



HAL
open science

Analyse multi-échelle de la filtration sur microsieve de particules modèles inertes et biologiques : caractérisation in situ du dépôt par microscopie confocale

Ines Ben Hassan

► **To cite this version:**

Ines Ben Hassan. Analyse multi-échelle de la filtration sur microsieve de particules modèles inertes et biologiques : caractérisation in situ du dépôt par microscopie confocale. Génie des procédés. INSA de Toulouse, 2014. Français. NNT : 2014ISAT0009 . tel-01073549

HAL Id: tel-01073549

<https://theses.hal.science/tel-01073549>

Submitted on 10 Oct 2014

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.



REPUBLIQUE TUNISIENNE
MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT
SUPERIEUR DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE



Université
de Toulouse

THESE DE DOCTORAT

Discipline : Sciences Biologiques

Présentée par :

Ines BEN HASSAN

Le 15/04/14

Analyse multi-échelle de la filtration sur microsieve de particules modèles inertes et biologiques : Caractérisation *in situ* du dépôt par microscopie confocale

Jury

Slim TOUNSI, Professeur, CBS, Sfax, Tunisie	Président
Hafedh BELGHITH, Professeur, CBS, Sfax, Tunisie	Rapporteur
José TEIXEIRA, Professeur, Université de MINHO, Portugal	Rapporteur
Martine MIETTON PEUCHOT, Professeur, Université de Bordeaux, France	Rapporteur
Christine LAFFORGUE-BALDAS, Maitre de Conférences, INSA, Toulouse, France	Examineur

Directeurs de thèse :

Pr. Abdel Moneim AYADI, Professeur, ENIS, Sfax, Tunisie

Pr. Philippe SCHMITZ, Professeur, INSA, Toulouse, France

Année Universitaire 2013/2014



Université
de Toulouse

Thèse

En vue de l'obtention du

DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par :

Institut National des Sciences Appliquées de Toulouse (INSA Toulouse)

Discipline ou spécialité :

Génie des Procédés et de l'Environnement

Présentée et soutenue par :

Ines BEN HASSAN

Le 15 avril 2014

Titre :

**Analyse multi-échelle de la filtration sur microsieve de particules modèles
inertes et biologiques : Caractérisation *in situ* du dépôt par microscopie
confocale**

Jury :

Slim TOUNSI, Professeur, CBS, Sfax, Tunisie	Président
José TEIXEIRA, Professeur, Université de Minho, Portugal	Rapporteur
Hafedh BELGHITH, Professeur, CBS, Sfax, Tunisie	Rapporteur
Martine MIETTON PEUCHOT, Professeur, Université de Bordeaux, France	Rapporteur
Christine LAFFORGUE-BALDAS, Maître de Conférences, INSA, Toulouse, France	Examineur

Ecole doctorale :

Mécanique, Energétique, Génie civil et Procédés (MEGeP)

Unité de recherche :

Laboratoire D'ingénierie des Systèmes Biologiques et des Procédés

Directeurs de thèse :

Pr. Philippe SCHMITZ, Professeur, INSA, Toulouse, France
Pr. Abdel Moneim AYADI, Professeur, ENIS, Sfax, Tunisie

Rapporteurs :

Pr. José TEIXEIRA, Professeur, Université de MINHO, Portugal
Pr. Hafedh BELGHITH, Professeur, CBS, Sfax, Tunisie

*A mes parents que j'aime et qui m'ont donnée et me donnent toujours,
la force, le soutien et même un peu plus encore pour avancer dans la direction que je veux.
« On ne peut donner que deux choses à ses enfants : des racines et des ailes »
Merci de me les avoir donnés
A ma sœur Imène qui m'a montrée que l'impossible n'existe pas
A Noomen*

Remerciements

Ce travail de thèse n'aurait pu se concrétiser sans un ensemble d'aides très précieuses. C'est pourquoi, je voudrais remercier tous ceux qui ont contribué au bon déroulement de ce travail aussi bien par leur encadrement, leurs compétences que leur soutien.

J'ai eu le plaisir et la chance d'être accueillie à deux Laboratoires : le Laboratoire de Radio Analyses et Environnement (Enis, Sfax, Tunisie) et le Laboratoire d'Ingénierie des Systèmes Biologiques et des procédés (INSA, Toulouse, France). Je souhaite donc tout d'abord remercier, leurs directeurs respectifs, Kamel ZOUARI et Nic LINDLEY, pour la confiance qu'ils m'ont accordée en m'accueillant dans leurs laboratoires.

Durant cette thèse, j'ai eu le plaisir de travailler avec non pas un, mais trois encadrants. Je tiens à les remercier chaleureusement individuellement. Tous mes remerciements vont à Abdel Moneim AYADI pour son encadrement constant et consciencieux, pour ses conseils éclairés, sa patience et sa gentillesse, je lui suis infiniment reconnaissante. Je tiens à remercier également Philippe SCHMITZ. Sa disponibilité et son optimisme inébranlable m'ont permis d'avancer sereinement et de franchir les nombreux obstacles qu'ils soient administratifs, matériels ou scientifiques. J'ai pu grâce à vous être formée et découvrir une discipline loin de mon univers scientifique de départ. Je remercie chaleureusement Christine LAFFORGUE pour son enthousiasme, son admirable implication dans ce travail, sa gentillesse, ses conseils avisés et ses encouragements de tous les instants.

Je tiens à remercier les membres du jury, qui ont accepté d'évaluer ce travail de thèse.

Je remercie Christophe ELLERO pour l'enthousiasme et la créativité dont il a fait preuve pendant le suivi de ces travaux. Je te suis reconnaissante surtout pour ton optimisme inébranlable dans les périodes où tout allait et surtout dans les périodes où rien ne semblait marcher.

Monia ENNOURI : Je n'aurais jamais assez de mots dans cette thèse pour te remercier. Tu m'as tellement aidé, tant sur le point scientifique qu'humain.

Je souhaite également souligner nos discussions avec Paul DURU de l'Institut de Mécanique des Fluides de Toulouse. Je le remercie pour m'y avoir accueilli et pour son savoir-faire concernant les microsieves.

Mes pensées vont également à Aurélie LE RU et Cécile POUZET du FR3450, Centre INRA de Toulouse, Pôle de Biotechnologie Végétale, pour leurs aides inestimables lors de l'acquisition et du traitement des images confocales.

Les laboratoires dans leurs intégralités ainsi que les personnes croisées au cours de ces trois années ont contribué à ce que cette thèse se déroule dans des conditions idéales. Je tiens à remercier mes deux équipes ainsi que les membres de l'équipe « Systèmes Microbiens et Bioprocédés » qui m'ont accueilli comme une des leurs.

Une thèse, c'est bien plus qu'un diplôme, c'est une aventure et quelle aventure. Pour les très bons souvenirs que je garderai, je remercie les nombreuses personnes qui sont passées dans ma vie notamment mes collègues de bureau : les doctorants ! Merci Céline, Jillian, Julie B., Lannig et Sandra, bon courage à vous. Je n'oublierai pas non plus les stagiaires, Aurore, Catarina, Mégane et Miguel.

Table des matières

<i>Index des tableaux</i>	13
<i>Index des figures</i>	15
<i>Valorisation des travaux de thèse</i>	19
<i>Liste des abréviations</i>	21
<i>Liste des symboles</i>	23
<i>Introduction Générale</i>	25
Chapitre I. Revue Bibliographique.....	29
I.1 Applications des procédés membranaires.....	31
I.1.1 Traitement des eaux	31
I.1.2 Industries pharmaceutique et biotechnologiques	34
I.2 Synthèse des connaissances sur la séparation membranaire.....	35
I.2.1 Principe.....	35
I.2.2 Classification des procédés membranaires.....	36
I.2.3 Structure et composition chimique des modules membranaires	37
I.2.4 Mise en œuvre des membranes	38
I.2.5 Transfert de matière et limites du procédé	39
I.2.6 Colmatage lié au dépôt de particules.....	40
I.2.7 Paramètres influants sur la filtration des suspensions cellulaires	44
I.3 Approches numériques de la filtration membranaire et de la formation d'un dépôt. 45	
I.3.1 Ecoulement dans une paroi poreuse	45
I.3.2 Simulation de la formation d'un dépôt.....	45
I.3.3 Validation des modèles numériques.....	47
I.4 Techniques de caractérisation du dépôt.....	49
I.4.1 Méthodes non optiques.....	50
I.4.2 Méthodes optiques.....	52

I.5	Caractérisation du dépôt par microscopie de fluorescence	59
I.5.1	Principe de la fluorescence.....	59
I.5.2	Marquage des microorganismes.....	60
I.5.3	Microscopie à fluorescence	61
I.6	Contexte et enjeux scientifiques	70
Chapitre II.	Contexte de l'étude et conception du dispositif expérimental.....	73
II.1	Présentation du travail, objectifs et approche.....	75
II.2	Conception et fabrication de la chambre de filtration	75
II.3	Microsieves.....	77
Chapitre III.	Matériel et Méthodes	109
III.1	Particules modèles	111
III.2	Microorganismes modèles	112
III.2.1	Milieux de culture	112
III.2.2	Conservation des souches.....	113
III.2.3	Mise en œuvre de la culture des microorganismes	113
III.2.4	Techniques analytiques	114
III.2.5	Marquage des microorganismes.....	115
III.3	Caractérisation des suspensions modèles	118
III.3.1	Distribution de taille des suspensions	118
III.3.2	Propriétés de surface	119
III.4	Acquisition d'images	120
III.4.1	Microscopie optique.....	120
III.4.2	Microscopie à épifluorescence	120
III.4.3	Microscopie confocale	121
III.5	Préparation des suspensions pour les essais de filtration	123
III.6	Essais de filtration	124
III.6.1	Membranes	124

III.6.2	Module de filtration.....	126
III.6.3	Protocole expérimental.....	126
III.7	Acquisition et traitement d'images.....	131
III.7.1	Acquisition des images.....	131
III.7.2	Analyse quantitative des images	132
Chapitre IV.	: Etude préliminaire : Qualification de la chambre de filtration.....	135
	Présentation du travail, objectifs et approche.....	137
Chapitre V.	: Filtration des suspensions de particules inertes.....	151
	Présentation du travail, objectifs et approche.....	153
V.1	Caractérisation tridimensionnelle, <i>in situ</i> , des dépôts de particules inertes monodispersées.....	154
V.2	Caractérisation tridimensionnelle, « <i>in situ</i> », des dépôts de particules inertes bidispersées.....	173
	<i>In situ</i> 3D characterization of bidispersed spherical particle cakes using confocal laser scanning microscopy.....	175
Chapitre VI.	: Filtration de suspensions de microorganismes et évaluation de la pertinence de l'étude	203
VI.1	Filtration de suspensions de microorganismes	205
	Présentation du travail, objectifs et approche.....	205
VI.1.1	Caractérisation tridimensionnelle, <i>in situ</i> , de dépôts de microorganismes en suspensions pures.....	206
VI.1.2	Caractérisation du dépôt issu du mélange des deux microorganismes	235
VI.2	Evaluation de la pertinence de particules modèles inertes pour simuler des dépôts biologiques.....	240
VI.2.1	Comparaison globale du colmatage	242
VI.2.2	Analyse à l'échelle microscopique des caractéristiques des dépôts de filtration	244
	Conclusion du chapitre.....	253
	<i>Conclusion Générale et Perspectives</i>	255

<i>Références Bibliographiques</i>	261
<i>Annexes</i>	271
A. Caractérisation des suspensions modèles	273
A.1. Microsphères en latex	273
B. Préparation et caractérisation des suspensions de microorganismes	275
B.1. Croissance des souches utilisées	275
B.2 Caractérisation du caractère hydrophile/hydrophobe des microorganismes par méthode MATS	278
B.3. Potentiel zêta	279
C. Sélection des fluorochromes	281
C.1. La Rhodamine et la diacétate de fluorescéine.....	281
C.2. Les fluorochromes Syto	289
D. Système de filtration	294

Index des tableaux

Tableau I.1-1: Prélèvements d'eau douce par secteur (année 2000) [5].....	32
Tableau I.2-1 A: Effet de la taille des particules sur résistance spécifique (porosité constante) ($\rho_s=2500 \text{ kg.m}^{-3}$) [29].....	42
Tableau I.2-2 B: Effet de la porosité des particules sur résistance spécifique (taille des particules constante) ($\rho_s=2500 \text{ kg.m}^{-3}$) [29].....	43
Tableau I.2-3: Effet de la forme des particules sur la résistance spécifique du dépôt (a : côte) [29].....	43
Tableau I.3-1: Résumé de quelques techniques modélisant le colmatage.....	48
Tableau I.5-1: Quelques fluorochromes utilisés en microscopie [71].....	61
Tableau I.6-1 : Synthèse et comparaison des techniques non invasives de caractérisation du dépôt.....	72
Tableau II.3-1 : Effet du traitement sur l'angle de contact.....	78
Tableau III.1-1: Propriétés spectrales des microsphères fluorescentes.....	111
Tableau III.2-1 : Composition du milieu de culture YPD.....	112
Tableau III.2-2 : Composition du milieu de culture LB.....	112
Tableau III.3-1: Tensions de surface (mJ/m^2) de Lifshitz-van der Waals (γ_{SLW}), polaires (γ_S^+ , γ_S^-) et énergie de surface totale (γ_{STotal}) des solvants utilisés dans la méthode MATS.....	120
Tableau III.4-1 : Caractéristiques des blocs filtres du microscope à épifluorescence.....	121
Tableau III.4-2 : Caractéristiques des objectifs utilisés en microscopie confocale.....	121
Tableau III.6-1 : Principales caractéristiques des membranes.....	125
Tableau III.7-1 : Calibration de la taille du voxel en système métrique durant l'observation du dépôt des particules en temps réel.....	131
Tableau III.7-2 : Calibration de la taille du voxel en système métrique pour la caractérisation du dépôt <i>in situ</i>	131
Tableau VI.2-1: Caractéristiques des suspensions et paramètres opératoires pour les suspensions de particules inertes.....	240
Tableau VI.2-2: Caractéristiques des suspensions et paramètres opératoires pour les suspensions de particules biologiques.....	241

Index des figures

Figure I.1-1 : Volume moyen journalier des eaux usées recyclées en Europe et quelques pays de la Méditerranée (données pour les années 2000-2003) [8].....	33
Figure I.2-1 : Principe de fonctionnement des procédés membranaires	36
Figure I.2-2 : Taille des particules et gamme d'utilisation des différentes membranes [16]..	37
Figure I.2-3 : Observations en microscopie électronique à balayage d'une microsieve.....	38
Figure I.2-4 : Modes opératoires en fonction du sens d'écoulement du fluide.....	39
Figure I.2-5 : Coupe d'un dépôt de particules de [28]	41
Figure I.2-6 : Effet de la taille et de la concentration des particules sur le colmatage [29]....	42
Figure I.3-1 : Morphologie des dépôts formés (100 particules) dans les 6 cas simulés.....	46
Figure I.4-1 : Principe de la réflectométrie ultrasonique :	51
Figure I.4-2 : Observation du dépôt par MEB	53
Figure I.4-3 : Illustration du principe de l'AFM [48]	54
Figure I.4-4 : Observation directe de la formation d'un dépôt bidisperse (alginate/bentonite) sur une fibre creuse [64].....	55
Figure I.4-5 : Evolution de l'épaisseur locale du dépôt en fonction de la masse des particules déposées ($C=1\text{g L}^{-1}$, $T=20^{\circ}\text{C}$) [65].....	56
Figure I.4-6 : Diagramme schématique du capteur optique (L1, L2, L3, L4: plan convexe ou lentilles biconvexes; T1, T2: trous microscopiques; D: diaphragme; PM: photomultiplicateur; PC: cellule photonique; M: membrane; LM: bande en verre).....	58
Figure I.5-1 : (A) : Diagramme de Jablonski (❶ Excitation; ❷ Relaxation; ❸ Emission) ; (B) : Exemple des spectres d'excitation et d'émission de fluorescence [72].....	60
Figure I.5-2 : Détails d'un microscope à épifluorescence.....	62
Figure I.5-3 : Détails d'un microscope confocale	64
Figure I.5-4 : Images d'une microsieve durant la filtration d'une suspension bidisperse avec $5,3 \times 10^{-7} \% 1\ \mu\text{m}$ (verte) et $2,3 \times 10^{-5} \% 9,7\ \mu\text{m}$ particules (rouge). A–C à $t = 6, 18$ et 30 min (sans visualisation de la microsieve), et D à $t=30$ min (visualisation de la microsieve).....	66
Figure I.5-5 : Images de coupes transversales du dépôt (bactéries en vert et EPS en rouge) en microscopie confocale et coefficients de rugosité évalués à partir du traitement d'images : ..	66
Figure I.5-6 : Porosité en fonction de la profondeur pour différents dépôts obtenus dans des conditions d'oxygénation variées des expériences (aérobie ou anoxique) [81].	67
Figure I.5-7 : Excitation et photoblanchiment pour	69

Figure I.5-8 : Observation en microscopie biphotonique du dépôt formé sur une membrane par des levures colorées par plusieurs marqueurs fluorescents lors d' une microfiltration tangentielle [25].....	70
Figure II.2-1 : Schéma de la chambre de filtration	77
Figure II.3-1 : Réduction de la perméabilité en fonction du temps de stockage d'une microsieve 0,8 μm	79
Figure III.2-1 : Spectre d'excitation et d'émission de la Rhodamine 123	116
Figure III.2-2 : Conversion de la fluorescéine diacétate (FDA) en fluorescéine.....	117
Figure III.2-3 : Spectre d'excitation et d'émission de la FDA	117
Figure III.2-4 : Spectres d'excitation et d'émission du Syto 9 et Syto 84.....	118
Figure III.4-1 : Principe de fonctionnement du microscope confocal durant l'excitation (A) et l'émission (B).....	122
Figure III.4-2 : Interface de réglage des paramètres pour l'excitation et l'émission des fluorochromes sur le microscope confocal.....	123
Figure III.6-1 : Observations de la surface d'une microsieve:	125
Figure III.6-2 : Représentation géométrique de l'organisation des pores	125
Figure III.6-3 : Illustration schématique du système de filtration	130
Figure III.7-1 : Etapes du traitement d'une image acquise d'un dépôt de particules (4,8 μm) : A : image brute, B : Image après réglage de la lumière et du contraste, C : Image après seuillage.....	132
Figure III.7-2 : Schéma du principe de l'analyse des séries d'images obtenues par microscopie confocale.....	133
Figure III.7-3 : Détermination du taux de couverture d'un dépôt de particules (4,8 μm), (Objectif x 40, zoom 1) : A : Image en lumière blanche, B : Image en fluorescence, C : Image composite.	134
Figure VI.1-1 : Observations en temps réel en mode fluorescence du dépôt des cellules de levures colorées avec le Syto 9 au cours du temps sur une microsieve de 0,8 μm :	206
Figure VI.1-2 : Evolution de la fraction de la surface occupée par les levures le long de l'axe z d'un dépôt formé sur une membrane 2 μm en fonction de la masse déposée.	226
Figure VI.1-3 : Evolution de la fraction de la surface occupée par les levures le long de l'axe z d'un dépôt formé sur une membrane 0,8 μm en fonction de la masse déposée	226
Figure VI.1-4 : Simulation de l'empilement de particules sphériques simulant des levures sur une membrane de 2 μm de taille de pores.	227

Figure VI.1-5 : Simulation de l'empilement de particules sphériques simulant des levures sur une membrane de 0,8 μm de taille de pores.	228
Figure VI.1-6 : Images composites du dépôt de bactéries colorées au Syto 9 sur une membrane de 0,8 μm de taille de pores, objectif x 10 ;	229
Figure VI.1-7 : Réduction de la perméabilité de la membrane 0,8 μm durant la filtration de bactéries (\blacktriangle) et de levures (\blacklozenge)	230
Figure VI.1-8 : Image composite de la microsieve 0,8 μm colmatée par des bactéries colorées avec le Syto 9 (objectif x63, zoom 6).....	231
Figure VI.1-9 : Série d'images composites de la formation progressive du dépôt des bactéries colorés avec le Syto 9 sur une microsieve de 0,8 μm de taille de pores pour des masses déposées de : (A) 5 μg , (B) 11 μg , (C) 26 μg (objectif x 63, zoom 1).....	231
Figure VI.1-10 : Perte de perméabilité, Lp^* , et fraction couverte de la membrane, α_c , en fonction de la masse déposée de bactéries	232
Figure VI.1-11 : Evolution de la fraction de la surface occupée par les bactéries dans chaque image le long de l'axe z d'un dépôt formé sur une membrane 0,8 μm en fonction de la masse déposée.	233
Figure VI.1-12 : Images en fluorescence du dépôt sur une membrane de 0,8 μm de taille de pores, objectif x 10: levures colorées au Syto 9 (A), bactéries colorées au Syto 84 (B) et image composite du dépôt mixte (C)	236
Figure VI.1-13 : Réduction de la perméabilité de la membrane 0,8 μm durant la filtration de suspensions mixte.....	237
Figure VI.1-14 : Image composite de la microsieve 0,8 μm colmatée par des bactéries colorées au Syto 84 (rouge) et des levures au Syto 9 (vert) (objectif x 63), (A) : zoom 6 et (B) : zoom 1.....	237
Figure VI.1-15 : Images composites de la formation progressive du dépôt mixte (bactéries en rouge, levures en vert) sur une microsieve de 0,8 μm de taille de pores pour des masses déposées de : (A) 3 μg , (B) 37 μg , (objectif x 63, zoom 1)	238
Figure VI.1-16 : Perte de perméabilité, Lp^* , et fraction couverte de la membrane, α_c , en fonction de la masse déposée du dépôt mixte	239
Figure VI.2-1 : Réduction de la perméabilité de la membrane 2 μm durant la filtration de suspensions de microsphères de 4,8 μm (\square) et de levures (\blacksquare).....	242
Figure VI.2-2 : Réduction de la perméabilité de la membrane 0,8 μm durant la filtration de suspensions de microsphères de 4,8 μm (\triangle) et de levures (\blacktriangle)	243

Figure VI.2-3 : Réduction de la perméabilité de la membrane 0,8 μm durant la filtration de suspensions de microsphères de 1 μm (\circ) et de bactéries (\bullet).....	243
Figure VI.2-4 : Réduction de la perméabilité de la membrane 0,8 μm durant la filtration de suspensions bidispersées des microsphères (Expériences D_1 (\diamond) et D_2 (\blacklozenge)) et d'un mélange de microorganismes (\blacktriangle).....	244
Figure VI.2-5 : Images composites de la microsieve 0,8 μm colmatée par des levures colorées avec le Syto 9 (A) et des microsphères de 4,8 μm (B) ; (objectif x 63, zoom 6).....	245
Figure VI.2-6 : Images composites de la microsieve 2 μm colmatée par des levures colorées avec le Syto 9 (objectif x 63, zoom 6) (A) et des microsphères de 4,8 μm (B) (objectif x 40, zoom 6).....	246
Figure VI.2-7 : Images composites de la microsieve 0,8 μm colmatée par des bactéries colorées au Syto 9 (A) et des microsphères de 1 μm (B) (objectif x 63, zoom 6).....	246
Figure VI.2-8 : Images composites de la microsieve 0,8 μm colmatée par un mélange de microorganismes (objectif x 63, (A_1 : zoom 6 et A_2 : zoom 1) et une suspension bidispersées de microsphères (B) (objectif x 63, zoom 6).....	247
Figure VI.2-9 : Taux de couverture apparent de la membrane, αc , en fonction de la masse déposée durant la filtration de particules monodispersées et de suspensions pures de microorganismes	248
Figure VI.2-10 : Taux de couverture apparent de la membrane, αc , en fonction de la masse déposée lors de la filtration de particules inertes bidisperses (D_1 et D_2) et du mélange levures/bactéries (H)	248
Figure VI.2-11 : Epaisseur quadratique moyenne des dépôts formés durant la filtration des levures (symboles pleins) et des microsphères 4,8 μm (symboles vides) sur les membranes 0,8 μm ($\blacktriangle, \triangle$) et 2 μm (\blacksquare, \square) en fonction de la masse déposée	249
Figure VI.2-12 : Fraction de la surface occupée par les levures (symboles pleins) et les microsphères de 4,8 μm (symboles vides) le long de l'axe z d'un dépôt sur une membrane 0,8 μm en fonction de la masse déposée	250
Figure VI.2-13 : Fraction de la surface occupée par les levures (symboles pleins) et les microsphères de 4,8 μm (symboles vides) le long de l'axe z d'un dépôt sur une membrane 2 μm en fonction de la masse déposée.	251
Figure VI.2-14 : Fraction de la surface occupée par les bactéries (symboles pleins) et les microsphères de 1 μm (symboles vides) pour chaque section le long de l'axe z de dépôts sur une membrane 0,8 μm en fonction de la masse déposée	252

Valorisation des travaux de thèse

Liste des publications

- I. Ben Hassan, M. Ennouri, C. Lafforgue, P. Schmitz, A. Ayadi, Experimental Study of Membrane Fouling during Crossflow Microfiltration of Yeast and Bacteria Suspensions: Towards an Analysis at the Microscopic Level, *Membranes* 3 (2013) 44–68.
- I. Ben Hassan, C. Lafforgue, C. Ellero, A. Ayadi, P. Schmitz, Coupling of local visualization and numerical approach for particle microfiltration optimization, *Microsyst. Technol.* 542 (2013) 1906–1909.
- I. Ben Hassan, C. Lafforgue, A. Ayadi, P. Schmitz, In situ 3D characterization of monodispersed spherical particle deposition on microsieve using confocal laser scanning microscopy. *Journal of Membrane Science*, 454 (2014) 283–297.
- I. Ben Hassan, C. Lafforgue, A. Ayadi, P. Schmitz, Study of the separation of yeast by microsieves: In situ 3D characterization of the cake using confocal laser scanning microscopy. *Food Bioprod Process* (2014).

Liste des abréviations

AFM	Microscopie à force atomique
BSA	sérum albumine bovine
CFD	« Computational Fluid Dynamics »
DOTM	« Direct Observation Through Membrane »
DVO	« Direct Visual Observation »
FRV	Facteur de Réduction Volumique
FTIR	spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier
LB	Milieu « Luria Bertani »
MEB	microscopie électronique à balayage
MF	Microfiltration
NF	Nanofiltration
OI	Osmose inverse
RMN	Imagerie par résonance magnétique nucléaire
TACO	tomographie axiale calculée par ordinateur
YPD	Milieu « yeast Peptone Dextrose »
UF	Ultrafiltration
UFC	Unité formant colonie

Liste des symboles

A_0 : densités optiques à 620 nm de la suspension de microorganismes avant le contact avec le solvant

A : densités optiques à 620 nm de la suspension de microorganismes après contact avec le solvant

D_f	Dimension fractale	
D_e	dimension euclidienne	
d	diamètre du pore (m)	
J	Flux de filtration ($L/(h.m^2)$)	
L_p^0	Perméabilité de la membrane neuve après mouillage ($L.h^{-1}.m^{-2}.bar^{-1}$)	
L_p^c	Perméabilité de la membrane colmatée ($L.h^{-1}.m^{-2}.bar^{-1}$)	
L_p^*	Perte de perméabilité ($L.h^{-1}.m^{-2}.bar^{-1}$)	
L	Longueur du canal (m)	
M_C	Masse du dépôt (kg)	
N	indice de réfraction du milieu	
N_0	Nombre total des pores de la microsieve (donnée constructeur)	
N_1	Nombre de pores actifs	
$N.A.$	Ouverture numérique de l'objectif (mm)	
N_p	Nombre de particules dans le dépôt	
α_0	Fraction des pores actifs	
PTM	Pression transmembranaire (Pa)	
ΔP_m	La variation de pression à l'intérieur des pores	(Pa)
Q	débit de filtration	($L.h^{-1}$)
q	débit d'eau dans un seul pore	($m^3.s^{-1}$)
r	rayon du pore	(m)
R_m	résistance de la membrane	(m^{-1})
R_c	Résistance de la couche colmatante	(m^{-1})
S_1	Surface active de la membrane	(m^2)
S_0	Surface de la microsieve (donnée constructeur)	(m^2)
T	Température	°C
$\langle Td \rangle$	épaisseur quadratique moyenne	(mm)
V_p	volume d'une particule	(m^3)

ζ	potentiel zêta	(mV)
μ	viscosité dynamique du perméat	(Pa.s)
λ	Longueur d'onde d'excitation	(nm)
δ_x	Limite de résolution, résolution dans la direction x	(μm)
δ_y	Limite de résolution, résolution dans la direction y	(μm)
δ_z	Limite de résolution, résolution dans la direction z	(μm)
α_c	Fraction apparente du champs de filtration couverts par les particules	
α_s	Fraction de la surface occupée par les particules le long de l'axe z	
ϵ_m	Porosité de la microsieve	
θ	angle de contact	($^\circ$)
ρ_c	densité des particules	(kg.m^{-3})

Introduction Générale

L'Organisation Mondiale de la Santé ainsi que l'Unicef estiment qu'au moins 11% de la population mondiale n'ont toujours pas accès à l'eau potable et que des milliards de personnes demeurent privées d'installations sanitaires [1]. L'importance de l'assainissement est indiscutable : il est crucial pour le développement économique et apporte des avantages économiques mesurables [2].

Les procédés de filtration par membranes, couplant la désinfection à la séparation membranaire, sont des techniques de choix qui répondent à cette demande. En effet, les progrès constants accomplis par ces procédés en matière de qualité permettent de potabiliser l'eau douce et de recycler les eaux traitées sans effet néfaste pour l'environnement.

Les technologies de séparation par membrane sont également très largement utilisées dans d'autres secteurs, en particulier dans l'industrie pharmaceutique, chimique, agroalimentaire et biotechnologique. Ces procédés contribuent à l'élaboration des produits et permettent de maîtriser leur qualité en assurant leur purification, leur fractionnement, l'élimination des germes... Dans ces domaines également, les performances sont encore limitées par le colmatage des membranes qui va modifier leurs propriétés en termes de productivité et de sélectivité. Ce phénomène est notamment induit par le dépôt, sur la surface de la membrane, des particules présentes dans la suspension à filtrer. Il cause la chute du flux de filtration et ainsi augmente le coût global du processus de filtration. En effet, les nettoyages répétés nécessaires au maintien d'un flux de filtration économiquement rentable et dans certains cas de la sélectivité, implique des arrêts fréquents et la diminution de la durée de vie des membranes. De plus, ces nettoyages nécessitent également l'utilisation de produits chimiques couteux, corrosifs et qui peuvent être néfastes pour l'environnement. Malgré le fait que la problématique posée par le colmatage des media filtrants soit ancienne, prévoir et optimiser les conditions opératoires du procédé pour le minimiser est toujours d'actualité.

Ainsi, de nombreuses études expérimentales et numériques ont été réalisées depuis plusieurs décennies pour mieux comprendre le phénomène de colmatage dans le but d'améliorer les performances des procédés de filtration membranaires. Ces dernières années, les industriels ont souhaité se doter d'outils de simulation numérique leur permettant de prédire les performances des procédés en limitant ainsi le recours aux essais expérimentaux systématiques. Même si l'essor de la CFD (Computational Fluid Dynamics) et l'utilisation de techniques mathématiques de changement d'échelle ont permis de développer formellement de tels outils, l'étape cruciale reste la prise en compte précise du colmatage dans les modèles. En effet les mécanismes se produisant à l'échelle microscopique, tels que l'accumulation de particules sur le filtre et le bouchage de pores, se traduisent à l'échelle macroscopique par une

augmentation de la résistance hydraulique globale du système filtrant. Il convient donc de mieux comprendre le colmatage par une approche multi-échelle afin d'enrichir sa modélisation.

Différentes techniques expérimentales ont déjà été proposées pour analyser la formation d'un dépôt de particules et caractériser sa morphologie. Parmi elles, la microscopie confocale apparaît comme la plus prometteuse car elle permet une observation *in situ* et en profondeur du dépôt. Au laboratoire d'ingénierie des systèmes biologiques et des procédés, Sandra Beaufort (thèse de doctorat 2010) a mis au point une stratégie originale basée sur cette technique et utilisant une chambre de filtration munie d'une fenêtre d'observation pour caractériser des dépôts purs et mixtes autofluorescents de *Saccharomyces cerevisiae* et *Escherichia coli* [3]. Cependant, dans ce travail, seules les couches supérieures du dépôt ont pu être analysées du fait de la densité et la compacité des structures et de leurs interactions avec les signaux lumineux.

La présente thèse s'inscrit dans la continuité de ces travaux pionniers en concevant et développant notamment une chambre de filtration originale et un protocole expérimental permettant de caractériser la morphologie de dépôts de particules inertes et biologiques dans toute leur profondeur en relation avec leur propriété de transport. Les objectifs de ce travail sont : une meilleure caractérisation à l'échelle microscopique (i) des mécanismes de dépôt des particules sur le filtre et (ii) de l'organisation de leur empilement pour former un dépôt épais. Les paramètres analysés seront : les caractéristiques des particules (taille, forme, inerte ou biologique) et les propriétés géométriques de la membrane (taille des pores, distance entre pores).

Ce manuscrit est organisé en six chapitres.

- Dans le premier chapitre, une synthèse bibliographique des travaux expérimentaux et numériques antérieurs se rapportant au colmatage et à la caractérisation des dépôts est effectuée.

- Le contexte précis de cette étude ainsi que la phase de conception du dispositif expérimental sont présentés dans le chapitre deux.

- Le troisième chapitre est consacré aux matériels et méthodes mis en œuvre dans ce travail. Le dispositif expérimental ainsi que les particules et les microorganismes mis en œuvre, les différentes techniques utilisées qui reposent sur des disciplines différentes telles que la microbiologie et la microscopie sont présentés. Les méthodes mathématiques de quantification des images obtenues par microscopie confocale sont aussi détaillées.

- Le chapitre quatre couple des approches numérique et expérimentale pour qualifier la chambre de filtration.

- L'étude morphologique de dépôts de suspensions pures et mixtes de particules inertes et biologiques fait l'objet des chapitres cinq et six.

- Enfin, la conclusion de ce manuscrit présente la synthèse des différents éléments analysés dans ce travail.

Chapitre I. Revue Bibliographique

L'objectif de cette revue bibliographique est de situer cette étude dans son contexte général et par rapport aux travaux déjà effectués, de présenter les notions nécessaires pour comprendre le comportement des suspensions modèles dans un procédé de filtration et d'appréhender les limites de ce travail.

La première partie est consacrée à la technique de filtration membranaire, ses applications, ses avantages, ses limites ainsi que les paramètres influant sur les performances.

La deuxième partie présente les études dédiées aux simulations numériques de la filtration membranaire et de la formation d'un dépôt.

Enfin, la dernière partie de ce chapitre est consacrée aux différentes techniques utilisées pour caractériser le dépôt accumulé sur une membrane en mettant l'accent sur la microscopie de fluorescence.

I.1 Applications des procédés membranaires

Les techniques membranaires sont largement répandues dans les industries alimentaires, pharmaceutiques et biotechnologiques ainsi que pour le traitement des eaux usées et la potabilisation de l'eau. Elles sont utilisées dans des opérations de clarification, de concentration et de désinfection. Les procédés à membranes présentent plusieurs avantages tels que la sélectivité, une surface importante par unité de volume de fluide traité.... De plus, les opérations de filtration peuvent être conduites à des températures et à des pressions relativement peu élevées ce qui les rend particulièrement adéquates pour des composés biologiques fragiles puisqu'elles n'impliquent pas de changement de phase ou d'addition de produits chimiques. Cet avantage majeur réduit les risques de dénaturation, de désactivation, et/ou de dégradation des produits biologiques [4].

Cette partie présente l'importance technologique des procédés de séparation membranaires et les enjeux environnementaux au travers de certaines applications courantes liées au traitement des eaux, à l'industrie pharmaceutique et aux biotechnologies.

I.1.1 Traitement des eaux

Le volume d'eau douce prélevé annuellement à des fins d'utilisation humaine est de 3830 km³, soit à peu près 600 m³ par personne et par an. Au niveau mondial, cela représente 9% des ressources en eau douce renouvelables [5]. Le secteur agricole est le plus gros consommateur d'eau dans la mesure où ces prélèvements représentent environ 70% de l'ensemble des prélèvements au niveau mondial, considérant que 10% sont affectés à l'usage domestique et 20% à l'industrie [5] (**Tableau I.1-1**).

Tableau I.1-1: Prélèvements d'eau douce par secteur (année 2000) [5]

Région	Ressources d'eau douce renouvelables km ³ /an	Volume total des prélèvements d'eau douce km ³ /an	Prélèvements d'eau douce par secteur (année 2000)						Prélèvements en pourcentage des ressources renouvelables
			Agriculture		Industrie		Municipalités		
			km ³ /an	%	km ³ /an	%	km ³ /an	%	
Monde	43 659	3 830	2 664	70	785	20	381	10	8,8
Afrique	3 936	217	186	86	9	4	22	10	5,5
Asie	11 594	2 378	1 936	81	270	11	172	7	20,5
Amérique latine	13 477	252	178	71	26	10	47	19	1,9
Caraïbes	93	13	9	68	1	9	3	23	14,4
Amérique du Nord	6 253	525	203	39	252	48	70	13	8,4
Océanie	1 703	26	19	72	3	10	5	18	1,5
Europe	6 603	418	132	32	223	53	63	15	6,3

A mesure que les besoins en eaux continuent à croître, le recours à des approches novatrices pour assurer un approvisionnement adéquat et sûr se fait sentir avec une urgence grandissante [6].

Afin de réduire l'écart entre approvisionnement et demande, les pays où l'eau est rare ont été contraints à recourir aux ressources hydriques non conventionnelles pour améliorer l'efficacité de l'utilisation de l'eau, réduire les pertes et augmenter le recyclage. Ainsi, l'utilisation par l'agriculture de ressources en eau de faible qualité, comme les eaux usées traitées, est devenue une question pertinente. En agriculture irriguée, ces eaux pourraient constituer une ressource précieuse car elles contiennent également des éléments fertilisants et permettraient d'assurer un apport constant [7].

L'assainissement des eaux usées en vue de réutilisation devient, ainsi, un enjeu politique et socio-économique [8]. De plus en plus de pays se mobilisent en mettant en place de nouvelles exigences et réglementations pour encourager la réutilisation des eaux usées épurées (**Figure I.1-1**).

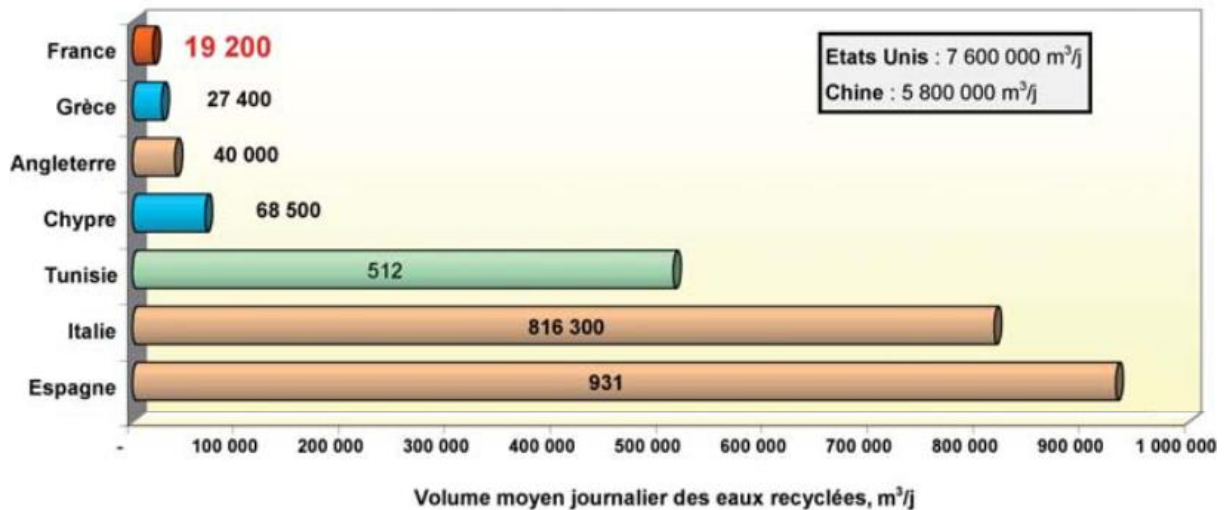


Figure I.1-1 : Volume moyen journalier des eaux usées recyclées en Europe et quelques pays de la Méditerranée (données pour les années 2000-2003) [8]

La sélection puis l'investissement dans des technologies de traitement de l'eau sont, aujourd'hui, le résultat d'un processus d'évaluation prenant en compte la protection de la santé, la réduction de la pollution, les coûts, la taille de l'entreprise, ainsi que la qualité de l'eau selon les fins spécifiques auxquelles elle est destinée. Ces exigences sont principalement basées sur la qualité biologique de ces eaux. Jusqu'à présent, la chloration est le moyen le plus utilisé pour réduire le nombre des microorganismes pathogènes. Cependant, Cette méthode n'a pas d'effet sur la turbidité causée par les composés solides en suspension. En outre, l'utilisation du chlore dans les eaux usées induit la formation de produits indésirables et dangereux aussi bien pour les humains que pour l'environnement. Face à ces problèmes, des technologies alternatives ont été développées telle que l'ozonation ou la désinfection UV ... L'ozone est un désinfectant très efficace mais la généralisation de son utilisation est limitée à cause de la complexité du matériel nécessaire et des opérations de maintenance. Quant à la désinfection UV, son efficacité dépend de la turbidité de l'eau et est corrélée à l'intensité et l'âge de la lampe UV. Par ailleurs, les rayonnements UV peuvent réagir avec les composés aromatiques et les nitrates présents dans les eaux usées et produire des composés mutagènes [9]. En plus de ces inconvénients, vu la diversité des pathogènes trouvés dans les eaux usées (parasites, bactéries, virus...), il est vraisemblable que tous les microorganismes ne peuvent être éliminés avec la même efficacité par ces technologies [10].

Les technologies de filtration membranaire offrent une alternative à ces processus de désinfection. Dans le passé, ces procédés étaient peu développés en raison de coûts d'exploitation élevés. Cependant, leur utilisation dans le traitement des eaux usées s'est

étendue significativement pendant la dernière décennie en conséquence des avancées technologiques et de la diminution des coûts d'exploitation [10].

Gomez et al (2006) [10] ont étudié l'efficacité de la désinfection par filtration d'une eau usée chargée en coliformes fécaux, *Escherichia coli*, coliphages et œufs de nématodes provenant de la station d'épuration de Melilla (Espagne). Ils ont comparé deux macrofiltres (filtre à sable sous pression et filtre à disque) et deux procédés membranaires : une microfiltration (MF) et une ultrafiltration (UF) de seuils de coupure respectifs 0,2 µm et 0,05 µm. Les opérations de MF et UF ont permis d'atteindre la rétention des coliformes fécaux et d'*Escherichia coli* de 99,9% et 100%, respectivement. Quant à la rétention des particules virales, les procédés de séparation par membrane sont les plus efficaces. En effet, les taux de rétention sont de 95%, 99,97%, et 85%, respectivement pour la MF, l'UF et la macrofiltration. En outre, des œufs de nématodes sont retrouvés dans les eaux macrofiltrées alors que leur concentration est nulle dans celles traitées par les technologies membranaires. Ces œufs sont très pathogènes et résistants aux désinfections classiques et à l'irradiation par UV.

Paraskeva et Graham (2005) [9] ont également montré que quelle que soit la charge initiale de l'effluent, l'eau traitée par la MF est exempte de charge bactérienne. De plus, cette opération a permis de réduire de 10 à 20% la couleur et de 4 à 5% l'absorbance à 254 nm.

I.1.2 Industries pharmaceutique et biotechnologiques

Les techniques de séparation membranaires ont largement intégré de nombreuses industries pharmaceutiques et biotechnologiques. Elles sont utilisées pour la récupération de molécules et la séparation de particules en suspension : concentration de protéines, clarification de suspensions lors de culture cellulaire, stérilisation de liquides pour éliminer virus et bactéries...

Ces technologies sont également adaptées à la production d'antibiotiques tels que la benzylpénicilline, l'érythromycine et la médmycine [4].

L'élimination de virus qui peuvent être présents dans les cultures cellulaires servant à la production de protéines [11] constitue également une application importante de la filtration en biotechnologie. En effet, le développement de filtres membranaires avec un seuil de coupure compris entre la taille des virus et celle des protéines a permis l'élimination de la contamination de cultures cellulaires par des parvovirus. Ces derniers sont difficiles à éliminer à cause de leur petite taille (un diamètre voisin de 20 nm) et leurs résistances aux traitements thermique et chimique [4].

Les bioréacteurs à membranes connaissent actuellement un intérêt croissant dans la production d'acides aminés, d'antibiotiques, d'anti-inflammatoires, d'anticancéreux, de vitamines, d'énantiomères optiquement purs et d'isomère. Grâce au développement des membranes synthétiques semi-perméables, ces dispositifs sont des alternatives aux méthodes classiques d'immobilisation. En effet, les biocatalyseurs, comme les enzymes, les microorganismes et les anticorps peuvent être compartimentés par une membrane dans le réacteur ou encore immobilisés sur ou à l'intérieur de la membrane elle-même [12]. L'immobilisation permet l'augmentation de la stabilité du réacteur et l'amélioration de la pureté et la qualité du produit.

De point de vue fondamental, un effort particulier a été porté ces dernières années au développement de nouveaux matériaux et modules membranaires présentant de meilleures caractéristiques de transfert de matière. Toutefois, le colmatage reste un problème majeur pour un grand nombre d'applications. Différentes techniques ont été testées pour limiter ce problème par un nettoyage en continu de la surface de la membrane tels que l'utilisation d'un débit pulsé de grande fréquence [13], de potentiels électriques, de champs d'ultrasons [14]... Cependant, afin de maîtriser le colmatage de manière permanente, il est impératif de bien comprendre les différents phénomènes ayant lieu durant sa mise en place aux différentes échelles du processus (particulaire, moléculaire...).

I.2 Synthèse des connaissances sur la séparation membranaire

I.2.1 Principe

Les membranes sont des médias filtrants qui jouent le rôle d'une barrière sélective qui, selon le diamètre de ses pores, permet de séparer les constituants d'un mélange (alimentation) en fonction de leurs tailles en produisant un perméat et un retentât [15]. Le transfert entre ces deux phases séparées par la membrane est induit par un gradient de pression (baro-membranaires) ou un gradient de potentiel chimique (**Figure I.2-1**).

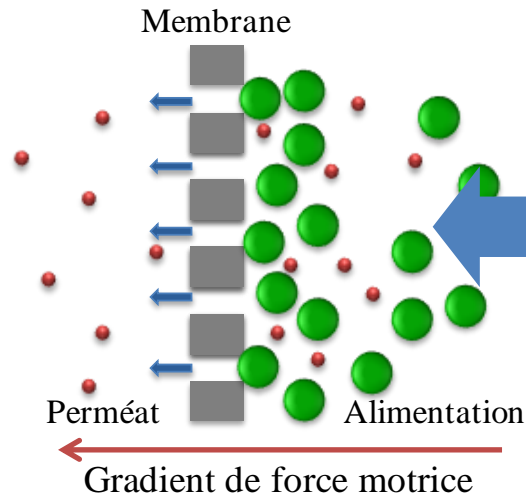


Figure I.2-1 : Principe de fonctionnement des procédés membranaires

I.2.2 Classification des procédés membranaires

Les procédés membranaires sont répartis en quatre familles qui se distinguent en fonction du seuil de coupure des membranes. Les pores ont une taille décroissante lorsque l'on passe de la microfiltration (MF) à l'ultrafiltration (UF) puis à la nanofiltration (NF) et enfin à l'osmose inverse (OI). Dans ce dernier cas, les membranes ne sont pas microporeuse, mais dense sans porosité permanente et la sélectivité résulte d'un mécanisme de solubilisation-diffusion.

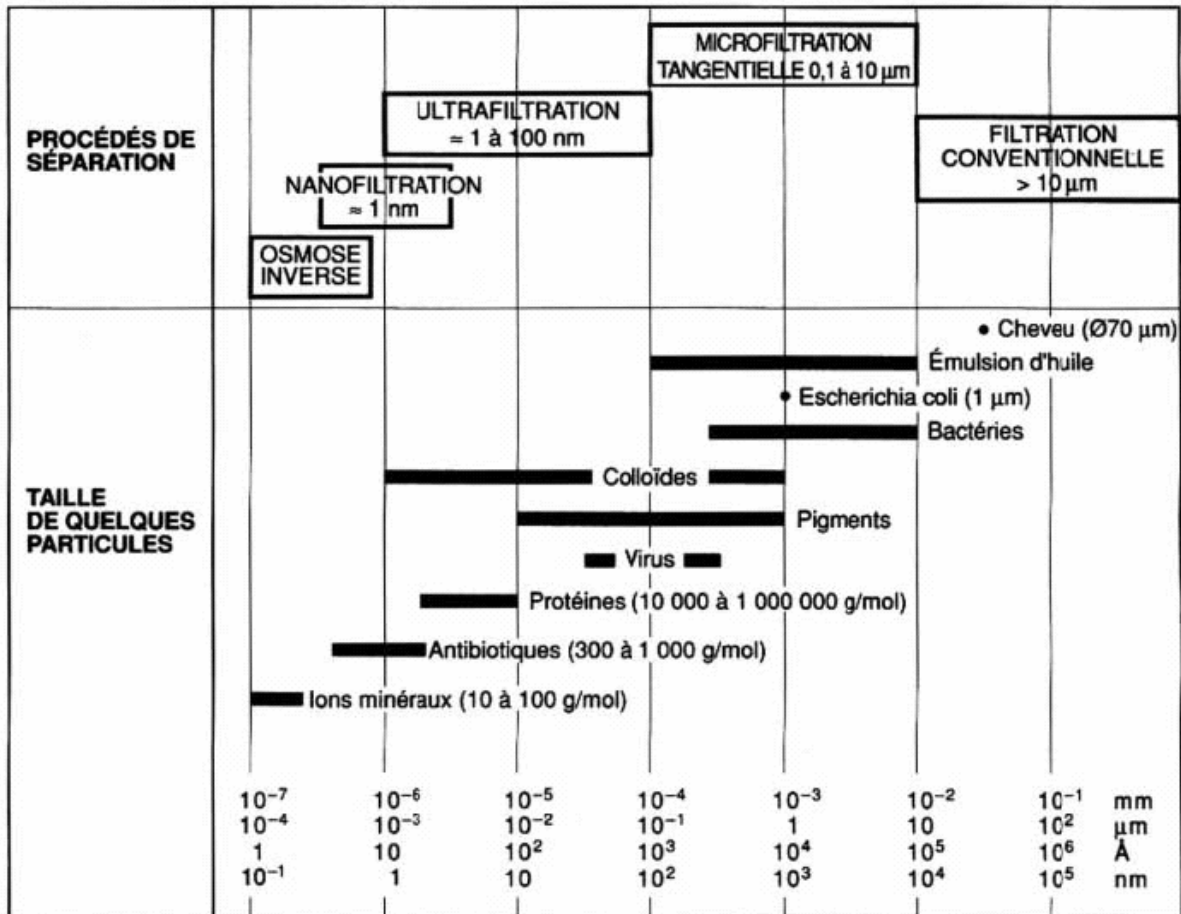


Figure I.2-2 : Taille des particules et gamme d'utilisation des différentes membranes [16]

I.2.3 Structure et composition chimique des modules membranaires

I.2.3.1 Structure

Les membranes sont généralement commercialisées sous forme de différents types de modules composés de plusieurs membranes qui sont structurées et agencées de différentes façons. On distingue : le module plan, le module tubulaire et le module spiralé [17].

I.2.3.2 Composition chimique

Les matériaux membranaires sont sélectionnés dans le but d'obtenir une membrane fine, résistante, sélective et perméable. Ils doivent, donc, posséder de bonnes résistances chimique, thermique et mécanique. On distingue habituellement les membranes organiques et minérales.

Les microsieves sont des membranes plus récentes, résultant d'un effort particulier porté au développement de nouveaux modules membranaires ayant des caractéristiques supérieures de transfert de matière. Les récents développements ont permis la fabrication de films très minces ($\approx 1 \mu\text{m}$) avec des pores identiques et un arrangement régulier (**Figure I.2-3**). La

géométrie des pores et leur arrangement spatial sont contrôlés via les innovations en techniques de lithographie [18]. Ces microsieves sont caractérisées par une faible épaisseur qui leur donne une faible résistance à l'écoulement ainsi qu'un flux de filtration important et une sélectivité maîtrisée [19]. Actuellement, ces membranes sont utilisées à l'échelle expérimentale pour des études fondamentales sur la filtration [20], le fractionnement de lait [21], la production d'émulsions stables [22] et la séparation de gaz [23].

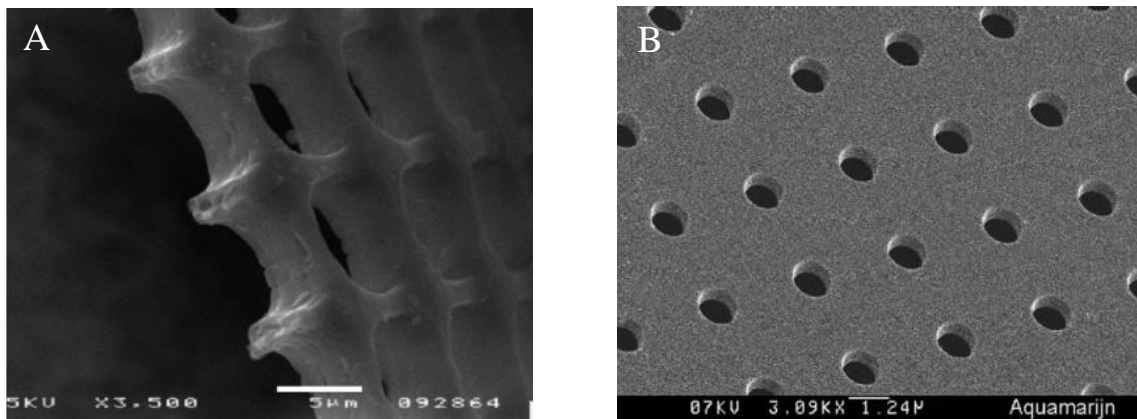


Figure I.2-3 : Observations par microscopie électronique à balayage d'une microsieve

(A: [20], B:[24])

I.2.4 Mise en œuvre des membranes

I.2.4.1 Conditions d'écoulement

Les procédés baro-membranaires fonctionnent selon deux modes opératoires en fonction du contexte (opération continue ou discontinue) et de la qualité du fluide à traiter. En mode frontal (**Figure I.2-4 A**), la filtration s'effectue perpendiculairement à la surface membranaire et, de ce fait, toute la matière pouvant être retenue par la membrane s'accumule à sa surface. En mode tangentiel (**Figure I.2-4 B**), le fluide à filtrer circule parallèlement à la surface membranaire et le perméat traverse la membrane grâce à une pression transmembranaire. L'écoulement tangentiel permet de réduire la formation du gâteau de filtration à la surface de la membrane par les conditions hydrodynamiques générées [4]. Les systèmes de filtration frontale sont généralement de configuration plus simple que les systèmes de filtration tangentielle. Cependant, leurs performances sont souvent plus faibles.

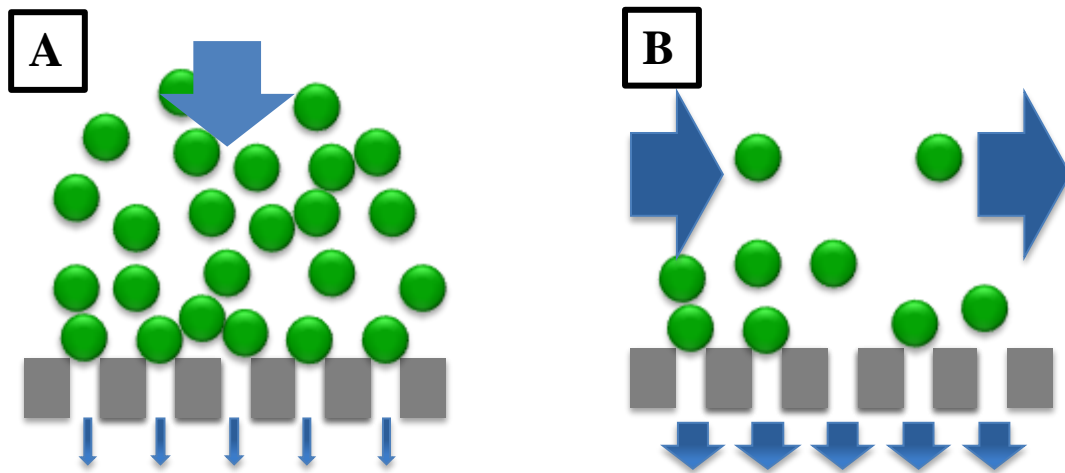


Figure I.2-4 : Modes opératoires en fonction du sens d'écoulement du fluide

I.2.4.2 Flux constant/Pression constante

Selon le type de technologie utilisée, le système de filtration peut fonctionner, soit à flux constant, soit à pression constante.

Lorsque la séparation est réalisée à flux constant, les conditions d'écoulement dans la membrane sont conservées, en revanche, la différence de pression croît lorsque le colmatage lié à l'accumulation de matière s'intensifie.

Si la filtration est opérée à pression transmembranaire constante, ce qui peut être énergétiquement avantageux sur de longues durées, le colmatage réduit irrémédiablement la valeur du flux de perméat.

I.2.5 Transfert de matière et limites du procédé

Le transfert de matière qui a lieu au niveau de la membrane induit le phénomène de colmatage qui reste le phénomène le plus pénalisant de ce procédé. Il a pour conséquences la chute du flux, la nécessité d'augmenter la pression transmembranaire, la biodégradation de la membrane.....Il induit des coûts d'exploitation et de nettoyage importants [25].

Durant la filtration d'un solvant, l'écoulement de fluide à travers le milieu poreux constitué par la membrane obéit à la loi de Darcy (Equation I.2-1).

$$J = \frac{Q}{S} = \text{PTM} \cdot \frac{1}{\mu \cdot R_m} = \text{PTM} \cdot L_p^0$$

Équation I.2-1

Avec :

J : densité du flux de filtration (L/(h.m²))

Q : débit de filtration de solvant pur (L.h⁻¹)

S : surface filtrante (m²)

PTM : pression transmembranaire (Pa)

μ : viscosité dynamique du perméat (Pa.s)

R_m : résistance de la membrane (m^{-1})

L_p^0 : perméabilité de la membrane ($(L/(h.m^2.Pa))$)

Ce colmatage résultant de l'accumulation de matière à la surface de la membrane se traduit par une plus grande résistance à l'écoulement. Ceci peut être modélisé par l'ajout d'une résistance à celle de la membrane en se basant sur le principe des résistances en série.

$$J = \frac{PTM}{\mu \cdot (R_m + R_c)} = PTM \cdot L_p^c \quad \text{Équation I.2-2}$$

R_c : résistance de la couche colmatante (m^{-1})

L_p^c : perméabilité de la membrane en fonctionnement ($(L/(h.m^2.Pa))$)

I.2.6 Colmatage lié au dépôt de particules

L'optimisation de la conduite de l'opération de filtration membranaire dépend essentiellement de la caractérisation du dépôt formé et des mécanismes impliqués. Ainsi, plusieurs études ont tenté de relier les caractéristiques du dépôt à l'échelle microscopique à la performance de filtration (échelle macroscopique). Même si les propriétés internes du dépôt sont inconnues, plusieurs auteurs ont tenté d'estimer sa hauteur et sa porosité à partir de la quantité de particules déposés [26]. Toutefois, les avancées réalisées dans l'observation *in situ* du dépôt ont montré que la porosité n'était pas uniforme. En effet, Marselina et al. [27]. ont identifié trois types de dépôt en fonction de la compacité : stagnant ; expansé et fluide. Un gradient de porosité dans l'épaisseur du dépôt a aussi été constaté par Tarabara et al. [28] durant la filtration de suspensions monodispersées de particules de 110 nm de diamètre sur des membranes de 2 nm de diamètre de pores. L'examen d'une coupe a montré la présence de structure stratifiée, composée d'une région dense sur la membrane et une zone plus poreuse à la surface du dépôt (**Figure I.2-5**).

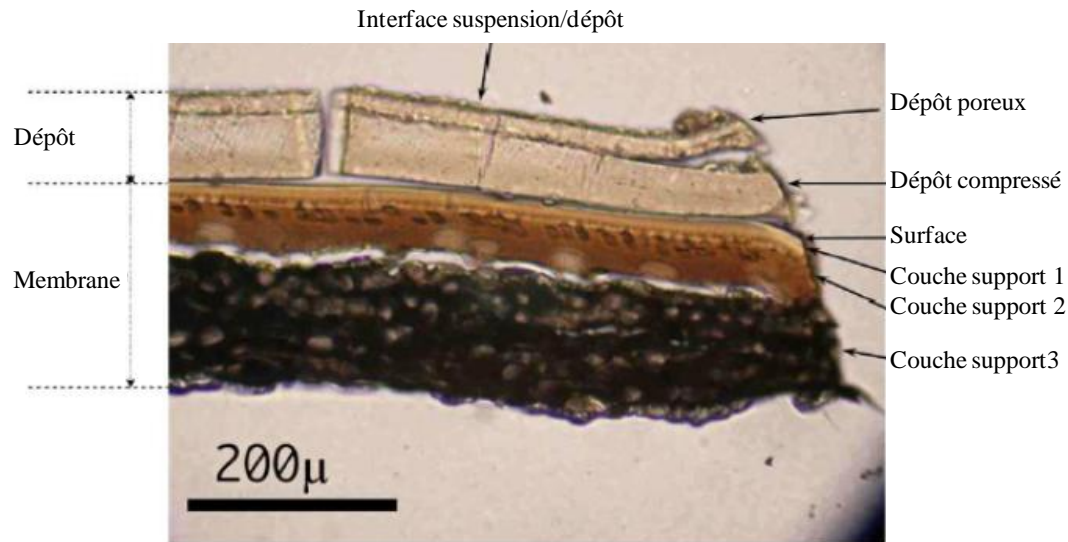


Figure I.2-5 : Coupe d'un dépôt de particules de [28]

I.2.6.1 Rôle des caractéristiques des particules sur les propriétés du gâteau

L'étude bibliographique montre que les propriétés des particules filtrées, notamment la forme, la taille et la charge de sa surface jouent un rôle non négligeable sur la conduite du processus de filtration, la formation du dépôt, le nettoyage de la membrane....

I.2.6.1.1 Influence de la taille des particules

Les membranes de filtration retiennent les particules principalement par deux mécanismes. Quand les particules sont de taille significativement supérieure à celle des pores de la membrane, elles forment un dépôt (ou gâteau) sur la surface (**Figure I.2-6 A**). Toutefois, quand les particules sont faiblement concentrées et sont de taille significativement inférieure à celle des pores, le colmatage se forme à l'intérieur du média filtrant (**Figure I.2-6 B**).

Un phénomène de pontage a lieu quand la concentration est plus élevée, plusieurs particules arrivant simultanément sur un pore forment alors un pont à l'entrée et sont alors bloquées (**Figure I.2-6 C**) [29].

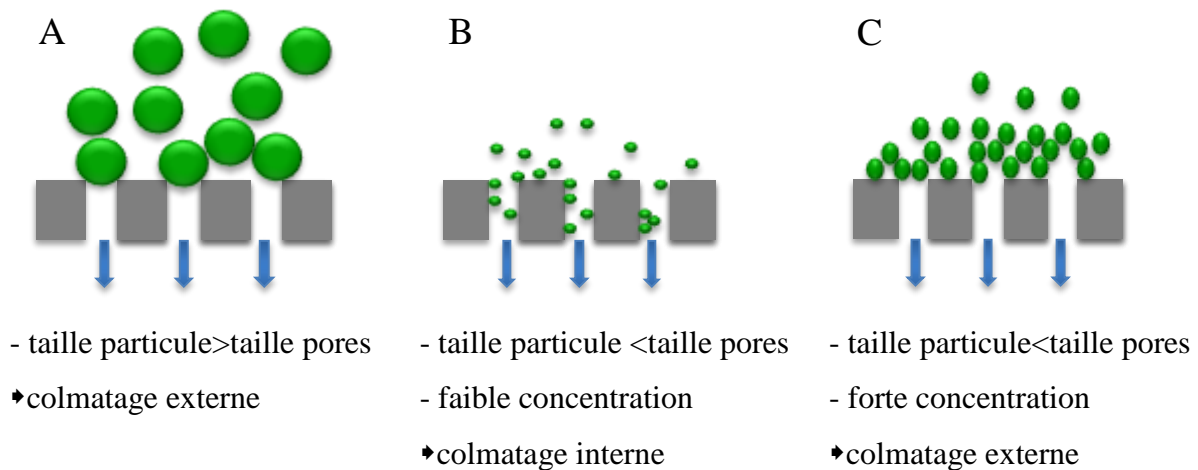


Figure I.2-6 : Effet de la taille et de la concentration des particules sur le colmatage [29]

La résistance spécifique du gâteau mesure la résistance à l'écoulement du fluide. Elle est inversement proportionnelle au carré de la taille des particules. La diminution de la taille des particules induit donc l'augmentation de la résistance spécifique [29].

En pratique, il existe, généralement, une distribution de la taille des particules et la porosité du gâteau est fonction de cette distribution. En effet, les particules de petite taille peuvent migrer dans les espaces vides entre les grosses particules pour former un dépôt plus dense et augmenter sa résistance spécifique (**Tableau I.2-1**) [29].

Tableau I.2-1 A: Effet de la taille des particules sur la résistance spécifique (porosité constante) ($\rho_s=2500 \text{ kg.m}^{-3}$) [29]

Taille des particules (μm)	Porosité ε	Résistance spécifique α (m.kg^{-1})
1	0,4	$6,7.10^{11}$
2	0,4	$1,7.10^{11}$
10	0,4	$0,068.10^{11}$
100	0,4	$0,00068.10^{11}$

Tableau I.2-2 B: Effet de la porosité des particules sur la résistance spécifique (taille des particules constante) ($\rho_s=2500 \text{ kg.m}^{-3}$) [29]

Taille des particules (μm)	Porosité ε	Résistance spécifique α (m.kg^{-1})
2	0,4	$1,7.10^{11}$
2	0,5	$0,72.10^{11}$
2	0,6	$0,33.10^{11}$
2	0,7	$0,16.10^{11}$

I.2.6.1.2 Influence de la forme des particules

La forme de la particule affecte le débit du liquide à travers le dépôt formé. Elle peut être caractérisée par la surface spécifique déterminée par sa surface et son volume. En effet, le **Tableau I.2-3** montre que la résistance spécifique est très influencée par la forme des particules. Un changement de forme induit un changement dans la porosité du dépôt. De plus, la forme des particules peut aussi influencer sur leurs interactions et le bouchage des pores [29].

Tableau I.2-3: Effet de la forme des particules sur la résistance spécifique du dépôt (a : côte) [29]

Forme de la particule	Surface spécifique m^{-1}	Résistance spécifique m.kg^{-1}
Cylindre	$4,1/a$	$1,7 10^9$
Sphère	$6/a$	$3,6 10^9$
Cube	$6/a$	$3,6 10^9$
Disque	$104/a$	$1100 10^9$

I.2.6.1.3 Rôle des propriétés de surface des particules

Le comportement des particules en suspensions est déterminé par les forces en présence. On distingue en général les forces attractives telles que la force de Van der Waals, le mouvement brownien et les forces répulsives qui permettent d'obtenir des suspensions stables [30]. Les forces répulsives entre les particules dépendent de la distribution des ions sur leur périphérie et des électrolytes présents dans la suspension. Les forces répulsives entre les particules augmentent lorsque le potentiel zéta (ζ) et/ou la fraction solide en suspension augmentent. Lorsque $\zeta \approx 0 \text{ mV}$, les forces répulsives entre particules étant faibles, leur agrégation et la formation du dépôt sont rapides. Pour des valeurs très élevées ou très faibles du potentiel ζ , les particules sont soumises à d'importantes forces répulsives et la suspension est plus stable, le dépôt se constitue alors lentement [29].

I.2.7 Paramètres influants sur la filtration des suspensions cellulaires

La filtration membranaire est utilisée pour la séparation et la concentration de cellules. D'après Okamoto et al. (2001) [31], la résistance à la filtration dépend de la taille, de la morphologie et même de l'âge des cellules puisque ce sont elles qui vont déterminer les caractéristiques du gâteau.

I.2.7.1 Influence de la pression sur la compressibilité du dépôt

La compressibilité des dépôts de cellules sous l'effet de l'augmentation de la pression appliquée est très controversée dans la littérature. En effet, dans le cas des suspensions biologiques, deux phénomènes peuvent avoir lieu : les cellules peuvent se réarranger à l'intérieur du dépôt ou/et se déformer [32]. Dans les deux cas, la porosité du dépôt ainsi que son épaisseur seront modifiées [15]. Meireles et al. [32] ont étudié les effets de la pression sur la compression de dépôt de levures. Ils ont montré que les cellules en contact avec la membrane sont exposées à une pression plus importante et sont, de ce fait, plus déformées sous l'effet de la pression. D'autre part, McCarthy et al. [33], ont étudié la compressibilité d'un dépôt de *K. marxianus* et ont confirmé que les dépôts formés par les cellules allongées sont plus compressibles que ceux de cellules sphériques.

I.2.7.2 Effet des propriétés de surface des cellules

Les propriétés de surface des cellules jouent un rôle déterminant durant leur filtration. La charge de surface, mesurée par le potentiel zêta ainsi que l'augmentation de l'hydrophobicité des cellules, contribuent à la diminution de leur agrégation et augmente la résistance spécifique du gâteau [15].

I.2.7.3 Effet de l'âge des cellules

Les propriétés des cellules et du milieu de culture évoluent durant la fermentation ainsi qu'au cours du stockage ce qui peut affecter les performances de la filtration [15]. Okamoto et al. [31] ont montré que la résistance du dépôt formé lors de la filtration d'une culture d'*Escherichia coli* âgé de 12 heures est pratiquement le double pour une culture de 0 heures. En effet, pour les cultures jeunes, la résistance a essentiellement pour origine le dépôt des cellules alors que pour une culture plus ancienne, il peut exister des interactions entre les bactéries et certains composés solubles du milieu.

I.3 Approches numériques de la filtration membranaire et de la formation d'un dépôt.

Les méthodes numériques (CFD : Computational Fluid Dynamics), présentent un grand potentiel pour étudier les phénomènes complexes gouvernant les mécanismes de séparation par membranes et pour identifier les paramètres opératoires critiques. En effet, elles permettent de minimiser les expériences et, en déterminant les conditions d'écoulement à l'échelle locale, d'analyser les phénomènes plus précisément que par l'approche expérimentale qui reste souvent macroscopique.

Ainsi, différents travaux menés depuis la fin des années 90 se sont plus particulièrement intéressés à la simulation de l'écoulement dans une paroi poreuse et à la formation du dépôt.

I.3.1 Ecoulement dans une paroi poreuse

La simulation de ce type d'écoulement a été étudiée par Damak et al. [34]. Dans cette étude, les auteurs ont couplés l'équation de Navier Stokes relative à un écoulement laminaire à l'équation de Darcy. Les résultats obtenus ont permis de distinguer l'influence des nombres de Reynolds axial (le long du tube) et de Reynolds de filtration (perpendiculaire à l'écoulement) sur les profils des vitesses axiales et radiales et sur les pertes de charge dans le tube dans le cas d'un écoulement laminaire incompressible et isotherme.

I.3.2 Simulation de la formation d'un dépôt

La simulation de la construction du dépôt sur le média filtrant a fait l'objet de nombreux travaux utilisant différents logiciels commerciaux dont les plus courants sont FLUENT (volumes finis), COMSOL ou encore Matlab qui couplent la résolution des équations de Navier Stokes et de Darcy-Brinkman. Ces outils numériques ont permis de simuler la formation des dépôts à plusieurs échelles.

Günther et al. [35]. ont développé un modèle d'écoulement simulant la formation d'un dépôt dans un canal à paroi poreuse de géométrie similaire à celle des fibres creuses de modules utilisés expérimentalement. Ce modèle a été utilisé pour simuler le fonctionnement d'un dispositif de microfiltration à fibres creuses pour évaluer l'effet de la densité de fibres dans le module sur la répartition spatiale longitudinale du dépôt.

La non uniformité de la perméabilité sur la longueur de la membrane a été simulée par Mendret et al. [36]. L'épaisseur du dépôt dépend étroitement de la phase initiale de sa formation et des caractéristiques de la membrane utilisée.

La formation d'un dépôt de particules à l'échelle du pore en fonction de la taille des particules a été étudiée par Noël et al. [37] (**Figure I.3-1**). Pour cela, l'écoulement est simulé dans le domaine fluide transportant les particules (écoulement de Stokes) et dans le domaine poreux (écoulement de Darcy ou Darcy-Brinkman). L'effet du dépôt des particules sur la perméabilité et la porosité est modélisé. Dans cette étude les interactions physicochimiques sont négligées. L'effet du pontage est bien mis en évidence. En fonction du ratio taille des particules / taille du pore de la membrane, deux cas sont distingués. L'utilisation de la loi de Darcy pour modéliser l'écoulement dans le dépôt est valide lorsque ce rapport est petit. Toutefois, quand la séparation n'est pas à l'échelle, les modèles homogénéisés type Darcy sont de mauvaises approximations de l'écoulement.

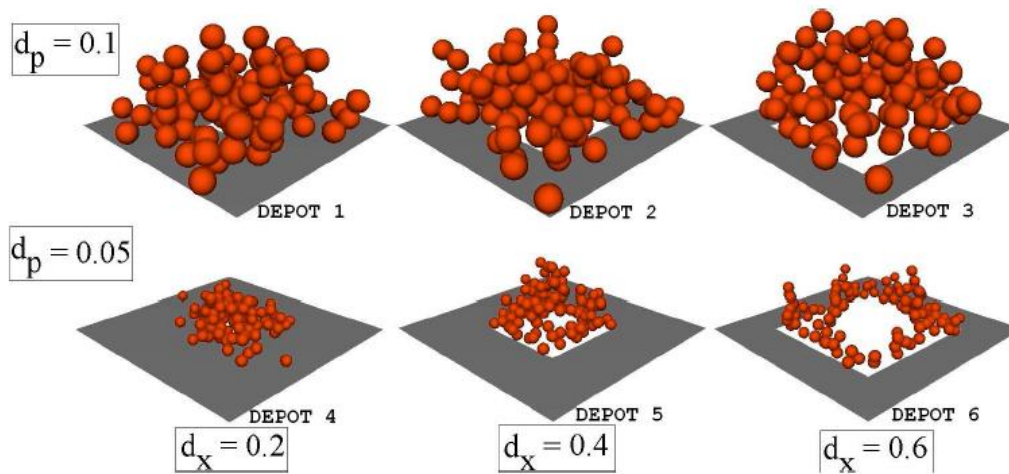


Figure I.3-1 : Morphologie des dépôts formés (100 particules) dans les 6 cas simulés (d_p : diamètre des particules, d_x taille des pores de la paroi) [37]

D'autres études se sont intéressées au dépôt d'une particule après son contact avec une autre particule déjà déposée en utilisant le bilan des forces qui s'exercent sur elle. Ainsi, pour étudier les caractéristiques des dépôts à l'échelle des particules, la structure du colmatage externe est simulée par prédiction de la position de chaque particule. L'effet de différentes conditions opératoires telles que le flux de filtration, la concentration et la forme des particules sur la structure des dépôts formés a été étudié par Hwang et al. [38]. Pour simplifier la simulation, les particules sont supposées rigides, monodisperses et de taille supérieure à $1 \mu\text{m}$ et le débit de filtration faible, les forces de Van der Waals, les interactions électrostatiques et les mouvements Browniens sont négligés. Les résultats montrent que la forme de la particule joue un rôle déterminant dans la porosité du dépôt : Plus les particules sont elliptiques et moins sphériques, plus le dépôt formé devient poreux. Ces simulations sont

validées par les résultats expérimentaux sur les effets de la forme et de la taille des microorganismes sur les propriétés du dépôt [15]. Ces auteurs ont aussi étudié la structure locale du dépôt formé par des particules sphériques de taille inférieure au micromètre [39]. Ils ont montré que l'empilement des particules dans le gâteau peut être divisé en deux régions. Quand la pression de compression est plus petite que la valeur maximale de la force de répulsion électrostatique, il existe là une distance d'équilibre entre les particules voisines. Par contre, si la pression de compression est supérieure à la valeur maximale de la force de répulsion électrostatique, les particules entrent en contact. L'empilement des particules au contact de la membrane est compact et présente une résistance élevée. Par contre, la fraction du dépôt superficielle présente une structure plus poreuse.

L'avantage majeur des modèles numériques à l'échelle de la particule est qu'ils permettent d'analyser l'influence des différents paramètres opératoires sur l'organisation des particules à l'intérieur du dépôt. Toutefois, ces approches restent souvent limitées. En effet la plupart des études ne font pas le lien entre l'échelle microscopique et l'échelle macroscopique (perméabilité du dépôt, résistance...). De plus, les particules sont généralement considérées rigides et monodisperses et les conditions opératoires sont simplifiées ce qui ne traduit pas la complexité des systèmes réels. C'est pourquoi ces simulations doivent être impérativement couplées à des validations expérimentales.

I.3.3 Validation des modèles numériques

Les modèles numériques sont souvent utilisés comme outils prédictifs pour étudier l'influence de certains paramètres opératoires sur le colmatage. Ils sont généralement validés par comparaison avec les résultats expérimentaux. D'autres études, à l'inverse, utilisent la simulation numérique pour valider des méthodologies expérimentales innovantes.

En effet, certains auteurs comme Rahimi et al. [40] et Ahmad et al. [41] ont simulé numériquement l'influence de plusieurs paramètres physiques clés de la filtration et ont validé les simulations numériques par l'expérience. Par exemple, le flux de perméat de l'eau à travers une membrane a été simulé par CFD 3D en utilisant dans l'équation de Darcy la distribution de pression prédite au lieu des pressions moyennes à l'entrée et à la sortie du module de filtration [40]. Ahmad et al. [41] ont simulé, sous FLUENT, la concentration de polarisation et le coefficient de transfert de masse pour différentes conditions opératoires dans un canal étroit avec une paroi poreuse. Leurs résultats numériques ont été validés par comparaison avec les données de la littérature. Bacchin et al. [42] ont simulé l'accumulation des colloïdes à la surface de membrane en filtration tangentielle en intégrant les propriétés

physico-chimiques spécifiques aux suspensions colloïdales déterminées expérimentalement. Le flux critique est déterminé par simulation numérique et comparé avec celui mesuré expérimentalement durant la filtration d'une suspension de particules de latex.

Delaunay et al. [43] ont, quant à eux, développé une nouvelle technique expérimentale basée sur la spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR) pour quantifier le colmatage causé par les protéines durant l'ultrafiltration du lait écrémé. Ces résultats expérimentaux ont été validés par simulation numérique des profils de vitesse et la distribution des protéines sur la membrane. Dans ce cas, la simulation numérique a permis de valider cette nouvelle technique de quantification de colmatage.

Les techniques numériques assistées par ordinateur (CFD) ont été utilisées pour modéliser l'écoulement de flux, les propriétés hydrodynamiques dans les différentes géométries de modules membranaires et le colmatage. Le **Tableau I.3-1** est une synthèse de quelques applications.

Tableau I.3-1: Résumé de quelques techniques modélisant le colmatage

Auteur	Technique
Rouvet et al. [44]	Développement d'une prédiction de la réduction de la perméabilité de membrane durant l'UF
Rahimi et al. [40]	Développement d'un CFD tridimensionnelle pour modéliser et prédire le flux de perméat à travers une membrane de MF
Ahmad et al. [41]	Développement d'un CFD bidimensionnelle pour prédire la concentration de polarisation et le coefficient de transfert de masse dans un canal poreux
Bacchin et al. [42]	Développement d'un CFD bidimensionnelle qui modélise le transfert de masse qui décrit l'accumulation des colloïdes sur la surface membranaire durant la filtration tangentielle
Pak et al. [45]	Une technique numérique 2D pour suivre la trajectoire d'une particule en régime laminaire sur une surface perméable en utilisant la méthode des éléments finis
Delaunay et al. [43]	Validation par CFD des résultats expérimentaux décrivant le plan de dépôt et les profils de vitesse
Yee et al. [46]	Modélisation dynamique de la chute de flux durant l'UF du lactosérum

Malgré les avancées réalisés dans les simulations numériques, la disponibilité de plusieurs logiciels commerciaux et l'important progrès réalisé au niveau de la compréhension de la formation du colmatage au niveau des membranes et son effet sur ses cinétiques, les modèles développés nécessitent d'être validés et perpétuellement améliorés par les résultats expérimentaux. Toutefois, peu de données sont disponibles sur les phénomènes ayant lieu à l'échelle microscopique. Les voies expérimentales classiques ne permettent pas d'explorer le dépôt au niveau du filtre sans d'altérer l'écoulement et les interactions entre les composants d'un dépôt.

I.4 Techniques de caractérisation du dépôt

L'étude de la construction des dépôts implique la compréhension des phénomènes ayant lieu dans trois régions : (i) la membrane (ii) l'interface membrane/liquide avec la présence possible d'un dépôt (iii) la partie fluide. La performance de la séparation est déterminée par les caractéristiques de ces trois régions et leurs interactions [47]. Plusieurs travaux ont été menés concernant l'étude du dépôt. L'approche classique évalue le colmatage de manière globale par le biais du suivi des paramètres physiques tel que la pression, la perméabilité... au cours des essais de filtration. Cependant, le suivi local, « *in situ* », en temps réel de la formation du dépôt est indispensable pour comprendre les mécanismes impliqués afin de mieux le maîtriser. Plusieurs techniques ont été développées dans ce sens : elles sont énumérées et évaluées de manière exhaustive dans les revues de Chen et al. [47] et Meng et al. [48]. De façon générale, elles peuvent être répertoriées selon différents critères :

- Non-invasif : la génération et la détection du signal permettant la caractérisation du dépôt doivent être externes au module de filtration.
- Temps réel : l'étude de phénomènes dynamiques nécessite de mettre en œuvre des techniques qui ont des temps de réponse très rapide
- Résolution : afin d'analyser l'organisation et la structure des dépôts, elle doit être de l'ordre de grandeur ou plus petite que la taille des particules. Pour les méthodes optiques, elle dépend de la longueur d'onde du signal appliqué.

En pratique, il est difficile d'observer en temps réel des événements au voisinage d'un pore avec une bonne résolution. La plupart des techniques de caractérisation des dépôts nécessitent la fabrication de dispositifs spécifiques.

On s'intéresse dans cette revue aux techniques les plus couramment utilisées telles que la microscopie électronique à balayage, la microscopie à force atomique... ainsi qu'à celles qui apparaissent les plus pertinentes pour l'étude du dépôt à l'échelle de la particule.

I.4.1 Méthodes non optiques

Les techniques qui ne reposent pas sur des principes d'optique présentent plusieurs avantages : leur résolution peut être de l'ordre de l'angström, les acquisitions sont rapides et elles ne nécessitent pas de dispositifs de filtration spécifiques. Selon leur principe de fonctionnement, elles permettent l'étude de phénomènes à la surface de la membrane et au niveau du dépôt (réflectométrie ultrasonique [49], Spectroscopie d'impédance électrochimique [50]), au niveau de la région de transport du liquide (tomographie axiale calculée par ordinateur (TACO) [51]) ou au niveau des trois zones simultanément (résonance nucléaire magnétique [52]). Néanmoins, ces méthodes sont complexes et l'interprétation des données peut être délicate.

I.4.1.1 Réflectométrie ultrasonique

C'est une des premières techniques utilisées dans la caractérisation du dépôt. Lorsqu'une onde sonore rencontre une interface, une partie est transmise et l'autre est réfléchi. L'analyse de ces ondes permet de mesurer la position ou le déplacement d'une interface. De plus, elle peut également fournir des informations sur les caractéristiques physiques des milieux traversés [47]. Cette technique a été utilisée par Li et al. [53] pour caractériser les différentes interfaces d'un dépôt formé sur une membrane plane durant le traitement d'un effluent (**Figure I.4-1**). La différence entre le temps d'arrivée et l'amplitude du signal réfléchi pour une membrane propre et une membrane colmatée a permis de déterminer l'épaisseur et la densité du dépôt.

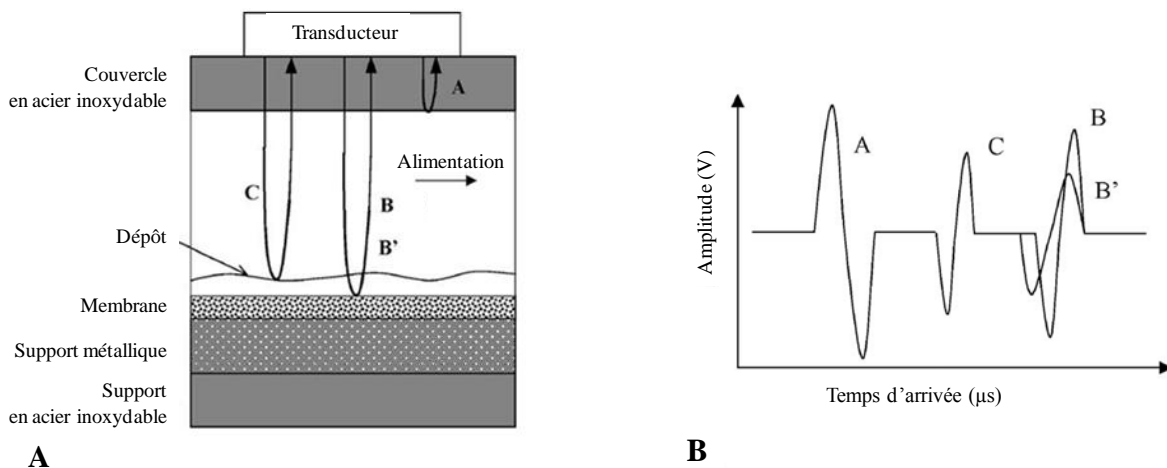


Figure I.4-1 : Principe de la réflectométrie ultrasonique :

(A) : Diagramme de la réflexion du signal sur une section d'une membrane colmatée,

(B) Signal de l'onde sonore réfléchi [53]

Mairal et al. [49] ont utilisé cette technique pour déterminer, *in situ*, le colmatage pendant l'osmose inverse de solutions de sulfate de calcium. L'amplitude des mesures a permis le suivi qualitatif de l'évolution du dépôt. Toutefois, cette technique n'était pas assez précise pour mesurer l'épaisseur du gâteau.

1.4.1.2 Imagerie par résonance magnétique nucléaire (RMN)

Cette technique, issue du domaine médical, permet la caractérisation chimique et spatiale du colmatage, la visualisation de l'écoulement et la détermination de la concentration locale du dépôt. Son principe repose sur l'excitation et la relaxation de protons dans un échantillon sous l'influence d'un champ magnétique externe. La modification de l'alignement des protons sous l'effet d'une fréquence magnétique provoque une résonance. Lors du retour à leurs états d'équilibre, les protons émettent une onde électromagnétique dont l'intensité est proportionnelle au nombre de protons présents dans l'échantillon analysé [47]. Selon ce principe, la structure d'un dépôt de particules en silicium (10 nm) et sa fluidité ont été déterminés par Airey et al. [52].

Schmitz et al. [54] ont aussi utilisé cette technique pour observer la croissance d'un dépôt, *in situ*, de suspensions de bentonites durant la filtration tangentielle sur fibre creuse. Les effets des conditions hydrodynamiques sur la porosité ainsi que sur l'épaisseur des dépôts ont été déterminés.

Malgré ses potentialités prometteuses, l'intérêt de la RMN reste limité car le champ d'observation est faible et l'analyse des données est complexe.

I.4.2 Méthodes optiques

Les techniques optiques utilisent généralement un microscope associé à un appareil photo ou une caméra vidéo. Elles nécessitent souvent un dispositif expérimental spécifique et parfois un type particulier de membranes [47]. L'utilisation d'un microscope confocal permet d'examiner le dépôt en profondeur, améliore le contraste, la résolution et la précision des images.

I.4.2.1 Microscopie électronique à balayage (MEB)

Un faisceau d'électrons balaie la surface de l'échantillon à analyser et les interactions entre ces électrons incidents (primaires) et la matière génèrent différents signaux. Le traitement de ces signaux aboutit à une vue en trois dimensions (3D) avec une très bonne résolution (de l'ordre du nanomètre) permettant d'étudier la topographie de l'objet. Cette méthode, très utilisée pour observer la surface du dépôt, permet d'identifier la taille, la forme ainsi que la nature de l'élément colmatant (bacille, bactérie filamenteuse...). Fan et Huang ont, ainsi, identifié deux strates dans le dépôt formé dans un bioréacteur à membrane durant le traitement d'une eau usée municipale [55]. La première, en contact avec la membrane, est de structure très poreuse en forme de toile et de nature hydrophile et la seconde couche plus compacte, est similaire à un gel (**Figure I.4-2**).

Boissier et al. [56] ont utilisé la MEB pour étudier l'impact respectif des particules présentes dans le vin rouge (*Saccharomyces cerevisiae*, bactéries lactiques et colloïdes) sur les performances de la filtration tangentielle sous différentes conditions hydrodynamiques et notamment pour estimer la réversibilité du dépôt. Ils ont conclu que les levures seules forment des dépôts toujours réversibles. Par contre, le mélange des levures avec les autres composants du vin synthétique induit des dépôts irréversibles.

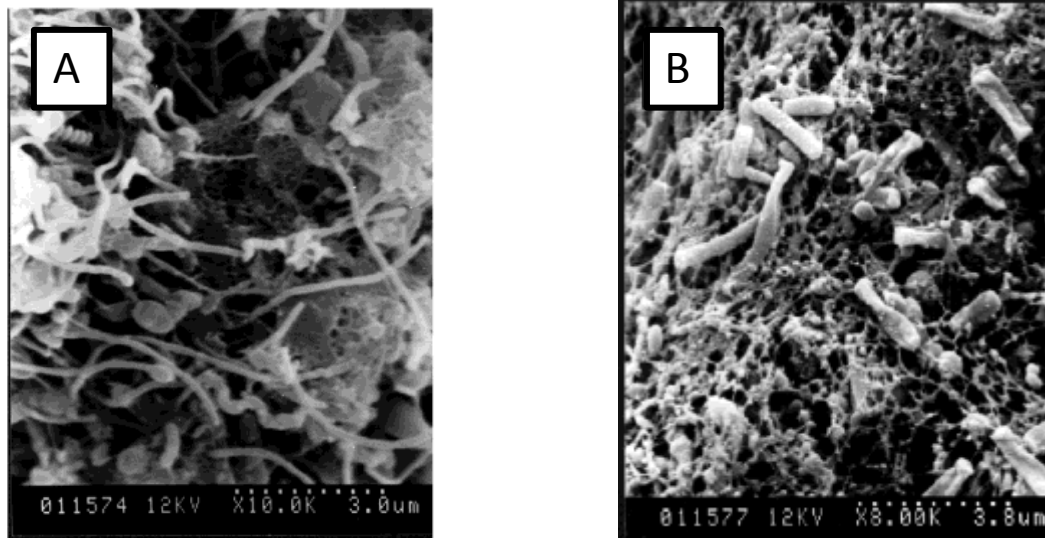


Figure I.4-2 : Observation du dépôt par MEB

(A) : dépôt poreux (10000×), (B) dépôt compact (8000×) [55]

Cependant, la microscopie électronique à balayage ne permet ni d'explorer l'intérieur du dépôt ni de réaliser des observations en temps réel. En effet, avant son observation, la membrane doit être retirée du module et subir différents traitements (déshydratation, métallisation à l'or...). Ces traitements peuvent déstructurer les dépôts. Les microscopes à balayages dit «environnementaux» sous faible vide permettent des observations directes avec peu, voire aucun traitement préalable, néanmoins, du fait du principe même de l'appareil, l'observation de la formation du dépôt en ligne n'est pas possible [26].

1.4.2.2 Microscopie à force atomique (AFM)

La microscopie à force atomique (AFM) est une technique de plus en plus utilisée dans l'étude du colmatage qui fournit des images tridimensionnelles de haute résolution et des informations quantitatives sur la morphologie du gâteau. Elle permet, par exemple, de mesurer les interactions microorganismes / membrane et de détecter l'adhésion entre microorganismes [48]. Cette technique permet de mesurer les forces s'exerçant entre une pointe portée par un « cantilever » (**Figure I.4-3**) et l'échantillon (forces de Van der Waals, forces capillaires, forces électrostatiques...) et ainsi d'évaluer la rugosité et les propriétés superficielles d'une membrane ou d'un dépôt [48]. Tansel et al. [57] ont, ainsi, caractérisé le colmatage induit par un effluent filtré par quatre types de membranes. Le changement de la rugosité superficielle du matériau membranaire est un indicateur de la formation d'un dépôt. Ces travaux ont montré que la rugosité superficielle du dépôt dépend du matériau

membranaire et de la composition chimique du fluide filtré (polysaccharides, protéines...). Cette technique peut également être mise en œuvre pour déterminer les interactions à l'échelle moléculaire entre membrane / agent colmatant, agent colmatant / agent colmatant et agent colmatant / produit nettoyant et étudier les phénomènes prenant place durant le colmatage et le nettoyage des membranes [58]. Bowen et al. [59] ont ainsi comparé la force d'adhésion de deux agents colmatants (sérum albumine bovine BSA) et la cellule de levure) avec deux types de membranes afin de développer des stratégies pour limiter le colmatage. Compte tenu de la diversité et de l'hétérogénéité des produits analysés (exemple des suspensions contenant des floccs de 10 à 1000 μm), différents types de pointes peuvent être utilisés pour étudier un même échantillon, ce qui peut générer une erreur importante de mesure [48]. Yamamura et al. [60] ont comparé la force adhésive entre un dépôt formé par une matière organique naturelle et une membrane et ont montré que la force obtenue avec une sonde à pointe hydroxyle mesure une force adhésive plus importante qu'avec une sonde à pointe carboxyle.

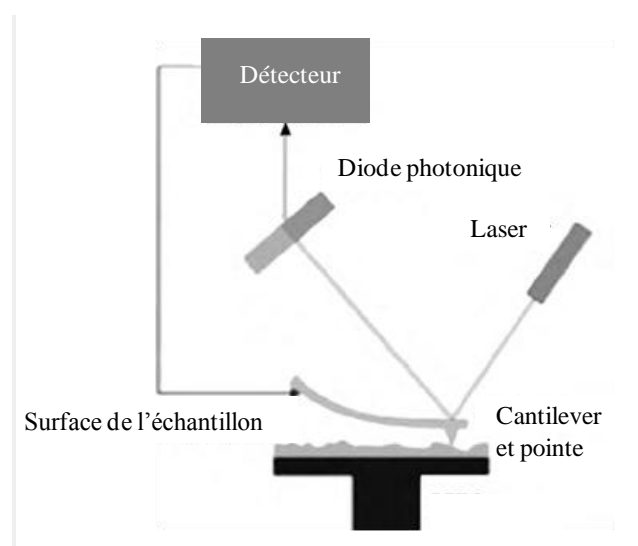


Figure I.4-3 : Illustration du principe de l'AFM [48]

I.4.2.3 Observation directe

Les techniques d'observation directes reposent sur l'utilisation de microscopes équipés de caméra vidéo permettant un suivi, en temps réel et *in situ* de la formation d'un dépôt. Selon la disposition du microscope par rapport à la membrane et à la chambre de filtration, plusieurs configurations sont possibles.

Li et al. [61] ont été les premiers à observer des dépôts en utilisant une membrane transparente et en plaçant l'objectif du côté du perméat (DOTM : Direct Observation Through Membrane). Des dépôts de particules de latex de 12 μm et de 3 μm ainsi que de levures et de

bactéries ont été observés dans différentes conditions opératoires [47]. La résolution de cette technique est de l'ordre de 1 μm et peut être améliorée en utilisant un microscope à épifluorescence [62]. Dans ces travaux les observations n'ont été possibles qu'en utilisant des membranes et des dispositifs de filtration transparents et seule la première couche déposée sur la membrane est analysée [48].

Mores et Davis ont pu observer la partie supérieure du dépôt en plaçant le microscope du côté de l'alimentation (DVO : Direct Visual Observation) [47]. Cette nouvelle configuration leur a permis d'observer le dépôt et le nettoyage de levures réhydratées (*Saccharomyces cerevisiae*) sur deux types de membranes [63]. Cette étude a montré que le dépôt des levures est moins uniforme sur les membranes en acétate de cellulose que sur les membranes inorganiques. De plus, les auteurs ont suivi les étapes de nettoyages en fournissant les premières données sur l'efficacité du décolmatage des membranes en fonction du type de membrane, de la nature du dépôt et des conditions hydrodynamiques. De plus, cette méthode peut être utilisée avec les membranes commerciales telles que les fibres creuses [48].

Néanmoins, dans ces différentes configurations, seule la première ou la dernière couche peuvent être caractérisées. Le Clech et al. [64] ont donc développé une nouvelle chambre de filtration basée sur le dispositif proposé par Li et al. [61] pour observer, « *in situ* », la croissance verticale du dépôt (**Figure I.4-4**). L'observation des gâteaux formés par des suspensions bidisperses d'alginate / bentonite et alginate / bactéries a montré que les dépôts sont structurés en trois zones: stagnante, étendue et fluide, qui restent, néanmoins, délicates à distinguer. De plus, les mesures de hauteur, réalisées en supposant que l'épaisseur du dépôt est uniforme et restent tributaires de l'appréciation de l'opérateur.

