



**HAL**  
open science

# Caractérisation du transport colloïdal du zinc en milieu sableux

Myriam Muris

► **To cite this version:**

Myriam Muris. Caractérisation du transport colloïdal du zinc en milieu sableux. domain\_other. Université Joseph-Fourier - Grenoble I, 2004. Français. NNT : . tel-00007757

**HAL Id: tel-00007757**

**<https://theses.hal.science/tel-00007757>**

Submitted on 14 Dec 2004

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

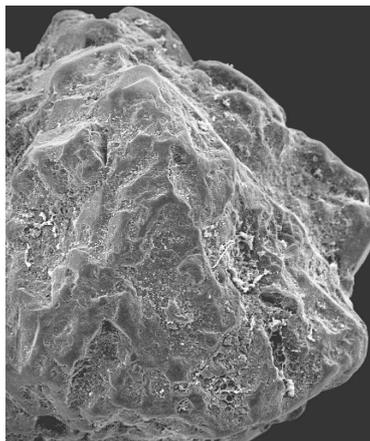
Université Joseph Fourier – Grenoble

École doctorale Terre Univers Environnement

Thèse pour obtenir le grade de

Docteur en sciences de l'université Joseph Fourier

## **Caractérisation du transport colloïdal du zinc en milieu sableux**



**Myriam Muris**

Thèse dirigée par Cécile Delolme et Jean-Paul Gaudet

soutenue publiquement le 8 Novembre 2004

Rapporteurs : Marie-Odile Simonnot, rapporteur  
Jean-Yves Bottero, rapporteur  
Cécile Delolme, directeur de thèse  
Jean-Paul Gaudet, directeur de thèse  
Laurent Charlet, examinateur  
Roberto Geremia, examinateur



---

## Merci!!!!!!

Il est de coutume de dire merci autour de soi en s'en allant, mais j'ai surtout très envie d'adresser mes plus vifs remerciements à mes deux encadrants : Cécile tout d'abord, qui a suivi au quotidien l'évolution de ces travaux. Sa grande disponibilité, sa confiance, sa gentillesse, d'une part, son intérêt scientifique, sa motivation sans faille d'autre part sont vraiment irremplaçables. Quoique d'un peu plus loin, Jean-Paul a toujours su nous accueillir entre Belledonne et Chartreuse et nous apporter le soutien scientifique et moral dont nous avons besoin, et m'accorder sa confiance : un très très grand merci !!!

Je voudrais ensuite remercier Marie-Odile Simonnot et Jean-Yves Bottero, rapporteurs de ce travail, qui m'ont fait part, après une lecture attentive du manuscrit, de leurs commentaires avisés et intéressants. Merci également à Laurent Charlet et Roberto Geremia qui, chacun dans leur domaine, ont apporté un nouvel éclairage et des interrogations intéressantes vis à vis de ce travail.

Au laboratoire, j'ai été très bien accueillie par le directeur, Yves Perrodin et les chercheurs, en particulier les sympathiques membres de l'équipe Sol : je les remercie pour leurs conseils, toujours précieux ! Côté manip, merci à Marc pour les coups de main, à Martine pour les analyses et Thérèse pour sa bonne humeur (et les analyses aussi !). Merci à Martine, la Grenobloise, qui m'a permis de travailler au LGIT dans de bonnes conditions. Alicia, merci beaucoup pour ... un peu tout !

Plusieurs comités de pilotage ont permis d'aiguiller ces travaux. Je remercie sincèrement tous ceux qui m'ont accordé un peu de leur temps pour faire avancer tout ça : Jean-Philippe Bedell qui a également eu la lourde tâche de superviser mes premiers pas en microbio, Béatrice Béchet qui n'a pas été découragée par mes multiples sollicitations sur IMPACT, Lorenzo Spadini qui m'a ouvert les portes du monde fabuleux de la géochimie et Michel Sardin qui nous a patiemment écouté et sagement conseillé !

Depuis le plateau de l'Arbois (bien connu pour ses sentiers VTT !), les membres du CEREGE ont été des interlocuteurs passionnants et motivés et mon seul regret sera de n'avoir pas pu consacrer plus de temps aux travaux que nous avons initiés ! Merci en particulier à Stéphane Moustier.

Au LTHE, au milieu de ses 1253 colonnes, de ses 564 essais en batchs, de ses cours et TD, Véro était toujours dispo pour me filer un (énorme) coup de main, avec gentillesse et simplicité ... mais comment fait-elle ?? En tout cas merci pour tout ça. Travailler et 'sandwicher' avec toi était toujours fort sympathique !

---

Vincent, je pourrais te remercier pour le dépannage quasi-instantané sur toutes ces petites tracasseries informatiques, ... pour les belles ballades sur les chemins boueux ou pour les conseils botaniques ... Mais finalement, c'est surtout quelle qu'en soit la forme, d'avoir toujours été là pendant ces trois années (même là maintenant à 17h59 au bout du fil;-)... ! Merci à Hélène aussi pour sa toujours souriante présence ... même avant le lever du soleil !

Lucile, Gaëlle, Manue, Céline, Laurent, Xavier, Evens ... si avec toutes nos discussions autour du thé, on n'arrive pas à changer le monde, c'est sûrement que c'est un cas désespéré ... En tout cas, y'a sûrement déjà moins de bateaux sur les océans ! J'étais ravie de vous connaître et de faire un bout de chemin avec vous. Merci à vous tous ! Xavier, promis, je penserai à toi en buvant mes demi sachets de thé ... ou en pestant devant mon ordinateur. Bonne chance à tous les thésards, profitez bien de ces trois belles années !

Ils m'ont accompagné sur des skis, fait faire mes premiers pas en VTT ou en kayak, et puis on est parti au bout du monde, ou juste au bout du parc mais qu'importe, ils étaient là quand je quittais le labo et sans eux mes escapades auraient été moins drôles : merci à vous tous, les skieurs de peuf, les accros des falaises, les cyclistes anti-crevaision, les kayakistes insubmersibles, les coureurs de la nuit et ceux du jour ...

Des gens se sont retrouvés parfois très au courant de la vie trépidante de mes bactéries et n'auraient sûrement jamais entendu parlé de transport colloïdal autrement, et pourtant ils ont su faire preuve de tellement d'attention : merci à vous !

Remerciements spéciaux pour Géraldine et Mireille, mes collocs, et toutes les baby sitters de mon chat, Hélène en particulier, à qui je souhaite bon courage : j'espère que ta persévérance et ta motivation seront récompensées par des colonnes ... sans fuite !

Une pensée particulière pour Jean-Claude, qui m'a montré le chemin.

## Abréviations

- Å** : Angström  
 **$\lambda$**  : Dispersivité du milieu  
 **$\theta$**  : Teneur en eau volumique  
 **$a_M$**  : Coefficient d'activité de l'espèce M  
**BM** : Bilan de Masse  
**BSA** : Bovine Serum Albumin (*Sérum-albumine bovin*)  
**CLSM** : Confocal Laser Scanning Microscopy (*Microscopie Laser à Balayage confocal*)  
**CMA** : Concentration Maximale Admissible  
**CSC** : Cell Surface Charge (*Charge de la surface cellulaire*)  
**CSH** : Cell Surface Hydrophobicity (*Hydrophobie de la surface cellulaire*) -  
**Cs** : Concentration Sorbée  
**D** : Coefficient de dispersion  
**d10** : Diamètre efficace  
**DLVO** : Théorie développée par Derjaguin, Landau, Verwey et Overbeek  
**DO** : Densité Optique  
**EPM** : ElectroPhoretic Mobility (*Mobilité Électrophorétique*)  
**EPS** : ExoPolySaccharides (*Polymères Exo-cellulaires*)  
**ESIC** : Electrostatic Interaction Chromatography (*Chromatographie d'interaction électrostatique*)  
**h** : Heure  
**HIC** : Hydrophobic Interaction Chromatography (*Chromatographie d'interaction hydrophobe*)  
**Hs** : Quantité de protons échangés  
**ICP-AES** : Inductively Coupled Plasma Atomic Emission Spectroscopy (*Spectrométrie d'émission atomique avec source plasma à couplage inductif*)  
**k** : Coefficient de dépôt des particules  
**K** : Degrés Kelvin  
**KDa** : kilo Dalton  
**L** : Longueur de la colonne  
**LPM** : Linear Programming Model (*Modèle de programmation linéaire*)  
**MAC** : Microbial Adhesion to Sphere (*Adhésion microbienne aux sphères*)  
**MATH** : Microbial Adhesion To Hydrocarbon (*Adhésion microbienne aux hydrocarbures*)  
**meq** : Mili-équivalent  
**M.S.** : Masse Sèche  
**min** : Minute  
**nm** : Nanomètre  
**n.m.** : Concentration non mesurée  
**OTHU** : Observatoire de Terrain en Hydrologie Urbaine  
**PIE** : Point IsoÉlectrique  
**ppm** : Partie par million  
**R** : Coefficient de retard  
**S** : Degré de saturation  
**s** : Seconde  
**SDS-PAGE** : Sodium Dodecyl Sulfate PolyAcrylamide Gel Electrophoresis (*Electrophorèse à gel de sodium dodecyl sulfate polyacrylamide*)  
**UFC** : Unité Formant Colonie

**US** : UltraSons  
**UV** : UltraViolets  
**V<sub>A</sub>** : Énergie d'attraction  
**V<sub>R</sub>** : Énergie de répulsion  
**w** : Teneur en eau massique  
**XAFS** : X-ray Adsorption Fine Structure determination (*Spectroscopie de structure fine d'absorption des rayons X*)  
**ZP** : Zêta potential (*Potentiel Zêta*)  
**ZPC** : Zero Point of Charge (*Point de charge nulle*)

## Glossaire

**acide uronique** : molécule issue de l'oxydation de la fonction alcool primaire d'un ose  
**acides teichoïques** : polymères de ribitol phosphate, de glycérol phosphate ou de mannitol phosphate, voire de N-acétylglycosamine phosphate ou de N-acétylgalactosamine phosphate, ce sont des composants de la paroi bactérienne  
**acides teichuroniques** : acides uroniques contenant des saccharides  
**couche de Stern** : voir figure 2.5  
**couche diffuse** : voir figure 2.5  
**force ionique** : demi-somme des produits des concentrations ioniques des différents ions par la carré de leur valence respective.  
**hydrophobie** : propriété des surface de se laisser mouiller par l'eau  
**inaniition** : état résultant de privation totale ou partielle des aliments  
**liaison covalente** : liaison dans laquelle les électrons de valence des deux atomes sont partagés entre les noyaux  
**motilité** : aptitude à effectuer des mouvements spontanés ou réactionnels dans la cellule  
**oligotrophe** : milieu très pauvre en substances nutritives  
**peptidoglycane** : constituant rigide de la paroi bactérienne  
**phospholipide** : lipide complexe dont une des fonctions alcool du glycérol est estérifiée par de l'acide phosphorique  
**phénotype** : ensemble des caractères, morphologiques ou fonctionnels, définissant visiblement une espèce ou un individu  
**planctonique** : par opposition aux cellules développées en biofilm, les cellules planctoniques demeurent libres dans la phase liquide  
**polysaccharides** : vaste groupe de polymères glucidiques  
**sessile** : immobile, fixé à une surface  
**surface spécifique** : surface totale par unité de masse de produit qui est accessible aux atomes et aux molécules  
**surfactant** : composé chimique qui, introduit dans un liquide, en abaisse la tension superficielle, ce qui a pour effet d'en augmenter les propriétés mouillantes  
**xénobiotique** : substance étrangère à l'organisme vivant  
**zêtamètre** : appareil utilisé pour l'évaluation du potentiel Zêta

# Chapitre 1

## Contexte de l'étude et définition du sujet

*Cette première partie se propose de définir le contexte de l'étude. D'un point de vue opérationnel, il s'agit de présenter la problématique des bassins d'infiltration d'eaux pluviales. Nous dresserons pour cela un rapide bilan des besoins des gestionnaires, puis des connaissances déjà acquises sur le fonctionnement de ces ouvrages. D'un point de vue plus théorique, nous présenterons les travaux sur le transfert colloïdal en faisant un bilan des études réalisées. Les champs d'investigation sont multiples : transport des colloïdes, transport facilité par les colloïdes... Dans les deux parties nous terminerons en définissant les nouvelles orientations des travaux de recherche dans ces domaines. Le plan du mémoire est ensuite présenté.*

### 1.1 Bassins d'infiltration d'eaux pluviales

#### 1.1.1 Présentation

Cette étude s'inscrit dans une réflexion sur l'une des préoccupations du ministère de l'Équipement : la gestion des bassins d'infiltration d'eaux pluviales (figure 1.1). Ces bassins permettent d'évacuer les eaux de ruissellement urbain recueillies sur de vastes surfaces pouvant atteindre plusieurs centaines d'hectares<sup>1</sup>. Ces méthodes de gestion des eaux pluviales sont souvent qualifiées de méthodes écologiquement adaptées (Lind et Karro, 1995) ; elles s'opposent au principe du tout au réseau (Chocat, 1997).

Les zones d'infiltration, constituées d'un bassin de rétention et d'un bassin d'infiltration se trouvent désormais souvent dans les paysages urbains (Fischer *et al.*, 2003). Les flux entrants dans ces bassins peuvent être très importants (Chocat, 1997).

---

<sup>1</sup>Le bassin Django Reinhardt infiltre sur une surface de 4800 m<sup>2</sup> les eaux d'un bassin versant de 253 ha (Winiarski *et al.*, 2001).

Le bassin d'infiltration doit évidemment se situer sur un sol perméable cependant la perméabilité doit rester telle que l'écoulement des eaux pluviales ne soit pas trop rapide, ce qui augmente l'efficacité de l'épuration (Chocat, 1997). Le sol est alors considéré dans une première approche comme une barrière perméable active, la distance entre la surface et la nappe phréatique devant être suffisante pour que la rétention des polluants par le sol soit optimale.



FIG. 1.1 – Bassin d'infiltration d'eaux pluviales de l'Est Lyonnais

### 1.1.2 Gestion et problématiques

#### a) Qualité des eaux infiltrées

Une des premières caractéristiques de la charge polluante des eaux de ruissellement est sa grande variabilité selon les caractéristiques du bassin versant, de l'épisode pluvieux, et le type d'effluent considéré (Bardin, 1999).

D'autre part, une diminution des zones perméables a augmenté les volumes à infiltrer (Fischer *et al.*, 2003). Ainsi, même des effluents peu concentrés peuvent générer des quantités importantes de polluants. En outre, ces concentrations sont parfois déjà relativement élevées, les sources de pollution des eaux de ruissellement étant multiples et croissantes. Lind et Karro, 1995, relèvent que les concentrations en métaux dans les sols des zones d'infiltration sont en moyenne le double de celles dans des zones de référé-

rence<sup>2</sup>. Il existe une grande variabilité des taux d'infiltration, qui peuvent être à titre d'exemple de l'ordre de 0,3 à 6 cm/min (Fischer *et al.*, 2003; Wi-niarski *et al.*, 2001).

A titre d'exemple, le tableau 1.1 synthétise des données mesurées dans des eaux de ruissellement sur différents types de surface. Ces valeurs doivent être analysées en tenant compte de la toxicité de chacun des métaux. La concentration maximale admissible, CMA, dans les eaux potables est fixée par une directive Européenne. Cette valeur est présentée dans la dernière ligne du tableau 1.1. Par ailleurs, des analyses de prélèvement d'eau de surface d'un bassin d'infiltration ont donné les concentrations suivantes en mg/L : Ca : 44,1, K : 9,3, Mg : 4,1, Na : 188,9 (Durin, 2003).

TAB. 1.1 – Concentrations moyennes en métaux en  $\mu\text{g/L}$  dans les eaux de ruissellement

Source	Type de zone	Pb	Cu	Cd	Zn
Legret et Pagotto, 1999	rurale	58	45	1	356
Davis <i>et al.</i> , 2001	résidentielle	2	7	0,1	110
Davis <i>et al.</i> , 2001	commerciale	12	29	0,7	760
Davis <i>et al.</i> , 2001	institutionnelle	64	2100	0,4	460
Dechesne, 2002	habitat	23	26	0,6	95
Dechesne, 2002	commerciale	32	25	0,73	125
Dechesne, 2002	industrielle	21	20	0,9	142
Dechesne, 2002	autoroute	52	18	0,8	179
Rossi, 1998	habitat	52	145	1,35	235
Rossi, 1998	commerciale	39	63	2,81	310
Rossi, 1998	industrielle	185	117	3,7	597
Saget, 1994	habitat	180	18	11	111
Gautier, 1998	industrielle	35	22	n.m. <sup>a</sup>	306
Pagotto, 1999		35	52	0,76	264
Xanthopoulos, 1993 <sup>b</sup>	chaussée urbaine	310	110	n.m.	600
Constant, 1995 <sup>c</sup>	zone urbaine	457	n.m.	n.m.	1300
Directive 98/83/EC		10	100	5	200

<sup>a</sup>n.m. : concentration non mesurée

<sup>b</sup>Cité par Colandini, 1997

<sup>c</sup>Cité par Durand, 2003b

Dechesne, 2002, propose une caractérisation de la pollution des eaux de ruissellement dans laquelle l'accent est mis sur la pollution inorganique : les métaux, les nutriments<sup>3</sup> et les sels. L'apport en sels (NaCl, CaCl<sub>2</sub> et KCl) reste très ponctuel et provient du déverglaçage des routes. Les sels sont

<sup>2</sup>Zones similaires n'ayant pas servi à l'infiltration

<sup>3</sup>Les nutriments sont les éléments essentiels à la nutrition des plantes. Ce sont principalement l'azote et le phosphore.

des composés solubles ce qui leur permet de migrer facilement dans les sols où ils peuvent provoquer la remobilisation des autres composés (Dechesne, 2002). Dans les eaux de ruissellement on trouve principalement les cations  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{K}^+$  et les anions  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{SO}_4^{2-}$ ,  $\text{HCO}_3^-$  et  $\text{CO}_3^{2-}$ . Notons que des variations des concentrations en sels sont tout à fait fréquentes. Elles peuvent être la conséquence de l'alternance de périodes de pluie et de sécheresse. Elles ne sont pas forcément représentatives d'une pollution (Dechesne, 2002).

Les eaux pluviales se chargent en polluants dans l'atmosphère tout d'abord pour 15 à 25 %, puis au cours du ruissellement sur les surfaces urbaines (circulation automobile, activité industrielle, rejets d'ordures diverses, érosion des sols et chantiers) et enfin lors du transfert dans les réseaux (Brelot, 1994).

#### b) Colmatage des bassins

Au cours de leur fonctionnement, les zones d'infiltration ont tendance à être colmatées par les matières en suspension qui se déposent au fond des bassins (Dechesne, 2002). Une vue du sol d'un bassin d'infiltration de l'Est Lyonnais montre le colmatage par les fines particules des premiers centimètres de surface (figure 1.2). Dans la partie supérieure de la photo, où le sol est intact, on observe en effet nettement une croûte qui a colmaté la surface.



FIG. 1.2 – Vue de dessus du sol d'un bassin colmaté

Parallèlement d'importantes accumulations des polluants dans ces couches superficielles peuvent être constatées comme on l'observe dans le tableau 1.2.

Régulièrement des travaux d'excavation doivent être entrepris pour rendre au bassin ses capacités d'infiltration.

TAB. 1.2 – Quantités de métaux accumulés dans le sol d'une zone d'infiltration en mg/kg M.S.

	Site	Pb	Cu	Zn
Lind et Karro, 1995	zone d'infiltration A 0-5 cm	7,5	2,7	6,9
Lind et Karro, 1995	zone de référence A	9,9	1,8	5,2
Lind et Karro, 1995	zone d'infiltration B 0-5 cm	9,3	5,4	10,2
Lind et Karro, 1995	zone de référence B	4,5	1,5	2,7
Winiarski <i>et al.</i> , 2001	zone d'infiltration 0-5 cm	0,31	0,24	1,5
Winiarski <i>et al.</i> , 2001	zone d'infiltration 5-10 cm	0,35	0,22	1,4
Winiarski <i>et al.</i> , 2001	zone d'infiltration 10-20 cm	0,23	0,16	1,1
Winiarski <i>et al.</i> , 2001	zone d'infiltration 30-40 cm	0,04	0,05	0,3
Bedell <i>et al.</i> , 2004	zone d infiltration 0-5 cm	0,13	0,19	2,12
Bedell <i>et al.</i> , 2004	zone d infiltration 5-20 cm	0,01	0,02	0,15

### c) Impact sur le milieu

Les bassins d'infiltration peuvent avoir un impact sur les milieux récepteurs que sont le sol et la nappe (Dechesne, 2002). La pollution des eaux souterraines est d'autant plus inquiétante que les nappes constituent une source importante d'eau potable (Brelot, 1994).

En s'infiltrant, les polluants contenus dans les eaux pluviales se retrouvent en grande partie dans le sol (Lind et Karro, 1995) ; la connaissance de leur devenir reste insatisfaisante. Dans les sites à l'étude, Wigington Jr. *et al.*, 1983, n'ont pas trouvé de métaux dans les couches de sol inférieures, cependant ils insistent sur le fait qu'un transport des métaux, à plus long terme, est tout à fait probable.

Plusieurs problématiques ont été identifiées :

- protection de la nappe sous-jacente
- devenir des sols en cas de rétention des polluants
- devenir des sols excavés

Plus précisément il s'agit de savoir si les polluants présents dans les eaux infiltrées vont être transportés jusqu'à la nappe ou retenus dans la matrice poreuse. De plus la prédiction de la répartition des polluants dans les différents horizons permettra une meilleure gestion des sols notamment en cas de réhabilitation de la zone. La connaissance des mécanismes de transport et de rétention des polluants est souhaitable pour satisfaire la recommandation formulée par Pitt *et al.*, 1999 : tous les ouvrages d'infiltration d'eaux pluviales devraient être soigneusement conçus, à la lumière des données du site, afin de protéger les ressources en eau, et rejoindre les objectifs fixés en terme de qualité d'eau.

### 1.1.3 L'OTHU

Créé en 1999 l'Observatoire de Terrain en Hydrologie Urbaine, OTHU, est une fédération de recherche qui regroupe 11 laboratoires Lyonnais. Des travaux in situ permettent de suivre le fonctionnement des ouvrages et de deux milieux récepteurs particulièrement sensibles : la nappe de l'Est Lyonnais et l'Yzeron et ses affluents, représentatifs des petites rivières périurbaines de l'ouest de Lyon.

Les objectifs scientifiques de l'OTHU sont d'améliorer les connaissances sur :

- les précipitations, et plus généralement la climatologie, ainsi que les facteurs aggravant des risques d'inondation et de pollution par les eaux pluviales urbaines ;
- les volumes d'eaux et les masses de polluants produits et rejetés par une zone urbaine (accumulation et transfert lié au ruissellement) ;
- **leur évolution à travers les divers ouvrages (réseaux, bassins de retenue, dispositifs d'infiltration) ;**
- leur devenir dans les systèmes naturels (rivières, sols et nappes) ;
- les changements, à différentes échelles de temps, dans les peuplements animaux et végétaux sur des gradients d'urbanisation. Un tel projet ambitionne de traiter de façon transversale la totalité du cycle de l'eau en milieu urbain et présente donc un caractère fortement multidisciplinaire.

La présente étude s'inscrit dans le cadre de l'OTHU. Cela se traduit entre autres par le souci de rester au plus près des valeurs du terrain et de ne pas faire un modèle de laboratoire trop éloigné de la réalité.

### 1.1.4 Les besoins en recherche

Dans l'axe de recherche qui nous concerne les besoins affirmés sont de connaître plus précisément les mécanismes à petite échelle, à la fois de rétention et de transport des polluants dans le milieu poreux.

D'autre part, il est apparu intéressant de se rapprocher des conditions réelles. Même s'il reste nécessaire de simplifier les modèles qu'on étudie en laboratoire, il nous a semblé nécessaire de travailler, par exemple, dans des gammes de concentrations représentatives du milieu naturel.

Dans les études réalisées, le rôle du compartiment microbien a pour l'instant peu été pris en compte. Le compartiment microbien est pourtant très développé dans les couches supérieures des bassins d'infiltration. Des concentrations de  $10^9$  UFC/g M.S. ont été rapportées pour un échantillon de surface d'un bassin d'infiltration (Bedell *et al.*, 2004). Il s'agit donc d'une population très dense et très active qui représente l'essentiel du compartiment vivant de cet horizon.

## 1.2 Le transport colloïdal

Il apparaît aujourd'hui nécessaire de prendre en compte le transport colloïdal pour effectuer des prédictions de transfert de polluants dans les sols. En effet la présence de particules colloïdales peut largement accroître les distances et les vitesses de transport des contaminants dans les sols.

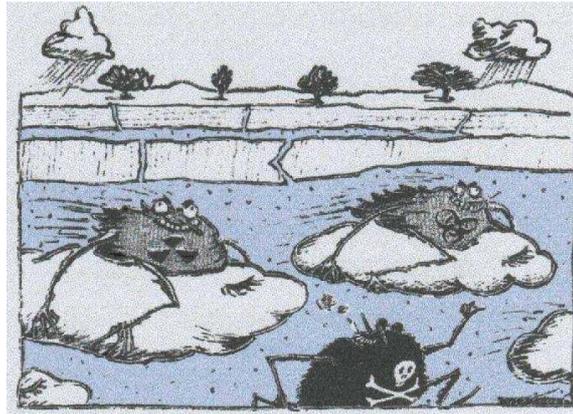


FIG. 1.3 – Illustration du rôle présumé des colloïdes dans un aquifère (McCarthy et Zachara, 1989)

Depuis les années 80, de nombreux auteurs ont souligné le rôle des particules dans le transport des polluants (Stumm, 1993; Fauré *et al.*, 1996; Kretzschmar *et al.*, 1999; Yee et Fein, 2002). Des mesures in situ (Kretzschmar et Sticher, 1998; Ross et Sherrell, 1999) et en laboratoire (Fauré *et al.*, 1996; Yee et Fein, 2002; McGechan et Lewis, 2002) ont montré que dans certaines conditions le transport colloïdal de certains polluants était prépondérant par rapport au transport soluble.

Pourtant de nombreux outils de modélisation du transfert de contaminants n'en tiennent pas compte et par conséquent, les vitesses et distances de transport des polluants peuvent être sous-évaluées.

### 1.2.1 Brève définition

Nous prenons ici comme définition du transport colloïdal, le transport des polluants qui se fait par l'intermédiaire de particules colloïdales<sup>4</sup>. Ces particules de petite taille ont été nommées à partir du mot grec κόλλα signifiant colle car elles possèdent une grande surface spécifique (Maréchal, 1996). La spécificité des particules colloïdales est que l'influence des forces de gravitation est négligeable devant celle du mouvement Brownien (Guelou, 1994).

Les colloïdes les plus souvent cités sont les particules argileuses, la matière organique morte, les microorganismes du sol, ou encore les oxy-

<sup>4</sup>Certains auteurs parlent de transport colloïdal pour qualifier le transport des colloïdes eux-mêmes.

hydroxydes métalliques (Fe, Al). En laboratoire, des colloïdes artificiels peuvent être utilisés comme par exemple des billes de latex.

### 1.2.2 Mise en évidence

Les premières investigations et surtout les premières mises en évidence du transport facilité de certains polluants, ont eu lieu dans le domaine du nucléaire. Ainsi des études sur le plutonium, depuis la première alerte donnée par Fried en 1975, jusqu'à la publication de Penrose en 1990, ont montré la migration in situ de ces éléments à des distances infiniment supérieures à celles qui avaient été évaluées.

Le sous titre de l'article de McCarthy et Zachara, 1989, est plutôt alarmant et la figure 1.3 qui illustre l'article reflète bien qu'on touchait ici à un thème qui laisse la place à l'imagination (Van der Lee, 1997). Depuis nombre d'études sur le sujet continuent d'être engagées. Les tableaux 1.3, 1.4 et 1.5 proposent un aperçu des travaux menés, des études expérimentales et des propositions de modélisation sur le thème du transport colloïdal.

### 1.2.3 Besoins en recherche

Les besoins en recherche sur le transport colloïdal apparaissent en conclusion de nombreux articles sur la contamination des sols. A titre d'exemple, Sutherland, 2000, conclut une étude sur la contamination des couches supérieures du sol en proposant de s'intéresser au transport colloïdal : "en prenant en compte ce mécanisme, la présence de ces métaux traces risque alors d'être une menace pour la nappe d'eau souterraine".

McCarthy et Zachara, 1989, terminent leur article en posant des questions dont celle-ci "est ce que les facteurs chimiques et hydrauliques qui contrôlent la stabilisation, le transport et le dépôt des particules colloïdales peuvent être décrits et inclus dans les modèles de transport prédictifs?"

Tout d'abord il apparaît nécessaire selon de nombreux auteurs de coupler la genèse des colloïdes, leur transport ainsi que l'adsorption des polluants dont ils vont faciliter le transport dans le milieu poreux.

Ensuite, après de nombreux résultats obtenus sur les billes de latex, parfois même dans des milieux poreux artificiels, il apparaît nécessaire de prendre en compte des colloïdes réels.

De très nombreuses études proposent d'infiltrer dans les colonnes des suspensions colloïdales. Ces colloïdes sont parfois préalablement mis au contact de polluants. L'objectif est alors d'observer leur transport et éventuellement celui des polluants associés. Peu de travaux partent d'un système stable et observent son évolution, vers un état dans lequel des colloïdes sont mis en mouvement.

TAB. 1.3 – Exemples d'études expérimentales sur le transport facilité des contaminants par des colloïdes bactériens (1 à 6) et non bactériens (7 à 9)

Description des expériences <sup>a</sup>	Objet de l'étude
Jenkins et Lion, 1993	
phénanthrène sable bactéries batchs et colonnes	capacité de certaines bactéries à accroître le transport de phénanthrène
Jenkins <i>et al.</i> , 1994	
phénanthrène et cadmium sable 3 bactéries méthanotrophes batchs et colonnes	mobilité des polluants associés aux bactéries rôle des EPS
Noell <i>et al.</i> , 1998	
cesium billes de verre colloïdes injectés colonnes	effet des colloïdes sur le facteur de retard validation du modèle de Corapcioglu et Haridas, 1985
Denaix <i>et al.</i> , 2001	
plomb, zinc et cadmium milieu poreux argileux biocolloïdes investigations par MET	identification des principaux transporteurs de ces métaux
Yee et Fein, 2002	
cadmium quartz + fer 1 bactérie batchs et en colonne	transport facilité d'un métal et rôle du pH
Baumann <i>et al.</i> , 2002	
pentachlorophénol aquifère graviers colloïdes in situ pilotes de laboratoire	transport facilité et rôle de la filtration
Fauré <i>et al.</i> , 1996	
radioéléments sable bentonite particules argileuses colonnes	migration des particules, transport associé et rôle de la salinité
Saiers et Hornberger, 1999	
<sup>137</sup> Cs sable (quartz) kaolinite colonnes	adsorption des contaminants et dépôt des colloïdes en fonction de la qualité d'eau des pores
Wieland <i>et al.</i> , 2004	
radionucléides mortier + quartz colloïdes in situ essais en batchs	capacité de sorption et de mobilisation

<sup>a</sup>Dans l'ordre : contaminant, milieux poreux, colloïdes, méthodologie

TAB. 1.4 – Exemples d'études expérimentales en colonnes de laboratoire sur le transport des particules colloïdales

Description des expériences <sup>a</sup>	Objets de l'étude
Huysman et Verstraete, 1993	
sol non saturé bactéries	influence de l'hydrophobie et des propriétés du sol
Harmand <i>et al.</i> , 1996	
sable particules de latex	rôle du flux, de la force ionique, de la taille des colloïdes et de leur concentration
Grolimund <i>et al.</i> , 1998	
sol (quartz) colloïdes naturels mobilisables et particules de latex injectées	cinétique d'advection, de dispersion et de dépôt
Jewett <i>et al.</i> , 1999	
sable bactéries	effet de la teneur en eau sur le transport des colloïdes
Cumbie et McKay, 1999	
saprolite fracturée microsphères de latex	diamètre optimal pour le transport localisation du transport rôle des fractures
Grolimund et Borkovec, 1999	
sol non calcaire saturé d'ions monovalents colloïdes in-situ	relargage à long terme rôle de la force ionique
Grolimund <i>et al.</i> , 2001	
sol non calcaire saturé d'ions monovalents colloïdes in-situ	relargage des particules en fonction des modifications chimiques
Bunn <i>et al.</i> , 2002	
sédiments aquifères in situ et en laboratoire colloïdes naturels	effet du pH de la force ionique mobilisation des colloïdes naturels
Zhuang et Jin, 2003	
sable virus	rôle de la force ionique et de la composition chimique sur la rétention et le transport de virus

<sup>a</sup>Dans l'ordre : milieu et colloïdes

TAB. 1.5 – Exemples de modèles liés au transport colloïdal

Objet du modèle (Hypothèses)	Résultats
Corapcioglu et Jiang, 1993 transport colloïdal modèle mathématique	importance de la matière organique dissoute pour le transport colloïdal
Van der Lee <i>et al.</i> , 1993 modèle microscopique de transport (considérations chimiques et électrostatiques)	mise en évidence du transport des radionucléides et des phénomènes d'interaction
Guellouz, 1994 transport des colloïdes (micromodèle)	les colloïdes se dispersent moins qu'un traceur
Corapcioglu et Kim, 1995 transport colloïdal (effets du métabolisme) 3 phases	transport d'un contaminant biodégradable en présence d'une bactérie
Van der Lee, 1997 transport des radionucléides en présence de colloïdes	conditions favorables au transport colloïdal
Choi et Corapcioglu, 1997 transport des colloïdes et d'un polluant volatil associé (équations d'équilibre de masse)	importance de l'interface air-liquide et des propriétés des contaminants et des surfaces colloïdales
Sun <i>et al.</i> , 2001 transport des colloïdes milieux poreux hétérogènes	mise en évidence des paramètres prépondérants
Grolimund et Borkovec, 2001 couplage entre composition chimique de l'eau et taux de mobilisation	prédominance des conditions physicochimiques sur la mobilisation
Tufenkji <i>et al.</i> , 2003 phénomènes de dépôt des particules microbiennes	améliore la théorie de la filtration

### 1.3 Définition du sujet de recherche

#### 1.3.1 Cadre général

A l'intersection des deux problématiques définies précédemment, le sujet de ce mémoire est le transport facilité d'un métal par des colloïdes bactériens. L'objectif est d'évaluer, en laboratoire, le transport facilité du zinc, dans des conditions physicochimiques représentatives du sol d'un bassin d'infiltration d'eaux pluviales.

#### 1.3.2 Choix stratégiques et contraintes matérielles

Plusieurs choix ont été faits pour limiter le champ des investigations. Nous avons ainsi retenu la solution de travailler avec des colloïdes bactériens et un métal caractéristique de la pollution urbaine, le zinc. Les bactéries de l'espèce des *Pseudomonas putida* se trouvent fréquemment dans les sols. Ce sont les colloïdes modèles retenus pour cette étude.

L'objectif principal de l'étude était donc de provoquer la déstabilisation d'un biofilm bactérien et d'évaluer le transfert facilité du zinc par les colloïdes ainsi mobilisés.

#### 1.3.3 Définition des objectifs et priorités

L'objectif général de la thèse est la caractérisation du transfert facilité par les colloïdes bactériens du zinc en milieux sableux. Dans le détail, l'étude porte sur la déstabilisation d'un biofilm bactérien et du transport colloïdal qui en résulte. Dans ce cas, les colloïdes sont donc des fragments de biofilm et il s'agira d'évaluer l'impact du transport de ces particules sur la migration du zinc.

Plus précisément, cet objectif principal se décline en trois sous-objectifs qui sont :

- la mise en place et la déstabilisation d'un biofilm bactérien et l'identification de certains facteurs physicochimiques prépondérants
- l'identification des mécanismes d'adsorption du zinc sur les colloïdes bactériens
- la quantification et la caractérisation du transport associé du zinc

#### 1.3.4 Originalité

L'originalité de cette étude a trait en particulier à la matrice considérée, au matériel colloïdal étudié et à la méthodologie employée.

##### a) Le support

La matrice poreuse choisie est le sable de Loire. Proche de la silice pure, il peut être considéré comme un milieu modèle, très bien caractérisé.

Il s'agit d'une des rares études utilisant un biofilm ayant colonisé une matrice poreuse. L'état de départ est considéré comme stable avec le biofilm développé sur le sable et l'expérience consiste alors en une déstabilisation de cet équilibre.

*b) Les colloïdes*

Les colloïdes ne sont ici ni des billes de latex, ni des particules minérales ou de la matière organique morte ou des oxydes de fer : ce sont des **colloïdes vivants**.

D'une part ces colloïdes sont largement présents dans les milieux réels, d'autre part ils ont des caractéristiques propres : évolution dans le temps, réactivité, interactions.

Toutefois, les bactéries utilisées sont bien caractérisées, il s'agit d'une seule espèce et en ce sens, le choix de pouvoir contrôler au mieux un maximum de paramètres est confirmé.

Ensuite, la volonté de s'intéresser plus précisément aux propriétés de surface des particules colloïdales et d'utiliser les techniques d'investigation sur les surfaces bactériennes dans la perspective du transport colloïdal apparaît aussi comme un aspect novateur de ce travail.

En fait on se situe dans une zone intermédiaire entre les études expérimentales menées avec des colloïdes modèles, billes de latex par exemple, et les études in situ ou avec des milieux et des colloïdes naturels pour lesquelles le degré de complexité est beaucoup plus important. Ces études ne peuvent pas avoir une approche aussi fine compte tenu des nombreux paramètres difficilement contrôlables.

Enfin, il s'agit de colloïdes initialement présents dans le milieu. Les études in situ prennent souvent ces colloïdes en considération. Mais les études de laboratoire consistent plus souvent en un ajout de colloïdes dans l'influent.

*c) La méthodologie*

La démarche, enfin, apporte également plusieurs originalités. L'approche expérimentale se fait à différentes échelles : à partir des constatations à l'échelle de la colonne, des travaux à des échelles plus petites, celles des particules, ont permis d'évaluer la vraisemblance de certaines hypothèses.

Enfin, cette étude est par nature réellement multidisciplinaire. Elle se situe au croisement de plusieurs champs d'investigation que sont la géochimie et la microbiologie. De plus, par l'aspect dynamique des phénomènes et la problématique transport, nous avons également fait appel au champ disciplinaire de l'hydrodynamique des milieux poreux.

## 1.4 Présentation du mémoire

Les travaux présentés dans cette thèse sont la synthèse des expériences menées en vue de répondre aux objectifs précédemment mentionnés. Ils sont présentés dans trois principaux chapitres. En outre ce premier chapitre introductif a présenté le contexte et les objectifs du travail et un dernier chapitre proposera des conclusions à cette étude.

Les annexes regroupent les éléments complémentaires qui n'avaient pas leur place dans le cours principal de l'exposé mais qui peuvent apporter un éclairage plus précis sur certains points sommairement abordés.

### 1.4.1 Revue de la littérature

L'état de l'art proposé ici s'attache à présenter tout d'abord les colloïdes bactériens et leurs propriétés. Le transport de ces particules colloïdales fait l'objet d'une deuxième partie. La partie suivante présente le transport facilité des polluants par les particules colloïdales. L'objectif est de donner au lecteur les données nécessaires à la compréhension des expériences et à l'analyse des résultats et ne prétend pas à l'exhaustivité sur les sujets traités.

### 1.4.2 Matériel et méthodes

En quatre volets, matériel, méthodes, analyses et analyses des données et modélisation, cette partie décrit les aspects matériel et dresse le plan d'expériences suivi. Les résultats des expériences préliminaires sont proposés et les choix techniques justifiés.

### 1.4.3 Résultats et discussion

Cette contribution est divisée en deux parties. La première est une présentation des différentes expériences menées et dans chaque cas les résultats sont analysés et les développements qui en découlent sont proposés.

La seconde moitié propose une nouvelle observation de ces résultats en les regroupant autour de trois questions principales :

- les bactéries planctoniques et sous forme de biofilm présentent elles les mêmes caractéristiques, la même réactivité vis-à-vis des métaux ?
- comment et sous quelles conditions la déstabilisation d'un biofilm bactérien est elle provoquée ?
- dans quelles mesures peut on parler ici de transport facilité du zinc par les colloïdes bactériens ?

## Chapitre 2

# Revue de la littérature

*Dans cette partie est proposé un état actuel des connaissances qui concernent le sujet étudié. Ainsi quelques éléments concernant les bactéries et biofilms sont présentés dans une première partie, avec une attention particulière sur leurs propriétés de surface et la formation et stabilité des biofilms. Ensuite est abordé le transport des particules colloïdales puis le transport des métaux associés. Cette dernière partie apporte un complément d'information sur les mécanismes de fixation des cations sur les surfaces.*

### 2.1 Biofilm

#### 2.1.1 Définition

##### *a) Principales caractéristiques*

Plus de 99% des microorganismes vivent sous la forme de biofilms et quasiment toutes les surfaces sont susceptibles d'être colonisées par des bactéries (Flemming, 1993; Davies, 2000). Les biofilms sont définis comme des assemblages complexes (Fletcher, 2001), stables (O'Toole *et al.*, 2000b) dotés d'une certaine "élégance structurelle et fonctionnelle" (Briones et Raskin, 2003). Par opposition les bactéries qui ne sont pas sous forme de biofilms sont qualifiées de planctoniques<sup>1</sup>(Costerton, 1999). Ainsi un biofilm est un film de cellules immobilisées dans un substrat et souvent dans une matrice de polymères extracellulaires d'origine bactérienne (Drury *et al.*, 1993).

Le comportement distinct de ces communautés sessiles et de la biomasse en suspension est mis en évidence par certains auteurs (Briones et Raskin, 2003). Pourtant, à ce jour, très peu d'études portent sur la comparaison de la diversité fonctionnelle dans les agrégats par rapport à la communauté planctonique (Briones et Raskin, 2003). Les études sur la formation

---

<sup>1</sup>On trouve également dans la littérature anglophone des expressions très explicites pour les désigner, "free-living", "free-swimming" (O'Toole *et al.*, 2000b) ou "free-floating".

des biofilms ont commencé dans les années 1970 en partant de l'hypothèse que les biofilms étaient des systèmes simples formés de bactéries ayant les mêmes propriétés que dans leur état planctonique (Pulcini, 2001).

L'intérêt croissant pour les biofilms s'explique par leur rôle dans les problématiques industrielles comme la corrosion ou le colmatage (Auerbach *et al.*, 2000). Parallèlement les avancées de la microbiologie en médecine qui ont longtemps seulement concerné les cellules planctoniques, portent également aujourd'hui sur les biofilms (Costerton, 1999). Ceux-ci sont en effet la cause de la résistance de certaines bactéries aux produits supposés désinfecter les surfaces.

b) *Formation et croissance*

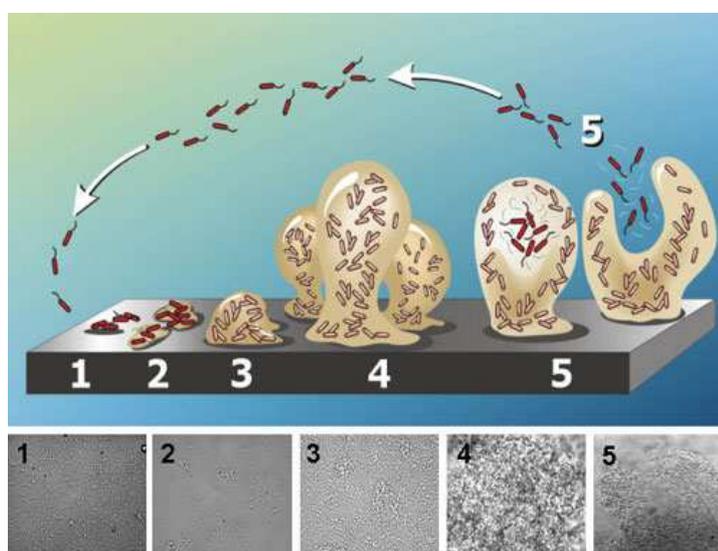


FIG. 2.1 – Cycle de formation d'un biofilm (Davies, 2004)

$\alpha$ ) Phases d'évolution. — La croissance d'un film biologique peut se décomposer en quatre étapes (Belkhadir *et al.*, 1988) :

- l'implantation et l'accumulation de la biomasse active qui se traduit par une phase de latence, suivie d'une phase dynamique de croissance ;
- l'accumulation d'une biomasse désactivée qui se traduit par une phase linéaire caractéristique d'une accumulation à taux constant ;
- une phase de ralentissement suivie d'une stabilisation de la masse et de l'épaisseur du biofilm liées à des phénomènes physiques comme le cisaillement ;
- une phase de décrochage au cours de laquelle le biofilm se détache de manière aléatoire du support et qui dépend de facteurs biologiques

intervenant au niveau de la surface de fixation et de facteurs physiques ; certaines cellules du biofilm peuvent alors retourner à un état planctonique (figure 2.1.)

L'événement initial pour la formation d'un biofilm est le contact entre les microorganismes et une surface (Davies, 2000). Ce contact peut être provoqué par le mouvement Brownien des particules, ou leur sédimentation ou le transport convectif des cellules (Van Loosdrecht *et al.*, 1987). Une fois le contact établi, le processus d'attachement a lieu au travers de plusieurs types d'interactions : l'hydrophobie de la cellule conditionne largement ce processus d'attachement, le rôle des flagelles et des autres récepteurs protéiques est également essentiel (Davies, 2000). Cette première étape reste réversible si elle n'est pas suivie par la création de liaisons plus fortes (figure 2.2).

Le passage d'une liaison faible à une liaison forte est fréquemment associé à la sécrétion de polymères extra cellulaires (EPS) et cette transition correspond au réel changement physiologique entre cellules planctoniques et biofilm (Davies, 2000) (voir 2.1.1.c). La maturation des biofilms microbiens résulte en un développement de l'architecture complexe, des canaux et des pores. Des différences de croissance de production d'EPS de dispersion des microbes ont été observées. De nombreuses études se sont intéressées à la communication entre cellules et au phénomène de quorum-sensing<sup>2</sup> qui semble jouer un rôle important.

Nous reviendrons dans la partie 2.1.2 sur la dernière phase ; la phase de décrochage du biofilm est celle qui nous intéresse plus précisément puisque c'est justement cette phase qui va provoquer la mise en mouvement de particules colloïdales, les fragments de biofilm décrochés. L'un des possibles signaux de détachement est l'inanition (O'Toole *et al.*, 2000b) mais une partie des bactéries décrochées du biofilm est encore active.

---

<sup>2</sup>Pour communiquer entre elles, les bactéries diffusent des molécules et sont capables également d'en mesurer la concentration. Le terme 'Quorum Sensing' est utilisé pour décrire le processus permettant à chaque bactérie de connaître la densité bactérienne (Atkinson et Diggle, 2004).

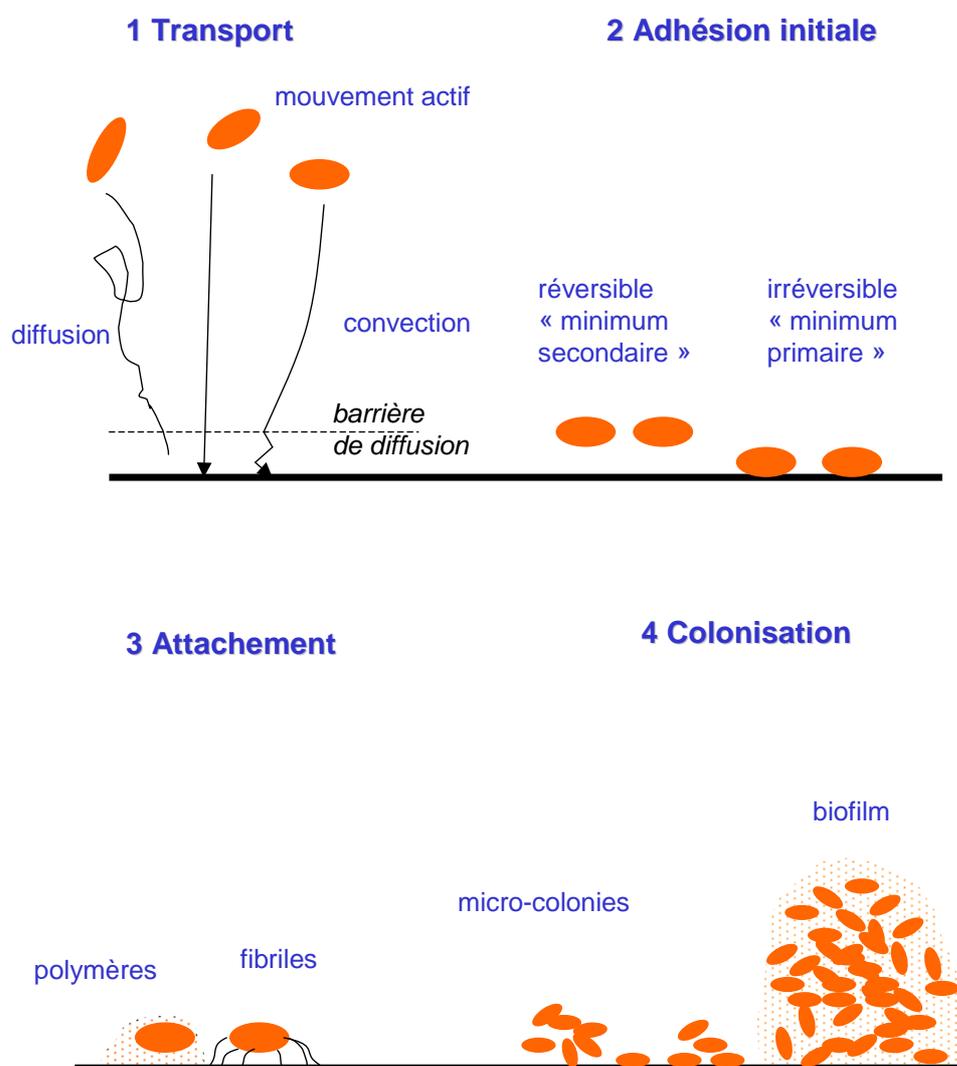


FIG. 2.2 – Représentation des étapes de colonisation des surfaces par des microorganismes (Van Loosdrecht *et al.*, 1990)

$\beta$ ) Adaptations physiologiques. — Après l'attachement à la surface, les bactéries alors sessiles connaissent plusieurs transformations pour s'adapter à la vie en biofilm (O'Toole *et al.*, 2000b; Davies, 2000). Deux propriétés sont souvent associées à l'attachement des bactéries à la surface : la synthèse croissante d'EPS et le développement d'une résistance antibiotique. D'autres propriétés peuvent apparaître comme la résistance aux UV, l'augmentation du taux d'échange génétique, les capacités modifiées de biodégradation, et une variation de la production métabolique (Davies, 2000).

On peut définir un phénotype biofilm (Pulcini, 2001). En effet, alors que les bactéries se divisent à l'échelle de quelques minutes dans leur état planctonique, elles arrêtent ce processus pendant des heures lors de leur attachement à une surface. Pendant cette période, se produisent de nombreux changements qui assurent la transition vers la phase biofilm. Des études sur *Pseudomonas aeruginosa* ont mis en évidence des modifications dans l'expression des protéines au moment de cet attachement ce qui confirme l'existence d'un phénotype différent pour les biofilms.

D'autre part pour la plupart des bactéries, l'attachement aux surfaces est très rapidement suivi par la perte de la motilité (Fletcher, 2001). De plus les bactéries sous forme de biofilms ont tendance à être plus efficaces dans leur utilisation de substrats macromoléculaires que les bactéries seules (Fletcher, 2001).

$\gamma$ ) Intérêt pour la survie. — Les bactéries trouvent généralement un intérêt à vivre et croître sous forme de biofilms (Brown *et al.*, 1998). Plusieurs études ont appuyé l'idée que les différences entre cellules planctoniques et celles présentes dans un biofilm venaient essentiellement de la disponibilité des nutriments pour les cellules dans les deux cas (Davies, 2000).

Flemming, 1993, a regroupé ce qu'il considère comme les avantages d'un mode de croissance sous forme de biofilm :

- transférer et concentrer les nutriments de la phase liquide vers la matrice du biofilm ;
- protéger contre les fluctuations de pH, de salinité, de concentration en biocide, les forces de compression et la déshydratation ;
- préserver les informations génétiques, favoriser le transfert de gènes à cause des longs temps de rétention des microorganismes ;
- développer des microconsortia :
  - symbioses, par exemple lichens ;
  - utilisation de substrats moins facilement biodégradables par des organismes spécialisés par exemple dégradation de la cellulose ou des xénobiotiques, nitrification ;
  - création de niches écologiques par exemple de zones anaérobies dans les environnements aérobies, des compartiments riches en nutriments dans des systèmes oligotrophes.

En outre, d'un point de vue médical, les biofilms sont connus pour protéger les cellules bactériennes contre les antibiotiques et les mécanismes de défense du receveur (Pulcini, 2001).

c) *Composition : Les polymères extracellulaires*

$\alpha$ ) Définition. — Une des adaptations des cellules à leur état de biofilm est la sécrétion de polymères extracellulaires qui représentent 75 à 90 % du biofilm selon les espèces (Costerton, 1999).

Les polysaccharides sont caractéristiques des substances extracellulaires des biofilms (Strathmann *et al.*, 2001; Sutherland, 1998) aussi le terme exopolysaccharides (EPS) ou polysaccharide exocellulaire a été proposé comme appellation générale pour les polymères sécrétés à l'extérieur de la cellule (Sutherland, 1982; Cerning *et al.*, 1994). Rappelons que certains polysaccharides se trouvent à l'intérieur de la cellule, dans le cytoplasme et sont utilisés par la bactérie comme source d'énergie, d'autres sont les composants de la paroi tels les peptidoglycanes et les acides teichoïques (Bergmaier *et al.*, 2001).

Les EPS peuvent soit être sécrétés dans le milieu environnant soit rester liés à la cellule sous forme de capsule (Bergmaier *et al.*, 2001). Ils appartiennent au "squelette" des biofilms (Wuertz *et al.*, 2001). Leur synthèse est exposée en détail par Sutherland, 1982.

Aujourd'hui des applications industrielles des polysaccharides microbiens ont favorisé l'étude de leurs propriétés et de leur production par les cellules bactériennes (Sutherland, 1982). Ces études concernent surtout la viscosité et les capacités de gélification des polymères. Une vaste partie des études concerne les systèmes de traitement d'eaux (Rittmann, 1993) (figure 2.3).

$\beta$ ) Rôle. — Les EPS jouent un rôle majeur dans l'adhésion aux surfaces et l'agrégation des cellules, la résistance aux composés antibactériens, aux métaux, la formation de colonies, la dégradation de composés organiques, la communication entre cellules (Flett *et al.*, 1989; O'Toole *et al.*, 2000a; de Swaaf *et al.*, 2001; Zhang et Fang, 2001).

La capsule d'EPS semble également augmenter l'hydrophobie de la surface bactérienne (Bergmaier *et al.*, 2001), favoriser l'adhésion, la cohésion et l'intégrité structurale des cellules (Flemming, 1993).

Il a ainsi été observé que les bactéries du sol peuvent créer leur propre microhabitat en produisant des EPS qui retiennent l'eau durant la dessiccation (Van Elsas *et al.*, 1997). Par ailleurs une étude sur *Pseudomonas putida* a mis en évidence une plus abondante production d'EPS dans des conditions d'oxygénation moindre (Zhang *et al.*, 1998).

Ainsi dans des conditions concurrentielles, les EPS semblent donner aux bactéries un avantage et leur permettre de se maintenir (Bergmaier



FIG. 2.3 – Représentation d'un biofilm développé dans une canalisation d'eau potable (PR-Company GmbH, 2004)

*et al.*, 2001; Davies, 2000) et des bactéries peuvent, si besoin, accroître leur production d'EPS. Des études sur des mutants produisant moins d'EPS ont d'ailleurs montré une moindre survie.

$\gamma$ ) Composition. — Les biofilms contiennent principalement de l'eau, entre 70 et 95% de leur poids humide. Les biofilms sont noyés dans les polymères extracellulaires très hydratés (Flemming, 1993; Zhang et Fang, 2001). Cette teneur en eau ne varie ni avec l'âge du biofilm ni avec la profondeur de l'échantillon prélevé (Zhang et Fang, 2001).

Les substances polymères extracellulaires sont composées d'une grande variété de matériaux organiques dont les polysaccharides, les protéines, les acides nucléiques, les phospholipides, les substances humiques (Zhang et Fang, 2001). Les polysaccharides prédominent et représentent jusqu'à 65% des matériaux extracellulaires (Zhang et Fang, 2001). Les protéines sont le deuxième composant majoritaire des biofilms ainsi que des EPS (Strathmann *et al.*, 2001; de Swaaf *et al.*, 2001).

Les groupes fonctionnels anioniques présents dans le peptidoglycane, les acides teichoïques et teichuroniques, les phospholipides sont responsables du caractère anionique et de la capacité à retenir les cations de la paroi cellulaire (Wuertz *et al.*, 2001).

$\delta$ ) Extraction et analyse. — Les EPS peuvent être extraits par séparation physique (centrifugation (Martinelli *et al.*, 2002)) et chauffage, ultrafiltration (Bergmaier *et al.*, 2001) ou par le biais de réactions chimiques (uti-

lisation d'éthanol, de formaldéhyde, d'EDTA et de résines échangeuses d'ions), ou par combinaison des deux (Wuertz *et al.*, 2001).

La quantification des polymères extracellulaires est directement liée à la méthode d'extraction (Zhang et Fang, 2001). Les valeurs trouvées lors du dosage des polymères sont très variables (Zhang et Fang, 2001). Les EPS dans les biofilms peuvent aussi être caractérisés par microscopie électronique à balayage confocal CLSM après coloration spécifique des sites ou en employant la méthode développée par Zhang et Fang, 2001. Les analyses les plus fréquemment réalisées sur les EPS isolés sont le dosage des protéines (méthodes de Lowry ou de Bradford) avec un étalon de BSA et des hydrates de carbones (méthode de Dubois) avec un étalon de glucose.

### 2.1.2 Stabilité des biofilms

#### a) *Déstabilisation et réversibilité de l'attachement*

La stabilité des biofilms a soulevé beaucoup d'intérêt et justifié de nombreuses études. Cette stabilité peut être recherchée ou au contraire, c'est la déstabilisation du biofilm qui importe lorsqu'il s'agit de nettoyer des canalisations encrassées par les biofilms par exemple.

Deux phénomènes peuvent être distingués pendant la phase de détachement : l'érosion, détachement des cellules isolées, et la desquamation<sup>3</sup>, détachement de fragments de biofilm (Stoodley *et al.*, 1999).

Les paramètres hydrauliques et biologiques vont affecter cette phase de détachement (Strevett et Chen, 2003). Ici, nous allons nous intéresser aux phénomènes physiques et au rôle de la composition de la solution sur la stabilité du biofilm. Deux cations reviennent souvent dans les études, pour leur comportement contrasté : le calcium et le sodium. Ce sont des éléments majeurs qui se trouvent fréquemment concentrés dans les eaux de ruissellement (Dechesne, 2002) et les sols (Davet, 1996).

Les données qui suivent concernent les suspensions colloïdales en général, y compris minérales.

#### b) *Rôle de la force ionique et de la valence des cations de la solution*

Dans la grande majorité des études, le taux de remobilisation des particules augmente lorsque la force ionique diminue, tant que le système est dominé par des ions monovalents (Kretzschmar *et al.*, 1999). Mais la remobilisation des colloïdes n'est pas systématique lorsqu'on passe d'une forte à une faible force ionique et il faut aussi tenir compte de la composition de la solution (Bunn *et al.*, 2002).

En effet, certains auteurs notent qu'au-delà des paramètres tels que la force ionique et le pH du milieu, la composition même de la solution influence la mobilisation des particules colloïdales. Ainsi, la présence de ca-

---

<sup>3</sup>Sloughing

tions divalents ( $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ) favorise le processus de dépôt alors que les cations monovalents ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ) favorisent la stabilité des particules colloïdales et agissent comme dispersant (Rousseau, 2003; Roy et Dzombak, 1996; Elimelech et Ryan, 2002).

Enfin plus précisément, les échanges entre sodium et calcium sont connus pour influencer la remobilisation des colloïdes (Kretzschmar *et al.*, 1999). Comme l'expliquent en détails Roy et Dzombak, 1996, la stabilité des colloïdes en équilibre avec des ions divalents peut être liée à la sélectivité de la plupart des surfaces pour les ions divalents. Cette sélectivité se traduit par la plus efficace neutralisation des charges lorsque les cations divalents se trouvent dans la couche de Stern et la couche diffuse.

$\alpha$ ) Mise en évidence. — Plusieurs phénomènes ont été mis en évidence lors d'expériences en laboratoire

– *Le rôle de la force ionique*

La mobilisation de colloïdes minéraux a pu être provoquée en saturant des colonnes en sodium puis en introduisant des solutions de sodium de force ionique décroissante (Kretzschmar *et al.*, 1999). La déstabilisation augmentait lorsque la force ionique diminuait et que le pH augmentait.

La quantité de particules de latex capturées par la matrice est une fonction croissance de la force ionique (Harmand, 1996) et décroissante du débit et de la taille des particules.

– *Le rôle du calcium*

Le rôle stabilisateur du calcium est largement reconnu : soit le calcium est utilisé pour stabiliser<sup>4</sup>, soit la présaturation avec du calcium empêche toute mobilisation<sup>5</sup>, soit enfin, la présence de calcium lors du dépôt des colloïdes prévient tout relargage ultérieur<sup>6</sup>. D'après Kretzschmar et Sticher, 1998, au-delà de 0,001 mol/L de calcium seule une très faible mobilité des particules colloïdales sera envisageable.

– *Les échanges sodium-calcium*

Dans deux cas de figure des échanges entre sodium et calcium ont pu être mis en évidence. Dans le premier cas, une colonne saturée en calcium est ensuite soumise à une forte concentration de sodium. Le calcium est d'abord échangé avec le sodium, puis lorsque la force ionique diminue, de grandes quantités de particules colloïdales sont remises en suspension (Kretzschmar *et al.*, 1999). La même

---

<sup>4</sup>La stabilité d'un biofilm est améliorée par un ajout de 0,1 mol/L de calcium (Strathmann *et al.*, 2001), ou pour des colonnes de sol le passage de 200 volumes des pores de 0,5 mol/L  $\text{CaCl}_2$  (Grolimund *et al.*, 1996).

<sup>5</sup>Des colonnes, préalablement saturées en calcium ne montrent aucune déstabilisation même en lavant avec de l'eau distillée (Kretzschmar *et al.*, 1999).

<sup>6</sup>La présence de  $\text{CaCl}_2$  pendant le dépôt des colloïdes empêche leur relargage par une même solution de moindre force ionique (Roy et Dzombak, 1996; Hahn *et al.*, 2004).

expérience sans le passage par le sodium a montré une totale immobilité des particules. Dans une autre expérience, une colonne est saturée par une solution Na/Ca dans un ratio 200/1. La force ionique est diminuée en conservant le ratio Na/Ca constant. Deux fronts sont alors observés : l'un normal, l'autre retardé par les échanges Ca/Na. Avec chacun, une mobilisation des particules colloïdales est évidente (Grolimund *et al.*, 1996). Roy et Dzombak, 1996, montrent également qu'alors qu'avec de l'eau distillée, peu de calcium présent dans le milieu peut être enlevé, le passage d'une solution concentrée de sodium, parvient à remplacer le calcium présent.

$\beta$ ) Justification théorique : la théorie DLVO. — La stabilité des particules colloïdales résulte de l'équilibre entre les forces attractive et répulsive qui s'exercent. La théorie DLVO, développée par Derjaguin, Landau, Verwey et Overbeek, propose de comparer l'attraction de van der Waals et l'interaction répulsive électrostatique (répulsion de la double couche).

L'attraction de van der Waals est dans une approche simplifiée inversement proportionnelle au carré de la distance intercolloïdale :

$$V_A = -k \frac{A}{d^2} = -\frac{Aa}{12H_0} \quad (2.1)$$

avec

A, constante de Hamaker

a, rayon des particules

d, distance entre deux colloïdes

k, une constante de proportionnalité

$H_0$ , plus petite distance d'interaction entre deux particules sphériques.

D'autre part, l'expression de la *répulsion électrostatique* dépend du potentiel de surface et de sa décroissance dans la partie diffuse de la double couche, cette décroissance étant elle même fonction de la force ionique.

$$V_R = \frac{\varepsilon a \psi_d^2}{2} \ln(1 + e^{-\kappa H_0}) \quad (2.2)$$

$\varepsilon$ , la constante diélectrique

$\psi_d$ , le potentiel de Stern à la surface des colloïdes, proportionnel à la capacité et à la charge

$\kappa$  l'inverse de la longueur de Debye, c'est-à-dire de l'épaisseur de la double couche

$$\kappa = \left( \frac{2F^2 I * 10^3}{\varepsilon \varepsilon_0 RT} \right)^{1/2} \quad (2.3)$$

avec

$F$ , la constante de Faraday  
 $I$ , la force ionique  
 $\epsilon_0$  la permittivité du vide  
 $R$ , la constante des gaz parfaits  
 $T$ , la température absolue

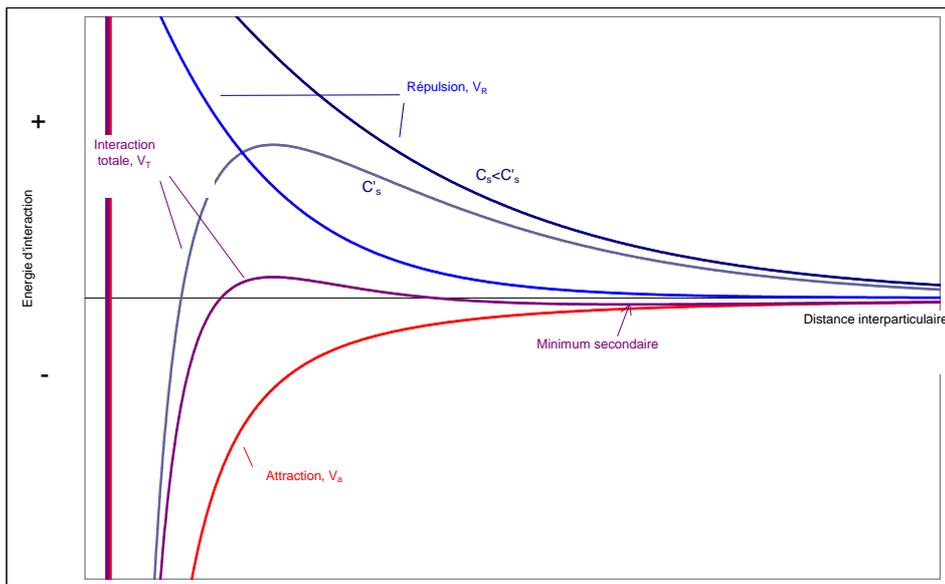


FIG. 2.4 – Représentation schématisée des énergies d'interaction, d'attraction et totale en fonction de la distance interparticulaire (Sigg *et al.*, 2000)

Sur la figure 2.4 sont représentés deux cas selon la concentration de l'électrolyte  $C_s$  ou  $C'_s$ . L'énergie totale d'interaction est la somme des énergie d'attraction  $V_A$  et de répulsion  $V_R$ ; celle-ci dépend de la concentration de l'électrolyte. Plus cette concentration est élevée, plus l'énergie qui doit être surmontée est faible.

La formation d'agrégats se produit lorsque l'énergie est minimale mais une coagulation peut également avoir lieu dans le second minimum (Sigg *et al.*, 2000).

Ainsi la stabilité des colloïdes dépend

- du potentiel de surface
- de la force ionique de la solution
- de la charge des contre-ions

(Sigg *et al.*, 2000)

$\gamma$ ) Interprétations pratiques. — Des phénomènes d'interaction et d'échange peuvent être déduits de ces principes.

– *Répulsion électrostatique entre particules*

La rapide mobilisation des colloïdes dans une colonne de sable lors d'une diminution de la force ionique est due à des répulsions entre particules (Roy et Dzombak, 1997)<sup>7</sup>. En effet, au plus les particules sont chargées, au plus elles ont tendance à se repousser alors qu'avec une faible charge, les phénomènes de coagulation, agglomération, agrégation, précipitation vont être privilégiés (Maréchal, 1996).

– *Énergie d'interaction*

Par ailleurs, la force ionique et la valence des ions déterminent la forme de la courbe d'énergie d'interaction dont la présence et la hauteur de la barrière énergétique et la présence et la profondeur du 2<sup>me</sup> puits (Hahn *et al.*, 2004). Or la remobilisation conséquente des particules dépend de l'énergie correspondante à leur dépôt primaire ou secondaire. L'hypothèse proposée est que les colloïdes se déposent principalement dans le premier minimum en présence du CaCl<sub>2</sub> et ne peuvent alors franchir la barrière énergétique pour leur détachement quand le 0,001 mol/L KCl est introduit (Hahn *et al.*, 2004). Alors que lorsqu'ils sont déposés en présence de KCl, les colloïdes restent dans leur minimum secondaire duquel ils peuvent sortir par seule réduction de la force ionique (Hahn *et al.*, 2004).

– *Particularités du calcium*

Le calcium est davantage disponible pour se complexer spécifiquement avec les sites des surfaces, provoquant une moindre répulsion électrostatique (Roy et Dzombak, 1996). Il joue un rôle majeur dans l'agrégation du fait qu'il est à l'origine de forces d'attraction très fortes avec les sites de surface chargés et ce dans une large gamme de concentrations de la solution du sol (Tessier, 1999).

– *Échange cationique*

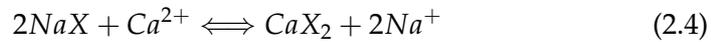
Si une solution de sodium est injectée dans une colonne dans laquelle les colloïdes sont en équilibre avec du calcium, la remobilisation du calcium se produira plus facilement que lorsqu'il s'agit d'eau distillée car certains ions sodium peuvent remplacer les ions calcium dans la phase échangeable. Ainsi la mobilisation des colloïdes est fonction à la fois de la force ionique et de la capacité de la solution à se substituer au calcium (Roy et Dzombak, 1996).

δ) Modélisation de l'échange cationique. — Deux types de modèles sont proposés pour représenter l'échange cationique, en particulier dans le cas des ions sodium et calcium proposés par Cernik, 1996, et Gaines-Thomas, 1953, (Vulava *et al.*, 2002).

Dans la convention de Gaines-Thomas, l'échange hétérovalent est ex-

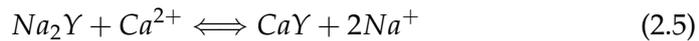
<sup>7</sup>Cette répulsion peut aussi être augmentée par l'élévation du pH (Roy et Dzombak, 1996).

primé par :

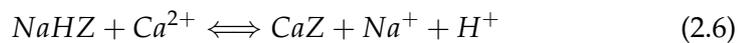


avec X un site de surface de charge -1

Cernik propose une écriture comparable, avec Y un site de charge -2 :



Vulava *et al.*, 2002, ajoutent une troisième équation :



avec Z de charge -2.

## 2.2 Propriétés des surfaces

Dans cette partie il faut entendre par surface, surface bactérienne ou tout type de surface, cellulaire ou extracellulaire d'un biofilm. Néanmoins, la plupart des définitions restent valables pour d'autres types de surface, par exemple des surfaces minérales. Le tableau 2.1 fait état des études fréquemment menées sur les surfaces bactériennes. On observe que les caractéristiques comme la charge de surface et l'hydrophobie sont assez largement documentées au dépend d'autres aspects comme la structure ou la capacité d'adsorption des cations.

### 2.2.1 Charge de surface et potentiel Zêta

#### a) Définitions

La charge de surface d'une particule dépend de sa nature et du milieu qui l'entoure (Stumm, 1992). Cette charge, dans le cas de particules dispersées en milieu liquide, est essentiellement liée à l'ionisation de groupes chimiques situés à la surface ainsi qu'à l'adsorption de surfactants ioniques.

La distribution des ions autour d'une particule chargée peut être représentée par un modèle à double couche électrique comme schématisé sur la figure 2.5. La première couche comporte des ions solidement liés à la surface, la seconde, externe, est plus diffuse. Le potentiel électrostatique décroît de manière exponentielle lorsque l'on s'éloigne de la surface de la particule. Le potentiel Zêta se mesure au niveau du plan de cisaillement, là où les particules interagissent vraiment entre elles. Il est proportionnel à une densité de charges exprimée en  $C/m^2$ .

Le point de charge nulle est le point pour lequel la densité surfacique de charge est nulle, il se détermine par titrage potentiométrique. Le point isoélectrique, PIE se détermine avec un zêtamètre : c'est lorsque la valeur du potentiel Zêta est nulle à 10 ou 15 Å de la surface.

TAB. 2.1 – Exemples d'études menées sur les propriétés de surface

Souches bactériennes	Propriétés	Méthodes
5 souches	CSH	MATH avec différents solvants
Rosenberg <i>et al.</i> , 1980		
4 streptocoques <sup>a</sup>	CSH	angle de contact
Busscher <i>et al.</i> , 1984		
<i>Streptococcus sanguis</i>	CSH Adhésion EPS	adhésion à l'hexadécane isotherme d'adsorption IEF et IES SDS-PAGE
Knox <i>et al.</i> , 1985		
<i>Proteus mirabilis</i>	CSH	MATH HIC
Onalapo et Klemperer, 1986		
<i>Streptococcus salivarius</i>	CSH CSC adhésion	angles de contact ZP adhésion
Van der Mei et Busscher, 1987		
23 souches	EPM	ZP
Van Loosdrecht <i>et al.</i> , 1987		
<i>Staphylococcus epidermis</i>	CSH CSC	MATH HIC ESIC ZP
Jones <i>et al.</i> , 1996		
<i>Staphylococcus Aureus</i>	CSC CSH	EPM dans un laser adhésion à l'hexadécane
Beck <i>et al.</i> , 1998		
<i>Escherichia coli</i>	adsorption EPM structure	spectrophométrie ZP granulo laser
Châtellier <i>et al.</i> , 2001		

<sup>a</sup> *Streptococcus salivarius*, *Streptococcus sanguis*, *Streptococcus mitior* et *Veillorella alcalescens*

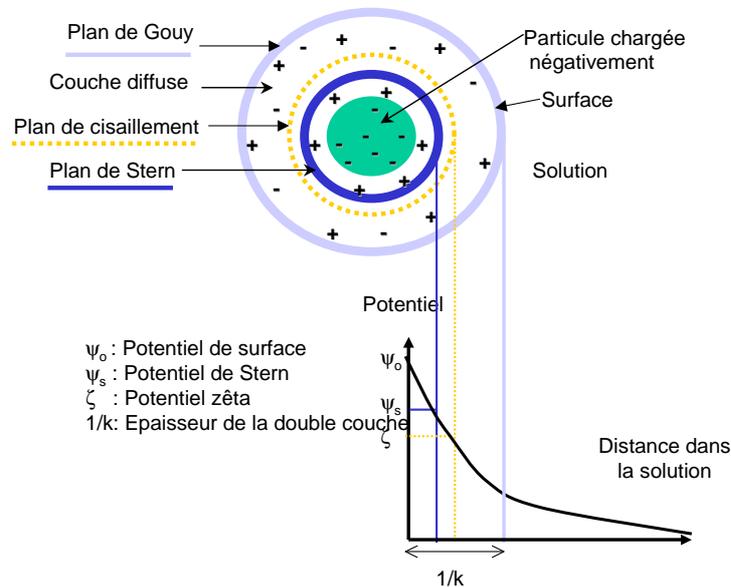


FIG. 2.5 – Charge de surface d’une particule (Touret et Vestier, 1970)

La mesure du potentiel Zêta peut être réalisée, dans les milieux faiblement concentrés, grâce à une simple mesure de vitesses de déplacement de particules soumises à un champ électrique. Le principe est de détecter les particules sur un réseau de franges d’interférences créées par deux faisceaux laser qui se croisent. Les détails du fonctionnement de l’appareil sont décrit précisément dans le manuel (Malvern Instruments, 2000).

Le potentiel Zêta, en évaluant la charge d’une particule, donne une indication de la stabilité d’une suspension ou d’une émulsion (Maréchal, 1996).

#### b) Facteurs modifiant la charge

La charge électrique des parois microbiennes dépend du pH ambiant. Elle est nulle lorsque le pH est égal à celui de leur point isoélectrique, négative quand le pH est supérieur et positive lorsqu’il est inférieur. Pour les bactéries, le PI est généralement très bas, inférieur au pH moyen du sol et les parois microbiennes sont donc le plus souvent chargées négativement, comme la surface des particules d’argile.

L’augmentation de la force ionique et la présence dans la solution de métaux lourds, particulièrement les plus électronégatifs, semblent favoriser une hausse du potentiel Zêta (Guiné, 2002; Sadowski, 2001).

La valeur du point isoélectrique varie aussi selon la nature des cations présents dans le milieu : de 2,5 à 3,5 en présence de cations monovalents, allant jusqu’à 5 en présence de  $\text{CrCl}_3$  à la même force ionique et jusqu’à 7 avec  $\text{FeCl}_3$  ou  $\text{AlCl}_3$  (Davet, 1996). En effet, la réduction de la mobilité

électrophorétique est plus importante avec les contre ions divalents comme le calcium que les contre ions monovalents comme le sodium (Grolimund *et al.*, 1998).

### 2.2.2 Hydrophobie

#### a) Définition

Le caractère hydrophobe d'une surface résulte des propriétés conférées par les molécules de surface comme les protéines et les lipides (Davies, 2000).

L'évolution du caractère hydrophobe lors de la phase d'attachement des bactéries aux surfaces est primordial (Davies, 2000). Certains auteurs soulignent que les bactéries sont susceptibles de produire des lipopolysaccharides et d'augmenter ainsi leur hydrophobie pour favoriser la phase d'attachement. Toutefois ces lipopolysaccharides présentent aussi une partie hydrophile dont il peu s'avérer nécessaire de tenir également compte.

#### b) Méthodes d'évaluation

En dépit de son importance dans de nombreux domaines, le caractère hydrophobe n'est pas défini de manière univoque et n'a pas une échelle de valeurs unique (Rosenberg et Kjelleberg, 1986). De même il n'y a pas à ce jour de consensus sur la manière de mesurer l'hydrophobie (Rosenberg et Kjelleberg, 1986; Onaolapo et Klemperer, 1986) d'où la difficulté pour comparer différents résultats. Par exemple un échantillon apparaît davantage hydrophobe qu'un autre en utilisant la méthode de l'angle de contact, et le contraire par une méthode d'adhésion (Onaolapo et Klemperer, 1986).

Les différents approches utilisées pour mesurer l'hydrophobie des surfaces cellulaires sont les méthodes basées sur les propriétés d'adhésion (Hydrophobic Interaction Chromatography, Bacterial Adhesion To Hydrocarbon, Salting-out Agregation Test, Adhesion to Solid Surfaces), les sondes moléculaires, la mesure de l'angle de contact, les techniques de séparation des phases et les méthodes indirectes (Rosenberg et Kjelleberg, 1986).

Une méthode simple pour mesurer l'hydrophobie utilise le degré d'adhésion des cellules à différents solvants (n-hexadécane, n-octane ou p-xylène) après une brève période d'agitation (Rosenberg *et al.*, 1980). Le principe est de comparer la quantité de cellules dans la phase aqueuse, par une mesure optique à une longueur d'onde de 600 nm, avant mélange avec l'hydrocarbure et après (Rosenberg, 1991). Le coefficient de partage hexadécane-eau peut être calculé

$$K_{HW} = \frac{[Cbact]_{Hexadécane}}{[Cbact]_{eau}} = \frac{[DO_{600}]_{Hexadécane}}{[DO_{600}]_{eau}} \quad (2.7)$$

TAB. 2.2 – Hydrophobie de cellules bactériennes : coefficient de partage hexadécane/eau,  $K_{HW}$ 

Source	Bactérie	$K_{HW}$
Knox <i>et al.</i> , 1985	<i>Streptococcus sanguis</i>	44-83 %
Knox <i>et al.</i> , 1985	<i>Streptococcus sanguis</i>	24-75 %
Onaolapo et Klemperer, 1986	<i>Proteus mirabilis</i>	45-95 %
Guiné, 2002	<i>Escherichia Coli</i>	17 %
Guiné, 2002	<i>Ralstonia metallidurans</i>	30 %
Gabelli, 2001	<i>Escherichia Coli</i>	5 %
Gabelli, 2001	<i>Ralstonia metallidurans</i>	40 %
Al-Tahhan <i>et al.</i> , 2000	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	10-30 %
Chavant <i>et al.</i> , 2002	<i>Listeria monocytogenes</i> <sup>a</sup>	43-63 %

<sup>a</sup>à 20°C en phase stationnaire

### c) Valeurs et facteurs de variabilité

La présence de plasmides, les conditions de croissance (Onaolapo et Klemperer, 1986), le pH, la température (Chavant *et al.*, 2002), la force ionique (Knox *et al.*, 1985) peuvent affecter l'hydrophobie d'une cellule. Une diminution du coefficient de partage hexadécane/eau pour *Escherichia Coli* et *Ralstonia metallidurans* lors d'ajouts de chlorure de sodium ou de métaux lourds est constatée (Guiné, 2002). Une augmentation de l'hydrophobie d'une cellule à Gram négatif en présence d'un biosurfactant a été mise en évidence (Al-Tahhan *et al.*, 2000).

Des études utilisant la méthode d'adhésion à l'hexadécane ont permis d'obtenir les résultats du tableau 2.2. L'adhésion est définie par le pourcentage de cellules ayant adhéré à l'hydrocarbure.

### 2.2.3 Structure des surfaces bactériennes

La surface bactérienne présente une grande hétérogénéité chimique (Plette *et al.*, 1996). L'utilisation de la spectroscopie infra rouge a mis en évidence la présence, dans les surfaces microbiennes, d'une grande variété de groupements fonctionnels : aldehydes (RCOH), cétone (RCOR), carboxyles (RCOOH), carbonyles ( $\text{CH}_3\text{CO}^-$ ), liaison peptide ( $-\text{CONH}^-$ ), éthers ( $-\text{CH}_2\text{O}-$ ,  $\text{CH}_3-\text{O}-$ ,  $-\text{C}-\text{O}-\text{C}-$ ), éthényles ( $-\text{CH}=\text{CH}-$ ,  $-\text{C}=\text{CH}_2$ ,  $-\text{CH}=\text{CH}_2$ ), ainsi que hydrogènes ( $\text{H}^+$ ) et hydroxyles ( $\text{OH}^-$ ) (Strevett et Chen, 2003).

Les parois des cellules à Gram positif sont constituées de polymères linéaires de peptidoglycane liés ensemble de façon covalente autour de la membrane cellulaire (Kelly *et al.*, 2002). Le peptidoglycane forme une macromolécule géante riche en groupes fonctionnels carboxyle et hydroxyle (Kelly *et al.*, 2002). La présence de ces groupes acides, surtout carboxyliques, confère à la surface une charge très dépendante du pH et de la force

ionique (Plette *et al.*, 1996). Les parois bactériennes sont aussi composées de polymères secondaires, les acides teichoïques, ayant des groupes fonctionnels phosphates (Beveridge et Murray, 1980).

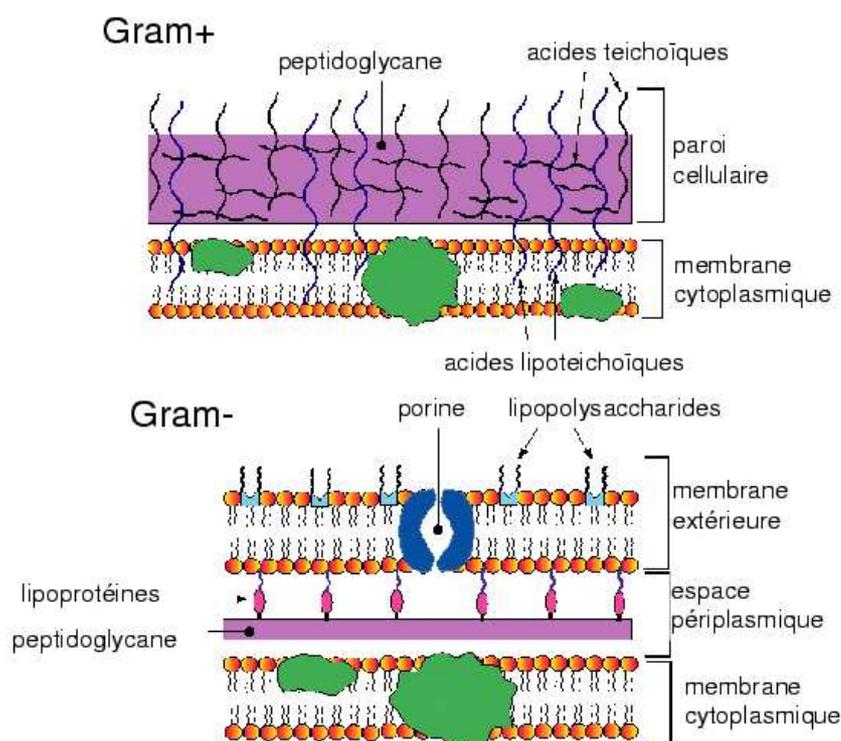


FIG. 2.6 – Structure des bactéries à Gram positif et négatif : représentation schématique (McKenna et Mondal, 1997)

Pour deux espèces à Gram positif (Daughney *et al.*, 1998), *Bacillus licheniformis* et *Bacillus subtilis*, les groupes fonctionnels<sup>8</sup> considérés sont les fonctions carboxyle, phosphate et hydroxyle. Les groupes amines sont positivement chargés sur toute la gamme de pH et on ne s'attend donc pas à ce qu'ils soient mis en jeu dans les réactions avec les cations métalliques divalents (Plette *et al.*, 1996).

Toutes les bactéries à Gram positif semblent avoir un comportement assez proches (Fein, 2000). Par contre, à cause de la nature plus complexe de leur paroi cellulaire, les bactéries à Gram négatif peuvent présenter un comportement d'adsorption plus complexe (Fein, 2000).

<sup>8</sup>Les surfaces présentent des groupes fonctionnels avec lesquels elles interagissent avec les éléments en solution ou les autres surfaces.

Pour les cellules à Gram négatif, une membrane extérieure lipopolysaccharidique entoure une fine paroi bactérienne, elle-même entourant une membrane plasmique interne (Nealson et Stahl, 1997).

Des variations importantes des concentrations absolues et relatives des groupes fonctionnels peuvent apparaître qui ne sont pas dues aux conditions de croissance ni à des effets osmotiques, ni à des effets aux pH extrêmes mais à des variations dans la structure même de la paroi cellulaire, notamment par la formation de spores (Daughney *et al.*, 1998).

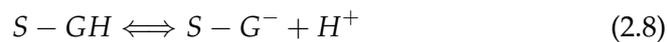
#### 2.2.4 Déprotonation des groupes fonctionnels

Les cellules bactériennes présentent une forte affinité pour les cations (Fein *et al.*, 1997; Beveridge et Murray, 1980). Cette capacité peut jouer un rôle majeur dans plusieurs processus géochimiques dont le transfert des contaminants en particulier métalliques (Corapcioglu et Kim, 1995).

Plus précisément ce sont les parois des cellules, qu'elles soient à Gram positif ou à Gram négatif, qui contiennent différents groupes fonctionnels organiques de surface. Et ce sont ces groupes fonctionnels qui présentent des affinités électrostatique, chimique et hydrophobe pour les métaux solubles, mais aussi les molécules organiques dissoutes et les surfaces minérales (Fein, 2000; Beveridge *et al.*, 1982; Beveridge et Murray, 1980).

Les parois des cellules bactériennes ne sont pas chargées à de faibles pH ( $\text{pH} < 2$ ) puis deviennent de plus en plus chargées négativement quand le pH augmente, par la déprotonation des groupes fonctionnels organiques de surface (Wightman *et al.*, 2001).

Pour chaque groupe fonctionnel  $G$  de la surface bactérienne  $S$ , la déprotonation peut être décrite par l'équilibre suivant (Daughney *et al.*, 1998) :



avec la constante de la réaction définie par :

$$K = \frac{[S - G^-] a_{H^+}}{[S - GH]} \quad (2.9)$$

où  $a$  est l'activité et  $[ ]$  représente la concentration des espèces de surface en moles par kg de solution.

La déprotonation des sites de surface est une réaction rapide, complètement réversible, qui ne dépend pas de la température jusqu'à au moins 75 ° (Wightman *et al.*, 2001).

Les groupes fonctionnels des bactéries sont isolés de sorte que la déprotonation de l'un des groupes fonctionnels n'est pas affectée par celle des autres. Le comportement acido-basique de chaque groupe fonctionnel peut être modélisé avec succès par une seule constante de déprotonation (Wightman *et al.*, 2001).

Des valeurs de constantes de déprotonation pour différentes cellules sont présentées dans le tableau 2.3. Chronologiquement, les premières études portaient surtout sur des organismes à Gram positif (*Rhodococcus erythropolis*, *Bacillus subtilis* et *licheniformis*, TOR39). Quelques études s'intéressent aux bactéries à Gram négatif dont la structure est plus complexe (*Shewanella putrefaciens*, *Enterobacteriaceae* et *Klebsiella pneumonia*). Elles sont pour la plupart obtenues en réalisant des titrations de surface et parfois en couplant des analyses EXAFS. Plusieurs modèles ont été utilisés pour obtenir les valeurs de pK à partir des résultats expérimentaux. D'un côté Fein *et al.*, 1997; Daughney *et al.*, 1998; Haas *et al.*, 2001; Ngwenya *et al.*, 2003, ont interprété les titrations à l'aide de modèles électrostatiques de complexation de surface. Une autre approche consiste à utiliser un système de programmation linéaire (Cox *et al.*, 1999; Sokolov *et al.*, 2001). Il semble que le choix du modèle soit déterminant puisque l'utilisation du modèle LPM conduit dans les deux cas à la détermination de 5 sites réactifs alors que le précédent permet d'identifier 3 sites. Daughney et Fein, 1998, proposent la comparaison du modèle à capacitance constante et du modèle à double couche. Le modèle à triple couche, qui reste pourtant le plus pertinent, n'est pas utilisé car les titrations seules ne permettraient pas de le contraindre suffisamment pour identifier les différents paramètres.

Les valeurs de constantes de déprotonation couramment rapportées pour les groupements carboxyles sont entre 4 et 6. Pour les groupes hydroxyles elles se situent entre 9 et 11, et autour de 6 pour les phosphates (Fein *et al.*, 1997). Quelques études font état d'un ou deux autres groupes fonctionnels (Cox *et al.*, 1999; Borrok *et al.*, 2004).

Sans fixer précisément de valeur, certains auteurs suggèrent que pour une cellule bactérienne, il est fréquent que la valeur de pK la plus faible corresponde à un site carboxyle, le deuxième à un site phosphate, le troisième à un site hydroxyle (Wightman *et al.*, 2001).

### 2.2.5 Géométrie des cellules bactériennes

#### a) Géométrie

Pour déterminer une répartition surfacique des groupes fonctionnels, les propriétés géométriques des cellules doivent être prises en compte. Dans une première approche, certaines bactéries sont considérées comme des bâtonnets. Plusieurs exemples sont donnés dans le tableau 2.4. Toutefois l'aspect fractal est alors complètement mis de côté. L'aspect irrégulier et fragmenté n'est pas pris en compte. Ceci entraîne d'importantes sous estimations des surfaces pouvant être mises en jeu.

TAB. 2.3 – Valeurs des constantes des réactions de déprotonation et concentrations des groupes fonctionnels pour des cultures en milieu liquide

Référence Bactérie	pK	Groupe Fonctionnel	Concentration de sites en 10 <sup>-5</sup> moles/g de bactérie
Goncalves <i>et al.</i> , 1987 <i>Klesbsiella pneumonia</i>	4,7 7,8 7,8	non déterminé	non calculé
Plette <i>et al.</i> , 1996 <i>Rhodococcus erythopolis</i>	4,62 ± 0,02 7,83 ± 0,1 9,96 ± 0,1	non déterminé	50,3 ± 1,5 19,3
Fein <i>et al.</i> , 1997 <i>Bacillus subtilis</i>	4,8 ± 0,1 6,9 ± 0,3 9,4 ± 0,3	carboxyle phosphate hydroxyle	12 ± 1,0 4,4 ± 0,2 6,2 ± 0,2
Daughney <i>et al.</i> , 1998 <i>Bacillus Licheniformis</i>	5,2 ± 0,3 7,5 ± 0,4 10,2 ± 0,5	carboxyle phosphate hydroxyle ou amine	8,87 ± 3,8 8,34 ± 4,6 12,4 ± 0,7
Daughney et Fein, 1998 <i>Bacillus subtilis</i>	4,7 ± 0,4 6,2 ± 0,6 9,8 ± 0,8	non déterminé	7 ± 2 10 ± 4 54 ± 42
Daughney et Fein, 1998 <i>Bacillus subtilis</i>	4,8 ± 0,1 6,6 ± 0,4 8,8 ± 1,0	non déterminé	9 ± 5 6 ± 2 15 ± 3
Cox <i>et al.</i> , 1999 <i>Bacillus subtilis</i>	5,17 ± 0,01 5,88 ± 0,01 6,91 ± 0,05 7,88 ± 0,04 9,24 ± 0,07	carboxyle carboxyle phosphorique phénol ou amine phénol ou amine	17 ± 4 5 ± 5 5 ± 2 1 ± 1 12 ± 1
Wightman <i>et al.</i> , 2001 <i>Bacillus subtilis</i>	4,4 ± 0,7 6,1 ± 0,8 8,3 ± 0,6	carboxyle phosphate hydroxyle	9,5 ± 0,3 10 ± 0,3 8,8 ± 0,1
Wightman <i>et al.</i> , 2001 TOR-39	4,5 ± 0,2 5,8 ± 0,1 8,2 ± 0,1	carboxyle phosphate hydroxyle	6 ± 2 5 ± 1 3 ± 1
Haas <i>et al.</i> , 2001 <i>Shewanella putrefaciens</i>	5,16 ± 0,04 7,22 ± 0,15 10,04 ± 0,67	carboxyle phosphate hydroxyle	3,17 0,895 3,8
Sokolov <i>et al.</i> , 2001 <i>Shewanella putrefaciens</i>	3,72 ± 0,06 4,95 ± 0,02 6,64 ± 0,5 8,83 ± 0,02 9,99 ± 0,01	phosphodiester carboxyle/phosphoryle phosphoryle amine amine/hydroxyle	0,29 ± 0,18 0,45 ± 0,07 0,28 ± 0,06 0,10 ± 0,05 0,65 ± 0,36
Ngwenya <i>et al.</i> , 2003 <i>Entorobacteriaceae</i>	4,3 ± 0,2 6,9 ± 0,5 8,9 ± 0,5	carboxyle phosphate hydroxyle	50 ± 7 22 ± 6 55 ± 22

TAB. 2.4 – Géométrie des cellules et surface spécifique

Bactérie	Dimensions	Masse g/cellule	Surface m <sup>2</sup> /g de cellule
	Goncalves <i>et al.</i> , 1987		
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	L=4,18 μm	1,45*10 <sup>-13</sup>	170
	Xue <i>et al.</i> , 1988		
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>		1,45*10 <sup>-13</sup>	
	Fein <i>et al.</i> , 1997		
<i>Bacillus subtilis</i>	L=5 μm l=1 μm	2,5*10 <sup>-13</sup>	140 à 290
	Hébrard-Labit, 1998		
<i>Pseudomonas putida</i>	L=1,5 à 4 μm l=0,5 à 1 μm		
	Haas <i>et al.</i> , 2001 et Haas, 2004		
<i>Shewanella putrefaciens</i>	L= 1,92 ± 0,32 μm l= 0,38 ± 0,09 μm	1,4*10 <sup>-13</sup>	55

#### b) Dimension fractale

La dimension fractale est une indication de l'aspect déchiqueté du contour des microcolonies des biofilms (Jackson *et al.*, 2001). Au plus la dimension fractale est élevée, au plus le contour est irrégulier. Or l'irrégularité du contour augmente la surface spécifique, permettant d'accroître les interactions avec le fluide alentour. La dimension fractale peut être vue comme un outil pour l'analyse morphologique des structures des biofilms. Cependant, il faut garder à l'esprit que la dimension fractale n'est pas une caractéristique unique et que deux objets totalement différents peuvent avoir la même dimension fractale (Jackson *et al.*, 2001).

La théorie des fractales est la géométrie du fractionnement de la matière. Cette géométrie caractérise à la fois les formes extrêmement contournées et fractionnées des objets vivants et leur interpénétration mutuelle rendue possible par ces formes, et grâce à laquelle des flux suffisants de matière, d'énergie et d'information sont assurés (Dajoz, 2000).

Pour un objet fractal, une dimension intermédiaire, donc non entière est définie, qui décrit un degré d'occupation situé entre deux espaces de dimensions entières. Par exemple Lambert *et al.*, 2003, trouvent, pour des agrégats d'*Escherichia Coli*, une dimension fractale comprise entre 1,9 et 2,2.

La description des agrégats a été largement améliorée par l'introduction de la notion de géométrie fractale (Thill *et al.*, 1999) mais la difficulté demeure d'obtenir la dimension fractale de ces agrégats. La plupart des méthodes étaient indirectes, à partir des caractéristiques géométriques, et

fastidieuses. De plus de nombreuses hypothèses devaient être formulées et cette méthode était particulièrement inadaptée pour les gros agrégats fragiles, du type des floccs bactériens.

La microscopie confocale permet d'obtenir des informations sur la structure des agrégats et leur dimension fractale (Thill *et al.*, 2001; Lambert *et al.*, 2000). En effet, la compacité d'un flocc correspond à l'arrangement tridimensionnel des particules entre elles. Et cet arrangement peut être visualisé par microscopie confocale sans séchage de l'échantillon. La microscopie confocale est une puissante technique qui permet d'utiliser un pouvoir séparateur autrement plus grand que celui offert par la microscopie optique classique. Elle permet également la création d'images tridimensionnelles des cellules et de leurs fractions infracellulaires. Contrairement à la microscopie électronique, cette technique peut être utilisée sur des cellules ou des tissus vivants (National Research Council Canada, 2004).

## 2.3 Transport des colloïdes (dont les bactéries)

### 2.3.1 Définition : les colloïdes

Les colloïdes sont souvent définis dans la littérature par leur taille (Maréchal, 1996; McCarthy et Zachara, 1989; Sposito, 1984) même si parfois leurs propriétés chimiques sont également invoquées (Maréchal, 1996). Il est ainsi convenu que les colloïdes sont d'une taille comprise entre 1 nm et 1  $\mu\text{m}$  (Mills *et al.*, 1991) et certains auteurs estiment cette limite jusqu'à 10  $\mu\text{m}$  (Baumann *et al.*, 2002). Ces limites, variables selon les auteurs, se justifient par le fait que les particules plus petites n'ont pas une telle réactivité et les plus grosses vont sédimenter trop rapidement. Une étude sur des microsphères de latex a mis en évidence un diamètre optimal pour le transport des microsphères de 0,5  $\mu\text{m}$  (Cumbie et McKay, 1999). Les particules plus petites diffuseraient davantage, et les plus grandes seraient retenues par sédimentation ou filtration (Cumbie et McKay, 1999). Wieland *et al.*, 2004, ajoutent également un critère de densité, qu'il fixe autour de 2  $\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$  pour les particules colloïdales.

Les particules solides que sont les colloïdes se caractérisent par une très faible solubilité dans l'eau (Sposito, 1989) et en général possèdent une grande surface spécifique de l'ordre de 1000  $\text{m}^2/\text{g}$  pour les plus petites particules (Noell *et al.*, 1998). Les colloïdes ne sédimenteront pas par eux-mêmes (leur vitesse de sédimentation est inférieure à  $10^{-2} \text{cm}\cdot\text{s}^{-1}$  (Sigg *et al.*, 2000)) mais peuvent se regrouper en agrégats qui, eux, sédimenteront. En pratique, la prise en compte du transport colloïdal revient à considérer une nouvelle phase : la matrice solide, la phase gazeuse, la phase liquide et la phase colloïdale (Corapcioglu et Jiang, 1993; Choi et Corapcioglu, 1997).

Les bactéries, les fragments de biofilm entrent donc dans le cadre de cette définition même si on peut s'attendre à ce que certains fragments de

biofilms soient de taille importante.

La principale source de colloïdes dans le sol sont les colloïdes initialement présents dans la matrice et qui peuvent être mobilisés (Baumann *et al.*, 2002). Dans les eaux souterraines on trouve  $10^6$  à  $10^{12}$  particules colloïdales par litre (Baumann *et al.*, 2002; Stumm, 1992). Dans une expérience de déstabilisation, Grolimund et Borkovec, 1999, trouvent de 20 à 30 mg/mL de colloïdes dans l'effluent des colonnes. En fonction des paramètres initiaux (teneur en eau, force ionique, pH), la concentration de particules colloïdales naturelles mobilisées varie de 1 à 4 mg/mL (Rousseau, 2003).

### 2.3.2 Mise en évidence du transport colloïdal

Beaucoup d'études ont porté sur le transport de particules colloïdales minérales. Il est nécessaire de s'y intéresser car elles apportent nombre d'éléments importants qui pourront être, sous réserve de quelques hypothèses, utilisés dans le cadre de colloïdes biologiques.

#### a) *Le transport des métaux dans les milieux poreux*

*NB : Il existe quantité de travaux sur le sujet et l'objet de ce paragraphe n'est en aucun cas d'en faire la synthèse mais seulement de donner les quelques éléments clés qui seront utiles à la lecture de ce document.*

Le transfert des métaux lourds dans les sols résulte du couplage entre trois composantes : le transport aqueux, le transport particulaire et enfin les mécanismes de rétention (Yong *et al.*, 1992) (voir figure 2.7). Le transport aqueux des solutés et des métaux lourds dissous résulte de l'advection et de la dispersion hydrodynamique. La rétention représente plusieurs mécanismes physicochimiques qui lient les métaux lourds à la matrice solide : la précipitation, la coprécipitation, l'échange ionique, la complexation de surface (Yong *et al.*, 1992; Stumm, 1992). Le transport particulaire correspond au processus de transport des métaux lourds par les particules mobiles du sol et est davantage développé dans la partie suivante.

Différentes approches existent pour évaluer la mobilité des métaux. Certaines la caractérisent par un coefficient de distribution entre phases solide et soluble (Anderson et Christensen, 1988), d'autres étudient la distribution des métaux entre différentes phases, caractérisant ainsi leur mobilité potentielle, (Asami *et al.*, 1995). La prise en compte de certains facteurs s'avère nécessaire car ils influencent directement le transport des métaux. Bar-Yosef, 1979, et Ma et Liu, 1997, ont considéré le rôle du pH sur l'adsorption du zinc. Une forte concentration en ions chlorure favorise la mobilité de certains métaux (Lumsdon *et al.*, 1995). La teneur en argile des sols va également modifier la rétention des métaux (Sidhu *et al.*, 1977).

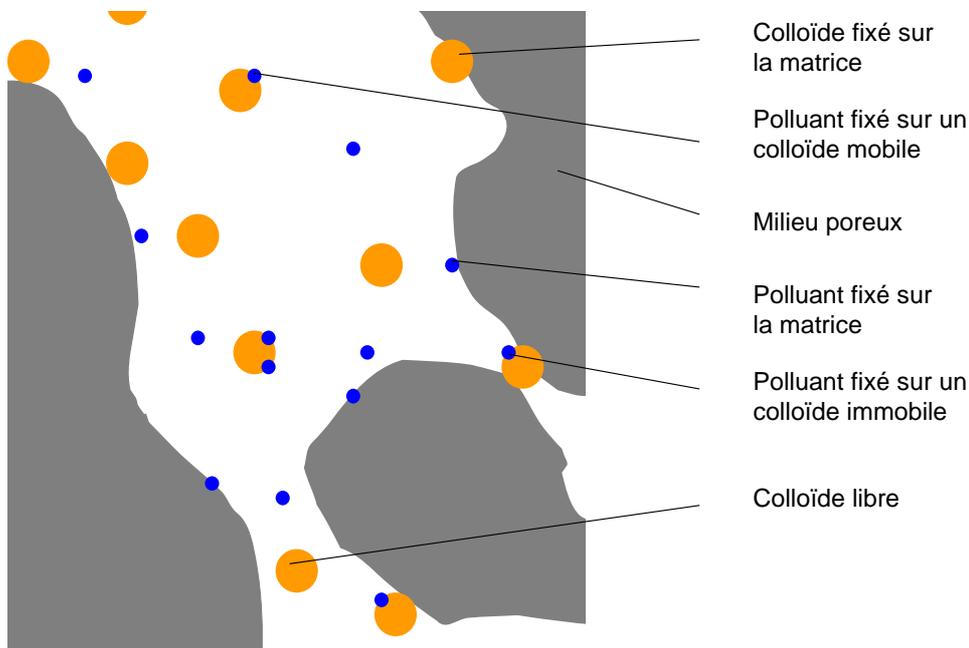


FIG. 2.7 – Les différentes formes de transport et de rétention des polluants en milieu poreux en présence de colloïdes

b) *Rôle des colloïdes*

En dépit de leur faible proportion en masse, les colloïdes jouent un rôle important dans la circulation des polluants (Maréchal, 1996). La non-consideration du rôle joué par les colloïdes dans le transport de contaminants peut entraîner d'importantes sous-estimations des distances parcourues par les contaminants (McCarthy et Zachara, 1989). Le transport colloïdal semble être la forme de transport prédominante pour un contaminant fortement adsorbé sur les colloïdes (Grolimund *et al.*, 1996). De plus l'importance à accorder à certains colloïdes provient aussi du fait qu'ils peuvent à la fois être considérés comme des contaminants et servir de vecteurs au transport d'autres contaminants (Wan et Tokunaga, 1997). La diffusion très limitée des colloïdes dans la matrice solide leur permet d'être très mobiles dans le sens de l'écoulement (Niehren et Kinzelbach, 1998).

Comprendre le transport et le dépôt des colloïdes est nécessaire pour de nombreuses applications dans le milieu souterrain et en particulier la prédiction du transport facilité des contaminants (Camesano *et al.*, 1999). Depuis les années 80 de nombreux auteurs ont cherché à évaluer le rôle du transport colloïdal sur le mouvement des métaux dans le milieu souterrain (Mills *et al.*, 1991).

### 2.3.3 Paramètres modifiant le transport des colloïdes

Burns, 1980, rappellent que les microorganismes sont soumis à tous les paramètres physicochimiques de leur environnement dont les gradients de force ionique.

Trois types de paramètres peuvent contrôler le transport et la capture des colloïdes :

- mécaniques (taille des particules, flux)
- physicochimiques (force ionique, pH, nature des ions, des colloïdes, du milieu poreux)
- autres tels que la concentration des particules

(Harmand, 1996; Baumann *et al.*, 2002).

La description du rôle des paramètres physicochimiques sur la stabilité des colloïdes a fait l'objet du paragraphe 2.1.2.

## 2.4 Métaux et microorganismes : rétention et transport

### 2.4.1 Mise en évidence

Beaucoup d'études ont porté sur les interactions métaux-bactéries pour des questions de dépollution des eaux ou de collecte de métaux précieux pour lesquelles la nécessité est d'avoir des espèces avec une haute sélectivité ou une grande capacité de rétention (Ledin *et al.*, 1997). La capacité de rétention par ces organismes a attiré l'attention de par son potentiel à répondre à la demande de remédiation des eaux polluées par les métaux notamment (Chang *et al.*, 1997). En comparaison avec des sédiments, un biofilm bactérien peut contenir une importante quantité de zinc et de cuivre et les biofilms ont donc montré leur rôle actif dans la sorption, la désorption et la biotransformation de certains polluants (Schorer et Eisele, 1997).

### 2.4.2 Mécanismes

La rétention des métaux par les microorganismes est couramment regroupée en trois catégories : liaison à la surface des cellules, accumulation intracellulaire, accumulation extracellulaire (Chang *et al.*, 1997). Elle se fait par trois processus simultanément : l'ionisation de surface, la formation de complexes et la formation d'une double couche électrostatique adjacente aux surfaces.

L'association des métaux peut se produire avec des cellules inactives ou au repos (Chen et Yiacoumi, 1997; Chang *et al.*, 1997). Ce ne sont pas seulement les cellules qui sont impliquées dans les interactions avec les cations métalliques mais aussi les polymères extracellulaires qui, comme dans l'étude de Chen *et al.*, 1995, s'avèrent même avoir un rôle prépondérant. En effet, les polymères extracellulaires peuvent agir comme un ligand dissous qui retient les métaux traces et vont altérer les caractéristiques de

sorption des surfaces (Lion *et al.*, 1990; Chen *et al.*, 1995). D'autres études mettent au contraire en évidence la prépondérance des cellules dans ces phénomènes (Wuertz *et al.*, 2001).

La biosorption est un phénomène très rapide, dont l'équilibre s'atteint en quelques secondes (Tsezos, 1985).

### 2.4.3 Localisation

Il existe une localisation préférentielle pour chaque métal, par rapport aux différentes parties de la cellule bactérienne (Tsezos et Remoudaki, 1997).

Par exemple, la biosorption de l'uranium et du thorium est surtout due à la paroi de la cellule bactérienne (Tsezos, 1985).

### 2.4.4 Facteurs

Il semble tout d'abord que la capacité de biosorption d'un métal dépende davantage du métal que de l'espèce considérée (Tsezos et Remoudaki, 1997).

La biosorption dépend fortement du pH. Quand le pH de la solution s'élève, la rétention du métal augmente (Chen et Yiacoumi, 1997; Daughney et Fein, 1998; Hébrard et Delolme, 1999); quand la concentration de l'ion métallique augmente, l'influence du pH est davantage sensible. Deux sites de rétention différents seraient donc mobilisés dans la rétention des cations métalliques : les premiers indépendants du pH, ont une grande affinité et une moindre disponibilité que les seconds, qui sont eux, davantage dépendants du pH (Chen et Yiacoumi, 1997).

La force ionique joue également un rôle important dans la biosorption des ions métalliques. Il n'y aurait pas d'influence significative de la force ionique jusqu'à une force ionique de  $10^{-3}$  puis la biosorption diminue quand la force ionique dépasse  $10^{-2}$ , ce qui indique que l'attraction électrostatique joue un rôle important dans l'enlèvement des ions métalliques par les biosorbants (Chen et Yiacoumi, 1997). Pour une faible force ionique, le champ électrique autour de la particule est étendu et la double couche épaisse. Une force ionique plus élevée provoque un amincissement de la double couche. Pour s'en affranchir certains auteurs fixent la force ionique : par exemple Fein *et al.*, 1997, et Daughney *et al.*, 1998, utilisent une force ionique constante de 0,1 mol/L dans leurs études.

Ensuite, Kanazawa et Mori, 1996, ont montré qu'au plus une cellule est résistante, au moins elle adsorbe et retient le cadmium. D'autre part la présence du zinc va remarquablement inhiber la biosorption du cadmium. Enfin la taille du biosorbant semble jouer un rôle important : lorsque sa taille augmente, le taux de biosorption diminue (Chen et Yiacoumi, 1997).

### 2.4.5 Modélisation

#### a) Rétention des métaux

Les interactions entre métaux traces et organismes vivants peuvent être compris en considérant qu'un organisme est l'assemblage de ligands réactifs (Plette *et al.*, 1996) et qu'ainsi l'adsorption métal-bactérie peut mettre en jeu plusieurs groupes fonctionnels (Fein, 2000).

On décrit les interactions entre les groupes fonctionnels et les cations comme des équilibres thermodynamiques (Fein *et al.*, 1997) régis par les équations suivantes, avec M le métal qui va être retenu par la surface S, par l'intermédiaire du groupe fonctionnel G :



La constante d'équilibre de cette réaction est définie par

$$K = \frac{[S - GM^{m-1}]}{[S - G^{-}]a_{M^m}} \quad (2.11)$$

D'autre part les surfaces bactériennes sont chargées et créent un champ électrique (Fein *et al.*, 1997). L'interaction électrostatique en résultant, entre le champ électrique et les ions peut être prise en compte dans l'expression de la constante d'équilibre de la réaction mettant en jeu les sites de surface (Stumm et Morgan, 1976).

#### b) Transport des contaminants associé aux colloïdes

Corapcioglu et Kim, 1995, proposent un modèle pour expliquer que les bactéries peuvent favoriser le transport de polluants en diminuant le facteur de retard des contaminants. Il s'agirait du premier modèle mettant en jeu dans les mécanismes de transport la phase dite "bactérienne", en plus des phases liquide et solide.

Pour que les colloïdes puissent avoir une influence sur la transport de certains polluants, plusieurs conditions sont nécessaires (Wieland *et al.*, 2004) :

- que les colloïdes soient présents en conditions suffisantes ;
- que les polluants s'associent avec les colloïdes ;
- que les colloïdes, associés aux polluants, soient en mouvement.

## 2.5 Synthèse de la revue de la littérature

Les biofilms sont la forme prépondérante des bactéries dans les milieux poreux réels. Ils sont constitués de cellules et de polymères exo-cellulaires. Ces EPS sont susceptibles de jouer un rôle important, en particulier dans la réactivité des biofilms envers les polluants.

La structure, la géométrie et la composition des parois bactériennes va déterminer certaines caractéristiques des cellules, et par exemple, leur affinité pour certains polluants.

La stabilité de ces biofilms est influencée par des paramètres physico-chimiques tels que la force ionique, mais aussi par la présence de certains cations. Des modèles (DLVO, échange cationique) permettent de décrire les interactions entre particules et le rôle de ces facteurs.

Les études qui ont porté sur le transport des colloïdes ont mis en évidence le rôle de certains paramètres physico-chimiques. De même, des modèles permettent une première description des interactions entre métaux et microorganismes. Il sera nécessaire de les considérer dans les phénomènes de transport colloïdal de ces métaux.



## Chapitre 3

# Matériel et méthodes

*Ce chapitre a pour objectif de présenter les travaux expérimentaux qui ont été menés. Pour cela une brève première partie précise les grandes lignes directrices des expériences et le plan expérimental suivi. Puis sont présentés les matériels employés, les méthodes mises en oeuvre et les analyses réalisées ainsi que la manière dont les données ont été analysées.*

### 3.1 Plan expérimental

Les figures 3.1 et 3.2 proposent une synthèse du plan expérimental adopté.

Les expériences sont articulées autour des essais en colonnes de sable : essais de déstabilisation du biofilm et essais de transport du zinc. Des allers-retours permanents entre les étapes de caractérisation et les essais colonnes étaient nécessaires. Des essais préliminaires de mise en place des colonnes ont été réalisés : ils ne sont pas développés ici.

Deux types d'échantillons ont été étudiés : les cellules planctoniques de *Pseudomonas putida* obtenues en culture liquide, et les fragments de biofilm décrochés lors des essais en colonnes. Ces derniers sont collectés dans l'effluent des colonnes. Il peut aussi dans certains cas s'agir d'échantillons de sable colonisés par le biofilm bactérien.

La caractérisation a consisté en l'étude de différentes propriétés, à la fois géométriques et surfaciques. La figure 3.2 présente plus en détails cette étape de caractérisation.

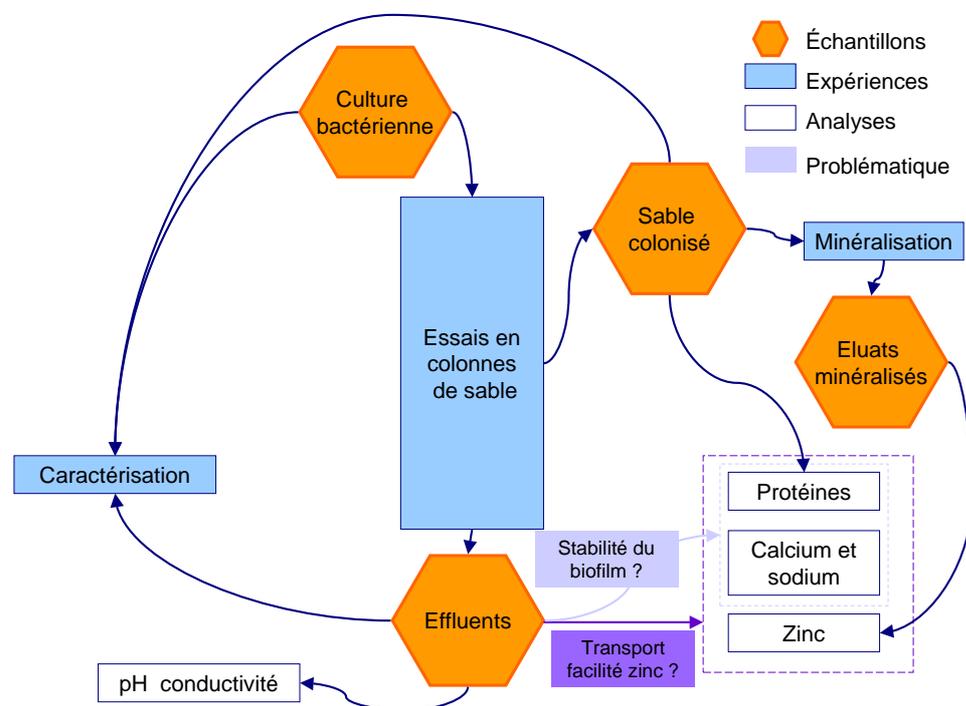


FIG. 3.1 – Plan expérimental : en complément des essais de déstabilisation et de transport en colonnes de sable, une partie caractérisation a été menée, en parallèle sur des échantillons de biofilm et des cultures bactériennes.

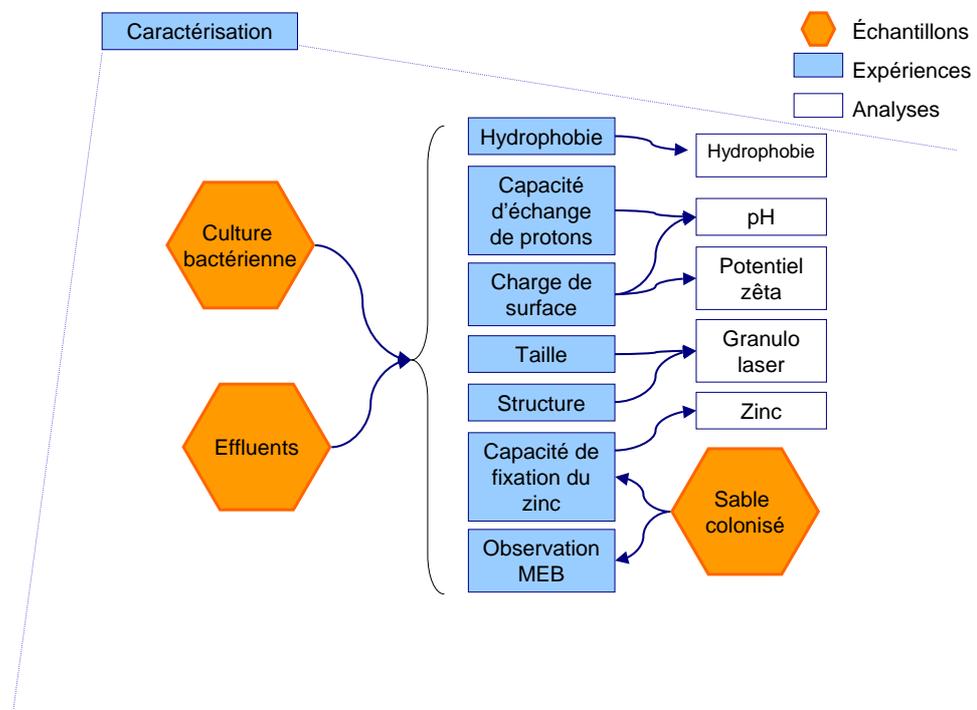


FIG. 3.2 – Plan expérimental : détail de la partie caractérisation

## 3.2 Matériel

### 3.2.1 Les colloïdes bactériens

#### a) *Pseudomonas putida*

La souche bactérienne utilisée, *Pseudomonas putida*, est une bactérie commune des sols et des milieux aquatiques (Pardo et Guadalix, 1996), déjà utilisée dans les travaux de thèse d'Hébrard-Labit, 1998.

Elle se trouve également dans les eaux douces et environnements marins où son activité est importante dans les processus de minéralisation de la matière organique (Hébrard-Labit, 1998).

La survie des bactéries est plus élevée lorsqu'elles sont introduites en fin de phase exponentielle (Vandenhove *et al.*, 1991).

TAB. 3.1 – *Pseudomonas putida* au microscope (SCIMAT, 2003) et sur boîte de Pétri



#### b) Principales caractéristiques

Une revue de la littérature sur *Pseudomonas putida* a été réalisée par Hébrard-Labit, 1998. Nous présentons ici seulement les caractères les plus significatifs, issus de ces travaux et de Todar, 2004. Les *Pseudomonas putida* présentent en général les caractéristiques suivantes :

- bâtonnets de 0,7-1,1 sur 2,0 à 4,0  $\mu\text{m}$  (figure 3.1)
- à Gram négatif et ne sporulent pas
- métabolisme énergétique purement respiratoire
- organismes aérobies strictes
- pas de facteurs de croissance particulier (besoins de carbone et également d'azote et de phosphore)
- croissance de 4 à 43°C (optimum autour de 30°C)
- croissance préférentielle proche de la neutralité (pH 6,8)
- résistantes aux métaux lourds, elles sont connues pour les accumuler (Ledin *et al.*, 1996)

### 3.2.2 Le métal : le zinc

#### a) Les métaux lourds dans les eaux de ruissellement

L'intérêt porté aux métaux lourds dans les eaux de ruissellement est justifié par leur ubiquité, leur toxicité et du fait qu'ils ne peuvent pas être chimiquement transformés ou détruits (Davis *et al.*, 2001; Pardo *et al.*, 2003). Parmi eux, le zinc, le plomb et le cuivre sont les plus souvent détectés dans les eaux de ruissellement (Legret et Pagotto, 1999; Burton et Pitt, 2002). Wigington Jr. *et al.*, 1983, identifient le plomb et le zinc comme les métaux les plus abondants dans les bassins d'infiltration étudiés. Dans un classement des métaux trouvés dans les eaux pluviales (Pitt *et al.*, 1999), le zinc et le nickel présentent un fort potentiel de contamination pour les eaux souterraines dans le cas d'un scénario d'infiltration.

#### b) Origine du zinc

Les principales sources du zinc dans les eaux de ruissellement de chaussées sont l'usure des pneus et des freins des véhicules et la corrosion des barrières de sécurité galvanisées (Legret et Pagotto, 1999; Wigington Jr. *et al.*, 1983), ainsi que le parement des bâtiments (briques, béton, peinture) (Davis *et al.*, 2001; Karlén *et al.*, 2001). Contrairement à d'autres métaux, le dépôt atmosphérique reste faible pour le zinc (Davis *et al.*, 2001).

Les quantités de zinc susceptibles d'être rencontrées dans les eaux de ruissellement ou les sols de bassins d'infiltration sont mentionnées dans la section 1.1.2.a.

#### c) Caractéristiques du zinc

$\alpha$ ) Mobilité et rétention. — Les sites du sol mis en jeu pour la rétention du zinc sont distincts de ceux d'autres métaux (Anderson et Christensen, 1988; Harter, 1983) pourtant certains auteurs mettent en évidence des phénomènes de compétition entre les cations métalliques (Kuo et Baker, 1980).

Le rôle du pH sur la rétention des métaux est très largement documenté (Lumsdon *et al.*, 1995; Harter, 1983; McBride et Blasiak, 1979). D'autres études ont également montré le rôle de la force ionique et de la composition électrolytique de la solution sur la fixation du zinc sur les sols (Pardo et Guadalix, 1996; Lumsdon *et al.*, 1995).

La mobilité du zinc dans les sols augmente fortement lorsque le pH diminue (Anderson et Christensen, 1988; Farrah et Pickering, 1976). La température favorise la rétention du zinc (Ma et Liu, 1997) Le zinc est d'ailleurs connu pour son importante solubilité (Wigington Jr. *et al.*, 1983). Plusieurs études sur la spéciation du zinc (Chlopecka *et al.*, 1996; Janssen *et al.*, 1997) ont montré une grande affinité pour les oxydes (McBride et Blasiak, 1979), et moindre pour les carbonates et la matière organique.

Smolders *et al.*, 2001, ont mis en évidence la cinétique très lente des mécanismes d'adsorption du zinc sur les sols.

Les espèces solubles et minérales de zinc recensées par Février, 2001, sont présentées en annexe A.3.

$\beta$ ) Toxicité. — En général, les métaux ont une influence sur les microorganismes en affectant leur croissance et leur activité (Sandaa *et al.*, 2001). Une surcharge du sol en métaux lourds semble non seulement réduire le nombre de microorganismes, mais encore entraîner une sélection parmi ceux-ci, réduisant ainsi le spectre des espèces (Walter et Stadelmann, 1979). Une revue des mécanismes mobilisés par les bactéries pour réagir à la présence de métaux est proposée par Van der Lelie et Tibazarwa, 2001.

Certains métaux sont tolérés à hautes doses car ils sont (bio)chimiquement non-réactifs alors que la majorité présente une certaine toxicité au-delà de certains seuils de concentration (Silver, 1996).

Les effets du zinc sur l'environnement ont fait l'objet de débats sérieux parmi les législateurs et les organisations environnementales en Europe, pendant les années 1990 (Karlén *et al.*, 2001). Walter et Stadelmann, 1979, ont retenu pour une étude le Zn et le Cd car ces métaux sont connus pour être toxiques pour les microorganismes. Cependant, ils notent que la contamination du sol d'essai par 288 ppm de Zn n'a pas d'effet visible sur la communauté microbienne du sol. D'autre part, ils montrent que la concentration optimale de zinc est de 72 ppm, concentration qui favorise la respiration et l'ammonification (Walter et Stadelmann, 1979).

Pour constater une inhibition, la concentration totale du sol en métaux lourds n'est pas déterminante, mais bien celle qui reste biodisponible dans le sol (Walter et Stadelmann, 1979).

Le cadmium et le plomb sont toxiques à faible concentration alors que le cuivre et le zinc sont essentiels mais potentiellement toxiques aussi à forte concentration (Pardo *et al.*, 2003).

### 3.2.3 Milieu poreux : le sable de Loire

Également utilisé dans les travaux d'Hébrard-Labit, 1998, c'est un milieu poreux simple qui, contrairement aux sols naturels, est très peu réactif. L'emploi d'un sable permet plus facilement de dissocier processus physiques et processus microbiologiques (Hébrard-Labit, 1998). Un sable plus fin (sable de Fontainebleau) avait montré lors d'essais préliminaires, une grande tendance au colmatage et la taille micrométrique du sable de Loire paraissait plus adaptée. Van Elsas et Heijnen, 1990, expliquent que la colonisation d'un sol par une souche bactérienne est très dépendante de la faculté de la bactérie à s'adapter à la structure et à la texture du sol. Hébrard-Labit, 1998, a montré la bonne compatibilité de *Pseudomonas putida* avec le sable de Loire.

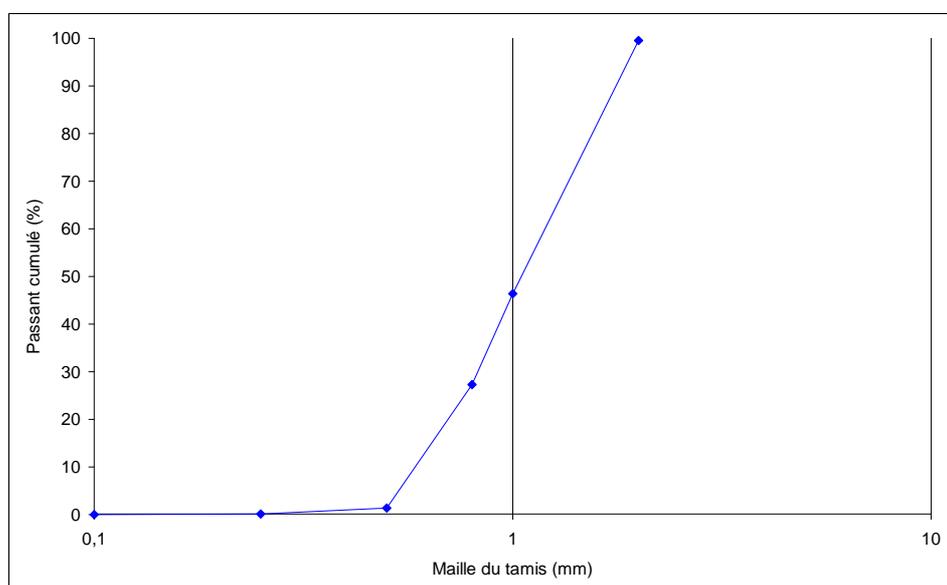


FIG. 3.3 – Courbe granulométrique du sable de Loire

La courbe granulométrique présentée sur la figure 3.3 donne une idée de la texture du milieu poreux. Le diamètre efficace  $d_{10}$ , qui représente conventionnellement le diamètre moyen des grains, est 0,55 mm.

Une étape préliminaire permet de purifier le sable et d'obtenir de la silice quasiment pure. Le détail de cette préparation est proposé en annexe B.3.

L'analyse chimique des grains de sable après lavage est proposée par Hébrard-Labit, 1998. Il faut retenir que ce matériau est composé à 98 % de quartz  $\text{SiO}_2$ , et on retrouve quelques traces de potassium, sodium et aluminium. La capacité d'échange cationique est de 3 meq/kg (Hébrard-Labit, 1998).

### 3.2.4 Colonnes

#### a) Caractéristiques physiques des colonnes

De nombreuses études en laboratoire sur le transport colloïdal sont réalisées en colonnes dont les dimensions peuvent varier classiquement de quelques centimètres à plusieurs dizaines de centimètres de longueur (Cumbie et McKay, 1999).

Vu les objectifs et les matériaux utilisés, nous avons décidé de travailler avec des colonnes de 20 cm de long et 5 cm de diamètre. Des colonnes en verre ont été équipées de pistons de colonnes de chromatographie Pharmacia (voir annexe B.4). L'ensemble est alimenté par le haut par une pompe péristaltique. Le même débit est maintenu en sortie en bas de la colonne

afin de maintenir le milieu non saturé. Un collecteur de fraction GILSON FC204 permet de recueillir en continu les éluats en sortie de colonne.

Le tableau 3.2 rassemble les principales caractéristiques<sup>1</sup> des colonnes. La définition précise des grandeurs physiques mentionnées est rappelée en annexe A.1.

TAB. 3.2 – Caractéristiques physiques moyennes des colonnes de sable

Hauteur de sable	20 cm
Diamètre colonne	5 cm
Surface colonne	19,625 cm <sup>2</sup>
Volume sable	393 cm <sup>3</sup>
Masse de sable	600 g
Débit entrant	1 mL.min <sup>-1</sup>
Masse volumique apparente sèche	1,53 g.cm <sup>-3</sup>
Volume d'eau	60 à 70 cm <sup>3</sup>
Teneur en eau volumique <sup>a</sup>	20 à 30%
Teneur en eau massique	10 %
Porosité théorique	40 %
Volume poral	157 cm <sup>3</sup>
Volume poral occupé par l'eau	60 cm <sup>3</sup>
Taux de saturation	38%
Vitesse de Darcy	8,49*10 <sup>-6</sup> m.s <sup>-1</sup> 3,05 cm.h <sup>-1</sup>
Vitesse de pores	5,58 <sup>-5</sup> m.s <sup>-1</sup> 20,0 cm.h <sup>-1</sup>
Temps de séjour moyen du traceur	60 min

<sup>a</sup>On distingue la teneur en eau massique  $w$ , définie comme le rapport entre la masse d'eau et la masse de solide contenue dans le volume étudié, et la teneur en eau volumique,  $\theta$ , définie comme le rapport entre le volume d'eau et le volume de l'ensemble

#### b) Traçages de l'écoulement

L'assemblage de la texture donne la structure qui est elle caractérisée par des essais en dynamique. Nous avons choisi d'utiliser comme traceur anionique l'ion Br<sup>-</sup>, couramment utilisé pour les traçages (Février, 2001).

La figure 3.5 présente la courbe d'éluion du traceur dans une colonne stérile. La courbe est dissymétrique et décalée vers la gauche. Ces particularités sont liées au caractère non saturé des colonnes, c'est-à-dire à la pré-

<sup>1</sup>La masse volumique est fonction de la nature des composants solides. Toutefois pour des sols minéraux sa valeur est généralement admise comme proche de 2,56 g.cm<sup>-3</sup> (Février, 2001). C'est la valeur que nous avons retenu pour les calculs des paramètres physiques.

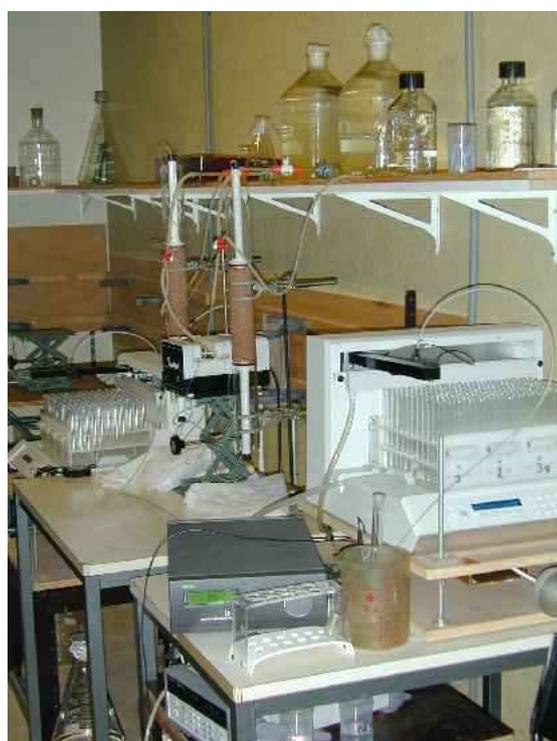


FIG. 3.4 – Dispositif expérimental

sence d'une phase gazeuse et à l'apparition d'une régionalisation de l'eau en fractions mobile et immobile (Hébrard-Labit, 1998; Février, 2001).

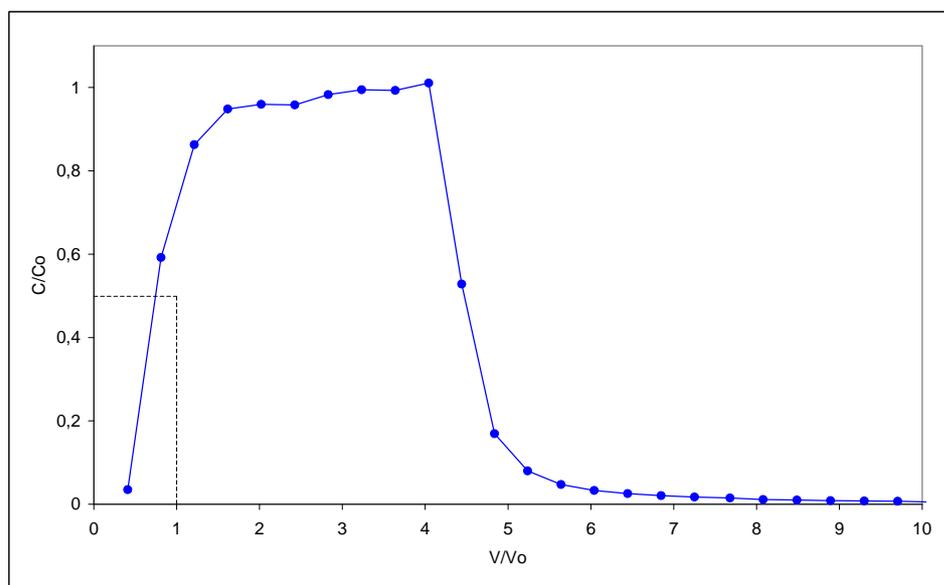


FIG. 3.5 – Traçage aux ions Br : courbe d'élution du traceur

Cette courbe permet de calculer le coefficient de retard, R et le bilan de masse du traceur, BM. R représente le rapport entre le temps de séjour moyen expérimental et le temps de séjour convectif moyen.

TAB. 3.3 – Caractéristiques de l'écoulement à partir de trois traçages

	BM	R
traçage 1 - teneur en eau volumique = 17 %	1,00	0,71
traçage 2 - teneur en eau volumique = 19 %	1,12	0,84
traçage 3 - teneur en eau volumique = 19 %	0,96	0,835

Les traçages ont montré que dans le cas du sable stérile comme du sable colonisé, il faut prendre en compte une fraction d'eau immobile. La valeur du coefficient  $f$ , défini comme la fraction d'eau mobile, est proche de 70 % dans les deux cas.  $\lambda$  la dispersivité du milieu est comprise entre 0,1 et 0,5 cm pour le sable colonisé et entre 0,1 et 1 cm pour le sable stérile. Les expériences menées ici ne permettent pas de mettre en évidence de différences liées à la présence ou non d'un biofilm dans le milieu poreux. On considérera donc l'écoulement comme homogène dans le temps au cours des expériences.

Le coefficient de retard R est théoriquement égal à 1. Les deux phénomènes invoqués pour justifier des coefficients inférieurs à 1 sont l'exclu-

sion anionique causée par la charge négative des particules (Hébrard-Labit, 1998) ou la présence de volumes exclus de l'écoulement (Lassabatere, 2002). L'utilisation du modèle de transfert MIM permet justement de tenir compte d'une fraction d'eau immobile (voir section 3.5.1).

### 3.2.5 Réactifs

Toutes les solutions salines et métalliques utilisées sont décrites dans le tableau B.1. Elles sont réalisées dans de l'eau déminéralisée.

#### a) Solution de lavage

Afin d'éviter des modifications de force ionique, toutes les opérations de lavage d'échantillons ont été réalisées dans une solution de force ionique  $0,01 \text{ mol.L}^{-1}$ . Pour cela du bromure de sodium est utilisé. Le sodium est fréquemment trouvé dans les eaux infiltrées (voir section 1.1.2.a).

#### b) Solution de traçage

L'ion bromure a été choisi comme traceur. La solution de traçage est une solution de bromure de sodium NaBr à  $0,01 \text{ mol.L}^{-1}$  identique à la solution qui sera utilisée comme solution de lavage.

#### c) Solutions métalliques

Les solutions métalliques ont servi pour la contamination du biofilm dans les colonnes et pour les essais en batchs. Pour les essais en colonnes, plusieurs concentrations ont été testées pour conserver une force ionique identique en faisant varier le ratio monovalents/divalents. Pour les essais en batchs une gamme de concentration allant de  $1 \text{ mg.L}^{-1}$  à  $100 \text{ mg.L}^{-1}$  de zinc a été utilisée.

#### d) Solutions salines

Les solutions salines, outre la solution de lavage et de traçage ont permis de stabiliser ou de déstabiliser le biofilm dans les colonnes. L'anion reste le bromure et les cations utilisés sont le calcium et le sodium. Le calcium, divalent, et le sodium, monovalent, ont des comportements différents comme nous le verrons plus en détails dans le chapitre suivant. Les concentrations varient de 0 à  $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ .

Dans un souci de rester proches des problématiques environnementales réelles, soulignons que les cations employés sont fréquemment trouvés dans le milieu naturel (voir section 1.1.2.a). En effet, certains cations divalents comme le  $\text{Ca}^{2+}$  sont des constituants importants des sols et des eaux naturelles (Grolimund *et al.*, 1998; Durin, 2003). Ces ions jouent un rôle important en contrôlant la stabilité, la réactivité et le devenir des particules colloïdales dans les environnement aquatiques (Grolimund *et al.*, 1998).

La composition des solutions est proposée en annexe dans le tableau B.2. Les ordres de grandeur des solutions sont proches de ce qui se trouve dans les milieux naturels (voir 2.1.2), à savoir des concentrations de l'ordre de la dizaine de millimole par litre.

### 3.3 Méthodes

*Compte tenu de l'influence de la force ionique sur divers paramètres et notamment la réactivité de la cellule (Cox et al., 1999), toutes les mesures de caractérisation ont été réalisées dans une solution de force ionique 0.01M, sauf si cela est explicitement précisé.*

Nous avons choisi de présenter les protocoles utilisés selon 3 types : dans la première partie on retrouve les protocoles de préparation des échantillons, tous assez classiques. La deuxième partie présente les protocoles qui constituent le coeur des expériences, la plupart d'entre eux ayant nécessité une phase préliminaire de mise au point. Dans un troisième temps sont brièvement mentionnés les expériences complémentaires, pour la plupart réalisées en collaboration avec un autre laboratoire qui s'est occupé de l'adaptation du protocole.

#### 3.3.1 Protocoles classiques

##### a) Culture et conservation des bactéries

La souche, reçue de l'institut Pasteur, est conservée à  $-80^{\circ}\text{C}$ . Les échantillons conservés sont constitués de 50% de glycérol et 50% de culture bactérienne concentrée. Avant utilisation, la souche est remise dans un milieu de culture riche, après passage 24h à  $-20^{\circ}$  puis 24h à  $4^{\circ}\text{C}$ . Pour vérifier la pureté de la souche, l'échantillon est étalé sur boîte de Pétri. De nouveaux milieux peuvent ensuite être ensemencés à partir des colonies formées sur boîte (voir figure 3.1).

Afin de limiter l'impact du vieillissement des échantillons et l'incidence d'une éventuelle congélation, les expériences réalisées sur des échantillons bactériens l'ont été, sauf mention contraire, dans les heures suivant la collecte de l'échantillon.

##### b) Préparation des échantillons bactériens

Pour certaines expériences (titrations, batchs), les cultures doivent être "lavées". Cela revient à centrifuger la suspension bactérienne, puis à suspendre le culot dans la solution de lavage. En répétant le cycle centrifugation/mise en suspension 3 fois, on élimine ainsi une grande partie du milieu initial. Les centrifugations se font à 10000 tours/minute soit entre 23000 et 25000 g.

c) *Stérilisation*

Afin d'en assurer la stérilité, tous les matériels le supportant sont autoclavés. L'autoclavage est assuré par un maintien 20 minutes à 120°C. Les pièces ne pouvant pas être autoclavées sont lavées à l'éthanol.

d) *Dénombrement*

$\alpha$ ) Sur boîte de Pétri. — Le dénombrement des bactéries s'est effectué de la manière classique sur boîtes de Pétri avec une gélose nutritive. Une gamme de dilutions est réalisée à partir de l'échantillon à tester. 100  $\mu$ L de chaque dilution est répartie sur une boîte qui est placée 48 h à l'étuve. On peut ensuite dénombrer visuellement le nombre d'UFC, unités formant colonie (plus de détails en annexe B.6.)

$\beta$ ) Dosage des protéines. — Nous utilisons la méthode adaptée de Lowry, selon la procédure proposée P5656 par Sigma Diagnostics. Le principe est d'ajouter un premier réactif, réactif de Lowry, qui complexe avec les liaisons peptides et ce complexe va se colorer avec l'ajout de Phénol. La lecture de l'absorbance permet ensuite, via une courbe de calibration, d'obtenir la quantité de protéines de l'échantillon. Le standard utilisé est du BSA, Sérum-Albumine Bovin. Le détail du protocole ainsi qu'une courbe de calibration sont présentés en annexe B.5.

Le spectromètre Lambda 25 Perkin Elmer permet de mesurer la densité optique des solutions. Il s'agit en pratique de mesurer, pour une longueur d'onde de 740 nm, l'absorbance des échantillons.

e) *Pesée des bactéries*

La masse des bactéries est évaluée par pesée d'un culot bactérien et dénombrement de la solution centrifugée. La corrélation entre la masse humide, puis après passage à l'étuve et du nombre d'UFC permet de donner une évaluation de la masse des bactéries.

f) *Teneur en eau*

La teneur en eau du sable est évaluée par pesées de l'échantillon avant et après séchage et détermination de la quantité d'eau.

g) *Minéralisation des échantillons*

La détermination des teneurs en zinc dans la matrice demande une étape préalable de minéralisation des échantillons. 0,5 g d'échantillon sont mis en contact avec 7 mL d'acide nitrique et 3 mL d'acide chlorhydrique. La digestion s'effectue par augmentation de la température et de la pression. Un four à micro-ondes, modèle MARS 5 de CEM, est utilisé. La température est augmentée linéairement pendant 30 minutes jusqu'à un premier

palier à 150°C, maintenu 30 minutes, de même jusqu'à un deuxième palier à 180°C. Les concentrations en métaux lourds sont ensuite déterminées dans les minéralisats par absorption atomique ou ICP-AES.

### 3.3.2 Principaux protocoles

#### a) *Hydrophobie*

Pour évaluer l'hydrophobie nous avons utilisé le test MATH, présenté en détails en annexe B.9. Le principe est de mettre en contact la solution bactérienne avec un hydrocarbure et d'observer la répartition des bactéries entre les phase aqueuse et hydrocarbure. Ainsi l'hydrophobie, avec ce principe de mesure, s'exprime par un coefficient de partage tel que défini dans la partie 2.2.2.b.

#### b) *Potentiel Zêta*

Le potentiel Zêta est mesuré à l'aide d'un zétamètre Zêtasizer 3000HS de Malvern. Avant mesure, les suspensions bactériennes sont lavées puis une gamme de pH est réalisée en faisant des ajouts acides (acide nitrique concentré) dans les sous-échantillons. Après stabilisation le pH de ces échantillons est mesuré.

#### c) *Développement du biofilm*

La mise en place du biofilm est adaptée des travaux d'Hébrard-Labit, 1998 et détaillée en annexe B.7.

L'installation du biofilm se fait en deux temps :

- l'inoculation du milieu (figure 3.6)
- la croissance du biofilm (figure 3.7)

Pendant la phase d'inoculation, une culture bactérienne circule en circuit fermé pendant 12 volumes<sup>2</sup> des pores dans la colonne.

Ensuite, la phase de croissance consiste à faire circuler un milieu nutritif (décrit en annexe B.1), préalablement stérilisé, dans les colonnes pour permettre le développement du biofilm. Pendant cette étape le dosage des protéines dans l'effluent du biofilm permet de connaître sa stabilité. Nous avons estimé que le biofilm avait atteint une certaine stabilité lorsque la quantité de biofilm décrochée se stabilise. Cette stabilisation a lieu au bout de 5 à 6 jours. La quantité de biofilm qui se décroche "naturellement" est variable d'une colonne à l'autre alors que tous les autres paramètres semblent identiques.

#### d) *Déstabilisation du biofilm*

La déstabilisation du biofilm consiste à faire circuler différentes solutions dans les colonnes, toujours en circuit ouvert. L'effluent est recueilli

---

<sup>2</sup>Un volume de pores est défini comme le volume d'eau contenu dans une colonne.

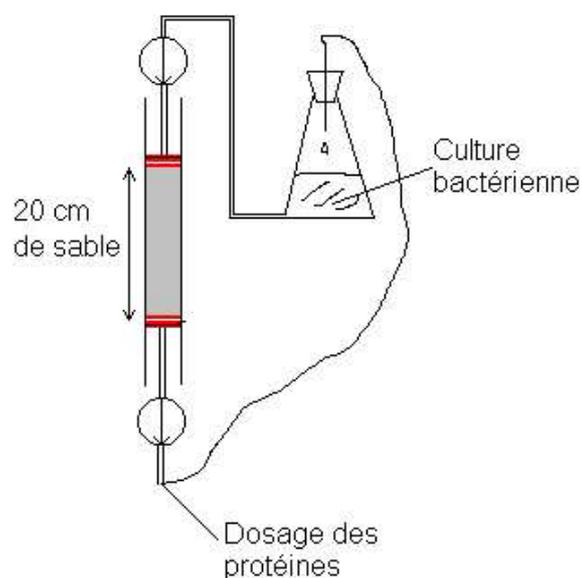


FIG. 3.6 – Dispositif expérimental pendant la phase d'inoculation

dans un collecteur de fractions et le pH et la conductivité sont mesurés. Plusieurs scénarios ont été testés, certains avec une seule solution ou jusqu'à trois solutions successives. Les solutions utilisées sont décrites en annexe B.2 et la destruction de la colonne en annexe B.8

e) *Essais en batchs*

Les essais en batchs consistent à mettre en contact une solution métallique (voir annexe B.2 avec l'échantillon à tester, suspension bactérienne ou sable colonisé dans notre cas. Les conditions analytiques sont résumées dans le tableau 3.4. Des essais en cinétique et à l'équilibre ont été réalisés pour la suspension bactérienne, des essais à l'équilibre pour le sable colonisé.

TAB. 3.4 – Conditions de réalisation des essais en batchs à l'équilibre

	culture	biofilm
température	25°C	25°C
échantillon	suspension bactérienne lavée	sable colonisé
quantité de protéines	40,3 mg	1,5 mg
masse sèche d'échantillon	74,3 mg	
concentration en zinc	0 à 100 mg/L	0 à 100 mg/L
fond ionique	NaBr 0,01 M	NaBr 0,01 M

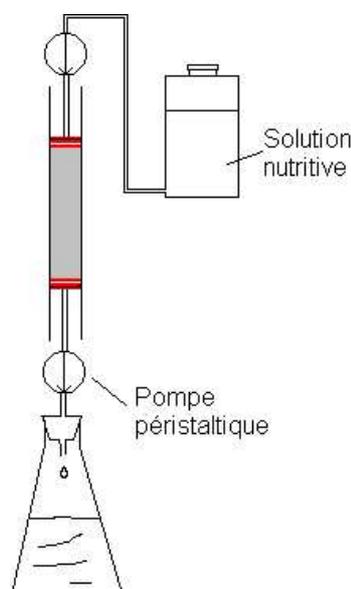


FIG. 3.7 – Dispositif expérimental pendant la phase de croissance

f) *Titrations de surface*

Les titrations de surface consistent à mesurer l'évolution du pH d'une suspension de l'échantillon en fonction des ajouts acides ou basiques réalisés. En pratique 50 mL de suspension bactérienne<sup>3</sup> sont maintenus, à température constante, agités, et avec bullage d'azote pour éviter tout apport d'oxygène. La titration est suivie par un logiciel qui commande, après chaque stabilisation et mesure du pH un nouvel ajout d'acide ou de base. Plusieurs scénarios de titrations ont été testés préalablement pour évaluer notamment la réversibilité des processus d'échange. Les détails du protocole suivi se trouvent en annexe B.11.

La quantité de protons échangés par la surface,  $H_s$ , est obtenue à partir de la mesure du pH et de la connaissance de la quantité de protons ajoutés au réacteur,  $H_a$ .

$$[Hs] = [H^+] - [H_0] + [H_a] - [H_w] \quad (3.1)$$

avec  $H_0$  la quantité de protons initialement présente,  $H_w$  les protons dus à l'autodissociation de l'eau et  $H^+$  la concentration de protons en solutions calculée à partir du pH mesuré.

<sup>3</sup>Culture bactérienne ou éluat de colonnes c'est-à-dire biofilm déstabilisé

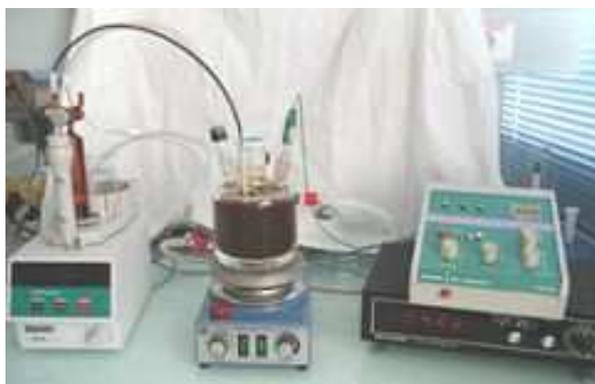


FIG. 3.8 – Dispositif expérimental pour les titrations de surface

### 3.3.3 Expériences complémentaires

#### a) Microscopie électronique à balayage et à transmission

Les échantillons observés en microscopie électronique ont été préalablement lavés et suspendus dans un mélange de glutaraldéhyde et de cacodylate de sodium (voir protocole en annexe B.10).

La suite de la préparation a été réalisée au centre de microscopie électronique appliquée à la biologie et à la géologie de l'université Claude Bernard de Lyon.

Le microscope électronique à balayage utilisé était le modèle Hitachi S800 FEG et le microscope à transmission le JEOL 1200 EX.

#### b) Granulométrie laser et évaluation de la dimension fractale

$\alpha$ ) Granulométrie laser. — Ces analyses ont été réalisées par le laboratoire de physicochimie des interfaces du Centre Européen de Recherche et d'Enseignement des Géosciences de l'Environnement d'Aix-en-Provence. La taille des particules est évaluée avec un granulomètre laser commercialisé par la société Malvern Instruments. Il s'agit du modèle Mastersizer. Cet appareil se compose d'un tube à gaz hélium-Néon de faible puissance (4mW) et de longueur d'onde  $0,6334 \mu\text{m}$ . Le laser éclaire une cellule d'échantillonnage de volume 0,61 mL, et une lentille convergente de 300 mm de distance focale. L'intensité diffusée est mesurée grâce à 42 détecteurs. Il s'agit de photodiodes au silicium disposées selon une progression géométrique d'angle de  $0,035$  à  $46^\circ$  par rapport au trajet optique direct. Une pompe, placée après la cellule de mesure, assure la circulation de l'échantillon à 2 mL/min. Un logiciel pilote l'instrument et permet de traiter le signal diffusé de façon satisfaisante si la nature des particules est bien connue et que la concentration de celle-ci est suffisamment faible pour éviter les problèmes de diffusion multiple. Le dispositif expérimental et les

adaptations du protocole sont détaillés dans l'article de Lambert *et al.*, 2003. Quelques notions théoriques relatives aux mesures qui ont été réalisées au Centre Européen de Recherche et d'Enseignement des Géosciences de l'Environnement sont présentées en annexe A.2.

Une des hypothèses sous-jacentes à l'interprétation directe des données fournies par le granulomètre est l'absence de polydispersivité. Celle-ci n'est pas respectée en présence d'agrégats et la méthodologie utilisée par Lambert *et al.*, 2003.

$\beta$ ) Dimension fractale. — Les travaux de Thill *et al.*, 2000, Châtellier *et al.*, 2001 et Lambert *et al.*, 2003, ont permis de développer une mesure précise des paramètres physiques de la dimension fractale et de la granulométrie des agrégats par utilisation de la diffraction de la lumière aux petits angles. Les travaux de Thill *et al.*, 2000 portent sur l'interprétation de la lumière diffusée par un agrégat formé de particules microniques. Le principe est le suivant : en fonction de la structure du floc, une particule quelconque d'un agrégat est source de lumière pour les particules situées dans son voisinage. Ce phénomène est à l'origine de la diffusion multiple. La lumière diffusée sortant de l'agrégat a donc traversé un milieu complexe formé de particules et de solvants.

## 3.4 Analyses

### 3.4.1 pH et conductivité

Le pH et la conductivité sont mesurés en sortie de colonne par un appareil Monitor pH/C 900 de Amersham Pharmacia Biotech. Une centrale d'acquisition Agilent 34970A permet la collecte en continu et le stockage des données. Lors des titrations une électrode Métrohm est utilisée.

### 3.4.2 Absorption atomique

Les concentrations en zinc sont obtenues par spectrométrie d'absorption atomique à flamme air-acétylène. L'appareil est un HITACHI Z-8200. L'absorbance est mesurée dans le domaine de linéarité de l'élément, pour le zinc, c'est-à-dire pour une concentration inférieure à 1 ppm, ce qui correspond à une absorbance de 0,5. La courbe étalon est réalisée avec des standards de concentrations 0, 0,25, 0,50, 1,00, 1,50 et 2,00 ppm. Ces standards sont préparés à partir d'une solution mère à 100 ppm. Les échantillons sont acidifiés et conservés à 4°C et dilués si nécessaires dans de l'acide nitrique à 10%

### 3.4.3 Chromatographie ionique

Les concentrations en bromure, calcium, sodium et magnésium ont été déterminées par chromatographie ionique avec un appareil DIONEX DX-100. Les mesures des concentrations sont basées sur l'aire du signal. Celle-ci est corrélée à la concentration par l'intermédiaire d'une courbe étalon.

Les standards de la courbe sont réalisés à partir d'une solution mère à 1000 ppm. Les concentrations des standards varient en fonction de la gamme de concentration dans laquelle on se situe. Les analyses peuvent être réalisées, sans dilution, jusqu'à des concentrations de 100 ppm.

Les échantillons sont stockés en chambre froide et si nécessaire dilués dans de l'eau au moment de la mesure.

### 3.4.4 ICP-AES

Pour certaines expériences (batches et dernière colonne), la mesure du zinc a été réalisée par Spectrométrie d'Emission Atomique avec Source Plasma à Couplage Inductif (ICP-AES). L'appareil utilisé est un Perkin Elmer. Le seuil de détection est plus faible qu'en absorption atomique à flamme et cette mesure est donc davantage adaptée pour les échantillons les moins concentrés. Une acidification préalable des échantillons était effectuée. La très haute température des plasmas (de 4000 à 40 000 K) et la grande stabilité de l'argon permettent d'éliminer la plupart des interférences que l'on trouve dans les flammes.

## 3.5 Analyse et modélisation des données : présentation des outils

Trois logiciels ont permis dans un premier temps d'exploiter les données expérimentales et dans une deuxième étape d'aller vers une modélisation des phénomènes observés (figure 3.9). Dans une première étape, MIM permet d'avoir une idée de la structure de l'écoulement et de fournir certaines informations sur la caractérisation.

D'autre part GRFIT permet, à partir des résultats obtenus à partir des batches, d'évaluer les réactions et les quantités de sites mises en jeu dans ces réactions.

Ces deux calculs vont permettre d'obtenir des données de base pour IMPACT.

Notons que les modèles utilisés n'ont pas la même approche. Alors que MIM est davantage dans une optique physique du sol, IMPACT va avoir une approche génie des procédés et GRFIT reste un modèle très géochimique. Ils sont maintenant présentés plus en détails, mais l'objectif reste de n'en présenter que les aspects qui vont nous servir par la suite.

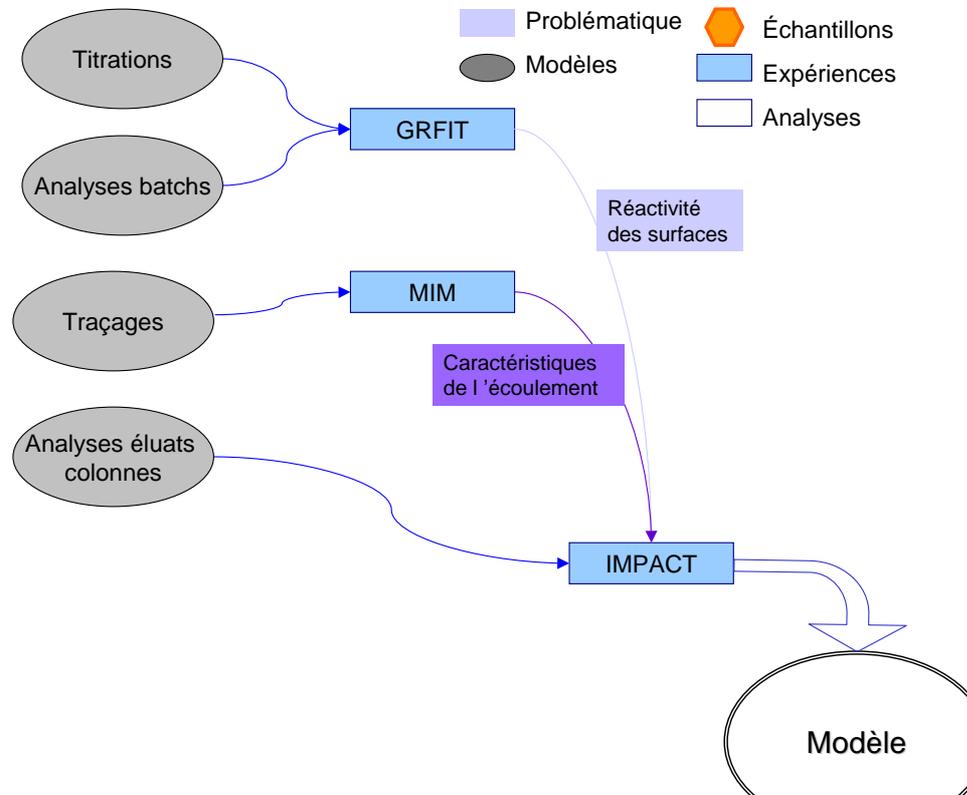


FIG. 3.9 – Utilisation des outils de modélisation

### 3.5.1 MIM

Le modèle de transfert MIM détermine l'élution théorique d'un traceur dans un milieu poreux comprenant une fraction mobile et une fraction immobile pouvant échanger des solutés selon une cinétique de 1er ordre (Lassabatere, 2002). Les codes de calcul ont été développés au Laboratoire d'étude des Transferts en Hydraulique et Environnement de Grenoble.

Les données du modèle sont :

- $\delta t$ , la largeur du créneau du traceur injecté
- $q$ , la vitesse de Darcy
- la longueur de la colonne  $L_q$

Les paramètres à optimiser sont :

- le fractionnement de l'eau, sous la forme de la teneur en eau mobile  $\theta_m$  et de la teneur en eau immobile  $\theta_{im}$
- le coefficient d'échange,  $\alpha$
- la dispersivité du milieu,  $\lambda_m$

Ainsi, par calage de la courbe d'élution et de la courbe théorique, les paramètres hydrauliques caractéristiques de l'écoulement peuvent être dé-

terminés.

### 3.5.2 GRFIT

GRFIT est un code de calcul permettant la détermination de constante d'équilibre à partir de données expérimentales. Ce modèle représente l'adsorbant comme une matrice de groupements fonctionnels. Chaque groupe de surface -SOH est considéré comme un ligand qui forme, avec les ions métalliques, des complexes de la même façon qu'en phase liquide (Puziy *et al.*, 2004).

### 3.5.3 IMPACT

Le code de calcul IMPACT, développé à l'École Supérieure des Industries Chimiques de Nancy et au Commissariat à l'Énergie Atomique, couple un modèle de transport et des réactions d'équilibre chimique (Jauzein *et al.*, 1989; Vulava *et al.*, 2002). Il a notamment été plusieurs fois utilisé dans des investigations sur l'échange cationique (Marcos, 2001; Fauré, 1994). Il permet de prendre en compte l'existence d'un ou plusieurs sites réactifs de surface.

En pratique IMPACT permet de modéliser les interactions à l'équilibre entre phases gazeuse, liquide et solide et de représenter les courbes d'élution et les profils de concentrations dans les systèmes (Schweich et Sardin, 1988). Ainsi, utilisé conjointement avec des expérimentations en colonne, IMPACT se révèle utile pour identifier les mécanismes physicochimiques qui contrôlent le transfert de solutés dans le milieu poreux. Ce principe d'utilisation repose sur l'analyse comportementale d'une colonne soumise à des perturbations d'entrée. IMPACT permet en outre de modéliser le système avec une réactivité hétérogène dans la colonne. En effet, dans chaque cellule il est possible de définir une réactivité différente.

Il requiert la connaissance des espèces réactives, de leur stoechiométrie et des constantes d'équilibre décrivant les lois d'action de masse. Le principe de fonctionnement et les limites de ce modèle sont décrits plus en détails par Marcos, 2001.



## Chapitre 4

# Résultats

*Ce chapitre présente les principaux résultats expérimentaux obtenus. La première partie s'attache à analyser les résultats et à donner les clés pour l'interprétation de ceux-ci. La partie suivante propose une nouvelle analyse de ces résultats, plus globale, articulée autour des principales questions évoquées au début du document.*

*Dans les parties suivantes on emploiera indifféremment pour décrire l'échantillon de cellules planctoniques, les termes cellules libres, cellules planctoniques ou culture liquide ; pour les échantillons de biofilm décroché du milieu poreux, on utilisera le terme fragments de biofilm ou biofilm. Quand il s'agit du sable colonisé par le biofilm, c'est explicitement mentionné.*

*Les résultats sont présentés en trois points qui sont en fait les trois conditions pour qu'il y ait transport facilité d'un polluant. Dans un premier temps il faut bien sûr que le polluant soit fixé sur les particules colloïdales et pour cela nous nous sommes intéressés à la réactivité des surfaces bactériennes. Ensuite, il faut qu'il y ait mouvement de ces colloïdes et en ce sens une partie de l'étude est consacrée à la stabilité du biofilm. Enfin, un troisième point sur le transport du métal est abordé.*

### 4.1 Caractérisation de la réactivité des surfaces

#### 4.1.1 Caractéristiques de la souche bactérienne et description des échantillons

##### 4.1.1.1 Caractéristiques morphologiques

Les caractéristiques morphologiques de *Pseudomonas putida* ont été évaluées à partir des images obtenues en microscopie électronique à balayage (figure 4.1), et d'essais de dénombrement, de dosages des protéines et de pesées (tableau 4.1). Un volume et une surface équivalente, en prenant comme modèle de la bactérie un cylindre, ont été calculés<sup>1</sup>. Ils ne donnent

---

<sup>1</sup>Cette représentation très sommaire d'une bactérie est néanmoins un modèle fréquemment utilisé (voir section 2.2.5.a.)

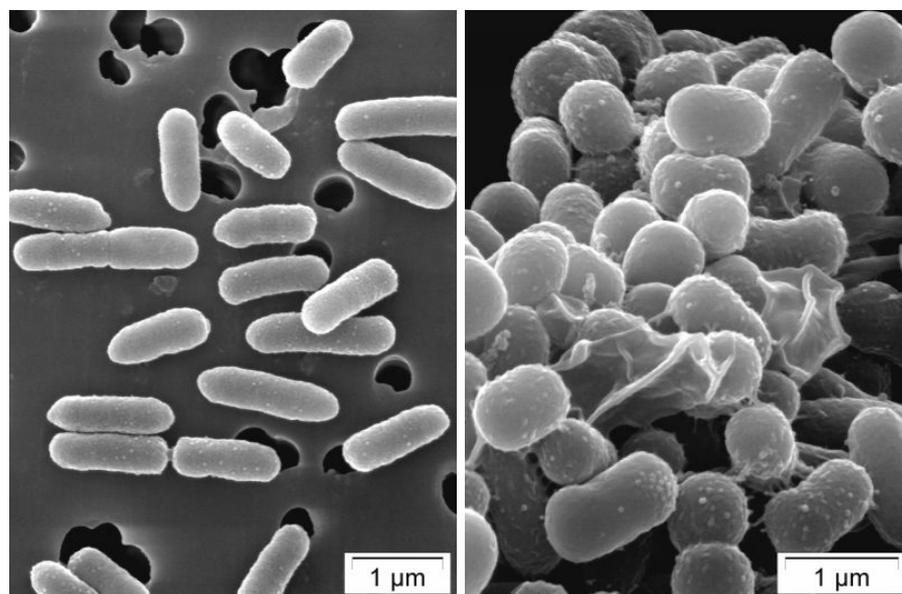


FIG. 4.1 – Observation en microscopie électronique à balayage d’une suspension bactérienne à gauche et de fragments de biofilm à droite

qu’une approximation grossière, en particulier pour la surface, qui doit être bien plus importante en réalité que dans cette estimation. La quantification de la surface réactive du biofilm n’est pour l’instant pas envisageable car elle inclut aussi les EPS qu’il est difficile de représenter géométriquement. Pour la suite des analyses, il apparaît opportun de se référer à la quantité de protéines qui est un indicateur intéressant de la biomasse présente, que ce soit dans les cellules en culture ou dans le biofilm (Todar, 2004).

Ces cellules sont de taille moyenne pour des bactéries, les valeurs trouvées pour la teneur en protéines et la masse sèche sont proches des valeurs rapportées dans la littérature (voir tableau 2.4).

Quand on compare les deux types d’échantillons, deux points importants apparaissent. Tout d’abord les bactéries dans le sable présentent des caractéristiques géométriques différentes de celles en culture. Ceci est en accord avec la proposition de Davies, 2000 : les bactéries attachées à une surface sont sensiblement plus grosses.

Ensuite il apparaît que la quantité de protéines par bactérie est sensiblement plus élevée dans le cas du biofilm. Ceci s’explique sûrement par la quantité importante de polymères qui sont inclus dans la quantité de protéines mais qui ne sont pas quantifiés avec les cellules.

Enfin, la teneur en eau dans les cellules est importante, conformément à de nombreuses références bibliographiques, teneur en eau élevée qui se retrouve dans les sécrétions exopolymères (Sutherland, 2001).

Des analyses ont permis d’évaluer la composition élémentaire d’une

culture de *Pseudomonas putida*. Les valeurs sont également reportées dans le tableau 4.1. Notons au passage que la même analyse réalisée sur d'autres souches bactériennes, *Ralstonia Metallidurans* et *Escherichia Coli* montre sensiblement les mêmes valeurs sauf pour le phosphore dont le ratio est plus élevé chez *Pseudomonas putida* (Guiné *et al.*, en cours).

TAB. 4.1 – Caractéristiques morphologiques de *Pseudomonas putida*

		Culture	Biofilm
Longueur moyenne des cellules	$\mu\text{m}$	1,7	1
Diamètre moyen des cellules	$\mu\text{m}$	0,4	0,6
Volume équivalent d'une cellule	$\mu\text{m}^3$	0,21	0,28
Surface équivalente d'une cellule	$\mu\text{m}^2$	2,26	2,17
Masse sèche	g/UFC	$8,26 \cdot 10^{-13}$	
Teneur en protéines <sup>a</sup>	g/UFC	$4,48 \cdot 10^{-13}$	
Densité sèche	$\text{g} \cdot \mu\text{m}^{-3}$	$3,87 \cdot 10^{-12}$	
Teneur en eau <sup>b</sup>	%	93,7	
Teneur en carbone <sup>c</sup>	%	43,6	
Teneur en azote	%	13,2	
Teneur en phosphate	%	2,54	

<sup>a</sup>Pour une culture de 24 à 200 heures

<sup>b</sup>Du culot bactérien après centrifugation

<sup>c</sup>Les teneurs en C, N et P ont été évaluées au service central d'analyses du CNRS à Solaize.

#### 4.1.1.2 Croissance

Sont présentées sur la figure 4.2 les évolutions de la concentration bactérienne dans une culture de *Pseudomonas putida* ainsi que dans l'effluent de la colonne lors de la phase de colonisation<sup>3</sup>. Nous avons choisi de travailler avec des échantillons ayant le même âge : 5 jours. Cela correspond au début de la phase plateau pour la culture bactérienne, avec une concentration de l'ordre de  $10^8$  UFC/mL et à un état de stabilité du biofilm.

Un échantillon dans la phase exponentielle est connu pour sa plus grande reproductibilité (Maier *et al.*, 2000), mais pour être sûr que le biofilm soit, dans tous les cas, suffisamment mature, il a été nécessaire de travailler avec des échantillons de 5 jours.

Pour obtenir des quantités d'effluent suffisantes pour certaines expériences, les échantillons de biofilm ont parfois été collectés pendant près de 24 heures soit entre 120 et 144 heures après l'inoculation de la colonne.

<sup>3</sup>T=0 au changement entre la circulation en boucle de la suspension bactérienne et la circulation en circuit ouvert du milieu nutritif

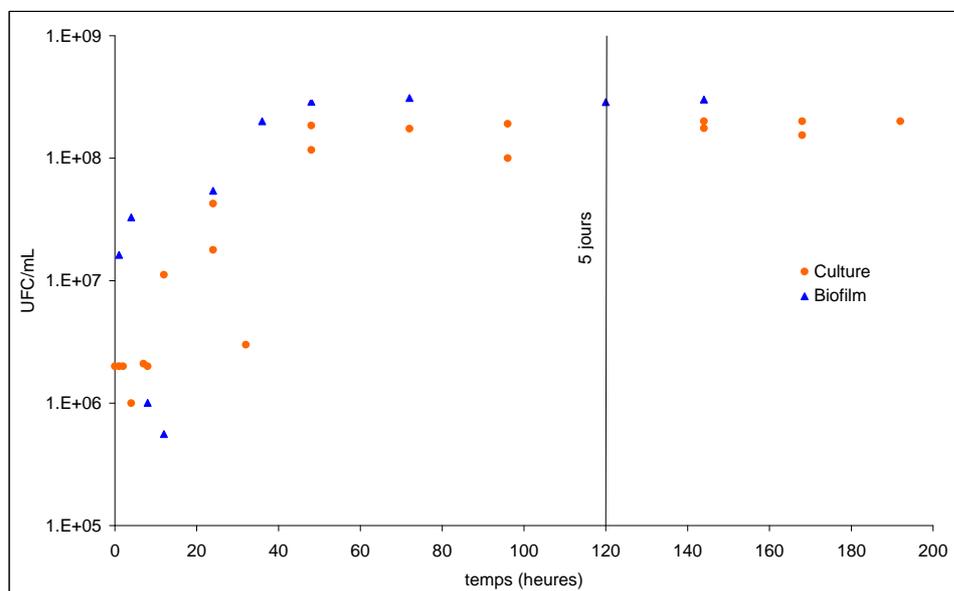


FIG. 4.2 – Evolution de la concentration bactérienne dans une culture liquide et dans l’effluent d’une colonne de sable en cours de colonisation

#### 4.1.1.3 Description du biofilm

Le développement du biofilm dans le sable se fait conformément à ce qu’avait décrit Hébrard-Labit, 1998, à savoir, une croissance du taux d’accumulation de la biomasse<sup>2</sup> qui devient ensuite constant après environ 5 jours (figure 4.2). Avec d’autres protocoles expérimentaux de croissance de biofilm, le temps pour que le biofilm arrive à maturation reste souvent compris entre 4 et 8 jours (Black *et al.*, 2004). Le développement de biofilm en conditions naturelles peut bien sûr se faire sur des périodes beaucoup plus longues.

A l’issue des 5 jours de croissance du biofilm, le milieu sableux est colonisé de façon hétérogène. Ce gradient de colonisation s’explique par un développement préférentiel en entrée de colonne, favorisé par l’arrivée du milieu nutritif et l’oxygène davantage disponible (Vandevivere et Baveye, 1992; Hébrard-Labit, 1998).

Une colonne, détruite et analysée après colonisation a permis d’obtenir la répartition de la quantité de protéines en fonction de la profondeur (figure 4.3). La teneur en protéines varie de près de 0,5 mg/g M.S. en surface à environ 0,05 mg/g M.S. sur le reste de la profondeur où elle demeure as-

<sup>2</sup>Différence entre le taux d’accroissement total de la biomasse et le taux d’élimination en sortie de colonnes

sez stable. La quantité de protéines dans les premiers centimètres est équivalente à la quantité sur les centimètres inférieurs. La quantité totale de protéines par colonnes est d'environ 60 mg.

Parallèlement, malgré l'emploi d'une deuxième pompe péristaltique en sortie de colonne, la teneur en eau est aussi hétérogène. De l'ordre de 5% dans les 15 premiers centimètres, elle devient bien plus élevée, 25%, dans les 5 cm inférieurs<sup>3</sup>.

Visuellement, on constate effectivement que la partie inférieure de la colonne est quasiment saturée, alors que toute la partie supérieure est de manière homogène non-saturée.

Des observations des grains de sable d'une colonne colonisée ont permis de visualiser la répartition du biofilm sur le support (figure 4.4). Les anfractuosités favorisent le développement du biofilm et on observe d'importantes discontinuités. Certaines zones sont davantage propices à l'attachement des cellules et donc au développement du biofilm. Ce peut être lié à des phénomènes mécaniques ; dans les anfractuosités les forces de cisaillement sont moindres et l'adhésion serait donc facilitée.

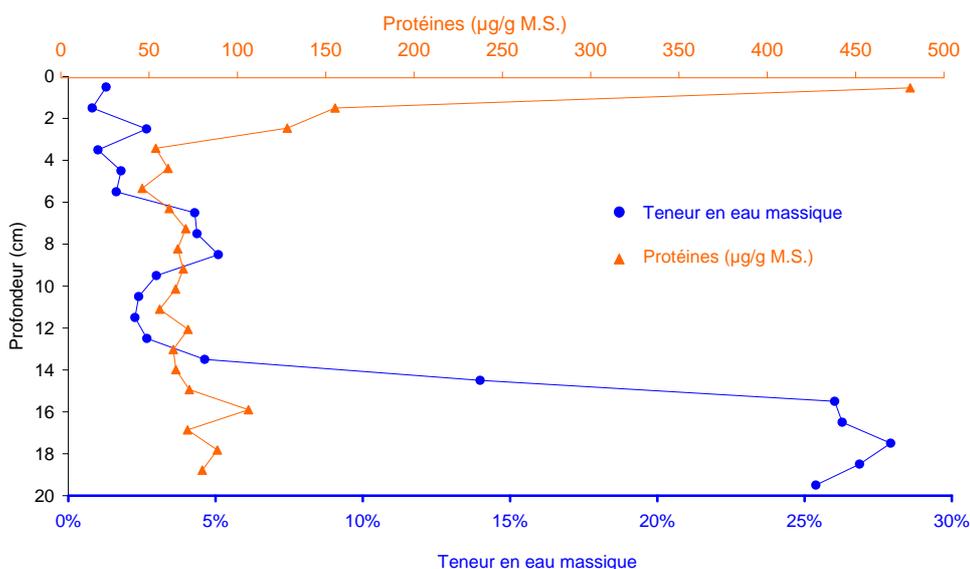


FIG. 4.3 – Teneur en eau massique et teneur en protéines dans une colonne de sable colonisée par un biofilm

<sup>3</sup>Ce qui correspond à une saturation de 29% en surface et jusqu'à 41% en profondeur.

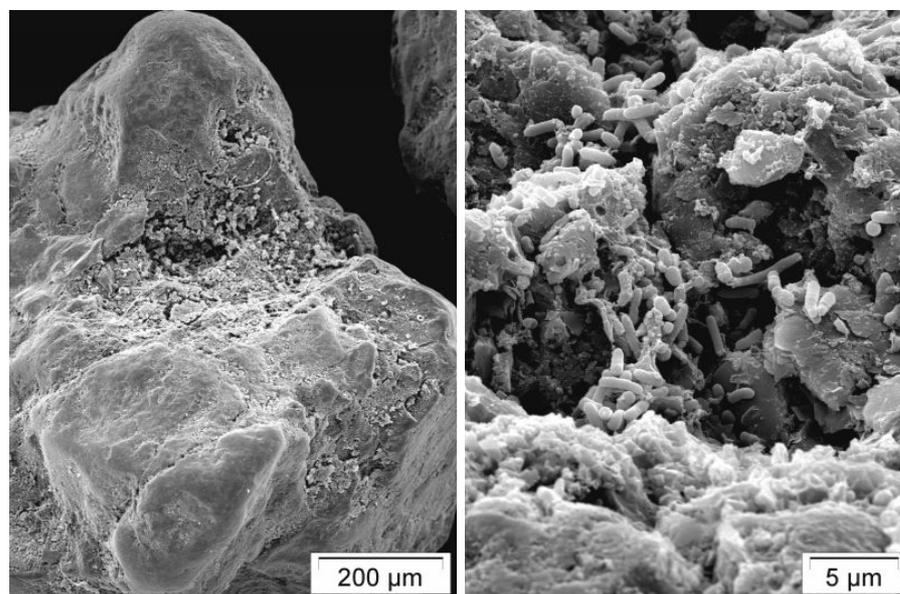


FIG. 4.4 – Observation en microscopie électronique à balayage d'un échantillon de sable colonisé par le biofilm

#### 4.1.1.4 Taille et structure des agrégats

##### a) Observations au MEB

Des observations en microscopie en balayage à différents grossissements ont été réalisées. Davantage d'images sont présentées en annexe C.1. Sont proposées ici les images les plus représentatives et intéressantes des deux types d'échantillons.

L'image de gauche (figure 4.5) montre une culture assez homogène. Les bâtonnets ont tous sensiblement le même diamètre. Leur longueur diffère probablement en fonction de l'âge de la cellule. On observe quelques cellules en début de phase de division (cellule assez longue dans lesquelles on repère deux futures cellules, encadrée en bleu) ou en fin de division (deux cellules encore reliées finement, encadrées en orange). La surface de la paroi cellulaire semble assez lisse. Certaines cellules qui paraissent beaucoup plus petites sont en fait perpendiculaires au plan de l'image.

La photographie de droite (figure 4.5) présente un échantillon de biofilm décroché du sable. Les images de la figure 4.6 ont été prises sur le même échantillon à un grossissement supérieur. On identifie assez nettement les cellules mais leur forme est sensiblement différente des cellules en culture liquide. Le rapport diamètre/longueur augmente. En outre, la surface est beaucoup plus rugueuse. Les cellules semblent recouvertes d'une matrice. Ce sont probablement les polymères qui sont sécrétés. Ceux-ci se présentent également sous la forme de filaments qui relient les cellules

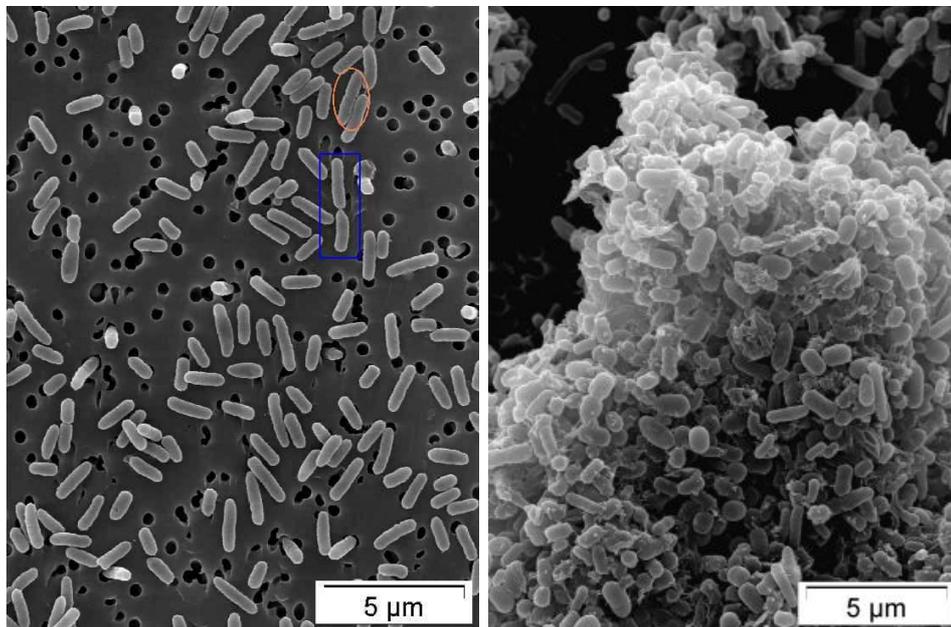


FIG. 4.5 – Échantillons de culture liquide (à gauche) et de biofilm décroché (à droite), observés au MEB avec un grossissement 6000

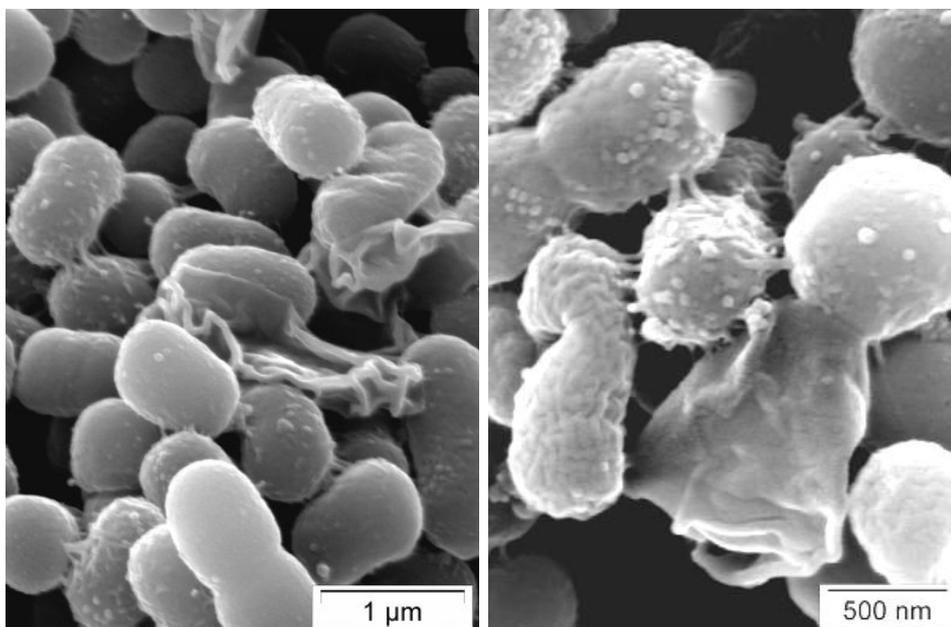


FIG. 4.6 – Fragments de biofilm décroché aux grossissement 30000 et 50000

entre elles. On distingue des formes qui font penser à des cellules mortes. Il semble que celles-ci contribuent à la constitution de la matrice dans laquelle les cellules vivantes du biofilm sont engluées.

*b) Détermination de la dimension fractale*

La dimension fractale des agrégats bactériens peut être illustrée par certaines des observations réalisées au MEB dans les faibles grossissements qui donne une première idée de l'arrangement des cellules dans les floccs bactériens (figure 4.7)

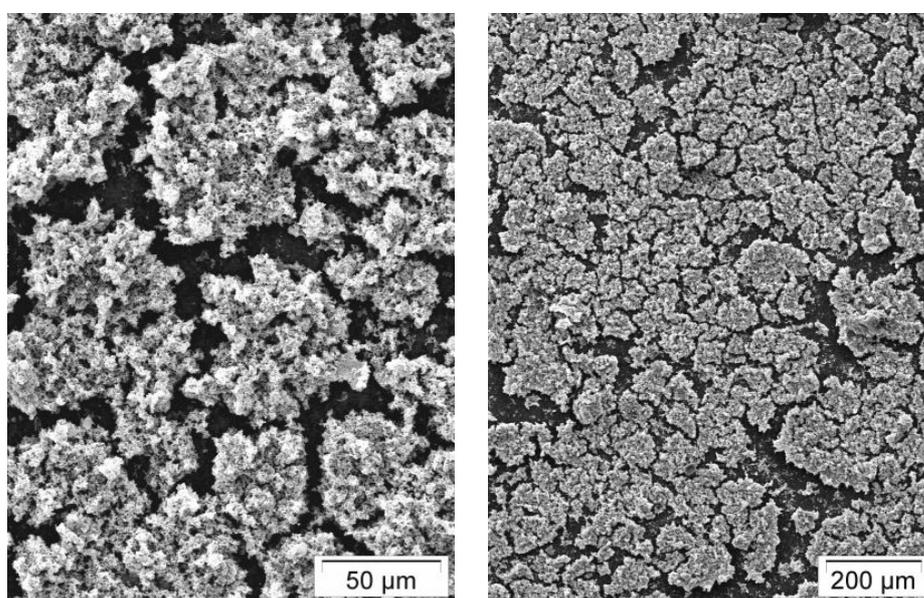


FIG. 4.7 – Observations au MEB de fragments de biofilm

L'évaluation de la granulométrie a fait l'objet de plusieurs séries d'analyses. La difficulté, pour l'obtention de la dimension fractale des agrégats, était d'avoir des particules élémentaires représentatives. Pour cela les échantillons bactériens ont subi un traitement aux ultrasons. Les cultures également présentaient des agrégats qu'il est apparu nécessaire de détruire pour obtenir des particules élémentaires et remonter ainsi à l'information structurelle. Des échantillons de biofilm provenant de différents scénarios de déstabilisation ont été analysés mais nous nous consacrerons seulement à la comparaison entre les échantillons de culture et ceux de biofilm (figure 4.8). L'intégralité des courbes obtenues est présentée en annexe C.3.

L'observation de ces courbes met en évidence que :

- la culture est composée essentiellement de particules de taille micrométrique et de quelques agrégats (quantité importante en % volumique mais faible en nombre) ;

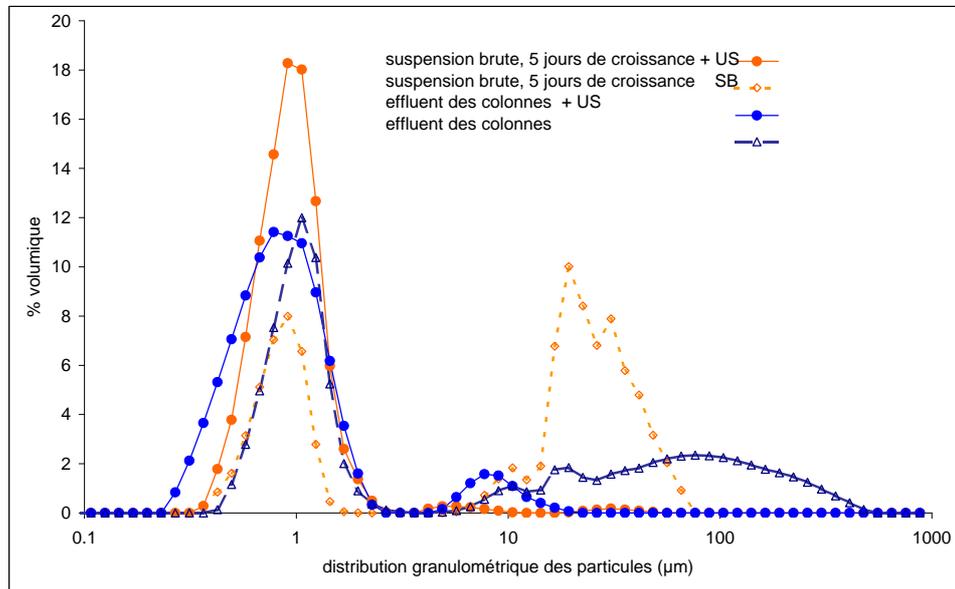


FIG. 4.8 – Distribution granulométrique des particules

- les échantillons de biofilm présentent cette même tendance : des particules d'un micron environ de taille, ainsi que des agrégats, dont la taille varie entre 10 et 100  $\mu\text{m}$  ;
- si la taille des petites particules demeure constante pour les deux échantillons considérés, la taille des agrégats est sensiblement différente ;
- le passage aux ultrasons (trait plein), que ce soit pour la culture (courbe orange) ou le biofilm (courbe bleue), permet d'enlever les agrégats et on obtient alors des particules élémentaires de taille essentiellement légèrement inférieure au micron ;
- le passage aux ultrasons décale légèrement les courbes vers la gauche, c'est-à-dire vers des particules de taille plus petite.

L'analyse de certaines des courbes, à la lumière des données obtenues sur les particules élémentaires, a permis d'obtenir une dimension fractale<sup>4</sup>.

Il est important dans tous les cas de savoir à partir de quelles particules élémentaires le calcul a été réalisé. **La culture présente une dimension fractale de 2,2**<sup>5</sup>. Cette valeur est proche des valeurs trouvées par Lambert *et al.*, 2003, pour *Escherichia Coli* (voir section 2.2.5.b). **Les échantillons de biofilm**, selon que les particules élémentaires sont ce même échantillon passé

<sup>4</sup>Plus précisément, il s'agit de la dimension fractale des plus gros éléments des suspensions.

<sup>5</sup>Les particules élémentaires sont bien sûr la culture après passage aux ultrasons.

aux ultrasons ou la culture elle-même passée aux ultrasons, **ont des dimensions fractales de 1,3 et 1,4 ou 1,8 et 2 respectivement**. Au-delà de la précision de la valeur et de sa signification, il faut noter que la suspension bactérienne présente une structure de dimension fractale plus importante que l'effluent de la colonne. Ainsi, la suspension bactérienne en culture est déjà une structure complexe et non la juxtaposition de particules dispersées.

A partir d'images en MEB, Chavant *et al.*, 2002, expliquent la présence d'espaces vides dans la structure des biofilms comme des canaux d'eaux qui permettent la distribution et la circulation des nutriments et de l'oxygène dans le biofilm.

En outre, ces résultats paraissent contradictoires avec les images obtenues pour ces mêmes échantillons en MEB (figure 4.5). Le mode de préparation des échantillons au MEB en est probablement responsable. Les nécessaires lavages et centrifugations ont pu totalement déstructurer la culture bactérienne, qui, en imagerie, est apparue comme un ensemble de cellules isolées.

Ce qu'on peut en déduire c'est que les liens entre cellules dans le cas de la culture bactérienne sont probablement plus fragiles que dans le cas du biofilm puisqu'une partie de la matrice est encore présente lors de l'observation au MEB. On a néanmoins pu observer, dans l'échantillon de cellules libres quelques agrégats qui attestent de la capacité d'agrégation y compris dans la culture en milieu liquide.

La collecte des échantillons (passage de l'échantillon dans une pompe péristaltique et risque de déstructuration) ainsi que le délai d'analyses (qui peut être en partie responsable de la formation d'agrégats) peuvent avoir perturbé l'étude des échantillons de biofilm cependant il n'était pas envisageable de mettre en place un autre système de collecte des échantillons de biofilm en sortie de colonne en maintenant les mêmes conditions (en particulier de non-saturation du milieu poreux).

## 4.1.2 Réactivité des surfaces

### 4.1.2.1 Hydrophobie

Les essais d'adhésion à l'hexadécane ont permis de quantifier le caractère hydrophobe en l'exprimant par le coefficient de partage  $K_{HW}$ . Ces essais ont porté sur 10 échantillons, 5 de biofilm et 5 de cellules planctoniques.

$K_{HW} = 37,1 \pm 12,5$  **pour les échantillons de biofilm et**  $27,3 \pm 7,2$  **pour les cellules libres de *Pseudomonas putida***. Ces valeurs montrent le caractère légèrement plus hydrophobe des cellules attachées à une surface. Ces valeurs sont dans les plages de valeurs communément rapportées pour des souches bactériennes (voir tableau 2.2). Les résultats proposés par Black *et al.*, 2004, pour une souche de *Streptococcus sanguis* vont dans le même sens mais sont bien plus marqués : 68,7% d'adhésion pour le biofilm et aucune adhésion pour les cellules planctoniques. En allant plus loin dans

cette caractérisation du caractère hydrophobe Black *et al.*, 2004, corrélient le caractère hydrophobe à l'expression d'une protéine d'adhésion CshA<sup>6</sup>, les deux étant élevés dans les cellules sous forme de biofilm contrairement aux cellules planctoniques.

#### 4.1.2.2 Charge de surface

A partir des valeurs de potentiel mesurées sur trois échantillons de chaque échantillon, à différents pH, une courbe moyenne du potentiel a été tracée (figure 4.9). Les courbes ont été extrapolées toutes les 0,1 unités de pH à partir des valeurs expérimentales. Les écarts types montrent une certaine variabilité de la mesure.

Les deux types d'échantillons présentent un potentiel de surface proche et relativement constant à partir de pH 5. Les surfaces sont négativement chargées entre -10 et -20 mV. En dessous de pH 4, l'échantillon de biofilm est chargé plus négativement que les cellules libres. Cette description est conforme à ce que proposent Cowan *et al.*, 1992, qui expliquent que cette dépendance au pH est caractéristique des surfaces amino-carboxyles.

**Le point isoélectrique est situé pour le biofilm entre pH 2,5 et 3,5 alors qu'il est de l'ordre de 4 pour les cellules planctoniques.**

Ces valeurs de point isoélectrique restent proches des valeurs fréquemment citées dans la littérature : pH 3,5 pour *Nocardia* (Sadowski, 2001), autour de pH 3,5 pour *Peptostreptococcus micros* et *Streptococcus mitis* (Cowan *et al.*, 1992), entre 2,0 et 3,5 pour *Lysteria monocytogenes* (Chavant *et al.*, 2002).

La charge électronégative globale sur la gamme de pH peut indiquer la présence, sur les surfaces cellulaires, de composés ayant un faible pKa (Chavant *et al.*, 2002).

#### 4.1.2.3 Capacité d'échange de protons

#### 4.1.2.4 Remarques et résultats préliminaires

Plusieurs séries de titrations ont permis de mettre en place et de valider le protocole ainsi que de définir certains paramètres, comme la concentration initiale de la suspension bactérienne, le critère de stabilité de l'électrode pH ou le temps préalable d'équilibration de la suspension bactérienne.

Ensuite, d'autres expériences ont permis d'évaluer les limites du protocole de titration en particulier en estimant la reproductibilité des expériences, leur réversibilité. Un blanc avec du sable non colonisé a été réalisé pour évaluer la réactivité du sable par rapport au biofilm.

---

<sup>6</sup>La protéine d'adhésion CshA est grande (259 KDa) et retenue à la surface de la cellule par une séquence terminée par un carboxyle. Les deux tiers de la protéines contiennent une répétition de blocs amines supposés maintenir la partie adhésive à distance de la surface bactérienne.

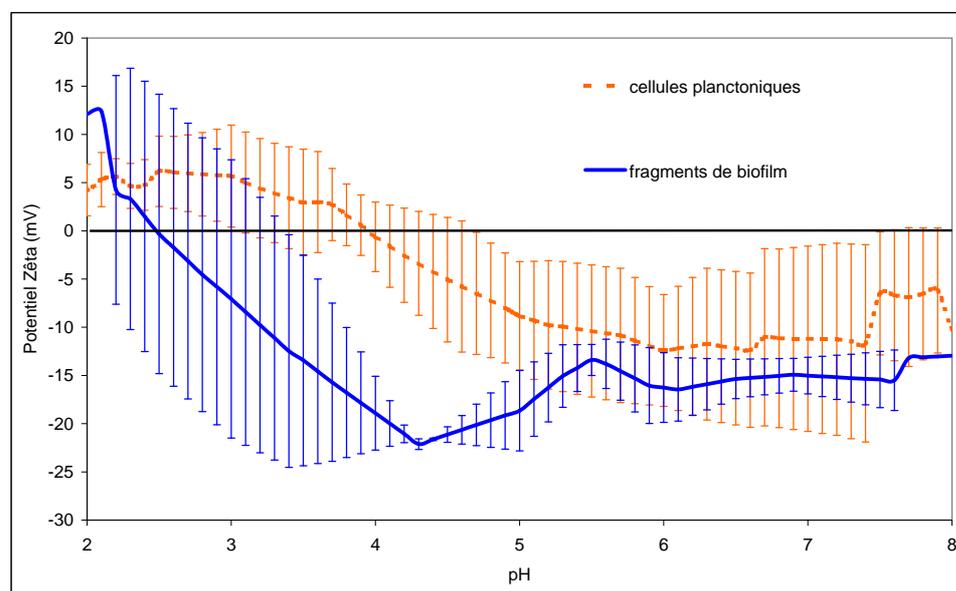


FIG. 4.9 – Potentiel Zêta des bactéries sous les deux formes étudiées

a) *Éléments préalables pour l'analyse des courbes de titration*

Les courbes présentées ici donnent, sur une gamme de pH, les variations de  $H_s$ , la quantité de protons échangés par la surface. L'unité de  $H_s$  peut être en mol/L ou en mol par unité de surface ou de masse sèche. Cette conversion permet de tenir compte de la quantité de surfaces réactives mise dans le réacteur. Celle-ci est peu variable pour les expériences proposées ici et donc la concentration en mol/L est parfois utilisée directement pour faire les comparaisons quand les échantillons étaient de même concentration initiale. Le facteur de conversion, estimé pour les cellules planctoniques et utilisé pour les deux types d'échantillons, est : 0,54 g protéines par g M.S. La valeur donnée par gramme de protéines est plus juste, la quantité de protéines ayant été mesurée sur chaque échantillon. Toutefois, nous avons eu besoin de convertir pour comparer aux données obtenues dans d'autres études.

Les valeurs des constantes de déprotonation, les  $pK$ , correspondent aux points d'inflexion de la courbe (Van der Wal *et al.*, 1997). C'est ce qu'il importe de prendre en compte lorsqu'on compare plusieurs courbes.

b) *Influence de la température*

Les expériences se sont déroulées à température ambiante mais un essai à 4°C a été réalisé pour estimer l'importance de la température dans les processus considérés. L'essai a consisté à suivre le pH d'une suspension

bactérienne à 4° et la même chose avait été faite dans les mêmes conditions<sup>7</sup> à 24°C. Alors qu'aucune variation temporelle significative n'est notée à 4°C, plus de 2 unités pH d'écart apparaissent à température ambiante, au bout de 24h.

On peut faire l'hypothèse qu'une baisse de la température réduit voire empêche les processus métaboliques de la bactérie, qui peuvent être responsables d'une acidification (Davet, 1996) du réacteur. En pratique, les titrations vont se faire dans les conditions des autres expériences, c'est-à-dire à température ambiante. Pour limiter l'incidence de cette dérive du pH au cours du temps, nous avons choisi un critère de stabilité de l'électrode pH moins contraignant qui permette de ne pas attendre trop longtemps entre deux ajouts d'acide ou de base. Ainsi la durée totale d'une titration n'excède pas quelques heures.

Cependant, le problème de travailler à de telles températures est que le métabolisme des bactéries est inhibé. Dans la même logique, certains auteurs travaillent avec des organismes morts (traités au formaldéhyde par exemple) (Goncalves *et al.*, 1987). Mais une question de pertinence et de validité des résultats pour des bactéries vivantes se pose alors. Cela permet toutefois d'isoler certains processus. Les processus de biosorption sont en effet en partie indépendants du métabolisme (sorption physique ou chimique) ou liés au métabolisme (transport interne, précipitation extracellulaire) (Chen *et al.*, 2000). Nous avons choisi de travailler sur l'ensemble des processus mis en jeu et pour cela avons travaillé à température ambiante en tenant compte des limites mises en évidence par le travail à 4°C.

### c) Réplicabilité

D'une part pour préciser le protocole, d'autre part pour s'assurer de la répliquabilité de celles-ci, plusieurs séries de mesures ont été réalisées et même si elles diffèrent au niveau de quelques ajustements, il est intéressant d'observer la répliquabilité des résultats obtenus. Un graphe présentant l'ensemble des courbes est proposé en annexe. Ce qu'il faut retenir est la plus importante variabilité entre des séries de mesure provenant d'échantillons différents (bien qu'ayant été produits dans les mêmes conditions) qu'entre plusieurs analyses de sous échantillons provenant d'un même échantillon source. Ainsi, il semble que la variabilité tiende davantage à la reproductibilité des échantillons et que le protocole de mesure, lui, permette une bonne répliquabilité de l'analyse. La même conclusion est avancée par Wightman *et al.*, 2001. Ces résultats sont cohérents avec les travaux de Durand, 2003a, qui mettent en évidence sur *Ralstonia metallidurans*, la très forte influence de l'âge de la culture sur la courbe de titration. Il importe donc, si l'on souhaite comparer des titrations, de maîtriser au mieux ce paramètre. En outre, il semble plus facile d'obtenir une bonne répliquabilité des échantillons de biofilm. Ceci peut être expliqué par une plus grande inertie du biofilm par rapport aux cellules planctoniques. Les échantillons

<sup>7</sup>agitation constante notamment

de biofilm sont en quelque sorte davantage résistants et stables vis-à-vis de perturbations et sont donc davantage homogènes entre eux (Maier *et al.*, 2000).

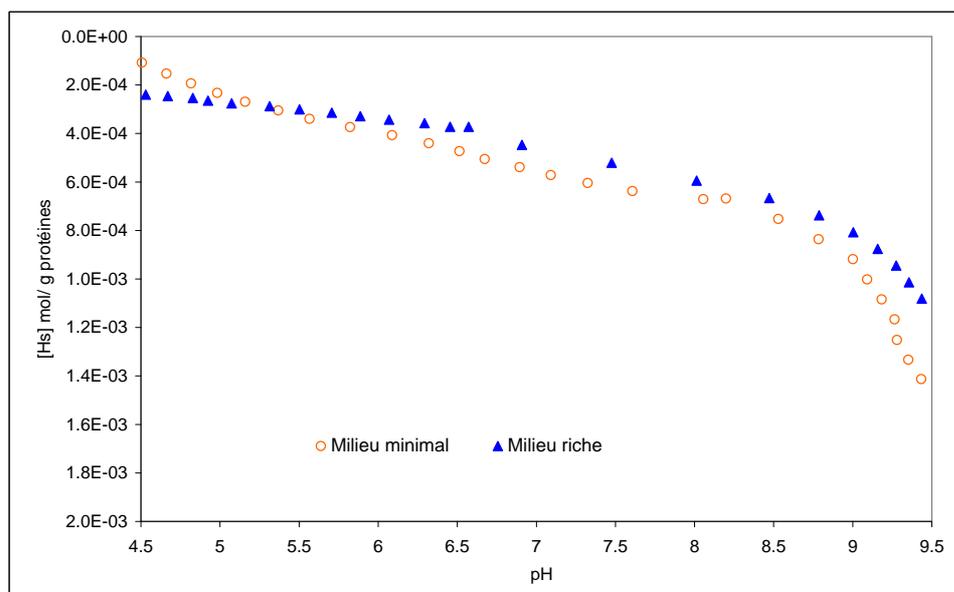


FIG. 4.10 – Titrations en milieux différents

La nature du milieu de croissance est susceptible d'affecter le type de groupes fonctionnels de surface et les capacités de sorption d'une même souche (Cox *et al.*, 1999). Dans notre cas, des titrations de cultures de *Pseudomonas putida* dans deux milieux de croissance différents n'ont pas permis d'observer d'importantes différences (figure 4.10). En effet les points d'inflexion des deux courbes et l'amplitude des protons échangés dans les deux cas sont proches. Ces résultats avaient par ailleurs été observés sur une autre bactérie à Gram négatif *Shewanella putrefaciens*; quelle que soit la richesse du milieu de croissance les capacités d'échange de protons restaient sensiblement les mêmes (Haas, 2004). D'après cette étude, ce sont les conditions aérobies ou anaérobies, plutôt que la nature du milieu ou l'âge de la culture, qui vont modifier les propriétés de surface des bactéries.

#### d) Réversibilité

En préalable aux essais, nous nous sommes aussi intéressés à la réversibilité des réactions étudiées. Pour cela un ajout acide ou basique préalable permet d'obtenir une titration à partir d'un état initial à pH basique ou acide. D'autre part des titrations d'abord par ajout acide, puis par ajout basique (et l'inverse) sur le même échantillon ont été faites.

Le graphique (figure 4.11) fait apparaître des différences au niveau de la quantité absolue de protons échangés. A  $\text{pH} > 7$ , toutes les courbes sont très proches alors que vers les  $\text{pH}$  acides, des comportements légèrement différents sont visibles. Cependant, les variations des courbes et l'amplitude relative de la quantité de protons échangés restent sensiblement identiques, sauf pour l'échantillon préalablement acidifié (trait épais). En effet les points d'inflexion de cette courbe sont beaucoup moins nets que pour les autres. Dans ce cas là, il est vraisemblable qu'une lyse de la cellule a eu lieu. On peut supposer que des groupes fonctionnels présents dans la cellule se sont ajoutés aux groupes fonctionnels de surface et ont ainsi accru la réactivité de la suspension.

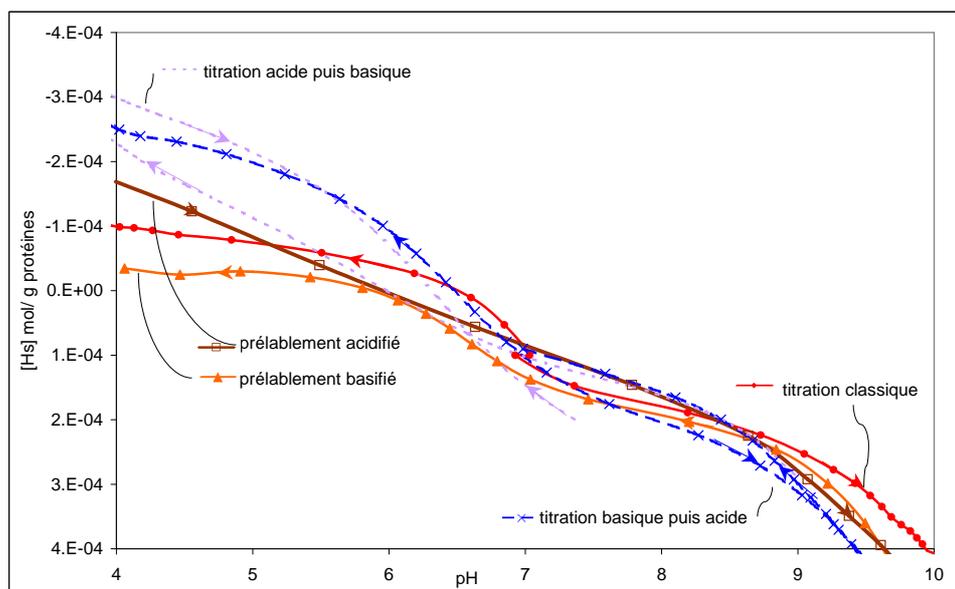


FIG. 4.11 – Réversibilité des titrations

Finalement, les processus d'échange de protons avec les surfaces bactériennes sont réversibles mais dans des cas extrêmes ( $\text{pH} < 3$ ), les modifications de l'état des cellules (et entre autres, la possible flocculation des cellules ou leur décomposition) vont évidemment avoir une influence sur la réactivité de la suspension. Reste que des  $\text{pH}$  2 à 4 sont relativement rares dans les milieux naturels.

Ces résultats sont en accord avec les précédents travaux de Wightman *et al.*, 2001, et Plette *et al.*, 1995.

e) *Réactivité du sable*

Pour ne pas perdre de vue l'utilisation de ces données lors de la modélisation des essais en colonnes, il est apparu opportun de s'intéresser aussi, à un échantillon de référence de la colonne, et donc à la réactivité du sable. Ainsi une courbe de titration du sable a été réalisée dans les mêmes conditions que les titrations sur les échantillons bactériens. Il apparaît que la quantité de sable mise dans le réacteur, 5 grammes, ne permet pas d'obtenir une réactivité significative. C'est seulement à partir de pH 9, pH de dissolution de la silice, qu'une variation de la quantité de protons échangés va pouvoir être observée (figure en annexe C.4). La réactivité du sable entre pH 4 et pH 8 est  $10^{-6}$  mol  $H^+$  /g M.S.

#### 4.1.2.5 Résultats et modélisation

Nous avons choisi de présenter ici plus en détails l'exploitation de deux séries de titrations, l'une avec les échantillons de culture en milieu minimal, l'autre sur les échantillons de biofilm provenant de la déstabilisation des colonnes. Dans chacun des cas les titrations ont été fait en triplicat dans les mêmes conditions et avec les mêmes critères de stabilité. Les résultats, convertis en mol de protons par g de protéines, sont présentés dans la figure 4.12. Les résultats bruts sont présentés en annexe C.4.

Avant d'entrer dans le détail de l'interprétation de l'allure de ces courbes, nous pouvons déjà déterminer la quantité de protons échangés par les deux types d'échantillons entre pH 4 et 10. Il apparaît clairement que pour une même quantité de protéines les échantillons de biofilm sont plus réactifs, c'est-à-dire qu'ils échangent plus de protons. Par gramme de protéines, plus de 10 mmol de protons sont échangées par le biofilm et 2 à 3 par les cellules planctoniques.

a) *Rappel : modèle utilisé*

L'hypothèse sur laquelle repose l'analyse des résultats est la suivante. Il s'agit d'un modèle non électrostatique dans lequel nous avons considéré que les échanges de protons sont des phénomènes régis par des équilibres thermodynamiques qui s'écrivent sous la forme :



où S est la surface considérée, X un groupe fonctionnel et K la constante de cet équilibre.

b) *Optimisation des constantes sous GRFIT*

La recherche semi-automatique du meilleur ajustement avec GRFIT des courbes théoriques et expérimentales se fait en plusieurs étapes. Pour chacune des courbes une première étape consiste à ne considérer qu'un seul

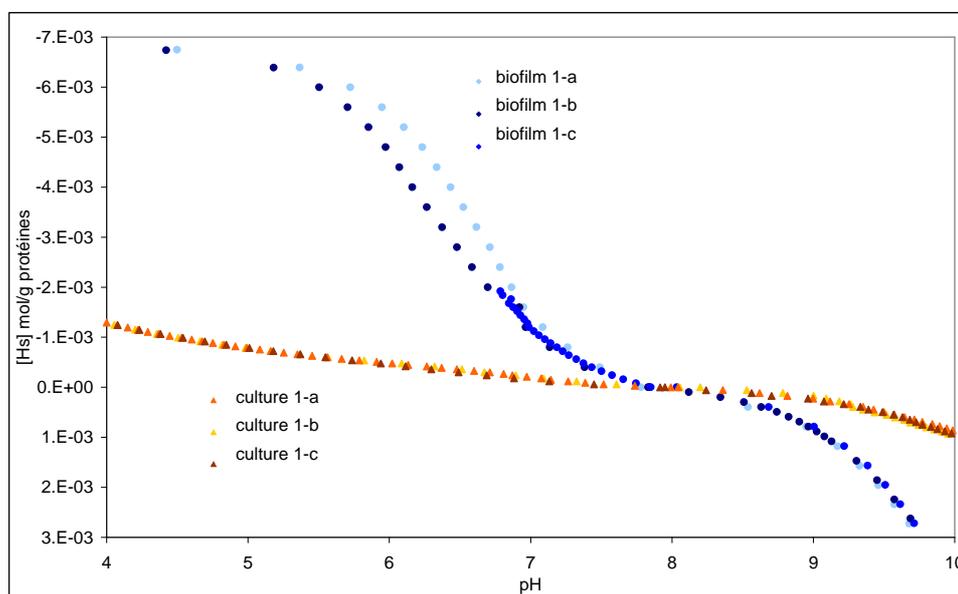


FIG. 4.12 – Titrations biofilm et culture

site d'échange. Cette tentative n'a pas abouti à un résultat satisfaisant. Ensuite des ajustements avec des courbes théoriques à partir de deux ou trois sites ont été réalisés. On contraint le modèle par le choix, visuel, de valeurs de pK proches de celles à optimiser. Pour chaque courbe, plusieurs ensembles de solutions (pK, nombres de sites) permettent une bonne approche de la courbe. Il est nécessaire d'écartier une à une les valeurs qui n'ont pas de sens (valeurs pK extrêmes en particulier ou concentrations de sites impossibles).

### c) Résultats

Après optimisation des constantes, les courbes en trait plein sont obtenues pour ajuster les données expérimentales (figures 4.13 et 4.14). La modélisation de la titration des cellules bactériennes en culture n'aboutit pas à un résultat satisfaisant lorsque seuls 2 sites sont mis en jeu. La définition d'un troisième site est nécessaire. Ce n'est pas le cas pour la titration des fragments de biofilm qui peut être modélisée avec deux sites fonctionnels. Dans ce cas là il est possible qu'un troisième site soit également présent mais en concentration négligeable par rapport aux deux précédents et pour cela il est possible d'obtenir une bonne approximation de la courbe malgré tout.

Il semble ainsi que les cellules sous forme de biofilm ont amplifié deux de leurs sites de rétention et non le troisième.

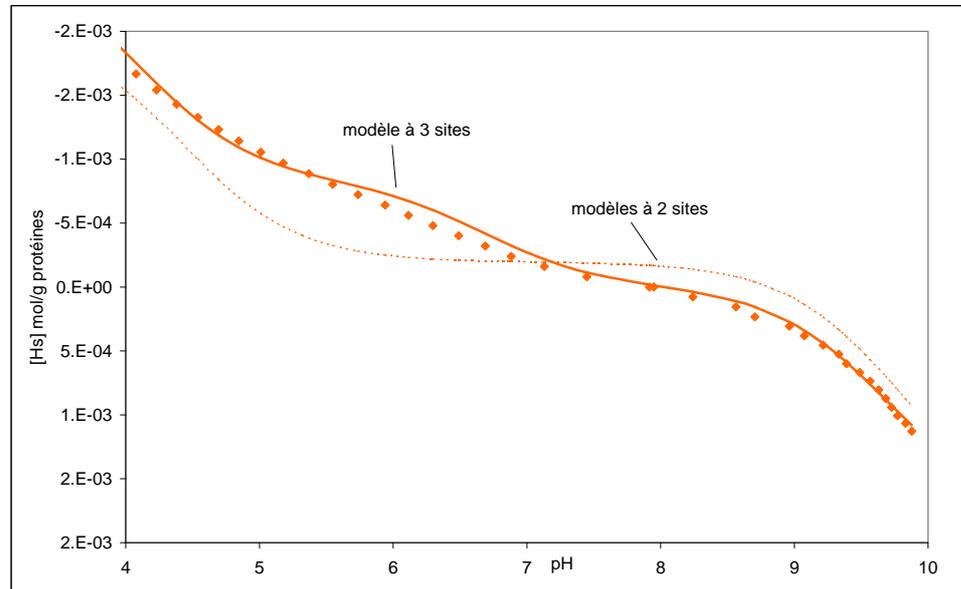


FIG. 4.13 – Modélisation d'une titration de culture bactérienne

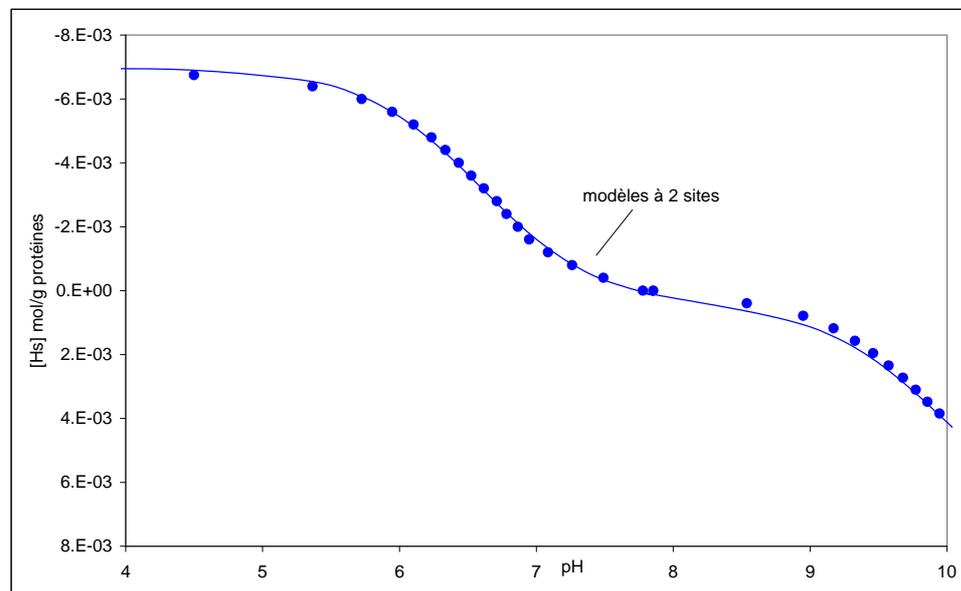


FIG. 4.14 – Modélisation d'une titration de fragments de biofilm

Les valeurs optimisées sont reportées dans le tableau 4.2. Chaque ligne représente la moyenne de valeurs optimisées pour chacun des triplicats.

TAB. 4.2 – Valeurs des constantes d'équilibre des réactions de déprotonation et concentration des groupements fonctionnels correspondant en mmol/g protéine, à la surface des cellules de *Pseudomonas putida*

	pK1	[sites1]	pK2	[sites2]	pK3	[sites3]
culture bactérienne 1	8,75	0,19	6,15	0,27	2,1	0,48
culture bactérienne 2	9,4	0,27	6,67	0,12	4,2	0,27
culture bactérienne 3	10,0	0,41	6,7	0,09	3,6	0,34
culture bactérienne 4	9,3	0,29	6,3	0,16	3,4	0,29
biofilm 1	10,0	7,2	6,4	7,4		
biofilm 2	10,2	6,8	6,6	7,4		
biofilm 3	10,8	20,7	6,3	20,8		

Ces valeurs peuvent être comparées à celles obtenues sur d'autres souches bactériennes. Elles sont reportées dans le tableau 2.3 et reprises dans l'histogramme des figures 4.15, 4.16 et 4.17. Notons cependant que des modèles différents ont été utilisés dans les études présentées. De plus pour pouvoir comparer les densités de site classiquement exprimées en mol/g M.S., nous avons retenu le même ratio protéines/matière sèche pour les cellules planctoniques et les fragments de biofilm, pour lesquels la matière sèche n'a pas été directement évaluée.

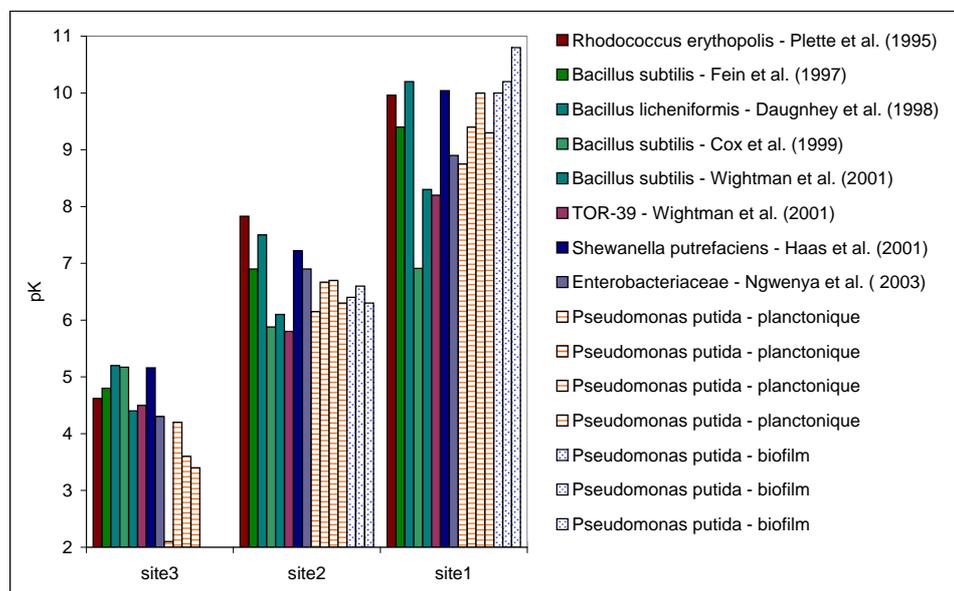


FIG. 4.15 – Comparaison des valeurs pK trouvées à celles d'autres souches bactériennes

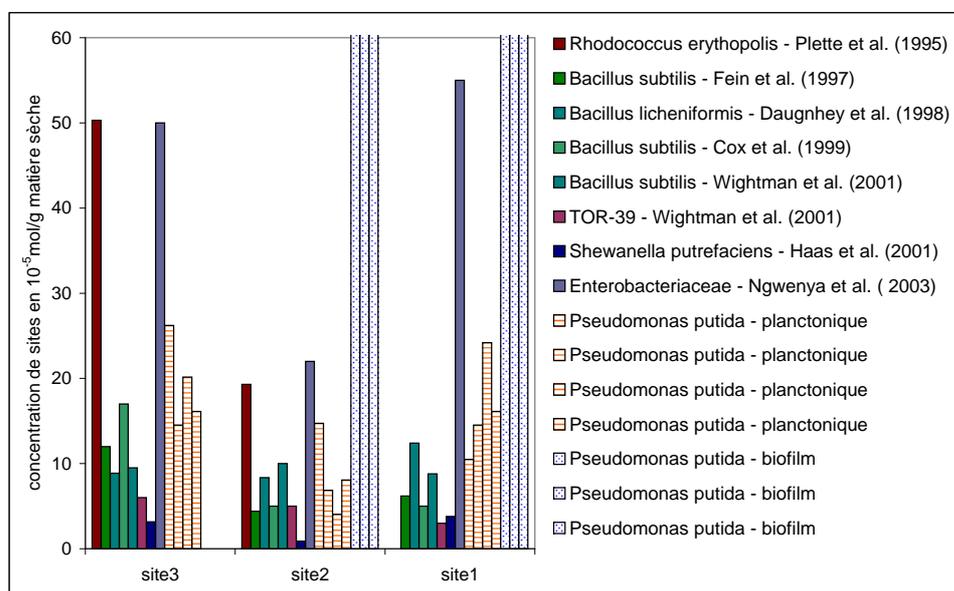


FIG. 4.16 – Densité de sites à la surface des bactéries - zoom sur les faibles concentrations

Pour les cellules bactériennes, la valeur de  $pK3$  est plutôt faible par rapport à ce qui se trouve dans la littérature pour d'autres souches bactériennes, alors que les deux autres valeurs correspondent tout à fait aux valeurs communément trouvées. Il en est de même pour les deux constantes d'équilibre déterminées pour les fragments de biofilm : elles sont dans la fourchette définie par les valeurs rapportées pour les autres souches. Soulignons toutefois que toutes les autres études mentionnées ici se réfèrent à des cellules planctoniques et non à des cellules sous forme de biofilm.

Ensuite, en couplant les résultats modélisés et la mesure de la teneur en protéines dans chaque échantillon, il est possible d'évaluer la densité de sites réactifs par unité de masse. Ainsi, les densités de sites relevées pour les cellules planctoniques sont  $2,9 \cdot 10^{-4}$  moles par gramme de protéines pour le premier site,  $1,6 \cdot 10^{-4}$  moles par gramme de protéines pour le deuxième site et  $3,5 \cdot 10^{-4}$  moles par gramme de protéines pour le dernier. Ces densités exprimées en moles par gramme M.S. sont :  $1,6 \cdot 10^{-4}$  pour le premier site,  $0,9 \cdot 10^{-4}$  pour le deuxième site et  $1,9 \cdot 10^{-4}$  pour le troisième. Pour le biofilm la densité de sites est supérieure et équivalente pour les deux sites considérés : 12 et  $11 \cdot 10^{-3}$  moles par gramme de protéines soit  $6,5$  et  $6,3 \cdot 10^{-3}$  moles par gramme M.S.

Là encore, en se référant au tableau 2.3 on peut comparer les valeurs obtenues ici avec celles obtenues pour d'autres souches bactériennes, mais dans ce cas on utilise les valeurs obtenues par g M.S.

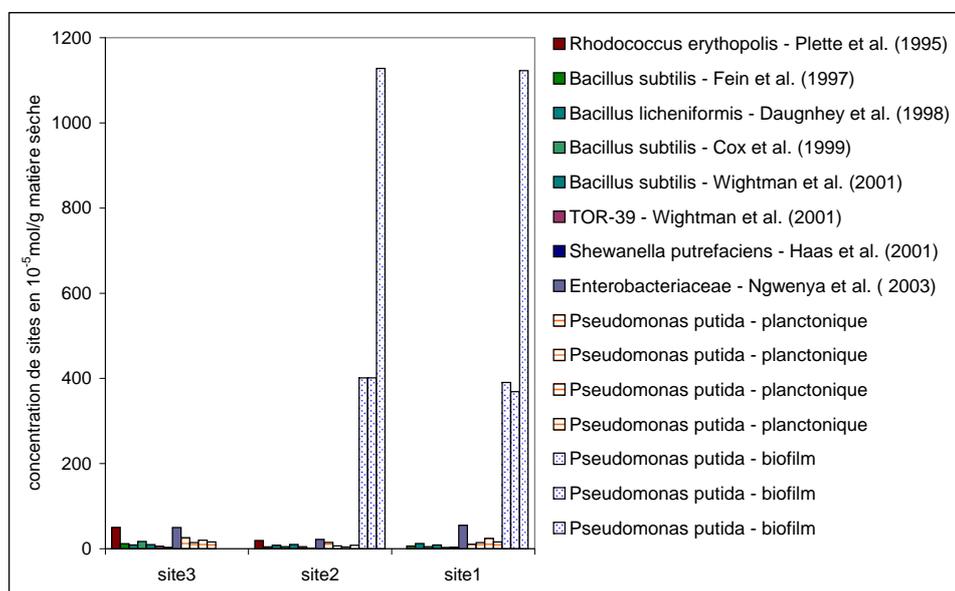


FIG. 4.17 – Densité de sites à la surface des bactéries

Il apparaît clairement que, alors que la quantité de sites trouvée sur les cellules libres est d'un ordre de grandeur comparable à d'autres études sur d'autres souches, les échantillons de biofilm présentent une concentration de sites très élevée.

Les différences entre les souches bactériennes peuvent être liées au caractère Gram positif ou Gram négatif des cellules (Haas *et al.*, 2001) (voir section 2.2.3). En effet, les parois des bactéries à Gram positif sont principalement constituées de peptidoglycane qui est par nature anionique principalement, et regroupe plusieurs sites fonctionnels, notamment phosphate, carboxyle et hydroxyle (Cox *et al.*, 1999). Par contre, les bactéries à Gram négatif, comme *Pseudomonas putida*, sont un mélange également de lipopolysaccharides et de protéines susceptibles d'apporter un complément de groupes amines (Haas *et al.*, 2001). Ainsi les parois des bactéries à Gram positif sont susceptibles de présenter une légèrement plus faible densité de groupements fonctionnels (Cox *et al.*, 1999; Ngwenya *et al.*, 2003).

D'autre part, les différences entre cellules planctoniques et cellules sous forme de biofilm peuvent avoir deux origines. Soit on considère que ce sont les polymères sécrétés par les cellules qui sont très réactifs, comme cela a été évoqué par plusieurs auteurs (Black *et al.*, 2004). Leur production en quantité importante lors de la formation du biofilm confère à celui-ci une importante concentration de groupements fonctionnels de surface. Certains auteurs suggèrent également une modification de la paroi des cel-

TAB. 4.3 – Les sites d'échange protonique des bactéries (Cox *et al.*, 1999; Haas *et al.*, 2001)

Site	Partie de la paroi bactérienne	Valeur du pK
Carboxyle	Peptidoglycane	2 à 6
	Acides teichuroniques	
	Acides gras des lipopolysaccharides	
Phosphodiesters	Acides teichoïques et liaisons avec le peptidoglycane	3,2 à 3,5
Phosphore	Acides teichoïques	0,2 à 2,91 et 5,65 à 7,2
Amine	Partie peptide du peptidoglycane	9,0 à 11,0
	Glucosamine et galactosamine	
Hydroxyle	Résidu d'acide muramique sur la partie peptide du peptidoglycane	8 à 12
	Acides teichoïques et teichuroniques	12 à 13

lules bactériennes en fonction de son stade de croissance et a fortiori lors de processus d'attachement à des surfaces (Bruinsma *et al.*, 2001).

#### d) Interprétation

Les titrations acido-basiques ne permettent pas de connaître directement la nature des sites échangeurs de protons mais il est possible d'en avoir une idée en les comparant avec les valeurs pK des composés modèles (Cox *et al.*, 1999). Comme suggéré par Haas *et al.*, 2001, ou Fein *et al.*, 1997, la confirmation des modèles proposés doit passer par des études spectroscopiques de la paroi cellulaire. Pour l'instant, les quelques études qui sont allées en ce sens (Kelly *et al.*, 2002; Sokolov *et al.*, 2001) ont confirmé les résultats de précédentes analyses et interprétations.

Des valeurs de constantes de déprotonation des sites, permettent également d'avoir une première idée de la composition des surfaces. En annexe A.4 sont recensées des valeurs de constantes de déprotonation pour les groupes amine, hydroxyle et carboxyle (tableau A.1).

En outre, la connaissance de la composition de la paroi bactérienne permet déjà d'avoir une idée des sites potentiellement présents sur les surfaces cellulaires. Des données proposées par Haas *et al.*, 2001, et Cox *et al.*, 1999, sont reprises dans le tableau 4.3. Par ailleurs, la connaissance des principaux composés des EPS (tableau 4.4) permet d'avoir une idée des groupes fonctionnels supplémentaires susceptibles d'être mis en jeu lorsque les cellules sont sous forme de biofilm.

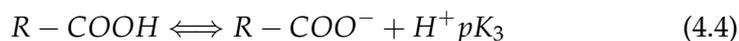
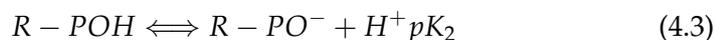
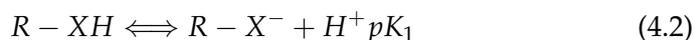
Les études présentées dans le tableau 2.3 ont en commun l'identification des deux premiers sites. Avec une constante de dissociation entre 3 et 5, le groupement carboxyle est unanimement associé au pK le plus bas déduit

TAB. 4.4 – Composition des EPS (Flemming, 1993)

Composés	Principaux constituants
Polysaccharides	Monosaccharides, acides uroniques et sucres aminés
Polypeptides	Acides aminés
Acides nucléiques	Nucléotides
Phospho-lipides	Acides gras, glycerol, phosphate, alcools et isoprene
Substances humiques	Composés phénoliques, sucres simples et acides aminés

des titrations de surface. Seuls Sokolov *et al.*, 2001, et Cox *et al.*, 1999, identifient un premier site phosphodiester au plus bas pK avant le site carboxyle qu'ils envisagent aussi comme un site phosphoryle. Autour de pH 6,5, un groupement phosphate ou phosphoryle est généralement associé à cette deuxième constante. La valeur du plus haut pK varie selon les auteurs et son interprétation également. Certains l'associent à un groupement amine, d'autres hydroxyle ou plus précisément pour Cox *et al.*, 1999, phénol. Les justifications avancées par les auteurs à ce sujet n'étant pas satisfaisantes et n'ayant pas non plus d'éléments complémentaires qui justifierait l'identification de ce troisième groupement fonctionnel, nous l'appellerons site X, pour site amine ou hydroxyle.

Ainsi, selon les hypothèses qui ont été formulées, trois principales équations régissent l'équilibre entre les surfaces bactériennes des cellules libres et les protons, les deux premières s'appliquant également dans le cas des fragments de biofilm.



**Les valeurs moyennes des pK sont pK<sub>1</sub> = 9,3, pK<sub>2</sub> = 6,3 et pK<sub>3</sub> = 3,4 pour les cellules planctoniques et pK<sub>1</sub> = 10,8 et pK<sub>2</sub> = 6,3 pour les fragments de biofilm.**

A partir des densités de sites évaluées, des ratios entre les différents sites sont calculés. Ils sont, respectivement pour les groupes fonctionnels carboxyles/phosphate/groupe X : 2/1/2 pour les cellules libres et 1/1 pour les groupements phosphate et groupe X pour le biofilm.

Plette *et al.*, 1995, rapportent un ratio 2/1 pour les groupes carboxyl et amine et mentionnent que la structure du peptidoglycane présente un ratio 3/1.

Ce qui est mis en évidence dans les valeurs obtenues ici sur *Pseudomonas putida* est l'importance prise par le groupe hydroxyle ou amine, aux dépens, en particulier des groupements carboxyles.

### 4.1.3 Capacité d'adsorption du zinc

#### a) Remarques et résultats préliminaires

$\alpha$ ) Éléments préalables pour l'analyse des courbes présentées. — Les courbes suivantes présentent la concentration de zinc retenue  $C_s$  en fonction, soit du temps, soit de la concentration de zinc restant à l'équilibre  $C_e$ . Les concentrations de zinc peuvent être exprimées en mg/L, en mol/L ou en pourcentage de la quantité initiale de zinc mise en solution,  $C_i$ . Dans tous les cas, il y a égalité entre la quantité de zinc initiale, et la somme de la quantité de zinc sorbée et de celle restant en solution à l'équilibre :

$$q_i = q_s + q_e \quad (4.5)$$

Aux pH auxquels nous avons travaillé, le zinc est principalement sous forme  $Zn^{2+}$ , les oxydes de zinc étant négligeables (voir diagramme de spéciation en annexe A.3), donc nous avons assimilé tout le zinc mesuré à du  $Zn^{2+}$ .

$\beta$ ) Cinétique. — La figure 4.18 propose l'évolution, en fonction du temps de la quantité de zinc adsorbée. Cette quantité est représentée comme un pourcentage de la quantité de zinc mise en contact avec l'échantillon. Trois courbes, correspondant à des concentrations initiales de zinc de 5, 10 et 20 mg/L, sont représentées. L'intégralité des concentrations est présentée en annexe C.6. Dans tous les cas, un état stationnaire est très rapidement atteint, moins de quelques minutes suffisent pour que les processus d'adsorption soient mis en oeuvre. Numériquement, 95% du zinc adsorbé à l'état final (c'est-à-dire au bout de 24 heures) l'est en moins d'un quart d'heure. La rapidité de ce phénomène a déjà été avancée pour d'autres métaux et d'autres bactéries : gadolinium par plusieurs souches et notamment *Saccharomyces cerevisiae* (Andres *et al.*, 2000), calcium et cadmium par *Bacillus subtilis* (Fowle et Fein, 1999) ou zinc sur des biocolloïdes (Norton *et al.*, 2004).

#### b) Isotherme d'adsorption du zinc

La figure 4.19 présente une isotherme moyenne obtenue lors des essais en batchs pour les deux types d'échantillon. Pour une même quantité de

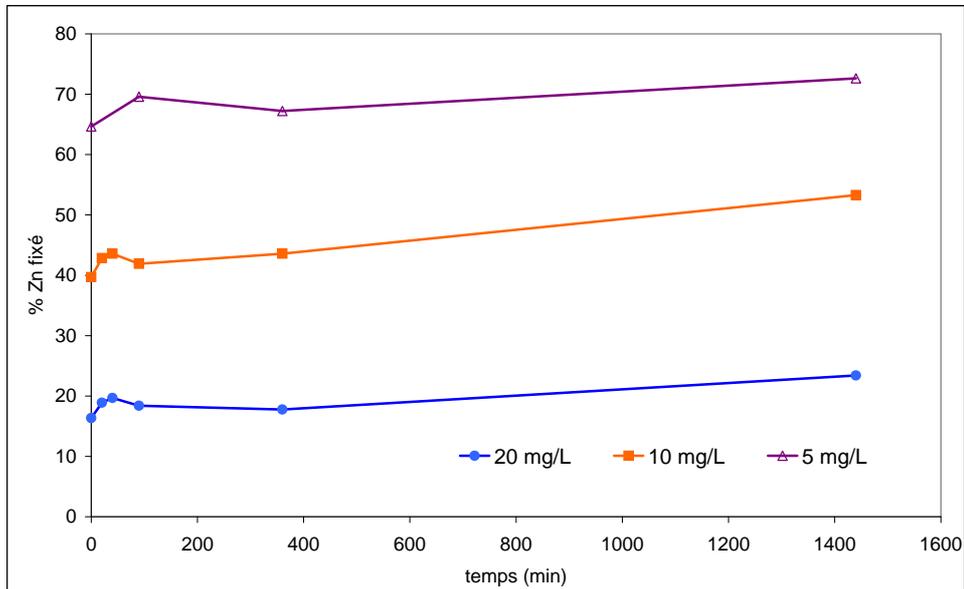


FIG. 4.18 – Cinétique de l'adsorption du zinc par *Pseudomonas putida*

zinc restant en solution à l'équilibre, la quantité retenue par les surfaces est plus importante lorsqu'il s'agit du biofilm ; ceci est en accord avec les résultats obtenus pour les protons. En annexe C.6 sont présentées les isothermes moyennes obtenues avec les écart-types correspondant.

Dans une première approche globale, ces isothermes peuvent être représentées par plusieurs modèles. Le plus adapté à ces données semble être la représentation de Freundlich (figure 4.20.)

Cette représentation est caractérisée par une sorption qui augmente lorsqu'il y a davantage de métal en solution. La quantité de métal adsorbée est proportionnelle à la quantité en solution, aux faibles concentrations, puis croît plus lentement au fur et à mesure de l'accumulation de métal sur les surfaces réactives lorsque  $n > 1$ .

L'isotherme de Freundlich est décrite par l'équation

$$C_S = K_F * C_e^{1/n} \quad (4.6)$$

avec  $C_S$  la concentration sorbée sur le solide,  $C_e$  la concentration à l'équilibre en solution,  $K_F$  le coefficient de Freundlich et  $n$  le degré de non linéarité (Sigg *et al.*, 2000), qui est supérieur à 1 pour la concavité expérimentale observée ici.

Les constantes du modèle de Freundlich ainsi obtenues sont :

- pour les fragments de biofilm  $\log K_F = 0,62$  et  $n = 4,38$
- pour les cellules libres  $\log K_F = 0,55$  et  $n = 1,33$

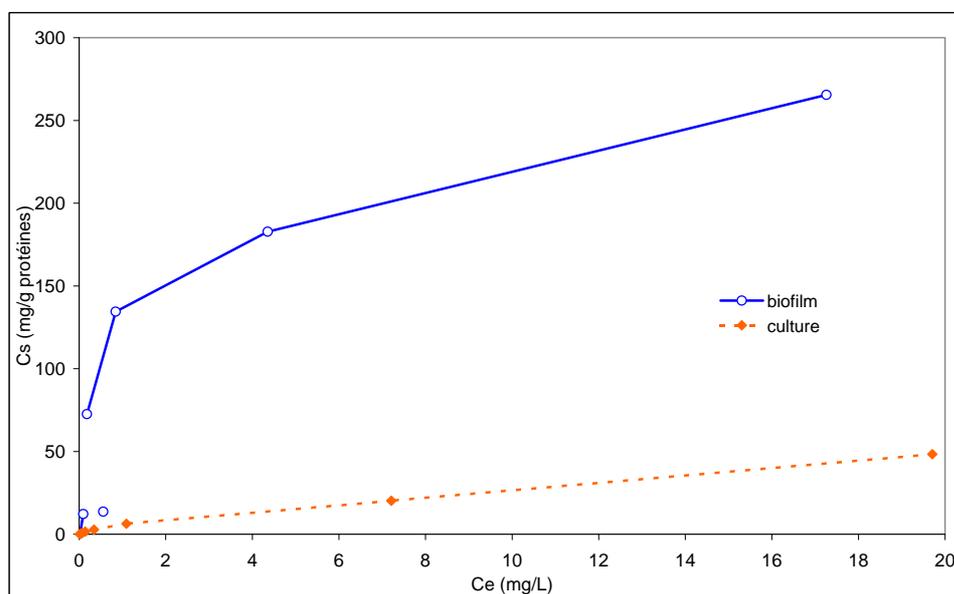


FIG. 4.19 – Isotherme d'adsorption du zinc par *Pseudomonas putida* sous forme planctonique et sous forme de biofilm

Cette représentation assez classiquement utilisée permet de se situer par rapport à d'autres études similaires d'adsorption mais elle ne sera pas davantage développée ici. Nous retrouvons des valeurs proches de celles proposées par Ledin *et al.*, 1997, qui a travaillé avec des concentrations plus faibles de zinc.

#### c) Modélisation - Analyse des isothermes

α) Hypothèses. — Nous avons choisi d'essayer de modéliser les isothermes d'adsorption du zinc par *Pseudomonas putida*, plus précisément, par des mécanismes de surface. Nous formulons l'hypothèse que ce sont les sites échangeurs de protons qui sont susceptibles d'adsorber le zinc. Ainsi, à partir des résultats obtenus par les titrations de surface nous connaissons pour chaque type d'échantillon les sites de surfaces réactifs, et en particulier leur constante de dissociation et leur concentration. Nous avons également choisi de considérer dans ce modèle la rétention d'un seul cation Zn par site réactif. Le modèle utilisé est un modèle de complexation de surface non-électrostatique<sup>8</sup> : l'utilisation de paramètres supplémentaires sur

<sup>8</sup>Le choix de ce modèle s'est fait préalablement à la prise en compte de phénomène d'échange. A posteriori, il pourrait être intéressant de chercher à savoir lequel de ces modèles est le plus adapté, et pour cela la mise en oeuvre d'essai en batch avec évaluation de la réversibilité pourrait être adéquat.

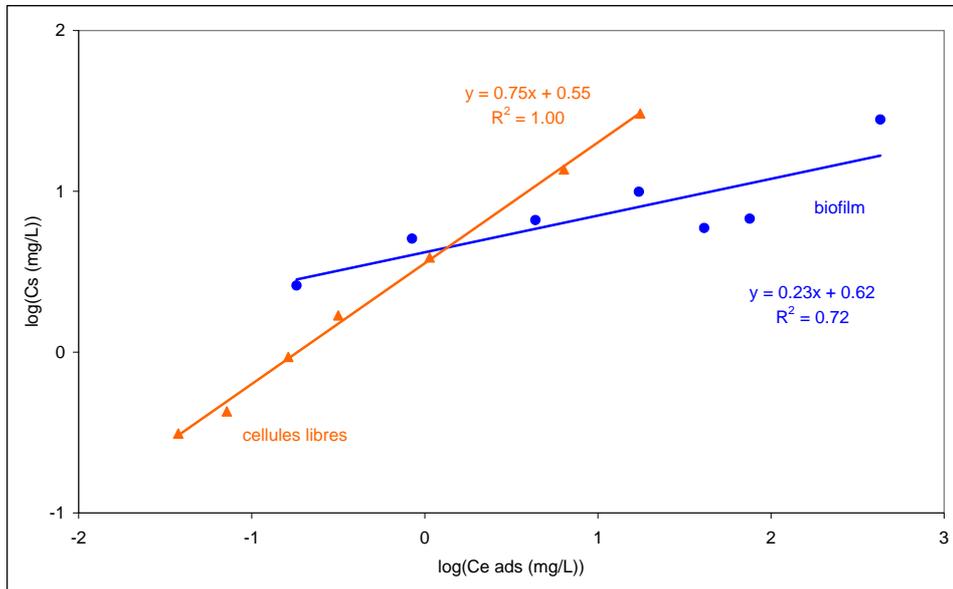
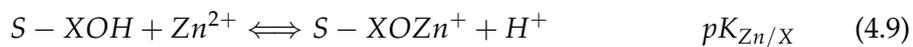
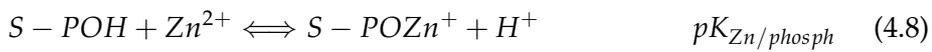
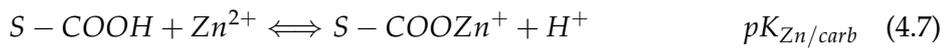


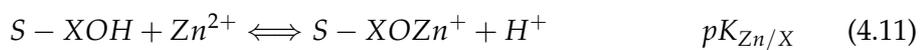
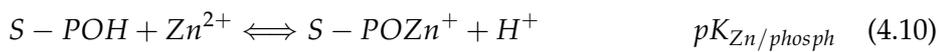
FIG. 4.20 – Isotherme d'adsorption du zinc par *Pseudomonas putida* sous forme planctonique et sous forme de biofilm - représentation logarithmique

lesquels nous n'avons aucune donnée ne nous paraissait pas pertinent.

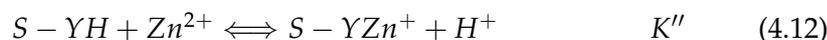
Les équations considérées sont donc pour la culture bactérienne :



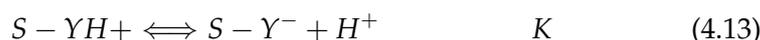
pour le biofilm :



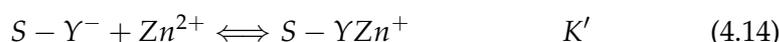
Chaque équation de type



est une combinaison de l'équation de déprotonation du site, dont la constante est issue des titrations de surface



puis d'adsorption du cation



Avec pour chacun la constante  $K''$  telle que  $pK'' = pK' + pK$

$\beta$ ) Ajustement. — En pratique, l'ajustement d'une courbe théorique consiste à trouver les valeurs des constantes des équations, les concentrations des sites ayant été déterminées précédemment. La sensibilité des solutions trouvées a été testée en faisant varier les constantes et en déterminant visuellement le meilleur ajustement.

Pour les échantillons de culture liquide, il est apparu que l'un des sites n'avait pas d'influence sur l'ajustement. Nous avons donc été amenés à ne travailler qu'avec les sites phosphate et carboxyle. A ce stade, il apparaissait possible, en modifiant les deux constantes de réaliser autant d'ajustements que souhaités. On obtenait un ajustement satisfaisant en passant du cas extrême où seul le site carboxyle intervient, à l'autre extrême où cette fois seul le site phosphate est mis en jeu.

Des analyses en EXAFS<sup>9</sup> sur les culots des échantillons utilisés lors des essais en batchs ont permis d'avoir une idée des groupements fonctionnels mis en jeu lors de l'adsorption du zinc. Les résultats et les limites de ces analyses ne sont pas présentés ici (se référer à Guiné *et al.*, en cours). Nous avons simplement utilisé le ratio obtenu pour fixer un critère supplémentaire au modèle. Les analyses ont en effet montré que les sites carboxyle et phosphate intervenaient dans une même proportion, pour l'adsorption du zinc sur les cellules bactériennes de *Pseudomonas putida*.

Pour les échantillons de biofilm, il était également délicat de discriminer la justesse des ajustements. Dans ce cas là aucune information sur la composition des associations Zn/biofilm n'est disponible. Nous avons donc utilisé comme contrainte la constante de complexation Zn/phosphate telle que définie par l'ajustement dans le cas des cellules libres. A partir de là, le système possède un seul degré de liberté qui est la constante de complexation avec le deuxième site mis en jeu à la surface des échantillons de biofilm.

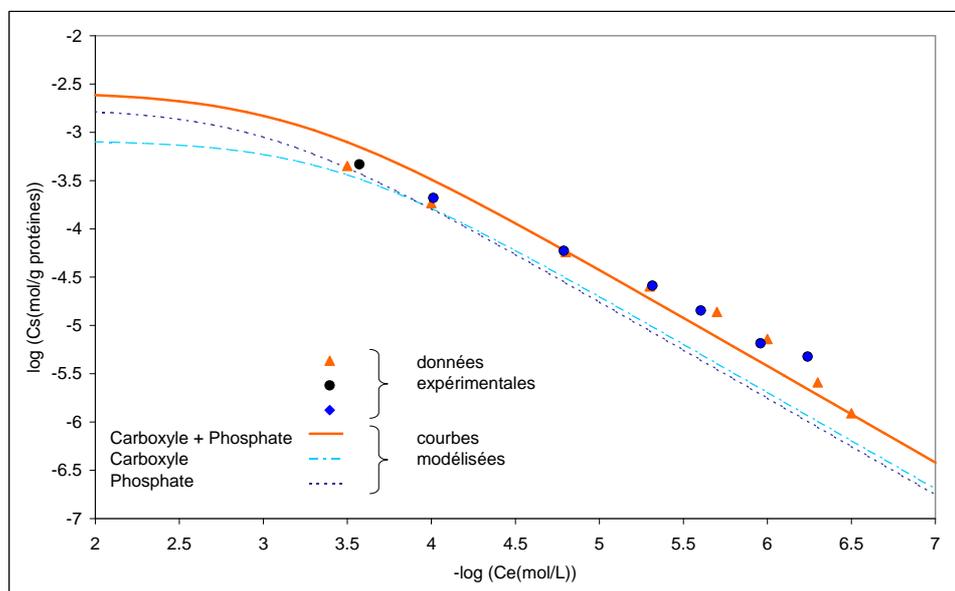


FIG. 4.21 – Adsorption du zinc : ajustement de la courbe d'adsorption du zinc par la culture bactérienne

$\gamma$ ) Modélisation de l'adsorption de la culture bactérienne. — A partir de là, un ajustement satisfaisant a pu être réalisé (voir figure 4.21). Sur le graphe, on observe en trait plein la quantité totale de zinc et en pointillés les quantités respectivement retenues par chacun des sites, carboxyle et phosphate. Le modèle obtenu permet d'avoir des quantités de sites phosphate et carboxyle mis en jeu équivalentes.

Les figures 4.22 et 4.23 montrent la sensibilité des valeurs obtenues en présentant les courbes modélisées obtenues pour d'autres constantes et en particulier lorsqu'on ne tient pas compte de la contrainte liée à l'EXAFS. On observe sur la figure 4.22 que des valeurs de constantes proches de 0,1 unité permettent aussi un ajustement satisfaisant. Ces valeurs sont confirmées par le graphe de la figure 4.23.

<sup>9</sup>analyses réalisées par le LGIT, Grenoble

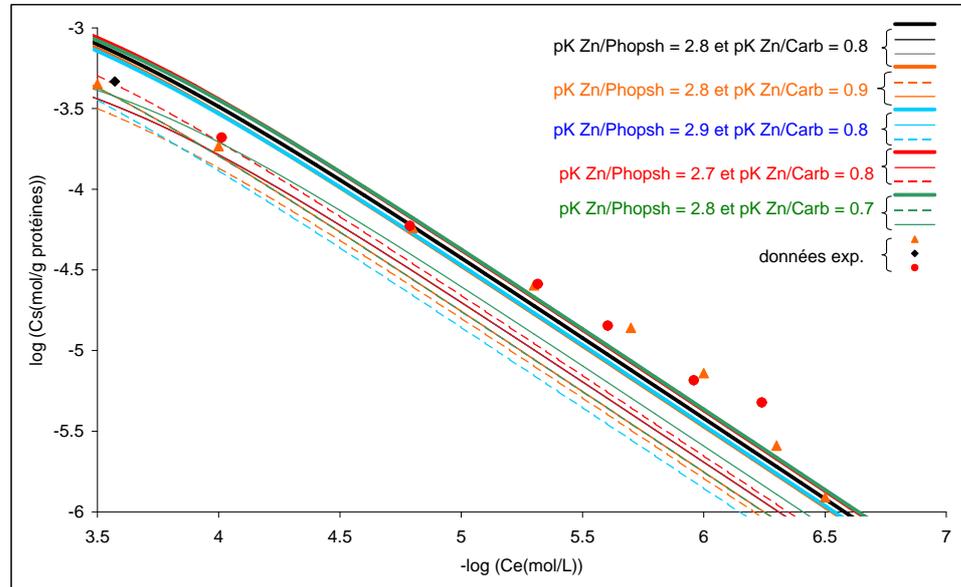


FIG. 4.22 – Adsorption du zinc : sensibilité de l'ajustement

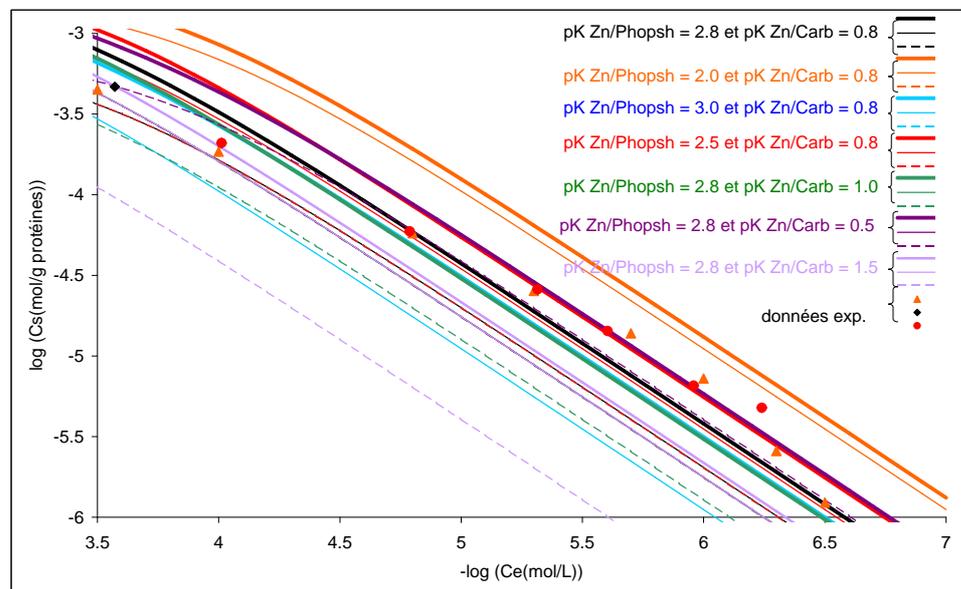


FIG. 4.23 – Adsorption du zinc : sensibilité de l'ajustement

δ) Modélisation de l'adsorption du biofilm. — Avec comme hypothèse la valeur  $pK_{Zn/Phosph}$  obtenue dans le cas des cultures bactériennes, la valeur de la deuxième constante a pu être calculée (voir figure 4.24). Les nombreuses hypothèses sous-jacentes à ces estimations doivent vraiment rester à l'esprit : estimation du nombre de sites disponibles pour le zinc, à partir du nombre de sites échangeurs de protons, estimation du ratio de sites phosphates et carboxyles à partir de mesures EXAFS, estimation de la constante de complexation phosphate/zinc du biofilm à partir de celle de la culture bactérienne.

Ces approximations ont été nécessaires car la faible quantité de données expérimentales ne permettait pas de contraindre suffisamment le système considéré. Au-delà de la justesse des valeurs proposées ici, il faut surtout s'intéresser d'une part au modèle proposé et à la démarche mise en jeu.

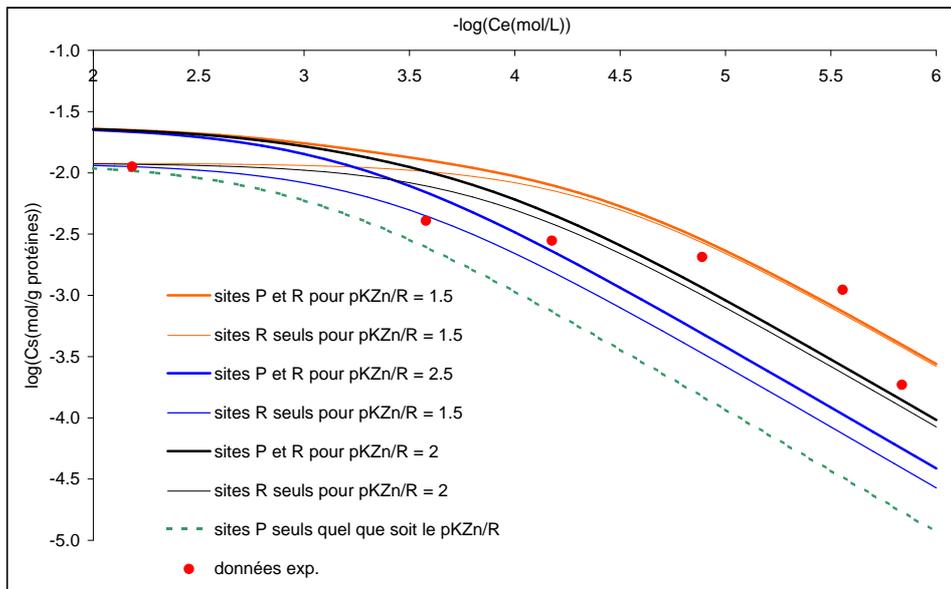
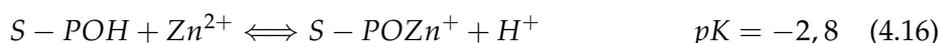
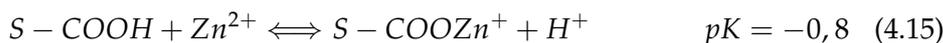


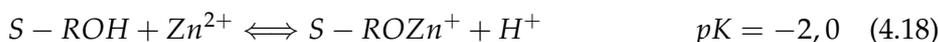
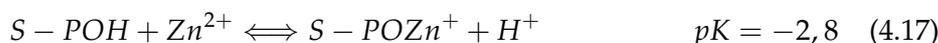
FIG. 4.24 – Adsorption du zinc par les fragments de biofilm : sensibilité de l'ajustement

e) Conclusion et comparaison aux constantes. — En résumé, les réactions de rétention du zinc par *Pseudomonas putida* peuvent être modélisées par les équations ci-dessous dont les constantes ont été ajustées avec le logiciel GRFIT, dans la limite des hypothèses précédemment mentionnées.

Culture bactérienne :

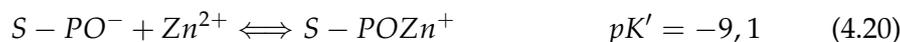


Biofilm bactérien :

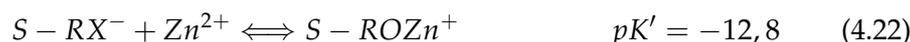
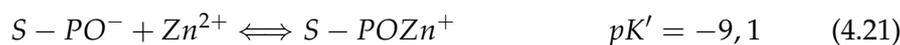


De ces valeurs et des constantes de déprotonation on peut calculer les constantes des réactions suivantes.

Culture bactérienne :



Biofilm bactérien :



D'autres valeurs de constantes de complexation entre les sites surfaciques et les métaux sont proposées dans les tableaux 4.5 et 4.6. Les valeurs proposées par Fowle et Fein, 1999, ont été confirmées par des analyses EXAFS de Kelly *et al.*, 2002. Toutes les bactéries étudiées à l'exception de *Enterobacteriaceae* et *Shewanella putrefaciens* sont à Gram positif. Notons que conventionnellement, l'usage de  $\log K$  est, dans le cas de l'adsorption des métaux sur des bactéries, plus fréquent que la valeur  $pK$ .

Fein *et al.*, 2001, ont modélisé l'adsorption du Co, Nd, Ni, et Sr en utilisant un modèle de complexation de surface entre métal et groupement carboxyle. Seulement dans le cas du zinc, afin d'obtenir un ajustement satisfaisant, 2 sites sont nécessaires : carboxyle et phosphore. Cela apparaît dans les autres études : les sites carboxyles et phosphates sont toujours nécessaires pour le zinc alors qu'en général un seul type de sites, généralement carboxyles, sont mis en jeu dans les mécanismes d'adsorption. Notons que dans la plupart de ces études, une capacitance est prise en compte

TAB. 4.5 – Constantes de complexation du zinc sur des surfaces bactériennes et groupes fonctionnels GF identifiés

Source	Bactérie	métal	log K'	G.F.
Plette <i>et al.</i> , 1996	<i>Rhodococcus erythropolis</i>	Zn	1,9	carboxyle phosphate
			4,1	
Fein <i>et al.</i> , 2001	<i>Bacillus subtilis</i>	Zn	3,4	carboxyle phosphate
			4,9	
Ngwenya <i>et al.</i> , 2003	<i>Enterobacteriaceae</i>	Zn	3,3	carboxyle phosphate
			5,1	

Source	Bactérie	métal	log K'	G.F.
Goncalves <i>et al.</i> , 1987	<i>Klebsiella pneumonia</i>	Cu	5,5 - 6,0	
Plette <i>et al.</i> , 1996	<i>Rhodococcus erythropolis</i>	Cd	2,2	carboxyle phosphate
			4,2	
Daughney et Fein, 1998	<i>Bacillus subtilis</i>	Cd	2,93	carboxyle phosphate
			2,39	
Daughney et Fein, 1998	<i>Bacillus licheniformis</i>	Cd	3,36	carboxyle phosphate
			4,24	
Daughney et Fein, 1998	<i>Bacillus subtilis</i>	Cu	3,2	carboxyle phosphate
			4,36	
Daughney et Fein, 1998	<i>Bacillus licheniformis</i>	Cu	3,93	carboxyle phosphate
			3,93	
Fowle et Fein, 1999	<i>Bacillus subtilis</i>	Cd	3,4	carboxyle
Fowle et Fein, 1999	<i>Bacillus licheniformis</i>	Cd	3,56	carboxyle
Fein <i>et al.</i> , 2001	<i>Bacillus subtilis</i>	Cd	4,9	
Haas <i>et al.</i> , 2001	<i>Shewanella putrefaciens</i>	U(VI)	5,16	carboxyle phosphate amine
			7,22	
			10,04	
Ngwenya <i>et al.</i> , 2003	<i>Enterobacteriaceae</i>	Cu	4,4	carboxyle

TAB. 4.6 – Constantes de complexation d'autres métaux sur des surfaces bactériennes et groupes fonctionnels GF identifiés

et donc les valeurs rapportées de constantes de complexation ne peuvent être directement comparées avec les valeurs trouvées dans notre étude.

Dans notre étude, la présence de groupements carboxyle et phosphate a également conduit à un ajustement satisfaisant pour la culture bactérienne. Aucune autre étude sur l'adsorption du zinc par *Pseudomonas putida* n'a été mentionnée. Ces résultats mettent aussi en évidence un groupe fonctionnel, pour l'instant complètement absent des études sur les cellules libres, qui semble majeur dans le cas de *Pseudomonas putida* sous forme de biofilm : un groupement amine ou hydroxyle.

En effet dans le cas du biofilm, on observe un comportement complètement différent lié à la très importante densité de sites et à la finalement relativement faible adsorption du zinc, en comparaison. En fait, il est probable que la rétention du zinc se fasse par l'intermédiaire de plusieurs sites. Ceci est confirmé par un rapide calcul à partir du point extrême mesuré sur l'isotherme qui atteste d'une rétention de 250 mg de zinc par g de protéines. Chaque gramme de protéines présente 12 et 11 mMol de chaque site fonctionnel identifié (voir section 4.1.2.c). On en déduit 0.3 atome de zinc par site réactif carboxyle + hydroxyle, donc probablement des liaisons multiples entre 1 atome de zinc et plusieurs sites du biofilm.

## 4.2 Stabilité du biofilm

Dans chaque expérience, le pH et la conductivité ont été mesurés en continu en sortie de colonne. Cependant, pour ne pas alourdir les graphes, ces données ne sont en général pas reportées. Le pH en sortie de colonne reste stable autour de pH 7,5.

### 4.2.1 Rapide présentation des scénarios

Au fil des expériences et des résultats obtenus, certains choix concernant les types de déstabilisation ont dû être faits. L'évolution des expériences de déstabilisation et la justification des choix est présentée ci-dessous. Quelques résultats sont brièvement mentionnés pour expliquer chronologiquement l'enchaînement des expériences (voir figure 4.25). Les résultats sont plus longuement développés dans les parties suivantes. Les résultats expérimentaux et la description des principales expériences en colonnes de sable sont mentionnés dans l'annexe C.7.

#### a) Chocs de force ionique

La première série d'expériences devait servir à évaluer l'ampleur de la déstabilisation en fonction de l'amplitude du choc de force ionique. Des essais avec des forces ioniques de 10% et 1% de la force ionique du milieu

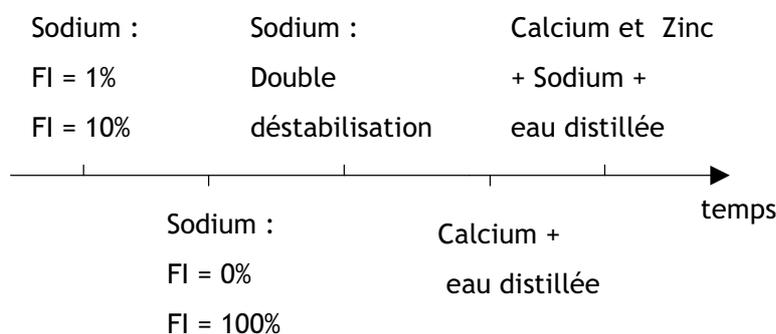


FIG. 4.25 – Les scénarios de déstabilisation

de croissance sont réalisés<sup>10</sup> ; ils ne présentent pas de différences sensibles.

En outre, la nécessité d'avoir une phase transitoire de contamination du biofilm par une solution de zinc fait également essayer une configuration avec une solution de NaBr de même force ionique que le milieu de croissance. Là encore, la déstabilisation constatée n'est pas différente. En complément un essai avec de l'eau distillée est réalisé qui va dans le même sens et n'est pas significativement distinct des précédents.

#### b) Double destabilisation

Afin de tester si les phénomènes mis en jeu lors du passage d'une solution saline et de l'eau sont les mêmes, une "double déstabilisation" est réalisée qui conduit effectivement à déstabiliser en deux fois le biofilm.

#### c) Rôle du calcium

Il s'agit donc maintenant que l'on a vu la grande facilité à détacher des fragments de biofilm de la matrice de le fixer suffisamment longtemps pour le contaminer avec du zinc. La succession d'une phase de lavage-contamination, que ce soit avec un mélange calcium-zinc ou sodium-zinc, puis d'une phase de décrochage avec de l'eau n'aboutit pas à un résultat satisfaisant. On constate au contraire une grande stabilité du biofilm après le passage de la première solution : le rôle des cations divalents (calcium mais aussi zinc) sur la stabilité, semble évident.

Il est donc nécessaire d'introduire un scénario en trois temps : un temps de lavage-contamination, une phase d'échange avec le passage d'une solution d'ions monovalents très concentrée, supposés s'échanger avec les cations divalents, avant la phase de décrochage finale du biofilm. Ce dernier scénario apporte une solution satisfaisante et permet d'observer une stabilisation du biofilm pendant la phase de contamination, puis un décrochage

<sup>10</sup>FI=x % signifie que la force ionique utilisée est égale à x % de la force ionique du milieu nutritif qui est 0,01M

de celui-ci et donc transport des colloïdes bactériens, i.e. des fragments de biofilm.

#### 4.2.2 Les différences forces ioniques

Des solutions de NaBr de différentes forces ioniques ont été mises au contact du biofilm en remplacement de la solution nutritive de croissance dans laquelle il s'est développé pendant 5 jours. Les forces ioniques varient de 0, dans le cas de l'eau distillée, à une force ionique équivalente à la force ionique du milieu nutritif : 0,01 mol/L. Deux concentrations intermédiaires équivalentes à 1% et 10 % de la force ionique du milieu nutritif ont également été utilisées.

La figure 4.26 présente pour les différents cas proposés, l'évolution, dans l'effluent de la colonne, de la teneur en protéines en fonction du temps. Le temps est figuré dans les graphiques par le nombre de volumes des pores écoulés dans la colonne. A  $V_p=0$ , l'injection de la solution de NaBr se produit. Plusieurs expériences ont été répétées. Les tendances des courbes présentées ici étaient les mêmes dans les répliquats effectués. Les échantillons de biofilm décrochés lors de ces scénarios ont été observés en microscopie électronique à balayage (voir figures 4.7, 4.1).

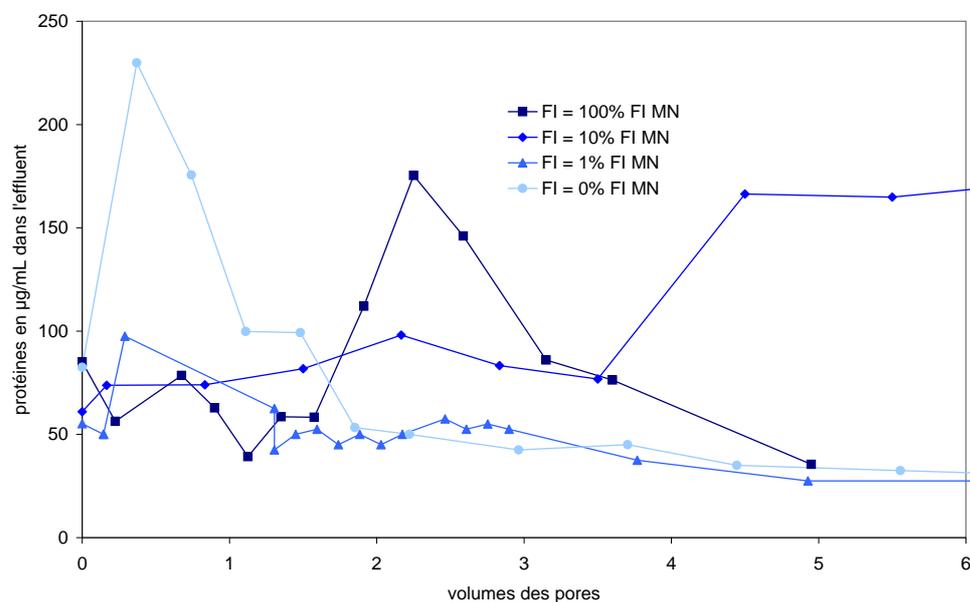


FIG. 4.26 – Teneur en protéines de l'effluent en fonction de la force ionique de la solution de "déstabilisation"

On observe une certaine hétérogénéité dans les répétitions, qui peut être due à la différence constatée de colonisation des colonnes. Toutefois, dans

tous les cas, un pic de déstabilisation apparaît très rapidement, dans les 2 premiers volumes des pores, et souvent avant même le premier volume de pores. Ce pic dure de 1 à 3 volumes de pores. La quantité de biofilm décroché lors du pic, lorsqu'on soustrait la ligne de base est très faible car le pic souvent très étroit. On n'observe pas de corrélation entre la valeur de la teneur initiale en protéines et l'état de colonisation mais une corrélation avec la hauteur du pic. Le ratio hauteur du pic/ligne de base reste entre 2 et 3. Le retard du pic de la courbe 10% est sûrement lié à un problème expérimental.

La figure 4.27 propose une comparaison des différents scénarios de déstabilisation utilisés. La force ionique de la solution de déstabilisation est indiquée en pourcentage de la force ionique du milieu nutritif. La fraction de biofilm décroché lors du pic de déstabilisation ne varie pas en fonction de ce paramètre. Quel que soit le scénario, entre 50 et 60% du biofilm présent initialement dans la colonne s'y trouve encore après déstabilisation et donc entre 40 et 50 % ont été décrochés.

Cependant, ni la hauteur des pics de protéines, ni leur amplitude ou le délai de réponse de la colonne ne permettent de discriminer les scénarios en fonction de la force ionique (voir figure 4.28). Les figures présentent l'ensemble des essais réalisés et les valeurs de différents paramètres. Les paramètres utilisés pour la comparaison des pics des différents scénarios sont présentés en annexe B.12.

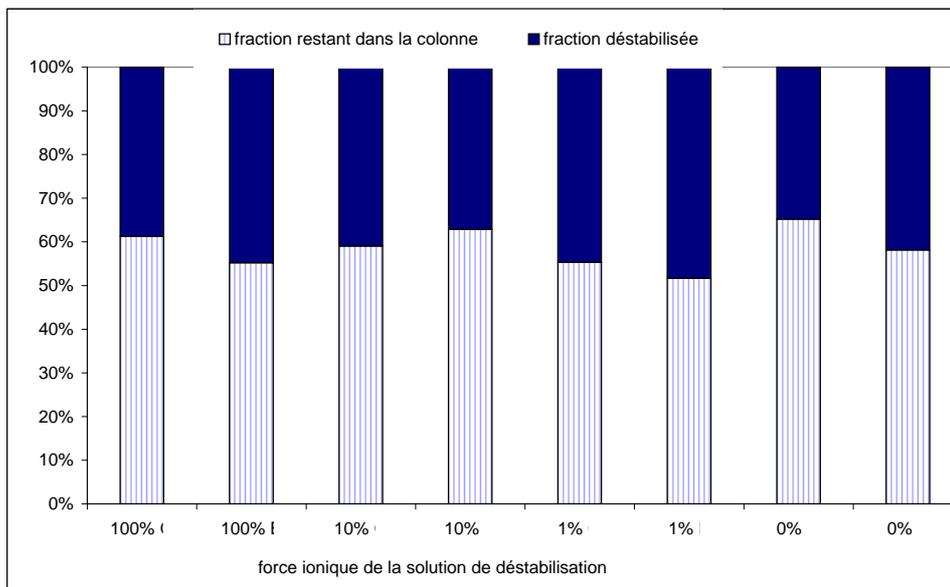


FIG. 4.27 – Fraction de biofilm décrochée en fonction du scénario de déstabilisation

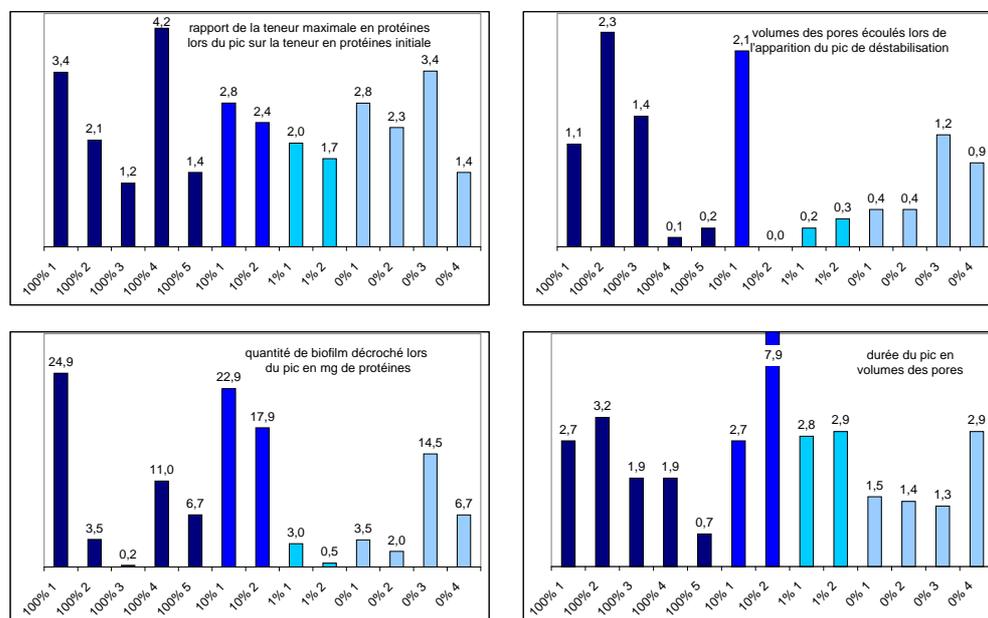


FIG. 4.28 – Comparaison des différentes forces ioniques de déstabilisation au travers de plusieurs critères sur le pic de déstabilisation

### 4.2.3 La "double déstabilisation"

On a cherché ensuite à vérifier si, suite à une première déstabilisation à force ionique équivalente, le biofilm restant dans la matrice était encore mobilisable. Pour cela une variation de force ionique en passant de l'eau distillée à été réalisée après le changement de composition de la solution à force ionique constante, passage du milieu nutritif à la solution de NaBr 100%.

Dans ce cas, une deuxième déstabilisation du biofilm a été constatée : 2 pics successifs, l'un suivant la première injection de NaBr, l'autre suivant l'injection de l'eau distillée dans la colonne. Là encore, les pics sont proches de ce qui avait été trouvé précédemment (figure 4.29).

Cette expérience a donc montré que des fractions différentes du biofilm étaient mobilisées lorsqu'on appliquait au système deux variations de la solution. Lors de la première, la force ionique ne varie pas, seule la composition, et en particulier la teneur en ions divalents, varie. Alors que la deuxième déstabilisation est provoquée par le passage d'une solution saline concentrée à une solution d'eau, donc à une importante variation de la force ionique.

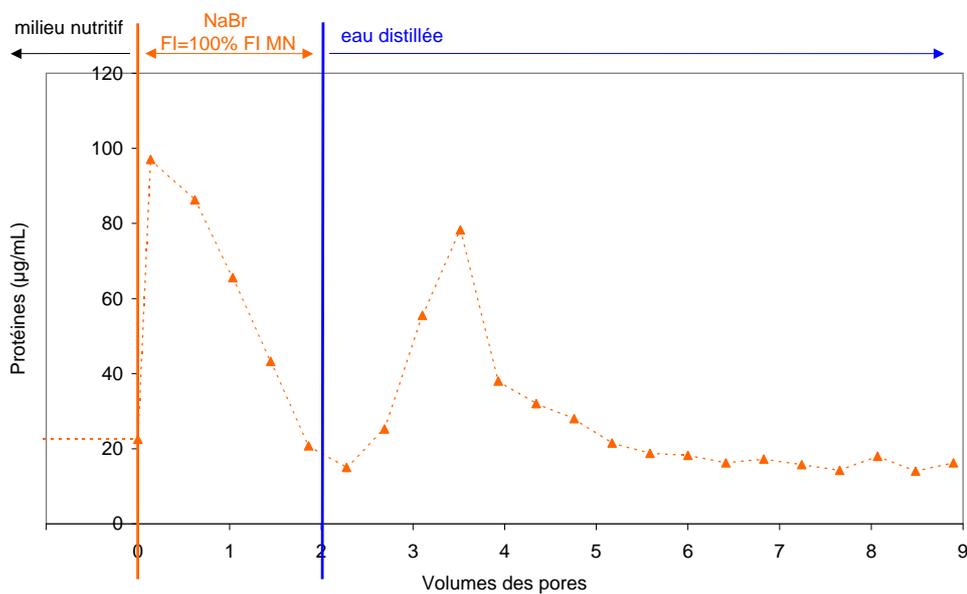


FIG. 4.29 – Teneur en protéines de l'effluent lors de la double déstabilisation

#### 4.2.4 Stabilisation du biofilm

Si à la place d'une solution de sodium une solution de calcium est utilisée, on observe un phénomène inverse qui est la réduction de la quantité de protéines dans l'effluent de la colonne (figure 4.30). Le graphique présente ainsi la teneur en protéines dans l'effluent ainsi que les concentrations de certains cations qui permettent de mieux comprendre les mécanismes mis en jeu.

La baisse sensible de la teneur en protéines atteste d'une certaine *stabilisation* du biofilm puisqu'on s'approche d'une totale rétention des fragments de biofilm que l'on trouve, dans le cas d'un régime normal, dans l'effluent de la colonne. L'augmentation de la teneur en calcium coïncide donc avec la diminution des protéines et également avec la disparition des éléments du milieu nutritif dosés : ammonium et sodium par exemple.

#### 4.2.5 Échange cationique et définition d'un scénario type

##### a) Description du scénario

Afin de stabiliser le biofilm pendant la phase de contamination, mais pour pouvoir ensuite le déstabiliser en faisant varier la force ionique, un scénario en 3 étapes semble nécessaire. Il s'agit en fait d'échanger les cations calcium par des ions sodium largement excédentaires comme cela a été rapporté dans d'autres expériences (Roy et Dzombak, 1996; Vulava *et al.*, 2000). En pratique, l'injection de calcium et zinc est suivie par une injection de sodium concentré, 1 mol/L, avant déstabilisation avec de l'eau distillée.

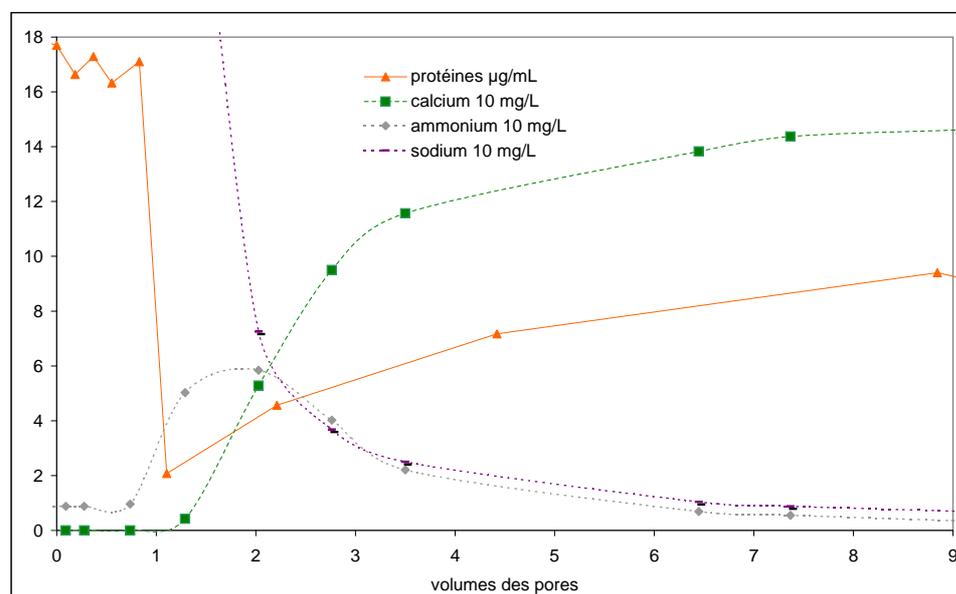


FIG. 4.30 – Teneur en protéines de l'effluent lors de l'utilisation de calcium

On constate dans ce cas-ci, un décrochage du biofilm au moment du passage de l'eau distillée. La mesure du calcium et du sodium dans l'effluent nous fournissent les informations nécessaires pour mieux appréhender les mécanismes mis en jeu. La figure 4.31 présente l'évolution des différentes grandeurs mesurées en sortie de colonne<sup>11</sup>.

#### b) Modélisation

Afin de mieux cerner les phénomènes mis en jeu, nous avons souhaité modéliser les réactions en accord avec les propositions décrites dans la section 2.1.2.b.δ. Le système peut être décrit comme suit. L'état initial consiste en une colonne saturée en sodium. En effet, nous prenons l'hypothèse que, vu la teneur du milieu nutritif et la durée de la phase de conditionnement, 5 jours, tous les sites potentiellement disponibles ont été saturés en sodium. Ainsi dans le modèle la capacité d'échange du milieu sera représentée par la concentration de sodium fixée initialement ( $Na_f$ ), le calcium étant le cation le plus concentré de la solution. Celle-ci est estimée à partir de la teneur en protéines dans la colonne (voir section 4.1.1.3) et la capacité d'échange de protons (voir section 4.1.2.5). Vu le profil de protéines dans la colonne, nous faisons l'hypothèse que toute la réactivité est comprise dans la tranche

<sup>11</sup>Des ratios différents 1/4 et 4/1 entre calcium et zinc ont été utilisés. Aucune différence notable n'est constatée sur l'effluent des colonnes.

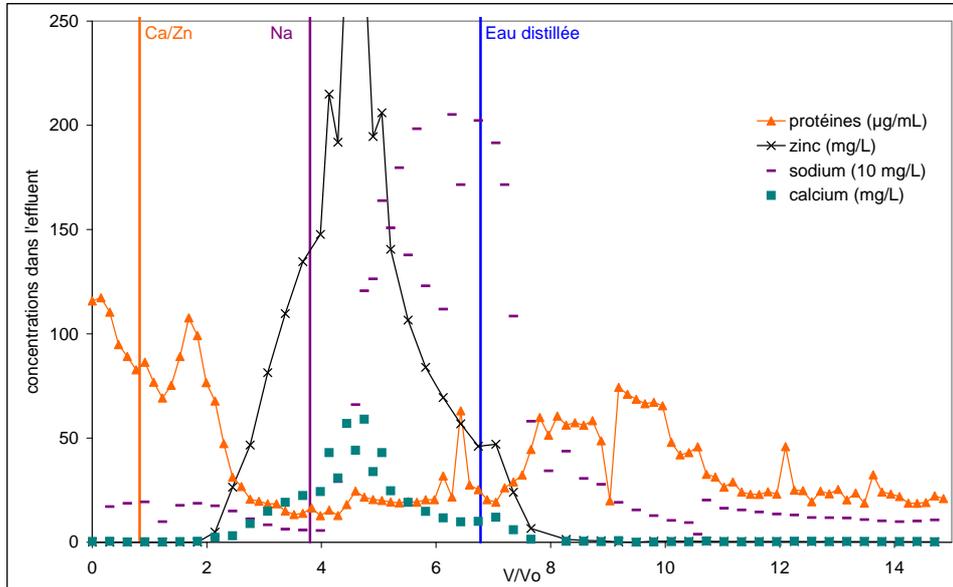


FIG. 4.31 – Teneur en protéines, zinc, sodium et calcium dans l'effluent lors de la déstabilisation

supérieure de sable<sup>12</sup>.

On obtient ainsi une capacité d'échange de 10 mMol/g protéines \* 0,06 g de protéines = 0,6 mMol pour un volume poral d'environ 6 mL<sup>13</sup>. D'où la valeur de  $Na_f = 0,1$  mol/L.

Ensuite la première étape consiste à injecter d'une solution de calcium et de zinc pendant 3 volumes des pores, à des concentrations de 4 mMol de zinc et de 1 mMol de calcium. Les anions associés sont déclarés inertes et ne rentrent donc pas en compte dans le calcul.

Le nombre de réacteurs  $J$  prend en compte le coefficient de dispersivité du milieu.

$$J = \frac{P}{2} = \frac{v.L}{2.D} \quad (4.23)$$

avec  $D = \lambda v$  le coefficient de dispersion

où  $P$  est le nombre de Péclet de la colonne,  $v$  la vitesse de pores  $L$  la longueur de la colonne.

<sup>12</sup>En outre, nous avons choisi de faire l'hypothèse d'une distribution de la réactivité constante au cours du temps.

<sup>13</sup>pour  $J=10$

D'après les résultats des traçages (voir 3.2.4.b), on obtient une dispersivité de 0,1 à 1 cm d'où un coefficient  $J = 10$  à 100.

Le tableau 4.7 rassemble les principaux paramètres nécessaires au modèle IMPACT.

Rappelons la réaction d'échange entre calcium et sodium :



Notons que cette constante n'est pas la constante de Gaines-Thomas qui elle est indépendante de la force ionique.

TAB. 4.7 – Paramètres utilisés dans IMPACT pour modéliser l'échange calcium sodium

paramètre	valeur supposée	source	valeur utilisée
J	20-200	traçages	6
$K_{Na/Ca}$	0,05		0,04
$Na_f$ initiale	0,1	caractérisation	0,14
$K_{Zn/Ca}$	1		1

Sur la figure 4.32 sont présentées la courbe expérimentale d'élution du calcium et du sodium et la courbe modélisée par IMPACT avec les paramètres retenus dans la dernière colonne du tableau 4.7.

Sur la courbe expérimentale on observe la complète rétention du zinc et du calcium pendant les trois volumes de pores d'injection de la solution divalente. Au bout d'un volume de pores d'injection de sodium concentré on dose à la fois dans l'effluent du sodium, du calcium et du zinc. La forte concentration de sodium a permis l'échange d'une partie du calcium et du zinc au profit du sodium.

Si on s'intéresse au bilan de masse du calcium, quasiment tout le calcium injecté dans la colonne, et qui est donc retenu pendant l'injection de la première solution, est ensuite échangé puis retrouvé dans l'effluent. Pour les détails des bilans de masse, voir en annexe C.8.

La courbe modélisée présente un léger décalage dans la première phase qui correspond à la sortie du calcium. Nous avons vu d'une part un fort impact de la dispersivité du milieu (traduite dans le modèle IMPACT par un nombre de cellules). D'autre part, dans le modèle IMPACT, nous ne prenons pas en compte l'hétérogénéité de l'écoulement et en particulier la présence de soluté immobile.

En résumé, la réaction d'échange calcium sodium sur le biofilm bactérien peut être modélisée de façon satisfaisante avec une constante d'échange  $K_{Ca/Na} = 0,04$ .

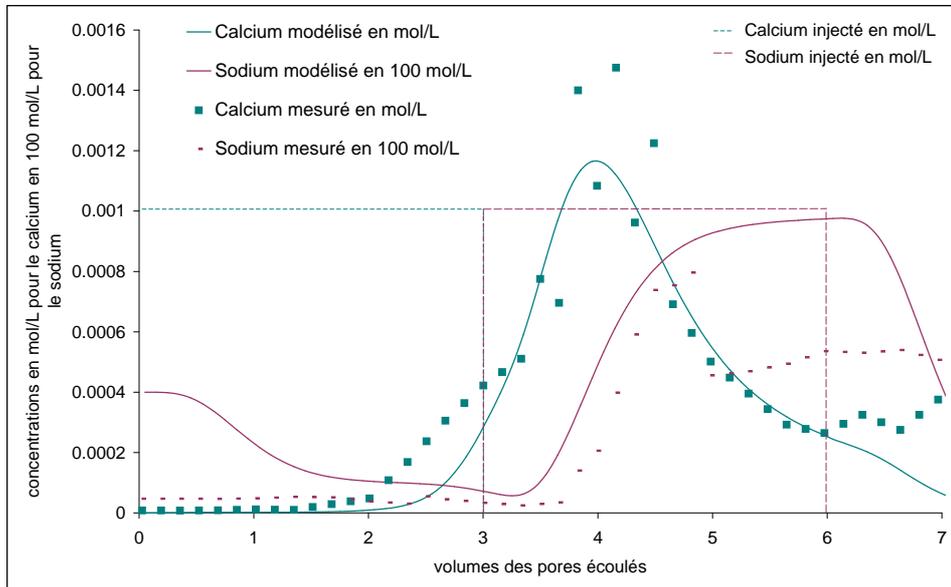


FIG. 4.32 – Teneur en sodium et calcium dans l'effluent lors des phases d'injection du calcium puis du zinc : courbes expérimentale et modélisée

Le choix de cette constante a fait l'objet d'une procédure d'ajustement manuelle que nous allons détailler dans l'annexe C.9. L'influence des différents paramètres sur l'ajustement est discutée dans la section 4.3.3 sur l'intégralité de la courbe.

Notons que d'autres combinaisons des paramètres ajustables donnaient une courbe modélisée comparable, par exemple  $K_{Ca/Na} = 0,05$  et  $K_{Zn/Ca} = 1,2$ . Les sensibilités de chacun des paramètres ont été évaluées en faisant varier ces paramètres autour de la valeur retenue.

### 4.3 Transport facilité du zinc

#### 4.3.1 Analyses MET

Lors des analyses en microscopie électronique en transmission, des échantillons provenant du pic de décrochage du biofilm ont été analysés. Les bactéries se présentent comme sur la figure 4.33. Il s'agit d'une coupe d'où l'allure différente de certaines bactéries. Sur l'image à faible grossissement, on observe des particules libres denses qui ont été identifiées comme étant des particules de fer.

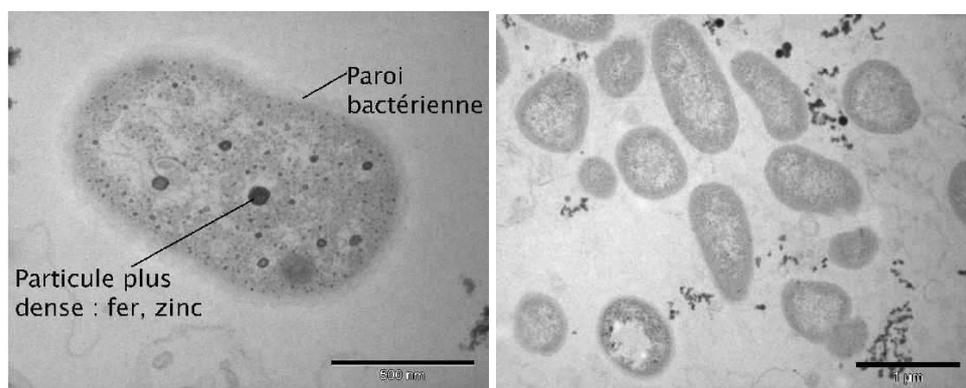


FIG. 4.33 – Observation au microscope électronique à transmission de cellules bactériennes à différents grossissement

Des particules plus denses se repèrent dans la cellule. L'analyse de ces particules aboutit à la détection de fer et de zinc en très petite quantité. Il n'est pas possible de définir si le zinc provient du zinc accumulé par la bactérie ou s'il s'agit du zinc du porte objet en laiton. D'autre part, nous sommes là aussi en limite de détection de l'appareil et des résultats plus fiables pourraient être obtenus avec d'autres techniques, plus sensibles, comme l'analyse par spectrométrie de rayons X à sélection en énergie.

#### 4.3.2 Analyses du sable

L'analyse de la teneur en zinc dans le sable, avant et après décrochage du biofilm a permis de mettre en évidence une légère migration du zinc lors de la déstabilisation. Celle-ci est présentée sur les graphes de la figure 4.34. Dans la courbe représentant la teneur en zinc dans la colonne avant déstabilisation, on observe une diminution de celle-ci avec la profondeur ; la concentration de zinc dans la couche supérieure de la colonne de sable est environ quatre fois plus importante que dans les 18 cm inférieurs. Notons que ce ratio est à peu près le même dans le cas de la teneur en protéines. Il paraît cohérent d'ailleurs que la quantité de zinc fixée dans la colonne soit proportionnelle à la quantité de sites réactifs, et donc de protéines présentes.

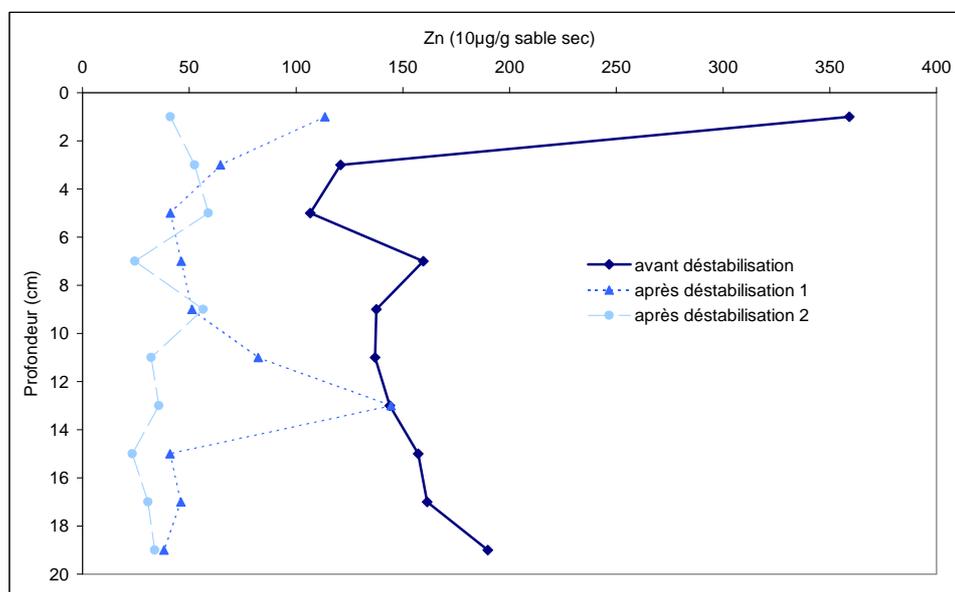


FIG. 4.34 – Evolution de la teneur en zinc dans la colonne de sable avant et après déstabilisation

Les deux courbes 'après déstabilisation' correspondent au même scénario mis en oeuvre simultanément sur deux colonnes. La courbe 'après déstabilisation 1' présente un profil différent de la courbe avant déstabilisation. La différence entre teneur en surface et en profondeur est moins sensible bien que légèrement marquée. Par contre la concentration en zinc n'est pas homogène sur la partie basse de la colonne et présente même un pic plus important que celui en surface. Notons qu'il correspond là aussi à un pic de protéines.

La courbe 'après déstabilisation 2' correspond au même scénario que précédemment et pourtant le profil est beaucoup plus homogène sur la profondeur de la colonne avec une teneur en zinc autour de  $400\ \mu\text{g/g}$  M.S.

Nous voyons donc la limite de ce genre de constatation puisque d'une part les analyses sont destructives, et donc la colonne avant et après déstabilisation n'est forcément pas la même, d'autre part la colonisation du biofilm et sa déstabilisation n'est pas suffisamment reproductible.

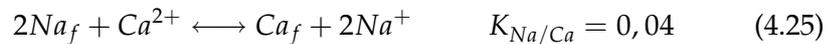
Quoiqu'il en soit, on observe dans tous les cas une disparition du pic de zinc en surface suite à la déstabilisation et, dans certains cas, l'apparition d'un ou plusieurs pics de zinc dans le profil de la colonne. Une migration du zinc dans la colonne est donc évidente. Elle peut être accompagnée d'une nouvelle rétention du zinc à l'intérieur de la colonne. La correspondance avec les protéines semble plaider en faveur d'une migration du zinc

associée aux particules bactériennes.

Ces analyses sont destructives et compte tenu de la répliquabilité médiocre des colonnes, il faut être prudent quand à l'interprétation à donner à ce genre de constatation. D'ailleurs, la courbe 2, qui a consisté au même scénario de déstabilisation que la colonne 1, montre bien le comportement pas toujours reproductible de ce genre d'expérience.

### 4.3.3 Modélisation

En reprenant les hypothèses formulées et les résultats obtenus pour les échanges sodium-calcium dans la section 4.2.5.b, nous pouvons décrire l'ensemble du scénario de déstabilisation. Deux équations d'échange décrivent le système<sup>14</sup>.



Le tableau C.13 présente l'ensemble des combinaisons de paramètres essayés pour obtenir une modélisation satisfaisante des données expérimentales. La première ligne présente les données retenues pour la modélisation finale qui est proposée dans la figure 4.35.

#### a) *Evaluation du zinc transporté par les colloïdes bactériens*

Il est possible d'évaluer à partir de la différence entre les deux courbes entre 6,5 et 8,5 Vp la fraction de zinc transportée que l'on peut supposer être due au transport colloïdal. La courbe modélisée explique, entre ces volumes, une élution de 0,11 mg de zinc alors que la courbe expérimentale en présente 4 mg, qui peuvent être expliqués par du transport colloïdal.

#### b) *Influence des paramètres de l'ajustement*

L'annexe C.9.3 présente les variations des courbes modélisées en fonction des variations des paramètres de l'ajustement. Tout d'abord on observe que le nombre de cellules, et donc la dispersivité du milieu, est un paramètre prépondérant. Lorsque J augmente, et donc que D diminue, la courbe modélisée est plus évasée<sup>15</sup>. Ainsi le calage du début de la courbe expérimentale est meilleur mais la pente de la courbe d'élution restant plus élevée cela ne permet pas d'avoir un bon ajustement. L'augmentation de la dispersivité, et donc la diminution de J, se traduit par un retard de la sortie

<sup>14</sup>La troisième équation d'échange sodium-zinc sera alors une combinaison des deux autres.

<sup>15</sup>Notons qu'on a en même temps réajusté la valeur de la capacité d'échange pour qu'elle soit équivalente quel que soit le nombre de cellules

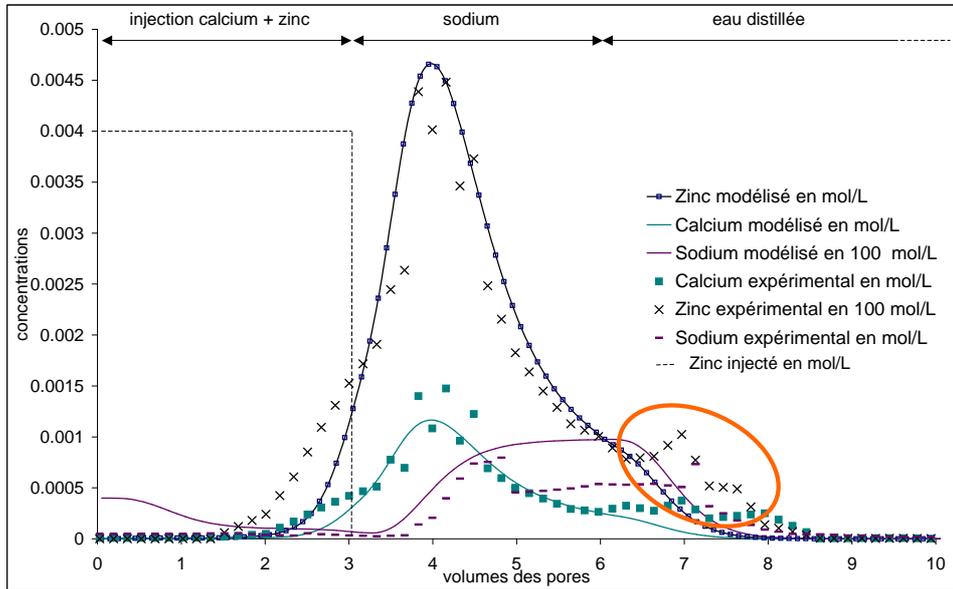


FIG. 4.35 – Courbes d'élution expérimentales et modélisées

des cations de la colonne ainsi qu'une plus faible concentration maximale. De même la concentration de la fin de courbe est plus élevée. La valeur  $J=6$  est la seule qui conduit à un résultat acceptable, d'où un coefficient de dispersivité de 1,7 cm. Cette valeur, élevée au regard des valeurs estimées par les traçages, peut en partie s'expliquer par la prise en compte d'une phase immobile. Cette valeur globale de 1,7 cm tiendrait compte des deux phases alors que la valeur évaluée lors des traçages ne considère que la phase mobile. De même, la dispersion évaluée peut résulter d'autres phénomènes : l'étalement de la courbe n'est pas seulement dû à la dispersivité théorique mais est aussi liée aux interactions des polluants, à d'éventuelles cinétiques, à l'accessibilité des sites d'échange. On parle dans ce cas de dispersivité active, qui est dans les faits, plus faible que la dispersivité calculée par les traçages.

L'influence de la réactivité initiale du milieu se traduit par les variations des valeurs de  $Na_f$ . Logiquement, lorsque la réactivité augmente (en particulier  $Na_f > 0,5$ ), la rétention devient élevée et très peu de cations sont présents dans l'effluent. Inversement, lorsque  $Na_f < 0,1$  l'élution du zinc et du calcium est importante et rapide.

Pour les valeurs des constantes de réactions, elles modifient essentiellement la hauteur du pic d'élution et dans une moindre mesure la pente. Lorsque l'équilibre se déplace du côté du calcium fixé, on observe une moindre élution de celui-ci et une plus forte élution du zinc. Un équilibre

satisfaisant est trouvé pour les valeurs  $K_{Na/Ca} = 0,04$  et  $K_{Ca/Zn} = 1$ . Il est délicat de donner une fourchette de variations dans laquelle l'ajustement reste satisfaisant. Au regard des graphes C.40 et C.42, une variation de 10% des valeurs proposées permet de rester dans un écart faible avec les données expérimentales.

Enfin, la distribution de la capacité d'échange au sein de la colonne montre des résultats proches lorsque cette réactivité est concentrée sur une seule cellule. La rétention des cations est moindre lorsque la capacité d'échange est répartie dans la colonne. Le modèle qui considère l'intégralité de l'échange dans la première cellule est celui qui s'approche le plus des données expérimentales.

#### 4.3.4 Conclusions

La mise en évidence du transport facilité a nécessité la mise en oeuvre de plusieurs moyens d'investigation compte tenu des faibles concentrations mises en jeu dans le scénario que nous avons défini. Par contre, nous avons montré le rôle prédominant de la phase de mise en mouvement des colloïdes sur le transport et des conditions physicochimiques du milieu sur cette forme de transport. Pour continuer les investigations dans ce domaine deux alternatives apparaissent : soit travailler avec un système qui favorisera une plus grande quantité de transport colloïdal (autre facteur de déstabilisation du biofilm, concentration bactérienne plus importante ...), soit continuer les analyses sur un système analogue en se concentrant sur le moment précis du transport colloïdal qui peut désormais être prédit assez finement.

### 4.4 Synthèse et discussion

#### 4.4.1 Réflexion méthodologique

##### a) *Evaluation primordiale de la quantité de matière mise en jeu*

Dans les expériences de caractérisation, nous avons choisi de travailler avec la quantité de protéines comme évaluation de la quantité cellulaire et extracellulaire pouvant être mise en jeu dans les mécanismes de rétention et de transport des métaux. La quantité de masse sèche est un indicateur auquel se réfèrent de nombreux auteurs même si sa mesure est souvent mal définie ou évaluée.

La quantité de protéines, ou de masse sèche, par cellule dénombrée (c'est-à-dire par unité formant colonie) est un facteur variable en particulier avec l'état physiologique de la cellule. Il est nécessaire, en cas de passage de l'un à l'autre, de préciser le facteur de conversion.

Reste que dans le cas du travail avec des fragments de biofilm, la mesure de la teneur en protéines nous a semblé la plus adaptée, car, outre

sa mise en oeuvre plus légère qu'un dénombrement, elle rend assez bien compte de la quantité de matière réactive. La relation à un nombre de cellules reste toujours délicat.

b) *Les titrations de surface*

Cet outil méthodologique et expérimental a été largement utilisé dans cette étude et nous avons essayé d'en tester la validité : la bonne répliquabilité de l'analyse est toutefois limitée par la difficile répliquabilité des échantillons. C'est au cours de la croissance des cultures qu'il est essentiel de maîtriser tous les paramètres et en particulier la température. *Pseudomonas putida* présente, en milieu minimal, une croissance assez lente, comparativement à d'autres souches bactériennes ce qui accroît les risques de variations lors de sa culture.

Les essais de réversibilité, de nature du milieu, ont parfois montré la sensibilité du système. Des études récemment publiées ont mis en évidence une plus ou moins grande influence d'autres facteurs sur les caractéristiques de surface : conditions aérobies ou anaérobies, lavage à l'acide, âge de la culture, composition du milieu de croissance (Haas, 2004; Borrok *et al.*, 2004). Toutes ces limites sont autant de barrières à une interprétation trop rapide ou à des comparaisons entre ces différentes études. Il importe pour l'instant de se situer dans des conditions expérimentales les plus proches possibles si l'on souhaite comparer plusieurs échantillons.

Ces expériences ont permis de proposer un modèle pour la rétention des protons puis des cations métalliques à la surface des bactéries. Ce modèle repose sur les mécanismes de complexation de surface et fait intervenir des groupes fonctionnels que les expériences permettent de quantifier. Des hypothèses sur la nature chimique de ces groupements fonctionnels peuvent être également faites. Ce modèle ne prétend en aucun cas décrire la réalité en détails mais proposer un modèle de fonctionnement en accord avec les observations et les connaissances actuelles dans ce domaine.

Demeure aussi la difficulté de travailler sous certaines conditions, sous lesquelles les cellules vont avoir un comportement différent, par exemple formation de floccs à faible pH.

Enfin, il serait possible, pour mieux évaluer la réactivité in situ et tenir compte de la complexité structurale du biofilm d'envisager des titrations en évaluant le potentiel d'écoulement.

c) *Granulométrie laser*

L'évaluation de la taille des floccs bactériens et l'estimation de leur dimension fractale a été réalisée dans des conditions qui pourront être améliorées. En effet, la collecte des effluents de colonnes nécessitait le passage de l'échantillon dans les capillaires d'une pompe péristaltique, ce qui est susceptible de modifier la structure de l'échantillon. Or, l'usage de cette

pompe est un moyen simple et efficace de conserver le caractère non-saturé des colonnes. Une collecte des échantillons en amont de la pompe garantirait une meilleure qualité des structures observées. Cependant, les principaux résultats trouvés, et en particulier la dimension fractale élevée des échantillons de culture planctonique restent indépendants de ce phénomène.

*d) Essais d'adsorption en batchs*

Les essais d'adsorption en batchs ont été réalisés dans une solution saline. Nous avons vu les possibles interactions entre les cations, en particulier le calcium, et le zinc. Les résultats obtenus ne restent valables que pour une force ionique et une composition du fond ionique équivalentes. Les constantes obtenues sont des constantes apparentes indissociables des conditions d'expérimentation.

En complément des expériences menées il aurait été intéressant d'étudier la réversibilité des processus et d'ainsi avoir une première idée des mécanismes prépondérants entre les bactéries et les métaux : complexation de surface ou échange ?

*e) Colonnes de sable*

Les colonnes de sable ont permis de représenter un échantillon de milieu poreux colonisé par un biofilm. Les dimensions de la colonne ont été choisies a priori. Une grande hétérogénéité dans le développement du biofilm, avec une croissance bactérienne très importante en surface, a été constatée. La densité bactérienne en tête de colonne est bien plus élevée compte tenu probablement de la plus grande disponibilité des nutriments et de la meilleure oxygénation. D'un côté, cela augmentait la complexité du système puisqu'il a fallu tenir compte de cette distribution de réactivité en fonction de la profondeur de la colonne, d'un autre côté cela a permis de mettre en évidence les phénomènes de décrochage et de déposition et représente plus fidèlement le milieu réel. Il apparaît dès lors nécessaire de s'attarder davantage dans de futures expériences à décrire ces processus qui gouvernent pour une part importante le transport colloïdal.

*f) Microscopie*

L'utilisation de la microscopie a apporté des informations intéressantes. L'observation d'autres types d'échantillon (suivi de l'effluent au cours du temps, échantillons de sable après déstabilisation) sont susceptibles de compléter les hypothèses formulées sur le détachement du biofilm.

g) *Outils de modélisation*

La conceptualisation qui a permis d'interpréter une partie des résultats obtenus par les titrations de surface et les essais d'adsorption en batchs repose bien sûr sur les hypothèses inhérentes aux modèles proposés. Cependant, elle permet d'une part de comparer nos travaux avec les précédentes études, d'autre part de comparer entre elles deux types de culture d'une même bactérie. Les limites du modèle de complexation de surface, en particulier dans l'interprétation des phénomènes dans les colonnes ont poussé à l'utilisation du modèle d'échange de surface.

Dans ce modèle d'échange, utilisé avec le logiciel IMPACT, nous avons vu l'incidence des différents paramètres, qui, pour certains, restent encore mal définis. Là encore, il faut se souvenir qu'il s'agit d'un modèle qui permet d'expliquer tout ou partie des phénomènes observés mais qui doit encore être complété par des observations et des expériences complémentaires.

h) *Réactivité du milieu poreux*

Le biofilm ne recouvre que partiellement les grains de sable, comme nous avons pu l'observer en microscopie, avec des accumulations importantes de cellules et de polymères dans les anfractuosités du sable. On ne peut donc pas considérer que les seules surfaces en contact avec la solution sont les surfaces bactériennes. Dans des milieux plus complexes, il s'agira de prendre aussi en compte la réactivité des particules minérales, par exemple des argiles.

i) *Maturation du biofilm*

Nous avons travaillé avec un biofilm développé pendant 5 jours et les résultats obtenus, tant lors de la caractérisation de ces échantillons que lors de la déstabilisation de ceux-ci sont probablement dépendants de la durée de colonisation du milieu. Un biofilm plus âgé sera-t-il plus difficile à décrocher ou au contraire une partie du biofilm sera-t-elle très instable ? Les caractéristiques, par exemple géométriques ou structurales, des fragments de biofilm décrochés, et donc également leur réactivité vis-à-vis des métaux peuvent être ainsi modifiées.

#### 4.4.2 Biofilm et culture : similitudes et différences

Plusieurs auteurs avaient suggéré que les données obtenues sur les cellules planctoniques ne pouvaient pas être directement utilisées pour les bactéries attachées aux surfaces (Costerton, 1999; Davies, 2000). Le tableau 4.36 illustre cette proposition avec les résultats obtenus dans cette étude sur des cellules planctoniques de *Pseudomonas putida* et ces mêmes cellules sous forme de biofilm.

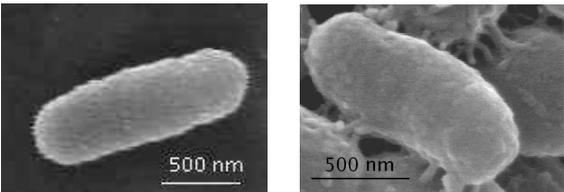
Caractéristiques	Observations
Morphologie	<p>Les cellules sous forme de biofilm (à droite) sont moins longues et plus épaisses que les cellules planctonique (à gauche). Les cellules des biofilms sont recouvertes de matériaux polymériques. Des filaments de ces matériaux relient les cellules entre elles et au support.</p> <div style="text-align: center;">  </div>
Quantité de protéines par cellule	Elle est plus élevée pour le biofilm car les EPS sont pris en compte dans la quantification des protéines.
Dimension fractale	Elle est proche de 2 pour les deux types d'échantillons, ce qui montre la complexité structurale de la culture bactérienne également.
Taille des agrégats	Quelques gros agrégats sont présents seulement dans les échantillons de biofilm. Les particules élémentaires dans les deux échantillons sont de taille micrométrique.
Hydrophobie	Le biofilm est plus hydrophobe que les cellules libres.
Potentiel Zêta	Il est plus faible pour le biofilm mais les surfaces restent dans les deux cas négativement chargées pour des pH supérieurs à 4,
Capacité d'échange de protons	Davantage de protons sont échangés par le biofilm entre 5 et 10 fois plus pour une même quantité de protéines mise en jeu.
Groupes fonctionnels identifiés	3 groupements fonctionnels pour les cellules libres (Carboxyle, phosphate et hydroxyle ou amine dans un ratio 2/1/2) alors que seulement les deux derniers apparaissent surtout dans les échantillons de biofilm (ratio 1/1 pour les groupements phosphate et hydroxyle ou amine), le groupement carboxyle devant être trop minoritaire.
Capacité d'adsorption du zinc	plus élevée pour le biofilm : pour une même quantité de protéines, les échantillons de biofilm peuvent retenir plus de 5 fois plus de zinc, pour des concentrations de dizaines de mg de zinc par litre.
Groupes fonctionnels mis en jeu	2 groupements fonctionnels permettent de modéliser la rétention du zinc, carboxyle et phosphate pour les cellules libres et phosphate et hydroxyle ou amine pour les fragments de biofilm.

FIG. 4.36 – Synthèse des caractéristiques de *Pseudomonas putida* sous forme planctonique et sous forme de biofilm

Plusieurs éléments justifient ces différences de comportement entre mêmes bactéries ayant des modes de croissance différents.

Tout d'abord, dans leur étude sur la dynamique et la diversité des communautés microbiennes, Briones et Raskin, 2003, insistent sur la stabilité importante des biofilms. En effet, les cellules peuvent être en partie à l'abri des modifications du milieu, la matrice polysaccharidique jouant alors le rôle de tampon vis-à-vis des modifications extérieures (Sutherland, 2001). En outre cette matrice peut également servir de réserve de carbone et d'énergie même s'il semble que les polymères sécrétés par une espèce ne puissent pas être consommés par cette même espèce sauf dans de rares cas (Sutherland, 2001).

Ensuite Black *et al.*, 2004, mentionnent les conditions différentes de croissance des bactéries. En particulier, la disponibilité des nutriments, l'oxygénation, n'est bien sûr pas la même pour des cellules attachées à une matrice solide et pour des cellules libres. Ainsi, la morphologie différente et la réactivité plus forte vis-à-vis des polluants pourraient être une adaptation à des conditions de développement différentes.

Une partie de l'explication viendra aussi certainement des études en cours sur l'expression des protéines. Citons à titre d'exemple les travaux de Vilain *et al.*, 2004, sur l'analyse des protéines de *Pseudomonas aeruginosa* sous forme planctonique et attachée à une surface. Les résultats obtenus renforcent l'hypothèse d'un comportement physiologique spécifique et ils évoquent même l'existence de plusieurs phénotypes au sein des cellules immobilisées. Une conséquence de cette hypothèse est la diversité des biofilms pour une même espèce. Ainsi, les biofilms pourraient avoir en fonction du support, du milieu, des conditions, un comportement différent et il faudrait, pour espérer étudier en laboratoire des biofilms réels, tenir compte de ces différents paramètres. En ce sens, on peut bien sûr s'interroger sur la ressemblance entre le biofilm in situ (dans la colonne, dans un premier temps, puis sur le terrain) et les fragments de biofilm auxquels nous nous sommes intéressés. Il faudra, pour accroître la pertinence de mesures au laboratoire, soit reconstituer au mieux l'environnement naturel du biofilm auquel on s'intéresse soit valider par des études préalables la similitude des biofilms développés en laboratoire et sur le terrain.

Costerton, 1999, souligne un paradoxe : la difficulté de créer des biofilms en laboratoire alors même que dans la vie courante, on cherche plutôt à éviter leur apparition, comme sur les vitres des aquariums par exemple. Aujourd'hui plusieurs méthodes de fabrication de biofilm permettent d'obtenir ce type d'échantillon (réacteurs, colonnes, tuyaux). Mais cela reste plus compliqué que de préparer une culture liquide. Cependant, les résultats de cette étude montrent qu'il est nécessaire de s'intéresser non plus seulement aux cellules planctoniques mais aussi aux cellules attachées et à l'ensemble des produits qui en découlent et notamment les polymères extracellulaires. Des tentatives de séparation des polymères extra-cellulaires

et des cellules ont eu lieu (Wuertz *et al.*, 2001) mais vu le ratio des polymères dans les biofilms (entre 70% et 95% (Costerton, 1999)), une première approche sur des échantillons de biofilm semble déjà satisfaisante.

Pour finir, un intérêt supplémentaire sur le travail sur les biofilms vient probablement de leur vaste champ d'application. Les domaines où les biofilms sont un centre d'intérêt croissant sont multiples : génie sanitaire, génie industriel... Il semble probable que sur certains sujets, des avancées dans un domaine pourront être utilisées dans un autre (Costerton, 1999).

#### 4.4.3 Rôle des cations divalents et de la force ionique sur la stabilité d'un biofilm bactérien

Les études sur les biofilms portent surtout sur les phénomènes d'attachement car dans les problématiques industrielles ou médicales, il s'agit souvent de prévenir l'apparition d'un biofilm plutôt que de le décrocher une fois formé.

Quelques études rapportent dans la littérature la mobilisation des particules colloïdales en fonction non seulement de la force ionique mais également de la composition du milieu (Grolimund *et al.*, 1996). Nous avons abouti aux mêmes conclusions dans le cas de colloïdes bactériens qui, lors de changements de composition du milieu, peuvent être déstabilisés dans d'aussi importantes proportions que lors de changements de force ionique. Les essais en colonne ont mis en évidence l'importance des phénomènes d'échange, en particulier entre calcium et sodium, sur la stabilité du biofilm.

Flemming *et al.*, 2000, proposent des pistes d'explication du rôle du calcium sur la cohésion<sup>16</sup> des biofilms. D'une part, l'ajout de cations divalents serait susceptible d'accroître, par effet électrostatique, la viscosité. D'autre part, cette étude montrait la capacité du calcium à créer des liaisons divalentes avec des résidus contenus dans les sécrétions extra-cellulaires de *Pseudomonas aeruginosa*. Les différentes interactions entre les molécules d'EPS sont résumées dans la figure 4.37. On y observe clairement le rôle stabilisateur du calcium qui crée une liaison entre deux groupements qui auparavant se repoussaient.

Cet aspect des choses met bien en avant l'importance de la complexité des solutions infiltrées dans les bassins d'infiltration. Il ne s'agit pas seulement de faire des solutions modèles en tenant compte des principaux cations présents mais bien de cerner les mécanismes qui vont être mis en jeu et qui peuvent résulter d'espèces minoritaires. On voit alors l'intérêt d'approches fines, qui s'attachent à expliquer les mécanismes.

De même, nous avons vu l'incidence de la chronologie des solutions infiltrées : de l'eau pure ne décrochera pas les colloïdes d'un milieu précé-

---

<sup>16</sup>Or, une forte cohésion est de nature à expliquer en partie une meilleure stabilité du biofilm.

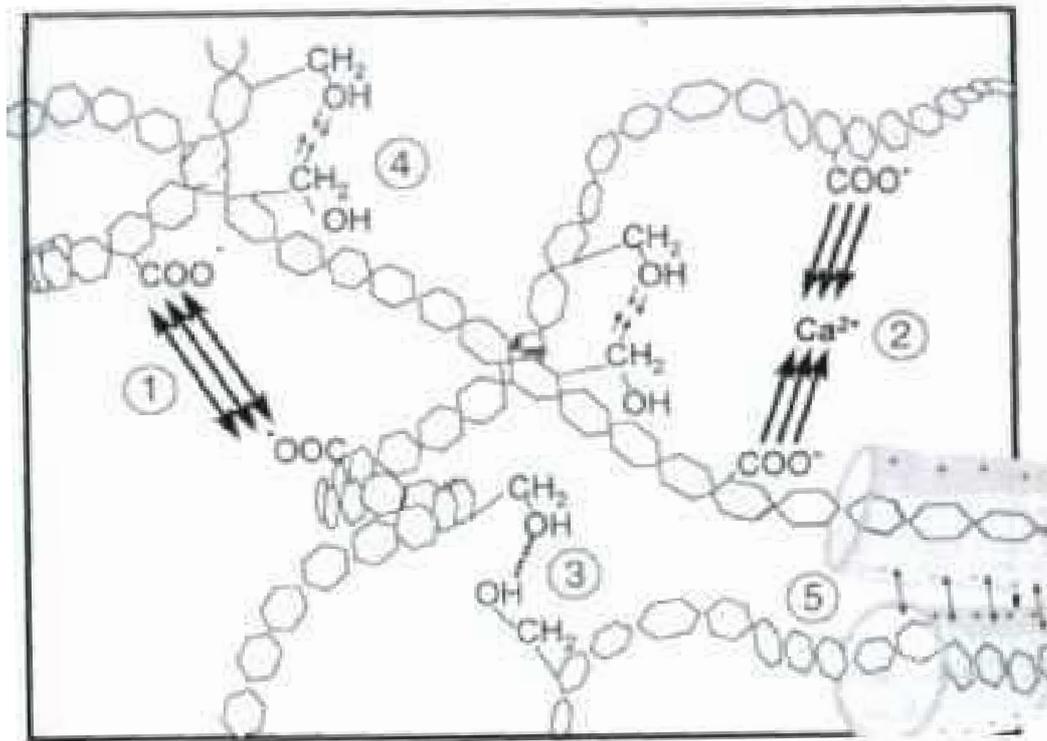


FIG. 4.37 – Interactions entre les polymères extra-cellulaires et rôle du calcium (Flemming *et al.*, 2000) 1, répulsion de deux groupes carboxyles, 2, attraction de deux groupes carboxyles par l'intermédiaire d'un cation divalent, 3, liaison hydrogène, 4, attraction électrostatique et 5 forces de dispersion.

demment saturé en calcium, sauf si, par exemple, une solution très concentrée en sodium est intercalée et permet l'échange des ions. In situ, ce genre de situation peut se produire lorsque une eau saline riche en sodium est remplacée par de l'eau douce (irrigation agricole, mise en valeur des sols, recharge des nappes) (Grolimund *et al.*, 1996). Dans une perspective de gestion des bassins d'infiltration, il sera nécessaire de s'intéresser à tous les épisodes d'infiltration puisque chacun est susceptible de modifier l'état initial de stabilité des particules colloïdales du sol.

#### 4.4.4 Transport facilité du zinc

En cherchant à évaluer le transport colloïdal du zinc, nous nous sommes rendus compte de l'ampleur que chacune des conditions nécessaires pour qu'il y ait effectivement transport facilité peut prendre. Le résultat de l'évaluation de chacune des conditions est présenté dans la figure 4.38.

Il faut tout d'abord qu'il y ait des colloïdes dans le milieu. Ceci ne rentre pas directement dans le cadre de notre étude mais nous avons toutefois observé la facilité avec laquelle le biofilm peut, lorsque les conditions sont favorables, se développer. En outre, quand on estime la quantité de colloïdes présents dans un milieu, il faut tenir compte également des colloïdes potentiellement présents, c'est-à-dire ceux qui ne sont pas encore sous forme colloïdale mais qui, lors de changements de conditions physicochimiques par exemple vont devenir des particules colloïdales. C'est le cas des biofilm qui se détachent en fragments colloïdaux par exemple mais aussi des agrégats minéraux qui peuvent se déstructurer.

Ensuite, nous avons vu qu'il fallait que les polluants auxquels on s'intéresse aient une certaine affinité pour ces colloïdes. La partie 4.4.2 insiste sur les différences entre biofilm et culture. En particulier, les bactéries, lorsqu'elles forment des biofilms, et c'est très largement le cas dans les sols, vont avoir une importante réactivité, vis-à-vis des protons, du zinc, et on peut imaginer le même comportement envers d'autres polluants. Il semble que la réactivité de la fraction extracellulaire soit très importante.

Dans cette étude, une forme de transport colloïdal a été mise en évidence même s'il reste dans de faibles proportions. Si le métal n'est pas toxique, cette faible fraction mobile n'est peut être pas importante mais dans le cas d'un métal toxique il faudra la considérer. En outre, la durée de l'étude reste assez courte, moins de 20 volumes poreux, et dans une colonne assez longue, 20 cm. Peut être faudrait il réduire l'échelle spatiale ou augmenter l'échelle temporelle pour prendre une plus juste mesure de l'ampleur de ce mode de transport.

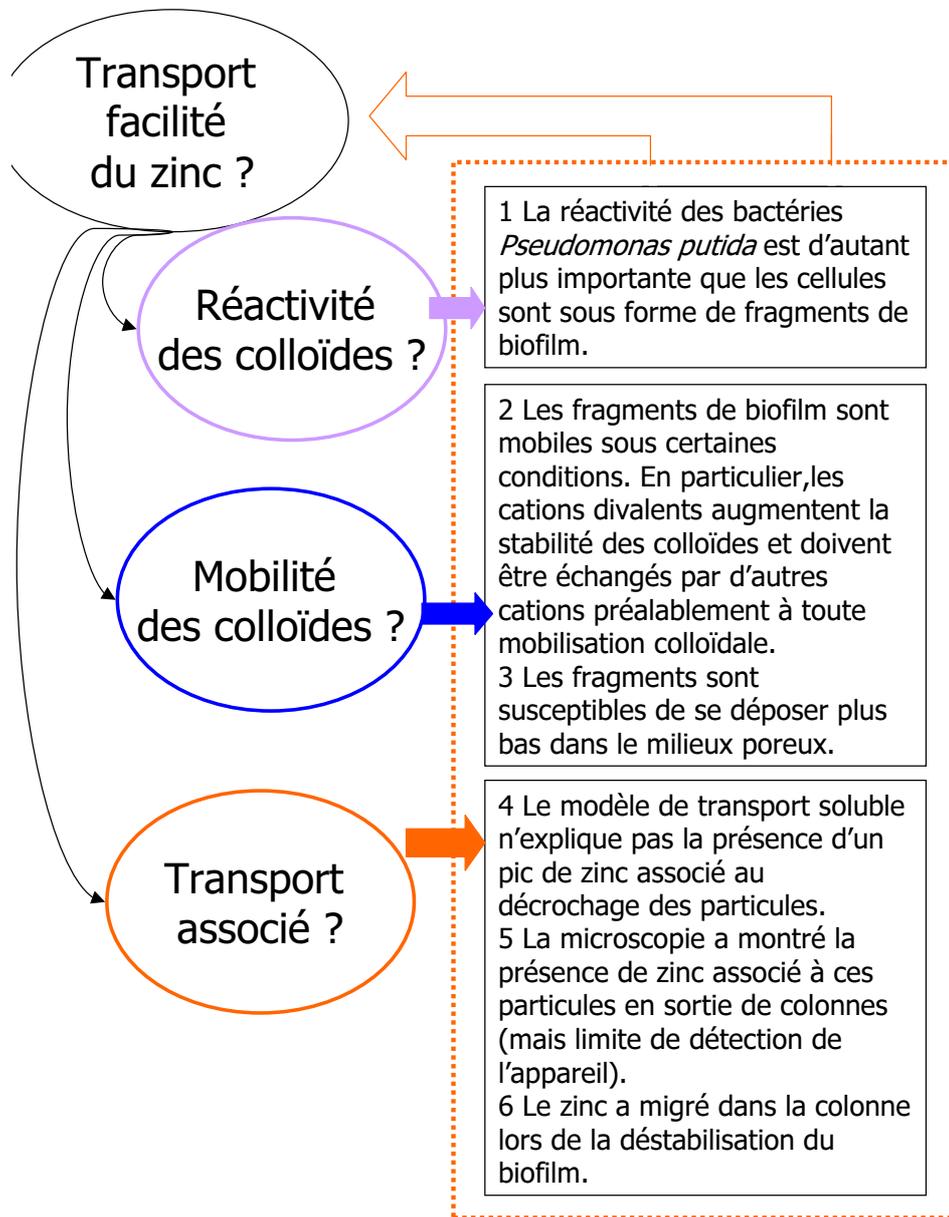


FIG. 4.38 – Les conditions nécessaires pour qu'il y ait transport facilité du zinc



## Chapitre 5

# Conclusions

L'étude réalisée s'est inscrite dans les travaux sur la compréhension des phénomènes de transport des polluants dans les sols, et en particulier, du transport facilité par les colloïdes bactériens. Au cours de la partie expérimentale, les investigations ont porté sur la caractérisation de la réactivité d'un biofilm bactérien, puis sur la mobilisation de ce biofilm et enfin sur le transport colloïdal ainsi provoqué.

### 5.1 Principaux résultats obtenus

La caractérisation des surfaces bactériennes mises en jeu a mis en évidence une réactivité particulière du biofilm, différente de celle des cellules libres. Les caractéristiques morphologiques, la réactivité et la composition des bactéries lorsqu'elles sont attachées à un support solide sont significativement différentes de celles qui sont sous forme planctonique. Dans les sols, les bactéries se développent souvent sous forme de biofilm et ont donc dans ce cas là, une affinité d'autant plus importante pour les polluants infiltrés avec les eaux de ruissellement.

Les investigations sur la stabilité du biofilm et sa capacité à se décrocher pour former des particules colloïdales ont mis en évidence l'importance de certains facteurs. Si les diminutions de force ionique du milieu sont effectivement responsables de la déstabilisation de fragments de biofilm, la composition du milieu, et en particulier la présence de cations divalents, va également jouer un rôle majeur. Ainsi, les cations divalents, comme ici le calcium, vont accroître considérablement la stabilité du biofilm. De plus, pour faire évoluer le système vers un état moins stable, un simple lessivage à l'eau n'aura pas d'effet. Il faudra mettre en oeuvre des mécanismes d'échange pour déloger les ions calcium et rendre au biofilm une certaine mobilité potentielle. En outre, les expériences ont montré que les variations de force ionique et de composition du milieu, dans les proportions gardées dans cette étude, n'engendrent qu'une faible déstabilisation du biofilm au

regard de la quantité totale de biofilm présente dans le milieu. La transposition de ces conclusions au milieu naturel sont multiples. Par exemple, on peut imaginer que les bactéries présentes en surface vont être plus faciles à décrocher que celles davantage en profondeur car en profondeur les conditions physicochimiques vont être plus stables.

Enfin, les essais en colonnes de laboratoire avec le zinc ont mis en évidence un comportement qui ne peut pas être entièrement expliqué par les modèles de transport ne prenant en compte que les polluants sous forme soluble. De même l'analyse des colonnes après décrochage du biofilm a montré l'évolution du zinc à l'intérieur du milieu, évolution qui semble être corrélée à la migration des fragments de biofilm. Toutefois, nous avons aussi constaté que le transport colloïdal pouvait être un phénomène transitoire vers un autre état de stabilité du système, le zinc ayant migré vers la profondeur. En plus des constatations en colonne, la forte réactivité du biofilm envers le zinc et sa mobilité potentielle montrent que les phénomènes de transport colloïdal doivent être pris en compte et surtout les conditions dans lesquels il devient prédominant doivent être identifiées.

De plus, nous avons mis en évidence que le transport colloïdal pouvait se traduire par la mobilisation et le dépôt un peu plus en profondeur des particules. Ainsi, ce n'est pas parce qu'il n'y a pas de polluants détectés dans la nappe que l'on peut affirmer que ceux-ci sont restés piégés à la surface. On peut facilement imaginer des scénarios pluvieux aboutissant au décrochage du biofilm contaminé puis au dépôt de ces mêmes colloïdes dans des horizons inférieurs dont il faudra tenir compte dans la gestion du site.

## 5.2 Originalité et contribution scientifique

Cette étude a permis de montrer le rôle très particulier des colloïdes bactériens, qui, par le fait même qu'ils sont vivants et par leurs propriétés de surface ont un comportement qui leur est spécifique. Par rapport à d'autres particules colloïdales, par exemple minérales, leur comportement est sûrement moins reproductible et ils ont fait pour l'instant l'objet d'un moindre intérêt.

Le choix de travailler sur un biofilm développé sur un milieu simple a permis de mettre en évidence plusieurs phénomènes. Cette étude compte parmi les rares à s'intéresser au milieu bactérien tel qu'il est principalement dans les milieux poreux, c'est-à-dire sous forme de biofilm. Alors que le rôle de nombreux paramètres, tant externes aux cellules (force ionique), qu'interne (respiration) avait été pris en compte dans l'analyse de la réactivité de la microfaune bactérienne, rien n'avait encore été mis en évidence sur les différences entre cellules libres et biofilm. Les caractéristiques propres des biofilms qui ont été mises en évidence montrent l'importance

à accorder à la distinction entre ces deux états physiologiques.

Cette étude a ensuite permis de s'intéresser à la composition des solutions, non seulement quantitativement, par la mesure de la force ionique, mais également qualitativement, en prenant en compte la composition des solutions. Nous avons montré que dans le cas des particules colloïdales bactériennes, la valence des cations présents va modifier la stabilité du biofilm.

D'un point de vue méthodologique, cette étude montre l'intérêt de croiser plusieurs approches pour une meilleure compréhension des mécanismes. L'utilisation de plusieurs échelles d'observation, depuis l'échelle macroscopique des colonnes jusqu'aux observations en microscopie électronique ou lors des titrations, permet de faire des observations, d'émettre des hypothèses et d'en vérifier la justesse. Des aller-retours entre les différentes échelles permettent ensuite de valider macroscopiquement les résultats obtenus à de plus faibles échelles.

Enfin, cette étude comporte un intérêt par rapport à la gestion des bassins d'infiltration d'eaux pluviales. Elle souligne en effet le rôle potentiel des biofilms bactériens et insiste sur la nécessité de s'en préoccuper. Elle met aussi en évidence la nécessité de mieux caractériser les eaux infiltrées et montre l'importance de l'état initial du sol c'est-à-dire sa teneur initiale en cations.

### 5.3 Perspectives et développement futurs

La prise en compte du compartiment bactérien dans les phénomènes de transport des métaux est relativement récente. Avant de pouvoir prédire efficacement le transport colloïdal des polluants, de nombreuses recherches doivent encore être poursuivies. En particulier, suite à cette étude, les points suivants doivent être précisés. L'ordre dans lequel ils sont présentés ne correspond pas à un quelconque classement. Les champs d'investigation sont variés et chacun apportera des informations complémentaires qui permettront de mieux comprendre les phénomènes impliqués.

#### *Compléments sur les méthodologies développées*

Suite aux analyses en microscopie électronique à balayage, il est apparu intéressant de conforter les résultats obtenus, notamment en descendant encore en résolution et en multipliant les analyses sur différents échantillons. Nous avons montré que cet outil était bien adapté à l'observation de tels échantillons et de nouvelles observations s'avèreraient sûrement fructueuses.

Les travaux initiés ici sur l'évaluation de la dimension fractale des flocs bactériens mériteraient d'être poursuivis. La connaissance de la dimension fractale permet en effet d'évaluer la véritable surface mise en jeu, mais aussi d'avoir une idée des interactions multiples qu'une dimension fractale élevée

engendre. Avec les limites mises en avant à propos de la collecte du biofilm, il s'agirait de définir un protocole qui ne modifie pas la structure des floccs. Cette définition géométrique des fragments décrochés serait complémentaire des données sur la réactivité des surfaces.

La hauteur des colonnes n'a pas permis d'observer le transport colloïdal sur de faibles distances. Des colonnes de longueur plus faible pourraient aisément être mises en places et permettraient sûrement d'apporter des informations complémentaires sur les mécanismes mis en jeu. De même des colonnes plus longues permettraient d'observer plusieurs cycles de transport et dépôt des particules. Des essais, si possible non-destructif, en ce sens doivent être menés pour améliorer la compréhension des phénomènes.

#### *Biofilm*

Dans cette étude nous avons travaillé avec un biofilm très particulier, développé pendant 5 jours et monospécifique. La durée de vie, et la présence de plusieurs espèces vont peut être conférer des propriétés différentes au biofilm. Il serait intéressant de regarder ces phénomènes. En particulier, au bout d'un certain temps, un décrochage spontané du biofilm est susceptible de se produire, lorsque les nutriments seront épuisés ou les cellules détruites. Le dispositif expérimental que nous avons mis en oeuvre serait adapté pour réaliser de telles expérimentations.

#### *Polymères extracellulaires*

Il semble que les caractéristiques particulières des biofilms leurs soient en partie conférées par les sécrétions polymériques. Nous n'avons pu qu'ébaucher une investigation de ces polymères. La séparation des cellules et de la matière extracellulaire reste délicate. Toutefois, la connaissance des propriétés et de la composition de ces surfaces apporterait des données complémentaires pour expliquer la grande réactivité des biofilms.

#### *Paramètres de stabilité*

Nous avons joué sur une faible partie des nombreux facteurs susceptibles de modifier la stabilité des suspensions colloïdales et dans notre cas des biofilms. Nous avons vu que la quantité mobilisée reste faible. D'autres facteurs, hydrodynamiques (variations du débit par exemple) ou chimiques (pH), peuvent s'avérer prédominant. L'alternance de cycles, par exemple de séchage et réhumidification, pourrait également exercer une influence sur la stabilité des colloïdes. Des études en ce sens sont menées dans d'autres domaines, dans des cas où l'objectif est d'éliminer le biofilm par exemple sur des tuyauteries. Il est nécessaire de tenir compte de ces résultats et de vérifier leur validité dans les milieux poreux. Dans un second temps, la connaissance de l'influence conjointe des différents paramètres susceptibles d'évoluer dans le milieu naturel, devrait permettre de prédire de manière satisfaisante la stabilité des biofilms.

#### *Autres colloïdes*

Bien sûr, nous avons choisi de ne travailler qu'avec des particules colloïdales bactériennes. Il importe que des études soient réalisées sur d'autres

particules colloïdales, et d'ailleurs plusieurs études en ce sens ont été ou sont réalisées. Mais il serait évidemment nécessaire de s'attacher à faire des passerelles et comparaisons dans les méthodologies employées. Dans un deuxième temps, le passage à la complexité par ce même genre d'études sur un sol réel apportera des informations intéressantes, qui manquent forcément dans des études sur des milieux modèles reconstitués.

*Affinité et mécanismes d'échange*

Nous avons vu que pour décrocher le biofilm il fallait tenir compte des phénomènes d'échange entre cations à la surface bactérienne. Ces phénomènes ont fait l'objet de plusieurs investigations sur des supports minéraux et il apparaît nécessaire aujourd'hui de vérifier les théories proposées pour le cas de supports bactériens. La connaissance de ces phénomènes est incontournable car toutes les expériences réalisées le sont dans un fond ionique susceptible d'entrer en compétition avec les polluants ou d'être échangé avec eux à la surface bactérienne. Les résultats pourraient alors être modifiés. Par exemple, il est probable que la capacité d'échange, que ce soit vis-à-vis des protons ou des cations métalliques, soit complètement différente dans un fond ionique de calcium plutôt que de sodium.

*Vers des modèles de transport colloïdal*

Des travaux de modélisation ne pourront être envisagés dans des conditions satisfaisantes qu'une fois suffisamment de données acquises sur les mécanismes mis en jeu, que ce soit dans les interactions métal colloïde ou sur la mobilité des colloïdes. Toutefois il importe dès à présent d'envisager de nouvelles études qui prépareront la prise en compte du transfert colloïdal dans les modèles de transport des polluants dans les sols.

*Applications à la gestion des bassins d'infiltration d'eaux pluviales*

Au delà des réponses apportées concernant le transport des métaux dans les sols des zones d'infiltration, cette étude permet d'ébaucher plusieurs perspectives concernant les bassins d'infiltration d'eaux pluviales.

Nous avons vu que la qualité des eaux infiltrées et leur chronologie influait sur la stabilité des biofilms. Il serait intéressant de regarder leur incidence sur d'autres phénomènes physiques et un lien pourrait sûrement être fait avec le colmatage, le transport des colloïdes minéraux ...

La microfaune s'est avérée une composante majeure du milieu étudié : il serait nécessaire de poursuivre les investigations sur ce compartiment, encore peu étudié, des bassins d'infiltration.

Enfin, dans le but de mieux définir des scénarios pouvant favoriser le transport colloïdal, il s'avérerait pertinent de reproduire le même genre d'étude en s'intéressant à d'autres facteurs physico-chimiques.



## Annexe A

# Compléments théoriques

### A.1 Définition des grandeurs physiques utilisées

La porosité est le rapport du volume des espaces vides sur le volume occupé par le solide.

La masse volumique apparente est égale à la masse du solide divisée par le volume.

On distingue la teneur en eau massique  $w$ , définie comme le rapport entre la masse d'eau et la masse de solide contenue dans le volume étudié, et la teneur en eau volumique,  $\theta$ , définie comme le rapport entre le volume d'eau et le volume de l'ensemble.

Enfin, le degré de saturation  $S$  est le rapport entre la teneur en eau volumique  $\theta$  et la porosité géométrique  $e$  :

$$S = \frac{\theta}{e} \quad (\text{A.1})$$

### A.2 Complément bibliographique sur la détermination de la dimension fractale

Pour un agrégat fractal, l'intensité angulaire diffusée est exprimée par (Thill *et al.*, 1998) :

$$I_{scatt}(q) \propto F(q) \cdot S(q) \quad (\text{A.2})$$

$F(q)$  est le facteur de forme, qui est l'intensité diffusée par les particules sphériques élémentaires, appelées diffuseur.

$S(q)$  est le facteur de structure et la transformée de Fourier de la fonction d'autocorrélation de la masse. Dans la géométrie fractale,

$$S(q) \propto q^{-D_f} \quad (\text{A.3})$$

quand  $r_s \ll 1/q \ll \xi$  avec  $D_f$  la dimension fractale,  $r_s$  le rayon de dispersion et  $\xi$  la distance au dessus de laquelle la distribution de masse dans l'agrégat ne peut plus être considérée comme fractale.

q le vecteur de diffusion est défini par

$$q = 4\pi m \lambda^{-1} \sin(\theta/2) \quad (\text{A.4})$$

avec  $m$  le contraste optique,  $\lambda$  la longueur d'onde du rayon incident et  $\theta$  l'angle de diffusion.

L'intensité diffusée  $I_{exp}(\theta)$  obtenue après correction à partir de la géométrie des détecteurs est normalisée par le nombre de diffuseurs (Thill *et al.*, 1999). Il vient :

$$I_{norm}(\theta) = I_{exp}(\theta) \frac{V_s}{\phi \cdot V_{cell}} = \frac{I_{exp}\theta}{N_s} \quad (\text{A.5})$$

avec  $V_s$  le volume primaire de diffusion,  $\phi$  la fraction volumique des diffuseurs en suspension,  $V_{cell}$  le volume de diffusion et

$$N_s = (\phi \cdot V_{cell} / V_s) \quad (\text{A.6})$$

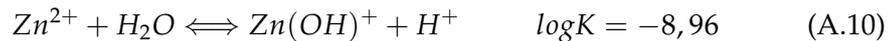
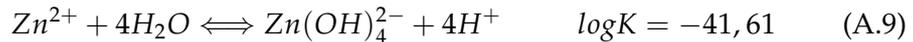
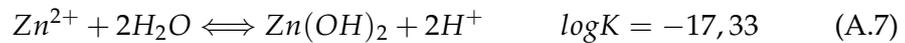
le nombre de diffuseurs dans le volume de diffusion. Le vecteur de diffusion  $q$  est relié à la distance maximale d'interférence par la relation  $q \cdot d = \pi$ .

Parallèlement un programme numérique permet d'obtenir, en utilisant la théorie de Mie, l'intensité diffusée par une sphère de  $0,8 \mu\text{m}$  de diamètre,  $I_{num}(\theta)$  (Thill *et al.*, 2000).

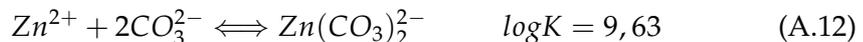
Il est alors possible de caler  $I_{norm}(\theta)$  à  $I_{num}(\theta)$  pour les faibles concentrations et d'en déduire les caractéristiques des agrégats (Thill *et al.*, 2000).

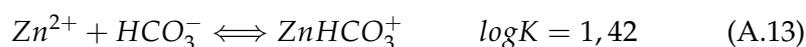
### A.3 Espèces solubles et minérales du zinc

Les hydrocomplexes



Les complexes carbonatés

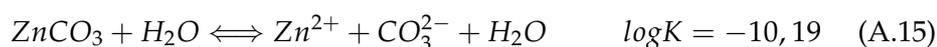




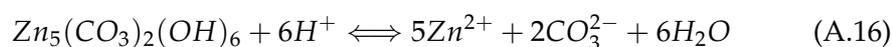
Deux carbonates et un hydroxycarbonate de zinc  
la smithsonite



le carbonate de zinc hydraté



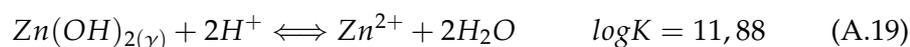
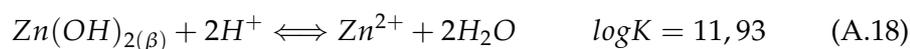
l'hydrozincite



Un oxyde et trois hydroxydes de zinc  
la zincite



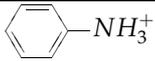
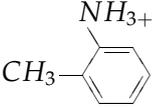
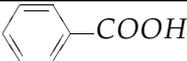
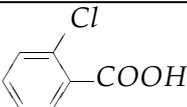
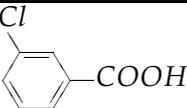
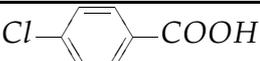
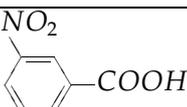
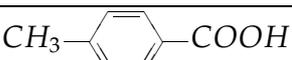
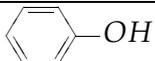
les trois hydroxydes

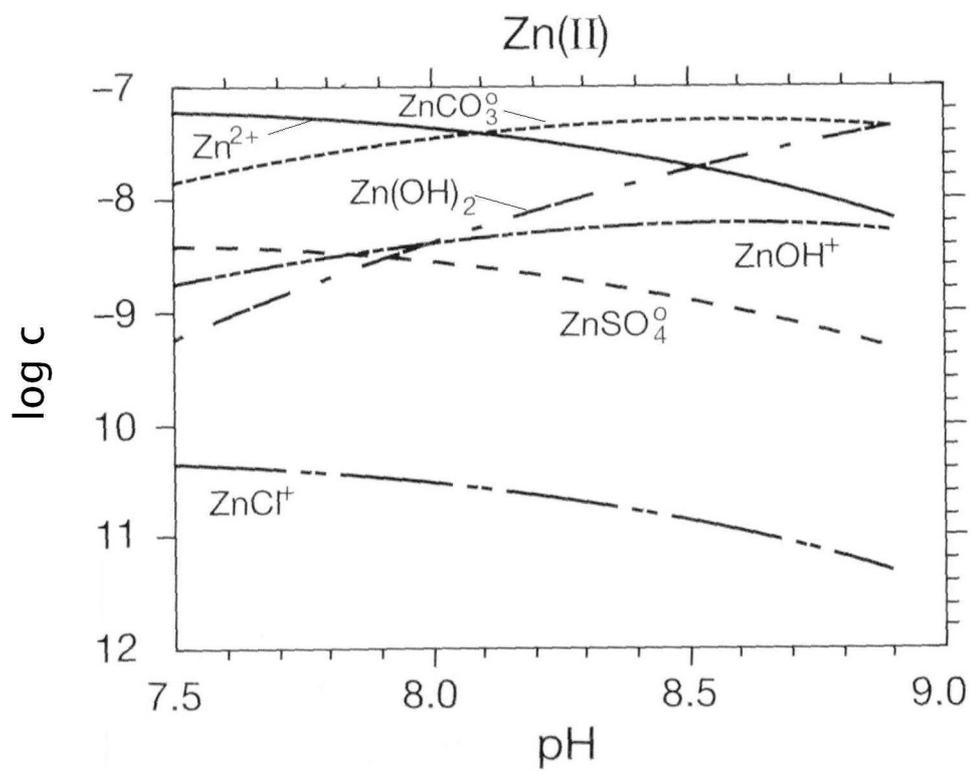


#### A.4 Constantes des composés en phase aqueuse

Elles sont répertoriées dans le tableau A.1. Les valeurs des constantes de dissociation des groupements fonctionnels trouvées par les titrations de surface sont comparées à ces valeurs.

TAB. A.1 – Constantes d'acidité des amines et acides carboxyliques

Nom	Formule	pKa
<b>les amines</b>		
ion ammonium	$NH_4^+$	9,24
ion méthylammonium	$CH_3NH_3^+$	10,62
ion dyméthylammonium	$(CH_3)_2NH_2^+$	10,73
ion cyanométhylammonium	$N \equiv C - CH_2NH_3^+$	5,34
ion anilinium		4,63
ion <i>p</i> -méthylanilinium		5,00
ion <i>p</i> -nitroanilinium		1,01
<b>les acides carboxyliques</b>		
acide formique	$HCOOH$	3,68
acide acétique	$CH_3COOH$	4,74
acide benzoïque		4,18
acide <i>o</i> /chlorobenzoïque		2,90
acide propanoïque	$CH_3CH_2COOH$	4,85
acide butanoïque	$CH_3CH_2COOH$	4,80
acide chloroacétique	$ClCH_2COOH$	2,82
acide dichloroacétique	$Cl_2CHCOOH$	1,30
acide trichloroacétique	$CCl_3COOH$	0,70
acide trifluoroacétique	$CF_3COOH$	0,23
acide 2-chlorobutanoïque	$CH_3CH_2CHClCOOH$	2,85
acide 3-chlorobutanoïque	$CH_3CHClCH_2COOH$	4,05
acide 4-chlorobutanoïque	$ClCH_2CH_2CH_2COOH$	4,52
acide <i>m</i> -chlorobenzoïque		3,80
<i>p</i> -chlorobenzoïque		4,00
<i>p</i> -nitrobenzoïque		3,40
<i>p</i> -toluïque		4,36
hydrochlorique	$HCl$	-2,2
phénol		10,0
éthanol	$CH_3CH_2OH$	16,0
eau	$HOH$	15,74

FIG. A.1 – Spéciation du zinc (Sigg *et al.*, 2000)



## Annexe B

# Protocoles expérimentaux détaillés

### B.1 Composition du milieu nutritif

#### B.1.1 Principe de composition

Le milieu devait respecter le ratio suivant : C/N/S/P : 100/10/1/1, avec une concentration d'acétate de sodium de 1g/L. En plus, du fer et du magnésium devaient être introduits, étant essentiels pour le développement de la bactérie.

#### B.1.2 Produits utilisés

	Poids moléculaire en g/mol	Quantité en g par litre de milieu
CH <sub>3</sub> COONa	82	1000
FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	278	12,7
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	246,5	11,3
NH <sub>4</sub> .Cl	53,5	111,8
KH <sub>2</sub> .PO <sub>4</sub>	136	54,2

#### B.1.3 Protocole

Le milieu est réalisé avec de l'eau distillée. Après ajout des réactifs et agitation, il est passé à l'autoclave 20 minutes à 120°C.

### B.2 Composition des autres solutions

TAB. B.1 – Composition des solutions

Solutions	Sels utilisés	Concentration mol.L <sup>-1</sup>	Masse molaire g.mol <sup>-1</sup>
Solution pour lavages et traçages			
NaBr10	NaBr	0,01	Br : 79,9 et Na : 23,0
Essais en batches			
Zn100	NaBr ZnNO <sub>3</sub> .6H <sub>2</sub> O	0,01 1,53*10 <sup>-3</sup>	Zn : 65,4
Zn50	NaBr ZnNO <sub>3</sub> .6H <sub>2</sub> O	0,01 7,64*10 <sup>-4</sup>	
Zn20	NaBr ZnNO <sub>3</sub> .6H <sub>2</sub> O	0,01 3,06*10 <sup>-4</sup>	
Zn10	NaBr ZnNO <sub>3</sub> .6H <sub>2</sub> O	0,01 1,53*10 <sup>-4</sup>	
Zn5	NaBr ZnNO <sub>3</sub> .6H <sub>2</sub> O	0,01 7,64*10 <sup>-5</sup>	
Zn2	NaBr ZnNO <sub>3</sub> .6H <sub>2</sub> O	0,01 3,06*10 <sup>-5</sup>	
Zn1	NaBr ZnNO <sub>3</sub> .6H <sub>2</sub> O	0,01 1,53*10 <sup>-5</sup>	
Zn0,5	NaBr ZnNO <sub>3</sub> .6H <sub>2</sub> O	0,01 7,64*10 <sup>-6</sup>	
Zn0,2	NaBr ZnNO <sub>3</sub> .6H <sub>2</sub> O	0,01 3,06*10 <sup>-6</sup>	
Zn0,1	NaBr ZnNO <sub>3</sub> .6H <sub>2</sub> O	0,01 1,53*10 <sup>-6</sup>	
Essais en colonnes			
Ca/Zn 4 :1	CaBr <sub>2</sub> ZnNO <sub>3</sub> .6H <sub>2</sub> O	0,004 0,001	Ca : 40,1
Ca/Zn 1 :4	CaBr <sub>2</sub> ZnNO <sub>3</sub> .6H <sub>2</sub> O	0,001 0,004	
NaBr 100%	NaBr	0,01	
NaBr 10%	NaBr	0,001	
NaBr 1%	NaBr	0,0001	

### B.3 Préparation du sable

Le sable est composé d'un milieu équimassique de deux fractions de taille effective moyenne égale à 0,55 mm et 0,95 mm. La fraction la plus grossière facilite l'infiltration et la partie la plus fine offre davantage de sites de fixation aux cellules bactériennes lors de l'installation du biofilm (Hébrard-Labit, 1998).

Le lavage du sable consiste à faire tremper 1200 g de sable dans un bac en verre, sous la hotte. La solution de lavage est composée de 1015 mL d'H<sub>2</sub>O, 385 mL d'HNO<sub>3</sub> (16N) et 500 mL d'HCl (12N).

Ensuite le sable est soigneusement rincé tant que le pH reste en dessous de 6, plusieurs fois à l'eau du robinet et pour finir 3 fois à l'eau déminéralisée. Le sable est laissé sécher dans une étuve à 100°C puis placé au four à 500°C pour 4 heures afin d'éliminer les traces de matières organiques.

Ces deux étapes permettent de débarasser le sable des traces de matière organique et de carbonates qui auraient pu contribuer à la rétention des métaux (Hébrard-Labit, 1998). Avant utilisation, le sable est passé à l'autoclave 20 minutes à 120°C, puis remis à l'étuve pour séchage.

### B.4 Présentation de la colonne utilisée

La figure B.1 présente la colonne avec laquelle nous avons travaillé. Dans notre cas la jaquette thermostatée n'a pas été utilisée. La partie principale est composée d'un tube de verre et de deux pistons. Chaque piston est constitué de plusieurs pièces en plastique et permet d'ajuster la longueur du milieu poreux étudié.

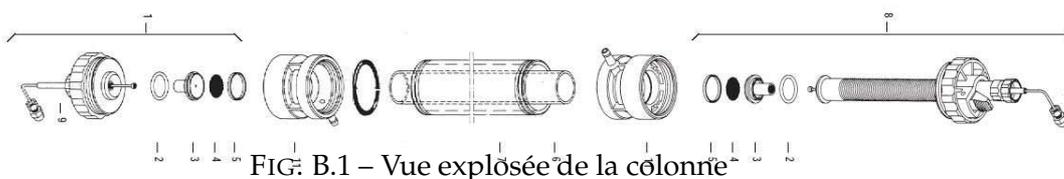


FIG. B.1 – Vue explosée de la colonne

### B.5 Méthode de Lowry pour le dosage des protéines

#### B.5.1 Principe

L'ajout d'un réactif alcalin de tartrate cuprique qui complexe avec les liaisons peptides, provoque une coloration violette avec l'ajout de phénol. Ensuite, la lecture de l'absorbance ( $500 \leq \lambda \leq 800$ ) permet, en passant par une courbe de calibration, d'obtenir la quantité de protéines.

**B.5.2 Réactifs utilisés**

- réactif de Lowry
- solution DOC (deoxycholate de sodium)
- solution TCA (acide trichloroacétique)
- Folin et Cicolaneus phénol
- standard de protéines BSA

**B.5.3 Échantillons dosés**

- 1 blanc : 1 mL d'eau (ou de milieu de culture sans les bactéries)
- 5 standards de 1 mL : 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de protéines, 100, 200, 300 et 400
- les échantillons à doser : 1 mL chacun

**B.5.4 Protocole suivi**

- ajouter aux échantillons 1 mL de réactif de Lowry
- agiter
- laisser 20 minutes à température ambiante
- ajouter (avec agitation rapide et immédiate), 0,5 mL de phénol de Folin et Cicolaneus
- laisser la couleur se développer 30 minutes
- transférer et mesurer l'absorbance
- calculer à partir de la courbe de calibration (figure B.2) et des éventuelles dilutions.

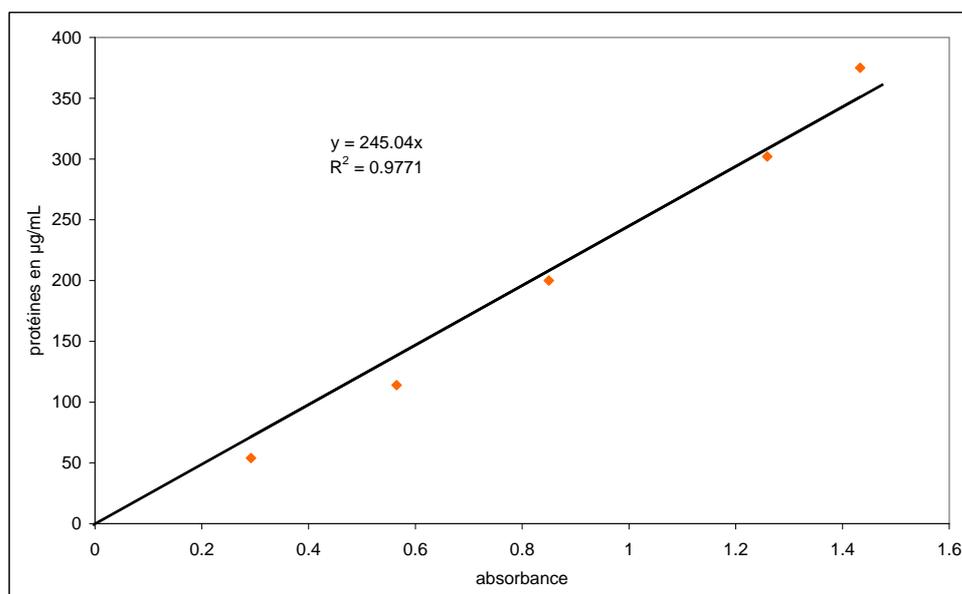


FIG. B.2 – Exemple de courbe de calibration de la méthode de Lowry

## B.6 Dénombrement sur boîtes de Pétri

### B.6.1 Matériel nécessaire

- poudre pour gélose
- boîtes de Pétri
- tubes pour les dilutions

### B.6.2 Protocole suivi

Un litre de gélose est préparé à partir d'une poudre de gélose et d'eau distillée. Après autoclavage, la gélose est refroidi avant d'être coulée dans des boîtes de Pétri, dans une atmosphère stérile. Les tubes servant aux dilutions contiennent 9mL de solution de NaBr ou de NaCl à 5 g/L.

Autour d'une flamme, l'échantillon est dilué en mélangeant 1 mL de la dilution précédente à 9 mL de solution ionique. La gamme de concentrations adéquates est sélectionnée et pour chaque dilution 0,1 mL de suspension est étalé sur la surface gélosée. 3 réplicats sont effectués pour chaque dilution puis les boîtes ensemencées sont placées à l'incubateur pour 48 heures. Le colonies formées sont alors dénombrées : entre 10 et 1000 colonies par boîte sur la gamme de concentrations adéquate.

## B.7 Mise en place du biofilm

Dans les colonnes lavées (éthanol + eau distillée), 600 grammes de sable sont déposés, pour une hauteur de 20 cm, au dessus d'une grille fine. Le système est maintenu en place par deux pistons. La colonne est ensuite reliée aux capillaires d'alimentation et d'évacuation.

Dans un premier temps les colonnes sont alimentées en circuit fermé par une pompe péristaltique. Le réservoir est un erlen maintenu à pression ambiante par l'intermédiaire d'un filtre à air. Des capillaires en téflon permettent de faire circuler les solutions. Des raccords et robinets sont utilisés pour changer de solution. L'alimentation en circuit fermé dure 12 volumes des pores, soit 12 h à un débit de 1 mL/min.

La croissance du biofilm est suivie par la prise quotidienne d'échantillons en sortie de colonne et l'analyse de leur teneur en protéines. Il est alors possible de déterminer quand le biofilm est "stable" c'est-à-dire quand la concentration en sortie de colonne est constante. Le pH et la conductivité électrique de ces échantillons seront également mesurés pour suivre leur évolution avec le développement du biofilm dans la colonne.

## B.8 Destruction de la colonne et analyse de l'état final

Après la colonisation, pour définir un état initial ou à la fin des expériences de déstabilisation, nous avons démonté la colonne pour analyser

la teneur en eau, en protéines et en zinc, dans le milieu poreux. Pour ce faire, le piston supérieur était enlevé et à l'aide d'une spatule des échantillons d'environ 2 cm de hauteur étaient prélevés. Une attention particulière était donnée pour supprimer les grains de sable restant sur les parois de la colonne. Sur chaque échantillon, correspondant à une soixantaine de grammes de sable sec, les analyses précédemment mentionnées étaient réalisées.

## B.9 Mesure de l'hydrophobie

### B.9.1 Matériel nécessaire

- n-hexadécane
- agitateur

### B.9.2 Protocole suivi

- prendre une suspension bactérienne telle que  $DO_{600} = 1$
- mettre 4,5 mL de solution dans des tubes
- vortexer et prélever 0,5 mL pour mesurer précisément la  $DO_{600}$  initiale
- ajouter 1 mL de n-hexadécane
- vortexer 1 minute
- laisser décanter 10 minutes
- prélever 3,5 mL de la phase aqueuse et mesurer la  $DO_{600}$
- reverser les 3,5 mL dans le tube
- vortexer 1 minute
- laisser décanter 10 minutes
- ...
- renouveler ces étapes jusqu'à obtenir une  $DO_{600}$  constante dans la phase aqueuse

### B.9.3 Expression des résultats

Les résultats sont exprimés en % de l'absorbance de la solution initiale. Le coefficient de partition hexadécane/eau est aussi employé, il est défini par  $K_{HW} = \frac{\text{fraction dans l'hexadécane}}{\text{fraction dans l'eau}}$

## B.10 Préparation des échantillons pour la microscopie électronique

### B.10.1 Réactifs nécessaires

- glutaraldéhyde 4%
- tampon cacodylate de sodium 0,2 mol/L pH ajusté

### **B.10.2 Protocole suivi**

Chaque suspension bactérienne est centrifugée puis mélangée au tampon et au glutaraldéhyde. Le mélange est laissé 1 h environ à température ambiante sans agitation mais en ayant remis les bactéries en suspension, puis centrifugé. Le culot est ensuite mis en suspension dans le tampon seul. Cette étape est renouvelée plusieurs fois pour éliminer le glutaraldéhyde. L'échantillon ainsi préparé est conservé à 4°C jusqu'à utilisation. L'inclusion doit se faire relativement rapidement, quelques jours, après la fixation.

## **B.11 Titrations de surface**

### **B.11.1 Matériel**

Le banc de titration se compose d'un pH-mètre et d'une électrode de bonne qualité et d'un titrateur automatique. Le réacteur est placé sur une plaque agitatrice avec agitateur magnétique. Un système thermostaté permet de maintenir l'échantillon à la température souhaitée. Une arrivée d'azote est également nécessaire.

### **B.11.2 Solutions utilisées**

Toutes les solutions sont réalisées dans un fond ionique de bromure de sodium de 0,01 mol/L. Les solutions acide (acide nitrique 0,001 mol/L) et basique (hydroxyde de sodium 0,002 mol/L) qui sont ajoutées à l'échantillon lors de la titration sont précisément réalisées à partir d'ampoules de solution titrisol.

### **B.11.3 Protocole suivi**

Après calibration préalable de l'électrode, 50 mL de solution à titrer sont placés dans le réacteur et soumis à agitation à température constante. Le bullage d'azote est activé, la sonde pH placée dans le réacteur et celui-ci fermé hermétiquement.

Après une demi-heure d'équilibration, la titration est lancée. Elle est pilotée par le logiciel "titratio" et elle consiste à faire des ajouts constants d'acide ou de base et à mesurer le pH une fois le système stabilisé. Les critères de stabilité peuvent être fixés par le temps de mesure ou l'écart maximum pour décider de la stabilité.

On obtient alors l'évolution du pH en fonction de la quantité d'ions H<sup>+</sup> ajoutés. La quantité de protons échangés avec la surface peut alors être calculée.

### B.12 Analyse des pics : méthode employée

La figure B.3 présente les paramètres utilisés pour comparer entre eux les différents scénarios de déstabilisation du biofilm. La quantité de biofilm décroché a été évaluée en considérant l'aire d'un triangle, de hauteur la quantité maximale de protéines dans l'effluent et de base la durée du pic de protéines.

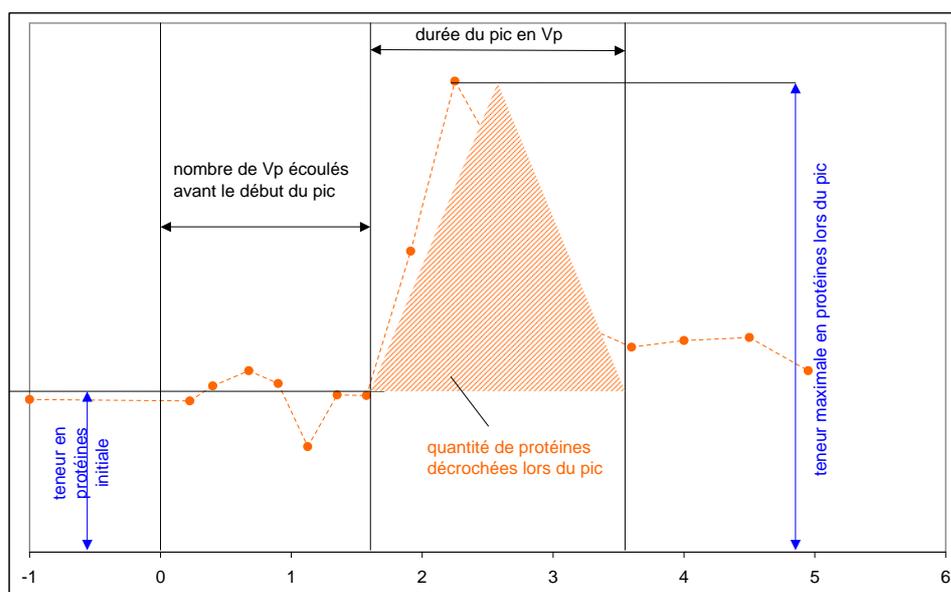


FIG. B.3 – Paramètres caractéristiques des pics de déstabilisation

## Annexe C

# Résultats complémentaires et détaillés

### C.1 Microscopie Électronique à Balayage

#### C.1.1 Culture de *Pseudomonas putida*

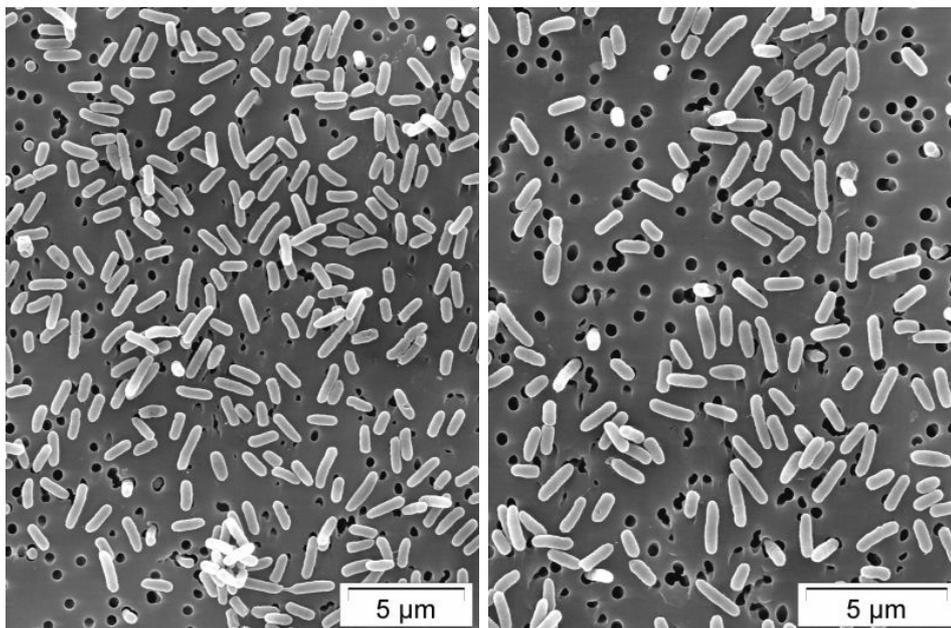


FIG. C.1 – Cellules de *Pseudomonas putida* - Grossissements 5000 et 6000

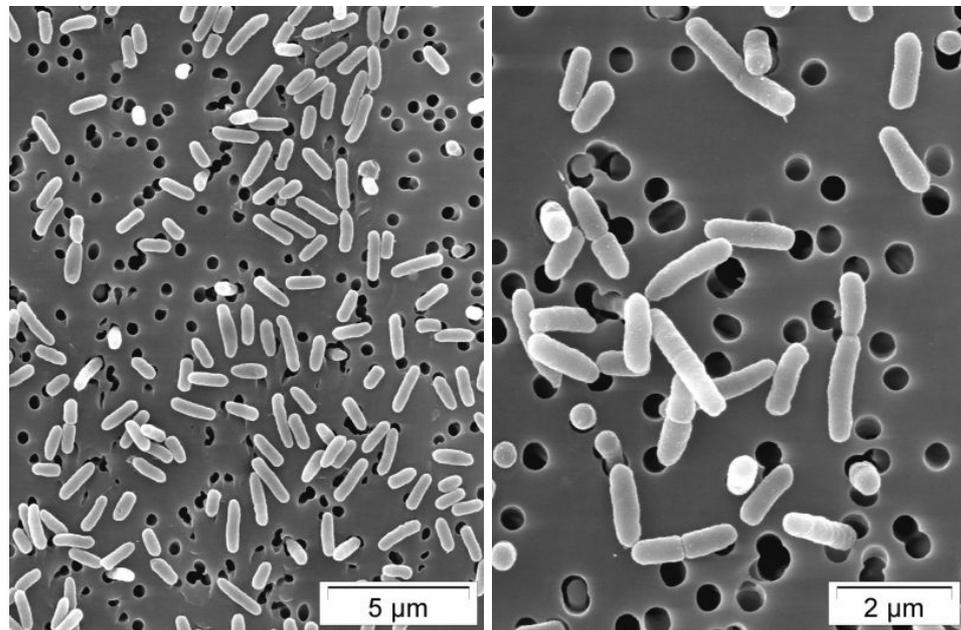


FIG. C.2 – Cellules de *Pseudomonas putida* - Grossissements 6000 et 12000

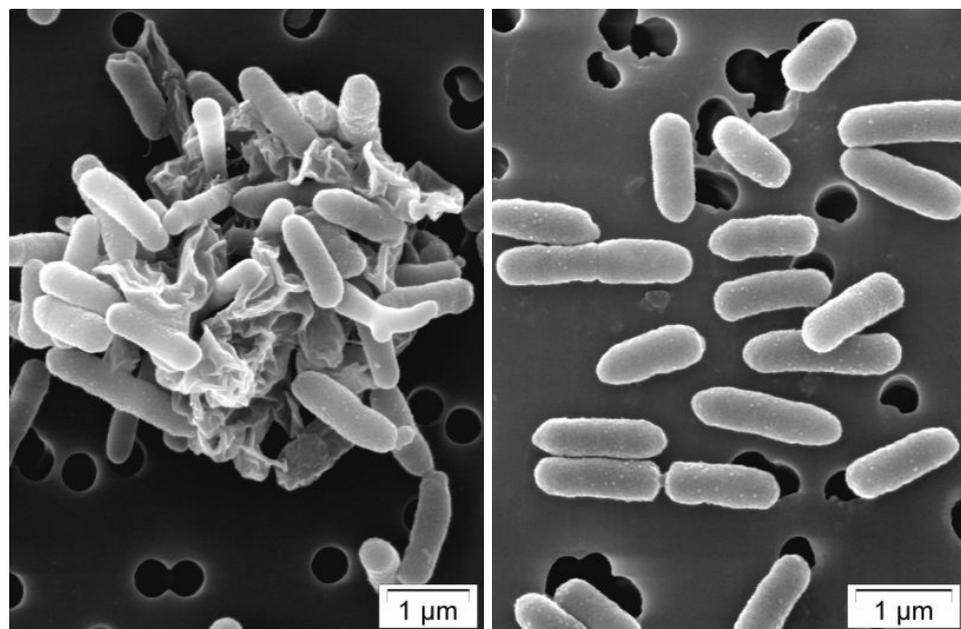


FIG. C.3 – Cellules de *Pseudomonas putida* - Grossissements 17000 et 20000

C.1.2 Sable colonisé

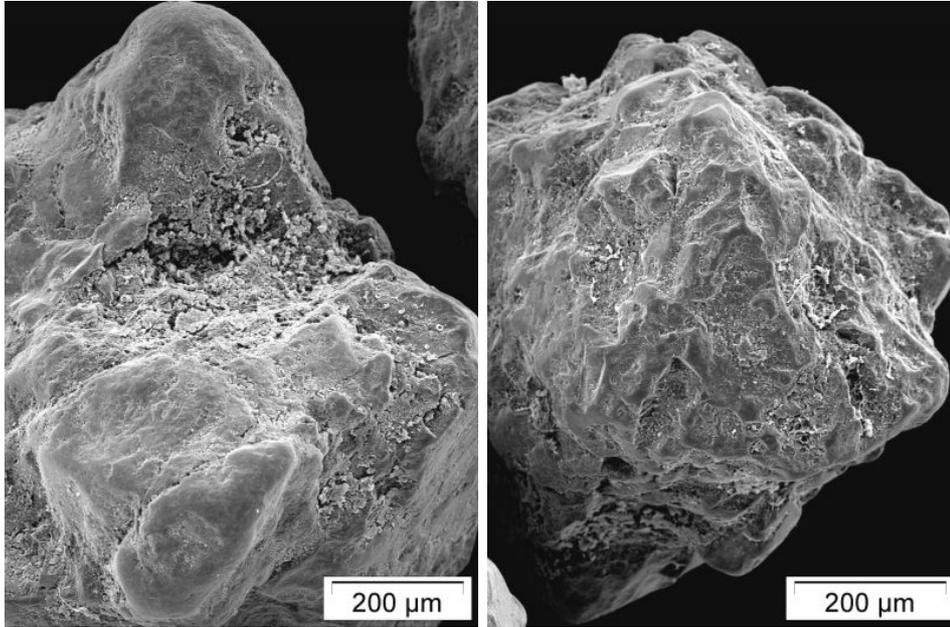


FIG. C.4 – Sable colonisé - Grossissement 150

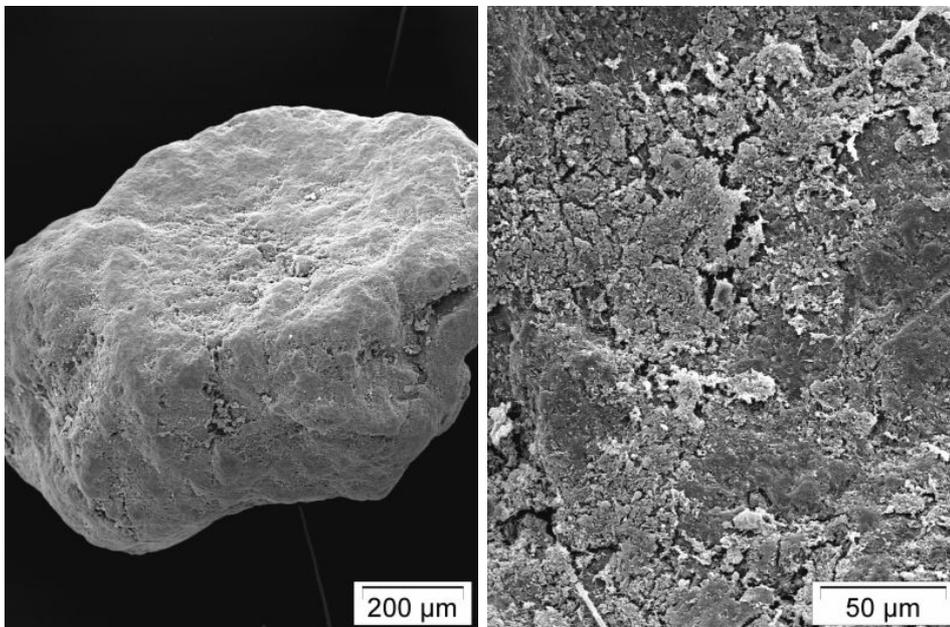


FIG. C.5 – Sable colonisé - Grossissements 100 et 500

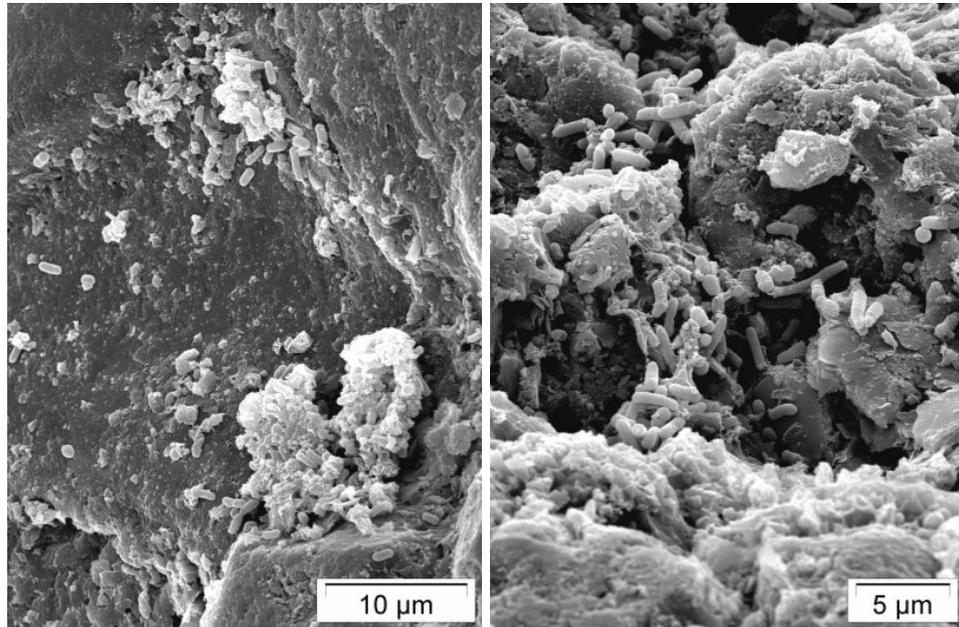


FIG. C.6 – Sable colonisé - Grossissements 3000 et 4000

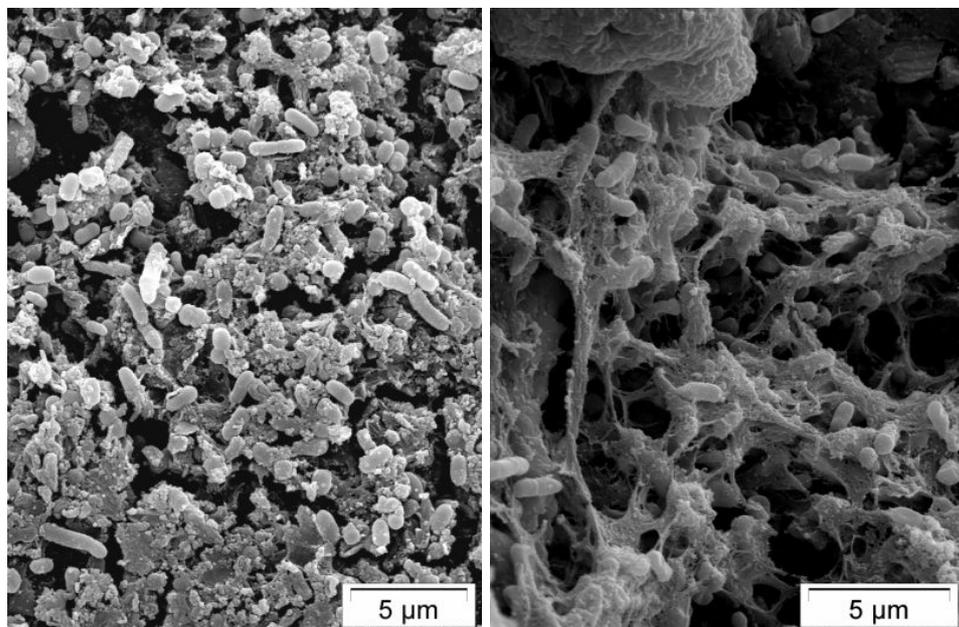


FIG. C.7 – Sable colonisé - Grossissements 5000 et 6000

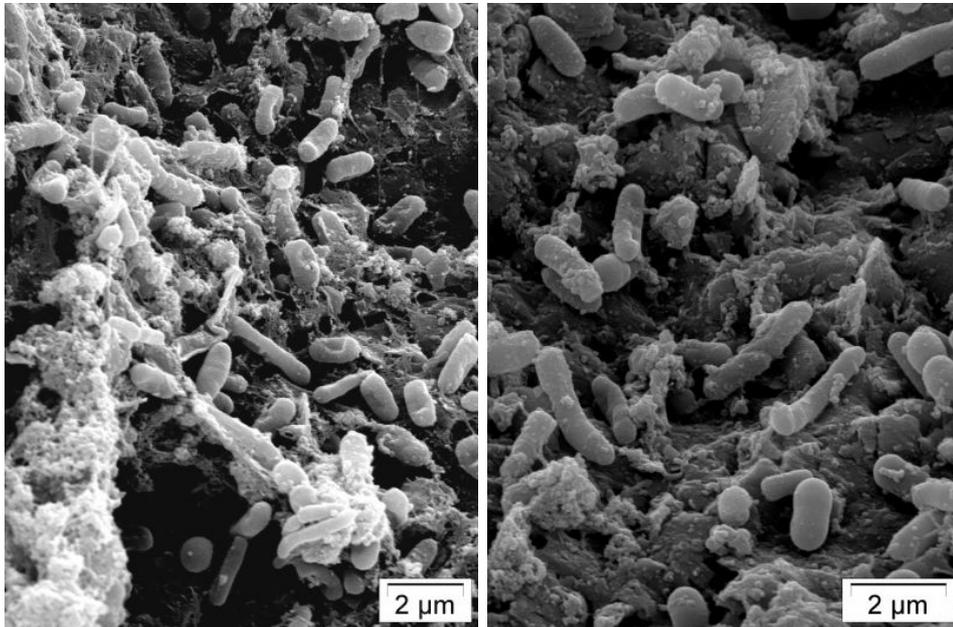


FIG. C.8 – Sable colonisé - Grossissements 8000 et 10000

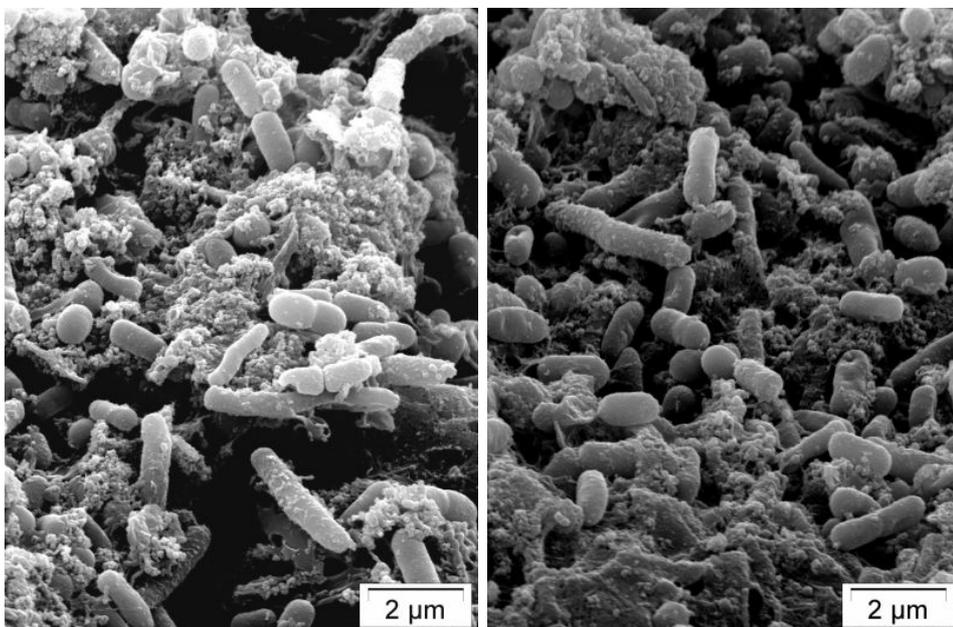


FIG. C.9 – Sable colonisé - Grossissement 10000

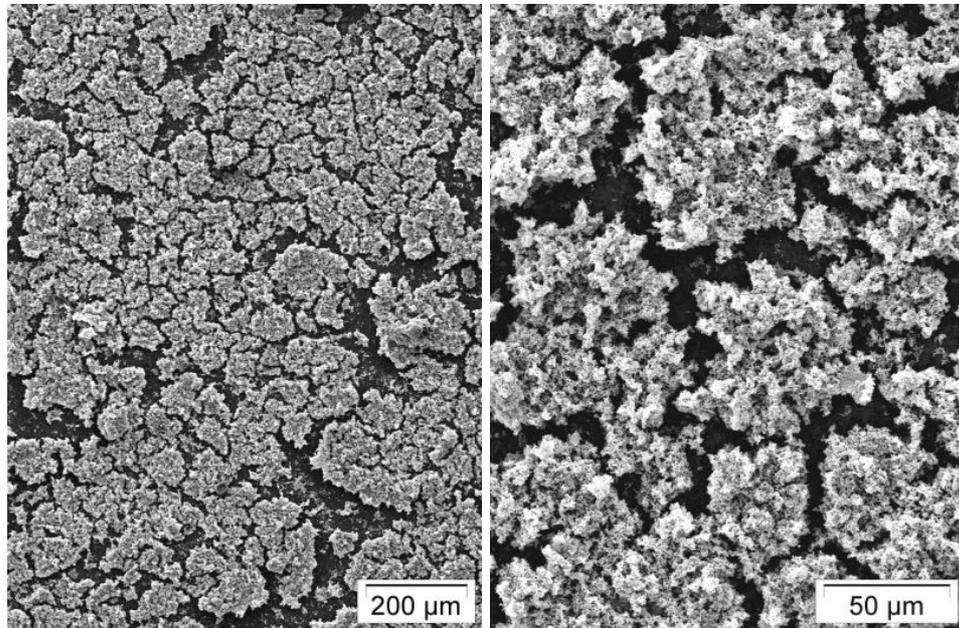
**C.1.3 Biofilm décroché sans variations des conditions du milieu**

FIG. C.10 – Fragments de biofilm - Grossissements 100 et 500

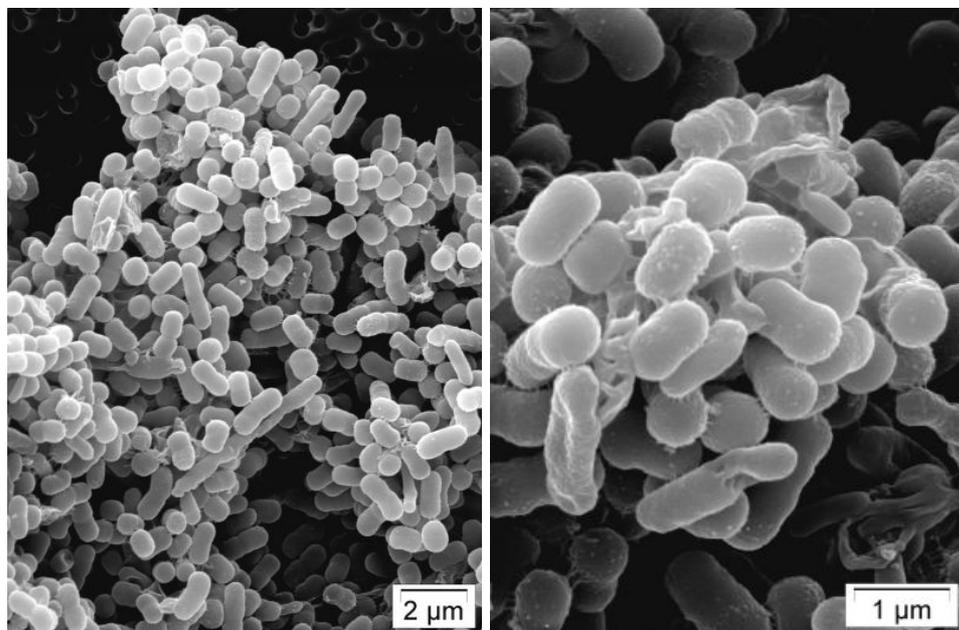


FIG. C.11 – Fragments de biofilm - Grossissements 7000 et 20000

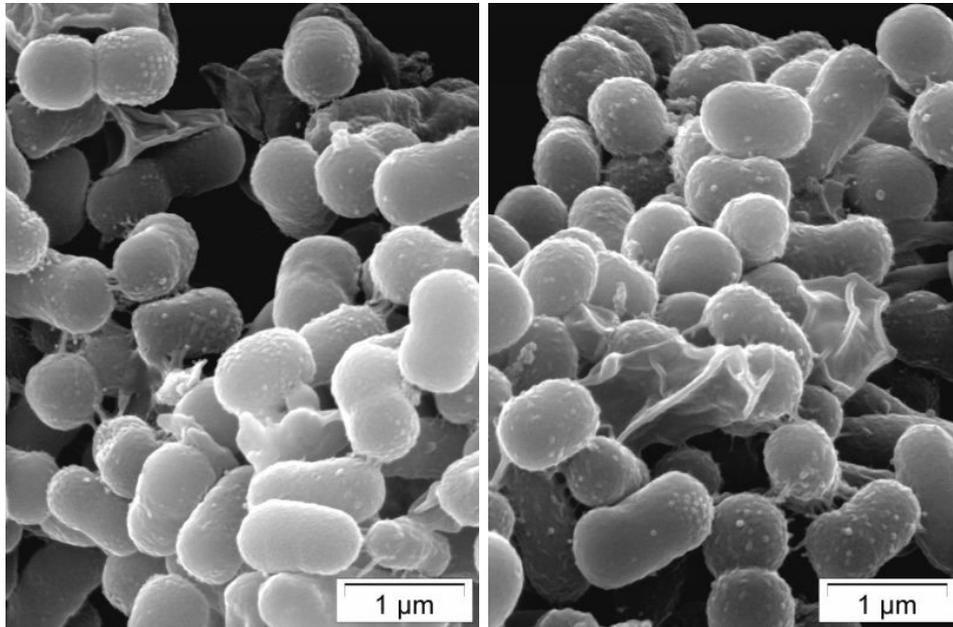


FIG. C.12 – Fragments de biofilm - Grossissement 25000

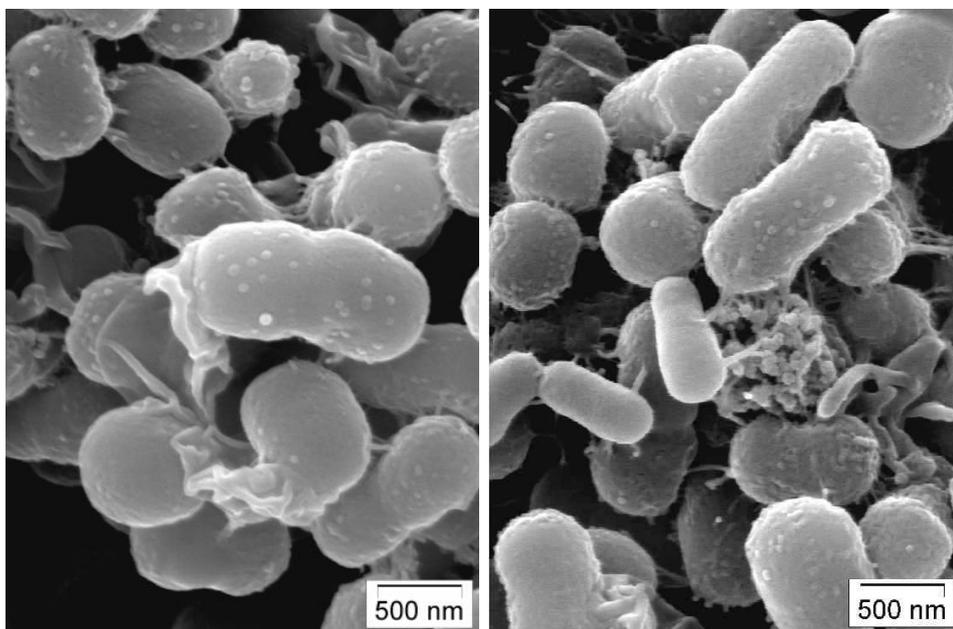


FIG. C.13 – Fragments de biofilm - Grossissement 35000

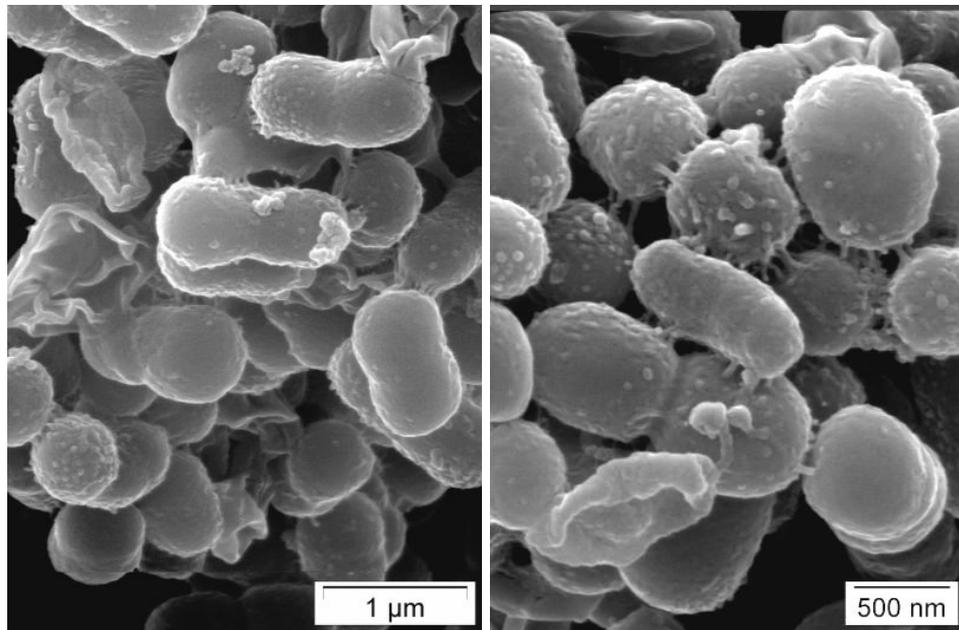


FIG. C.14 – Fragments de biofilm - Grossissements 30000 et 40000

C.1.4 Biofilm décroché lors du changement de force ionique

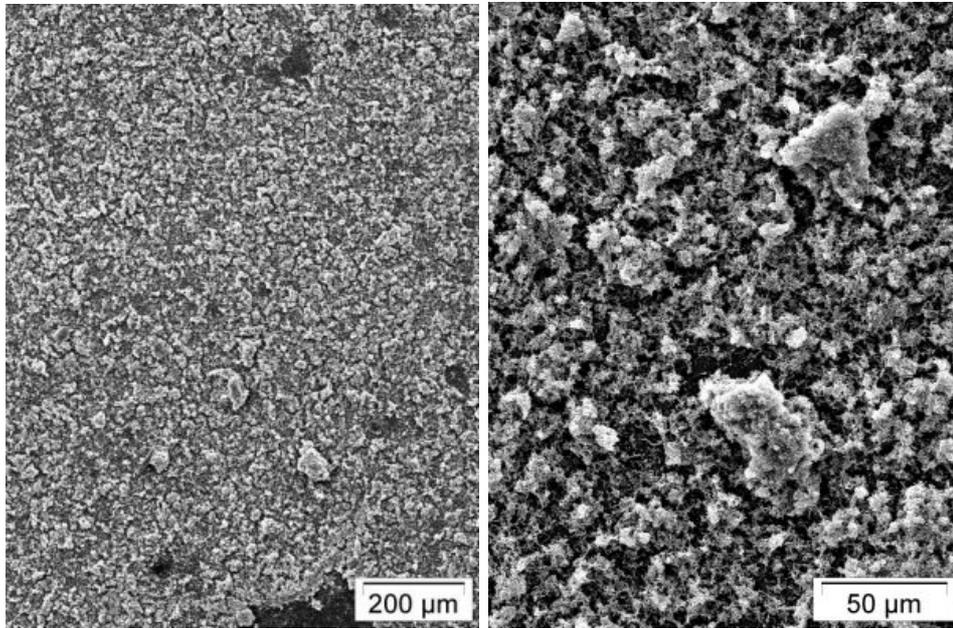


FIG. C.15 – Fragments de biofilm - Grossissements 400 et 100

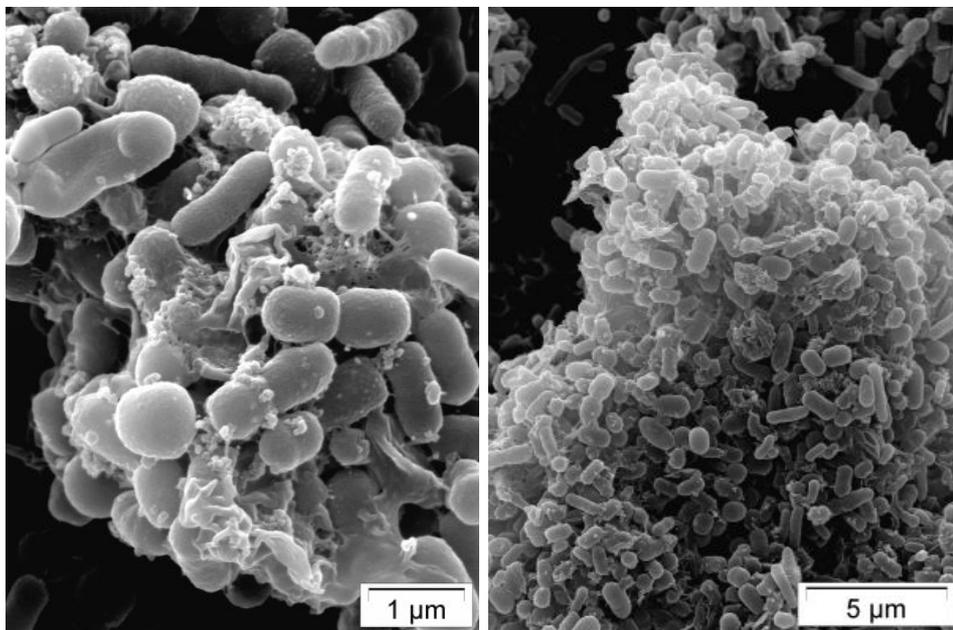


FIG. C.16 – Fragments de biofilm - Grossissements 2000 et 6000

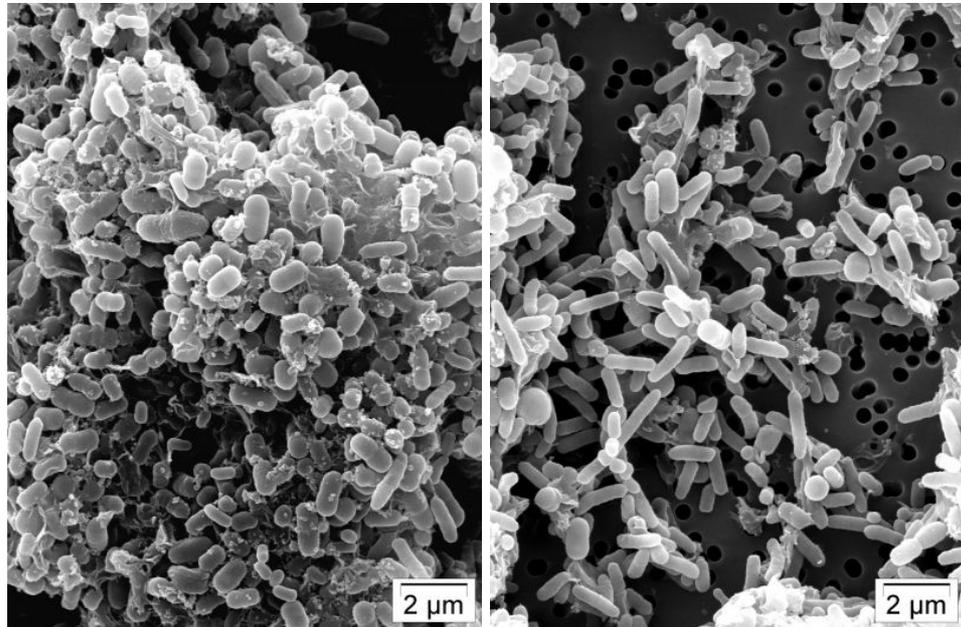


FIG. C.17 – Fragments de biofilm - Grossissement 7000

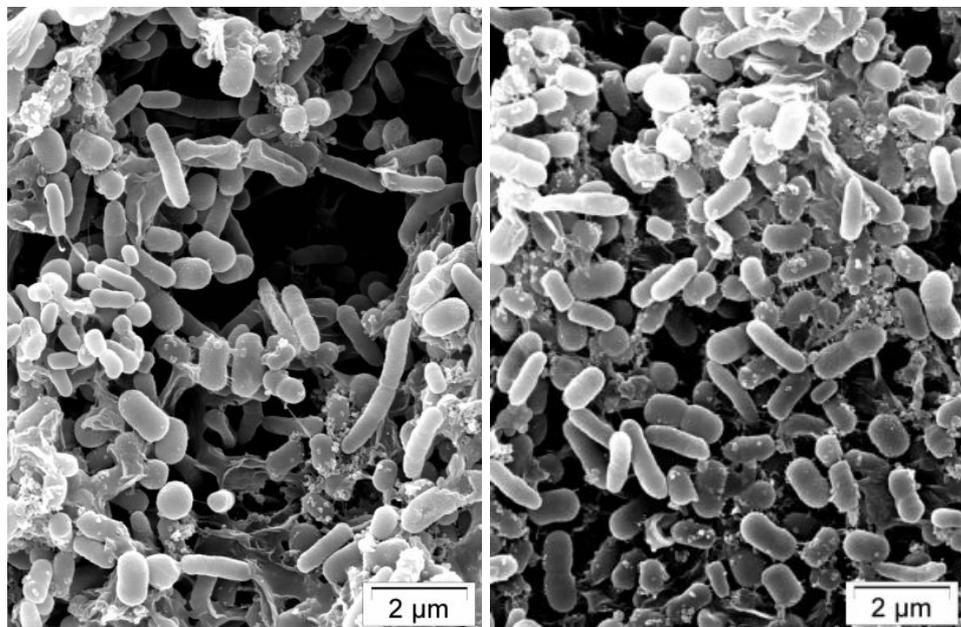


FIG. C.18 – Fragments de biofilm - Grossissement 10000

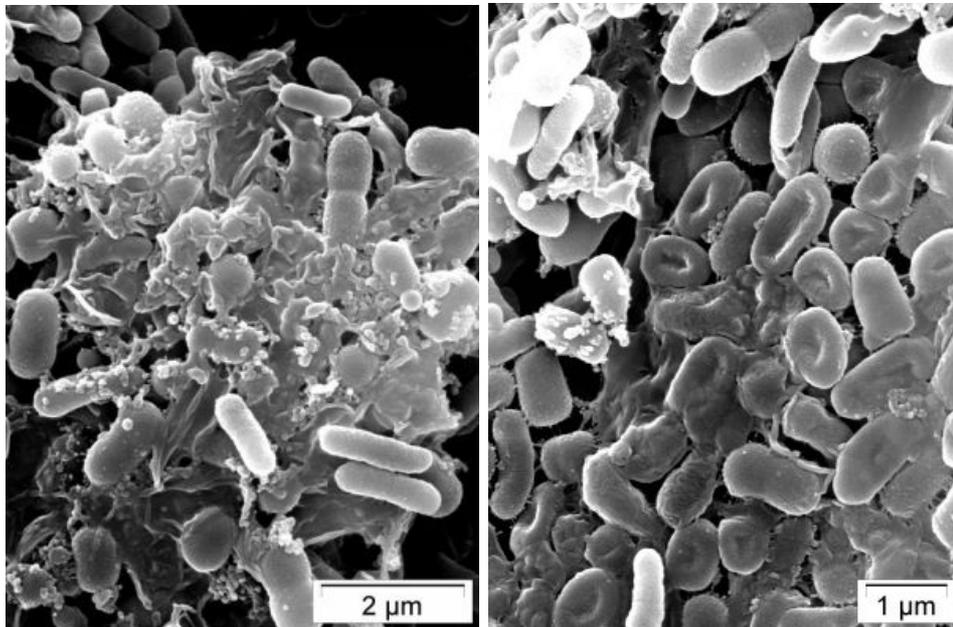


FIG. C.19 – Fragments de biofilm - Grossissements 15000 et 17000

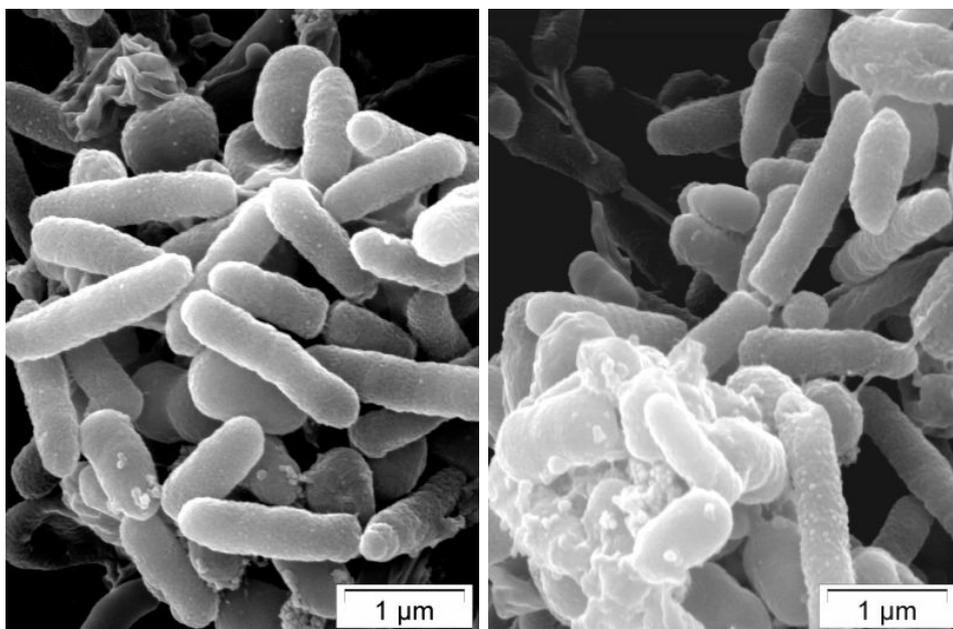


FIG. C.20 – Fragments de biofilm - Grossissement 25000

## C.2 Microscopie Électronique à Transmission

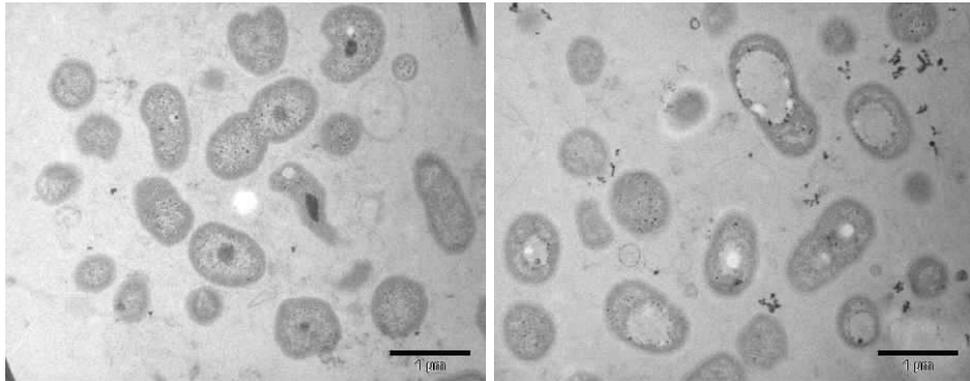


FIG. C.21 – Biofilm - Grossissement 17000

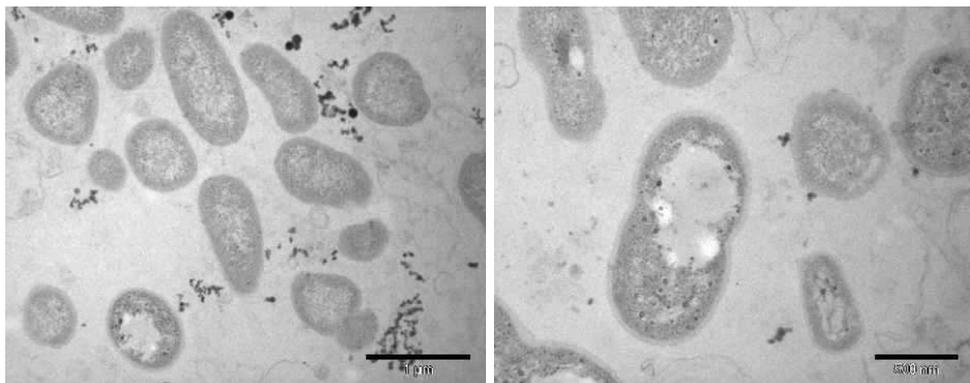


FIG. C.22 – Biofilm - Grossissements 20000 et 34000

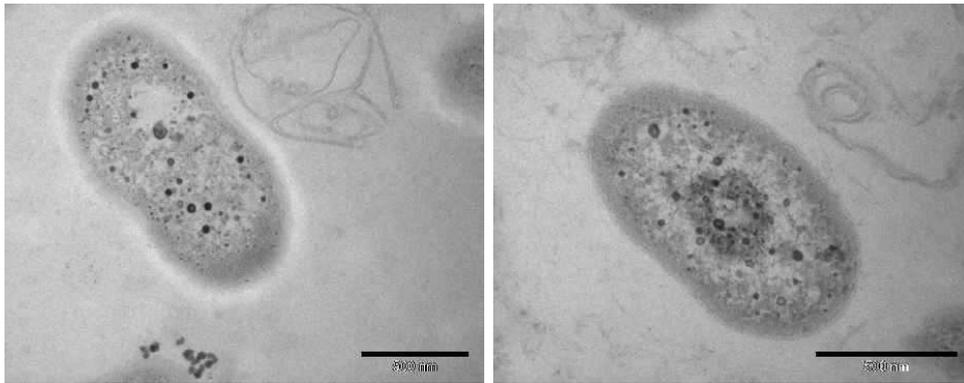


FIG. C.23 – Biofilm - Grossissements 45000 et 60000

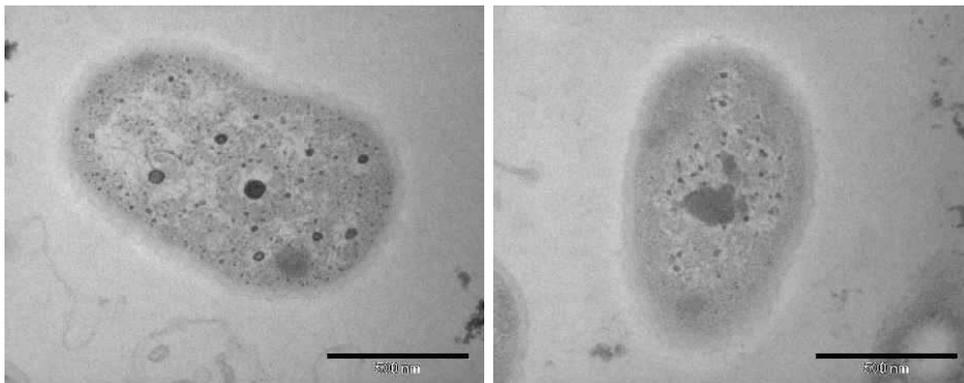


FIG. C.24 – Biofilm - Grossissement 60000

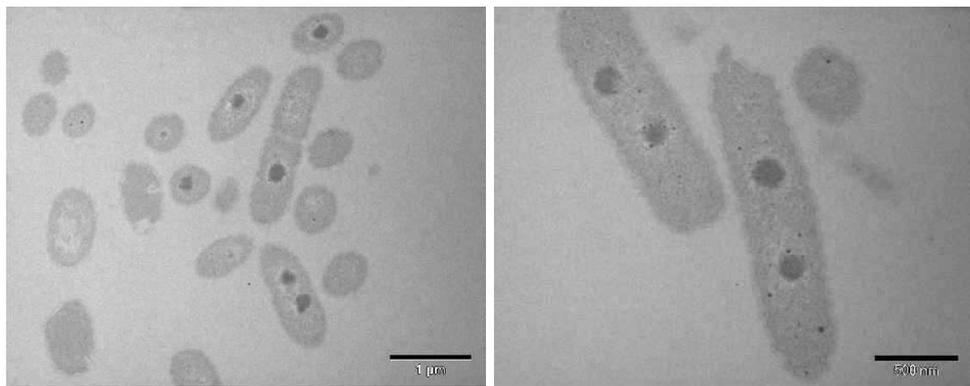


FIG. C.25 – Cellules de *Pseudomonas putida* - Grossissements 17000 et 34000

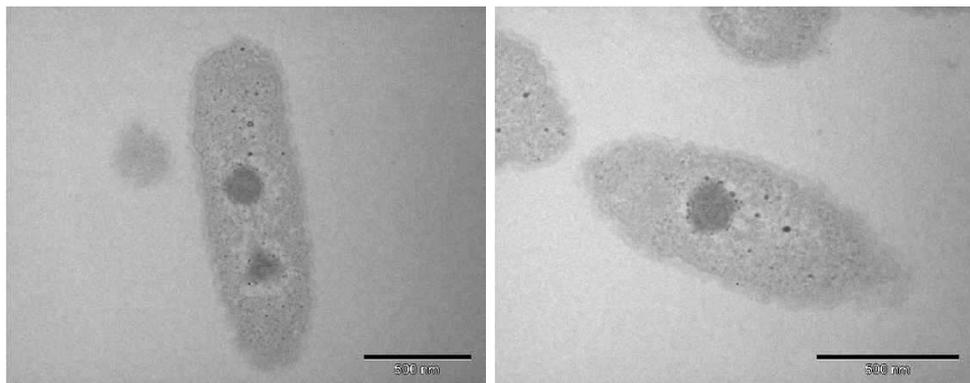


FIG. C.26 – Cellules de *Pseudomonas putida* - Grossissements 45000 et 60000

C.3 Analyses en granulométrie laser des échantillons bactériens

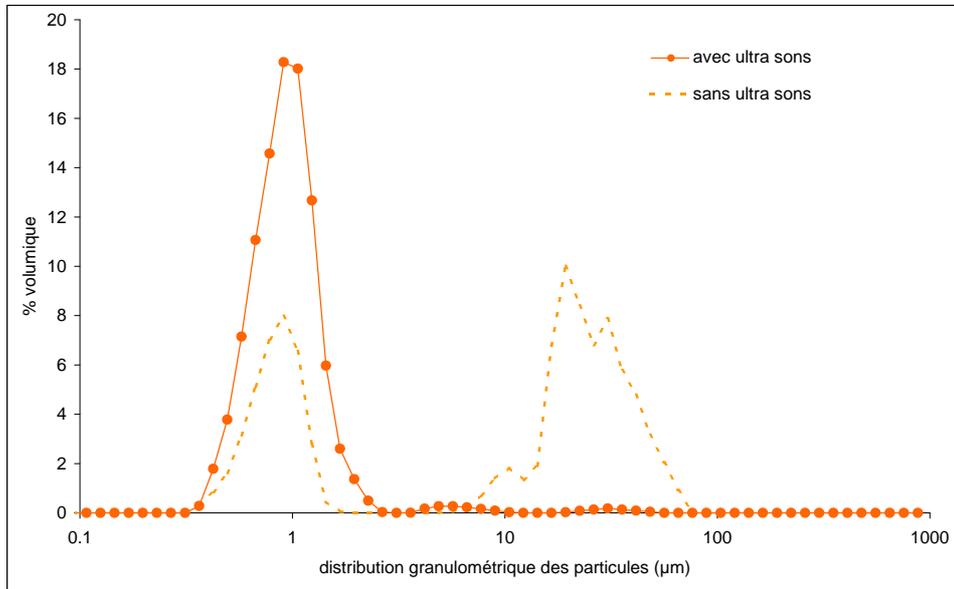


FIG. C.27 – Distribution granulométrique des cellules en culture

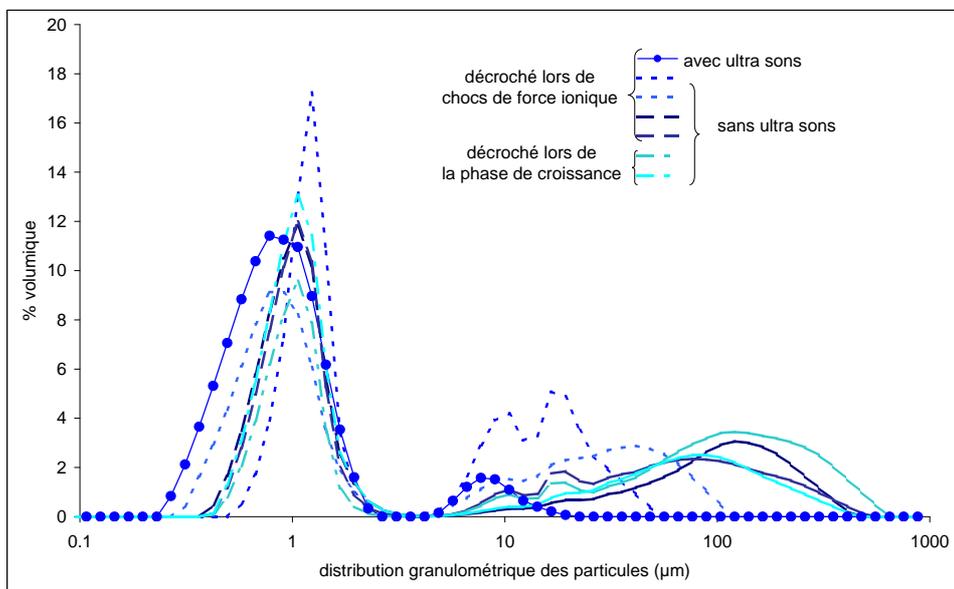


FIG. C.28 – Distribution granulométrique des échantillons de biofilm

#### C.4 Courbes de titrations de surface complémentaires

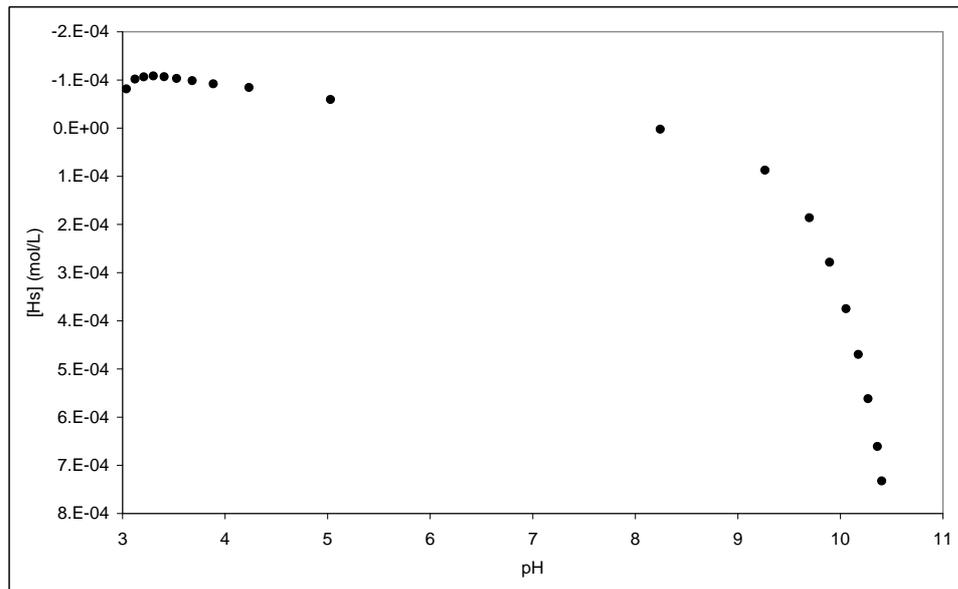


FIG. C.29 – Titration de 5 g de sable

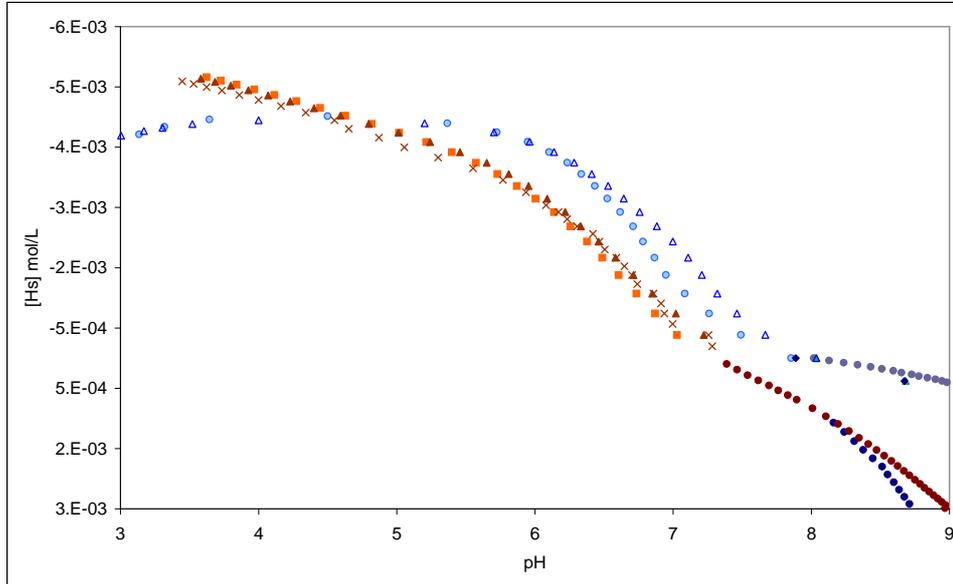


FIG. C.30 – Résultats avant traitement de plusieurs titrations de biofilm

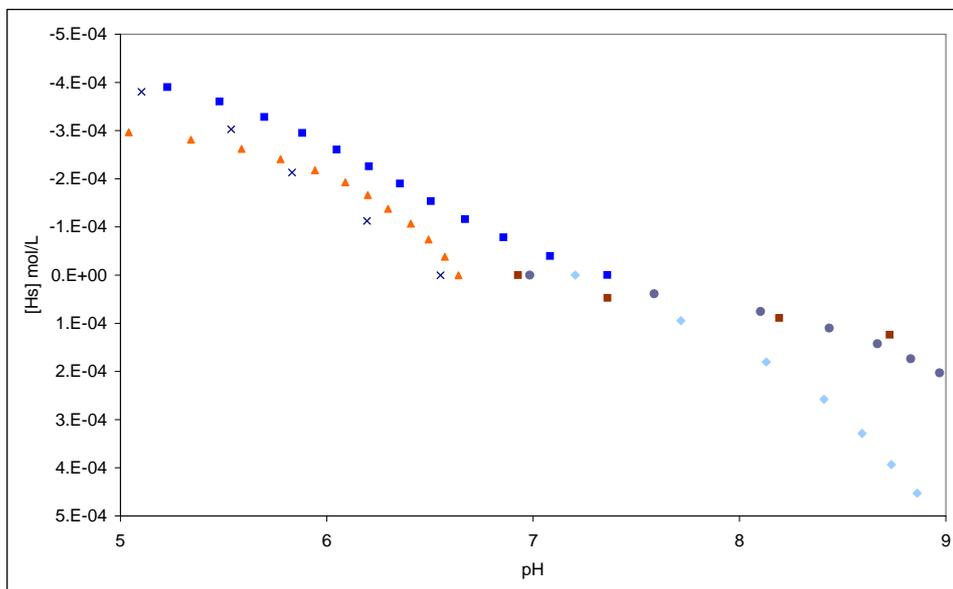


FIG. C.31 – Résultats avant traitement de plusieurs titrations de cellules planctoniques

### C.5 Modélisation des courbes de titrations de surface

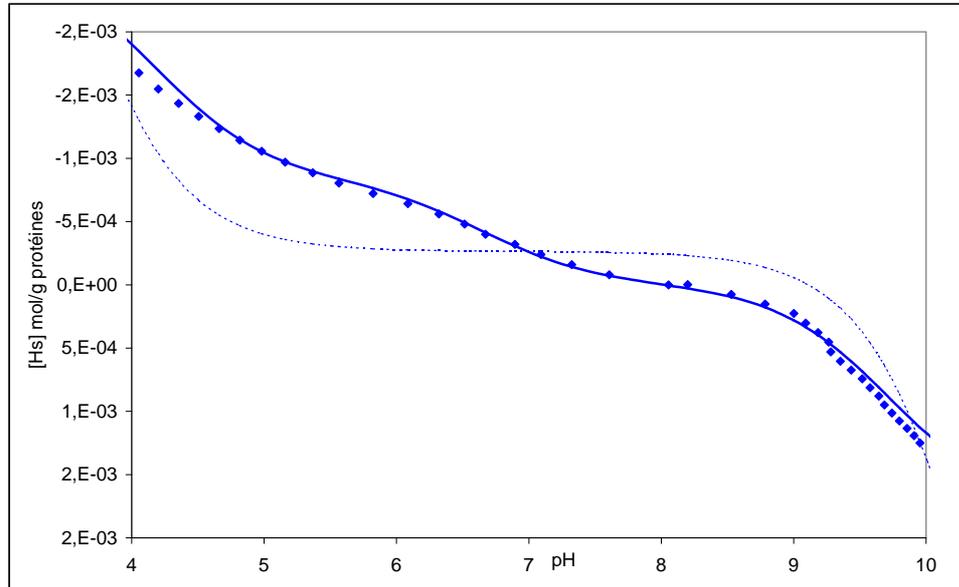


FIG. C.32 – Modélisation d'une titration de culture bactérienne

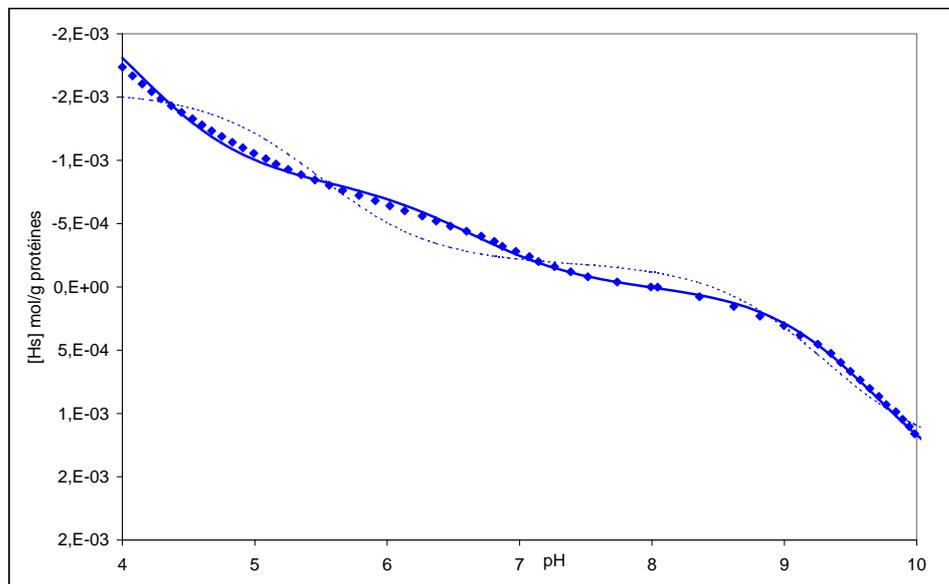


FIG. C.33 – Modélisation d'une titration de culture bactérienne

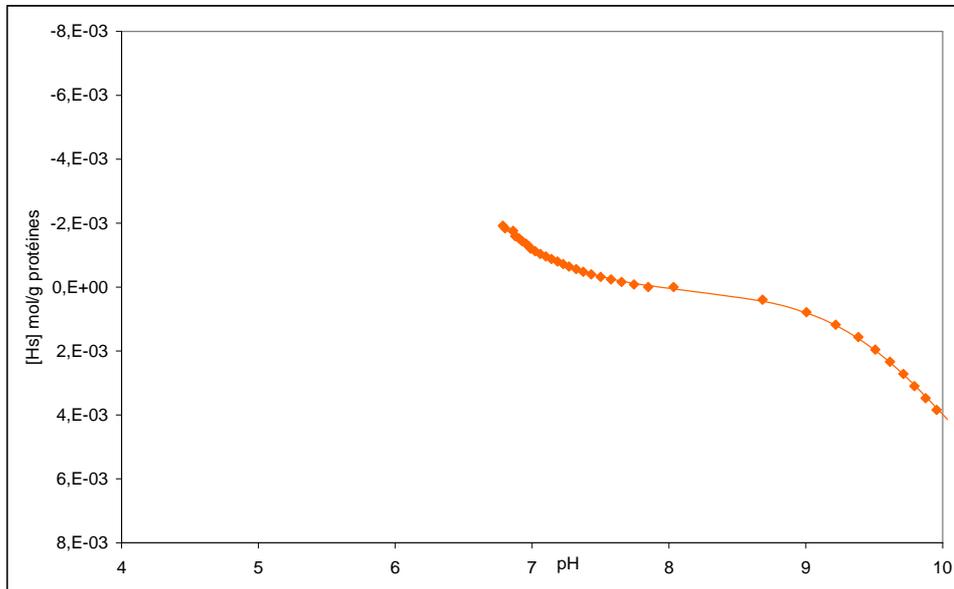


FIG. C.34 – Modélisation d’une titration de biofilm

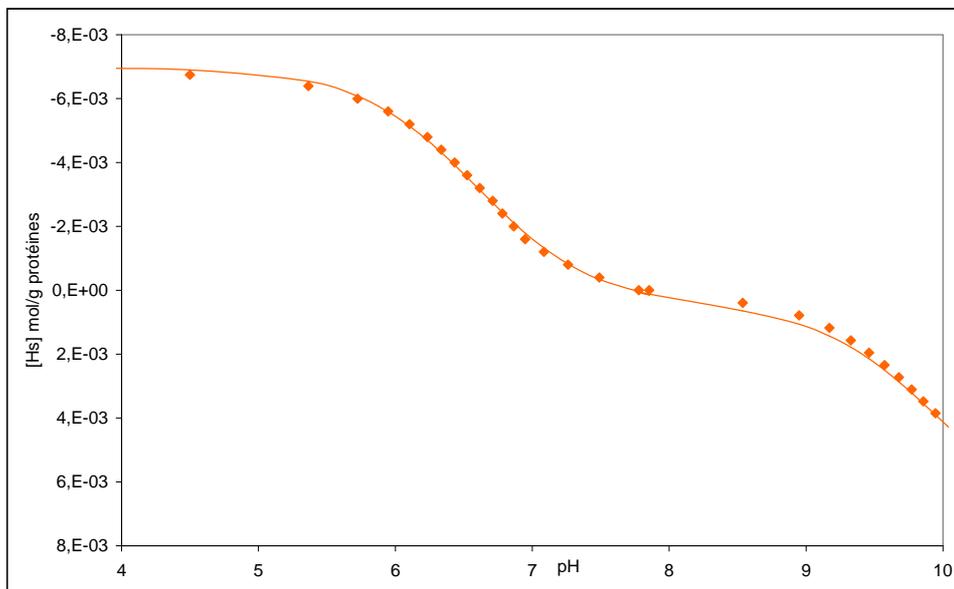


FIG. C.35 – Modélisation d’une titration de biofilm

### C.6 Essais en batchs d'adsorption du zinc

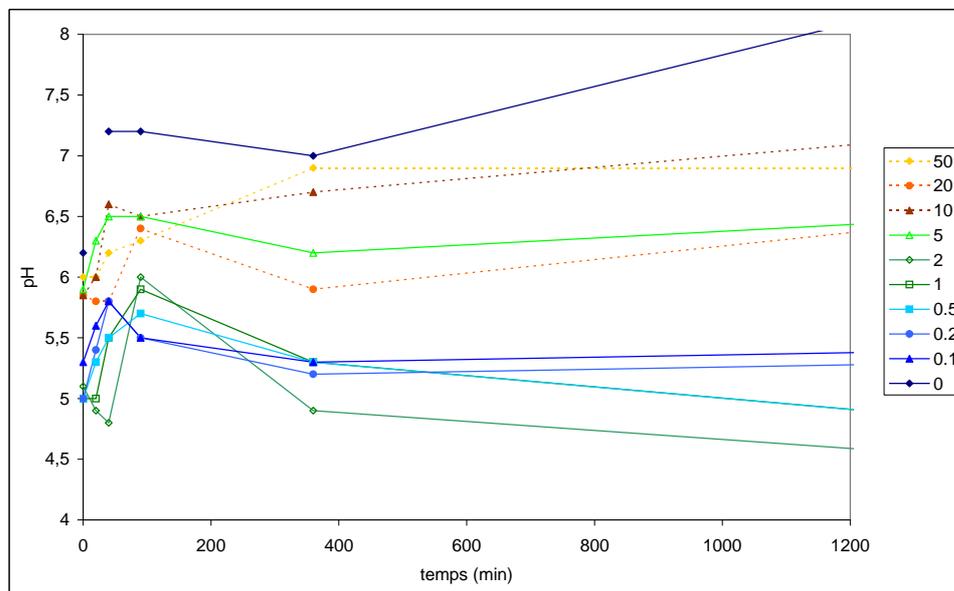


FIG. C.36 – Cinétique d'adsorption du zinc par les cellules planctoniques

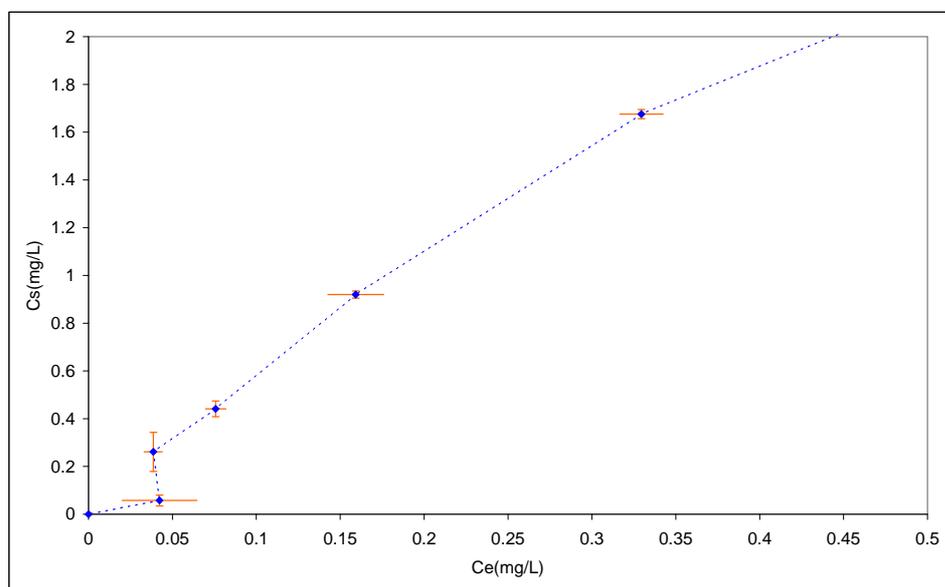


FIG. C.37 – Isotherme d'adsorption du zinc par les cellules planctoniques aux faibles concentrations

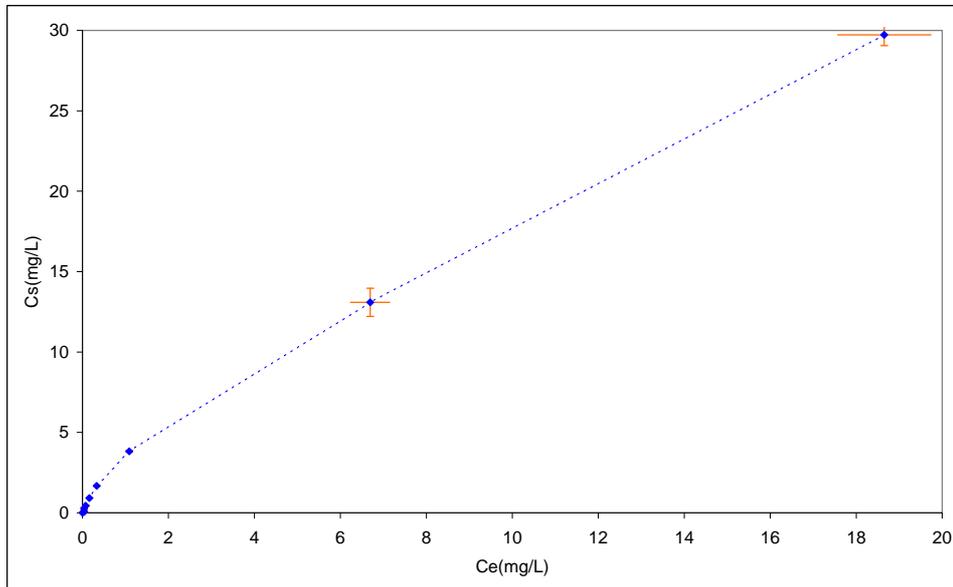


FIG. C.38 – Isotherme d'adsorption du zinc par les cellules planctoniques

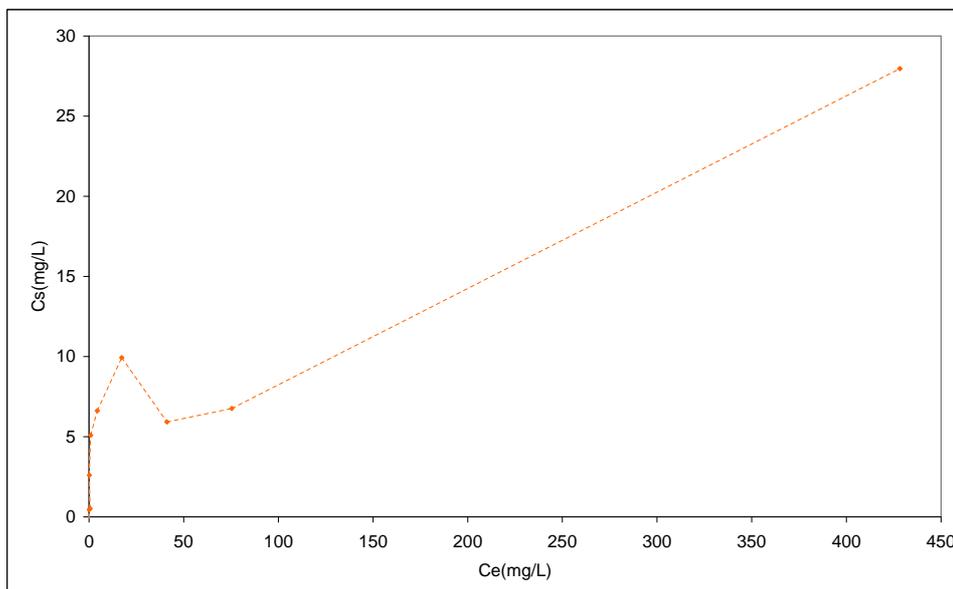


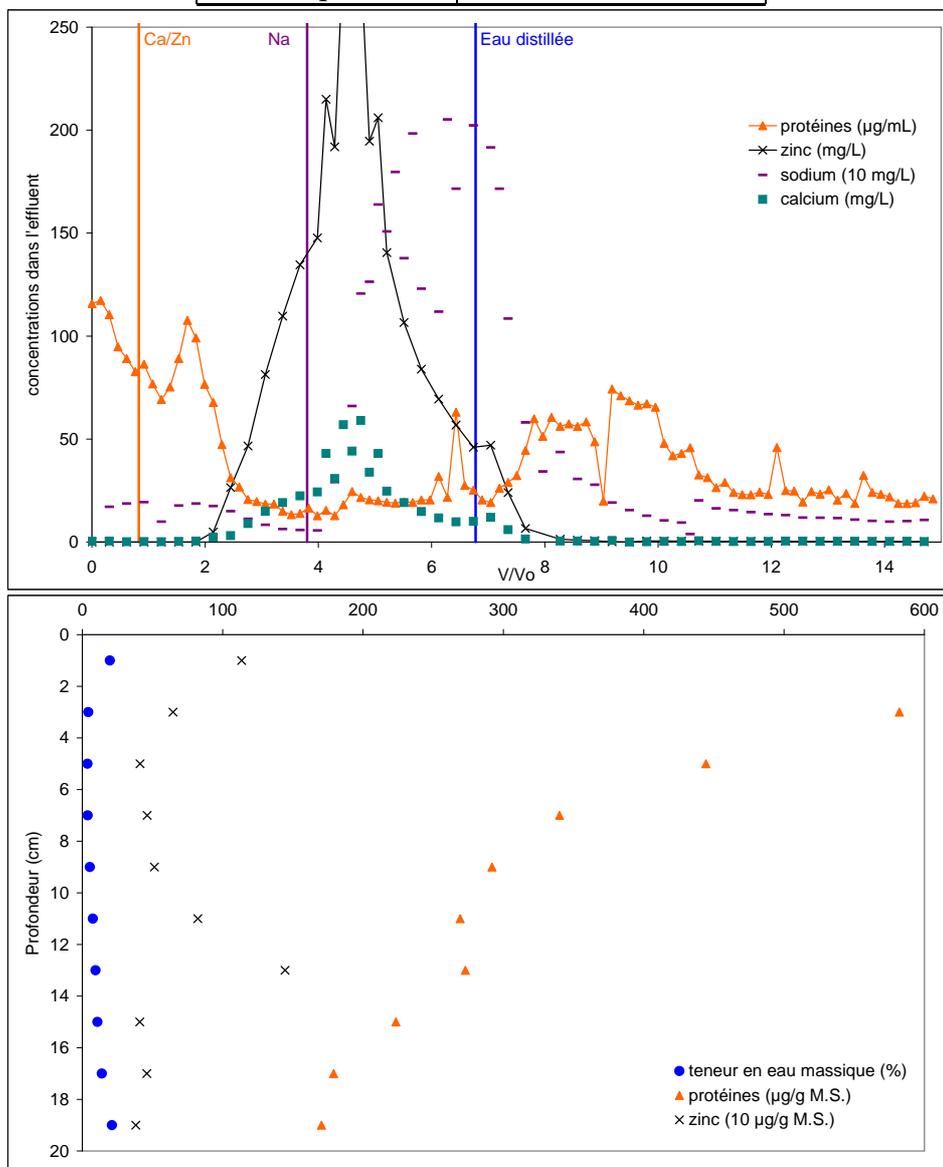
FIG. C.39 – Isotherme d'adsorption du zinc par les échantillons de biofilm

### **C.7 Courbes d'élution et profils dans les colonnes pour les expériences de transport facilité**

Sont présentées dans les figures C.1 à C.11 les courbes d'élution et les profils dans les colonnes en fin d'expériences. Chaque scénario a été réalisé simultanément dans deux colonnes.

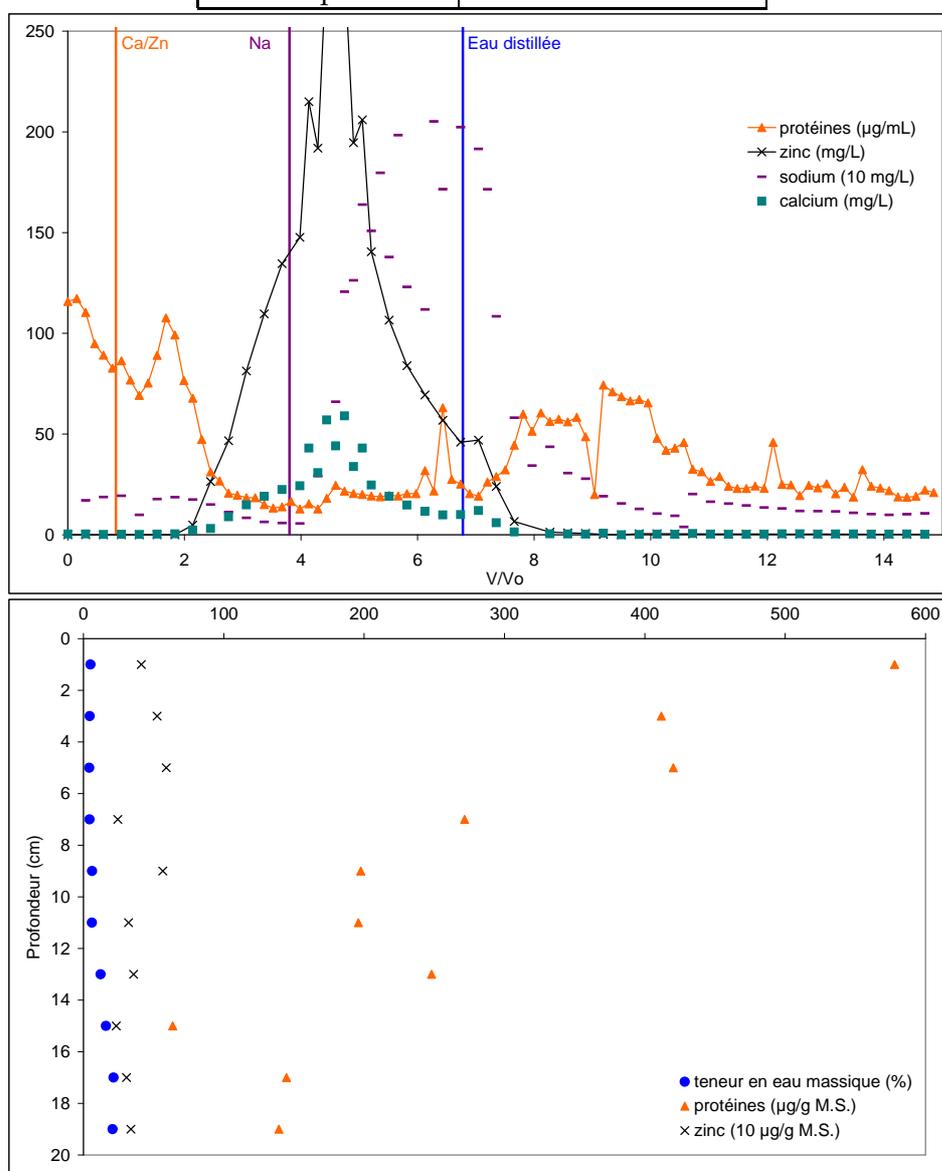
TAB. C.1 – Caractéristiques de la colonne 1, analyse de l'effluent, et profil en fin d'expérience

colonne	1
teneur en eau	10,1 %
volume des pores	60,5 mL
étape 1	Ca - 0,001 mol/L Zn - 0,004 mol/L - 3h
étape 2	Na - 0,1 mol/L - 3 h
étape 3	eau distillée - 14 h



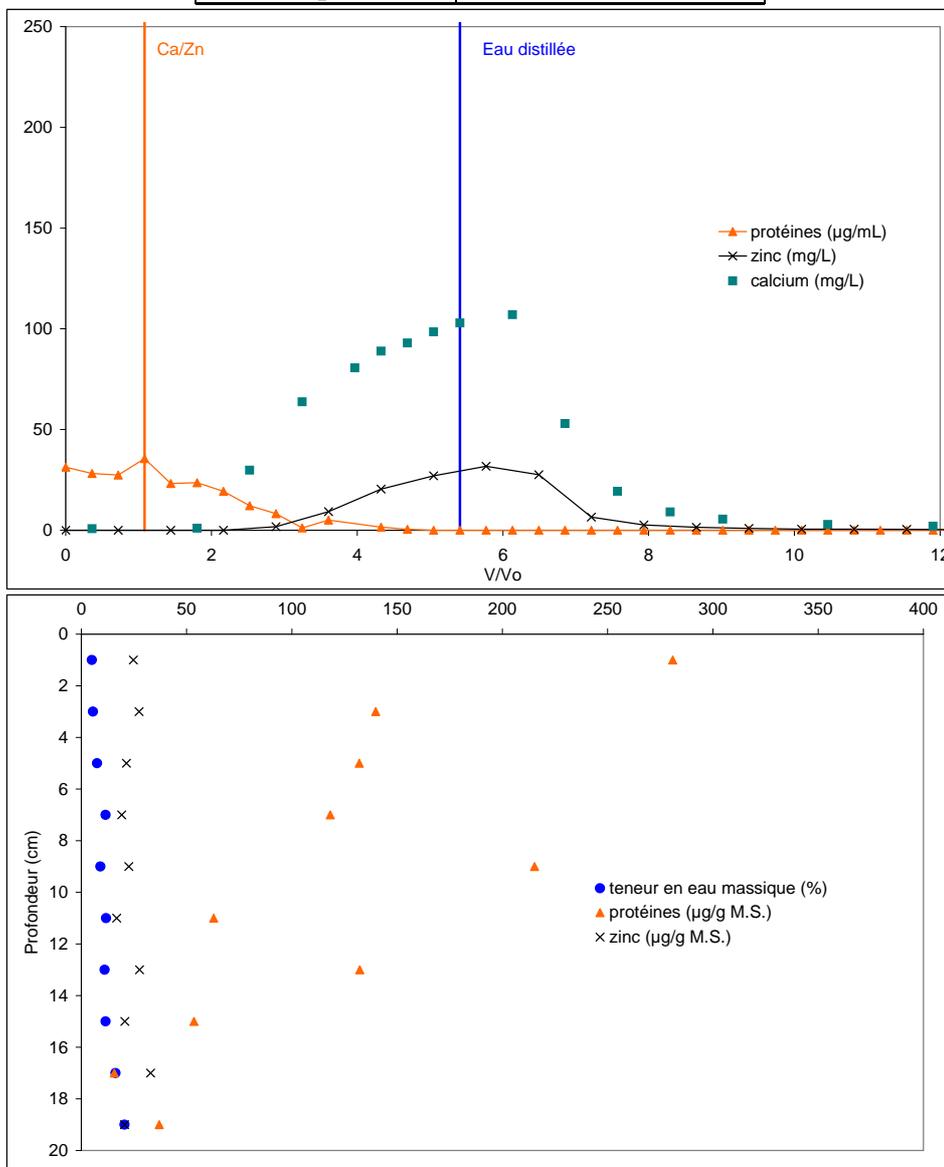
TAB. C.2 – Caractéristiques de la colonne 2, analyse de l'effluent, et profil en fin d'expérience

colonne	2
teneur en eau	10,9 %
volume des pores	65,3 mL
étape 1	Ca - 0,001 mol/L Zn - 0,004 mol/L - 3h
étape 2	Na - 0,1 mol/L - 3 h
étape 3	eau distillée - 14 h



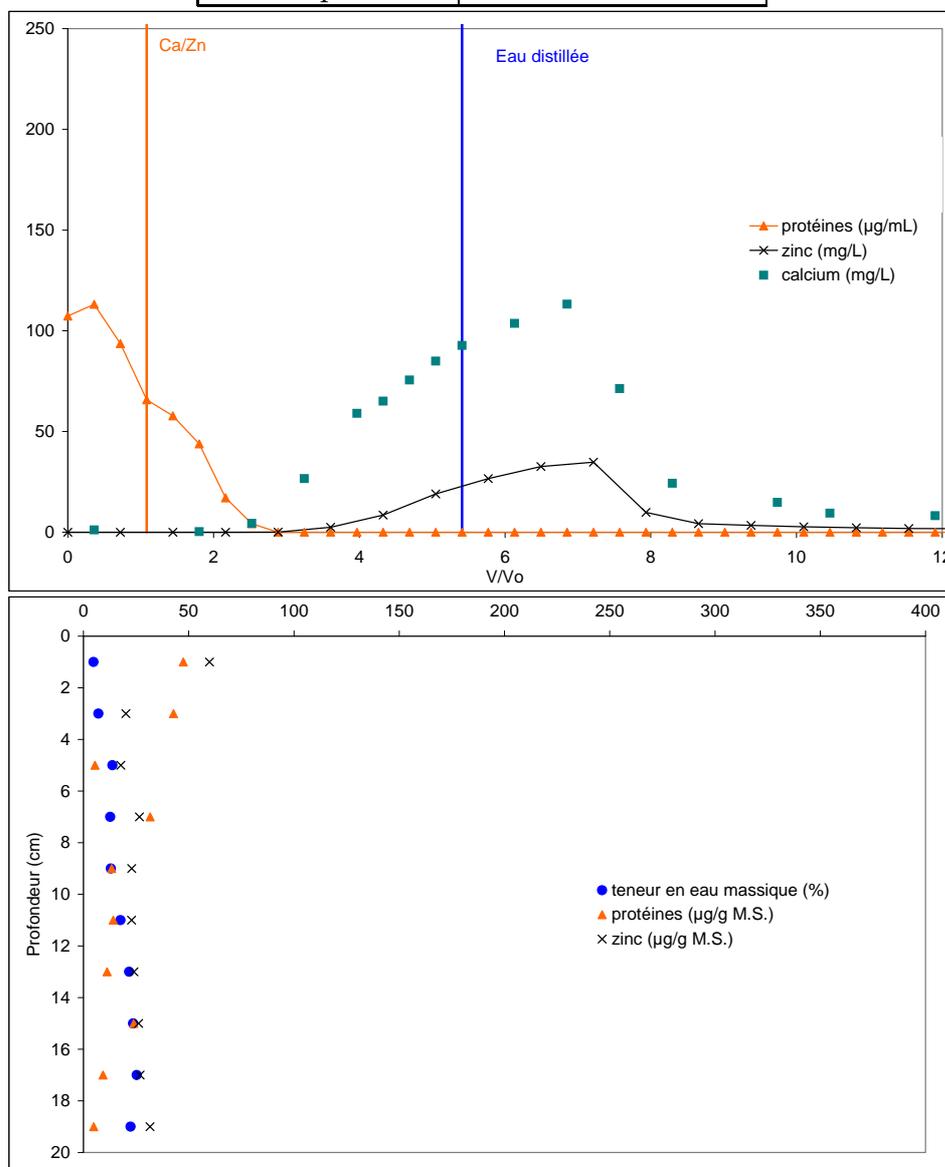
TAB. C.3 – Caractéristiques de la colonne 3, analyse de l'effluent, et profil en fin d'expérience

colonne	3
teneur en eau	10,1 %
volume des pores	61 mL
étape 1	Ca - 0,004 mol/L Zn - 0,001 mol/L - 4h
étape 2	eau distillée - 14 h



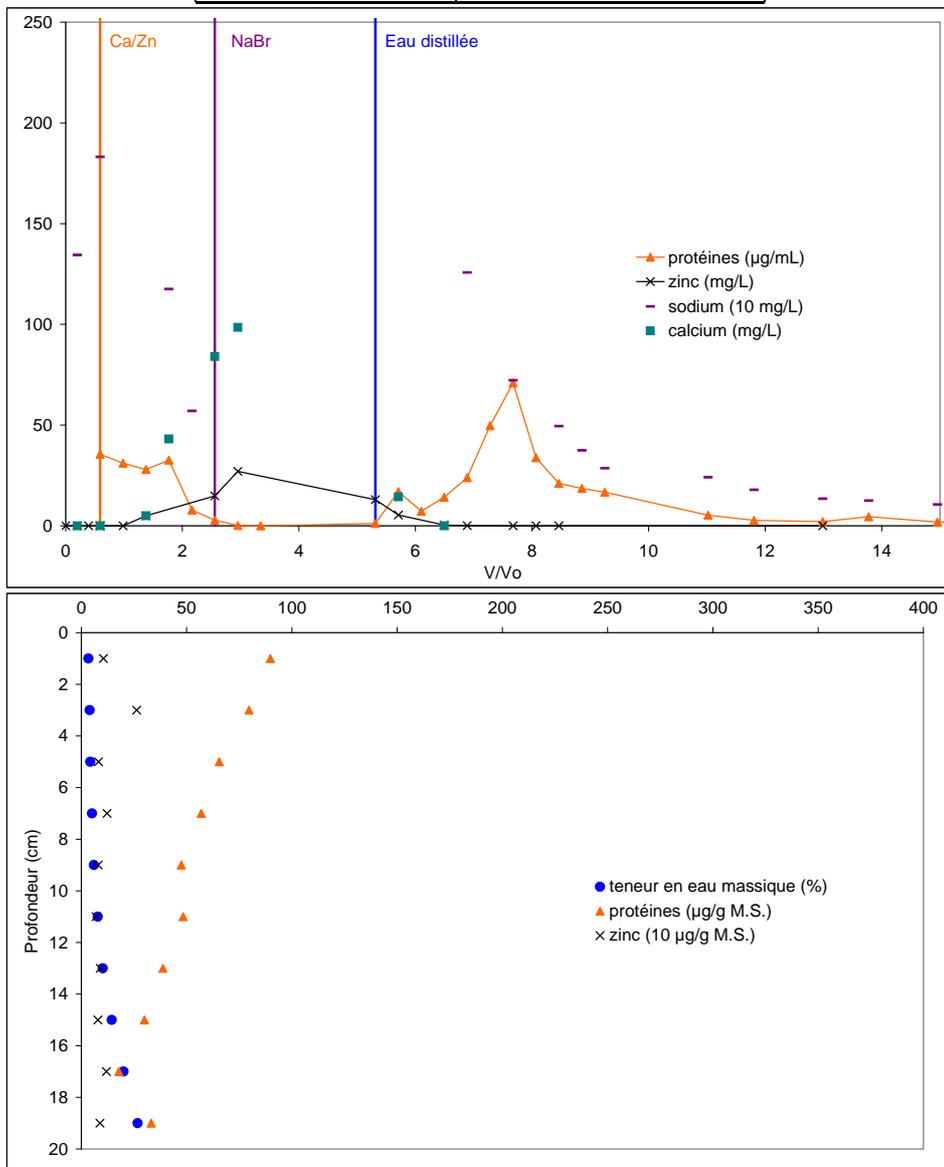
TAB. C.4 – Caractéristiques de la colonne 4, analyse de l'effluent, et profil en fin d'expérience

colonne	4
teneur en eau	15,7 %
volume des pores	94 mL
étape 1	Ca - 0,004 mol/L Zn - 0,001 mol/L - 4h
étape 2	eau distillée - 14 h



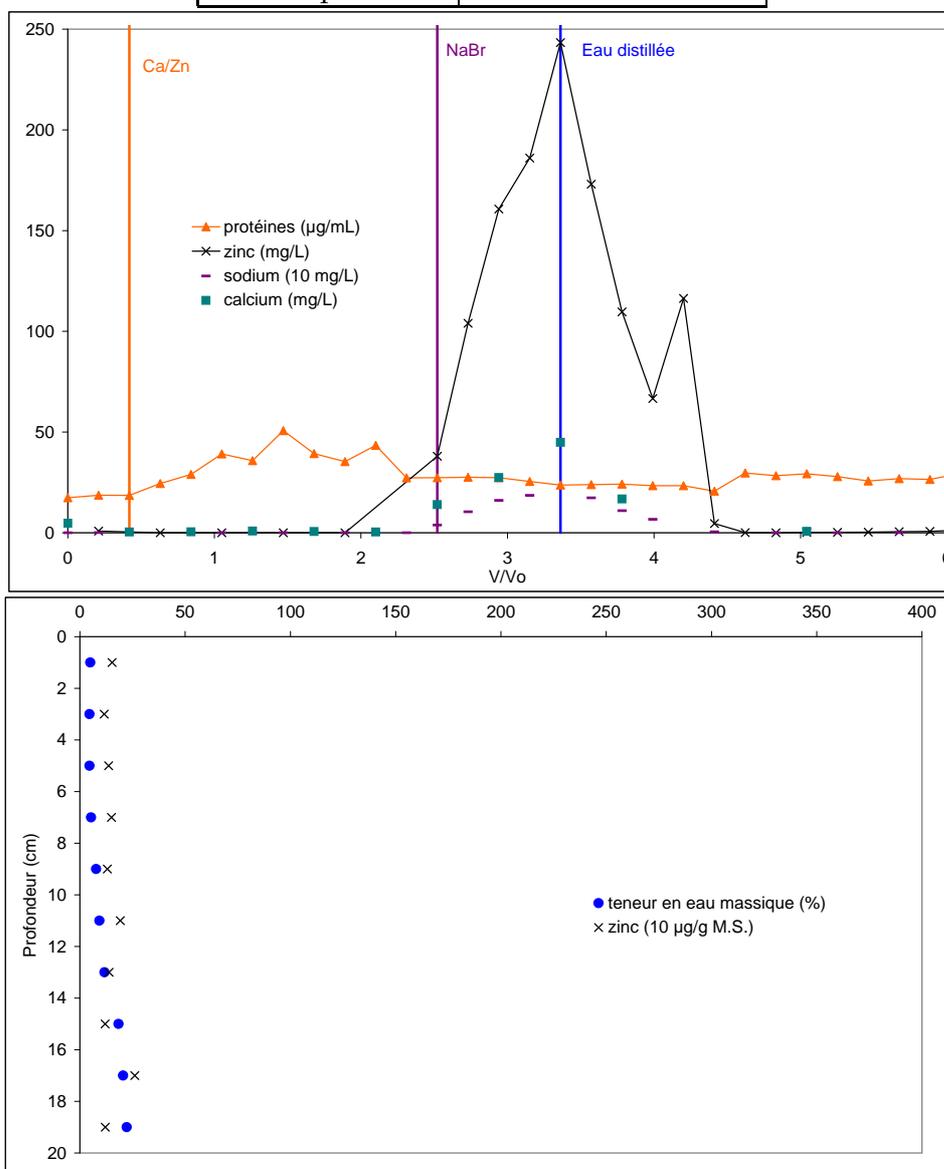
TAB. C.5 – Caractéristiques de la colonne 5, analyse de l'effluent, et profil en fin d'expérience

colonne	5
teneur en eau	13,7 %
volume des pores	68,6 mL
étape 1	Ca - 0,004 mol/L Zn - 0,001 mol/L - 3h
étape 2	Na - 0,1 mol/L - 3h
étape 3	eau distillée - 14 h



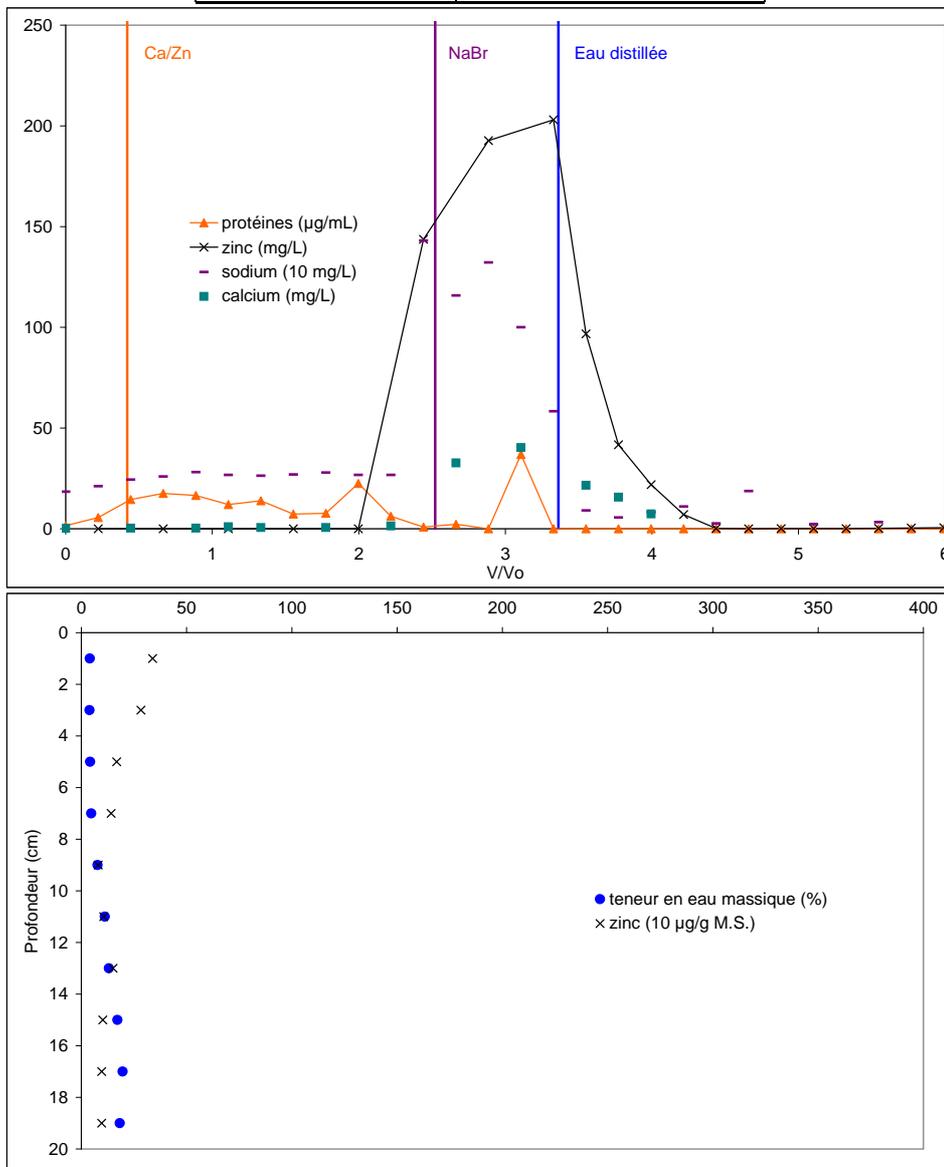
TAB. C.6 – Caractéristiques de la colonne 6, analyse de l'effluent, et profil en fin d'expérience

colonne	6
teneur en eau	11,9 %
volume des pores	71,4 mL
étape 1	Ca - 0,001 mol/L Zn - 0,004 mol/L - 3h
étape 2	Na - 0,1 mol/L - 1h
étape 3	eau distillée - 4 h



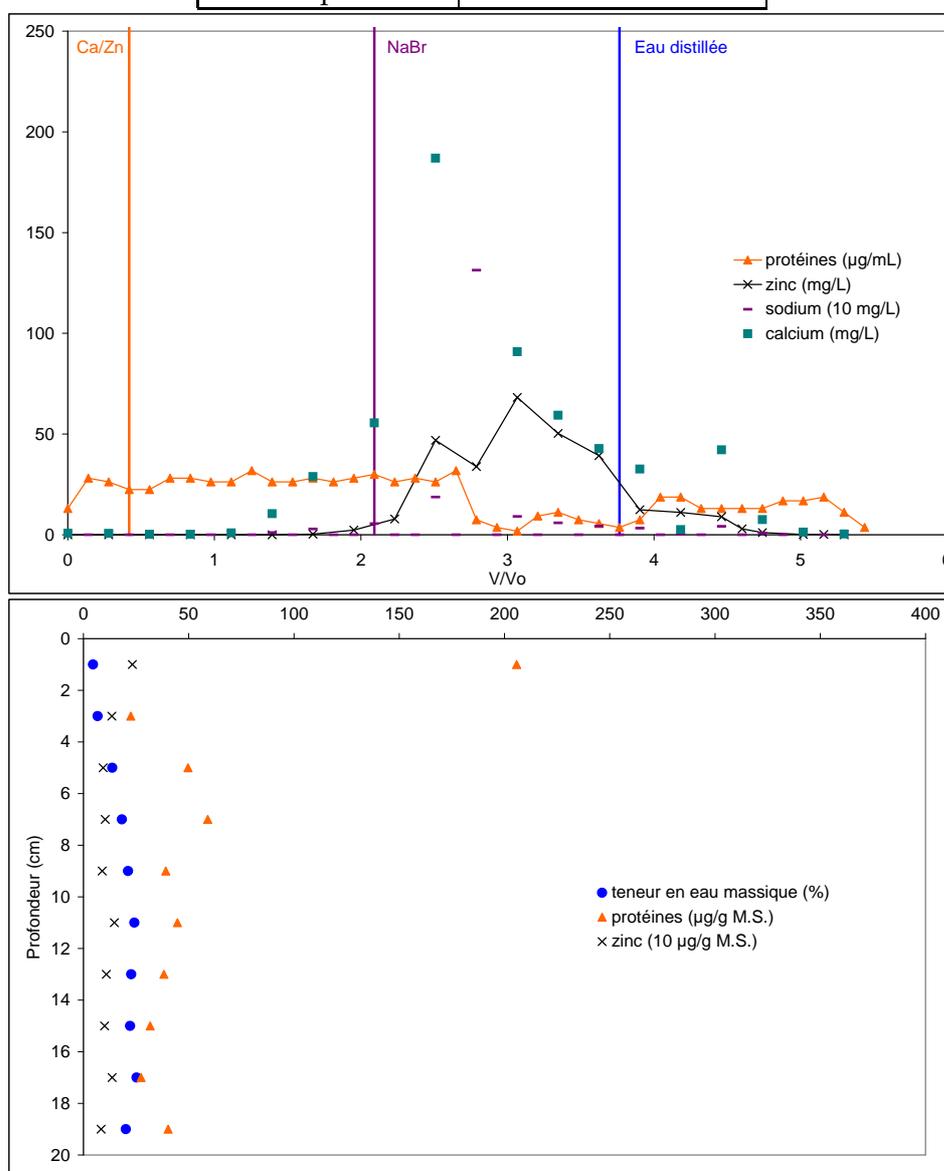
TAB. C.7 – Caractéristiques de la colonne 7, analyse de l'effluent, et profil en fin d'expérience

colonne	7
teneur en eau	11,3 %
volume des pores	67,6 mL
étape 1	Ca - 0,001 mol/L Zn - 0,004 mol/L - 3h
étape 2	Na - 0,1 mol/L - 1h
étape 3	eau distillée - 4 h



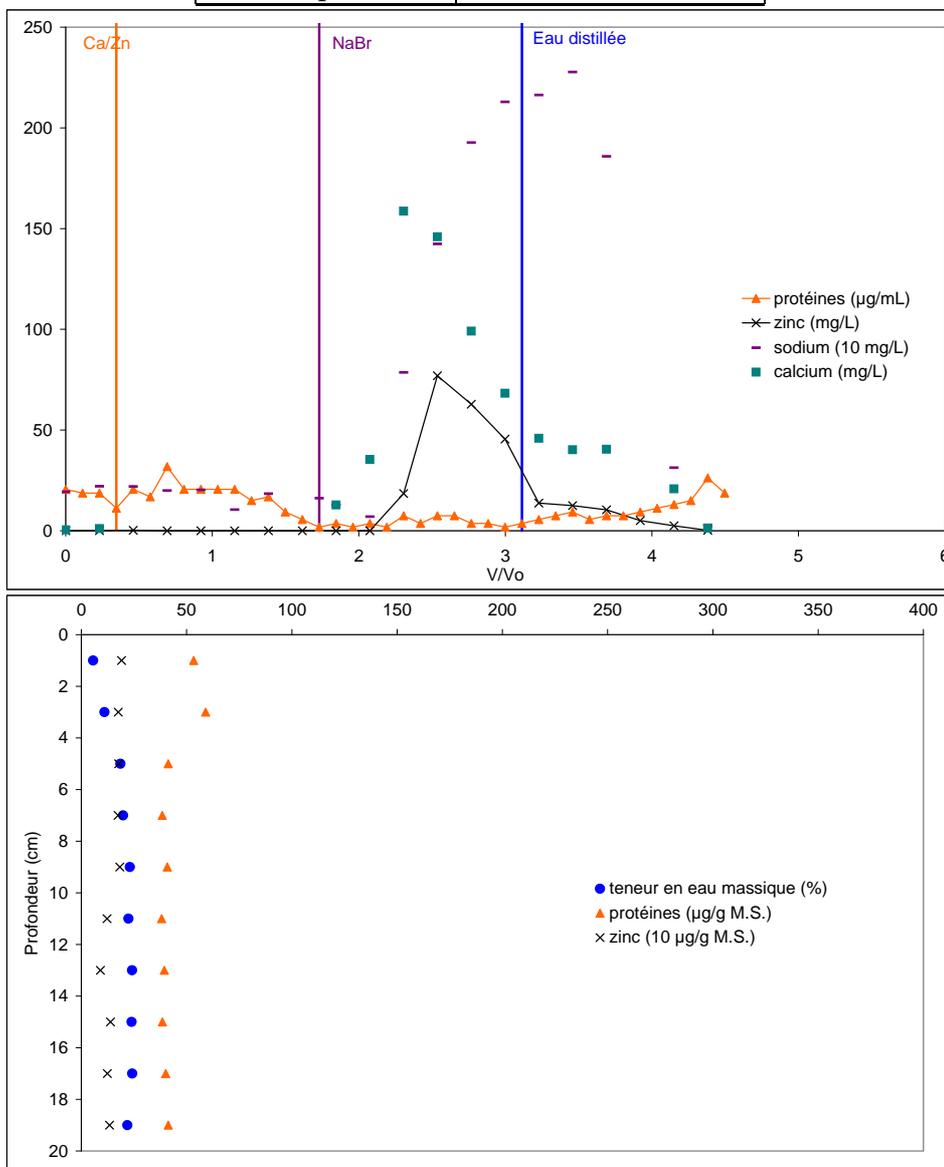
TAB. C.8 – Caractéristiques de la colonne 8, analyse de l'effluent, et profil en fin d'expérience

colonne	8
teneur en eau	21,7 %
volume des pores	130 mL
étape 1	Ca - 0,001 mol/L Zn - 0,004 mol/L - 3h
étape 2	Na - 0,1 mol/L - 3h
étape 3	eau distillée - 4 h



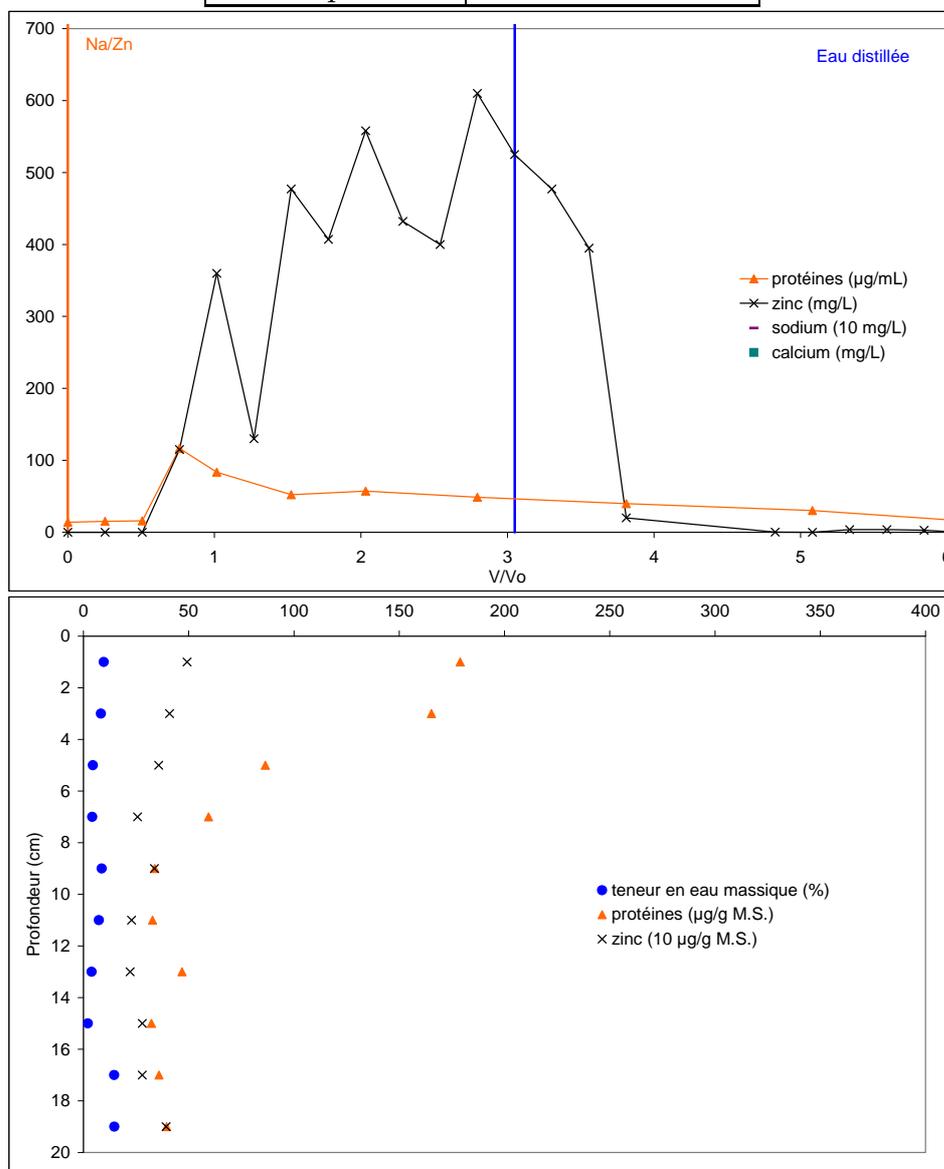
TAB. C.9 – Caractéristiques de la colonne 9, analyse de l'effluent, et profil en fin d'expérience

colonne	9
teneur en eau	17,9 %
volume des pores	107,6 mL
étape 1	Ca - 0,001 mol/L Zn - 0,004 mol/L - 3h
étape 2	Na - 0,1 mol/L - 3h
étape 3	eau distillée - 4 h



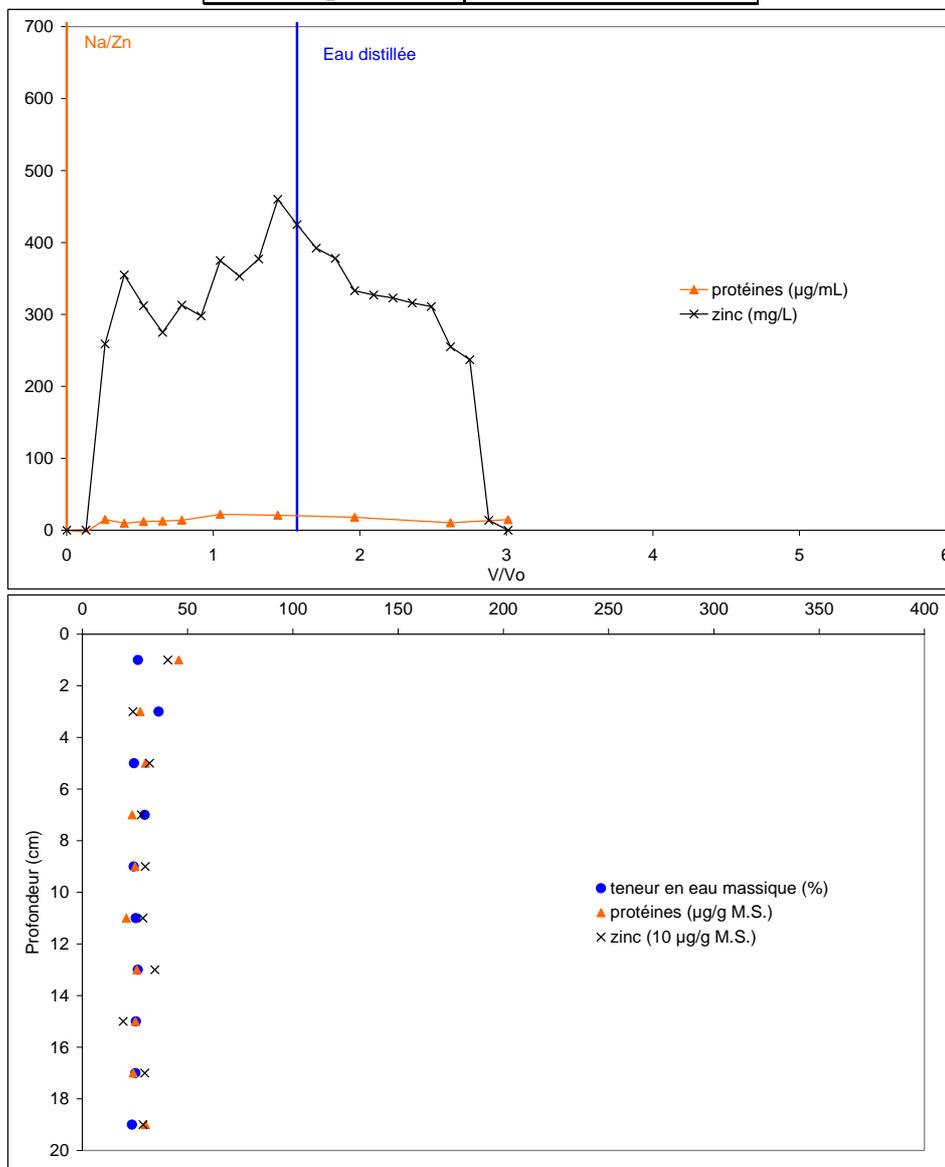
TAB. C.10 – Caractéristiques de la colonne 10, analyse de l'effluent, et profil en fin d'expérience

colonne	10
teneur en eau	14,4 %
volume des pores	86,6 mL
étape 1	Na - 1 mol/L Zn - 0,01 mol/L - 4h
étape 2	eau distillée - 4 h



TAB. C.11 – Caractéristiques de la colonne 11, analyse de l'effluent, et profil en fin d'expérience

colonne	11
teneur en eau	27,9 %
volume des pores	168 mL
étape 1	Na - 1 mol/L Zn - 0,01 mol/L - 4h
étape 2	eau distillée - 4 h



## C.8 Bilan de masse

### C.8.1 Evaluation des bilan de masse

Les bilans de masse ont pu être réalisés pour le zinc et dans un cas pour le calcium et le sodium. Les quantités entrant dans la colonne sont connues par mesure du volume injecté et des concentrations dans la solution initiale de chacun des éléments. Les concentrations en cations sortant de la colonne sont mesurées dans chaque échantillon pendant toute l'expérience. A la fin de l'expérience, la destruction des colonnes a permis d'obtenir des fractions de sable. Un aliquot supposé représentatif de chaque 'tranche' a été minéralisé et la concentration en zinc (et pour une expérience en calcium et sodium) a été mesurée.

### C.8.2 Exemple

Sur la colonne 160204B

– Calcul de la quantité de zinc injectée dans la colonne :

$$280,4 * 0,195 = 54,7 \text{ mg}$$

– Calcul de la quantité de sodium injectée dans la colonne :

$$2300 * 0,195 = 448,5 \text{ mg}$$

– Calcul de la quantité de calcium injectée dans la colonne :

$$38,1 * 0,195 = 7,4 \text{ mg}$$

– Mesure du zinc sortant : 37,6 mg

– Mesure du sodium sortant : 347 mg

– Mesure du calcium sortant : 7 mg

– Evaluation du zinc restant dans la colonne : 23 mg

– Evaluation du sodium restant dans la colonne : 87 mg

– Evaluation du calcium restant dans la colonne : non réalisée

97% du sodium injecté est retrouvé : les quatre cinquièmes en sortie de colonne et un cinquième restant dans la colonne en fin d'expérience. Pour le calcium, la quasi-totalité du zinc injecté a été dosé en sortie de colonne. L'évaluation de la quantité de calcium restant n'ayant pas donné de résultat significatif. Pour le zinc, une quantité de 10% supérieure à la quantité de zinc injectée est retrouvée lorsqu'on fait la somme du zinc dans l'effluent et dans la colonne. Les incertitudes des mesures peuvent être à l'origine de cet écart. Environ 40 % du zinc est présent dans la colonne en fin d'expérience, les autres 60 % étant dans l'effluent.

### C.8.3 Résultats

Pour les 11 colonnes étudiées les résultats sont présentés dans le tableau C.12. Il apparaît nettement deux types de colonnes. Celles pour lesquelles moins de la moitié du zinc injecté ressort pendant l'expérience. En général, c'est associé à une forte rétention du calcium également. Ce sont les colonnes pour lesquelles il n'y a pas eu échange avec le sodium et cela

TAB. C.12 – Bilan de masse pour les essais en colonnes

colonne	injecté (mg)			sortant (mg)			retenu (mg)
	Zn	Na	Ca	Zn	Na	Ca	Zn
Colonne 1	51	414	7	37,5	347	7,3	18
Colonne 2	51	414	7	37,8	431	7,2	23
Colonne 3	17	0	38	6	n.m.	12	13,9
Colonne 4	17	0	38	7,8	n.m.	14,9	15
Colonne 5	12	414	29	5	421	17	6,6
Colonne 6	24	138	7	18,4	160,5	3,8	9,1
Colonne 7	24	138	7	17,41	136	3,9	9,4
Colonne 8	16	552	29	8,5	434	n.m.	7,4
Colonne 9	16	552	29	7,5	475	23	9,1
Colonne 10	173	5520	0	147	n.m.	n.m.	22
Colonne 11	173	5520	0	119	n.m.	n.m.	15

correspond aussi aux colonnes pour lesquelles le biofilm n'a pas été déstabilisé. Pour les autres colonnes, la quantité importante de sodium permet un échange avec les cations zinc et calcium en place dans le milieu et on assiste parallèlement à une rétention partielle du sodium dans la colonne.

## C.9 Modélisation des courbes d'élution avec IMPACT

### C.9.1 Principe

Cette étape de modélisation consistait à ajuster aux courbes expérimentales obtenues en sortie de colonnes, des courbes obtenues par la modélisation du système. Les fichiers utilisés sont proposés dans la section C.9.2. Les réactions d'échange mentionnées dans la section 4.3.3 ont été prises en compte. Quatre paramètres ont ensuite été ajustés. Des valeurs obtenues dans la littérature ou par calculs ont servi de points de départ à cet ajustement. En particulier les constantes des équilibres d'échange ont été modifiées par rapport à celles obtenues dans d'autres études pour obtenir un ajustement satisfaisant. La quantité de sites réactifs est entrée dans la modèle sous la forme de quantité de sodium fixée initialement c'est-à-dire  $Na_f$ . La dispersivité est comprise dans la valeur du nombre de cellules  $J$ . Pour évaluer l'impact de la seule valeur de dispersivité, une correction a été faite par rapport à la capacité d'échange de manière à ce qu'elle soit équivalente pour tous les essais, quel que soit le nombre de cellules. Enfin, différentes distributions de la capacité d'échange ont été évaluées : soit la capacité d'échange est uniformément répartie sur la profondeur, soit l'intégralité de la capacité d'échange se trouve dans la première ou la dernière cellule, soit les cellules en profondeur sont 10 fois moins réactives que la cellule en surface. Dans tous les cas la réactivité totale de la colonne est maintenue constante.

La section C.9.3 montre l'influence des ces cinq paramètres sur la justesse d'ajustement des courbes modélisées aux données expérimentales.

## C.9.2 Fichiers utilisés

### a) Fichier de données

```

J=10, CA/ZN=1, CEC=0,01
  2 --> Number of reactions
  8 --> Number of species
  6 --> Number of mixing cells
  3 --> Number of feed solutions
0.18000000000000D+02 --> Duration of simulation
0.10000000000000D+00 --> Fraction size
Echange Zn/Ca K=1 (myriam)
  2 --> Reaction category
0.10000000000000D+01 --> Equilibrium constant
-.10000000000000D+01 --> Stoichiometric coefficient
0.10000000000000D+01 --> Stoichiometric coefficient
0.10000000000000D+01 --> Stoichiometric coefficient
-.10000000000000D+01 --> Stoichiometric coefficient
0.00000000000000D+00 --> Stoichiometric coefficient
0.00000000000000D+00 --> Stoichiometric coefficient
0.00000000000000D+00 --> Stoichiometric coefficient
0.00000000000000D+00 --> Stoichiometric coefficient
Echange Na/Ca K=4.4E-4
  2 --> Reaction category
0.04000000000000D+00 --> Equilibrium constant
0.00000000000000D+00 --> Stoichiometric coefficient
0.10000000000000D+01 --> Stoichiometric coefficient
0.00000000000000D+00 --> Stoichiometric coefficient
-.10000000000000D+01 --> Stoichiometric coefficient
-.20000000000000D+01 --> Stoichiometric coefficient
0.20000000000000D+01 --> Stoichiometric coefficient
0.00000000000000D+00 --> Stoichiometric coefficient
0.00000000000000D+00 --> Stoichiometric coefficient
  1 --> Cell #
  7 --> Cell feeding current cell
  0 --> Cell feeding current cell
0.10000000000000D+01 --> Source flow rate
0.00000000000000D+00 --> Natural background flow rate
0.16670000000000D+00 --> Volume of current cell
0.10000000000000D+01 --> Flow rate through current cell
  2 --> Cell #
  1 --> Cell feeding current cell
  0 --> Cell feeding current cell
  1 0.10000000000000D+01 --> J & flow rate from J to current cell
0.00000000000000D+00 --> Source flow rate
0.00000000000000D+00 --> Natural background flow rate
0.16670000000000D+00 --> Volume of current cell
0.10000000000000D+01 --> Flow rate through current cell
  3 --> Cell #
  2 --> Cell feeding current cell
  0 --> Cell feeding current cell
  2 0.10000000000000D+01 --> J & flow rate from J to current cell
0.00000000000000D+00 --> Source flow rate
0.00000000000000D+00 --> Natural background flow rate
0.16670000000000D+00 --> Volume of current cell
0.10000000000000D+01 --> Flow rate through current cell
  4 --> Cell #
  3 --> Cell feeding current cell
  0 --> Cell feeding current cell
  3 0.10000000000000D+01 --> J & flow rate from J to current cell
0.00000000000000D+00 --> Source flow rate
0.00000000000000D+00 --> Natural background flow rate
0.16670000000000D+00 --> Volume of current cell
0.10000000000000D+01 --> Flow rate through current cell
  5 --> Cell #

```

```

4 --> Cell feeding current cell
0 --> Cell feeding current cell
4 0.100000000000000D+01 --> J & flow rate from J to current cell
0.000000000000000D+00 --> Source flow rate
0.000000000000000D+00 --> Natural background flow rate
0.166700000000000D+00 --> Volume of current cell
0.100000000000000D+01 --> Flow rate through current cell
6 --> Cell #
5 --> Cell feeding current cell
0 --> Cell feeding current cell
5 0.100000000000000D+01 --> J & flow rate from J to current cell
0.000000000000000D+00 --> Source flow rate
0.000000000000000D+00 --> Natural background flow rate
0.166700000000000D+00 --> Volume of current cell
0.100000000000000D+01 --> Flow rate through current cell
Zn++
3 --> Species category
0.100000000000000D+01 --> Species mobility
0.000000000000000D+00 --> Natural background concentration
1 0.000000000000000D+00 --> J & initial concentration in cell #J
2 0.000000000000000D+00 --> J & initial concentration in cell #J
3 0.000000000000000D+00 --> J & initial concentration in cell #J
4 0.000000000000000D+00 --> J & initial concentration in cell #J
5 0.000000000000000D+00 --> J & initial concentration in cell #J
6 0.000000000000000D+00 --> J & initial concentration in cell #J
1 0.400000000000000D-02 --> J & concentration in feed #J
2 0.000000000000000D+00 --> J & concentration in feed #J
3 0.000000000000000D+00 --> J & concentration in feed #J
Ca++
3 --> Species category
0.100000000000000D+01 --> Species mobility
0.000000000000000D+00 --> Natural background concentration
1 0.000000000000000D+00 --> J & initial concentration in cell #J
2 0.000000000000000D+00 --> J & initial concentration in cell #J
3 0.000000000000000D+00 --> J & initial concentration in cell #J
4 0.000000000000000D+00 --> J & initial concentration in cell #J
5 0.000000000000000D+00 --> J & initial concentration in cell #J
6 0.000000000000000D+00 --> J & initial concentration in cell #J
1 0.100000000000000D-02 --> J & concentration in feed #J
2 0.000000000000000D+00 --> J & concentration in feed #J
3 0.000000000000000D+00 --> J & concentration in feed #J
Znf
4 --> Species category
0.000000000000000D+00 --> Species mobility
0.000000000000000D+00 --> Natural background concentration
1 0.000000000000000D+00 --> J & initial concentration in cell #J
2 0.000000000000000D+00 --> J & initial concentration in cell #J
3 0.000000000000000D+00 --> J & initial concentration in cell #J
4 0.000000000000000D+00 --> J & initial concentration in cell #J
5 0.000000000000000D+00 --> J & initial concentration in cell #J
6 0.000000000000000D+00 --> J & initial concentration in cell #J
1 0.000000000000000D+00 --> J & concentration in feed #J
2 0.000000000000000D+00 --> J & concentration in feed #J
3 0.000000000000000D+00 --> J & concentration in feed #J
Caf
4 --> Species category
0.000000000000000D+00 --> Species mobility
0.000000000000000D+00 --> Natural background concentration
1 0.000000000000000D+00 --> J & initial concentration in cell #J
2 0.000000000000000D+00 --> J & initial concentration in cell #J
3 0.000000000000000D+00 --> J & initial concentration in cell #J

```





*b) extrait du fichier espe.dat*

```
DEB
Na+          --> Species name
  3 --> Species Category: Cation in the liquid phase
DEB
Zn++         --> Species name
  3 --> Species Category: Cation in the liquid phase
DEB
Znf          --> Species name
  4 --> Species Category: Adsorbed species
DEB
Ca++         --> Species name
  3 --> Species Category: Cation in the liquid phase
DEB
Caf          --> Species name
  4 --> Species Category: Adsorbed species
DEB
Naf          --> Species name
  4 --> Species Category: Adsorbed species
DEB
Br-          --> Species name
  2 --> Species Category: Anion in the liquid phase
DEB
NO3-        --> Species name
  2 --> Species Category: Anion in the liquid phase
```

c) *extrait du fichier reac.dat*

```

DEB
Echange Zn/Ca K=1                                --> Reaction name
  2 --> Reaction categ.:Adsorption reactions
0.100000000000000D+01 --> Equilibrium Constant
  4 --> Species in reaction
Zn++      --> Species name
  23 --> Species #
  3 --> Species Category:Cation in the liquid phase
-.100000000000000D+01 --> Stoich. Coeff.
Ca++      --> Species name
  33 --> Species #
  3 --> Species Category:Cation in the liquid phase
0.100000000000000D+01 --> Stoich. Coeff.
Znf       --> Species name
  26 --> Species #
  4 --> Species Category:Adsorbed species
0.100000000000000D+01 --> Stoich. Coeff.
Caf       --> Species name
  34 --> Species #
  4 --> Species Category:Adsorbed species
-.100000000000000D+01 --> Stoich. Coeff.
DEB
Echange Na/Ca K=0.04                             --> Reaction name
  2 --> Reaction categ.:Adsorption reactions
0.400000000000000D-01 --> Equilibrium Constant
  4 --> Species in reaction
Na+       --> Species name
  19 --> Species #
  3 --> Species Category:Cation in the liquid phase
-.200000000000000D+01 --> Stoich. Coeff.
Ca++      --> Species name
  33 --> Species #
  3 --> Species Category:Cation in the liquid phase
0.100000000000000D+01 --> Stoich. Coeff.
Naf       --> Species name
  35 --> Species #
  4 --> Species Category:Adsorbed species
0.200000000000000D+01 --> Stoich. Coeff.
Caf       --> Species name
  34 --> Species #
  4 --> Species Category:Adsorbed species
-.100000000000000D+01 --> Stoich. Coeff.
FIN

```

## d) extrait du fichier syst.dat

```
DEB
Echange Ca/Na/Zn sur biofilm
  2 --> Nb. of reactions
  8 --> Nb. of species
Echange Zn/Ca K=1.0 --> Reaction name
  17 --> Reaction #
  2 --> Reaction categ.:Adsorption reactions
0.100000000000000D+01 --> Equilibrium Constant
  23 -.100000000000000D+01 --> Sp. # and Stoi. Coeff.
  33 0.100000000000000D+01 --> Sp. # and Stoi. Coeff.
  26 0.100000000000000D+01 --> Sp. # and Stoi. Coeff.
  34 -.100000000000000D+01 --> Sp. # and Stoi. Coeff.
  19 0.000000000000000D+00 --> Sp. # and Stoi. Coeff.
  35 0.000000000000000D+00 --> Sp. # and Stoi. Coeff.
  36 0.000000000000000D+00 --> Sp. # and Stoi. Coeff.
  37 0.000000000000000D+00 --> Sp. # and Stoi. Coeff.
Echange Na/Ca K=0.04 --> Reaction name
  18 --> Reaction #
  2 --> Reaction categ.:Adsorption reactions
0.400000000000000D-01 --> Equilibrium Constant
  23 0.000000000000000D+00 --> Sp. # and Stoi. Coeff.
  33 0.100000000000000D+01 --> Sp. # and Stoi. Coeff.
  26 0.000000000000000D+00 --> Sp. # and Stoi. Coeff.
  34 -.100000000000000D+01 --> Sp. # and Stoi. Coeff.
  19 -.200000000000000D+01 --> Sp. # and Stoi. Coeff.
  35 0.200000000000000D+01 --> Sp. # and Stoi. Coeff.
  36 0.000000000000000D+00 --> Sp. # and Stoi. Coeff.
  37 0.000000000000000D+00 --> Sp. # and Stoi. Coeff.
Zn++ --> Species name
  23 --> Species #
  3 --> Species Category:
0.100000000000000D+01 --> Mobility Coeff.
Ca++ --> Species name
  33 --> Species #
  3 --> Species Category:
0.100000000000000D+01 --> Mobility Coeff.
Znf --> Species name
  26 --> Species #
  4 --> Species Category:
0.000000000000000D+00 --> Mobility Coeff.
Caf --> Species name
  34 --> Species #
  4 --> Species Category:
0.000000000000000D+00 --> Mobility Coeff.
Na+ --> Species name
  19 --> Species #
  3 --> Species Category:
0.100000000000000D+01 --> Mobility Coeff.
Naf --> Species name
  35 --> Species #
  4 --> Species Category:
0.000000000000000D+00 --> Mobility Coeff.
Br- --> Species name
  36 --> Species #
  2 --> Species Category:
0.100000000000000D+01 --> Mobility Coeff.
NO3- --> Species name
  37 --> Species #
  2 --> Species Category:
0.100000000000000D+01 --> Mobility Coeff.
```

### C.9.3 Influence des différents paramètres

TAB. C.13 – Paramètres utilisés dans IMPACT pour modéliser l'échange calcium sodium

J	$K_{Na/Ca}$	$K_{Zn/Ca}$	$Na_f$
6	0,04	1	0,14
6	0,04	1,2	0,14
6	0,04	2	0,14
6	0,04	10	0,14
6	0,04	0,5	0,14
6	0,04	0,1	0,14
6	0,04	0,8	0,14
6	0,03	1	0,14
6	0,05	1	0,14
6	0,4	1	0,14
6	0,004	1	0,14
6	0,1	1	0,14
10	0,01	1	0,23
20	0,04	1	0,46
5	0,04	1	0,12
4	0,04	1	0,09
6	0,04	1	0,1
6	0,04	1	0,02
6	0,04	1	1
6	0,04	1	2
6	0,04	1	0,5
6	0,04	1	$C_i = 0,14$ pour $i=1$ à $6$
6	0,04	1	$C_6 = 0,14$ et $C_1$ à $C_5 = 0$
6	0,04	1	$C_i = C_1/10 = 0,0093$ pour $i=2$ à $6$

Lorsque ce n'est pas précisé la valeur de  $Na_f$  est la valeur de la cellule 1,  $C_1$ . Les  $C_i$  sont les valeurs de  $Na_f$  pour la cellule  $i$ .

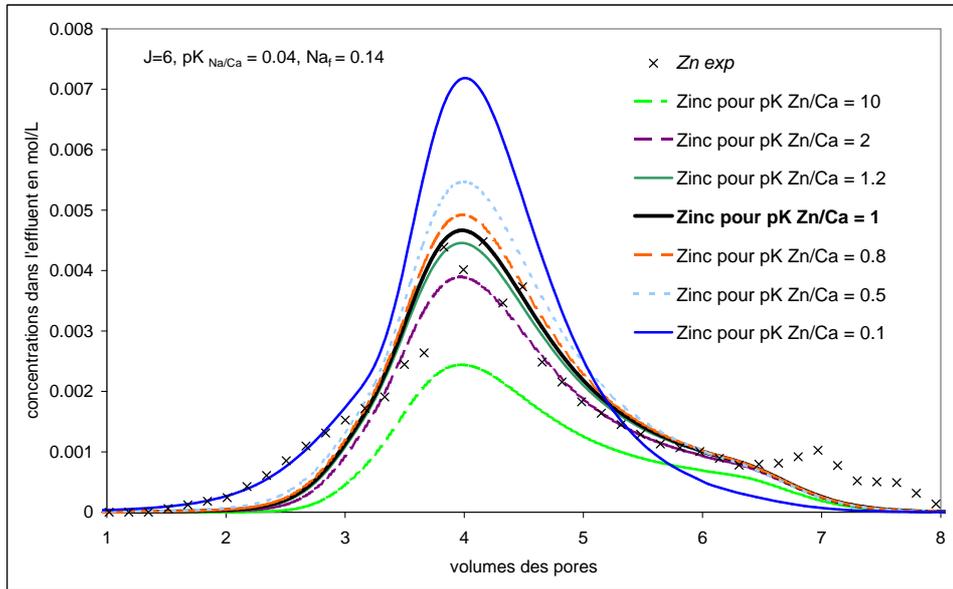


FIG. C.40 – Influence de la constante d'équilibre entre zinc et calcium

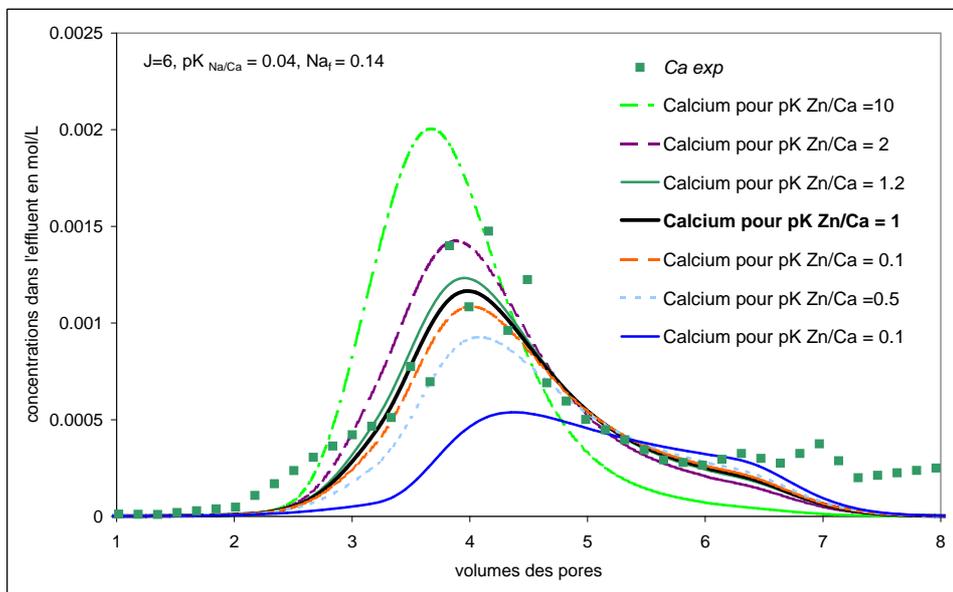


FIG. C.41 – Influence de la constante d'équilibre entre zinc et calcium

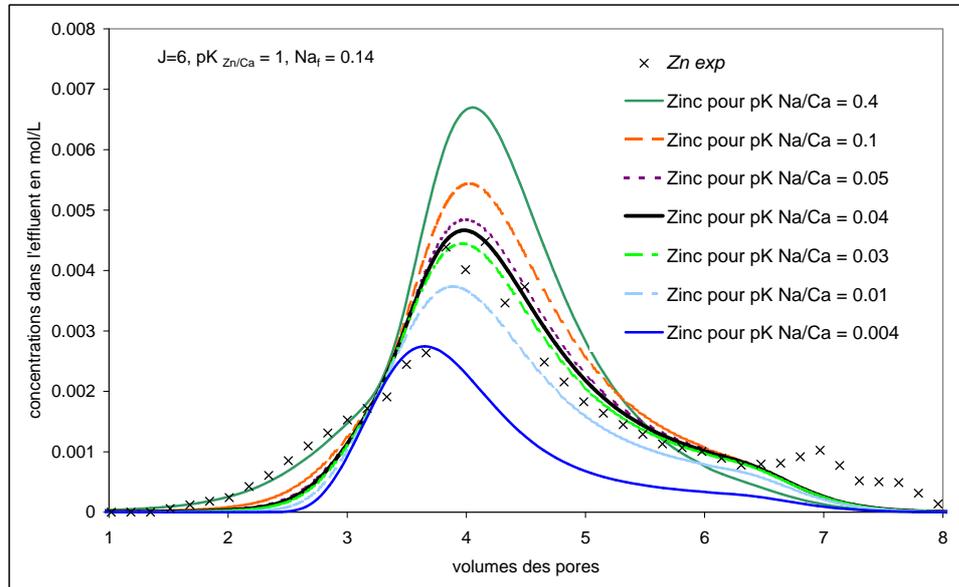


FIG. C.42 – Influence de la constante d'équilibre entre sodium et calcium

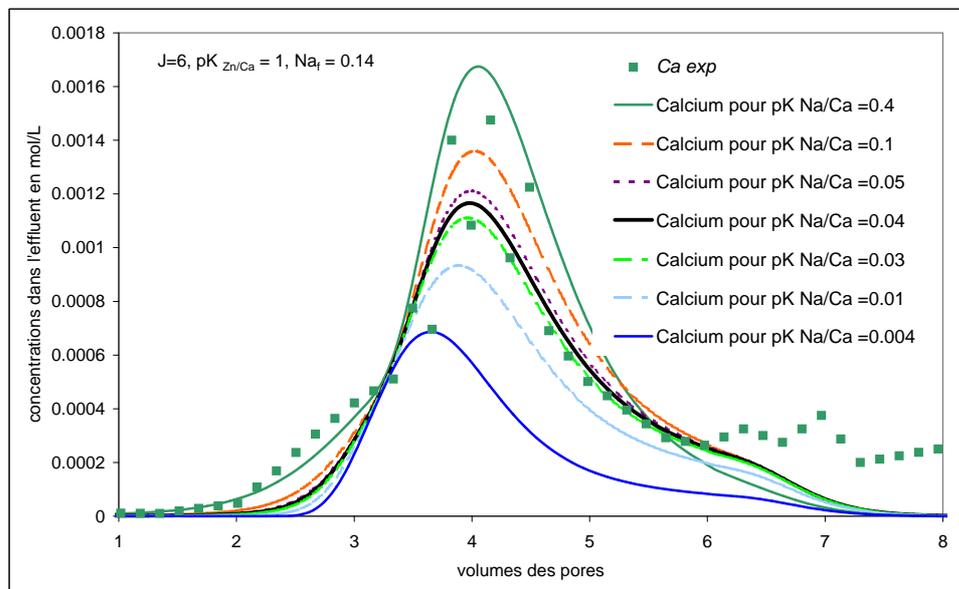


FIG. C.43 – Influence de la constante d'équilibre entre sodium et calcium

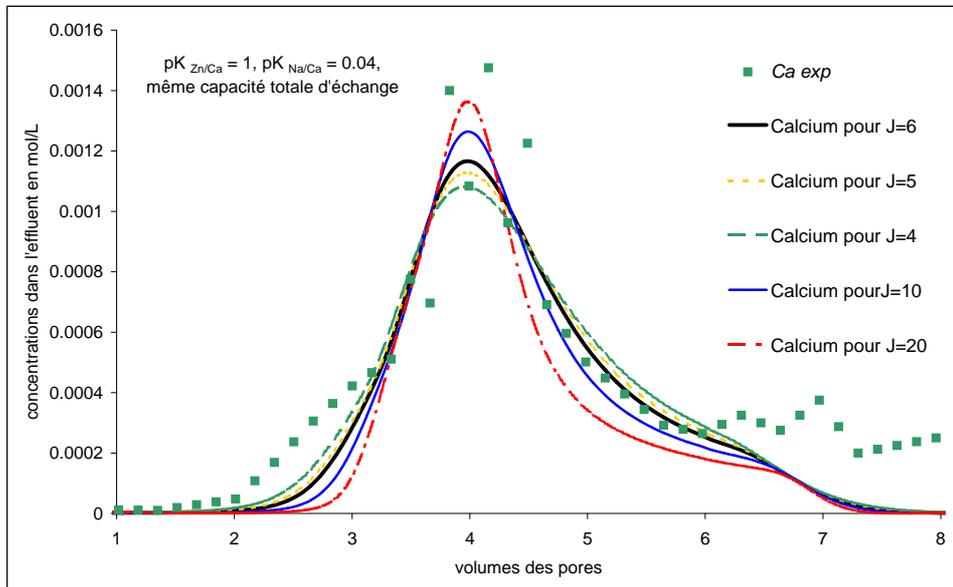


FIG. C.44 – Influence du nombre de cellules, J

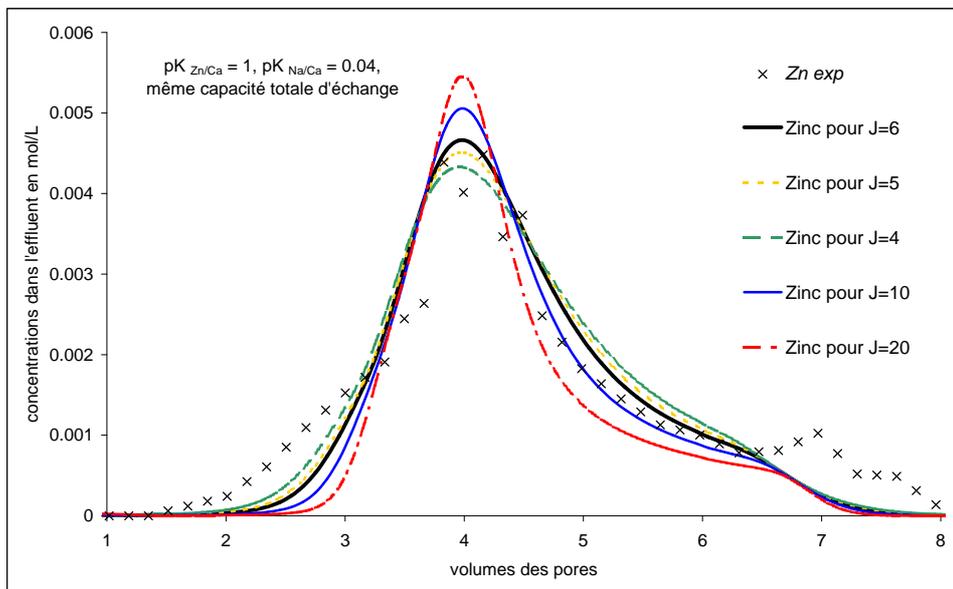


FIG. C.45 – Influence du nombre de cellules, J

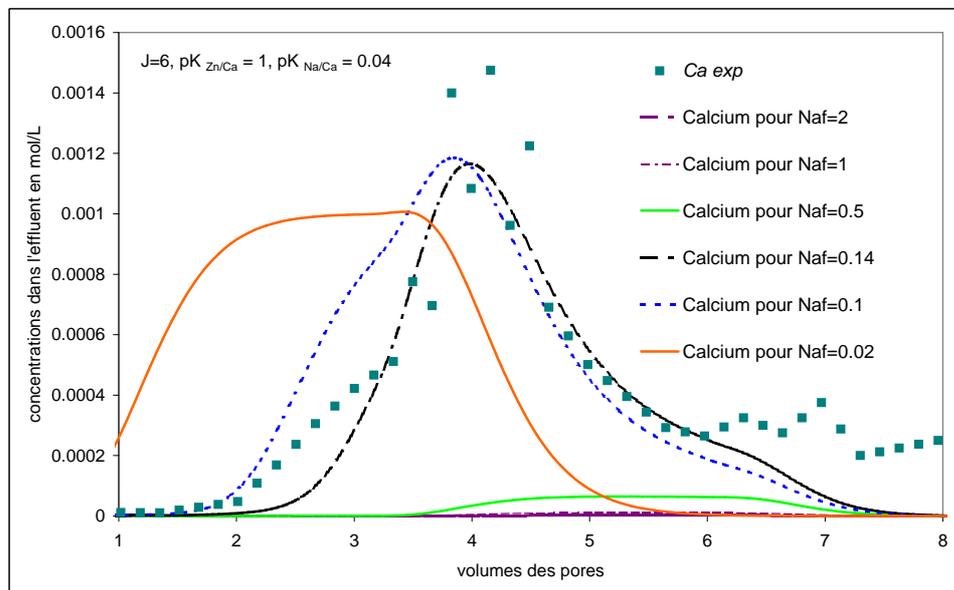


FIG. C.46 – Influence de la réactivité initiale du milieu

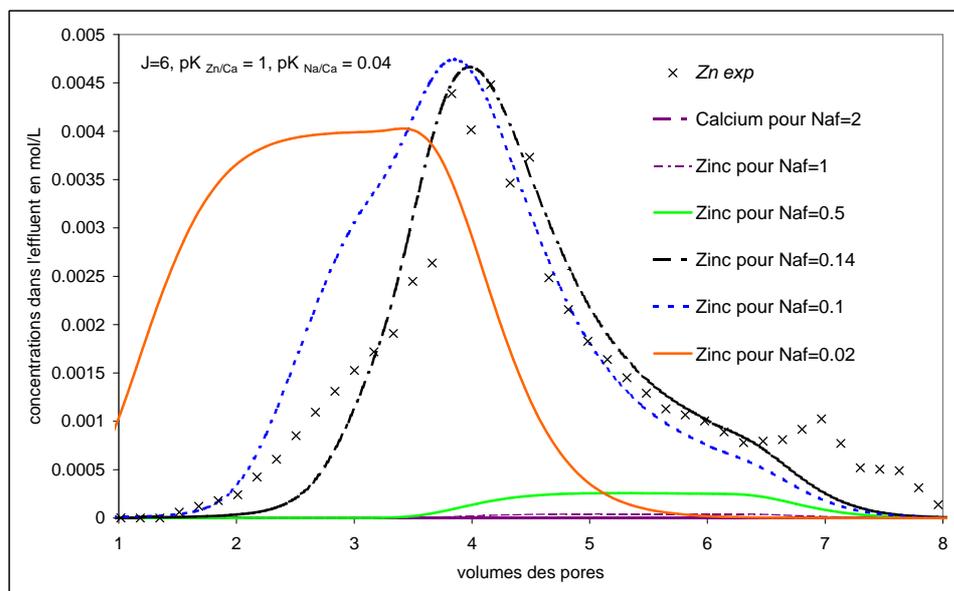


FIG. C.47 – Influence de la réactivité initiale du milieu

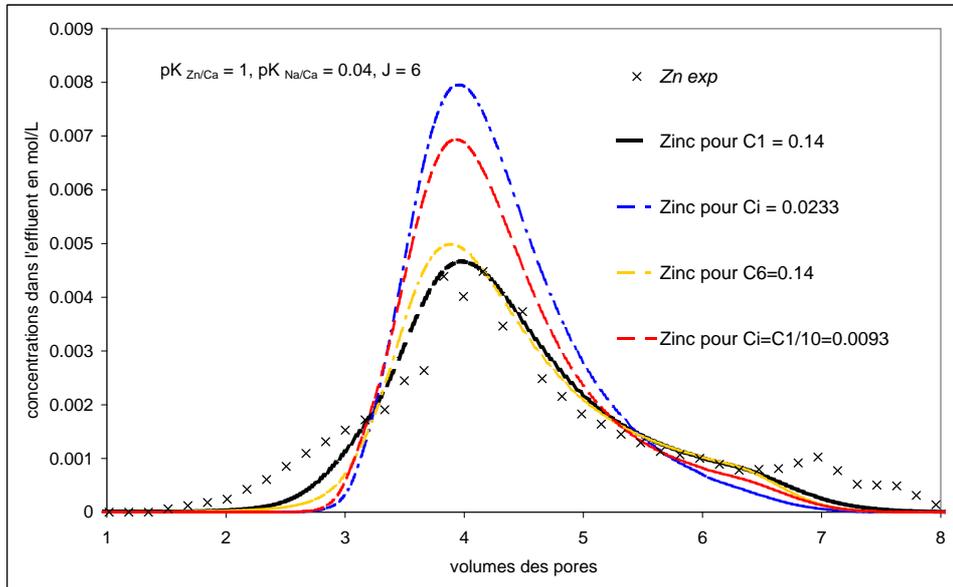


FIG. C.48 – Influence de la distribution de la capacité d'échange

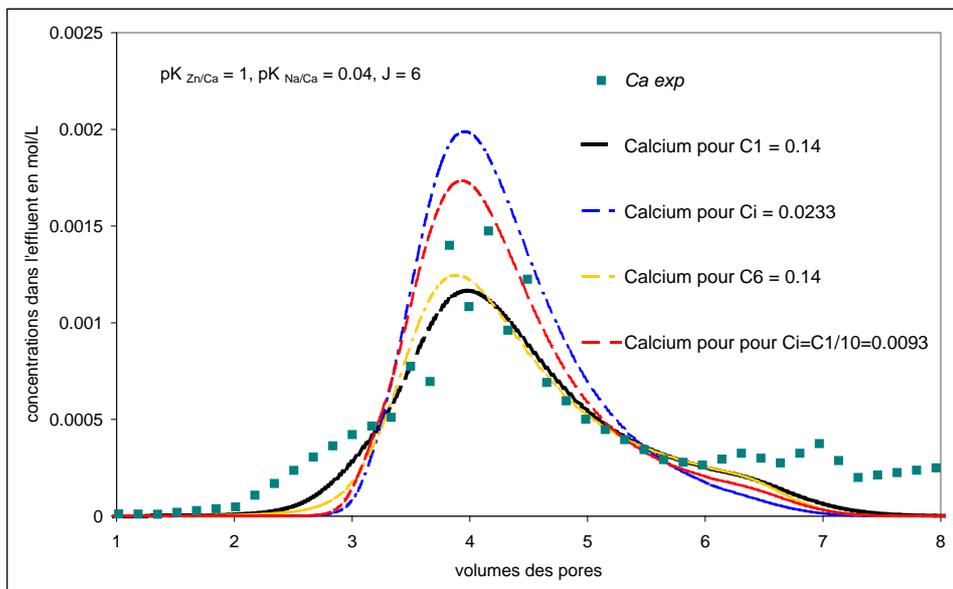


FIG. C.49 – Influence de la distribution de la capacité d'échange



# **Bibliographie**



- AL-TAHHAN, R. A., SANDRIN, T. R., BODOUR, A. A., et MAIER, R. M. (2000). « Rhamnolipid induced removal of lipopolysaccharide from *Pseudomonas aeruginosa* : effect on cell surface properties and interaction with hydrophobic substrates ». *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 66, n°8, p. 3262–3268.
- ANDERSON, P. et CHRISTENSEN, T. (1988). « Distribution coefficients of Cd, Co, Ni and Zn in soils ». *Journal of Soil Science*, vol. 39, p. 15–22.
- ANDRES, Y., THOUAND, G., BOUALAM, M., et MERGEAY, M. (2000). « Factors influencing the biosorption of gadolinium by microorganisms and its mobilisation from sand ». *Applied Microbiology Biotechnology*, vol. 54, p. 262–267.
- ASAMI, T., KUBOTA, M., et ORIKASA, K. (1995). « Distribution of different fractions of cadmium, zinc, lead and copper in unpolluted and polluted soils ». *Water, Air and Soil Pollution*, vol. 83, p. 187–194.
- ATKINSON, S. et DIGGLE, S. (2004). « The quorum-sensing site The home of bacterial cell-cell communication on the web ». <http://www.nottingham.ac.uk/quorum/what.htm>.
- AUERBACH, I., SORENSEN, C., HANSMA, H., et HOLDEN, P. (2000). « Physical morphology and surface properties of unsaturated *Pseudomonas putida* biofilms ». *Journal of bacteriology*, vol. 182, n°13, p. 3809–3815.
- BAR-YOSEF, B. (1979). « pH-dependent zinc adsorption by soils ». *Soil Science Society of America Journal*, vol. 43, p. 1095–1099.
- BARDIN, J.-P. (1999). « Contribution à une meilleure connaissance du fonctionnement qualitatif des bassins de retenue soumis en permanence à un débit traversier avec la prise en compte des incertitudes ». Thèse de doctorat, Institut National des Sciences Appliquées de Lyon, Lyon.
- BAUMANN, T., MÜLLER, S., et NIESSNER, R. (2002). « Migration of dissolved heavy metal compounds and PCP in the presence of colloids through a heterogeneous calcareous gravel and a homogeneous quartz sand-pilot scale experiments ». *Water Research*, vol. 36, p. 1213–1223.
- BECK, G., PUCHELLE, E., PLOTKOWSKI, C., et PESLIN, R. (1998). « Effect of growth on surface charge and hydrophobicity of *Staphylococcus aureus* ». *Annales de l'Institut Pasteur - Microbiologie*, vol. 139, p. 655–664.
- BEDDLE, J.-P., NETO, M., DELOLME, C., GHIDINI, M., WINIARSKI, T., et PERRODIN, Y. (2004). « Study of physico-chemical and microbiological parameters of a soil in restored stormwater infiltration basin in the Lyon

- area ». Dans *NOVATECH, 5th international conference on sustainable techniques and strategies in urban water management*, volume 2, p. 1469–1476.
- BELKHADIR, R., CAPDEVILLE, B., et ROQUES, H. (1988). « Etude descriptive et modélisation de la croissance d'un film biologique I. Etude descriptive fondamentale de la croissance d'un film biologique ». *Water Research*, vol. 22, n°1, p. 55–69.
- BERGMAIER, D., LACROIX, C., MACEDO, M. G., et CHAMPAGNE, C. (2001). « New method for exopolysaccharide determination in culture broth using stirred ultrafiltration cells ». *Applied Microbiology Biotechnology*, vol. 57, p. 401–406.
- BEVERIDGE, T., FORSBERG, C., et DOYLE, R. (1982). « Major sites of metal binding in *Bacillus licheniformis* walls ». *Journal of Bacteriology*, vol. 150, n°3, p. 1438–1448.
- BEVERIDGE, T. et MURRAY, R. (1980). « Sites of metal deposition in the cell wall of *Bacillus subtilis* ». *Journal of Bacteriology*, vol. 141, n°2, p. 876–887.
- BLACK, C., ALLAN, I., FORD, S. K., WILSON, M., et MCNAB, R. (2004). « Biofilm-specific surface properties and protein expression in oral *Streptococcus sanguis* ». *Archives of Oral Biology*, vol. 49, p. 295–304.
- BORROK, D., FEIN, J., TISCHLER, M., E.O'LOUGHLIN, MEYER, H., LISS, M., et KEMNER, K. (2004). « the effect of acidic solutions and growth conditions on the adsorptive properties of bacterial surfaces ». *Chemical Geology*, vol. 209, p. 107–119.
- BRELOT, E. (1994). « *Elements pour la prise en compte de l'impact des rejets urbains sur les milieux naturels dans la gestion des systèmes d'assainissement* ». Thèse de doctorat, Institut National des Sciences Appliquées de Lyon, Lyon.
- BRIONES, A. et RASKIN, L. (2003). « Diversity and dynamics of microbial communities in engineered environments and their implications for process stability ». *Current Opinion in Biotechnology*, vol. 14, p. 270–276.
- BROWN, D., BEVERIDGE, T., KEEVIL, C., et SHERRIFF, B. (1998). « Evaluation of microscopic techniques to observe iron precipitation in a natural microbial biofilm ». *FEMS Microbiology Ecology*, vol. 26, p. 297–310.
- BRUINSMA, G. M., RUSTEMA-ABBING, M., VAN DER MEI, H. C., et BUSCHER, H. J. (2001). « Effects of cell surface damage on surface properties and adhesion of *Pseudomonas aeruginosa* ». *Journal of Microbiological Methods*, vol. 45, p. 95–101.
- BUNN, R. A., MAGELKY, R. D., RYAN, J. N., et ELIMELECH, M. (2002). « Mobilization of natural colloids from an iron oxide-coated sand aquifer : effect of pH and ionic strength ». *Environmental Science and Technology*, vol. 36, p. 314–322.

- BURNS, R. (1980). « Microbial adhesion to soil surfaces : consequences for growth and enzyme activities ». Dans *Microbial adhesion to surfaces*, p. 249–262. Ellis Horwood Limited.
- BURTON, G. et PITT, R. (2002). *Stormwater effects handbook. A toolbox for watershed managers, scientists and engineers*. Lewis publishers.
- BUSSCHER, H., WEERKAMP, A., VAN DER MEI, H., VAN PELT, A., DE JONG, H., et ARENDS, J. (1984). « Measurement of the surface free energy of bacterial cell surfaces and its relevance for adhesion ». *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 48, n°5, p. 980–983.
- CAMESANO, T., UNICE, K., et LOGAN, B. (1999). « Blocking and ripening of colloids in porous media and their implications for bacterial transport ». *Colloids and Surfaces A : Physicochemical and Engineering Aspects*, vol. 160, p. 291–308.
- CERNING, J., RENARD, C., THIBAUT, J., BOUILLANNE, C., LANDON, M., DESMAZEAUD, M., et TOPISIROVIC, L. (1994). « Carbon source requirements for exopolysaccharide production by *Lactobacillus casei* CG11 and partial structure analysis of the polymer ». *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 60, p. 3914–3919.
- CHANG, J.-S., LAW, R., et CHANG, C.-C. (1997). « Biosorption of lead, copper and cadmium by biomass of *Pseudomonas aeruginosa* PU 21 ». *Water Research*, vol. 31, n°7, p. 1651–1658.
- CHAVANT, P., MARTINIE, B., MEYLHEUC, T., BELLON-FONTAINE, M.-N., et HEBRAUD, M. (2002). « *Listeria monocytogenes* LO28 : Surface Physicochemical properties and ability to form biofilms at different temperatures and growth phases ». *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 68, n°2, p. 728–737.
- CHEN, B.-Y., UTGIKAR, V. P., HARMON, S. M., TABAK, H. H., BISHOP, D. F., et GOVIND, R. (2000). « Studies on biosorption of zinc (II) and copper (II) on *Desulfovibrio desulfuricans* ». *International Biodeterioration and Biodegradation*, vol. 46, p. 11–18.
- CHEN, J. et YIACOUMI, S. (1997). « Biosorption of metal ions from aqueous solutions ». *Separation Science and Technology*, vol. 32, n°1-4, p. 51–69.
- CHEN, J.-H., LION, L., GHIORSE, W., et SHULER, M. (1995). « Mobilization of adsorbed cadmium and lead in aquifer material by bacterial extracellular polymers ». *Water Research*, vol. 29, n°2, p. 421–430.
- CHLOPECKA, A., BACON, J. R., WILSON, M. J., et KAY, J. (1996). « Forms of cadmium, lead, and zinc in contaminated soils from Southwest Poland ». *Journal of Environmental Quality*, vol. 25, p. 69–79.
- CHOCAT, B. (1997). « Encyclopédie de l'hydrologie urbaine et de l'assainissement ».

- CHOI, H. et CORAPCIOGLU, M. (1997). « Effect of colloids on volatile contaminant transport and air-water partitioning in unsaturated porous media ». *Water Resources Research*, vol. 33, n°11, p. 2447–2457.
- CHÂTELLIER, X., BOTTERO, J.-Y., et PETIT, J. L. (2001). « Adsorption of a cationic polyelectrolyte on Escherichia coli bacteria : 1. Adsorption of the polymer ». *Langmuir*, vol. 17, p. 2782–2790.
- COLANDINI, V. (1997). « Effets des structures réservoirs à revêtement poreux sur les eaux pluviales : Qualité des eaux et devenir des métaux lourds ». Thèse de doctorat, Université de Pau et des pays de l'Adour, Pau.
- CORAPCIOGLU, M. et HARIDAS, A. (1985). « Microbial transport in soils and groundwater : A numerical model ». *Advances Water Resources*, vol. 8, p. 188–200.
- CORAPCIOGLU, M. et JIANG, S. (1993). « Colloid facilitated groundwater contaminant transport ». *Water Resources Research*, vol. 29, n°7, p. 2215–2226.
- CORAPCIOGLU, M. Y. et KIM, S. (1995). « Modeling facilitated contaminant transport by mobile bacteria ». *Water Resources Research*, vol. 31, n°11, p. 2639–2647.
- COSTERTON, J. (1999). « Introduction to biofilm ». *International Journal of Antimicrobial Agents*, vol. 11, p. 217–221.
- COWAN, M., VAN DER MEI, H., ROUXHET, P., et BUSSCHER, H. (1992). « Physico-chemical and structural properties of the surfaces of *Peptostreptococcus micros* and *Streptococcus mitis* as compared to those of mutants *Streptococci*, *Streptococcus sanguis* and *Streptococcus salivarius* ». *Journal of General Microbiology*, vol. 138, p. 2707–2714.
- COX, J. S., SMITH, D. S., WARREN, L. A., et FERRIS, F. G. (1999). « Characterizing heterogeneous bacterial surface functional groups using discrete affinity spectra for proton binding ». *Environmental Science and Technology*, vol. 33, n°24, p. 4514–4521.
- CUMBIE, D. et MCKAY, L. (1999). « Influence of diameter on particle transport in a fractured shale saprolite ». *Journal of Contaminant Hydrology*, vol. 37, p. 139–157.
- DAJOZ, R. (2000). *Précis d'écologie*. Dunod.
- DAUGHNEY, C. et FEIN, J. (1998). « The effect of ionic strength on the adsorption of  $H^+$ ,  $Cd^{2+}$ ,  $Pb^{2+}$  and  $Cu^{2+}$  by *Bacillus subtilis* and *Bacillus licheniformis* : a surface complexation model ». *Journal of Colloid and Interface Science*, vol. 198, p. 53–77.
- DAUGHNEY, C., FEIN, J., et YEE, N. (1998). « A comparison of the thermodynamics of metal adsorption onto two common bacteria ». *Chemical Geology*, vol. 144, p. 161–176.

- DAVET, P. (1996). *Vie microbienne du sol et production végétale*. INRA Editions.
- DAVIES, D. G. (2000). « Physiological events in biofilm formation ». Dans *SGM Symposium 59*, p. 37–52.
- DAVIES, D. G. (2004). « Microbiology, bacterial physiology, biofilm research ». <http://biology.binghamton.edu/davies/>.
- DAVIS, A. P., SHOKOUHIAN, M., et NI, S. (2001). « Loading estimates of lead, copper, cadmium, and zinc in urban runoff from specific sources ». *Chemosphere*, vol. 44, p. 997–1009.
- DE SWAAF, M., GROBBEN, G., EGGINK, G., DE RIJK, T., VAN DER MEER, P., et SIJTSMA, L. (2001). « Characterisation of extracellular polysaccharides produced by *Cryptocodium cohnii* ». *Applied Microbiology Biotechnology*, vol. 57, p. 395–400.
- DECHESNE, M. (2002). « Connaissance et modélisation du fonctionnement des bassins d'infiltration d'eaux de ruissellement urbain pour l'évaluation des performances techniques et environnementales sur le long terme ». Thèse de doctorat, Institut National des Sciences Appliquées de Lyon, Lyon.
- DENAIX, L., SEMLALI, R., et DOUAY, F. (2001). « Dissolved and colloidal transport of Cd, Pb, and Zn in a silt loam soil affected by atmospheric industrial deposition ». *Environmental Pollution*, vol. 113, p. 29–38.
- DRURY, W., CHARACKLIS, W., et STEWART, P. (1993). « Interactions of 1µm latex particles with pseudomonas aeruginosa biofilms ». *Water Research*, vol. 27, n°7, p. 1119–1126.
- DURAND, A. (2003a). « Caractérisation d'une surface bactérienne, *Escherichia coli* ». rapport de stage, Université Joseph Fourier, Grenoble.
- DURAND, C. (2003b). « Caractérisation physico-chimique des produits de l'assainissement pluvial. Origine et devenir des métaux traces et des polluants organiques ». Thèse de doctorat, Université de Poitiers, Poitiers.
- DURIN, B. (2003). « Etude des mécanismes du transfert colloïdal des métaux lourds en milieu urbain et routier ». Comité de suivi, Laboratoire Central des Ponts et Chaussées, Nantes.
- ELIMELECH, M. et RYAN, J. (2002). « The role of minerals colloids in the facilitated transport of contaminants in saturated porous media ». Dans *Interactions between Soil Particles and Microorganisms : Impact on the Terrestrial Ecosystem*, p. 1–45. John Wiley and Sons.
- FARRAH, H. et PICKERING, W. (1976). « The sorption of zinc species by clay minerals ». *Australian Journal of Chemistry*, vol. 29, p. 1649–1656.
- FAURÉ, M. (1994). « Migration de particules et de solutés en milieux poreux ». Thèse de doctorat, Institut National Polytechnique de Lorraine, Nancy.
- FAURÉ, M.-H., SARDIN, M., et VITORGE, P. (1996). « Transport of clay particles and radioelements in a salinity gradients : experiments and simulations ». *Journal of Contaminants Hydrology*, vol. 21, p. 255–267.

- FEIN, J. (2000). « Quantifying the effects of bacteria on adsorption reactions in water-rock systems ». *Chemical geology*, vol. 169, p. 265–280.
- FEIN, J., DAUGHNEY, C., YEE, N., et DAVIS, T. (1997). « A chemical equilibrium model for metal adsorption onto bacterial surfaces ». *Geochimica et Cosmochimica Acta*, vol. 61, n°16, p. 3319–3328.
- FEIN, J. B., MARTIN, A. M., et WIGHTMAN, P. G. (2001). « Metal adsorption onto bacterial surfaces : development of a predictive approach ». *Geochimica et Cosmochimica Acta*, vol. 65, n°23, p. 4267–4273.
- FÉVRIER, L. (2001). « Transfert d'un mélange Zn-Cd-Pb dans un dépôt fluvio-glaciaire carbonaté. Approche en colonnes de laboratoire ». Thèse de doctorat, Institut National des Sciences Appliquées de Lyon, Lyon.
- FISCHER, D., CHARLES, E. G., et BAEHR, A. L. (2003). « Effects of stormwater infiltration on quality of groundwater beneath retention and detention basins ». *Journal of environmental engineering*, vol. 129, n°5, p. 464–471.
- FLEMMING, H.-C. (1993). « Biofilms and environmental protection ». *Water Science and Technology*, vol. 27, n°7-8, p. 1–10.
- FLEMMING, H.-C., WINGENDER, J., MAYER, C., KÖRSTGENS, V., et BORCHARD, W. (2000). « Cohesiveness in biofilm matrix polymers ». *SGM Symposium 59*, p. 87–105.
- FLETCHER, M. (2001). « Biofilms ». *Encyclopedia of life sciences*. <http://www.els.net>.
- FLETT, W. F., OSMAN, S. F., et DUNN, M. F. (1989). « Characterization of exopolysaccharides produced by plant-associated *fluorescent Pseudomonads* ». *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 55, n°3, p. 579–583.
- FOWLE, D. A. et FEIN, J. B. (1999). « Competitive adsorption of metal cations onto two Gram positive bacteria : Testing the chemical equilibrium model ». *Geochimica et Cosmochimica Acta*, vol. 63, n°19-20, p. 3059–3067.
- GABELLI, L. (2001). « Contribution des colloïdes biotiques au transfert rapide de métaux lourds dans les sols vers les nappes ». Rapport de stage, Université Joseph Fourier, Grenoble.
- GONCALVES, M., SIGG, L., REUTLINGER, M., et STUMM, W. (1987). « Metal ion binding by biological surfaces : voltametric assessment in the presence of bacteria ». *Science of the Total Environment*, vol. 60, p. 105–119.
- GROLIMUND, D., BARMETTLER, K., et BORKOVEC, M. (2001). « Release and transport of colloidal particles in natural porous media : 2. Experimental results and effects of ligands ». *Water Resources Research*, vol. 37, n°3, p. 571–582.

- GROLIMUND, D. et BORKOVEC, M. (1999). « Long-term release kinetics of colloidal particles from natural porous media ». *Environmental Science and Technology*, vol. 33, p. 4054–4060.
- GROLIMUND, D. et BORKOVEC, M. (2001). « Release and transport of colloidal particles in natural porous media : 1. Modelling ». *Water Resources Research*, vol. 37, n°3, p. 559–570.
- GROLIMUND, D., BORKOVEC, M., BARMETTLER, K., et STICHER, H. (1996). « Colloid-facilitated transport of strongly sorbing contaminants in natural porous media : a laboratory column study ». *Environmental Science and Technology*, vol. 30, n°10, p. 3118–3123.
- GROLIMUND, D., ELIMELECH, M., BORKOVEC, M., BARMETTLER, K., KRETZSCHMAR, R., et STICHER, H. (1998). « Transport of in situ mobilized colloidal particles in packed soil columns ». *Environmental Science and Technology*, vol. 32, n°22, p. 3562–3569.
- GUELLOUZ, S. (1994). « Modélisation de la migration de colloïdes dans un milieu poreux ». Thèse de doctorat, Ecole Nationale des Ponts et Chaussées, Paris.
- GUINÉ, V. (2002). « Etude des transferts de métaux lourds facilités par les colloïdes bactériens dans les sols ». Mémoire de DEA, Université Joseph Fourier, Grenoble.
- GUINÉ, V., MURIS, M., DELOLME, C., DURAND, A., GAUDET, J.-P., MARTINS, J., SARRET, G., et SPADINI, L. « Acid base characteristics and zinc sorption of three Gram-negative bacteria ». to be published.
- HAAS, J. R. (2004). « Effects of cultivation conditions on acid-base titration properties of *Shewanella-putrefaciens* ». *Chemical Geology*, vol. 209, p. 67–81.
- HAAS, J. R., DICHRISTINA, T. J., et WADE, R. J. (2001). « Thermodynamics of U(VI) sorption onto *Shewanella putrefaciens* ». *Chemical Geology*, vol. 180, p. 33–54.
- HAHN, M. H., ABADZIC, D., et O'MELIA, C. (2004). « Colloid transport in porous media under unfavorable chemical conditions II : experimental assessment and implications ». *Environmental Science and Technology*, vol. 38, n°1, p. 210–220.
- HARMAND, B. (1996). « Contribution à la compréhension des processus de transport de colloïdes en milieu naturel poreux ou fracturé ». Thèse de doctorat, Institut National Polytechnique de Lorraine, Nancy.
- HARMAND, B., RODIER, E., SARDIN, M., et DODDS, J. (1996). « Transport and capture of submicron particles in a natural sand : short column experiments and a linear model ». *Colloids and Surfaces A : Physicochemical and Engineering Aspects*, vol. 107, p. 233–244.

- HARTER, R. D. (1983). « Effect of soil pH on adsorption of lead, copper, zinc and nickel ». *Soil Science Society of America Journal*, vol. 47, p. 47–51.
- HÉBRARD, C. et DELOLME, C. (1999). « Role of the biotic compartment in the transfer of zinc through the vadose zone - Application to an infiltration system ». *Water Science and Technology*, vol. 39, n°2, p. 209–215.
- HÉBRARD-LABIT, C. (1998). « Influence du compartiment bactérien sur le transfert du zinc en milieu poreux non-saturé - Expériences et modélisation ». Thèse de doctorat, Institut National des Sciences Appliquées de Lyon, Lyon.
- HUYSMAN, F. et VERSTRAETE, W. (1993). « Water-facilitated transport of bacteria in unsaturated soil columns : influence of cell surface hydrophobicity and soil properties ». *Soil Biology Biochemistry*, vol. 25, n°1, p. 83–90.
- JACKSON, G., BEYENAL, H., REES, W. M., et LEWANDOWSKI, Z. (2001). « Growing reproducible biofilms with respects to structure and viable cell counts ». *Journal of Microbiological Methods*, vol. 47, p. 1–10.
- JANSSEN, R., PEIJNENBURG, W., POSTHUMA, L., et VAN DEN HOOP, M. (1997). « Equilibrium partitioning of heavy metals in ducth field soils - 1 Relationship between metal partition coefficients and soil characteristics ». *Environmental Toxicology and Chemistry*, vol. 16, n°12, p. 2470–2478.
- JAUZEIN, M., ANDRE, C., MARGRITA, R., SARDIN, M., et SCHWEICH, D. (1989). « A flexible computer code for modelling transport in porous media : IMPACT ». *Geoderma*, vol. 44, n°2-3, p. 95–113.
- JENKINS, M., CHEN, J.-H., KADNER, D., et LION, L. (1994). « Methanotrophic bacteria and facilitated transport of pollutants in aquifer material ». *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 60, n°10, p. 3491–3498.
- JENKINS, M. et LION, L. (1993). « Mobile bacteria and transport of polynuclear aromatic hydrocarbons in porous media ». *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 59, n°10, p. 3306–3313.
- JEWETT, D. G., LOGAN, B. E., ARNOLD, R. G., et BALES, R. C. (1999). « Transport of *Pseudomonas fluorescens* strain p17 through quartz sand columns as a function of water content ». *Journal of Contaminant Hydrology*, vol. 36, p. 73–89.
- JONES, D. S., COLIN G ADAIR, MAWHINNEY, W. M., et GORMAN, S. P. (1996). « Standardisation and comparison of methods employed for microbial cell surface hydrophobicity and charge determination ». *International Journal of Pharmaceutics*, vol. 131, p. 83–89.

- KANAZAWA, S. et MORI, K. (1996). « Isolation of cadmium-resistant bacteria and their resistance mechanisms - part 2. Cadmium biosorption by Cd-resistant and sensitive bacteria ». *Soil Science and Plant Nutrition*, vol. 42, n°4, p. 731–736.
- KARLÉN, C., WALLINDER, I. O., HEIJERICK, D., LEYGRAF, C., et JANSSEN, C. (2001). « Runoff rates and ecotoxicity of zinc induced by atmospheric corrosion ». *The Science of the Total Environment*, vol. 277, p. 169–180.
- KELLY, S., KEMNER, K., FEIN, J., FOWLE, D., BOYANOV, M., BUNKER, B., et YEE, N. (2002). « X-ray absorption fine structure determination of pH-dependent U-bacterial cell wall interactions ». *Geochemica et Cosmochimica Acta*, vol. 66, n°22, p. 3855–3871.
- KNOX, K., HARDY, L., MARKEVICS, L., EVANS, J., et WICKENS, A. (1985). « Comparative studies on the effect of growth conditions on adhesion, hydrophobicity, and extracellular protein profile of *Streptococcus sanguis* G9B ». *Infection and Immunity*, vol. 50, n°2, p. 545–554.
- KRETZSCHMAR, R., BORKOVEC, M., GROLIMUND, D., et ELIMELECH, M. (1999). « Mobile subsurface colloids and their role in contaminant transport ». *Advances in Agronomy*, vol. 66, p. 1–94.
- KRETZSCHMAR, R. et STICHER, H. (1998). « Colloid transport in natural porous media : influence of surface chemistry and flow velocity ». *Physics and Chemistry of Earth*, vol. 23, n°2, p. 133–139.
- KUO, S. et BAKER, A. (1980). « Sorption of copper, zinc and cadmium by some acid soils ». *Soil Science Society of America Journal*, vol. 44, p. 969–974.
- LAMBERT, S., MOUSTIER, S., DUSSOUILLEZ, P., BARAKAT, M., BOTTERO, J., PETIT, J. L., et GINESTET, P. (2003). « Analysis of the structure of very large bacterial aggregates by small-angles multiple light scattering and confocal image analysis ». *Journal of Colloid and Interface Science*, vol. 262, p. 384–390.
- LAMBERT, S., THILL, A., GINESTET, P., AUDIC, J., et BOTTERO, J. (2000). « Structural interpretations of static light scattering patterns of fractal aggregates ». *Journal of Colloid and Interface Science*, vol. 228, p. 379–385.
- LASSABATERE, L. (2002). « Modification du transfert de trois métaux lourds (Zn, Pb et Cd) dans un sol issu d'un dépôt fluvioglacière carbonaté par l'introduction de géotextiles ». Thèse de doctorat, Institut National des Sciences Appliquées de Lyon, Lyon.
- LEDIN, M., KRANTZ-RÜLCKER, C., et ALLARD, B. (1996). « Zn, Cd and Hg accumulation by microorganisms, organic and inorganic soil components in multi-compartment systems ». *Soil Biology and Biochemistry*, vol. 28, n°6, p. 791–799.

- LEDIN, M., PEDERSEN, K., et ALLARD, B. (1997). « Effects of pH and ionic strength on the adsorption of Cs, Sr, Eu, Zn, Cd and Hg by *Pseudomonas putida* ». *Water Air and Soil Pollution*, vol. 93, p. 367–381.
- LEGRET, M. et PAGOTTO, C. (1999). « Evaluation of pollutant loadings in the runoff waters from a major rural highway ». *The Science of the Total Environment*, vol. 235, p. 143–150.
- LIND, B. et KARRO, E. (1995). « Stormwater infiltration and accumulation of heavy metals in roadside green areas in Göteborg, Sweden ». *Ecological Engineering*, vol. 5, p. 533–539.
- LION, L., HSIEH, K., SHULER, M., et GHIORSE, W. (1990). « Characterization of biofilm interactions with toxic trace metals : consequences for metal removal and the biophase ». Environmental Engineering Division of the American Society of Civil Engineers.
- LUMSDON, D. G., EVANS, L. J., et BOLTON, K. A. (1995). « The influence of pH and chloride on the retention of cadmium, lead, mercury, and zinc by soils ». *Journal of Soil Contamination*, vol. 4, n°2, p. 137–150.
- MA, Y. et LIU, J. F. (1997). « Adsorption kinetics of zinc in a calcareous soil as affected by pH and temperature ». *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, vol. 28, n°13-14, p. 1117–1126.
- MAIER, R., PEPPER, I., et GERBA, C. (2000). *Environmental microbiology*. Academic Press.
- MALVERN INSTRUMENTS (2000). « Zeta potential measurements ».
- MARÉCHAL, A. (1996). « Transport colloïdal dans les sols ». Thèse de doctorat, Institut national polytechnique de Lorraine, Nancy.
- MARCOS, L. (2001). « Etude expérimentale et modélisation du transfert du zinc et du plomb dans des milieux sableux modèles ». Thèse de doctorat, Université de Nantes, Nantes.
- MARTINELLI, D., BACHOFEN, R., et BRANDL, H. (2002). « Effect of medium composition, flow rate, and signaling compounds on the formation of soluble extracellular materials by biofilms of *Chromobacterium violaceum* ». *Applied Microbiology Biotechnology*, vol. 59, p. 278–283.
- MCBRIDE, M. et BLASIAK, J. (1979). « Zinc and copper solubility as a function of pH in an acid soil ». *Soil Science Society of America Journal*, vol. 43, p. 866–870.
- MCCARTHY, J. et ZACHARA, J. (1989). « Subsurface transport of contaminants, Mobile colloids in the subsurface environment may alter the transport of contaminants ». *Environmental Science and Technology*, vol. 23, n°5, p. 496–502.
- MCGECHAN, M. et LEWIS, D. (2002). « Transport of particulate and colloid-sorbed contaminants through soil, part 1 : general principles ». *Biosystems Engineering*, vol. 83, n°3, p. 255–273.

- MCKENNA, S. et MONDAL, D. (1997). « Cell biology of bacteria ». [www.liu.edu](http://www.liu.edu).
- MILLS, W., LIU, S., et FONG, F. (1991). « Literature review and model (COMET) for colloid/metals transport in porous media ». *Ground Water*, vol. 29, n°2, p. 199–208.
- NATIONAL RESEARCH COUNCIL CANADA (2004). « Microscopie confocale ». <http://ibs-isb.nrc-cnrc.gc.ca/ibs/facilities/microscopyf.html>.
- NEALSON, K. H. et STAHL, D. A. (1997). « Microorganisms and biogeochemical cycles : what can we learn from layered microbial communities ». *Reviews in Mineralogy*, vol. 35, p. 1–34.
- NGWENYA, B. T., SUTHERLAND, I. W., et KENNEDY, L. (2003). « Comparison of the acid-base behaviour and metal adsorption characteristics of a Gram-negative bacterium with other strains ». *Applied Geochemistry*, vol. 18, p. 527–538.
- NIEHREN, S. et KINZELBACH, W. (1998). « Artificial colloid tracer tests : development of a compact on-line microsphere counter and application to soil column experiments ». *Journal of Contaminant Hydrology*, vol. 35, p. 249–259.
- NOELL, A., THOMPSON, J., CORAPCIOGLU, M., et TRIAY, I. (1998). « The role of silica colloids on facilitated cesium transport through glass bead columns and modeling ». *Journal of Contaminant Hydrology*, vol. 31, p. 23–56.
- NORTON, L., BASKARAN, K., et MCKENZIE, T. (2004). « Biosorption of zinc from aqueous solutions using biosolids ». *Advances in Environmental Research*, vol. 8, p. 629–635.
- ONAOLAPO, J. A. et KLEMPERER, R. M. (1986). « Effect of R-plasmid RP1 on surface hydrophobicity of *Proteus mirabilis* ». *Journal of General Microbiology*, vol. 132, p. 3303–3307.
- O'TOOLE, G., GIBBS, K., HAGER, P., PHIBBS, P. J., et KOLTER, R. (2000a). « The global carbon metabolism regulator Crc is a component of a signal transduction pathway required for biofilm development by *Pseudomonas aeruginosa* ». *Journal of Bacteriology*, vol. 182, p. 425–431.
- O'TOOLE, G., KAPLAN, H. B., et KOLTER, R. (2000b). « Biofilm formation as microbial development ». *Annual Review of Microbiology*, vol. 54, p. 49–79.
- PAGOTTO, C. (1999). « Etude sur l'émission et le transfert dans les eaux et les sols des éléments traces métalliques et des hydrocarbures en domaine routier ». Thèse de doctorat, Université de Poitiers, Poitiers.
- PARDO, M. et GUADALIX, M. (1996). « Zinc sorption-desorption by two anepts : effect of pH and support medium ». *European Journal of Soil Science*, vol. 47, p. 257–263.

- PARDO, R., HERGUEDAS, M., et BARRADO, E. (2003). « Biosorption of cadmium, copper, lead and zinc by inactive biomass of *Pseudomonas putida* ». *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, vol. 376, p. 26–32.
- PITT, R., CLARCK, S., et FIELD, R. (1999). « Groundwater contamination potential from stormwater infiltration practices ». *Urban Water*, vol. 1, p. 217–236.
- PLETTE, A., BENEDETTI, M., et VAN RIEMSDIJK, W. (1996). « Competitive binding of protons, calcium, cadmium and zinc to isolated cell walls of a Gram-positive soil bacterium ». *Environmental Science and Technology*, vol. 30, p. 1902–1910.
- PLETTE, A. C., VAN RIEMSDIJK, W. H., BENEDETTI, M. F., et VAN DER WAL, A. (1995). « pH dependant charging behavior of isolated cell walls of a Gram-Positive soil bacterium ». *Journal of Colloid and Interface Science*, vol. 173, p. 354–363.
- PR-COMPANY GMBH (2004). « Ein Hersteller aus Brandenburg bekämpft erfolgreich gefährliche Bakterien im Trinkwasser ». <http://www.baupresse24.de>.
- PULCINI, E. D. L. (2001). « Bacterial biofilms : a review of current research ». *Nephrologie*, vol. 8, p. 439–441.
- PUZIY, A., PODDUBNAYA, O., ZAITSEV, V., et KONOPLITSKA, O. (2004). « Modeling of heavy metal ion binding by phosphoric acid activated carbon ». *Applied Surface Science*, vol. 221, p. 421–429.
- RITTMANN, B. (1993). « The significance of biofilms in porous media ». *Water Resources Research*, vol. 29, n°7, p. 2195–2202.
- ROSENBERG, M. (1991). « Basic and applied aspects of microbial adhesion at the hydrocarbon : water interface ». *Critical Reviews in Microbiology*, vol. 18, n°2, p. 159–173.
- ROSENBERG, M., GUTNICK, D., et ROSENBERG, E. (1980). « Adherence of bacteria to hydrocarbons : a simple method for measuring cell-surface hydrophobicity ». *FEMS Microbiology Letters*, vol. 9, p. 29–33.
- ROSENBERG, M. et KJELLEBERG, S. (1986). « Hydrophobic interactions : role of bacterial adhesion ». *Advances in Microbial Ecology*, vol. 9, p. 353–393.
- ROSS, J. et SHERRELL, R. (1999). « The role of colloids in tracemetal transport and adsorption behavior in New Jersey Pinelands streams ». *Limnology Oceanography*, vol. 44, n°4, p. 1019–1034.
- ROUSSEAU, M. (2003). « Transport préférentiel de particules dans un sol non saturé : de l'expérimentation en colonne lysimétrique à l'élaboration d'un modèle à base physique ». Thèse de doctorat, Institut National Polytechnique de Grenoble, Grenoble.

- ROY, S. et DZOMBAK, D. (1997). « Chemical factors influencing colloid-facilitated transport of contaminants in porous media ». *Environmental Science and Technology*, vol. 31, p. 656–664.
- ROY, S. B. et DZOMBAK, D. A. (1996). «  $\text{Na}^+$ - $\text{Ca}^{2+}$  exchange effects in the detachment of latex colloids deposited in glass bead porous media ». *Colloids and surfaces A- Physicochemical and engineering aspects*, vol. 119, p. 133–139.
- SADOWSKI, Z. (2001). « Effect of biosorption of Pb(II), Cu(II) and Cd(II) on the zeta potential and flocculation of *Nocardia sp.* ». *Minerals Engineering*, vol. 14, n°5, p. 547–522.
- SAIERS, J. E. et HORNBERGER, G. M. (1999). « The influence of ionic strength in the facilitated transport of cesium by kaolinite colloids ». *Water Resources Research*, vol. 35, n°6, p. 1713–1727.
- SANDAA, R.-A., TORSVIK, V., et ENGER, . (2001). « Influence of long-term heavy-metal contamination on microbial communities in soil ». *Soil Biology and Biochemistry*, vol. 33, p. 287–295.
- SCHORER, M. et EISELE, M. (1997). « Accumulation of inorganic and organic pollutants by biofilms in the aquatic environment ». *Water Air and Soil Pollution*, vol. 99, p. 651–659.
- SCHWEICH, D. et SARDIN, M. (1988). « IMPACT User Guide v. 1.0 ».
- SCIMAT (2003). « Two images of *Pseudomonas putida* by scanning electron microscopy ». <http://anka.livstek.lth.se/>.
- SIDHU, A., RANDHAWA, N., et SINHA, M. (1977). « Adsorption and desorption of zinc in different soils ». *Soil Science*, vol. 124, n°4, p. 211–218.
- SIGG, L., BEHRA, P., et STUMM, W. (2000). *Chimie des milieux aquatiques*. Dunod, 3ème édition.
- SILVER, S. (1996). « Bacterial resistances to toxic metal ions - a review ». *Gene*, vol. 179, p. 9–19.
- SMOLDERS, E., MCCLAUGHLIN, M. J., MCGRATH, S. P., VAN GESTEL, C. A. M., LOCK, K., JANSSEN, C. R., ZHAO, F.-J., et DEGRYSE, F. (2001). « Reaction rate of zinc in soils : state of the art and implication for effects assessment ». review prepared for the international zinc association-europe.
- SOKOLOV, I., SMITH, D., HENDERSON, G., GORBY, Y., et FERRIS, F. (2001). « Cell surface electrochemical heterogeneity of the Fe(III)-Reducing bacteria *Shewanella putrefaciens* ». *Environmental Science and Technology*, vol. 35, p. 341–347.
- SPOSITO, G. (1984). *The surface chemistry of soils*. Oxford University Press.
- SPOSITO, G. (1989). *The chemistry of soils*. Oxford University Press.

- STOODLEY, P., BOYLE, J., DEBEER, D., et LAPPIN-SCOTT, H. (1999). « Evolving perspectives of biofilm structure ». *Biofouling*, vol. 14, n°1, p. 75–90.
- STRATHMANN, M., WINGENDEER, J., et FLEMMING, H.-C. (2001). « Examination of extracellular polymeric substances in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms using lectin assays ». VAAM annual meeting.
- STREVETT, K. A. et CHEN, G. (2003). « Microbial surface thermodynamics and applications ». *Research in Microbiology*, vol. 154, p. 329–335.
- STUMM, W. (1992). *Chemistry of the solid-water interface - Processes at the mineral-water and particle-water interface in natural systems*. John Wiley and Sons Inc.
- STUMM, W. (1993). « Aquatic colloids as chemical reactants : surface structure and reactivity ». *Colloids and Surfaces A - Physicochemical and Engineering Aspects*, vol. 73, p. 1–18.
- SUN, N., SUN, N.-Z., ELIMELECH, M., et RYAN, J. N. (2001). « Sensitivity analysis and parameter identifiability for colloid transport in geochemically heterogeneous porous media ». *Water Resources Research*, vol. 37, n°2, p. 209–222.
- SUTHERLAND, I. (1982). « Biosynthesis of microbial exopolysaccharides ». *Advances in Microbial Physiology*, p. 80–150.
- SUTHERLAND, I. W. (1998). « Novel and established applications of microbial polysaccharides ». *Tibtech Reviews*, vol. 16, p. 41–46.
- SUTHERLAND, I. W. (2001). « The biofilm matrix - an immobilized but dynamic microbial environment ». *Trends in Microbiology*, vol. 9, n°5, p. 222–228.
- SUTHERLAND, R. (2000). « Depth variation in copper, lead and zinc concentrations and mass enrichment ratios in soils of an urban watershed ». *Journal of Environmental Quality*, vol. 29, n°5, p. 1414–1422.
- TESSIER, D. (1999). « La capacité d'échange et son importance pour la gestion actuelle des sols ». *Comptes rendus de l'Académie d'Agriculture de France*, vol. 85, n°2.
- THILL, A., LAMBERT, S., MOUSTIER, S., GINESTET, P., AUDIC, J., et BOTTERO, J. (2000). « Structural interpretations of static light scattering patterns of fractal aggregates ». *Journal of Colloid and Interface Science*, vol. 228, p. 386–392.
- THILL, A., MOUSTIER, S., AZIZ, J., WIESNER, M., et BOTTERO, J. (2001). « Flocs restructuring during aggregation : experimental evidence and numerical simulation ». *Journal of Colloid and Interface Science*, vol. 243, p. 171–182.

- THILL, A., VEERAPANENI, S., SIMON, B., WIESNER, M., BOTTERO, J., et SNIDARO, D. (1998). « Determination of structure of aggregates by confocal scanning laser microscopy ». *Journal of Colloid and Interface Science*, vol. 204, p. 357–362.
- THILL, A., WAGNER, M., et BOTTERO, J. (1999). « Confocal Scanning Laser Microscopy as a Tool for the Determination of 3D Floc Structure ». *Journal of Colloid and Interface Science*, vol. 220, p. 465–467.
- TODAR, K. (2004). « Textbook of Bacteriology ». [www.textbookofbacteriology.net](http://www.textbookofbacteriology.net).
- TOURET, C. et VESTIER, D. (1970). « Propriétés électrocinétiques des argiles Applications ». Dans *Propriétés des petites particules*, p. 205–209.
- TSEZOS, M. (1985). « The selective extraction of metals from solution by micro-organisms. A brief overview ». *Canadian Metallurgical Quarterly*, vol. 24, n°2, p. 141–144.
- TSEZOS, M. et REMOUDAKI, E. (1997). « Recent advances in the mechanistic understanding of metal mobility and interaction with microbial biomass ».
- TUFENKJI, N., REDMAN, J. A., et ELIMELECH, M. (2003). « Interpreting deposition patterns of microbial particles in laboratory-scale column experiments ». *Environmental Science and Technology*, vol. 37, p. 616–623.
- VAN DER LEE, J. (1997). « Modélisation du comportement géochimique et du transport des radionucléides en présence de colloïdes ». Thèse de doctorat, Ecole des Mines, Paris.
- VAN DER LEE, J., DE MARSILY, G., et LEDOUX, E. (1993). « Are colloids important for transport rate assesment of radionuclides? a microscopic modeling approach ». *High Level Radioactive waste management*, p. 646–652.
- VAN DER LELIE, D. et TIBAZARWA, C. (2001). « Bacteria ». Dans *Metals in the environment*, p. 1–36. M.N.V. Prasad Editeur.
- VAN DER MEI, H. A. W. et BUSSCHER, H. (1987). « Physico-chemical surface characteristics and adhesive properties of *Streptococcus salivarius* strains with defined cell surface structures ». *FEMS Microbiology Letters*, vol. 40, p. 15–19.
- VAN DER WAL, A., NORDE, W., ZEHNDER, A. J., et LYKLEMA, J. (1997). « Determination of the total charge in the cell walls of Gram-positive bacteria ». *Colloids and Surfaces B : Biointerfaces*, vol. 9, p. 81–100.
- VAN ELSAS, J. et HEIJNEN, C. (1990). « Methods for the introduction of bacteria into soils : a review ». *Biology and Fertility of Soils*, vol. 10, p. 127–133.

- VAN ELSAS, J. D., TREVORS, J. T., et WELLINGTON, E. M. (1997). *Modern soil microbiology*. Marcel Dekker.
- VAN LOOSDRECHT, M. C. M., LYKLEMA, J., NORDE, W., SCHRAA, G., et ZEHNDER, A. J. B. (1987). « Electrophoretic mobility and hydrophobicity as a measure to predict the initial steps of bacterial adhesion ». *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 53, n°8, p. 1898–1901.
- VAN LOOSDRECHT, M. C. M., LYKLEMA, J., NORDE, W., et ZEHNDER, A. J. B. (1990). « Influence of interfaces on microbial activity ». *Microbiological Reviews*, vol. 54, n°1, p. 75–87.
- VANDENHOVE, H., MERCKX, R., WILMOTS, H., et VLASSAK, K. (1991). « Survival of *Pseudomonas fluorescens* inocula of different physiological stages in soil ». *Soil Biology and Biochemistry*, vol. 23, n°12, p. 1133–1142.
- VANDEVIVERE, P. et BAVEYE, P. (1992). « Sampling method for the observation of microorganisms in unconsolidated porous media via scanning electrons microscopy ». *Soil Science*, vol. 153, n°6, p. 482–485.
- VILAIN, S., COSETTE, P., HUBERT, M., LANGE, C., JUNTER, G.-A., et JOUENNE, T. (2004). « Comparative proteomic analysis of planktonic and immobilized *Pseudomonas aeruginosa* cells : a multivariate statistical approach ». *Analytical Biochemistry*, vol. 329, n°120-130.
- VULAVA, V., KRETZSCHMAR, R., BARMETTLER, K., VOEGELIN, A., GROLIMUND, D., et BORKOVEC, M. (2002). « Cation competition in a natural subsurface material : Prediction of transport behavior ». *Water Resources Research*, vol. 38.
- VULAVA, V., KRETZSCHMAR, R., et RUSCH, U. (2000). « Cation competition in a natural subsurface material : modeling of sorption equilibria ». *Environmental Science and Technology*, vol. 34, n°11, p. 2149–2155.
- WALTER, C. et STADELMANN, F. (1979). « Influence du zinc et du cadmium sur les microorganismes ainsi que sur quelques processus biochimiques du sol ». *Schweiz Landw Forschung*, vol. 18, p. 311–324.
- WAN, J. et TOKUNAGA, T. (1997). « Film straining of colloids in unsaturated porous media : Conceptual model and experimental testing ». *Environmental Science and Technology*, vol. 31, n°8, p. 2413–2420.
- WIELAND, E., TITS, J., et BRADBURY, M. (2004). « The potential effect of cementitious colloids on radionuclide mobilisation in a repository for radioactive waste ». *Applied geochemistry*, vol. 19, p. 119–135.
- WIGHTMAN, P. G., FEIN, J. B., WESOLOWSKI, D. J., PHELPS, T. J., BENEZETH, P., et PALMER, D. A. (2001). « Measurement of bacterial surface protonation constants for two species at elevated temperatures ». *Geochimica et Cosmochimica Acta*, vol. 65, n°21, p. 3657–3669.
- WIGINGTON JR., P., RANDALL, C., et GRIZZARD, T. (1983). « Accumulation of selected trace metals in soils of urban runoff detention basins ». *Water Resources Bulletin*, vol. 19, n°5, p. 709–718.

- WINIARSKI, T., DELOLME, C., BEDELL, J.-P., GHIDINI, M., et PERRODIN, Y. (2001). « Distribution spatiale des paramètres physico-chimiques et biologiques le long d'un profil de sol d'un bassin d'infiltration d'eaux pluviales de la ville de Lyon ». Dans *NOVATECH, 4th international conference on innovative technologies in the domain of urban storm water drainage*, volume 2, p. 751–758.
- WUERTZ, S., SPAETH, R., HINDERBERGER, A., GRIEBE, T., FLEMMING, H.-C., et WILDERER, P. (2001). « A new method for extraction of extracellular polymeric substances from biofilms and activated sludge suitable for direct quantification of sorbed metals ». *Water Science and Technology*, vol. 43, n°6, p. 25–31.
- XUE, H.-B., STUMM, W., et SIGG, L. (1988). « The binding of heavy metals to algal surfaces ». *Water Research*, vol. 22, p. 917–926.
- YEE, N. et FEIN, J. B. (2002). « Does metal adsorption onto bacterial surfaces inhibit or enhance aqueous metal transport? Column and batch reactor experiments on Cd-*Bacillus subtilis*-quartz systems ». *Chemical Geology*, vol. 185, p. 303–319.
- YONG, R., MOHAMED, A., et WARKENTIN, B. (1992). *Principles of contaminant transport in soils*. Elsevier.
- ZHANG, T. et FANG, H. (2001). « Quantification of extracellular polymeric substances in biofilms by confocal laser scanning microscopy ». *Biotechnology Letters*, vol. 23, p. 405–409.
- ZHANG, X., BISHOP, P. L., et KUPFERLE, M. J. (1998). « Measurement of polysaccharides and proteins in biofilm extracellular polymers ». *Water Science and Technology*, vol. 37, n°4-5, p. 345–348.
- ZHUANG, J. et JIN, Y. (2003). « Virus retention and transport through Al-oxide coated sand columns : effects of ionic strength and composition ». *Journal of Contaminant Hydrology*, vol. 60, p. 193–209.



# Table des matières

<b>1</b>	<b>Contexte de l'étude et définition du sujet</b>	<b>3</b>
1.1	Bassins d'infiltration d'eaux pluviales . . . . .	3
1.1.1	Présentation . . . . .	3
1.1.2	Gestion et problématiques . . . . .	4
	a) Qualité des eaux infiltrées . . . . .	4
	b) Colmatage des bassins . . . . .	6
	c) Impact sur le milieu . . . . .	7
1.1.3	L'OTHU . . . . .	8
1.1.4	Les besoins en recherche . . . . .	8
1.2	Le transport colloïdal . . . . .	9
1.2.1	Brève définition . . . . .	9
1.2.2	Mise en évidence . . . . .	10
1.2.3	Besoins en recherche . . . . .	10
1.3	Définition du sujet de recherche . . . . .	14
1.3.1	Cadre général . . . . .	14
1.3.2	Choix stratégiques et contraintes matérielles . . . . .	14
1.3.3	Définition des objectifs et priorités . . . . .	14
1.3.4	Originalité . . . . .	14
	a) Le support . . . . .	14
	b) Les colloïdes . . . . .	15
	c) La méthodologie . . . . .	15
1.4	Présentation du mémoire . . . . .	16
1.4.1	Revue de la littérature . . . . .	16
1.4.2	Matériel et méthodes . . . . .	16
1.4.3	Résultats et discussion . . . . .	16
<b>2</b>	<b>Revue de la littérature</b>	<b>17</b>
2.1	Biofilm . . . . .	17
2.1.1	Définition . . . . .	17
	a) Principales caractéristiques . . . . .	17
	b) Formation et croissance . . . . .	18
	c) Composition : Les polymères extracellulaires . . . . .	22
2.1.2	Stabilité des biofilms . . . . .	24

a)	Déstabilisation et réversibilité de l'attachement . . . . .	24
b)	Force ionique et valence des cations . . . . .	24
2.2	Propriétés des surfaces . . . . .	29
2.2.1	Charge de surface et potentiel Zêta . . . . .	29
a)	Définitions . . . . .	29
b)	Facteurs modifiant la charge . . . . .	31
2.2.2	Hydrophobie . . . . .	32
a)	Définition . . . . .	32
b)	Méthodes d'évaluation . . . . .	32
c)	Valeurs et facteurs de variabilité . . . . .	32
2.2.3	Structure des surfaces bactériennes . . . . .	33
2.2.4	Déprotonation des groupes fonctionnels . . . . .	35
2.2.5	Géométrie des cellules bactériennes . . . . .	36
a)	Géométrie . . . . .	36
b)	Dimension fractale . . . . .	36
2.3	Transport des colloïdes (dont les bactéries) . . . . .	39
2.3.1	Définition : les colloïdes . . . . .	39
2.3.2	Mise en évidence du transport colloïdal . . . . .	40
a)	Le transport des métaux dans les milieux poreux . . . . .	40
b)	Rôle des colloïdes . . . . .	40
2.3.3	Paramètres modifiant le transport des colloïdes . . . . .	41
2.4	Métaux et microorganismes : rétention et transport . . . . .	42
2.4.1	Mise en évidence . . . . .	42
2.4.2	Mécanismes . . . . .	42
2.4.3	Localisation . . . . .	42
2.4.4	Facteurs . . . . .	43
2.4.5	Modélisation . . . . .	43
a)	Rétention des métaux . . . . .	43
b)	Transport des contaminants associé aux colloïdes . . . . .	44
2.5	Synthèse de la revue de la littérature . . . . .	44
<b>3</b>	<b>Matériel et méthodes</b> . . . . .	<b>45</b>
3.1	Plan expérimental . . . . .	45
3.2	Matériel . . . . .	48
3.2.1	Les colloïdes bactériens . . . . .	48
a)	<i>Pseudomonas putida</i> . . . . .	48
b)	Principales caractéristiques . . . . .	48
3.2.2	Le métal : le zinc . . . . .	49
a)	Les métaux lourds dans les eaux de ruissellement . . . . .	49
b)	Origine du zinc . . . . .	49
c)	Caractéristiques du zinc . . . . .	49
3.2.3	Milieu poreux : le sable de Loire . . . . .	50
3.2.4	Colonnes . . . . .	51
a)	Caractéristiques physiques des colonnes . . . . .	51

---

b)	Traçages de l'écoulement . . . . .	52
3.2.5	Réactifs . . . . .	55
a)	Solution de lavage . . . . .	55
b)	Solution de traçage . . . . .	55
c)	Solutions métalliques . . . . .	55
d)	Solutions salines . . . . .	55
3.3	Méthodes . . . . .	56
3.3.1	Protocoles classiques . . . . .	56
a)	Culture et conservation des bactéries . . . . .	56
b)	Préparation des échantillons bactériens . . . . .	56
c)	Stérilisation . . . . .	56
d)	Dénombrement . . . . .	57
e)	Pesée des bactéries . . . . .	57
f)	Teneur en eau . . . . .	57
g)	Minéralisation des échantillons . . . . .	57
3.3.2	Principaux protocoles . . . . .	58
a)	Hydrophobie . . . . .	58
b)	Potentiel Zêta . . . . .	58
c)	Développement du biofilm . . . . .	58
d)	Déstabilisation du biofilm . . . . .	58
e)	Essais en batchs . . . . .	59
f)	Titrations de surface . . . . .	59
3.3.3	Expériences complémentaires . . . . .	61
a)	Microscopie électronique . . . . .	61
b)	Granulométrie et dimension fractale . . . . .	61
3.4	Analyses . . . . .	62
3.4.1	pH et conductivité . . . . .	62
3.4.2	Absorption atomique . . . . .	62
3.4.3	Chromatographie ionique . . . . .	62
3.4.4	ICP-AES . . . . .	63
3.5	Analyse et modélisation des données : présentation des outils	63
3.5.1	MIM . . . . .	63
3.5.2	GRFIT . . . . .	64
3.5.3	IMPACT . . . . .	65
<b>4</b>	<b>Résultats</b>	<b>67</b>
4.1	Caractérisation de la réactivité des surfaces . . . . .	67
4.1.1	Caractéristiques et description des échantillons . . . . .	67
4.1.1.1	Caractéristiques morphologiques . . . . .	67
4.1.1.2	Croissance . . . . .	69
4.1.1.3	Description du biofilm . . . . .	70
4.1.1.4	Taille et structure des agrégats . . . . .	72
a)	Observations au MEB . . . . .	72
b)	Détermination de la dimension fractale . . . . .	74

4.1.2	Réactivité des surfaces . . . . .	76
4.1.2.1	Hydrophobie . . . . .	76
4.1.2.2	Charge de surface . . . . .	77
4.1.2.3	Capacité d'échange de protons . . . . .	77
4.1.2.4	Remarques et résultats préliminaires . . . . .	77
a)	Analyse des courbes de titration . . . . .	78
b)	Influence de la température . . . . .	78
c)	Répliquabilité . . . . .	79
d)	Réversibilité . . . . .	80
e)	Réactivité du sable . . . . .	81
4.1.2.5	Résultats et modélisation . . . . .	82
a)	Rappel : modèle utilisé . . . . .	82
b)	Optimisation des constantes sous GRFIT . . . . .	82
c)	Résultats . . . . .	83
d)	Interprétation . . . . .	88
4.1.3	Capacité d'adsorption du zinc . . . . .	90
a)	Remarques et résultats préliminaires . . . . .	90
b)	Isotherme d'adsorption du zinc . . . . .	90
c)	Modélisation - Analyse des isothermes . . . . .	92
4.2	Stabilité du biofilm . . . . .	100
4.2.1	Rapide présentation des scénarios . . . . .	100
a)	Chocs de force ionique . . . . .	100
b)	Double destabilisation . . . . .	101
c)	Rôle du calcium . . . . .	101
4.2.2	Les différences forces ioniques . . . . .	102
4.2.3	La "double destabilisation" . . . . .	104
4.2.4	Stabilisation du biofilm . . . . .	105
4.2.5	Échange cationique et définition d'un scénario type . . . . .	105
a)	Description du scénario . . . . .	105
b)	Modélisation . . . . .	106
4.3	Transport facilité du zinc . . . . .	110
4.3.1	Analyses MET . . . . .	110
4.3.2	Analyses du sable . . . . .	110
4.3.3	Modélisation . . . . .	112
a)	Evaluation du zinc transporté . . . . .	112
b)	Influence des paramètres de l'ajustement . . . . .	112
4.3.4	Conclusions . . . . .	114
4.4	Synthèse et discussion . . . . .	114
4.4.1	Réflexion méthodologique . . . . .	114
a)	Evaluation de la quantité de matière . . . . .	114
b)	Les titrations de surface . . . . .	115
c)	Granulométrie laser . . . . .	115
d)	Essais d'adsorption en batchs . . . . .	116
e)	Colonnes de sable . . . . .	116

---

f) Microscopie . . . . .	116
g) Outils de modélisation . . . . .	117
h) Réactivité du milieu poreux . . . . .	117
i) Maturation du biofilm . . . . .	117
4.4.2 Biofilm et culture : similitudes et différences . . . . .	117
4.4.3 Rôle des cations divalents et de la force ionique . . . . .	120
4.4.4 Transport facilité du zinc . . . . .	122
<b>5 Conclusions</b>	<b>125</b>
5.1 Principaux résultats obtenus . . . . .	125
5.2 Originalité et contribution scientifique . . . . .	126
5.3 Perspectives et développement futurs . . . . .	127
<b>A Compléments théoriques</b>	<b>131</b>
A.1 Définition des grandeurs physiques utilisées . . . . .	131
A.2 Détermination de la dimension fractale . . . . .	131
A.3 Espèces solubles et minérales du zinc . . . . .	132
A.4 Constantes des composés en phase aqueuse . . . . .	133
<b>B Protocoles expérimentaux détaillés</b>	<b>137</b>
B.1 Composition du milieu nutritif . . . . .	137
B.1.1 Principe de composition . . . . .	137
B.1.2 Produits utilisés . . . . .	137
B.1.3 Protocole . . . . .	137
B.2 Composition des autres solutions . . . . .	137
B.3 Préparation du sable . . . . .	139
B.4 Présentation de la colonne utilisée . . . . .	139
B.5 Méthode de Lowry pour le dosage des protéines . . . . .	139
B.5.1 Principe . . . . .	139
B.5.2 Réactifs utilisés . . . . .	140
B.5.3 Échantillons dosés . . . . .	140
B.5.4 Protocole suivi . . . . .	140
B.6 Dénombrement sur boîtes de Pétri . . . . .	141
B.6.1 Matériel nécessaire . . . . .	141
B.6.2 Protocole suivi . . . . .	141
B.7 Mise en place du biofilm . . . . .	141
B.8 Destruction de la colonne et analyse de l'état final . . . . .	141
B.9 Mesure de l'hydrophobie . . . . .	142
B.9.1 Matériel nécessaire . . . . .	142
B.9.2 Protocole suivi . . . . .	142
B.9.3 Expression des résultats . . . . .	142
B.10 Préparation des échantillons pour la microscopie électronique	142
B.10.1 Réactifs nécessaires . . . . .	142
B.10.2 Protocole suivi . . . . .	143

B.11	Titration de surface . . . . .	143
B.11.1	Matériel . . . . .	143
B.11.2	Solutions utilisées . . . . .	143
B.11.3	Protocole suivi . . . . .	143
B.12	Analyse des pics : méthode employée . . . . .	144
<b>C</b>	<b>Résultats complémentaires et détaillés</b>	<b>145</b>
C.1	Microscopie Électronique à Balayage . . . . .	145
C.1.1	Culture de <i>Pseudomonas putida</i> . . . . .	145
C.1.2	Sable colonisé . . . . .	147
C.1.3	Biofilm décroché naturellement . . . . .	150
C.1.4	Biofilm décroché lors du changement de force ionique	153
C.2	Microscopie Électronique à Transmission . . . . .	156
C.3	Analyses en granulométrie laser des échantillons bactériens	159
C.4	Courbes de titration de surface complémentaires . . . . .	160
C.5	Modélisation des courbes de titration de surface . . . . .	162
C.6	Essais en batchs d'adsorption du zinc . . . . .	164
C.7	Courbes d'éluion et profils . . . . .	166
C.8	Bilan de masse . . . . .	178
C.8.1	Evaluation des bilan de masse . . . . .	178
C.8.2	Exemple . . . . .	178
C.8.3	Résultats . . . . .	178
C.9	Modélisation des courbes d'éluion avec IMPACT . . . . .	180
C.9.1	Principe . . . . .	180
C.9.2	Fichiers utilisés . . . . .	181
a)	Fichier de données . . . . .	181
b)	extrait du fichier espe.dat . . . . .	185
c)	extrait du fichier reac.dat . . . . .	186
d)	extrait du fichier syst.dat . . . . .	187
C.9.3	Influence des différents paramètres . . . . .	188
	<b>Bibliographie</b>	<b>195</b>

# Table des figures

1.1	Bassin d'infiltration d'eaux pluviales de l'Est Lyonnais . . .	4
1.2	Vue de dessus du sol d'un bassin colmaté . . . . .	6
1.3	Illustration du rôle présumé des colloïdes dans un aquifère .	9
2.1	Cycle de formation d'un biofilm . . . . .	18
2.2	Étapes de colonisation des surfaces par des microorganismes	20
2.3	Biofilm développé dans une canalisation d'eau potable . . .	23
2.4	Représentation des énergies d'interaction . . . . .	27
2.5	Charge de surface d'une particule . . . . .	31
2.6	Structure des bactéries à Gram positif et négatif . . . . .	34
2.7	Transport et rétention des polluants en présence de colloïdes	41
3.1	Plan expérimental . . . . .	46
3.2	Plan expérimental : détail de la partie caractérisation . . . .	47
3.3	Courbe granulométrique du sable de Loire . . . . .	51
3.4	Dispositif expérimental . . . . .	53
3.5	Traçage aux ions Br : courbe d'élution du traceur . . . . .	54
3.6	Dispositif expérimental pendant la phase d'inoculation . . .	59
3.7	Dispositif expérimental pendant la phase de croissance . . .	60
3.8	Dispositif expérimental pour les titrations de surface . . . .	60
3.9	Utilisation des outils de modélisation . . . . .	64
4.1	Observation d'échantillons bactériens au MEB . . . . .	68
4.2	Evolution de la concentration bactérienne . . . . .	70
4.3	Teneurs en eau et en protéines d'une colonne . . . . .	71
4.4	Sable colonisé observé au MEB . . . . .	72
4.5	Observation au MEB - Grossissement 6000 . . . . .	73
4.6	Biofilm observé au MEB . . . . .	73
4.7	Observations au MEB de fragments de biofilm . . . . .	74
4.8	Distribution granulométrique des particules . . . . .	75
4.9	Potentiel Zêta des bactéries sous les deux formes étudiées .	78
4.10	Titrations en milieux différents . . . . .	80
4.11	Réversibilité des titrations . . . . .	81
4.12	Titrations biofilm et culture . . . . .	83

4.13	Modélisation d'une titration de culture bactérienne . . . . .	84
4.14	Modélisation d'une titration de fragments de biofilm . . . . .	84
4.15	Comparaison des valeurs pK . . . . .	85
4.16	Densité de sites à la surface des bactéries . . . . .	86
4.17	Densité de sites à la surface des bactéries . . . . .	87
4.18	Cinétique de l'adsorption du zinc par <i>Pseudomonas putida</i> . . . . .	91
4.19	Isotherme d'adsorption du zinc par <i>Pseudomonas putida</i> . . . . .	91
4.20	Isotherme d'adsorption du zinc par <i>Pseudomonas putida</i> . . . . .	93
4.21	Adsorption du zinc : ajustement de la courbe d'adsorption . . . . .	95
4.22	Adsorption du zinc : sensibilité de l'ajustement . . . . .	96
4.23	Adsorption du zinc : sensibilité de l'ajustement . . . . .	96
4.24	Adsorption du zinc : sensibilité de l'ajustement . . . . .	97
4.25	Les scénarios de déstabilisation . . . . .	101
4.26	Teneur en protéines de l'effluent . . . . .	102
4.27	Fraction de biofilm décroché . . . . .	103
4.28	Comparaison des différentes forces ioniques . . . . .	104
4.29	Teneur en protéines lors de la double déstabilisation . . . . .	105
4.30	Teneur en protéines de l'effluent lors de l'utilisation de calcium . . . . .	106
4.31	Teneur en protéines, zinc, sodium et calcium dans l'effluent . . . . .	107
4.32	Teneur en sodium et calcium dans l'effluent . . . . .	109
4.33	Cellules bactériennes observées au MET . . . . .	110
4.34	Evolution de la teneur en zinc dans la colonne de sable . . . . .	111
4.35	Courbes d'élution expérimentales et modélisées . . . . .	113
4.36	Synthèse des caractéristiques . . . . .	118
4.37	Interactions entre les EPS . . . . .	121
4.38	Conditions au transport facilité . . . . .	123
A.1	Spéciation du zinc . . . . .	135
B.1	Vue explosée de la colonne . . . . .	139
B.2	Exemple de courbe de calibration de la méthode de Lowry . . . . .	140
B.3	Paramètres caractéristiques des pics de déstabilisation . . . . .	144
C.1	Cellules de <i>Pseudomonas putida</i> - Grossissements 5000 et 6000 . . . . .	145
C.2	Cellules de <i>Pseudomonas putida</i> - Grossissements 6000 et 12000 . . . . .	146
C.3	Cellules de <i>Pseudomonas putida</i> - Grossissements 17000 et 20000 . . . . .	146
C.4	Sable colonisé - Grossissement 150 . . . . .	147
C.5	Sable colonisé - Grossissements 100 et 500 . . . . .	147
C.6	Sable colonisé - Grossissements 3000 et 4000 . . . . .	148
C.7	Sable colonisé - Grossissements 5000 et 6000 . . . . .	148
C.8	Sable colonisé - Grossissements 8000 et 10000 . . . . .	149
C.9	Sable colonisé - Grossissement 10000 . . . . .	149
C.10	Fragments de biofilm - Grossissements 100 et 500 . . . . .	150
C.11	Fragments de biofilm - Grossissements 7000 et 20000 . . . . .	150

---

C.12	Fragments de biofilm - Grossissement 25000 . . . . .	151
C.13	Fragments de biofilm - Grossissement 35000 . . . . .	151
C.14	Fragments de biofilm - Grossissements 30000 et 40000 . . . . .	152
C.15	Fragments de biofilm - Grossissements 400 et 100 . . . . .	153
C.16	Fragments de biofilm - Grossissements 2000 et 6000 . . . . .	153
C.17	Fragments de biofilm - Grossissement 7000 . . . . .	154
C.18	Fragments de biofilm - Grossissement 10000 . . . . .	154
C.19	Fragments de biofilm - Grossissements 15000 et 17000 . . . . .	155
C.20	Fragments de biofilm - Grossissement 25000 . . . . .	155
C.21	Biofilm - Grossissement 17000 . . . . .	156
C.22	Biofilm - Grossissements 20000 et 34000 . . . . .	156
C.23	Biofilm - Grossissements 45000 et 60000 . . . . .	157
C.24	Biofilm - Grossissement 60000 . . . . .	157
C.25	Cellules de <i>Pseudomonas putida</i> - Grossissements 17000 et 34000	158
C.26	Cellules de <i>Pseudomonas putida</i> - Grossissements 45000 et 60000	158
C.27	Distribution granulométrique des cellules en culture . . . . .	159
C.28	Distribution granulométrique des échantillons de biofilm . . . . .	159
C.29	Titration de 5 g de sable . . . . .	160
C.30	Résultats avant traitement de plusieurs titrations de biofilm	161
C.31	Titrations de cellules planctoniques . . . . .	161
C.32	Modélisation d'une titration de culture bactérienne . . . . .	162
C.33	Modélisation d'une titration de culture bactérienne . . . . .	162
C.34	Modélisation d'une titration de biofilm . . . . .	163
C.35	Modélisation d'une titration de biofilm . . . . .	163
C.36	cinétique d'adsorption du zinc . . . . .	164
C.37	Isotherme d'adsorption du zinc . . . . .	164
C.38	Isotherme d'adsorption du zinc . . . . .	165
C.39	Isotherme d'adsorption du zinc . . . . .	165
C.40	Influence de la constante d'équilibre entre zinc et calcium . . . . .	189
C.41	Influence de la constante d'équilibre entre zinc et calcium . . . . .	189
C.42	Influence de la constante d'équilibre entre sodium et calcium	190
C.43	Influence de la constante d'équilibre entre sodium et calcium	190
C.44	Influence du nombre de cellules, J . . . . .	191
C.45	Influence du nombre de cellules, J . . . . .	191
C.46	Influence de la réactivité initiale du milieu . . . . .	192
C.47	Influence de la réactivité initiale du milieu . . . . .	192
C.48	Influence de la distribution de la capacité d'échange . . . . .	193
C.49	Influence de la distribution de la capacité d'échange . . . . .	193



# Liste des tableaux

1.1 Métaux dans les eaux de ruissellement . . . . .	5
1.2 Métaux dans le sol d'une zone d'infiltration . . . . .	7
1.3 Etudes expérimentales sur le transport facilité . . . . .	11
1.4 Etudes sur le transport des particules . . . . .	12
1.5 Exemples de modèles liés au transport colloïdal . . . . .	13
2.1 Exemples d'études menées sur les propriétés de surface . . .	30
2.2 Hydrophobie de cellules bactériennes . . . . .	33
2.3 Constantes des réactions de déprotonation . . . . .	37
2.4 Géométrie des cellules et surface spécifique . . . . .	38
3.1 <i>Pseudomonas putida</i> au microscope et sur boîte de Pétri . . . .	48
3.2 Caractéristiques physiques moyennes des colonnes de sable	52
3.3 Caractéristiques de l'écoulement à partir de trois traçages . .	54
3.4 Conditions de réalisation des essais en batchs à l'équilibre . .	59
4.1 Caractéristiques morphologiques de <i>Pseudomonas putida</i> . . .	69
4.2 Constantes de déprotonation obtenues . . . . .	85
4.3 Les sites d'échanges protoniques des bactéries . . . . .	88
4.4 Composition des EPS (Flemming, 1993) . . . . .	89
4.5 Constantes de complexation du zinc . . . . .	99
4.6 Constantes de complexation d'autres métaux . . . . .	99
4.7 Paramètres utilisés dans IMPACT . . . . .	108
A.1 Constantes d'acidité des amines et acides carboxyliques . . .	134
B.1 Composition des solutions . . . . .	138
C.1 Caractéristiques de la colonne 1 . . . . .	167
C.2 Caractéristiques de la colonne 2 . . . . .	168
C.3 Caractéristiques de la colonne 3 . . . . .	169
C.4 Caractéristiques de la colonne 4 . . . . .	170
C.5 Caractéristiques de la colonne 5 . . . . .	171
C.6 Caractéristiques de la colonne 6 . . . . .	172
C.7 Caractéristiques de la colonne 7 . . . . .	173

C.8	Caractéristiques de la colonne 8 . . . . .	174
C.9	Caractéristiques de la colonne 9 . . . . .	175
C.10	Caractéristiques de la colonne 10 . . . . .	176
C.11	Caractéristiques de la colonne 11 . . . . .	177
C.12	Bilan de masse pour les essais en colonnes . . . . .	179
C.13	Paramètres utilisés dans IMPACT . . . . .	188



---

## Résumé — Caractérisation du transport colloïdal du zinc en milieu sableux

---

Cette étude se situe au carrefour d'une problématique opérationnelle de gestion des sols de bassins d'infiltration d'eaux pluviales et d'une thématique plus théorique sur le transport colloïdal. En effet, malgré la mise en évidence du rôle parfois prédominant des colloïdes dans le transport de polluants, les mécanismes considérés prennent encore peu en compte cette forme de transport et les conditions sous lesquelles il prédomine restent mal définies.

Dans ce cadre, l'objectif principal de ces travaux est la caractérisation du transport colloïdal d'un métal caractéristique des pollutions d'eaux pluviales urbaines, le zinc. Les colloïdes considérés sont des bactéries de l'espèce *Pseudomonas putida* qui sont présentes dans le milieu poreux sous forme de biofilm. Les essais ont été réalisés en colonnes de sable de Loire, non saturées en eau. Des expériences complémentaires en réacteurs fermés ont permis de mieux caractériser la réactivité des surfaces mises en jeu.

Les résultats permettent d'apporter des éléments de réponse à trois grandes questions qui sont en fait les conditions nécessaires pour qu'il y ait transport colloïdal : réactivité des colloïdes pour les polluants, mouvement des colloïdes, et transport associé.

Tout d'abord, les titrations de surface et les essais d'adsorption ont montré la grande réactivité des surfaces en particulier du biofilm. Ensuite la composition de la solution en contact avec le milieu poreux et sa force ionique influencent largement la stabilité du biofilm et donc la formation de colloïdes mobiles. Ainsi les conditions sont réunies pour observer le transport associé du zinc et des bactéries; celui-ci n'a pas été directement quantifié, mais observé par des méthodes indirectes. Il apparaît donc nécessaire aujourd'hui de tenir compte, sous certaines conditions, du transport facilité par les colloïdes bactériens dans les sols de bassins d'infiltration.

---

**Mots clés :** zinc ; transport colloïdal ; *Pseudomonas putida*; titrations de surface ; colonnes de sable

---

---

## Abstract — Characterization of colloidal transport of zinc in a sandy medium

---

This study deals both with the theoretical issue of colloidal transport and the more practical one of infiltration bassins management. Actually, even if many field studies have pointed out the main role played by colloids in pollutant transport, this phenomenon has not yet been fully studied and not taken into account in predictive transport models. The conditions under which it becomes predominant are not clearly assessed.

In this way, the main aim of this study is the characterization of zinc transport facilitated by bacterial colloids. Zinc is used as a model pollutant characteristic of urban waters pollution and colloids are *Pseudomonas putida* bacteria as a biofilm in porous media. Experiments have been carried out in non-saturated Loire sand columns. Extra batch experiments have been performed to investigate surface reactivity.

Results deal with the three main conditions to obtain colloidal transport : affinity between colloidal particles and pollutants, colloidal movement in the media, and facilitated transport of pollutants.

First, surface proton titrations and adsorption batches have shown the high affinity of the cell surfaces for zinc, particularly when cells are arranged as a biofilm. Thus, solution composition and ionic strength have significant influence on biofilm stability and consequently on mobile colloid formation. Hence required conditions are obtained to get facilitated transport of zinc by bacterial colloids; however facilitated zinc transport has not been directly quantified, but observed through indirect methods. It seems necessary to take into account, under certain conditions, facilitated bacterial transport of metals in infiltration bassins soils.

---

**Keywords :** zinc; colloidal transport; sandy columns; *Pseudomonas putida*; surface titrations

---