



HAL
open science

Détection et caractérisation de biofilms par méthodes électrochimiques.

Eva l'Hostis

► **To cite this version:**

Eva l'Hostis. Détection et caractérisation de biofilms par méthodes électrochimiques.. Autre. Université Pierre & Marie Curie - Paris 6, 1996. Français. NNT : 1996PA066607 . tel-04166773

HAL Id: tel-04166773

<https://theses.hal.science/tel-04166773v1>

Submitted on 20 Jul 2023

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.



Distributed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License

THESE DE DOCTORAT
DE L'UNIVERSITE PIERRE ET MARIE CURIE
PARIS 6

Spécialité Electrochimie

présentée par
Eva L'HOSTIS

pour obtenir le grade de
Docteur de l'UNIVERSITE DE PARIS 6

Sujet
DETECTION ET CARACTERISATION DE BIOFILMS
PAR METHODES ELECTROCHIMIQUES

soutenue le 24 octobre 1996 devant le jury composé de

Mr C. FIAUD	Président
Mr H.-C. FLEMMING	Rapporteur
Mr M. L'HER	Rapporteur
Mr B. TRIBOLLET	
Mr D. FESTY	
Mr Y. LEVI	
Mr G. HERROUIN	

Ce travail a été réalisé dans cinq différents laboratoires :

- *Laboratoire Matériaux Marins, IFREMER Centre de Brest, Plouzané*
- *Laboratoire Physique de Liquides et Electrochimie, UPR 15 du CNRS, Paris 6*
- *CIRSEE / Lyonnaise des Eaux, Le Pecq*
- *Lehrstuhl für Wassergüte der TU Munchen, Munich*
- *Laboratoire d'Océanographie Biologique d'Arcachon, Bordeaux I*

Donc cinq fois plus de possibilités de rencontres, de conseils, d'échanges et de découvertes. Toute ma reconnaissance va bien évidemment aux personnes qui m'ont aidée au cours de ces trois années. Ce n'est pas seulement pour leur aide scientifique et technique que je tiens à les remercier mais aussi pour leurs qualités humaines. Les nommer toutes tient de la gageure mais mes remerciements leur sont dédiés à tous et toutes.

Je remercie M. Keddou pour son accueil au sein de l'UPR15. Toute ma reconnaissance va à Bernard Tribollet, un directeur de thèse toujours présent, à Claude Deslouis mais aussi à tous les membres de l'UPR15 : Takenouti, M. et Mme Cachet, Isabelle, Hubert, Gabrielli... Je garderai aussi dans mon coeur une place pour toutes ces personnes de passage au laboratoire pour de plus ou moins brefs séjours : Célia, Guilherme, Touriya, Marco...

Je tiens à remercier Lionel Lemoine pour son accueil au sein du laboratoire Matériaux Marins et Dominique Festy pour avoir été mon parrain de thèse mais aussi Chantal, Florence, Régis, Maxou, Dominique, Peter, Jean-Pierre, Luc, Annie et Michel. Je n'oublierai pas non plus tous les stagiaires qui sont passés au laboratoire pendant ma thèse : Nathalie, Fabrice, JB, Gildas, Patrick, Anne...

Toute ma gratitude va à Yves Lévi et à Laurent Kiéné du CIRSEE / Lyonnaise des Eaux ainsi qu'à Karine et Michel.

Je remercie Hans-Curt Flemming pour son accueil au Lehrstuhl für Wassergüte der TU Munchen. Mon séjour à Munich restera un très bon souvenir et certains visages resteront gravés dans ma mémoire : Stéfan, Uli, Martin...

Et je remercie Nathalie et Xavier au Laboratoire d'Océanographie Biologique d'Arcachon pour leur participation et leur gentillesse.

LISTE DES SYMBOLES ET ACRONYMES UTILISES	7
INTRODUCTION	10
 Chapitre 1 BIOFILM : FORMATION, TECHNIQUES D'ETUDE ET PROPRIETES	
I. FORMATION DU BIOFILM	14
A. Différentes étapes de la formation du biofilm	14
1. <i>Adhésion primaire</i>	14
2. <i>Adhésion réversible</i>	15
3. <i>Adhésion irréversible</i>	16
B. Paramètres influençant la formation d'un biofilm	18
1. <i>Physico-chimie du milieu</i>	19
2. <i>Support</i>	20
II. TECHNIQUES DE DETECTION ET DE CARACTERISATION DU BIOFILM	21
A. Techniques de détection permettant le suivi des premières étapes du développement du biofilm	21
B. Techniques de caractérisation du biofilm	23
1. <i>Masse</i>	23
2. <i>Densité et porosité</i>	24
3. <i>Epaisseur</i>	24
C. Techniques d'analyse des propriétés physico-chimiques du biofilm	27
1. <i>Analyses physico-chimiques</i>	27
2. <i>Analyses biochimiques</i>	28
3. <i>Microscopies</i>	29
4. <i>Mesures du frottement et du transfert de chaleur</i>	30
5. <i>Mesures de transport de matière</i>	30
a) <i>Mesures de vitesses</i>	32
b) <i>Mesures de profil de concentration</i>	32
c) <i>Mesures de coefficients de diffusion</i>	33

III. PROPRIETES PHYSICO-CHIMIQUES DU BIOFILM	34
A. Structure du biofilm	34
1. <i>Distribution spatiale</i>	34
2. <i>Epaisseur</i>	35
3. <i>Densité et porosité</i>	35
4. <i>Rhéologie</i>	37
B. Composition chimique du biofilm	37
C. Propriétés de transport et interfaciales	38
1. <i>Transport de matière</i>	38
2. <i>Conductivité thermique et coefficient de friction</i>	43
IV. CONCLUSION	45

Chapitre 2 MODELE, TECHNIQUES ET PROCEDURES

I. MODELE PHYSIQUE : ANALYSE DU TRANSPORT DE MATIERE	47
A. Analyse du transport de matière au voisinage une électrode à disque tournant	47
B. Analyse du transport de matière au voisinage une électrode à disque tournant recouverte d'une couche poreuse	50
II. TECHNIQUES D'ETUDE	53
A. Régime stationnaire	53
B. Techniques transitoires	54
1. <i>Impédance électrohydrodynamique (EHD)</i>	56
2. <i>Impédance électrochimique (AC)</i>	64
III. TECHNIQUES EXPERIMENTALES	67
A. Dispositifs expérimentaux	67
B. Procédures expérimentales	73
1. <i>Préparation des électrodes de travail</i>	73
2. <i>Traceurs électrochimiques</i>	73
a) Traceur ferricyanure.....	73

b) Oxygène.....	74
3. Mesures.....	75
a) Mesures en régime stationnaire	75
b) Mesures d'impédance EHD	76
c) Mesures d'impédance AC	76
C. Traitement des données.....	77

Chapitre 3 ELABORATION ET CARACTERISATION D'UNE COUCHE MODELE POREUSE

I. CONDITIONS EXPERIMENTALES.....	80
A. Elaboration de la couche de gélatine.....	80
1. Préparation de la gélatine.....	80
2. Dépôt de la gélatine sur l'électrode.....	80
B. Traceurs électrochimique.....	80
1. Traceur ferricyanure	81
2. Traceur oxygène	81
II. DETERMINATION DU NOMBRE DE SCHMIDT.....	83
A. Traceur ferricyanure	84
B. Traceur oxygène.....	87
III. DETERMINATION DE D_f ET D_c DANS UNE COUCHE DE GELATINE.....	89
A. Traceur	89
1. Régime stationnaire	89
2. Impédance EHD	91
3. Traitement des données	91
B. Traceur oxygène.....	94
1. Régime stationnaire	94
2. Impédance EHD	96
3. Traitement des données	96
C. Comparaison des résultats obtenus avec les traceurs ferricyanure et oxygène.....	99

V. CONCLUSION.....	101
--------------------	-----

Chapitre 4 CARACTERISATION D'UN BIOFILM FORME EN MILIEU NATUREL

I. CARACTERISATION DE BIOFILMS FORMES EN EAU DE MER.....	105
A. Caractérisation de biofilms formés en eau de mer additionnée d'un nutriment.....	105
1. <i>Conditions expérimentales</i>	105
2. <i>Résultats et discussion</i>	109
a) Traceur ferricyanure.....	109
b) Traceur oxygène.....	120
c) Comparaison des épaisseurs obtenues avec les deux traceurs	123
B. Etude en milieu stérile	128
1. <i>Conditions expérimentales</i>	128
a) Montage expérimental.....	128
b) Procédures de stérilisation.....	131
c) Contrôles de stérilité	133
2. <i>Résultats et discussion</i>	134
a) Maintien de la stérilité.....	134
b) Régime stationnaire.....	136
3. <i>Conclusion</i>	140
C. Caractérisation de biofilms formés en eau de mer naturelle.....	141
1. <i>Conditions expérimentales</i>	141
2. <i>Résultats et discussion</i>	142
a) Traceur ferricyanure.....	142
b) Traceur oxygène.....	151
c) Comparaison des épaisseurs obtenues avec les deux traceurs	157
3. <i>Conclusion</i>	161
D. Comparaison des épaisseurs des biofilms formés en eau de mer.....	162
E. Conclusion.....	163

II. CARACTERISATION DE BIOFILMS FORMES EN EAU DOUCE	164
A. Etude exploratoire en eau douce	165
1. <i>Conditions expérimentales</i>	165
2. <i>Résultats et discussion</i>	169
3. <i>Conclusion</i>	175
B. Seconde étude réalisée en eau douce	179
1. <i>Conditions expérimentales</i>	180
2. <i>Résultat et discussion</i>	180
a) Mesures en régime stationnaire.....	180
b) Impédance EHD.....	183
c) Impédance AC.....	189
d) Traitement des données.....	191
e) Observations en épifluorescence.....	192
3. <i>Conclusion</i>	193
 CONCLUSION GENERALE	 196
 ANNEXE	 199
Dosage de l'oxygène dissous : Méthode de Winkler	199
Etude bactéricide de toxicité bactérienne du ferri/ferrocyanure de potassium	201
Préparation des échantillons destinés à l'observation en Microscopie Electronique à Balayage	202
Observations au Microscope en Epifluorescence	203
Milieu culture R2A	205
Milieu de culture et procédure utilisés dans le chapitre §4.I.B concernant l'étude en eau de mer stérile	206
Dosage de l'ATP	207
Dosage du chlore résiduel : méthode à l'orthotolodine	210
Ajustement des paramètres par la technique de simplexe	211
 REFERENCE	 213

**Liste des symboles
et acronymes utilisés**

LISTE DES SYMBOLES ET ACRONYMES UTILISES

A	Amplitude de l'impédance EHD
A_0	Amplitude à la fréquence zéro de l'impédance EHD
A/A_0	Amplitude réduite
AC	Impédance électrochimique ou AC
a_D	Coefficient (5/3 pour une orientation aléatoire des pores dans un gel) (§1.III)
ADN	Acide DésoxyriboNucléique
ATP	Adénosine TriPhosphate
b	Coefficient de Tafel
BET	Technique de mesure de surface spécifique des poudres (Brunauer, Emmett, Teller)
c	Concentration
C_{dc}	Capacité double charge
c_∞	Concentration dans la solution
D	Coefficient de diffusion dans la solution électrolytique
D_{gel}	Coefficient de diffusion dans un gel (§1.III)
D_{sol}	Coefficient de diffusion dans la solution (§1.III)
E	Potentiel
E_i	Potentiel interfacial
ECS	Electrode au Calomel Saturé
EDT	Electrode à Disque Tournant
EHD	Impédance ElectroHydroDynamique
EPS	Polymères Extracellulaires
F	Constante de Faraday (96500C)
f	Fréquence de modulation
i	Courant total
\bar{i}	Courant moyen
i_f	Courant faradique
i_K	Courant d'origine cinétique
i_L	Courant de Levich
i_0	Courant non diffusionnel
i_∞	Courant fonction de la diffusion moléculaire dans la couche poreuse
IgG	Immunoglobulines humaines de classe G
IR	Infra-Rouge
IRMN	Imagerie à Résonance Magnétique Nucléaire
IR-TF	Infra-Rouge à Transformée de Fourier

j	Nombre complexe
J	Flux
K	Coefficient de Levich
MAF	Microscope à Force Atomique
MEB	Microscope Electronique à Balayage
MET	Microscope Electronique à Transmission
MLBC	Microscope Laser à Balayage Confocal
n	Nombre d'électrons mis en jeu lors de la réaction électrochimique
p	Fréquence adimensionnelle ($p = \frac{\omega}{\Omega}$)
q	Charge
R	Constante des gaz parfait
R_e	Résistance électrolytique
$Re\{x\}$	Partie réelle de x
RMN	Résonance Magnétique Nucléaire
RX	Rayon X
S	Surface active de l'électrode
SAB	Sérum Albumine Bovin
Sc	Nombre de Schmidt
s_f	Fréquence adimensionnelle ($s_f = j\omega \frac{\delta_f^2}{D_f}$)
T	Température
t	Temps
v	Vitesse
v_z	Composante normale de la vitesse
z	Coordonnée axiale (origine de l'axe prise à l'interface métal/couche) par rapport à l'électrode
z^*	Coordonnée axiale (origine de l'axe prise à l'interface solution/couche, $z^* = z - \delta_f$)
z	Valeur absolue de la charge d'un ion
Z	Impédance électrochimique sous contrôle diffusionnel
Z_C	Fonction de transfert dépendant du transport de charge
$Z_d(p)$	Impédance de diffusion convective ($Z_d(p)/Z_d(0) = -1/\theta'(0)$)
$Z_{EHD,E}$	Impédance électrohydrodynamique sous contrôle potentiostatique
$Z_{EHD,i}$	Impédance électrohydrodynamique sous contrôle potentiostatique
Z_f	Impédance lié au processus faradique
δ_f	Epaisseur de la couche poreuse

δ_n	Epaisseur de la couche de diffusion
$\Delta\Omega$	Amplitude de modulation de la vitesse de rotation
Δi	Amplitude de modulation du courant
ε	Porosité
ϕ	Potentiel électrostatique
ϕ_D	Coefficient correspondant à la fraction de volume occupé par un gel
$\Gamma(4/3)$	Fonction Gamma de 4/3
η	Surtension
φ	Déphasage
ν	Viscosité cinématique
$-1/\theta'(0)$	Impédance de diffusion adimensionnelle sur une électrode nue, fonction de $pSc^{1/3}$
ω	Pulsation
Ω	Vitesse de rotation de l'électrode
$\bar{\Omega}$	Vitesse moyenne de rotation
∇	Gradient
$\frac{D_f}{\delta_f}$	Vitesse de diffusion dans la couche poreuse
$\frac{\delta_f^2}{D_f}$	Temps de diffusion dans la couche poreuse

Introduction

Le développement de *biofilms* sur les surfaces immergées en milieu aquatique naturel a un impact très important sur la productivité et la compétitivité industrielle ainsi que sur la santé publique. Les enjeux économiques sont énormes.

Les biofilms peuvent s'avérer nocifs en :

- accélérant et/ou induisant la corrosion
- diminuant l'efficacité des circuits de refroidissement et des échangeurs thermiques
- ralentissant les navires
- bloquant certaines fonctions mécaniques
- induisant des problèmes de santé publique tels que le développement de la plaque dentaire

Mais l'existence de ces biomasses peuvent aussi être exploitée de façon bénéfique, par exemple pour :

- le traitement des eaux usées
- la fabrication du vinaigre ou de certains vins

Le biofilm est un thème de recherche interdisciplinaire reposant sur la compréhension des phénomènes biologiques, chimiques et électrochimiques en prenant en compte les processus de transfert interfaciaux et de transport. Son étude nécessite donc la collaboration de spécialistes dans de nombreux domaines tels que la microbiologie, la chimie et la physique. Pour être pleinement efficace, cette collaboration implique de trouver un vocabulaire compréhensible par chacun de ces membres.

L'objectif de ce travail est d'élaborer et de développer une technique de détection et de caractérisation des biofilms développés en milieux naturels d'un point de vue physico-chimique (porosité, épaisseur et coefficient de diffusion).

Dans un premier temps, ce manuscrit permettra d'appréhender les connaissances actuelles sur la formation du biofilm, les techniques de détection et de caractérisation de celui-ci et ses propriétés physico-chimiques.

A partir de ces recherches bibliographiques, les biomasses peuvent être considérées en première approximation comme une couche poreuse homogène, à l'échelle macroscopique, du point de vue du transport de matière. L'étude présentée confirmera la véracité cette hypothèse.

Une approche expérimentale possible permettant de caractériser les couches poreuses est donc l'étude du transport de matière. La méthode développée dans ce travail repose sur l'analyse du courant limite de réduction d'un traceur rédox contrôlé par le transport de matière. Le gradient de concentration de l'espèce diffusante est distribué entre la couche poreuse où seule intervient la diffusion moléculaire et la solution électrolytique, siège de la diffusion convective. Par la variation des conditions hydrodynamiques au voisinage du biofilm, à partir des mesures du courant limite de diffusion, il est possible de distinguer les contributions respectives de ces processus diffusionnels et d'atteindre ainsi des paramètres propres à la couche poreuse.

Les deux principales techniques électrochimiques utilisées sont :

- la mesure du courant limite stationnaire en fonction de la vitesse de rotation.
- l'impédance électrohydrodynamique (EHD)

Deux traceurs électrochimiques sont employés dans cette étude : l'oxygène et le ferricyanure. Ces deux traceurs permettent de valider la méthode en montrant que les résultats obtenus sont indépendants du traceur utilisé. L'oxygène a l'avantage d'être naturellement présent dans le milieu. Le ferricyanure est, quant à lui, une espèce rédox habituellement choisie pour les études de transport de matière, sa vitesse de réaction électrochimique pouvant être considérée comme infiniment rapide.

La première étape du travail expérimental est l'élaboration d'une couche poreuse modèle reproduisant le comportement d'un biofilm ainsi que le développement d'un protocole expérimental ayant pour objet la caractérisation de sa géométrie par analyse du transport de matière. Le matériau choisi pour jouer le rôle du biofilm doit avoir un caractère poreux. Le choix s'est dirigé assez naturellement vers un gel. C'est la gélatine alimentaire qui a été retenue pour sa simplicité d'emploi, son faible coût et sa disponibilité.

La seconde étape est l'adaptation du protocole mis au point avec la couche modèle afin de suivre *in-situ* l'évolution d'un biofilm développé en milieu naturel tel que l'eau de mer ou l'eau douce.

L'adaptation de la technique est plus aisée en milieu marin car la composition de l'eau de mer avec sa forte salinité en fait un excellent électrolyte support pour des mesures électrochimiques. De plus, en raison de l'entartrage, les mesures électrochimiques s'avèrent plus délicates en eau douce.

Le développement de la technique en milieu marin est la première étude abordée, comme un but en soi, mais aussi afin d'aplanir les difficultés propres à l'eau douce. L'adaptation du protocole est réalisée sur des biofilms relativement épais développés avec un apport de nutriment. Une fois ce premier point accompli, une étude est réalisée en milieu stérile afin de déterminer, pour la technique présentée, la limite de détection du biofilm. Enfin, la technique est appliquée dans le cas d'un biofilm développé en eau de mer sans apport extérieur de nutriment.

La technique électrochimique est alors adaptée à des biofilms développés en eau douce. Le milieu de mesure doit limiter les risques de dépôt calcaire sans tout fois perturber de façon trop importante les microorganismes présents dans le biofilm. Le milieu de mesure est différent du milieu de développement. Le choix s'est porté sur l'eau de Volvic qui est peu minéralisée et contient peu de calcium et de carbonates. Des modifications du protocole expérimental sont nécessaires du fait de la faible minéralisation de l'eau de Volvic.

A chaque étape, des observations (Microscope Electronique à Balayage, cultures, épifluorescence, Microscope Laser à Balayage Confocal) sont réalisées pour permettre l'interprétation des résultats obtenus du point de vue de la biologie.

Le prolongement naturel de cette étude sera le développement d'un capteur pour détecter *in-situ* les biomasses et de les caractériser par leur géométrie (épaisseur et porosité).

Chapitre 1

Biofilm : formation, techniques d'étude et propriétés

- I. Formation du biofilm
- II. Techniques de détection et de caractérisation du biofilm
- III. Propriétés physico-chimiques du biofilm
- IV. Conclusion

Des cellules microbiennes viennent recouvrir et se lier à presque toute surface immergée dans un environnement aquatique. Les cellules immobilisées croissent, se reproduisent et excrètent des polymères organiques extracellulaires constitués principalement de polysaccharides et de protéines. Ces polymères forment une matrice qui engluie les microorganismes pour former une entité appelée *biofilm* ou *biomasse* ou *voile bactérien*.

Dans la nature, les bactéries prédominent numériquement et métaboliquement sous forme de biofilm. Les microorganismes planctoniques^(a) ne sont que des "émisaires" de colonies incluses dans des biofilms vers de nouveaux sites d'implantation. Les cellules sessiles^(b) réagissent à leur environnement et sont fondamentalement différentes des cellules planctoniques de la même espèce (Costerton *et al.*, 1995).

En fait, la différence essentielle entre un biofilm et d'autres systèmes microbiens est l'hétérogénéité de la biomasse où les processus de transport et les gradients sont importants. A titre d'exemple, un film bactérien épais peut contenir à la fois des environnements aérobies et anaérobies.

Dans le cas le plus simple, le biofilm est composé de cellules microbiennes et de leurs produits. Un tel biofilm est généralement une structure très adsorptive et poreuse (> 95% d'eau). Le plus souvent, les biofilms observés se composent d'une part importante de particules inorganiques et abiotiques adsorbées et enrobées dans les exopolymères.

Ce chapitre a pour objet de permettre d'appréhender les connaissances actuelles sur les biofilms :

- formation du biofilm
- techniques de détection et de caractérisation de la biomasse
- propriétés physico-chimiques du voile bactérien

(a) *Planctonique* : qui flotte, est emporté par les courants.

(b) *Sessile* : fixé à un substratum.

I. FORMATION DU BIOFILM

A. Différentes étapes de la formation du biofilm

La formation du biofilm peut être décomposée (fig. §1.1) :

- Evénements initiaux (adhésion primaire)
- Accumulation exponentielle
- Etat stationnaire

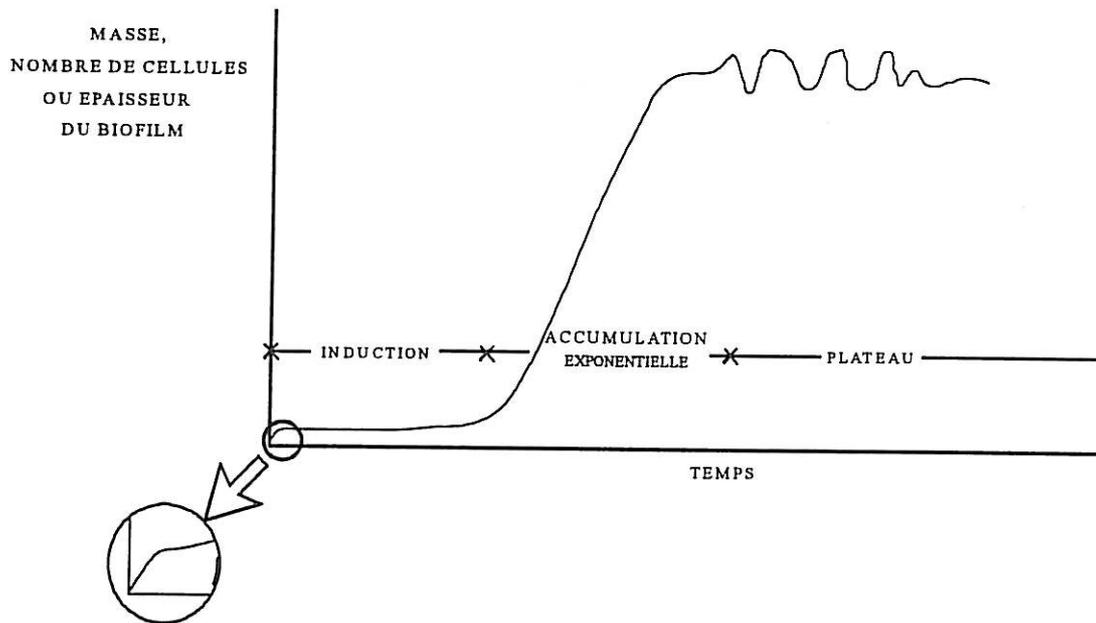


Figure §1.1 : Evolution du développement du biofilm dans le temps (Charaklis, 1990).

1. Adhésion primaire

La première phase (fig. §1.2) consiste en une accumulation irréversible de macromolécules organiques présentes dans le milieu ou sécrétées par des microorganismes vivant dans le milieu. Ces particules conditionnent la surface support en un temps très court (quelques minutes à quelques heures après l'immersion). Les propriétés de la surface

telles que la mouillabilité, les propriétés hydrophobes, la charge de surface, le potentiel de contact, la tension de surface et la mobilité électrophorétique sont modifiées (Loeb et Neihof, 1975 ; Baier, 1980). Des auteurs ont décrit ce film comme fortement composé de lipopolysaccharides, glycoprotéines, exopolymères et acides humiques (Baier et Weiss, 1975 ; Baier, 1980 ; Berk et al, 1981). Cette couche constitue un "film primaire" qui conditionne l'attachement ultérieur des bactéries.

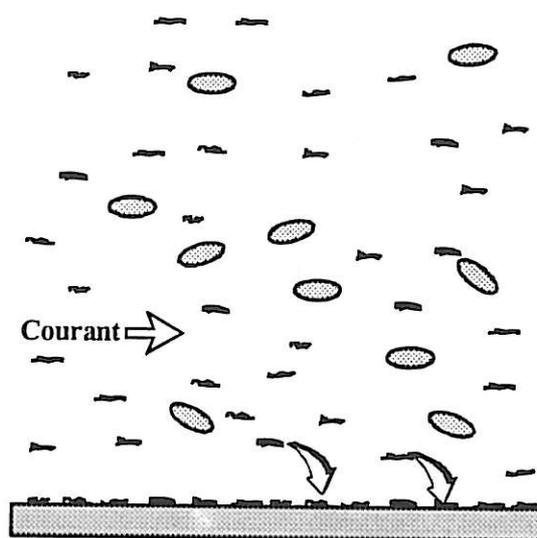


Figure §1.2 : Transport et adsorption de molécules organiques sur un support propre : formation du film primaire.

2. Adhésion réversible

Des cellules viennent s'adsorber réversiblement sur le support où la concentration en nutriments est plus importante (fig. §1.3). Cette adsorption réversible met en jeu de faibles interactions entre le support et les cellules telles que les forces de Van Der Waals, les interactions électrostatiques de double couche, les interactions stériques et des liaisons par l'intermédiaire de polymères (Pethica, 1961 ; Dolowy, 1980 ; Fletcher, 1980 ; Vincent, 1980 ; Rutter et Vincent, 1980). Les forces mises en jeu dans le phénomène de fixation réversible des bactéries sont décrites par la théorie de la stabilité des colloïdes lyophobes^(c)

(c) *Lyophobe* : se dit des substances qui ne peuvent subir ni dessiccation, ni imbibation.

(Derjaguin et Landau, 1941 ; Verway et Overbeek, 1948). Les bactéries sont considérées comme des particules colloïdales vivantes du fait de leur petite taille, leur densité qui n'est pas beaucoup plus importante que celle de l'eau, leur charge de surface négative et les différentes variations de l'hydrophobicité des parois bactériennes. Cependant, les microorganismes sont plus complexes que des particules colloïdes classiques car ces organismes sont capables de se mouvoir de façon indépendante, de se développer et de produire des polymères extracellulaires.

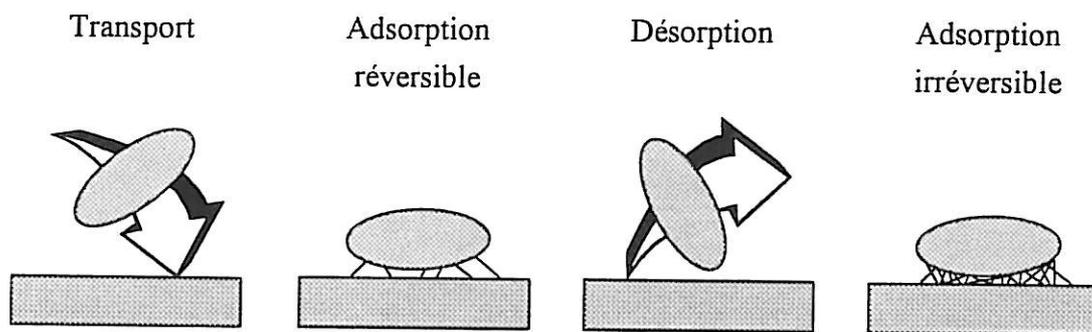


Figure §1.3 : Transport des cellules microbiennes au support conditionné, adsorption réversible, désorption et adsorption irréversible de cellules sur le support.

3. Adhésion irréversible

Une partie des cellules s'adsorbent irréversiblement alors qu'une autre partie se désorbent (fig. §1.3). Ce type d'adhésion met en jeu des interactions de hautes énergies telles des interactions dipôle-dipôle, dipôle-dipôle induit, ion-dipôle, liaisons hydrogène,... Les cellules irréversiblement adsorbées se multiplient et excrètent des produits métaboliques. Durant le processus complexe de l'adhésion, les cellules bactériennes altèrent leur phénotype en réponse à la proximité de la surface du support (Fletcher, 1991). Cette modification de leur phénotype provoque un changement de leurs molécules structurales et les bactéries synthétisent les polymères extracellulaires (EPS). Ces polymères jouent alors un rôle de pont polymérique entre la cellule et la surface et garantissent alors l'intégrité du biofilm.

D'autres cellules continuent à s'attacher au biofilm pour augmenter le volume du voile biologique alors que des particules s'emprisonnent dans la structure. Finalement, des

parties de biofilm se détachent et sont entraînées dans la solution. Les étapes d'attachement et de détachement permettent l'évolution des différentes populations bactériennes dans un biofilm (fig. §1.4). L'évolution du voile biologique atteint un plateau.

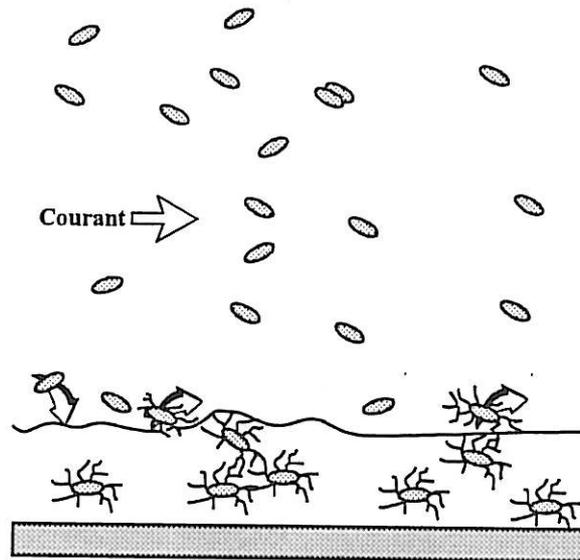


Figure §1.4 : Attachement et détachement de cellules et autres particules à partir du biofilm.

Les premiers microorganismes mis en jeu dans le phénomène d'adhésion sont généralement dits copiotrophes, c'est-à-dire nécessitant des teneurs en matières organiques importantes qu'ils trouvent alors dans le film primaire. Les bactéries dites oligotrophes ^(d) succèdent à la précédente population. Le voile bactérien sert alors de support à la fixation et au développement de cellules eucaryotiques ^(e).

(d) *Oligotrophe* : qui a besoin de très peu de matière organique pour se développer (opposé à copiotrophe).

(e) *Eucaryotique* : se dit d'un être vivant dont les cellules possèdent un noyau structuré (opposé à procaryote). Cellule animale ou végétale eucaryote.

B. Paramètres influençant la formation d'un biofilm

Les conditions nécessaires à la formation d'un biofilm sont simples : surface, nutriments, microorganismes et humidité (tableau §1.1). L'adhésion sur des surfaces est une stratégie développée par les microorganismes pour survivre dans les milieux peu propices à leur développement. Ainsi, le développement des biomasses est possible avec des valeurs de concentration supérieures à 2 mg.L^{-1} de chlore (biocides très utilisés). Des voiles biologiques ont été observés dans les canalisations de désinfectants. Des biofilms ont aussi été mis en évidence autour de lampes UV et sur des sources radioactives (Flemming, 1991).

<i>Température</i>	de -12°C à $+115^{\circ}\text{C}$
<i>pH</i>	de 0 à 13
<i>Salinité</i>	de 0 à presque toutes les solutions salines saturées
<i>Potentiel rédox</i>	sur la gamme complète de la stabilité de l'eau
<i>Pression hydrostatique</i>	de moins de 0,01 bar à des pressions supérieures à 1400 bar
<i>Concentrations en nutriments</i>	à partir de $10 \text{ }\mu\text{g.L}^{-1}$
<i>Nature de la surface</i>	Tout type de surface

Tableau §1.1 : Conditions permettant la vie d'un biofilm (Flemming, 1991).

L'organisation en biofilm confère de nombreux avantages aux cellules (Marshall, 1985) :

- Possibilité de former des microconsortiums
- Facilité d'échange de matériel génétique
- Accumulation de nutriments à partir de la phase liquide

- Protection contre les agressions extérieures telles que les substances toxiques : les bactéries immobilisées dans un biofilm montrent une remarquable capacité de résistance aux biocides et antibiotiques.

La majorité des études sur la formation des biofilms et l'adhésion bactérienne se focalisent sur les effets directs de l'activité microbienne sur les surfaces. Cependant, il existe des indications montrant que les microorganismes immobilisés sur des surfaces possèdent des propriétés physiologiques différentes par rapport aux microorganismes en phase aqueuse. Les cellules bactériennes planctonique altèrent leur phénotype pour devenir des cellules sessiles lors de l'adhésion. Les cellules sessiles vivant dans un biofilm et les cellules planctoniques de la même espèce sont différentes sous bien des points de vue : biochimie, phénotype, physiologie,... Dans la nature, les cellules bactériennes se développent de façon prédominante sous le mode sessile et sont engluées dans une matrice afin de se protéger des agressions extérieures. Cette protection est sacrifiée par les cellules planctoniques qui périodiquement s'échappent vers de nouveaux habitats pouvant être colonisés par de nouveaux biofilms (Costerton *et al.*, 1995).

1. *Physico-chimie du milieu*

Les *conditions hydrodynamiques* influencent le transport de matière : apport de nutriments, cellules et autres matériels de la solution vers le biofilm et détachement de matériel à partir du voile biologique. L'épaisseur d'un biofilm peut varier de quelques micromètres dans un milieu où les forces de cisaillement sont importantes à plusieurs centimètres dans un système d'eaux usées où ces forces sont faibles. Cependant, des forces de cisaillement importantes n'évitent pas la formation d'un biofilm mais rendent celui-ci plus fin et plus dense (Characklis, 1990 ; Leech et Hefford, 1980 ; Powell et Slater, 1982, 1983).

La *température* du milieu semble jouer un rôle important dans le développement du biofilm à plusieurs niveaux : adhésion primaire des microorganismes et croissance bactérienne. De plus, la vitesse de la plupart des processus chimiques et biochimiques et des processus de transport est influencée par les conditions thermiques.

Le *pH* du milieu a été décrit comme jouant un rôle important dans les premières phases de l'adhésion microbienne en modifiant les doubles couches électrostatiques du support et des cellules bactériennes (Applegate et Erkenbrecher, 1987).

Les *substances organiques dissoutes* ont une action sur l'adhésion initiale en formant un film primaire qui conditionne la surface du matériau-support et en modifiant la surface de la cellule microbienne. Ainsi Little *et al.* (1986) ont montré que la quantité de source carbonée influence l'hydrophobicité des microorganismes. De plus, le carbone organique, l'azote, le phosphore, les matières organiques biodégradables ... présents dans le milieu sont des sources nutritives pour les microorganismes de la biomasse. En outre, les *particules organiques et inorganiques* peuvent s'accumuler dans le voile biologique qui a une structure adsorptive.

2. Support

La vitesse de colonisation microbienne des surfaces dépend de la *composition chimique du support* (Schoenen, 1990). Les populations bactériennes peuvent être très différentes du point de vue morphologique et quantitatif suivant la nature chimique du support (Little *et al.*, 1986). Des facteurs tels que l'hydrophobicité et l'énergie de surface du matériau sont reconnus pour avoir un rôle important dans l'adhésion. La majorité des microorganismes montrent une préférence pour les surfaces hydrophobiques de basse énergie (Baier, 1980).

La *microtypologie de la surface* est un facteur important pour la formation d'un biofilm. Ce fait est particulièrement marqué dans le cas des surfaces d'échangeurs de chaleur (Characklis, 1990). Cependant, si la dimension des rugosités est inférieure à la taille des microorganismes, ce facteur devient négligeable.

La *polarisation de la surface* peut influencer la formation du voile bactérien. En effet, la polarisation d'une surface métallique induit une modification du *pH* interfacial qui joue lui-même un rôle sur la charge de la surface des cellules microbiennes. La mobilité électrophorétique de la bactérie est modifiée par la polarisation du support (Little *et al.*, 1986).

II. TECHNIQUES DE DETECTION ET DE CARACTERISATION DU BIOFILM

Les différentes méthodes d'étude du biofilm (Tableau §1.2) peuvent se classer suivant différents critères : directes ou indirectes, *ex-situ* ou *in-situ*, destructive ou non-destructive. De plus, les techniques utilisées peuvent permettre d'appréhender différents paramètres concernant le biofilm tels les premières étapes de son développement, sa quantification et ses propriétés physico-chimiques. Cette revue de différentes techniques de détection et de caractérisation du biofilm n'est pas exhaustive mais seulement indicatrice de techniques pouvant être rencontrées dans la littérature. Ce chapitre n'aborde pas les techniques biologiques. En effet, le propos de ce travail est de détecter et de caractériser d'un point de vue physico-chimique le biofilm.

A. Techniques de détection permettant le suivi des premières étapes du développement du biofilm

La première phase consiste en une accumulation de macromolécules organiques qui conditionnent la surface support. Les techniques permettant de suivre ces premières étapes du développement du biofilm sont essentiellement des techniques d'analyse de surface.

Les propriétés électrostatiques de la surface sont modifiées lors de la formation du film primaire et peuvent être suivies par des techniques d'étude de surface et d'analyses physico-chimiques.

- *Microélectrophorèse* permettant l'étude de la charge de surface mais limitée à quelques matériaux tels que le platine (Loeb et Neihof, 1975)
- *Mesures d'angles de contact* montrant le changement de la charge de surface (Loeb et Neihof, 1975 ; Baier et Weiss, 1975)
- *Ellipsométrie* permettant de déterminer les indices de réfraction et l'épaisseur de ces films très minces et transparents (Kristoffersen *et al.*, 1982)
- *Spectroscopie Infrarouge* permettant l'étude de la composition de la couche formée mais applicable seulement sur certaines surfaces

<p>Techniques de détection permettant de suivre les premières étapes du développement du biofilm</p>	<p>Microélectrophorèse Mesures d'angles de contact Ellipsométrie Spectroscopie IR Spectroscopie RX Techniques de microscopie Spectrométrie de masse - pyrolyse Techniques électrochimiques Spectroscopie photoacoustique</p>	<p>Loeb et Neihof, 1975 Loeb et Neihof, 1975 Baier et Weiss, 1975 Kristoffersen <i>et al.</i>, 1982 Nivens <i>et al.</i>, 1991 Baier et Weiss, 1975 Duic <i>et al.</i>, 1973 Ramasamy <i>et al.</i>, 1973 Stoner et Srinivasan, 1970 Dexter et Lucas, 1985</p>
<p>Techniques directes de caractérisation du biofilm</p>	<p>Masse Epaisseur</p>	<p>Nivens <i>et al.</i>, 1991 et 1993 Picologlou <i>et al.</i>, 1980 Trulear et Characklis, 1982 Bakke et Olsson, 1986 Bryers et Characklis, 1981 Hoehn et Ray, 1973 Norrman <i>et al.</i>, 1977 Sanders, 1966 Trulear et Characklis, 1982 Trulear, 1983 Zelver, 1979</p>
<p>Mesures indirectes de la quantité de biofilm : activité microbienne</p>	<p>Comptage de cellules vivantes Microscopie épifluorescente ATP Vitesse d'utilisation des substrats</p>	<p>Costeron et Colwell, 1979 Corpe, 1973 Gerchakov <i>et al.</i>, 1977 Geesey <i>et al.</i>, 1977 Little et Lavoie, 1979 Bobbie <i>et al.</i>, 1979 Costeron et Colwell, 1979 Trulear et Characklis, 1982 Bakke <i>et al.</i>, 1984</p>
<p>Mesures indirectes de la quantité de biofilm : constituant spécifique du biofilm et effets du biofilm sur les propriétés de transport</p>	<p>Constituant spécifique du biofilm : polysaccharides, carbone organique total, protéines Effets du biofilm sur les propriétés de transport : frottement et transfert de chaleur</p>	<p>Bobbie <i>et al.</i>, 1979 Bobbie et White, 1980 Bryers et Characklis, 1981 Little et Lavoie, 1979 McCoy, 1979 Trulear et Characklis, 1982 Picologlou <i>et al.</i>, 1980 Norrman <i>et al.</i>, 1977 Characklis <i>et al.</i>, 1981</p>

Tableau §1.2 : Différentes méthodes pour évaluer l'accumulation du biofilm.

- *Spectroscopie Rayon X* permettant l'étude de la nature de la couche formée (Baier et Weiss, 1975)
- *Techniques de microscopie* permettant de suivre les premiers stades du développement bactérien (voir le paragraphe §1.II.C.3)
- *Spectrométrie de masse - pyrolyse* donnant des informations sur les poids moléculaires des espèces chimiques composant le film
- *Techniques électrochimiques* utilisées pour étudier l'adsorption des protéines sur les surfaces métalliques : voltamétrie cyclique (Duic *et al.*, 1973 ; Ramasamy *et al.*, 1973) et mesure de capacité (Stoner et Srinivasan, 1970).
- *Spectroscopie photo acoustique* permettant de déterminer *in-situ* la présence d'un film organique adsorbé (Dexter et Lucas, 1985)

B. Techniques de caractérisation du biofilm

1. Masse

Du biofilm humide est prélevé de son milieu de culture puis séché à une température élevée constante (100-105°C). La différence de masse entre le support recouvert du biofilm et du support nettoyé et séché donne la masse du biofilm sec (Characklis, 1990).

La *microbalance à quartz* (Gabrielli *et al.*, 1991 et 1992) a été utilisée pour suivre l'évolution de la masse d'un biofilm de façon non destructive et en temps réel (Nivens *et al.*, 1991 et 1993 ; Ebersole *et al.*, 1991). Le principe de cette technique repose sur l'effet piézo-électrique. Une tension appliquée sur les deux côtés d'un cristal provoque une elongation ou une contraction de celui-ci parallèlement au champ électrique. L'analyse de la réponse en fréquence de résonance d'un quartz où se développe un biofilm permet de déterminer la masse de la biomasse. Cette technique est sensible à la pression, à la température, aux propriétés viscoélastiques du dépôt,... La limite de détection de cette méthode est de 1 pg environ.

2. Densité et porosité

Zhang et Bishop (1994a et b) ont élaboré un modèle pour calculer la *porosité* d'un voile biologique basé sur la différenciation de l'eau présente dans et hors des cellules. La connaissance de différents paramètres tels que la *densité* de la biomasse humide, des matières minérales et volatiles est indispensable.

3. Epaisseur

Trulear et Characklis (1982) ont utilisé un *microscope optique* pour déterminer l'épaisseur apparente d'un biofilm en adaptant une méthode mise au point par Sanders (1966). Le microscope est successivement mis au point sur la surface du biofilm et sur le support inerte où s'est développé ce biofilm (fig. §1.5). La précision de cette mesure est de $\pm 10-12 \mu\text{m}$ (incluant les irrégularités de la surface du biofilm) pour des épaisseurs de la limite de détection à $130 \mu\text{m}$. Il est possible de corriger cette épaisseur en tenant compte de l'indice de réfraction du biofilm humide et d'utiliser cette technique *in-situ* (Bakke et Olsson, 1986).

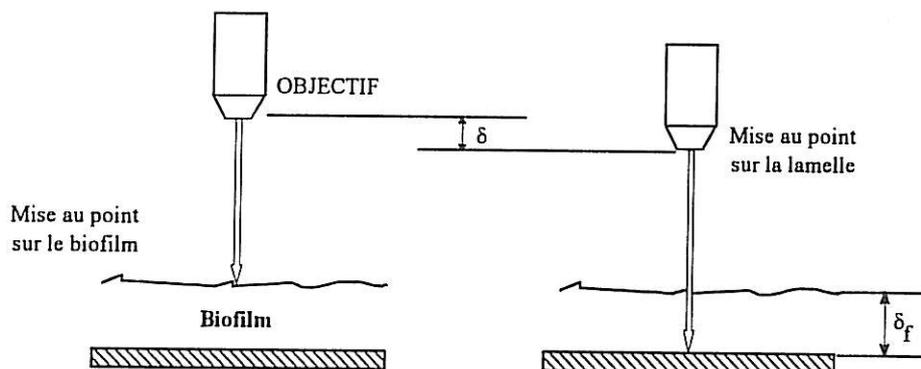


Figure §1.5 : Détermination de l'épaisseur du biofilm à l'aide d'un microscope optique (Bakke et Olsson, 1986).

Le *volume* du biofilm peut être mesuré par la différence de volume déplacé d'un liquide eau-surfactant par un support recouvert d'un biofilm par rapport au volume déplacé par le support nettoyé et séché (Zelver, 1979). Le niveau du liquide est mesuré à l'aide d'un bras manipulateur dont le contact avec le liquide est déterminé par observation visuelle ou mesure de conductivité (fig. §1.6). La connaissance de ce volume et de la surface de l'échantillon permet d'atteindre l'épaisseur du biofilm. La précision de cette mesure est de $\pm 10 \mu\text{m}$ pour des épaisseurs allant de 50 à 300 μm .

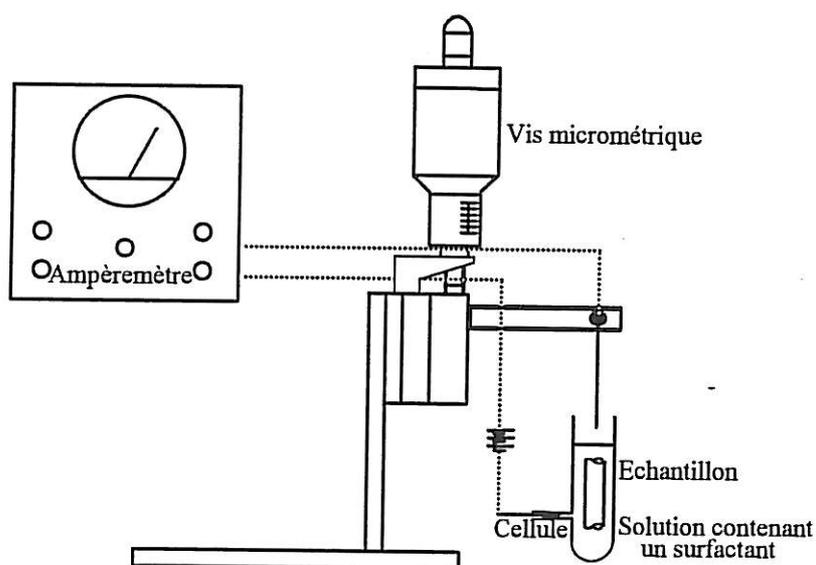


Figure §1.6 : Mesure de volume de biofilm humide par différence de volume déplacé entre un support recouvert par un biofilm et le même support nettoyé et séché (Zelver, 1979).

Norrman *et al.* (1977) ont pu mesurer l'épaisseur d'un biofilm en localisant, par la mesure de la *conductivité électrique*, les interfaces liquide-biofilm et biofilm-support en adaptant une technique mise au point par Hoehn et Ray (1973). Une aiguille en acier est enfoncée dans le biofilm (fig. §1.7). Un pic de courant est observé à la traversée de chaque interface. La précision de cette méthode est d'environ $\pm 6 \%$.

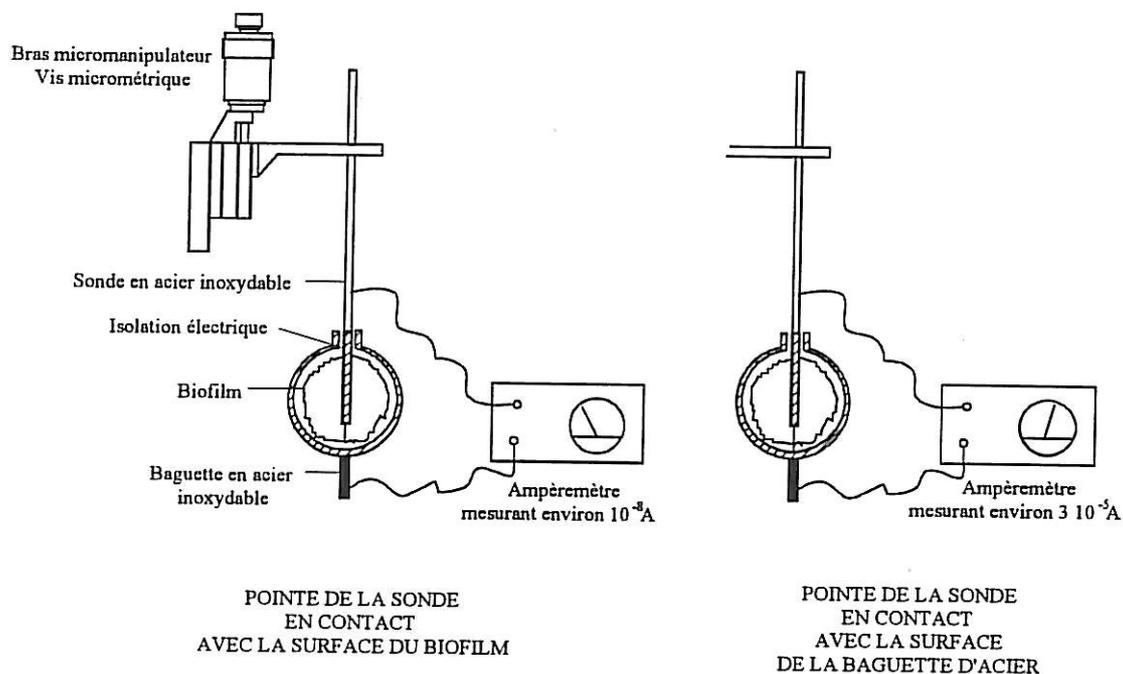


Figure §1.7 : Mesure d'épaisseur de biofilm par mesure de conductivité électrique à l'aide d'une aiguille d'acier (Hoehn et Ray, 1973).

L'utilisation d'un *Microscope Laser à Balayage Confocal (MLBC)* permet l'observation de biofilms hydratés par une technique non intrusive, en trois dimensions et en temps réel sur des biofilms vivants. Cette technique permet l'étude des relations chimiques et spatiales existant entre les bactéries, leurs produits extracellulaires et leur environnement (morphologie, métabolisme, chimie environnementale). Il est possible de suivre les premières étapes de la formation du biofilm et de caractériser les propriétés de transport de la biomasse par l'étude de la diffusion de molécules fluorescentes (Lawrence *et al.*, 1991, 1992). Le MLBC a l'avantage de permettre l'observation des biomasses fixées sur des surfaces non transparentes telles que les métaux, les gels, les minéraux, ... L'épaisseur minimale du biofilm observable est de $8 \mu\text{m}$ avec une précision de $\pm 3 \mu\text{m}$.

C. Techniques d'analyse des propriétés physico-chimiques du biofilm

1. Analyses physico-chimiques

L'analyse de la composition des exopolymères fait appel à différentes techniques : infrarouge (IR), Résonance Magnétique Nucléaire (RMN), chromatographie en phase gazeuse, spectrométrie de masse, analyse élémentaire par combustion,...

La *spectroscopie à infrarouge à Transformée de Fourier (IR-TF) à Réflexion Totale Atténuée* est une technique non-destructive et puissante qui permet l'analyse en continu de la nature chimique de l'attachement bactérien et de la formation du biofilm (Nichols *et al.*, 1985 ; Nivens *et al.*, 1991 ; Bremer et Geesey, 1991). Une source IR émet un rayon qui entre en contact avec un matériau transparent au IR tel que le germanium. Le rayon se reflète sur la face interne de ce matériau transparent sur lequel se développe un biofilm (fig. §1.8). Le spectre d'absorption donne des informations sur la nature chimique des composés organiques localisés dans la région proche de la surface ($\approx 1\mu\text{m}$).

Suivant les ions métalliques présents dans le milieu, il est possible d'observer une modification des propriétés des exopolymères produits par le biofilm (formation de complexes). Ces interactions ions métalliques/polymères peuvent être mises en évidence par IR-TF (Geesey *et al.*, 1988).

La *Résonance Magnétique Nucléaire (RMN)* est une technique directe et non destructive. Cette technique donne des informations concernant des assemblages de noyaux atomiques spécifiques telles que leur concentration, l'environnement chimique,...

La *RMN à impulsion* a été utilisée pour estimer la fraction de polymère liée à une surface solide en milieux aqueux par mesure des énergies d'interaction polymère/substrat (Barnett *et al.*, 1981).

La *RMN ^{13}C* permet d'étudier les événements physiologiques ayant lieu dans le biofilm tels que l'utilisation des sources de carbones par les micro-organismes. Cette technique demande un biofilm mature et des concentrations en substrats élevés qui ne reflètent pas toujours les conditions en milieu naturel (Lapin-Scott *et al.*, 1993).

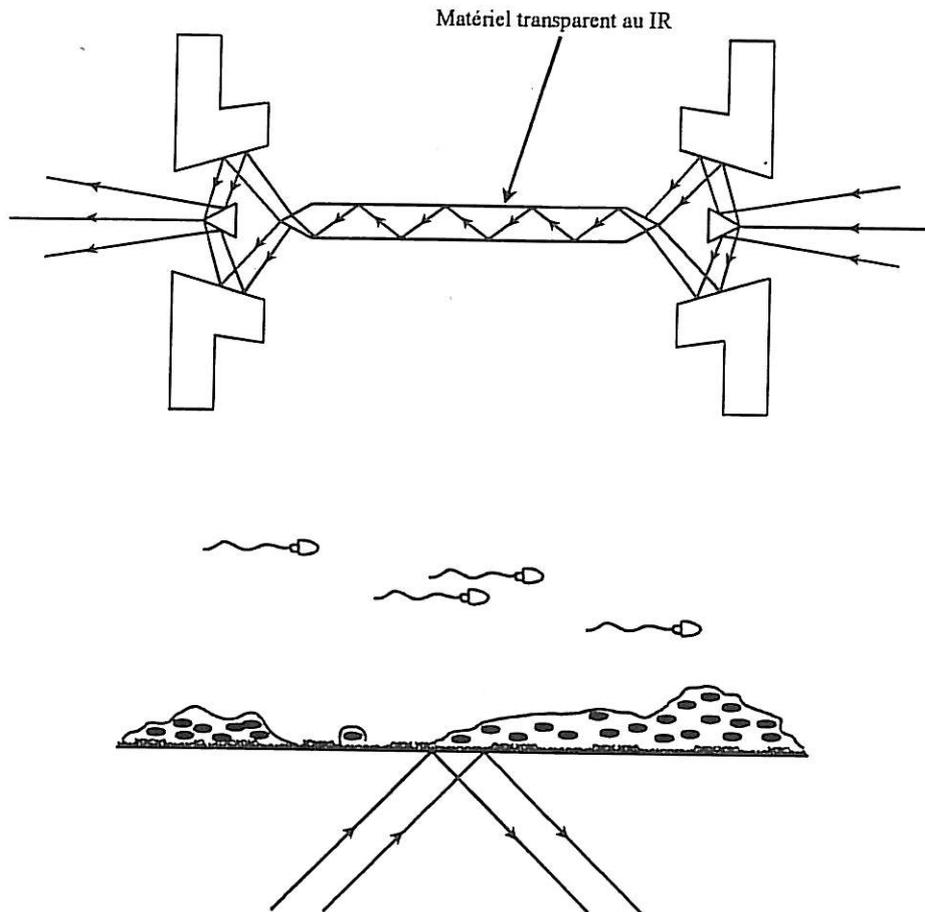


Figure §1.8 : Spectroscopie à Infrarouge à Transformée de Fourier à réflexion Totale Atténuée (d'après Lapin-Scott *et al.*, 1993).

2. Analyses biochimiques

Le dosage de certains constituants du biofilm tels que le carbone organique, protéines ou les polysaccharides permet de suivre l'accumulation du biofilm (Bobbie *et al.*, 1979 ; Bobbie et White, 1980). De plus, l'analyse biochimique de composés cellulaires peut permettre l'évaluation de l'activité biologique du voile biologique et de son accumulation. Les composés les plus couramment étudiés sont l'Adénosine TriPhosphate (ATP), les protéines, les phospholipides, l'acide muramique et l'ADN.

Le dosage de l'ATP extractible peut donner une idée de l'importance de la biomasse "vivante" totale (bactéries, algues,...). Une source potentielle d'erreur de cette technique est l'extraction incomplète du matériel à partir des échantillons (Geesey et Costerton, 1979).

Le *dosage des phospholipides* permet, quant à lui, de quantifier les cellules vivantes dans le milieu (Vestal et White, 1989). Ce composé chimique est présent dans les cellules vivantes suivant une quantité variable suivant les espèces bactériennes et se dégrade après la mort des microorganismes.

3. *Microscopies*

Le *Microscope Optique* et le *Microscope Laser à Balayage Confocal*, déjà présentés, permettent une évaluation directe de l'épaisseur des biofilms. D'autres techniques microscopiques sont utilisées pour suivre de façon indirecte l'évolution du biofilm en fonction de l'activité microbienne.

Les premiers stades de l'adhésion bactérienne peuvent être suivis par *Microscopie de Lumière Transmise* qui permet de visualiser l'attachement et la distribution des bactéries sur les surfaces. L'observation des premières étapes de la fixation bactérienne est aussi possible à l'aide de la *Microscopie Electronique à Transmission (MET)*.

De plus, la *Microscopie Electronique à Balayage (MEB)* permet l'observation de la répartition des amas bactériens. Cette méthode comporte cependant l'inconvénient de modifier la morphologie du biofilm lors de la phase de préparation des échantillons. En effet, le MEB, ainsi que le MET, nécessite la fixation puis la déshydratation des échantillons alors que la matrice du biofilm est composée de près de 95 % d'eau. Il est toutefois possible d'atténuer la modification de la morphologie du biofilm en utilisant la cryofixation de l'échantillon avant l'observation (Alleman *et al.*, 1985). La résolution du MEB est moins bonne que celle du MET. Récemment, l'utilisation du *Microscope Electronique à Balayage Environnemental* a permis l'observation d'échantillons partiellement déshydratés.

Le *Microscope à Force Atomique (MFA)* est basé sur les phénomènes de répulsion et d'attraction générés entre une micro-sonde et une surface. Cette technique permet de visualiser la topographie d'une surface. Le grand avantage de cette technique sur le MEB et le MET est qu'il n'est pas nécessaire de déshydrater l'échantillon pour l'observation (Bremer *et al.*, 1992). De plus, le MFA permet l'étude des premiers stades de l'adhésion.

4. Mesures du frottement et du transfert de chaleur

L'accumulation d'un biofilm augmente les frottements (Zelver, 1979 ; Picologlou *et al.*, 1980 ; Trulear et Characklis, 1982) et la résistance de transfert de chaleur (Characklis *et al.*, 1981) permettant ainsi de suivre son développement dans le temps. Des réacteurs sont utilisés pour étudier le développement du biofilm en fonction de la résistance de friction et de la conductivité thermique :

- Un *réacteur annulaire* (fig. §1.9) est un outil sensible de laboratoire pour suivre le développement du biofilm. Ce réacteur consiste en deux cylindres concentriques : un cylindre externe fixe et un cylindre interne rotatif. Des lamelles forment une partie intégrante de la paroi interne du cylindre externe et permettent de suivre l'épaisseur (au microscope), la masse et/ou la composition chimique et microbienne du biofilm. Le frottement peut être calculée à partir de la force qu'il est nécessaire d'appliquer pour imposer une vitesse de rotation donnée au cylindre interne. Ce réacteur permet de suivre indirectement et en continu l'accumulation du biofilm.

- Un *réacteur tubulaire* (fig. §1.10) permet de calculer le frottement à partir du débit et de la chute de pression dans une section test tubulaire. Une autre section du réacteur permet de suivre le transfert de chaleur en fonction du développement du biofilm. Le prélèvement de sections de tube permet de suivre périodiquement l'épaisseur, la masse, la composition chimique du biofilm... Une section transparente du tube permet l'observation visuelle ou microscopique du biofilm.

5. Mesures de transport de matière

L'étude du transport de matière dans la biomasse et à la surface de celle-ci est importante pour la compréhension et la prédiction des cinétiques de croissance du biofilm. Les facteurs hydrodynamiques influencent le voile biologique durant chaque étape de son développement.

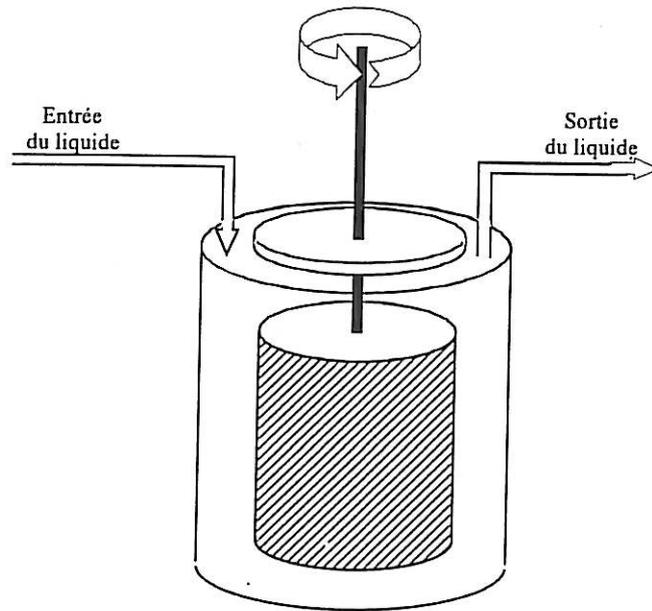


Figure §1.9 : Diagramme schématisé d'un réacteur annulaire (d'après Characklis, 1990).

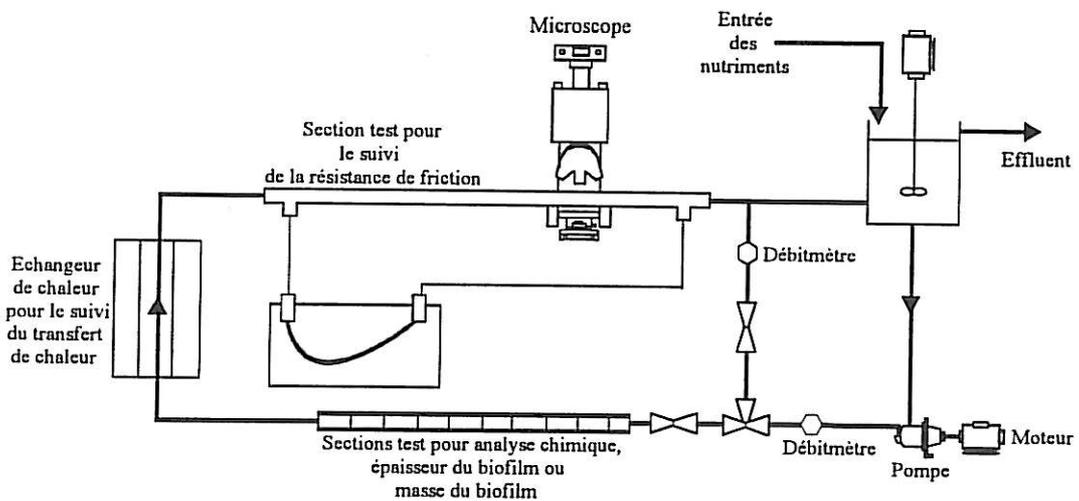


Figure §1.10 : Diagramme schématisé d'un réacteur tubulaire (d'après Characklis, 1990).

a) Mesure de vitesses

La *Résonance Magnétique Nucléaire (RMN)* est une technique directe et non destructive permettant l'étude des flux convectifs à l'extérieur et dans le biofilm.

Ainsi, la *RMN à impulsion* a été utilisée pour estimer les flux dans le voile bactérien (Lewandowski *et al.*, 1992).

L'*imagerie à RMN (IRMN)* permet l'étude de l'hydrodynamique dans et à la surface du biofilm ainsi que l'environnement chimique, la géométrie et la structure de la biomasse (Lewandowski *et al.*, 1992 et 1993 ; Costerton *et al.*, 1995). L'IRMN a la capacité de montrer les ions H⁺ mobiles. La variation de la mobilité des molécules d'eau dans le biofilm et dans la solution permet la localisation de la biomasse et la visualisation des mouvements d'eau dans celle-ci.

La *célérimétrie de particules par imagerie* est une technique non intrusive. L'utilisation simultanée d'un Microscope Optique et un Microscope Laser à Balayage Confocal (Costerton *et al.*, 1995) permet de déterminer la trajectoire et la vitesse de particules fluorescentes.

b) Mesures de profils de concentration

Les gradients de concentration d'espèces chimiques telles que l'oxygène dissous, le glucose, les sulfures, les protons... peuvent être mesurés à l'aide de *microélectrodes* dans un biofilm (Bungay *et al.*, 1969 ; Nelson *et al.*, 1986, Jørgensen *et al.*, 1986 ; Cohen *et al.*, 1986 ; Revsbech, 1989a). Lewandowski (1994) a développé un microcapteur alliant un capteur électrochimique à une fibre optique pour une mesure simultanée de la concentration de substrat chimique et de la densité optique. La variation de la densité optique permet de déterminer la position de la microsonde par rapport à la surface du film. Le développement de systèmes de détection basés sur les fibres optiques devrait permettre dans le futur l'analyse de molécules organiques dissoutes et d'abaisser les limites de détection (Revsbech, 1989b).

L'épaisseur des biofilms pouvant être relativement faible, l'espace permettant des mesures instrumentées intra-film est limité. La taille de l'électrode doit être assez petite

pour pénétrer dans la couche sans modifier sa structure physique. L'avancée des travaux pour l'étude du voile biologique par des microcapteurs dépend donc des progrès de la miniaturisation de l'instrumentation. A l'heure actuelle, la taille des microélectrodes utilisées est inférieure à 10 μm . La mesure locale de concentrations peut donner lieu à des erreurs expérimentales qui, considérant la complexité de l'équipement, peuvent être dues à différentes causes telles que les bruits électromagnétiques et la distorsion du signal. Cette mesure peut être automatisée et effectuée *in-situ*.

c) Mesures de coefficients de diffusion

La mesure des coefficients de diffusion peut aider à étudier l'efficacité des agents anti-microbiens, le transport de nutriments,... Les techniques de détermination de coefficients de diffusion peuvent demander l'inactivation de la biomasse avec des sels de métaux lourds ou par irradiation. Ces inactivations peuvent changer les caractéristiques diffusionnelles du voile bactérien.

Une approche possible est le calcul des coefficients de diffusion dans le biofilm ainsi que dans le milieu à partir des *profils de concentration* mesurés à l'aide de microélectrodes. Les procédures de calcul des paramètres cinétiques basées sur les gradients de concentration d'un substrat requièrent le plus souvent une solution stagnante (Lewandowski *et al.*, 1991).

Les mesures de diffusion peuvent être obtenues par l'utilisation de *biomasse filtrée* sur une membrane (Matson et Characklis, 1976).

L'utilisation du *Microscope Laser à Balayage Confocal* permet de déterminer les coefficients de diffusion de molécules fluorescentes (Lawrence *et al.*, 1994). Pour cela, le biofilm est imbibé d'une solution contenant une espèce chimique fluorescente. Le principe de cette technique est basé sur une forte photoexcitation d'un point précis de la biomasse pendant une très courte période. Cette excitation provoque l'extinction de la fluorescence. L'observation du retour de la fluorescence, correspondant à la diffusion des fluorophores, permet d'atteindre les coefficients de diffusion des molécules-traceurs. Cette technique permet d'étudier un ensemble de molécules fluorescentes de différents poids moléculaires et, ainsi, de décrire la structure du biofilm.

III. PROPRIETES PHYSICO-CHIMIQUES DU BIOFILM

A. Structure du biofilm

1. *Distribution spatiale*

Le volume d'un biofilm est occupé par une matrice de polymères associée à des espaces remplis de liquide (80 à 95%) et par des cellules bactériennes (5 à 20%). Les cellules sont réparties de façon aléatoire dans la matrice et concentrées dans la partie supérieure du biofilm (Lawrence, 1991 ; Caldwell *et al.*, 1992a ; Zhang et Bishop, 1994a). Elles tendent à former des microcolonies. La matrice polymérique occupe l'espace séparant les agrégats de cellules appelés souvent "clusters" (Caldwell *et al.*, 1992b ; De Beer *et al.*, 1994). La distribution spatiale des composants d'un film bactérien dépend des paramètres hydrodynamiques.

Dans le cas des matrices les moins denses, différentes méthodes telles que le Microscope Laser à Balayage Confocal et IR-TF ont mis en évidence des "canaux d'eau", des cavités et des pores dans la matrice de biopolymères (Jass *et al.*, 1991 ; Dudman, 1977 ; Lawrence *et al.*, 1994). L'importance volumétrique de ces canaux est difficile à déterminer avec précision. Cependant, ils sont plus ou moins réguliers suivant les espèces bactériennes présentes et le régime hydrodynamique. La RMN a permis l'étude de l'hydrodynamique au niveau des "canaux" et de montrer que les flux ne sont pas nuls au niveau de la surface du biofilm par rapport à la solution, ni dans les "canaux d'eau" présents dans la matrice (Lewandowski *et al.*, 1992 et 1993). Les microcolonies bactériennes se situent le plus souvent au niveau des "canaux" où l'apport nutritif est facilité.

L'utilisation de nouvelles techniques d'observation telles que le MLBC a permis de modifier la conception de la structure du biofilm au début des années 90. Auparavant, la biomasse était décrite comme une distribution homogène de cellules dans une matrice d'exopolymère uniforme (Wanner et Gujer, 1986). Par la suite, le modèle proposé a été basé sur une structure hétérogène (De Beer *et al.*, 1994 ; Lawrence *et al.*, 1994).

La structure du biofilm est actuellement décrite comme tortueuse, fortement hydratée, poreuse, stratifiée, contenant de nombreux canaux et avec des distributions aléatoires de cellules et d'agrégats (fig. §1.11) (Costerton *et al.*, 1995).

2. *Épaisseur*

L'épaisseur d'un biofilm peut varier de façon importante suivant les conditions environnementales. Ainsi, l'épaisseur d'un biofilm pourra aller de quelques micromètres à plusieurs centimètres suivant les conditions hydrodynamiques du milieu, la composition et la texture du support, la diversité des espèces bactériennes,... (Characklis, 1980 ; Characklis, 1990).

3. *Densité et porosité*

La *densité* d'un biofilm varie suivant différents facteurs :

- Épaisseur : augmentation de la densité avec l'épaisseur (Rittmann et McCarty, 1981 ; Williamson et McCarty, 1976)
- Profondeur : densité plus importante dans les parties les plus profondes (Christensen et Characklis, 1990 ; Zhang et Bishop, 1994b)
- Structure : corrélation entre une faible densité du biofilm et une structure filamenteuse (Picologlou *et al.*, 1980 ; Trulear et Characklis, 1982 ; McCoy et Costerton, 1982)
- Age : augmentation de la densité en fonction du temps due à une accumulation des EPS (Hoehn et Ray, 1973 ; Trulear, 1983 ; Nivens *et al.*, 1991).
- Réponse à l'agressivité du milieu : forces de cisaillement ou concentration limitée en substrat (Characklis, 1980).
- Milieu : augmentation de la densité dans un milieu où la turbidité est importante.

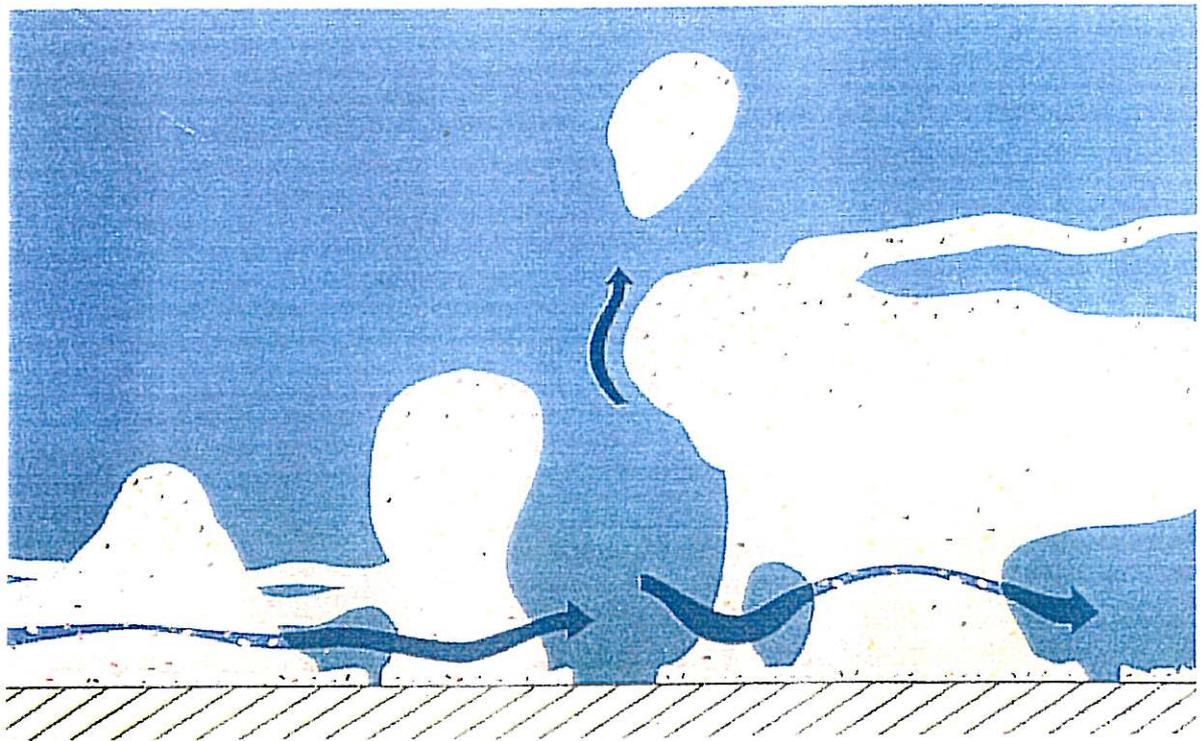


Figure §1.11 : Structure du biofilm décrite comme tortueuse, fortement hydratée, poreuse, stratifiée et contenant de nombreux canaux (Costerton, 1995).

La *porosité* d'un biofilm a été définie par Wanner (1989) comme la proportion du film occupé par de l'eau, eau des cellules excepté. Comme la densité, la porosité varie en fonction de la profondeur dans le voile biologique passant de 84-93% dans les couches supérieures à 58-67% dans les couches inférieures (Zhang et Bishop, 1994a).

La biomasse est décrite comme un milieu poreux contenant des porosités différentes. La diffusion à travers les "clusters" peut être associée à une faible porosité dite primaire et le transport à travers les canaux ou interstices avec une forte porosité dite secondaire (De Beer *et al.*, 1994).

4. Rhéologie

La présence de groupements chargés dans un polymère bactérien influence de façon importante ses propriétés physiques (stabilité, viscosité) et fournit des sites d'échange ionique (Geesey, 1982). La nature et la concentration des ions présents en solution influencent les propriétés du polymère. La formation de certains gels de biopolymères se fait par l'intermédiaire d'ions (ex : Ca^{2+} , Mg^{2+}) qui servent de ponts entre différentes chaînes de polymères par l'intermédiaire de forces électrostatiques (Smidsrød, 1974). Ces gels de polymères possèdent des propriétés viscoélastiques. La nature viscoélastique du biofilm a été démontrée par des mesures réalisées *in-situ* à l'aide d'un viscosimètre de Weissenburg. L'augmentation des frottements confirme cette propriété (Characklis, 1980 ; Christensen et Characklis, 1990).

B. Composition chimique du biofilm

La composition chimique organique est fortement conditionnée par les sources d'énergie et de carbone assimilables par le métabolisme des microorganismes.

La composition chimique inorganique varie suivant la composition du support et de la phase aqueuse. De nombreuses particules organiques et inorganiques sont emprisonnées dans la matrice polymérique (ex : substances humiques, débris, silice, produits de corrosion...).

La plupart des polymères extracellulaires sont composés de polysaccharides et/ou de protéines (Fletcher, 1980 ; Sutherland, 1984; Costerton *et al.*, 1987; Christensen et Characklis, 1990). Les polysaccharides sont constitués principalement de sucres courants : glucose, galactose, mannose, fructose, N-acétylglucosamine, acide glucuronique... Les polymères extracellulaires confèrent au biofilm un caractère extrêmement hydrophile et la biomasse est fortement hydratée (Characklis *et al.*, 1981 ; Lawrence, 1991).

Des gradients de concentration d'espèces chimiques telles que l'oxygène, les oxydes nitreux, les ions hydrogène,... ont été mis en évidence par l'utilisation de microcapteurs dans le biofilm (Revsbech, 1989).

L'activité métabolique des microorganismes altère la composition du milieu. Les molécules et ions produits par les cellules diffusent à partir des cellules. Certains ions et molécules sont retenus et forment un "halo" autour de la cellule en fonction de leur taille et de leur densité de charge. Durant les processus métaboliques, le pH est modifié. Les ions H⁺ produits par les microorganismes sont retenus autour des bactéries et provoquent une diminution du pH autour des cellules (Caldwell *et al.*, 1992a et b).

L'hétérogénéité chimique du biofilm donne lieu à des disparités électrochimiques. Lewandowski a cartographié les zones anodiques et cathodiques sur des surfaces métalliques recouvertes de biomasse (Costerton *et al.*, 1995). Les études initiales ont indiqué que les parties recouvertes par le voile biologique sont généralement anodiques alors que les parties dépourvues de biofilm sont cathodiques.

Les concentrations en oxygène dissous sont extrêmement variables suivant la situation géographique de la mesure. Ainsi les valeurs relevées au centre des microcolonies bactériennes montrent que celles-ci peuvent être totalement anoxique alors que les valeurs relevées au niveau des canaux s'étendent sur toute une gamme de concentration.

C. Propriétés de transport et interfaciales

1. Transport de matière

Le transport de matière est extrêmement important car il apporte nutriments, cellules et autres matériels dans le biofilm. La matrice d'exopolymères peut jouer à différents

degrés un rôle de barrière de diffusion. Cette propriété est souvent invoquée pour expliquer la résistance aux agents anti-microbiens, le développement de microzones anaérobies, l'hétérogénéité de la structure du biofilm... De plus, la mesure de la mobilité de différentes espèces chimiques est importante pour la compréhension de phénomènes dynamiques dans les biomasses.

La mécanique des fluides décrit traditionnellement les conditions près de surfaces rigides. Un biofilm est constitué de biopolymères viscoélastiques et sa surface n'est pas rigide et est quelquefois filamenteuse. Il n'y a pas de modèle mathématique pouvant être directement appliqué à la description des flux près de telles surfaces.

Différents auteurs (Harremöes, 1978 ; Williamson et McCarty, 1976 ; Revsbech, 1989b) ont élaborés des modèles décrivant le transport de matière au niveau d'une biomasse et de son interface tout en tenant compte de l'utilisation des nutriments par les organismes vivants (fig. §1.12).

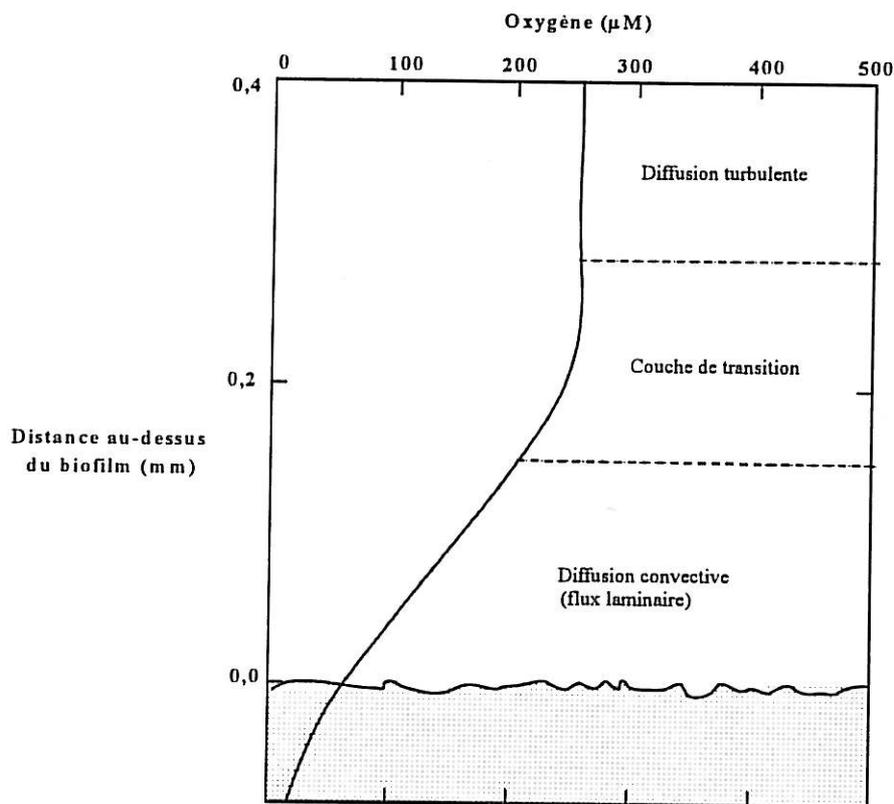


Figure §1.12 : Profil de concentration de l'oxygène à travers un biofilm (Redessiné à partir de Revsbech, 1989b).

La forme des profils de concentration d'une espèce chimique dans le biofilm peut être attribuée à :

- Vitesse de consommation de cette espèce dépendant de la quantité de microorganismes présents et de leur affinité pour cette substance.
- Vitesse de transport de cette espèce dans le film dépendant de la diffusion moléculaire
- Vitesse de transport de cette espèce vers le biofilm dépendant de la vitesse de consommation de l'espèce et de la diffusion convective.

Pour simplifier les modèles, il est possible d'inactiver la biomasse avec des sels de métaux lourds ou par irradiation. Ces inactivations peuvent changer les caractéristiques diffusionnelles du voile bactérien.

Les coefficients de diffusion obtenus pour différentes espèces chimiques à travers un biofilm varient énormément d'un auteur à l'autre (tableau §1.3). Cependant, le plus souvent, les valeurs des coefficients de diffusion ne sont pas corrélées avec l'âge ou la densité du biofilm étudié et sont mesurées par des méthodes expérimentales différentes.

Siegrist et Gujer (1985) indiquent que les coefficients de diffusion décroissent avec l'augmentation de l'épaisseur du biofilm et de sa densité. Les coefficients de diffusion varient suivant les régions de la biomasse. Les valeurs déterminées dans les régions les moins denses telles que la partie supérieure du biofilm ou dans les volumes adjacents aux canaux sont plus importantes que les valeurs déterminées dans les parties les plus denses.

Récemment, De Beer *et al.* (1994) ont montré que les coefficients de diffusion dans un biofilm ne diffèrent pas considérablement de ceux mesurés dans l'eau (tableau §1.4). Seules les macromolécules diffusent significativement plus lentement dans le biofilm (Lawrence *et al.*, 1994).

Espèce diffusante	Coefficient de diffusion D_f ($10^{-6} \text{ cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$)	$\frac{D_f}{D_{\text{H}_2\text{O}}}$	Références
Oxygène	15	0,70	Tomlinson et Snaddon, 1966.
Oxygène		0,95	Bungay <i>et al.</i> , 1969.
Oxygène	22	0,9	Williamson et McCarty, 1976.
Ammoniaque	13	0,8	
Nitrate	14	0,9	
Glucose		$\approx 0,5$	Siegrist et Gujer, 1985.
Sodium (Na^+)		$\approx 0,6$	
Bromure (Br^-)		$\approx 0,6$	
Lactose		0,66	Yu et Pinder, 1993.
Oxygène	17,6	0,88	Lewandowski <i>et al.</i> , 1991
Oxygène	13	0,75	Lewandowski, 1994.

Tableau §1.3 : Coefficients de diffusion de différentes espèces dans des biofilms.

Molécule	Masse moléculaire	Coefficient de diffusion $D_{\text{H}_2\text{O}}$ ($10^{-6} \text{ cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$)	Coefficient de diffusion D_f ($10^{-6} \text{ cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$)	$\frac{D_f}{D_{\text{H}_2\text{O}}}$
Fluorescéine	332	5,55	5,40	0,91
Dextrane	10 000	0,22	0,196	0,89
Dextrane	70 000	0,17	0,144	0,85
SAB	68 000	0,69	0,59	0,86
IgG	146 000	0,38	/	/
Hexokinase	102 000	0,59	0,41	0,69
Catalase	225 000	0,41	0,278	0,67
ADN	$3,2 \cdot 10^6$	0,0008	0,0005	0,63

Tableau §1.4 : Coefficients de diffusion dans des biofilms de différentes espèces (SAB = Sérum Albumine Bovin, IgG = Immunoglobulines humaines de classe G, ADN = Acide DésoxyriboNucléique) (De Beer *et al.*, 1994).

Une couche modèle de gel de polyacrylamide a montré un comportement identique à celui du biofilm (White et Dorion, 1961). L'expression suivante met en relation la diffusion à travers des gels (agar) par rapport à la diffusion dans la solution (Dudman, 1977) :

$$D_{\text{gel}} = \frac{D_{\text{sol}}}{1 + (a_D - 1)\phi_D} \quad (\S 1.1)$$

où D_{gel} et D_{sol} sont respectivement les coefficients de diffusion dans le gel et dans la solution, ϕ_D un coefficient correspondant à la fraction de volume occupé par le gel (Lauffer, 1961) et a_D un coefficient (5/3 pour une orientation aléatoire des pores). D'après cette relation, un gel d'agar 1,5% ($\phi_D \approx 0,05$; Schantz et Lauffer, 1962) modifie peu la vitesse de diffusion d'une espèce donnée ($D_{\text{gel}} \approx 97\% D_{\text{sol}}$). De plus, la taille des pores du gel impose une limite de la dimension des molécules diffusant à travers ce gel. Les facteurs influençant la diffusion à travers les gels (et probablement les biofilms) sont les forces électrostatiques, le pH, la composition et la force ionique.

D'autres hypothèses sur la structure des biomasses proposent la possibilité de mouvements d'eau dans le biofilm infirmant ainsi la supposition présentant le transport de matière dans le biofilm comme gouverné totalement par la diffusion moléculaire. Des mesures en IRMN et en célérimétrie de particules par imagerie ont corroboré ces suppositions en montrant des flux convectifs au niveau des pores et canaux dans la biomasse (Costerton *et al.*, 1995).

De Beer *et al.* (1994) ont décrit le biofilm comme un milieu poreux contenant des pores primaires associés à la diffusion à travers les agrégats cellulaires et des pores secondaires associés au transport à travers les interstices. L'utilisation d'un paramètre de transport tel que le coefficient de diffusion est alors insuffisant. Par exemple, dans le cas des biocides, la présence de biocide à la base d'un biofilm ne signifie pas obligatoirement que le produit a pénétré entièrement dans les "clusters" composés de cellules bactériennes. L'expérience montre qu'il y a un retour de l'activité et de la croissance microbienne à partir des cellules des "clusters".

2. Conductivité thermique et coefficient de friction

Un biofilm recouvrant les parois d'un conduit réduit considérablement le *transfert de chaleur* (fig. §1.13). Ce phénomène est notamment rencontré dans les échangeurs de chaleur (Characklis *et al.*, 1981 ; Zilver *et al.*, 1982). La conductivité thermique d'un biofilm est significativement moindre par rapport à celle d'une surface métallique. Par contre, la conductivité thermique de la biomasse est assez proche de celle de l'eau ce qui n'est pas une surprise puisque le biofilm contient 73 à 99% d'eau (Tableau §1.5).

De plus, l'accumulation d'un voile biologique provoque une perte d'énergie cinétique par augmentation du *frottement* (fig. §1.13) (Picologlou *et al.*, 1980 ; Trulear et Characklis, 1982). Cette perte d'énergie peut être due à la modification de la rugosité de la surface recouverte par le biofilm, à la nature viscoélastique et à la nature filamenteuse des organismes composant le biofilm (McCoy et Costerson, 1982)... Le frottement dépend de l'épaisseur du biofilm au-delà d'une épaisseur critique approximativement égale à celle de la couche hydrodynamique.

Matériaux	Conductivité thermique (W/mK)	Température (°C)
Biofilm	0,68 ± 0,27	8,3 ± 0,3
	0,71 ± 0,39	26,7 ± 0,3
	0,57 ± 0,10	28,3 ± 0,3
Eau	0,61	26,7
	0,62	28,3
Acier au carbone	51,92	0 - 100
Acier inoxydable	16,30	0 - 100
Titane	16,44	0 - 100

Tableau §1.5 : Conductivité thermique du biofilm et d'autres matériaux impliqués dans les échangeurs de chaleurs (d'après Characklis, 1981).

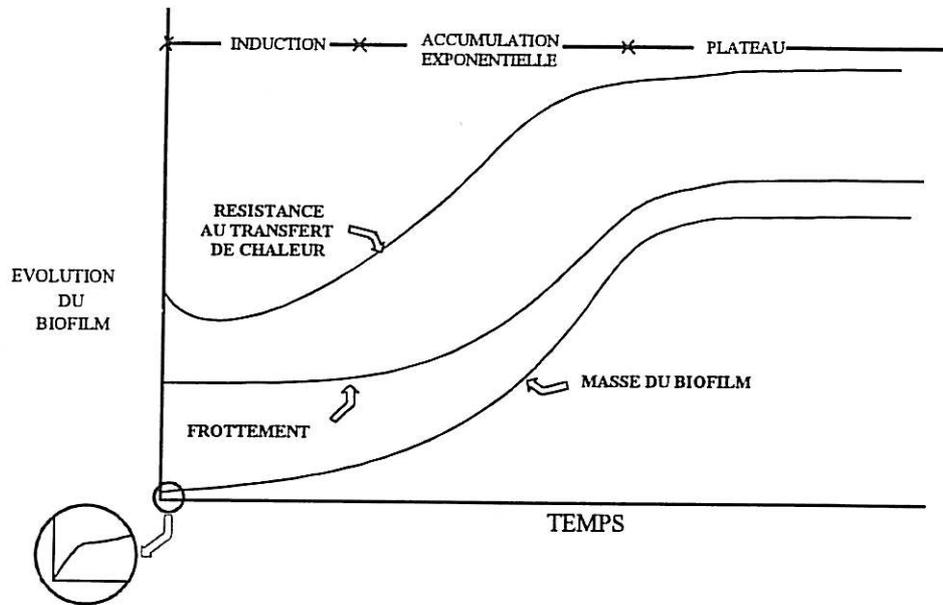


Figure §1.13 : Cinétique de croissance du biofilm décrite en terme d'accumulation du dépôt, de frottement hydrodynamique et de résistance de transfert de chaleur (Characklis, 1990)

IV. CONCLUSION

La structure du biofilm est décrite suivant les auteurs en utilisant différentes caractéristiques :

- Porosité (Wanner, 1989; Characklis *et al.*, 1981 et Characklis, 1990 ; Costerton, 1994)
- Hydratation (Characklis *et al.*, 1981 ; Lawrence, 1991)
- Viscoélasticité (Characklis, 1980 ; Christensen et Characklis, 1990).
- Tortuosité
- Stratification

Ce film poreux est une barrière de diffusion et modifie donc le transport de matière. Le rôle du transport de matière dans un biofilm est extrêmement important : apport de nutriments, de cellules bactériennes et d'autres matériels, résistance aux agents antimicrobiens... Mais, dans le cadre de ce travail, l'intérêt d'étudier le transport de matière dans un biofilm sera de permettre sa caractérisation physique en terme de porosité ϵ et d'épaisseur δ_f .

Chapitre 2

Modèle physique, Techniques d'étude et expérimentales

- I. Modèle physique : Analyse du transport de matière**
- II. Techniques d'étude**
- III. Techniques expérimentales**

Dans cette étude, le biofilm sera considéré à l'échelle macroscopique comme une couche poreuse homogène.

La caractérisation de la porosité d'une couche fine recouvrant un support solide n'est pas aisée par les techniques conventionnelles. Ainsi, la technique BET qui est utilisée dans le cas d'un milieu poreux (généralement une poudre) en contact avec un gaz est peu sensible ; l'aire spécifique n'étant pas assez importante.

Les techniques électrochimiques basées sur le contrôle du transport de matière permettent de caractériser la porosité.

L'électrode à Disque Tournant (EDT) est un outil dont l'hydrodynamique est parfaitement connue aussi bien en régime stationnaire (Levich, 1962) qu'en régime transitoire (Tribollet et Newman, 1983 ; Deslouis et Tribollet, 1991). Son emploi est particulièrement bien adapté aux études mettant en jeu un courant limite de diffusion. Ce travail s'appuiera plus particulièrement sur l'étude d'une EDT recouverte d'une couche poreuse (Deslouis *et al.*, 1987).

L'étude du transport de matière au voisinage d'une électrode recouverte par une couche poreuse non réactive d'épaisseur δ_f à travers laquelle les espèces sont transportées par diffusion moléculaire repose sur l'analyse du courant limite de réduction ou d'oxydation d'un traceur électrochimique.

Différentes techniques électrochimiques peuvent être utilisées :

- Régime stationnaire : mesure du courant limite en fonction de la vitesse de rotation
- Régime transitoire : impédance électrochimique
impédance électrohydrodynamique

I. MODELE PHYSIQUE : ANALYSE DU TRANSPORT DE MATIERE

L'équation de Nernst-Planck pour le flux J d'une espèce chargée est de la forme :

$$J = -D\nabla c - \frac{zF}{RT} D c \nabla \phi + c v \quad (\S 2.1)$$

où les différents termes représentent respectivement :

- Diffusion ($-D\nabla c$) : flux d'espèces, chargées ou non, créé par un gradient de potentiel chimique. Le milieu tend à retrouver son homogénéité lors de l'apport ou de la consommation d'une espèce chimique.
- Migration ($-\frac{zF}{RT} D c \nabla \phi$) : flux de particules chargées créé par un gradient de potentiel électrique. Lorsque le milieu contient un excès d'électrolyte support, ce terme peut être négligé.
- Convection ($c v$) : flux d'espèces créé par le mouvement du milieu dû à l'agitation mécanique et/ou thermique.

A. Analyse du transport de matière au voisinage d'une électrode à disque tournant

Le transport de matière au voisinage d'une électrode en mouvement dans un fluide immobile est décrit par le modèle de diffusion convective. Ce modèle suppose l'existence, au contact de l'électrode, d'une couche d'électrolyte d'épaisseur δ_n appelée couche de diffusion dans laquelle est localisée la variation de concentration. Au voisinage immédiat de l'interface, les concentrations des espèces électroactives varient linéairement en fonction de la distance à l'électrode (fig. §2.1).

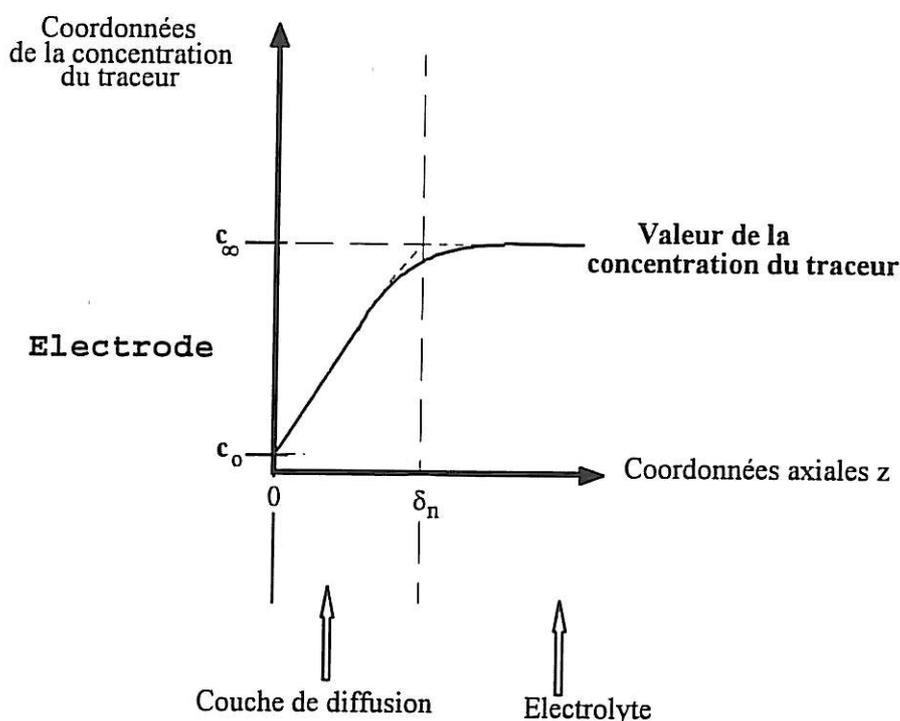


Figure §2.1 : Profil de concentration d'espèces électroactives consommées à l'électrode nue en fonction de la coordonnée axiale z de l'électrode à disque tournant.

Dans le cas d'une électrode à disque tournant, les profils de vitesse et les lignes de courant peuvent être obtenus à partir de la résolution de l'équation de Navier-Stokes et de l'équation de continuité. La rotation du disque entraîne dans son mouvement le fluide qui est rejeté vers l'extérieur selon des directions radiales. Le renouvellement de la solution au voisinage du disque s'effectue grâce un mouvement le long de la direction normale à sa surface (fig. §2.2). La résolution stationnaire de ces équations montre que la composante normale de la vitesse v_z est indépendante des coordonnées radiale et tangentielle et ne fait intervenir que les coordonnées normales. L'origine de l'axe z est prise à l'interface métal/solution.

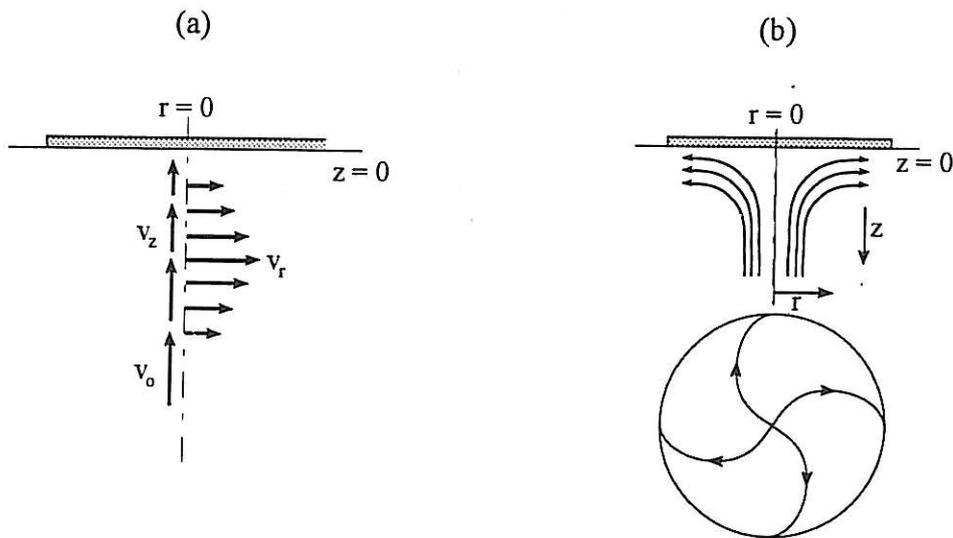


Figure §2.2 : (a) Représentation vectorielle des vitesses près du disque et (b) lignes de courant résultantes d'une EDT en rotation uniforme autour de son axe.

La distribution de concentration dans la solution est gouvernée par la diffusion convective. En supposant une concentration uniforme en tout point de l'électrode (réactivité uniforme) et compte tenu des propriétés hydrodynamiques de la EDT, l'équation du transport de matière se réduit à une équation monodimensionnelle :

$$\frac{\partial c}{\partial t} + v_z \frac{\partial c}{\partial z} = D \frac{\partial^2 c}{\partial z^2} \quad (§2.2)$$

Cette équation peut être décomposée en deux équations stationnaire et non-stationnaire.

Le champ de concentration stationnaire est obtenu par l'intégration de l'équation précédente avec :

$$\frac{\partial c}{\partial t} = 0 \quad (§2.3)$$

L'expression du gradient de concentration à l'interface conduit à celle du courant sachant que :

$$i_L = n F D S \left. \frac{\partial c}{\partial z} \right|_0 \quad (\S 2.4)$$

Levich (1962) a ainsi obtenu l'équation §2.5 reliant le courant limité par le transport de matière à la vitesse angulaire du disque.

$$i_L = 0,62 n F S \sqrt{\frac{2\pi}{60}} D^{2/3} \nu^{-1/6} c_\infty \Omega^{1/2} \quad (\S 2.5)$$

avec n nombre d'électrons mis en jeu

F constante de Faraday (96500 C)

S surface de l'électrode (en cm^2)

D coefficient de diffusion du traceur dans la solution électrolytique ($\text{cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$)

ν viscosité cinématique ($\text{cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$)

c_∞ concentration du traceur ($\text{mol} \cdot \text{cm}^{-3}$)

Ω vitesse de rotation ($\text{tr} \cdot \text{min}^{-1}$)

Lorsque la réaction électrochimique n'est pas infiniment rapide, un terme cinétique i_K doit être pris en compte dans l'expression du courant total.

$$i^{-1} = i_L^{-1} + i_K^{-1} \quad (\S 2.6)$$

B. Analyse du transport de matière au voisinage une électrode à disque tournant recouverte d'une couche poreuse

Une couche poreuse d'épaisseur δ_f recouvrant l'interface métallique d'une EDT agit comme une barrière de diffusion. La variation de concentration d'une espèce électroactive (Deslouis *et al.*, 1987), impliquée dans une réaction Rédox rapide, est distribué entre (fig. §2.2) :

- la *couche poreuse* où le transport de matière est contrôlé par un processus de diffusion moléculaire
- la *solution électrolytique* où le transport de matière est contrôlé par la diffusion convective

L'interface métal/couche est supposée uniformément réactive. Le problème reste monodimensionnel (le long de l'axe z de l'EDT).

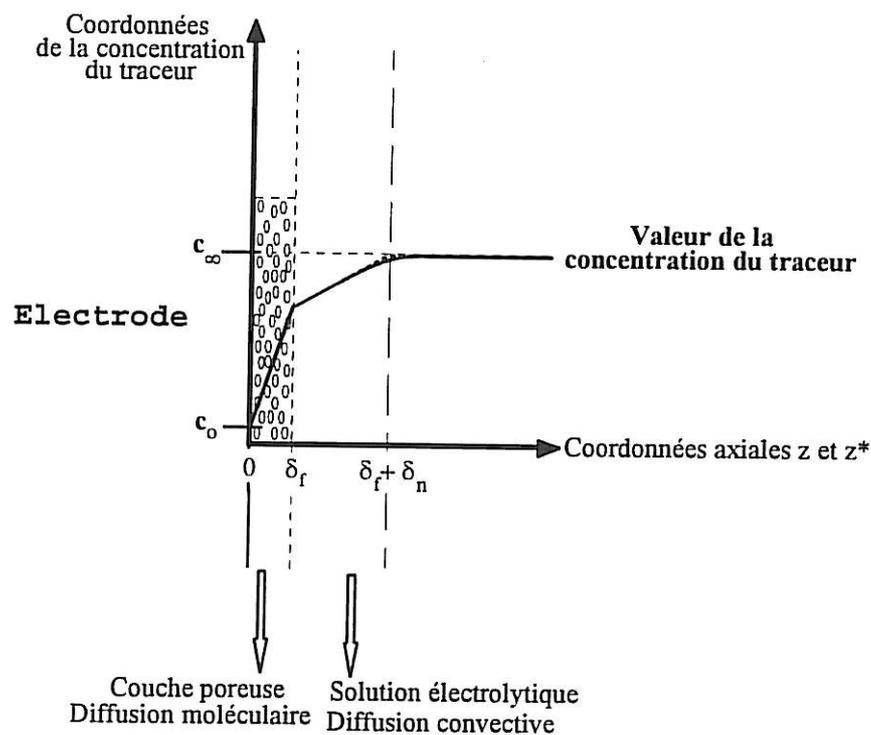


Figure 2.3 : Profil de concentration d'espèces électroactives consommées à l'électrode recouverte d'une couche poreuse en fonction de la coordonnée axiale z de l'électrode à disque tournant.

Dans une couche poreuse, la distribution de concentration c_1 est seulement déterminée par la diffusion moléculaire :

$$\frac{\partial c_1}{\partial t} = D_f \frac{\partial^2 c_1}{\partial z^2} \quad (\S 2.7)$$

Dans la solution électrolytique, la distribution de concentration c_2 est gouvernée par la diffusion convective :

$$\frac{\partial c_2}{\partial t} + v_z \frac{\partial c_2}{\partial z^*} = D \frac{\partial^2 c_2}{\partial z^{*2}} \quad (\S 2.8)$$

Pour plus de facilité, deux coordonnées z et z^* ont été définies. L'origine de l'axe z est prise à l'interface métal/couche et celle de l'axe z^* à l'interface couche/solution ($z^* = z - \delta_f$). Les conditions de continuité des concentrations et des flux à l'interface solution/couche constituent les conditions limites des équations différentielles précédentes.

$$\Rightarrow \text{Pour } z = \delta_f \quad \text{soit } z^* = 0 \quad c_1(\delta_f) = c_2(0)$$

$$D_f \frac{\partial c_1}{\partial z} = D \frac{\partial c_2}{\partial z} \quad (\S 2.9)$$

En régime stationnaire, ce système d'équations a été résolu par Deslouis *et al.* (1987). Le courant total s'écrit sous la forme :

$$i = \frac{1}{i_\infty^{-1} + i_K^{-1} + i_L^{-1}} \quad (\S 2.10)$$

{	où	$i_\infty^{-1} = \frac{\delta_f}{n F S D_f c_\infty} \quad (\S 2.11)$	Inverse du courant fonction de la diffusion moléculaire dans la couche poreuse
		$i_K^{-1} = \frac{1}{n F S c_\infty k \exp(b\eta)}$	Inverse du courant d'origine cinétique avec b coefficient de Tafel et η surtension.
		$i_L^{-1} = \left(0,62 n F S \sqrt{\frac{2\pi}{60}} D^{2/3} \nu^{-1/6} c_\infty \Omega^{1/2} \right)^{-1} \quad (\S 2.13)$	Inverse du courant de Levich

II. TECHNIQUES D'ETUDE

Différentes techniques électrochimiques ont été utilisées conjointement ou séparément :

- technique stationnaire : mesure du courant limite en fonction de la vitesse de rotation
- techniques transitoires : impédances électrohydrodynamique (EHD) et électrochimique (AC)

A. Régime stationnaire

Dans le cas d'une *EDT nue*, l'équation §2.5 décrite par Levich peut aussi être exprimée sous la forme :

$$i_L = K \Omega^{1/2} \quad (\S 2.14)$$

avec K coefficient de Levich.

L'équation reliant le courant i à Ω est une droite dans les coordonnées $(\sqrt{\Omega}, i)$. Cette droite passe par l'origine et sa pente correspond au coefficient de Levich K. Cette technique permet de mesurer K et ainsi d'atteindre le coefficient de diffusion D du traceur utilisé dans la solution électrolytique (éq. §2.5). L'équation précédente peut être représentée sous la forme $i_L^{-1} = f(\Omega^{-1/2})$ dite de Koutechy-Levich. La droite ainsi définie a pour pente l'inverse du coefficient de Levich.

Dans les cas pratiques, au courant limite de diffusion s'ajoute un courant non diffusionnel i_0 correspondant à une réaction électrochimique parallèle. En considérant la réaction Rédox du traceur infiniment rapide, l'expression du courant devient alors :

$$i = i_0 + i_L \quad (\S 2.15)$$

Dans le cas d'une *EDT recouverte d'une couche poreuse*, le courant est de la forme :

$$i = i_0 + \frac{1}{i_{\infty}^{-1} + K^{-1}\Omega^{-0,5}} \quad (\S 2.16)$$

A partir de l'étude du courant en fonction de la vitesse de rotation de l'électrode, trois paramètres interviennent :

$$\text{où } i_0 \quad (\S 2.17)$$

$$i_{\infty}^{-1} = \frac{\delta_f}{nFD_f c_{\infty} S} \quad (\S 2.18)$$

$$K^{-1} = \left(0,62nFS \sqrt{\frac{2\pi}{60}} D^{2/3} \nu^{-1/6} c_{\infty} \right)^{-1} \quad (\S 2.19)$$

Par l'ajustement de l'équation §2.16 aux données expérimentales, les trois paramètres i_0 , i_{∞}^{-1} et K^{-1} peuvent être déterminés. Le paramètre i_{∞}^{-1} permet alors d'atteindre la vitesse de diffusion $\frac{D_f}{\delta_f}$ à travers la couche.

B. Techniques transitoires

Parmi les méthodes en régime transitoire se trouvent l'impédance électrochimique (AC) et l'impédance électrohydrodynamique (EHD). Le principe de base de ces techniques repose pour l'utilisation de perturbations de faible amplitude du potentiel, du courant ou de la vitesse de rotation de l'électrode sur un système à l'état stationnaire. L'amplitude du signal de perturbation doit être suffisamment faible pour que la réponse demeure dans le domaine de linéarité. L'analyse en fréquence de grandeurs observables telles que le

potentiel ou le courant permet de caractériser le système : coefficients de diffusion, constantes de vitesse de réaction....

Dans le cas d'une *électrode à disque tournant*, le régime hydrodynamique est contrôlé. Si le système électrochimique étudié est au moins partiellement sous contrôle diffusif, il peut être décrit par une relation de la forme :

$$F(i, E, \Omega) = 0 \quad (\S 2.20)$$

où i est le courant total traversant la cellule d'électrolyse

E est le potentiel de l'électrode de travail par rapport à l'électrode de référence

Ω est la vitesse de rotation de l'EDT

Les dérivées partielles de ces trois grandeurs sont liées entre elles par la relation :

$$\left(\frac{\partial i}{\partial \Omega} \right)_E = - \left(\frac{\partial i}{\partial E} \right)_\Omega \left(\frac{\partial E}{\partial \Omega} \right)_i \quad (\S 2.21)$$

avec $\left(\frac{\partial i}{\partial \Omega} \right)_E$ impédance électrohydrodynamique $Z_{EHD, E}$ sous contrôle potentiostatique

$\left(\frac{\partial E}{\partial \Omega} \right)_i$ impédance électrohydrodynamique $Z_{EHD, i}$ sous contrôle galvanostatique

$\left(\frac{\partial E}{\partial i} \right)_\Omega$ impédance électrochimique Z sous contrôle diffusif

L'expression §2.21 s'écrit alors :

$$Z_{EHD, E} = - \frac{1}{Z} Z_{EHD, i} \quad (\S 2.22)$$

A partir de la relation §2.20, l'équation suivante peut être exprimée :

$$\Delta i = \frac{1}{Z} \Delta E + Z_{EHD, E} \Delta \Omega \quad (\S 2.23)$$

Les deux équations §2.22 et §2.23 montrent l'interdépendance entre les impédances EHD et l'impédance électrochimique.

1. Impédance électrohydrodynamique (EHD)

L'impédance électrohydrodynamique repose sur l'analyse de la réponse en fréquence d'un système électrochimique à la modulation sinusoïdale de la vitesse de rotation (fig. §2.4) d'une électrode à disque tournante (Tribollet et Newman, 1983 ; Deslouis et Tribollet, 1991). La description suivante portera sur l'impédance EHD sous contrôle potentiostatique c'est-à-dire avec une concentration constante à l'interface.

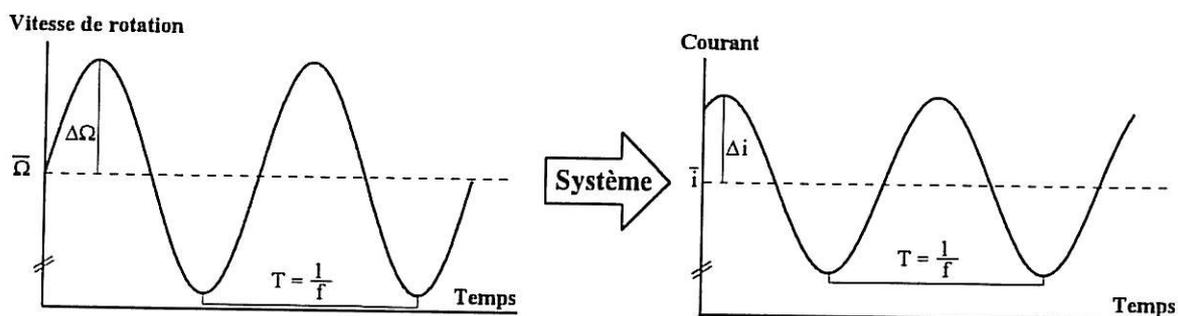


Figure §2.4 : Principe de l'impédance EHD sous contrôle potentiostatique.

Le potentiel d'électrode est maintenu constant et le courant électrique est limité par le transport de matière. Une petite perturbation sinusoïdale est imposée à la vitesse de rotation de l'électrode tournante et le courant électrochimique sinusoïdal résultant est mesuré. La vitesse de rotation peut être exprimée mathématiquement en fonction du temps :

$$\Omega(t) = \bar{\Omega} + \text{Re}\{\Delta\Omega \exp(j\omega t)\} \quad (\S 2.24)$$

où ω la pulsation est liée à la fréquence de modulation f par $\omega = 2\pi f$, $\Delta\Omega$ et $\bar{\Omega}$ sont respectivement l'amplitude de modulation et la valeur moyenne de la vitesse de rotation et $\text{Re}\{x\}$ est la partie réelle de x .

La perturbation de la vitesse de rotation induit une modulation sinusoïdale de l'épaisseur de la couche de diffusion. Cette méthode est donc particulièrement bien adaptée dans l'étude du transport de matière. L'amplitude de la modulation $\Delta\Omega$ doit être suffisamment petite ($\Delta\Omega \ll \bar{\Omega}$) pour que la réponse en courant soit linéaire :

$$i(t) = \bar{i} + \text{Re}\{\Delta i \exp(j\omega t)\} \quad (\S 2.25)$$

où Δi est une fonction complexe et \bar{i} est le courant moyen.

L'impédance EHD est définie comme :

$$Z_{\text{EHD}}(\omega) = \frac{\Delta i}{\Delta\Omega} = A(\omega) \exp[j\varphi(\omega)] \quad (\S 2.26)$$

où $A(\omega)$ et $\varphi(\omega)$ sont respectivement le rapport des amplitudes et le déphasage entre les deux signaux.

Tribollet et Newman (1983) ont développé l'analyse de l'équation de diffusion convective transitoire nécessaire à l'interprétation rigoureuse de Z_{EHD} . Dans une première partie, la résolution numérique de l'équation de Navier - Stokes a permis de déterminer le flux résultant de la modulation de la vitesse de rotation. Ces profils de vitesse sont alors utilisés dans l'équation de diffusion convective pour obtenir le profil de concentration modulé des espèces électroactives.

A l'interface, la conservation du flux est :

$$\frac{\Delta i_f}{nF} = D \left. \frac{\partial \Delta c}{\partial z} \right|_0 \quad (\S 2.27)$$

Une fois le profil de concentration connu, le flux transitoire linéarisé est donné par :

$$\left. \frac{\partial \Delta c}{\partial z} \right|_0 = \frac{\Delta c_0}{\delta_n} \Gamma(4/3) \theta'(0) + \frac{\Delta \Omega}{\Omega} \left. \frac{\partial c}{\partial z} \right|_0 W \quad (\S 2.28)$$

où z est la distance axiale par rapport à l'électrode et $\Gamma(4/3) = 0,89298$. L'impédance de diffusion adimensionnelle sur une électrode nue, $-1/\theta'(0)$ est fonction uniquement de $pSc^{1/3}$ ($p = \frac{\omega}{\Omega}$, $Sc = \frac{v}{D}$) pour une surface uniformément accessible. La fonction complexe W dépend de p et de Sc .

δ_n est l'épaisseur de la couche de diffusion en régime stationnaire et s'exprime par :

$$\delta_n = \left(\frac{a}{3} Sc \right)^{-1/3} \Gamma(4/3) \sqrt{\frac{v}{\Omega}} \quad (\S 2.29)$$

avec $a = 0,51023$

La dernière étape de cette démarche est de relier la concentration interfaciale et le gradient de concentration à l'interface, aux grandeurs électriques observables courant et potentiel.

Dans une cellule électrochimique, à l'interface électrode/électrolyte, le courant total i est la somme du courant faradique et du courant capacitif. Le courant faradique i_f résulte d'une réaction électrochimique avec transfert d'électrons à travers l'interface. Le courant capacitif i_c est dû à la variation de charge interfaciale.

Le courant capacitif s'exprime par :

$$i_c = \frac{dq}{dt} = C_{dc} \frac{dE_i}{dt} \quad (\S 2.30)$$

avec C_{dc} capacité double couche et E_i potentiel interfacial. L'équation du courant total s'exprime par :

$$\Delta i = \Delta i_f + j\omega C_{dc} \Delta E \quad (\S 2.31)$$

Compte tenu de la chute ohmique où R_e est la résistance de l'électrolyte, la différence de potentiel entre les électrodes de travail et de référence ΔE est définie par l'expression suivante :

$$\Delta E = \Delta E_i + R_e \Delta i \quad (\S 2.32)$$

A partir des équations §2.27, §2.28, §2.31 et §2.32, on a :

$$Z_{EHD} = \left(\frac{\Delta i}{\Delta \Omega} \right)_E = \frac{\bar{i}}{\Omega} \frac{Z_d(p)}{R_e + (R_{tc} + Z_d(p))(1 + j\omega R_e C_{dc})} W(p) \quad (\S 2.33)$$

où R_{tc} est la résistance de transfert de charge et $Z_d(p)$ est l'impédance de diffusion convective ($\frac{Z_d(p)}{Z_d(0)} = -\frac{1}{\theta'(0)}$). Quand R_e est très faible ou quand la chute ohmique est compensée, il n'y a pas de modulation du potentiel interfacial et $\Delta i = \Delta i_f$. L'équation précédente donne :

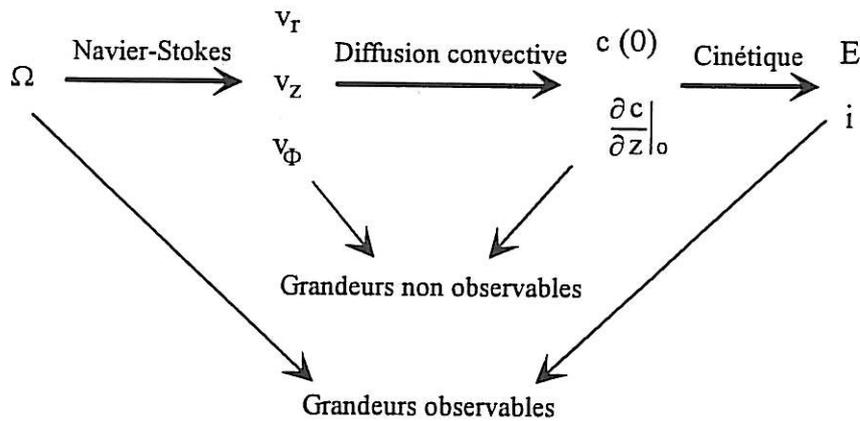
$$Z_{EHD} = \frac{\bar{i}}{\Omega} \frac{Z_d}{R_{tc} + Z_d} W \quad (\S 2.34)$$

Pour une réaction électrochimique très rapide sur le plateau de diffusion, $R_{tc} \ll |Z_d|$, on a alors :

$$Z_{EHD} = Z_C = \frac{\bar{i}}{\Omega} W \quad (\S 2.35)$$

où Z_C est une fonction de transfert dépendant uniquement du transport de matière.

Ces différentes étapes peuvent être représentées par le schéma suivant :



Les impédances EHD sont généralement représentées dans le plan de Bode $\log A/A_0 = f(\log p)$ et $\text{phase} = f(\log p)$, $p = \frac{\omega}{\Omega}$ étant la fréquence réduite adimensionnelle, A/A_0 l'amplitude réduite et A_0 l'amplitude à fréquence nulle.

Pour une électrode nue uniformément accessible, les courbes obtenues à différentes vitesses de rotation sont réductibles en p (fig. §2.5). L'amplitude varie en p^{-2} et la phase atteint une limite à 180° dans la gamme des plus hautes fréquences.

L'impédance EHD peut avoir différentes applications. La première application est la détermination de coefficients de diffusion par l'intermédiaire du nombre de Schmidt $Sc = \frac{v}{D}$. Cette technique peut aussi permettre de caractériser la surface d'électrodes partiellement bloquées ou recouvertes d'une couche poreuse (Deslouis et Tribollet, 1991).

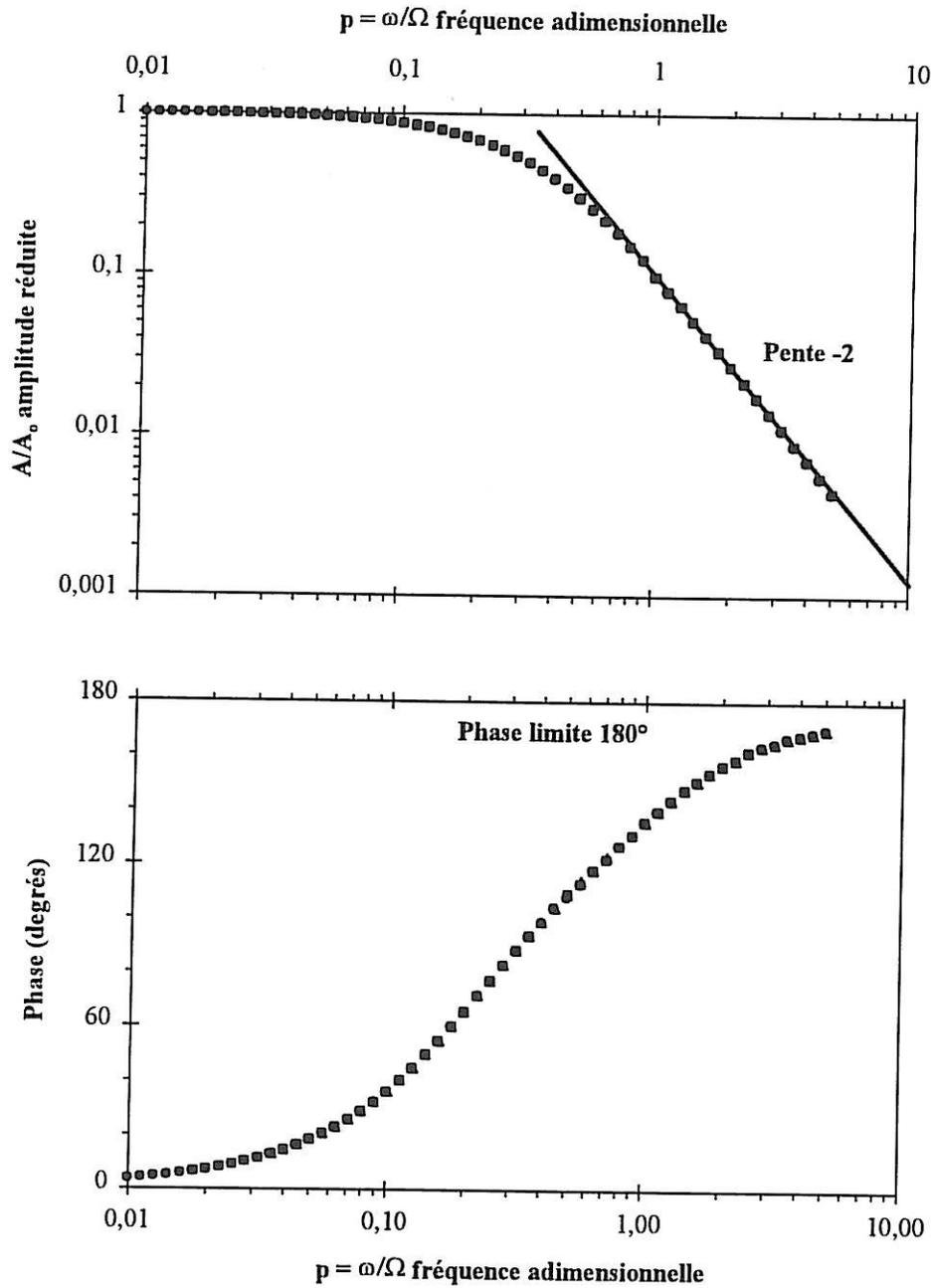


Figure §2.5 : Variation de l'impédance EHD en fonction de la fréquence adimensionnelle p pour un nombre de Schmidt 1000 à différentes vitesses de rotation \triangle 300, \blacksquare 600 et \bullet 1200 tr.min⁻¹.

Dans le cas d'une *couche poreuse* non réactive recouvrant l'électrode, l'intégration des équations non-stationnaires §2.5 et §2.7 donne (Deslouis *et al.*, 1987) :

$$Z_{\text{EHD}} = \frac{\Delta \left(\frac{\partial c_1}{\partial z} \Big|_0 \right)}{\Delta \Omega} = \frac{1}{D_f \operatorname{ch} s_f^{1/2}} \frac{D Z_C}{1 - \frac{\delta_f D}{D_f \delta_n} \Gamma\left(\frac{4}{3}\right) \theta'(0) \frac{\operatorname{th} s_f^{1/2}}{s_f^{1/2}}} \quad (\S 2.36)$$

$$\text{avec } s_f = j\omega \frac{\delta_f^2}{D_f} \quad (\S 2.37)$$

où $-1/\theta'(0)$ est l'impédance de diffusion adimensionnelle sur une électrode nue et est fonction uniquement de $pSc^{1/3}$ ($p = \frac{\omega}{\Omega}$).

Il est facile de vérifier que quand l'effet de la couche est graduellement diminué, $\delta_f \rightarrow 0$ et $D_f \rightarrow D$, on retrouve alors $Z_{\text{EHD}} = \frac{\Delta i}{\Delta \Omega} = Z_C$

Trois paramètres peuvent être déterminés à partir des expressions §2.36 et §2.37 : le nombre de Schmidt Sc , la vitesse de diffusion D_f / δ_f et le temps de diffusion δ_f^2 / D_f à travers la couche poreuse.

Contrairement au comportement d'une électrode nue, les données ne sont plus réductibles par la fréquence adimensionnelle p . Une augmentation de la vitesse de rotation de l'électrode produit un déplacement des diagrammes de Bode vers de plus petites valeurs de p . De plus, les phases ne tendent pas vers une valeur limite lorsque la fréquence tend vers l'infini : elles restent des fonctions croissantes de la fréquence (fig. §2.6)

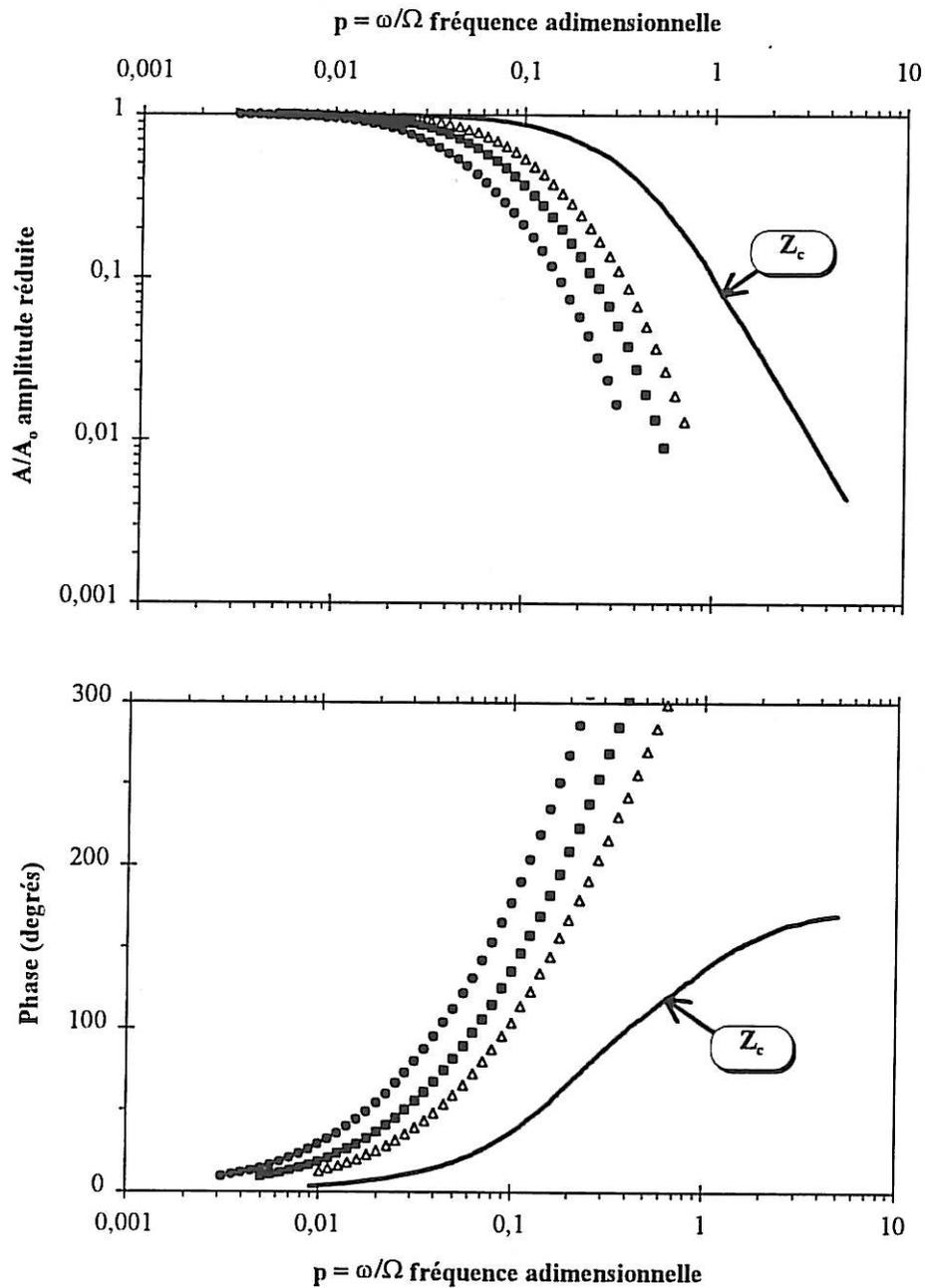


Figure §2.6 : Simulation de l'impédance EHD dans le cas d'une diffusion à travers une couche poreuse en prenant le nombre de Schmidt à 1000, la vitesse de diffusion à $5 \cdot 10^{-3} \text{ cm.s}^{-1}$ et le temps de diffusion 1 s. Courbes obtenues à différentes vitesses de rotation Δ 300, \blacksquare 600 et \bullet 1200 tr.min⁻¹ pour une EDT recouverte d'une couche poreuse comparées au diagramme obtenu pour une électrode nue — .

2. Impédance électrochimique (AC)

L'impédance électrochimique repose sur l'analyse de la réponse en fréquence d'un système électrochimique à une modulation sinusoïdale appliquée à un potentiel continu ou un courant continu. La description suivante portera sur l'impédance électrochimique en mode potentiostatique avec une EDT à vitesse de rotation constante.

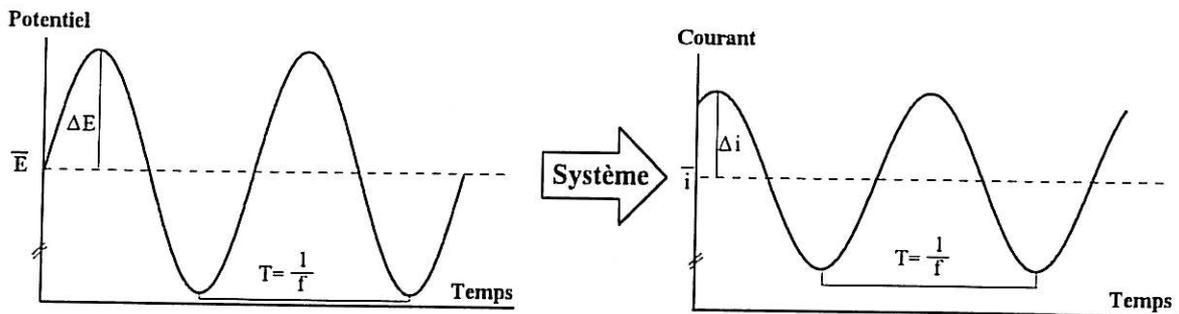


Figure §2.7 : Principe de l'impédance AC en mode potentiostatique.

Une perturbation sinusoïdale de faible amplitude est imposée à une tension continue et le courant sinusoïdal résultant est mesuré (fig. §2.7). Le potentiel peut alors être exprimé mathématiquement en fonction du temps :

$$E(t) = \bar{E} + \text{Re}\{\Delta E \exp(j\omega t)\} \quad (\S 2.38)$$

où la pulsation ω est liée à la fréquence de modulation par $\omega = 2\pi f$ et $\text{Re}\{x\}$ est la partie réelle de x . Cette perturbation du potentiel engendre une perturbation de la concentration interfaciale ou du gradient de concentration à l'interface et implique une réponse en courant. L'amplitude de la modulation ΔE doit être suffisamment petite pour que la réponse en courant soit linéaire :

$$i(t) = \bar{i} + \text{Re}\{\Delta i \exp(j\omega t)\} \quad (\S 2.39)$$

où Δi est une fonction complexe.

L'impédance est définie comme étant le rapport des deux grandeurs observables ΔE et Δi :

$$Z(\omega) = \frac{\Delta E}{\Delta i} = A(\omega) \exp[j\varphi(\omega)] \quad (\S 2.40)$$

où $A(\omega)$ et $\varphi(\omega)$ sont respectivement le rapport des amplitudes et le déphasage entre les deux signaux.

La combinaison des deux équations §2.31 et §2.32 amène à l'expression suivante :

$$\Delta i = (\Delta E_i - R_e \Delta i) \left(\frac{\Delta i_f}{\Delta E} + j\omega C_{dc} \right) \quad (\S 2.41)$$

$$Z = R_e + \frac{1}{Z_f + j\omega C_{dc}} \quad (\S 2.42)$$

L'impédance $Z_f = \frac{\Delta E}{\Delta i_f}$ n'est liée qu'au processus faradique et est indépendante de R_e et de C_{dc} . Z_f peut être définie comme la somme d'une résistance de transfert de charge R_{tc} et d'une impédance de diffusion convective $Z_d(p)$. L'impédance AC s'écrit alors par :

$$Z = R_e + \frac{R_{tc} + Z_d(p)}{1 + j\omega C_{dc}(R_{tc} + Z_d(p))} \quad (\S 2.43)$$

A partir de cette expression, il est possible de décrire un circuit électrique équivalent ainsi qu'un diagramme d'impédance théorique en représentation de Nyquist (fig. §2.8). Ce diagramme permet de déterminer expérimentalement les différents paramètres : R_e la résistance de l'électrolyte, C_{dc} la capacité double couche, R_{tc} la résistance de transfert de charge et R_p la résistance de polarisation. La représentation de Z_d dans le plan complexe fait apparaître une droite inclinée à 45° appelée droite de Warburg.

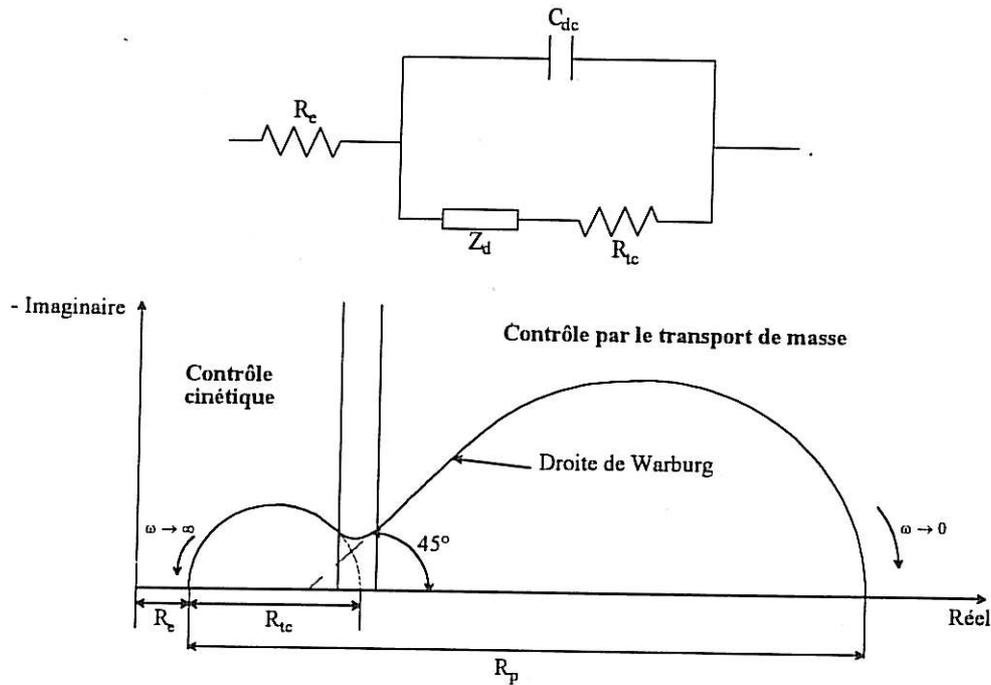


Figure 2.8 : Circuit électrique équivalent et diagramme d'impédance théorique.

Dans le cas d'une *couche poreuse* non réactive recouvrant l'électrode, l'intégration des équations non-stationnaires §2.7 et §2.9 fait intervenir deux fréquences adimensionnelles. La première fréquence $pSc^{1/3}$ correspond au transport dans la solution électrolytique et la seconde, $\omega \frac{\delta_f^2}{D_f}$, à la diffusion dans la couche poreuse. L'impédance de diffusion devient alors :

$$Z_d = \frac{\Delta c_1(0)}{\Delta \left(\frac{\partial c_1}{\partial z} \right)_0} = -\delta_f \frac{1 - \Gamma(4/3) \frac{D}{\delta_n} \frac{\delta_f}{D_f} \theta'(0) \frac{\text{th } s_f^{1/2}}{s_f^{1/2}}}{s_f^{1/2} \text{th } s_f^{1/2} - \Gamma(4/3) \frac{D}{\delta_n} \frac{\delta_f}{D_f} \theta'(0)} \quad (§2.44)$$

L'influence de la couche poreuse pourra donc être observée dans le diagramme d'impédance dans la seconde boucle correspondant au contrôle par le transport de matière. L'impédance électrochimique permet la détermination simultanée d'au moins huit paramètres pour un simple système rédox : résistance de transfert de charge, résistance de diffusion, capacité double couche, résistance d'électrolyte, capacité du film, nombre de Schmidt et finalement la vitesse de diffusion et la constante de temps de diffusion à travers la couche poreuse.

III. TECHNIQUES EXPERIMENTALES

A. Dispositifs expérimentaux

La cellule électrochimique utilisée est un système à trois électrodes comprenant :

- Electrode de travail : électrode à disque tournant en or 24 carats.
- Contre électrode : grille de platine de grande surface
- Electrode de référence : électrode au calomel saturé (ECS)

L'électrode de travail est constituée de deux parties (fig. §2.9). Elle est formée d'une tige sur laquelle se visse un embout d'environ 1,5 cm de haut où se trouve collé un disque d'or d'un diamètre de 0,5 cm (surface 0,196 cm²). Chaque partie est enrobée d'un isolant (résine) avec un joint étanche entre la tige et l'embout pour éviter toute entrée d'eau. Ce système a été mis au point pour faciliter l'observation au microscope.

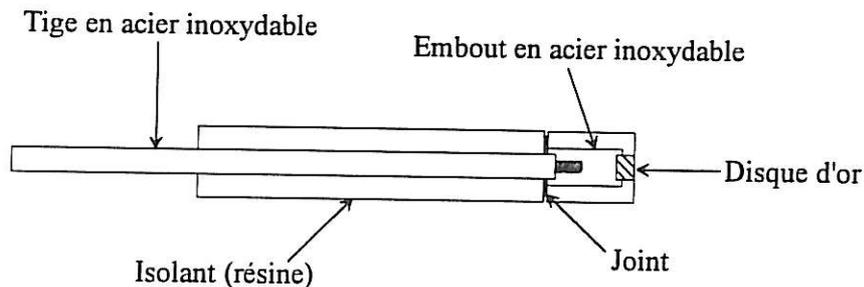


Figure §2.9 : Electrode de travail.

Le choix du matériau formant le disque de l'électrode de travail a été assujéti à différentes contraintes. Ainsi, pour dissocier les problèmes de corrosion et de développement du biofilm, il était nécessaire d'opter pour un métal inerte. Tout naturellement, le choix s'est porté sur des métaux tels que l'or ou le platine. Des études

préliminaires réalisées à l'UPR15 du CNRS (Deslouis *et al.*, 1992) ont montré que l'utilisation du platine avait quelques désavantages : résultats non reproductibles dans le temps et tendance à devenir inactif par l'adsorption significative d'oxygène et d'hydrogène. L'or ne présente pas ou à moindre degré ces désavantages. De plus, l'or possède aussi une surtension plus importante vis à vis de l'évolution de l'hydrogène par rapport au platine.

Les mesures en régime stationnaire, d'impédance EHD et d'impédance AC ont été réalisées respectivement grâce aux montages présentés figures §2.10, §2.11 et §2.12 ainsi que sur la photo §2.1. Les différents montages comprennent :

- Moteur à faible inertie avec son asservissement (Société AE)
- Interface électrochimique Schlumberger 1286
- Analyseur de fonction de transfert Schlumberger 1255 (FRA1255) qui permet à la fois la génération du signal perturbateur et de la mesure des fonctions de transfert $\frac{\Delta E}{\Delta i}$ et $\frac{\Delta i}{\Delta \Omega}$
- Filtre Kemo VBF-8 pour éliminer les bruits en hautes fréquences
- Générateur de rampe
- Oscilloscope afin de contrôler les signaux de mesure
- Ordinateur avec un logiciel d'acquisition de données en régime stationnaire (Xtalk) ainsi qu'un logiciel (Fracom) permettant de réaliser les mesures d'impédance en pilotant le FRA 1255 et le filtre Kemo
- Cellule électrochimique

Le potentiel est imposé à l'aide de l'interface électrochimique Schlumberger 1286. Les mesures de courant sont réalisées par cette même interface par l'intermédiaire d'un contacteur au mercure auquel est fixée l'électrode à disque tournant.

Le moteur à faible inertie permet d'atteindre des fréquences de modulation mécanique de près de 100 Hz sans amortissement notable de l'amplitude. La vitesse du moteur est contrôlée au moyen d'une dynamo tachymétrique.

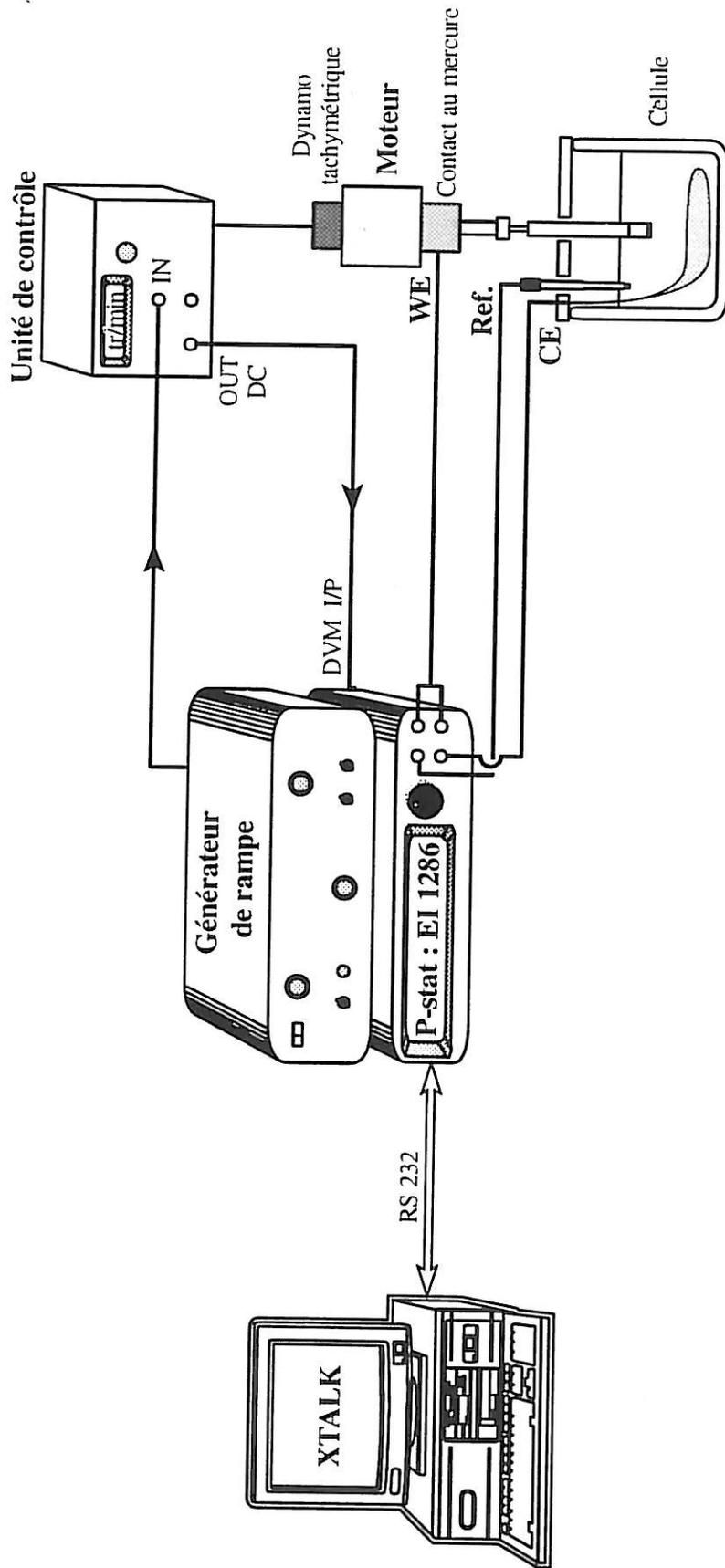


Figure §2.10 : Montage expérimental utilisé pour les mesures en régime stationnaire.

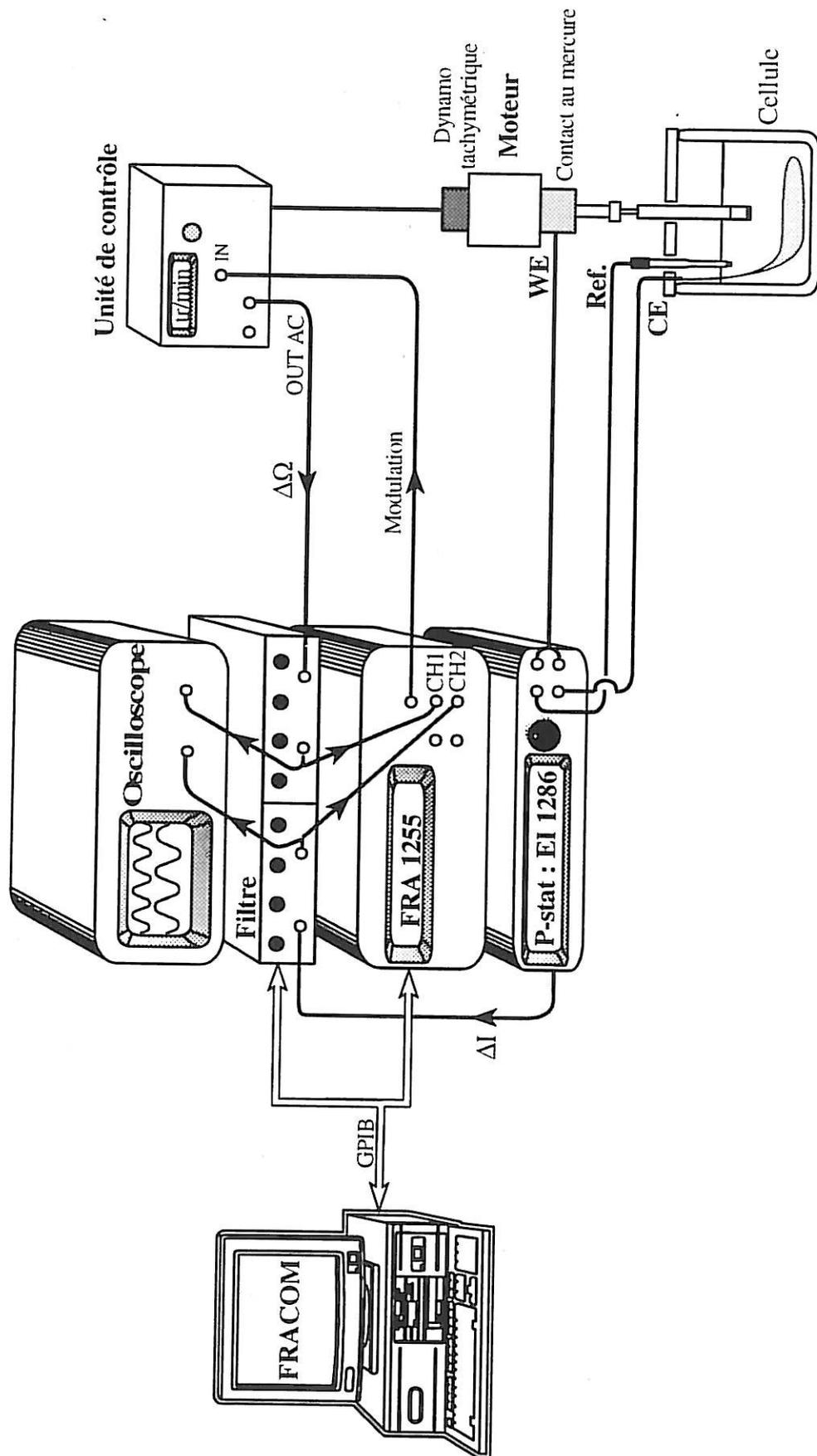


Figure §2.11 : Montage expérimental utilisé pour les mesures d'impédance EHD.

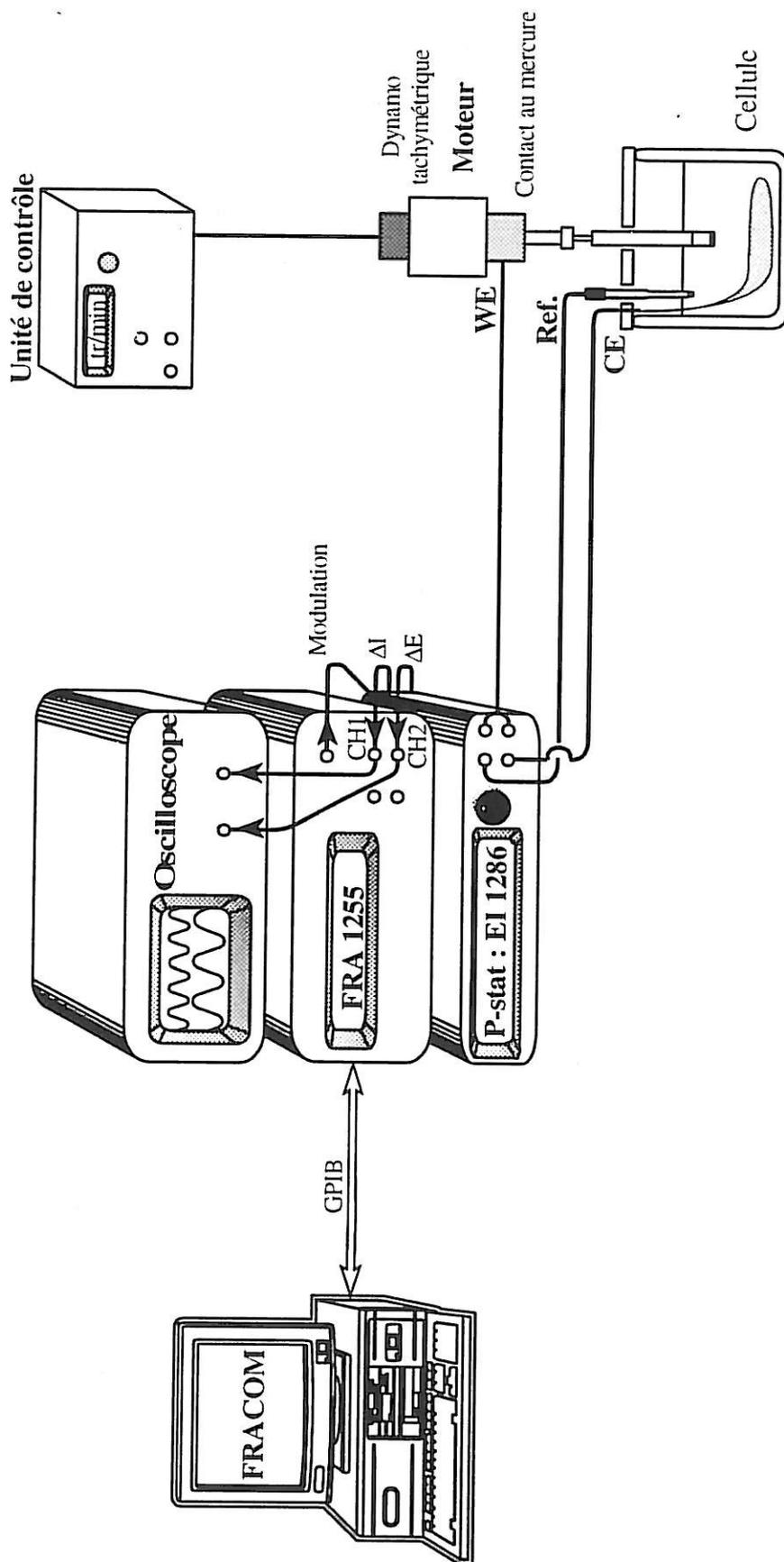
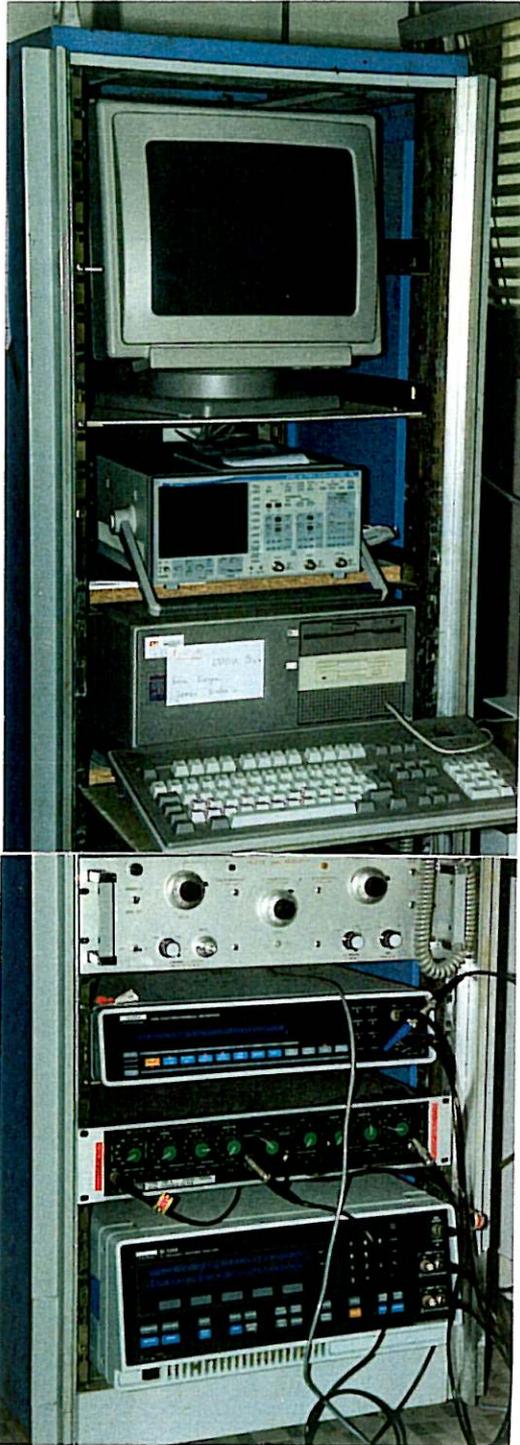
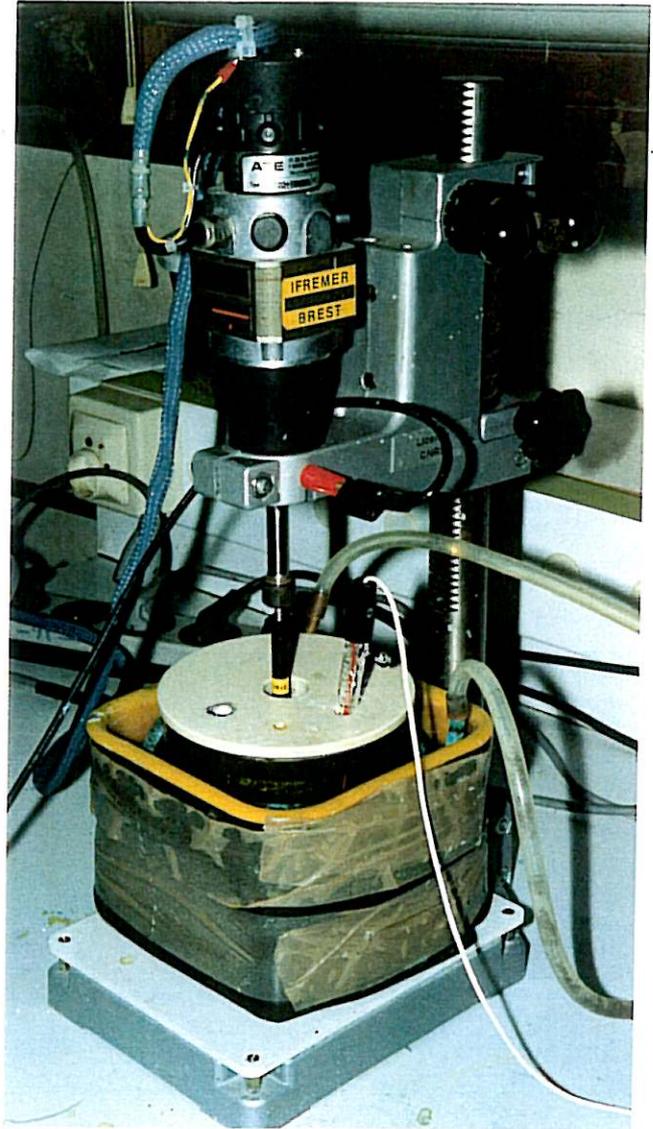


Figure §2.12 : Montage expérimental utilisé pour les mesures d'impédance AC.



(a) Appareils de mesure



(b) Moteur de l'électrode
à disque tournante

Photo §2.1 : Appareillage utilisé pour les mesures en régime stationnaire, impédance EHD et impédance AC.

B. Procédures expérimentales

1. Préparation des électrodes de travail

Avant chaque début d'expérience, les électrodes de travail sont passées au papier émeri 1200 pour éliminer les rayures éventuelles, puis polies successivement avec de l'alumine 3 μm puis 1 μm . Après chacune de ces étapes, les électrodes sont rincées à l'eau distillée dans un bain à ultrason pour éliminer les particules d'alumine puis dégraissées successivement avec de l'alcool et de l'acétone.

2. Traceurs électrochimiques

Deux traceurs électrochimiques ont été utilisés : l'ion ferricyanure $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$ et l'oxygène (Deslouis *et al.*, 1992).

a) Traceur $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$

Le couple rédox $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-} / \text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$ a l'avantage d'être un système électrochimique connu. La réaction rédox mise en jeu est très rapide comparée au transport de matière (fig. §2.13). Dans le cas de cette étude, c'est la réduction du ferricyanure qui sera la réaction employée.



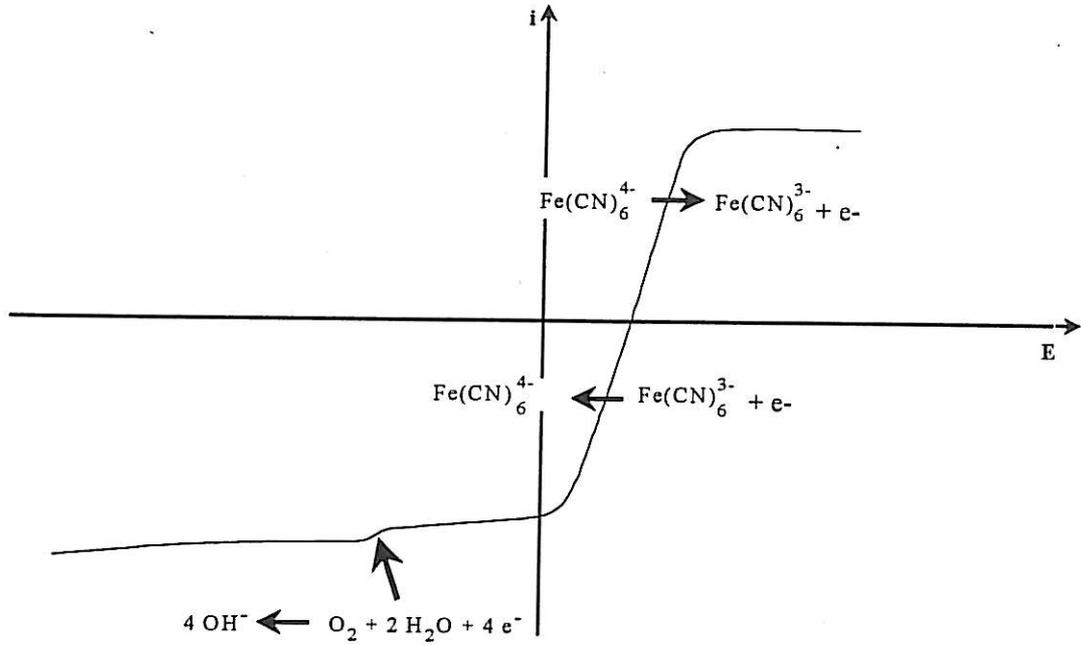
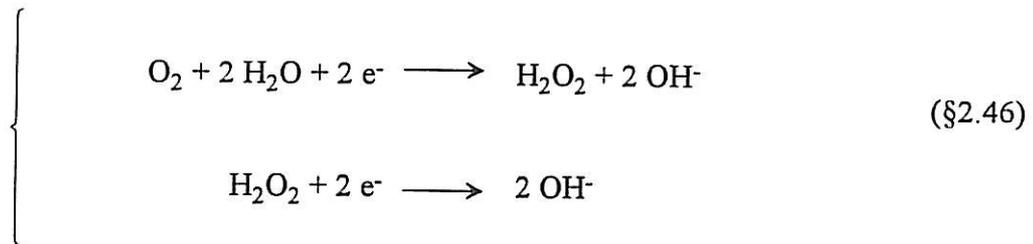


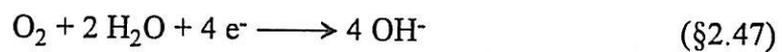
Figure §2.13 : Courbe de polarisation dans une solution aqueuse neutre ou alcaline contenant le couple $\text{Fe}(\text{CN})_6^{2-} / \text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$ en concentration équimolaire.

b) Oxygène

Au potentiel correspondant au palier de diffusion, la réaction de réduction de l'oxygène se produit en deux étapes en milieu neutre ou alcalin.



Les deux étapes sont des processus rapides et la réaction totale apparaît comme un transfert relativement rapide à quatre électrons (fig. §2.14).



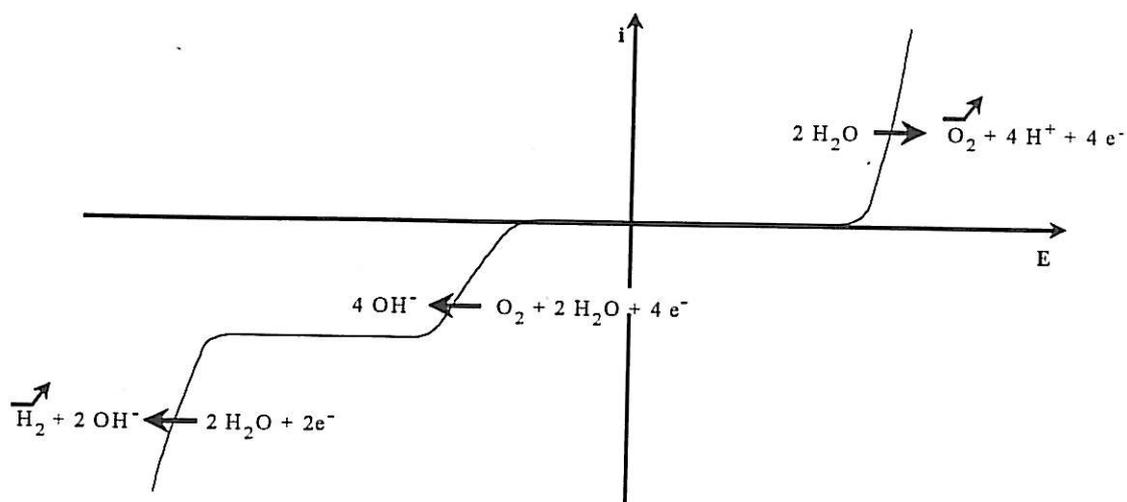


Figure §2.14 : Courbe de polarisation dans une solution aqueuse neutre ou alcaline.

3. Mesures

a) Mesures en régime stationnaire

Les mesures en régime stationnaire sont réalisées suivant la procédure suivante :

- Polarisation sur le plateau limite de diffusion de la réaction de réduction du traceur
- Stabilisation du courant (10 min)
- Augmentation régulière de la vitesse de rotation de l'EDT de 120 à 1200 tr.min⁻¹ en 10 min
- Diminution régulière de la vitesse de rotation de 1200 à 120 tr.min⁻¹ en 10 min avec enregistrement du courant en fonction de $\sqrt{\Omega}$

Les valeurs $i = f(\sqrt{\Omega})$ ne sont donc enregistrées que 20 min après le début de la polarisation c'est-à-dire lorsque le système est dans un état quasi-stationnaire.

b) Mesures d'impédance EHD

Toujours sur le plateau limite de diffusion après établissement d'un état quasi-stationnaire, une amplitude de modulation de 10% est réalisée autour de la vitesse de rotation $\bar{\Omega}$. Cette valeur de modulation assure la linéarité nécessaire aux mesures d'impédance.

Un filtre est utilisé pour éliminer les bruits en hautes fréquences. Un oscilloscope est employé pour contrôler les signaux de mesure tant en vitesse de rotation qu'en courant. Il permet d'éviter des artefacts dûs à des instabilités de la régulation, à des distorsions provenant d'un signal de mesure trop important ou à la présence d'un bruit parasite excessif. Sa présence facilite l'élimination de la composante continue des signaux de mesure avant leur introduction dans l'analyseur de fonction de transfert.

Le filtre et l'analyseur de fonction de transfert sont pilotés à l'aide d'un ordinateur.

Le domaine de fréquence exploré peut aller de quelques dizaines de milliHertz à une centaine de Hertz.

c) Mesures d'impédance AC

Un potentiel correspondant à la moitié du courant mesuré sur le plateau limite de diffusion de la réaction de réduction du traceur est imposé au système électrochimique. Après stabilisation du courant, la mesure d'impédance AC est réalisée. Tout comme l'impédance EHD, l'analyse de l'impédance AC doit être faite dans le domaine de linéarité. Une amplitude de modulation est de 10 mV. Pour les mêmes raisons que celles citées pour l'impédance EHD, un oscilloscope est employé.

L'analyseur de fonction de transfert est piloté à l'aide d'un ordinateur.

Le domaine de fréquence exploré peut aller de quelques dizaines de milliHertz à une centaine de kiloHertz.

C. Traitement des données

Le traitement des données est basé sur une méthode d'ajustement élaborée et développée à l'UPR15 du CNRS. Elle repose sur l'emploi d'un simplexe pour minimiser une fonction. Les informations connues *a priori* sur les paramètres sont introduit dans le simplexe.

Le problème est de rechercher la meilleure détermination des paramètres, de façon univoque de telle façon que les valeurs définies aient un sens physique. Pour chaque ajustement, il faut estimer d'une part les erreurs sur les mesures et d'autre part les bornes inférieure et supérieure de chaque paramètre entre lesquelles s'effectue la recherche du paramètre (cf Annexe).

La figure §2.15 présente les différents paramètres pouvant être déterminés par l'ajustement des données expérimentales obtenues avec les différentes techniques.

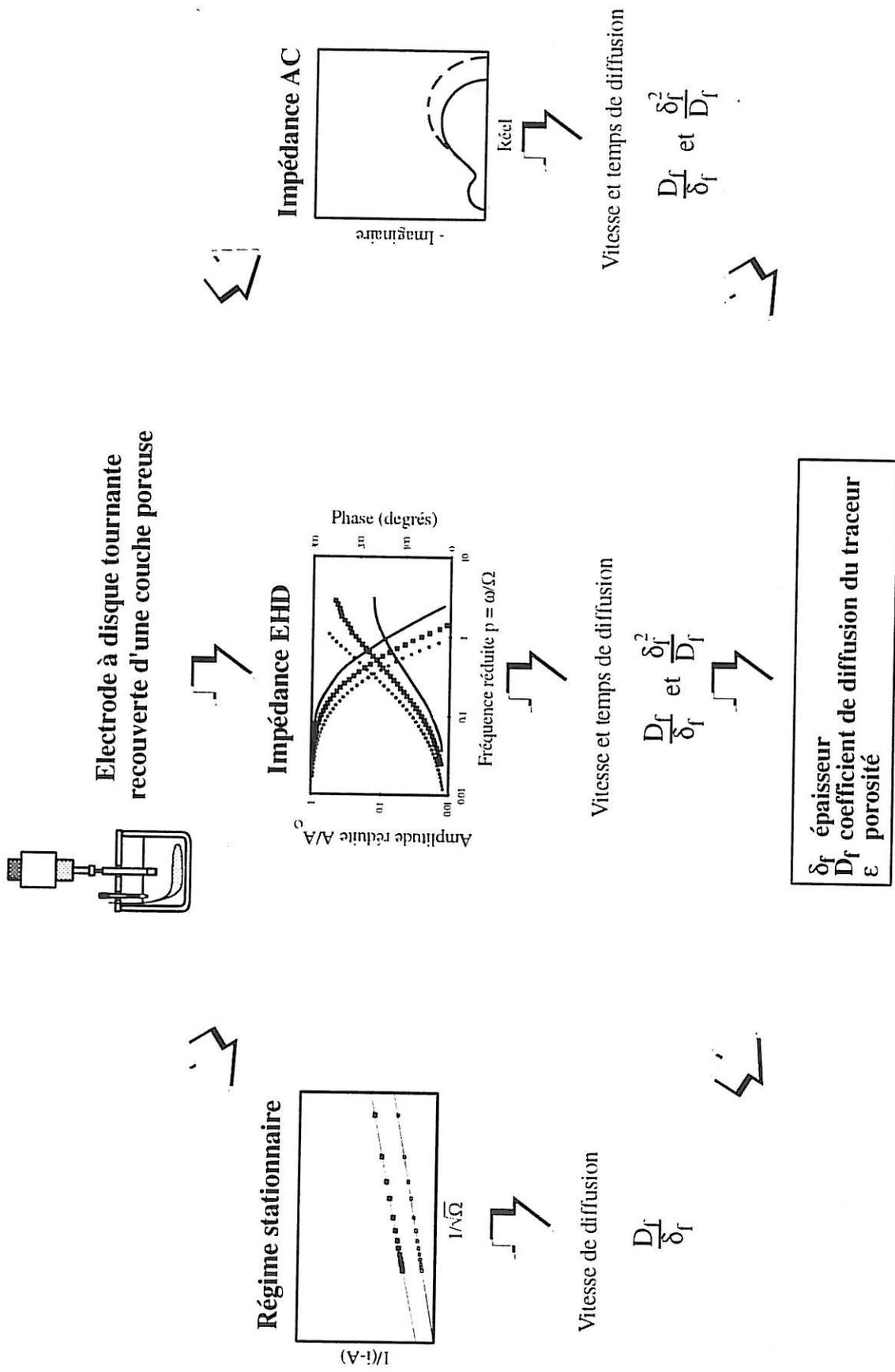


Figure §2.4 : Synopsis des techniques employées et des renseignements qui en sont retirés.

Chapitre 3

Elaboration et caractérisation d'une couche modèle poreuse

- I. Conditions expérimentales
- II. Détermination du nombre de Schmidt
- III. Détermination de δ_f et D_f dans une couche de gélatine
- IV. Conclusion

L'objectif du travail exposé dans ce chapitre est d'élaborer une couche modèle de biofilm et de définir le protocole expérimental pour la caractérisation de sa géométrie (porosité ϵ , épaisseur δ_f) par analyse du transport de matière. Cette étude part du principe que la biomasse peut être considérée en première approximation comme une couche poreuse homogène à l'échelle macroscopique. La bibliographie abonde dans ce sens (Christensen et Characklis, 1990 ; Wanner, 1989 ; De Beer *et al.*, 1994).

Le matériau qui joue le rôle du biofilm doit répondre à différents critères, le principal étant bien évidemment le caractère poreux. Par le passé, différents gels ont été utilisés comme couche modèle de la biomasse et ont montré un comportement identique au biofilm. Ainsi White et Dorion (1961) ont employé un gel de polyacrylamide et Dudman (1977) un gel d'agar.

Le choix s'est donc dirigé assez naturellement vers un gel. C'est la gélatine alimentaire qui a été retenue pour sa simplicité d'emploi, son faible coût et sa disponibilité.

A partir du modèle physique proposé, un protocole d'étude basé sur les techniques électrochimiques présentées dans le chapitre 2 est élaboré puis testé. Deux techniques sont utilisées dans cette étude : l'impédance ElectroHydroDynamique (EHD) et la mesure du courant limite de diffusion en fonction de la vitesse de rotation. La mesure du temps de diffusion $\frac{\delta_f^2}{D_f}$ par l'impédance EHD et la mesure de vitesse de diffusion $\frac{D_f}{\delta_f}$ à partir des données stationnaires, fournissent une détermination de l'épaisseur δ_f et du coefficient de diffusion D_f dans la couche de gélatine. La comparaison des coefficients de diffusion dans la couche poreuse et dans la solution électrolytique permet de déduire la porosité de la gélatine.

Les résultats obtenus sur une même couche à l'aide de deux traceurs différents (oxygène et ferricyanure) sont comparés.

I. CONDITIONS EXPERIMENTALES

A. Elaboration de la couche de gélatine

La gélatine alimentaire est une substance albuminoïde extraite par hydrolyse de tissus animaux riches en collagène. La gélatine commercialisée est produite à partir de la peau, du tissu conjonctif et des os de bovins. C'est un aliment composé de 65 à 90% de protéines, de sels minéraux et d'eau.

1. Préparation de la gélatine

La gélatine utilisée se présente sous forme de feuillets. La proportion de gélatine est de l'ordre de 1 à 1,5%. Avant manipulation, les feuillets sont ramollis dans de l'eau froide quelques minutes. Les feuilles de gélatine sont ensuite égouttées puis ajoutées à de l'eau chaude. La préparation est alors agitée jusqu'à complète dissolution de la gélatine puis ramenée à température ambiante.

2. Dépôt de la gélatine sur l'électrode

Après retour à la température ambiante, la préparation change de structure pour devenir un gel. Lorsque la solution commence à se polymériser, la gélatine est déposée sur une électrode en or. Pour obtenir une couche plane et uniforme, le dépôt est effectué sur une électrode en rotation à une vitesse de 2500 tr.min^{-1} (Fig. §3.1). Plusieurs couches successives sur l'électrode sont nécessaires afin d'obtenir un film relativement épais. L'électrode est alors maintenue en rotation durant quelques minutes afin de permettre la polymérisation du gel.

B. Traceurs électrochimique

La couche de gélatine est testée dans un premier temps avec le traceur $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$ puis dans un second temps avec le traceur oxygène. Les procédures expérimentales employées sont décrites dans le chapitre 2. Les mesures sont réalisées à température ambiante (18°C).

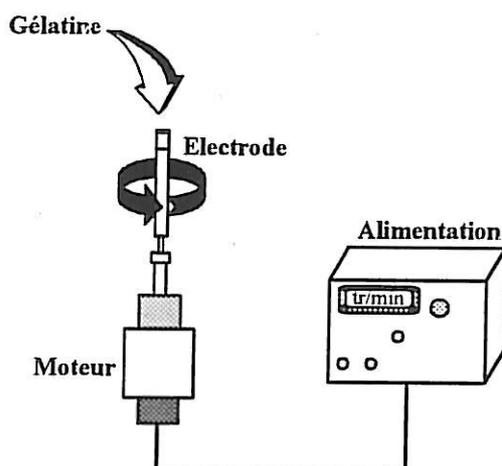


Figure §3.1 : Technique de dépôt de la gélatine sur l'électrode.

1. Traceur ferricyanure

Dans un premier temps, l'électrode est placée dans une solution composée de KCl 1M, de $K_3Fe(CN)_6/K_4Fe(CN)_6$ $10^{-2}M$ et d'eau distillée. Avant la mesure, l'électrode est laissée dans la solution une demi-heure pour permettre la diffusion des différents ions de la solution dans la couche poreuse. Elle est alors polarisée sur le plateau limite de diffusion de réduction de $Fe(CN)_6^{3-}$ à 0 mV/ECS (Electrode au Calomel Saturé). Ce potentiel a été déterminé en traçant la courbe de polarisation dans la solution de mesure à l'aide d'une électrode de travail nue (fig. §3.2).

2. Traceur oxygène

Dans un second temps, les mesures sont réalisées dans une solution aqueuse de KCl 1M dont la concentration en oxygène dissous déterminée par la méthode Winkler (Protocole, cf. Annexe) est de 6,0 ppm soit $2 \cdot 10^{-4}M$. Après quelques minutes, l'électrode est polarisée sur le plateau limite de diffusion de réduction l'oxygène à -900 mV/ECS (fig. §3.3).

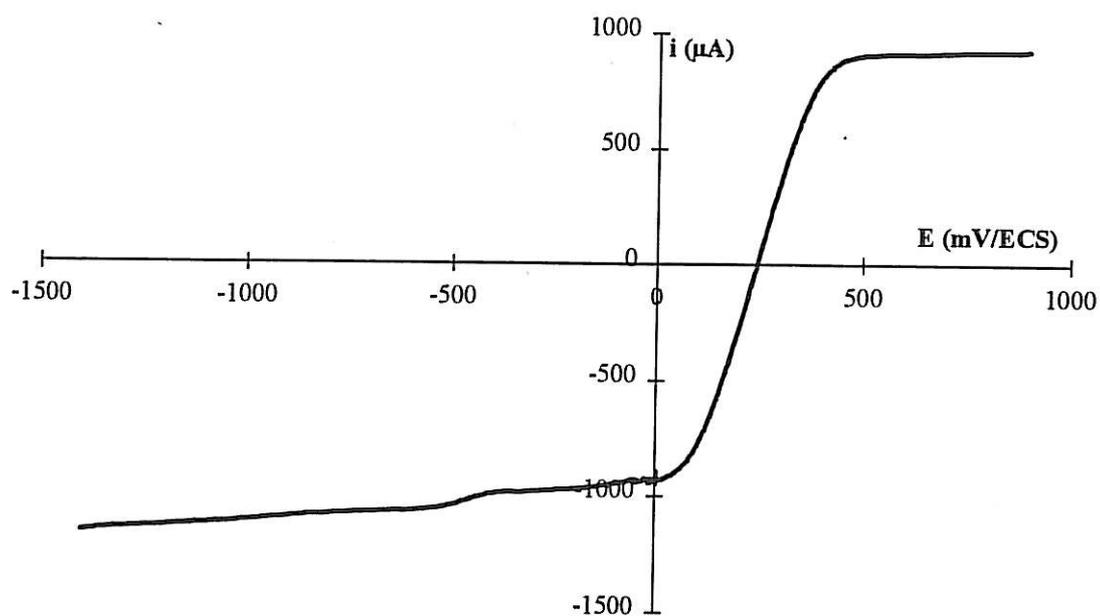


Figure §3.2 : Courbe de polarisation avec une électrode de travail nue dans une solution $\text{KCl } 1\text{M} - \text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6/\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6 10^{-2}\text{M}$.

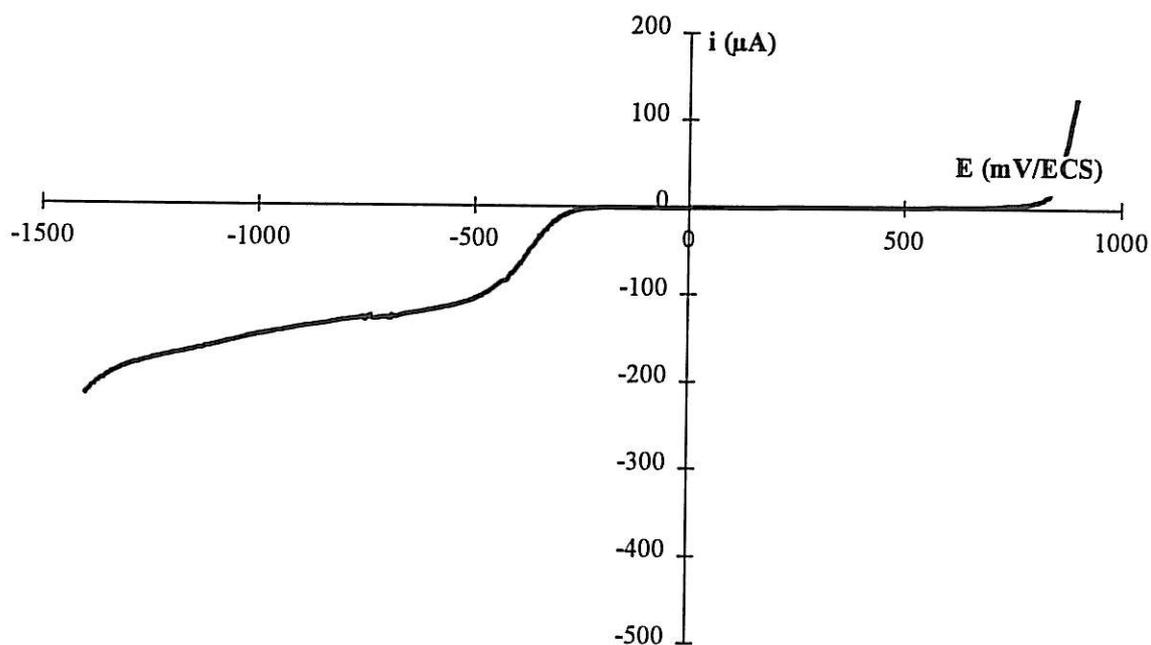


Figure §3.3 : Courbe de polarisation avec une électrode de travail nue dans une solution $\text{KCl } 1\text{M}$.

II. DETERMINATION DU NOMBRE DE SCHMIDT

Le nombre de Schmidt Sc est défini par :

$$Sc = \frac{v}{D} \quad (\S 3.1)$$

Sc est une grandeur adimensionnelle caractéristique des espèces diffusantes en solution. De sa mesure, après détermination de la viscosité cinématique v , il est possible de déduire le coefficient de diffusion D .

Le nombre de Schmidt est utilisé lors de la procédure d'ajustement des données expérimentales EHD. La méthode d'ajustement repose sur l'emploi d'un simplexe où les informations connues *a priori* sur les paramètres sont introduites. Il est donc avantageux de déterminer ce paramètre dans une première étape pour réduire le nombre d'inconnus lors de la régression des données en présence de la couche poreuse.

La mesure d'un coefficient de diffusion moléculaire D par des techniques électrochimiques, et par conséquent du nombre de Schmidt, est généralement réalisée à l'aide d'une électrode à disque tournant.

Levich (1962) a décrit l'équation reliant le courant limité par le transport de matière à la vitesse angulaire du disque (éq §2.5). L'utilisation de cette technique pour mesurer le coefficient de diffusion nécessite la connaissance des paramètres suivants : la surface de l'électrode, le nombre d'électrons mis en jeu dans la réaction rédox, la concentration du traceur dans la solution et la viscosité cinématique. Les erreurs de mesure de ces différentes quantités peuvent causer une erreur conséquente sur la détermination de D .

Cet inconvénient est partiellement écarté avec les méthodes transitoires, impédances AC et EHD, qui ne nécessitent pas la connaissance des paramètres énumérés ci-dessus.

Afin d'obtenir un courant modulé détectable, les mesures d'impédance AC doivent être réalisées sous le plateau limite de diffusion. Il a été montré que ces mesures ne sont exploitables pour la détermination du nombre de Schmidt que dans certains cas particuliers (Newman, 1973 ; Deslouis et Tribollet, 1984). Cette technique ne sera donc pas utilisée à cette fin dans ce travail.

L'impédance EHD est mieux adaptée à ce genre d'étude. Le nombre de Schmidt est déduit par comparaison des données expérimentales avec une fonction théorique (Robertson *et al.*, 1988).

La détermination de Sc est réalisée avec une électrode nue pour les différents traceurs.

A. Traceur ferricyanure

Les mesures d'impédance EHD ont été réalisées sur une électrode nue à différentes vitesses de rotation : 120, 300, 600 et 1200 tr.min⁻¹ dans la solution KCl 1M - K₃Fe(CN)₆/K₄Fe(CN)₆ 10⁻²M. L'électrode est polarisée sur le plateau limite de diffusion de réduction du ferricyanure à 0 mV/ECS. Les données expérimentales sont présentées dans le plan de Bode sur la figure §3.4.

La réductibilité des résultats en EHD par la fréquence adimensionnelle p sur une électrode nue est vérifiée. Les données sont seulement fonction de la fréquence adimensionnelle p.

Pour chaque vitesse de rotation, le nombre de Schmidt est déterminé par ajustement des données expérimentales. Les résultats obtenus sont rassemblés dans le tableau §3.1.

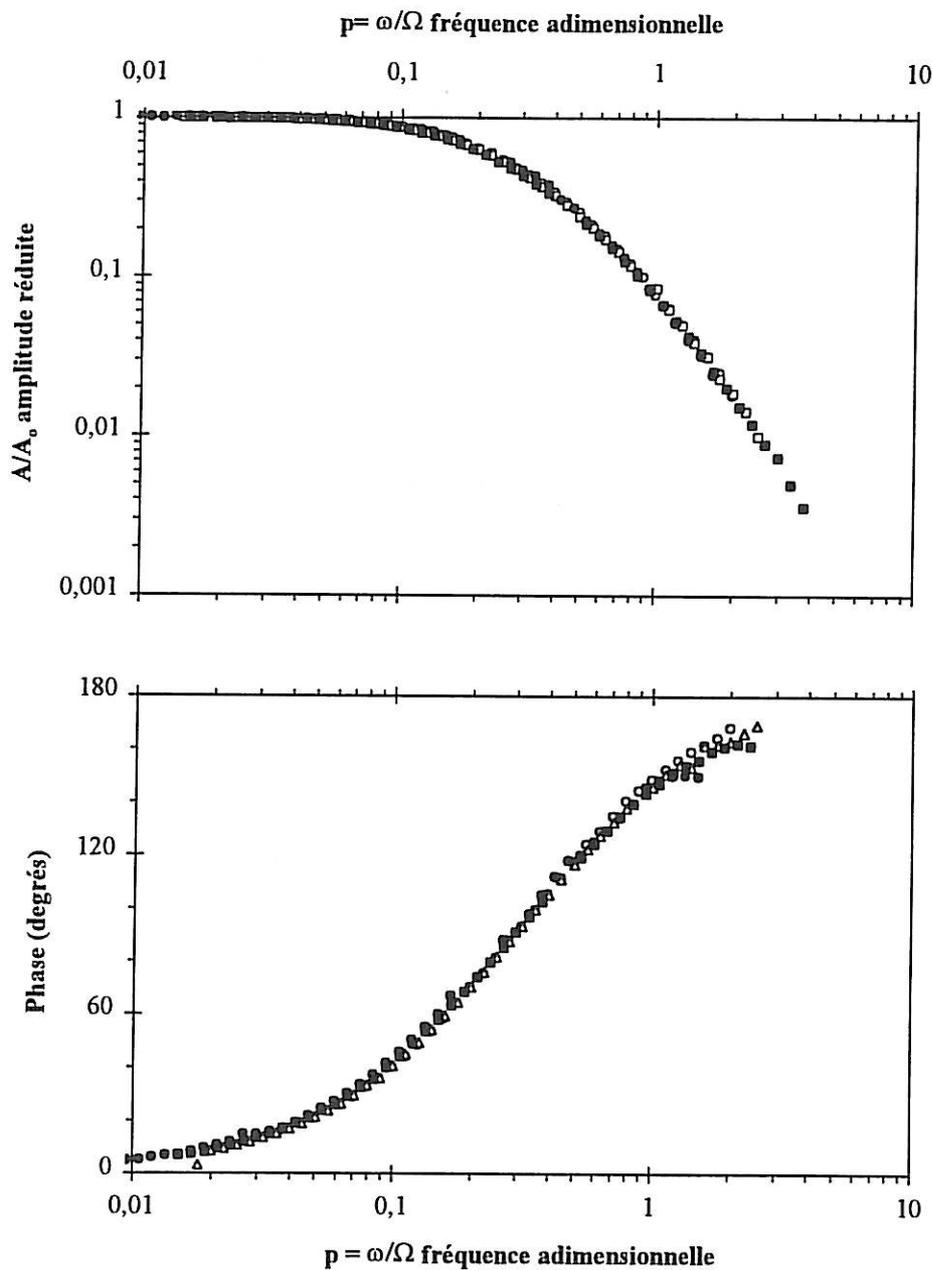


Figure §3.4 : Impédances EHD représentées dans le plan de Bode pour une EDT nue en or dans une solution $\text{KCl } 1\text{M} - \text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6/\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6 \ 10^{-2}\text{M}$ à différentes vitesses de rotation : \circ 120, \triangle 300, \blacksquare 600 et \bullet 1200 tr.min^{-1} (Traceur $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$).

Ω (tr.min ⁻¹)	120	300	600	1200
$Sc_{Fe(CN)_6^{3-}}$	1423	1474	1501	1418

Tableau §3.1 : Valeurs de $Sc_{Fe(CN)_6^{3-}}$ déterminées par ajustement des données EHD à différentes valeurs de rotation d'une électrode nue.

La dispersion des valeurs suivant la vitesse de rotation peut être attribuée à l'incertitude de mesure. La valeur moyenne de $Sc_{Fe(CN)_6^{3-}}$ est 1454 ± 47 . Cette valeur peut être comparée à celles disponibles dans la littérature (tableau §3.2).

Auteurs	$Sc_{Fe(CN)_6^{3-}}$
Robertson <i>et al.</i> , 1988	$1155,1 \pm 43,2$
Orazem <i>et al.</i> , 1996	1110 ± 61

Tableau §3.2 : Valeurs de $Sc_{Fe(CN)_6^{3-}}$ issues de la littérature.

La valeur du nombre de Schmidt déterminé par régression est supérieure à celles décrites dans la littérature car ces dernières ont été mesurées à 25°C alors que la température expérimentale est ici de 18°C. Cet écart de température explique cette différence. Dans la suite de ce chapitre, la valeur utilisée pour le nombre de Schmidt du traceur $Fe(CN)_6^{3-}$ sera de 1500.

$$Sc_{Fe(CN)_6^{3-}} = 1500$$

B. Traceur oxygène

Des mesures d'impédance EHD ont été réalisées sur une électrode nue dans la solution KCl 1M. L'électrode est alors polarisée sur le plateau limite de diffusion de réduction de l'oxygène à -900 mV/ECS. Les données obtenues sont présentées dans le plan de Bode sur la figure §3.5. La réductibilité des résultats en EHD par la fréquence adimensionnelle p sur une électrode nue est vérifiée.

Pour chaque vitesse de rotation, le nombre de Schmidt a été déterminé par ajustement des données expérimentales (tableau §3.3).

Ω (tr.min ⁻¹)	120	300	600	1200
Sc_{O_2}	641	830	809	960

Tableau §3.3 : Valeurs de Sc_{O_2} déterminées par ajustement des données EHD à différentes valeurs de rotation d'une électrode nue.

La dispersion de ces valeurs est plus importante que celle obtenue pour le traceur $Fe(CN)_6^{3-}$. La plus faible de la concentration en oxygène entraîne une plus grande incertitude relative sur les mesures du courant de réduction que dans le cas du ferricyanure, expliquant ainsi la plus grande dispersion des valeurs de Sc . La valeur moyenne de Sc_{O_2} est 810 ± 169 .

Deslouis *et al.* (1992) ont déjà évalué Sc_{O_2} à environ 500 à 25°C. La valeur du nombre de Schmidt ici déterminée est supérieure à celle de la littérature. L'écart de température explique cette différence. Dans la suite de ce chapitre, la valeur utilisée pour le nombre de Schmidt du traceur oxygène sera de 800.

$$Sc_{O_2} = 800$$

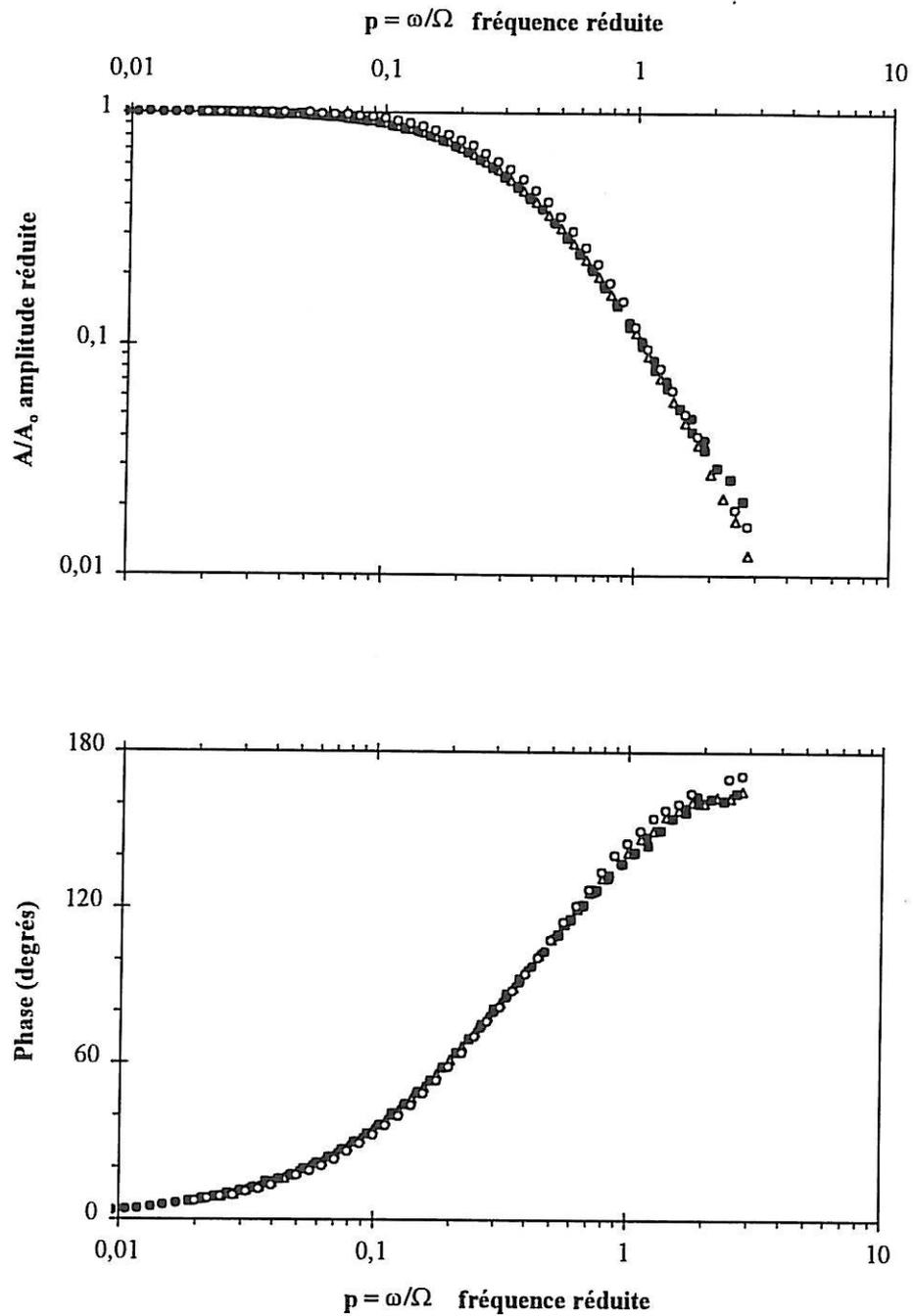


Figure §3.5 : Impédances EHD représentées dans le plan de Bode pour une EDT nue en or dans une solution KCl 1M à différentes vitesses de rotation : \circ 120, \triangle 300, \blacksquare 600 et \bullet 1200 $\text{tr}\cdot\text{min}^{-1}$ (Traceur oxygène).

III. DETERMINATION DE δ_f ET D_f DANS UNE COUCHE DE GELATINE

Toutes les mesures présentées ont été réalisées sur une même couche de gélatine et réalisée successivement avec le traceur ferricyanure et le traceur oxygène.

A. Traceur ferricyanure

1. Régime stationnaire

Après polarisation de l'électrode à 0 mV/ECS, le courant de réduction de $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$ en régime stationnaire est enregistré en fonction de la racine carrée de la vitesse angulaire avec et sans couche poreuse. A partir de l'équation §2.16, une procédure d'ajustement des données expérimentales permet de déterminer les trois paramètres i_o , i_∞^{-1} et K^{-1} . Les résultats sont présentés dans le tableau §3.4.

	i_o (μA)	i_∞^{-1} (μA^{-1})	K^{-1} ($\mu\text{A}^{-1} \cdot (\text{tr} \cdot \text{min}^{-1})^{-0,5}$)
Sans gélatine	0,0	0,0	0,032
Avec gélatine	0,0	$1,3 \cdot 10^{-3}$	0,036

Tableau §3.4 : Paramètres i_o , i_∞^{-1} et K^{-1} ajustés à partir des données expérimentales pour une électrode avec et sans une couche de gélatine (traceur $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$).

Sur la figure §3.6, les données sont présentées sous la forme $\frac{1}{i} = f\left(\frac{1}{\sqrt{\Omega}}\right)$. La corrélation entre les données expérimentales et le modèle analytique proposé dans le cas

des mesures en régime stationnaire est excellente. L'ordonnée à l'origine correspond au paramètre i_∞^{-1} et la pente au paramètre K^{-1} . D'après l'équation §2.18, i_∞^{-1} est proportionnel au rapport de l'épaisseur de la couche sur le coefficient de diffusion du traceur dans cette même couche.

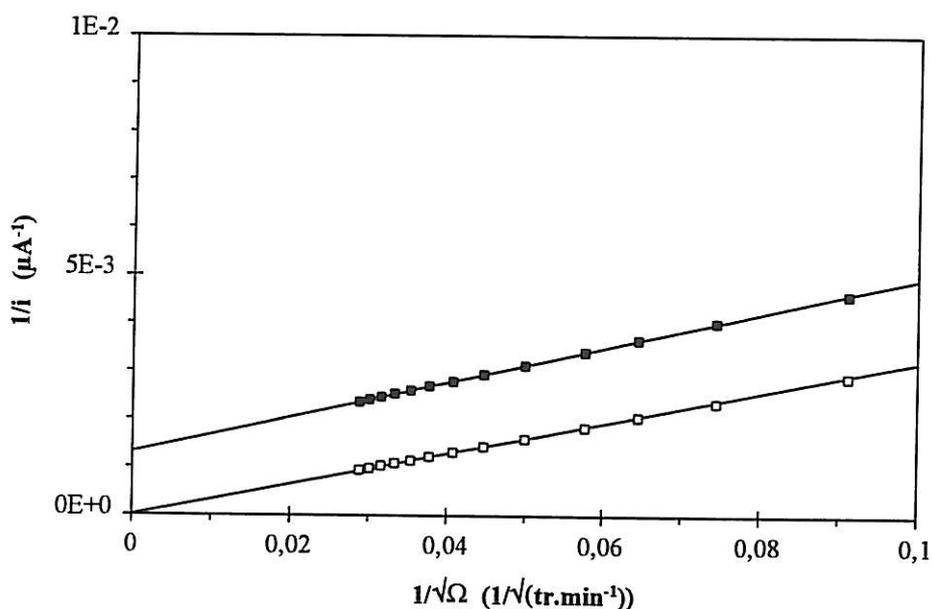


Figure §3.6 : Mesure en régime stationnaire présentée sous la forme $\frac{1}{i} = f\left(\frac{1}{\sqrt{\Omega}}\right)$ sur une électrode en or dans une solution KCl 1M - $K_3Fe(CN)_6/K_4Fe(CN)_6$ $10^{-2}M$ avec et sans couche de gélatine. Les symboles correspondent aux points expérimentaux □ sans gélatine et ■ avec gélatine et les droites aux valeurs ajustées par régression (traceur $Fe(CN)_6^{3-}$).

Dans le cas de l'*électrode nue*, à ce potentiel de polarisation, le courant non diffusionnel i_0 est nul. La droite passe par l'origine c'est-à-dire l'épaisseur de la couche est nulle. De plus, la valeur de la pente expérimentale est égale à $0,032 \mu A^{-1} \cdot (tr.min^{-1})^{-0,5}$. A l'incertitude de mesure près, cette valeur est identique à la valeur théorique pouvant être calculée à partir de l'équation §2.19 qui est de $0,034 \mu A^{-1} \cdot (tr.min^{-1})^{-0,5}$ en prenant :

- Nombre d'électrons mis en jeu dans la réaction rédox $n = 1$

- Surface de l'électrode $S = 0,196 \text{ cm}^2$
- Coefficient de diffusion dans la solution électrolytique $D = 6,7 \cdot 10^{-6} \text{ cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ calculé à partir du nombre de Schmidt
- Viscosité cinématique $\nu = 10^{-2} \text{ cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$
- Concentration du traceur dans la solution $c_\infty = 10^{-2} \text{ M}$

La translation de la droite obtenue avec *une électrode recouverte d'une couche de gélatine* par rapport à une électrode nue correspond à une valeur non nulle de $\frac{\delta_f}{D_f}$. La pente reste constante à l'incertitude de mesure près.

2. Impédance EHD

Des mesures d'impédance EHD sont réalisées sur l'électrode recouverte d'une couche de gélatine à différentes vitesses de rotation : 120, 300, 600 et 1200 $\text{tr} \cdot \text{min}^{-1}$. Les diagrammes (fig. §3.7) montrent que les données ne sont plus réduites par la fréquence adimensionnelle p . Les diagrammes de Bode sont déplacés vers des valeurs de p plus basses quand la vitesse de rotation de l'électrode augmente. La phase n'est plus limitée à 180° mais tend vers des valeurs supérieures. Ce comportement correspond qualitativement à la diffusion du traceur à travers une couche poreuse.

3. Traitement des données

La valeur de i_∞^{-1} déterminée lors de l'ajustement des données obtenues en régime stationnaire est inversement proportionnelle à la vitesse de diffusion $\frac{D_f}{\delta_f}$ dans la couche poreuse (éq. §2.18). On obtient alors :

$$\frac{D_f}{\delta_f} = 4,06 \cdot 10^{-3} \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}$$

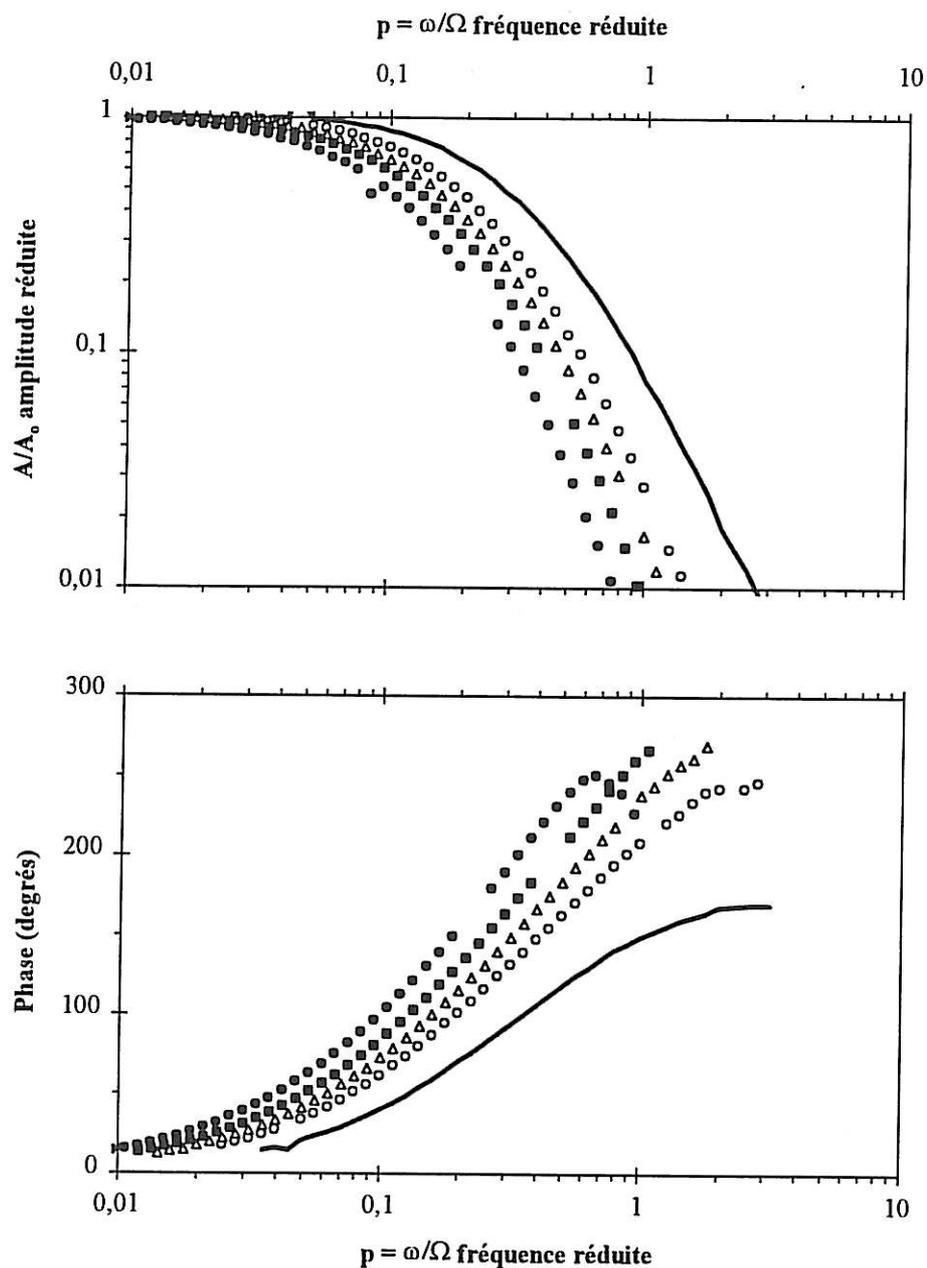


Figure §3.7 : Impédance EHD représentée dans le plan de Bode dans une solution $\text{KCl } 1\text{M} - \text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6/\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6 \ 10^{-2}\text{M}$ à différentes vitesses de rotation : \circ 120, \triangle 300, \blacksquare 600 et \bullet 1200 $\text{tr}\cdot\text{min}^{-1}$ pour une EDT en or recouverte d'une couche de gélatine comparée au diagramme obtenu pour une électrode nue — aux mêmes vitesses de rotation (Traceur $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$).

Les données EHD sont ajustées au modèle analytique (éq. §2.36). Le nombre de Schmidt et la vitesse de diffusion qui ont été déterminés précédemment sont fixés respectivement à 1500 et à $4,06 \cdot 10^{-3} \text{ cm.s}^{-1}$. La régression des données permet alors de déterminer le temps de diffusion $\frac{\delta_f^2}{D_f}$ du traceur dans la couche poreuse. Pour chaque vitesse de rotation, les valeurs obtenues sont reportées dans le tableau §3.5.

$\Omega \text{ (tr.min}^{-1}\text{)}$	$\frac{\delta_f^2}{D_f} \text{ (s)}$
120	$2,26 \cdot 10^{-1}$
300	$2,30 \cdot 10^{-1}$
600	$2,26 \cdot 10^{-1}$
1200	$2,33 \cdot 10^{-1}$

Tableau §3.5 : Paramètres $\frac{\delta_f^2}{D_f}$ ajustés à partir des données expérimentales pour une électrode recouverte d'une couche de gélatine (traceur $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$).

La valeur moyenne du temps de diffusion est $2,29 \pm 0,04 \cdot 10^{-1} \text{ s}$. L'association des deux paramètres que sont la vitesse et le temps de diffusion permet alors d'atteindre l'épaisseur de la couche poreuse ainsi que le coefficient de diffusion du traceur ferricyanure dans cette même couche.

$$\begin{aligned} \delta_f &= 9,3 \pm 0,2 \text{ } \mu\text{m} \\ D_f &= 3,77 \pm 0,07 \cdot 10^{-6} \text{ cm}^2 \cdot \text{s}^{-1} \end{aligned}$$

La porosité d'une couche a été définie par Newman (1991) et West (1993) en se basant sur la comparaison des coefficients de diffusion dans la couche poreuse ($3,77 \cdot 10^{-6} \text{ cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$) et dans la solution électrolytique ($6,4 \cdot 10^{-6} \text{ cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$):

$$D_f = D \varepsilon^{1,5} \quad (\S 3.2)$$

En utilisant cette relation, la porosité du film de gélatine étudié est de 0,8. Ce résultat confirme la nature très poreuse de la couche.

B. Traceur oxygène

1. