academic Press, New York, pp 441.
- Hermansson M and Marshall K C. 1985. Utilization of surface localised substrate by non-adhesive marine bacteria, *Microb. Ecol.*, 11: 91.
- Heydorn A, Nielsen AT, Hentzer M, Sternberg C, Givskov M, Ersboll BK, Molin S. 2000. Quantification of biofilm structures by the novel computer program COMSTAT. *Microbiology*. 146: 2395– 2407.
- Hiras DN, Manariotis ID, Grigoropoulos SG. 2004. Organic and nitrogen removal in a two-stage rotating biological contactor treating municipal wastewater, *Bioresource Technology* 93(1): 91-98.
- Holden PA, Hunt JR, Firestone MK. 1997. Toluene diffusion and reaction in unstructured *Pseudomonas putida* biofilms. *Biotechnol. Bioeng.* 56: 656–670.
- Horgan GW, Creasey AM and Fenton B. 1992. Superimposing two-dimensional gels to study genetic variation in malaria parasites. *Electrophoresis*, 13 : 871-875.
- Hornby JM, Jensen CE, Lisek AD. 2001. Quorum sensing dans le dimorphisme champignon *Candida albicans* est médiée par farnesol. *Appl Environ Microbiol* 67:2982-2992.
- Howard I, Espigares E, Lardelli P, Martin J.L. and Espigares M. 2004. Evaluation of microbiological and physicochemical indicators for wastewater treatment. *Environmental Toxicology*, 19: 241–249.
- Hoyle BD and Costerton WJ. 1991. Bacterial resistance to antibiotics: the role of biofilms. *Prog. Drug Res.* 37: 91–105.
- Humphrey BA, Dickson M R and Marshall K C. 1979. Physiological and in situ observations on adhesion of gliding bacteria to surfaces, *Arch. Microbiol.*, 120: 231.
- Hyde FW, Alberg M and Smith K. 1997. Comparison of fluorinated polymers against stainless steel, glass and polypropylene in microbial biofilm adherence and removal, *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, 19(2): 142.
- Jefferson KK, Goldmann DA and Pier GB. 2005. Use of Confocal Microscopy To Analyze the Rate of Vancomycin Penetration through *Staphylococcus aureus* Biofilms. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 49(6): 2467.
- Jefferson KK. 2004. What drives bacteria to produce a biofilm *FEMS Microbiol.Lett.* 236: 163–173.
- John L Pace, Mark E Rupp, Roger G Finch. 2006. *Biofilms, Infection and Antimicrobial Therapy* CRC Press Taylor & Francis Group, P 205.
- John L Pace, Mark E Rupp, Roger G Finch. 2006. *Biofilms Infection and Antimicrobial Therapy*. CRC Press Taylor & Francis Group. P4.
- Jones KH and Senft JA. 1985. An improved method to determine cell viability by simultaneous staining with fluorescence diacetate-propidium iodide, *J. Histochem. Cytochem.*, 33: 77.
- Jun W, Kim MS, Lee K, Millner P and Chao K. 2009. Assessment of bacterial biofilm on stainless steel by hyperspectral fluorescence imaging. *Sensing and Instrumentation for Food Quality and Safety*. 3:41-48.

Références bibliographiques

- Kadouri D, Venzon NC, O'Toole GA. 2007. Vulnerability of pathogenic biofilms to *Micavibrio aeruginosavorus*. *Appl Environ Microbiol* 73: 605-614.
- Kaprelyants A S and Kell D B. 1992. Rapid assessment of bacterial viability and vitality by rhodamine 123 and flow cytometry, *J. Appl. Bacteriol.*, 72: 410.
- Karina Waldemark, Thomas Lindblad, Vlatko Bečanovi, Jose LL Guillen, Phillip L. Klingner. 2000. Patterns from the sky Satellite image analysis using pulse coupled neural networks for pre-processing, segmentation and edge detection. *Pattern Recognition Letters* 21: 227-237.
- Karsten Rodenacker. 2007. Does digital analysis of micro image data improve understanding of reality? Contradictions–Challenges. *Ecological Informatics*, 2: 353 – 360.
- Karthikeyan KG, Meyer MT. 2006. Occurrence of antibiotics in wastewater treatment facilities in Wisconsin, USA. *Science of the Total Environment* 361: 196–207.
- Katsuaki Koike, Shuichi Nagano and Michito Ohmi. 1995. Lineament analysis of satellite images using a Segment Tracing Algorithm (STA). *Computers & Geosciences*, 21(9): 1091-1104.
- Keren Iris, Kaldalu Niilo, Spoering Amy, Wang Yipeng, Lewis Kim. 2004. Persister cells and tolerance to antimicrobials. *FEMS Microbiology Letters* 230: 13-18.
- Kolpin DW, Furlong ET, Meyer MT, Thurman EM, Zaugg SD, Barber LB, Buxton HT. 2002. Pharmaceuticals, hormones, and other organic wastewater contaminants in U.S. streams, 1999–2000: a national reconnaissance. *Environ. Sci. Technol.* 36: 1202–1211.
- Kreft JU, Picioreanu C, Wimpenny JWT, van Loosdrecht MCM. 2001. Individual-based modelling of biofilms. *Microbiology-Sgm* 147: 2897–2912.
- Kumar CG and Anand SK. 1998. Significance of microbial biofilms in the food industry: a review. *Int. Food Microbiol.* 42: 9–27.
- Lappin-Scott HM, Jass, J and Costerton JW. 1993. *Microbial Biofilm Formation and Characterisation*, Society for Applied Bacteriology Technical Series No. 30, Blackwell Science.
- Lappin-Scott HM, Costerton JW. 1995. *Microbial biofilms*. Cambridge University Press, Cambridge, England.
- Laspidou CS and Rittmann BE. 2004. Modeling the development of biofilm density including active bacteria, inert biomass, and extracellular polymeric substances. *Wat. Res.* 38: 3349-3361.
- Lawrence JR, Korber DR and Caldwell DE. 1989. Computer enhanced darkfield microscopy for the quantitative analysis of bacterial growth and behaviour on surfaces, *J. Microbiol. Meth.*, 10: 123.
- Lawrence JR, Neu TR, Swerhone GDW. 1998. Application of multiple parameter imaging for the quantification of algal, bacterial and exopolymer components of microbial biofilms. *Journal of Microbiological Methods*, 32: 253-261.
- Lewandoski Z, Beyenal H, Stookey D. 2004. Reproducibility of biofilm processes and the meaning of steady state in biofilm reactors, *Wat. Sci. Technol.*, 49(11-12): 359-364.
- Lewandowski Z, and Beyenal H. 2007. *Fundamentals of Biofilm Research*. Lewis Publishers. Boca Raton. CRC Press Inc.