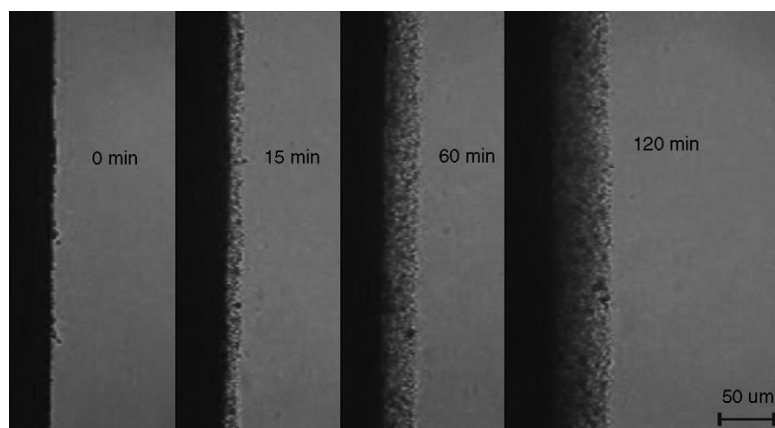


Figure I.4-4 : Observation directe de la formation d'un dépôt bidisperse (alginate/bentonite) sur une fibre creuse [64]

1.4.2.4 La trigonométrie laser

Cette technique optique repose sur le principe de la réflexion d'un rayon laser lorsqu'il entre en contact avec la surface de la membrane ou celle du dépôt. L'angle de ce rayon change en fonction de l'épaisseur du dépôt ce qui permet de l'estimer. La trigonométrie laser nécessite, une chambre de filtration munie d'une fenêtre d'observation, mais sa mise en œuvre est simple [47].

Mendret et al. [65] l'ont utilisé pour la caractérisation de dépôt de particules de bentonites, « *in situ* ». Cette technique permet d'évaluer la variation spatio-temporelle de l'épaisseur du dépôt de 10 μm à des centaines de micromètres avec une résolution de 3 μm . De plus, ils ont montré que la structure de ce type de dépôt est non homogène dans son épaisseur. Comme illustré à la **Figure I.4-5**, le suivi de l'évolution de l'épaisseur du dépôt locale en fonction de la masse de particules déposée pour les trois pressions différentes met en évidence l'existence d'une limite de compressibilité, en terme de quantité de matière déposée par unité de surface filtrante. Au dessous de 35 g/m^2 de particules déposées, l'épaisseur de dépôt augmente linéairement en fonction de la masse du dépôt indépendamment de la pression. Par contre, au delà de cette masse de dépôt, la structure du colmatage dépend de la pression transmembranaire appliquée.

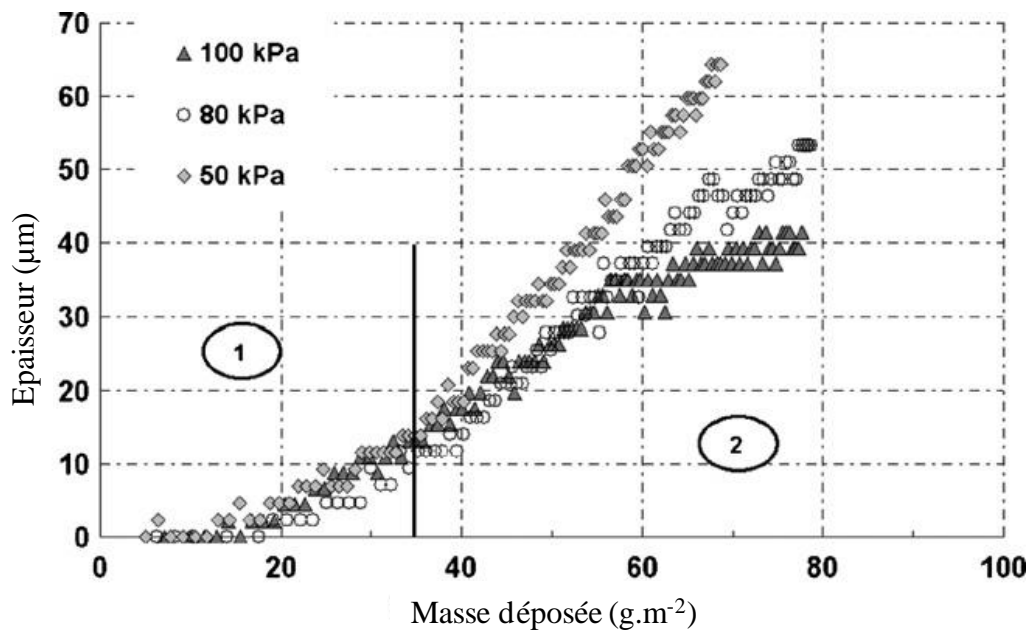


Figure I.4-5 : Evolution de l'épaisseur locale du dépôt en fonction de la masse des particules déposées ($C=1\text{g L}^{-1}$, $T=20^\circ\text{C}$) [65]

Altmann et Ripperger ont, aussi, suivi la formation d'un dépôt de particules de silice de 0,24-1,5 mm de diamètre en déterminant sa hauteur au cours du temps [66]. Les observations expérimentales montrent que le dépôt atteint 90% de l'épaisseur maximale en 5 minutes tandis que le flux continue à diminuer pendant 30 minutes. Les plus grosses particules se déposeraient en premier. Ensuite, les plus petites se déposant et contribueraient à la chute du flux de filtration mais sans augmentation significative de la hauteur de gâteau [47]. Néanmoins, la faible résolution de cette méthode est une limite importante.

Schluep et Widmer ont mesuré, par cette méthode, avec une précision de $\pm 2 \mu\text{m}$, la hauteur du dépôt de levures formé en filtration tangentielle sur membranes millipore [67]. Ces données ont été utilisées dans un modèle numérique simulant la formation du dépôt et le déclin de flux. L'écart entre la simulation numérique et les données expérimentales est de $\pm 20\%$.

1.4.2.5 Capteur optique

Hamachi et Mietton-Peuchot [68] ont développé une nouvelle méthode utilisant un capteur optique pour déterminer l'épaisseur du dépôt formé durant la microfiltration tangentielle de suspensions de bentonite. Cette technique a permis la mesure, *in situ*, de la hauteur du dépôt et le suivi de son évolution durant la filtration. Pour ce faire, un rayon laser est concentré sur le plan focal qui correspond à la membrane et détecté par le photomultiplicateur (**Figure I.4-6**). A fur et à mesure que le dépôt se forme, l'absorption de lumière correspondante de l'intensité focale diminue. Ainsi, la variation de l'intensité de signal correspond directement à l'épaisseur de gâteau. Le protocole de calibrage réalisé avec des dépôts de hauteurs connues permet de déterminer la corrélation entre intensité du laser et hauteur du gâteau. L'appareillage expérimental consiste en un module membranaire tubulaire muni de deux fenêtres optiques par lesquelles le rayon laser traverse tangentiellement à la surface de la membrane. Ensuite, le rayon lumineux est capturé par un photomultiplicateur qui convertit l'intensité lumineuse en une tension équivalente. Les suspensions de modèles de particules de bentonite de taille moyenne $2,45 \mu\text{m}$ (de $0,77$ à $7,54 \mu\text{m}$) étaient filtrées par une membrane de $0,2 \mu\text{m}$ de taille de pores. Les détails de l'appareillage utilisé ainsi que le protocole expérimental sont détaillés par Hamachi et Mietton-Peuchot [68]. L'étude de l'effet des paramètres opératoires sur le colmatage a montré que l'épaisseur du gâteau augmente avec l'augmentation de la pression transmembranaire et la concentration de la suspension filtrée mais diminue avec l'augmentation de la vitesse tangentielle [69]. La résistance spécifique et la porosité des dépôts formés sont calculées, respectivement, par la loi de Darcy et la loi de

Carman–Kozeny. Pour une épaisseur de dépôt donnée, la résistance de la couche de gâteau accroît avec l'augmentation de la pression transmembranaire ce qui a été attribuée à la compaction du dépôt sous l'effet de la pression.

Cette technique se révèle être une méthode efficace de caractérisation de colmatage qui permet la mesure de l'épaisseur de la couche de gâteau, *in situ*, et en temps réel sans perturbation des phénomènes menant au dépôt des particules. Elle peut être utilisée pour d'autres suspensions à condition d'utiliser des particules qui absorbent la lumière du laser. Toutefois, la concentration de la suspension constitue le facteur de limitation de cette technique.

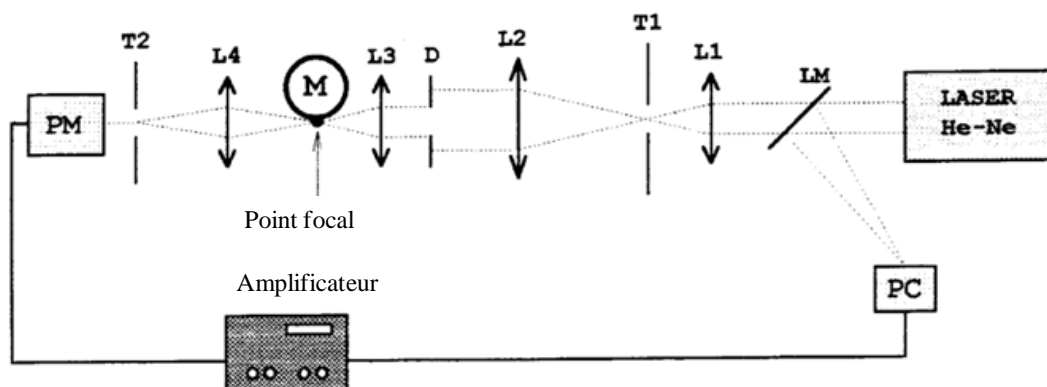


Figure I.4-6 : Diagramme schématisé du capteur optique (L1, L2, L3, L4: plan convexe ou lentilles biconvexes; T1, T2: trous microscopiques; D: diaphragme; PM: photomultiplicateur; PC: cellule photonique; M: membrane; LM: bande en verre).

Les méthodes de caractérisation des dépôts ont prouvé leur intérêt dans la compréhension des mécanismes de colmatage et le développement et la validation de modèles numériques simulant l'évolution du flux et la construction du dépôt. Leur généralisation se heurte, cependant, à certaines limitations en particulier liées à la concentration de la suspension filtrée, à la profondeur du champ d'observation et à leur résolution spatiale. En outre, les observations sont limitées à des plans bidimensionnels (2D), du fait de la faible profondeur de champ des microscopes utilisés. Les épaisseurs des dépôts sont déterminées en supposant leur homogénéité. A notre connaissance, aucune méthode permettant de déterminer, *in situ*, la structure interne du dépôt et sa caractérisation en 3D n'a été décrite.

Dans le cas de dépôts biologiques de microorganismes, en plus des limitations techniques, une difficulté supplémentaire apparaît car ces particules vivantes peuvent évoluer en fonction de l'environnement. Elles peuvent changer de morphologie, se multiplier, mourir... et leurs propriétés de surfaces peuvent se modifier. Pour faciliter l'étude des

mécanismes de colmatage pour des suspensions de microorganismes, des modèles de particules inertes sont généralement utilisés. Cependant, afin de prendre en compte la complexité du vivant, des marquages fluorescents peuvent être utilisés pour localiser et évaluer l'activité métabolique des microorganismes. Des techniques basées sur de la microscopie de fluorescence pourraient, ainsi, être proposées pour étudier la structure globale de dépôts inertes ou biologiques.

I.5 Caractérisation du dépôt par microscopie de fluorescence

Le marquage par fluorescence combiné à l'instrument d'imagerie approprié, est une technique sensible et quantitative qui est largement utilisée en biologie moléculaire et biochimie dans des applications expérimentales, analytiques... La détection de fluorescence présente plusieurs avantages dont les plus importants sont décrits ci-dessous [71].

- Sensibilité : les marqueurs fluorescents sont beaucoup plus sensibles que des méthodes colorimétriques classiques. Ainsi, des sondes de fluorescence adaptées permettent la détection de nombreuses molécules biologiques.

- Détection simultanée de différents marqueurs : la détection de fluorescence multicolorée permet d'analyser plusieurs cibles en utilisant des marqueurs fluorescents spectralement résolus. Cet avantage permet de détecter et d'analyser deux cibles ou plus dans un même échantillon ce qui réduit les biais dus à l'évolution temporelle de l'échantillon vivant lors d'analyses consécutives.

- Stabilité : Grâce à leur longue durée de vie, les réactifs fluorescents peuvent être préparés et utilisés sur de longues périodes, minimisant ainsi les erreurs dues à la variabilité du réactif entre les essais.

I.5.1 Principe de la fluorescence

La fluorescence est un phénomène qui résulte de l'excitation lumineuse, à une longueur d'onde donnée, de certaines molécules appelées fluorochromes et qui se traduit par une émission de rayons lumineux à une autre longueur d'onde [70].

La **Figure I.5-1** illustre les niveaux d'énergie d'un fluorochrome. Dans des conditions normales, le niveau d'énergie des électrons a une valeur minimale, S_0 , (état fondamental électronique). Lorsqu'une molécule absorbe à une longueur d'onde λ , elle peut passer de l'état stable, S_0 , à un état excité supérieur S_1 ou S'_1 si l'énergie des photons est égale exactement à la différence d'énergie entre le niveau fondamental et l'un des sous-niveaux d'énergie de l'un

des états excités. S_1 et S_1' sont respectivement le premier et le second état électronique excité [71].

Toute molécule fluorescente est caractérisée par des spectres d'absorption et d'émission qui lui sont propres et qui représentent la distribution de probabilité des transitions énergétiques. Ces spectres se trouvent généralement dans les régions du visible et de l'ultraviolet du spectre électromagnétique (250 - 600 nm) et sont caractéristiques de la structure énergétique des molécules. Comme une partie uniquement de l'énergie absorbée peut être émise sous forme de rayonnement, la longueur d'onde du maximum d'excitation est inférieure au maximum d'émission et la différence entre les deux pics est appelée décalage de Stokes. Le spectre d'émission de fluorescence est approximativement une image inversée (effet miroir) du spectre d'absorption. Toutefois, cette symétrie n'est pas toujours observée. En effet, les dissimilitudes entre les deux spectres peuvent révéler l'existence de plusieurs formes de la molécule considérée, caractérisées par des longueurs d'onde d'absorption et/ou d'émission différentes [71].

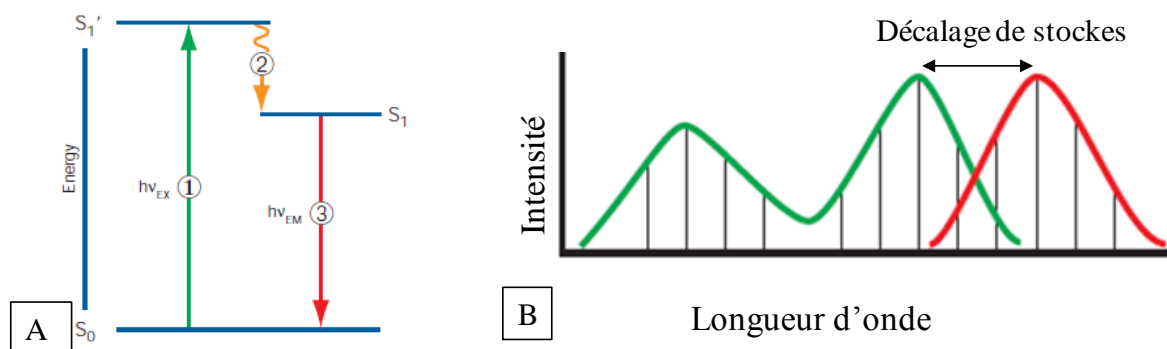


Figure I.5-1 : (A) : Diagramme de Jablonski (❶ Excitation; ❷ Relaxation; ❸ Emission) ;
(B) : Exemple des spectres d'excitation et d'émission de fluorescence [72]

I.5.2 Marquage des microorganismes

Les caractéristiques de l'émission de fluorescence (spectre, rendement et durée de vie de fluorescence) dépendent fortement de l'environnement local de la molécule. Parmi les facteurs exogènes les plus influents, on dénombre la température, la force ionique, le pH, le temps d'incubation, l'intensité de la lumière d'excitation et sa durée, le nombre de cycles d'excitation... l'effet le plus significatif est la photoblanchiment ou « photobleaching » [73]. Ces phénomènes qui induisent une baisse du rendement de fluorescence sans modifier le spectre d'émission, sont liés à une perte de la fluorescence « bleaching », une interaction entre

différents fluorochromes « quenching » ou encore le transfert d'énergie à des composés non fluorescents tel que l'oxygène.

Le choix d'un fluorochrome doit permettre d'obtenir un signal spécifique, durable et fort tout en respectant les fonctions cellulaires. Dans la cellule vivante, le fluorochrome peut permettre d'accéder à des paramètres fonctionnels reflétant des modifications rapides comme des activités enzymatiques (peroxydases, déshydrogénases...), des mouvements ioniques (calcium, pH...), la perméabilité membranaire ou encore des paramètres structuraux (macromolécules, ADN, protéines du cytoplasme, molécules constitutives de faible taille antigène membranaire, cholestérol...). Le **Tableau I.5-1** répertorie quelques fluorochromes classiquement utilisés en microscopie de fluorescence [71].

Tableau I.5-1: Quelques fluorochromes utilisés en microscopie de fluorescence [71]

Immunofluorescence	Cy 2 (Cyanine 2), FITC, Cy 3,5, TRITC, lissamine, rhodamine,
ADN	Iodure de propidium, Syto 16, DAPI
Mitochondrie,	Rhodamine 123, DiOC ₆ , DiOC ₇
Paroi cellulaire	Calcofluor, FM1-43, FM4-64
Viabilité	fluorescéine diacétate
Protéines autofluorescentes	CFP, GFP, YFP, DsRed, DsRed 2, HcRed 1
Divers	LysoTracker, Acridine Orange, Neutral Red, Lucifer Yellow, chlorophylle

Le choix d'un fluorochrome et son utilisation optimale s'appuient sur la connaissance de son mode d'action et de ses caractéristiques physico-chimiques (propriétés spectrales, brillance, photo-stabilité, influence de l'environnement...).

I.5.3 Microscopie à fluorescence

En vue de l'intérêt croissant de la microscopie à fluorescence, plusieurs types de microscopes associés à des logiciels de traitement d'images 2D et 3D ont été développés. Pour toute observation microscopique, classique ou à fluorescence, le pouvoir de résolution est le paramètre clé. La résolution, ou pouvoir de séparation, est la distance minimale entre deux points contigus pour qu'ils soient correctement discernés par un système de mesure ou d'observation [74]. Il dépend de l'ouverture numérique de l'objectif (N.A.), de la longueur d'onde d'excitation (λ) et de l'indice de réfraction du milieu (n) [75]. Pour les observations en

2D, les limites de résolution, δ_x et δ_y dans les directions x et y, respectivement, sont déterminées par:

$$\delta_x = \delta_y = 0.61 \frac{\lambda}{\sqrt{2}(N.A.)} \quad \text{Équation I.5-1}$$

Durant l'acquisition d'images tridimensionnelles, la résolution axiale (selon l'axe z), est définie le long de l'axe optique du microscope, perpendiculairement au plan dans lequel on a considéré la résolution latérale [75]. la résolution dans la direction z, δ_z , s'écrit :

$$\delta_z = 0.61 \frac{1.4 n \lambda}{(N.A.)^2} \quad \text{Équation I.5-2}$$

I.5.3.1 Microscope à fluorescence 2D : Microscopie à épifluorescence

Un microscope équipé en épifluorescence est un microscope photonique généralement pourvu de jeux de filtres correspondant aux fluorochromes habituellement utilisés. Chaque jeu est constitué d'un filtre d'excitation fixant la longueur d'onde incidente, d'un miroir dichroïque et d'un filtre d'émission permettent de sélectionner la longueur d'onde émise par l'objet excité. L'observation peut se faire en direct ou par une caméra (**Figure I.5-2**). En fluorescence, seuls les objets porteurs d'un marqueur excité sont visibles, les autres objets de l'échantillon doivent être observés en lumière blanche.

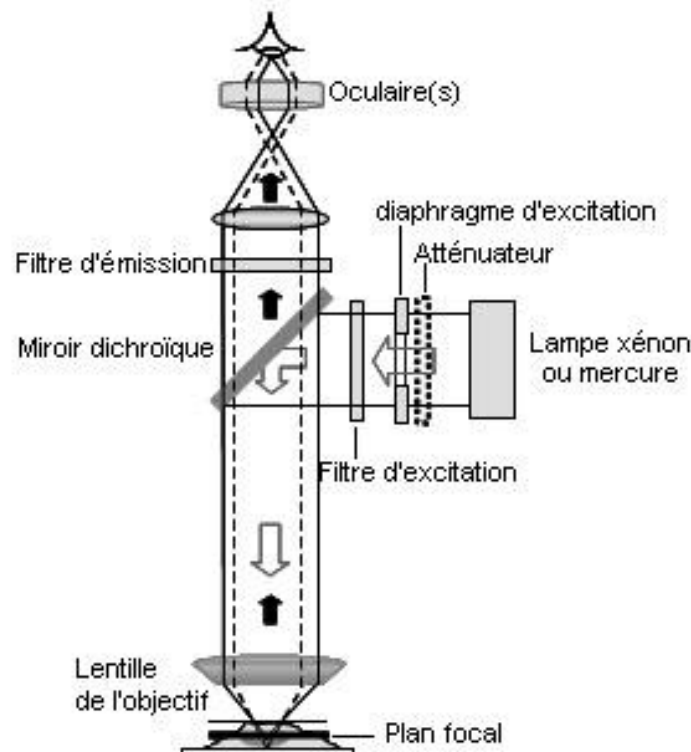


Figure I.5-2 : Détails d'un microscope à épifluorescence

Li et al. [62] ont, ainsi, adapté la microscopie à épifluorescence pour visualiser un dépôt de bactéries (SW8) de taille inférieure à 1 μm colorées avec l'Acridine Orange et étudier leurs dépôt et leur décolmatage.

Toutefois, cette technique pertinente pour des dépôts minces, ne permet pas d'étudier des gâteaux épais. Dans ce cas, les images comportent un bruit de fond important dû à la fluorescence provenant des plans en dehors du plan focal et pouvant atteindre plus de 90 % du signal global [76]. Ce bruit réduit le ratio de signal / bruit de l'image et donne des images peu claires [77].

Pour améliorer la qualité des observations et visualiser des dépôts plus épais, la microscopie à fluorescence tridimensionnelle a été développée.

1.5.3.2 Microscope à fluorescence 3D.

Différentes techniques ont été développées pour étudier *in-situ* et même *in vivo* des agrégats ou des dépôts : la microscopie mono-photonique comme la microscopie confocale et la microscopie multi-photonique.

Microscopie confocale à balayage laser

Le microscope confocal à balayage laser se distingue du microscope à fluorescence classique par l'optimisation du trajet optique en chaque point de l'image obtenue par le balayage de l'ensemble de l'échantillon observé. Afin d'intensifier le signal émis tout en limitant l'excitation de l'échantillon, des lasers sont utilisés comme source lumineuse et un photomultiplicateur (PMT) comme détecteur [78].

Le balayage sur une plage spectrale préalablement définie, permet l'acquisition de séquences d'images spectrales qui sont, ensuite, traitées pour séparer les émissions provenant des différents marqueurs fluorescents (**Figure I.5-3**). Un diaphragme sur le trajet du laser d'excitation permet un éclairage focalisé en un point unique. Le mouvement de deux miroirs galvanométriques permet le balayage spatial en x et en y de l'échantillon et l'obtention de l'image bidimensionnelle d'un plan focal. Un diaphragme ajustable (pinhole) est placé devant le détecteur pour limiter la lumière émise en dehors du plan focal. Le mouvement vertical de la platine déplace l'objet en z dans l'espace. En observant ainsi des plans successifs, on obtient alors une série d'images dont chacune correspond à une image xy d'un plan focal donné et servira à reconstituer l'image en 3D de l'objet. Les filtres sont sélectionnés, de façon à encadrer les spectres d'émission de chacun des marqueurs avant leur détection par le photomultiplicateur pour former l'image par conversion du signal lumineux (photons) en

signal électronique (électrons) qui est alors amplifié. Le microscope confocal est piloté par un logiciel informatique, qui permet de régler les paramètres de l'acquisition et d'enregistrer les données acquises. Plusieurs logiciels de traitement d'image permettent le traitement et la visualisation de l'échantillon en 3D.

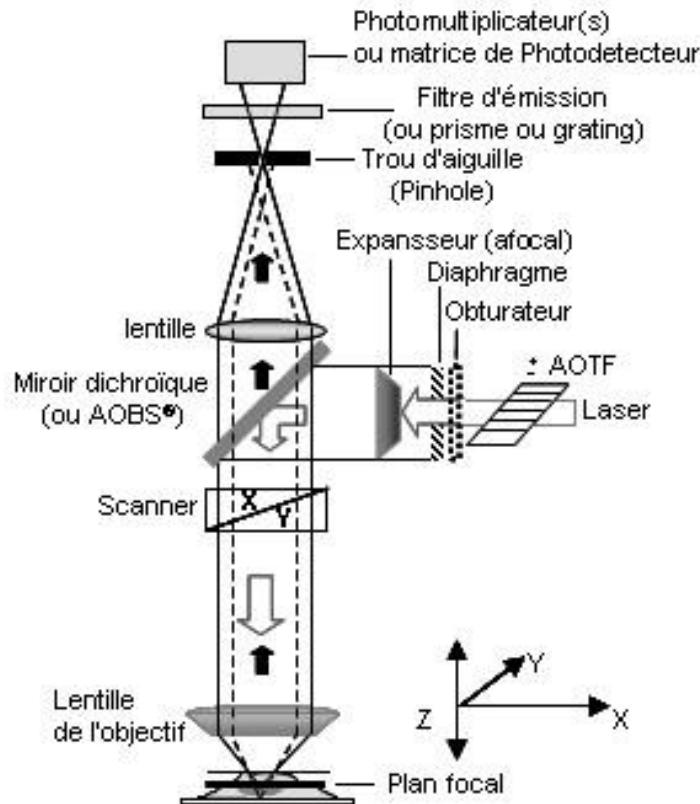


Figure I.5-3 : Détails d'un microscope confocale

Pour caractériser un échantillon, deux méthodes d'acquisition sont utilisées :

- L'imagerie spectrale qui repose sur l'utilisation de plusieurs lasers et des filtres passe-bande spécifiques pour chaque fluorochrome qui doivent émettre à des longueurs d'ondes distinctes. Elle permet de visualiser plusieurs marqueurs dans un même échantillon de manière successive ou simultanée. Il est, ainsi, possible d'étudier précisément des colocalisations en superposant les images obtenues dans un même plan focal pour les différents fluorochromes.

- L'imagerie temporelle permet d'apprécier l'évolution de l'échantillon et repose sur l'acquisition des images relatives à un plan focal présélectionné à des intervalles de temps supérieurs au temps de balayage d'une image (de l'ordre de 10 s).

Généralement, un intérêt de l'imagerie en microscopie confocale est de pouvoir combiner les deux techniques. Toutefois, si l'échantillon analysé est épais et/ou de structure dense, la pénétration du laser peut être limitée et le temps d'acquisition est plus long. Ce

temps est également plus important lorsque l'échantillon est marqué par plusieurs fluorochromes car dans ce cas, l'acquisition s'opère en mode séquentiel qui consiste à balayer successivement chaque plan focal par les différents lasers correspondant à chaque fluorochrome. Pour cela, il faut, cependant, s'assurer que les propriétés spectrales des marqueurs sont bien distinctes. Le temps d'acquisition peut constituer un réel verrou pour cette technique en particulier si l'échantillon évolue rapidement au cours du temps ou encore si les marqueurs sont instables et risquent de subir un photoblanchiment.

Durant les dernières années, plusieurs travaux utilisant la microscopie confocale ont été conduits pour caractériser les membranes et explorer la construction des dépôts.

Ainsi, Marroquin et al. [74] ont analysé la morphologie de membranes symétriques et asymétriques de 0,22 à 8 μm avec une haute résolution mais la pénétration du laser n'a pas pu excéder 0,4 μm .

Ferrando et al. [79] ont, quant à eux, réussi à observer jusqu'à 3 μm à l'intérieur des pores des protéines marquées (BSA et ovalbumine) durant une filtration sur membranes de 0,8 μm en polycarbonate. L'utilisation du microscope, simultanément, en mode fluorescent et en lumière blanche a permis l'identification des protéines et leur localisation sur la membrane et dans les pores. Ensuite, ils ont calculé le taux de couverture des pores afin de caractériser la morphologie du dépôt lors de la filtration de suspensions pures et mixtes [79]. Cependant, dans ces travaux, les observations n'ont pas été réalisées en temps réel et « *in situ* ». Les membranes étant retirées de la chambre de filtration pour être analysées, cette opération a pu modifier la morphologie du dépôt.

D'autres études ont mis à profit les potentialités de la microscopie confocale pour visualiser en 3D des dépôts, bien distinguer la membrane des particules déposées et étudier, simultanément, la distribution de différentes familles de particules dans un dépôt. Ces études ont permis des avancées notables dans la compréhension des mécanismes de colmatage. Par exemple, Brans et al. [20] ont étudié le passage à travers la membrane de petites particules (1 μm) en latex durant une filtration frontale sur une microsieve (5 μm de taille de pore) en examinant l'influence des paramètres opératoires et de la présence de grosses particules de 9,7 μm . La visualisation des dépôts formés a montré qu'en fonction de la pression transmembranaire, quatre régimes de passage existaient en l'absence de grosses particules. Pour une suspension bidispersée, des conditions opératoires correspondant à un régime stable ont été établies. Elles permettent le passage des petites particules et un dépôt des plus grosses (**Figure I.5-4**).

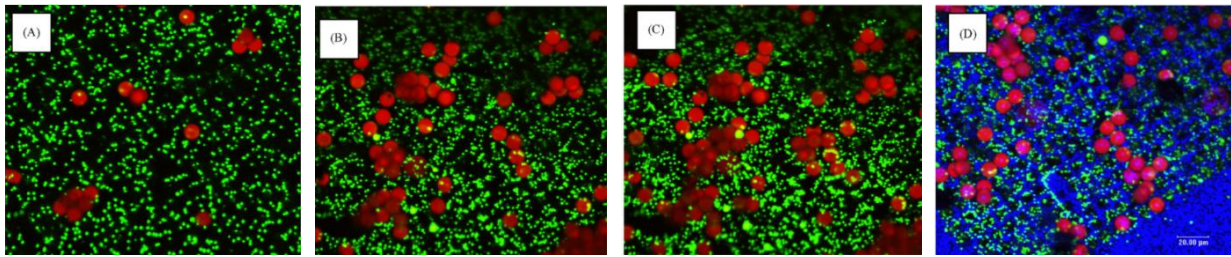


Figure I.5-4 : Images d'une microsieve durant la filtration d'une suspension bidisperse avec $5,3 \times 10^{-7} \% 1 \mu\text{m}$ (verte) et $2,3 \times 10^{-5} \% 9,7 \mu\text{m}$ particules (rouge). A–C à $t = 6, 18$ et 30 min (sans visualisation de la microsieve), et D à $t=30$ min (visualisation de la microsieve)

Beaufort et al. [3] ont étudié, « *in situ* », la distribution de levures (*Saccharomyces cerevisiae*) et de bactéries (*Escherichia coli*) autofluorescentes en fonction de la profondeur du dépôt en utilisant une chambre de filtration munie d'une fenêtre d'observation placée sous microscope. La caractérisation en profondeur de la structure du colmatage a été limitée par la résolution axiale et la faible pénétration du laser. Seuls les $30 \mu\text{m}$ supérieurs ont été visualisés. Par ailleurs, la grande surface de la membrane utilisée n'a pas permis de garantir l'uniformité spatiale du dépôt.

Certains marqueurs fluorescents ciblant des molécules spécifiques peuvent être particulièrement intéressants pour analyser la structure d'un dépôt. Par exemple, Hwang et al. [80] ont utilisé le Syto 9 et la Concanavaline A conjuguée avec le Tetramethylrhodamine (TRITC) pour colorer, respectivement, des bactéries marines et les EPS (exopolysaccharides). L'analyse du dépôt formé dans un réacteur à membrane a permis d'étudier le changement de sa structure en profondeur et d'évaluer les contributions respectives des cellules bactériennes et des EPS à la résistance globale du gâteau (**Figure I.5-5**).

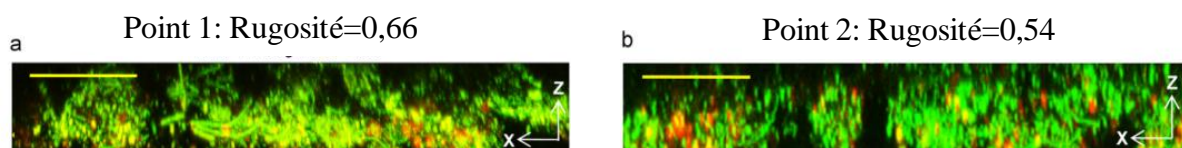


Figure I.5-5 : Images de coupes transversales du dépôt (bactéries en vert et EPS en rouge) en microscopie confocale et coefficients de rugosité évalués à partir du traitement d'images :

(a) 0,66 et (b) 0,54 [80].

Pour compléter les avancées techniques de la microscopie confocale, plusieurs logiciels d'analyse d'images ont été développés. Le traitement utilise différents paramètres physiques, spectraux ou temporels ou l'intensité de fluorescence qui peut être corrélée à l'épaisseur de

chaque composé [78]. Il est, ainsi, possible de réaliser l'analyse de la structure interne du dépôt et sa reconstruction tridimensionnelle.

Les données accessibles par cette technique sont particulièrement intéressantes pour confirmer les simulations numériques de la structure du dépôt. Par exemple, Schmitz et al. [54] se sont intéressés par simulation à l'homogénéité de dépôts sur des parois poreuses et ont distingué trois zones: (i) une zone de germination en contact avec la membrane de porosité moyenne, (ii) une région centrale très concentrée en particules et (iii) une région superficielle, appelé région de capture, où les particules sont interceptées. En 2008, Lee et al. [81] ont prélevé, marqué avec des colorants fluorescents et observé en microscopie confocale une membrane de fibre creuse colmatée par des dépôts biologiques obtenus dans différentes conditions opératoires. La porosité évaluée à partir de l'observation de leur structure interne (**Figure I.5-6**) a confirmé les résultats des simulations.

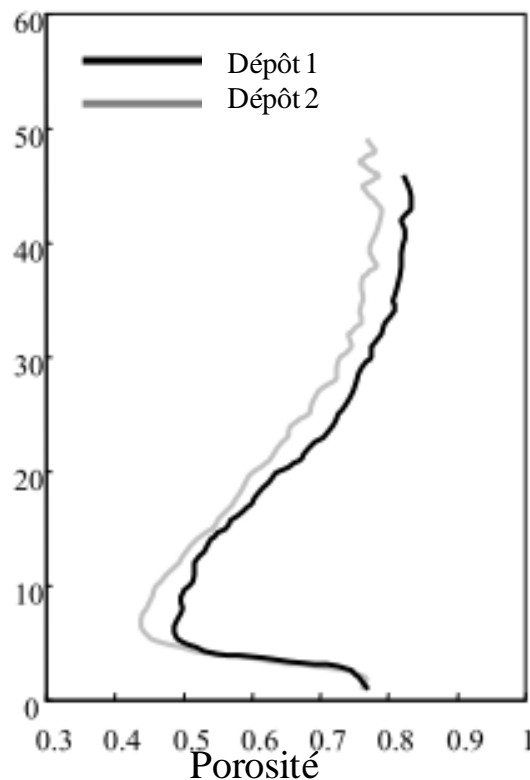


Figure I.5-6 : Porosité en fonction de la profondeur pour différents dépôts obtenus dans des conditions d'oxygénation variées des expériences (aérobie ou anoxique) [81].

D'autres travaux illustrent l'intérêt de la microscopie confocale pour déterminer la porosité d'agrégats par traitement d'image. Park et al. [82] ont validé cette méthode, dans le cas de dépôts de particules de 0,1 μm de diamètre en comparant les porosités mesurées avec celles calculées à partir de l'équation de Carman-Kozeny. Toutefois, dans l'ensemble des

travaux répertoriés, les observations sont réalisés « *ex situ* » et les porosités sont déterminées de manière globale et au niveau des agrégats et non au niveau des particules. Pour pallier certaines limites de la microscopie confocale et améliorer la résolution et l'observation d'objets épais, la microscopie multi-photonique a été développée.

Microscopie biphotonique

Son principe repose sur la probabilité pour un échantillon d'absorber quasi simultanément deux photons de faible énergie générés par des lasers «femtosecondes» ayant des pics d'émission infrarouge entre 700 et 1000 nm. En effet, l'énergie d'un seul photon de longueur d'onde élevée est insuffisante pour exciter les marqueurs situés dans des plans focaux voisins. L'excitation et l'émission ont quasiment lieu autour du point focal ce qui limite le phénomène de photoblanchiment [83]. De plus, l'excitation infrarouge permet une meilleure pénétration dans l'échantillon et réduit la diffraction de la lumière observée pour de courtes longueurs d'onde. Par comparaison à la microscopie confocale, l'excitation est très puissante, localisée et réagit dans un temps plus court: la zone excitée est plus localisée [78]. Cet outil est particulièrement utilisé pour explorer les échantillons biologiques *in vivo* puisque le rayonnement infrarouge utilisé est moins agressif que certains lasers pour les tissus vivants. Par ailleurs, la profondeur de pénétration du faisceau laser est supérieure à celle obtenue en microscopie confocale ce qui permet d'étudier des échantillons plus épais [84].

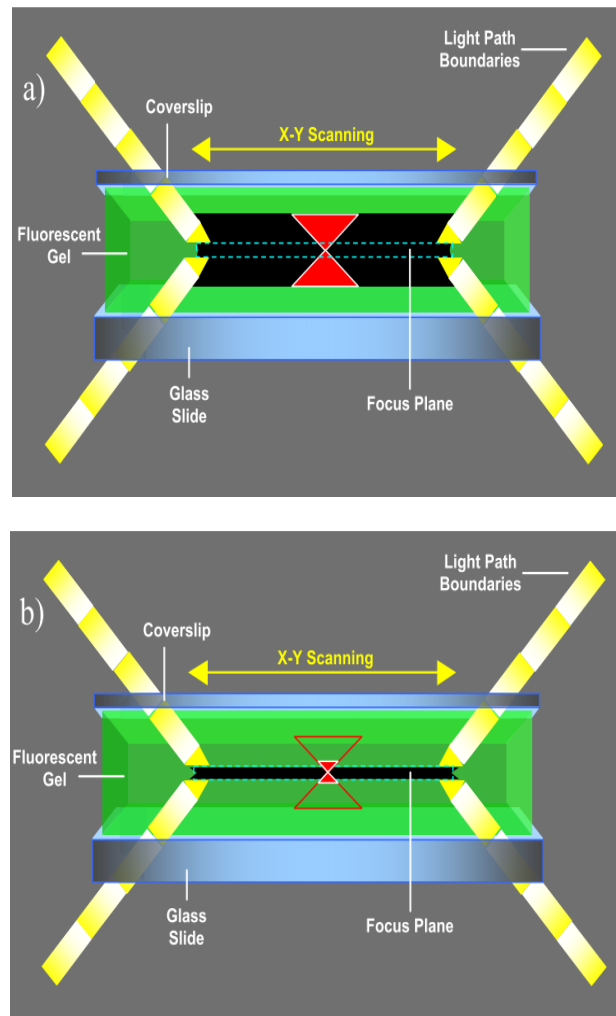


Figure I.5-7 : Excitation et photoblanchiment pour
 a) la microscopie confocale b) Microscopie biphotonique [84]

Cette technique a été utilisée par Hughes et al. [25] pour une caractérisation tridimensionnelle non invasive, « *in situ* », d'un dépôt formé durant la microfiltration tangentielle de levures. Elle a permis de suivre l'évolution de l'épaisseur du dépôt avec une haute résolution permettant de visualiser les cellules (**Figure I.5-8**). Toutefois, les auteurs n'ont pas pu observer la membrane et n'ont pu uniquement caractériser qu'une quarantaine de microns du dépôt. Par ailleurs, son épaisseur a été mesurée localement pour différentes zones de la membrane sans assurance de son uniformité sur toute la surface.

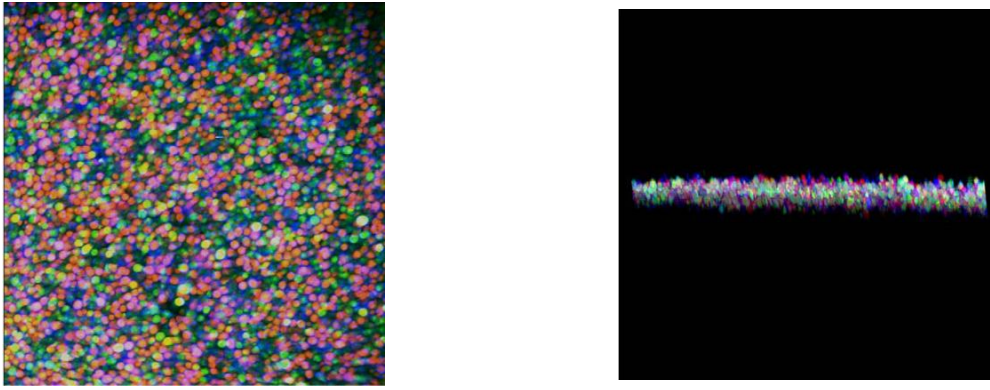


Figure I.5-8 : Observation en microscopie biphotonique du dépôt formé sur une membrane par des levures colorées par plusieurs marqueurs fluorescents lors d'une microfiltration tangentielle [25].

Cette revue bibliographique illustre la nécessité de proposer une nouvelle méthodologie basée sur l'utilisation de la microscopie confocale pour étudier le colmatage externe aux échelles macroscopique et microscopique. Les particules intervenant dans le colmatage pouvant être de différentes tailles, formes et nature. Des particules inertes et biologiques modèles permettront de simuler différents cas de milieux complexes et des membranes planes modèles caractérisées par des pores parfaitement organisés seront utilisées.

I.6 Contexte et enjeux scientifiques

Lors de la présentation du contexte de cette thèse plusieurs problématiques ont été soulevées. Les procédés de filtration largement répandus dans de très nombreux secteurs, biotechnologies, industries agroalimentaires et pharmaceutiques ainsi que les filières de traitement de l'eau...se heurtent à un verrou majeur : le colmatage de la membrane. Afin de mieux maîtriser le fonctionnement de cette technologie, et définir les conditions optimales de mise en œuvre en s'appuyant sur des modèles numériques valides, il est primordial de comprendre les mécanismes de formation du dépôt aux différentes échelles du procédé.

Les techniques actuellement utilisées pour caractériser la morphologie des dépôts reposent souvent sur des approches globales basées sur l'évolution de la performance de la filtration. Plusieurs dispositifs ont été développés pour étudier les dépôts « *in situ* » et améliorer la compréhension des phénomènes à l'échelle microscopique. Les techniques classiques d'observation directe permettent d'étudier la topologie des dépôts mais ne donnent pas accès à l'organisation des particules à l'intérieur de la structure, surtout dans le cas de systèmes complexes polydispersés. Le **Tableau I.6-1** synthétise les différentes techniques non invasives de caractérisation des dépôts de colmatages décrites dans ce chapitre. Plusieurs de ces techniques nécessitent l'utilisation de module de filtration spécial transparent ou muni

d'une fenêtre d'observation. Leurs complexité de l'utilisation et le coût est variable. Leurs résolutions, qui représente un facteur clé dans le choix de la méthode, varie entre 0,1 μm à 10 μm . De plus, la plupart des observations sont réalisées « *ex situ* » sur des échantillons de membrane. Or, les propriétés des dépôts (porosité, épaisseur,...) dépendent des conditions hydrodynamiques en fonctionnement (débit, pression, température.....).

L'étude des dépôts biologiques doit également prendre en compte les évolutions temporelles potentielles liées à des systèmes vivants. Les délais de mise en œuvre du protocole expérimental, de préparation de l'échantillon avant son observation (coloration, temps d'incubation, lavage....) est susceptible d'influer sur le résultat.

En conclusion, une étude pertinente de la construction et la caractérisation d'un dépôt biologique requiert l'utilisation d'un dispositif expérimental en ligne et *in situ* afin de l'observer directement à l'intérieur du module de filtration sans modification des conditions opératoires.

Tableau I.6-1 : Synthèse et comparaison des techniques non invasives de caractérisation du dépôt

Méthode	Complexité	Résolution	Avantages	Inconvénients	Référence
Non optique					
Réflectométrie ultrasonique	Moyenne	5 – 10 μm	Détermination de la densité et de la hauteur du dépôt	Limitation de la propagation des ondes sonores	[85]
RMN	Elevée	10 μm	- Non invasive	- Analyse des données difficile. - Nécessite un spécialiste	[52]
Optique					
MEB	Facile	4 nm	Identification de la taille, la forme et la nature de l'élément colmatant	Le prétraitement comprenant une déshydratation et une métallisation à l'or	[55]
AFM	Difficile	0,1 à 1 μm	- Image 3D du dépôt - Profil des forces entre la membrane et les agents colmatants	Le résultat dépend du type de la pointe de la sonde	[60]
DOTM	Faible	> 0,5 μm	Dynamique du dépôt des particules sur la membrane	Formation de la première couche	[61]
DVO	Faible	> 0,5 μm	Dynamique de la formation du dépôt	- Suspension très dilués - Dépôt fin	[63]
Trigonométrie laser	Faible	5 μm	- Dynamique de la formation du dépôt - Mesure de la hauteur	- La membrane ne peut pas être observée - Faible résolution	[66]
Capteur laser optique	Difficile	10 μm	- Mesure <i>in situ</i> de la hauteur du dépôt	- Suspensions dilués - Particules spéciales - Calibrage difficile	[68]
Microscopie à épifluorescence	Moyenne	1 μm	Identification des agents colmatant	Photoblanchiment Bruit de fond	[62]
Microscopie confocale	Difficile	180 nm 400nm-800 nm	- Identification des particules - Caractérisation 3D du dépôt	Photoblanchiment Couteuse	[48]
Microscopie biphotonique	Difficile	<1 μm	Caractérisation 3D du dépôt	- Très couteuse - Complexe	[84]

*Chapitre II. Contexte de l'étude et
conception du dispositif expérimental*

II.1 Présentation du travail, objectifs et approche

De façon générale, les techniques de filtration sont confrontées à une forte limitation due à leur colmatage consécutif à l'accumulation de matière sur le média filtrant qui peut engendrer des pertes économiques importantes. Lors de la filtration de fluides réels, en particulier contenant des microorganismes et des composés issus de leur activité, les mécanismes peuvent être très complexes. En effet, les microorganismes peuvent être de différentes espèces et morphologies. Ils sont souvent déformables et possèdent des propriétés de surface qui varient selon les conditions environnementales. Toutes ces spécificités rendent difficile la compréhension des mécanismes gouvernant le colmatage.

Afin de positionner la problématique et borner le cadre de l'étude, des expériences de filtration de suspensions de microorganismes ont été réalisées avec un pilote semi industriel équipé de membranes céramiques tubulaires fonctionnant en mode tangentiel.

Pour ce travail préliminaire, deux microorganismes modèles ont été sélectionnés présentant des différences morphologiques notables : la levure *Saccharomyces cerevisiae* et la bactérie *Escherichia coli*. Les suspensions, réalisées à partir de cultures pures utilisées indépendamment ou en mélange, permettront de simuler différents cas de milieux complexes. L'influence de la concentration a été étudiée pour des suspensions pures de levure (6 g/L, 8 g/L et 10 g/L). La modification des performances consécutives à l'ajout de bactéries (*Escherichia coli*) à des concentrations de 0,15 g/L et 0,3 g/L aux suspensions de levures (6 g/L et 10 g/L) a été analysée et l'effet de la morphologie des cellules sur la conduite de la filtration a été examiné.

Ces expériences ont mis en évidence les limites de l'approche globale pour comprendre les mécanismes impliqués dans le colmatage. Sur la base de ce constat, une technique d'investigation alternative est proposée. Elle repose sur l'observation en temps réel et *in situ* par microscopie confocale de la construction du dépôt constitué de particules ou microorganismes fluorescents. Une telle approche nécessite le dimensionnement et la conception d'une chambre de filtration spécifique.

II.2 Conception et fabrication de la chambre de filtration

Notre but était de concevoir un dispositif de filtration permettant la visualisation directe par microscopie confocale de la croissance des dépôts pendant la filtration et une mesure pertinente et représentative de leurs caractéristiques (organisation des particules, épaisseur,

porosité ...). Différentes exigences doivent, de ce fait, être satisfaites. Ainsi, par exemple, afin de mesurer l'épaisseur des dépôts, l'observation de la membrane propre avant la filtration et la croissance du gâteau doivent pouvoir être réalisées directement, sans déplacement de la chambre de filtration. La taille et le poids du dispositif doivent être en accord avec les spécifications du microscope (distance entre surface de la fenêtre et objectif, caractéristiques de la platine...). La résolution optique doit être en accord avec la taille des objets observés et le niveau de précision souhaité. De plus, le système doit être nettoyable aisément. Un cahier des charges listant les paramètres de conception de la chambre de filtration a, ainsi, été établi:

1. Choix de la membrane : afin de réaliser une étude générique, des conditions modèles ont été sélectionnées. Le choix des membranes s'est porté sur des microsieves dont les pores sont parfaitement calibrés et répartis. Elles présentent, en outre, le meilleur compromis en termes de minimisation de la taille de membrane et maximisation du débit de perméat.

2. Contraintes géométriques : La taille de la chambre doit permettre la visualisation, *in situ*, de la totalité du dépôt afin de déterminer son épaisseur en différents endroits et non seulement sur une partie. Les dimensions de la fenêtre d'observation doivent être suffisamment grandes pour permettre à l'objectif du microscope de parcourir une partie représentative de la membrane.

3. Contraintes liées à l'optique : Pour bien observer le dépôt de particules sur la surface de la membrane, la lumière doit traverser la lame de verre et la suspension de particules au-dessus de la microsieve. La distance totale correspond à la hauteur du canal. La lamelle utilisée doit être le plus mince possible pour avoir une profondeur de chambre totale inférieure à la distance de travail des objectifs de microscope. Cependant, le verre ne doit pas être déformé sous l'effet de la pression lors de la filtration.

4. Nettoyage de membrane : le matériau de la chambre de filtration doit être compatible avec les techniques de nettoyage des membranes qui exige généralement deux phases : un nettoyage hydraulique et un nettoyage chimique.

Sur la base de ces contraintes, une chambre de filtration en acier inoxydable, a été conçue au laboratoire d'ingénierie des systèmes biologiques et des procédés et fabriquée par Arias (Toulouse) (Figure II.2-1). Elle consiste en un canal de 5,18 mm de largeur, 60 mm de longueur et 0,25 mm de hauteur portant sur l'une de ses faces un emplacement dans lequel est insérée la microsieve. En vis-à-vis de la membrane une fenêtre optique permet d'observer le dépôt en cours de formation.

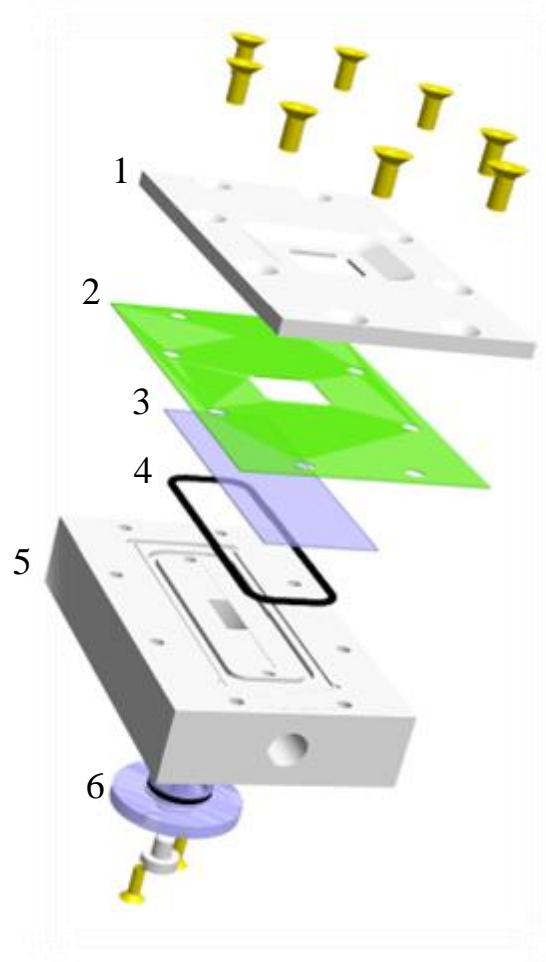


Figure II.2-1 : Schéma de la chambre de filtration

1 : couvercle ; 2 : joint plat ; 3 : lamelle ; 4 : joint ; 5 : chambre de filtration ; 6 : support microsieve

II.3 Microsieves

Les microsieves sont décrites dans le détail dans le chapitre « Matériel et Méthodes » (chapitre III). Elles sont composées de Nitrure de Silicium (Si_xN_y) qui est sensible à l'oxydation ou à l'adsorption de contaminants [86]. Afin d'obtenir une performance optimale lors des expériences, les membranes sont au préalable traitées. Un traitement plasma est appliqué afin d'homogénéiser les surfaces et de les rendre plus hydrophiles par oxydation et mouillage par l'isopropanol pour activer les pores.

Le caractère hydrophile/hydrophobe de la surface filtrante a été déterminé par la méthode de la goutte posée. Les angles de contact des microsieves neuves, $82,66 \pm 0,32$ et $75,32 \pm 0,28$ pour les membranes de diamètres des pores $0,8 \mu\text{m}$ et $2 \mu\text{m}$, respectivement,

indiquent que les membranes présentent une surface filtrante hydrophobe (très grand angle de contact avec l'eau). La différence de taille entre les deux microsieves pourrait expliquer que la 2 μm soit plus hydrophile. Après traitement, les angles de contact diminuent, témoignant d'une surface plus hydrophile (**Tableau II.3-1**). Ce résultat est en accord avec les travaux de Gironès et al. [86] qui a comparé la composition de la surface des microsieves en silicone nitride avant et après un traitement et a trouvé une augmentation des ratios O/N et O/Si après traitement, confirmant l'oxydation des microsieves.

L'effet du stockage dans l'eau ultrapure sur le traitement est déterminé par le suivi de la perméabilité relative d'une microsieve 0,8 μm . La membrane perd la moitié de sa perméabilité dès la première semaine (**Figure II.3-1**). La conservation post-traitement n'est donc pas envisageable et les membranes doivent être utilisées rapidement.

Afin d'obtenir une performance optimale et un comportement identique pour toutes les microsieves, les prétraitements consistant à l'activation des pores par mouillage et hydrophilisation des surfaces jouent donc un rôle clé. Le protocole expérimental qui permet d'avoir une perméabilité maximale et stable à l'eau ultrapure a, ainsi, été établi : après un traitement plasma suivi d'un mouillage avec l'isopropanol, les microsieves sont scellées dans de l'eau ultrapure en absence de bulles d'air et sont utilisées dans les 48 heures. Toutefois, il faut signaler que l'assemblage du système de filtration peut s'accompagner de l'introduction de quelques bulles d'air dans la boucle de filtration qui, même si elles sont chassées avant le début de l'expérience, sont susceptibles d'engendrer l'inactivation locale de quelques pores.

Tableau II.3-1 : Effet du traitement sur l'angle de contact

Membrane	Angle de contact (°)	
	Non modifiée	Traitée
2 μm microsieve	75,32 \pm 0,28	22,58 \pm 0,04
0,8 μm microsieve	82,66 \pm 0,32	33,40 \pm 0,13

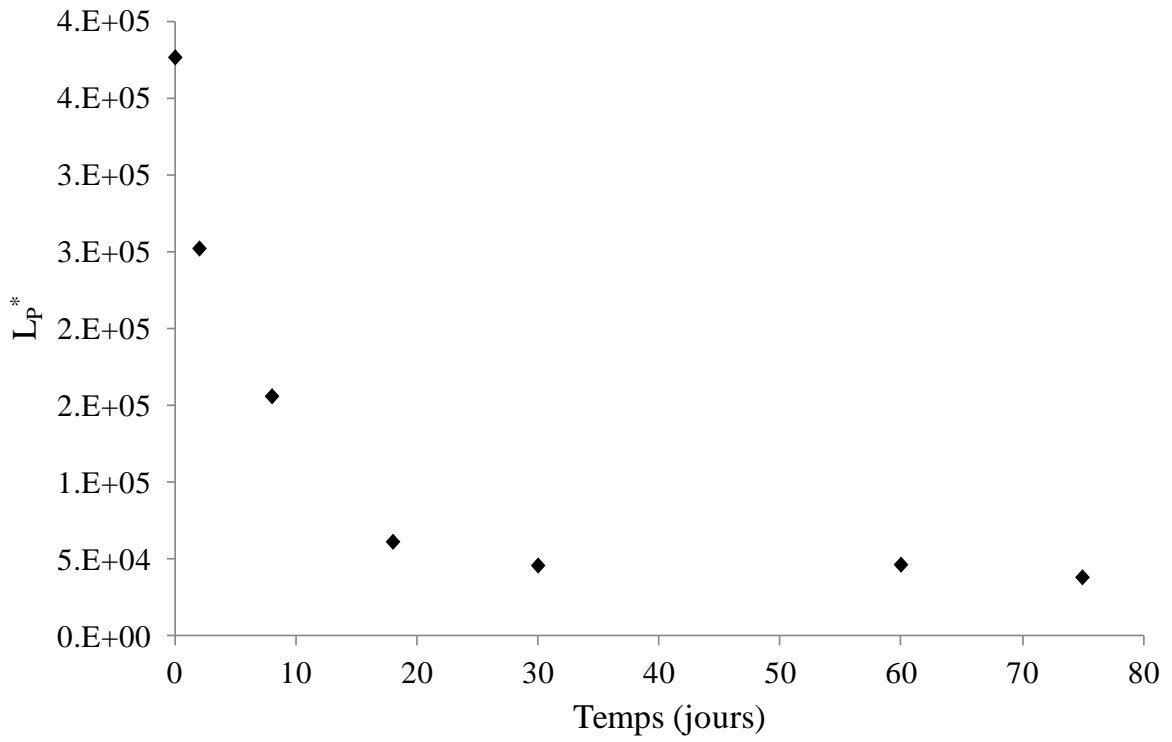


Figure II.3-1 : Réduction de la perméabilité en fonction du temps de stockage d'une microsieve 0,8 μm

ARTICLE 1

Experimental Study of Membrane Fouling during Crossflow Microfiltration of Yeast and Bacteria Suspensions: Towards an Analysis at the Microscopic Level

Membranes 3 (2013) 44–68

I. Ben Hassan, M. Ennouri, C. Lafforgue, P. Schmitz, A. Ayadi

Article

Experimental Study of Membrane Fouling during Crossflow Microfiltration of Yeast and Bacteria Suspensions: Towards an Analysis at the Microscopic Level

Ines Ben Hassan^{1,2,3,4,†}, Monia Ennouri^{5,6,†}, Christine Lafforgue^{2,3,4,*}, Philippe Schmitz^{2,3,4,†} and Abdelmoneim Ayadi^{1,†}

¹ LRAE (Laboratoire Radio analyses et Environnement), Ecole nationale d'ingénieurs de Sfax., Sfax BP3038, Tunisie; E-Mails: inesbenhassan@yahoo.fr (I.B.H.); moneim.ayadi@enis.rnu.tn (A.A.)

² Université de Toulouse, INSA, UPS, INP, LISBP, 135 Avenue de Rangueil, Toulouse F-31077, France; E-Mail: philippe.schmitz@insa-toulouse.fr

³ INRA (Institut National de la Recherche Agronomique), UMR792, Ingénierie des Systèmes Biologiques et des Procédés, Toulouse F-31400, France

⁴ CNRS (Centre National de la Recherche Scientifique), UMR5504, Toulouse F-31400, France

⁵ LAA (Laboratoire Analyses Alimentaires), Ecole nationale d'ingénieurs de Sfax., Sfax BP3038, Tunisie; E-Mail: ennouri_monia@yahoo.fr

⁶ Institut supérieur des Sciences Appliquées et de Technologie de Mahdia, Hiboun Sidi Massoud Mahdia 5111, Tunisie

† These authors contribute equally to this work.

* Author to whom correspondence should be addressed; E-Mail: christine.lafforgue@insa-toulouse.fr; Tel.: +33-5-6155-9742; Fax: +33-5-6155-9400.

Received: 7 February 2013; in revised form: 22 April 2013 / Accepted: 24 April 2013 /

Published: 10 May 2013

Abstract: Microfiltration of model cell suspensions combining macroscopic and microscopic approaches was studied in order to better understand microbial membrane fouling mechanisms. The respective impact of *Saccharomyces cerevisiae* yeast and *Escherichia coli* bacteria on crossflow microfiltration performances was investigated using a multichannel ceramic 0.2 µm membrane. Pure yeast suspensions (5 µm ovoid cells) and mixtures of yeast and bacteria (1 to 2.5 µm rod shape cells) were considered in order to analyse the effect of interaction between these two microorganisms on fouling reversibility. The resistances varied significantly with the concentration and characteristics

of the microorganisms. Membrane fouling with pure yeast suspension was mainly reversible. For yeast and bacteria mixed suspensions (6 g L^{-1} yeast concentration) the increase in bacteria from 0.15 to 0.30 g L^{-1} increased the percentage of normalized reversible resistance. At 10 g L^{-1} yeast concentration, the addition of bacteria tends to increase the percentage of normalized irreversible resistance. For the objective of performing local analysis of fouling, an original filtration chamber allowing direct *in situ* observation of the cake by confocal laser scanning microscopy (CLSM) was designed, developed and validated. This device will be used in future studies to characterize cake structure at the microscopic scale.

Keywords: microfiltration; *Saccharomyces cerevisiae*; *Escherichia coli*; filtration resistances; filtration chamber design; direct observation

Nomenclature

MF	microfiltration
UF	ultrafiltration
LB	Luria Bertani medium
YPD	Yeast Peptone Dextrose
VRR	volume reduction ratio
SEM	scanning electron microscopy
Re	Reynolds number
D	hydraulic diameter of the channel (m)
J	flux ($\text{L h}^{-1} \text{m}^{-2}$)
J_0	flux of distilled water for the clean membrane ($\text{L h}^{-1} \text{m}^{-2}$)
TMP	transmembrane pressure (bar)
R_t	the total resistance to flow (m^{-1})
P_f	pressure of the feed (bar)
P_r	pressure of the retentate (bar)
P_p	pressure of the filtrate (bar)
R_m	membrane intrinsic resistance of the clean membrane (m^{-1})
R_f	fouling resistance (m^{-1})
R_{rf}	reversible fouling resistance (m^{-1})
R_{if}	irreversible fouling resistance (m^{-1})
U	tangential velocity (m s^{-1})
V_0	feed initial volume (m^3)
V_p	filtrate volume (m^3)
VRR	volume reduction ratio
μ	dynamic viscosity (Pa s)
ρ	fluid density (kg m^{-3})
ν	$\nu = \mu/\rho$ kinematic viscosity

1. Introduction

Cell filtration technology is widely used in biotechnology, food processing and the beverage industry, in drinking water production as well as for wastewater treatment [1–3] or as a preliminary step in purification processes [4,5]. The main factor limiting the membrane performances in these applications is their propensity to biofouling. Faced with the increasing economic importance of these industries, it has become necessary to enhance membrane performance, so that these systems can become more affordable and efficient [6].

During filtration processes, fouling is the main problem causing loss of productivity, especially in the case of biological fluids. Indeed, it reduces equipment efficiency, increases production cost by repetitive cleaning and can induce contamination problems due to the growth of microorganisms at the membrane surface [7]. This has led to extensive research into the characterization of fouling. Most of the studies have focused on the evolution of permeate flux and total resistance *versus* time [7]. Recent researches focused on the role of several important factors affecting membrane fouling, such as cell characteristics (shape, size *etc.*), membrane properties, process parameters and hydrodynamic forces [8,9]. As yeast is one of the most important hosts of genetic modification for bioproduct manufacture and is also used in many industrial processes such as for beer, wine, bread *etc.* *Saccharomyces cerevisiae* microfiltration has appeared as a pertinent model for the study of fouling mechanisms. Indeed, recent scientific and industrial studies dealing with fouling mechanisms in the brewing and wine industry indicate the scientific and economic stakes of this application. In order to model real processes more closely, some studies were carried out with a *Saccharomyces cerevisiae* suspension combined to different proteins. Thus, Foley *et al.* [10] filtering yeast suspension of *Saccharomyces cerevisiae* (2 g L^{-1}) on flat sheet membranes demonstrated that the deposition of particulate matter at the membrane surface could reduce access of fouling material inside the pores. The effect of interaction between yeasts or cell debris and molecular compounds such as proteins or lipids and their consequences on fouling have been pointed out in packed bed processes [4,11,12]. Bovine serum albumin (BSA) and yeast particles on the reversibility of cake formation during microfiltration were investigated [13,14]; these studies have suggested that protein fouling of the membrane and filtration resistance was reduced in the presence of cells. The same results were reported for other proteins in mixtures with *Saccharomyces cerevisiae* such as lysozyme and ovalbumin [15]. Yet, in the cases of dextran and yeast [16] or molasses and yeast [17], more compact cakes were formed during filtration of the mixture inducing the increase of resistance. Baker's yeast was even combined with deproteinized cheese whey powder [18].

Concerning *Escherichia coli*, which is another widely cultivated microorganism and often considered as the prokaryotic model, the microfiltration of a fermentation broth containing *Escherichia coli*, studied by Li *et al.* [19] using a ceramic membrane filter with a nominal pore size of $0.2 \mu\text{m}$ indicated that the filtration resistance was mainly caused by the cake formed on the membrane surface. According to Okamoto *et al.* [20], the ultrafiltration resistance of *Escherichia coli* whole broth nearly doubled over 12 h of experiment.

However, in many cases of application of microfiltration processes, heterogenic microbial and/or particle suspensions need to be considered; which is the case during the clarification of fermented beverages in which bacteria and yeast have to be removed [21], in membrane bioreactors for

wastewater treatment or in biotechnology (production of pharmaceutical compounds by microorganisms). In most of these industrial applications, the main goals are not only to maintain a high permeate flow rate, but also to guarantee a constant quality of the product, *i.e.*, to control the retention of molecular compounds (for instance in the pharmaceutical industry). Thus the analysis of the mechanisms involved in filtration cake building and transport properties during the microfiltration of a defined mixture of model micro-organisms and/or particle suspensions could be of interest. Many studies have shown that cake resistance and porosity are often sensitive to cell and/or particle size, morphology, surface properties, ionic environment, medium components and interactions phenomena [9]. Indeed, McCarthy *et al.* studying the polymorphic yeast *K. marxianus* var. *marxianus* NRRLy2415, found a strong relationship between cell morphology (ovoid or filamentous) and the specific cake resistance [22]. Moreover, Mota *et al.* analyzed the specific cake resistance, porosity and tortuosity for rod-like particles (*B. subtilis*, *B. brevis* and *B. cereus*) spheroid cells (*Saccharomyces cerevisiae*) [1]. They showed that tortuosity due to cell shape was an important parameter for compressible cakes and that specific cake resistance of rod-like particles in cross-flow filtration depended on the higher tortuosity obtained by the shear-induced ordered arrangement. In turn, spheroid cells do not affect tortuosity as much as the rod-shaped cells.

To our knowledge, only a few studies have investigated the microfiltration of a mixture of *Saccharomyces cerevisiae* and *Escherichia coli* suspensions at similar concentration ranges to those chosen in this work. These model suspensions were chosen as a first step of investigation in viewing the effect of microorganisms on filtration performance. Indeed, this paper focuses on the performance of microfiltration and the properties of the formed fouling by *Saccharomyces cerevisiae* and *Escherichia coli* on the membrane. Special attention was paid to the hydraulic resistance of the cake and its reversibility. The impact of a yeast/bacteria mixture was experienced and is discussed.

At the microscopic scale several techniques have been already proposed to characterize cake properties [23]. One of them is Confocale Laser Scanning Microscopy (CLSM) which is becoming well established to analyze filter cakes. However the major of works are restricted to the examination *ex situ* of fouled filter samples after a sequence of filtration [24,25]. In the present paper, a new filtration chamber design which allows the direct observation of the formation of fouling *in situ* at a microscopic scale by CLSM microscopy has been developed and validated.

2. Materials and Methods

2.1. Growth Media

2.1.1. *Escherichia coli*

Escherichia coli strain (Top 10) used in this work, provided by the Center of Biotechnology of Sfax, was grown in Luria-Bertani (LB) medium. It consists of 10 g L⁻¹ peptone, 5 g L⁻¹ yeast extract and 5 g L⁻¹ NaCl prepared in distilled H₂O and adjusted to pH 7.2. For bacteria preculture fermentation, a few colonies were inoculated into 25 mL of the medium in a 50 mL flask and incubated at 37 °C under agitation (Ika Ks 130, Ika Werke GMBH & CO. KG) for 10 h. For the main culture fermentation, the preculture broth was inoculated into 500 mL of medium at a temperature of 37 °C

under agitation over 7 h. At the end of this growth process, the suspension concentration was about 0.86 g L^{-1} .

Cells from the fermentation broth were harvested by centrifugation at 6082 g for 15 min (Universal 320 R, Hettich Zentrifugen, Germany) then washed twice by suspension in water 9 g L^{-1} NaCl followed by centrifugation.

2.1.2. *Saccharomyces cerevisiae*

Although it is now known that the results obtained with rehydrated yeast suspension could differ from those obtained with fresh cultivated cells, dehydrated yeast was used for the sake of simplicity. However a careful protocol was followed before use. The yeast suspensions were obtained from a dry strain of *Saccharomyces cerevisiae* (Alimentary Industry Rayen's yeast, lot 2/153) rehydrated in water 9 g L^{-1} NaCl. The initial feed suspension was prepared as follows: the dry yeast was rehydrated at $35 \text{ }^{\circ}\text{C}$ for 10 min with stirring. In commercial baker's yeast, some cell debris and soluble components are present. Their exact amount and composition are hard to analyze, which make it difficult to understand the influence of these soluble components in the yeast cake. Fortunately, broken cells and soluble components are lost in the supernatant during the washing [14]. After the rehydration, the yeast suspension was centrifuged for 15 min at 2376 g using a centrifuge (Universal 320 R, Hettich Zentrifugen, Germany) and washed twice with distilled water. Each wash step consisted of suspending the yeast in physiologic water followed by centrifugation under the same conditions as those mentioned previously.

For CLSM experiments, fresh cultivated yeast was used. The *S. cerevisiae* was grown in YPD medium at $30 \text{ }^{\circ}\text{C}$ under agitation (10 g L^{-1} glucose, 10 g L^{-1} yeast extract, and 10 g L^{-1} bactopectone) prepared in distilled H_2O for 15 h. The final concentration was about $2.4 \times 10^6 \text{ cell L}^{-1}$.

2.2. Dry Mass of Microbial Suspensions

During fermentation, dry bacterial mass was determined by centrifugation of the samples for 15 min at 2376 g (centrifuge Universal 320 R, Hettich Zentrifugen, Germany) and washing twice with distilled water. The mass was measured after drying the washed bacteria at $60 \text{ }^{\circ}\text{C}$ for 48 h.

Dry yeast mass was measured after drying the washed yeast at $60 \text{ }^{\circ}\text{C}$ for 48 h. After repeating three times the same process for several yeast concentrations, the result was obtained as Equation (1):

$$\text{Washed Yeast Dry mass (g L}^{-1}\text{)} = 0.732 \times \text{unwashed Dry yeast} - 0.004 \text{ (with a } R^2 = 0.998\text{)} \quad (1)$$

The yeast obtained after two washing steps was then suspended in physiologic water 9 g L^{-1} NaCl [14]. All yeast concentrations referred to in this paper are the concentrations of washed yeast in suspension.

The microbial concentrations of yeast and bacteria suspensions were also determined by absorbance at 620 nm wavelength (spectrophotometer HACH Lange DO, DR 5000). The correlations were obtained as Equations (2) and (3):

$$\text{Bacteria dry mass (g L}^{-1}\text{)} = 0.599 \times \text{DO}_{620 \text{ nm}} - 0.006 \text{ (with a } R^2 = 0.995\text{)} \quad (2)$$

$$\text{Yeast dry mass (g L}^{-1}\text{)} = 0.925 - 0.234 \times \text{DO}_{620 \text{ nm}} \text{ (with a } R^2 = 0.995\text{)} \quad (3)$$

2.3. Suspensions Preparation for Crossflow Microfiltration

As the filtration of cell suspension properties are sensitive to the cells' age [20], all crossflow filtration experiments were conducted with fresh *Escherichia coli* culture. To ensure that crossflow filtration was done with microorganism at the same physiological state, trial fermentations were first performed. The dry mass of cell suspension at the end of the trial fermentation was determined. A new fermentation was then performed in identical conditions to produce the broth for crossflow filtration.

The suspensions of *Saccharomyces cerevisiae* were prepared just before the experiments. Table 1 summarizes the samples prepared for filtration runs and the abbreviations used for each of them.

Table 1. Summary of the suspensions prepared for microfiltration runs.

Abbreviation	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (g L ⁻¹)	<i>Escherichia coli</i> (g L ⁻¹)
S ₁	6	0
S ₂	6	0.15
S ₃	6	0.3
S ₄	8	0
S ₅	10	0
S ₆	10	0.15
S ₇	10	0.30

2.4. Fundamentals of Microfiltration

Darcy's law [Equation (4)] models the solvent flow through a porous media during a filtration operation. Thus, the filtrate flux through the membrane was calculated by the following equations:

$$J = \frac{\text{TMP}}{\mu R_t} \quad (4)$$

$$\text{TMP} = \frac{P_f + P_r}{2} - P_p \quad (5)$$

where J is the flux, TMP the transmembrane pressure, μ the dynamic viscosity of the feed, R_t the total resistance to flow and P_f , P_r and P_p are respectively the pressure of the feed, the retentate and the filtrate. It can be observed that Equation (5) does not mean that TMP decreases linearly all along the membrane. Indeed, for a tubular channel membrane, complex spatial variations of pressure can take place both in the inner and outer region of the capillary. See for instance the effect of packing density in hollow fiber modules [26]. Nevertheless, it is a reasonable definition for TMP as P_f , P_r and P_p are the only measurable parameters in the experiments.

The total resistance of the membrane (R_t) can be considered as the sum of several resistances given by:

$$R_t = R_m + R_f = R_m + R_{rf} + R_{if} \quad (6)$$

where R_m is the intrinsic resistance of clean membrane, R_f is the fouling layer resistance.

Using Equation (6) assumes that there is separation of the scales, *i.e.*, particle size is much larger than pore size and that fluid flow is locally uniform at the porous surface. These assumptions can fail in some intricate cases [27,28], exhibiting a total resistance of one order of magnitude higher than the

one obtained by Equation (6). The fouling layer resistance is negligible for a clean membrane but will increase with accumulation of fouling. R_f can be considered as the sum of the external and the internal fouling resistances. The R_{rf} resistance is due to concentration polarization if particles are Brownian and convective deposition of solids (cake layer) on the membrane surface, and therefore it can be removed by cleaning with water after the filtration run. On the contrary, the R_{if} resistance is due to pore blocking and adsorption of materials on the membrane surface and pores which cannot be removed by water cleaning [29]. The intrinsic and the fouling layer resistance for the membrane were calculated using the following equations:

$$R_m = \frac{\text{TMP}}{\mu J_0} \quad (7)$$

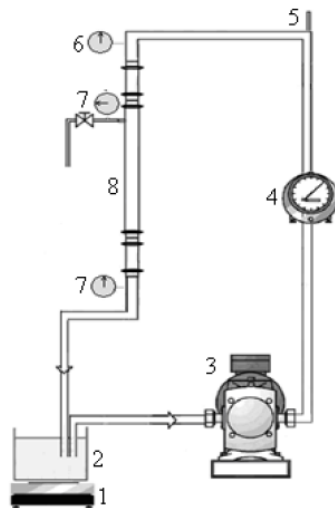
$$R_f = \frac{\text{TMP}}{\mu J} - R_m \quad (8)$$

where J_0 is the flux of distilled water at the beginning of the filtration experiment [30].

2.5. Crossflow Microfiltration Set-Up and Membrane

Microfiltration experiments were performed using a semi industrial device (Tech-Sep, Rhône Poulenc, France) equipped with a Kerasep membrane (illustrated in Figure 1) and fed from an 8 L feed tank with a volumetric pump (SKFD/005 Motovario, Spezzano, Italy). The ceramic membrane consists of 19 channels, each capillary having an internal diameter of 2.5×10^{-3} m and a length of 0.4 m; the area is 595×10^{-4} m². The mean pore diameter is 0.2 μ m. Before each experiment, the integrity of the membrane was checked by measurement of its permeability with distilled water at 20 °C.

Figure 1. Scheme of crossflow filtration system, 1: Heating plate; 2: Feed tank; 3: Feed volumetric pump; 4: Flow meter; 5: Temperature gauge; 6 and 7: Pressure gauges; 8: Membrane module.



In agreement with a previous experiment performed with wastewater (data not shown), the filtration parameters selected for this work were: transmembrane pressure (TMP) of 1.5 bar and a cross flow velocity of 2.38 m s^{-1} . The Reynolds number was calculated by Equation (9):

$$Re = \frac{\rho \cdot U \cdot D}{\mu} = \frac{U \cdot D}{\nu} \quad (9)$$

where U is the mean fluid velocity, μ is the dynamic viscosity of the fluid, ν is the kinematic viscosity ($\nu = \mu/\rho$), ρ is the density of the fluid and D is the hydraulic diameter of the channel. The flow is turbulent as the Reynolds number is equal to 5950. For the clean membrane, the flux obtained with distilled water was about $1200 \text{ L h}^{-1} \text{ m}^{-2}$ at a TMP of 1.5 bar.

For this study, the experimental temperature was constant and equal to $25 \text{ }^\circ\text{C}$. The crossflow velocity and the pressure were adjusted manually by the use of valves before and after the microfiltration carter.

The volume reduction ratio (VRR) was calculated using the equation:

$$VRR = \frac{V_0}{V_0 - V_p} \quad (10)$$

where V_0 is the feed initial volume and V_p is the filtrate volume.

The flux loss was calculated using the equation:

$$\Delta J = \frac{J_0 - J_s}{J_0} \times 100\% \quad (11)$$

where J_0 is the initial filtration flux and J_s is the stabilized filtration flux.

2.6. Membrane Regeneration

In order to recover the initial permeability, the MF membrane was carefully cleaned immediately after each experiment at a transmembrane pressure (TMP) of 1.5 bar and a crossflow velocity (U) of 2.38 m s^{-1} . The pilot unit was rinsed with hot water ($50 \text{ }^\circ\text{C}$). After this first rinsing step, the water flow rate under the processing conditions (temperature, pressure) was measured to estimate the irreversible fouling (R_{if}) of the membrane (due to a layer that could not be removed with water) using Equation (8). Then, a 10 g L^{-1} sodium hydroxide solution ($80 \text{ }^\circ\text{C}$ during 30 min) was circulated. After a water rinsing step, a 5 mL L^{-1} nitric acid solution at $60 \text{ }^\circ\text{C}$ was circulated during 30 min. Finally, the circuit was rinsed with distilled water.

The total resistance (R_t) was calculated with the stabilized filtrate flow rate using Equation (4). The resistance caused by concentration polarization and cake layer was estimated according to Equation (6).

2.7. Scanning Electron Microscopy (SEM)

Specimens of microbial suspensions sampled at the end of the runs were observed with a scanning electron microscope Philips XL30 (Philips, Leimeil-Brevannes, France). The samples, deposited on small fragments of a Carbosep membrane ($0.14 \text{ } \mu\text{m}$ mean pore diameter, Tech-Sep, Rhône Poulenc, France), were fixed with glutaraldehyde and incubated overnight in the dark at $4 \text{ }^\circ\text{C}$. The samples were then dehydrated with an ethanol/water gradient (25%–100%) and dried to CO_2 critical point using

a Baltec CPD 030 apparatus and coated with gold by a Baltec MED 20 apparatus (Balzers Union, Balzers, Germany).

2.8. Confocal Laser Scanning Microscopy Analysis

2.8.1. Preparation of Microbial Suspensions

The microorganisms were double stained with Fluorescein diacetate (FDA) and Rhodamine 123 (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA). The Fluorescein diacetate is a colorless compound which is hydrolyzed by both free and membrane bound enzymes releasing a colored end product. Rhodamine 123, is a cell permeant fluorescent dye that is sequestered by active mitochondria within a few minutes. Dye stock solutions were prepared as follows and stored at $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$: 0.2 mg mL^{-1} rhodamine 123 in water and 5 mg mL^{-1} FDA in acetone.

The *S. cerevisiae* was grown in YPD medium at $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ and the *E. coli* was grown on LB medium at $37\text{ }^{\circ}\text{C}$, as described previously. The two microorganisms were grown to the log phase ($7.64 \times 10^7\text{ cells mL}^{-1}$ for yeast and $2 \times 10^8\text{ cells mL}^{-1}$ for bacteria). A sample of 20 mL of each broth was centrifuged at 10,621 g for 5 min at room temperature. Then, the supernatant was removed and the pellet was resuspended and washed with deionized water. Firstly, each pellet was stained with $1\text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$ rhodamine, kept in the dark to avoid eventual bleaching for 5 min and centrifuged (10,621 g, 5 min). Then, the dyed cells were stained again with FDA ($0.35\text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$ PBS) following the same staining procedure. The supernatant was removed each time to remove excess dye and eliminate extracellular compounds.

2.8.2. Microscopic Apparatus and Operating Conditions

Microscopic observations were performed on a Confocal Laser Scanning Microscope, CLSM, (LEICA SP2, DMRXA2) equipped with detectors and filter sets for the simultaneous monitoring of the different dyes used. The deposits were magnified by a $\times 40$ objective. The samples were first analyzed in reflection mode to select the position of the z -axis corresponding to the membrane surface. Then, all the samples were analyzed using the fluorescence mode with the appropriate laser wavelength. In order to obtain a better-resolved image, noise was decreased by averaging many scans of each z -image. The result of CLSM analysis was z -series images which were used to carry out the z -projection and 3D orthogonal views. In the selected conditions, the voxel sizes were $0.73\text{ }\mu\text{m} \times 0.73\text{ }\mu\text{m} \times 0.48\text{ }\mu\text{m}$ with a zoom of 1 and $0.32\text{ }\mu\text{m} \times 0.32\text{ }\mu\text{m} \times 0.32\text{ }\mu\text{m}$ with a zoom of 1.44 during the observation of *E. coli* and the fouled microsieve with *S. cerevisiae*, respectively.

2.9. Image Analysis

The recorded pictures were processed using Image J (1.45 s downloaded from [31]). This program was used to measure the surface porosity. Indeed, the image was segmented by setting a threshold, which separated the pixels of interest from the rest of the image. Moreover, Image J enables a single 3D projection of the fluorescence-image series to be formed. The 3D image was projected to give a profile view.

3. Results and Discussion

The sizes of the selected microorganisms were much larger than the membrane pore diameter; the mean diameter of the yeast was $5\ \mu\text{m}$, while the rod shape bacteria dimensions were $1\ \mu\text{m} \times 2.5\ \mu\text{m}$. Consequently, mainly external fouling could be expected.

3.1. Microfiltration of Cells Suspensions

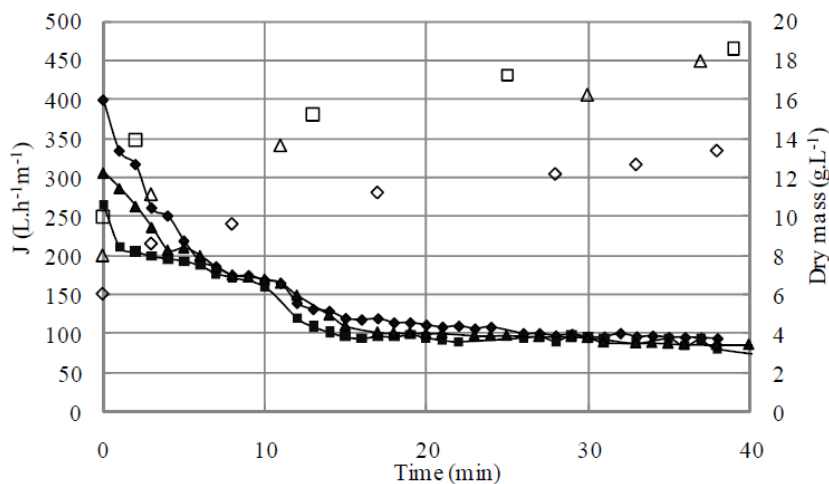
The first runs were performed with yeast suspensions in order to investigate the influence of the variation of initial biomass concentration on membrane fouling nature. Further runs were investigated with yeast and bacteria mixture and were compared to first runs (Table 1).

3.1.1. Microfiltration of Yeast Suspensions

The filtrate fluxes of yeast suspensions filtered at different yeast initial concentrations (S_1 : $6\ \text{g L}^{-1}$, S_4 : $8\ \text{g L}^{-1}$, S_5 : $10\ \text{g L}^{-1}$) were firstly investigated.

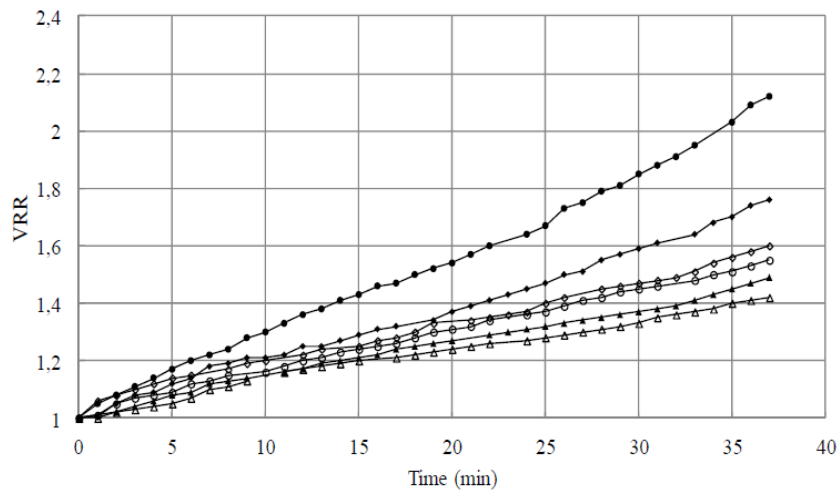
For the tested suspensions, high initial fluxes are observed followed by a rapid decline. The initial value of the permeate flux was inversely proportional to the cell concentration; for instance, an increase in cell concentration from 6 to $10\ \text{g L}^{-1}$ allowed the decrease of initial filtrate flux from 400 to $265\ \text{L h}^{-1}\ \text{m}^{-2}$ approximately. Then after approximately fifteen minutes of filtration, a pseudo-steady state was reached (Figure 2). The flux value at this steady state was quite similar, whatever the cell initial concentrations were the filtrate flux decreased, and was thus more pronounced with the increase of initial cell concentration. This result contradicts Russotti *et al.* [32] who concluded that, when initial cell concentration increases, cell mass deposited per filter surface area unit increases which leads to a lower steady state flux.

Figure 2. Effect of initial cell concentration ($\diamond S_1$; $\blacktriangle S_4$; $\blacksquare S_5$) on microfiltration performance and evolution of dry mass of the retentates ($\diamond S_1$; ΔS_4 ; $\square S_5$) versus time (TMP = 1.5 bar, $U = 2.38\ \text{m/s}$, $Re = 5950$).



During the filtration runs, the VRR increased from 1 to 2.12 and from 1 to 1.55 for S_1 (the less concentrated suspension) and S_5 (representing the most concentrated suspension), respectively (Figure 3). Furthermore, an increase of total solids in the retentate is noticed. This augmentation resulted in fouling and, consequently, contributed to the decline of the filtrate flux.

Figure 3. VRR evolution during the microfiltration of the microbial suspensions ($\bullet S_1$; $\blacklozenge S_2$; $\diamond S_3$; $\circ S_5$; $\blacktriangle S_6$; $\triangle S_7$) (TMP = 1.5 bar, $U = 2.38$ m/s, $Re = 5950$).



Moreover, the increasing initial cell concentration could lead to an increase in cell aggregation in the retentate. Indeed, the retentate yeast organization that was visualized with SEM observations (Figure 4) for different concentrations could explain the increasing fouling behaviour of the suspensions. In these observations it can be seen that the size and shape of the suspended microorganisms are quite homogenous.

Figure 4. SEM images of clean membrane and retentates of suspensions containing different concentrations of *S. cerevisiae* (a) clean membrane; (b) S_1 ; (c) S_4 ; (d) S_5 ($\times 160$).

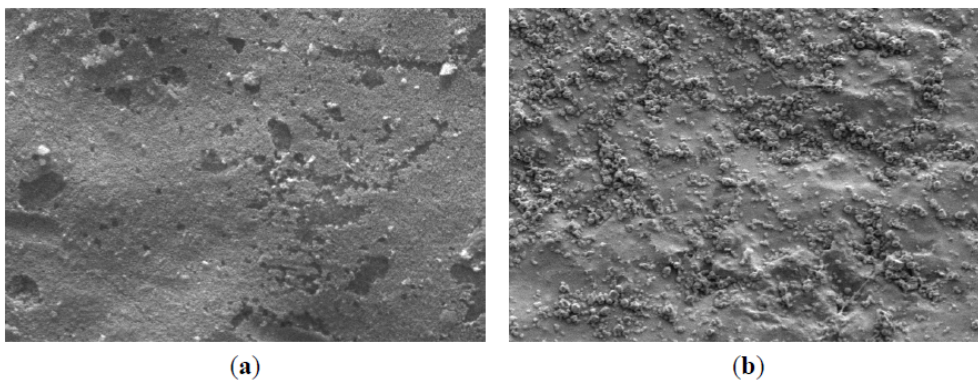
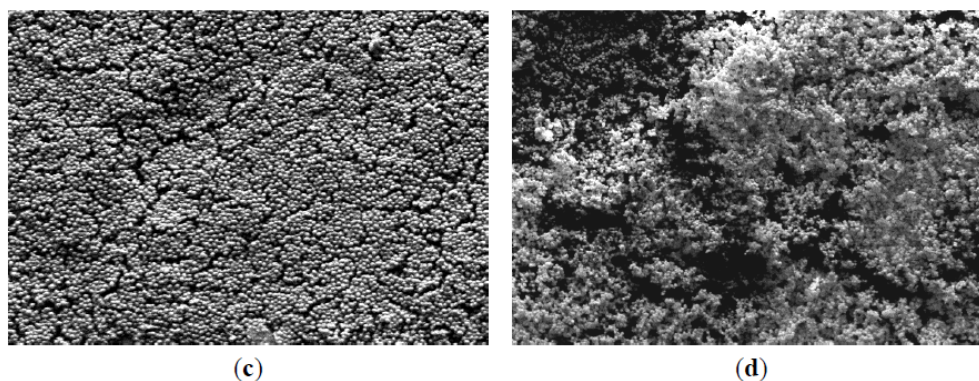


Figure 4. Cont.



The membrane fouling plays a key role in filtration processes. The presence of its effect was confirmed by the decline of the filtrate flux with processing time which lowered the filtration performances. This phenomenon could be due to several factors, such as cake formation, adsorptive fouling and pore blocking mechanisms [7] which may change the membrane characteristics and lead to an increase of filtration resistance. In order to understand the nature of fouling on the filtrate flux drop with time, total resistance, intrinsic membrane resistance and the nature of the fouling resistance were determined. It can be noted that, effectively, the contribution of intrinsic membrane resistance, $R_m = 0.448 \times 10^{12} \text{ m}^{-1}$, was rapidly negligible compared to the fouling resistances as shown in Table 2.

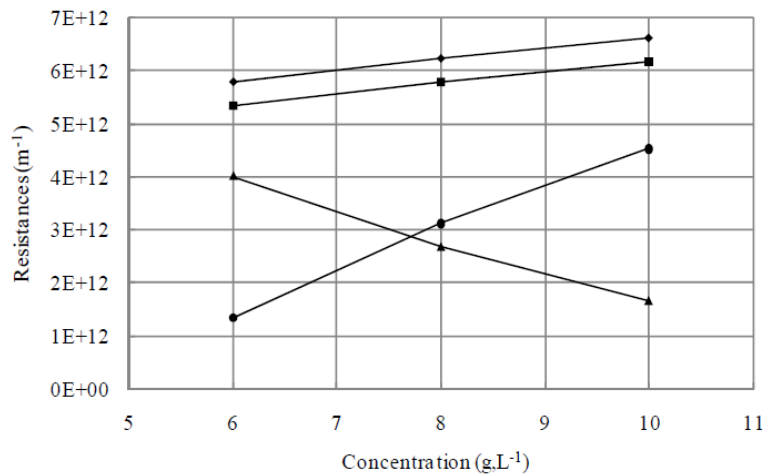
Table 2. Values of resistances obtained from the microfiltration of tested cell suspensions.

Suspension	Resistances $\times 10^{12} (\text{m}^{-1})$				Normalised resistances (%)	
	R_t	R_f	R_{if}	R_{rf}	R_{if}/R_t	R_{rf}/R_t
S ₁	5.79	5.34	4.01	1.33	75	25
S ₂	6.40	5.95	2.83	3.12	48	52
S ₃	6.49	6.04	2.39	3.65	40	60
S ₄	6.24	5.78	2.67	3.12	46	54
S ₅	6.63	6.18	1.65	4.53	27	73
S ₆	6.72	6.27	2.51	3.76	38	62
S ₇	7.68	7.23	2.84	4.39	40	60

To assess the potential reversibility of fouling, the resistances for the different concentrations were compared (Figure 5). Indeed, fouling and reversible resistances increased linearly with higher concentration. However, R_{if} decreased linearly when the concentration of the suspension increased.

As previously mentioned, aggregation phenomena at high yeast concentrations, suggested by SEM observations (Figure 4), could contribute to the membrane fouling.

Figure 5. Effect of initial cell concentration of *S. cerevisiae* on cake resistances ($\blacklozenge R_i$; $\blacksquare R_f$; $\blacktriangle R_{if}$; $\bullet R_{rf}$).



3.1.2. Microfiltration of Yeast and Bacteria Mixture

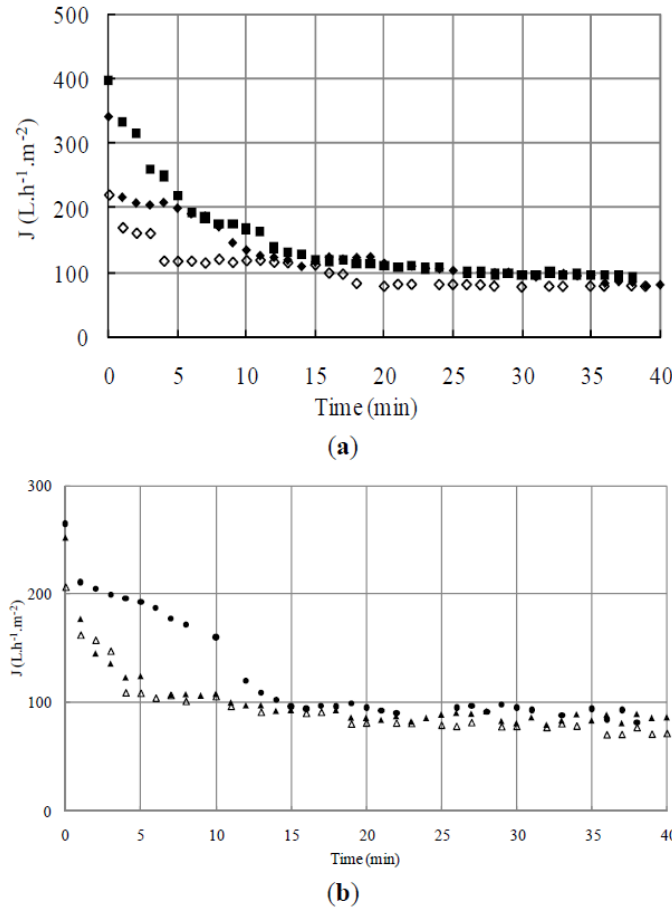
With the addition of *Escherichia coli* to the feed suspension, the interactions between yeasts cells and bacteria on the nature of fouling could be investigated. In this study, we focused on the suspensions presenting the highest reversible fouling (S_5) and the suspension causing the highest irreversible one (S_1).

3.1.2.1. Effect of Initial Cell Concentration on Microfiltration Performances

The effects of small bacteria on the type of cake formation could be studied by the addition of *Escherichia coli* to the microbial mixture. Figure 6a,b shows the flux evolution of two concentrations of washed yeast (6 g L^{-1} and 10 g L^{-1}) mixed with two different bacterial suspensions (0.15 g L^{-1} and 0.30 g L^{-1}). At the lower yeast concentration of 6 g L^{-1} (Figure 6a), the addition into the feed suspension of 0.15 g L^{-1} *Escherichia coli* reduced the initial flux value but after five minutes of filtration, the obtained flux was similar despite bacteria addition. The same behavior could be observed for the addition of 0.3 g L^{-1} of *Escherichia coli* with a more pronounced decrease in initial flux value and a slightly smaller value in the stabilized flux. In all runs for single species suspensions, the flux decreased until the fifteen first minutes was reached.

Under the same operating conditions, fluxes of yeast and bacteria mixtures were significantly lower in the case of the higher yeast concentration of 10 g L^{-1} (Figure 6b). The fluxes for mixture suspensions show an important decrease until the fifth minute and, then, tend towards stability. The percentages of flux loss during the different runs S_1 , S_2 , S_3 , S_4 , S_5 , S_6 and S_7 were respectively $77\% \pm 0.8\%$, $77\% \pm 1.5\%$, $65\% \pm 0.8\%$, $72\% \pm 0.6\%$, $69\% \pm 1.1\%$, $66\% \pm 1.1\%$ and $66\% \pm 0.5\%$. That showed that the flux loss was higher than 65% in the case of all cell suspensions.

Figure 6. (a) Effect of initial cell concentration on microfiltration of the mixture: *S. cerevisiae* (6 g L^{-1}) and *E. coli* [0 g L^{-1} ($\blacksquare S_1$); 0.15 g L^{-1} ($\blacklozenge S_2$); 0.3 g L^{-1} ($\diamond S_3$)] (TMP = 1.5 bar, $U = 2.38 \text{ m/s}$, $Re = 5950$); (b) Effect of initial cell concentration on microfiltration of the mixture: *S. cerevisiae* (10 g L^{-1}) and *E. coli* [0 g L^{-1} ($\bullet S_5$); 0.15 g L^{-1} ($\blacktriangle S_6$); 0.3 g L^{-1} ($\triangle S_7$)] (TMP = 1.5 bar, $U = 2.38 \text{ m/s}$, $Re = 5950$).



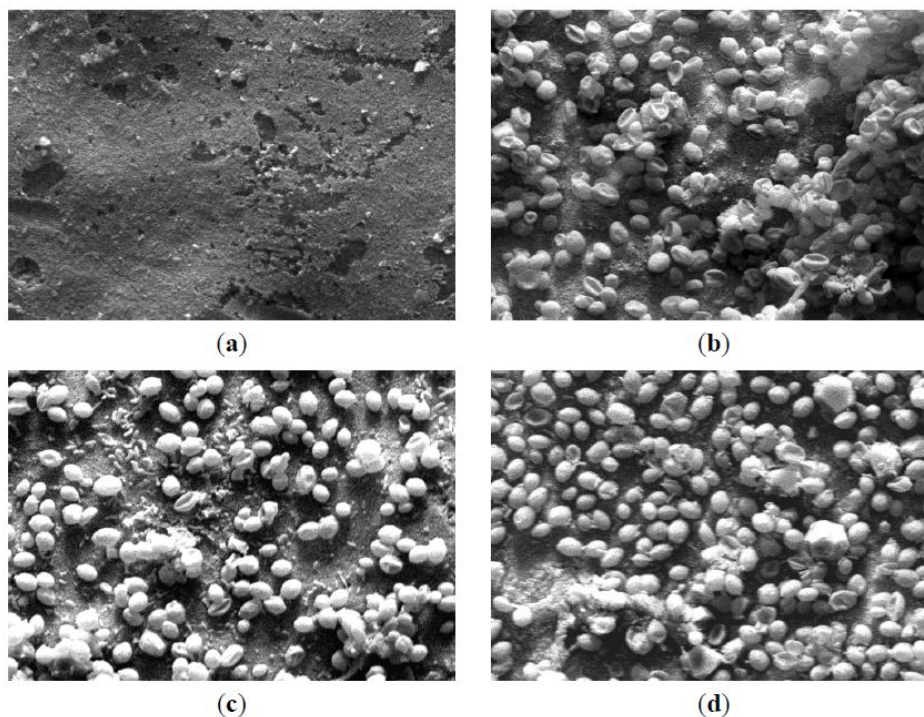
The size of *Escherichia coli* cells is about $0.5\text{--}1 \mu\text{m}$ in diameter and $2.5 \mu\text{m}$ in length [19] while the yeasts are ellipsoidal cells with a mean diameter around $5\text{--}6 \mu\text{m}$. Due to their low size, bacteria cells can be potentially captured on the bottom or inside of the yeast cake, which can increase the fouling resistance [23]. Indeed, the study of microfiltration on a ceramic membrane filter of *Escherichia coli* fermentation broth by Li *et al.* [19] showed that the flow resistance was mainly caused by the cake formed on the membrane surface. This author concluded that the contributions due to internal pore blockage by cells and the membrane itself are relatively unimportant. Indeed, the high ratio bacteria size/membrane pore diameter could explain the low internal fouling. It should also be mentioned that interactions between yeast/bacteria or bacteria/membrane could participate in the consolidation of the cake structure.

3.1.2.2. Effect of Initial Cell Concentration on Resistances

Interactions between microorganisms themselves and microorganisms/membrane could increase cake resistance by modifying the cake pore structure and by changing the cells aggregation [20,33,34]. As expected, with the introduction of *Escherichia coli*, the fouling resistance increased, compared to the one obtained with pure yeast suspensions. The presence of the bacteria modified the reversible part of the fouling even though it did not affect the flux. Indeed, the addition of bacteria to the suspensions of 6 g L^{-1} of yeast caused increase of reversible fouling: the ratio R_{rf}/R_f increased from 25% for S_1 to reach 52% and 60% for S_2 and S_3 , respectively (Table 2). Moreover, in the case of high yeast concentration (10 g L^{-1}), even though the reversible fouling remained the most important which decreased with the rise of the bacteria concentration: the ratio R_{rf}/R_f decreased from 73% for S_5 to reach 62% and 60% for S_6 and S_7 , respectively. The tendency was inversed for the irreversible fouling (Table 2). Even although some studies have concluded that internal fouling was negligible, others have shown that bacteria deformation could led to pore blocking, depending on membrane properties [35,36]. Indeed, when approaching the entrance of a pore, bacteria are submitted to hydrodynamic stresses due to velocity and pressure fields in the fluid that surrounds them. Such stresses could lead to their volume reduction (related to the osmotic equilibrium) and surface deformation (governed by the cell-wall Young modulus value) which would allow the cell to penetrate into the membrane pore (pore size deformation around mean diameter). In a wider sense, many authors assume bacteria deformation at constant volume. Indeed, some reports indicate that a low ionic strength or a high negative charge of bacteria facilitate their transport through a porous medium [37,38]. Moreover, bacteria volume reduction was observed in other studies. Mille *et al.* showed that, when submitted to a mechanical pressure, bacteria could lose a part of their internal liquid [39]. Others focused on the ability of various bacteria to pass through a membrane with a nominal pore size smaller than the cell size [36,40]. While Suchecka *et al.* [40] assumed that the passage of a Gram negative bacteria through a microfiltration membrane is possible by releasing intracellular matter into the environment. Lebleu *et al.* [36] found a correlation between the bacteria external structure and the filtration behavior. Indeed, for many tested strains, only the Gram-negative ones were able to pass through the $0.4 \mu\text{m}$ membrane whereas all Gram-positive ones were rejected.

At this point, the observation by SEM of the characteristics of the retentates sampled during filtration runs is highly interesting as it allows the retentates characteristics to be observed (Figure 7). Comparatively to the clean membrane piece used as a support (Figure 7a), the suspension's retentate containing only *Saccharomyces cerevisiae* S_1 (Figure 7b) at the lower tested concentration showed mostly individualized yeast cells; only a few aggregates and dead cells can be seen. When 0.3 g L^{-1} *Escherichia coli* were added (S_3), individualized yeasts with a few aggregates (Figure 7c) with yeast and bacteria apart were observed. Moreover, S_7 observation (Figure 7d) illustrated a higher cell density caused by higher concentration of *Saccharomyces cerevisiae* and more aggregates formed as well by *Saccharomyces cerevisiae* and *Escherichia coli*. These observations permit the assumption that *Escherichia coli* probably tend to favour aggregates and thus cake formation in comparison with pure suspensions of *Saccharomyces cerevisiae*.

Figure 7. SEM images of the clean membrane and retentates of solutions containing different concentrations of *S. cerevisiae* and *E. coli* (a) clean membrane; (b) S₁; (c) S₃; (d) S₇; ($\times 1000$).



To improve the analysis of the deposit characteristics during the microfiltration process, a proposed strategy was based upon direct observation with Confocal Laser Scanning Microscopy (CLSM). Indeed, different works have previously demonstrated the interest in CLSM to investigate fouling mechanisms at the local scale [12,23,41], performed thanks to a specifically designed microfiltration chamber equipped with a microscope glass coverslip. This system could then allow *in vivo* and *in situ* local analysis of the 3D-organisation of fouling deposition.

3.2. Filtration Chamber Design

Even though the mechanisms leading to membrane fouling during filtration are not yet fully understood, macroscopic laws have been developed assuming that basic mechanisms take place such as pore clogging, cake formation *etc.* These models are widely used in order to explain flux decline. However, they do not take into consideration particle size distribution, pore size distribution, cake morphology *etc.* In order to improve the performance of membrane processes, these mechanisms have to be better understood at the microscale level. Recent studies [1,42,43] have pointed out the strong influence of particle and flow characteristics on the properties of the cake and the filtration performances. Moreover, in the case of suspended microorganisms with a size distribution, their location and arrangement inside the cake seems to be correlated to their size [23]. However, the used chamber design allowed only the observation of the upper part of the deposits, corresponding to a 30 μm thickness slice. Moreover, the cake was obtained after the one-step filtration of a selected

volume of microbial suspension and it was then subsequently observed. Besides, the progressive formation of the deposit (real time analysis of the monolayer cake) and the effect of hydrodynamics on deposit formation and organization were not realized. All these drawbacks should be solved in an upcoming study.

To better study the respective effects of flow conditions and particle size, shape and surface properties on the dynamics of cake growth and morphology at the particle level and to establish correlations with microfiltration performance, a specific filtration chamber design has to be developed and optimized. This design should allow the direct observation of the formation of the cake *in situ* under various flow conditions (dead-end or cross-flow filtration).

3.2.1. Design Guidelines

Many studies have been conducted in the areas of membrane manufacturing and applications development. However, filtration chamber design is generally made by membrane system specialized companies and fewer investigations have been carried out on module development [23,33,44]. Our aim was to design a filtration chamber enabling a direct visualization of the deposit growth during filtration operating under controlled flow conditions. Indeed, the observation chamber previously used by Beaufort *et al.* [23] showed only a few μm of the top of the cake. In order to accurately measure the cake characteristics (thickness, porosity *etc.*), the chamber design should both allow the observation of the clean membrane and the cake growth during all the runs. Towards this end, the design should take into account several requirements and guidelines about chamber sizing, accurate resolution for observations and cleaning of the system.

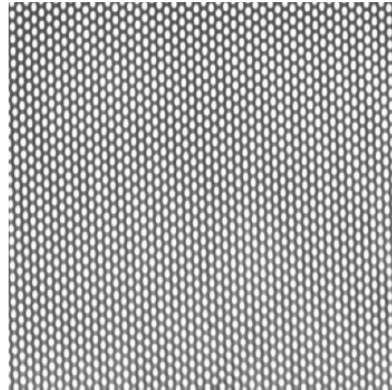
1. The key-question was to find the optimal apparatus size which allows the observation *in situ* of all the deposit cake in its full depth and not only in a part of it. Moreover, the dimensions of the observation window should be sufficiently large to allow the microscope objective to scan a representative area of the filtration membrane. In addition, the chamber glass coverslip thickness has to remain as thin as possible to keep a total chamber depth suitable for the working length of the microscope objective. However, it should not be deformed when submitted to pressure variations due to fluid flow that limits the size of the window.

2. In order to observe the particle deposit on the membrane surface *in situ*, the light has to cross the glass cover slip and the particle suspension above the microsieve. The total distance corresponds to the height of the flow channel required to set the selected flow conditions over the membrane and the thickness of the cover slip. According to these constraints, a microscope objective with “Long Working Distance Lenses” has to be selected.

3. Membrane cleaning: The filtration chamber material has to be consistent with the membrane cleaning technique which most commonly requires two phases: hydraulic cleaning and chemical cleaning.

4. Membrane choice: It should be noted that the microsieve system is the best compromise in terms of membrane area minimization and permeate flow rate maximization [45]. Indeed, microsieves are perfectly plane thin silicon nitride membranes with a regular arrangement of circular well-defined and uniform pores of high porosity and permeability, and compared to conventional membranes, exhibit a uniform distribution of particles in the filtration field. Figure 8 shows micrographs of the sieves with $0.45 \mu\text{m}$ pore width (Aquamarijn[®], [43]). Moreover, these membranes have previously been used for yeast separation in beer processing [46].

Figure 8. Optical micrograph of microsieve with circular pores: 0.45 μm .

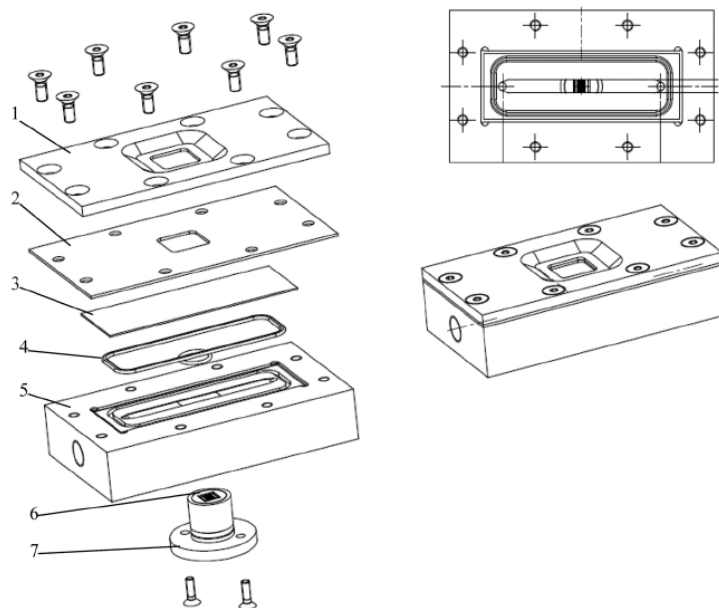


In this research, a designed laboratory-scale filtration chamber incorporates the developments discussed above.

3.2.2. Direct Observation Chamber and Apparatus

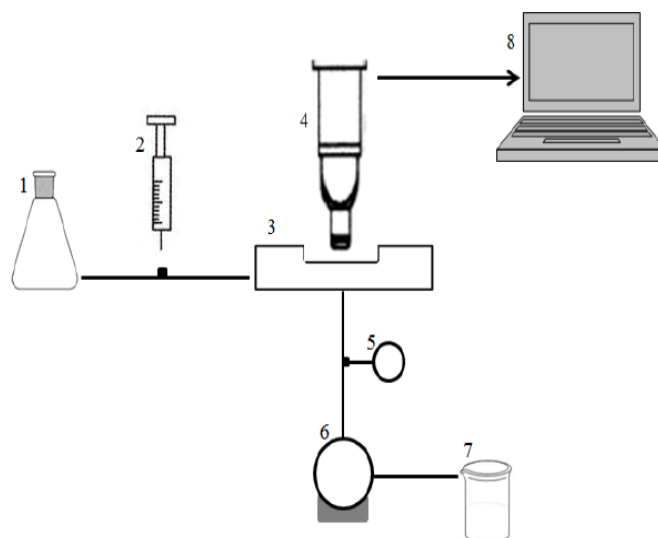
The filtration chamber was designed and constructed from stainless steel with a glass window in the top plate allowing direct microscopic observation of particle deposition and cake formation. The selected material was stainless steel suitable for chemical cleaning. A schematic illustration of the chamber and the filtration unit are presented in Figures 9 and 10. For deposit observations during the filtration process, this chamber can be directly mounted on a CLSM microscope (Leica, Japan). Images of the membrane surface are taken and combined into an overlay with the Leica CLSM software.

Figure 9. Schematic diagrams of the direct observation filtration chamber (1: cover; 2: joint; 3: glass coverslip; 4: O ring; 5: base; 6: microsieve; 7: disc mount).



The filtration apparatus (Figure 10) consisted of two circulation loops with two feed flasks: The first one is for the circulation of deionized water and the second for the particle suspension. Moreover, a pump (Masterflex, Bioblock scientific, USA) and a digital compact vacuum meter (Thyrcont, Germany) are used to monitor the crossflow conditions.

Figure 10. Schematic illustration of the microfiltration set up (1: deionized feed flask; 2: particle injection; 3: filtration chamber; 4: CLSM microscope; 5: numeric manometer; 6: pump; 7: permeate outlet; 8: PC).



3.2.3. CLSM for Membrane Characterization and Preliminary Fouling Observations

The manufacturer's data for surface porosity of the clean membrane was compared with the porosity determined experimentally in reflection mode, to check the measurement accuracy obtained by image processing of CLSM recordings. The values were 25.6% and $25.5\% \pm 2.3\%$ respectively, which validate the use of CLSM and Image J image processing in order to get a correct estimation of cake properties.

The proposed strategy uses the direct observation by CLSM of fluorescent dyed microorganisms (yeasts and/or bacteria). The studied microorganisms were double stained. As the selected fluorescent dyes targeted different cell sites, the microorganism were efficiently stained. Fluorescence intensity is dependent on several factors including dye concentration, spectral intensity at a particular wavelength, photobleaching *etc.* Characteristics of the two dyes were examined and visualization conditions optimized. Furthermore, even though background fluorescence caused by the microsieve was frequently less intense than the dyed cells, visualization conditions were set to only observe the microorganisms.

In order to validate the staining method, preliminary observations of different samples with CLSM were done. Firstly *Escherichia coli* aggregates were dyed with rhodamine 123 and directly observed on a glass slide. Secondly, a microsieve fouled by 4.5×10^{-3} g of *Saccharomyces cerevisiae* both dyed by rhodamine 123 and fluorescein diacetate, was examined. The stack of images recorded along the z-axis was processed with the software Image J to generate 3D images and, then, the aggregate or the

deposit could be analyzed according to various cross sections. These orthogonal planes allow examination of the cross-sectional slices through the image volume in the *XZ*, *YZ* and *XY* planes (Figures 11 and 12, respectively).

Figure 11. Orthogonal view of the 3D reconstruction of an *E. coli* fouling cake dyed by rhodamine 123.

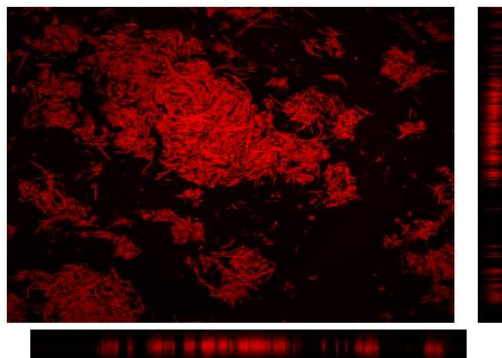


Figure 12. Orthogonal view of the 3D reconstruction of a 0.45 μm microsieve fouled by a *S. cerevisiae* suspension dyed by rhodamine 123 and fluorescein diacetate.

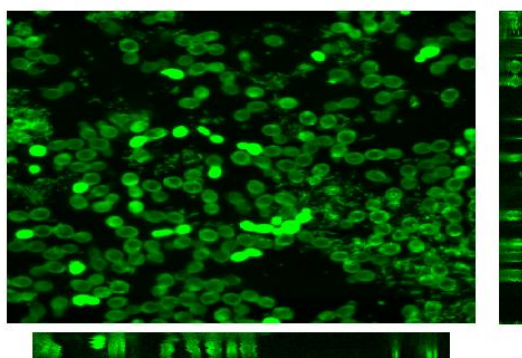


Figure 13 shows the fouled microsieve by yeast in reflection mode which validated that CLSM makes it possible to clearly distinguish both the pores on the membrane surface and the cells deposited. In addition first tests of the filtration of a mixture of *Saccharomyces cerevisiae* and *Escherichia coli* were performed. A promising typical image of the first layer of the cake obtained by CLSM is shown in Figure 14. It is thus expected to be able to better understand the link between bioparticle properties and interactions, cake formation and membrane fouling and subsequent filtration performance.

Figure 13. CLSM image in reflection and (a) fluorescence (b) mode in of a 0.45 μm microsieve fouled by *S. cerevisiae* suspension dyed by rhodamine 123 and fluorescein diacetate.

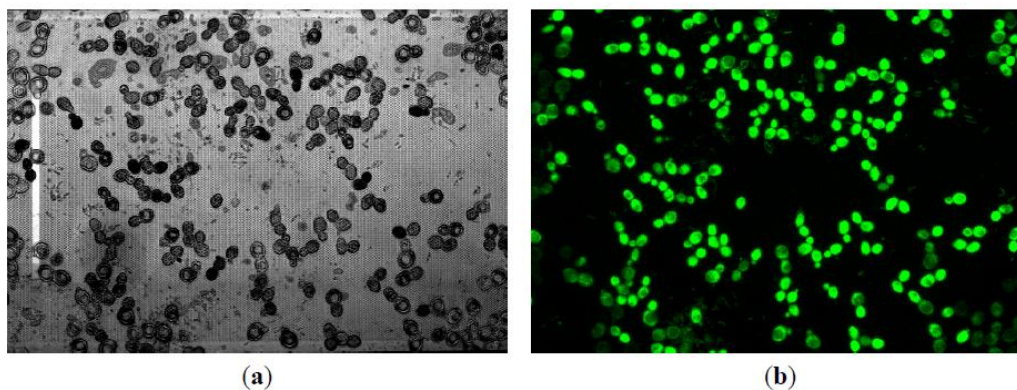
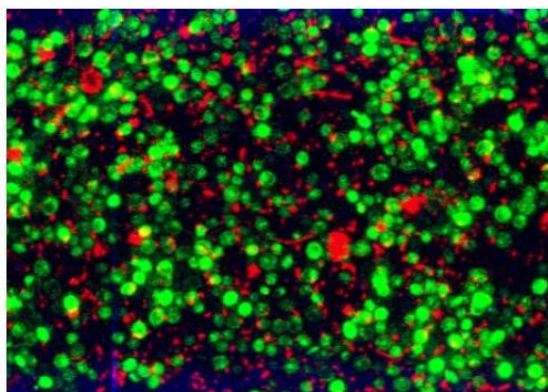


Figure 14. Composite image of a 0.8 μm pore size microsieve fouled with one layer of *E. coli* and *S. cerevisiae*.



These first results have shown that this new filtration chamber could be a powerful tool for fouling characterization and analysis of cake building mechanisms.

4. Conclusions and Perspectives

The fouling behavior of the microorganisms was analyzed thanks to model suspensions. It was shown that membrane fouling is highly dependent on the respective concentration of microorganism species in suspension. Indeed, the microfiltration of *Saccharomyces cerevisiae* yeast mainly causes a reversible fouling. The addition of *Escherichia coli* to the lowest yeast concentration of 6 g L^{-1} induces an increase of reversible fouling. Moreover, the addition of *Escherichia coli* reveals a significant increase of irreversible resistance for higher concentration of yeast (10 g L^{-1}). This analysis made at a macroscopic scale is in agreement with previous work of Beaufort *et al.* [23] obtained at a microscopic scale but limited to the upper part of a thick cake already formed ($30 \mu\text{m}$ vs. $80 \mu\text{m}$). To

better understand the effects of incorporating bacteria into cake on the fouling type, the progressive formation of the deposit *in situ* should be studied in further work.

In order to improve the knowledge on the building mechanisms and morphology of microbial cakes, a new filtration chamber design allowing the direct *in situ* observation of the formation and subsequent organization of microbial deposits has been proposed. Moreover this device has been designed to operate either in dead-end or cross-flow filtration. This original approach for fouling characterization using CLSM and image analysis technique has been developed and validated.

This device will give us the opportunity to exhibit the 3D-organisation of the microorganisms in the cake and then improve the study of fouling mechanisms in the case of bi-dispersed suspensions by the direct visualization of the fluorescent fouling *in situ* and the identification of each microorganism.

The ongoing work intends to analyze the characteristics of mixed microbial deposits at the particle level under controlled flow conditions (transmembrane pressure and cross flow rate) in order to better understand fouling mechanisms and to improve the performances at the process level. Moreover, this first approach, performed with re-hydrated and rinsed microorganisms, should be developed for cultivated microorganisms since it is obvious that all the chemical compounds of the medium surrounding the cells could play an important part in cake organization and reversibility.

Acknowledgements

The authors gratefully acknowledge the support of Zouhair Fakfakh from the Science University of Sfax for scanning electron microscopy analysis, Hafedh Ben Ouada, the head of the Science and Technology Superior Institute of Mahdia, for the material support in the fermentation experiments and the technical support of Christophe Ellero from LISBP for the conception of the new filtration chamber, Paul Duru from the Fluid Mechanic Institute of Toulouse (IMFT) and Aurélie Le Ru from the IFR40, INRA.

The financial support from Franco-Tunisian Integrated Action of French Foreign and European office and Tunisian Higher Education and Scientific Research office is gratefully acknowledged.

References

1. Mota, M.; Teixeira, J.A.; Yelshin, A. Influence of cell-shape on the cake resistance in dead-end and cross-flow filtrations. *Sep. Purif. Technol.* **2002**, *27*, 137–144.
2. Fillaudeau, L.; Carrère, H. Yeast cells, beer composition and mean pore diameter impacts on fouling and retention during cross-flow filtration of beer with ceramic membranes. *J. Membr. Sci.* **2002**, *196*, 39–57.
3. Daufin, G.; Escudier, J.P.; Carrère, H.; Berot, S.; Fillaudeau, L.; Decloux, M. Recent and emerging applications of membrane processes in food and dairy industry. *Food Bioprod. Process.* **2001**, *79*, 89–102.
4. Jin, J.; Chhatre, S.; Titchener-Hooker, N.J.; Bracewell, D.G. Evaluation of the impact of lipid fouling during the chromatographic purification of virus-like particles from *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **2009**, *85*, 209–215.

5. Chau, S.; Baldascini, H.; Hearle, D.; Hoare, M.; Titchener-Hooker, N.J. Effect of fouling on the capacity and breakthrough characteristics of a packed bed ion exchange chromatography column. *Bioprocess. Biosys. Eng.* **2006**, *28*, 405–414.
6. Wang, L.; Wang, X.; Fukushi, K. Effects of operational conditions on ultrafiltration membrane fouling. *Desalination* **2008**, *229*, 181–191.
7. Pelegrine, D.H.G.; Gasparetto, C.A. Whey proteins solubility as function of temperature and pH. *Food Sci. Technol.* **2005**, *38*, 77–80.
8. Nigam, M.O.; Bansal, B.; Dong, C.X. Fouling and cleaning of whey protein concentrate fouled ultrafiltration membranes. *Desalination* **2008**, *218*, 313–322.
9. Foley, G. A review of factors affecting filter cake properties in dead-end microfiltration of microbial suspensions. *J. Membr. Sci.* **2006**, *274*, 38–46.
10. Foley, G.; McLoughlin, P.F.; Malone, D.M. Membrane fouling during constant flux crossflow microfiltration of dilute suspensions of active dry yeast. *Sep. Sci. Technol.* **1995**, *30*, 383–398.
11. Iskra, T.; Bolton, G.R.; Coffman, J.L.; Godavarti, R. The effect of protein A cycle number on the performance and lifetime of an anion exchange polishing step. *Biotechnol. Bioeng.* **2013**, *110*, 1142–1152.
12. Corbett, R.; Carta, G.; Iskra, T.; Gallo, C.; Godavarti, R.; Salm, J.R. Structure and protein adsorption mechanisms of clean and fouled tentacle-type anion exchangers used in a monoclonal antibody polishing step. *J. Chromatogr. A* **2013**, *1278*, 116–125.
13. Kuberkar, V.T.; Davis, R.H. Effects of added yeast on protein transmission and flux in cross-flow membrane microfiltration. *Biotechnol. Prog.* **1999**, *15*, 472–479.
14. Ye, Y.; Chen, V. Reversibility of heterogeneous deposits formed from yeast and proteins during microfiltration. *J. Membr. Sci.* **2005**, *265*, 20–28.
15. Güll, C.; Czekaj, P.; Davis, R.H. Microfiltration of protein mixtures and the effects of yeast on membrane fouling. *J. Membr. Sci.* **1999**, *155*, 113–122.
16. Kawakatsu, T.; Nakao, S.; Kimura, S. Macromolecule rejection with compressible and incompressible cake layer formed in crossflow microfiltration. *J. Chem. Eng. Jpn.* **1993**, *26*, 656–661.
17. Tanaka, T.; Kamimura, R.; Fujiwara, R.; Nakanishi, K. Crossflow filtration of yeast broth cultivated in molasses. *Biotechnol. Bioeng.* **1994**, *43*, 1094–1101.
18. Li, Y.; Shahbazi, A.; Kadzere, C.T. Separation of cells and proteins from fermentation broth using ultrafiltration. *J. Food Eng.* **2006**, *75*, 574–580.
19. Li, S.L.; Chou, K.S.; Lin, J.Y.; Yen, H.W.; Chu, I.M. Study on the microfiltration of *Escherichia coli* containing fermentation broth by a ceramic membrane filter. *J. Membr. Sci.* **1996**, *110*, 203–210.
20. Okamoto, Y.; Ohmori, K.; Glatz, C.E. Harvest time effects on membrane cake resistance of *Escherichia coli* broth. *J. Membr. Sci.* **2001**, *190*, 93–106.
21. Boissier, B.; Lutin, F.; Moutounet, M.; Vernhet, A. Particles deposition during the cross-flow microfiltration of red wines-incidence of the hydrodynamic conditions and the yeast to fines ratio. *Chem. Eng. Process. Process Intensif.* **2008**, *47*, 276–286.
22. Mccarthy, A.A.; Walsh, P.K.; Foley, G. Experimental techniques for quantifying the cake mass, the cake and membrane resistances and the specific cake resistance during crossflow filtration of microbial suspensions. *J. Membr. Sci.* **2002**, *201*, 31–45.
23. Beaufort, S.; Alfenore, S.; Lafforgue, C. Use of fluorescent microorganisms to perform *in vivo* and *in situ* local characterization of microbial deposits. *J. Membr. Sci.* **2011**, *369*, 30–39.

24. Hwang, B.-K.; Lee, C.-H.; Chang, I.-S.; Drews, A.; Field, R. Membrane bioreactor: TMP rise and characterization of bio-cake structure using CLSM-image analysis. *J. Membr. Sci.* **2012**, *419–420*, 33–41.
25. Sun, C.; Fiksdal, L.; Hanssen-Bauer, A.; Rye, M.B.; Leiknes, T. Characterization of membrane biofouling at different operating conditions (flux) in drinking water treatment using confocal laser scanning microscopy (CLSM) and image analysis. *J. Membr. Sci.* **2011**, *382*, 194–201.
26. Günther, J.; Schmitz, P.; Albasi, C.; Lafforgue, C. A numerical approach to study the impact of packing density on fluid flow distribution in hollow fiber module. *J. Membr. Sci.* **2010**, *348*, 277–286.
27. Dufreche, J.; Prat, M.; Schmitz, P.; Sherwood, J.D. On the apparent permeability of a porous layer backed by a perforated plate. *Chem. Eng. Sci.* **2002**, *57*, 2933–2944.
28. Gassara, D.; Schmitz, P.; Ayadi, A.; Prat, M. Modelling the effect of particle size in microfiltration. *Sep. Sci. Technol.* **2008**, *43*, 1754–1770.
29. Kimura, K.; Hane, Y.; Watanabe, Y.; Amy, G.; Ohkuma, N. Irreversible membrane fouling during ultrafiltration of surface water. *Water Res.* **2004**, *38*, 3431–3441.
30. Kumar, M.S.; Madhu, G.M.; Roy, S. Fouling behaviour, regeneration options and on-line control of biomass-based power plant effluents using microporous ceramic membranes. *Sep. Purif. Technol.* **2007**, *57*, 25–36.
31. Image J Home Page. Available online: <http://rsb.info.nih.gov/ij/> (accessed on 6 May 2013).
32. Russotti, G.; Osawa, A.E.; Sitrin, R.D.; Buckland, B.C.; Adams, W.R.; Lee, S.S. Pilot-scale harvest of recombinant yeast employing microfiltration: A case study. *J. Biotechnol.* **1995**, *42*, 235–246.
33. Kang, S.T.; Subramani, A.; Hoek, E.M.V.; Deshusses, M.A.; Matsumoto, M.R. Direct observation of biofouling in cross-flow microfiltration: Mechanisms of deposition and release. *J. Membr. Sci.* **2004**, *244*, 151–165.
34. Stewart, P.S.; Robertson, C.R. Microbial growth in a fixed volume: Studies with entrapped *Escherichia coli*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **1989**, *30*, 34–40.
35. McDonogh, R.M.; Fane, A.G.; Fell, C.J.D.; Flemming, H. The influence of polydispersity on the hydraulic behaviour of colloidal fouling layers on membranes perturbations on the behavior of the “ideal” colloidal layer. *Colloids Surf. A* **1998**, *138*, 231–244.
36. Lebleu, N.; Roques, C.; Aimar, P.; Causserand, C. Role of the cell-wall structure in the retention of bacteria by microfiltration membranes. *J. Membr. Sci.* **2009**, *326*, 178–185.
37. Johnson, W.P.; Martin, M.J.; Gross, M.J.; Logan, B.E. Facilitation of bacterial transport through porous media by changes in solution and surface properties. *Colloids Surf. A* **1996**, *107*, 263–271.
38. Sharma, M.M.; Chang, Y.I.; Yen, T.F. Reversible and irreversible surface charge modification of bacteria for facilitating transport through porous media. *Colloids Surf.* **1985**, *16*, 193–206.
39. Mille, Y.; Beney, L.; Gervais, P. Viability of *Escherichia coli* after combined osmotic and thermal treatment: A plasma membrane implication. *Biochim. Biophys. Acta* **2002**, *1567*, 41–48.
40. Suchecka, T.; Piatkiewicz, W.; Sosnowski, T.R. Is the cell retention by MF membrane absolutely safe—A hypothetical model for cell deformation in a membrane pore. *J. Membr. Sci.* **2005**, *250*, 135–140.
41. Siu, S.C.; Boushaba, R.; Topoyassakul, V.; Graham, A.; Choudhury, S.; Moss, G.; Titchener-Hooker, N.J. Visualising fouling of a chromatographic matrix using confocal scanning laser microscopy. *Biotechnol. Bioeng.* **2006**, *95*, 714–723.

42. Zhang, Y.P.; Fane, A.G.; Law, A.W.K. Critical flux and particle deposition of bidisperse suspensions during crossflow microfiltration. *J. Membr. Sci.* **2006**, *282*, 189–197.
43. Kuiper, S.; Brink, R.; Nijdam, W.; Krijnen, G.J.M.; Elwenspoek, M.C. Ceramic microsieves: Influence of perforation shape and distribution on flow resistance and membrane strength. *J. Membr. Sci.* **2002**, *196*, 149–157.
44. Brans, G.; van Dinther, A.; Odum, B.; Schroen, C.G.P.H.; Boom, R.M. Transmission and fractionation of micro-sized particle suspensions. *J. Membr. Sci.* **2007**, *290*, 230–240.
45. Van Rijn, C.J.M. *Nano and Micro Engineered Membrane Technology*; Membrane Science and Technology Series 10; Elsevier: Amsterdam, the Netherlands, 2004.
46. Kuiper, S.; van Rijn, C.J.M.; Nijdam, W.; Raspe, O.; van Wolferen, H.; Krijnen, G.; Elwenspoek, M. Filtration of lager beer with microsieves: Flux, permeate, haze and in-line microscope observations. *J. Membr. Sci.* **2002**, *196*, 159–170.

© 2013 by the authors; licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution license (<http://creativecommons.org/licenses/by/3.0/>).

Chapitre III. Matériel et Méthodes

Cette étude a pour but d'analyser, par une approche expérimentale, la construction d'un gâteau de filtration et son effet sur les performances du procédé. Les fluides réels contiennent fréquemment une composante biologique de composition complexe et variable. Cela peut être un large spectre de microorganismes de différentes tailles et propriétés. Vu l'importante diversité de microorganismes et la complexité des interactions entre les différentes espèces, il est impossible de généraliser les résultats obtenus lors de quelques essais de filtration d'eaux réelles. Néanmoins, il est essentiel d'identifier les phénomènes et mécanismes prépondérants afin de tendre vers une optimisation de la conduite des opérations. Dans ce sens, le recours à des systèmes modèles est particulièrement pertinent.

Ce chapitre a pour but de présenter le matériel utilisé (suspensions modèles inertes, suspensions de microorganismes, système de filtration), ainsi que les différents protocoles expérimentaux mis en œuvre.

III.1 Particules modèles

Dans cette étude, on se propose, d'abord, de remplacer des microorganismes par des particules microniques inertes. Les particules sélectionnées doivent répondre à plusieurs critères:

- Taille de l'ordre de grandeur de microorganismes (*Escherichia coli* et *Saccharomyces cerevisiae*)
- Géométrie parfaitement sphérique, monodisperse.
- Posséder un pouvoir interactif négligeable.
- Inertes vis à vis de microorganismes quand elles sont mélangées avec eux
- Spectres d'émission de fluorescence bien distincts.

Au vu de ces critères, des microsphères en polystyrène (Thermo Scientifique, USA) de 1 μm et 4,8 μm de diamètre ont été sélectionnées. Elles sont conditionnées à une concentration de 1 % (w/w) dans de l'eau ultrapure avec des traces de conservateur et de tensio-actif, pour limiter leur agrégation. Les maxima d'émission de fluorescence sont bien distincts (**Tableau III.1-1**).

Tableau III.1-1: Propriétés spectrales des microsphères fluorescentes

Diamètre des microsphères	Couleur	Maximum d'excitation (nm)	Maximum d'émission (nm)
1 μm	rouge	542	612
4,8 μm	vert	468	508

III.2 Microorganismes modèles

La levure *Saccharomyces cerevisiae* a été sélectionnée comme modèle d'étude eucaryote. Elle est très répandue dans les industries alimentaires d'où une grande présence dans les eaux industrielles. L'organisme procaryote retenu comme modèle est *Escherichia coli*. Cette bactérie est très largement répandue et impliquée dans de nombreuses pathologies. Elle est considérée comme marqueur de contaminations fécales dans les contrôles microbiologiques. Les deux microorganismes choisis présentent des différences morphologiques notables.

Toutes les manipulations sont effectuées sous un PSM (Poste de Sécurité Microbiologique) de type II respectant la norme NF EN 12469.

III.2.1 Milieux de culture

Les milieux de culture YPD (Yeast Extract Peptone Dextrose) (**Tableau III.2-1**) et LB (Luria Bertani) (**Tableau III.2-2**) sont utilisés, respectivement, pour la préculture et la culture de *Saccharomyces cerevisiae* et *Escherichia coli*. Les milieux sont autoclavés à 120°C pendant 20 minutes. Une solution de glucose concentrée (500 g.L⁻¹) est préparée et stérilisée à part par autoclavage puis ajoutée au milieu LB.

Les milieux gélosés, obtenus par ajout d'agar à 15 g.L⁻¹, sont utilisés pour le dénombrement des microorganismes.

Tableau III.2-1 : Composition du milieu de culture YPD

Composés	Concentration (g.L ⁻¹)
Glucose	10
Extrait de levure	10
Bactopeptone	10
<i>Agar pour gélose</i>	15

Tableau III.2-2 : Composition du milieu de culture LB glucosé

Composés	Concentration (g.L ⁻¹)
NaCl	10 g
Extrait de levure	5
Tryptone	10
Glucose	10
<i>Agar pour gélose</i>	15

III.2.2 Conservation des souches

Un milligramme de levures sèches (*Sacharomyces cerevisiae* active sèche, Lesaffre, France) est réhydraté dans quelques millilitres d'eau physiologique stérile et incubé à 30°C pendant 10 minutes sous agitation. Les levures ainsi réactivées servent à ensemercer une gélose YPD pendant 48 heures à 30°C.

La culture de la bactérie *Escherichia coli* K12 est initiée à partir de un millilitre d'un tube de glycérol-stock conservé au congélateur (-20°C) dans 50 mL de LB. Une boîte de Pétri contenant de la gélose LB est ensemençée à partir de cette culture et incubée à 37°C pendant 24h.

Des précultures de 2 mL de milieu sont réalisées à partir de colonies isolées et incubées sous agitation (200 tours/minutes) pendant 24 heures à 30°C pour les levures et 12 heures à 37°C pour les bactéries. Les contenus de ces tubes sont transférés dans des fioles d'Erlenmeyer de 500 mL contenant 50 mL de milieux puis incubés dans les mêmes conditions. Les microorganismes sont, ensuite, récoltés en phase exponentielle et stockés à -80°C dans des cryotubes avec 20 % de glycérol stérile.

III.2.3 Mise en œuvre de la culture des microorganismes

La culture des microorganismes modèles est réalisée en fiole d'Erlenmeyer et en fermenteur.

III.2.3.1 Cultures en fiole d'Erlenmeyers

Les inocula pour les cultures en bioréacteur ainsi que les suspensions cellulaires utilisées pour les expériences de microfiltration sont obtenus par cultures discontinues en fioles d'Erlenmeyers. Pour cela 50 mL de milieu sont ensemençés (10% v/v) avec 1 mL de la souche conservée et mis à incuber 24 heures à 30°C pour *Saccharomyces cerevisiae* et 12 heures à 37°C pour *Escherichia coli* sur une table d'agitation (200 tours/minutes).

III.2.3.2 Cultures en bioréacteurs

Les cinétiques biologiques des souches de *Saccharomyces cerevisiae* et *Escherichia coli* ont été caractérisées lors d'une culture dans un réacteur double enveloppe en verre d'un volume de 2 L (CBC5 Chemap) équipé de sondes pour la mesure et le contrôle du pH, de la température et de l'oxygène dissous. La sonde pH est calibrée par des solutions tampons (Chem-Lab, Belgique) avant l'autoclavage et la sonde pO₂ est calibrée après autoclavage. Le

bioréacteur est autoclavé avec le milieu correspondant aux microorganismes à étudier, à l'exception du glucose qui est ajouté avant inoculation du réacteur. 200 mL de la préculture en phase exponentielle de croissance est introduite dans le fermenteur (10 % v/v). Initialement, la vitesse d'agitation est fixée à 200 tours/min puis elle est graduellement augmentée afin de ne pas limiter la culture en oxygène.

III.2.4 Techniques analytiques

III.2.4.1 Mesure de la densité optique (DO)

La croissance est suivie par spectrométrie (spectrophotomètre Biochrom Libra S4) à 600 nm dans une microcuve à usage unique de 1 cm de trajet optique. Des dilutions sont effectuées pour obtenir une absorbance comprise entre 0,1 et 0,7 UA. La mesure est réalisée en triple pour chaque dilution.

III.2.4.2 Détermination de la masse sèche

5 à 10 mL d'échantillon sont filtrés sur système Büchner avec une pompe à vide (Knf, Laboport) sur des membranes (Sartorius Sortolon polyamide) de 0,2 µm de diamètre de pores, séchées 48 heures à 60 °C sous 200 mm d'Hg) et pesées au préalable (masse m_0). Les filtres sont à nouveau séchés dans les mêmes conditions puis pesés (masse m_1). La masse de matière sèche par unité de volume, notée ρ_s , est alors déterminée :

$$\rho_s = \frac{(m_1 - m_0)}{\text{Volume filtré}} \quad \text{Équation III.2-1}$$

III.2.4.3 Dénombrement des microorganismes

Les microorganismes viables sont déterminés par dénombrement des UFC (unités formant colonies) sur boîte de pétri contenant pour *Saccharomyces cerevisiae* une gélose YPD et pour *Escherichia coli* une gélose LB. Les échantillons sont dilués de façon appropriée avec de l'eau physiologique stérile (9 g.L⁻¹ NaCL). Le comptage des cellules est réalisé au bout de 24 h à 48 h d'incubation à 30 °C pour les levures et 37 °C pour les bactéries.

III.2.4.4 Détermination de la concentration en glucose

La teneur en glucose est déterminée dans le surnageant de culture (centrifugation 12000 g, 5 minutes) par une méthode enzymatique avec un analyseur biochimique YSI 27A (Yellow Springs Instruments). Dans ce dispositif, la glucose oxydase, immobilisée sur une membrane,

agit sur le glucose du milieu en libérant du peroxyde d'hydrogène. L'oxydation de H_2O_2 sur une électrode en platine libère un flux d'électrons proportionnel à la concentration en glucose dans le milieu. Cet instrument est calibré par une solution de glucose de $2,5 \text{ g.L}^{-1}$ et la gamme linéaire se situe entre 0 et $0,25 \text{ g.L}^{-1}$. L'erreur est de l'ordre de 2 à 5 %.

III.2.5 Marquage des microorganismes

Plusieurs colorants ont été utilisés : le bleu de méthylène, le diacétate de fluorescéine (FDA), la Rhodamine 123, le Syto 9 et le Syto 84. Les trois premiers ne sont pas classés comme dangereux au sens de la Directive 67/548/CEE. Le Syto 9 et le Syto 84 doivent en revanche être manipulés avec un soin particulier car, pouvant se lier aux acides nucléiques, ils sont considérés comme potentiellement mutagènes. De plus, ils sont dilués dans le DMSO (Diméthyle sulfoxyde) dont le rôle est de faciliter la pénétration des molécules organiques dans les cellules et les tissus et qui pourrait présenter une toxicité notable. Tous les colorants doivent être manipulés et éliminés selon la réglementation.

III.2.5.1 Utilisation du bleu de méthylène pour *Saccharomyces cerevisiae*

Le bleu de méthylène est utilisé comme marqueur de l'activité métabolique chez *Saccharomyces cerevisiae*. En effet, la détermination de la viabilité des cellules est basée sur la décoloration du bleu de méthylène qui traduit l'intégrité de l'enveloppe cellulaire et l'activité de la déshydrogénase intracellulaire ou estérases fonctionnelles chez les cellules actives. Ainsi, la réduction du bleu de méthylène (incolore) initialement bleu témoigne de l'activité globale des cellules, et de leur viabilité. Les cellules bleues sont considérées comme non viables.

Pour marquer les cellules, un volume de suspension cellulaire est ajouté au même volume de la solution de colorant ($0,1 \text{ g.L}^{-1}$). Après 5 minutes d'incubation, la suspension est observée au microscope optique (objectif 40 x) sur une lame de Thoma.

Le colorant est préparé avec 100 mg bleu de méthylène déshydraté pour 100 mL d'eau distillée. La solution est, ensuite, filtrée sur des filtres Minisart $0,2 \mu\text{m}$ stériles (Sartorius, Allemagne).

III.2.5.2 Marquage des microorganismes par les fluorochromes

III.2.5.2.1 Marquage à la Rhodamine 123

La Rhodamine 123 est un fluorochrome qui s'accumule dans les mitochondries des cellules vivantes. Ce marqueur se distribue en fonction de la charge négative du potentiel de la membrane à l'intérieur des mitochondries. Ses maxima d'excitation et d'émission sont à 507 nm et 529 nm, respectivement (**Figure III.2-1**). Ce fluorochrome est utilisé à une concentration de $5 \mu\text{g.mL}^{-1}$ dans des suspensions cellulaires lavées deux fois et resuspendues dans l'eau physiologique.

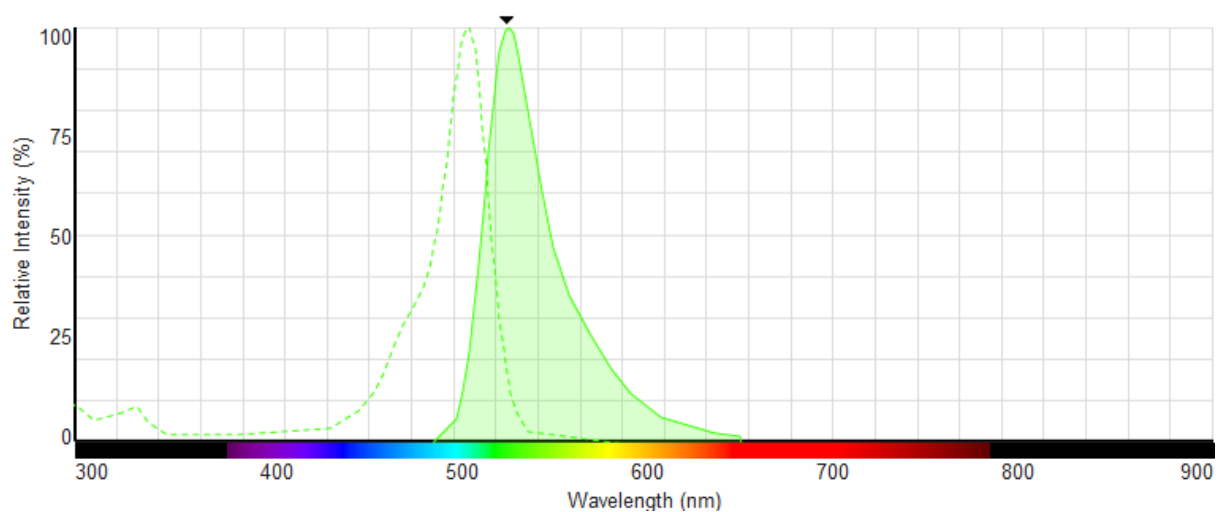


Figure III.2-1 : Spectre d'excitation et d'émission de la Rhodamine 123

III.2.5.2.2 Marquage au diacétate de fluorescéine

Le diacétate de fluorescéine (FDA) est un composé, incolore, non polaire qui pénètre passivement dans les cellules. A l'intérieur des cellules, il est hydrolysé par des estérases non spécifiques produites par les microorganismes métaboliquement actifs pour donner un composé fluorescent : la fluorescéine (**Figure III.2-2**) [87]. Ce fluorochrome émet une fluorescence verte à 520 nm lorsqu'il est excité à 490 nm (**Figure III.2-3**).

Une solution mère est préparée à 5 mg.mL^{-1} dans de l'acétone à partir de poudre de FDA (Sigma Aldrich). Elle est conservée à -20°C puis diluée au moment de l'utilisation dans du PBS (Phosphate Buffered Saline) (Sigma Aldrich) à la concentration voulue. Ce colorant est utilisé à une concentration de $0,35 \mu\text{g.mL}^{-1}$ dans des suspensions cellulaires lavées deux fois et resuspendues dans l'eau physiologique. Les microorganismes sont, ensuite, observés en fluorescence après 10 minutes d'incubation à température ambiante à l'obscurité.

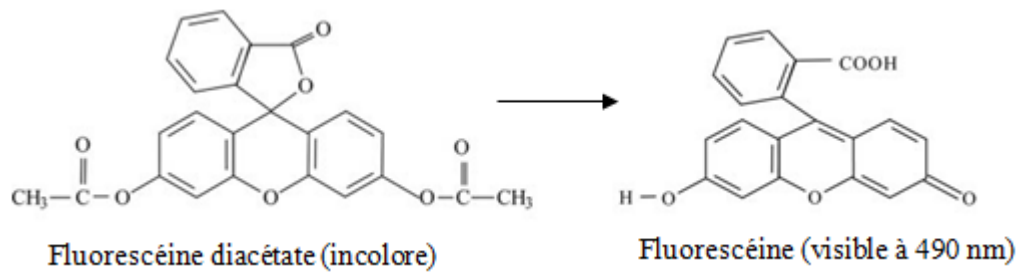


Figure III.2-2 : Conversion de la fluorescéine diacétate (FDA) en fluorescéine

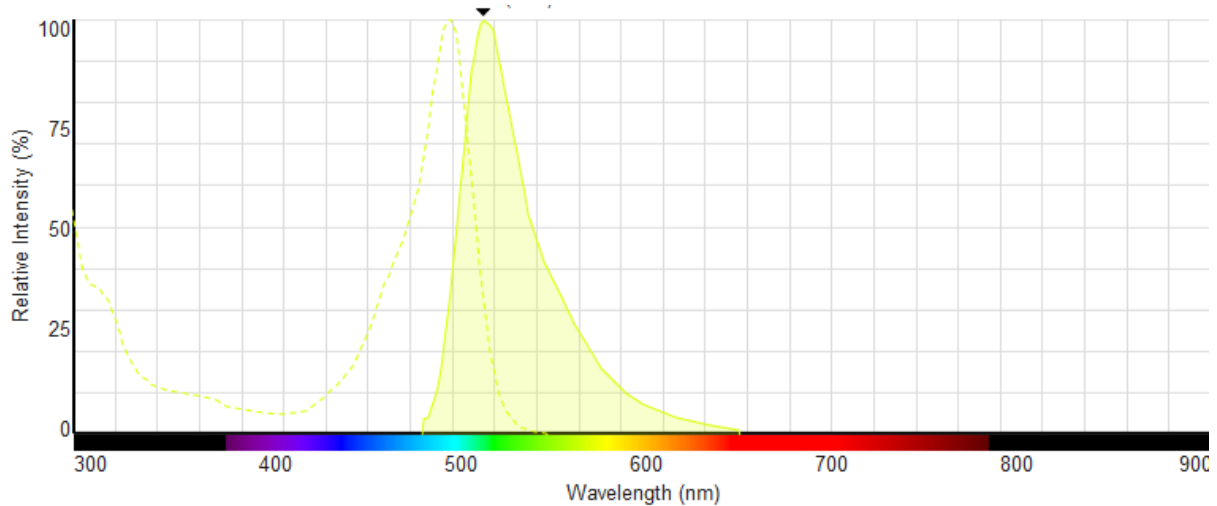


Figure III.2-3 : Spectre d'excitation et d'émission de la FDA

III.2.5.2.3 Le marquage aux fluorochromes Syto

Ces colorants des acides nucléiques sont utilisés dans le marquage des cellules eucaryotes mortes et vivantes ainsi que des bactéries. Bien qu'ils soient des marqueurs de l'ADN et L'ARN, toute la cellule marquée est fluorescente. Le Syto 9 est un fluorochrome vert excité à 485 nm et observé à 498 nm. Quant au Syto 84, il est rouge avec des maxima d'excitation et d'émission à 567 nm et 582 nm, respectivement (**Figure III.2-4**). Les solutions mères sont préparées à une concentration de 10^{-4} mol.L⁻¹ dans du DMSO et conservées à -20°C.

Ces fluorochromes sont utilisés à une concentration de $5 \cdot 10^{-8}$ mol.L⁻¹ dans des suspensions cellulaires lavées deux fois et resuspendues dans l'eau physiologique. Les suspensions cellulaires sont incubées 30 minutes à l'obscurité.

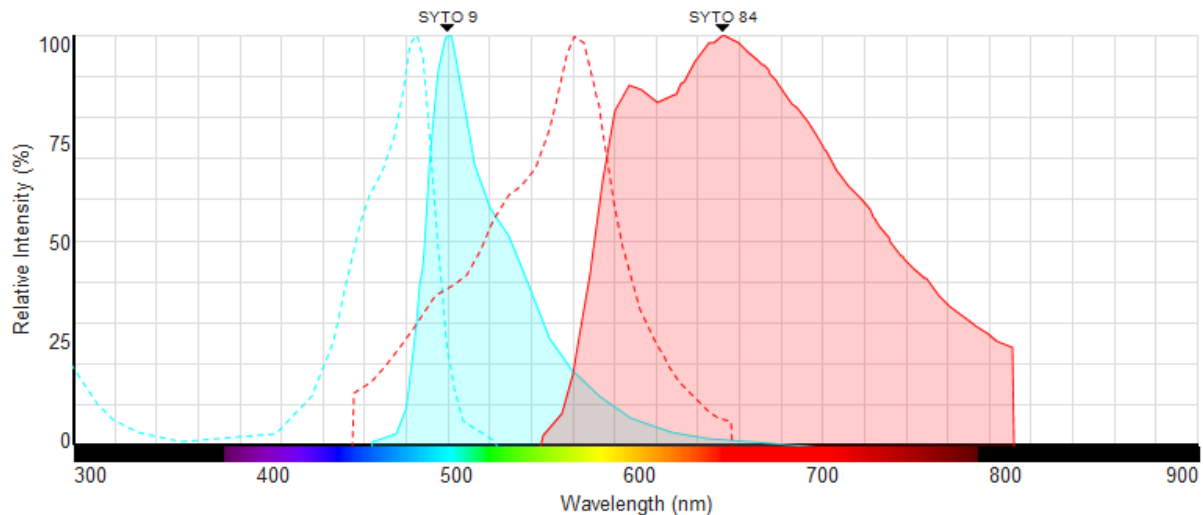


Figure III.2-4 : Spectres d'excitation et d'émission du Syto 9 et Syto 84

III.3 Caractérisation des suspensions modèles

La caractérisation des suspensions modèles comprend plusieurs mesures, en particulier la répartition de taille, le potentiel zêta, le caractère hydrophile/hydrophobe des microorganismes...

III.3.1 Distribution de taille des suspensions

III.3.1.1 Particules modèles

La répartition de taille des particules modèles est analysée avec un zetasizer (Malvern Instrument, Nano zs). Cette technique mesure la diffusion des particules soumises au mouvement brownien et calcule une distribution de taille des particules au moyen de la relation de Stokes-Einstein. Dans la pratique, 1 mL d'échantillon est introduit dans une cuve et placé dans le zetasizer. Les fluctuations d'intensité du laser causées par les mouvements browniens des particules, en fonction du temps sont mesurées et auto-correlées à leurs tailles.

III.3.1.2 Microorganismes modèles

La répartition de tailles des suspensions de microorganismes est obtenue par un granulomètre laser Mastersizer 2000 (Malvern instrument SA). La mesure du diamètre moyen des microorganismes est une technique basée sur la diffraction de la lumière. En effet, quand le faisceau laser rencontre une particule, il subit une diffraction. L'intensité du rayonnement diffracté et l'angle de diffraction dépendent de la taille des particules. Tout d'abord, le

granulomètre mesure le bruit de fond causé par le diluant. Ensuite, la suspension est mise sous agitation à vitesse constante durant toutes les mesures. Quelques millilitres de suspension cellulaire sont prélevés et dilués (1 à 2 g de cellules en suspension aqueuse). Ensuite, la suspension est injectée dans la cellule de mesure. Enfin, l'angle de déviation du faisceau lumineux est analysé par les détecteurs.

III.3.2 Propriétés de surface

III.3.2.1 Potentiel zêta

Le potentiel zêta (ζ) en millivolts est mesuré à l'aide d'un zétasizer (Malvern Instrument, Nano zs). Il est déduit de la mobilité électrophorétique en utilisant l'équation de Smoluchowski. Chaque mesure est répétée cinq fois.

III.3.2.2 Caractère hydrophile/hydrophobe et propriétés acide/base de Lewis des microorganismes : méthode MATS

La méthode MATS (Microbial Adhesion To Solvents) est une méthode de partition, basée sur la comparaison de l'affinité d'un microorganisme pour un solvant monopolaire et un solvant non polaire [88]. Le solvant monopolaire peut être acide (accepteur d'électrons) ou basique (donneur d'électrons) mais ces deux solvants doivent posséder une composante de Lifshitz-van der Waals similaire à celle du solvant non polaire qui leur est associé. Deux paires de solvants ont ainsi été choisies. Les composantes d'énergie de surface des solvants sont présentées dans le **Tableau III.3-1**.

- le chloroforme, solvant acide avec une composante basique négligeable et l'hexadécane, n-alcane apolaire [88], permettent de déterminer le caractère donneur d'électrons de la souche

- l'acétate d'éthyle, solvant fortement basique et le décane, n alcane apolaire, permettent de déterminer le caractère accepteur d'électrons de la souche.

Le caractère hydrophobe (ou hydrophile) est révélé par l'affinité pour les solvants apolaires.

Le caractère hydrophile/hydrophobe et les propriétés donneur/accepteur d'électrons de la surface des microorganismes, prélevés en phase stationnaire de croissance sont évalués selon le protocole décrit ci-dessous [89].

La suspension de microorganismes lavée est préparée dans NaCl 9 g.L⁻¹ à une densité optique à 620 nm d'environ 0,7. Dans un tube à hémolyse, 0,4 mL de solvant sont ajoutés à

2,4 mL de suspension cellulaire. Le mélange est agité manuellement pendant 10 secondes puis « vortexé » pendant 50 secondes. Le mélange est ensuite laissé au repos 15 min afin de permettre la séparation complète des deux phases. Puis, un échantillon (1 mL) de la phase aqueuse est délicatement prélevé pour la mesure de la densité optique à 620 nm. Le pourcentage de cellules liées à chaque solvant est ensuite calculé par Équation III.3-1.

$$\% \text{ d'affinité} = 100. \left(1 - \frac{A}{A_0}\right) \quad \text{Équation III.3-1}$$

Avec A_0 et A : densités optiques à 620 nm de la suspension de microorganismes avant et après contact avec le solvant, respectivement.

Les tests sont réalisés en *triplicata* sur trois cultures indépendantes.

Tableau III.3-1: Tensions de surface (mJ/m²) de Lifshitz-van der Waals (γ_S^{LW}), polaires (γ_S^+ , γ_S^-) et énergie de surface totale (γ_S^{Total}) des solvants utilisés dans la méthode MATS

	Tensions de surface (mJ.m ⁻²)			
	γ_S^{LW}	γ_S^+	γ_S^-	γ_S^{Total}
Hexadécane	27,5	0,0	0,0	27,5
Décane	23,8	0,0	0,0	23,8
Chloroforme	27,1	3,8	0,0	27,1
Acétate d'éthyle	23,9	0,0	19,2	23,9

III.4 Acquisition d'images

III.4.1 Microscopie optique

Avant la filtration, l'état et la propreté de la microsieve utilisée est vérifié à l'aide d'un microscope optique à transmission (Nikon eclipse LV 100). Cet appareil sera aussi utilisé pour le dénombrement des levures sur cellule de Thoma.

III.4.2 Microscopie à épifluorescence

Un microscope à épifluorescence (Leica DM 4000B) est utilisé pour l'observation des microorganismes et particules fluorescentes ainsi que le contrôle des microsieves durant leur nettoyage. Il est équipé de quatre cubes « blocs filtres » correspondant aux fluorochromes usuels (DAPI, FITC, CY 3 et CY 5) dont les caractéristiques sont présentées au **Tableau III.4-1**. Cet appareil permet l'observation en lumière blanche, contraste de phase et réflexion.

Tableau III.4-1 : Caractéristiques des blocs filtres du microscope à épifluorescence

Bloc filtre	Longueur d'onde d'excitation (nm)	Longueur d'onde d'émission (nm)
DAPI	360 ± 40	470 ± 40
FITC	480 ± 40	505 ± 30
CY3	545 ± 30	610 ± 75
CY5	620 ± 60	700 ± 75

III.4.3 Microscopie confocale

La formation du dépôt peut être suivie sur deux appareils:

- Un microscope confocal (TCS SP2, Leica) pour les dépôts monodispersés.
- Un microscope confocal (TCS AOBS, Leica) pour les dépôts bidispersés.

Le microscope confocal SP2 dispose d'un seul laser en plus de la lumière blanche, un seul type de particules peut donc être visualisé. Par contre, le microscope confocal AOBS possède deux lasers d'excitation en plus de la lumière blanche ce qui permettra l'observation simultanée de deux types de particules.

Trois objectifs sont utilisés: x 10, x 40 et x 63 (**Tableau III.4-2**).

Tableau III.4-2 : Caractéristiques des objectifs utilisés en microscopie confocale

Objectif	Ouverture numérique	Milieu d'immersion	Distance de travail (mm)
x 10	0,3	sec	11
x 40	0,8	eau	3,3
x 63	0,9	eau	2,2

En microscopie confocale à balayage laser, deux modes d'observation sont disponibles :

- Lumière blanche : le microscope fonctionne comme un microscope à réflexion classique.

- Fluorescence : un système de balayage du laser d'excitation permet de scanner l'échantillon, point par point, et ligne par ligne sur le plan xy selon l'axe z (**Figure III.4-1 A**). Un seul point focal est excité à la fois ce qui limite l'interférence avec les plans supérieurs et inférieurs ainsi qu'avec les autres éléments du plan focal. Notons qu'une exposition trop intense des microorganismes peut induire un phénomène de photoblanchiment. Les lasers permettent une excitation précise des fluorochromes aux longueurs d'ondes adéquates. De

plus, l'intensité du laser est réglée en fonction de l'intensité de fluorescence émise par l'échantillon. La fluorescence émise par le plan focal est récupérée et celle provenant des zones n'appartenant pas au plan focal est bloquée (**Figure III.4-1 B**). La largeur de la bande d'émission est aussi réglée en fonction de l'intensité de la fluorescence récupérée. Si deux fluorochromes sont utilisés, la fenêtre doit être rétrécie pour éviter la superposition des spectres d'émission.

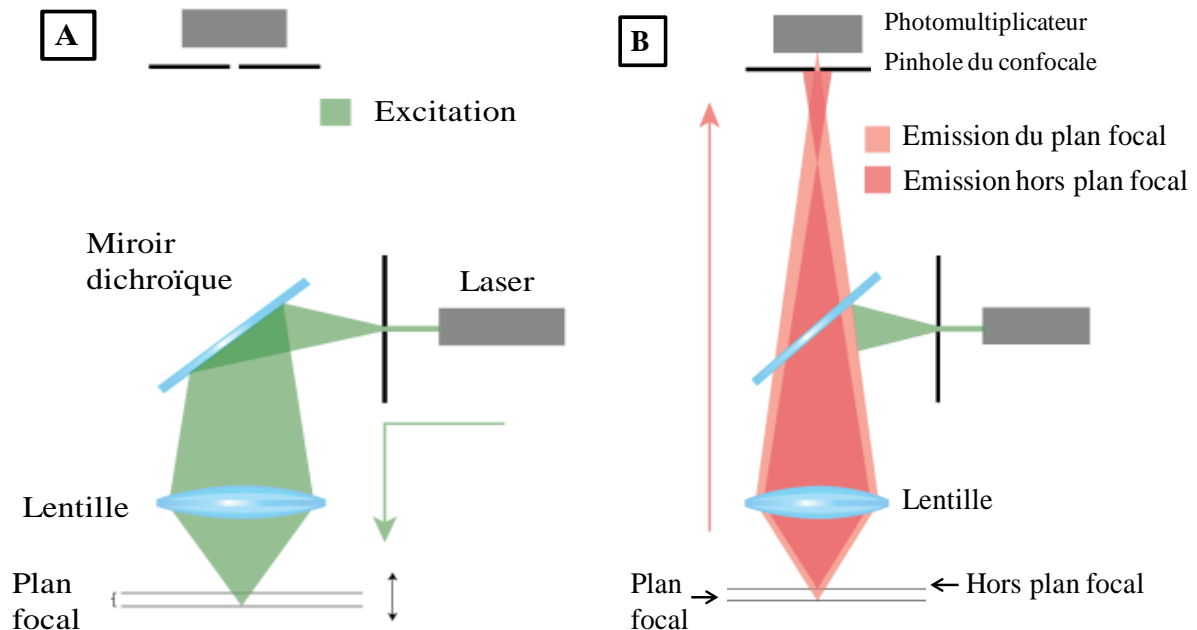


Figure III.4-1 : Principe de fonctionnement du microscope confocal durant l'excitation (A) et l'émission (B)

Deux modes d'acquisition peuvent être utilisés si plusieurs lasers d'excitation sont utilisés :

- Une acquisition simultanée : Les lasers d'excitation sont utilisés en même temps lors du balayage de l'échantillon.
- Une acquisition séquentielle : Le premier laser correspondant à l'un des fluorochromes, balaye la totalité ou une ligne du plan focal. Après récupération du signal, ce laser est éteint et le deuxième laser balaye alors l'échantillon. Ce mode permet de minimiser les interférences dues au recouvrement des spectres.

Pour limiter le recouvrement, il est aussi important de choisir des fluorochromes excités par différents lasers et qui ont des spectres d'émission assez éloignés.

L'interface disponible pour le réglage des paramètres pour l'excitation et l'émission des fluorochromes est présentée sur la **Figure III.4-2**.

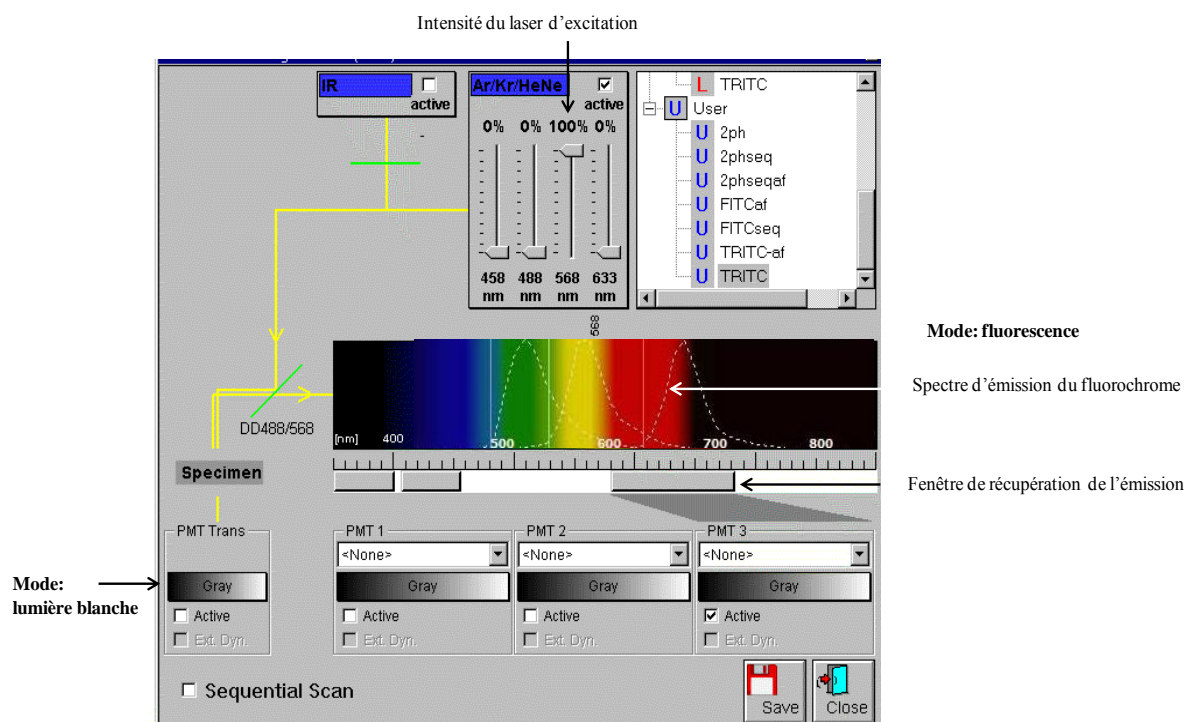


Figure III.4-2 : Interface de réglage des paramètres pour l'excitation et l'émission des fluorochromes sur le microscope confocal

Les appareils utilisés sont équipés des sources lasers suivantes:

- Un laser Hélium-Néon avec une raie d'excitation à 543 nm
- Un laser Argon équipé de quatre raies d'excitation à 458, 476, 488 et 514 nm

Le signal est récupéré par un photomultiplicateur dont le réglage permet d'obtenir une image sans saturation de signal ni bruit de fond.

Les paramètres d'acquisition sont maintenus constants pour chaque essai et restent proches d'un essai à un autre. En effet, durant ce réglage, deux seuils sont fixés :

- Le seuil inférieur de détection « off set » au-dessous duquel le signal est considéré comme bruit de fond.
- Le seuil supérieur de détection « gain » : le signal reçu de l'échantillon est amplifié par le photomultiplicateur sans dépasser cette valeur au delà de laquelle l'image est saturée.

III.5 Préparation des suspensions pour les essais de filtration

III.5.1.1 Suspensions des particules modèles

Les particules modèles sont tout d'abord dispersées dans de l'eau ultrapure filtrée sur des membranes 0,22 μm . La concentration des particules est calculée de manière que la masse

totale de particules injectées formerait une monocouche de particules si elle se répartissait uniformément sur la surface filtrante. Cette stratégie a pour but d'observer la construction du gâteau de particules couche par couche.

III.5.1.2 Préparation des suspensions des microorganismes modèles

Les suspensions de microorganismes modèles sont toujours préparées à partir de cultures fraîches obtenues dans les conditions décrites au paragraphe III.2.3.1. Elles sont centrifugées à 11500 g pendant 10 min (centrifugeuse 5810 R Eppendorf, Allemagne) et lavées deux fois avec de l'eau physiologique stérile. La concentration en microorganismes est déterminée par mesure de la densité optique à 600 nm puis corrigée après détermination de la masse sèche.

Les suspensions cellulaires sont alors marquées et incubées à l'obscurité. Avant de commencer les injections, l'absence de contamination et le taux de marquage sont systématiquement contrôlés par observation au microscope confocal en lumière blanche et en fluorescence aux longueurs d'ondes d'excitation et d'émission correspondant au fluorochrome utilisé.

III.6 Essais de filtration

L'étude de la formation du dépôt sur les membranes durant la microfiltration est réalisée suivant un protocole standardisé. Après avoir décrit les caractéristiques des membranes sélectionnées, le protocole de filtration est présenté. Ensuite, les protocoles de détermination de la compressibilité des gâteaux formés et de nettoyage sont décrits.

III.6.1 Membranes

Les membranes utilisées pour les études de microfiltration sont des microsieves en Nitrure de Silicium (Si_xN_y) fournies par Aquamarijn B.V. ($5 \times 5 \text{ mm}^2$). Elles sont composées de quatorze bandes filtrantes correspondant à une surface totale de filtration de $6,3 \text{ mm}^2$ (**Figure III.6-1**). Les microsieves sont des membranes minces constituées d'un arrangement régulier de pores cylindriques parfaitement calibrés. La couche de Nitrure de Silicium est de $0,9 \mu\text{m}$ d'épaisseur. Deux types de microsieves de tailles de pores $0,8 \mu\text{m}$ et $2 \mu\text{m}$ ont été utilisées (**Tableau III.6-1**). L'organisation géométrique des pores est présentée dans la **Figure III.6-2**.

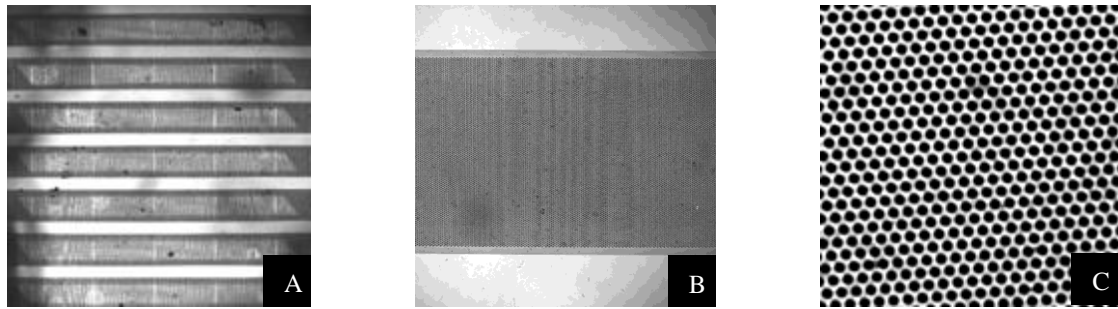


Figure III.6-1 : Observations de la surface d'une microsieve:

(A) bandes filtrantes (objectif 10 x) et détails des pores (Objectif 63 x), zoom 1 (B) et 6 (C).

Tableau III.6-1 : Principales caractéristiques des membranes

Taille de pore (m)	Taille du « pitch » (m)	Porosité (%)	Nombre de pores
$0,8 \cdot 10^{-6}$	$1,6 \cdot 10^{-6}$	22,7	2841646
$2 \cdot 10^{-6}$	$3 \cdot 10^{-6}$	40,3	808290

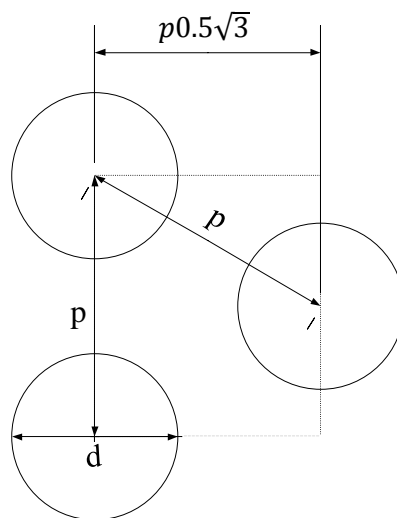


Figure III.6-2 : Représentation géométrique de l'organisation des pores

(d : diamètre du pore, p : pitch (distance entre deux centres de pores voisins))

III.6.1.1 Traitement des microsieves

Vu le faible diamètre de pores et les caractéristiques de surface des microsieves, un traitement avant leur utilisation doit être effectué pour assurer leur mouillabilité et ainsi obtenir une bonne perméabilité à l'eau. Pour optimiser ce prétraitement, plusieurs techniques ont été testées.

III.6.1.1.1 Hydrophilisation

Les microsieves sont soumises à un traitement plasma (Four Harrick Plasma, Belgique) pendant 10 minutes. Ce traitement a été effectué grâce à la collaboration de l'Institut des Mécanique des Fluides de Toulouse (IMFT). Après traitement, la microsieve est immédiatement montée dans la chambre de filtration remplie d'eau ultrapure. Après avoir chassé l'air en injectant de l'eau ultrapure, la chambre est scellée et la membrane est utilisée dans les 48 heures qui suivent le traitement.

III.6.1.1.2 Mouillage

Comme préconisé par le constructeur, quelques gouttes d'isopropanol (Sigma Aldrich) filtré sur une membrane 0,2 µm sont injectés sur les microsieves à contre-sens de filtration.

III.6.1.2 Caractérisation des microsieves

III.6.1.2.1 Hydrophobicité

Le caractère hydrophile/hydrophobe de la microsieve (mouillabilité) est déterminé par la mesure de l'angle de contact d'une goutte d'eau ultrapure posée sur sa surface à l'aide d'un goniomètre (Digidrop, Contact Angle Meter, GBX Scientific Instruments), d'une caméra et d'un logiciel de capture et d'analyse d'images (logiciel Win Drop).

Pour une surface hydrophobe, l'angle de contact est élevé. Par contre, pour une surface hydrophile, l'angle est faible.

III.6.2 Module de filtration

Une chambre de filtration munie d'une fenêtre d'observation permettant l'observation de la formation du dépôt *in situ*, en temps réel, a été conçue et fabriquée.

III.6.3 Protocole expérimental

Les expériences de filtration frontales sont réalisées à flux constant afin de maintenir des conditions d'écoulement identiques pendant tout l'essai.

L_p ($L \cdot h^{-1} \cdot m^{-2} \cdot bar$) désigne la perméabilité selon la loi de Darcy (Équation III.6-1):

$$L_p = \frac{J}{PTM} \quad \text{Équation III.6-1}$$

Afin d'étudier l'évolution de la performance de la microsieve durant la formation du dépôt, la perte de perméabilité, L_p^* , est définie :

$$L_p^* = \frac{L_p^c}{L_p^0} \quad \text{Équation III.6-2}$$

Avec :

L_p^0 : La perméabilité de la membrane neuve après mouillage ($L.h^{-1}.m^{-2}.bar^{-1}$)

L_p^c : La perméabilité de la membrane colmatée ($L.h^{-1}.m^{-2}.bar^{-1}$)

III.6.3.1 Paramètres caractéristiques de la membrane

La perméabilité de la microsieve neuve traitée est déterminée en mode frontal par mesure de la masse d'eau filtrée et de la pression transmembranaire au cours du temps.

L'efficacité du prétraitement des membranes est estimée par la fraction des pores actifs, α_0 ,:

$$\alpha_0 = \frac{N_1}{N_0} \quad \text{Équation III.6-3}$$

Avec:

N_0 : Le nombre total des pores de la microsieve (donnée constructeur).

N_1 : Le nombre de pores actifs.

Deux approches ont été adoptées pour calculer la perméabilité initiale des membranes.

La première se base sur l'équation de Hagen–Poiseuille :

Soit q est le débit d'eau dans un seul pore ($m^3.s^{-1}$) :

$$\Delta P_m = \frac{8q\mu L}{\pi r^4} \quad \text{Équation III.6-4}$$

avec:

ΔP_m : La variation de pression à l'intérieur des pores (Pa)

μ : La viscosité dynamique du liquide (Pa.s)

L : La longueur du canal (m)

r : Le rayon du canal (m)

On suppose que tous les pores participent de manière égale au débit, Q ($m^3.s^{-1}$) calculé comme suit :

$$Q = N_1 q \quad \text{Équation III.6-5}$$

La surface active de la membrane (S_1) est calculée par Équation III.6-6.

$$S_1 = \alpha_0 S_0 \quad \text{Équation III.6-6}$$

Avec :

S_0 : La surface de la microsieve (donnée constructeur).

Toutefois, l'équation Hagen–Poiseuille a pour hypothèse que le rayon du pore est significativement plus faible que sa longueur. En réalité, ce n'est le cas pour les microsieves dont la longueur des pores est de 0,9 μm . De ce fait, pour calculer le débit, on considère des pores circulaires de longueur L et de diamètre d [23]:

$$Q_0 = \frac{d^3 N_1 \Delta P_0}{24 \mu} \left(1 + \frac{16 L}{3 \pi d}\right)^{-1} (1 - f(\epsilon_m))^{-1} \quad \text{Équation III.6-7}$$

Avec :

ϵ_m : La porosité de la microsieve

La fonction de porosité, $f(\epsilon)$, est décrite comme suit :

$$f(\epsilon) = \sum_{i=1}^3 a_i \epsilon^{(2i+1)/2} \quad \text{Équation III.6-8}$$

Avec :

$a_1 = 0,894$, $a_2 = 0,111$ et $a_3 = 0,066$ [90].

III.6.3.2 Etude de la formation du dépôt

La chambre de filtration est préalablement démontée et nettoyée avec de l'eau ultrapure. La microsieve et les tuyaux sont changés à chaque essai. La microsieve mouillée et hydrophilisée est montée dans la chambre et son état est contrôlé (observation de la surface, mesure de la perméabilité...) sous le microscope confocal en lumière blanche et fluorescence (contrôle particules résiduelles).

Les expériences de filtration sont réalisées conformément au protocole suivant:

- La chambre de filtration est placée sous microscope et fixée à la platine.
- La cuve d'alimentation (500 mL) est remplie d'eau ultrapure.
- On effectue une circulation tangentielle (sortie perméat fermée) afin de chasser l'air.
- La circulation tangentielle est stoppée et la sortie perméat est ouverte. L'aspiration (pompe Masterflex, Bioblock scientific, USA), du perméat débute. La pression côté perméat est mesurée par un manomètre digital (Thyrcont, Germany). La pression transmembranaire est obtenue par différence entre la pression mesurée coté perméat et la pression mesurée avant la mise en marche de la pompe.

- La planéité de la microsieve est soigneusement contrôlée.
- Le plan focal, $z = 0$, défini comme la surface supérieure de la microsieve, est déterminé avec tous les objectifs. Toutes ces analyses sont réalisées en lumière blanche. Le seuil inférieur de détection est réglé afin que tout signal de fluorescence soit du bruit de fond.
- Lorsque la pression se stabilise, la suspension à filtrer est introduite dans le petit réservoir dédié. Notons que ce réservoir ainsi que la conduite jusqu'à la chambre de filtration sont en verre pour éviter l'adhésion des particules et des microorganismes.
- La suspension est introduite dans la chambre par ouverture de la vanne trois voies et l'acquisition des images de la formation du dépôt est réalisée simultanément (l'objectif x10 ou x 63). La masse de perméat est mesurée (balance de précision Sartorius, Allemagne) pour calculer, *a posteriori*, le volume de suspension réellement injecté.
- Lorsque tout le volume de suspension a été filtré, la vanne est refermée et la circulation d'eau ultrapure est maintenue sans modifier le débit de la pompe d'aspiration. La pression stabilisée est enregistrée pour déterminer la perméabilité en présence du dépôt, notée L_p^C .
- Le dépôt formé est alors scruté selon l'axe z sous différents grossissements.
- Les injections sont répétées jusqu'à stabilité de la perméabilité.

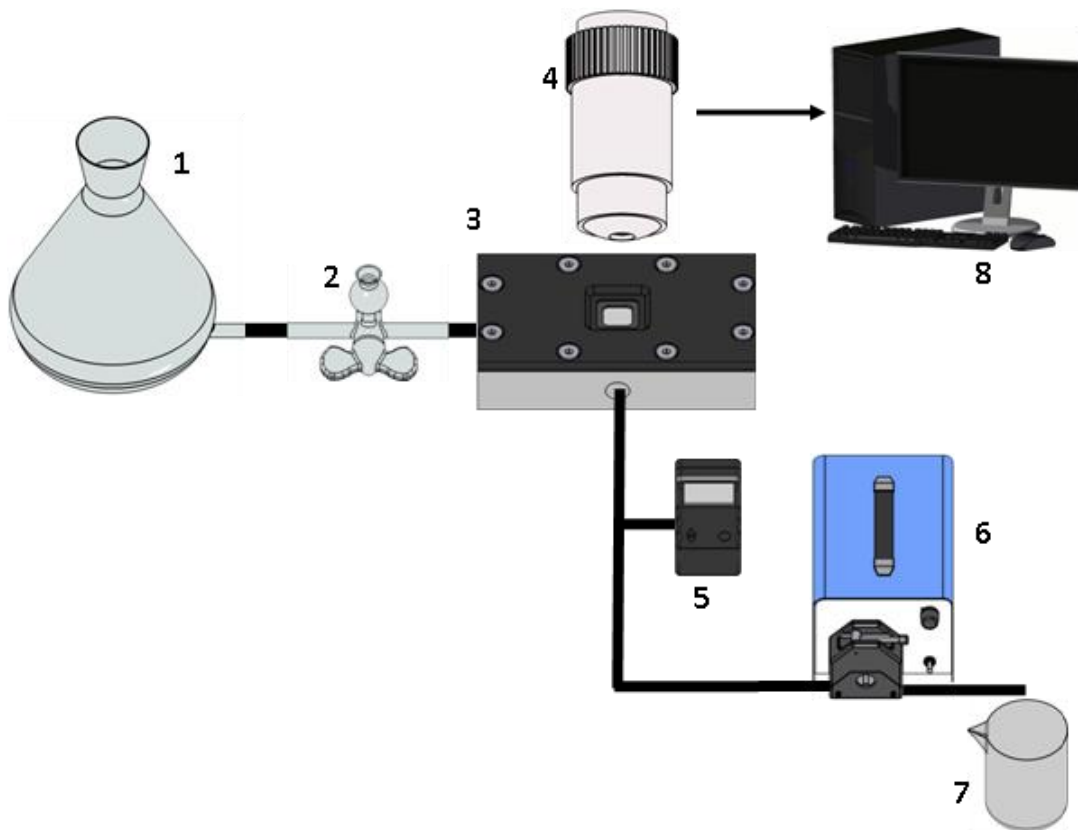


Figure III.6-3 : Illustration schématique du système de filtration

1 : réservoir d'eau ultrapure, 2 : réservoir des suspensions modèles, 3 : cellule de filtration, 4 : microscope confocal, 5 : manomètre, 6 : pompe, 7 : perméat, 8 : ordinateur

III.6.3.3 Etude de la compression du dépôt

Pour déterminer la compressibilité du dépôt formé, des pressions croissantes puis décroissantes sont appliquées en changeant le débit de la pompe. Après chaque palier de pression, le dépôt est scanné selon l'axe z pour déterminer son épaisseur et sa porosité.

III.6.3.4 Nettoyage de la microsieve

La surface de la membrane est observée avec un microscope à épifluorescence ou à réflexion durant différents essais de nettoyage afin d'apprécier l'intensité des interactions entre le dépôt et la membrane. Pour ce faire, le protocole suivant est appliqué :

1. Circulation tangentielle d'eau ultrapure pendant 15 minutes
2. Circulation tangentielle d'eau ultrapure combinée avec une injection de bulles d'air durant 3 minutes

Ces deux étapes sont répétées deux fois. La perméabilité est mesurée après chaque étape.

III.7 Acquisition et traitement d'images

III.7.1 Acquisition des images

Les images obtenues par microscopies à épifluorescence (2D) et confocale (3D) sont traitées avec le logiciel Image J (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>). A partir des images, les modules de quantification du logiciel permettent d'obtenir différentes caractéristiques des dépôts: l'épaisseur, le taux de vide, le taux de couverture de la membrane, l'homogénéité du dépôt... Afin d'extraire ces données, les images sont calibrées d'après la taille du pixel (largeur, longueur) pour les acquisitions 2D ou du voxel (largeur, longueur, épaisseur ou temps) dans le cas des acquisitions 3D. La taille du pixel et/ou voxel dépend des caractéristiques de l'objectif utilisé et des paramètres d'acquisition (**Tableau III.7-1** et **Tableau III.7-2**).

Tableau III.7-1 : Calibration de la taille du voxel en système métrique durant l'observation du dépôt des particules en temps réel

Type d'observation	Construction du dépôt au cours du temps		
Objectif		x10	x63
zoom		1	6
Dimensions	x (μm)	2,930	0,078
	y (μm)	2,930	0,078
	t (s)	173,31	215,01

Tableau III.7-2 : Calibration de la taille du voxel en système métrique pour la caractérisation du dépôt *in situ*

Type d'observation	Caractérisation du dépôt en 3D					
Objectif		x10		x40		x63
zoom		1	1	6	1	6
Dimensions	x (μm)	2,930	0,732	0,122	0,465	0,078
	y (μm)	2,930	0,732	0,122	0,465	0,078
	z (μm)	2,389	0,411	0.410801	0,320	0,320

III.7.2 Analyse quantitative des images

Malgré les différents modules disponibles dans le logiciel Image J, il n'existe pas de protocole universel pour le traitement d'image. Afin de garantir des mesures et des quantifications les plus pertinentes possibles, une partie du travail méthodologique a consisté à étudier, comparer et même développer différents modules afin de mettre au point un protocole adapté à la nature de nos images. Deux critères ont été considérés : les limites et précisions des modules en premier lieu et la reproductibilité du protocole afin qu'il puisse être utilisable par différents utilisateurs.

Tout d'abord, les images sont compilées afin d'obtenir une série d'images calibrées permettant d'aboutir à des données quantitatives. L'image brute correspond à l'ensemble du signal fluorescent collecté par le photomultiplicateur dans un plan z défini. L'intensité de fluorescence des différents pixels est comprise entre 0 et 255 (codage sur 8 bits). L'intensité lumineuse et le contraste de l'image sont réglés avant d'effectuer un seuillage suivi d'une binarisation. Cette opération a pour but d'éliminer le bruit de fond. Un exemple de traitement est donné sur la **Figure III.7-1**. Afin de limiter les biais liés au choix manuel du seuil, l'analyse comparative des propriétés des dépôts a été réalisée par une même personne. De plus, lors d'une même expérience, les valeurs de seuillage sont conservées.

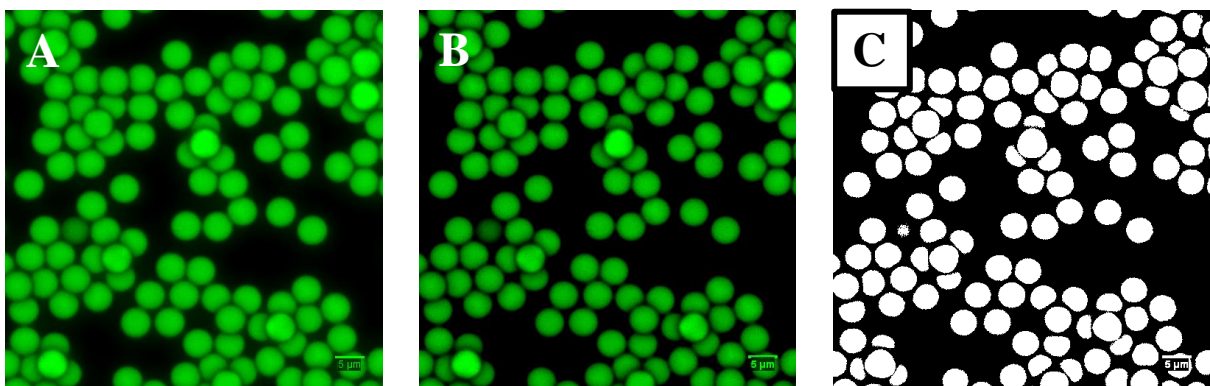


Figure III.7-1 : Etapes du traitement d'une image acquise d'un dépôt de particules (4,8 μm) :

A : image brute, B : Image après réglage de la lumière et du contraste, C : Image après seuillage.

Le schéma suivant résume le principe de traitement des images dans ce travail.

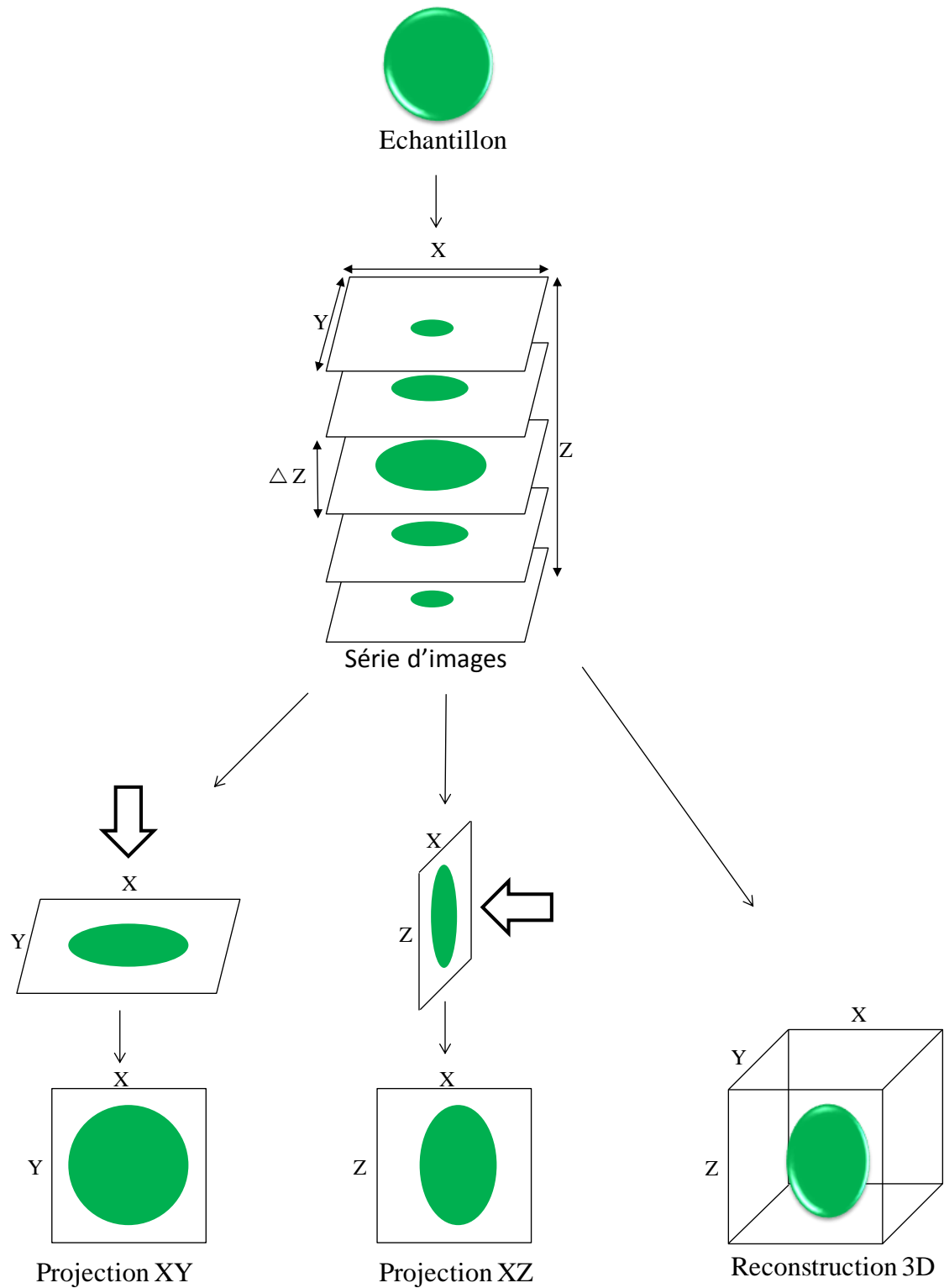


Figure III.7-2 : Schéma du principe de l'analyse des séries d'images obtenues par microscopie confocale

III.7.2.1 Quantification du taux de couverture de la membrane

Les microsieves étant constituées d'une succession de bandes filtrantes et non filtrantes, l'incidence de cette hétérogénéité macroscopique sur la répartition du dépôt doit être considérée. Pour ce faire, la fraction apparente de la zone filtrante couverte par les particules, appelée taux de couverture (α_c), est calculée :

$$\alpha_c = \frac{S_c}{S_{f1}} \quad \text{Équation III.7-1}$$

S_{f1} : surface de la zone filtrante déterminée à partir des images obtenues en lumière blanche à un zoom 1.

S_c : surface apparente couverte par les particules déterminée à partir des images de la surface externe du dépôt, obtenues avec un objectif x 40 ou x 63, zoom 1 en mode fluorescence projetées selon l'axe z (**Figure III.7-3**).

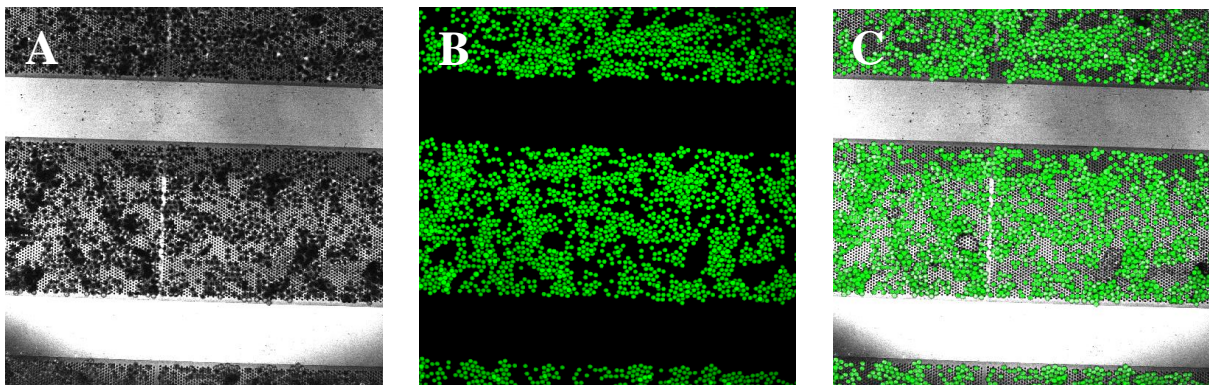


Figure III.7-3 : Détermination du taux de couverture d'un dépôt de particules (4,8 µm), (Objectif x 40, zoom 1) : A : Image en lumière blanche, B : Image en fluorescence, C : Image composite.

*Chapitre IV. : Etude préliminaire :
Qualification de la chambre de filtration*

Présentation du travail, objectifs et approche

Avant d'entreprendre une campagne expérimentale pour étudier les mécanismes de construction des dépôts et leur organisation, différentes validations de la stratégie proposée doivent être réalisées.

L'exploitation quantitative des images de dépôt de particules qui seront obtenues grâce à la microscopie confocale nécessite de faire l'hypothèse que le dépôt est spatialement uniforme le long de la membrane. Il est, en effet, impossible d'observer le dépôt en temps réel, *in situ*, la totalité de la membrane à cause de limites imposées par les champs d'observations des techniques utilisées. Seule une très petite partie de la surface est scrutée. Dans notre étude, nous avons sélectionné des membranes de très faible taille de sorte que la surface observée puisse être considérée, proportionnellement, significative par rapport à la surface totale. De plus, les membranes étant des membranes parfaitement planes dont la taille des pores et leur répartition spatiale sont uniformes sur toutes les bandes filtrantes, l'hypothèse d'une répartition homogène du dépôt sur toute la surface est cohérente. Toutefois, elle doit être confirmée en vérifiant que le dépôt des particules est bien uniforme sur les bandes filtrantes pour s'y baser dans le reste de ce travail. Par ailleurs, ces membranes, étant constituées d'une succession de bandes filtrantes et de bandes non filtrantes, il est important de vérifier que cette hétérogénéité macroscopique n'a pas d'effet notable sur la construction du dépôt de particules formé et qu'il est identique sur toutes les bandes.

Enfin, la pertinence du protocole expérimental que nous avons mis au point et qui consiste à former et caractériser un dépôt épais couche par couche doit aussi être vérifiée. Notons que ce protocole original n'a pas, à notre connaissance, été décrit dans la bibliographie.

Ce chapitre est subdivisé en deux parties. Dans une première partie, des expériences préliminaires en microscopie confocale de filtration de suspensions de microsphères fluorescentes sont effectuées afin de mettre en place et valider le protocole expérimental. Dans une seconde partie, des simulations numériques de l'écoulement du fluide, du transport de particules et de la formation progressive du dépôt sur la membrane sur un domaine bidimensionnel de géométrie comparable à la chambre de filtration sont réalisées. Il s'agit ici de confirmer que le dépôt de particules attendu a une répartition uniforme sur la membrane.

Le code de calcul COMSOL Multiphysics a été utilisé pour résoudre les équations couplées de Navier Stokes et Darcy Brinkman, respectivement dans les parties fluide et

poreuse du domaine et l'équation de transport des particules de type convection diffusion dans la partie fluide. La partie du domaine considérée comme poreuse est constituée de la membrane et du dépôt. Les dimensions de la chambre de filtration ainsi que les conditions opératoires étudiées correspondent à ceux décrits dans le chapitre « Contexte de l'étude et conception du dispositif expérimental ». La croissance du dépôt sur la membrane et son influence sur l'écoulement sont prises en compte par un modèle de déformation de maillage de type ALE (Arbitrary Lagrangian Eulerian).

Les résultats expérimentaux ont pour but de valider la pertinence du protocole proposé. Les différentes échelles de visualisation ont, notamment, conduit à identifier les points suivants :

- L'association des deux modes d'observation (lumière blanche et fluorescence) permet, clairement, la distinction entre les particules déposées et la membrane.
- Les premières particules arrivent une à une et se déposent de façon parfaitement centrée sur les pores de la microsieve.
- Bien que l'arrivée des particules sur la membrane se fasse de façon aléatoire et discrète, le dépôt formé par les particules déposées à la fin de la première injection est homogène et identique sur chaque bande filtrante.
- L'épaisseur du dépôt peut être déterminée à partir des séries d'images obtenues.

La simulation numérique réalisée par le code de calcul Comsol Multiphysics a permis de simuler l'écoulement du fluide dans le canal ainsi que la formation progressive du dépôt sur la microsieve. On constate que le volume de particules qui arrive sur la microsieve se dépose d'abord au milieu de la surface filtrante et forme un dépôt hétérogène. Puis, le dépôt s'étale progressivement pour devenir homogène sur toutes les bandes filtrantes à la fin de la première injection. Les résultats de la simulation numérique confirment donc les observations expérimentales réalisées.

ARTICLE 2

Coupling of local visualization and numerical approach for particle microfiltration optimization

Microsyst. Technol. 542 (2013) 1906–1909.

I. Ben Hassan, C. Lafforgue, C. Ellero, A. Ayadi, P. Schmitz

Microsyst Technol
DOI 10.1007/s00542-013-1906-9

TECHNICAL PAPER

Coupling of local visualization and numerical approach for particle microfiltration optimization

Ines Ben Hassan · Christine Lafforgue ·
Christophe Ellero · Abdelmoneim Ayadi ·
Philippe Schmitz

Received: 1 April 2013 / Accepted: 2 September 2013
© Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2013

Abstract The performance of the microfiltration process is controlled by the filter fouling due to the accumulation of solid matter forming a cake layer on the membrane surface. The objective of this work is to study the cake build up and growth at the particle level and to establish correlations with microfiltration performance measured at the process scale. A theoretical model coupling Navier–Stokes equation, convective/diffusion particle transport and deposit formation is developed to simulate a sequence of microfiltration in a confined geometry (Comsol Multiphysics®). This model is used to make predictive simulations of cake growth during the filtration of diluted particles in the range of size of microorganism (5 µm). In the same time a specific filtration micro-system including an optical chamber and a microsieve (Aquamarijn®) filtration membrane is designed in order to perform an experimental approach allowing in situ 3D-visualization of a deposit of model particles (polystyrene fluorescent microspheres) using Confocal laser scanning microscopy (CLSM). Based on image analysis, the cake building and properties (particle arrangement, thickness) are analyzed. These experimental

data will be further used to improve the filtration model in order to obtain a predictive tool for process optimization.

1 Introduction

Microfiltration of micro-sized particle suspensions is largely used in biotechnology, water and wastewater treatment, food and pharmaceutical industries (Le-Clech et al. 2006; Gómez et al. 2006) or biomedical analysis (Brans et al. 2007; Hughes et al. 2006). However, the fouling due to the particle cake layer build up on the membrane surface reduces productivity and selectivity of the separation. Even though the mechanisms leading to membrane fouling during filtration are not yet fully understood, macroscopic laws have been developed assuming basic mechanisms taking place such as pore clogging and cake formation. However, in order to improve the performance of membrane processes, mechanisms have to be better understood at the microscale level. Macroscopic models widely used to explain flux decline, lack of accuracy about cake characteristics (particle size distribution, cake porosity and morphology...). Thus, recent studies (Zhang et al. 2006; Foley 2006) have pointed out the strong influence of particle and flow characteristics on the properties of the cake and the filtration performances. Moreover, in the case of suspended particles with a size distribution, their location and arrangement inside the cake seems to be correlated to their size (Beaufort et al. 2011). Therefore, it is necessary to carefully analyse the combined effects of flow conditions and particle size on the formation of the cake at the particle scale. Furthermore, the subsequent morphology of the cake should be correlated to microfiltration performance. Thus, in order to better understand filtration cakes build up, in situ accurate

I. Ben Hassan · C. Lafforgue (✉) · C. Ellero · P. Schmitz
INSA, UPS, INP, LISBP, Université de Toulouse,
135 Avenue de Rangueil, 31077 Toulouse, France
e-mail: christine.lafforgue@insa-toulouse.fr

I. Ben Hassan · C. Lafforgue · C. Ellero · P. Schmitz
UMR792 Ingénierie des Systèmes Biologiques et des Procédés,
INRA, 31400 Toulouse, France

I. Ben Hassan · C. Lafforgue · C. Ellero · P. Schmitz
CNRS, UMR5504, 31400 Toulouse, France

I. Ben Hassan · A. Ayadi
LRAE (Laboratoire Radio Analyses et Environnement),
Université de Sfax, Sfax, Tunisie

Published online: 27 September 2013

 Springer

non-invasive techniques that enable the cake to be directly visualized are required.

In this paper, the deposit of particles on a membrane during dead-end microfiltration experiments and the cake growth were in situ studied by CLSM. A numerical model was developed to simulate the flow and the cake growth on the membrane numerically. Finally, experimental and simulations results were compared.

2 Materials and methods

2.1 Microsieves

The selected high porosity (36.7 %) silicon nitride microsieve is a plane inorganic membrane of 25 mm² total area, 6.3 mm² filtration area with a regular arrangement of 2 μm diameter circular pores (Aquamarijn®) (Fig. 1). Filtrating stripes (Fig. 1a) and pore morphology (Fig. 1b) are displayed (each microsieve consists of 14 identical filtrating stripes with approximately 575,751 pores per field). The sieve was glued to a plastic membrane ship. The microsieves were plasma treated with a Plasma Cleaner (Harrick Plasma, Belgium) before the characterization tests and filtration runs.

2.2 Model suspensions: polystyrene microspheres

Polystyrene fluorescent microspheres (Thermo Scientific, USA) with 4.8 μm diameter have been selected to model microbial particles. They are packaged at a concentration of 1 % (w/w) in deionized water with trace amounts of surfactant and preservative to limit aggregation and promote stability. They emitted green fluorescence at 508 nm (excitation wavelength at 468 nm).

2.3 Experimental set-up

A specific stainless steel microfiltration chamber (5.18 mm width, 60 mm length, 0.25 mm height) was designed with

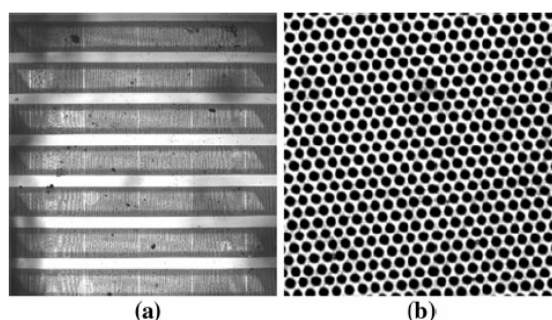


Fig. 1 CLSM images of a silicon nitride microsieve surface a) filtrating stripes (×10) and b) close-up of pores (×15, zoom 15)

a glass window in the top plate, allowing direct microscopic observation of particle deposition and cake formation (Fig. 2). The chamber was directly set under a CLSM microscope (Leica, Japan) during filtration experiments. Images of the particle deposit on membrane surface were recorded with the Leica CLSM software. The whole filtration set-up (Fig. 2) consisted of two circulation loops with two feed flasks containing respectively deionized water that was circulating in the filtration system and the particle suspension. A pump (Masterflex, Bioblock scientific, USA) was used to provide a constant flow rate (1 mL/min). A digital compact vacuum meter (Thyrcont, Germany) was used to monitor the transmembrane pressure. To investigate the microsieve performance during filtration experiments, water fluxes are expressed as permeability reduction:

$$L_p^* = \frac{L_p}{L_{p0}}$$

where L_p is the water permeability at a given time of the filtration experiment and L_{p0} the water permeability of the clean microsieve. Ultrapure water for flux measurements was obtained with a Millipore purification unit MilliQ plus (0.22 μm).

2.4 Filtration procedures

The microsieve was placed in the experimental chamber which was set under the microscopic objective and connected to the deionized water feed flask. Water was circulated in dead end filtration mode thanks to a peristaltic pump mounted on the permeate line. Transmembrane pressure was determined by a digital compact vacuum meter placed upstream the pump. When pressure was stable, the permeate flow rate was measured (triplicates measurements). Microscopic observation was simultaneously done in both bright light and fluorescent modes. Finally, fluorescent polystyrene particles were placed in the particle feed flask and flowed to the membrane by opening the three way valve. In the same time, images of the cake which consists of deposited particles were recorded for analysis. Figure 3 shows the coordinate system used in the paper. It can be seen that the CSLM images consist of successive thin slices (0.41 μm) of the cake parallel to the microsieve (XY plane) along the Z axis. The observation was done using both bright light and fluorescence modes. After image recording, a new suspension volume was injected and the same procedure was repeated.

2.5 CLSM analysis

CLSM observations were performed on a confocal scanning laser microscope (LEICA SP2, DMRXA2) equipped

Microsyst Technol

Fig. 2 Schematic illustration of the microfiltration set-up (1 deionized water feed flask, 2 particle feed flask, 3 three way valve, 4 CLSM microscope, 5 filtration chamber, 6 numeric manometer, 7 pump, 8 filtrate outlet, 9 PC)

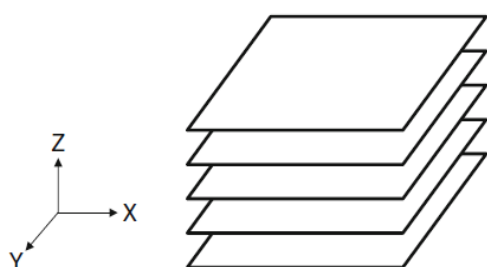
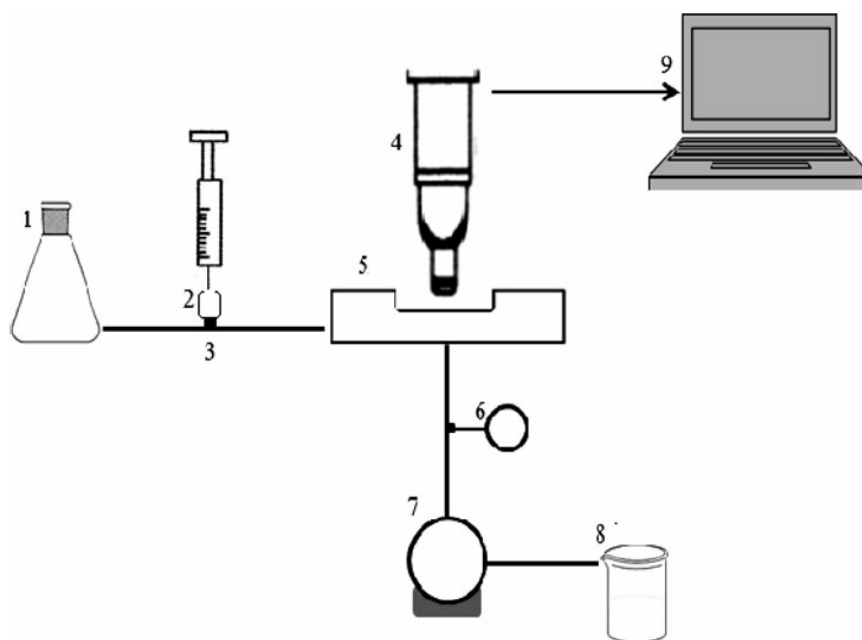


Fig. 3 Coordinate system used in CLSM observation. The XY planes illustrate the CSLM images recorder along the Z axis

with detectors and filter sets. The developed protocol allowed the membrane characterization and the cake formation on the membrane. The microsieve was first examined in bright light mode to determine the membrane surface position on the z axis. Then, the cake formation versus time on the microsieve surface was analyzed using both modes with the appropriate wavelengths. The deposits were magnified by X10 and X40 objectives to obtain better-resolved images and each z image noise was averaged (image resolution + frame rate).

2.6 Image analysis

The recorded pictures were processed using Image J (1.45 s downloaded from <http://rsb.info.nih.gov/ij/>). Firstly, images were automatically calibrated from the voxel sizes (depth, width and length). This program allowed different measurements as well as a 3D stack

reconstruction. Moreover, Image J enables to form a single 3D projection of the fluorescence-image series. The 3D image was projected to give a profile view.

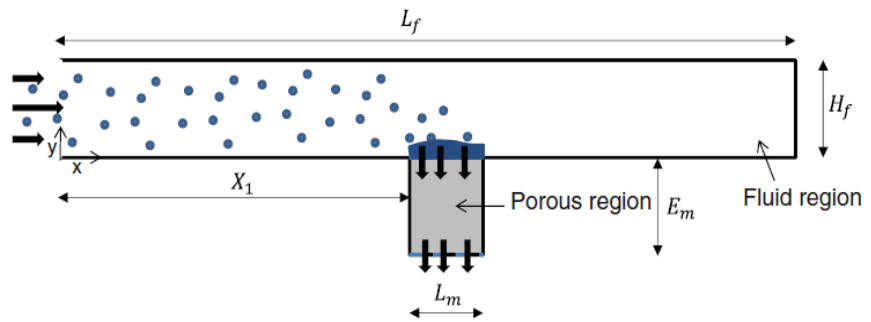
2.7 Theoretical approach

2.7.1 Flow model

A model based on the finite element method was developed in a previous paper (Günther et al. 2010) to simulate numerically the flow in a dead-end hollow fiber module. An analog model, which combines Navier–Stokes equations and Darcy Brinkman equations, was used to simulate the flow in the filtration chamber. To simplify the numerical simulation, we considered a two dimensional domain that was justified by the geometry of the filtration chamber, the width of the flow channel being quite large compare to its height (26 times). Therefore, the flow and the subsequent particle transport and deposition could be assumed to be two dimensional except very close to the lateral edge of the chamber (not considered here). Thus, the domain consisted of a rectangular fluid region (the dead end channel) of height H_f and length L_f in contact with a small rectangular porous region (the membrane) of height E_m , length L_m and permeability K_m as depicted in Fig. 4. Then the membrane resistance R_m equals E_m/K_m .

The boundary conditions were chosen with respect to experimental conditions, i.e. constant flow rate equal to 1 mL/min. It was also assumed that there was a no slip velocity at the fluid/porous interface.

Fig. 4 Scheme of the computational domain (scales not respected). Small circles indicate suspended particles that accumulate at the membrane surface and form a filtration cake



2.7.2 Mass transport model

The transport of particles in the channel from the entrance to the membrane was modelled using an Eulerian description. To this end, we made use of a classical convective diffusion equation of the particle concentration C (kg/m^3) as follows:

$$\frac{\partial C}{\partial t} + \mathbf{u}_f \cdot \nabla C = \nabla \cdot (D \cdot \nabla C) \tag{1}$$

where \mathbf{u}_f the fluid velocity (m/s). Both hydrodynamic and physic-chemical interactions were neglected in the present work.

According to the experiment, a constant particle concentration, C_0 , was taken at the inlet as a boundary condition. The other one assumed a vanishing normal diffusive particle flux component at fluid/porous interface. And a zero flux condition was considered at all the walls of the domain.

2.7.3 Fouling model

As already explained in a previous paper (Günther et al. 2012), it was assumed that the total resistance R_t of the fouled membrane depended on the position along the membrane and can be given as the sum of the intrinsic resistance of clean membrane and the particle cake layer resistance $R_c(x)$ due to the accumulation of particles at the membrane surface. Indeed, the internal fouling resistance was neglected due to the difference in pore and particle size. The hydraulic resistance of the cake layer of particles is given by Carman Kozeny model (Dullien 1991), as:

$$R_c = \frac{150 E_c (1 - \varepsilon_c)^2}{d_p^2 \varepsilon_c^3} \tag{2}$$

where d_p is the particle diameter and E_c and ε_c are the thickness and the porosity of the layer, respectively.

The thickness of the cake layer was calculated from the mass of particles deposited per area unit.

Thus, the accumulation of particles on the membrane surface induced, not only a modification of the shape and

properties of the porous domain, but also a restriction of the channel aperture just above the membrane. This in turn resulted in the eventual evolution of the free fluid flow within the channel due to the modification of both the free fluid domain geometry and filtration velocity distribution along the membrane. These effects were accounted for in the model under the assumption of a quasi-steady evolution of the flow.

2.7.4 Numerical method

The set of equations was solved using the commercially-available finite element code COMSOL multiphysics™. To compute the evolution of filter medium properties as far as filtration occurs, the channel height was no longer uniform and constant but became time dependant and varied along the x axis above the membrane.

The time variation of mass of particles deposited per unit area m_p at time t at the position x along the membrane was equal to the normal component of the convective particle flux per unit volume. This could be expressed as:

$$\frac{dm_p}{dt}(x, t) = C \vec{u}_f \cdot \vec{n} \tag{3}$$

Cake growth, resulting from the mass of particles deposited, was modelled using a mesh deformation method, named A.L.E (Arbitrary Lagrangian and Eulerian method). This method aimed to increase the porous domain constituted by the porous wall (membrane) and the cake layer and to decrease the inner fluid domain with respect to cake layer thickness without any remeshing. The permeability and the thickness of the new porous domain were no longer uniform and constant and varied as follows:

$$\frac{E_t(x)}{K_t(x)} = R_c(x) + R_m \tag{4}$$

$$E_t(x) = E_c(x) + E_m \tag{5}$$

where K_t was the permeability of the porous domain (instead of K_m) and E_t was the thickness of the porous domain (instead of E_m).

From a technical point of view, the velocity component of the fluid-cake interface in the normal direction, u_n^c , had to be considered. It was simply derived as:

$$u_n^c(x) = \frac{\frac{dm_p}{dt}}{\rho_p \cdot (1 - \epsilon_c)} \quad (6)$$

where ρ_p was the particle density and ϵ_c the cake porosity.

The A.L.E. model was solved at each time step to calculate the new mesh, using u_n^c as the boundary condition at the interface of the fluid/porous domain meshes. It meant that the displacement velocity of the mesh was prescribed

at the fluid/porous domain interface in the direction of cake growth.

3 Results and discussion

To analyze the effect of particle deposition on the dynamics of cake growth and morphology at the particle level, dead-end filtration experiments and simulations were done. Then, experimental and simulations results were compared.

3.1 Experimental results

3.1.1 First particle layer formation

Since the particles deposit on the microsieve surface, they cause an additional resistance for filtration. In an attempt to better understand fouling mechanisms, the formation of the first particle layer and the growth of the fouling cake on the membrane were studied by injecting a low concentration suspension of polystyrene microspheres. Observations of the microsieve surface during dead end filtration of a $3.142 \cdot 10^{-3} \text{ g L}^{-1}$ microspheres suspension were performed (Figs. 5, 6).

In agreement with Brans et al. (2006), during the microspheres microfiltration with a $2 \mu\text{m}$ pore diameter membrane, it was observed that particles deposited randomly in the observation area ($40\times$ objective). First deposited particles appear to be perfectly centered over one pore (exemplified by the white dot circles) (Fig. 5) as they followed the flow streamlines. In this configuration, in the absence of noticeable particle/membrane interaction, the

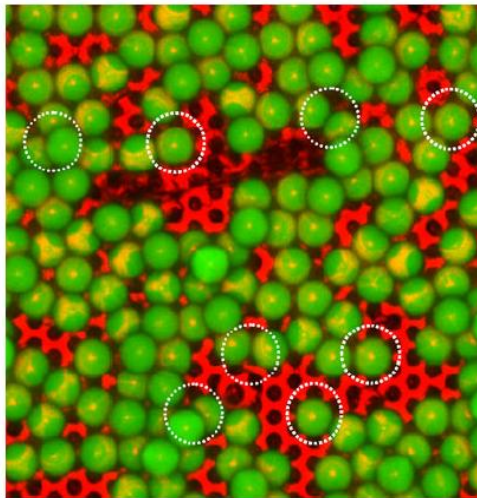


Fig. 5 Composite image of a $2 \mu\text{m}$ pore size microsieve fouled with one layer of $4.8 \mu\text{m}$ fluorescent polystyrene microspheres. White dot circles indicate some particles that are centered over one pore

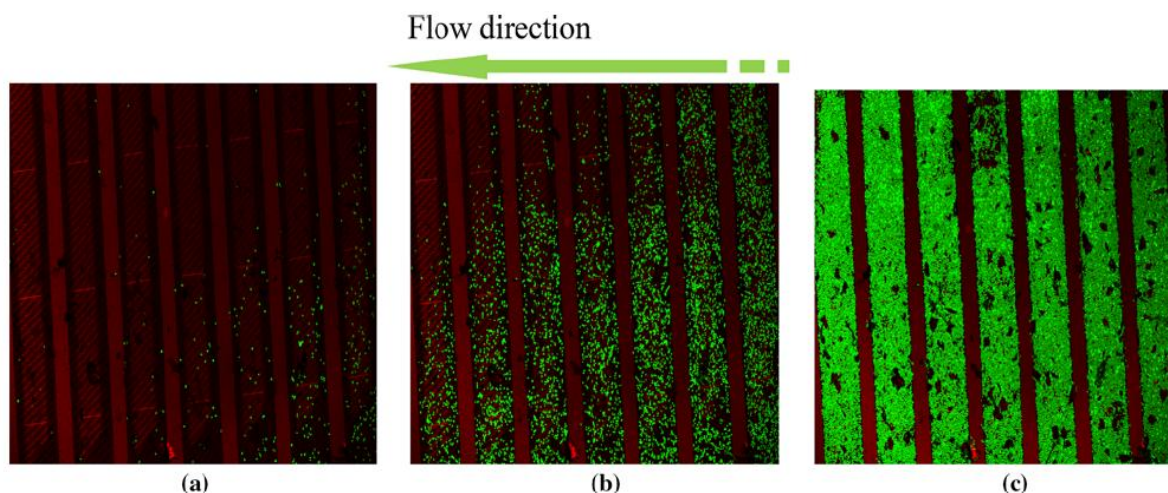
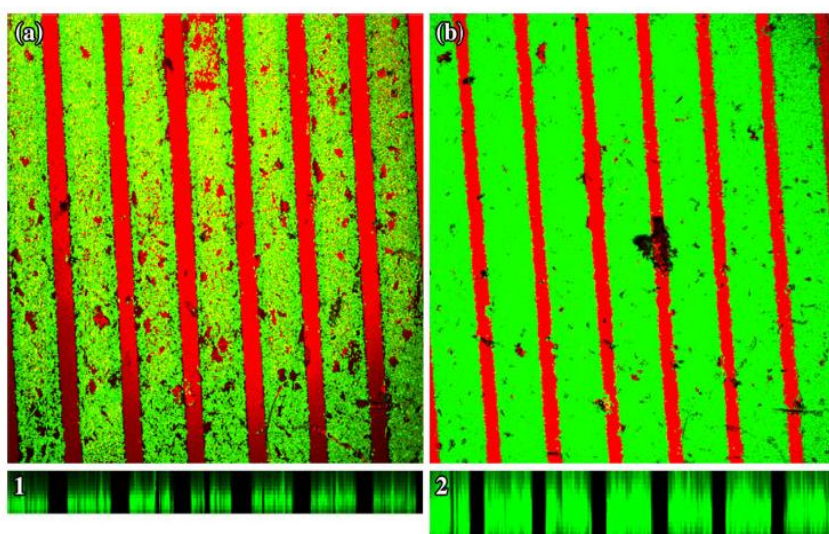


Fig. 6 Time-lapse series of composite images of microfiltration cake formed by $3.142 \cdot 10^{-3} \text{ g L}^{-1}$ suspension of fluorescent polystyrene microspheres on $2 \mu\text{m}$ pore size microsieve at different times: a) 30 s, b) 50 s, c) 1 min 20 s

Fig. 7 Images stacks projections of microsieves fouled with polystyrene microspheres. Representative top down views (a, b) and XZ views (1, 2) of a multilayers cake (14.88 and 61.28 μg), respectively



pores have a higher probability to be blocked. The following particles were either deposited over open pores or intercepted by previously deposited particles. At this scale, the formed cake was far to be homogeneous.

The increasing number of injected particles with time led to the formation of the first layer on the microsieve surface and the gradual growth of the filtration cake the particles cover progressively the filtering stripes to form a non uniform deposit in the flow direction.

3.1.2 Formation of particles multilayer cake

In order to obtain a thicker multilayered cake that is commonly encountered, several injections of particle suspension were processed. Figure 6 shows the formation of the multilayer particles deposit on the microsieve. To accurately determine the cake thicknesses, the image stacks were processed using Image J. They were automatically calibrated and merged to form a single projection (Fig. 7a, b). The XZ view of each stack is showed in Fig. 7 (1, 2) and the thickness of the deposit was, measured using Image J (Table 1).

It appeared that the particle deposition was not uniform on the membrane at the beginning of the filtration step. As illustrated in Fig. 7, at the beginning of filtration, the particles were deposited only in the filtrating stripes (porous

part). However, once a multilayer cake was accumulated on the filtration field, particles were also deposited on the “non filtrating” part of the microsieve. The spaces between the fouled stripes shrunk progressively, until practically disappearing Fig. 7. This phenomenon should be taking in consideration during numerical simulation.

As expected, after a certain amount of particles was deposited on the membrane, an uniform cake layer was formed on top of the filtrating stripes. Indeed, microsieves were perfectly plane thin silicon nitride membranes with a regular arrangement of circular well-defined and uniform pores high porosity and permeability, and compared to conventional membranes, they could exhibit a uniform distribution of particles on the filtration field.

3.2 Numerical results

The numerical model was used to study the very first step of cake formation on the membrane surface in order to better understand the experimental observations obtained with CLSM. It is well known that a uniform cake layer should be expected after a certain time of filtration since membrane hydraulic conductivity is extremely higher than channel hydraulic conductivity even if membrane properties are not spatially uniform (Mendret et al. 2010). However what about the transient filtration step? It can also be noticed that the filtration surface of microsieve type membrane is not uniform as can be seen in Fig. 1. It consists of a succession of rectangular filtering stripes (14) separated by rectangular non filtering stripes. What about cake distribution at such a membrane surface? It is crucial to answer these questions before any quantitative interpretations of cake morphology.

Table 1 Polystyrene cake mass injected and corresponding cake thickness determined by Image J

Cake mass (μg)	Cake thickness (μm)
14.88	19.73
61.28	40.26

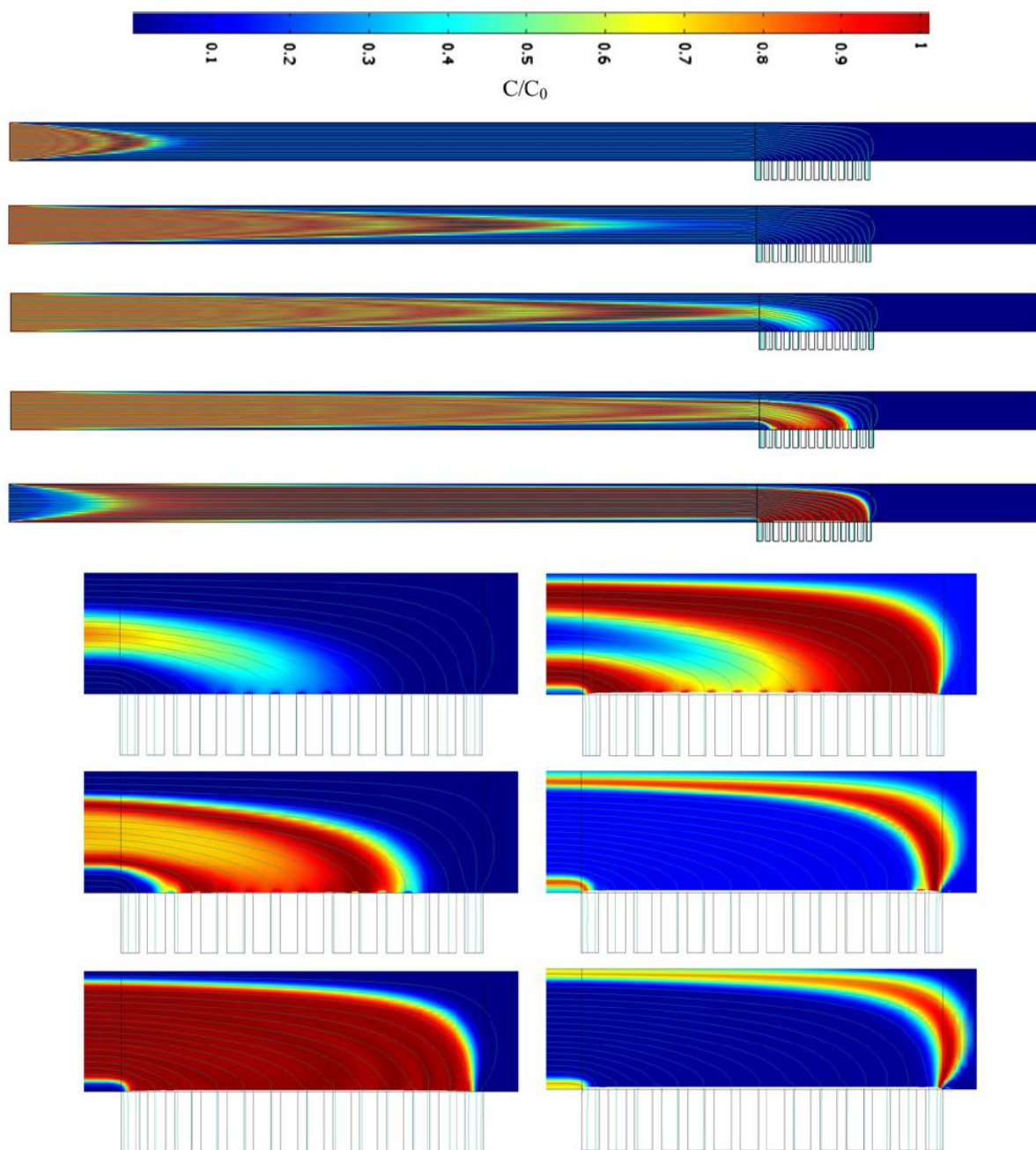


Fig. 8 Concentration field C/C_0 and streamlines in the filtration chamber at $t^* = 3, 12, 16, 22, 44$, b) $t^* = 16, 22, 44, 60, 80, 100$ (from top to bottom and left to right)

For convenience some dimensionless variables were defined using the channel height H_f as the length scale and the initial mean velocity in the channel U_0 as the velocity scale:

$$x^* = x/H_f; y^* = y/H_f; t^* = U_0 t/H_f; E_c^* = E_c/H_f; Q^* = Q/U_0 H_f B$$

with Q the volumetric flow rate and B the width of the channel (5.18 mm).

Simulations were performed at constant flow rate equal to 1 mL/min and for $C_0 = 0.5\text{g/L}$ assuming that a volume of particles corresponding to a uniform monolayer of deposited particles were injected at time $t^* = 0$ according to experimental conditions. A full model that could be

applicable to filtration of any kind of particles both for dead end and cross flow filtration modes was presented in Sect. 2.7. In the present study particles are relatively large as their diameter is $4.8 \mu\text{m}$. Brownian diffusion can thus be neglected compared to convection mechanism. Some authors such as Kromkamp et al. (2005), show that shear induced diffusion should be taken into account to model particle transport close to the membrane. But it can be also neglected here as microsieve membranes work in dead end filtration mode. Indeed, using Leighton and Acrivos formulae exhibits a shear induced diffusion coefficient about $10^{-16} \text{ m}^2/\text{s}$. However, numerical simulations were finally performed with a very low but non zero diffusion coefficient to preserve numerical stability of the solution. It can be noticed that preliminary numerical simulations (not presented here) showed that particle diffusion has no significant effect on results for diffusion coefficient lower than $10^{-10} \text{ m}^2/\text{s}$.

The particle concentration field and the streamline patterns in the channel flow for different times of filtration are presented in Fig. 8. As can be expected, it could be seen that particle convective transport dominated as the shape of the concentration front in the entrance part of the flow channel preserved the parabolic shape of the velocity profile, i.e. 2D Poiseuille flow. It could be noticed that particle injection was stopped at $t^* = 44$. It was clearly seen that particle deposition was not uniform over the membrane at the beginning of the filtration. Indeed the particles, located at the centre of the flow channel where fluid velocity was higher, reached the membrane before the others, located closer to the wall of the channel where fluid velocity was lower. Thus only a fraction of membrane surface was covered by particles at short times ($t^* = 16$ and $t^* = 22$). However, the membrane surface was progressively covered by particles at longer times ($t^* = 44$). At the end of filtration ($t^* = 80-100$) the slower particles finally reached the ends of the membrane surface. Indeed two stripes of non-zero concentration still remained close to the entrance channel walls while the rest of the computation domain exhibits zero concentration. This transient phenomenon was responsible for the non-uniform particle deposition at the beginning of filtration.

The time variations of deposit thickness over the membrane were plotted in Fig. 9a. The central part of the membrane surface was almost covered by a deposit of about one layer of particles at $t^* = 100$. The vertical dash line indicates the point of higher deposit thickness. It splits the membrane into two regions: 6 filtering stripes upstream and 8 filtering stripes downstream). Once all the injected particles had deposited on the membrane surface ($t^* = 100$), the cake appear to be homogenous.

We recall that the mass of particles injected is low (equivalent to a monolayer of particles deposited at the

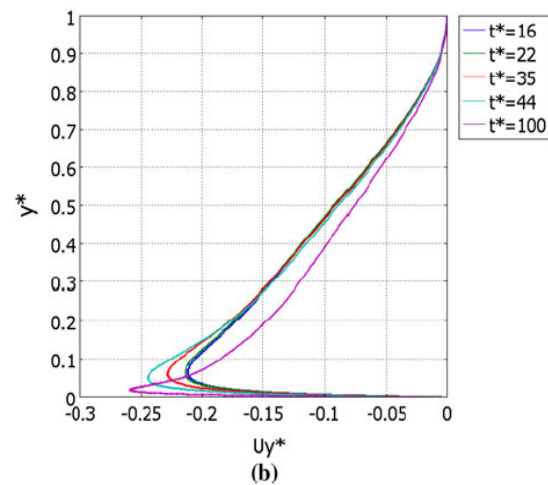
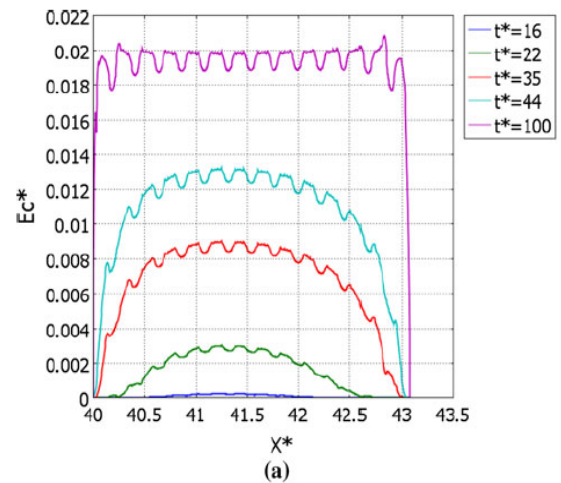


Fig. 9 a Spatial variation of the deposit thickness along the membrane surface, b vertical profile of the y-component of the velocity vector just above the membrane ($x^* = 40$) at different filtration times

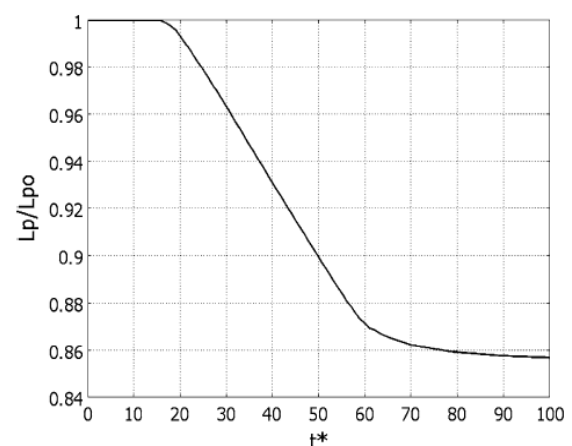


Fig. 10 Time variations of the permeability reduction

membrane surface). Therefore the influence of deposited particles on flow pattern and subsequent particle deposition is expected to be weak. However the time variations of cake thickness distribution over the membrane (Fig. 9a) reveal a noticeable coupling between fluid velocity and particle deposition according to Eq. (3). This coupling is well exemplified in Fig. 9b where time variations of the vertical profile of vertical velocity component just at the edge of the membrane are plotted.

The time variations of the permeability reduction, (L_p/L_{p0}), are plotted in Fig. 10. The curve consists of three parts. During the first times, particle concentration was transported in the entrance channel from the inlet to the membrane. Thus, the permeability reduction was kept constant equal to 1, as no deposition existed. Then particle deposition occurred and the transmembrane pressure increased significantly which cause the microsieve permeability loss. The deposit became progressively uniform; this could explain the quasi linear decrease of the permeability reduction rate as a function of time of filtration. At the end of filtration (third part of the curve), the permeability slowly diminished to finally reach an asymptotic value when the whole volume of particles injected is deposited at the membrane surface.

4 Conclusion

In this study, a non invasive in situ optical technique for 3D imaging of microfiltration cakes was used during dead end microfiltration of polystyrene fluorescent microspheres. In the current study, 4.8 μm model particles were used. The proposed technique has been proved to be helpful in order to study the real time deposition of particles on top of the membrane and the cake growth. A numerical model (Comsol Multiphysics[®]) was developed in order to simulate the flow and the cake build up on the membrane. Numerical results were in agreement with the experimental data. In the future work, various issues will be addressed:

1. The microfiltration of particles of different sizes monodispersed or bidispersed suspensions will be studied.
2. The building and characteristics of deposits resulting from crossflow filtration of various particles suspensions will be studied and compared to the cakes obtained during dead end microfiltration.
3. In order to take advantage of filtering living microbial cells, the impact of the microbial physicochemical

properties on the deposit characteristics will be taking on consideration.

Acknowledgments The authors gratefully acknowledge Paul Duru from the Fluid Mechanic Institute of Toulouse (IMFT) and Aurélie Le Ru from FR3450 confocal platform (Auzerville France) for their technical support. The financial support from “Franco-Tunisian Integrated Action of French Foreign and European office and Tunisian Higher Education and Scientific Research office” is also gratefully acknowledged.

References

- Beaufort S, Alfenore S, Lafforgue C (2011) Use of fluorescent microorganisms to perform in vivo and in situ local characterization of microbial deposits. *J Membr Sci* 369:30–39
- Brans G, Kromkamp J, Pek N, Gielen J, Heck J, van Rijn CJM, van der Sman RG, Schroën CGPH, Boom RM (2006) Evaluation of microsieve membrane design. *J Membr Sci* 278:344–348
- Brans G, van Dinther A, Odum B, Schroën CGPH, Boom RM (2007) Transmission and fractionation of micro-sized particle suspensions. *J Membr Sci* 290:230–240
- Dullien FAL (1991) Porous media: fluid transport and pore structure, 2nd edn. Academic Press
- Foley G (2006) A review of factors affecting filter cake properties in dead-end microfiltration of microbial suspensions. *J Membr Sci* 274:38–46
- Gómez M, de la Rúa A, Garralón G, Plaza F, Hontoria E, Gómez MA (2006) Urban wastewater disinfection by filtration technologies. *Desalination* 190:16–28
- Günther J, Schmitz P, Albasi C, Lafforgue C (2010) A numerical approach to study the impact of packing density on fluid flow distribution in hollow fiber module. *J Membr Sci* 348:277–286
- Günther J, Hobbs D, Albasi C, Lafforgue C, Cockx A, Schmitz P (2012) Modeling the effect of packing density on filtration performances in hollow fiber microfiltration module: a spatial study of cake growth. *J Membr Sci* 389:126–136
- Hughes D, Tirlapur UK, Field R, Cui Z (2006) In situ 3D characterization of membrane fouling by yeast suspensions using two-photon femtosecond near infrared non-linear optical imaging. *J Membr Sci* 280:124–133
- Kromkamp J, Bastiaanse A, Swarts J, Brans G, van der Sman RGM, Boom RM (2005) A suspension flow model for hydrodynamics and concentration polarisation in crossflow microfiltration. *J Membr Sci* 253:67–79
- Le-Clech P, Chen V, Fane TAG (2006) Fouling in membrane bioreactors used in wastewater treatment. *J Membr Sci* 284:17–53
- Mendret J, Guigui C, Cabassud C, Schmitz P (2010) Numerical investigations of the effect of non-uniform membrane permeability on deposit formation and filtration process. *Desalination* 263:122–132
- Zhang Y, Fane A, Law A (2006) Critical flux and particle deposition of bidisperse suspensions during crossflow microfiltration. *J Membr Sci* 282:189–197

*Chapitre V. : Filtration des suspensions de
particules inertes*

Présentation du travail, objectifs et approche

Ce chapitre est consacré à l'analyse du dépôt formé par l'accumulation de particules solides sphériques inertes sur la surface de la membrane durant une filtration frontale. L'organisation de la première couche de particules sur la microsieve, la morphologie du dépôt et les propriétés de transport seront caractérisées en fonction de la taille des particules et de la taille des pores de la microsieve.

L'étude est divisée en deux parties :

❶ Caractérisation de dépôts de particules monodispersées : dans ce volet on étudiera, particulièrement, l'effet de la taille des particules ainsi que celui de la structure géométrique de la membrane sur la construction des dépôts.

❷ Caractérisation de dépôts de particules bidispersées : l'effet du mélange de particules selon différentes conditions d'injection sera analysé.

L'analyse repose sur une approche multi-échelle du colmatage de la membrane en s'appuyant sur la caractérisation qualitative et quantitative du dépôt (épaisseur, porosité, homogénéité) par microscopie confocale, *in situ*, c'est à dire au cours de la filtration, et sur le suivi simultané des propriétés de transport du système « membrane + dépôt » :

- L'échelle du système filtrant : classiquement adoptée pour évaluer les performances de séparation par membrane. Elle consiste à déterminer les variations de la perméabilité (ou de la résistance hydraulique) de la membrane par le suivi du flux de perméat et de la pression transmembranaire.

- L'échelle du filtre (ou de la membrane) : le dépôt des particules sera suivi en temps réel et l'homogénéité de la distribution des particules sur la membrane sera estimée.

- L'échelle de la bande filtrante : le taux de couverture de la bande filtrante ainsi que la topographie des dépôts des particules formés seront analysés.

- L'échelle du pore et/ou de la particule : l'organisation des particules déposées durant la formation de la première couche et leur empilement durant la formation du dépôt seront analysés et la structure interne du dépôt sera caractérisée.

V.1 Caractérisation tridimensionnelle, *in situ*, des dépôts de particules inertes monodispersées

La caractérisation tridimensionnelle « *in situ* » du colmatage des microsieves a été réalisée par microscopie confocale. La chambre de filtration permettant l'observation directe de dépôt des particules a été utilisée.

Les essais de filtration de particules inertes monodispersées sont conduits en mode frontal et en régime laminaire. Des microsphères en polystyrène fluorescent de 4,8 μm et 1 μm de diamètre sont filtrées sur deux types de microsieves de 0,8 μm et 2 μm de taille de pores.

La caractérisation précise des positions finales des particules sur la microsieve lors de la formation de la première couche permet de montrer que les particules se déposent, préférentiellement, de manière parfaitement centrée sur les pores et les bouchent. Du fait de la répartition régulière des pores sur la membrane, de leur taille et de leur espacement, les particules déposées sur les pores peuvent protéger les pores voisins de l'obstruction par d'autres particules. Ce mécanisme physique permet, ainsi, de maintenir une perméabilité élevée de la membrane et donc un débit de filtration élevé, notamment si on effectue la filtration de grosses particules sur une membrane à faible taille de pores. Ce résultat marquant peut s'avérer pertinent pour le dimensionnement de certains procédés de filtration.

L'étude de la morphologie du dépôt à partir de la mesure de l'évolution de la densité surfacique en particules le long de l'épaisseur du dépôt révèle l'existence des trois régions :

- La région de germination en contact avec la membrane avec une densité modérée en particules.
- Le cœur du dépôt est la région centrale du dépôt où la densité en particules est la plus élevée.
- La région superficielle appelée aussi région de capture, peu dense.

ARTICLE 3

In situ 3D characterization of
monodispersed spherical particle
deposition on microsieve using confocal
laser scanning microscopy

Journal of Membrane Science, 454 (2014) 283–297

I. Ben Hassan, C. Lafforgue, A. Ayadi, P. Schmitz



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Membrane Science

journal homepage: www.elsevier.com/locate/memsci

In situ 3D characterization of monodispersed spherical particle deposition on microsieve using confocal laser scanning microscopy

Ines Ben Hassan^{a,b,c,d}, Christine Lafforgue^{a,b,c}, Abdelmoneim Ayadi^d, Philippe Schmitz^{a,b,c,*}^a Université de Toulouse, INSA, UPS, INP, LISBP, 135 Avenue de Rangueil, F-31077 Toulouse, France^b INRA, UMR792 Ingénierie des Systèmes Biologiques et des Procédés, F-31400 Toulouse, France^c CNRS, UMR5504, F-31400 Toulouse, France^d LRAE (Laboratoire Radio analyses et Environnement), Université de Sfax, Sfax, Tunisia

ARTICLE INFO

Article history:

Received 7 October 2013

Received in revised form

28 November 2013

Accepted 1 December 2013

Available online 12 December 2013

Keywords:

Filtration

CLSM

Spherical particles

Microsieve

Cake

ABSTRACT

In situ 3D characterization of Aquamarin microsieves fouling was achieved using Confocal Laser Scanning Microscopy (CLSM). A filtration chamber allowing direct microscopic observation of particle deposition and cake characterization, specially designed for *in situ* observations, was used. Suspensions of fluorescent monodisperse spherical particle (1 μm and 4.8 μm) were filtered under constant flow rate through 0.8 μm and 2 μm pore diameters silicon nitride microsieves. On-line images of particle deposition were recorded and the cake build up was followed layer by layer. Based on 3D image processing, cake morphology (particle arrangement, homogeneity, thickness and porosity) was characterized and correlated to permeability reduction recorded during the filtration experiments.

© 2013 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Micro-sized particle microfiltration is widely used in biotechnology, water and wastewater treatment, and food and pharmaceutical industries [1]. The build-up of a fouling cake layer on the membrane surface is the most important drawback of these technologies. Indeed, fouling reduces productivity and may change the selectivity properties of membranes, which makes the process less efficient [2] and lead to higher operating cost [3]. Usually, membranes with pores smaller than particle size to be retained are selected. Therefore, external fouling due to particle deposition on the membrane surface is generally expected in the form of a cake layer. Cake mass, thickness, porosity, particle size distribution and adhesiveness to the membrane are the main cake properties [4]. The cake layer can be simply studied by monitoring online filtration performances parameters such as permeability decrease, transmembrane pressure, increase or/and concentration variation of a specific component. However, it is not easy to understand the phenomena that take place at the microscopic level using this strategy. Indeed, the interactions between the different feed components and the membrane as well as their organization on the membrane surface are not accessible using the classic fouling

study techniques. Subsequent models developed in order to simulate a sequence of filtration are generally partly empirical [5].

Towards an accurate knowledge of cake properties and a better understanding of the basic mechanisms governing particle deposition and subsequent cake formation, a number of non-invasive characterization techniques at a microscopic level have been developed. They could be classified in optical or nonoptical techniques. Many researchers have developed laser based methods to characterize the cake [6]. These techniques are based on the reflection of laser beam towards the membrane surface through a window in the feed side of a crossflow membrane module. Mendret et al. measured the local thickness of a clay cake on a plane membrane using laser sheet at grazing incidence [7]. However, internal cake characteristics could not be determined and the low resolution of this method was a high drawback [8]. Li et al. have used ultrasonic time domain reflectometry (UDTR) to measure kaolin cake's thickness. In this technique, sound waves permit the evaluation of the thickness of a fouling layer on the membrane surface [9].

Thus, accurate non-invasive observation techniques that enable the cake to be directly visualized could bring information of importance. Direct visualization of membrane and cake surface has then been adapted. They can be classified into in two groups: *in situ* and *ex situ* techniques [4]. *Ex situ* techniques like scanning electron microscopy (SEM) and atomic force microscopy (AFM) are relevant techniques for autopsying structure of the cake layer. Indeed, SEM imaging has a high resolution level. Moreover, it provides additional clues regarding the origins, the shape and the

* Corresponding author.

E-mail address: schmitz@insa-toulouse.fr (P. Schmitz).

size of foulants [3]. Thus, according to SEM observations of Fan and Huang, the cake could be divided into two layers: a loose cake layer and a web-like gel layer [10]. However, this technique requires fouled membrane removal from the filtration chamber and a specific treatment before observation. The experimental protocol is delicate and complex which is a high potential for experimental error and makes impossible the study of cake growth on line.

AFM permits to obtain 3D images with resolution at around atomic level. No special sample pretreatment is required. Additionally, it enables the comparison of the fouling potential of membranes and the investigation of membrane-to-foulant, foulant-to-foulant, and foulant-to-cleaning agent interactions.

Bowen et al. have propose to measure the adhesive force between the foulants (yeast cells and BSA) and two type of membranes using AFM [11]. The major drawback of this method was that the results depend strongly on the probe used [3].

Optical *in situ* techniques provide very sensitive real time observation and require, generally, a specially designed filtration chamber [12]. Direct optical techniques (DO) allow to visualize the deposition behavior of particles during membrane filtration [12]. One of the drawbacks is that the observation is limited to the focal plane. Indeed, only the fouling layer at the surface of membranes can be observed clearly [3]. This technique was used to observe the deposition of single sized latex and mixed suspensions [13], yeast and bacteria [14], polysaccharide [15] etc. Laser triangulometer technique, based on the reflection of laser light shone towards the membrane surface [12], was used by Altmann and Ripperger to measure the cake layer height [16]. However, this technique does not seem accurate enough for the smaller particles. Indeed, they were still depositing and causing flux decline without significant increase in the cake height. Fluorescence techniques allow the visualization of foulants with a smaller size than those resolved in bright light optical microscopy [12]. Many other non-invasive observation techniques were fully reviewed by Chen et al. [12] and Meng et al. [3]. Recently, a direct observation technique using a confocal laser scanning microscope (CLSM) has been developed. The laser beam is focused on a focal plane and, thanks to the pinhole, the emitted fluorescence light from the excited in-focus spot is only detected [3] which allows the observation of a selected plane at a given depth. Indeed, the main advantage of CLSM is the exclusion of planes out of focus [18]. Moving the sample height allows different focal planes at different depths to be observed. At the end, the stack of the successive images recorded at consecutive depths permits the 3-dimensional image reconstruction of the whole sample [18]. This *in situ* non-invasive fluorescence imaging was used to assess membranes morphology [17]. In the same way, deposition on and inside the pores could be studied by Ferrando et al. in the case of proteins microfiltration (BSA and ovalbumin), however, in this study, laser light penetration in the membrane was limited to 3 μm [18]. Numerous works have demonstrated that CLSM allows a three-dimensional reconstruction of the cake layer on membrane to be carried out [12]. This feature is the main advantage of confocal microscopy compared to conventional observation techniques as it permits to differentiate the membrane and the cake which allows the study of the particle distribution on the membrane surface. In the case of polydisperse suspensions, CLSM allows the visualization of the cake in 3D (at different depths) and the distinction between the different species by using different fluorescent dyes with different excitation and emission wavelengths [18]. In this way, the distribution of every foulant within the cake layer is determined [3]. Beaufort et al. studied, *in situ*, the distribution as a function of the cake depth of bacteria and yeast in a bidispersed cake. However, in that study, only the 30 μm in top of the cake was observed [19]. Some fluorescence dyes can even target specific biopolymers. Hwang

et al. used Syto 9 and Concanavalin A conjugated with TRITC to stain, respectively, bacterial cells and EPSs on the cake and, eventually, to quantify the spatial change in the cake architecture and to calculate the contribution of each component [20]. This technique allows also to follow the removal of single foulants within the fouling layer during membrane cleaning [21]. Development of image treatment techniques along scanning confocal laser microscopy offered the access to accurate three-dimensional quantification of the cake. The pioneer theoretical works of Schmitz et al. [22] pleading in favor of the porosity heterogeneity of the fouling layer were recently experimentally confirmed by Lee et al. In that study, the authors visualized the cake *ex situ* using CLSM. Indeed, the hollow fiber was cut and stained before observation which could be a source of experimental error [23]. Park et al. used the same protocol and compared the porosity and its distribution of cake formed by accumulation of polystyrene latex beads aggregates on membrane filtration to the values calculated from specific cake resistances. They also demonstrate the validity of CLSM accuracy and the image analysis technique [24].

Nevertheless, the decrease in fluorescence as a function of cake depth could make difficult the analysis of thick fouling layers [19]. Scattering and absorption of the excitation and emission lights depend on the concentration and transparency of the particle and, thus, the laser penetration is limited [25]. Moreover, to our knowledge, almost all the cake observations were made *ex situ* after cakes staining. For example, Hwang et al., in order to observe a bio-cake deposited on a membrane fiber located in the middle section of the membrane module, have picked a piece of fiber and stained it [20]. As the cake properties (porosity, depth etc.) depend on the flow conditions (pressure, flow rate and direction, temperature etc.), the *ex situ* characterization could not be meaningful. In addition when dealing with living cells, the delay required for sample preparation could certainly have an effect on cell state. Ultimately, the conclusion that can be drawn from these data and analyses is that the cake formation should be monitored on line and *in situ*. The deposit construction should be observed inside the filtration module and under the filtration conditions.

The present study aimed to develop an *in situ* on line CLSM method able (i) to analyze the particle deposition on the membrane at the microscale level and (ii) to characterize qualitatively and quantitatively the growth of the cake. To this end, perfectly defined pore size microsieves were selected. Two sizes of fluorescent spherical particles were used to build step by step cakes on the microsieves that were *in situ* observed using CLSM. The effects of membrane properties on cake build up and filtration performance were analyzed. A special attention was paid to the first cake layer build up. The evolution of the structural parameters along the cake depth was followed.

2. Materials and methods

2.1. Membrane characteristics

The selected silicon nitride microsieves have appeared to be the best compromise in terms of membrane area minimization and permeate flow rate maximization [26]. Indeed, microsieves are perfectly plane thin membranes of high porosity and permeability, 25 10^{-6}m^2 total area, 6.3 10^{-6}m^2 filtration area, with a regular arrangement of circular uniform pores (Aquamarijn[®]) (Fig. 1). Membranes with 0.8 μm or 2 μm pores diameter were used. Microsieves characteristics (Table 1), filtrating stripes characteristics (Fig. 1A and B) and pore morphology (Fig. 1C) are displayed. Each microsieve consists of 14 identical filtrating stripes. The sieves were glued to a plastic membrane ship.

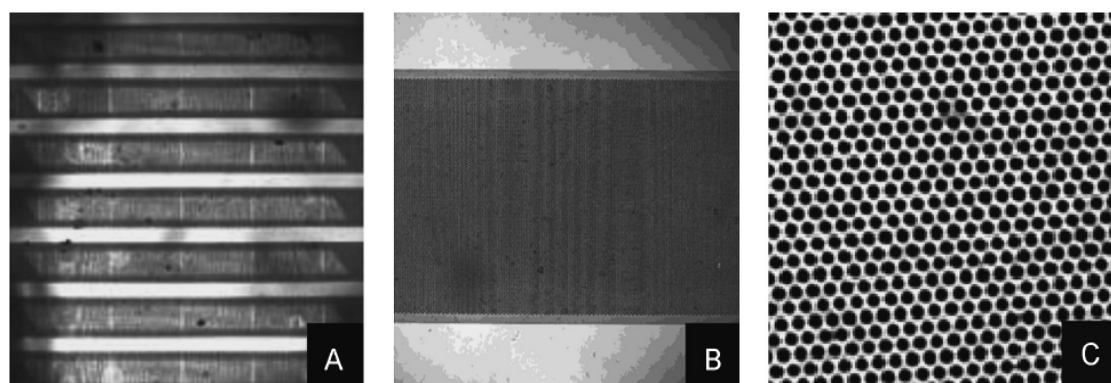


Fig. 1. CLSM images of a silicon nitride microsieve surface (A) (objective $\times 10$) filtering stripes and details of pores on the stripes (Objective $\times 63$), zoom 1 (B) and 6 (C).

Table 1
Microsieves characteristics.

Pore size (μm)	Pore pitch (μm)	Membrane porosity (%)	Number of pores
0.8	1.6	22.7	2,841,646
2	3	40.3	808,290

Table 2
Spectral characteristics of fluorescent microspheres.

Microspheres diameter (μm)	Specified color	Excitation maxima (nm)	Emission maxima (nm)
1	Red	542	612
4.8	Green	468	508

2.2. Model suspensions of polystyrene microspheres

Depth dyed fluorescent microspheres (Thermo Scientific, USA) with 1 μm and 4.8 μm diameter, made of polystyrene which has a density of $1.05 \cdot 10^3 \text{ kg/cm}^3$ have been selected. According to the manufacturer data, size uniformity is less than 5%. They are packaged at a concentration of 1% (w/w) in deionized water with trace amounts of surfactant and preservative to limit aggregation and promote stability. Their spectral properties are listed in Table 2.

Surface potentials were estimated by a zetasizer (nano zs, Malvern instruments). The zeta potentials of the two size particles suspended in ultrapure water were measured. For the concentrations range corresponding to the suspensions used during the experiments, the zeta potentials were $-12.3 \pm 2.14 \text{ mV}$ and $-7.83 \pm 1.48 \text{ mV}$ for the 4.8 μm and 1 μm particles, respectively. Larger particles appear to have a slightly lower zeta potential.

2.3. Microsieve characterization

Wetting the microsieve surface before experiment is a very important step in order to get a maximal active surface and obtain its maximum performance [27]. To this end, the microsieves were plasma treated with a Plasma Cleaner (Harrick Plasma, Belgium) and wetted with isopropanol before the water characterization tests and the filtration runs. To check the effect of the surface wetting procedure, the water contact angles of unmodified (as received) and plasma treated membrane were compared using a Goniometry (Digidrop, GBX, Fance). The sessile drop method was used to determine the static contact angle, θ , of silicon nitride microsieve before and after modification. The results are averages over five measurements on each sample.

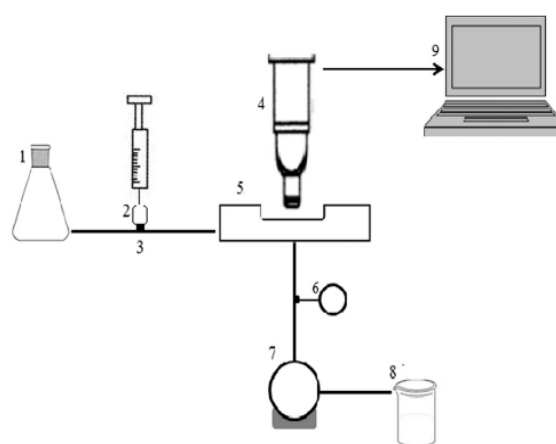


Fig. 2. Schematic illustration of the microfiltration set-up (1—deionized water feed flask, 2—particle feed flask, 3—three way valve, 4—CLSM microscope, 5—filtration chamber, 6—numeric manometer, 7—pump, 8—permeate outlet, and 9—PC).

Kirby et al. found that the zeta potentials of silicon nitride powders do not vary significantly between silicate types. However, pH, long-term storage and contact with aqueous solutions have an effect [28]. In this study, the microsieves are mounted in the filtration chamber filled with ultrapure water immediately after the wetting treatment and used on the following day. The microsieves surface zeta potential can be reasonably supposed negatively charged. Indeed, measurements of the zeta potential of silica and naturally oxidized SiN and was -50 mV [29] and $\approx -35 \text{ mV}$ [30], respectively, in the salinity and pH range used in this study.

To investigate the decrease of microsieve performance during the filtration experiments, water fluxes are expressed as permeability reduction L_p^*

$$L_p^* = \frac{L_p^c}{L_p^0} \tag{1}$$

where L_p^c is the water permeability at a given time of the filtration experiment and L_p^0 the water permeability of the clean microsieve, calculated from flow rate and transmembrane pressure measurements. Ultrapure water was obtained with a Millipore purification unit MilliQ plus (0.22 μm).

2.4. Direct observation filtration chamber and set up

In the present study, the filtration chamber (5.18 mm width, 60 mm length, and 0.25 mm height) was especially designed to

have a uniform frontal flow through the membrane, in order to ensure the construction of a homogenous cake. To this end, numerical simulations were performed to study the very first step of cake formation on the membrane surface at a constant flow rate [31]. At the beginning, they showed that particle convective transport dominated as the shape of the concentration front in the entrance part of the flow channel preserved the parabolic shape of the velocity profile, i.e. 2D Poiseuille flow. It was seen that first arriving particle deposition was not uniform over the membrane at the very beginning of the filtration. Indeed the particles, located at the center of the flow channel, where fluid velocity was higher, reached the membrane before the others located closer to the wall of the channel where fluid velocity was lower. Then, the membrane surface was progressively covered by particles and the slower particles finally reached the ends of the membrane surface. After the first injection, the cake appeared to be homogenous. No cross-flow effects in the chamber were noticed. It can be explained by the very low value of the permeability ratio between the channel and the membrane. Transmembrane pressure was, thus, uniform all over the membrane. The chamber equipped with a glass window in the top plate, allowing direct microscopic observation of particle deposition and cake formation, was used (Fig. 2). The chamber glass coverslip thickness was manufactured as thin as possible to keep a total chamber depth suitable for the working length of the microscope objective. In addition, the glass coverslip should not be deformed when submitted to pressure variations due to fluid flow. This requires limiting the size of the glass window. The chamber design and detailed sketch is presented in a previous work [32]. The chamber was set under a CLSM microscope (Leica, Japan) during filtration experiments. Images of the particle deposited on the membrane surface were recorded with the Leica CLSM software. The whole filtration set-up (Fig. 2) consisted of two circulation loops with two feed flasks containing respectively deionized water and the particle suspension. The feed suspension was circulated in dead end filtration mode thanks to a pump (Masterflex, Bioblock scientific, USA) mounted on the permeate line (1 mL min⁻¹). The volume of injected suspension as well as the permeate flow rate were measured by weighting the liquid collected after the pump during a few minutes (triplicates measurements). A digital compact vacuum meter (Thyrcont, Germany) was used to monitor the filtration conditions (transmembrane pressure).

2.5. Filtration procedure and in situ CLSM analysis

A dedicated procedure was developed to locate the fluorescent particles that accumulate on the microsieves and to analyze the cake build-up. It was shown in previous works that the depth value that can be effectively detected and explored using CLSM depends on cake morphology and particle properties [19]. In order to overcome such a limitation, the cake was formed and studied layer by layer thanks to successive injections of the particle suspension. Observations were performed for each injection in order to achieve an accurate analysis of cake build-up mechanism and deposit properties. CLSM observations were performed on a confocal scanning laser microscope (LEICA SP2, DMRXA2) equipped with detectors and filter sets. Firstly, the microsieve was placed in the experimental chamber which was set under the objective and connected to the deionized water feed flask. Water was circulated in dead end filtration mode thanks to a pump mounted on the permeate line and the clean membrane water permeability was measured. Transmembrane pressure was determined by a digital compact vacuum meter placed upstream of the pump. When pressure was stable, the permeate flow rate was controlled by weighting the liquid collected during a few minutes (triplicates measurements). The microscope was first used in

bright light mode to select the position of the z-axis corresponding to microsieve surface. In this mode, the maximum amount of light is reflected when the observed surface, which is the membrane top, is on the focal plan. Membrane flatness was checked. Indeed, in order to get a homogenous deposition of particles, the microsieve surface has to be perfectly horizontal. The z positions of different membrane segments were compared. It is seen in Fig. 1 that it is possible to clearly discern the microsieve pores. Just before observation, a known amount of fluorescent particles suspension was placed in the feed flask and flowed to the membrane by opening the three way valve and, at the same time, the permeate mass was measured to calculate the injected mass (triplicates measurements). It was assumed that all the injected particles deposit on the membrane surface. Microscopic observation was simultaneously done in both bright light and fluorescent modes. The particle time deposition on the microsieves is observed with an $\times 10$ objective (x, y, t). When the deposition step is achieved, the fouled membrane is analyzed with the $\times 63$ or the $\times 40$ objectives with zooms 1 and 6. Recorded CLSM images consist of successive thin slices of the cake parallel to the microsieve (xy planes) along the z-axis. Two scans of every image are performed to improve the accuracy. The z-series or stacks of images taken at a z-axis were distanced at 0.32 μm . After image recording, a new suspension volume was injected and the same procedure was repeated. The filtration experiments were runs in dead end mode at a constant rate.

2.6. Image analysis

The recorded high resolution images were processed using Image J (1.45 s downloaded from <http://rsb.info.nih.gov/ij/>). The optical sections captured in the reflection and fluorescence modes can, thus, be visualized simultaneously in order to localize the particles deposited on the microsieves. To process CLSM images, pictures were automatically calibrated from the voxel sizes (depth, width and length) and converted to grey-scale images. Then, they were segmented into background and foreground by setting a threshold.

As the microsieves consist of a succession of rectangular filtering stripes separated by nonfiltering stripes, this non uniformity has to be addressed. To do so, the apparent fraction of filtration area covered by particles, named filtration field coverage, α_c , is given as

$$\alpha_c = \frac{S_c}{S_{f1}} \quad (2)$$

S_c is the apparent area of the surface covered by the particles on the image and S_{f1} is the area of the filtrating field in the image measured with the bright light mode. The image stacks recorded with the $\times 40$ or $\times 63$ objectives (zoom 1) in fluorescence mode are projected to show the top down view of the filtration cake. Then, an assessment of S_c can be obtained.

To analyze cake morphology, different variables were defined and determined, based on the optical sectioned images obtained with the $\times 40$ or $\times 63$ objectives (zoom 6). At this magnification, only a restricted area of the filtration field is observed but the analyzed data is more accurate. The following procedure was used: firstly, all the fluorescent images were converted to gray-scale images and, then, converted to binary images by thresholding. The fraction of the area covered by the particles in each image along the z axis α_s is measured

$$\alpha_s(z) = \frac{S(z)}{S_{f6}} \quad (3)$$

$S(z)$ is the area of the surface covered by the particles for each image of the stack and S_{f6} is the area of the filtration area at zoom 6.

Three-dimensional segmentation of a porous cake is a challenging task in image processing. Thus, towards more accuracy, $\alpha_s(z)$ precision is assessed using the error criterion $\Delta\alpha_s = \pm \Delta S(z)/S(z)$. The average volume fraction of the cake was, then, calculated according to the following equation

$$\langle\alpha_s\rangle = \frac{1}{z_{max}} \int_0^{z_{max}} \alpha_s(z) dz \tag{4}$$

where z_{max} (μm) the point along the z axis corresponding to the highest spot of the cake. This variable gives in turn the cake porosity as $\varepsilon = 1 - \langle\alpha_s\rangle$. The mean cake thickness, $\langle T_{ds}\rangle$, was determined from the root mean square as follows:

$$\langle T_d \rangle = \sqrt{\frac{\int_0^{z_{max}} \alpha_s(z) z^2 dz}{\int_0^{z_{max}} \alpha_s(z) dz}} \tag{5}$$

In order to study cake homogeneity, Schmitz et al. have shown that the fractal dimension of an aggregate can be deduced from the following relation:

$$\langle T_d \rangle = BN_p^\lambda \tag{6}$$

where N_p is the number of particles in the cake and B is a constant. The exponent λ was expressed as a function of the fractal dimension D_f and of the Euclidian dimension D_e , as follows:

$$\lambda = \frac{1}{1 - D_e + D_f} \tag{7}$$

The cake heterogeneity degree is evaluated with the arithmetic difference $D_e - D_f$. Indeed, for a perfectly homogeneous cake, $D_e - D_f = 0$. While a non-zero value denotes a heterogeneous deposit [22].

In the present study, the number of particles in the observed part of the cake, N_p , is *a priori* unknown but it can be estimated from α_s as follows:

$$N_p = \frac{1}{V_p} \int_0^{z_{max}} S_{f6} \alpha_s(z) dz \tag{8}$$

where V_p is the mean volume of one particle. Combining Eqs. (6) and (8), we finally obtain an alternate relation to determine the fractal dimension of the deposit:

$$\langle T_d \rangle = B' \left[\int_0^{z_{max}} \alpha_s(z) dz \right]^\lambda \tag{9}$$

where B' is a constant.

3. Results and discussion

The strategy here proposed is based on the use of polystyrene fluorescent microspheres to study the influence of particle size on cake construction on a given membrane geometry and its subsequent morphology. Firstly, the precision, the accuracy and the limits of the CLSM technique were analyzed. Secondly, the filtration properties of the microsieves were discussed. Then, the cake build up layer by layer was analyzed. Finally, some morphological parameters of the cake were determined. Three dead-end filtration experiments have been undertaken according to the experimental conditions reported in Table 3.

3.1. Validation of the procedure and reliability of experimental measurements

3.1.1. Microsieve position

The channel above the microsieve being extremely thin (0.25 mm height), it is crucial to have a perfectly plane microsieve to obtain a random particle deposition before each run. That was checked using the bright light mode of the CLSM before each experiment. Moreover, during this step, the position of the z -axis

Table 3
Experimental conditions.

Experiment	Particle size (μm)	Suspension concentration in the feed (g L^{-1})	Fluorescence	Microsieve pore size (μm)
Experiment A	4.8	$3.1 \cdot 10^{-3}$	Green	2
Experiment B	4.8	$1.61 \cdot 10^{-3}$	Green	0.8
Experiment C	1	$6.55 \cdot 10^{-4}$	Red	0.8

Table 4
Theoretical CLSM resolution limit.

CLSM resolution	Green particles (μm)	Red particles (μm)
$\delta_x = \delta_y$	0.22	0.26
δ_z	1.07	0.76

corresponding to microsieve surface was determined. Furthermore, preliminary experimental data showed that the silicon nitride microsieves can reflect the laser. Thus, the first layers of particles deposited on the membrane surface could be difficult to interpret as the technique sensitivity can be affected if the adjustment is not adapted. Therefore, before each experiment, the detection parameters are adjusted in order that the microsieve is invisible in the fluorescent mode.

3.1.2. Experiment reliability

Due to the high complexity of experimental runs and the duration of a full experiment, it was not possible to systematically repeat each of them. However, to check the reproducibility of the filtration runs, experiment A was duplicated. The difference between the two profiles of the permeate flow rate evolution remained less than a few percent (results not shown), so the analysis from single run experiments were considered to be significant.

The accuracy and the limits of the microscopy technique were investigated at the particle level and at the cake level. The resolution limit of CLSM: δ_x , δ_y , and δ_z in the x , y , and z directions, respectively, can be estimated taking into account the excitation source wavelength λ (nm), the numerical aperture of the objective lens (N.A.) and the refraction index of the medium, n [17]. For the cake characterization, $\times 10$, $\times 40$ and $\times 63$ objectives were used with 0.3, 0.8 and 0.9 numerical apertures, respectively. The excitation source wavelengths were 468 nm and 542 nm for the green and the red particles, respectively. The subsequent theoretical resolution limits are reported in Table 4. As the microsieves were only observed in the xy directions, the 0.8 μm pores were well resolved. Concerning the cake, only the particles separated by distances larger than these resolution limits could be resolved. These are the main limitations of CLSM.

Even though cake characterization by CLSM is a very promising technique, the quality of the results is drastically influenced by the ability of the laser to penetrate the deposit. The main relevant parameters are sample transparency and laser diffraction [3]. Furthermore, both the sensitivity and the resolution of the detection diminish with cake's increasing depth, as less emitted light reaches the detector [17]. That can affect the accuracy of cake characterization. To avoid this drawback, in the present work, the cake was built up layer by layer by successive injections of the suspension. The concentration of each injection was chosen in a way that the thickness of subsequent cake layer due to this injection was always lower than the laser penetration limit length.

Moreover, we take advantage of these particular experimental conditions to scan accurately with the CLSM each new cake layer built after each injection.

3.2. Filtration performances of the microsieve

The contact angles were measured before and after wetting treatment. The static contact angle decreased from 75.32 ± 0.28 to 22.58 ± 0.04 and from 82.66 ± 0.32 to 33.40 ± 0.13 for the $2 \mu\text{m}$ and $0.8 \mu\text{m}$ microsieve, respectively. The effect of treatment on the contact angle values confirms the relevance of the wetting treatment in the working conditions of microsieve as previously described by Gironès et al. [27]. To assess the wetting efficiency, the number of totally open pores, i.e. activated pores, N_1 , is evaluated, assuming that open pores contribute equally to the total flow rate.

The fraction of open pores (α_0) compared to the constructor data, N_0 can then be defined as

$$\alpha_0 = \frac{N_1}{N_0} \tag{10}$$

In a first simplified approach, the flow is assumed to be fully developed in the whole pore length; the Hagen–Poiseuille equation can, then, be applied:

$$N_1 = \frac{8Q_0\mu L}{\pi r^4 \Delta P_0} \tag{11}$$

where ΔP_0 and Q_0 are respectively, the pressure drop and the flow rate measured at the beginning of the filtration run with ultrapure water, μ the dynamic viscosity of the fluid (Pa s), L and r are the pore length (m) and radius (m), respectively.

However, the Hagen–Poiseuille equation assumes that the pore radius is lower than the pore length. Actually, that is not the case of the microsieves ($L=0.9 \mu\text{m}$). Accordingly, the flow has to be more rigorously calculated. Considering circular pores with finite thickness (L) and diameter (d) [33]:

$$Q_0 = \frac{d^3 N_1 \Delta P_0}{24 \mu} \left(1 + \frac{16L}{3\pi d}\right)^{-1} (1 - f(\epsilon_m))^{-1} \tag{12}$$

where ϵ_m represents the microsieve porosity.

Table 5
Fraction of open pores, α_0 , for the wetted microsieves.

Sample	Hagen–Poiseuille equation	Thin wall model
Experiment A	0.13 ± 0.01	0.22
Experiment B	0.10 ± 0.02	0.15
Experiment C	0.22 ± 0.02	0.34

The porosity function $f(\epsilon)$ is described as

$$f(\epsilon) = \sum_{i=1}^3 a_i \epsilon^{(2i+1)/2} \tag{13}$$

where $a_1=0.894$, $a_2=0.111$ and $a_3=0.066$ [34].

The first term in Eq. (12) stands for the resistance of the pore in an infinitely thin membrane. The second one denotes a correction for a finite wall correction and the final term corrects for the synergetic effect pores on a membrane with a porosity ϵ_m [33].

Results reported in Table 5 exhibit very low value for the fraction of open pores. This would probably influence the deposit of the first particle layer.

3.3. Cake build-up

The first assumption when using a characterization technique at a microscopic scale is that the membrane segment scrutinized is representative of the whole membrane. Indeed, at present, no observation tool can monitor *in situ*, at real time and at the particle level the cake formation on the whole membrane area. Therefore, since the selected segment is supposed to represent what happens on the whole membrane surface, it is crucial to construct a cake as homogeneous as possible all along all the filtration stripes. For instance, Mendret et al. have reported a non-uniform thickness profile along a 28 cm flat membrane, showing that the deposit was thicker at the extremities due to wall effects [7]. Uniform distribution of the cake over the membrane after a certain time of filtration was previously demonstrated thanks to numerical simulations performed on the geometry of the present filtration chamber [31]. These numerical results were fortunately confirmed experimentally in the present work.

Two types of particle cakes could be macroscopically analyzed using a large observation area with the $\times 10$ objective (Fig. 3). Particle deposition seems to be homogeneous all over the observed filtration field. Moreover, particles reach the membrane one by one, i.e. there is no aggregation in the fluid flow. In addition, no rearrangement was observed in the cake. After a certain amount of particles was deposited on the membrane, a rather uniform cake layer was formed on top of the filtrating stripes and the deposit appeared to be homogenous.

3.3.1. Effect of pore size on pore blocking

Particle deposition leads to an additional resistance for filtration. In an attempt to better understand fouling mechanisms and subsequent progressive permeability reduction of the membrane due to particle accumulation, the construction of the very first particle layers on the membrane were studied by injecting low concentration suspensions of polystyrene microspheres. Two microsieves with different pore size and pore pitch were used to visualize the effects of membrane

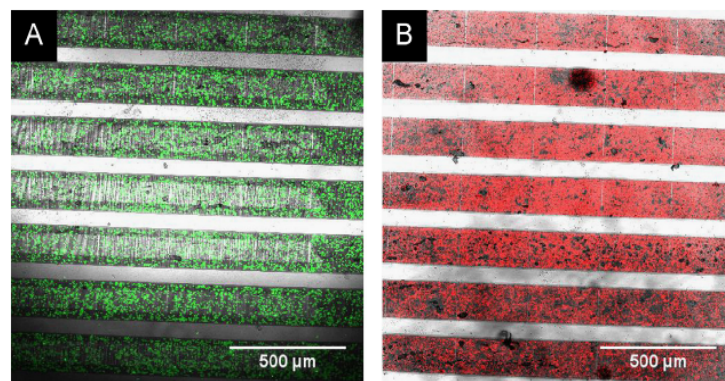


Fig. 3. Composite images of microfiltration cake formed by $4.8 \mu\text{m}$ ($15 \mu\text{g}$) and $1 \mu\text{m}$ ($3 \mu\text{g}$) particles suspension on $2 \mu\text{m}$ (A) and $0.8 \mu\text{m}$ (B) pore size microsieves, respectively (objective: $\times 10$).

properties in particle deposition. Membrane fouling is followed by monitoring the increase of transmembrane pressure. One can see in Fig. 4 that permeability reduction, I_p^* , sharply decreases as a function of particle mass deposited, M_c , during the first injection steps and, then, smoothly diminishes during the next injections. Indeed, in the very first filtration step, fouling is caused by pore blocking due to the deposition of the microspheres on some pores of the membrane. As these pores become completely closed, the permeability reduction is rapid. Once the first particle layer is formed, the cake progressively builds in the form of multilayers of particles whose morphology seems to be homogeneous and the associated permeability reduction is slower. It can also be noticed that the 0.8 μm pore diameter micro-sieve shows a lower permeability reduction in the very first filtration step. Now let us carefully look at the position of the first particles deposited at the membrane surface. This could help us to better understand not only the kinetics of cake building according to permeability reduction but also the surprising difference between permeability reduction curves for the two pore diameters. As can be seen in Figs. 5 and 6, the first particles deposited seem to be always perfectly centered over one pore (red circles) which means that they follow the flow streamlines until they make contact with the micro-sieve due to direct interception. The contact point is necessary close to

one pore since each flow streamline passes through one pore. Recall that both particles and membrane are negatively charged (see Sections 2.2 and 2.3). Then, they experience repulsive interactions that prevent particles to be captured by the solid part of the membrane surface. Thus, the first particles arriving at the membrane reach their final stable position when they are perfectly centered over one pore. In the following, we will consider that the pore blocked by a particle becomes completely closed, i.e. the fluid can no longer flow through this pore. Furthermore, the surrounding pores are protected by the aforementioned particles deposited. Indeed, no other particle of the same size can snap to these pores. The number of surrounding pores protected depends on the pore diameter and pitch of the micro-sieve. Accordingly, the organization of the first arriving particles mainly depends on the geometrical properties of the micro-sieve (pore size, pitch and pore arrangement). This is clearly exemplified in the schemes B, C and D of Figs. 5 and 6. As illustrated, three types of compact microsphere arrangements can be considered for the micro-sieves in use in these experiments (0.8 μm or 2 μm pore size). Then, the residual fraction of open pores after the deposition of the first particles, named α_1 , can be theoretically calculated using these schematic representations (Table 6). It should be noticed that the fraction of pores remaining open is always lower for 2 μm micro-sieve than for 0.8 μm micro-sieve which is confirmed by the CLSM observations. This can explain the difference between the two curves of permeability reduction vs. mass deposited plotted in Fig. 4, especially at the beginning of the filtration run.

Obviously, this approach is a simplified representation of what could really happen during the construction of the first layer of microspheres on the membrane. Indeed, CLSM observations show that some particles are not intercepted by a pore but by particles already deposited, even if the complete packing of the first layer is not achieved. However, a link between the observation at the local scale (CLSM images) and the measurements at the macroscopic scale (permeability reduction) is made. Indeed, after the deposition of a similar amount of particle (30 μg and 26 μg on the 2 μm and 0.8 μm micro-sieves, respectively) the permeability reduction is about 0.8 and 0.5 respectively for 2 μm and 0.8 μm micro-sieves, which probably corresponds to the direct pore blockage.

In order to study the behavior of the next particles arriving after the very first layer is built, we now analyze the organization of the

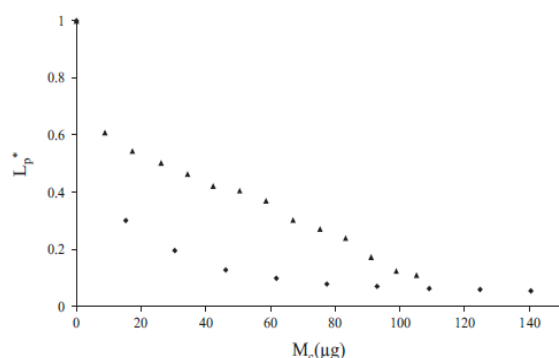


Fig. 4. Fouling caused during the dead end microfiltration of 4.8 μm microspheres on 0.8 μm (\blacktriangle) and 2 μm (\star) pores diameter micro-sieves: permeability reduction vs. cake mass.

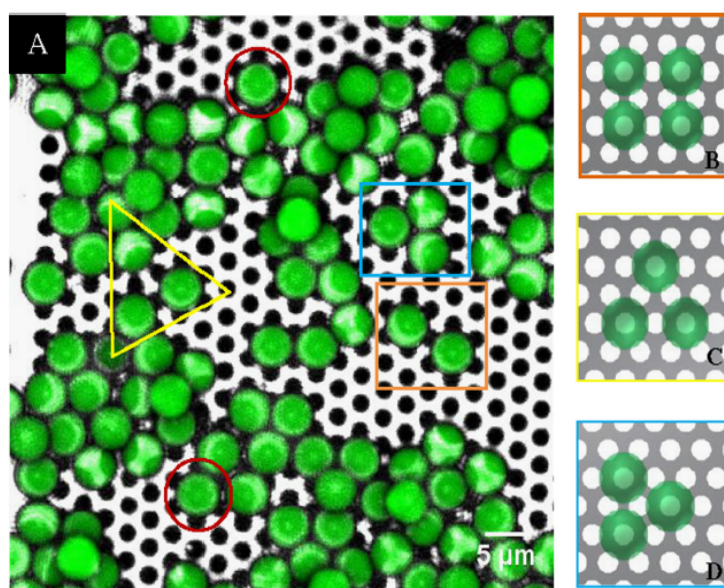


Fig. 5. Composite image of a 2 μm pore size micro-sieve (A) fouled with 4.8 μm particle (objective $\times 40$, zoom 6) and its schematic representations (B–D). (For interpretation of the references to color in this figure, the reader is referred to the web version of this article.)

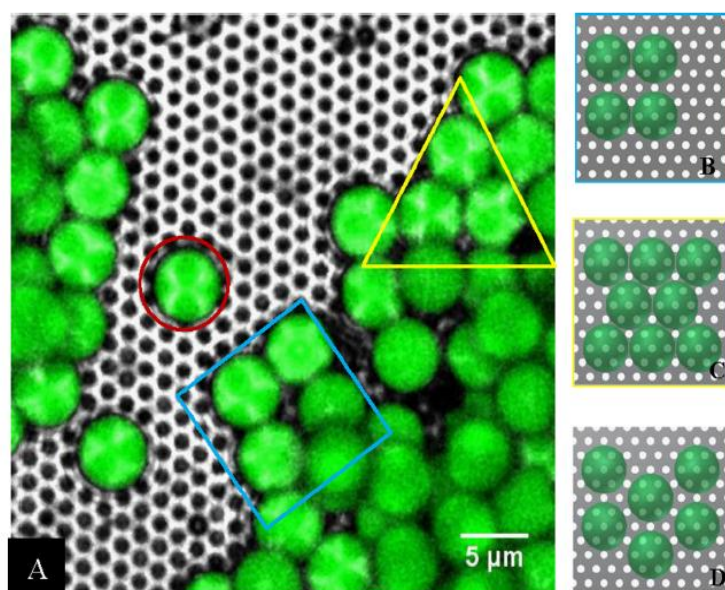


Fig. 6. Composite image of a 0.8 μm pore size microsieve (A) fouled with 4.8 μm particle (objective ×63, zoom 6) and its schematic representations (B–D). (For interpretation of the references to color in this figure, the reader is referred to the web version of this article.)

Table 6
Theoretical fraction of open pores after a monolayer particle deposition.

Schematic representations	Experiment A			Experiment B		
	Fig. 5B	Fig. 5C	Fig. 5D	Fig. 6B	Fig. 6C	Fig. 6D
α_1	0.75	0.75	0.66	0.92	0.89	0.92

following layers of the cake. To this end, we firstly deposited particles that are artificially colored in red. The following ones are kept in green, their original color. As shown in Figs. 7 and 8, the green particles arrangement and subsequent cake morphology seem to be influenced by the organization of the first layer (in red). The second layer of particles appears to deposit in the space between the already deposited microspheres. This is a naturally stable position, exemplified by schemes B, C and D of Figs. 7 and 8. That can be simply explained by the repulsive interactions between negative charged particles. Such an arrangement was obtained by Gassara et al. from numerical simulations of particle accumulation on a filter based on DLVO interactions between particles [35]. Of course some green particles still take place directly at the membrane surface over pores not previously blocked by 'red' particles. At this stage of analysis, it can be stated that the part of the cake in contact with the membrane is less compact than the rest of the cake. Pioneer simulations of Schmitz et al. [22] based on empirical motion and capture rules have already shown that the cake could be divided into several regions: (i) the so called germination region that connects the membrane to the cake, (ii) a core region of high particle concentration and (iii) a superficial region, named capture region, where flowing particles are intercepted. This will be further verified from the calculation of the variations of fraction of the area occupied by the particles in each image along the z axis, α_z (Section 3.4).

3.3.2. Effect of particle size on pore blocking

In filtration processes, the permeability of a particle cake highly depends on cake porosity as well as size and shape of particles [24]. Besides, this is expressed by the well-known Karman Cozeny model that is widely used to calculate the permeability.

To investigate the effect of particle size on cake construction, suspensions of 1 μm and 4.8 μm diameter particle were filtered on 0.8 μm pore size microsieves. The comparison between the permeability reductions obtained in the two experiments is shown in Fig. 9. As the particle size is in the same range as the membrane pore size in the case of 1 μm particles, the microspheres can block the pores of the membrane without protecting the neighboring ones, Fig. 10A (yellow circles). This mechanism, represented in Fig. 10B, probably explains the dramatic L_p^* decline after the first injection (84%). On the contrary, recall that deposited 4.8 μm particles (the biggest ones) block one pore and keep the surrounding pores opened as already explained in the previous section. However, in the case of the 1 μm particles, some bridges formed over open pores (blue circles), prevent some pores from being blocked and subsequently preserve a residual permeability (schemed in Fig. 10C). As explained by Wakeman, cake formation is achieved by the combination of two mechanisms, pore blocking and bridging [36]. A bridge of particles built over the pore entrance is basically an arch stabilized by the flow environment around a pore entrance. Indeed, as the experiments are performed in dead end filtration mode at a constant flow rate, no additional external forces can destabilize it. The cake formed after the next injection of 1 μm particles (the smallest ones) can be seen in Fig. 10C. During this second filtration step, some remaining open pores are blocked by newly arriving particles while other bridges are built. Moreover, a number of coming particles are intercepted by the previously formed bridges. Accordingly, permeability reduction slightly decreases as most of the pores are blocked during the first filtration step (first particle injection). We could, thus, expect that the permeability reduction will become weaker as far as filtration proceeds.

3.4. Cake morphology

3.4.1. Effect of pore size

The evolution of the apparent fraction of the microsieve filtration area covered by particles, α_c , and the mean cake thickness, T_d , for the 0.8 μm and 2 μm microsieves are presented in Fig. 11. The microsieve coverage as well as the cake thickness rapidly increase at the beginning of filtration and, then, tend to

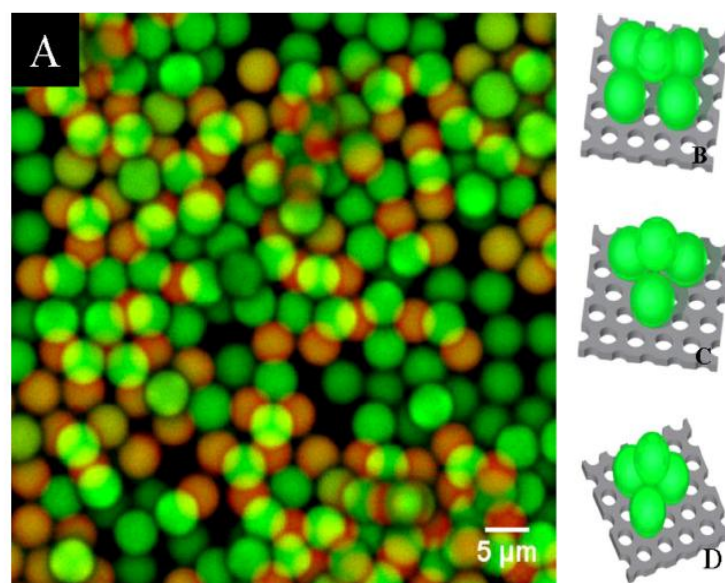


Fig. 7. Composite image of first arriving (red) and following (green) $4.8 \mu\text{m}$ particles on a $2 \mu\text{m}$ pore size microsieve (A) (objective $\times 40$, zoom 6) and its schematic representations (B–D). (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

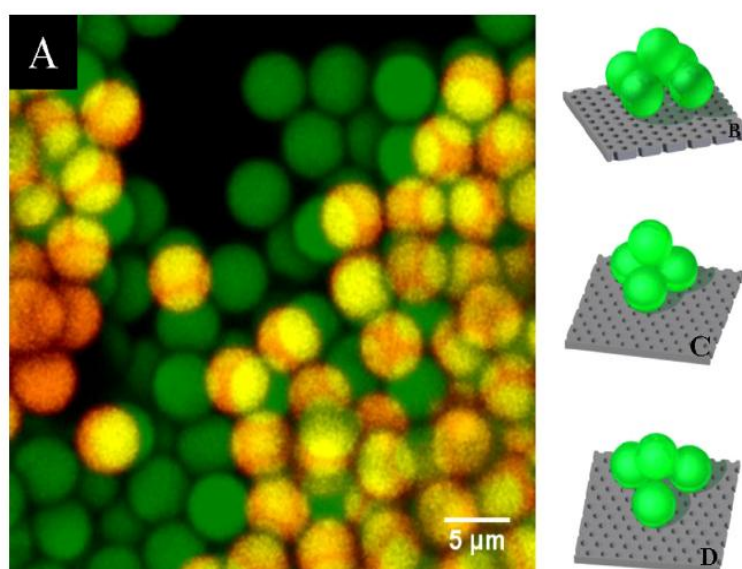


Fig. 8. Composite image of first arriving (red) and following (green) $4.8 \mu\text{m}$ particles on a $0.8 \mu\text{m}$ pore size microsieve (A) (objective $\times 63$, zoom 6) and its schematic representations (B–D). (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

asymptotic values for higher cake masses deposited. An accurate analysis of the particle deposition scenario is illustrated by successive images of particle cake formation in Figs. 12 and 13. The coming particles deposited progressively in the filtrating stripes of the microsieve until the whole filtrating fields were covered. Indeed, particles were transported by fluid flow towards the pores of the microsieve as already explained in Sections 3.3.1 and 3.3.2. Once the filtration area was totally covered by a multi-layer cake, it can be noticed that some particles also deposited between the filtration stripes, i.e. in the non-filtrating surface of the microsieve, close to the stripes. The spaces between these stripes began to shrink progressively and the microsieve coverage, relative to the membrane filtration area, exceeded 1 (about 1.1) as reported in Fig. 11. The particles were still transported toward the filtrating stripes but they preferentially came at the edges of the

stripes at the place where the hydraulic resistance was the weakest. They came in contact with already aggregated particles and, then, were captured and accumulated in the non-filtrating surface. At this step of filtration, the mean thickness (Fig. 11) as well as the associated permeability reduction (Fig. 4) reached an asymptotic value. Indeed, as the particles deposited no more on top of the cake but on its edges, the thickness remained apparently constant. Consequently, the pore size did not seem to have any effect neither on the microsieve apparent coverage nor on the mean cake thickness.

A careful examination of the cross-sections (yz planes) of the cake (Figs. 12 and 13) showed that the cake thickness was roughly uniform when the particles were deposit only in the filtrating stripes (cases A and B). However, the shape of the cake surface tended to swell when particles were also accumulating in the

non-filtrating region at the edge of the stripes. Finally, we also noted that the cake seemed to be homogeneous. This will be discussed in the next section.

3.4.2. Estimation of cake porosity

For the time being, it is still unrealistic to accurately calculate the cake porosity directly from image processing results. Indeed, the resolution of CLSM images in terms of fluorescence level variations remains low and it is a hard task to threshold the images. Nevertheless, using image processing, we have proposed a direct method to measure the fraction of the area occupied by the particles in each image along the z axis, named α_s . The corresponding cake porosity, expressed as $\epsilon_D = 1 - \alpha_s$ can, then, be calculated and compared with a cake porosity value determined using a classical indirect method using cake thickness and cake mass.

3.4.2.1. Indirect method. We have previously discussed the shape and the location of the cake at the end of the filtration runs (Section 3.4.1). In particular, we have claimed that the cake spread out over the non-filtrating region, between the filtrating stripes of the microsieve. Moreover, the shape of cake surface tends to round up. Therefore, we should determine cake porosity before the step of cake spreading. We, thus, assume that the top cake surface was no longer rounded but flat. Subsequently, the cake is considered as

a uniform parallelepiped all over the filtrating stripes. Then, the total volume of the cake is $S_0 T_{d100}$ where T_{d100} is the cake thickness when the fraction of microsieve coverage reaches 1. Experimentally, this corresponds to cake masses of 83 μg and 91 μg on the 0.8 μm and 2 μm microsieves, respectively. Cake porosity, named ϵ_i , is calculated from cake thickness and corresponding cake mass as

$$\epsilon_i = 1 - \frac{M_{C100}}{S_{f6} T_{d100} \rho_C} \tag{14}$$

where M_{C100} is the cake mass (kg) at the fraction of microsieve coverage equal to 1 and ρ_C the particles density (kg m^{-3}). This method was also reported by Vayas et al. [4]. Cake thickness is generally defined as the maximum thickness of the cake, i.e. the z -coordinate of the higher fluorescent pixel detected. Here, we calculate ϵ_i using the maximum thickness of the cake as well as mean cake thickness T_d given by Eq. (5). Results reported in Table 7, seem to be qualitatively consistent according to the assumptions discussed in previous section. They reveal that identical suspensions lead to cakes of roughly the same morphology except in the first cake layer as discussed in Section 3.3. Moreover, using mean cake thickness for the calculation seems to give porosity values qualitatively in good agreement with CLSM images at the particle scale (zoom 6) revealing quite compact deposits. However, this easy method is obviously expected to be imprecise, since significant

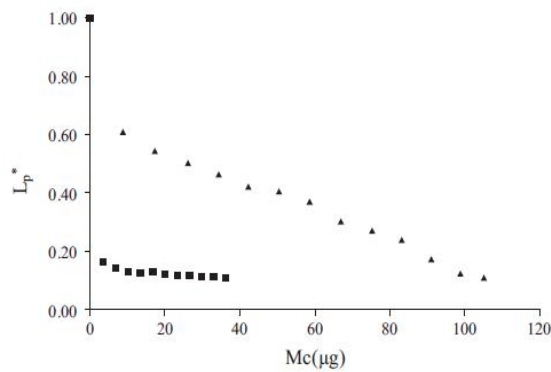


Fig. 9. Fouling caused during the dead end microfiltration of 1 μm (■) and 4.8 μm (▲) microspheres on 0.8 μm pores diameter microsieves: permeability reduction vs. cake mass.

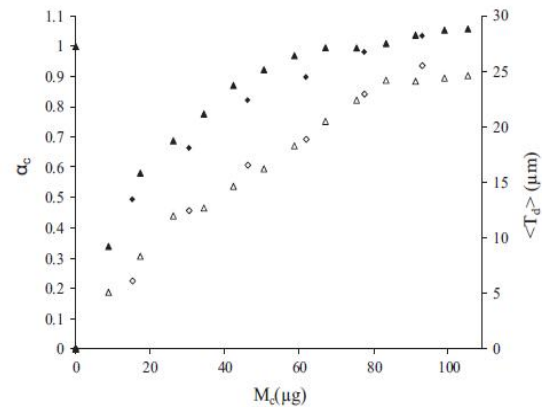


Fig. 11. Evolution of the apparent fraction of the microsieve (α_s) and the mean thickness ($\langle T_d \rangle$), respectively, of the 0.8 μm (▲, △) and 2 μm (◆, ◇) microsieves fouled by 4.8 μm particles vs. cake mass.

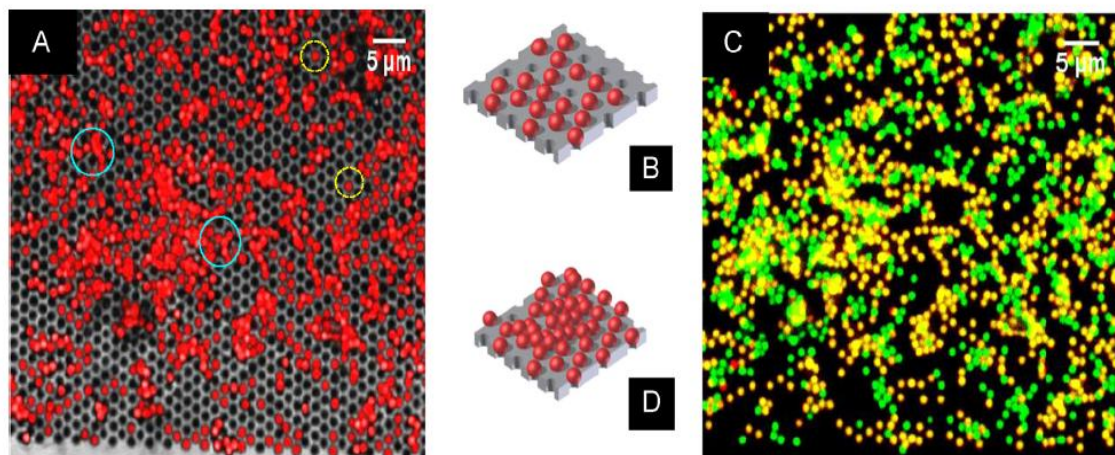


Fig. 10. Composite image of a 0.8 μm pore size microsieve fouled with 3 μg particle (A) and 7 μg of 1 μm particles (C) (first coming in yellow and the following in green) (objective $\times 63$, zoom 6) and its schematic representations (B and D), respectively. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

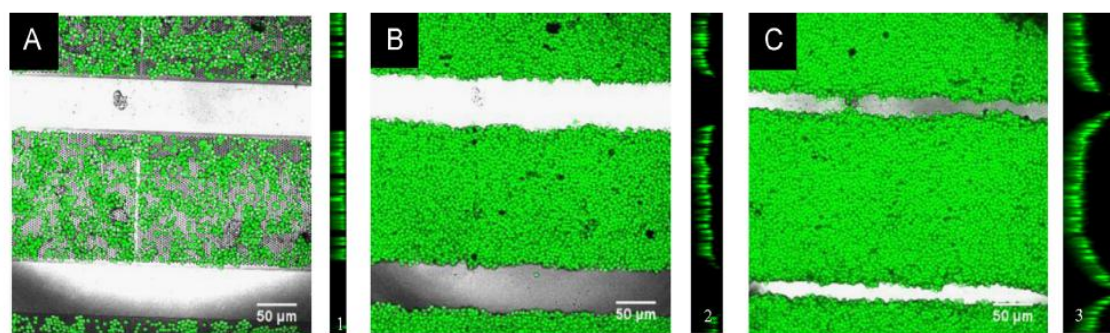


Fig. 12. Series of composite images of microfiltration cake formed by the 4.8 μm microspheres suspension at cake mass (A) 15 μg, (B) 77 μg, (C) 203 μg on 2 μm microsieve (objective ×40, zoom 1).

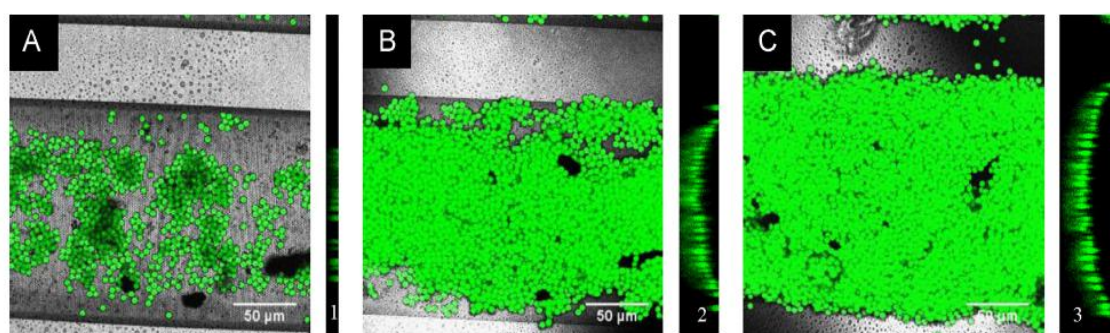


Fig. 13. Series of composite images of microfiltration cake formed by the 4.8 μm microspheres suspension at cake mass (A) 9 μg, (B) 34 μg, (c) 105 μg on 0.8 μm microsieve (objective ×63, zoom 1).

Table 7
Effect of pore size on cake porosity.

	0.8 μm microsieve		2 μm microsieve	
	T_d (μm)=24	T_{100max} (μm)=47	T_d (μm)=23	T_{100max} (μm)=43
Cake porosity (ϵ_t)	0.49	0.74	0.41	0.68

errors could exist either in cake mass or cake thickness estimations. Moreover, it does not take into account either the particle size or the membrane characteristics. Additionally, the cake morphology is assumed to be uniform. However, many authors found similarly that the porosity could change greatly along the cake thickness [3].

3.4.2.2. *Direct method.* As already mentioned in Section 3.3.1, and also reported by other authors, the porosity is not homogenous along the z axis. The observation of the cake made by Marselina et al., showed that the fouling layer can be characterized into three different areas: stagnant, expanded and fluidized layers [37]. Microscopic examination of membrane cake cross-sections by Tarabara et al. revealed a stratified structure: a dense region of the colloidal deposit adjacent to the membrane with an abrupt transition to a much more porous layer near the membrane/suspension interface [38]. It, thus, appeared useful to estimate the porosity along the z axis, i.e. as a function of mean cake thickness. To this end, we exploit the stacks of images recorded after each filtration step at high magnification (objective ×63 or ×40, zoom 6). Firstly, let us look at the variations of the area occupied by the particles in each image along the z axis, named $\alpha_s(z)$ for experiments A and B (Fig. 14). Recall that only a superficial region of the cake (about two to three layers of particles) can be explored

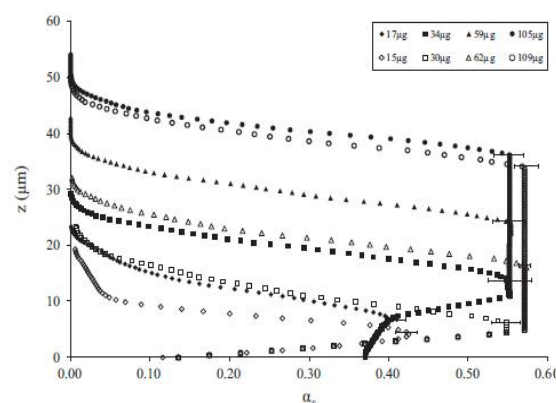


Fig. 14. Evolution of the fraction of the area occupied by the particles in each image along the z axis of the 0.8 μm (full symbols) and 2 μm (empty symbols) microsieves fouled by 4.8 μm particles vs. cake mass.

after each filtration step as laser penetration is limited. Thus, $\alpha_s(z)$ curves plotted in Fig. 14 are reconstructed from the mathematical envelop of all the $\alpha_{s_i}(z)$, $i=1, N_f$ curves associated to the N_f filtration steps, $\alpha_{s_i}(z)$ being proportional to the fluorescent signal. It is a consistent approximation to consider that there is no particle rearrangement as long as cake is growing. The shape of $\alpha_s(z)$ curves confirms that the cake includes three different regions: (i) a germination region in contact with the membrane of moderate particle concentration, (ii) a central high particle concentration region and (iii) a superficial region, named capture region, where flowing particles are intercepted. We notice that particle concentration in the germination region appears to be higher for 0.8 μm microsieve than for 2 μm microsieve. This is in agreement with the organization of the first particle layer shown in Figs. 5 and

6. On the contrary, the gap between α_5 values obtained for the two microsieves in the central region is not significant, according to the standard deviation (Fig. 14). This is still in agreement with the assumption of a compact arrangement of the particles. The shape of the curves associated with the capture region reflects that cake top surface is not smooth as some particles appeared higher than the others.

These results are in agreement with the pioneer theoretical works of Schmitz et al. [22] and those reported by Meng et al. [3].

Towards a better characterization of cake homogeneity, mean cake thickness, T_d , is plotted against $z_{max}(\alpha_5)$, according to the Schmitz et al. approach (Fig. 15). Two regions can be identified. In the first region, the exponent λ is higher than 1 (fractal dimension D_f is lower than Euclidian dimension D_e) meaning that the cake is not homogeneous. In the second region, the exponent λ is 1 (fractal dimension D_f equals Euclidian dimension D_e) meaning that the cake can be considered as homogeneous. Results do not depend on the microsieve pore diameter. Moreover, cake porosity at $T_D=24 \mu\text{m}$ is about 0.48. It is surprisingly very close to the value obtained with the indirect method using cake mass arguing that the whole analysis is coherent.

3.4.3. CLSM 3D reconstruction

As previously mentioned in the introduction part, one of the main advantages of the CLSM technique, compared to the other cake investigation methods, is to allow a 3D reconstruction of the cake fouling thanks to Image J 3D viewer. We have taken benefit from this reconstruction to analyze the shape of the deposit formed over the filtration stripes. In Fig. 16, two composite images made from the microsieve observation in bright field mode and the cake 3D reconstruction in fluorescence mode can be seen. It shows the topography of the cake formed on a 2 μm microsieve at different times of filtration associated with different masses of particles deposited. These representations are the most realistic views of the cake. It confirms the random distribution of the particles on the filtering stripes at the beginning of the run. At the

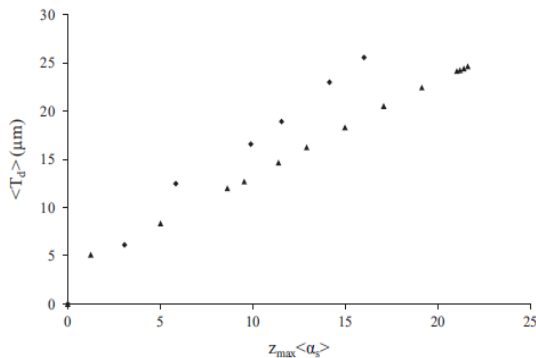


Fig. 15. The evolution of $\langle T_d \rangle$, vs. $z_{max}(\alpha_5)$, for the 0.8 μm (\blacktriangle) and 2 μm (\bullet) microsieves fouled by 4.8 μm particles.

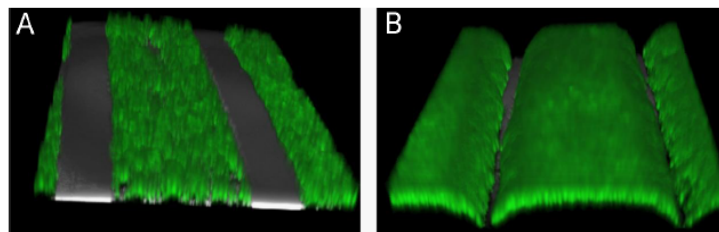


Fig. 16. Composite image of 3 D construction microfiltration cake formed by 4.8 μm particles suspension on 2 μm pore size microsieve at cake mass (A) 15 μg and (B) 266 μg (objective $\times 40$, zoom 1).

end of filtration, the shape of cake surface becomes rounded as already discussed in Section 3.4.1.

3.4.4. Effect of particle size

Now we are going to examine what happens during the filtration of the smallest particles (1 μm diameter). It is clear that it is a great challenge to make a quantitative analysis of CLSM images for this type of particles due to resolution limitations. Two main drawbacks were identified. Firstly, the number of particle layers to reach a cake thickness in the same order of magnitude than the one obtained with larger particles was too high to perform the experiment. The study was, thus, restricted to the same number of particle layers, i.e. a maximum cake thickness of about 15 μm . Secondly, the low value of active filtration surface area characterized by the fraction of open pores of the clean microsieve α_0 (Eq. (11) and Table 5) has a drastic impact on cake morphology.

We can see in the images of Fig. 17 that some small areas of the membrane remain perfectly clean while a multilayer cake is built elsewhere. It could be assumed that repulsive interactions of non-wetted zones could explain this observation. Accordingly, the apparent fraction of the microsieve filtration area covered by particles, α_c , remains lower than 1 even for the higher values of cake mass associated with particle multilayers (Fig. 18). However, it can be noticed that the profile variations of α_c and T_d as a function of cake mass are still the same: from a high increase at the beginning of filtration to a weaker increase. Finally, cake morphology can be examined from Fig. 19. Here, we take advantage of the thin thickness of the cake that can be entirely explored by the laser. Under these operating conditions, the new coming particles deposit in the regions previously identified: the germination, the central and the superficial regions of the cake. Particles progressively fill the free spaces of the cake. The α_5 curve which corresponds to the highest cake mass (plain circles) clearly reveals the existence of the three aforementioned regions. It can be seen that the associated value of α_5 for the central region is 0.58. This would give a porosity of 0.42. If we account for the high standard deviation of the results, it appears to be a rather consistent value in agreement with the usual porosity of the compact cakes formed by 4.8 μm particles.

4. Conclusion

In this study, an *in situ* method using CLSM to characterize step by step filtration cakes formed by monodisperse fluorescent particles was developed. The main advantages and present limitations of the technique were identified. Local observation of particles organization in the deposit was achieved at the particle scale. The influence of particle size and of geometrical characteristics of the microsieves (pore size and pore pitch) on the formation and the morphology of the cake were investigated for dead end microfiltration experiments.

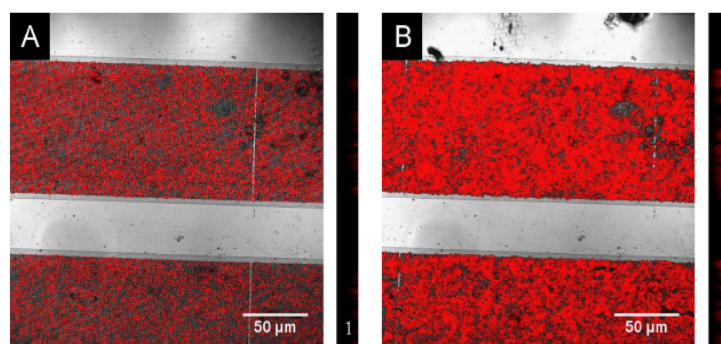


Fig. 17. Series of composite images of microfiltration cake formed by the 1 µm microspheres suspension at cake mass (A): 3.5 µg and (B): 36.2 µg on 0.8 µm microsieve (objective ×63, zoom 1).

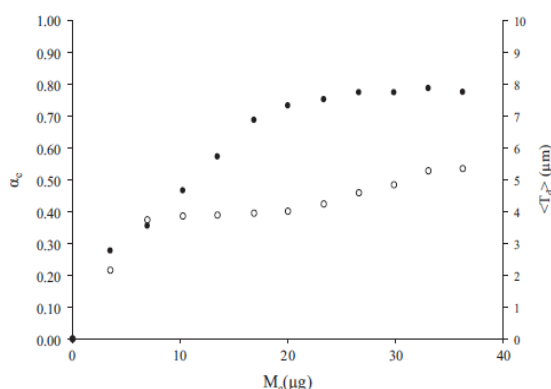


Fig. 18. Evolution of the apparent fraction of filtration area covered by particles (α_c) (●) and the mean thickness ($\langle T_c \rangle$) (○) of the 0.8 µm microsieve fouled by 1 µm particles vs. cake mass.

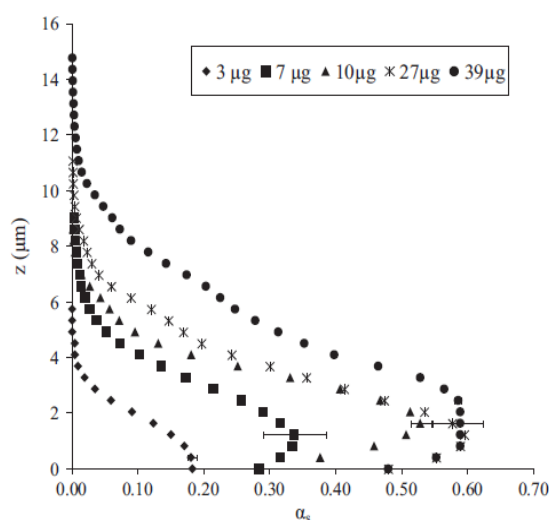


Fig. 19. Evolution of the fraction of the area occupied by the particles in each image along the z axis of the 0.8 µm microsieve fouled by 1 µm particles vs. cake mass.

During the very first step of cake formation, particles have appeared to preferentially deposit over pores. Subsequently, the geometrical ratio between particles size (1 µm and 4.8 µm) and microsieves pore diameter (0.8 and 2 µm pore sizes) modified the fraction of protected pores surrounding the one plugged. Every 1 µm microsphere can block only one pore of the membrane. However, after deposition, 4.8 µm particles protect all the surrounding pores on the 0.8 µm microsieve and only a fraction of these pores in the 2 µm microsieve case. This probably explains why the combination of larger particles and smaller pores microsieve exhibits the lowest permeability reduction. This finding could be helpful to optimize industrial membrane processes.

During the full cake formation, cake morphology is investigated in terms of microsieve coverage, thickness and porosity. Cake porosity was evaluated using two methods (i) indirect method using classic equation and (ii) a direct one based on image processing. The obtained results were consistent in comparison with filtration performance and variation of the pressure drop at a constant flow rate.

The study of the surface covered by particles along the cake thickness reveals the existence of the three aforementioned regions: germination region in contact with the membrane of moderate particle concentration, a central high particle concentration region and a superficial region, named capture region. The difference in pore size seems to have only an effect in the organization of the first deposited particles. However, the cakes formed are quite similar.

Nowadays, numerical simulation has become an essential tool for the design and optimization of industrial membrane processes.

Its main advantage is to reduce the number of costly experimental tests. Not only some key parameters such as cake permeability and thickness but also the fouling model should be known to perform accurate computations. The quantitative results obtained from the present study are expected to upgrade membrane filtration models. In future works, various issues will be addressed. Bidispersed fluorescent microspheres will be investigated. One of the objectives will be to better explore the organization of the particles and the formation of the first layer of cake suggested in the present paper when the two size particles are mixed.

Acknowledgments

The authors thank the 'Action Intégrée Franco-Tunisienne' program from Ministère des affaires étrangères et Européennes français et du ministère de l'Enseignement Supérieur, de la recherche Scientifique tunisien for its financial support.

They also thank Christophe ELLERO FROM LISBP, Cecile POUZET and Aurélie LE RU from FR3450 confocal platform (Auzeville France) for their technical support and Paul DURU from IMFT for his helpful discussions.

Nomenclature

α_c	apparent fraction of filtration area covered by particles
α_s	fraction of the area occupied by the particles in each image along the z axis
$\langle \alpha_s \rangle$	volume fraction of the cake
α_0	fraction of open pores
ϵ	cake porosity
ϵ_D	cake porosity determined by image processing
ϵ_I	cake porosity determined by indirect method
ϵ_m	microsieve porosity
N_p	the number of particles in the cake
B	constant
D_f	fractal dimension
D_e	euclidian dimension
N_1	number of totally open pores
N_0	number of microsieve pores
N.A.	numerical aperture of the objective lens
n	refraction index of the medium
θ	static contact angle (°)
ρ_c	particles density (kg m^{-3})
λ	excitation source wavelength (nm)
ΔP_0	pressure drop measured at the beginning of the filtration run with ultrapure water (Pa)
μ	liquid viscosity (Pa s)
$\delta_x, \delta_y, \delta_z$	resolution limit of CLSM in the x, y, and z directions, respectively (μm)
d	pore diameter (m)
L_p^c	water permeability at a given time of the filtration experiment ($\text{L h}^{-1} \text{m}^{-2} \text{bar}^{-1}$)
L_p^0	water permeability of the clean microsieve ($\text{L h}^{-1} \text{m}^{-2} \text{bar}^{-1}$)
L_p^*	permeability reduction
L	pore length (m)
M_C	cake mass (kg)
M_{C100}	cake mass at microsieve coverage equal 1 (kg)
Q_0	flow rate measured at the beginning of the filtration run with ultrapure water ($\text{m}^3 \text{s}^{-1}$)
r	pore radius (m)
S_c	apparent area of the surface occupied by the cake on the image (μm^2)
S_{f1}	filtration area in the observed image at zoom 1 (μm^2)
S_{f6}	filtration area in the observed image at zoom 6 (μm^2)
S_0	area of the filtration region (m^2)
$S(z)$	area of the surface occupied by the particles at each image of the stack
$\langle T_d \rangle$	mean cake thickness (μm)
T_{d100}	cake thickness when the microsieve coverage equals 1
z_{max}	the point along the z axis in which the highest particle in the cake is spotted (μm)
V_p	volume of one particle (m^3)

References

[1] W. Zhang, K.E. Thompson, A.H. Reed, L. Beenken, Relationship between packing structure and porosity in fixed beds of equilateral cylindrical particles, *Chem. Eng. Sci.* 61 (2006) 8060–8074.
 [2] M. Nystrom, M. Manttari, *Introduction: Opportunities and Challenges of Real Time Monitoring on Membrane Processes*, Wiley-VCH (2009) 1–8.

[3] F. Meng, B. Liao, S. Liang, F. Yang, H. Zhang, L. Song, Morphological visualization, compositional characterization and microbiological identification of membrane fouling in membrane bioreactors (MBRs), *J. Membr. Sci.* 361 (2010) 1–14.
 [4] H.K. Vyas, A.J. Mawson, R.J. Bennett, A.D. Marshall, A new method for estimating cake height and porosity during crossflow filtration of particulate suspensions, *J. Membr. Sci.* 176 (2000) 113–119.
 [5] K. Damak, A. Ayadi, P. Schmitz, B. Zeghmami, Modeling of crossflow membrane separation processes under laminar flow conditions in tubular membrane Desalination 168 (2004) 231–239.
 [6] L.M. Gowman, C.R. Ethier, Concentration and concentration gradient measurements in an ultrafiltration concentration polarization layer Part I: a laser-based refractometric experimental technique, *J. Membr. Sci.* 131 (1997) 95–105.
 [7] J. Mendret, C. Guigui, P. Schmitz, C. Cabassud, An optical method for in situ characterization of fouling during filtration, *Aiche J.* 53 (2007) 2265–2274.
 [8] I.S. Ngene, R.G.H. Lammertink, M. Wessling, W.G.J. Van der Meer, Visual characterization of fouling with bidisperse solution, *J. Membr. Sci.* 368 (2011) 110–115.
 [9] J. Li, R.D. Sanderson, E.P. Jacobs, Non-invasive visualization of the fouling of microfiltration membranes by ultrasonic time-domain reflectometry, *J. Membr. Sci.* (2002) 17–29.
 [10] B. Fan, X. Huang, Characteristics of a self-forming dynamic membrane coupled with a bioreactor for municipal wastewater treatment, *Environ. Sci. Technol.* 36 (2002) 5245–5251.
 [11] R. Bowen, W.N. Hilal, R.W. Lovitt, C. Wright, A new technique for membrane characterisation: direct measurement of the force of adhesion of a single particle using an atomic force microscope, *J. Membr. Sci.* 139 (1998) 269–274.
 [12] V. Chen, Non-invasive observation of synthetic membrane processes? A review of methods, *J. Membr. Sci.* 241 (2004) 23–44.
 [13] Y. Zhang, A. Fane, A. Law, Critical flux and particle deposition of bidisperse suspensions during crossflow microfiltration, *J. Membr. Sci.* 282 (2006) 189–197.
 [14] S.T. Kang, A. Subramani, E. Hoek, M.A. Deshusses, M.R. Matsumoto, Direct observation of biofouling in cross-flow microfiltration: mechanisms of deposition and release, *J. Membr. Sci.* 244 (2004) 151–165.
 [15] P. Le-Clech, Y. Marselina, Y. Ye, R.M. Stuetz, V. Chen, Visualisation of polysaccharide fouling on microporous membrane using different characterisation techniques, *J. Membr. Sci.* 290 (2007) 36–45.
 [16] J. Altmann, S. Ripperger, Particle deposition and layer formation at the crossflow microfiltration, *J. Membr. Sci.* 124 (1997) 119–128.
 [17] M. Marroquin, T. Bruce, J. Pellegrino, S.R. Wickramasinghe, S.M. Husson, Characterization of asymmetry in microporous membranes by cross-sectional confocal laser scanning microscopy, *J. Membr. Sci.* 379 (2011) 504–515.
 [18] M. Ferrando, A. Rzek, M. Zator, F. Lopez, C. Guell, An approach to membrane fouling characterization by confocal scanning laser microscopy, *J. Membr. Sci.* 250 (2005) 283–293.
 [19] S. Beaufort, S. Alfenore, C. Lafforgue, Use of fluorescent microorganisms to perform in vivo and in situ local characterization of microbial deposits, *J. Membr. Sci.* 369 (2011) 30–39.
 [20] B.K. Hwang, C.H. Lee, I.S. Chang, A. Drews, R. Field, Membrane bioreactor: TMP rise and characterization of bio-cake structure using CLSM-image analysis, *J. Membr. Sci.* 419–420 (2012) 33–41.
 [21] D. Spettmann, S. Eppmann, H.C. Flemming, J. Wingender, Visualization of membrane cleaning using confocal laser scanning microscopy, *Desalination* 224 (2008) 195–200.
 [22] P. Schmitz, B. Wandelt, D. Houi, M. Hildenbrand, Particle aggregation at the membrane surface in crossflow microfiltration, *J. Membr. Sci.* 84 (1993) 171–183.
 [23] C.H. Lee, P.K. Park, W.N. Lee, B.K. Hwang, S.H. Hong, K.M. Yeon, H.S. Oh, I.S. Chang, Correlation of biofouling with the bio-cake architecture in an MBR, *Desalination* 231 (2008) 115–123.
 [24] P.K. Park, C.H. Lee, S. Lee, Analysis of cake porosity in a coagulation-microfiltration using confocal laser scanning microscope, *Desalination* 200 (2006) 302–304.
 [25] D. Hughes, U.K. Tirlapur, R. Field, Z. Cui, In situ 3D characterization of membrane fouling by yeast suspensions using two-photon femtosecond near infrared non-linear optical imaging, *J. Membr. Sci.* 280 (2006) 124–133.
 [26] C. Ning Koh, T. Wintgens, T. Melin, F. Pronk, Microfiltration with silicon nitride microsieves and high frequency backpulsing, *Desalination* 224 (2008) 88–97.
 [27] M. Gironès, Z. Borneman, R.G.H. Lammertink, M. Wessling, The role of wetting on the water flux performance of microsieve membranes, *J. Membr. Sci.* 259 (2005) 55–64.
 [28] B. Kirby, E.F. Hasselbrink, Zeta potential of microfluidic substrates: 2. Data for polymers, *Electrophoresis* 25 (2004) 203–213.
 [29] J. Lin, D. Bourrier, M. Dilhan, P. Duru, Particle deposition onto a microsieve, *Phys. Fluids* 21 (2009) 073–301.
 [30] I. Sokolov, Q.K. Ong, H. Shodiev, N. Chechik, D. James, M. Oliver, AFM study of forces between silica, silicon nitride and polyurethane pads, *J. Colloid Interface Sci.* 300 (2006) 475–481.
 [31] I. Ben Hassan, C. Lafforgue, C. Ellero, A. Ayadi, P. Schmitz, Coupling of local visualization and numerical approach for particle microfiltration optimization, *Microsyst. Technol.* (2013) 1906–1909.
 [32] I. Ben Hassan, M. Ennouri, C. Lafforgue, P. Schmitz, A. Ayadi, Experimental study of membrane fouling during crossflow microfiltration of yeast and

- bacteria suspensions: towards an analysis at the microscopic level, *Membranes* 3 (2013) 44–68.
- [33] S. Kuiper, C.J.M. Van Rijn, W. Nijdam, M.C. Elwenspoek, Development and applications of very high flux microfiltration membranes. *J. Membr. Sci.* 150 (1998) 1–8.
- [34] C.J.M. Van Rijn, Microfiltration membrane sieve with silicon micromachining for industrial and biomedical applications, in: *IEEE Proceedings*, 1995, pp. 83–87.
- [35] D. Gassara, P. Schmitz, A. Ayadi, Numerical simulation of particle accumulation at the membrane surface in microfiltration, *Int. Rev. Mech. Eng.* 6 (2012) 485.
- [36] R. Wakeman, The influence of particle properties on filtration, *Sep. Purif. Technol.* 58 (2007) 234–241.
- [37] Y. Marselina, P. Le-Clech, R. Stuetz, V. Chen, Detailed characterisation of fouling deposition and removal on a hollow fibre membrane by direct observation technique, *Desalination* 231 (2008) 1–3.
- [38] V. Tarabara, Effect of hydrodynamics and solution ionic strength on permeate flux in cross-flow filtration: direct experimental observation of filter cake cross-sections, *J. Membr. Sci.* 241 (2004) 65–78.

V.2 Caractérisation tridimensionnelle, « *in situ* », des dépôts de particules inertes bidispersées

On s'intéresse ici à l'étude de dépôts formés lors de la filtration d'un mélange des deux tailles de particules précédemment étudiées. Afin de caractériser la morphologie interne du dépôt et en particulier le rôle respectif de chaque type de particules dans sa construction, l'analyse « *in situ* » par microscopie confocale est effectuée avec deux lasers de longueurs d'onde d'émission éloignées permettant l'excitation séparée de la fluorescence des deux types de particules. La caractérisation tridimensionnelle « *in situ* » du dépôt formé sur la membrane a été réalisée par microscopie confocale en utilisant la même la chambre de filtration.

Les essais de microfiltration des particules inertes bidispersées sont conduits en mode frontal et en régime laminaire. Les microsphères en polystyrène fluorescent de 4,8 μm et 1 μm de diamètre sont filtrées sur les microsieves de 0,8 μm de taille de pores.

L'étude confirme que les grosses particules, qui se déposent préférentiellement de façon centrée sur les pores lors de la formation de la première couche de dépôt, permettent de maintenir un débit élevé au cours de la filtration. En effet, certains pores restent toujours ouverts et permettent, ainsi, le passage facilité du fluide. De plus, les petites particules ont tendance à former majoritairement des agrégats autour des grosses particules puisqu'elles sont transportées par le fluide qui se dirige vers les pores maintenus ouverts autour des grosses particules déposées. Par ailleurs, les petites particules bouchent également des pores isolés en s'y déposant de façon centrée.

L'étude de la morphologie des dépôts épais formés par un mélange de particules bidispersées montre que les trois régions distinctes (germination, centrale et superficielle) mises en évidence au §I.1 existent toujours.

L'essai mené en filtrant, successivement, des grosses particules puis des petites a confirmé l'idée largement suggérée dans la littérature de mettre en place par ce biais une membrane secondaire constituée d'une précouche de grosses particules déposées pour améliorer les performances de filtration ultérieure et faciliter le nettoyage.

Ce travail a été soumis au journal « Journal of Membrane Science » le 8 Février 2014 :

***In situ* 3D characterization of bidispersed spherical particle cakes using confocal laser scanning microscopy**

Ben Hassan Ines^{1,2}, Lafforgue Christine¹, Ayadi Abdelmoneim², Schmitz Philippe¹

¹Université de Toulouse; INSA, UPS, INP; LISBP, 135 Avenue de Rangueil, F-31077 Toulouse, France, INRA, UMR792 Ingénierie des Systèmes Biologiques et des Procédés, F-³1400 Toulouse, France, CNRS, UMR5504, F-31400 Toulouse, France

²LRAE (Laboratoire Radio analyses et Environnement), Université de Sfax, Sfax, Tunisie.

Abstract

In situ 3D characterization of a filtration cake obtained with a model bidisperse suspension containing two sizes of fluorescent particles (1 μ m and 4.8 μ m) has been performed using Confocal Laser Scanning Microscopy (CLSM). The suspensions were dead-end filtered through 0.8 μ m pore diameters silicon nitride microsieves, under a constant flow rate. The membrane was put in a specific filtration chamber previously designed [1], allowing direct on-line microscopic observations of particles deposition. The final position of first particles arriving on the membrane was investigated. Then, the online deposition of the following particles was recorded and, thus, the cake build up could be analysed layer by layer. In addition, in order to analyze the protective effect of a layer of large particles, 1 μ m particles were filtrated over a previously deposited cake formed with the 4.8 μ m microspheres.

Keywords: filtration; bidisperse particles; microsieve; cake, CLSM

1. Introduction

Microfiltration membrane processes are widely encountered in industry in order to clarify the products retaining micro-sized particle (biotechnology, water and wastewater treatment, food and pharmaceuticals) [2]. Usually, membranes with pores much smaller than the size of the particles to be retained are selected, thus, a predominant external fouling is expected [3]. However, the retained particles lead to membrane fouling that reduces productivity, changes membranes selectivity, which makes the process less efficient [4] and increases operating cost [5]. Indeed, the cake layer build-up on the membrane surface is the most important drawback of these processes. In most cases, suspensions contain a mixture of particles of different sizes (fermentation broth, wastewater, juices, alcoholic beverages...) [6].

Even though the mechanisms leading to fouling during filtration are complex and not yet fully understood, macroscopic laws have been developed assuming basic mechanisms taking place such as pore clogging and cake formation [7]. Indeed, cake characteristics (mass, thickness, porosity, particle size distribution.....) that play a key role in the fouling effect on filtration [8] have been poorly studied at particle or pore scale. Interactions between the different feed components as well as particle organization on the membrane surface are not accessible by the classic fouling study techniques. *Ex situ* techniques like SEM (scanning electron microscopy) and AFM (atomic force microscopy) ones are relevant techniques for autopsying structure of the fouled layer with high resolution levels [5]. However, they require that the cake and the membrane are removed from the filtration chamber and sometimes treated before observation which could modify its organization. Several optical techniques have been proposed to perform an accurate *in situ* characterization of cake local properties, such as the use of a laser beam [9] and direct visualization (DO) methods [8]. These optical techniques provide accurately *in situ* sensitive real-time observation [10]. However, their main drawback is that the observation is limited to the focal plane and /or the membrane surface on the side view [10]. Recently, direct observation technique of filtration cake using a confocal laser scanning microscope (CLSM) has been proposed. In this *in situ* non-invasive fluorescence imaging method, selected planes at given depths are observed and planes out of focus are excluded [5]. A stack of the successive images recorded at consecutive depths permits the 3-dimensional image reconstruction of the whole sample [11]. In the case of filtration cakes, the use of fluorescent dyes permits to differentiate membrane and cake, and allows the particle distribution on the membrane surface to be studied. In addition, in the case of bidispersed suspensions, the observation of the cake at different depths associated to particles dyed with different fluorochromes (different fluorescent excitation and emission wavelengths) could allow the distinction between the different species [11]. However, laser penetration in the cake is limited and depends on the concentration and transparency of the particle [5], to scattering and absorption of the excitation and emission light [12]... The decrease in fluorescence as a function of cake depth could make it difficult to analyze thick fouling layers [5]. An original strategy for analysis of cake build up, proceeding step by step examination the result of the addition of successive layers upon the cake, has been previously described and applied to the filtration of a monodisperse suspension of fluorescent particles [13]. In this work the effect of the relative sizes of particle and pore on membrane fouling has been studied thanks to the observation by CLSM of the cake organization.

The current work aims to study more realistic situations such as those encountered in various applications where suspensions containing different sizes of particle are filtered. The objective is to better understand the mechanisms of cake build up in the case of a bidisperse suspension. A multilayered cake is built layer by layer on a microsieve, by depositing successively small amounts of particles and observed *in situ* by CLSM. The description of the characteristics of the cake (porosity, mass, homogeneity...) is combined with macroscopic measured parameters. Different combinations of large and small size particles in the suspension have been undertaken.

2. Materials and methods

The experimental methods used in the current work are the same as the ones previously described [13].

2.1. Microsieve and model particles

The silicon nitride microsieves (25 mm² total area, 6.3 mm² filtration area) (Aquamarijn®) were considered as the best compromise in terms of membrane area minimization and permeate flow rate maximization [14]. Membranes with 0.8 μm pores diameter, 1.6 μm pore pitch and 22.7% porosity were used (**Figure 1**). Each microsieve consists of 14 identical filtrating stripes. Before experiments, the microsieves were plasma treated with a Plasma Cleaner (Harrick Plasma, Belgium) and wetted with isopropanol.

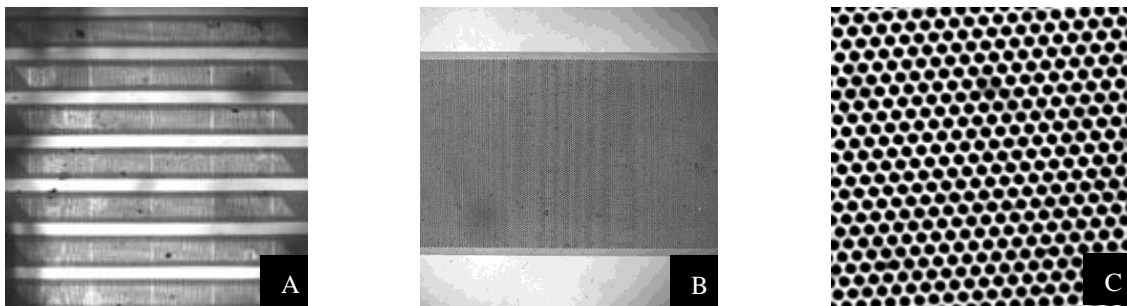


Figure 1: CLSM images of a silicon nitride microsieve surface (A) (objective x 10) filtrating stripes and details of pores on the stripes (Objective x 63), zoom 1 (B) and 6 (C).

After filtration experiments, water fluxes were expressed as permeability reduction L_P^* :

$$L_P^* = \frac{L_P^c}{L_P^0} \quad (1)$$

where L_p^c is the water permeability at a given time of the filtration experiment and L_p^0 the water permeability of the clean microsieve. The fluorescent polystyrene microspheres, 1 μm and 4.8 μm diameter (**Table 1**), ($1.05 \cdot 10^3 \text{ kg/cm}^3$) were provided from Thermo Scientific (USA). Their characteristics were detailed in a previous work [13].

Table 1: Spectral properties of fluorescent microspheres

Microspheres diameter	Specified color	Excitation maxima wave length (nm)	Emission maxima wave length (nm)
1 μm	Red	542	612
4.8 μm	Green	468	508

2.2. Filtration procedure with direct observation system and *in situ* CLSM analysis

The design of the filtration chamber used to perform *in situ*, layer by layer, analysis of cake building was the same as described in a previous work [7]. This apparatus was directly set under a CLSM microscope (LEICA SP2, DMRXA2 and TCS AOBS) during filtration experiments, allowing a direct microscopic observation of particle deposition and cake formation. Images were recorded on line with the Leica CLSM software. The volume of injected suspension and the permeate flow rate were measured by weighting the liquid collected after the pump during a few minutes (triplicates measurements). The transmembrane pressure during filtration was monitored (vacuum meter Thycont, Germany).

In order to overcome CLSM limitation due to insufficient laser penetration for compact and/or opaque deposit, the cake was formed layer by layer thanks to successive injections of the particle suspension and images were recorded after each injection.

The clean microsieve was first observed in bright light mode to determine the zero position of the z-axis and to verify its flatness. A selected volume of the suspension of fluorescent particles at a known concentration was, then, flown to the membrane. Observations were both done in bright light and fluorescent modes. The particles deposition on the microsieves was recorded with an 10x objective (x,y,t). The fouled membrane was, then, analyzed with the 63 x objective at two magnifications, zoom 1 and 6. CSLM images consist of successive thin slices parallel to the microsieve (xy plane) along the z axis. Two scans of every image were performed to improve resolution. The z-series or stacks of images taken at a z-axis were distanced of 0.32 μm . After all image recording, a new suspension volume was injected and the same procedure was repeated.

2.3. Image analysis

Images were processed using Image J (1.45s downloaded from <http://rsb.info.nih.gov/ij/>). The optical sections captured in the reflection and fluorescence modes could be visualized simultaneously to localize the particles and microsieve. Images were automatically calibrated from the voxel sizes (depth, width and length) and converted to grey-scale images. They were, then, segmented into background and foreground by setting a threshold.

The non-uniformity of the microsieves due to the succession of filtering stripes separated by non-filtering stripes (Figure 1) was taken into account in the calculation of the apparent fraction of filtration area covered by particles, α_c :

$$\alpha_c = \frac{S_c}{S_m} \quad (3)$$

S_c and S_m are, respectively, the surfaces occupied by the cake and the area of the filtrating stripes. They are obtained from the image stacks captured with the x 63 objectives (zoom 1) in fluorescence mode, projected to get the top down view of the cake, and from the bright field mode image for the filtrating stripes, respectively.

According to Meng et al, the cake porosity could change greatly along the cake thickness [5]. In order to analyze the internal cake construction, different parameters were determined based on the optical sectional views obtained with the x 63 objective (zoom 6). After binarization of gray-scale images fixing a threshold, the area coated by the particles in each image along the z axis α_s was measured:

$$\alpha_s(z) = \frac{S(z)}{S_{f6}} \quad (4)$$

$S(z)$ is the area of the surface occupied by the particles at each image of the stack and S_{f6} is the area of the filtrating area at zoom 6.


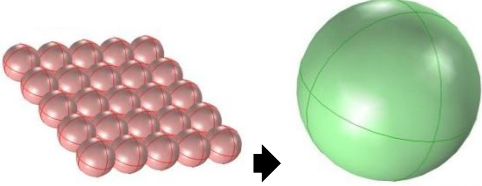
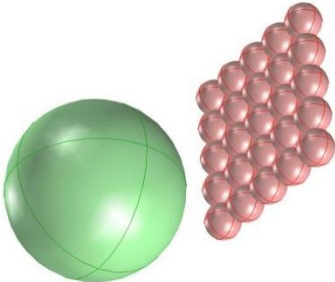
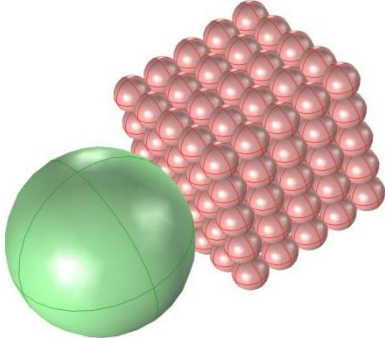
3. Results and discussion

The formation and the morphology of the cakes obtained by dead-end filtration of bidispersed polystyrene fluorescent microspheres are studied according to the procedure detailed in a previous paper [13], i.e. each sequence of filtration is divided into successive filtration steps.

Four experiments are performed (**Table 2**) in order to analyze the collaborative or protective effects of particles of different sizes on membrane fouling and cake characteristics when they are mixed together:

- Experiment E₁: a single filtration sequence of a monodispersed suspension of 1 μm particles.
- Experiment E₂: a first filtration sequence of a monodispersed suspension of 4.8 μm particles followed by a second filtration sequence of a monodispersed suspension of 1 μm particles. The volume ratio of 4.8 μm particles to 1 μm particles is fixed to 5, thus the number of 1 μm particles is about 25 times higher than the number of 4.8 μm ones.
- Experiment E₃: a single filtration sequence of bidispersed suspension. The suspension is obtained by mixing a volume of 1 μm particles five times lower than the volume of 4.8 μm particles. The number of smaller particles is, thus, the same as the one in experiment E₂.
- Experiment E₄: a single filtration sequence of a bidispersed suspension obtained by mixing an equal volume of 4.8 μm and 1 μm particles. Here, the number of smaller particles is about 125 times higher than the number of the larger ones.

Table 2: Particle concentrations in the suspensions filtrated in the experiments

Experiment	Particle number ratio	Feed concentration (g.L ⁻¹)	
		1µm particles	4.8µm particles
E ₁		3.34 10 ⁻⁴	-
E ₂		3.34 10 ⁻⁴	16.1 10 ⁻⁴
E ₃		1.67 10 ⁻⁴	8 10 ⁻⁴
E ₄		4 10 ⁻⁴	4 10 ⁻⁴

As discussed in a previous paper [7], the membrane region observed at high magnification (say x 63, zoom 6) is assumed to be representative of the whole membrane. Images recorded at a magnification x10 at the end of the first filtration step (**Figure 2**) show a uniform cake layer on top of the filtrating stripes; the cake can be, thus, considered roughly homogenous at the membrane scale. No noticeable difference is observed along the filtration stripes. Additionally, the particles seem to deposit on all the stripes and a careful analyse of the filtration field (**Figure 2**) shows that the particles are deposited all over it, reflecting a uniform membrane substructure [15]. Moreover, the continuous recording of cake formation at magnification x10 (record not shown) confirms that particles arrive one by one to the

microsieve filtration surface, no aggregate is observed as it was expected since the suspensions concentrations were very low. Furthermore, no rearrangement of the particles is observed, that will be confirmed at higher magnification level (x 63). These first observations confirm that the morphology of the cake characterized in a sample region of the microsieve at the microscopic scale, i.e. the particle scale, can be considered as representative of all the cake over the membrane.

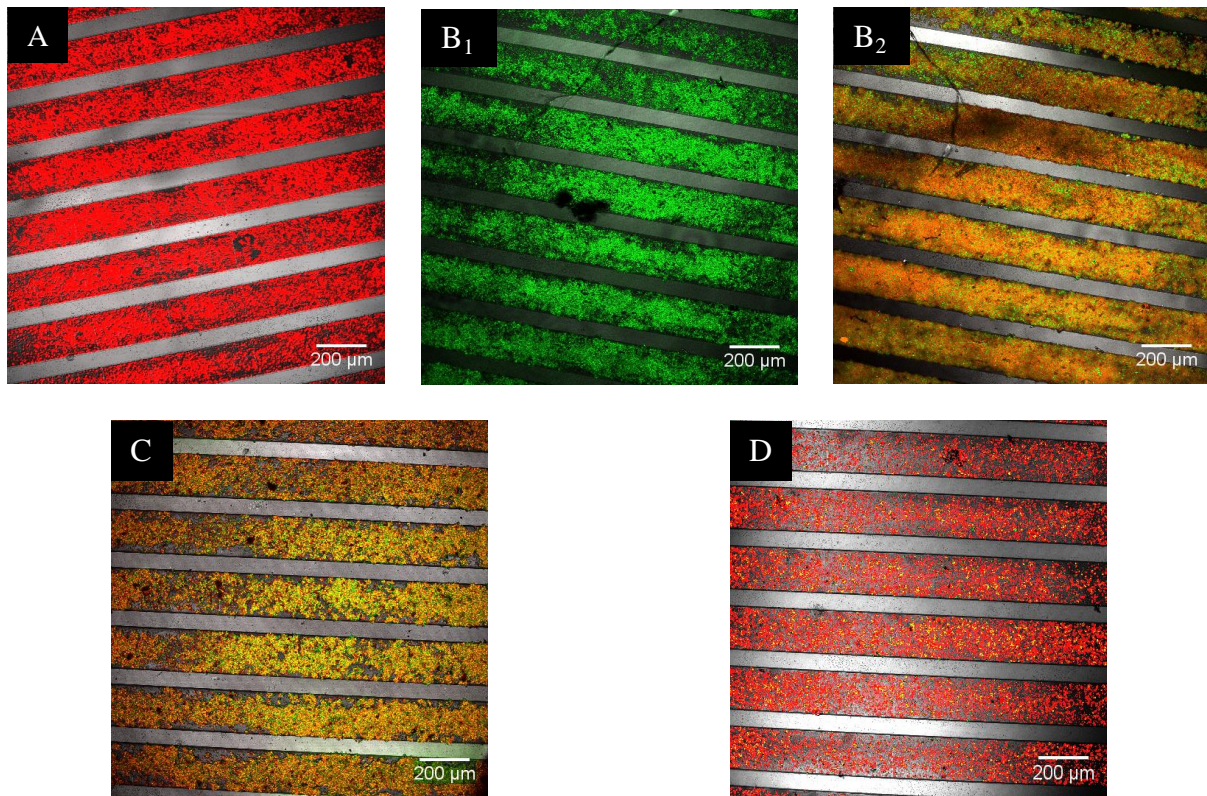


Figure 2 : Composite images of microfiltration cakes on 0.8 μm pore size microsieve during experiment E_1 (A), experiment E_2 (sequence 1 (B_1) and sequence 2 (B_2)), experiment E_3 (C) and experiment E_4 (D) (objective x10)

3.1. Permeability reduction

The decrease of permeability when particles accumulate at the membrane surface is expressed in terms of permeability reduction L_p^* versus mass deposited (**Figure 3**). As observed in a previous work [13], the smaller size particles always have a drastic effect on permeability reduction. It is especially obvious during experiment E_2 since L_p^* sharply decreases from about 45% when 44 μg of 4.8 μm particles are deposited, to 5% once a very small amount of 2 μg of 1 μm particles are additionally deposited. We can also see that the

different initial rates of permeability reduction dL_p^*/dM_T obtained for experiments E₁, E₂ and E₃ (straight lines in **Figure 3**), are consistent with the number of 1 μm particles deposited for a given total mass filtrated M_T . The number of 1 μm particles which are likely to be deposited are represented by N_1 , N_3 and N_4 for experiment E₁, E₃ and E₄ and, for the sake of simplification, we assume that the diameter ratio between big and small particles is about 5. Then, according to **Table 2**, for the same total mass of particle filtrated M_T , assuming that the particle density is about 1 (for mass to volume conversion), the number of 1 μm particles deposited in experiments E₃ and E₄ should be equal to $N_1/6$ and $N_1/2$, respectively, and the corresponding mass of 1 μm particles should be $M_T/6$ and $M_T/2$, respectively. It means that $N_3 < N_4 < N_1$.

Accordingly, we should obtain $|dL_p^*/dM_T|_3 < |dL_p^*/dM_T|_4 < |dL_p^*/dM_T|_1$. This is what can be observed by comparing the beginning of the experiments **Figure 4**. This result demonstrates that smaller particles mainly prevail in pore blockage and, thus, in permeability reduction. On the contrary, the blockage of one pore by bigger particles results in the protection of neighbor pores that remain open [13]. This particular mechanism was previously observed during the CLSM analysis of filtration of monodispersed particles. It will be deeper discussed in the next section about filtration of bidispersed particles. It can be also seen in **Figure 3** that L_p^* is kept slightly higher in experiment E₂ than in experiments E₃ and E₄. It is probably favored by the same mechanism. Therefore, it can be assumed that it could be helpful in some applications to perform a preliminary filtration of big particles to maintain a higher flux during the further filtration of smaller particles.

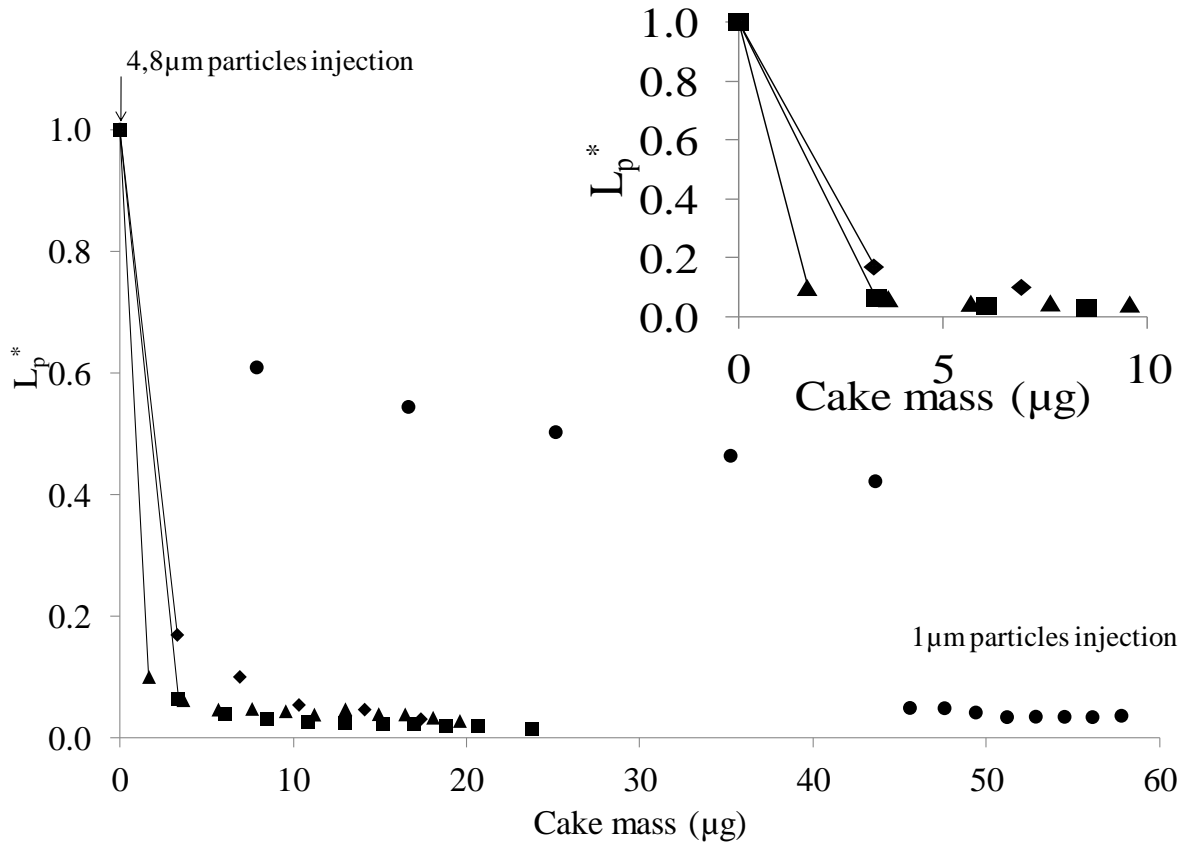


Figure 3 : Fouling caused during the dead end microfiltration of the different suspensions of microspheres on 0.8µm pores diameter microsieve: relative permeability vs. cake mass; (\blacktriangle): Experiment E1, (\bullet): Experiment E2, (\blacklozenge): Experiment E3, (\blacksquare): Experiment E4.

3.2. Cake build up during the filtration of monodispersed particles (Experiment E1 and first part of experiment E2)

In the previous paper about monodisperse spherical particles suspensions, the effect of the relative ratio “pore diameter / particle diameter” has been carefully studied and the notion of protective effect was discussed [13]. A summary of the main results is briefly given in the following. At the beginning of cake formation, particles preferentially deposit over pores. The geometrical ratio between particle size (1 μm or 4.8 μm) and microsieves pore diameter (0.8 or 2 μm pore size) and pitch (1.6 or 3 μm , respectively) modified the fraction of protected pores surrounding the plugged one. A 1 μm microsphere can block only one pore of the membrane. A 4.8 μm particle protects a certain number of surrounding pores depending on microsieve type (0.8 μm microsieve or 2 μm microsieve). This probably explains why the combination of larger particles and smaller pores microsieve exhibits the lowest permeability

reduction. These aforementioned mechanisms are exemplified for experiment E₁ and the first sequence of experiment E₂ as it can be observed in the corresponding images and schemes of **(Figure 4 and 5)**. It was also noticed that pore bridging mechanisms, often discussed in the literature [16], still existed. That probably explained why the 0.8 μm microsieve was not completely fouled during the filtration of 1 μm microspheres.

During the full cake formation, cake morphology was investigated in terms of microsieve coverage and porosity. According to the previous paper, cake porosity was evaluated from the surface occupied by the particle along the z axis using image processing [13]. The results reported in **Table 3** reveal that identical suspensions lead to cakes of roughly the same morphology revealing quite compact deposits except in the first cake layer as already illustrated in **Figure 4 and 5**.

The analysis of the surface covered by particles along the cake thickness exhibits the existence of three regions: a germination region in contact with the membrane with moderate particle concentration, a central high particle concentration region and a superficial region, named capture region. These results were in agreement with the pioneer theoretical works of Schmitz et al. in 1993 [17] and those reported by Meng et al. [5]. Whatever the particle size, the cake organization has appeared to be quite similar except in the germination region.

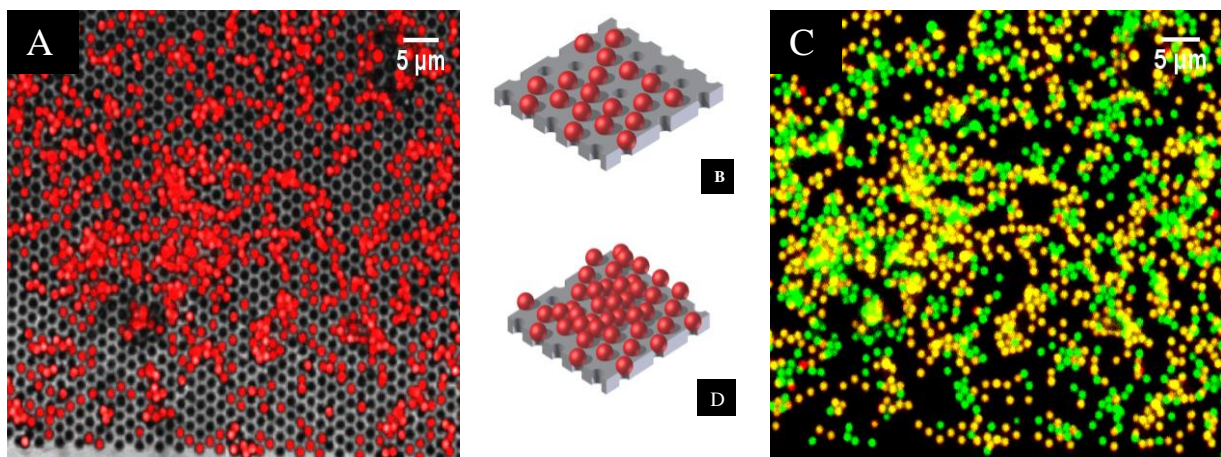


Figure 4 : Composite image of a 0.8 μm pore size microsieve fouled with 3 μg particle (A) and 7 μg of 1 μm particles (C) (first coming in yellow and the following in green) (objective x 63, zoom 6) and its schematic representations (B,D), respectively

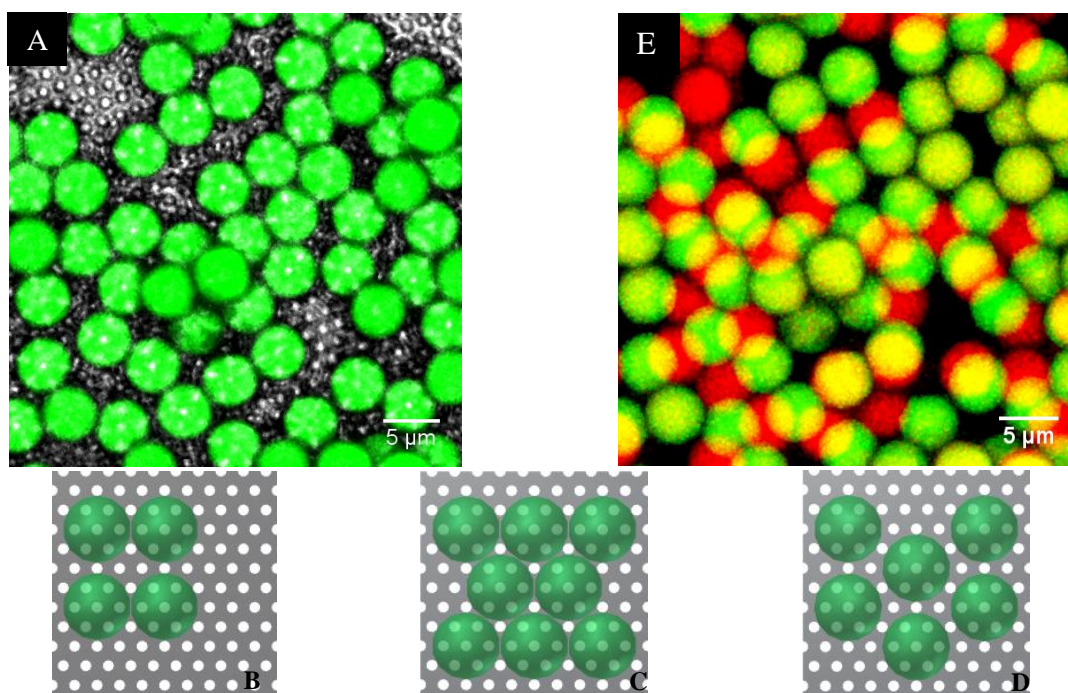


Figure 5 : Composite image of a 0.8 μm pore size microsieve fouled with (A) 4.8 μm particle (8 μg), its schematic representations (B,C,D), respectively and composite image of first arriving (green) and following (red)

Table 3: Effect of particle size on monodisperse cake porosity

1 μm particles (E ₁)	4.8 μm particles (E ₂ , sequence 1)
0.42	0.45

3.3. Cake build up during the filtration of bidispersed particles

During the filtration of real suspensions, the feed composition may vary from very fine particles, molecular aggregates to granular solids [6]. It is well known that particle size has a major effect on fouling separation performance. The effect of particle size on both the pore blockage and the first cake layer formation should be carefully examined for process optimization. Moreover, in the case of particles with a size distribution, their location and arrangement inside the cake could be correlated to their size [18]. To this end, the procedure of successive filtration step by step was used to make a CLSM analysis at microscopic scale, i.e. at particle scale (magnification x63, zoom 6). Recall that conducting such refined experiments is a long and very complex task. Each filtration step with the associated CLSM analysis lasts about one hour, limiting thereby the number of filtration sequences.

3.3.1. Simultaneous filtration of bidispersed particles

3.3.1.1. Initial filtration steps

In experiment E₃, the very first steps of filtration can be studied as few particles are injected at each filtration step. The final total mass deposited is low (less than 17 µg) although the number of filtration steps is 5. Thereby, pore blocking mechanisms and progressive coverage of the microsieve can be accurately examined. As can be expected, the behavior of first 4.8 µm and 1 µm particles deposited is in agreement with the observations already made and described in section 1.2. Indeed it can be seen in **Figure 6** that single particles are perfectly centered over some pores and these pores, are thus presumably blocked and closed, i.e. the fluid cannot flow anymore.

Significant accumulations of small particles can be observed in different places over the microsieve. Small agglomerates, were already observed in the case of the filtration of only 1 µm particles (experiment E₁) where bridging of some pores was also found. Largest accumulations of small particles mainly take place around the large particles deposited, where fluid can still easily flow around particles. Indeed, as schematically illustrated in **Figure 7**, 6 pores around each 4.8 µm particle centered over one pore, remain completely open as they are inaccessible to 1 µm particles. Since small particles aggregates around the larger ones, the flow towards these aggregates should remain high and it can be assumed that the permeability reduction mainly results from pore blockage by isolated small particles instead of small particle accumulation.

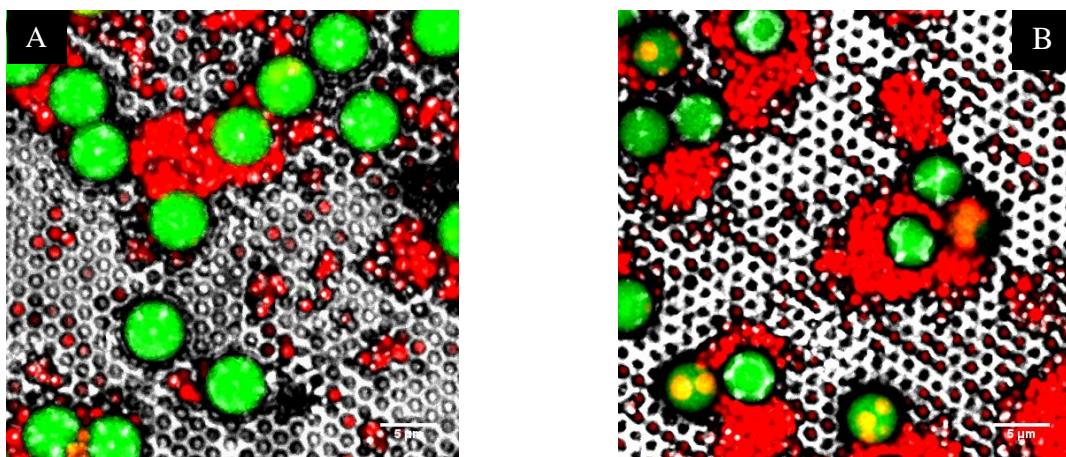


Figure 6 : Composite images of microfiltration cake formed by bidisperse suspension; (A): 1.19 µg 1 µm particles and 5.72 µg 4.8 µm particles; (B): 1.68 µg of 1 µm particles and 4.8 µm particles

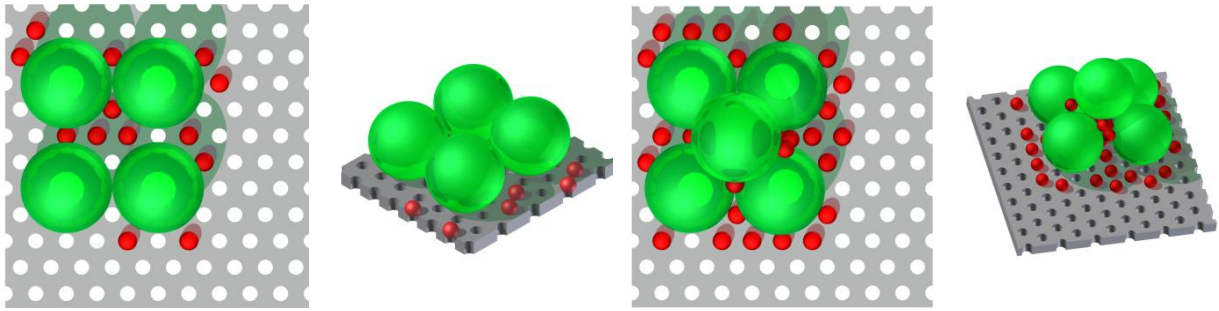


Figure 7 : Schematic representations of the microsieve fouled with bidisperse suspensions

Now let us look at the next filtration steps which correspond to the beginning of cake growth. The apparent fraction of the microsieve filtration area covered by particles, α_c , vs total cake mass is plotted in **Figure 8** and compared to permeability reduction L_p^* . It should be noticed that a low value of α_c (about 25%) is sufficient to get a dramatic value of L_p^* (about 15%). This still confirms that permeability reduction is driven by pore blockage mechanism at the beginning of filtration. When other particles settle, α_c significantly increases to reach 70% at the end of experiment E_3 . Accordingly the calculation of the mean cake thickness shows that only one to two layers of the 4.8 μm particles were finally deposited. That is in agreement with the low ratio (1/25) between the number of 4.8 μm and 1 μm particles in the feed solution of experiment E_3 . Finally, it can also be deduced from **Figure 8** that the aggregates of small particles accumulated around large particles tends to grow in both direction since the increase of α_c becomes smooth as far as mass deposited increases. This is confirmed by the variations of the fraction of the area occupied by particles, α_s , along the z -axis showing that the cake thickens and slightly grows during the initial filtration steps (**Figure 9 and 10**). Now, let us examine more carefully the area occupied by the 4.8 μm and 1 μm particles, respectively (**Figure 10**). If the smaller particles contribute equally to cake thickening and cake growth (**Figure 8**), the larger ones seem more involved in cake thickening as reported by **Figure 10** where the respective fraction of area occupied by each particle type is plotted along the z -axis. However, the large particles are few because the overall number of particles injected during experiment E_3 has remained quite low and ratio between 4.8 μm and 1 μm particles in the feed solution is low (1/25). Thus, the subsequent thickness of the cake at the end of experiment is in the order of magnitude, of about three large particle diameters. Moreover, the shape of the α_s vs. z curve (**Figure 9**) indicates that the cake contains only two regions (see section 1.2, [5]): the germination region and the superficial region whose thickness are of about one and two large particle diameter respectively. The central region of

high particle concentration does not yet exist. This is confirmed by the maximum value of α_s which only equals 0.4, giving a high void fraction of 0.6. It would not make sense to give a porosity value of the cake at this stage.

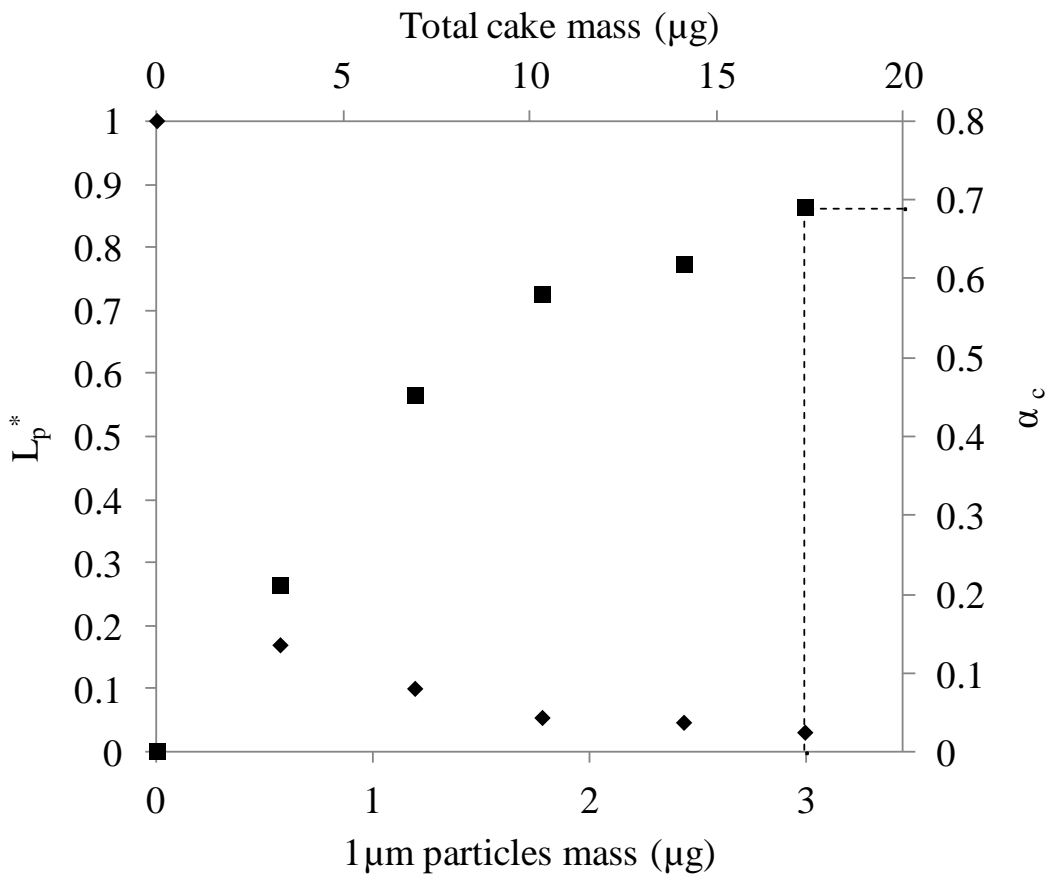


Figure 8 : Evolution of the apparent fraction of the microsieve filtration area covered by particles, α_c , and the permeability reduction (L_p^*) during experiment E₃

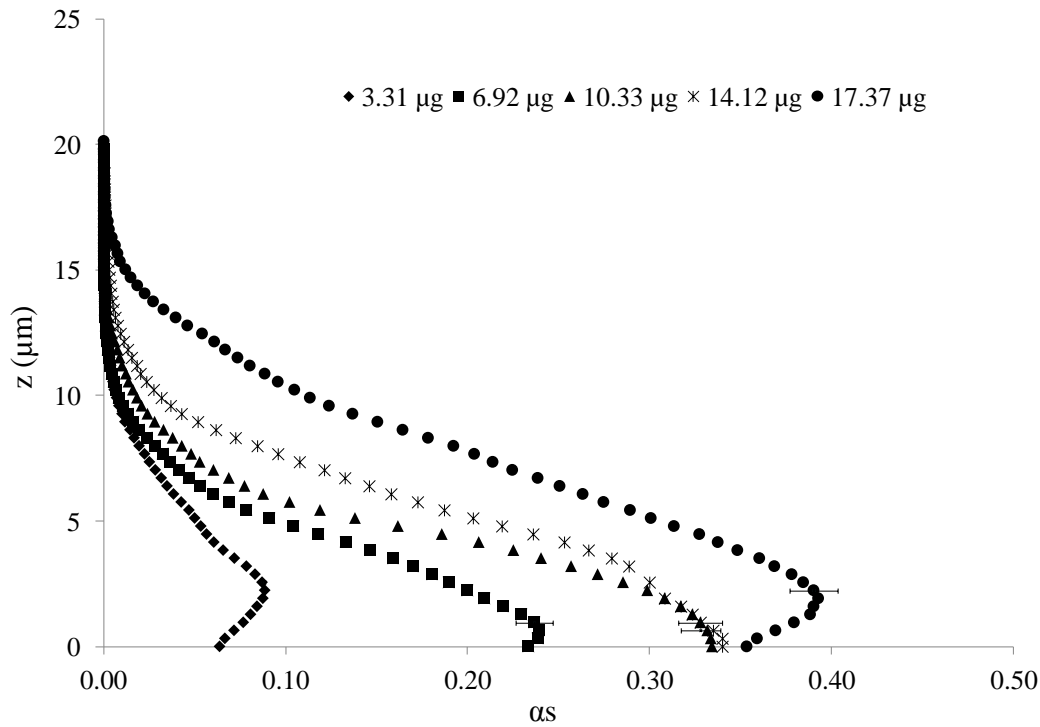


Figure 9 : Evolution of the fraction of the area occupied by the particles in each image along the z axis vs. total cake mass during experiment E₃

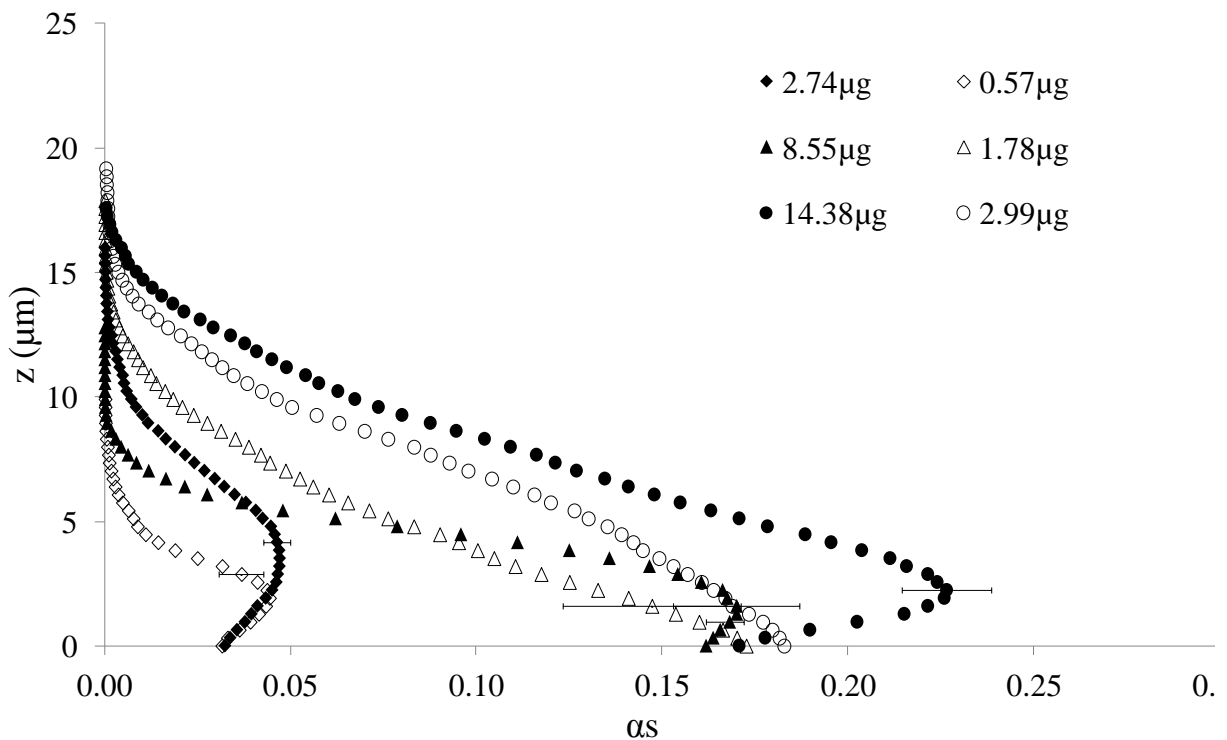


Figure 10 : Evolution of the fraction of the area occupied by each type of particles in each image along the z axis vs. cake mass: 1 μm particles: (empty symbols), 4.8 μm particles: (full symbols); total cake mass (◆,◇) 3.31 μg, (▲,△) 10.33 μg, (●,○) 17.37 μg

3.3.1.2. Multilayer cake formation

Contrary to experiment E_3 that was stopped after the injection of a quite low mass of particles (17 μg), experiment E_4 was performed at higher mass injected (24 μg) in order to follow the formation of a multilayered cake. As expected, the initial filtration steps of experiment E_4 are found to be quite similar to the ones of experiment E_3 . As illustrated in **Figure 11** *Erreur ! Source du renvoi introuvable*, 1 μm particles mainly accumulate around the 4.8 μm particles (yellow square) or block some pores of the microsieve. It should be noted that the larger particles also progressively accumulate in these aggregates initially formed by the smaller particles around one large particle (blue triangle). Then, both particle types contribute to the growth and thickening of the aggregates. These observations still confirm that the highest flow rate is maintained around the first 4.8 μm particles deposited and, thus, strengthen the assumption of the existence of remaining open pores around them.

Now have a look at the specific role of the 1 μm particles that they are much more numerous than the 4.8 μm particles, 25/1 and 125/1 for experiment E_3 and E_4 , respectively. The apparent fraction of the microsieve filtration area covered by particles, α_c , has been specifically plotted vs 1 μm particle mass deposited in **Figure 8** (experiment E_3) and 12 (experiment E_4). For a given value of 1 μm particle mass deposited, say 3 μg (identified by the straight lines drawn in the figures), the corresponding value of α_c remains the same in both experiments (0.7). This is an important finding showing that smaller particles predominately contribute to cake thickening and subsequently facilitate the progressive cake homogenization.

It can also be seen in **Figure 13** that the cake progressively thickens to get apparently homogeneous in terms of spatial distribution over the microsieve. Surprisingly the spatial distribution of the two types of particles seems to become also homogeneous during the growth of the cake (**Figure 11D**) and only driven by the very low ratio (1/125) between the number of 4.8 μm and 1 μm particles in the feed suspension. At this filtration step, new arriving particles are no longer in contact with the heterogeneous germination region. The growth of the multilayer cake becomes uniform all over the microsieve (**Figure 13C**). The associated value of the apparent fraction of the microsieve filtration area covered by particles, α_c , reaches then 1 (**Figure 12**).

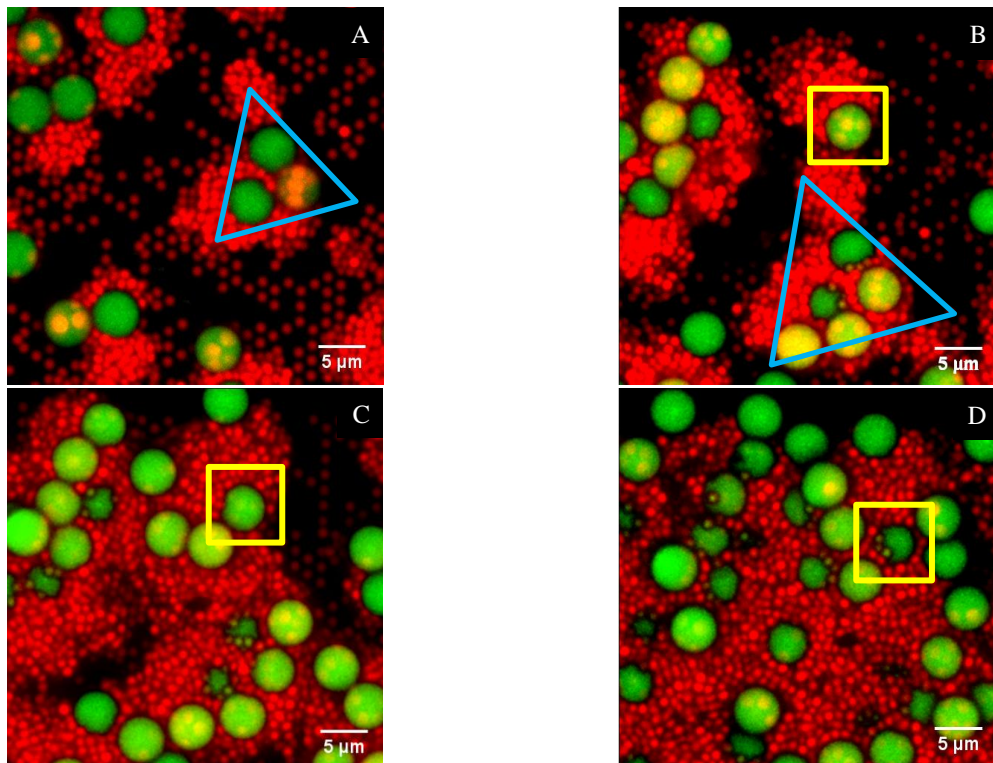


Figure 11: Composite images of microfiltration cake formed by bidisperse suspension; Total cake mass: (A): 3.36 μg , (B): 6.01 μg , (C): 8.50 μg , (D): 10.83 μg (Experiment E₄)

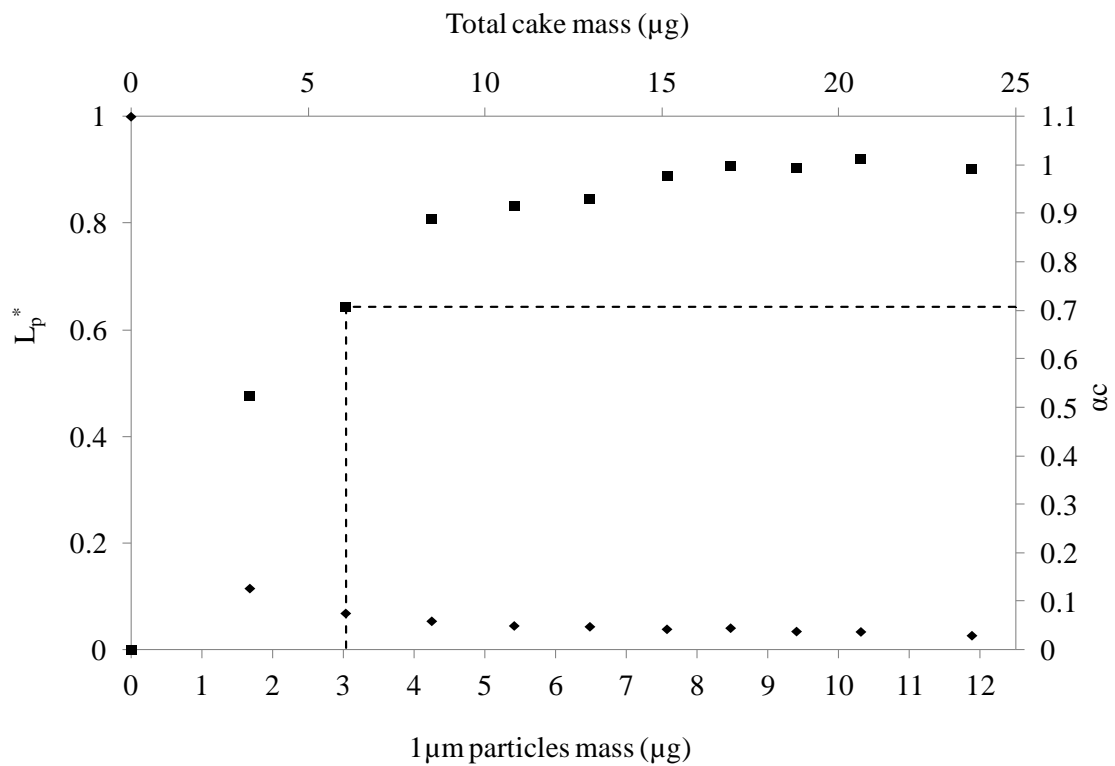


Figure 12 : Evolution of the apparent fraction of the microsieve filtration area covered by particles, α_c , (■) and the permeability reduction (◆) of the 0.8 μm microsieve fouled by a bidisperse suspension during experiment E₄ particles vs. cake mass

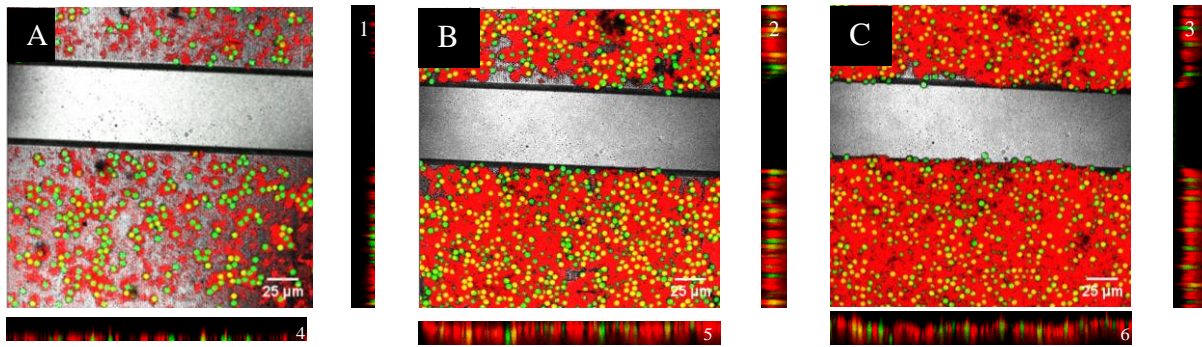


Figure 13 : Series of composite images of microfiltration cake formed by the bidisperse suspension at cake mass (A) 3.36 μg , (B) 10.84 μg , (c) 23.78 μg (objective x 63, zoom 1)

Taking benefit of the CLSM method, the morphology of the cake can then, be carefully examined using the variations of the fraction of the area occupied by particles, α_s along the z -axis. We have already discussed in another paper [13] that the global approach using cake mass and cake thickness to calculate cake porosity [8] was not relevant especially for cakes of low thickness. Indeed, two drawbacks should be mentioned: (i) the germination region and the superficial region of the cake are not taken into account and (ii) the calculation depends on the definition of the cake thickness. This is particularly true in the present case of the filtration of bidispersed suspensions. As mentioned by other authors [19], three different regions in the cake have been demonstrated (see section 1.2 and [13]). Here, these three regions are still well illustrated in Figure 14. It can be noticed that the formation of the germination region for experiment E_4 is in good agreement with the one previously discussed for experiment E_3 . Indeed, the z -variations of α_s are similar during the first steps of filtration (mass deposited lower than 15 μg). In this first region, α_s progressively increases as mass deposited increases to get 0.6 which is the constant value associated with the central region of the cake and that corresponds approximately to the void ratio of random packing of spheres. From this filtration step, the cake consists of the three aforementioned regions: (i) the germination region of about 10 μm (twice the larger particle diameter), (ii) the high concentration region where the porosity is about 0.4 (say $1 - \alpha_s$) and (iii) the superficial region of about 10 μm (twice the larger particle diameter). This morphological analysis of the cake formed by bidispersed particles exhibits an analog result as the one found in the case of the filtration of monodispersed particles [13]. However, it should be mentioned that the value of 0.4 is an approximate value of porosity because it is a hard task to perform accurate measurements of the area occupied by 1 μm particles.

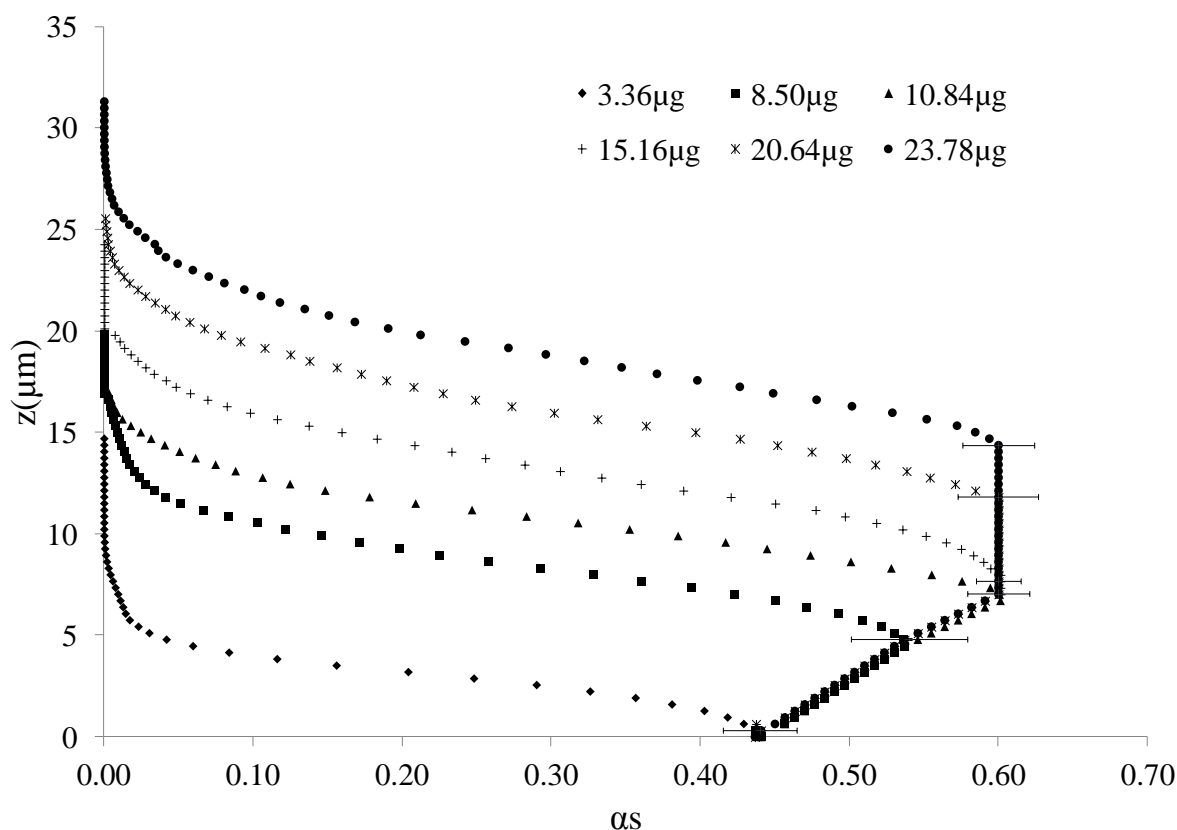


Figure 14 : Evolution of the fraction of the area occupied by the particles in each image along the z axis vs. total cake mass during experiment E₄

Recently, numerous of non-invasive characterization techniques were developed in order to better understand the basic mechanisms governing particle deposition and following cake formation. For instance, laser based method allowed Mendret et al. to measure the local thickness of a clay cake on a plane membrane [9]. Furthermore, ultrasonic time domain reflectometry (UDTR) was used by Li et al. to measure kaolin cake's thickness [20]. However, the internal cake characteristics could not be determined by classical characterization techniques. Compared to other methods, one of the main features of the CLSM, is that it allows the 3D reconstruction of the cake fouling thanks to Image J 3D viewer. This tridimensional reconstruction helps to analyze the shape of the deposit formed over the filtration stripes. In **Figure 15**, three composite images made from the microsieve observation in bright field mode and the cake 3D reconstruction in fluorescence mode can be seen. It shows the topography of the cake formed on a 0.8 μm microsieve at different times of filtration associated with different mass of particles deposited. These representations are the most realistic views of the cake. It confirms the random distribution of the particles on the filtering stripes at the beginning of the run. At the end of filtration, all the filtration area is covered.

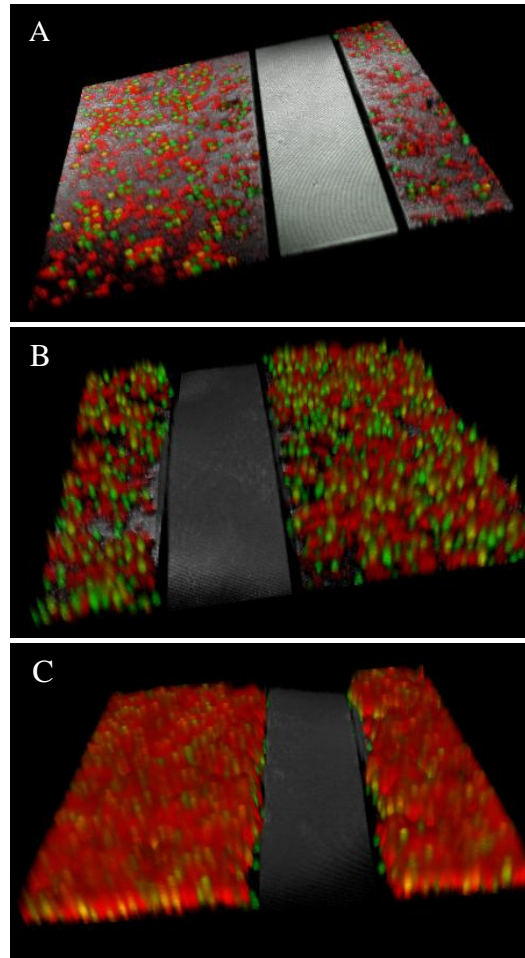


Figure 15: Composite image of 3 D construction microfiltration bidispersed cake at cake mass (A) 3.36 μg and (B) 8.50 μg and (C) 16.96 μg (objective x 63, zoom 1) (Experiment E₄)

3.3.1. Filtration of small particles after a first filtration of large particles (Experiment E₂)

The mechanisms that take place during the beginning of monodispersed particles cake formation were already discussed in section 1.2., especially in the case of the filtration of 4.8 μm particles. In experiment E₂, a mass of 43.60 μg of 4.8 μm particles was injected before the injection of 1 μm particles. Images of the cake obtained after this first filtration are given in **Figure 16**. Accordingly the z-variations of α_s (fraction of area occupied by the particles) show that the cake consists of approximately two layers of particles (**Figure 17** (full triangles)). The maximum value of α_s associated with 43.60 μg of large particles deposited is a little bit higher than 0.5. This indicates that the germination region is almost achieved. Only a few voids at the cake surface are still present. Further large particle injections would lead to the growth and the thickening of the cake as already found [13].

Now let us examine what happens during the filtration of small particles on the cake formed by large particles. As can be observed in **Figure 16 B and C**, small particles first migrate towards the voids of the cake that they may cross because of their small size. Then, they tend to thicken the cake and some of them eventually reach the membrane surface. This is confirmed by the z -variations of α_s plotted in **Figure 17 and 18**. In particular the curves which correspond to the first steps of filtration of $1\mu\text{m}$ particles (empty squares and triangles) in **Figure 18** exhibit an approximate value of α_s equal to 0.03 at $z=0$ which reveals that some small particles reach the membrane surface during the first steps of the filtration of the small particle suspension. It can also be observed that, due to small particles, α_s increases in the germination region. Indeed, the cake is thickened by small particle accumulation in the remaining void space. As the void spaces get filled, small particles accumulate at the surface of the cake formed by large particles during the further steps of filtration. They progressively smooth the cake surface by filling the space between the large particles (**Figure 16 C**). It is well exemplified by the z -variations of α_s (**Figure 17**) associated with these steps of filtration. This confirmed that the surface of the cake becomes smoother. Finally, the cake is expected to grow due to further accumulation of small particles and at this stage the cake obtained with the addition of the small particles should be homogenous. Unfortunately it was impossible to keep on going the experiment for validation because the transmembrane pressure was too high. It is noticeable that the overall maximum value of α_s is of the order of 0.6, giving a porosity of 0.4 (**Figure 17**). This value is the same as the one obtained in experiment E₄ in the high concentration region of the cake. Moreover, α_s becomes finally equal to 0.6 on a range of z , presuming the beginning of a homogeneous growth of the cake during the further steps of filtration.

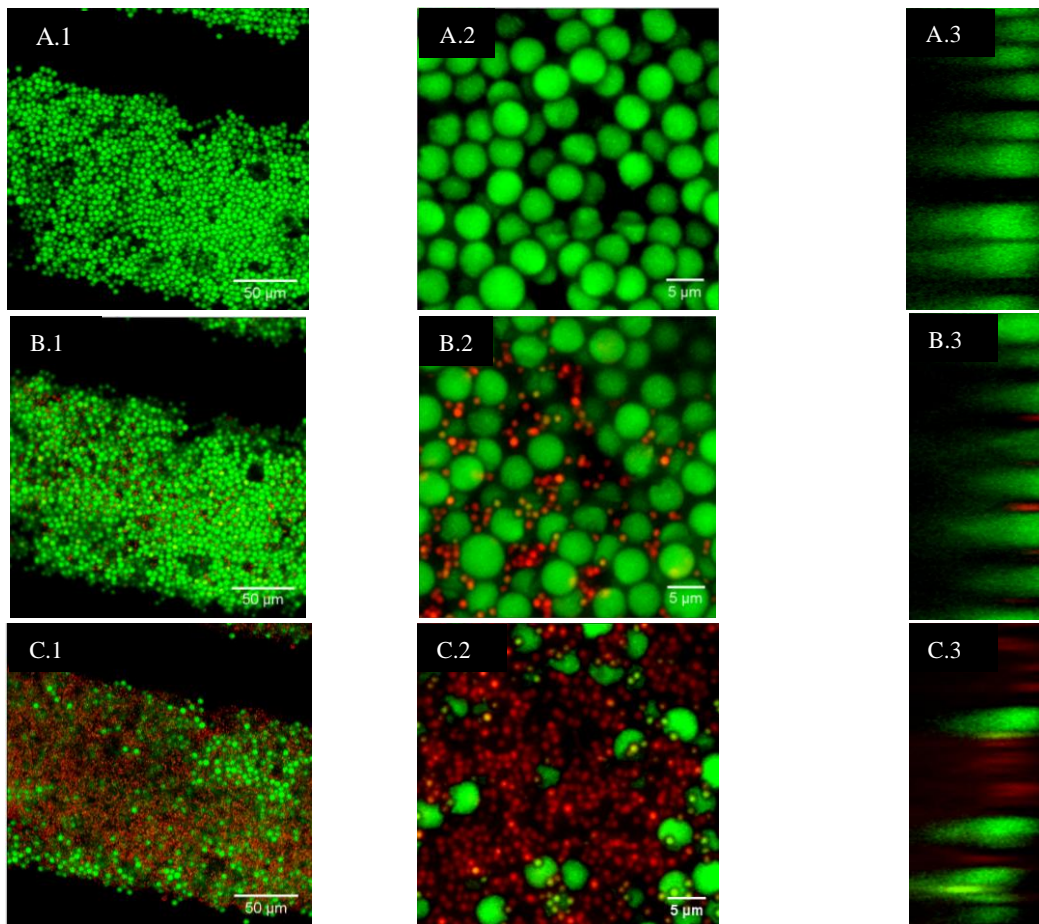


Figure 16: Series of composite images of microfiltration cake formed by the bidisperse suspension at cake mass (A) 43.6 µg, (B) 45.6 µg, (c) 57.8 µg during experiment E₂; objective x 63, zoom 1 (1), zoom 6 xy and yz views (2,3), respectively

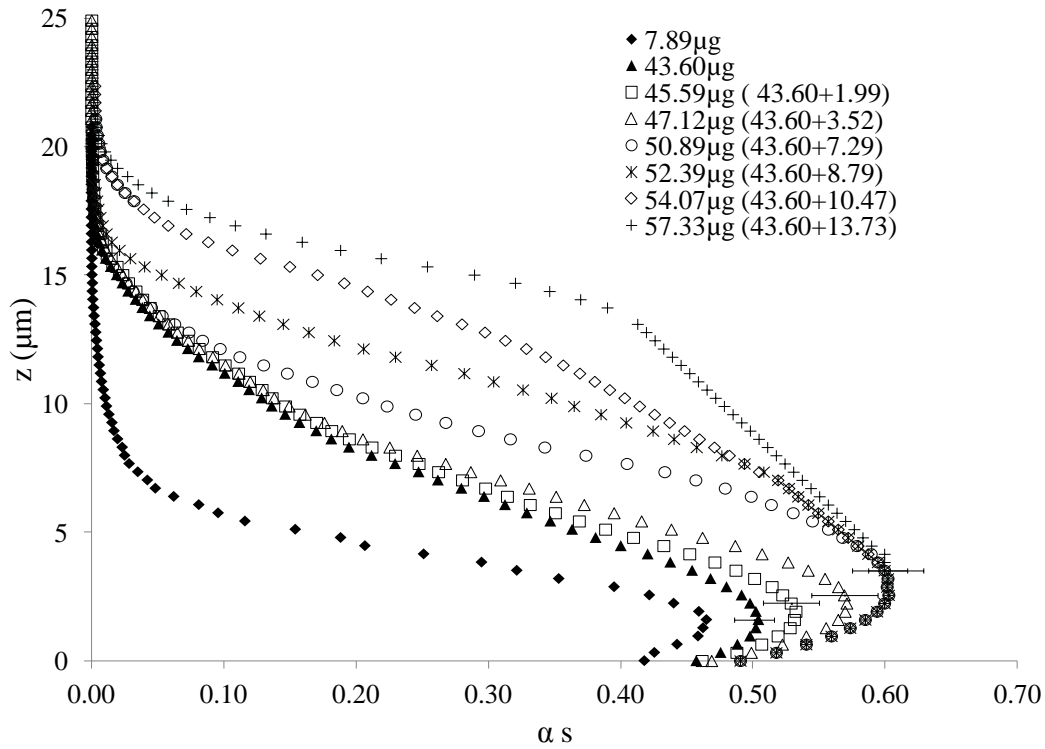


Figure 17: Evolution of the fraction of the area occupied by the particles along the z axis vs. cake mass during the filtration of monodisperse suspension of 4.8 μm particles (full symbols) and bidisperse suspensions (empty symbols)

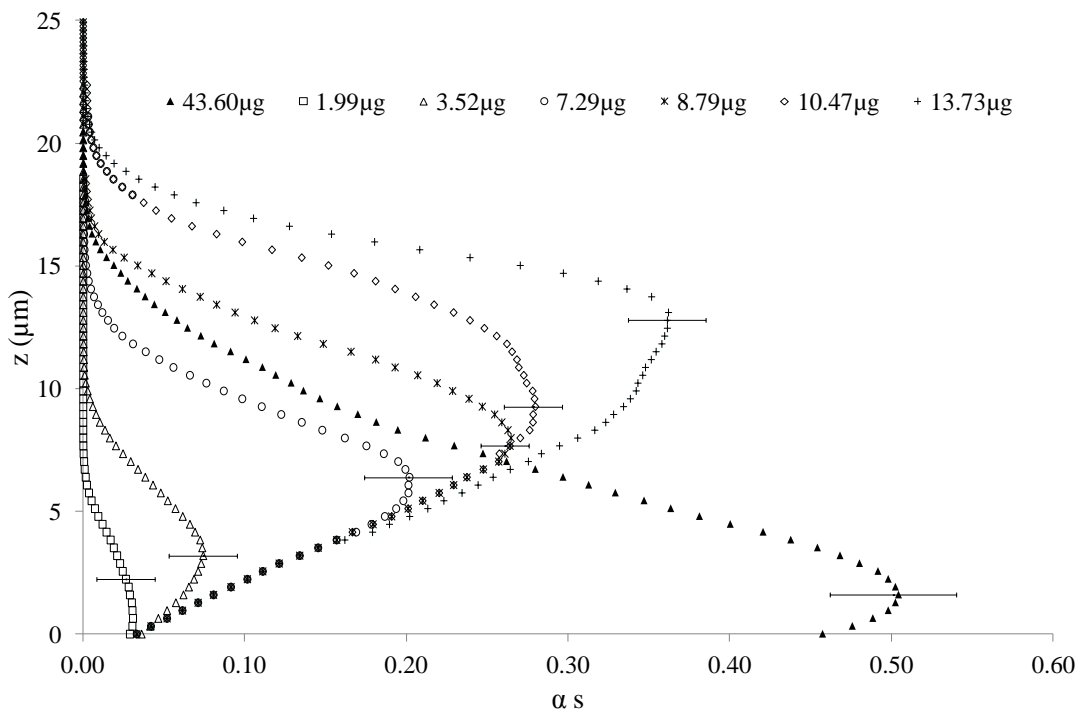


Figure 18: Evolution of the fraction of the area occupied by each type of particles along the z axis vs. cake mass of monodisperse suspensions : 4.8 μm particles: (full symbols), 1 μm particles: (empty symbols)

Conclusion

In this work, the initiation and building of cakes formed during the filtration of bidisperse fluorescent particles suspensions were studied. *In situ* analyses at the particle level were performed according to a previous described method based on CLSM.

During the filtration of bidisperse suspensions, the particle distribution over the membrane for the first cake layer as well as the cake build up were investigated in terms of microsieve coverage, permeability reduction and porosity.

As the particles arrive at the membrane surface, the behavior of first 4.8 μm and 1 μm particles is similar to the one witnessed during the filtration of monodisperse suspensions. Moreover small particles seem to preferentially accumulate around the large particles deposited close to the place where pores surrendering the blocked pores are still open and, then, the fluid can easily flow. Then, the scenario of multilayer cake formation was studied step by step. The evolution of the apparent fraction of the microsieve filtration area covered by particles showed that 1 μm particles predominately contribute to cake thickening and facilitating the progressive cake homogenization.

Moreover, the shape of the area occupied by particles along the z-axis still demonstrated three regions with different concentration: germination, central and superficial zone. The cake porosity in the central region was about 0.4.

Finally, the small particles were filtrated after the deposition of a cake formed with the large ones. Small particles migration in the voids of the cake formed by the larger particles is observed.

In future works, various issues will be addressed; especially the analysis of the fouling cakes obtained during the filtration of biological suspensions using mix of fluorescent microorganisms will be investigated. On the other hand, the effect of the membrane properties on cake build up, as suggested in the present paper, when two size cells are mixed will also need to be better explored.

Acknowledgments

This work would not have been possible without the financial support of Action Intégrée Franco-Tunisienne du Ministère des affaires étrangères et Européennes français et du ministère de l'Enseignement Supérieur, de la recherche Scientifique tunisien. We thank Christophe ELLERO (LISBP) for his technical support and Cecile POUZET and Aurélie LE RU from IFR40 confocal platform (Auzeville France) for their technical assistance.

Nomenclature

- α_c : apparent fraction of filtration area covered by particles
- α_s : fraction of the area occupied by the particles in each image along the z axis
- T_d : mean cake thickness (μm)
- L_p^c : water permeability at a given time of the filtration experiment ($\text{L.h}^{-1}.\text{m}^{-2}.\text{bar}^{-1}$)
- L_p^0 : water permeability of the clean microsieve ($\text{L.h}^{-1}.\text{m}^{-2}.\text{bar}^{-1}$)
- L_p^* : permeability reduction
- J : permeate flux (m.s^{-1})
- R : hydraulic resistance to filtrate flow (m^{-1}),
- ΔP : transmembrane pressure (Pa)
- μ : liquid viscosity (Pa s)
- ε : cake porosity
- S_c : apparent area of the surface occupied by the cake on the image (μm^2).
- S_m : filtration area in the observed image (μm^2).
- $S(z)$: area of the surface occupied by the particles at each image of the stack
- S_{f6} : area of the filtrating area at zoom 6
- M_c : cake mass (kg)
- M_T : total cake mass (kg)
- N_1 : number of $1\mu\text{m}$ particles deposited in experiment E_1
- N_3 : number of $1\mu\text{m}$ particles deposited in experiment E_3
- N_4 : number of $1\mu\text{m}$ particles deposited in experiment E_4
- ρ_c : particles density (kg.m^{-3})

References

- [1] I. Ben Hassan, M. Ennouri, C. Lafforgue, P. Schmitz, A. Ayadi, Experimental Study of Membrane Fouling during Crossflow Microfiltration of Yeast and Bacteria Suspensions: Towards an Analysis at the Microscopic Level, *Membranes*, 3 (2013) 44–68.
- [2] Y. Zhang, A. Fane, A. Law, Critical flux and particle deposition of bidisperse suspensions during crossflow microfiltration, *J. Memb. Sci.*, 282 (2006) 189–197.
- [3] G. Brans, A. van Dinther, R. M. Boom, Transmission and fractionation of micro-sized particle suspensions, *J. Memb. Sci.*, 290 (2007) 230–240.

- [4] M. Nystrom and M. Manttari, Introduction : Opportunities and Challenges of Real Time Monitoring on Membrane Processes, Wiley-VCH, (2009) pp. 1–8.
- [5] F. Meng, B. Liao, S. Liang, F. Yang, H. Zhang, L. Song, Morphological visualization, componential characterization and microbiological identification of membrane fouling in membrane bioreactors (MBRs), *J. Memb. Sci.*, 361 (2010) 1–14.
- [6] R. Wakeman, The influence of particle properties on filtration, *Sep. Purif. Technol.*, 58 (2007) 234–241.
- [7] I. Ben Hassan, C. Lafforgue, C. Ellero, A. Ayadi, P. Schmitz, Coupling of local visualization and numerical approach for particle microfiltration optimization, *Microsyst. Technol.*, 542 (2013) 1-9.
- [8] H. K. Vyas, A. J. Mawson, R. J. Bennett, A. D. Marshall, A new method for estimating cake height and porosity during crossflow filtration of particulate suspensions, *J. Memb. Sci.*, 176 (2000) 113–119.
- [9] J. Mendret, C. Guigui, P. Schmitz, C. Cabassud, An Optical Method for In Situ Characterization of Fouling During Filtration, *J. Memb. Sci.*, 53 (2007) 2265–2274.
- [10] V. Chen, Non-invasive observation of synthetic membrane processes? a review of methods, *J. Memb. Sci.*, 241 (2004) 23–44 2004.
- [11] M. Ferrando, A. Rzek, M. Zator, F. Lopez, C. Guell, An approach to membrane fouling characterization by confocal scanning laser microscopy, *J. Memb. Sci.*, 250 (2005) 283–293.
- [12] D. Hughes, U. K. Tirlapur, R. Field, Z. Cui, In situ 3D characterization of membrane fouling by yeast suspensions using two-photon femtosecond near infrared non-linear optical imaging, *J. Memb. Sci.*, 280 (2006) 124–133.
- [13] I. Ben Hassan, C. Lafforgue, A. Ayadi, P. Schmitz, In situ 3D characterization of monodispersed spherical particle deposition on microsieve using confocal laser scanning microscopy, *J. Memb. Sci.*, 454 (2014) 283–297.
- [14] C. Ning Koh, T. Wintgens, T. Melin, F. Pronk, Microfiltration with silicon nitride microsieves and high frequency backpulsing, *Desalination*, 224 (2008) 88–97.
- [15] G. Brans, J. Kromkamp, N. Pek, J. Gielen, J. Heck, C. J. M. van Rijn, R. G. van der Sman, C. G. P. H. Schroën, R. M. Boom, Evaluation of microsieve membrane design, *J. Memb. Sci.*, 278 (2006) 344–348.
- [16] R. Wakeman, The influence of particle properties on filtration, *Sep. Purif. Technol.*, 58 (2007) 234–241.

- [17] P. Schmitz, B. Wandelt, D. Houi, M. Hildenbrand, Particle aggregation at the membrane surface in crossflow microfiltration, *J. Memb. Sci.*, 84 (1993) 171–183.
- [18] S. Beaufort, S. Alfenore, C. Lafforgue, Use of fluorescent microorganisms to perform in vivo and in situ local characterization of microbial deposits, *J. Memb. Sci.*, 369 (2011) 30–39.
- [19] Y. Marselina, P. Le-Clech, R. Stuetz, V. Chen, Detailed characterisation of fouling deposition and removal on a hollow fibre membrane by direct observation technique, *Desalination*, 231 (2008) 3–11.
- [20] J. Li and R. D. Sanderson, In situ measurement of particle deposition and its removal in microfiltration by ultrasonic time-domain reflectometry, *Desalination*, 146 (2002) 169–175.

*Chapitre VI. : Filtration de suspensions de
microorganismes et évaluation de la
pertinence de l'étude*

VI.1 Filtration de suspensions de microorganismes

Présentation du travail, objectifs et approche

L'étude bibliographique a montré que très peu de travaux ont étudié la formation de dépôts biologiques vivants *in situ*. Généralement, la membrane colmatée est retirée du module de filtration et le dépôt est traité et coloré avant de l'observer *ex situ*, ce qui peut engendrer de nombreux biais et rendre les interprétations délicates.

Beaufort et al. [3] se sont intéressés au colmatage induit par des microorganismes auto-fluorescents sur des membranes en céramique par microscopie confocale. Toutefois, seule la partie la plus haute du dépôt a pu être observée. L'utilisation de microorganismes auto-fluorescents obtenus par manipulation génétique est une approche originale et séduisante mais qui repose sur une technique délicate ; le marquage obtenu s'est avéré hétérogène et très sensible à l'environnement.

Dans ce chapitre, l'étude des caractéristiques des dépôts à l'échelle microscopique (taux de couverture des membranes, hauteur, porosité.....) est réalisée en parallèle d'analyses macroscopiques classiques (perméabilité, résistance.....) pour différentes expériences :

- Filtration de suspensions pures de levures *Saccharomyces cerevisiae* colorées par le Syto 9 sur une microsieve de 0,8 μm .
- Filtration de suspensions pures de levures *Saccharomyces cerevisiae* colorées par le Syto 9 sur une microsieve de 2 μm .
- Filtration de suspensions pures de bactéries *Escherichia coli* colorées par le Syto 9 sur une microsieve de 0,8 μm .
- Filtration d'un mélange de levures colorées par le Syto 9 et bactéries colorées par le Syto 84 sur une microsieve de 0,8 μm .

La pureté des suspensions et le taux de marquage des cellules sont contrôlés avant chaque expérience. Seuls les dépôts issus de suspensions où le taux de marquage est de 100% sont analysés.

VI.1.1 Caractérisation tridimensionnelle, *in situ*, de dépôts de microorganismes en suspensions pures

VI.1.1.1 Suspension de levures

VI.1.1.1.1 Effet de la taille du pore sur la formation du dépôt

Des suspensions pures de la levure *Saccharomyces cerevisiae* colorée par le Syto 9 ont été filtrées sur deux microsieves ($2\ \mu\text{m}$ et $0,8\ \mu\text{m}$). La formation des dépôts a été analysée *in situ* par microscopie confocale en termes de taux de couverture de la membrane, d'épaisseur et de porosité. La compressibilité du gâteau de levure et sa facilité de nettoyage ont également été étudiées.

La persistance de la fluorescence permet de réaliser un suivi temporel du dépôt des microorganismes sur la microsieve (**Figure VI.1-1**).

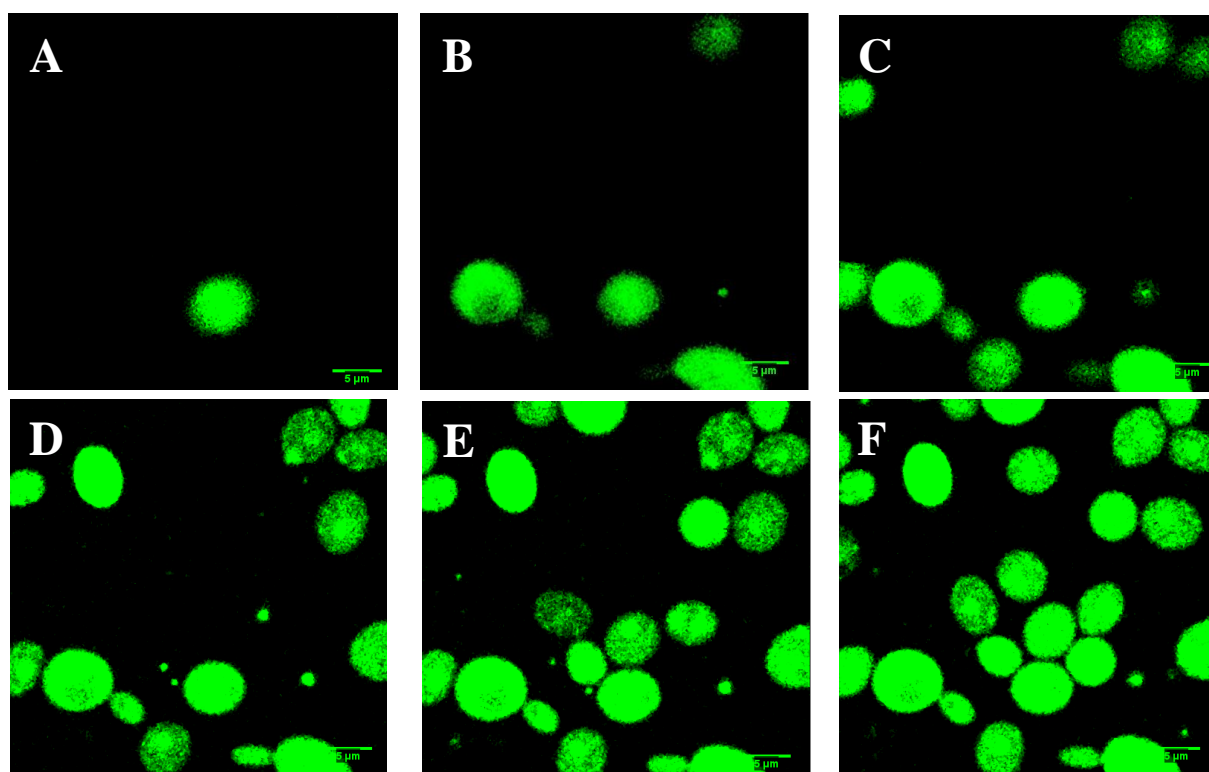


Figure VI.1-1 : Observations en temps réel en mode fluorescence du dépôt des cellules de levures colorées avec le Syto 9 au cours du temps sur une microsieve de $0,8\ \mu\text{m}$:
(A) : $t=16\ \text{s}$, (B) : $19\ \text{s}$, (C) : $23\ \text{s}$, (D) : $29\ \text{s}$, (E) : $32\ \text{s}$ (F) : $36\ \text{s}$

Durant la première étape d'initiation du colmatage, les levures semblent suivre les lignes de courant, se déposent sur les pores et les obstruent. Les pores avoisinants sont alors

protégés, les particules ne pouvant y accéder. La comparaison des deux microsieves (0,8 et 2 μm) indique que le taux de pores protégés dépend du rapport entre la taille du microorganisme et la taille du pore. Ainsi, l'organisation de la première couche dépend essentiellement de la géométrie de la membrane. Ces observations justifient les différences d'évolution de la perte de la perméabilité pour les deux membranes.

En outre, l'augmentation de la pression appliquée sur des dépôts multicouches n'a pas d'effet mesurable sur son épaisseur ce qui argumente en faveur d'une haute compacité initiale.

L'étude du nettoyage des microsieves suggère l'existence d'interactions complexes et fortes entre levures et entre les cellules et les microsieves. En effet, une importante fraction du dépôt biologique reste attachée sur la membrane malgré les différents cycles de nettoyage.

ARTICLE 4

Study of the separation of yeast by microsieves: *In situ* 3D characterization of the cake using confocal laser scanning microscopy

Food Bioprod Process (2014)

I. Ben Hassan, C. Lafforgue, A. Ayadi, P. Schmitz



Contents lists available at ScienceDirect

Food and Bioproducts Processing

IChemE

journal homepage: www.elsevier.com/locate/fbp

Study of the separation of yeast by microsieves: In situ 3D characterization of the cake using confocal laser scanning microscopy

Ines Ben Hassan^{a,b,c,d}, Christine Lafforgue^{a,b,c,*}, Abdelmoneim Ayadi^d,
Philippe Schmitz^{a,b,c}

^a Université de Toulouse; INSA, UPS, INP; LISBP, 135 Avenue de Rangueil, F-31077 Toulouse, France

^b INRA, UMR792 Ingénierie des Systèmes Biologiques et des Procédés, F-31400 Toulouse, France

^c CNRS, UMR5504, F-31400 Toulouse, France

^d LRAE (Laboratoire Radio analyses et Environnement), Université de Sfax, Sfax, Tunisia

ABSTRACT

In situ 3D characterization of Aquamarijn microsieves fouling was achieved using Confocal Laser Scanning Microscopy (CLSM). A filtration chamber allowing direct microscopic observation of microbial cell deposition and cake characterization, specially designed for *in situ* observations, was used. Fluorescent dyed *Saccharomyces cerevisiae* yeast suspensions were filtered through 0.8 μm and 2 μm pore diameters silicon nitride microsieves under constant flow rate. The on-line yeasts deposition was recorded and the cake construction was followed layer by layer. Based on the 3D image processing, cake properties (particle arrangement, homogeneity, thickness and porosity). The compressibility of the yeast cake was analyzed. Finally, cake removal efficiency was also studied during microsieve cleaning operation.

© 2014 The Institution of Chemical Engineers. Published by Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Filtration; CLSM; Yeast; Microsieve; Cake; 3D characterization

1. Introduction

Microfiltration of micro-sized particle suspensions has become a standard process in biotechnology, water and wastewater treatment, food and pharmaceutical industries (Zhang et al., 2006). However, the fouling due to the particle cake layer build up on the membrane surface modifies its selectivity and reduces process productivity (Vyas et al., 2000). Even though the mechanisms leading to membrane fouling during filtration are not yet fully understood, macroscopic laws have been developed assuming basic mechanisms taking place such as pore clogging and cake formation. Usually, membranes with pores smaller than the size of the particles to be retained are selected. Therefore, external fouling is generally expected. Cake mass, thickness, porosity, particle size distribution and adhesiveness to the membrane are the main cake properties (Vyas et al., 2000). In order to improve

the membrane process performance and its monitoring, an improved knowledge of the fouling cake characteristics is required. Thus, to better understand these properties and to characterize fouling in real time, accurate non-invasive methods have to be developed. Generally, fouling is studied by monitoring filtration performance parameters. Although this strategy is based at the fouling effects like permeability decrease, flux loss, hydraulic resistance increase... , it does not allow an accurate understanding of the phenomena. Indeed, the interactions between the different feed components, as well as their organization on the membrane surface, are not accessible using the classic fouling study techniques. Toward this end, it is essential to study the membrane surface on line *in situ*. Many non-invasive methods allowing monitoring the cake growth and properties during filtration have been proposed. They can be classified in optical and non optical techniques. Many researchers use laser based methods

* Corresponding author at: Université de Toulouse; INSA, UPS, INP; LISBP, 135 Avenue de Rangueil, F-31077 Toulouse, France. Tel.: +33 561559742.

E-mail address: christine.lafforgue@insa-toulouse.fr (C. Lafforgue).

Received 25 June 2013; Received in revised form 20 December 2013; Accepted 23 December 2013

0960-3085/\$ – see front matter © 2014 The Institution of Chemical Engineers. Published by Elsevier B.V. All rights reserved. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fbp.2013.12.012>

Please cite this article in press as: Ben Hassan, I., et al., Study of the separation of yeast by microsieves: In situ 3D characterization of the cake using confocal laser scanning microscopy. Food Bioprod Process (2014), <http://dx.doi.org/10.1016/j.fbp.2013.12.012>

Nomenclature

θ	static contact angle (-)
μ	the dynamic viscosity of the fluid (Pa s)
ϵ	cake porosity
δ_x	resolution limit of CLSM in x direction (μm)
δ_y	resolution limit of CLSM in y direction (μm)
δ_z	resolution limit of CLSM in z direction (μm)
α_K	Kozeny constant
α_0	fraction of open pores
α_c	fraction of microsieve coverage
λ	excitation source wavelength (nm)
ρ_c	yeast cell density (kg m^{-3})
N_0	total number of pores
N_1	number of open pores
n	refraction index of the medium
N.A.	numerical aperture of the objective lens (μm)
S_c	apparent area of the surface occupied by the cake on the image (μm^2)
S_m	area of the filtrating stripes in the image (μm^2)
J	permeate flux ($\text{m}^3 \text{s}^{-1}$)
L_p^*	permeability reduction
L_p^0	water permeability of the new microsieve ($\text{L h}^{-1} \text{m}^{-2} \text{bar}^{-1}$)
L_p^t	water permeability at a given time of filtration experiment ($\text{L h}^{-1} \text{m}^{-2} \text{bar}^{-1}$)
Q	total flow rate ($\text{m}^3 \text{s}^{-1}$)
Q_0	flow rate with the new microsieve ($\text{m}^3 \text{s}^{-1}$)
Q_{100}	flow rate at membrane coverage equal 100 ($\text{m}^3 \text{s}^{-1}$)
ΔP	transmembrane pressure (Pa)
ΔP_0	pressure drop with the new microsieve (Pa)
ΔP_{100}	pressure drop at membrane coverage equal 100 (Pa)
ΔP_c	cake pressure drop (Pa)
ΔP_{CF}	final cake pressure drop (Pa)
L	pore length (m)
r	pore radius (m)
S_0	area of the filtration region of the microsieve surface (m^2)
S_1	area of the active microsieve surface (m^2)
H_c	cake thickness (μm)
H_{c100}	cake thickness when microsieve coverage equal 100% (μm)
M_{c100}	wet cake mass at microsieve coverage equal 100% (kg)
R_t	total resistance (m^{-1})
R_{t100}	total hydraulic resistance of the filtration system at membrane coverage equal 100 (m^{-1})
R_{c100}	cake resistance at membrane coverage equal 100 (m^{-1})
R_{mc}	resistance of the microsieve in the presence of the cake (m^{-1})
D_T	particle diameter of equivalent sphere (μm)

to characterize the cake (Gowman and Ross Ethier, 1997). Mendret et al. (2007) succeeded to measure the local thickness of the clay cake on hollow-fiber membrane using laser sheet at grazing incidence. However, particle organization on the membrane could not be determined. Moreover, the low resolution this method is a high drawback (Ngene et al., 2010). Li and Sanderson (2002) have used ultrasonic time domain

reflectometry (UDTR) to measure kaolin cakes thickness. In this technique, sound waves permit the evaluation of the fouling layer thickness on the membrane surface.

Additionally, accurate non-invasive observation techniques that enable the cake to be directly visualized could bring information of importance. Direct visualization of membrane and cake surface has then been adapted.

Different cake visualization methods were reported and could be classified into in two groups: in situ and ex situ techniques (Vyas et al., 2000). Ex situ techniques like SEM and AFM ones are powerful methods for autopsying structure of the fouled layer. Indeed, SEM imaging has a high resolution level but this technique requires removal of the membrane covered by the cake from the filtration chamber. The experimental protocol is delicate and complex which is a high potential for experimental error and does not allow the time study the cake growth. AFM permits to obtain 3D images, which provides information about fouling layer (surface roughness, force adhesion...). However, the results depend strongly on the probe used (Meng et al., 2010). In situ observation of the cake has the advantage of continuous monitoring cake deposition during the filtration process. For example, Direct Observation techniques (DO) allow both the monitoring of the fouling layer development and the observation of foulant detachment from the membranes. The observation of the side view of the channel membranes by Ngene et al. (2010) has permitted the measurement of the cake height and the determination of the particle trajectory. However, the main disadvantage of direct observation techniques is that only the top of the fouling layer can be studied.

Recently, a cake direct observation method using a Confocal Laser Scanning Microscope (CLSM) has been developed. This in situ non-invasive fluorescence imaging allows the three-dimensional reconstruction of the fouling layers (Chen, 2004). The laser beam is focused at the focal plane and, thanks to the pinhole, only the emitted fluorescence light from the excited in-focus spot is detected (Meng et al., 2010) which allows the observation of a selected plane at a given depth. Indeed, the main advantage of CLSM is the exclusion of planes out of focus (Ferrando et al., 2005). Moving the sample along the z axis allows different focal planes, at different depths, to be observed. At the end, the stack of the successive images recorded at consecutive depths, permits the 3-dimensional image reconstruction of the whole sample (Ferrando et al., 2005).

The use of fluorescent dye to stain the microbial cells permits to differentiate between the membrane and the cake which allows the study of the particle distribution on the membrane surface. In addition, in the case of mixed species suspensions, CLSM allows the 3D cake visualization and the distinction between the different species by using different fluorochromes (Ferrando et al., 2005). Thus, Beaufort et al. (2011) have suggested that microorganism size and morphology have a strong influence on the organization of pure and mixed yeasts and bacteria microbial cakes. However, the main limitation of this technique is the photobleaching of the stained sample. Indeed, fluorochromes fade irreversibly when exposed to the excitation laser beam. This phenomenon depends on the characteristics of the dye, the laser intensity and the specimen preparation. Moreover, during CLSM observations, the cells surrounding the focal plane are too exposed to the laser excitation light which accelerate their photobleaching (Hughes et al., 2006). Another drawback of CLSM is the limitation of the laser penetration in the cake

Please cite this article in press as: Ben Hassan, I., et al., Study of the separation of yeast by microsieves: In situ 3D characterization of the cake using confocal laser scanning microscopy. Food Bioprod Process (2014), <http://dx.doi.org/10.1016/j.fbp.2013.12.012>

which depends on the concentration and transparency of the particle (Meng et al., 2010), the scattering and absorption of the excitation and emission light (Hughes et al., 2006)... The decrease in fluorescence as a function of cake depth, could make difficult the analysis of thick fouling layers (Meng et al., 2010).

The goals of this study were to develop a CLSM method to perform the characterization of thick biological cakes and to determine the limits of this technique. In this aim, *Saccharomyces cerevisiae* yeast cakes were layer by layer built on microsieves and *in situ* observed using CLSM. Limits of laser penetration in the deposit and image resolution were experimentally determined. The effects of membrane properties on cake build up and filtration performance were studied and cake compressibility was investigated.

2. Materials and methods

2.1. Yeast characteristics, culture media and growth monitoring

The *S. cerevisiae* strain was grown in YPD medium (10 g L⁻¹ glucose, 10 g L⁻¹ yeast extract and 10 g L⁻¹ bacto-peptone, prepared in distilled H₂O) at 30 °C under agitation for 24 h. For each experiment, fresh yeast suspensions were prepared. Cell growth was monitored by measuring the suspensions optical density at 600 nm (spectrophotometer Biochrom Libra S12, England). The cell dry mass was determined after filtration (0.2 μm polyamide membranes, Sartorius) and drying under partial vacuum (48 h, 200 mm Hg, 60 °C) of a known suspension volume. In order to obtain a precise dry mass and to remove extracellular compounds, cells were harvested by centrifugation (11.5 × g, 10 min), then, washed twice by suspending in isotonic solution (9 g L⁻¹ NaCl) and centrifuged one more time under the same conditions. For cell staining, a 10⁻⁴ mol L⁻¹ stock solution in DMSO of Syto 9 fluorochrome (Life technologies, USA) was added to cell sample in order to obtain a final concentration of 5 × 10⁻⁸ mol L⁻¹. The suspension was kept in the dark to avoid bleaching for 60 min. The Syto 9 is a green fluorescent nucleic acid stain which dye live and dead cells and emit at 498 nm (excitation wavelength at 485 nm).

The cell hydrophobicity was determined by the MATS method (Microbial Adhesion To Solvents) as described by Bellon-Fontaine et al. (1996). This method, that gives qualitative information on electron-donating/electron accepting properties of microbial cells, is based on the comparison between the affinity of microorganisms for a monopolar solvent (acidic or basic) and an apolar solvent, both solvents having similar van der Waals properties. Microbial affinity is considered to be the result of interplay of electrostatic, Van der Waals and Lewis acid-base interactions. The following solvents were used: chloroform, hexadecane, ethyl acetate and decane.

Yeast size distribution in suspensions was measured using Laser Diffraction (Mastersizer 2000, Malvern instruments).

2.2. Membrane characterization

The selected silicon nitride microsieves have appeared to be the best compromise in terms of membrane area minimization and permeate flow rate maximization (Ning Koh et al., 2008). Indeed, microsieves are perfectly plane thin membranes of high porosity and permeability, of 25 mm² total area,

Table 1 – Microsieves characteristics.

Pore size (μm)	Pore pitch (μm)	Membrane porosity (%)	Number of pores
0.8	1.6	22.7	2841646
2	3	40.3	808290

6.3 mm² filtration area, with a regular arrangement circular uniform pores (Aquamarjin®) (Fig. 1). Membranes with 0.8 μm or 2 μm diameter pores were used. Microsieves characteristics (Table 1), filtrating stripes (Fig. 1A and B) and pore morphology (Fig. 1C) are displayed. Each microsieve consists of 14 identical filtrating stripes. The sieves were glued to a plastic membrane ship.

2.3. Microsieve physical characterization

Wetting the microsieve before use is a very important step in order to obtain its maximum performance (Gironès et al., 2005). Toward this end, the microsieves were plasma treated with a Plasma Cleaner (Harrick Plasma, Belgium) and wetted with isopropanol before the water characterization tests and the filtration runs. In order to compare unmodified (as received) and plasma treated membrane, the water contact angles were measured with a Goniometer (Digidrop, GBX, France). The sessile drop method was used to determine the static contact angle, θ , of silicon nitride microsieve before and after modification. A high resolution camera and Windrop++ software were used to capture and analyze automatically the contact angle. Only one microsieve was analyzed for each measurement and, because of its small surface, only one drop could be deposited on its surface. Wiping the water drop could change the membrane surface properties or damage the microsieve. The contact angle measurement for a same drop was automatically repeated by the software. These experiments were only performed to confirm the modification expected in the surface properties after the wetting treatment. For this measurement, the microsieves were new ones and they were not used thereafter.

To investigate the decrease of performance of the microsieve after filtration experiments, water fluxes are expressed as permeability reduction, L_p^+ .

$$L_p^+ = \frac{L_p^c}{L_p^0} \quad (1)$$

where L_p^c is the water permeability at a given time of the filtration experiment and L_p^0 the water permeability of the wetted new microsieve. Ultrapure water for flux measurements was obtained with a Millipore purification unit MilliQ plus (0.22 μm).

The hydraulic total resistance to filtrate flow, R_t (m⁻¹), was determined with the Darcy's law:

$$J = \frac{\Delta P}{\mu R_t} \quad (2)$$

where J is the permeate flux (m s⁻¹), ΔP is transmembrane pressure (Pa) and μ the liquid viscosity (Pa s).

2.4. Direct observation filtration chamber and set up

A specific microfiltration chamber (5.18 mm width, 60 mm length, 0.25 mm height) with a glass window in the top plate,

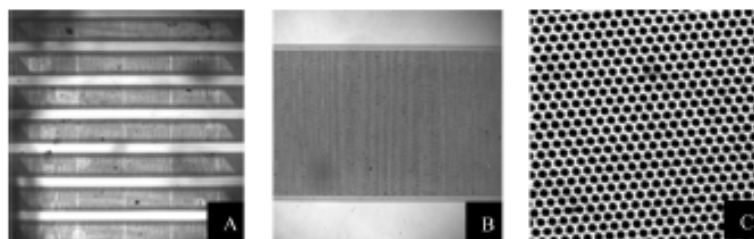


Fig. 1 – CLSM images of a silicon nitride microsieve surface (A) (objective 10×) filtering stripes and details of pores on the stripes (objective 63×), zoom 1 (B) and 6 (C).

allowing direct microscopic observation of particle deposition and cake formation, was used (Fig. 2). The chamber glass coverslip thickness was manufactured as thin as possible to keep a total chamber depth suitable for the working length of the microscope objective. Moreover the glass coverslip should not be deformed when submitted to pressure variations due to fluid flow that limits the size of the window. The chamber was directly set under a CLSM microscope (Leica, Japan) during filtration experiments. Images of the particle deposit on membrane surface were recorded with the Leica CLSM software. The whole filtration set-up (Fig. 2) consisted of two circulation loops with two feed flasks containing respectively deionized water that was circulating in the filtration system and the particle suspension. A pump (Masterflex, Bioblock scientific, USA) and a digital compact vacuum meter (Thyrcot, Germany) were used to monitor the filtration conditions (transmembrane pressure).

2.5. Filtration procedure and CSLM analysis

A new procedure was developed to locate the yeast cell on the microsieves and to analyze the cake build-up, layer by layer. When CLSM is used to analyze the cake morphology, the depth value that can be effectively detected and explored depends on the sample properties. Indeed, Beaufort et al. (2011) have reported that, for a compact deposit of self-fluorescent yeast, only the upper 30 μm could be observed. In order to overcome such limitation, the cake was formed layer by layer thanks

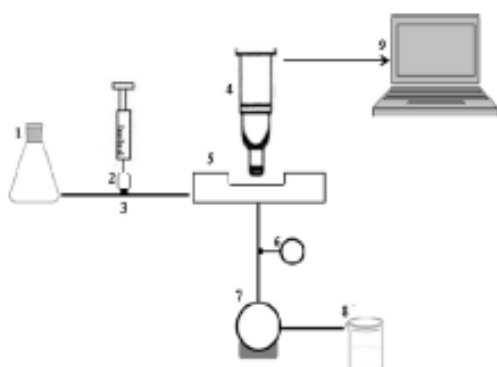


Fig. 2 – Schematic illustration of the microfiltration set-up ((1) deionized water feed flask, (2) particle feed flask, (3) three way valve, (4) CLSM microscope, (5) filtration chamber, (6) numeric manometer, (7) pump, (8) permeate outlet, (9) PC).

to successive injections of the yeast suspension. Observations were performed for each injection, in order to realize an accurate analysis of the cake build-up mechanisms and deposit properties. CLSM observations were performed on a confocal scanning laser microscope (LEICA SP2, DMRX2) equipped with detectors and filter sets. Firstly, the microsieve was placed in the experimental chamber which was set under the microscopic objective and connected to the deionized water feed flask. Water was circulated, in dead end filtration mode, thanks to a pump (Masterflex, Bioblock scientific, USA) mounted on the permeate line and the clean membrane water permeability was measured. Transmembrane pressure was determined by a digital compact vacuum meter (Thyrcot, Germany) placed upstream the pump. When the pressure was stable, the permeate flow rate was measured by weighing the permeate volume collected during a few minutes (triplicates measurements). The CLSM was first used in bright light mode to select the position of the z-axis corresponding to microsieve surface and to verify its flatness. Fig. 1 shows that it is possible to clearly discern the microsieve pores. In bright field mode, the maximum amount of light is reflected when the observed surface, which is the membrane top, is on the focal plan. In order to have a homogenous deposition of microorganisms, the microsieve surface has to be completely flat. The z positions of different membrane segments are compared. Just before observation, a known concentration of fluorescent yeast suspension ($1.39 \times 10^{-3} \text{ g L}^{-1}$ on the 0.8 μm microsieve and $2.84 \times 10^{-3} \text{ g L}^{-1}$ on the 2 μm microsieve) was placed in the feed flask. This suspension was then flowed to the membrane by opening the three-way valve while the permeate volume was measured. Microscopic observation was, simultaneously, done in both bright light and fluorescent modes. The cell deposition on the microsieves was observed with an 10× objective (x, y, t). Then, the fouled membrane was analyzed with the 63× objective in zoom 1 and 6. CLSM images consist of successive thin slices of the cake parallel to the microsieve (xy plane) along the z axis. Two scans of every image were performed to obtain a good resolution. The z-series or stacks of recorded images, were distanced of 0.32 μm. After image recording, another volume of the suspension was injected and the same procedure was repeated. The filtration runs were operated in dead end mode at a constant rate. At the end of the filtration experiment, in order to analyze the cake compressibility, the transmembrane pressure was step by step increased while the position of the top of the cake was determined.

2.6. Image analysis

The recorded high resolution images were processed using Image J (1.45s downloaded from <http://rsb.info.nih.gov/ij/>).

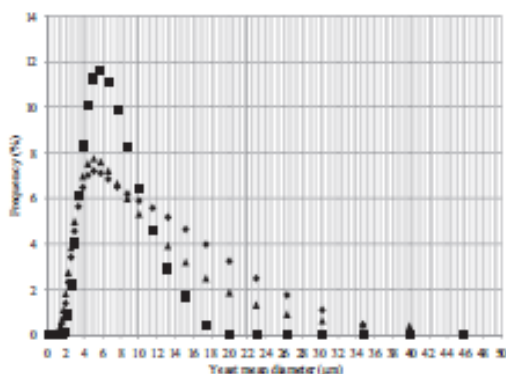


Fig. 3 – Distribution of the mean yeasts diameter (measurement of about 200 cells) in different growth stage (▲ lag phase, ◆ exponential phase, ■ stationary phase).

The optical sections captured in the reflection and fluorescence modes could, thus, be visualized, simultaneously, in order to localize the yeast cells on the microsieves. To process CLSM images, pictures were automatically calibrated from the voxel sizes (depth, width and length) and converted to grayscale images. Then, they were segmented into background and foreground by setting a threshold.

The percentage of the microsieve area recovered by cells, named microsieve coverage, α_c , is given as:

$$\alpha_c = \frac{S_c}{S_m} \times 100 \quad (3)$$

S_c is the apparent area of the surface occupied by the cake on the image and S_m is the area of the filtrating stripes in the image.

The image stacks in the fluorescence mode were projected to show the top down view of the filtration cake. The thickness of the cake could be determined using different methods. One of them, used by many authors, consisted in a direct measurement of the cake thickness at random locations in the profile view of the cake 3D image (Hughes et al., 2006). In the present work, the stack of CLSM images was processed to accurately determine the maximal thickness of the cake. Furthermore, this program was also applied to 3D stack reconstruction.

2.7. Optical and epifluorescence microscopy

Microscopic checking of the microsieve before filtration runs was performed with an optical microscope (Nikon eclipse LV 100). The microsieve surface before and after cake removal was visualized with an epifluorescence microscope (Leica DM 4000 B).

3. Results and discussion

3.1. Physicochemical properties of yeast and microsieves

For a better interpretation of the filtration runs and the cake build up, the yeast suspension should be as homogenous as possible. The yeast cell size distribution (Fig. 3) exhibited a large range of sizes, in particular during the "lag phase" and the "exponential phase". Indeed, small cells were young cells

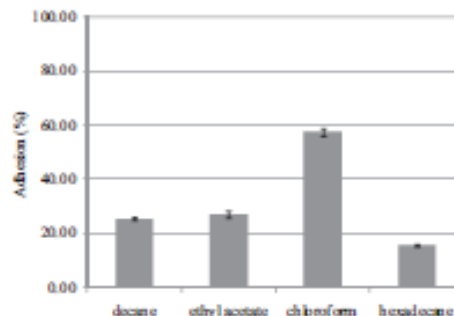


Fig. 4 – Adhesion of *Saccharomyces cerevisiae* to various solvent water interfaces.

just detached from the mother cell, while large cells should correspond to budding cells that were considered as a unique cell. This was confirmed by microscopic observations (not shown here). Therefore, in order to work with cell suspensions as uniform as possible during the filtration runs, the cells were always harvested in the stationary phase (24 h).

The MATS results obtained for *S. cerevisiae*, harvested at the stationary phase, are shown in Fig. 4. The cell affinity was always higher with chloroform (electron acceptor solvent) than with hexadecane (apolar solvent). From these results, it could be deduced that the yeast had an electron donor character. Moreover, as the cell surfaces hydrophobicity was estimated by the affinity to hexadecane, it could be deduced that *S. cerevisiae* cell surface was rather hydrophilic (lower affinity to hexadecane). These results were in agreement with previously described (Guillemot et al., 2006).

As prescribed by the microsieve manufacturer, a wetting treatment was applied on the microsieves to homogenize and hydrophilize their surface and activate the pores. The contact angles were measured before and after wetting treatment. The static contact angle decreased from 75 to 22 and from 83 to 33 for the 2 μm and 0.8 μm microsieve, respectively. These strong differences clearly exemplifies the high importance of the wetting treatment prior to microsieves use as previously described by Gironès et al. (2005). Moreover, the 2 μm pore size microsieve appeared slightly more hydrophilic than the 0.8 μm pore size one. To assess the wetting efficiency, the number of open pores, i.e. activated pores, N_1 , was calculated and compared to the constructor data, N_0 . Then, the fraction of open pores (α_0) is defined as follows:

$$\alpha_0 = \frac{N_1}{N_0} \quad (4)$$

Usually used Hagen-Poiseuille equation assumes a pore radius lower than the pore length. Actually, that was not the case of the used microsieves ($L = 0.9 \mu\text{m}$) and this calculation was inadequate. Considering circular pores with finite thickness (l) and diameter (d) (Kuiper et al., 1998) the flow could be more rigorously calculated as:

$$Q_0 = \frac{d^3 N_1 \Delta F_0}{24 \mu} \left(1 + \frac{16L}{3\pi d} \right)^{-1} \quad (5)$$

where ΔF_0 and Q_0 were the pressure drop and the flow rate measured at the beginning of the filtration run with ultrapure water (Van Rijn, 2004).

Table 2 – Wetted microsieves characteristics.

Sample	Microsieve 2 μm	Microsieve 0.8 μm
a_0	0.46	0.82
S_1 (m ²)	2.91×10^{-4}	5.14×10^{-4}

The first term in Eq. (5) stand for the resistance of the pore in an infinitely thin membrane and the second one denoted a correction for a finite wall (Kuiper et al., 1998). Then, the area of the active microsieve surface S_1 (m²) was defined as:

$$S_1 = a_0 S_0 \tag{6}$$

where S_0 (m²) was the filtration area of the microsieve (filtrating stripes) given by the constructor.

Results reported in Table 2 were exhibiting very low values for the fraction of opened pores. This would probably influence the deposit of the first yeast layer at the surface of the microsieve.

3.2. CLSM limits

Even if cake characterization by CLSM is becoming a very useful technique, the quality of the results is drastically influenced by the ability of the laser to penetrate the sample. The main relevant parameters are: sample transparency, laser diffraction and fluorescent dyes quality (Meng et al., 2010). Furthermore, as reported by Marroquin et al. (2011), both the sensitivity and the resolution of the detection diminish with cake increasing depth, as less emitted light reaches the detector. Fig. 5 shows the evolution of the fluorescence signal of a yeast cake deposit on a microsieve. The top of the membrane was taken at $z=0$. It could be noticed that the fluorescence signal weakened as the cake thickness increased. Only about 30 μm of the top of the cake could be investigated. A similar value of laser penetration limitation was given by Beaufort

et al. (2011). This limitation, also reported by Meng et al. (2010), can affect the accuracy of cake characterization. To avoid this drawback in the present work, the cake was build up layer by layer by successive injections of the suspension. The concentration of the suspension and the volume of each injection were chosen in order that the thickness of the subsequent cake layer remained always lower than the maximal depth for laser penetration. During the filtration runs, the pump was not stopped between each injection to maintain pressure drop and deionized water flow through the cake. This strategy was expected to maintain the hydrodynamic forces exerted on the cake as during conventional filtration process. Moreover, we could take benefit of these particular experimental conditions to scan with CLSM each cake layer after the injection of a new suspension volume.

The other major concern of CLSM technique is the resolution. Two objects of two equally bright spots could be resolved if the distance between them is equal or larger than the value of resolution (Marroquin et al., 2011). The resolution limit of CLSM: $\delta_x, \delta_y, \delta_z$ in the x, y, and z direction, respectively, can be estimated using the following equations:

$$\delta_x = \delta_y = 0.61 \frac{\lambda}{\sqrt{2}(N.A.)} \tag{7}$$

$$\delta_z = 0.61 \frac{1.4n\lambda}{(N.A.)^2} \tag{8}$$

where λ is the excitation source wavelength, (N.A.) the numerical aperture of the objective lens and n the refraction index of the medium.

For the cake characterization, a 63× water immersion objective with (N.A.) 0.9 was used. The excitation source wavelength of the laser used to excite the Syto 9 was 488. These data gave a theoretical resolution limit $\delta_x = \delta_y = 0.23 \mu\text{m}$ and $\delta_z = 1.12 \mu\text{m}$. As the microsieves will only be observed in the xy plane, the pores of the 0.8 μm would be well resolved. Concerning the yeast cake, only cells separated by distances larger than these resolution limits could be resolved. These limits were the main limitation of CLSM.

3.3. Effect of pore size on cake build up

In any in situ cake characterization technique, only a sample of the membrane surface can be scrutinized. The choice of this surface sample can be critical since it is expected to represent what happens on the whole membrane surface. In other words, it is necessary to assume that the cake is homogeneous all along the membrane. But this is not always true. For instance, Mendret et al. (2007) showed that a spatially non uniform cake can take place along a long flat membrane (28 cm) supposed to work in frontal conditions.

In the present study, the selected membranes were microsieves of very small surface area with a regular arrangement of perfectly cylindrical pores (Bikel et al., 2010). Furthermore, the filtration chamber was specially designed to have a uniform frontal flow through the membrane, to get the construction of a homogenous cake. Preliminary numerical simulations were performed to demonstrate that the cake was uniformly distributed over the membrane after a certain time of filtration since membrane hydraulic conductivity was extremely lower than channel hydraulic conductivity (Ben Hassan et al., 2013). Fortunately, we have further experimentally verified this assumption. The direct observation of

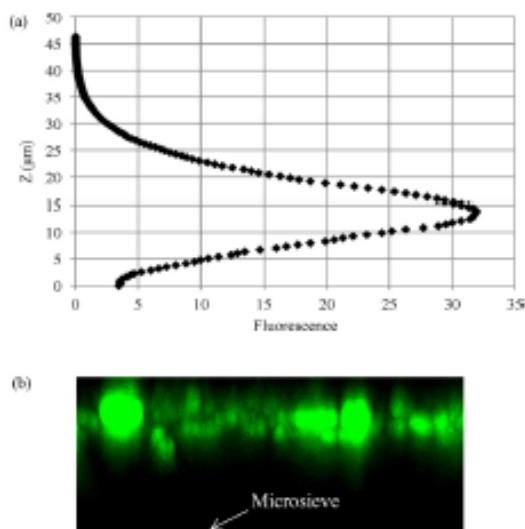


Fig. 5 – (A) Evolution of fluorescence signal of yeast cake on 2 μm microsieve vs. channel thickness, (B) yz view of the stack projection of a 111 μg yeast cake on a 2 μm microsieve (objective 63×, zoom 1).

Please cite this article in press as: Ben Hassan, I., et al., Study of the separation of yeast by microsieves: In situ 3D characterization of the cake using confocal laser scanning microscopy. Food Bioprod Process (2014), <http://dx.doi.org/10.1016/j.fbp.2013.12.012>

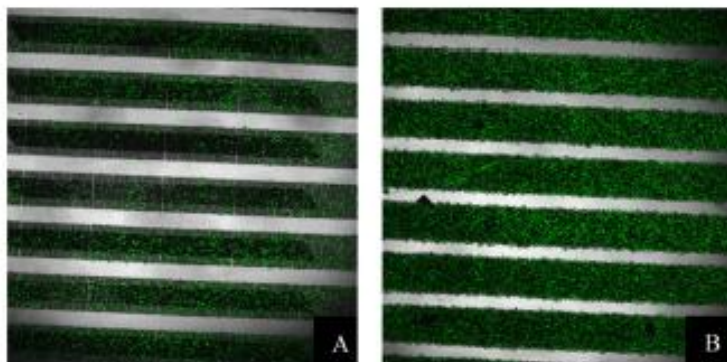


Fig. 6 – Time-lapse series of composite images of microfiltration cake formed by $2.84 \times 10^{-3} \text{ g L}^{-1}$ suspension of Syto 9 labeled yeast on $2 \mu\text{m}$ pore size microsieve at (A) 2 min and (B) 14 min. (objective $10\times$).

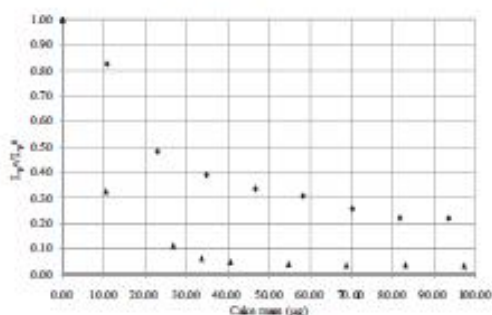


Fig. 7 – Fouling caused during the dead end microfiltration of *Saccharomyces cerevisiae* on $0.8 \mu\text{m}$ (◆) and $2 \mu\text{m}$ (▲) pores diameter microsieves: permeability reduction vs. cake mass.

yeast deposition on the microsieve vs. time (Fig. 6) has shown that the cell deposition was macroscopically homogeneous all over the microsieve filtration field. The yeast seemed to deposit randomly in the observation area. No noticeable long range particle/membrane interaction was observed and no large yeast cell aggregates seemed to deposit. As observed by Hughes et al. (2006) during the filtration of washed fluorescent labeled yeast suspensions on a $0.22 \mu\text{m}$ membrane, individual cells could be seen and they were randomly distributed over the microsieve (Fig. 6). Moreover, no rearrangement could be observed; cells stayed where they were deposited. As expected, after a certain amount of particles were deposited, a

uniform cake layer was formed on top of the filtrating stripes. In addition, it could therefore be assumed that this operating procedure was consistent to simulate the cake obtained during a conventional filtration process.

To study thicker cakes which are commonly encountered in most applications and to understand the mechanisms of cake build up on the top of the microsieve, a cake is build, layer by layer, by successive injections of the yeast suspension. The filtration runs were conducted at constant permeate flow rate. The fouling was monitored by the decrease of the membrane hydraulic permeability which was comparable to that obtained with ultrapure water. In Fig. 7, the variations of permeability reduction with dry cake mass were plotted for the two microsieves. The L_p gradually decreased due to the deposition of cells on the membrane surface. The permeability reduction appeared to be 0 lower for the $8 \mu\text{m}$ pore diameter microsieve. To understand what really happened at the microscale level, i.e. cell level, a special attention was paid to the first layer formation.

As shown in Figs. 8A and 9A, the first deposited yeast cells seem to be always centered over one pore. It means that they follow the flow streamlines until they make contact with the membrane due to direct interception. The contact point is necessary close to one pore since each flow streamline passes through one pore. Then they snap to the closest pore meaning that cell/membrane physico-chemical interactions are weak. In the following, we will consider that the pore blocked by a cell becomes completely closed, i.e. the fluid cannot longer flows through the pore. Moreover, it can be seen in Figs. 8A and 9A that a certain number of surrounding pores are kept protected by the aforementioned cell deposited. Indeed, no other cell

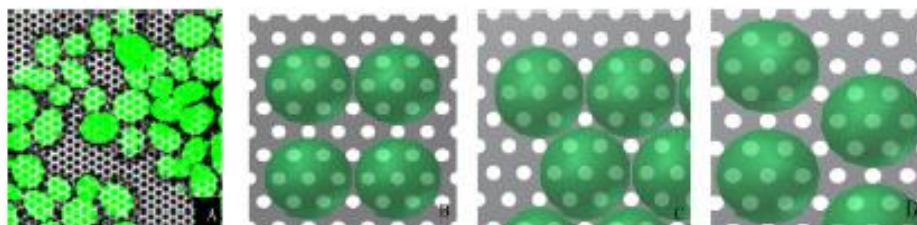


Fig. 8 – Composite image of a $0.8 \mu\text{m}$ pore size microsieve (A) fouled with *Saccharomyces cerevisiae* (objective $63\times$, zoom 6) and its schematic representations (B–D).

Please cite this article in press as: Ben Hassan, I., et al., Study of the separation of yeast by microsieves: In situ 3D characterization of the cake using confocal laser scanning microscopy. Food Bioprod Process (2014), <http://dx.doi.org/10.1016/j.fbp.2013.12.012>

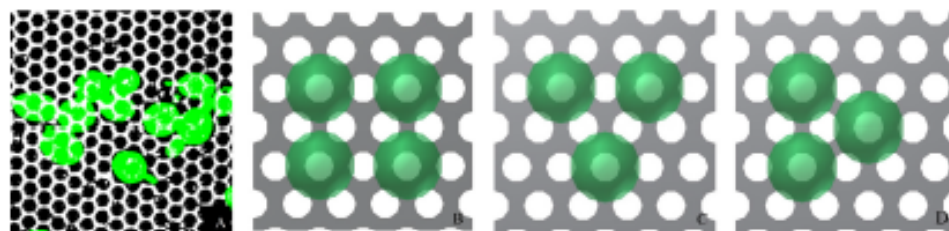


Fig. 9 – Composite image of a 2 μm pore size microsieva (A) fouled with *Saccharomyces cerevisiae* (objective 63 \times , zoom 6) and its schematic representations (B–D).

Table 3 – Effect of pore size on the theoretical fraction of open pores after the first layer deposit.

Microsieve	0.8 μm microsieve			2 μm microsieve		
	Fig. 8B	Fig. 8C	Fig. 8D	Fig. 9B	Fig. 9C	Fig. 9D
α_1	0.92	0.89	0.92	0.75	0.75	0.66

can snap to these surrounding pores. This mechanism is more clearly exemplified in the schemes of Figs. 8B–D and 9B–D. The cells are assumed spherical for simplicity. It can, thus, be deduced that the organization of the cells in the first cake layer mainly depends on the geometrical properties of the microsieve (pore size, pitch and pore arrangement). As can be seen in the schematic representations of Figs. 8 and 9, different types of cell arrangements can be considered for each microsieve type (0.8 μm or 2 μm pore size). Then, the fraction of open pores after the building of the first layer of cells deposited, named α_1 , can be calculated using these schematic representations. The different α_1 values are given in Table 3. The fraction of pores remaining open has appeared to be always lower for 2 μm microsieve than for 0.8 μm one which was confirmed by the CLSM observations. This could explain the large difference between the two curves of permeability reduction vs. the mass deposited plotted in Fig. 7. Of course these assumptions are based on a simplified scheme of what could really happen during the construction of the first layer of cells on the membrane. Indeed, some cells were probably intercepted by one or several cells already deposited

before the end of the complete building of the very first layer. However, this analysis was consistent with the observation at the local scale (CLSM images) and the measurements at the macroscopic scale (permeability reduction).

3.4. Scenario of multilayer cake formation

The evolution of microsieve coverage and permeability reduction with cake mass for the 0.8 μm and 2 μm microsieves are presented in Fig. 10. The microsieve coverage increased rapidly at the beginning of filtration and then, reached an asymptotic value as the mass of yeast injected was high. Even though it is well known that permeability reduction is caused by the deposition of yeast cells on the microsieve, the images of cake formation in Figs. 11 and 12 clearly demonstrates that cake growth was directly correlated to permeability reduction. These observations were similar those of Hughes et al. (2005) during the filtration of fast dried yeast with two-photon femtosecond near infrared non-linear optical microscopy. However, in that study, the authors could not observe the membrane. Now look carefully at the cell deposit scenario

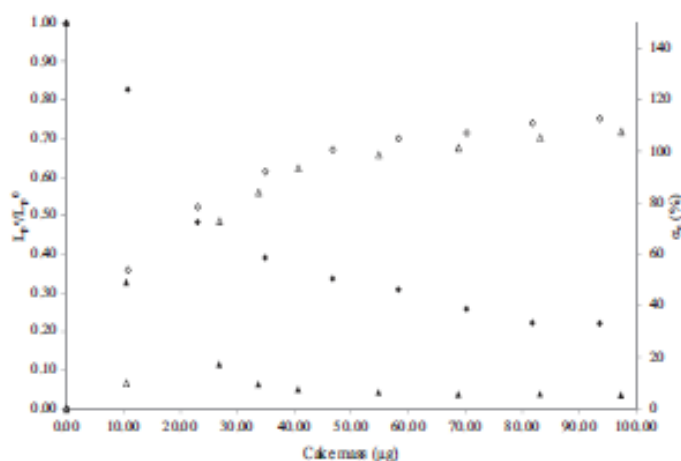


Fig. 10 – Evolution of the permeability reduction and the percentage of coverage of the 0.8 μm (♦, ◊) and 2 μm (▲, △) microsieves fouled by *Saccharomyces cerevisiae* vs. cake mass.

Please cite this article in press as: Ben Hassan, I, et al., Study of the separation of yeast by microsieves: In situ 3D characterization of the cake using confocal laser scanning microscopy. Food Bioprod Process (2014), <http://dx.doi.org/10.1016/j.fbp.2013.12.012>

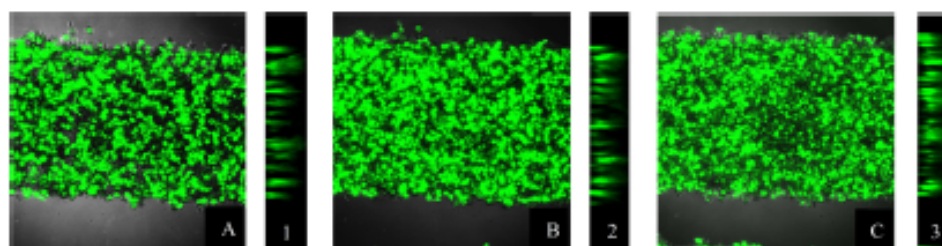


Fig. 11 – Series of composite images of microfiltration cake formed by *Saccharomyces cerevisiae* suspension on $2\ \mu\text{m}$ microsieve: representative top down views (A) $27\ \mu\text{g}$, (B) $55\ \mu\text{g}$, (C) $97\ \mu\text{g}$ and corresponding xz views (1, 2, 3) (objective $63\times$, zoom 1).

illustrated in Figs. 11 and 12. The cells were deposited progressively on the filtrating stripes of the microsieve until the whole filtrating fields were recovered. The microsieve consisted of 14 parallel filtrating stripes separated by non-filtrating stripes as shown in Fig. 1. At the very beginning of the filtration, the biological particles deposited progressively on the pores of the filtrating stripes to form the first particle layer. Indeed, yeast cells were transported by fluid flow toward the pores of the microsieve as already explained in Section 3.3. Then, the cake thickness increases proportionally to the mass deposited until a thick multilayer cake was accumulated on the filtrating stripes. At this final stage of filtration, the whole filtration field is covered by the cake and the microsieve coverage reaches 100%. Once a cake multilayer was accumulated in the filtrating stripes, some yeast cells could also be observed between the stripes, i.e. in the non-filtrating surface of the microsieve, close to the stripes. The space between them shrank progressively and microsieve coverage exceeded 110%. Cells were still transported toward the filtrating stripes but they preferentially arrived at their edges where the hydraulic resistance was the weakest. They get in touch with the already aggregated cells and, were then, captured and accumulated on the non-filtrating surface and the cake thickness reached an asymptotic value. Consequently, it could be noticed that the cake thickness was roughly proportional to mass deposited between 20 and $70\ \mu\text{g}$ and move toward an asymptotic value beyond this point. Indeed, at this step of filtration, the permeability reduction also leveled off as can be seen in Fig. 10.

Let now examine the cross-sections (yz plane) of the cake (Figs. 11 and 12). The cake appeared to be roughly of uniform thickness as far as cell deposition was exclusively on the filtrating stripes (case 1 and 2). But the shape of the cake surface tended to become rounded when cells were also accumulating in the non-filtrating region at the edge of the stripes. It could

be noted that the cake seems to be homogeneous. This will be evaluated in Section 3.6 by the study of cake characteristics.

3.5. CSLM 3D reconstruction

Recall that CSLM technique consists of the capture a stack of cross-section (xy planes) images at different Z values. Image J 3D viewer is used to generate a 3D reconstruction from this stack. In Fig. 13, two composite images made from the microsieve observation in bright field mode and the cake 3D reconstruction in fluorescence mode can be seen. They show two cakes formed on a $0.8\ \mu\text{m}$ microsieve at different times of filtration associated with different mass of cells deposited. This representation is a useful tool to get a realistic view of the cake formed by the accumulation of yeast cell at the membrane surface and, in particular, to better visualize its morphology. It is, thus, confirmed that yeast cells were accumulating randomly throughout the filtering stripes of the microsieve and progressively formed a cake which looked qualitatively homogeneous as suggested in Section 3.4. Analog results were obtained in the case of filtration on a $2\ \mu\text{m}$ microsieve (not presented here).

3.6. Cake characterization

3.6.1. Measurement of cake thickness by image processing

The cells were gradually accumulating on the membrane surface to form a cake. The cake thickness was determined after each step of suspension injection by image processing using Image J software. At first, each image was automatically calibrated and thresholded. Then, the cake thickness was measured by the plot z axis profile plugging. It was defined as the z-coordinate of the higher fluorescent pixel. Fig. 14 combines the macroscale information obtained from

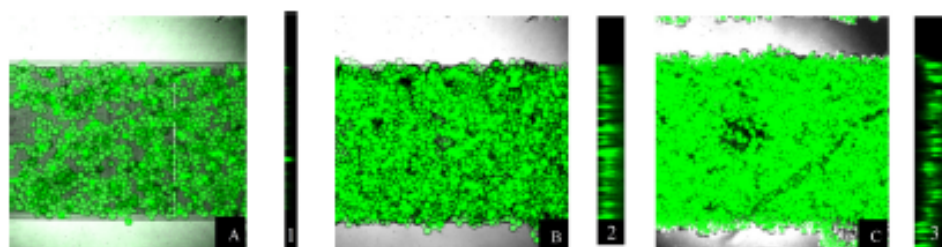


Fig. 12 – Series of composite images of microfiltration cake formed by *Saccharomyces cerevisiae* suspension on $0.8\ \mu\text{m}$ microsieve: representative top down views (A) $11\ \mu\text{g}$, (B) $35\ \mu\text{g}$, (C) $93\ \mu\text{g}$ and corresponding xz views (1, 2, 3) (objective $63\times$, zoom 1).

Please cite this article in press as: Ben Hassan, I., et al., Study of the separation of yeast by microsieves: In situ 3D characterization of the cake using confocal laser scanning microscopy. Food Bioprod Process (2014), <http://dx.doi.org/10.1016/j.fbp.2013.12.012>

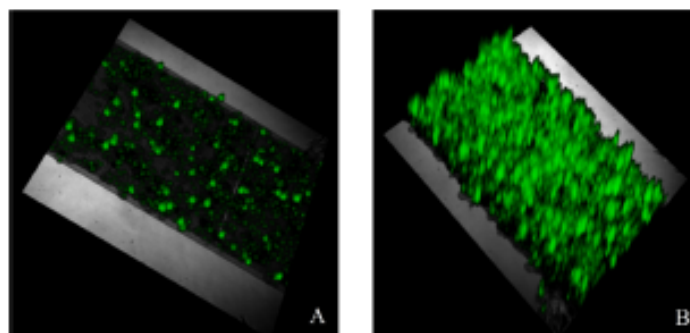


Fig. 13 – Composite image of 3D construction microfiltration cake formed by *Saccharomyces cerevisiae* suspension on 0.8 µm pore size microsieve at cake mass (A) 11 µg and (B) 35 µg (objective 63x, zoom 1).

pressure drop measurements (permeability reduction) and the microscale information obtained from image processing (cake thickness) for the filtration of yeast cells on the two microsieves. The shapes of the cake thickness curves vs. cake mass for the two filtration runs were similar: the fast increase at low cake mass, slowed down to reach an asymptotic value at the highest cake mass. In parallel, the shape of the permeability reduction vs. cake mass curves was converse: a continuous decrease of the rate of reduction from a high value at low cake mass to an asymptotic value at high cake mass. It was the direct consequence of cell accumulation and organization on the filter surface as already discussed in Sections 3.3–3.5.

3.6.2. Cake resistance

As the mass of deposited yeast was increased, the resistance of the cake should be modified. According to the cake resistance model (Eq. (9)), the membrane flux (J) is related to the flow resistance

$$J = \frac{\Delta P}{\mu R_t} = \Delta P \cdot I_P \quad (9)$$

where R_t the total resistance (m^{-1}) (cake resistance + microsieve resistance). The total resistance vs. cake

mass for the two microsieves is plotted in Fig. 15. The study of cake resistance is actually only relevant for a homogenous cake. At the early stage of filtration, only a fraction of the pores are plugged and no cake layer is totally formed. Until the microsieve coverage reach 100% (vertical line), the plot of total resistance vs. cake mass is linear. It can be deduced that the cake could be considered incompressible. This will be deepened in Section 3.7. The total resistance increased as the mass of deposited yeast was increased. This is due to the thickening of the cake on the membrane surface which causes more resistance to the passage of the fluid. Once the microsieve coverage reach 100% and cells began to deposit on the non filtration field, the formed cake is no more considered homogenous.

3.6.3. Cake porosity

For the moment, it is still unrealistic to accurately calculate the cake porosity from image processing. Indeed, the resolution of CLSM images in terms of fluorescence level variations is unfortunately too low. Then, we have developed two indirect methods to determine the cake porosity of multilayer cakes. We have, already, discussed the shape and the location of the cake at the end of the filtration runs mainly in Section 3.4. In particular, we have demonstrated that the cake was spread

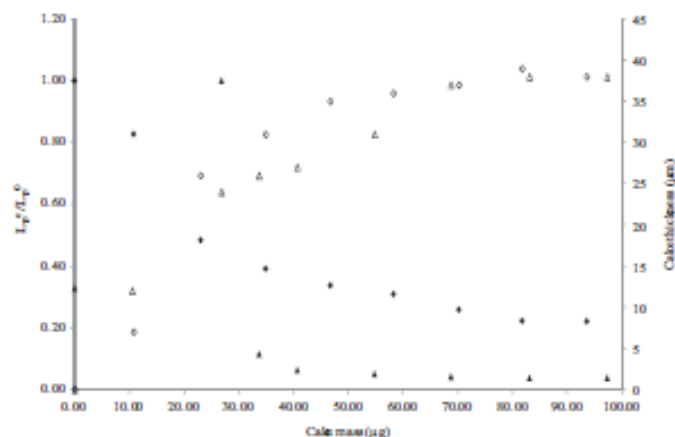


Fig. 14 – Evolution of the permeability reduction (full symbols) and cake thickness (empty symbols) for the 2 µm (▲, △) and 0.8 µm (●, ○) microsieve, respectively.

Please cite this article in press as: Ben Hassan, I., et al., Study of the separation of yeast by microsieves: In situ 3D characterization of the cake using confocal laser scanning microscopy. Food Bioprod Process (2014), <http://dx.doi.org/10.1016/j.fbp.2013.12.012>

over the non-filtrating region between the filtrating stripes of the microsieve. Moreover, the shape of cake surface tended to become rounded. Therefore, we have to determine the cake porosity before the step of cake spreading.

We, thus, assume that cake surface was no longer rounded but flat. Subsequently, the cake was considered as uniform all over the filtrating stripes. Then, the total volume of the cake was $S_0 H_{C100}$ where H_{C100} was the cake thickness when microsieve coverage was equal to 100%. This was corresponding to cake mass of 47 μg and 55 μg on the 0.8 μm and 2 μm microsieves, respectively.

According to a first method, quite simple, the cake porosity, named ε , was calculated from cake thickness and corresponding wet cake mass as:

$$\varepsilon = 1 - \frac{M_{C100}}{S_0 H_{C100} \rho_C} \quad (10)$$

where M_{C100} was the wet cake mass at microsieve coverage equal 100% (kg) and ρ_C the yeast cell density (kg m^{-3}). Also reported by [Vyas et al. \(2000\)](#), this method gives the following cake porosity values: 38% and 18% for the 0.8 μm and 2 μm microsieves, respectively. Although these results seem to be qualitatively consistent according to the assumptions made in previous sections, however, the values of the two cases were quite different. The reason why a same yeast suspension would lead to cakes with different morphology is still unclear, maybe this could be linked to the characteristics of the first cake layer as discussed in Section 3.3. Moreover, this simple method is expected to be inaccurate since significant errors could exist to estimate wet cake mass from the cell dry mass since water content can vary from 3 to 5 g/g dry wet.

The second method was based on well-known Carman Kozeny equation which could be expressed in terms cake resistance, R_{C100} (m^{-1}), at membrane coverage equal 100% as:

$$R_{C100} = \frac{\alpha_K H_{C100} (1 - \varepsilon)^2}{D_p^2 \varepsilon^3} \quad (11)$$

where D_p was the particle diameter of equivalent sphere and α_K the Kozeny constant. Assuming that yeast cells were almost spherical led to α_K equals 180.

Then, the R_{C100} value that was required to get cake porosity was deduced from the total hydraulic resistance of the filtration system R_{t100} obtained by the measurements of the flow rate Q_{100} and the net pressure drop ΔP_{100} at membrane coverage equal 100% as:

$$R_{t100} = \frac{\Delta P_{100} S_0}{\eta Q_{100}} \quad (12)$$

According to the classical resistance-in-series model, the total hydraulic resistance could be given by the following addition:

$$R_{t100} = R_{mC} + R_{C100} \quad (13)$$

At this stage recall that only a fraction of the pores of the microsieves remained open due to (i) imperfect wetting and (ii) pore plugging. Then, R_{mC} could be calculated using Hagen-Poiseuille equation as:

$$R_{mC} = \frac{\Delta P_0 S_0}{\mu Q_0 \alpha_1} \quad (14)$$

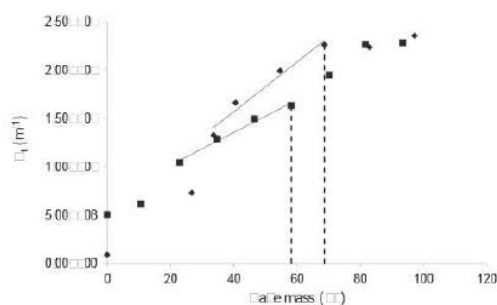


Fig. 15 – Evolution of the total resistance for the 2.0 mm (\square) and 0.8 mm (\circ) microsieves.

Table 4 shows the effect of pore size and α_1 on hydraulic resistances and cake porosity. It can be noticed that the 0.8 μm microsieve had a resistance R_{mC} about ten time higher than the 2 μm one, mainly due to the respective geometrical characteristics of the two microsieves (pore size and number of pores). As can be expected, the decrease of the fraction of open pores after the cake first layer could lead to the increase of the membrane resistance in the presence of the cake. The cake porosity values were of the same order meaning that the geometrical characteristics of the microsieve have no significant impact on multilayer cake morphology. However, recall that a number of approximations were made to achieve these results such as: uniform cake surface, spherical cells and pore plugging. Nevertheless, the results were in good agreement with the results of [Beaufort et al. \(2011\)](#). Indeed, they found that 30 μm thickness *S. cerevisiae* cakes had a porosity varying between 0.09 and 0.13 on 0.2 μm membrane.

3.7. Pressure effect on the cake morphology

The influence of cake compressibility on filtration performances have been discussed in many papers. In dead-end filtration, the pressure gradient causes a viscous drag at the particle/fluid interface and the cake packing structure reach a new stable structure ([Foley, 2006](#)). In the case of biological cakes, two mechanisms could occur: cells rearrangement in the cake and/or deformation or reorientation ([Meireles et al., 2004](#)). This will cause a modification in cake porosity, thickness... ([Foley, 2006](#)). [Meireles et al. \(2004\)](#) have studied the effects of pressure on the compressibility of yeast cells cake. Observations of a yeast suspension during a slow drying process show a cell deformation by flattening in regions of cell/cell contact while remaining rounded elsewhere which cause a compact arrangement. However, these observations were not made during filtration. They only show the principle that cells deform ([Foley, 2006](#)). During centrifugal technique, the rapid relaxation of the cell bed once compression is stopped makes it no conclusive. According to [McCarthy et al. \(2002\)](#) rearrangement of cells in the filter bed is the most likely mechanism. They investigated the effect of cell morphology on cake compressibility of *Kluyveromyces marxianus*, and found that the compressibility noticed in the literature with more elongated cells reflect the greater number of orientations available to non-spherical particles. In this study, compression/release tracking pressure experiments have been done with increase and then decrease of the pressure. The effect of pressure on cake thicknesses is shown in [Figs. 15 and 16](#) for the 0.8 μm

Table 4 – Effect of pore size and α_1 on hydraulic resistances and cake porosity.

	0.8 μm microsieve		2 μm microsieve	
	$\alpha_1 = 0.92$	$\alpha_1 = 0.89$	$\alpha_1 = 0.75$	$\alpha_1 = 0.66$
R_{mc} (m^{-2})	2.1710 ⁶	2.2310 ⁶	2.3810 ⁷	2.7110 ⁷
R_{c10} (m^{-2})	1.2710 ⁶	1.2610 ⁶	2.0010 ⁶	2.0010 ⁶
Cake porosity (ϵ)	0.12	0.12	0.10	0.10

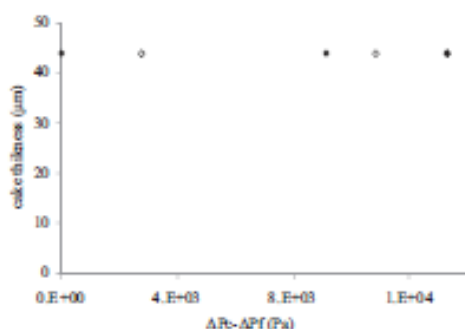


Fig. 16 – The effect of pressure on the thickness of 320 μg yeast cake deposit on 0.8 μm microsieve (●: pressure up, ○: pressure down).

and the 2 μm microsieves, respectively. The pressure gradient applied on the cake was calculated as follows:

$$\Delta P_C = \Delta P - \frac{\mu R_{mc} Q}{S_0} \tag{15}$$

In the objective to examine the effect of an overpressure on cake compressibility, an increase of pressure was applied at the end of the filtration runs ΔP_F . In order to study the cake properties independently of the microsieve properties, the pressure drop across the cake was determined. As the fouling take place, the R_{mc} would increase. The cake pressure drop would reflect the degree of fouling (Foley, 2006). Meireles et al. (2004) reported that the first cake layer was exposed to the highest compressive deformation which will lead to increase pore blocking. Results in terms of H_C vs. $(\Delta P_C - \Delta P_{Cr})$ are plotted in Figs. 16 and 17 for the two cases studied. It seems that overpressure had no effect on cake thickness in the applied range of overpressures. This was in accordance with the low values of cake porosity estimated in Section 3.6.

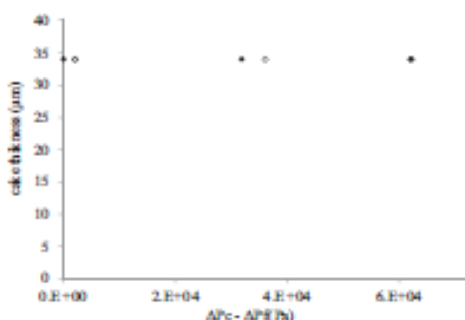


Fig. 17 – The effect of pressure on the thickness of 178 μg yeast cake deposit on 2 μm microsieve (▲ pressure up, △ pressure down).

Yeast cells thus appeared to be (i) incompressible and (ii) definitely immobile in the cake as soon as they were captured. Several hypotheses could explain the cake incompressibility. Smith et al. (2000) studied the cell/wall mechanical properties of *S. cerevisiae* and showed that yeast cell populations strengthen as they enter in the growth stationary phase by increasing wall thickness which may leads to decrease or suppress cell compressibility. However, cell properties were not constant neither during fermentation nor storage. Then, the filtration cakes characteristics could depend on the cell age (Foley, 2006). For instance, Okamoto et al. (2001) found that the specific cake resistance doubled when *E. coli* cultures were aged for 12 h after glucose depletion.

3.8. Cake removal

In the case of microbial suspensions, parameters such as cell surface properties, interactions phenomena between microorganisms or between the membrane and microorganism, chemical compounds production could also have a key role on cake organization (Beaufort et al., 2011). In order to investigate yeast/membrane interactions, one of the strategies was to study cake removal. To this end the microsieves fouled with the yeast were cleaned by alternating two sequences of (i) microsieve crossflow washing with ultrapure water for 15 min and (ii) air bubble injection for 3 min. The residual cake resistance was calculated and the surface of the microsieve was observed after each sequence. Recall that the cakes at the end of the filtration runs were obtained with dry masses of 320 μg and 178 μg on the 0.8 μm and 2 μm microsieves, respectively.

Results of the residual cake resistance presented in Fig. 18, were far from the value of 0 corresponding to a perfect cleaning. In the present experimental conditions, cell removal is more important for the 2 μm microsieve than for the 0.8 μm one whatever the operating mode was and for any sequences. This could be explained by the theoretical distribution of cells at the microsieve surface during the first step of deposition as stated in Section 3.3 and exemplified by the schemes in Figs. 8 and 9. Basically the number of cells plugging the pores, i.e. in contact with the membrane, should be higher in the case

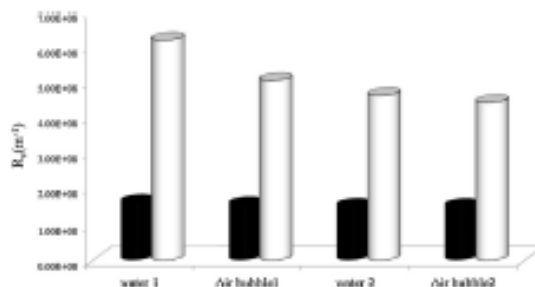


Fig. 18 – Residual fouling layer resistances of microsieves during cleaning (□ 0.8 μm , ■ 2 μm microsieves).

Please cite this article in press as: Ben Hassan, I, et al., Study of the separation of yeast by microsieves: In situ 3D characterization of the cake using confocal laser scanning microscopy. Food Bioprod Process (2014), <http://dx.doi.org/10.1016/j.fbp.2013.12.012>

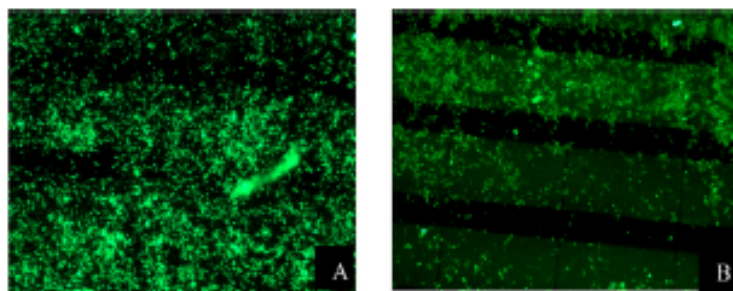


Fig. 19 – Epifluorescence visualization of the 0.8 μm membrane before (A) and after (B) cleaning.

of 0.8 μm microsieve than in the case of 2 μm one. The residual cake after cleaning would be thus more important in the case of the 0.8 μm microsieve if we assume that the cleaning conditions are the same for the two microsieves. The different cleaning steps did not seem to have a significant effect on cake removal. The image of the 0.8 μm membrane before and after cleaning (Fig. 19) showed that, even if an important fraction of the cake was removed, a significant part of the cake and/or cells has remained attached to the microsieve. This could suggest complex and strong interactions between yeast cells and yeast cells/microsieve and justify the apparent incompressible properties of the cakes described in Section 3.7. Hughes and Field (2006) have filtrated unwashed yeast, washed yeast and extra polymeric substance (EPS) suspensions with 0.2 μm membranes to investigate the role of cells and soluble components in fouling. At all concentrations, the fouling of the washed yeast was almost totally irreversible. When the cakes were flushed under a higher shear stress, the washed yeast presented the greater irreversible fouling.

4. Conclusion

In this study, an *in situ* method to characterize filtration biological cakes by CLSM was developed. The advantages and present limitations of this technique were identified. The effect of the geometrical characteristics of the microsieves (pore size and pore pitch) on the formation and the morphology of the cake during dead-end microfiltration of *S. cerevisiae* yeast suspensions was investigated.

During the very first step of cake formation, yeast cells were preferentially deposited over pores which became presumably plugged. Subsequently, the different geometrical ratio between cell size, pore size and pore pitch for the two microsieves (0.8 μm and 2 μm pore size) induced various fractions of pores surrounding the pore plugged by cells. These surrounding pores could no longer be plugged as they were sheltered under the cells deposited. This could probably explain why the larger pore microsieve exhibited a higher L_p^* reduction. Thus, it can be assumed that the first cake layer organization mainly depends on the geometrical characteristics of the microsieves.

During the full cake formation, cake morphology was investigated in terms of microsieve coverage, thickness and porosity. For the two cases, the low porosity calculated has revealed compact cakes. Furthermore, an overpressure exerted on multilayer cakes had no measurable effect on cake thickness, in agreement with its initial high capacity.

The efficiency of microsieve cleaning runs have suggested the existence of complex and strong interactions between

yeast cells and yeast cells/microsieve as a significant part of the cake and/or yeast cells deposited have remained attached.

In future works, various issues will be addressed. As biological suspensions are too heterogeneous, fluorescent microspheres will be selected as model of microbial particles. One of the objectives will be to better explore the mode of formation of the first layer of cake suggested in the present paper. Furthermore, mono and bidispersed particle suspensions will be used as a first step to better understand the formation and the morphology of complex biological cakes.

Acknowledgments

This work would not have been possible without the financial support of Action Intégrée Franco-Tunisienne du Ministère des affaires étrangères et Européennes français et du ministère de l'Enseignement Supérieur, de la recherche Scientifique tunisien. We thank Christophe ELLERO (LISBP) for his technical support and Cecile POUZET and Aurélie LE RU from FR3450 confocal platform (Auzeville France) for their technical assistance.

References

- Beaufort, S., Alfonora, S., Lafforgue, C., 2011. Use of fluorescent microorganisms to perform *in vivo* and *in situ* local characterization of microbial deposits. *J. Membr. Sci.* 369, 30–39.
- Bellon-Fontaine, M.N., Rault, J., Van Oss, C.J., 1996. Microbial adhesion to solvents: a novel method to determine the electron-donor/electron-acceptor or Lewis acid–base properties of microbial cells. *Colloids Surf. B: Biointerfaces* 7, 47–53.
- Ben Hassan, I., Lafforgue, C., Ellero, C., Ayadi, A., Schmitz, P., 2013. Coupling of local visualization and numerical approach for particle microfiltration optimization. *Microsyst. Technol.* 542, 1906–1909.
- Bikel, M., Çulfaz, P.Z., Bolhuis-Versteeg, L.A.M., Garduño Pérez, J., Lammertink, R.G.H., Wessling, M., 2010. Polymeric microsieves via phase separation microfabrication: process and design optimization. *J. Membr. Sci.* 347, 93–100.
- Chen, V., 2004. Non-invasive observation of synthetic membrane processes? A review of methods. *J. Membr. Sci.* 241, 23–44.
- Ferrando, M., Rzek, A., Zator, M., Lopez, F., Guell, C., 2005. An approach to membrane fouling characterization by confocal scanning laser microscopy. *J. Membr. Sci.* 250, 283–293.
- Foley, G., 2006. A review of factors affecting filter cake properties in dead-end microfiltration of microbial suspensions. *J. Membr. Sci.* 274, 38–46.
- Gironès, M., Zandrie, B., Lammertink, G.H., Wessling, M., 2005. The role of wetting on the water flux performance of microsieve membranes. *J. Membr. Sci.* 259, 55–64.

- Gowman, L., Ross Ethier, C., 1997. Concentration and concentration gradient measurements in an ultrafiltration concentration polarization layer. Part 1: a laser-based refractometric experimental technique. *J. Membr. Sci.* 131, 95–105.
- Guillemot, G., Guadalupe, V.M., Martín-Yken, H., Vernhet, A., Schmitz, P., Mercier-Bonin, M., 2006. Shear-flow induced detachment of *Saccharomyces cerevisiae* from stainless steel: influence of yeast and solid surface properties. *Colloids Surf. B: Biointerfaces* 49, 126–135.
- Hughes, D., Field, R.W., 2006. Crossflow filtration of washed and unwashed yeast suspensions at constant shear under nominally sub-critical conditions. *J. Membr. Sci.* 280, 89–98.
- Hughes, D., Uday, K., Tirilapur, R., Field, Zhanfeng, C., 2006. In situ 3D characterization of membrane fouling by yeast suspensions using two-photon femtosecond near infrared non-linear optical imaging. *J. Membr. Sci.* 280, 124–133.
- Kuiper, S., Van Rijn, C.J.M., Nijdam, W., Elwenspoek, M.C., 1998. Development and applications of very high flux microfiltration membranes. *J. Membr. Sci.* 150, 1–8.
- Li, J., Sanderson, R.D., 2002. In situ measurement of particle deposition and its removal in microfiltration by ultrasonic time-domain reflectometry. *Desalination* 146, 169–175.
- Marroquin, M., Bruce, T., Pellegrino, J., Wickramasinghe, S.R., Husson, S.M., 2011. Characterization of asymmetry in microporous membranes by cross-sectional confocal laser scanning microscopy. *J. Membr. Sci.* 379, 504–515.
- McCarthy, A., Walsh, F.K.K., Foley, G., 2002. Characterising the packing and dead-end filter cake compressibility of the polymorphic yeast *Kluyveromyces marxianus* var. *marxianus* NRRLy2415. *J. Membr. Sci.* 198, 87–94.
- Meireles, M.C., Molla, Clifton, M.J.J., Aimar, P., 2004. The origin of high hydraulic resistance for filter cakes of deformable particles: cell-bed deformation or surface-layer effect? *Chem. Eng. Sci.* 59, 5819–5829.
- Mendret, J., Guigui, C., Schmitz, P., Cabassud, C., 2007. An optical method for in situ characterization of fouling during filtration. *AIChE J.* 53, 2265–2274.
- Meng, F., Baoqiang, L., Shuang, L., Fenglin, Y., Hanmin, Z., Lianfa, S., 2010. Morphological visualization, componential characterization and microbiological identification of membrane fouling in membrane bioreactors (MBRs). *J. Membr. Sci.* 361, 1–14.
- Ngone, I.S., Lammertink, R.G.H., Wessling, M., van der Meer, W., 2010. A microfluidic membrane chip for in situ fouling characterization. *J. Membr. Sci.* 346, 202–207.
- Ning Koh, C., Wintgens, T., Melin, T., Fronk, F., 2008. Microfiltration with silicon nitride microsieves and high frequency backpulsing. *Desalination* 224, 88–97.
- Okamoto, Y., Karushige, O., Charles, E.G., 2001. Harvest time effects on membrane cake resistance of *Escherichia Coli* broth. *J. Membr. Sci.* 190, 93–106.
- Smith, A.E., Zhang, Z., Thomas, C.R., Moxham, K.E., Middelberg, P., 2000. The mechanical properties of *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97, 9871–9874.
- Van Rijn, C.J.M., 2004. *Nano and Micro Engineered Membrane Technology*. Elsevier.
- Vyas, H.K., Mawson, A.J., Bennett, R.J., Marshall, A.D., 2000. A new method for estimating cake height and porosity during crossflow filtration of particulate suspensions. *J. Membr. Sci.* 176, 113–119.
- Zhang, Y., Fane, A., Law, A., 2006. Critical flux and particle deposition of bidisperse suspensions during crossflow microfiltration. *J. Membr. Sci.* 282, 189–197.

Please cite this article in press as: Ben Haesen, I., et al., Study of the separation of yeast by microsieves: In situ 3D characterization of the cake using confocal laser scanning microscopy. *Food Bioprod Process* (2014), <http://dx.doi.org/10.1016/j.fbp.2013.12.012>

VI.1.1.1.2 Caractérisation tridimensionnelle, « *in situ* », de l'organisation interne du dépôt de levure en suspensions pures

Des travaux antérieurs expérimentaux [92] et numériques [54] ont reporté que la porosité des dépôts formés sur les membranes durant la filtration n'est pas uniforme le long de l'axe z (hauteur du dépôt). Le dépôt peut être subdivisé en trois zones en fonction de sa compacité : couche stagnante, étendue et fluidisée.

Dans le chapitre précédent, trois régions de concentration différentes ont été identifiées dans le cas du dépôt de microsphères : (i) une zone de germination en contact avec la membrane de concentration modéré, (ii) le cœur de dépôt de porosité faible et (iii) une zone de capture de concentration faible.

Un travail similaire a été réalisé pour les levures et la porosité du gâteau a été estimée couche par couche, le long de l'axe z pour les deux essais à partir des images enregistrées aux grossissements $\times 40$ et $\times 63$, (microsieve $2\ \mu\text{m}$ et $0,8\ \mu\text{m}$, respectivement), zoom 6. Pour ce faire, des suspensions de très faible concentration en levures ; $1,3910^{-3}\ \text{g.L}^{-1}$ et $2,84\ 10^{-3}\ \text{g.L}^{-1}$ sont filtrées sur la membrane $0,8\ \mu\text{m}$ et $2\ \mu\text{m}$ microsieve, respectivement. Après chaque injection, le dépôt formé est observé le long de l'axe z par l'acquisition d'une série d'image. Le mouvement automatique programmé de la platine permet l'observation de différents plans, espacés d'un pas, Δz , de la microsieve jusqu'au dernier plan où la fluorescence est détectée. Le traitement des N séries d'image permet de tracer $\alpha_s(z)$ qui représente la fraction de surface occupée par les cellules le long de l'axe z . Dans cette étude, quelques hypothèses ont été faites :

- La concentration des suspensions étant extrêmement faible, chaque particule sera observée plusieurs fois. Ainsi, les images obtenues pour une injection N doivent se superposer partiellement avec celles de l'injection $N-1$ et celles de l'injection $N+1$.

- Les particules déposées ne bougent plus dans le dépôt, aucun réarrangement n'a lieu durant la construction du dépôt et les caractéristiques de la partie profonde du colmatage qui ne peuvent plus être scannée par le laser ne changent pas au cours de la filtration.

Les fractions de la surface en fonction de la profondeur occupée par les levures filtrées sur les membranes de $2\ \mu\text{m}$ et $0,8\ \mu\text{m}$ sont présentées, respectivement dans la **Figure VI.1-2** et la **Figure VI.1-3**.

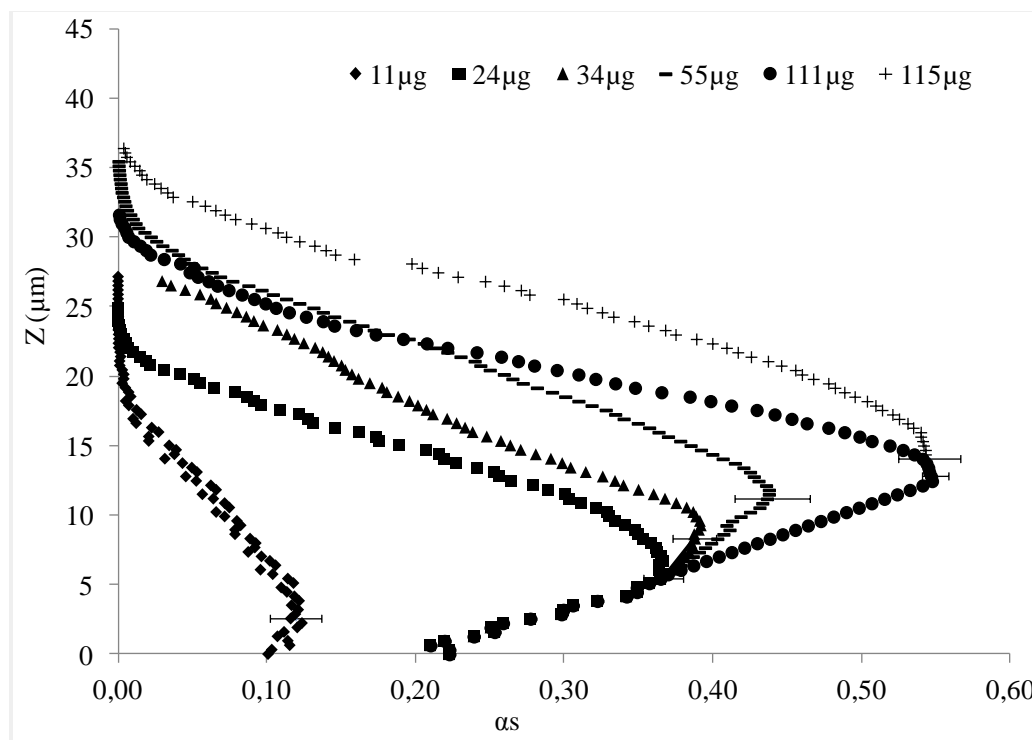


Figure VI.1-2 : Evolution de la fraction de la surface occupée par les levures le long de l'axe z d'un dépôt formé sur une membrane 2 µm en fonction de la masse déposée.

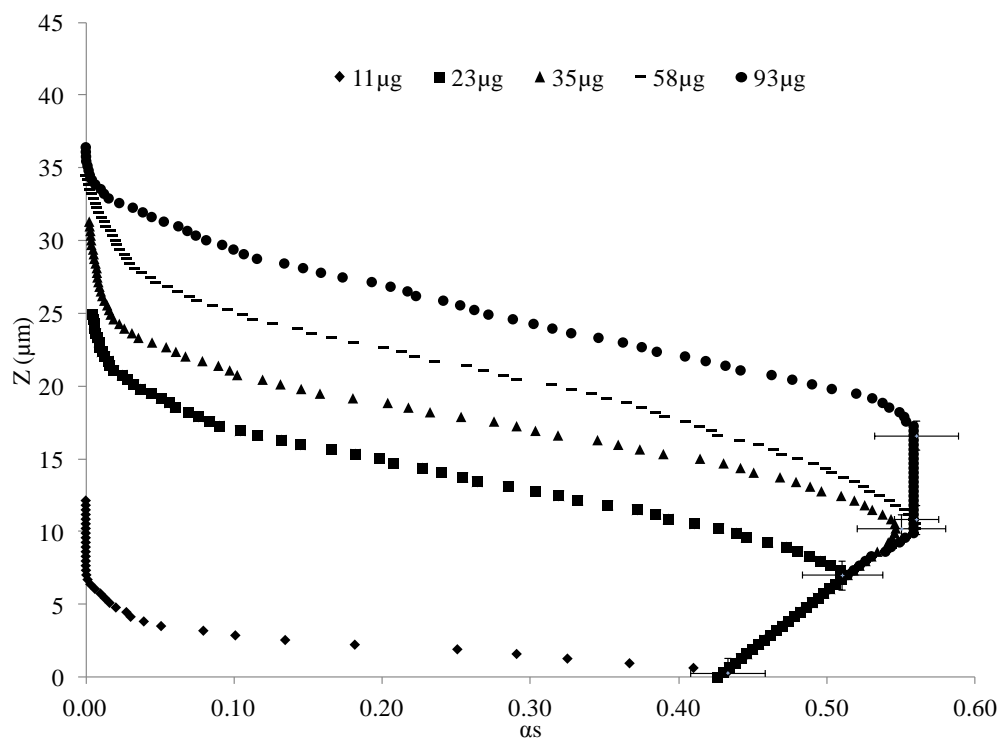


Figure VI.1-3 : Evolution de la fraction de la surface occupée par les levures le long de l'axe z d'un dépôt formé sur une membrane 0,8 µm en fonction de la masse déposée

On retrouve ici les trois zones spécifiques du dépôt déjà mises en évidence pour les dépôts des particules inertes:

- *La région de germination* en contact avec la membrane de concentration moyenne en levures où l'organisation du dépôt dépend de la géométrie de la membrane. La concentration en cellules y est plus importante pour la membrane de $0,8 \mu\text{m}$ de taille de pore avec une valeur de α_s de $0,43$ contre $0,12$ sur la microsieve de $2 \mu\text{m}$. Ceci est en accord avec les observations de la première couche qui montrent que le dépôt est plus compact sur les membranes de petits pores dont la porosité notablement plus importante et la distance entre les centres de deux pores voisins plus petite.

- *La région centrale du gâteau* de concentration maximale en cellules et de porosité de l'ordre de $0,45$ dans les deux cas. En supposant les levures sphériques de diamètre moyen $5 \mu\text{m}$, l'initiation de leur empilement sur les membranes de $2 \mu\text{m}$ et $0,8 \mu\text{m}$ de taille de pores dépend des caractéristiques des membranes (**Figure VI.1-4** et la **Figure VI.1-5**). Cependant, la comparaison entre la porosité des régions centrales montre qu'il n'existe pas une différence significative entre les deux cas. L'empilement des particules dans le dépôt ne dépend donc que de leur taille et de leur forme conformément à la théorie [93].

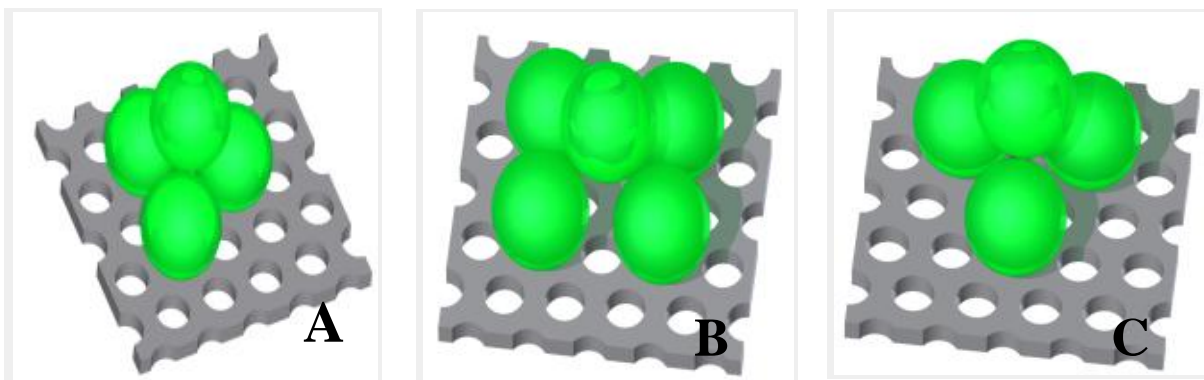


Figure VI.1-4 : Simulation de l'empilement de particules sphériques simulant des levures sur une membrane de $2 \mu\text{m}$ de taille de pores.

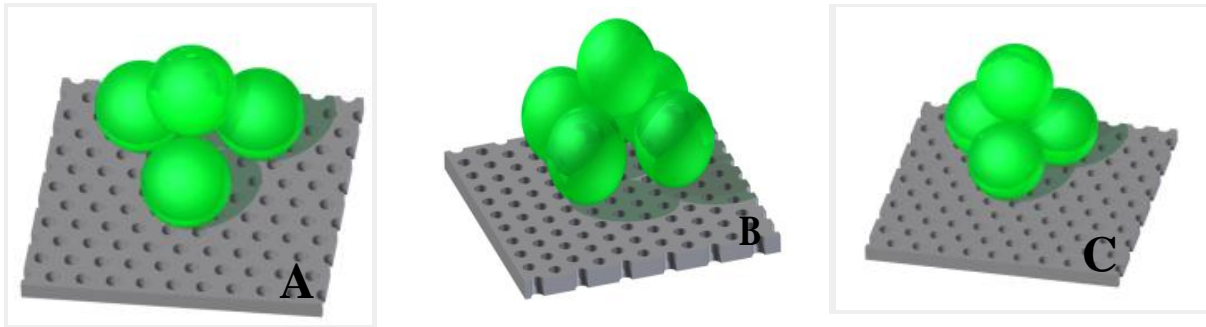


Figure VI.1-5 : Simulation de l'empilement de particules sphériques simulant des levures sur une membrane de $0,8 \mu\text{m}$ de taille de pores.

- *La région superficielle ou région de capture* : Les particules en suspension suivent les lignes de courant dans le canal au-dessus de la microsieve. Elles sont interceptées sur la partie superficielle du dépôt par les cellules déjà déposées. La taille des cellules étant uniforme et la zone centrale relativement compacte, les levures se déposant ne migrent pas à l'intérieur du gâteau.

VI.1.1.2 Suspension de bactéries : Effet de la taille du microorganisme

Dans cette partie, on s'intéresse au dépôt formé lors de la filtration d'*Escherichia coli*, bactérie en forme de bâtonnet dont la taille, entre 0,5 et 3 μm . Ce microorganisme est à la limite de la résolution optique et sensible au phénomène de photoblanchiment.

VI.1.1.2.1 Formation de la première couche

Le dépôt est supposé homogène et la zone observée aux objectifs les plus puissants représentative de toute la membrane. Cette homogénéité a été vérifiée avec un objectif x 10 dans le cas de la filtration de bactéries sur la microsieve de 0,8 μm de taille de pores (**Figure VI.1-6**). De plus, on ne note ni la présence de floccs ni de réarrangement au niveau de la membrane.

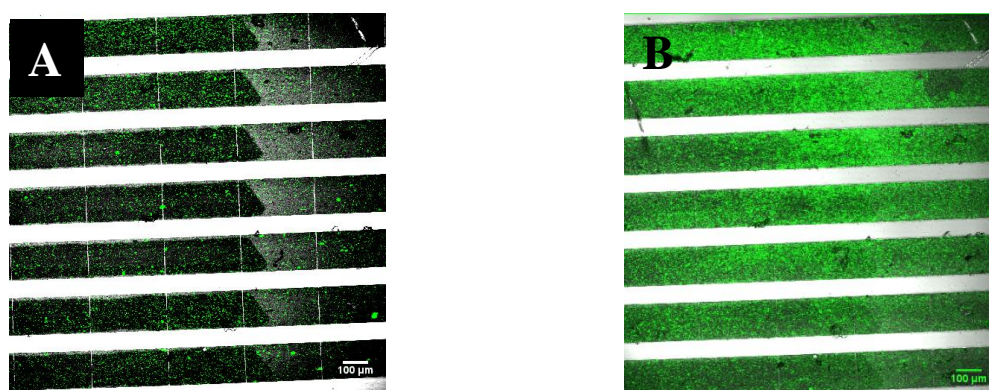


Figure VI.1-6 : Images composites du dépôt de bactéries colorées au Syto 9 sur une membrane de 0,8 μm de taille de pores, objectif x 10 ;
masse du dépôt : (A) : 5 μg , (B) : 26 μg

Le colmatage est caractérisé globalement par la réduction de perméabilité L_p^* , en fonction de la masse de cellules déposée sur la membrane. La comparaison entre les performances lors de la filtration de levures et de bactéries sur une microsieve de 0,8 μm de taille de pores montre que la perméabilité diminue rapidement après la première injection et de façon plus importante pour les bactéries. Au fur et à mesure de l'augmentation de la masse injectée, elle se stabilise. La perméabilité résiduelle est très faible, proche de zéro, pour la suspension de bactéries. En début de la filtration, le colmatage est essentiellement causé par le blocage des pores et la réduction de perméabilité est rapide (**Figure VI.1-7**). Ceci est confirmé par l'observation de la microsieve après la première injection (**Figure VI.1-8**) qui montre que la plupart des cellules se déposent sur les pores de la membrane (cercle rouge). On remarque aussi la présence de quelques agrégats cellulaires (cercle jaune). La chute de

perméabilité est beaucoup plus faible durant la filtration de *Saccharomyces cerevisiae*. En effet, comme les bactéries sont approximativement de même taille que les pores, le dépôt d'une bactérie sur un pore le bloque sans avoir d'effet sur les pores voisins alors que la levure en se déposant protège les six pores qui l'entourent. La présence de quelques agrégats de bactéries durant la formation de la première couche pourrait induire la formation de ponts sur certains pores ce qui expliquerait la perméabilité résiduelle de la membrane à la fin de l'expérience.

Durant les injections suivantes, les cellules bouchent les pores encore ouverts et se déposent sur le dépôt déjà formé. Une fois la majorité des pores bloqués, le dépôt devient homogène et la chute de perméabilité est plus lente.

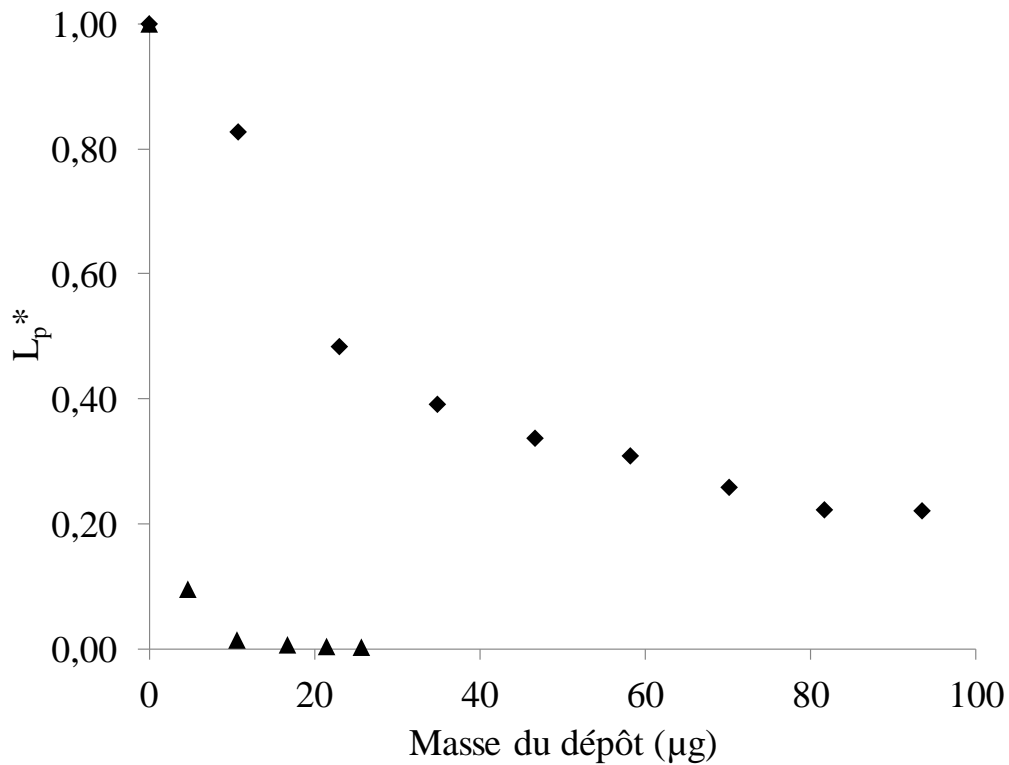


Figure VI.1-7 : Réduction de la perméabilité de la membrane 0,8 µm durant la filtration de bactéries (▲) et de levures (◆)

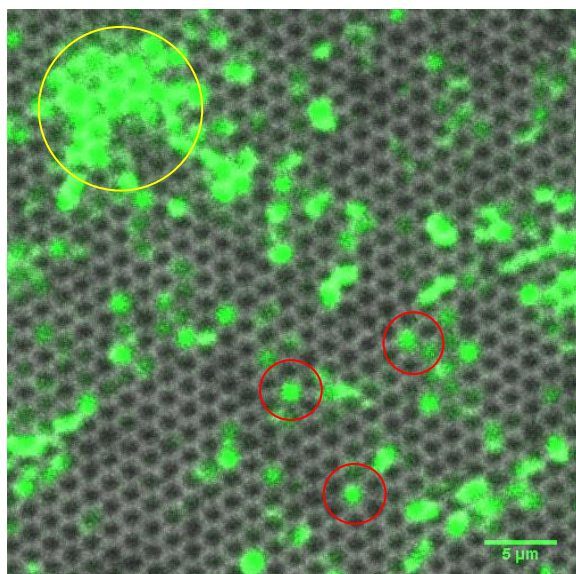


Figure VI.1-8 : Image composite de la microsieve 0,8 µm colmatée par des bactéries colorées avec le Syto 9 (objectif x63, zoom 6)

VI.1.1.2.2 Construction d'un dépôt multicouches et étude de sa morphologie interne

La série d'images composites du dépôt des bactéries sur la membrane, **Figure VI.1-9**, illustre la construction progressive du dépôt. Alors que la perméabilité chute rapidement dès la première injection, α_c augmente plus progressivement à fur et à mesure des injections (**Figure VI.1-10**). A la fin de l'expérience, la perméabilité résiduelle est constante et très faible et le taux de couverture de la membrane atteint 70% de la surface filtrante.

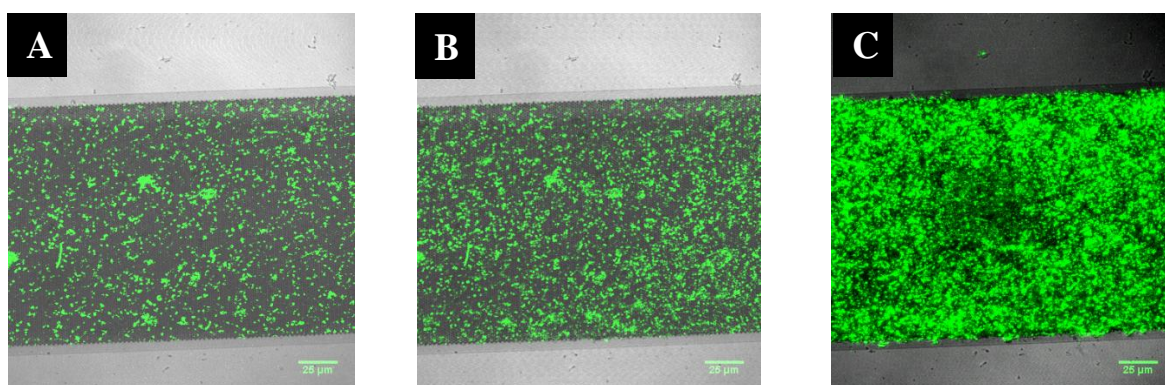


Figure VI.1-9 : Série d'images composites de la formation progressive du dépôt des bactéries colorées avec le Syto 9 sur une microsieve de 0,8 µm de taille de pores pour des masses déposées de : (A) 5 µg, (B) 11 µg, (C) 26 µg (objectif x 63, zoom 1).

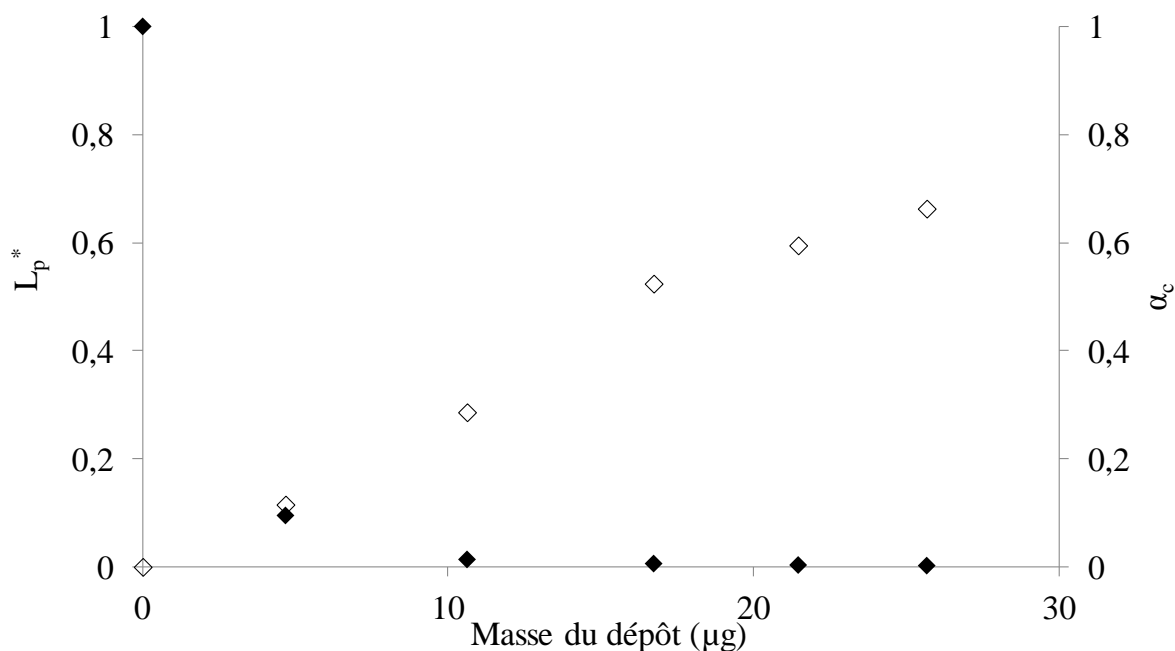


Figure VI.1-10 : Perte de perméabilité, L_p^* , et fraction couverte de la membrane, α_c , en fonction de la masse déposée de bactéries

La morphologie interne du dépôt, **Figure VI.1-11**, montre que l'augmentation de la masse déposée induit l'augmentation du taux de couverture de la microsieve ($z = 0$) puisque les cellules nouvellement arrivées remplissent les espaces libres dans les deux directions xy et xz et complètent progressivement la première couche. Pour une concentration plus importante (22 μg), la courbe représentant l'évolution de la surface occupée le long de l'axe z (triangles pleins) révèle clairement l'existence des trois régions déjà mentionnées: la zone de germination, la zone centrale et la zone de capture.

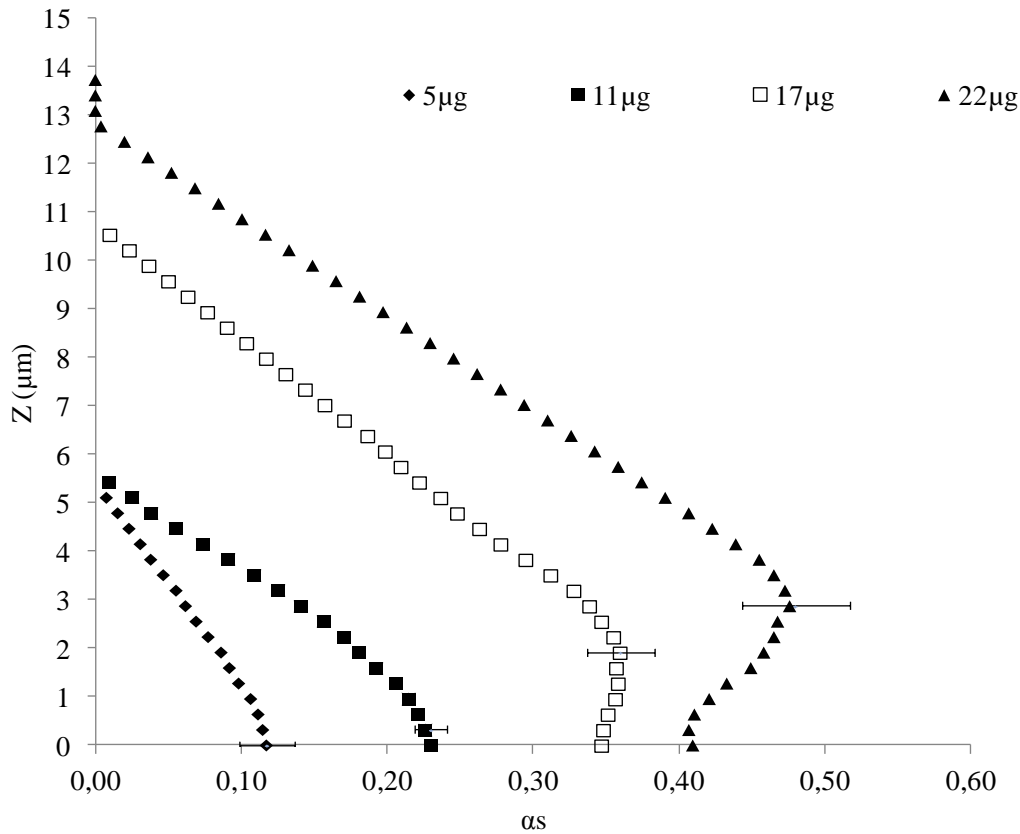


Figure VI.1-11 : Evolution de la fraction de la surface occupée par les bactéries dans chaque image le long de l'axe z d'un dépôt formé sur une membrane 0,8 μm en fonction de la masse déposée.

La porosité moyenne de la région centrale du dépôt est de l'ordre de 0,52. Cependant, il est délicat de comparer cette valeur à la porosité d'un empilement de sphères car *Escherichia coli* a une forme de bâtonnet et peut s'orienter de différentes façons à l'intérieur du dépôt (**Figure VI.1-12**). Par ailleurs, la taille des bactéries étant du même ordre que la taille des pores et la suspension présentant une certaine hétérogénéité, les cellules les plus petites pourraient causer un colmatage interne ou passer à travers les pores. Néanmoins, l'observation et la mise en culture du perméat n'a pas pu mettre en évidence la présence de bactéries qui auraient traversé la membrane.

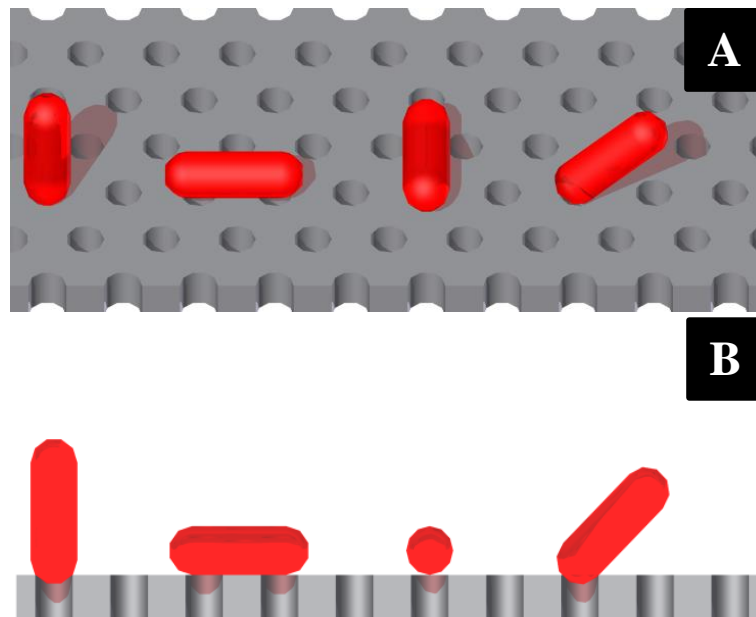


Figure VI.1-12 : Simulation de l'empilement de particules sous forme de bâtonnets simulant des bactéries sur une membrane de 0,8 µm de taille de pores ; (A) : Vue de haut ((B) : Vue latérale

VI.1.2 Caractérisation du dépôt issu du mélange des deux microorganismes

Afin d'appréhender la filtration de suspensions complexes de microorganismes, les deux espèces modèles sélectionnées ont été mélangées. La levure et la bactérie, cultivées séparément, recueillies en phase stationnaire, sont lavées et marquées au Syto 9 pour la levure et au Syto 84 pour la bactérie. Elles sont ensuite diluées ($5,26 \cdot 10^{-4} \text{ g.L}^{-1}$ et $8,77 \cdot 10^{-4} \text{ g.L}^{-1}$ pour les bactéries et les levures, respectivement), mélangées et filtrées sur une microsieve de $0,8 \mu\text{m}$ de taille de pores.

L'arrivée des microorganismes sur la membrane et la construction du dépôt sont suivies en temps réel. En raison de la sensibilité du Syto 84 à l'excitation par le rayon laser, il n'a pas été possible d'observer le dépôt avec l'objectif x 63, zoom 6, la perte de la fluorescence du Syto 84 étant plus rapide que le temps d'acquisition. De ce fait, la morphologie interne du dépôt n'a pas pu être analysée.

VI.1.2.1 Formation de la première couche

Avant de caractériser le dépôt du mélange de microorganismes, il est important de contrôler son homogénéité sur toutes les zones filtrantes de la microsieve. En effet, les microorganismes présentant une différence de taille et de masse notable, leur transport et leur dépôt pourraient différer.

Le choix des colorants avec des spectres d'excitation et d'émission bien distincts a permis l'observation individuelle de chaque espèce dans le dépôt. Il ressort de l'observation des levures, des bactéries et de l'image composite du dépôt mixte que la répartition des deux espèces sur la membrane est uniforme (**Figure VI.1-13**, A, B et C)

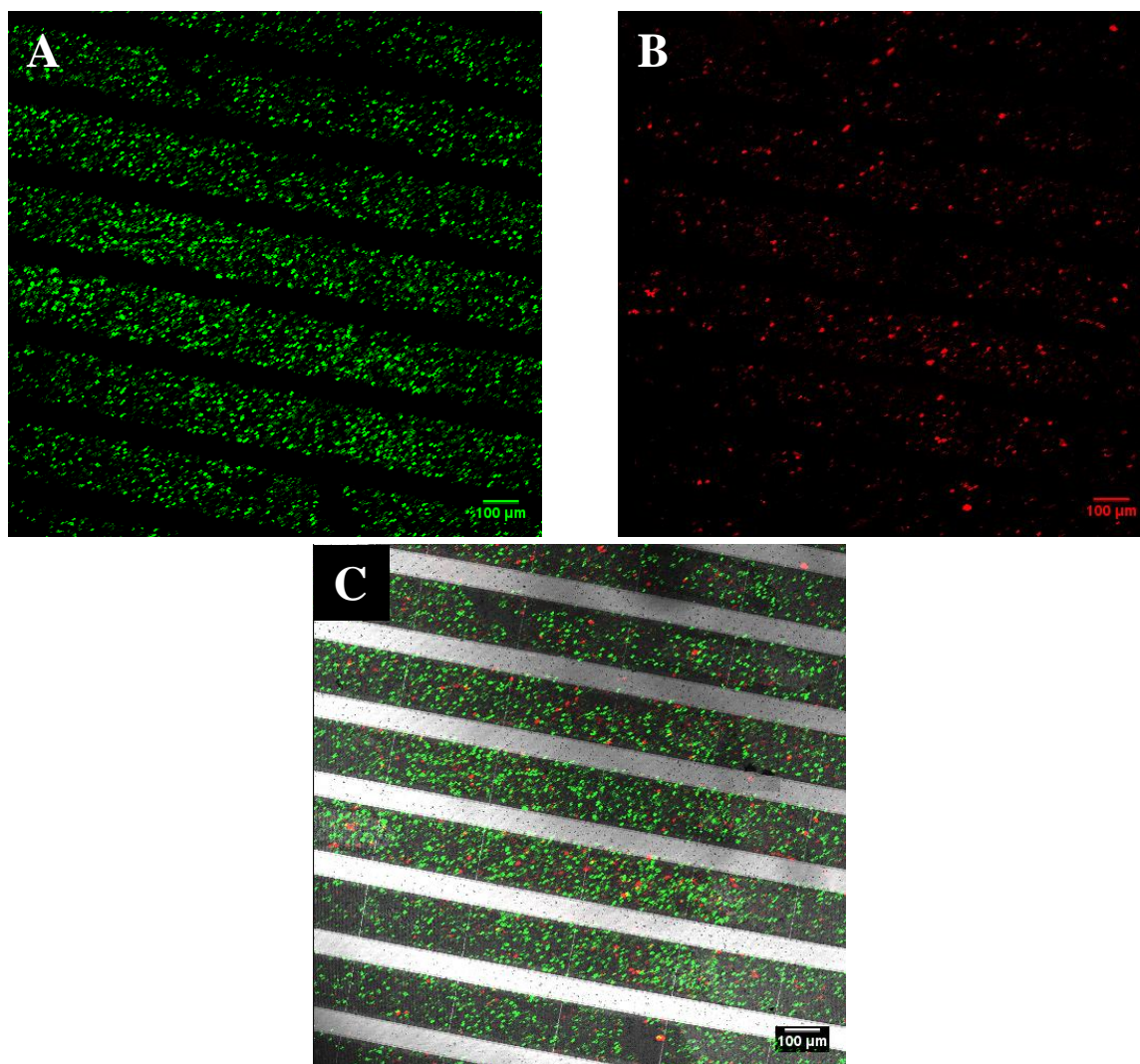


Figure VI.1-13 : Images en fluorescence du dépôt sur une membrane de 0,8 µm de taille de pores, objectif x 10: levures colorées au Syto 9 (A), bactéries colorées au Syto 84 (B) et image composite du dépôt mixte (C)

La réduction de perméabilité, liée à l'accumulation des cellules sur la membrane (**Figure VI.1-14**), est très importante au début du dépôt des cellules avant de tendre vers une valeur asymptotique très faible. En début de la filtration, un blocage des pores dès les premières cellules déposées (**Figure VI.1-15, A**), induit la réduction rapide de la perméabilité. Toutefois, à fort grossissement, le photoblanchiment des bactéries rend difficile leur localisation précise sur la membrane et dans le dépôt. L'observation de la première couche à un zoom moins important afin de diminuer l'intensité du laser (**Figure VI.1-15, B**) montre la répartition uniforme des cellules sur une bande filtrante de la microsieve. Quelques agrégats bactériens sont observés autour des levures déposées. Lorsque la plupart des pores deviennent

complètement fermés et la première couche formée, le dépôt croît progressivement en multicouches et la réduction de perméabilité associée est plus lente.

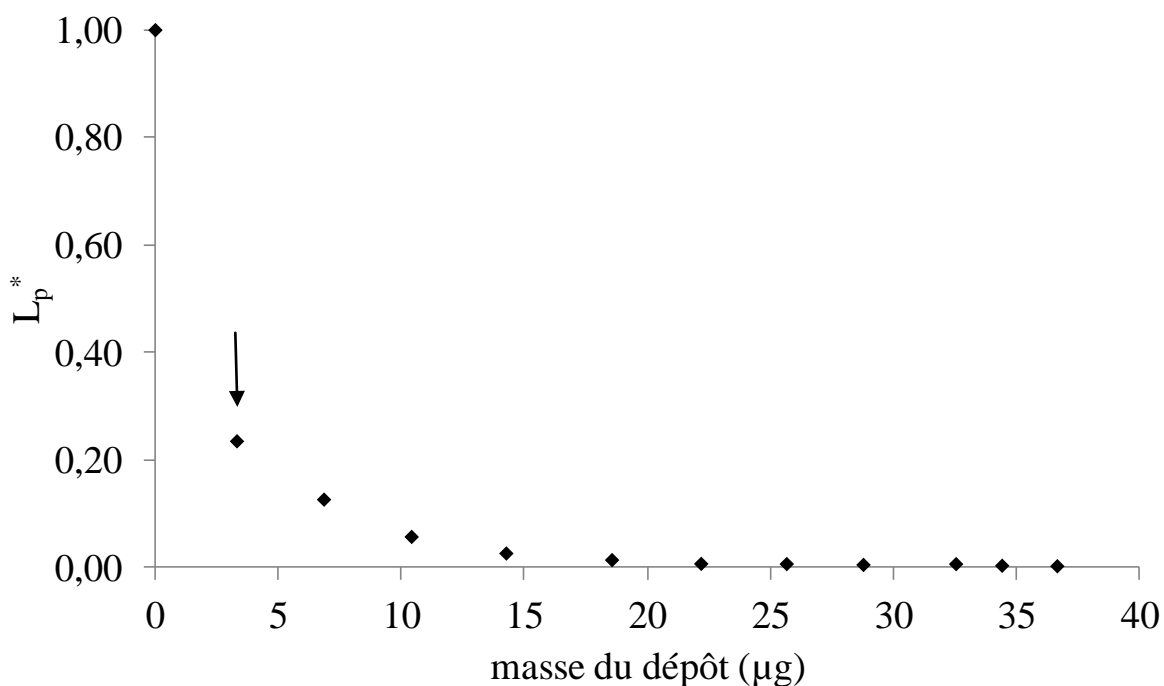


Figure VI.1-14 : Réduction de la perméabilité de la membrane 0,8 µm durant la filtration de suspensions mixte

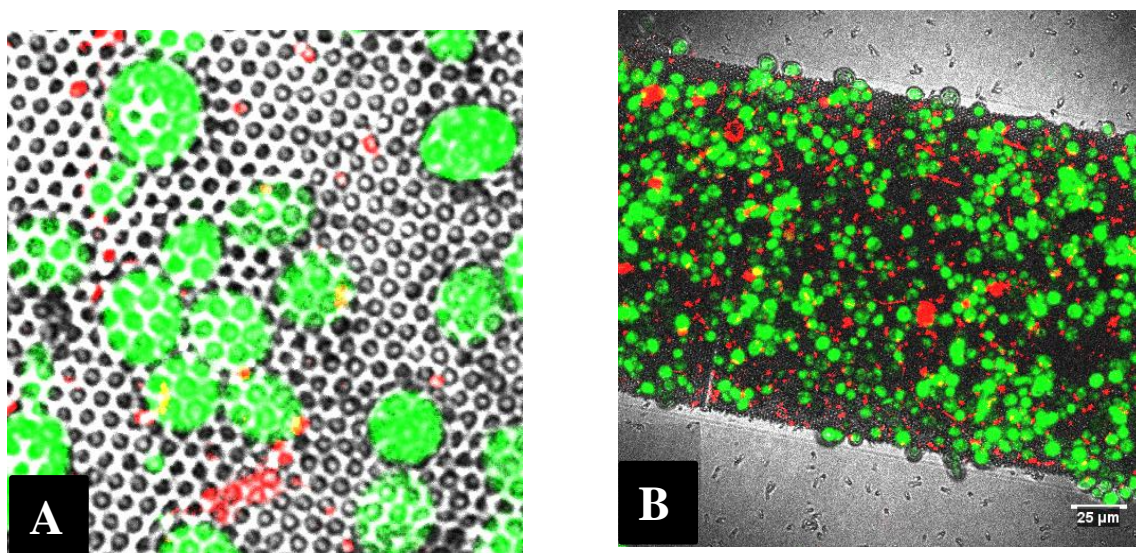


Figure VI.1-15 : Image composite de la microsieve 0,8 µm colmatée par des bactéries colorées au Syto 84 (rouge) et des levures au Syto 9 (vert) (objectif x 63), (A) : zoom 6 et (B) : zoom 1

VI.1.2.2 Construction d'un dépôt multicouches

La construction du dépôt obtenu par filtration d'une suspension mixte de microorganismes, bactéries (rouges) et levures (vertes), est illustrée dans la **Figure VI.1-16**. Au début de la filtration, l'évolution d' α_c , fraction de la surface de la membrane couverte par les cellules, en fonction de la masse déposée est pratiquement linéaire (**Figure VI.1-17**). Lorsqu'un dépôt multicouches croît sur la membrane, le taux de couverture, comme la réduction de la perméabilité, tendent vers des valeurs asymptotiques. A la fin de l'expérience, α_c se stabilise à 0,52. Vu l'importance du photoblanchiment des bactéries marquées au Syto 84, l'hypothèse que le taux de couverture soit sous estimé à cause de la perte de fluorescence d'*Escherichia coli* ne peut pas être écartée. Par ailleurs, la perte de fluorescence des bactéries est trop importante à un zoom 6 pour pouvoir réaliser une étude de la morphologie interne du gâteau. A un grossissement plus faible, la précision des mesures serait insuffisante et les erreurs commises durant le traitement des images trop importantes pour pouvoir obtenir des informations pertinentes.

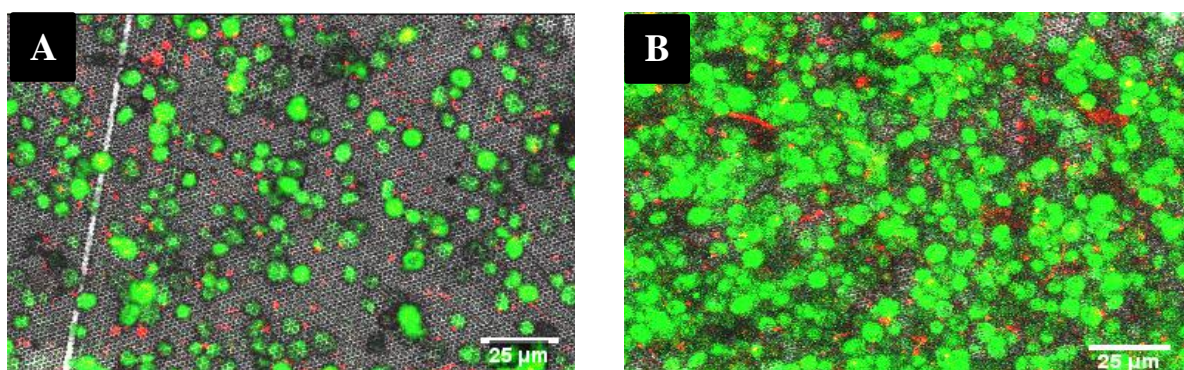


Figure VI.1-16 : Images composites de la formation progressive du dépôt mixte (bactéries en rouge, levures en vert) sur une microsieve de 0,8 µm de taille de pores pour des masses déposées de : (A) 3 µg, (B) 37 µg, (objectif x 63, zoom 1)

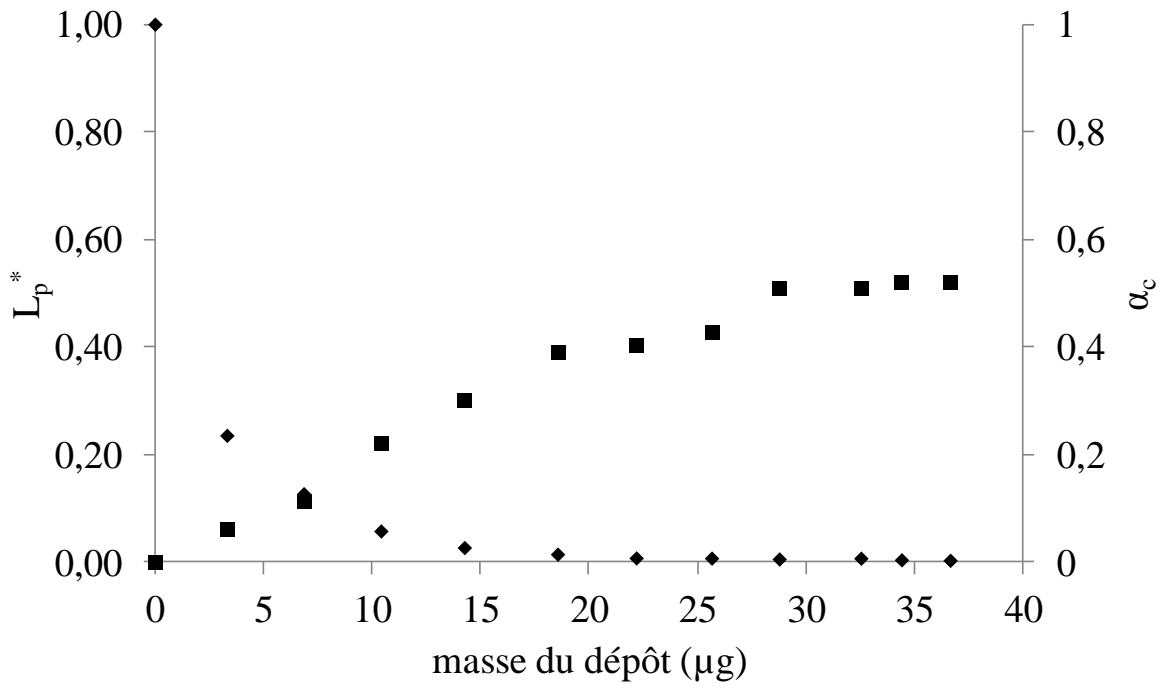


Figure VI.1-17 : Perte de perméabilité, L_p^* , et fraction couverte de la membrane, α_c , en fonction de la masse déposée du dépôt mixte

VI.2 Evaluation de la pertinence de particules modèles inertes pour simuler des dépôts biologiques

Le colmatage induit par des microsphères en polystyrène de 4,8 μm et 1 μm de diamètres et des cellules vivantes (la levure *Saccharomyces cerevisiae* et la bactérie *Escherichia coli*) durant la filtration, en mode frontal, a été caractérisé à l'échelle globale. Les caractéristiques locales des dépôts ont été étudiées, *in situ*, en temps réel par microscopie confocale. Les résultats obtenus sont évalués afin de valider l'utilisation de particules inertes pour modéliser des microorganismes lors de l'étude de la formation de dépôts biologiques.

Les conditions expérimentales des essais sont résumées dans le **Tableau VI.2-1** et le **Tableau VI.2-2**.

Tableau VI.2-1: Caractéristiques des suspensions et paramètres opératoires pour les suspensions de particules inertes

		Particules inertes		
		Microsieve	Taille des particules	
			4,8 μm (g.L^{-1})	1 μm (g.L^{-1})
Monodisperse	A	2 μm	$3,1 \cdot 10^{-3}$	-
	B	0,8 μm	-	$3,34 \cdot 10^{-4}$
	C	0,8 μm	$1,61 \cdot 10^{-3}$	-
Bidisperse	D₁	0,8 μm	$8 \cdot 10^{-4}$	$1,67 \cdot 10^{-4}$
	D₂	0,8 μm	$4 \cdot 10^{-4}$	$4 \cdot 10^{-4}$

Tableau VI.2-2: Caractéristiques des suspensions et paramètres opératoires pour les suspensions de particules biologiques

		Particules biologiques		
		Microsieve	Microorganismes	
			Levures (g.L ⁻¹)	Bactéries (g.L ⁻¹)
Suspension pure	E	2 µm	2,84 10 ⁻³	-
	F	0,8 µm	-	9,7 10 ⁻⁴
	G	0,8 µm	1,3910 ⁻³	-
Mélange	H	0,8 µm	8,77 10 ⁻⁴	5,26 10 ⁻⁴

VI.2.1 Comparaison globale du colmatage

L'ordre de grandeur de performances de filtration et les pertes de perméabilités durant la filtration des particules inertes et biologiques sont similaires, compte tenu des incertitudes expérimentales (Figures VI.2-1, VI.2-2, VI.2-3 et VI.2-4). Les modèles inertes permettent donc de prédire l'évolution du colmatage de façon relativement correcte. Toutefois, durant la filtration des suspensions pures de microorganismes, la perte de perméabilité atteinte en fin d'expérience est légèrement plus importante dans le cas des suspensions monodispersées de particules. Cette différence pourrait être due à l'hétérogénéité et l'évolution des suspensions de microorganismes. En effet, malgré leur rinçage et l'absence de nutriments, certaines cellules sont susceptibles de se modifier et éventuellement se diviser ce qui pourrait avoir deux conséquences:

- Une légère sous-estimation de la masse de cellules déposées sur la microsieve
- Une hétérogénéité de taille : les cellules mères en cours de division étant plus grandes que les cellules filles.

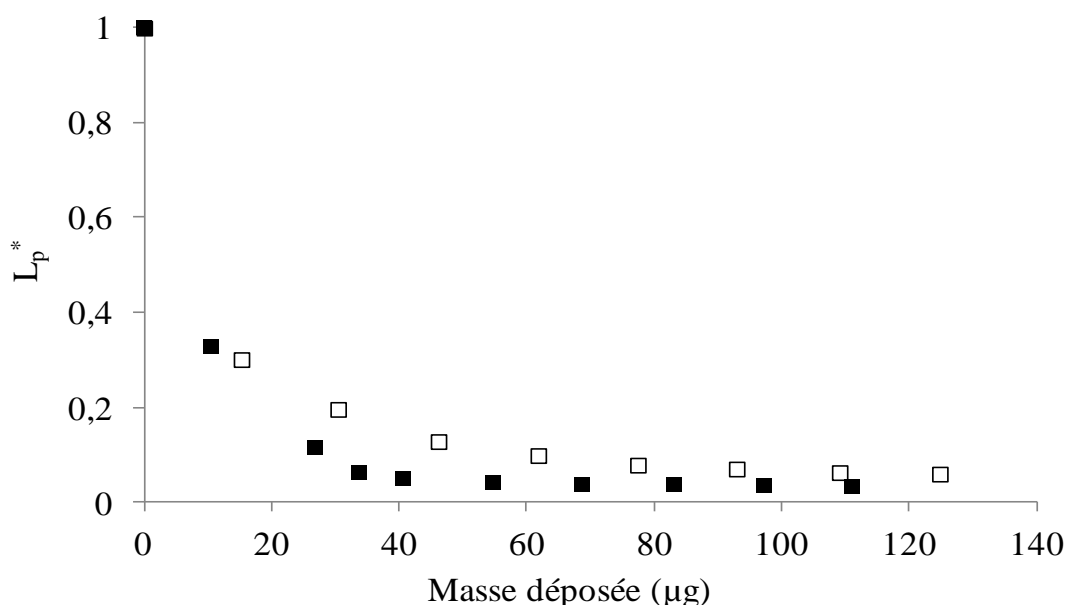


Figure VI.2-1 : Réduction de la perméabilité de la membrane 2 µm durant la filtration de suspensions de microsphères de 4,8 µm (□) et de levures (■)

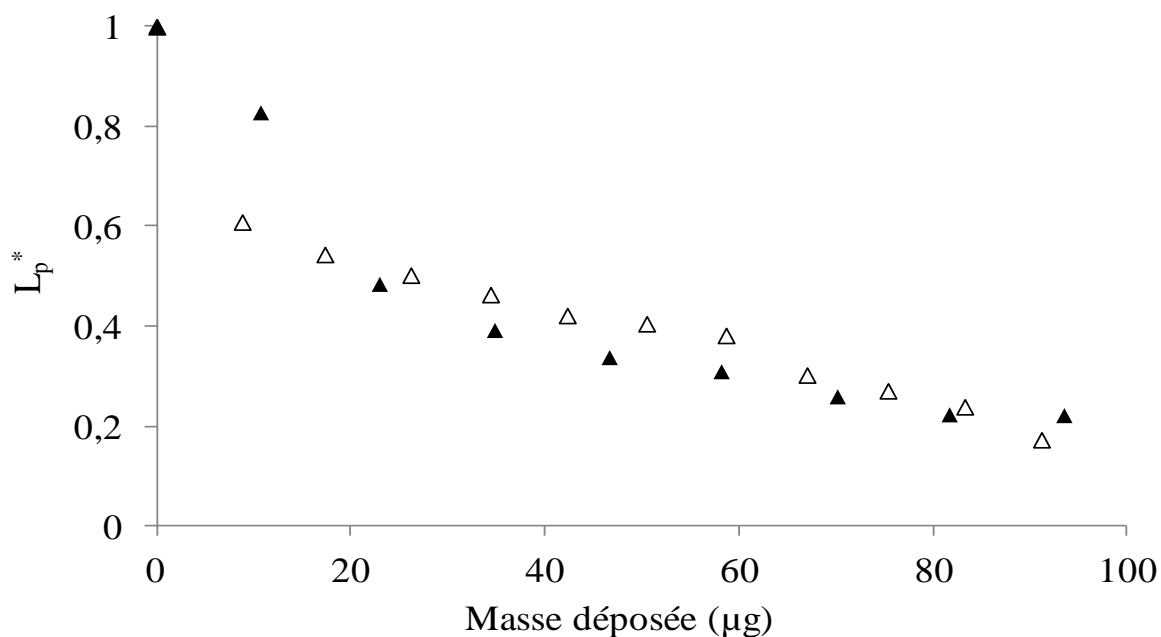


Figure VI.2-2 : Réduction de la perméabilité de la membrane 0,8 µm durant la filtration de suspensions de microsphères de 4,8 µm (△) et de levures (▲)

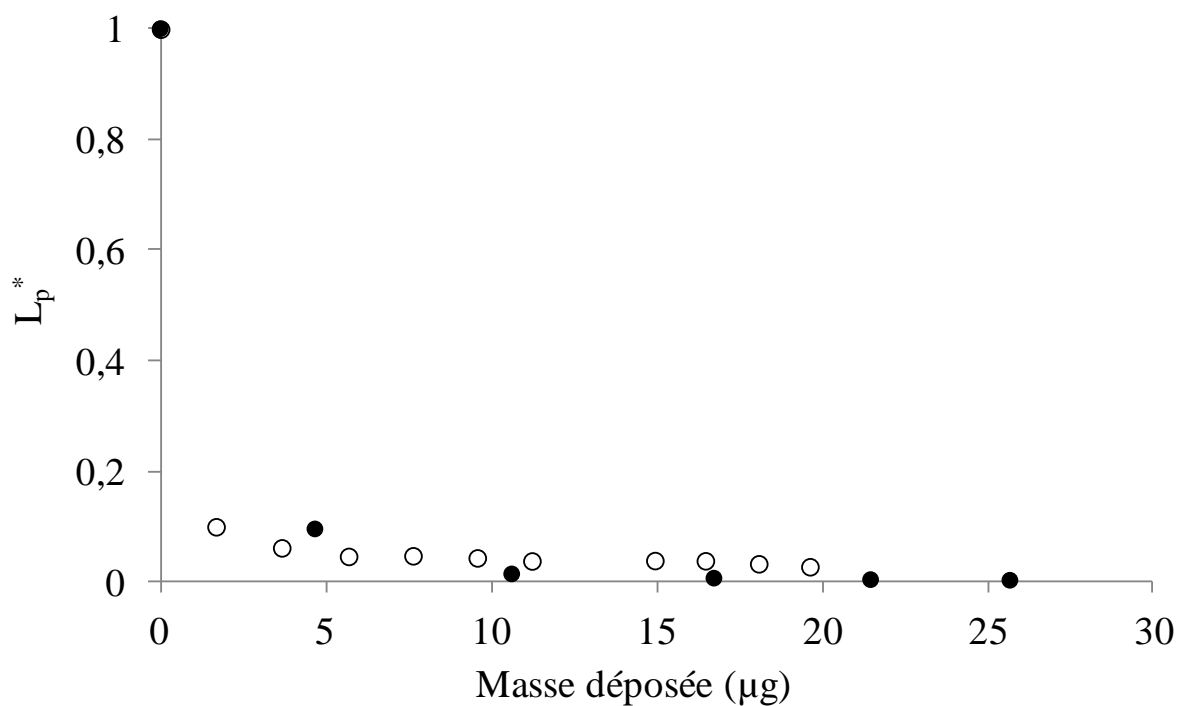


Figure VI.2-3 : Réduction de la perméabilité de la membrane 0,8 µm durant la filtration de suspensions de microsphères de 1 µm (○) et de bactéries (●)

Dans le cas de mélanges de particules ou de microorganismes (**Figure VI.2-4**), les performances finales sont sensiblement du même ordre de grandeur. Néanmoins, la diminution initiale est clairement corrélée à la proportion de petites particules sphériques qui induisent un bouchage important des pores sur la première couche, les microorganismes apparaissant moins « colmatants » en début de filtration.

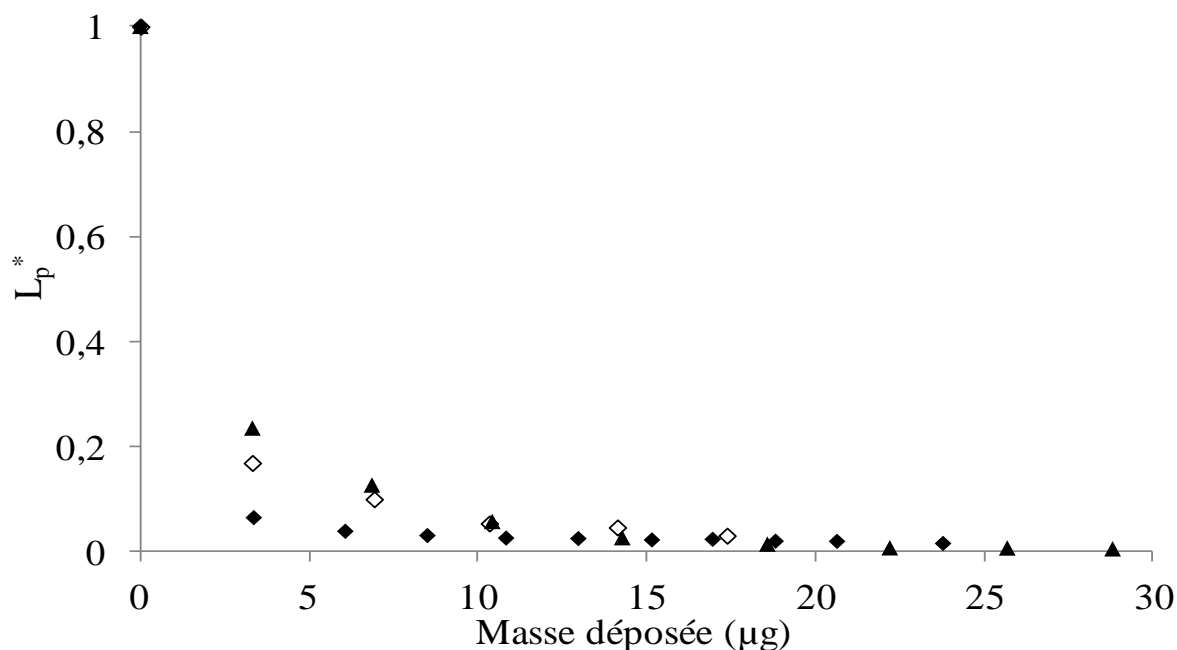


Figure VI.2-4 : Réduction de la perméabilité de la membrane 0,8 µm durant la filtration de suspensions bidispersées des microsphères (Expériences D₁ (◊) et D₂ (◆)) et d'un mélange de microorganismes (▲)

VI.2.2 Analyse à l'échelle microscopique des caractéristiques des dépôts de filtration

Dans ce travail, on a simulé la levure *Saccharomyces cerevisiae* et la bactérie *Escherichia coli* par des microsphères de 4,8 µm et 1 µm, respectivement. Or, dans la réalité, *S. cerevisiae* est de forme ellipsoïde. *E. coli*, quand à elle, est sous forme de bâtonnet. Cette différence de forme a, sans doute, un effet sur le dépôt des cellules sur la microsieve et leur organisation dans le dépôt. Il semble exister une étroite relation entre la forme de la cellule et les propriétés de la filtration, la résistance et la porosité du dépôt [33].

VI.2.2.1 Influence de la morphologie sur la formation de la première couche

L'organisation de la première couche des dépôts de levures et de microsphères de 4,8 μm sur les microsieves de 0,8 μm et 2 μm sont présentés, respectivement dans la **Figure VI.2-5** et la **Figure VI.2-6**. Pour les levures comme pour les microsphères, les caractéristiques géométriques de la microsieve (taille de pores, distance entre deux centres de pores, porosité de la membrane...) jouent un rôle déterminant sur le pourcentage des pores bloqués et sur la fraction de pores protégés après le dépôt des premières particules. Cependant, même si les levures paraissent toujours centrées sur les pores, leur forme elliptique change la fraction des pores voisins protégés. L'hétérogénéité de taille des levures et la présence de certaines cellules de taille supérieure à celle des microsphères causent, pour la membrane de 0,8 μm , la couverture d'un nombre plus important de pores que dans le cas des microsphères. Pour la membrane de 2 μm , après le dépôt d'une levure, le nombre de pores protégés semble plus important que pour les microsphères. Cependant, ces différences lors de la formation de la première couche ne semblent pas avoir un effet important sur l'organisation générale des dépôts formés.

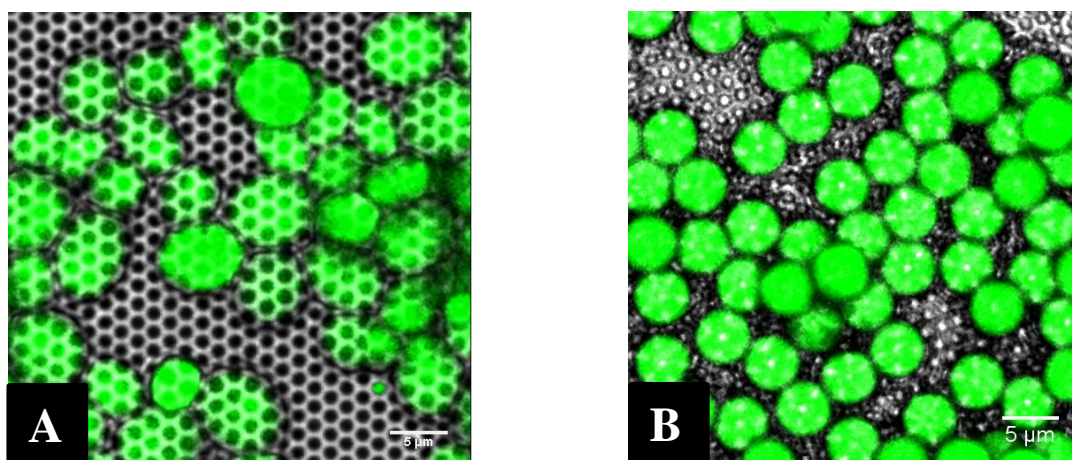


Figure VI.2-5 : Images composites de la microsieve 0,8 μm colmatée par des levures colorées avec le Syto 9 (A) et des microsphères de 4,8 μm (B) ; (objectif x 63, zoom 6)

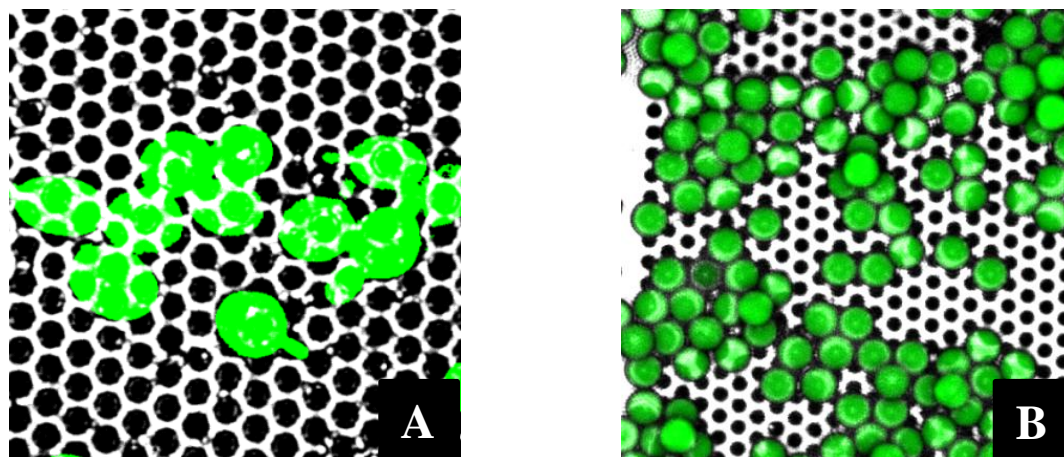


Figure VI.2-6 : Images composites de la microsieve 2 µm colmatée par des levures colorées avec le Syto 9 (objectif x 63, zoom 6) (A) et des microsphères de 4,8 µm (B) (objectif x 40, zoom 6)

Pour les bactéries et les microsphères de 1 µm, l'organisation de la première couche est présentée dans la **Figure VI.2-7**. Le phénomène de blocage des pores est observé dans les deux cas ainsi que la formation d'agrégats de particules sur quelques pores qui induirait la construction de ponts. Malheureusement, la taille des bactéries, à la limite de la résolution de l'objectif utilisé, et leur photoblanchiment rend l'observation d'*Escherichia coli* imprécise et la détermination de l'orientation des cellules en bâtonnets durant le blocage des pores n'est pas possible. Cette limite est encore plus pénalisante durant la filtration de mélanges de microorganismes et les bactéries colorées au Syto 84 (**Figure VI.2-8**).

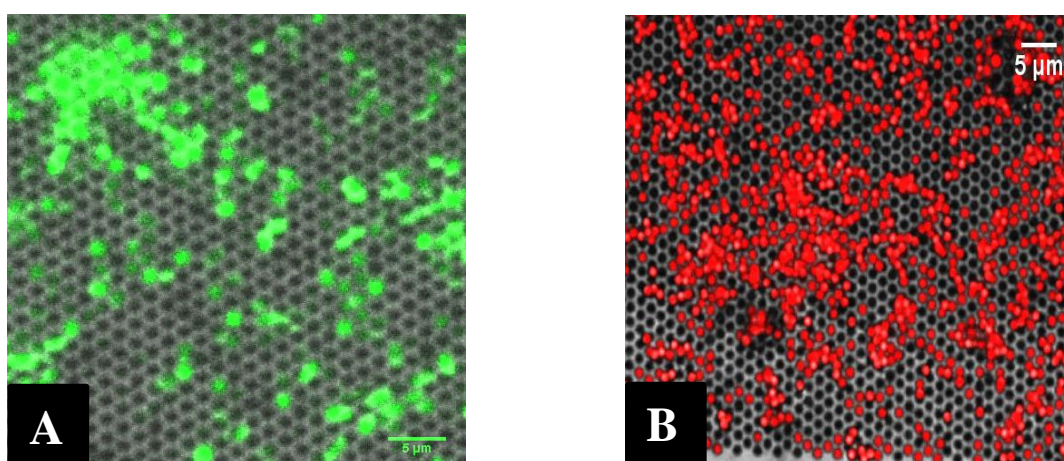


Figure VI.2-7 : Images composites de la microsieve 0,8 µm colmatée par des bactéries colorées au Syto 9 (A) et des microsphères de 1 µm (B) (objectif x 63, zoom 6)

Durant la filtration de suspensions bidispersées de particules et de mélanges levures/bactéries, l'organisation générale des dépôts est assez similaire (**Figure VI.2-8**) même si le photoblanchiment d'*Escherichia coli* rend imprécise et difficile l'observation des bactéries. Les microorganismes et les microsphères semblent se poser individuellement et se répartir uniformément sur les zones filtrantes des microsieves. Les mêmes mécanismes de formation du dépôt sont observés. On remarque la présence de quelques agrégats de bactéries entre les cellules de levures.

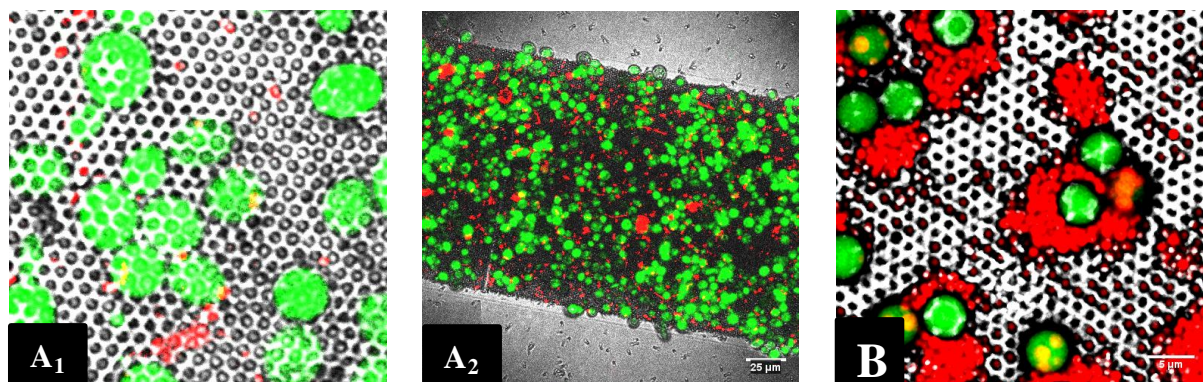


Figure VI.2-8 : Images composites de la microsieve 0,8 µm colmatée par un mélange de microorganismes (objectif x 63, (A₁ : zoom 6 et A₂ : zoom 1) et une suspension bidispersées de microsphères (B) (objectif x 63, zoom 6)

VI.2.2.2 Construction de dépôts multicouches et analyse de leur morphologie interne

Pour des suspensions monodispersées de particules inertes et pures de microorganismes, les taux de couverture de la membrane, α_c , en fonction de la masse de particules déposée (**Figure VI.2-9**) peuvent être considérées similaires pour des microorganismes et des microsphères de tailles voisines, compte tenu de la précision du traitement des images. La géométrie de la membrane (taille de pore, porosité...) et les caractéristiques des particules filtrées (forme, propriétés de surface, taille...) ne semblent pas avoir un effet notable sur l'évolution d' α_c .

En revanche, pour le mélange des microorganismes, le taux de couverture semble faible par rapport à celui obtenu lors de la filtration de suspensions bidispersées de particules inertes (**Figure VI.2-10**). Il se stabilise à une valeur de 0,52 alors qu'il atteint 1 pour les particules inertes en mélange. Ceci pourrait être attribué au photoblanchiment des bactéries colorées au Syto 84 et donc à une sous-estimation du dépôt.

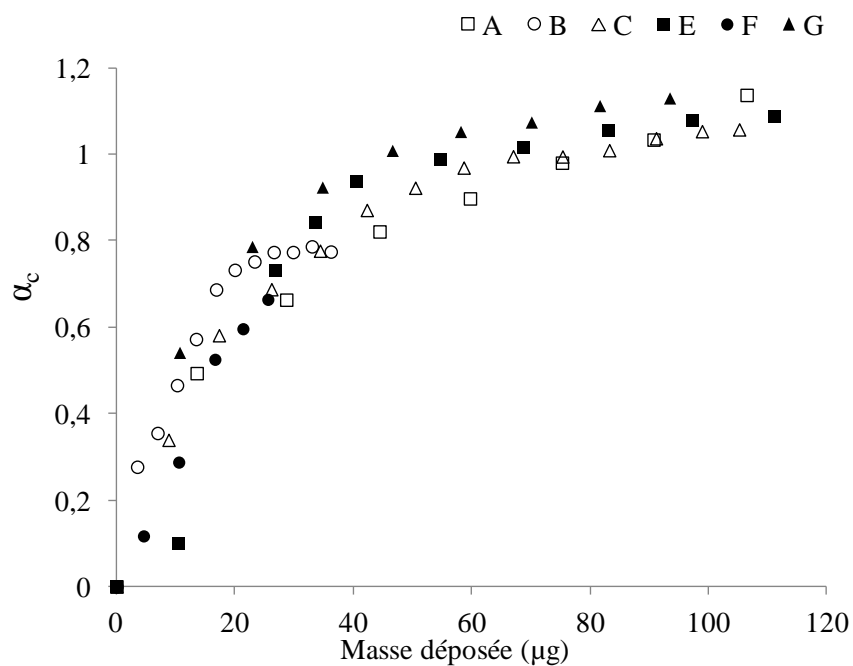


Figure VI.2-9 : Taux de couverture apparent de la membrane, α_c , en fonction de la masse déposée durant la filtration de particules monodispersées et de suspensions pures de microorganismes

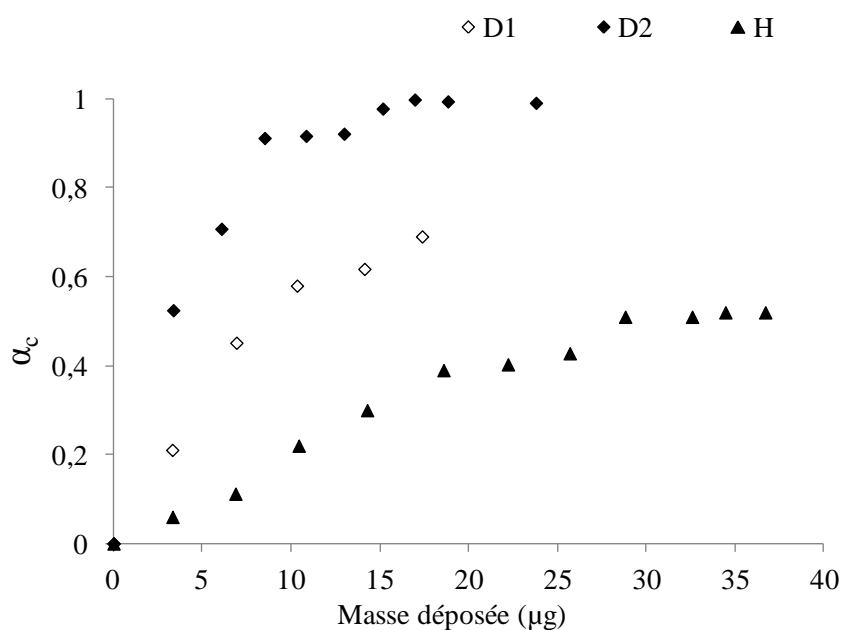


Figure VI.2-10 : Taux de couverture apparent de la membrane, α_c , en fonction de la masse déposée lors de la filtration de particules inertes bidisperses (D_1 et D_2) et du mélange levures/bactéries (H)

La comparaison des hauteurs quadratiques moyennes des dépôts de levures et de microsphères de 4,8 μm sur les deux microsieves (0,8 μm et 2 μm) indique que les caractéristiques géométriques des membranes ne semblent pas avoir d'effet sur l'épaisseur moyenne pour des masses déposées inférieures à 50 μg environ qui sont similaires dans les deux cas **Figure VI.2-11**. Toutefois, pour des masses déposées supérieures, les dépôts de microsphères apparaissent plus épais que ceux de levures à même masse déposée.

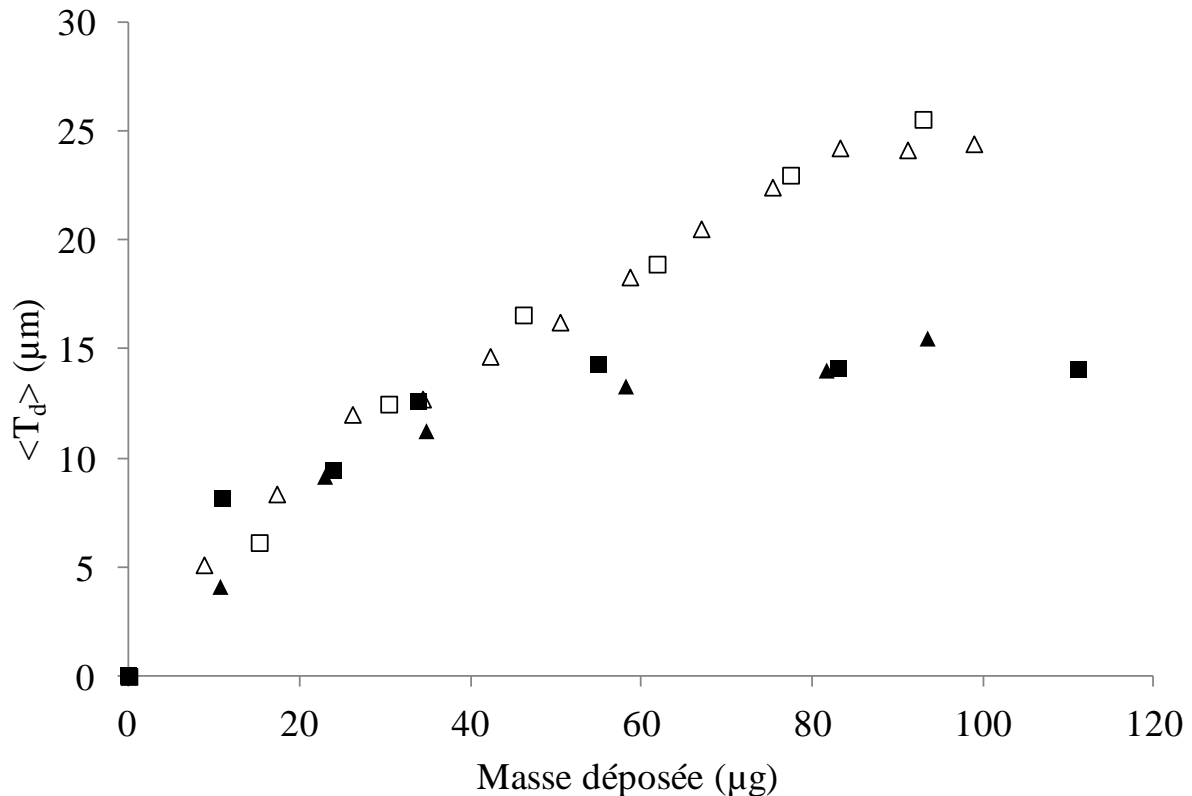


Figure VI.2-11 : Epaisseur quadratique moyenne des dépôts formés durant la filtration des levures (symboles pleins) et des microsphères 4,8 μm (symboles vides) sur les membranes 0,8 μm ($\blacktriangle, \triangle$) et 2 μm (\blacksquare, \square) en fonction de la masse déposée

Dans les deux cas, la fraction de la surface occupée par les levures et les microsphères pour chaque section le long de l'axe z des dépôts (épaisseur) en fonction de la masse déposée (**Figures VI.2-12 et VI.2-12**) met en évidence trois régions de différentes porosités et concentrations. Les particules semblent couvrir la première couche et couvrir la surface de la membrane (direction xy) avant la construction du dépôt (direction xz). Les porosités mesurées localement dans les parties centrales des dépôts sont proches. Cependant, si les particules inertes parfaitement sphériques et rigides, forment des dépôts homogènes le long de l'axe z,

les levures en revanche de forme elliptique pourraient prendre différentes orientations dans le dépôt ce qui expliquerait la réduction un peu plus importante de perméabilité précédemment constatée (**Figure VI.2-2**). Mota et al. [94] ont comparé la résistance spécifique, la porosité et la tortuosité des dépôts pour différents microorganismes en forme de bâtonnet (*Bacillus sp.*) et de forme elliptique (*S. cerevisiae*). En analysant le colmatage en fonction du ratio δ =longueur/diamètre des cellules, ils ont montré que plus les cellules sont allongées et le ratio δ important, plus la tortuosité des dépôts intervient sur la résistance spécifique. Par contre, pour les particules plus sphériques, l'effet de la tortuosité est négligeable.

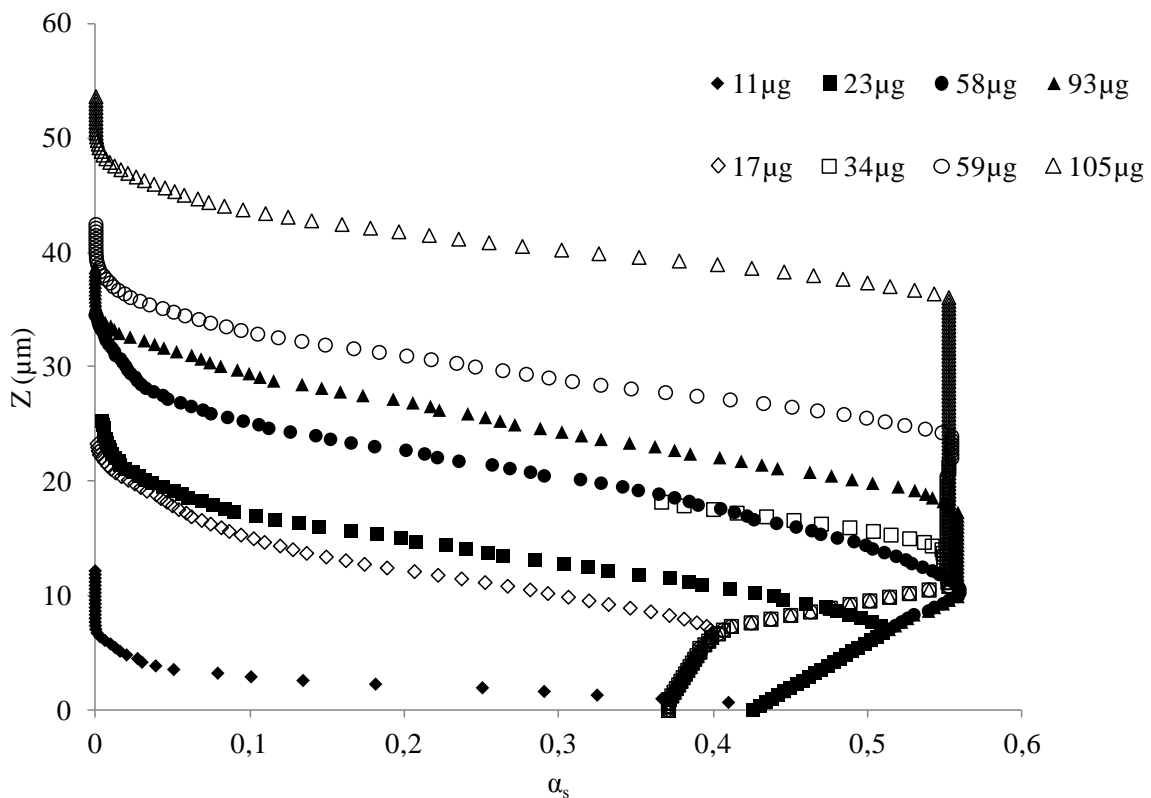


Figure VI.2-12 : Fraction de la surface occupée par les levures (symboles pleins) et les microsphères de 4,8 µm (symboles vides) le long de l'axe z d'un dépôt sur une membrane 0,8 µm en fonction de la masse déposée

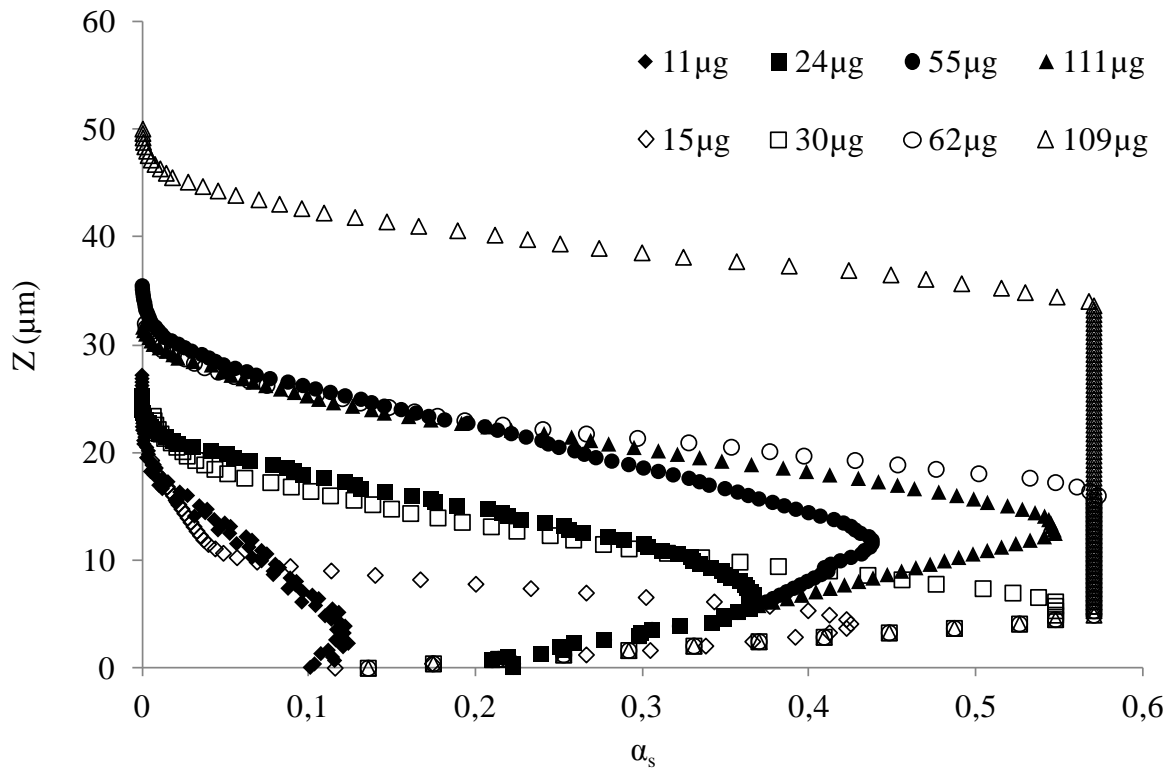


Figure VI.2-13 : Fraction de la surface occupée par les levures (symboles pleins) et les microsphères de 4,8 μm (symboles vides) le long de l'axe z d'un dépôt sur une membrane 2 μm en fonction de la masse déposée.

La comparaison de α_s en fonction de la hauteur du dépôt durant la microfiltration des microsphères de 1 μm et les bactéries (**Figure VI.2-14**) indique que la croissance des dépôts semblent se faire simultanément dans les deux directions xy et xz. En effet, la hauteur augmente rapidement avant que la première couche ne soit entièrement formée. Néanmoins, les hauteurs des dépôts monodispersées de microsphères et de bactéries sont assez proches ce qui fait des particules inertes un bon modèle pour ces bactéries.

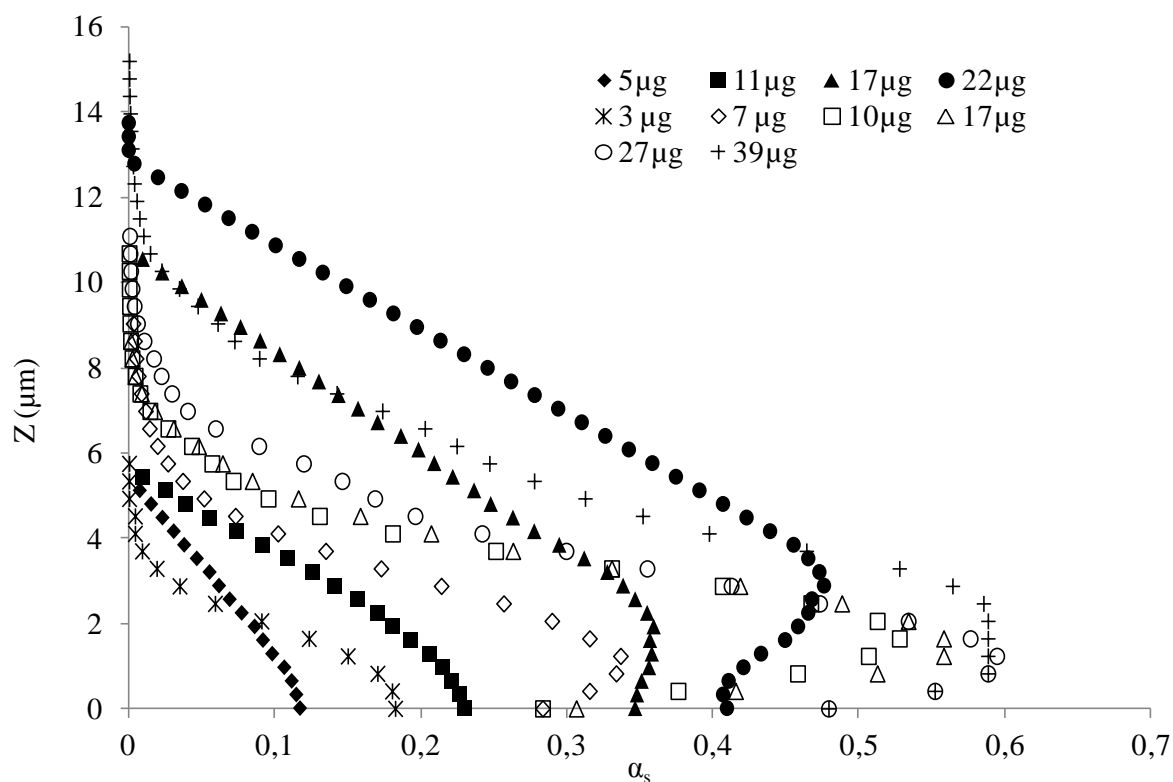


Figure VI.2-14 : Fraction de la surface occupée par les bactéries (symboles pleins) et les microsphères de 1 μm (symboles vides) pour chaque section le long de l'axe z de dépôts sur une membrane 0,8 μm en fonction de la masse déposée

Conclusion du chapitre

Ce chapitre s'est intéressé à la caractérisation à l'échelle globale et à l'échelle microscopique des dépôts biologiques par l'étude de l'organisation des microorganismes sur les membranes durant une filtration frontale en régime laminaire.

La première section a étudié la filtration des suspensions pures de microorganismes modèles. L'effet de la taille des pores du média filtrant est analysé lors de la filtration de suspensions de levures *Saccharomyces cerevisiae* colorée au Syto 9 sur des microsieves de 0,8 μm et 2 μm de diamètre de pores. Le rapport entre le diamètre des pores et celui des levures semble avoir un effet important sur la formation de la première couche. Pour les dépôts plus épais, ces paramètres ne semblent plus avoir d'impact sur leur morphologie.

L'effet de la taille de la cellule est étudié durant la filtration de la bactérie *Escherichia coli* colorée au Syto 9. L'ensemble des résultats obtenus lors de la filtration de suspensions pures montre que trois régions peuvent être identifiées dans le dépôt formé par des particules biologiques : la zone de germination, la zone centrale et la zone de capture.

La filtration d'une suspension contenant à la fois des levures et des bactéries colorées avec des marqueurs différents afin de les identifier de façon individuelle a été limitée à la formation de la première couche en raison du photoblanchiment des bactéries. Néanmoins, il ressort de ces essais que le dépôt s'initie bien de façon homogène et que la diminution initiale de perméabilité, à masse déposée identique, est moins importante que pour des bactéries seules.

Enfin, les résultats expérimentaux obtenus lors de l'étude de la morphologie des dépôts de particules inertes et biologiques sont confrontés et la simulation validée. En effet, l'ordre de grandeur de la performance des essais de filtration sont assez proches pour les deux types de particules. De plus, les mêmes phénomènes prenant place durant le dépôt des particules et la construction des dépôts sont observés.

Conclusion Générale et Perspectives

Les travaux réalisés dans cette thèse, sur l'observation et la caractérisation de la formation d'un dépôt de particules modèles sur une microsieve par microscopie confocale, ont permis des avancées nouvelles et prometteuses. Un certain nombre de points clés sur les mécanismes d'initiation et de construction ont été éclaircis ce qui pourra contribuer notamment à enrichir les modèles de colmatage mais également à améliorer les performances des procédés de filtration par membrane. Cependant, des verrous techniques et scientifiques ont été mis en lumière et il faudra les surmonter pour pouvoir analyser et modéliser le colmatage d'une membrane dans une application industrielle réelle avec un fluide complexe.

L'étude bibliographique a, d'abord, permis de rappeler les principaux paramètres régissant la formation des dépôts de particules et de présenter les techniques de caractérisation les plus pertinentes. Parmi ces techniques, la microscopie confocale est une méthode optique, innovante, non invasive permettant l'étude tridimensionnelle des dépôts *in situ* et en temps réel.

Puis, la problématique de cette étude a été positionnée en s'appuyant sur des essais de filtration tangentielle de suspensions de microorganismes à l'échelle semi industrielle. Deux microorganismes modèles avec des différences morphologiques importantes ont été sélectionnés : la levure *Saccharomyces cerevisiae* et la bactérie *Escherichia coli*. L'influence de la concentration des suspensions pures de levure ainsi que l'effet de l'ajout des bactéries sur les performances du procédé et sur la réversibilité des dépôts a été étudiée. Ce travail préliminaire a surtout montré les limites de l'approche globale.

Ainsi, une méthode innovante d'étude de la formation d'un dépôt qui repose sur l'utilisation de la microscopie confocale a été proposée. Une chambre de filtration munie d'une fenêtre d'observation a été conçue et réalisée pour visualiser *in situ* la dynamique du dépôt de microsphères de polystyrène ou de microorganismes fluorescents et caractériser l'évolution de la morphologie de l'empilement formé. Les membranes sélectionnées sont des microsieves en Nitrure de Silicium. Ce sont des membranes minces constituées d'un arrangement régulier de pores cylindriques parfaitement calibrés. Deux tailles de pores ont été utilisées : 0,8 μm et 2 μm .

Une étape de validation du dispositif couplant l'expérience à la simulation numérique a permis d'aboutir à un mode opératoire pertinent pour localiser les particules sur le média filtrant et analyser les mécanismes de construction de dépôts épais couche par couche. Le code de calcul Comsol Multiphysics a été utilisé, pour simuler numériquement l'écoulement

du fluide dans le canal et la formation progressive du dépôt sur la microsieve. Ce travail a permis de prédire la dynamique de la formation des premières couches et de confirmer l'homogénéité du dépôt après la première injection. La méthode innovante ainsi validée permet l'étude multiéchelle du dépôt : globalement à l'échelle du filtre, à l'échelle de la bande filtrante et à l'échelle du pore et/ou de la particule.

Afin d'approcher les mécanismes complexes se produisant durant la filtration de suspensions réelles, deux systèmes modèles ont été sélectionnés:

- Des microsphères fluorescentes en polystyrène de 1 μm et 4,8 μm de diamètre, de l'ordre de grandeur des microorganismes usuels, avec des caractéristiques spectrales distinctes.

- Des microorganismes largement rencontrés et exploités: la bactérie *Escherichia coli* et la levure *Saccharomyces cerevisiae*.

De façon générale, il faut noter que dans les conditions expérimentales de l'étude, les deux systèmes modèles, particules inertes et biologiques, conduisent à des dépôts dont la morphologie est sensiblement identique. Les propriétés de transport de ces différents dépôts varient, cependant, quelque peu compte tenu en particulier de la dispersion en taille des microorganismes par rapport aux microsphères.

Lors de la formation de la première couche de particules sur la microsieve, les particules se déposent, préférentiellement, de manière parfaitement centrée sur les pores, les bouchent et protègent de cette manière les pores voisins de l'obstruction par d'autres particules. Ce mécanisme induit la persistance d'une perméabilité résiduelle des membranes dont l'importance dépend du ratio taille des particules / taille des pores.

L'étude de la construction des dépôts multicouches par le biais de la mesure de l'évolution de la densité surfacique en particules le long de l'épaisseur du dépôt montre l'existence de trois régions spécifiques en fonction de la profondeur : (i) une région de germination en contact avec la microsieve avec une densité moyenne en particules, (ii) une région centrale où la porosité est la plus faible et (iii) une région superficielle, appelée aussi région de capture, de faible concentration où les particules nouvellement arrivées se déposent.

L'effet de l'homogénéité en taille de la suspension sur les caractéristiques du dépôt, lorsqu'un mélange de particules est filtré, a été étudié dans différentes configurations. Les positions finales des particules sur la microsieve restent identiques à celles observées durant la filtration de suspensions pures. En outre, les petites particules ont tendance à s'agréger autour des grosses particules puisqu'elles sont transportées par le fluide qui se dirige vers les pores

maintenus ouverts autour des grosses particules déjà déposées. L'analyse de la morphologie interne des dépôts épais constitués par un mélange de particules de taille différente montre l'existence des mêmes trois régions déjà mises en évidence. La filtration des petites particules sur une précouche de grosses particules déjà déposées conduirait à une amélioration des performances de filtration.

L'étude des propriétés des dépôts mixtes formés par un mélange des deux espèces de microorganismes s'est malheureusement limitée à la formation de la première couche en raison du problème du photoblanchiment des bactéries lorsqu'elles étaient colorées par du Syto 84. Toutefois, on a constaté que le dépôt s'initiait de manière homogène.

L'ensemble des résultats expérimentaux obtenus durant cette thèse s'inscrivent dans une démarche originale pour améliorer l'étude locale des caractéristiques des dépôts. Dans ce sens, ils contribuent significativement à une meilleure compréhension de l'accumulation de particules sur un support filtrant et de ses conséquences sur le colmatage du système filtrant et ses performances. En particulier, le développement d'une méthode innovante comportant un dispositif expérimental original et un protocole spécifique de caractérisation de la morphologie du dépôt de filtration *in situ* offre de nombreuses perspectives intéressantes.

En effet, la méthode développée dans ce travail pourra servir à la caractérisation d'autres dépôts. Plus précisément, elle pourrait être appliquée à l'étude de cas plus réalistes : par exemple pour étudier l'effet de la physico-chimie du milieu de suspension (pH, salinité...) sur l'agrégation des particules ou des paramètres environnementaux au sens large sur la structuration du dépôt.

De plus, compte tenu des résultats encourageants obtenus pour les microorganismes modèles, une complexification graduelle des paramètres opératoires est envisageable avec en particulier l'incorporation d'autres espèces pour tendre vers des fluides réels. Le rôle de l'âge des microorganismes sur leur physiologie et leurs propriétés de surface, sur la filtration et la construction du dépôt pourrait également être exploré.

Par ailleurs, dans cette thèse, seuls des dépôts externes ont été analysés. Or, en réalité, le colmatage interne des membranes est fréquent et a un effet drastique sur la performance de la filtration. La démarche proposée dans ce travail pourrait être appliquée à l'étude de la construction de dépôts de particules de taille inférieure à celle des pores et à différentes concentrations. La localisation préférentielle des particules dans le cas de suspensions diluées et la dynamique de la formation de ponts sur les pores dans le cas de suspensions plus

concentrées pourrait également être suivie en temps réel et *in situ* grâce à la méthode proposée dans ce travail

L'utilisation de deux microsieves de taille de pores différentes a souligné le rôle clé joué par la structure du média filtrant sur les caractéristiques des premières couches. Afin de confirmer les résultats obtenus, d'autres tailles ou forme de pores ainsi que d'autres organisations spatiales des pores pourraient être considérées, de même qu'un autre type de membrane.

D'un point de vue théorique, le développement d'un modèle de formation de dépôt à l'échelle de la particule, s'appuyant sur un calcul précis de l'écoulement et des trajectoires de particules, en tenant compte des forces d'interaction entre particules et entre particules et support filtrant, pourrait être envisagé. Un tel modèle, une fois confronté aux résultats expérimentaux et validé, contribuerait à une meilleure compréhension des mécanismes suggérés dans cette thèse et permettrait d'explorer des situations plus complexes.

Enfin, l'approche numérique à l'échelle de l'élément filtrant développée dans cette étude pourrait contribuer au développement d'une nouvelle modélisation pour simuler des systèmes filtrants à l'échelle industrielle ou semi industrielle (module de fibres creuses...) à partir d'une méthode de changement d'échelle. Les paramètres déterminés expérimentalement (épaisseur, perméabilité en fonction de la masse déposée, porosité...) pourraient aisément être incorporés dans cette approche numérique afin d'affiner les prédictions de la simulation.

Références Bibliographiques

-
- [1] UNICEF & OMS, Progrès en matière d'alimentation en eau et d'assainissement en 2012, *The Water Institute at UNC/Emily Zuehlke, Ouganda* (2012) 1-134.
- [2] UNICEF & OMS, Progrès en matière d'eau potable et d'assainissement, Spécial assainissement, *UNICEF, New York et OMS, Genève* (2008) 1-58.
- [3] S. Beaufort, S. Alfenore, and C. Lafforgue, Use of fluorescent microorganisms to perform *in vivo* and *in situ* local characterization of microbial deposits, *Journal of Membrane Science*, 369 (2011) 30–39.
- [4] C. Charcosset, Procédés membranaires à application pharmaceutique et biotechnologique, *Itbm-Rbm*, 27 (2006) 1–7.
- [5] FAO, Agriculture et rareté de l'eau: une approche programmatique pour l'efficacité de l'utilisation de l'eau et la productivité agricole, *COAG*, 7 (2007) 1–13.
- [6] FAO, L'eau, l'agriculture et l'alimentation, *World water assesement programme*, (2004) 1–63.
- [7] K. Frenken & B. Kiersch, Monitoring agricultural water use at country level: Experiences of a pilot project in Benin and Ethiopia, *Land and Water discussion paper* (2011) 9-47.
- [8] V. Lazarova & F. Brissaud, Intérêt, bénéfices et des eaux usées en France, L'eau, l'industrie, les nuisances, *Unesco*, 299 (2003) 43–53.
- [9] P. Paraskeva & N.J.D. Graham, Treatment of a secondary municipal effluent by ozone, UV and microfiltration: microbial reduction and effect on effluent quality, *Desalination*, 186 (2005) 47–56.
- [10] M. Gómez, A. de la Rua, G. Garralón, F. Plaza, E. Hontoria, M. Gómez, Urban wastewater disinfection by filtration technologies, *Desalination*, 190 (2006) 16–28.
- [11] S. Liu, M. Carroll, R. Iverson, C. Valera, J. Vennari, K. Turco, R. Piper, R. Kiss, H. Lutz, Development and qualification of a novel virus removal filter for cell culture applications, *Biotechnolgy Progress*, 16 (2000) 425-434.
- [12] L. Giorno & E. Drioli, Biocatalytic membrane reactors: applications and perspectives, *Trends in Biotechnology*, 18 (2000) 339–349.
- [13] J.A. Levesley & M. Hoare, The effect of high frequency backflushing on the microfiltration of yeast homogenate suspensions for the recovery of soluble proteins, *Journal of Membrane Science*, 158 (1999) 29–39.
- [14] R.J. Wakeman & C.J. Williams, Additional techniques to improve microfiltration, *Separation and Purification Technology*, 26 (2002) 3–18.

-
- [15] G. Foley, A review of factors affecting filter cake properties in dead-end microfiltration of microbial suspensions, *Journal of Membrane Science*, 274 (2006) 38–46.
- [16] B. Espinasse, Approche théorique et expérimentale de la filtration tangentielle de colloïdes: flux critique et colmatage, *Université Paul Sabatier, Toulouse*, 2003.
- [17] K. Sutherland, Filters and filtration handbook, 5th ed. in Elsevier (Eds.), Oxford, 2008, pp. 1–521.
- [18] J. Lin, D. Bourrier, M. Dilhan, P. Duru, Particle deposition onto a microsieve, *Physics of Fluids*, 21 (2009) 1–13.
- [19] C. Ning Koh, T. Wintgens, T. Melin, F. Pronk, Microfiltration with silicon nitride microsieves and high frequency backpulsing, *Desalination*, 224 (2008) 88–9.
- [20] G. Brans, A. van Dinther, R.M. Boom, Transmission and fractionation of micro-sized particle suspensions, *Journal of Membrane Science*, 290 (2007) 230–240.
- [21] E. Brito-de la Fuente, B. Torrestiana-Sánchez, E. Martínez-González, J.M. Mainou-Sierra, Microfiltration of whole milk with silicon microsieves: Effect of process variables, *Chemical Engineering Research and Design*, 88 (2010) 653–660.
- [22] G.T. Vladislavljević & R. Williams, Recent developments in manufacturing emulsions and particulate products using membranes, *Advances in colloid and interface science*, 113 (2005) 1–20.
- [23] S. Kuiper, C.J.M. Van Rijn, W. Nijdam, M.C. Elwenspoek, Development and applications of very high flux microfiltration membranes, *Journal of Membrane Science*, 150 (1998) 1–8.
- [24] G. Brans, J. Kromkamp, N. Pek, J. Gielen, J. Heck, C. J. M. van Rijn, R.G. . vander Sman, C.G.P.H. Schroën, R.M. Boom, Evaluation of microsieve membrane design, *Journal of Membrane Science*, 278 (2006) 344–348.
- [25] D. Hughes, U.K. Tirlapur, R. Field, Z. Cui, *In situ* 3D characterization of membrane fouling by yeast suspensions using two-photon femtosecond near infrared non-linear optical imaging, *Journal of Membrane Science*, 280 (2006) 124–133.
- [26] H.K. Vyas, A.J. Mawson, R.J. Bennett, A.D. Marshall, A new method for estimating cake height and porosity during crossflow filtration of particulate suspensions, *Journal of Membrane Science*, 176 (2000) 113–119.
- [27] Y. Marselina, P. Le-Clech, R.M. Stuetz, V. Chen, Characterisation of membrane fouling deposition and removal by direct observation technique, *Journal of Membrane Science*, 341 (2009) 163–171.
- [28] V. Tarabara, Effect of hydrodynamics and solution ionic strength on permeate flux in cross-flow filtration: direct experimental observation of filter cake cross-sections, *Journal of Membrane Science*, 241 (2004) 65–78.
-

-
- [29] R. Wakeman, The influence of particle properties on filtration, *Separation and Purification Technology*, 58 (2007) 234–241.
- [30] S.T. Kang, A. Subramani, E. Hoek, M.A. Deshusses, M.R. Matsumoto, Direct observation of biofouling in cross-flow microfiltration: mechanisms of deposition and release, *Journal of Membrane Science*, 244 (2004) 151–165.
- [31] Y. Okamoto, K. Ohmori, C. E. Glatz, Harvest time effects on membrane cake resistance of *Escherichia coli* broth, *Journal of Membrane Science*, 190 (2001) 93–106.
- [32] M. Meireles, C. Molle, M.J.J. Clifton, P. Aimar, The origin of high hydraulic resistance for filter cakes of deformable particles: cell-bed deformation or surface-layer effect?, *Chemical Engineering Science*, 59 (2004), 5819–5829.
- [33] A.A. McCarthy, P.K. Walsh, G. Foley, Characterising the packing and dead-end filter cake compressibility of the polymorphic yeast *Kluyveromyces marxianus* var. *marxianus* NRRLy2415, *Journal of Membrane Science*, 198 (2002) 87–94.
- [34] K. Damak, A. Ayadi, B. Zeghmami, P. Schmitz, A new Navier-Stokes and Darcy's law combined model for fluid flow in crossflow filtration tubular membranes, *Desalination*, 161 (2004) 67–77.
- [35] J. Günther, P. Schmitz, C. Albasi, C. Lafforgue, A numerical approach to study the impact of packing density on fluid flow distribution in hollow fiber module, *Journal of Membrane Science*, 348 (2010) 277–286.
- [36] J. Mendret, C. Guigui, C. Cabassud, P. Schmitz, Numerical investigations of the effect of non-uniform membrane permeability on deposit formation and filtration process, *Desalination*, 263 (2010) 122–132.
- [37] F. Noël, P. Schmitz, M. Prat, Modélisation de la formation d'une couche de particules sur une paroi poreuse, 18ème Congrès Français de Mécanique, Grenoble, 27-31 août, 2007, pp. 1-7.
- [38] K.-J. Hwang, Y.-S. Wu, W.-M. Lu, The surface structure of cake formed by uniform-sized rigid spheroids in cake filtration, *Power Technology*, 7 (1996) 161–168.
- [39] K.-J. Hwang, H.-C. Liu, W.-M. Lu, Local properties of cake in cross-flow microfiltration of submicron particles, *Journal of Membrane Science*, 138 (1998). 181–192.
- [40] M. Rahimi, S. S. Madaeni, K. Abbasi, CFD modeling of permeate flux in cross-flow microfiltration membrane, *Journal of Membrane Science*, 255, (2005) 23–31.
- [41] A.L. Ahmad, K.K. Lau, M.Z.A. Bakar, S.R.A. Shukor, Integrated CFD simulation of concentration polarization in narrow membrane channel, *Computers & Chemical Engineering*, 29 (2005) 2087–2095.
-

-
- [42] P. Bacchin, B. Espinasse, P. Aimar, Numerical simulation of colloidal dispersion filtration: description of critical flux and comparison with experimental results, *Desalination*, 192 (2006) 74–81.
- [43] D. Delaunay, M. Rabiller-Baudry, L. Paugam, Mapping of protein fouling by FTIR-ATR as experimental tool to study membrane fouling and fluid velocity profile in various geometries and validation by CFD simulation, *Chemical Engineering and Processing: Process Intensificatio*, 47 (2008) 1106–1117.
- [44] F. Rouvet, K. Fiaty, P. Laurent, J.K. Liou, Modelling and simulation of membrane fouling in batch ultrafiltration on pilot plant, *Computers and Chemical Engineering*, 22 (1998) 901–904.
- [45] A. Pak, T. Mohammadi, S.M. Hosseinalipour, V. Allahdini, CFD modeling of porous membranes, *Desalination*, 222 (2008) 482–488.
- [46] K.W.K. Yee, D.E. Wiley J. Bao, A unified model of the time dependence of flux decline for the long-term ultrafiltration of whey, *Journal of Membrane Science*, 332 (2009) 69–80.
- [47] V. Chen, Non-invasive observation of synthetic membrane processes? a review of methods, *Journal of Membrane Science*,. 241 (2004) 23–44.
- [48] F. Meng, B. Liao, S. Liang, F. Yang, H. Zhang, L. Song, Morphological visualization, componential characterization and microbiological identification of membrane fouling in membrane bioreactors (MBRs), *Journal of Membrane Science*, 361 (2010) 1–14.
- [49] A.P. Mairal, A.R. Greenberg, W.B. Krantz, L.J. Bond, Real-time measurement of inorganic fouling of (RO) desalination membranes using ultrasonic time-domain reflectometry, *Journal of Membrane Science*, 159 (1999) 185–196.
- [50] H.G.L. Coster, T.C. Chilcott, A.C.F. Coster, Impedance spectroscopy of interfaces, membranes and ultrastructures, *Bioelectrochemistry and Bioenergetics*., 40 (1996) 79–98.
- [51] A. Frank, G.G. Lipscomb, M. Dennis, Visualization of concentration fields in hemodialyzers by computed tomography, *Journal of Membrane Science*, 175 (2000) 239–251.
- [52] D. Airey, S. Yao, J. Wu, V. Chen, A.G. Fane, J.M. Pope, An investigation of concentration polarization phenomena in membrane filtration of colloidal silica suspensions by (NMR) microimaging, *Journal of Membrane Science*, 145 (1998) 145–158.
- [53] J. Li, R.D. Sanderson, E.P. Jacobs, Non-invasive visualization of the fouling of microfiltration membranes by ultrasonic time-domain reflectometry, *Journal of Membrane Science*, 201 (2002) 17–29.
- [54] P. Schmitz, B. Wandelt, D. Houi, M. Hildenbrand, Particle aggregation at the membrane surface in crossflow microfiltration, *Journal of Membrane Science*, 84 (1993) 171–183.
-

-
- [55] B. Fan & X. Huang, Characteristics of a Self-Forming Dynamic Membrane Coupled with a Bioreactor for Municipal Wastewater Treatment, *Environmental Science and Technology*, 36 (2002) 5245–5251.
- [56] B. Boissier, F. Lutin, A. Vernhet, Particles deposition during the cross-flow microfiltration of red wines incidence of the hydrodynamic conditions and of the yeast to fines ratio, *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification*, 47 (2007) 276–286.
- [57] B. Tansel, J. Sager, J. Garland, S. Xu, L. Levine, P. Bisbee, Biofouling affinity of membrane surfaces under quiescent conditions, *Desalination*, 227 (2008) 264–273.
- [58] B. Mi & M. Elimelech, Organic fouling of forward osmosis membranes: Fouling reversibility and cleaning without chemical reagents, *Journal of Membrane Science* 348 (2010) 337–345.
- [59] W.R. Bowen, N. Hilal, R.W. Lovitt, C. Wright, Characterisation of membrane surfaces: direct measurement of biological adhesion using an atomic force microscope, *Journal of Membrane Science* 154 (1999) 205–212.
- [60] H. Yamamura, K. Kimura, T. Okajima, H. Tokumoto, Y. Watanabe, Affinity of Functional Groups for Membrane Surfaces: Implications for Physically Irreversible Fouling, *Environmental Science & Technology*, 42 (2008) 5310–5315.
- [61] H. Li, A. G. Fane, H. G. L. Coster, S. Vigneswaran, Direct observation of particle deposition on the membrane surface during crossflow microfiltration, *Journal of Membrane Science*, 149 (1998) 83–97.
- [62] H. Li, A. G. Fane, H.G.L. Coster, S. Vigneswaran, Observation of deposition and removal behaviour of submicron bacteria on the membrane surface during crossflow microfiltration, *Journal of Membrane Science*, 217 (2003) 29–41.
- [63] W. D. Mores and R. H. Davis, “Direct visual observation of yeast deposition and removal during microfiltration,” *Journal of Membrane Science*, vol. 189, pp. 217–230, 2001.
- [64] P. Le-Clech, Y. Marselina, Y. Ye, R.M. Stuetz, V. Chen, Visualisation of polysaccharide fouling on microporous membrane using different characterisation techniques, *Journal of Membrane Science*, 290 (2007) 36–45.
- [65] J. Mendret, C. Guigui, P. Schmitz, C. Cabassud, An Optical Method for *In Situ* Characterization of Fouling During Filtration, 53 (2007) 2265–2274.
- [66] J. Altmann & S. Ripperger, Particle deposition and layer formation at the crossflow microfiltration, *Journal of Membrane Science.*, 124 (1997) 119–128.
- [67] T. Schluep & F. Widmer, Initial transient effects during cross flow microfiltration of yeast suspensions, *Journal of Membrane Science*, 115 (1996) 133–145.
-

-
- [68] M. Hamachi & M. Mietton-Peuchot, Cake thickness measurement with an optical laser sensor, *Trans IChemE*, 79 (2011) 2–6.
- [69] M. Hamachi & M. Mietton-Peuchot, Experimental investigations of cake characteristics in crossflow microfiltration, *Chemical Engineering Science* 54 (1999) 4023–4030.
- [70] D.C. Fung & J.A Theriot, Imaging techniques in microbiology, *Current opinion in microbiology*, 1 (1998) 346–51.
- [71] S. Brown & C. Poujoul, Mieux comprendre les fluorochromes pour la microscopie, *La Microscopie confocale Formation Permanente*, CNRS, 2009, pp. 1–35.
- [72] A. Biosciences, Fluorescence Imaging, Principeles and methods, *Amersham Biosciences*, Rev, AB, 2002, pp 1-162.
- [73] H.C. Hoch, C.D. Galvani, D. H. Szarowski, J.N. Turner, Two new fluorescent dyes applicable for visualization of fungal cell walls, *Mycologia*, 97, (2005) 580–588.
- [74] M. Marroquin, T. Bruce, J. Pellegrino, S.R. Wickramasinghe, S.M. Husson, Characterization of asymmetry in microporous membranes by cross-sectional confocal laser scanning microscopy, *Journal of Membrane Science*, 379 (2011) 504–515.
- [75] S. Inou, Foundations of Confocal Scanned Imaging in Light Microscopy, in *Handbook of Biological Confocal Microscopy*, Springer Sc., J. B. Pawley, Ed. New York, 2006, pp. 1–19.
- [76] J. Conchello & J. W. Lichtman, Optical sectioning microscopy, *Nature Methods*, 2 (2005) 920–931.
- [77] P.T. Tran, A. Paoletti, F. Chang, Imaging green fluorescent protein fusions in living fission yeast cells, *Methods*, 33 (2004) 220–5.
- [78] E. Kahn, Imagerie spectrale et analyse de séquences d'images en microscopie confocale à balayage laser, *IRBM*, 28 (2007) 107–116.
- [79] M. Ferrando, A. Rozek, M. Zator, F. Lopez, C. Guell, An approach to membrane fouling characterization by confocal scanning laser microscopy, *Journal of Membrane Science* 250 (2005) 283–293.
- [80] B.-K. Hwang, C.-H. Lee, I.-S. Chang, A. Drews, R. Field, Membrane bioreactor: TMP rise and characterization of bio-cake structure using CLSM-image analysis, *Journal of Membrane Science*, 419–420 (2012) 33–41.
- [81] C.H. Lee, P.K. Park, W.N. Lee, B.K. Hwang, S.H. Hong, K.M. Yeon, H.S. Oh, I.S. Chang, Correlation of biofouling with the bio-cake architecture in an MBR, *Desalination*, 231 (2008) 115–123.
- [82] P. Park, C. Lee, S. Lee, Determination of cake porosity using image analysis in a coagulation–microfiltration system, *Journal of Membrane Science*, 293 (2007) 66–72.
-

-
- [83] K.H. Kim, C. Buehler, P.T. So, High-speed, two-photon scanning microscope. *Applied Optics*, 38 (1999) 6004–6009.
- [84] G.Y. Fan, H. Fujisaki, A. Miyawaki, R.K. Tsay, T.Y.T. Roger, M. Ellisman, Multiphoton Microscopy : Seeing deeper and clearer, *Biophysical Journal*, 76 (1999) 1–7.
- [85] J. Li & R. D. Sanderson, *In situ* measurement of particle deposition and its removal in microfiltration by ultrasonic time-domain reflectometry, *Desalination*, 146 (2002) 169–175.
- [86] M. Gironès, Z. Borneman, M. Wessling, The role of wetting on the water flux performance of microsieve membranes, *Journal of Membrane Science*, 259 (2005) 55–64.
- [87] G. Adam & H. Duncan, Development of a sensitive and rapid method for the measurement of total microbial activity using Fluorescein diacetate (FDA) in a range of soils, *Soil Biology and Biochemistry*, 33 (2001) 943–951.
- [88] M.-N. Bellon-Fontaine, J. Rault, C.J. van Oss, Microbial adhesion to solvents: a novel method to determine the electron-donor/electron-acceptor or Lewis acid-base properties of microbial cells, *Colloids Surfaces B Biointerfaces*, 7 (1996) 47–53.
- [89] G. Guillemot, G. Vaca-Medina, H. Martin-Yken, A. Vernhet, P. Schmitz, M. Mercier-Bonin, Shear-flow induced detachment of *Saccharomyces cerevisiae* from stainless steel: influence of yeast and solid surface properties, *Colloids Surf. B. Biointerfaces*, 49 (2006) 126–35.
- [90] C.J.M. Van Rijn, Micro filtration Membrane Sieve with Silicon Micro Machining for Industrial and Biomedical Applications, *IEEE*, 6 (83–87).
- [91] R. Wakeman, The influence of particle properties on filtration, *Separation and Purification Technology*, 58 (2007) 234–241.
- [92] Y. Marselina, P. Le-Clech, R. Stuetz, V. Chen, Detailed characterisation of fouling deposition and removal on a hollow fibre membrane by direct observation technique, *Desalination*, 231 (2008) 3–11.
- [93] G. Foley, A.A. McCarthy, P. K. Walsh, Evidence for shape-dependent deposition in crossflow microfiltration of microbial cells, *Journal of Membrane Science.*, 250 (2005) 311–313.
- [94] M. Mota, J. Teixeira, A. Yelshin, Influence of cell-shape on the cake resistance in dead-end and cross-flow filtrations, *Separation and Purification Technology*, 27 (2002) 137–144.
- [95] S.L. Forsburg, The yeasts *Saccharomyces cerevisiae* and *Schizosaccharomyces pombe*: models for cell biology research, 18 (2005) 3–10.
-

- [96] M. Osumi, The ultrastructure of yeast: cell wall structure and formation. *Micron*, vol. 29 (1998) 207–33.
- [97] H.A. Barton & N.R. Pace, Discussion: Persistent coliform contamination in Lechuguila pools, *Journal of Cave and Karst Studies*, 4 (2005) 55–57.
- [98] P. Ludovico, F. Sansonetty, M. Côte-Real, Assessment of mitochondrial membrane potential in yeast cell populations by flow cytometry, *Microbiology*, 147 (2001) 3335–43.
- [99] S. Jakobs, High resolution imaging of live mitochondria., *Biochimica et Biophysica Acta*,. 1763 (2006) 561–75.
- [100] W.C. Swart, W.J.P. Van Wyk, H.C. Pohl, L.F.J. Kock, Variation in mitochondrial activity over the life cycle of *Nadsonia fulvescens*, *African Journal of Microbiology Research*, 4 (2010) 1727–1732.

Annexes

A. Caractérisation des suspensions modèles

A.1. Microsphères en latex

Distribution de taille

La distribution de taille des particules fluorescentes suspendues dans l'eau ultrapure, dans les mêmes conditions opératoires des essais de filtration, avant et après sonication correspond à celle annoncée par le constructeur avec une déviation inférieure à 5% (**Figure 1**). La sonication, ne modifie que légèrement la distribution moyenne des particules. On note la présence de petits agrégats à une faible concentration.

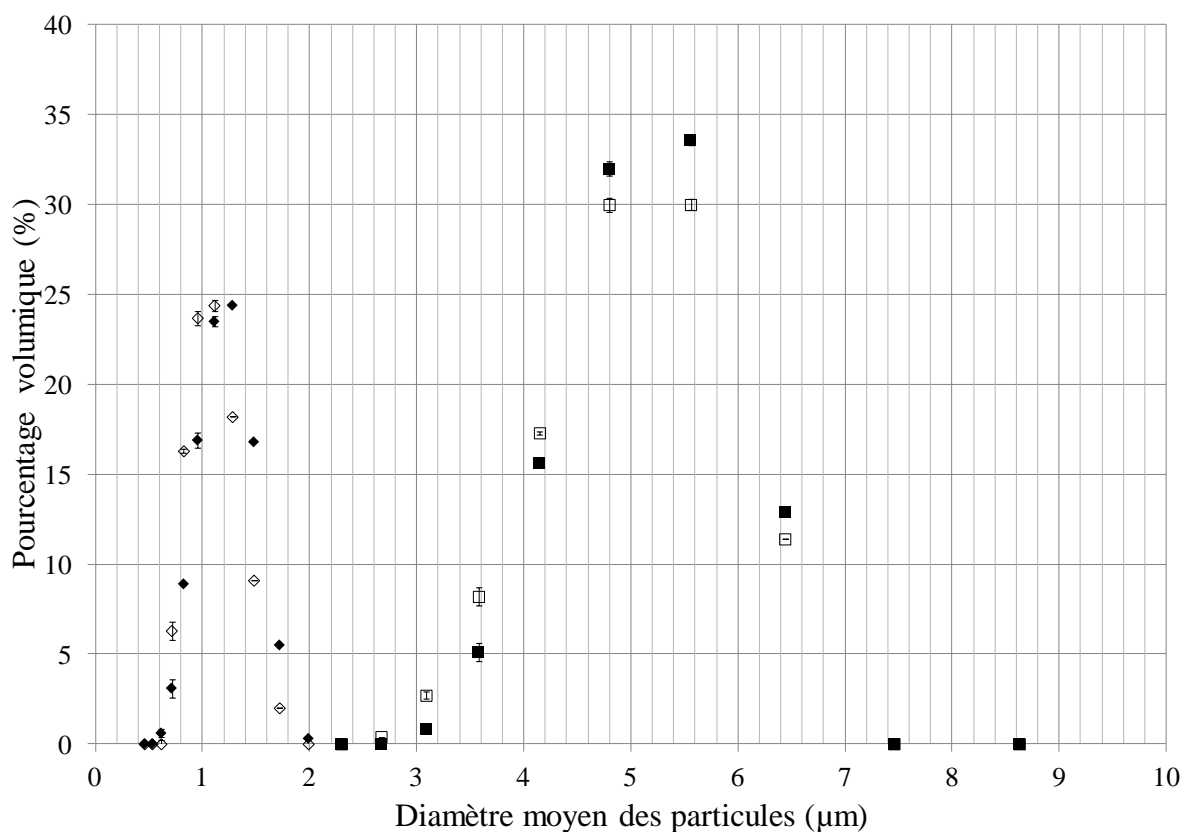


Figure 1 : Distribution de taille des particules en polystyrène de 4,8 µm (□, ■) et 1 µm (◇, ◆) suspendues dans l'eau ultrapure avant et après sonication (symboles pleins et vides, respectivement)

Potentiel zêta

Le potentiel zêta des deux types de particules dans l'eau ultrapure diminue lorsque leur concentration augmente (**Figure 2**). Dans toute la gamme de concentration considérée, les particules sont chargées négativement.

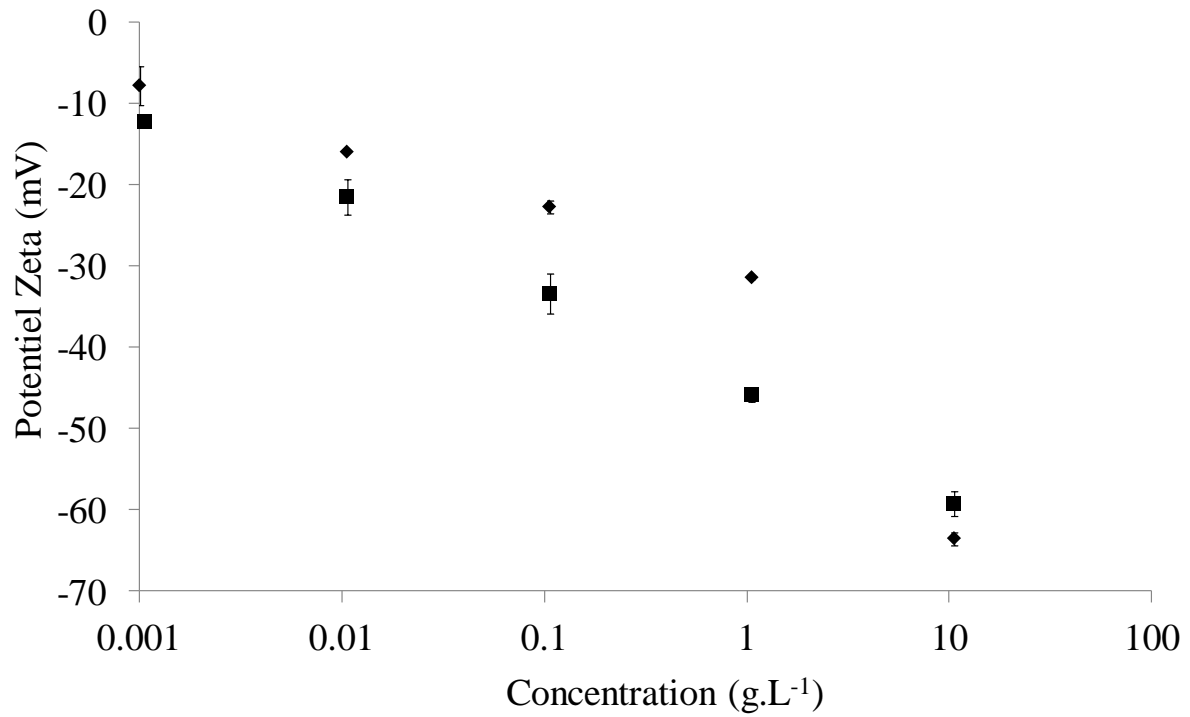


Figure 2 : Potentiel zêta des particules de 1 µm (◆) et 4,8 µm (■) en fonction de leur concentration

B. Préparation et caractérisation des suspensions de microorganismes

B.1. Croissance des souches utilisées

Saccharomyces cerevisiae

La levure de boulangerie *Saccharomyces cerevisiae* est l'un des microorganismes les plus utilisés dans l'industrie et au laboratoire [95]. C'est un organisme eucaryote, unicellulaire, de forme ovoïde de 5 à 10 μm de diamètre moyen, qui se multiplie par bourgeonnement [96].

Elle est cultivée dans le fermenteur double enveloppe avec du glucose comme source de carbone. Les évolutions temporelles de la croissance et de consommation du substrat sont quantifiées par dénombrement, mesure des masses sèches et dosage du glucose (**Figure 3**). Les concentrations des suspensions utilisées dans les expériences de microfiltration sont déterminées par mesure de masse sèche volumique. La corrélation entre la masse sèche en levure et la densité optique mesurée à 600 nm est donnée par l'équation B-1

$$\text{Masse sèche} = 0,173\text{DO}_{600\text{nm}} + 0,32 \quad \text{Equation B-1}$$

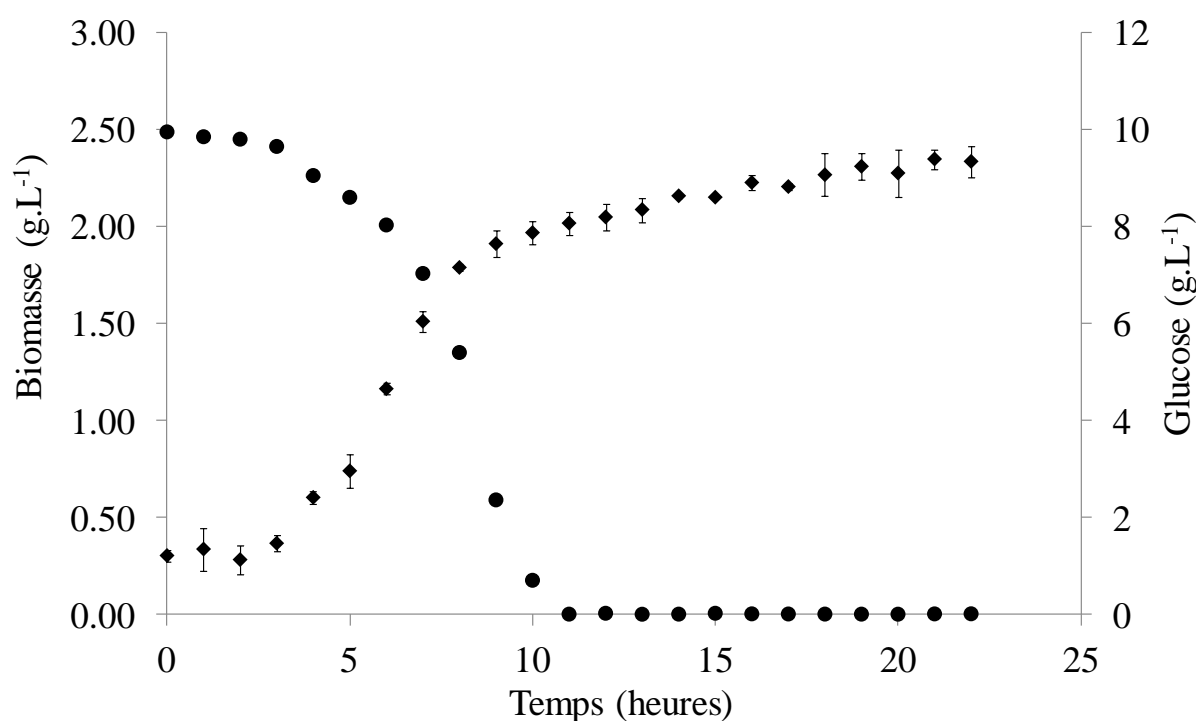


Figure 3 : Croissance de la souche *Saccharomyces cerevisiae* et consommation du glucose

Pour une meilleure interprétation des essais de filtration, les suspensions en microorganismes utilisées doivent être aussi homogènes que possible. Le taux de bourgeonnement des levures au cours de la culture, peut atteindre 40% en phase exponentielle (**Figure 4**). L'hétérogénéité des cellules est confirmée par la distribution de taille des levures âgées de 3 heures (phase de latence), 9 heures (phase exponentielle) et 24 heures (phase stationnaire), mesurée par granulométrie (**Figure 5**). La distribution de taille apparaît importante durant les phases latence et exponentielle. On note de petites cellules, correspondant aux bourgeons qui viennent de se détacher des cellules mères et de grosses unités correspondant aux levures en bourgeonnement. Ces conclusions sont confirmées par observation microscopique et ont déjà été reportées par Beaufort et al. [3]. Afin de travailler avec des suspensions le plus homogènes possible, les levures sont récoltées en phase stationnaire.

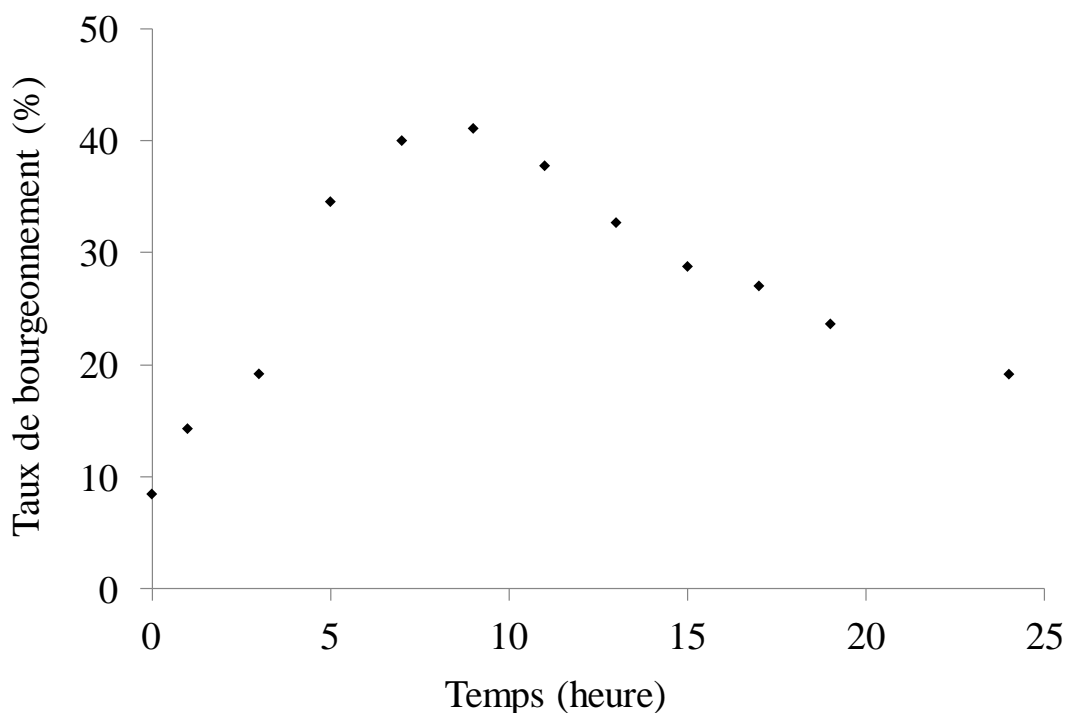


Figure 4 : Taux de bourgeonnement de *Saccharomyces cerevisiae* au cours de la culture

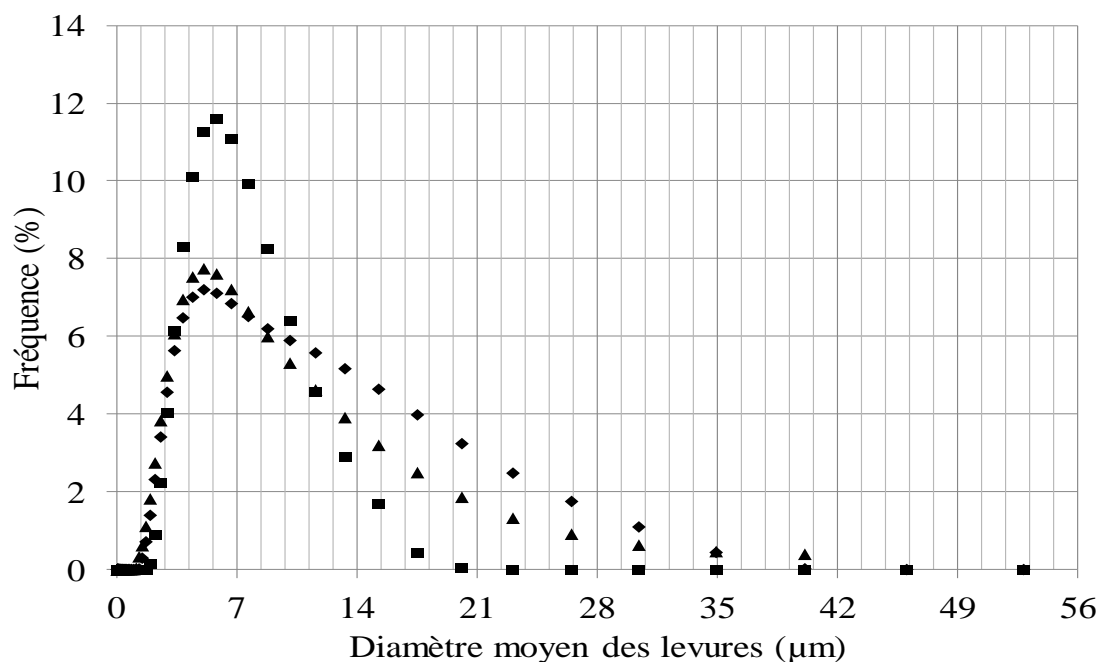


Figure 5 : Répartition du diamètre moyen de levures en fonction de la phase de croissance (▲ : phase de latence, ◆ : phase exponentielle, ■ : phase stationnaire)

Escherichia coli

Ce bacille Gram négatif de la famille des Enterobactéries, aéro-anaérobie facultatif, mesurant de 1 à 3 µm de longueur est normalement présent parmi la microflore digestive de l'Homme et des animaux à sang chaud. Toutefois, certaines souches sont pathogènes car elles ont acquis des facteurs de virulence. Cette bactérie est également considérée comme indicateur spécifique d'une pollution fécale [97].

Escherichia coli est cultivée dans le fermenteur double enveloppe avec du glucose comme source de carbone. Les évolutions temporelles de la croissance et de consommation du substrat sont quantifiées durant le temps par dénombrement, mesure des masses sèches et dosage de la concentration en glucose (**Figure 6**). Les concentrations des suspensions dans les expériences de microfiltration sont déterminées par mesure de la masse sèche volumique. La corrélation entre la masse sèche en bactérie et la densité optique mesurée à 600nm est donnée par l'équation B-2.

$$\text{Masse sèche} = 0,216 \text{ DO}_{600\text{nm}} + 1,03$$

Equation B-2

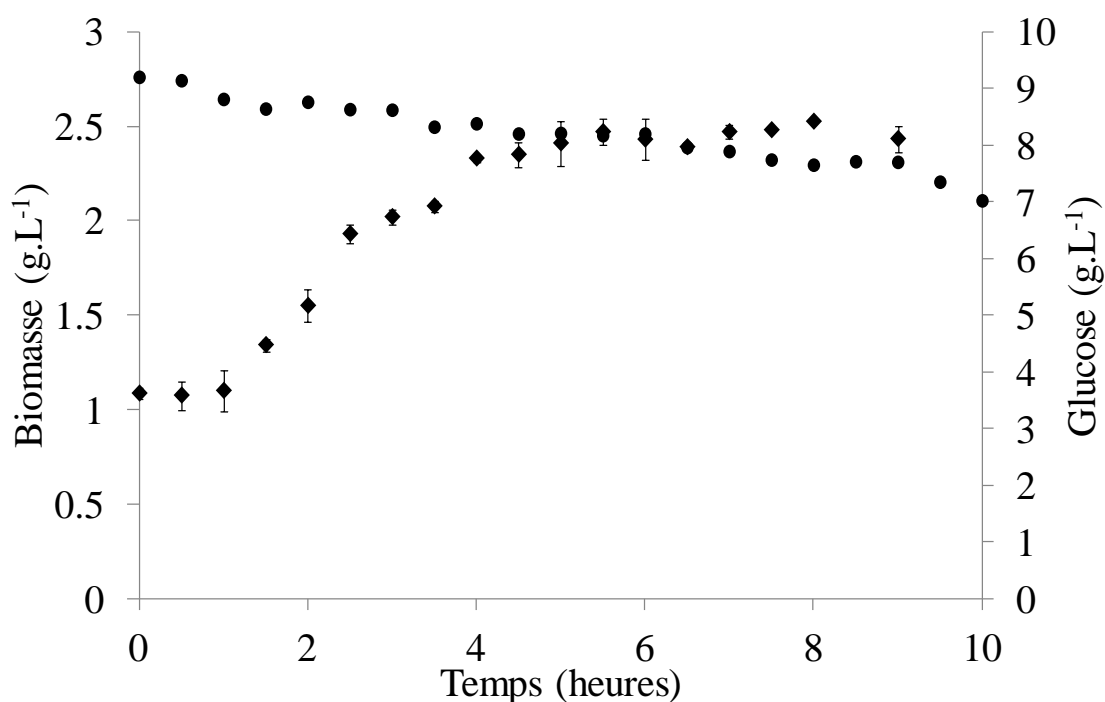


Figure 6 : Croissance de la souche *Escherichia coli* et consommation du glucose

B.2 Caractérisation du caractère hydrophile/hydrophobe des microorganismes par méthode MATS

Les propriétés de surface de la levure *S. cerevisiae* et de la bactérie *E. coli* prélevées en début de phase stationnaire de croissance et suspendues dans une solution saline (NaCl 9 g/L¹), sont évaluées par la méthode MATS (microbial adhesion to solvents). Les résultats présentés correspondent à la moyenne de trois tests, réalisés avec des cultures indépendantes (**Figure 7**). L'affinité de ces microorganismes pour le chloroforme est supérieure à celle pour l'hexadécane, ce qui plaide pour une composante électron-donneur importante. En outre, ils présentent un caractère plutôt hydrophile. Les affinités pour l'acétate d'éthyle et pour le décane sont très proches dans le cas de la levure ($\approx 26\%$) indiquant un caractère accepteur d'électron faible. Avec une affinité faible pour l'hexadécane, de l'ordre de 15 %, les bactéries semblent plus hydrophiles que les levures, leur affinité pour les solvants apolaires étant moins marquée. Le caractère hydrophile de *S. cerevisiae* a déjà été reporté par Guillemot et al. qui ont montré que même si les conditions de culture modifient les propriétés de surface des levures, elles restent globalement hydrophiles [89]. Les deux microorganismes sélectionnés pour l'étude présentent donc des caractéristiques de surface globalement similaires, en termes de polarité.

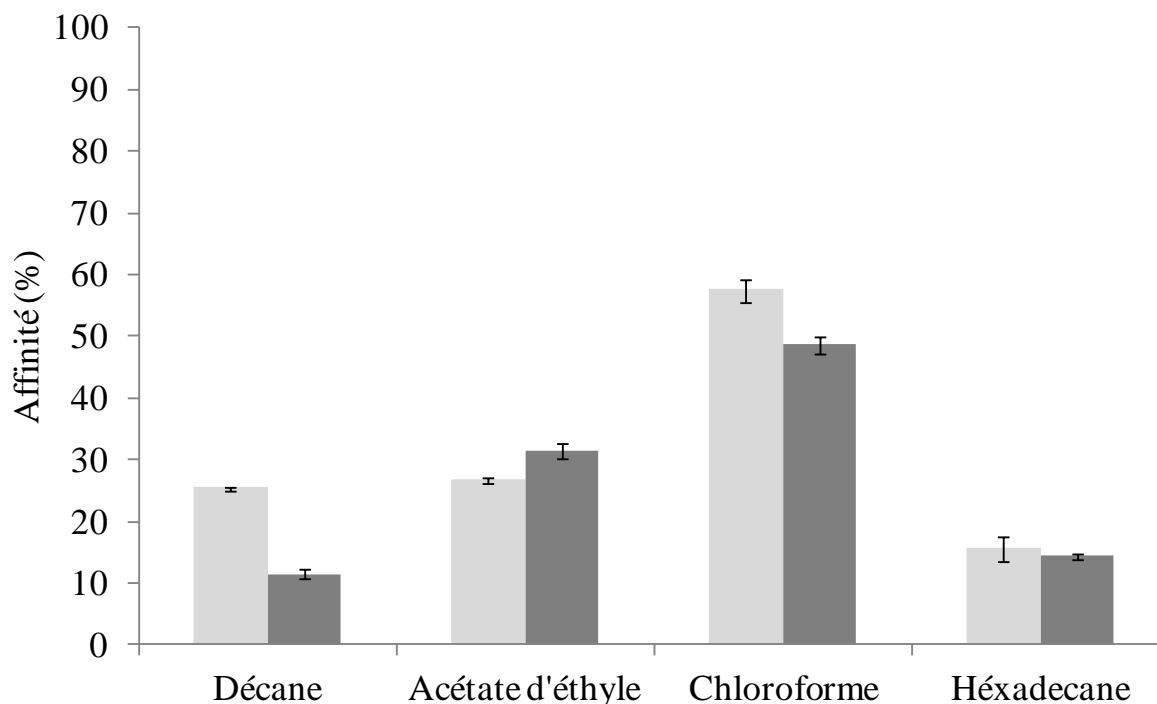


Figure 7 : Caractère hydrophile/hydrophobe des microorganismes par méthode MATS sur la levure *S. cerevisiae* (■) et la bactérie *E. coli* (■) prélevées en phase stationnaire de croissance et suspendues dans une solution saline ($\text{NaCl } 9 \text{ g.L}^{-1}$)

B.3. Potentiel zêta

Le potentiel zêta des microorganismes permet d'évaluer les interactions physico-chimiques cellules / membrane et entre les particules elles même. Les suspensions considérées sont très diluées et les forces d'interactions ou de répulsions y sont donc très faibles. Toutefois, dans le dépôt, comme la concentration cellulaire est plus importante, la charge de surface des microorganismes peut avoir un effet plus marqué. Ainsi, Les caractéristiques des dépôts de particules sur des membranes dépendent étroitement des charges de surface des particules filtrées et des membranes [30].

L'effet de la concentration sur le potentiel zêta des microorganismes suspendus dans l'eau ultrapure est présenté dans la figure suivante. Pour les deux microorganismes, le potentiel zêta diminue lorsque la concentration de la suspension augmente. De plus, les levures présentent une charge de surface faiblement moins répulsives que celle des bactéries.

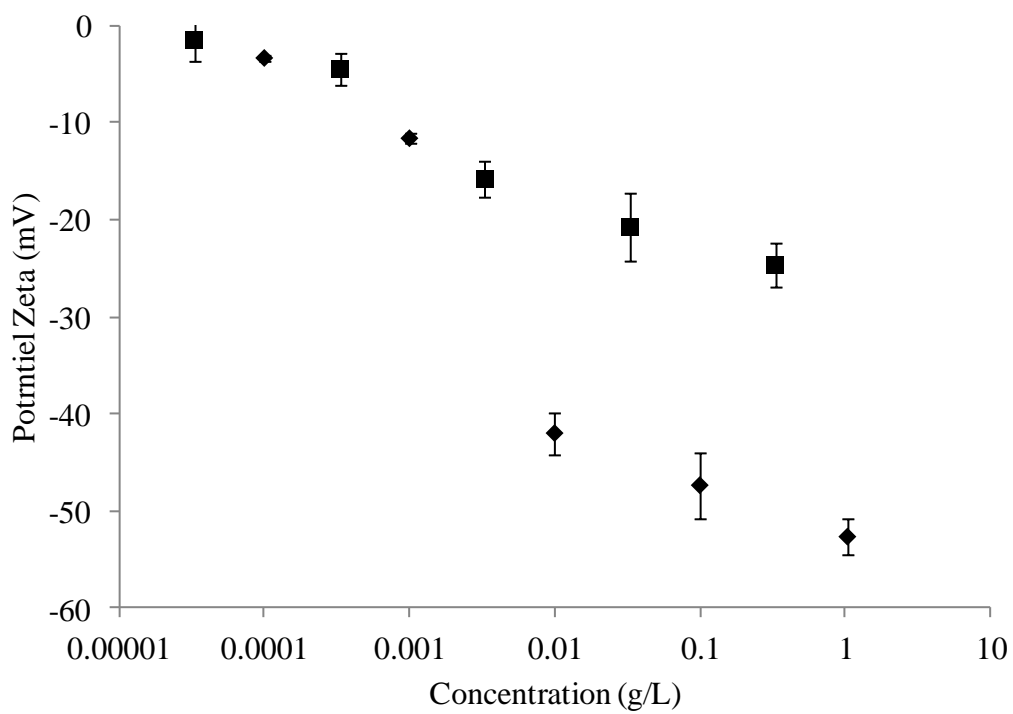


Figure 8 : Potentiel zêta des bactéries (◆) et des levures (■) en fonction de la concentration des suspensions

C. Sélection des fluorochromes

En microscopie de fluorescence, il est essentiel d'obtenir un signal spécifique, fort et durable au cours du temps sans dégradation ni perturbation des fonctions cellulaires. Afin d'obtenir des résultats quantitatifs lors du traitement des images, le marquage des cellules doit être identique pour chaque expérience, homogène pour chaque cellule et le taux de marquage doit être maximal (idéalement total). Dans une première approche, deux marqueurs ont été testés en se basant sur la bibliographie :

- La Rhodamine 123 : colorant fluorescent, non toxique aux doses usuelles, souvent utilisé comme marqueur direct des mitochondries pour évaluer la fonction respiratoire [98].

- Le diacétate de fluorescéine: ce colorant, activé après son hydrolyse par des enzymes membranaires, est un témoin de l'activité microbienne [87].

L'emploi des colorants fluorescents doit prendre en compte certaines contraintes, en particulier la diminution temporelle de l'intensité de la fluorescence (lavages successifs des cellules, photoblanchiment...) ainsi que leurs toxicités pour le manipulateur et les cellules [73].

Une optimisation des protocoles de marquage a été réalisée pour permettre l'acquisition d'images de très bonne qualité. Plusieurs paramètres opératoires sont considérés :

- La maximisation du taux de marquage de la population.
- L'homogénéité du marquage.
- La minimisation de la concentration du colorant pour limiter les risques liés à la toxicité.
- La persistance de la fluorescence lors du lavage des cellules lié à l'écoulement lors des filtrations.
- La persistance de la fluorescence plusieurs heures après la coloration afin de pouvoir réaliser des mesures pertinentes à partir des visualisations du dépôt de microorganismes.

C.1. La Rhodamine et la diacétate de fluorescéine

Effet de la concentration des fluorochromes

Pour des doses trop faibles, peu de cellules sont colorées et le nombre des microorganismes est alors sous-estimé. Si la concentration est trop forte, le colorant peut avoir un effet toxique sur les cellules. En se basant sur des données bibliographiques plusieurs concentrations du colorant (0,1 µg/mL, 1 µg/mL, 5 µg/mL, 10 µg/mL et 50 µg/mL) ont été

testées pour les différents marqueurs. Les suspensions ont été lavées deux fois pour éliminer le colorant en excès

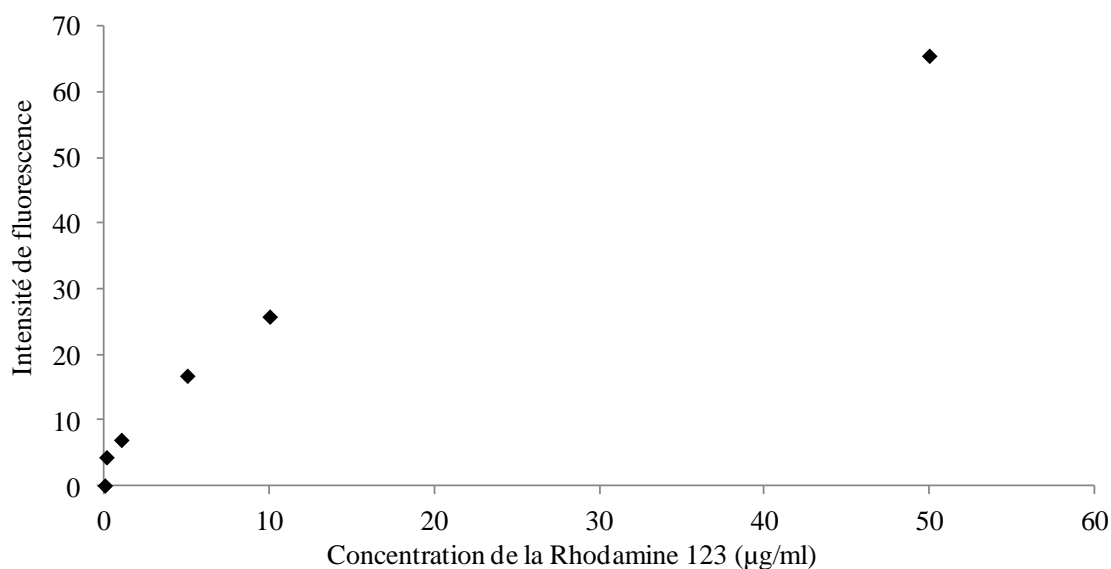


Figure 9 : Effet de la concentration en Rhodamine 123 sur l'intensité de fluorescence durant la coloration de la levure *S. cerevisiae*

En deçà de 0,1 µg/mL, la coloration des cellules est insuffisante (**Figure 9**), et au-delà de 10 µg/mL, le signal de fluorescence est trop saturé (**Figure 10**). La concentration utilisée sera donc comprise entre 1 et 5 µg/mL ce qui est en accord avec les valeurs de la bibliographie. Des résultats similaires ont été obtenus pour les bactéries (**Figure 11**).

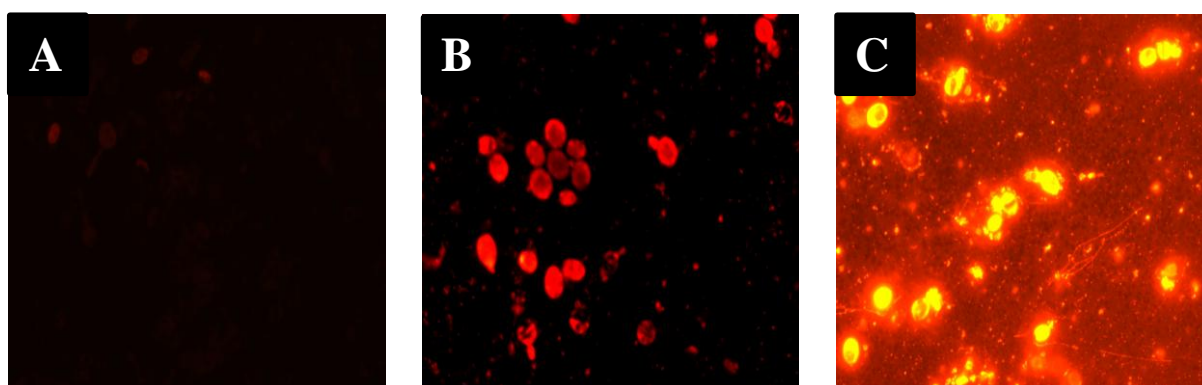


Figure 10 : Observations en microscopie à épifluorescence de *S. cerevisiae* marquée par la Rhodamine 123 à 0,1 µg/mL (A), 5 µg/mL (B) et 50 µg/mL (C)

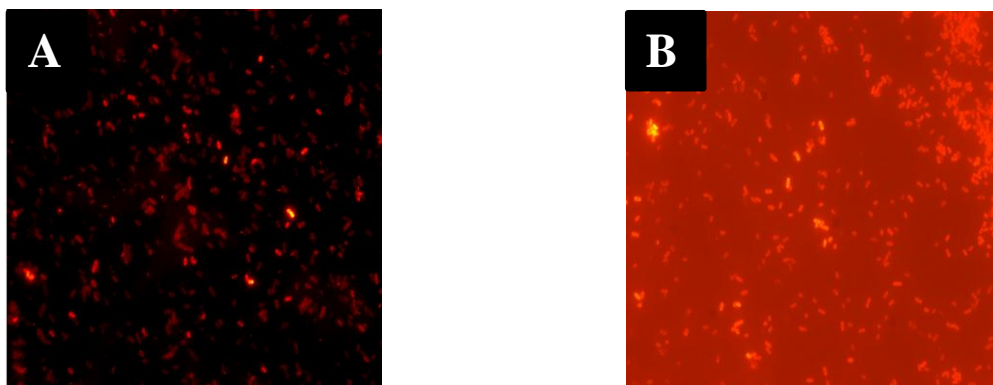


Figure 11 : Observations en microscopie à épifluorescence d'*E. coli* marquée par la Rhodamine 123 à 5 µg/mL (A) et 50 µg/mL (B)

Effet du lavage des microorganismes sur l'intensité de fluorescence

L'observation des microorganismes en cours de la filtration entre deux injections de la suspension est réalisée en maintenant un flux d'eau au travers du dépôt. Ceci est équivalent à effectuer un rinçage continu des cellules. Afin d'optimiser le choix du fluorochrome, il est donc primordial de s'assurer que la fluorescence persiste après plusieurs lavages malgré un éventuel relargage du colorant à l'extérieur des cellules par sa diffusion ou son extinction. Des observations ont été effectuées pour différentes concentrations de la Rhodamine 123 après plusieurs lavages. Les résultats montrent que, pour les levures comme pour les bactéries, l'intensité de la fluorescence diminue de manière drastique même après un seul lavage. Pour une concentration de 5 µg/mL, la fluorescence s'estompe au bout du troisième lavage pour les levures (**Figure 12**) et du deuxième pour les bactéries (**Figure 13**).

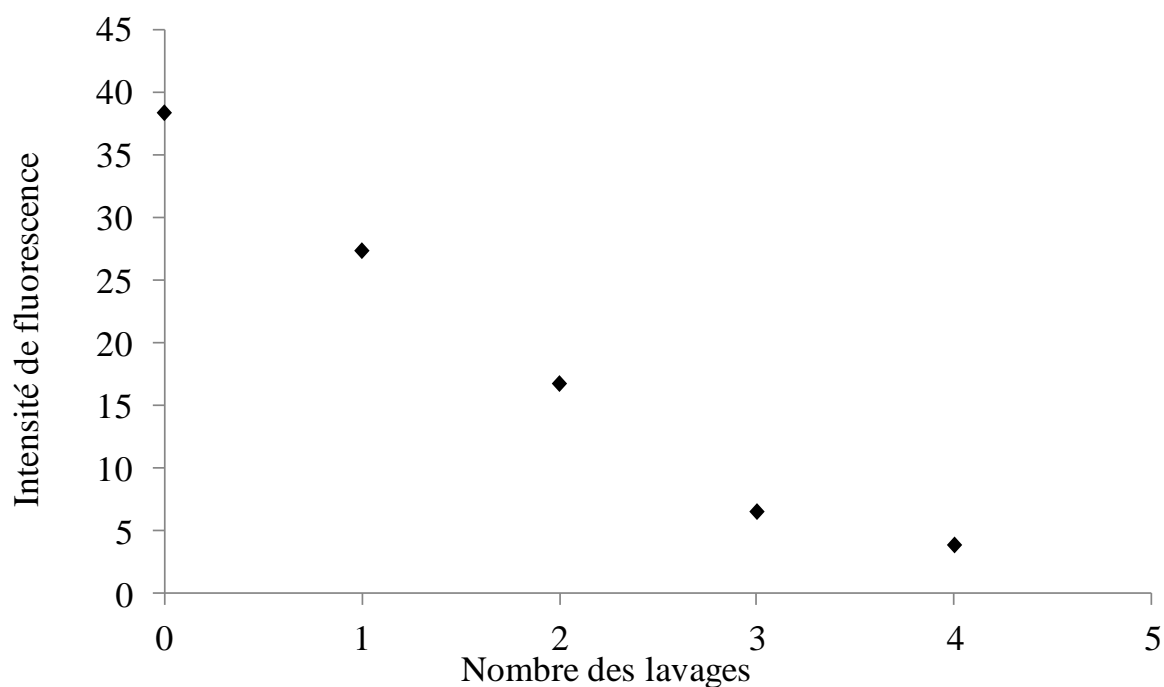


Figure 12 : Effet du lavage sur l'intensité de fluorescence de la levure *S. cerevisiae* marquée par la Rhodamine 123

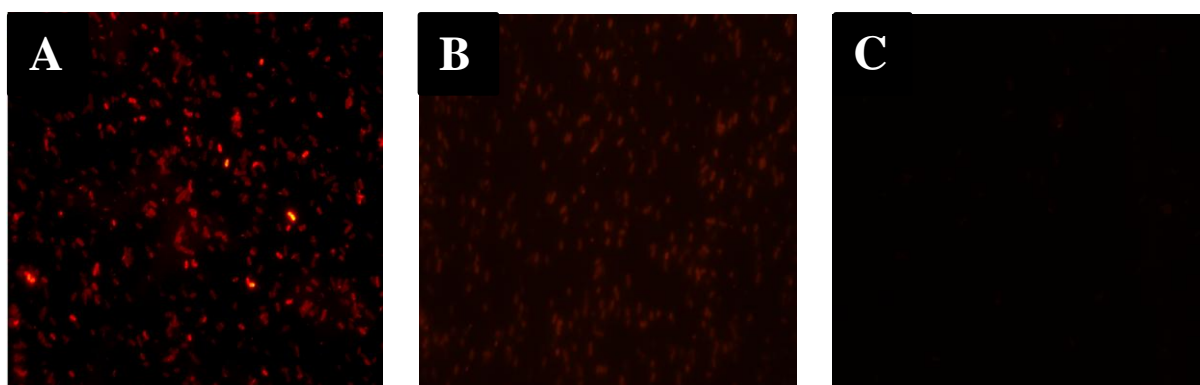


Figure 13 : Observations en microscopie à épifluorescence d'*Escherichia coli* marquée par 5 $\mu\text{g/mL}$ de la Rhodamine 123 après (A) : 0 lavage, (B) : 1 lavage et (C) : 2 lavages

Atténuation de la fluorescence en fonction du temps

Etant donné que les cellules sont colorées avant les expériences de filtration, il est nécessaire d'évaluer la perte naturelle de fluorescence au cours du temps. L'intensité de la fluorescence au cours du temps mesurée après un seul prélavage avec une concentration de Rhodamine 123 de 5 $\mu\text{g/mL}$ persiste pour *Saccharomyces cerevisiae*, au-delà d'une heure après la coloration. Toutefois, pour d'*Escherichia coli*, elle diminue au bout de 20 min

(**Figure 14**). Les observations en microscopie confocale seront donc limitées aux vingt premières minutes suivant la coloration. Ceci constitue une limite majeure pour l'étude car seuls des dépôts de faible épaisseur peuvent être construits dans des temps aussi courts.

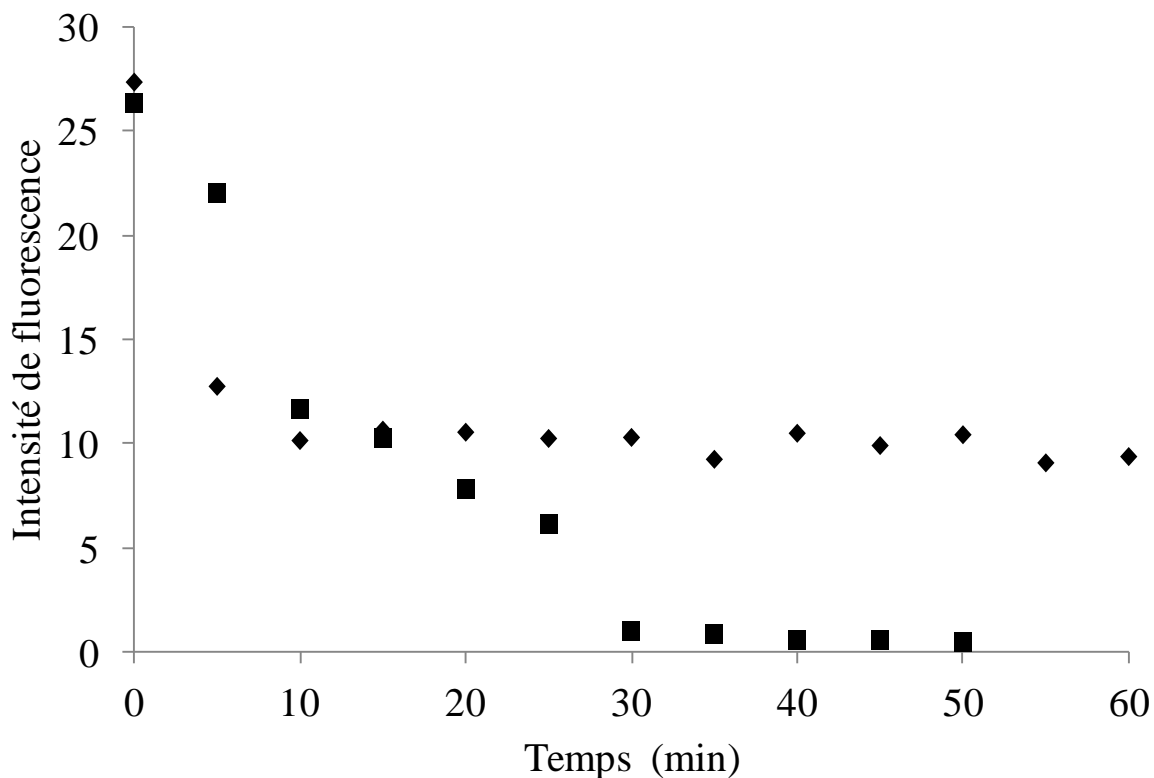


Figure 14 : Décroissance temporelle de l'intensité de fluorescence de *S. cerevisiae* (◆) et de *E. coli* (■) après marquage par la Rhodamine 123 (5 µg/mL)

Effet du photoblanchiment sur l'intensité de fluorescence

Une des principales limites de l'observation en fluorescence est le photoblanchiment des fluorochromes avec le temps d'observation lorsqu'ils sont excités de façon intense. L'effet d'une exposition continue à la longueur d'onde d'excitation de la Rhodamine 123 (5 µg/mL) a été caractérisé. Dans le cas des levures, malgré l'atténuation de la fluorescence, les cellules sont encore visibles au bout de 65 minutes (**Figure 15**). En revanche, les bactéries s'avèrent plus sensibles puisqu'après 10 minutes d'exposition, elles ne sont pratiquement plus décelables (**Figure 16**).

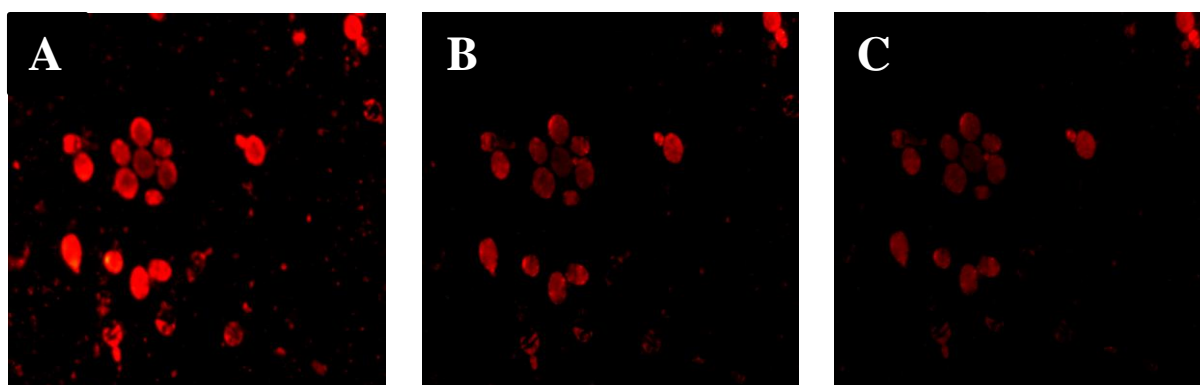


Figure 15: Photoblanchiment de la levure *S. cerevisiae* marquée par la Rhodamine 123 : après : (A) : 0 min, (B) : 30 min et (C) : 65 min

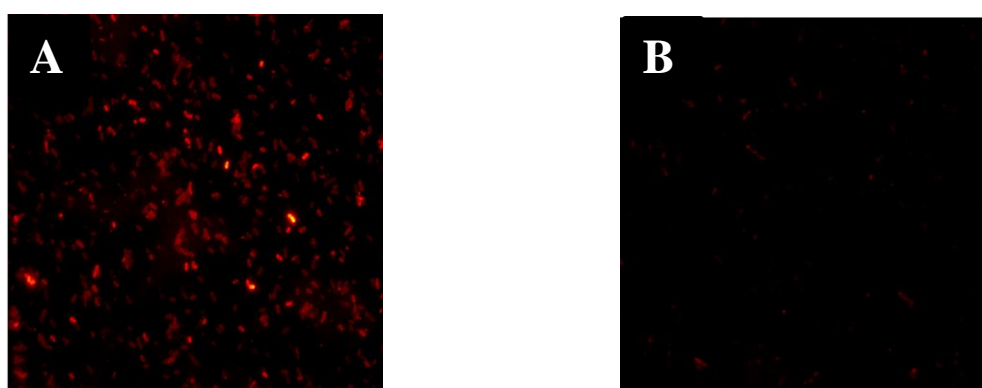


Figure 16 : Photoblanchiment de la bactérie *E. coli* marquée par la Rhodamine 123 après : (A): 0 min et (B) : 10 min

Taux de marquage des cellules

Afin de réaliser une étude pertinente et quantitative, il est impératif d'évaluer la qualité et le taux de marquage des cellules. L'observation de bactéries et de levures marquées par la Rhodamine 123 (**Figure 17**) et le diacétate de fluorescéine (**Figure 18**) montre que le taux de marquage reste faible. Par ailleurs, le marquage ne colore pas l'intégralité de la cellule. Il est hétérogène et diffère d'un individu à l'autre, probablement en fonction de l'état physiologique. En effet, la Rhodamine 123 et la FDA sont utilisées pour évaluer le potentiel membranaire des mitochondries actives [99] et l'activité métabolique des cellules [87], respectivement. Or, comme dans les expériences prévues les cellules sont collectées en phase stationnaire, stade pour lequel les activités métaboliques sont en déclin, on peut supposer que c'est en particulier le cas pour l'activité respiratoire des mitochondries [100] ou l'activité enzymatique des estérases responsables de l'oxydation de la fluorescéine ce qui pourrait expliquer les faibles taux de marquages. Le marquage des levures par les deux colorants

simultanément (**Figure 19**) montre qu'ils ciblent des organes différents à l'intérieur de la cellule et se concentrent dans différents compartiments cellulaires ce qui peut améliorer leur détection.

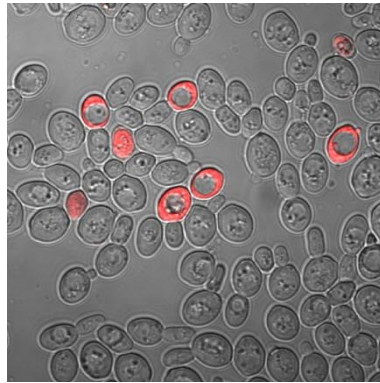


Figure 17 : Image composite de levures marquées par la Rhodamine 123
(Objectif : x 63, zoom : 3)

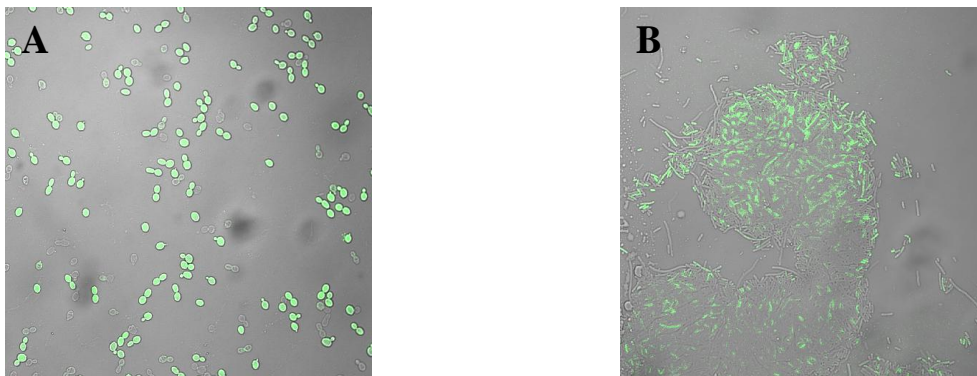


Figure 18 : Images composites de levures (A) et de bactéries (B) marquées par la FDA
(Objectif : x 40, zoom : 2)

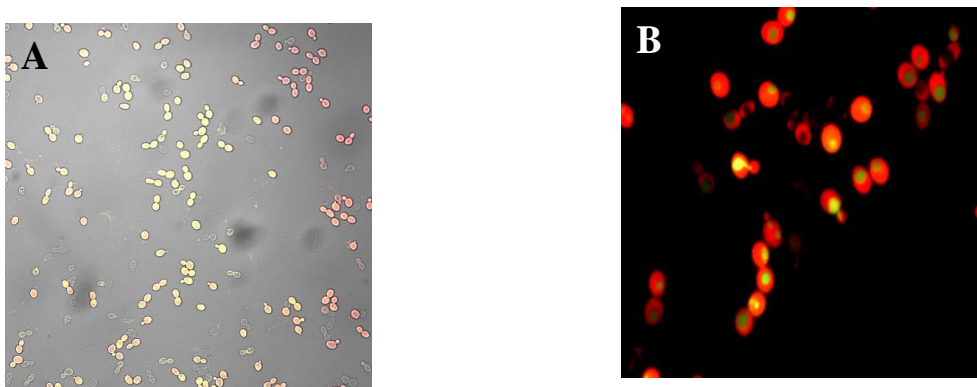


Figure 19 : Double marquage de *Saccharomyces cerevisiae* avec la Rhodamine 123 et la fluorescéine diacétate, (A) : (objectif x 40), (B) : (objectif x 100)

Distinction entre les microorganismes dans dépôt mixte

Afin d'étudier des dépôts de mélanges de levures et de bactéries, il faut distinguer les deux souches sans chevauchement des signaux fluorescents émis. Les deux souches cultivées séparément sont récoltées par centrifugation, lavées et colorées par la Rhodamine 123 pour les levures et la diacétate de fluorescéine pour les bactéries. Après un lavage pour éliminer l'excès de colorant, elles sont observées par microscopie confocale séparément, afin de sélectionner les longueurs d'ondes d'excitation et d'émission optimale pour chaque colorant (**Figures 20 et 21**) puis en mélange (**Figure 22**).

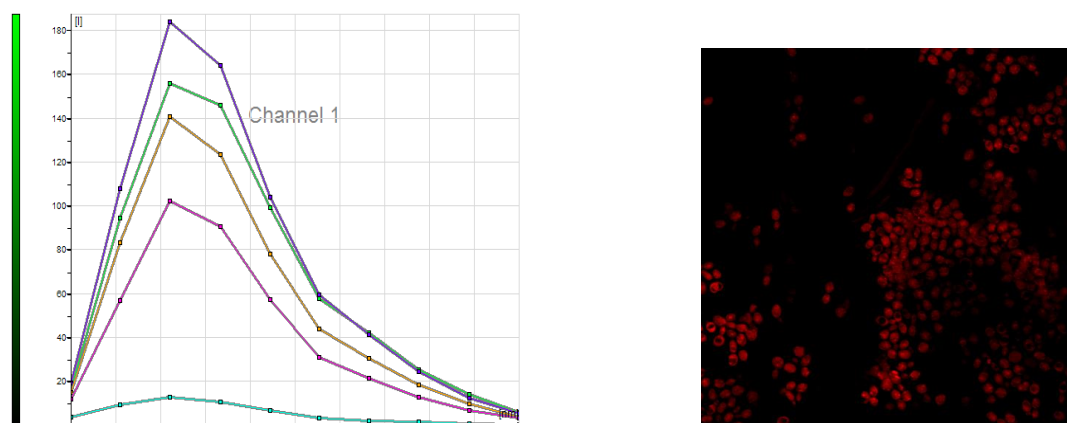


Figure 20 : Détermination de la longueur d'onde de la fluorescence émise par des levures colorées par la Rhodamine 123 ;
Observation par microscopie confocale, objectif x 40, zoom : 2

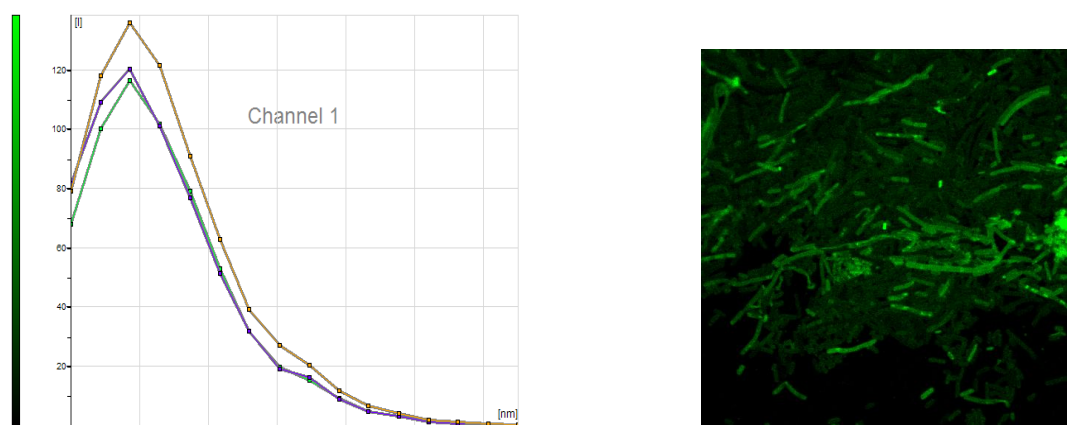


Figure 21 : Détermination de la longueur d'onde de la fluorescence émise par des bactéries colorées par la diacétate de fluorescéine;

Observation par microscopie confocale, objectif x 40, zoom : 4

Comme l'illustre la **Figure 22**, il existe un chevauchement entre les spectres d'émission des deux marqueurs. De ce fait, la distinction sans ambiguïté des deux souches avec les deux colorants sélectionnées est impossible ainsi que la quantification de chaque espèce cellulaire au sein d'un dépôt.

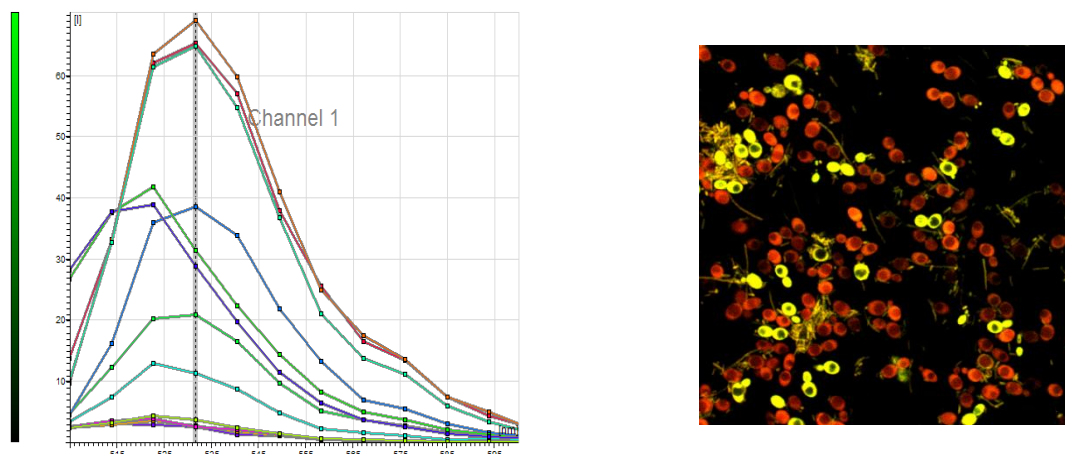


Figure 22 : Détermination de la longueur d'onde de la fluorescence émise par des levures et les bactéries colorées, respectivement, par la FDA et la Rhodamine 123 ;

Observation par microscopie confocale, objectif x 40, zoom 4

Limites de la Rhodamine 123 et du diacétate de fluorescéine

Deux protocoles expérimentaux ont été optimisés pour le marquage des levures et des bactéries par la Rhodamine 123 et le diacétate de fluorescéine. Toutefois, le marquage des cellules n'est pas total et la surface cellulaire marquée par le colorant n'est pas proportionnelle au nombre de microorganismes. Ainsi, le volume occupé par les microorganismes peut être sous-estimé. Par ailleurs, la sensibilité de ces colorants au photoblanchiment, leur atténuation lors des lavages et le recouvrement partiel de leurs spectres nous ont conduits à les délaissier et à tester d'autres fluorochromes.

C.2. Les fluorochromes Syto

En se basant sur la recherche bibliographique, deux fluorochromes Syto ont été sélectionnées. Ce sont des marqueurs des acides nucléiques qui colorent les cellules mortes et vivantes. Afin d'éviter le chevauchement des signaux d'excitation et d'émission, on a choisi le Syto 9 et le Syto 84 qui sont excités, respectivement, à 485 nm et 567 nm et émettent respectivement, à 498 nm et 582 nm (« Matériel et Méthodes »).

Le taux de marquage des microorganismes modèles, *Saccharomyces cerevisiae* et *Escherichia coli* atteint 100% et la coloration semble homogène au niveau des cellules (**Figure 23**).

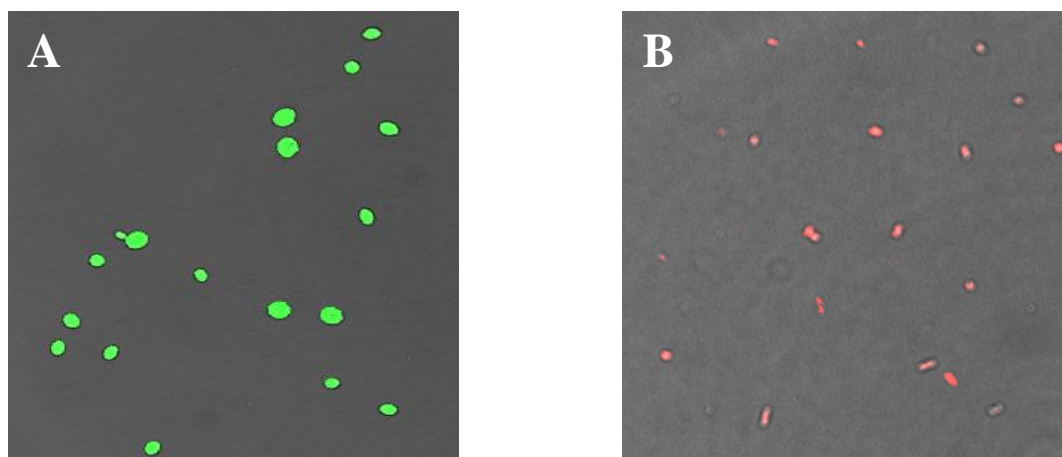


Figure 23 : Marquage de *Saccharomyces cerevisiae* avec le Syto 9 (A) et d'*Escherichia coli* par le Syto 84 (B)

Effet de la concentration des fluorochromes

La concentration des colorants Syto a été optimisée afin d'obtenir un taux de marquage satisfaisant et persistant au cours du temps durant les essais de filtrations (lavage répétitifs, exposition continue au laser, temps d'incubation). Plusieurs concentrations (0,33 mol/mL, 3,33 mol/mL et 5 mol/mL) ont été testées aussi bien pour les levures que pour les bactéries. Une concentration de 5 mol/mL semble optimale. En effet, le taux de marquage est de 100%, la pénétration du colorant est totale et toute la superficie cellulaire est fluorescente (**Figure 24**).

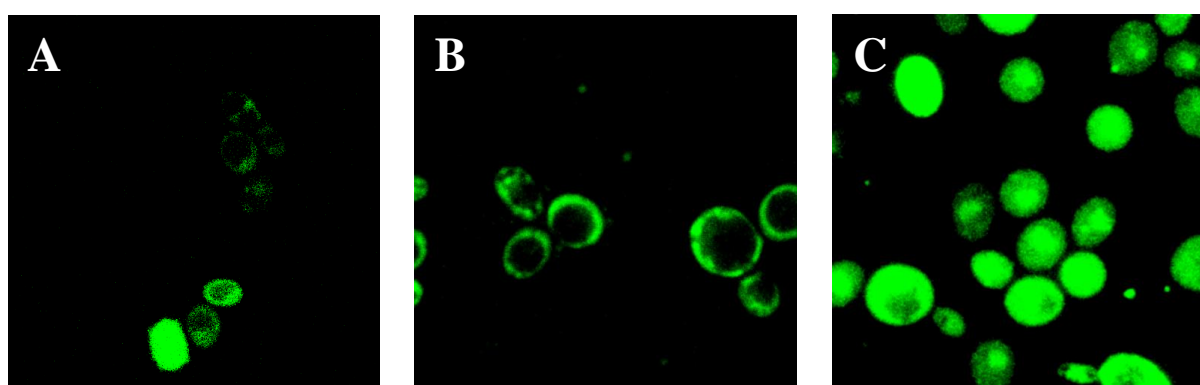


Figure 24 : Observations en microscopie à épifluorescence de *Saccharomyces cerevisiae* marquée avec 0,33 mol/mL (A), 3,33 mol/mL (B) et 5 mol/mL (C) par le Syto 9

Effet des conditions opératoires sur l'intensité de fluorescence

La diminution naturelle de la fluorescence durant l'incubation à l'obscurité et en fonction de l'exposition continue à la longueur d'onde d'excitation du colorant ont été suivies. Pour les deux fluorochromes, la fluorescence persiste après 48 heures pour les levures et les bactéries colorées, respectivement, par le Syto 9 et le Syto 84 et incubées à l'obscurité.

En ce qui concerne le Syto 9, le photoblanchiment est très faible aussi bien pour les bactéries que pour les levures (**Figure 25**). En effet, même après dix heures d'exposition au laser, la fluorescence persiste. Par contre, le Syto 84 est sensible au photoblanchiment et perd très vite la fluorescence.

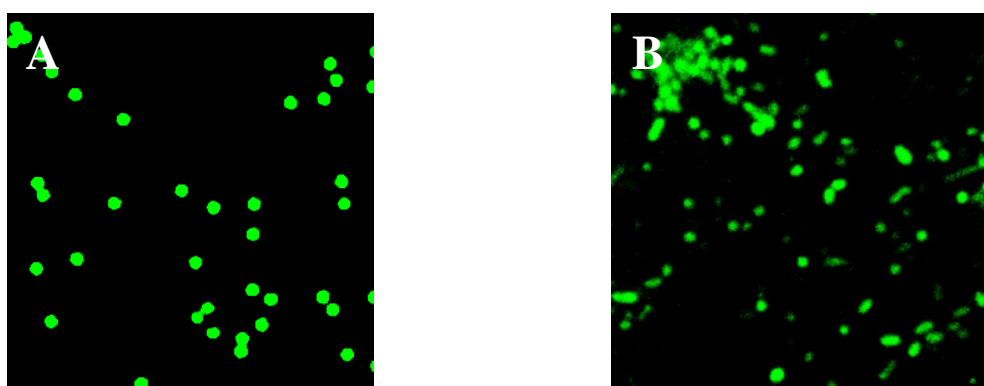


Figure 25 : Marquage de *Saccharomyces cerevisiae* (A) et *Escherichia coli* avec le Syto 9 (objectif x 63, zoom : 1 et 6, respectivement)

Afin de s'assurer que les images acquises d'un dépôt de bactéries sont pertinentes et peuvent être utilisées dans la quantification du colmatage formé sur la membrane, on a observé par microscopie confocale le dépôt d'une suspension de bactéries colorées par le Syto 84 sur une membrane de 0,8 μm de taille de pores (**Figure 26**). Après l'observation et l'acquisition des séries d'images du dépôt en utilisant l'objectif x 10 et l'objectif x 63 (zooms 1 et 6), on a observé l'effet de l'excitation du laser avec l'objectif x 10 au zoom 1 (carré jaune) et au zoom 6 (carré vert). La zone observée a perdu une grande partie de sa fluorescence.

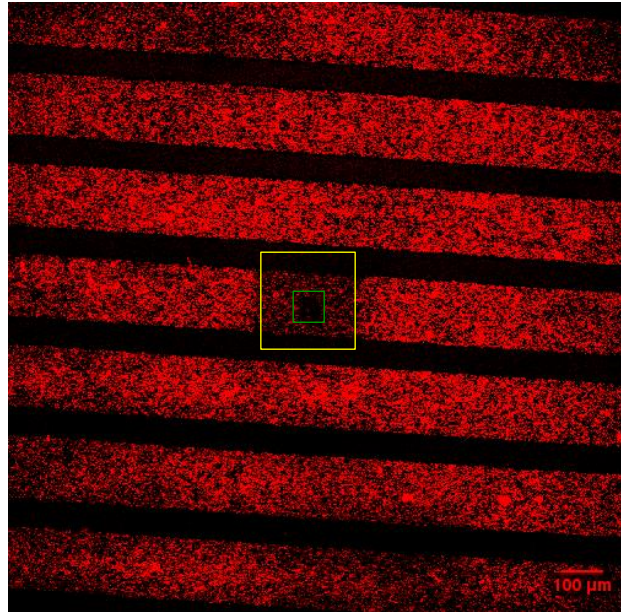


Figure 26 : Observation de l'effet de l'excitation laser sur un dépôt de bactéries colorées avec le Syto 84 (Objectif : x10)

L'observation simultanée d'une zone qui a subi une excitation laser et une zone qui ne l'a pas subie est illustrée dans la **Figure 27**. L'observation des cellules déposées à un zoom plus important est impossible car la perte de fluorescence est plus rapide que le temps d'acquisition des images.

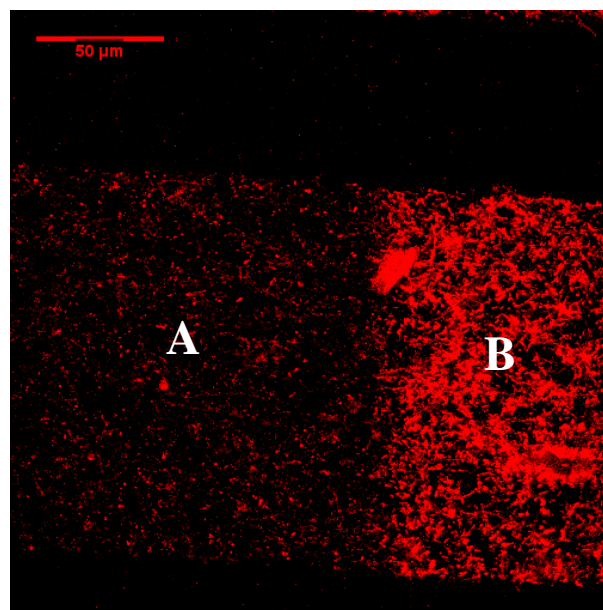


Figure 27 : Observation d'un dépôt de bactéries colorées au Syto 84 ;
(A) : zone excitée par le laser, (B) : zone non excitée par le laser (Objectif 63, zoom 1)

Les bactéries seront donc marquées au Syto 9 durant l'étude des dépôts purs (**Figure 28**) qui donne des observations de très bonne qualité aux différents grossissements.

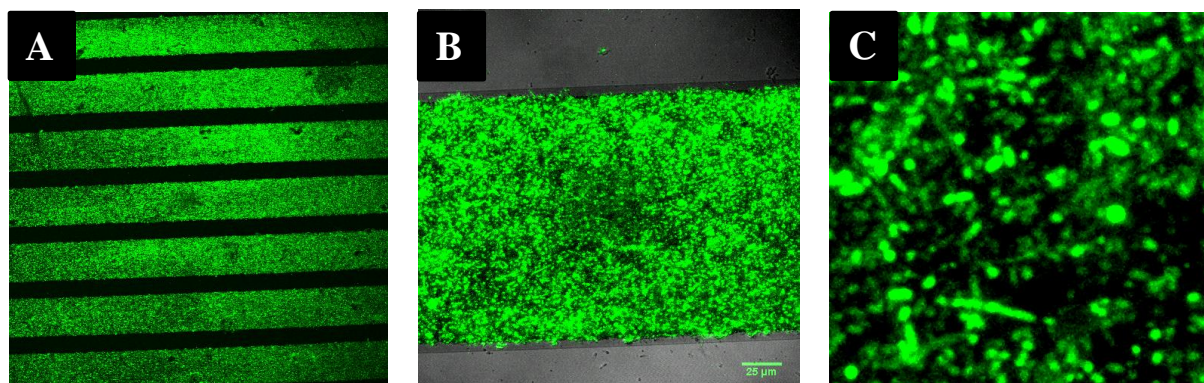


Figure 28 : Observation d'un dépôt de bactéries colorées au Syto 9 : objectif x 10 (A), objectif x 63, zoom 1 (B) et zoom 6 (C)

Néanmoins, l'observation du mélange levures / bactéries colorées, respectivement, par le Syto 9 et le Syto 84 montre qu'il n'y a pas de chevauchement entre les deux colorants ce qui permet de séparer sans aucun doute les microorganismes les uns des autres (**Figure 29**). De plus, comme les spectres d'excitation ne se recouvrent pas, l'excitation des dépôts mixtes pourra être réalisée simultanément et la fluorescence émise par chaque microorganisme sera récupérée dans un canal distinct. L'utilisation simultanée des lasers permettra de limiter le photoblanchiment puisque les microorganismes marqués seront exposés une seule fois au laser. Enfin, les lavages successifs ne semblent pas avoir un effet sur l'intensité de la fluorescence.

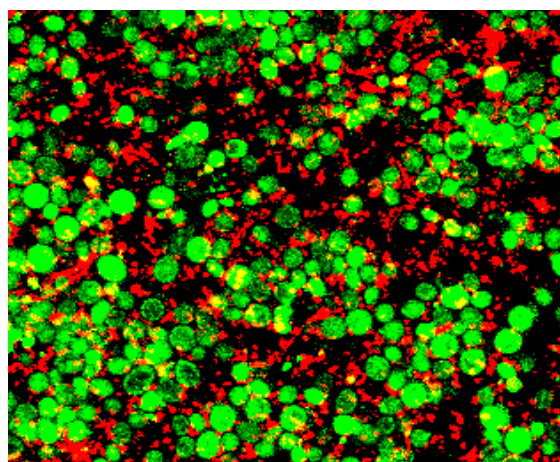


Figure 29: Marquage de *S. cerevisiae* et *E. coli* avec le Syto 9 et le Syto 84, respectivement

D. Système de filtration



Résumé

Durant les opérations de filtration membranaire, les industries font face à un problème majeur : le colmatage. En particulier, la formation d'un dépôt de particules sur la membrane provoque une chute de sa perméabilité et de sa sélectivité. L'étude a pour but de mieux caractériser la morphologie des dépôts de particules, en lien avec ses propriétés de transport, dans le but d'enrichir les modèles utilisés pour prédire les performances de filtration des dispositifs industriels. Des expériences de filtration de suspensions pures et mixtes de particules inertes et biologiques, sont réalisées sur des microsieves et observées *in situ* par microscopie confocale. Les propriétés spatiales du dépôt (arrangement des particules, épaisseur, porosité, taux de couverture de la membrane) sont déterminées par traitement d'images et corrélées aux variations de perméabilité. L'influence des paramètres tels que : la taille des particules, la géométrie de la microsieve (taille de pore, distance entre pores) et la nature des particules, est soigneusement analysée. Plusieurs mécanismes physiques sont mis en évidence :

- La préfiltration de grosses particules avant la filtration des petites permet le maintien d'un débit élevé.
- Les particules déposées protègent les pores qui leurs sont périphériques en fonction du rapport « taille de particules / taille de pores ».
- Dans les conditions expérimentales étudiées, la morphologie des dépôts de particules inertes et biologiques est identique.
- Le dépôt est structuré en trois régions distinctes : une zone de germination en contact avec la membrane, une couche centrale dense, une région de capture superficielle.

Mots-clefs : Dépôt, Filtration, Particules, Microscopie confocale, microsieve

Abstract

During the operations of filtration, the industries are facing a major problem: fouling. Indeed, the cake layer build-up on top of the membrane reduces its permeability and selectivity. The aim of this study is to characterize the particle deposit morphology at different operating conditions in order to enhance the models used to predict the filtration performances at the industrial level. Pure and mixed suspensions of inert and biological particles are filtrated with microsieves and observed *in situ* by Confocal Laser Scanning Microscopy (CLSM). The spatial properties of the cake (particle arrangement, thickness, porosity, microsieve coverage) are determined by image processing and correlated with the permeability reduction. The effect of the parameters such as: the particles size, the microsieve geometry (pore size, pore pitch) and the particles characteristics, is carefully analyzed. Several physical mechanisms are highlighted:

- The prefiltration of large particles before the filtration of the small ones maintains a high flux.
- Deposited particles protect the surrounding pores when the ratio "particles size/pores size" is high.
- In the studied experimental conditions, the cake morphology of the inert and biological particles is similar.
- The cake is structured in three regions: germination region in contact with the membrane, a central high particle concentration region and a superficial region, named capture region

Keywords: Cake, Filtration, Particles, Confocal microscopy, Microsieve