Références bibliographiques

- Lewandowski Z, Beyenal H. 2008. Fundamentals of biofilm research. CRC Press / Taylor & Francis Group, PP. 7-8.
- Lewandowski Z, Stoodley P and Roe F. 1995. Internal mass transport in heterogeneous biofilms. Recent advances, in Corrosion/95, NACE International, Houston, TX; Paper No. 222.
- Lewandowski Z, Webb D, Hamilton M. and Harkin G. 1999. Quantifying biofilm structure, Water Science and Technology, 39(7): 71-76.
- Lewis K. 2001. Riddle of biofilm resistance. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 45: 999–1007.
- Li B, Logan BE. 2004. Bacterial adhesion to glass and metal oxide surfaces, Colloid Surf. B 36: 81–90.
- Lim YT, Yoon CH, Seo JB, Yu SJ, Rhew DH, Hong JS, Suh YS. 1992. Treatment of the polluted stream water by using gravel contact oxidation process, J. Korean Society of Water Quality 8: 173–180.
- Lin AYC, Tsai YT. 2009. Occurrence of pharmaceuticals in Taiwan's surface waters: impact of waste streams from hospitals and pharmaceutical production facilities. Science of the Total Environment 407: 3793–3802.
- Lopez C, Pons MN, Morgenroth E. 2005. Evaluation of microscopic techniques (epifluorescence microscopy, CLSM, TPE-LSM) as a basis for the quantitative image analysis of activated sludge. Water Res. 39 (2-3): 456–468.
- Louvet JN, Giammarino C, Potier O, Pons MN. 2010a. Adverse effects of erythromycin on the structure and chemistry of activated sludge Environmental Pollution 158: 688–693.
- Louvet JN, Heluin Y, Attik G., Dumas D., Potier O., Pons MN. 2010b. Assessment of erythromycin toxicity on activated sludge via batch experiments and microscopic techniques (epifluorescence and CLSM). Process Biochemistry 45 (11):1787-1794.
- Lu C, Li HC, Lee LY, Lin MR. 1997. Effects of disc rotational speed and submergence on the performance of an anaerobic rotating biological contactor. Environ Intern 23: 253-263.
- Ma ZJ, Lu ZH. 1990. Cell Immobilization Technique and Application. Ningxia: People's Press of Ningxia Province, 16.
- Mai G T, McCormack J G, Seow W K, Pier G B, Jackson L A & Thong Y H. 1993. Inhibition of adherence of mucoid *Pseudomonas aeruginosa* by alginate specific monoclonal antibodies and antibiotics. Infect Immun 61: 4338–4343.
- Majors PD, McLean JS, Pinchuk GE, Fredrickson JK, Gorby YA and Minard KR. 2005. NMR methods for in situ biofilm metabolism studies, Journal of Microbiological Methods, 62: 337-344.
- Manz B, Volke F, Goll D and Horn H. 2003. Measuring local flow velocities and biofilm structure in biofilm systems with magnetic resonance imaging (MRI). Biotechnology and Bioengineering, 84: 424-432.
- Mark Pasmore, Paul Todd, Sara Smith, Dawn Baker, JoAnn Silverstein, Darrell Coons, Christopher N. Bowmana. 2001. Effects of ultrafiltration membrane surface properties on *Pseudomonas aeruginosa* biofilm initiation for the purpose of reducing biofouling. J. Membrane Science 194: 15–32.

Références bibliographiques

- Marshall KC. 1992. Biofilms: an overview of bacterial adhesion, activity and control at surfaces, *Am. Soc. Microbiol. News*, 58: 202.
- Martin, N.J. and Falloweld, H.J. 1989. Computer modelling of algal waste treatment systems. *Water Science and Technology*, 21: 277-287.
- Martins da Costa P, Vaz-Pires P, Bernardo F. 2006. Antimicrobial resistance of *Enterococcus spp.* isolated in flow, effluent and sludge from municipal sewage treatment plants, *Water Res.* 40: 1735–1740.
- Maurício R, Dias CJ and Santana F. 2006. Monitoring biofilm thickness using a non-destructive, on-line, electrical capacitance technique. *Environmental Monitoring and Assessment*, 119: 599-607.
- Mayer C, Moritz R, Kirschner C, Borchard W, Maibaum R, Wingender J & Flemming H-C. 1999. The role of intermolecular interactions: studies on model systems for bacterial biofilms. *Int J Biol Macromol* 26: 3–16.
- McBride JS. 2001. Bacterial gliding motility: multiple mechanisms for cell movement over surfaces. *Annu. Rev. Microbiol.* 55: 49-75.
- McEldowney S and Fletcher M. 1988, Effect of pH, temperature, and growth conditions on the adhesion of a gliding bacterium and three nongliding bacteria to polystyrene, *Microb. Ecol.*, 16: 183.
- Medilanski E, Kaufmann K, Wick LY, Wanner O and Harms H. 2002. Influence of the surface topography of stainless steel on bacterial adhesion, *Biofouling*, 18(3): 193–203.
- Mervyn YH Chin, Andrew Sandham, Joop de Vries, Henny C van der Mei, Henk J Busscher. 2007. Biofilm formation on surface characterized micro-implants for skeletal anchorage in orthodontics. *Biomaterials* 28: 2032–2040.
- Milferstedt K, Pons MN et Morgenroth E. 2006. Optical method for long-term and large-scale monitoring of spatial biofilm development, *Biotechnology and Bioengineering*, 94: 773-782.
- Milferstedt K, Pons MN, Morgenroth E. 2007. Analyzing Characteristic Length Scales in Biofilm Structures. *Biotechnology and Bioengineering*, 102(2): 368-379.
- Milferstedt K, Pons MN, Morgenroth E. 2007. Texture analysis of spatial biofilm development. *Water Sci Technol* 55(8–9):481–488.
- Milferstedt K, Pons MN, Morgenroth E. 2008. Textural fingerprints: A comprehensive descriptor for biofilm structure development. *Biotechnol Bioeng* 100:889–901.
- Milferstedt K, Pons MN, Morgenroth E. 2008a. Textural Fingerprints: A Comprehensive Descriptor for Biofilm Structure Development. *Biotechnology and Bioengineering*, 100(5): 889-901.
- Milferstedt K, Pons MN, Morgenroth E. 2008b. Analyzing Characteristic Length Scales in Biofilm Structures. *Biotechnology and Bioengineering*, 102(2): 369- 379.
- Miller ST, Xavier KB, Campagna SR et al . 2004. *Salmonella typhimurium* recognizes a chemically distinct form of the bacterial quorum-sensing signal AI-2. *Mol Cell* 15: 677–687.
- Miqueleto AP, Dolosic CC, Pozzi E, Foresti E, Zaiat M. 2010. Influence of carbon sources and C/N ratio on EPS production in anaerobic sequencing batch biofilm reactors for wastewater treatment. *Bioresource Technology* 101: 1324–1330.

Références bibliographiques

- Möhle RB, Langemann T, Haesner M, Augustin W, Scholl S, Neu TR, Hempel DC and Horn H. 2007. Structure and shear strength of microbial biofilms as determined with confocal laser scanning microscopy and fluid dynamic gauging using a novel rotating disc biofilm reactor. *Biotechnology and Bioengineering*, 98: 747-755.
- Mohseni-Bandpi A, Elliott DJ. 1996. Nitrate removal from groundwater using an anoxic aerobic rotating biological contactor. *Water Sci Technol* 34:(1-2) 323-330.
- Møller S, Korber D R, Wolfaardt G M. & Caldwell D E. 1997. Impact of nutrient composition on a degradative biofilm community. *Appl Environ Microbiol* 63: 2432-2438.
- Monroe D. 2007. Looking for Chinks in the Armor of Bacterial Biofilms. *PLoS Biology*. 5(11): 2458.
- Morgenroth E and Wilderer PA. 2000. Influence of detachment mechanisms on competition in biofilms. *Water Res.* 34(2): 417-426.
- Morgenroth E. 2003. Detachment—an often overlooked phenomenon in biofilm research and modeling. In: Wuertz S, Wilderer PA, Bishop PL, editors. *Biofilms in Wastewater treatment*. IWA Publishing, London, p 264-290.
- Mrkva M. 1983. Evaluation of correlations between absorbance at 254 nm and COD of river waters. *Water Res.*, 17 : 231-235,
- Munch R, Robert Koch. 2003. *Microbes Infect.* 5: 69-74.
- Munson BR, Young DF and Okishi TH. 1990. *Fundamental fluid mechanics*, in *Fundamental Fluid Mechanics*, John Wiley & Sons, London.
- Najafpour GD, Zinatizadeh AAL, Lee LK. 2006. Performance of a three-stage aerobic RBC reactor in food canning wastewater treatment, *Biochem. Eng. J.* 30 (3): 297-302.
- Nealson KH .1977. Autoinduction of bacterial luciferase. Occurrence, mechanism and significance. *Arch Microbiol* 112:73-79.
- Neu KE. 1994. Upgrading of rotating biological contactor (RBC) systems to achieve higher effluent quality, including biological nutrient enrichment and reduction techniques. *Water Sci Technol* 29(12):197-206.
- Neu TR and Lawrence JR. 2005. One-photon versus two-photon laser scanning microscopy and digital image analysis of microbial biofilms. *Methods in Microbiology*, 34: 89-136.
- Neu TR, Woelfl S and Lawrence JR. 2004. Three-dimensional differentiation of photoautotrophic biofilm constituents by multi-channel laser scanning microscopy (single-photon and two-photon excitation). *Journal of Microbiological Methods*, 56: 161-172.
- Nichols WW. 1991. Biofilms, antibiotics and penetration. *Reviews of Medical Microbiology*, 2: 177-181.
- Nielsen P-H, Jahn A and Palmgren R. 1997. Conceptual model for production and composition of exopolymers in biofilms. *Water Sci Technol* 36: 11-19.
- Okkerse WJH, Ottengraf SPP and Osinga-Kuipers B. 2000. Biofilm thickness variability investigated with a laser triangulation sensor. *Biotechnology and Bioengineering*, 70: 619-629.
- Olivier Basset, Beatrice Buquet, Saoed Abouelkaram, Philippe Delachartre, Joseph Culioli. 2000. Application of texture image analysis for the classification of bovine meat. *Food Chemistry* 69: 437-445.

Références bibliographiques

- Pan B and Hartman L. 1992. Activity of biomass in RBC systems treating pulp industrial wastewater. *Journal of Environmental Engineering (ASCE)*, 118: 722–754.
- Park YH, Wallis DA. 1984. Steady-state performance of a continuous biofilm fermentor system for penicillin production. *Korean J Chem Eng.* 1: 119–128.
- Park YS, Moon JH, Kim DS, Ahnd KH. 2004. Treatment of a polluted stream by a fixed-bed biofilm reactor with sludge discharger and backwashing system. *Chemical Engineering Journal* 99: 265–271.
- Pasmore Mark, Paul Todd, Sara Smith, Dawn Baker, JoAnn Silverstein, Darrell Coons, Christopher N. Bowman. 2001. Effects of ultrafiltration membrane surface properties on *Pseudomonas aeruginosa* biofilm initiation for the purpose of reducing biofouling. *Journal of Membrane Science* 194: 15–32.
- Patwardhan AW, Mathure P. 2005. Comparison of mass transfer efficiency in horizontal rotating packed beds and rotating biological contactors. *J Chem Technol Biotechnol* 80:413–419.
- Peeters E, Hans J. Nelis, Tom Coenye. 2008. Comparison of multiple methods for quantification of microbial biofilms grown in microtiter plates. *Microbiological Methods.* 72: 157–165.
- Peyton BM. and Characklis WG. 1993. A statistical analysis of the effect of substrate utilization and shear-stress on the kinetics of biofilm detachment. *Biotechnol Bioeng* 41: 728–735.
- Picioreanu C, van Loosdrecht MCM & Heijnen JJ. 2000b. Effect of diffusive and convective substrate transport on biofilm structure formation: a 2-D modeling study. *Biotechnol. Bioeng.* 69(5): 504.515.
- Picioreanu C, Van Loosdrecht MCM and Heijnen JJ. 2001. Twodimensional model of biofilm detachment caused by internal stress from liquid flow. *Biotechnol. Bioeng.* 72(2): 205.218.
- Picioreanu C, van Loosdrecht MCM and Heijnen JJ. 1998. Mathematical modeling of biofilm structure with a hybrid differentialdiscrete cellular automaton approach. *Biotechnol. Bioeng.* 58(1): 101.116.
- Pons MN, Milferstedt K et Morgenroth E. 2008. Macrostructural biofilm characterization via textural image analysis by SGLDM and GLRLM, Proc. IFAC XVII World Congress, Seoul.
- Pons MN, Milferstedt K. and Morgenroth E. 2009. Biofilm monitoring on rotating discs by image analysis. *Biotechnology and Bioengineering*, 103: 105-116.
- Pons MN, Belaroui K, Simer N. 2004. Characterisation of grinding media wear by visual texture. *Int. J. Miner. Process.* 74: 255–265.
- Powell M S and Slater N K H. 1982. Removal rate of bacterial cells from glass surfaces by fluid shear, *Biotechnol. Bioeng.*, 24: 2527.
- Pradhan N, Pradhan SK, Nayak BB, Mukherjee PS, Sukla LB and Mishra BK. 2008. Micro-Raman analysis and AFM imaging of *Acidithiobacillus ferrooxidans* biofilm on uranium ore. *Research in Microbiology*, 159: 557-561.
- Prasad V, Semwogerere D and Eric R Weeks. 2007. Confocal microscopy of colloids. *J. Phys.: Condens. Matter.* 19: 113102 (25pp).

Références bibliographiques

- Priester JH, Horst AM, Van De Werfhorst LC, Saleta JL, Mertes LAK and Holden PA. 2007. Enhanced visualization of microbial biofilms by staining and environmental scanning electron microscopy, *Journal of Microbiological Methods*, 68: 577-587.
- Prince AS. 2002. Biofilms, antimicrobial resistance and airway infection. *N. Engl. J. Med.* 347: 1110–1111.
- Ramsay J, Shin M, Wong S, Goode C. 2006. Amaranth decoloration by *Trametes versicolor* in a rotating biological contacting reactor. *J Ind Microbiol Biotechnol* 33: 791–795.
- Reese S. and Guggenheim B. 2007. A novel TEM contrasting technique for extracellular polysaccharides in in vitro biofilms. *Microscopy Research and Technique*, 70: 816-822.
- Reichert P, AQUASIM 2.0, 1998. Computer program for the identification and simulation of aquatic systems. EAWAG, Dübendorf, Switzerland, ISBN-3-906484-16-5.
- Reipa V, Almeida J, Cole KD. 2006. Long-term monitoring of biofilm growth and disinfection using a quartz crystal microbalance and reflectance measurements. *Journal of Microbiological Methods*, 66: 449-459.
- Rittle KH, Helmstetter CE, Meyer AE and Baier RE. 1990. *Escherichia coli* retention on solid surfaces as functions of substratum surface energy and cell growth phase, *Biofouling*, 2: 121.
- Rittman BE. 1989. The effect of shear stress on biofilm loss rate, *Biotechnol. Bioeng.*, 24: 501.
- Rittmann BE. 1989. Detachment from biofilms. In *Structure and Function of Biofilms*, Edited by W. G. Characklis & P. A. Wilderer. Chichester: Wiley, pp. 49–58.
- Rittmann BE and McCarty PL. 2001. *Environmental Biotechnology: Principles and Applications*, McGraw-Hill, New York, USA.
- Rittmann BE, McCarty PL. 1980. Model of steady-state-biofilm kinetics. *Biotechnol Bioeng* 22: 2343–2357.
- Rittmann BE. 1989. Detachment from biofilms,. In Characklis WG, Wilderer, editors. *Structure and function of biofilms*. John Wiley & Sons, New York. p 49–58.
- Rittmann BE and McCarty PL. 1980. Model of steady-state-biofilm kinetics. *Biotechnol. Bioeng.* 22: 2343-2357.
- Ritz K and Crawford JW. 1990. Quantification of the fractal nature of colonies of *Trichoderma viride*. *Mycological Research*, 94: 1138-1141.
- Rodgers M, Zhan XM. 2003. Moving-medium biofilm reactors. *Rev Environ Sci Biotechnol* 2: 213–224.
- Rodriguez GG, Phipps D, Ishiguro K and Ridgway HF. 1992. Use of a fluorescent redox probe for direct visualisation of actively respiring bacteria, *Appl. Environ. Microbiol.*, 58: 1801.
- Rogers J, Dowsett AB, Dennis P J, Lee JV and Keevil CW. 1994. Influence of temperature and plumbing material selection on biofilm formation and growth of *Legionella pneumophila* in a model potable water containing complex microbial flora, *Appl. Environ. Microbiol.*, 60: 1585.
- Ronald J. Doyle *Methods in Enzymology*. 1999. AP ACADEMIC PRESS Volume 310: 118-119.

Références bibliographiques

- Rota E, Flares J, Ntifiez M J and Lema J M. 1996. Ethanol fermentation by immobilized *Saccharomyces cerevisiae* in a semi pilot pulsing packed-bed bioreactor. *Enzyme and Microbial Technology* 19:132-139.
- Rupak Aryal, Julie Lebegue, Saravamuthu Vigneswaran, Jaya Kandasamy Alain. Grasmick. 2009. Identification and characterisation of biofilm formed on membrane bio-reactor. *Separation and Purification Technology* 67: 86–94.
- Sahinkaya E, Dilek FB. 2006. Biodegradation of 4-CP and 2, 4-DCP mixture in a rotating biological contactor (RBC) *Biochem. Eng. J.* 31 (2): 141-147.
- Santos R, Callow ME and Bott TR. 1991. The structure of *Pseudomonas fluorescens* biofilms in contact with flowing systems. *Biofouling* 4: 319–336.
- Sawyer LK and Hermanowicz SW. 1998. Detachment of biofilm bacteria due to variations in nutrient supply. *Water Sci Technol* 37: 211–214.
- Schwingle TA, Lepak AJ, Wenta RJ. 2005. Refining applications. *Hydrocarbon Engineering*. January.
- Senevitratne CJ, Silva WJ, Jin LJ, Samaranayake YH and Samaranayake LP. 2009. Architectural analysis, viability assessment and growth kinetics of *Candida albicans* and *Candida glabrata* biofilms, *Archives of Oral Biology*, 54: 1052-1060.
- Seymour JD, Codd SL, Gjersing EL and Stewart PS. 2004. Magnetic resonance microscopy of biofilm structure and impact on transport in a capillary bioreactor. *Journal of Magnetic Resonance*, 167: 322-327.
- Shams El Din AM, El-Dahshan ME, Tag El Din AM. 2003. Bio-film formation on stainless steels Part 2. The role of seasonal changes, seawater composition and surface roughness. *Desalination* 154 : 267-276.
- Shemesh H, Goertz DE, van der Sluis LWM, de Jong N, Wu MK and Wesselink PR. 2007. High-frequency ultrasound imaging of a single-species biofilm. *Journal of Dentistry*, 35: 673-678.
- Shirtiliff ME, Mader JT and Camper AK. 2002. Molecular interactions in biofilms. *Chem. Biol.* 9: 859–871.
- Sonesson A, Jantzen E, Bryn K, Larsson L and Eng J. 1989. Chemical composition of a lipopolysaccharide from *Legionella pneumophila*, *Arch. Microbiol.*, 153: 72.
- Srivastava P, Kundu S. 1999. Studies on cephalosporin production in an air lift reactor using different growth modes of *Cephalosporium acremonium*. *Proc Biochem* 34:329–333.
- Steinmoen H, Knutsen E and Håvarstein LS .2002 . Induction of natural competence in *Streptococcus pneumoniae* triggers lysis and DNA release from a subfraction of the cell population . *Proc . Natl . Acad . Sci . USA* 99:7681-7686.
- Stepanovic S, Vukovic D, Dakic I, Savic B, Svabic-Vlahovic M. 2000. A modified microtiter-plate test for quantification of *staphylococcal* biofilm formation. *J. Microbiol. Methods* 40: 175–179.
- Steven L, Percival James T, Walker Paul Hunter. 2000. *Microbiological Aspects of Biofilms and Drinking water*. CRC Press Boca Raton London New York Washington, D.C. p 61.
- Steven L, Percival James T, Walker Paul R. 2000. *Microbiological Aspects of Biofilms and Drinking water*. CRC Press Boca Raton London New York Washington, D.C. p 164-168.

Références bibliographiques

- Stewart PS, Roe F, Rayner J, Elkins JG, Lewandowski Z, Ochsner UA and Hasset DJ. 2000. Effect of catalase on hydrogen peroxide penetration into *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Applied and Environmental Microbiology*, 66: 836–838.
- Stewart PS, Murga R, Srinivasan R and de Beer D. 1995. Biofilm structural heterogeneity visualized by three microscopic methods, *Water Research*, 29: 2006–2009.
- Stewart PS. 1996. Theoretical aspects of antibiotic diffusion in to microbial biofilms. *Antimicrob. Agents Chemother.* 40: 2517–2522
- Stewart PS. 1998. A review of experimental measurements of effective diffusive permeability and effective diffusion coefficients in biofilms. *Biotechnol. Bioeng.* 59: 261–272.
- Stewart PS. 2003. Slow Growth in *P. aeruginosa* Biofilms, *Biofilms*. Victoria. American Society for Microbiology, BC, Canada, November 1–6.
- Stoodley P, Boyle JD, Dodds I and Lappin-Scott H M. 1997. Consensus model of biofilm structure, in *Biofilms: Community Interactions and Control*, Third Meeting of the British Biofilm Club, Gregynog Hall, Powys, September 26–28: 1.
- Stoodley P, Dodds I, Boyle J D and Lappin-Scott H M. 1999a. Structural deformation of bacterial biofilms caused by short-term fluctuations in fluid shear: an in situ investigation of biofilm rheology. *Biotechnol Bioeng* 65: 83–92.
- Stoodley P, Dodds I, Boyle J D and Lappin-Scott H M. 1999b. Influence of hydrodynamics and nutrients on biofilm structure. *J Appl Microbiol* 85: 19–28.
- Stoodley P, Sauer K, Davies DG and Costerton JW. 2002. Biofilms as complex differentiated communities. *Annu. Rev. Microbiol.* 56: 187–209.
- Strathmann M, Wingender J and Flemming HC. 2002. Application of fluorescently labeled lectins for the visualization and biochemical characterization of polysaccharides in biofilms of *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Microbiological Methods*, 50: 237–248.
- Sutherland IW .2001. The biofilm matrix – an immobilized but dynamic microbial environment. *Trends Microbiol* 9: 222–227.
- Tang X. 1998. Texture information in run-length matrices. *IEEE Trans Image Proc* 7:1602–1609.
- Tawfik A, Klapwijk B, el-Gohary F, Lettinga G. 2002. Treatment of anaerobically pre-treated domestic sewage by a rotating biological contactor. *Water Res* 36:147–155.
- Tchobanoglous G, Burton FL.1991. *Wastewater engineering: treatment, disposal and reuse*. Metcalf & Eddy, 3rd ed. McGraw-Hill International Editions, New York.
- Tebbs SE, Sawyer A and Elliott TSJ. 1994. Influence of surface morphology on in vitro bacterial adherence to central venous catheters, *British Journal of Anaesthesia*, 72: 587–591.
- Teixeira P, Oliveira R. 2001. Denitrification in a closed rotating biological contactor: effect of disk submergence. *Proc Biochem* 37:345–349.
- Telgmann U, Horn H, Morgenroth E. 2004. Influence of growth history on sloughing and erosion from biofilms. *Wat Res* 38:3671–3684.
- Thurnheer T, Gmür R and Guggenheim B. 2004. Multiplex FISH analysis of a six-species bacterial biofilm. *Journal of Microbiological Methods*, 56: 37–47.

Références bibliographiques

- Tijhuis L, Hijman B, van Loosdrecht M CM and Heijnen J J. 1996. Influence of detachment, substrate loading and reactor scale on the formation of biofilms in airlift reactors Appl Environ Microbiol 45: 7–17.
- Todd B Reynolds, Gerald R Fink. 2001. Bakers' Yeast, a Model for Fungal Biofilm Formation. Science. 291(5505): 878 – 88.
- Tolker-Nielsen T, Brinch UC, Ragas PC, Andersen JB, Jacobsen CS, Molin S. 2000. Development and dynamics of *Pseudomonas sp* biofilms. J. Bacteriol. 182:6482–6489.
- Tré-Hardy M, Macé C, El Manssouri N, Vanderbist F, Traore H, Devleeschouwer MJ. 2009. Effect of antibiotic co-administration on young and mature biofilms of cystic fibrosis clinical isolates: the importance of the biofilm model. International Journal of Antimicrobial Agents, 33: 40-45.
- Trulear MG and Characklis WG. 1982. Dynamics of biofilm processes, J. Water Pollut. Control Fed., 54: 1288.
- Trulear MG, Characklis WG. 1982. Dynamics of biofilm processes. J Water Pollut Control Fed 54:1288–1301.
- Tuominen Sakari, Pekkarinen Anssi. 2005. Performance of different spectral and textural aerial photograph features in multi-source forest inventory. Remote Sensing of Environment 94: 256–268.
- Tyagi RD, Tran FT, Chowdhury AKMM. 1993. Biodegradation of petroleum refinery wastewater in a modified rotating biological contactor with polyurethane foam attached to the disks, Wat. Res., 27(1): 91-99.
- Van Loosdrecht MCM, Eikelboom D, Gjaltema A, Mulder A, Tijhuis L, Heijnen JJ. 1995. Biofilm structures. Water Sci Technol 32:35–43.
- Van Loosdrecht MCM., Norde W, Zehnder AJB. 1987. Influence of cell surface characteristics on bacterial adhesion to solid surfaces, In: Proceedings of the 4th European Congress on Biotechnology, European Federation for Biotechnology, Brussels, Belgium, p 575.
- Verwey E J W and Overbeek J T G. 1948. Theory of the Stability of Lyophobic Colloids, Elsevier, Amsterdam.
- Vikhansky A, Kraft M, 2004, Modelling of a RDC using a combined CFD-population balance approach. Chemical Engineering Science 59: 2597 – 2606.
- Wanner J, Eberl T, Morgenroth E, Noguera D, Picioreanu C, Rittman B, Van Loosdrecht M, 2006. Mathematical modeling of biofilms. STR 18, IWA Publishing, London.
- Wanner O and Morgenroth E. 2004. Biofilm modeling with AQUASIM. Water Science and Technology, 49(11–12): 137–144.
- Wanner O and Reichert P. 1996. Mathematical modeling of mixed-culture biofilms. Biotechnol.Bioeng. 49(2): 172-184.
- Wanner O, Ebert HJ, Morgenroth E, Noguera D, Picioreanu C, Rittmann BE, Van Loosdrecht MCM. 2006. Mathematical modeling of biofilms. IWA Scientific and Technical IWA Task Group on Biofilm Modeling Report No.18.
- Wanner O, Gujer W. 1986. A multispecies biofilm model. Biotechnology and Bioengineering 28: 314–328.

Références bibliographiques

- Watkins L and Costerton JW. 1984. Growth and biocide resistance of bacterial biofilms in industrial systems. *Chem Times Trends* (October), 35–40.
- Whitehead KA and Verran J. 2006. The effect of surface topography on the retention of microorganisms. *Food and Bioproducts Processing*, 84(C4): 253–259.
- Whitehead NA, Barnard AM, Slater H, Simpson NJ, Salmond GP. 2001. Quorum-sensing in Gram-negative bacteria. *FEMS Microbiol Rev*, 25:365–404.
- Williams A T, Wiltshire R J and Thomas M C. 1998. Sand grain analysis –image processing textural algorithm and neural nets. *Computers & Geosciences* 24(2): 111-118.
- Wilson F. 1993. Kinetics and reaction order in rotating biological contactors using TOC. *Water Research*, 27: 1423–1429.
- Woldringh C L, de Jong M A, van den Berg, W and Koppes L. 1977. Morphological analysis of the division cycle of two *Escherichia coli* substrains during slow growth, *J. Bacteriol.*, 131: 270.
- Wuhrmann K, Mitchell R. 1972. *Stream Purification in Water pollution Microbiology*. New York: Wiley Interscience. 119–200.
- Yang X, Beyenal H, Harkin G, Lewandowski Z. 2000. Quantifying biofilm structure using image analysis. *J. Microbial. Methods*, 39: 109-119.
- Yang Xinmin, Beyenal Haluk, Harkin Gary, Lewandowski Zbigniew. 2000. Quantifying biofilm structure using image analysis. *Journal of Microbiological Methods* 39: 109–119.
- Yang XM, Beyenal H, Harkin G, Lewandowski Z. 2000. Quantifying biofilm structure using image analysis. *J Microbiol Methods* 39(2):109–119.
- Yasuda H, Koga T and Fukuoka T. 1999. *In vitro* and *in vivo* models of bacterial biofilms. *Methods Enzymol.* 310: 577–595.
- Yen-Hui Lin. 2008. Kinetics of nitrogen and carbon removal in a moving-fixed bed biofilm reactor. *Applied Mathematical Modelling* 32: 2360–2377.
- Yong-Hak Kim, Thomas M. Heinze, Richard Beger, Jairaj V. Pothuluri, Carl E. Cerniglia. 2004. A kinetic study on the degradation of erythromycin A in aqueous solution. *International Journal of Pharmaceutics* 271: 63–76.
- Zahid W and Ganczarczyk J. 1994. A technique for a characterization of RBC biofilm surface, *Water Research*, 28: 2229-2231.
- Zanfır M, Sun X, Gavriilidis A. 2007. Investigation of a rotating disc reactor for acetone stripping and asymmetric transfer hydrogenation: Modelling and experiments. *Chemical Engineering Science* 62: 741 – 755.
- Zobell C E. 1943. The effect of solid surfaces upon bacterial activity, *J. Bacteriol.*, 46: 39.

[1] Site internet de l'université Montana Etats-Unis <http://www.biofilm.montana.edu>

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

o0o

VU LES RAPPORTS ETABLIS PAR :

Monsieur Hervé VIVIER, Professeur, Université de Saint-Etienne, Saint-Etienne

Monsieur Alain GRASMICK, Professeur, Université de Montpellier 2, Montpellier

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

Monsieur ALNNASOURI Muatasem

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

"Etude du développement de biofilms dans des réacteurs de traitement d'eau"

en vue de l'obtention du titre de :

DOCTEUR DE L'INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE LORRAINE

Spécialité : « **Génie des Procédés et des Produits** »

Fait à Vandoeuvre, le 23 novembre 2010

Le Président de l'I.N.P.L.,

F. LAURENT



NANCY BRABOIS
2, AVENUE DE LA
FORET-DE-HAYE
BOITE POSTALE 3
F - 5 4 5 0 1
VANDŒUVRE CEDEX

Etude du développement de biofilms dans des réacteurs de traitement d'eau

Résumé

Le développement de biofilms est étudié sur de longues périodes (de deux à sept mois) dans des réacteurs à disque tournant (RBC) et à lit fixe alimentés par des eaux résiduaires domestiques ou des substrats synthétiques en continu à l'échelle du laboratoire. Deux réacteurs ont été spécialement conçus pour des expériences. Les biofilms ont été soumis à des stress physiques (forces hydrodynamiques) ou chimiques (antibiotique). L'activité biologique des réacteurs a été suivie au cours du temps (dégradation de la pollution carbonée et azotée). Les phénomènes de détachement et de redéveloppement des biofilms ont été caractérisés sur des surfaces lisses ou structurées par des techniques d'analyse d'images non destructives. La quantité globale de biomasse présente est évaluée par l'opacité du biofilm et cette méthode d'évaluation a été validée par comparaison avec des méthodes classiques destructives (coloration au Cristal Violet, matières sèches). La macrostructure du biofilm, liées aux phénomènes de croissance, détachement et recroissance, a été évaluée à l'aide de deux méthodes de caractérisation de la texture visuelle : la méthode de cooccurrence de niveaux de gris (SGLDM) et la longueur des segments (GLRLM). Le travail montre l'efficacité de l'analyse d'images comme une méthode rapide et peu onéreuse dans l'étude des biofilms sur le long terme.

Mots-clés : Biofilm, détachement, Activité biologique, Réacteur à disques tournants, Réacteur à lit fixe, Erythromycine, Analyse d'images, SGLDM, GLRLM.

Study of the development of biofilms in water treatment reactors

Abstract

The development of biofilm has been studied over long periods of time (two to seven months) in laboratory-scale rotating biological contactors and fixed bed reactors continuously fed with municipal wastewater or synthetic growth media. Two reactors have been specifically designed for this purpose. The biofilms have been subject to hydrodynamic and chemical (antibiotics) stresses. The overall biological activity of the reactors has been monitored, in terms of carbon and nitrogen removal. The phenomena of sloughing and re-growth have been characterized on smooth and rough surfaces using image analysis non-destructive techniques. The amount of biomass present on the substratum has been evaluated by the biofilm opacity and this monitoring method has been validated by comparison with destructive methods such as crystal violet staining and dry weight. The biofilm macrostructure, related to growth, sloughing and re-growth phenomena, has been evaluated through visual texture characterization of the scanning gray level co-occurrence matrix (SGLDM) and the gray level run length method (GLRLM). The results show the efficiency of image analysis as a rapid and cheap method to monitor biofilm development on the long term.

Keywords: Biofilm, Detachment, Biological activity, Rotating biological contactor, Fixed bed reactor, Erythromycin, Image Analysis, SGLDM, GLRLM.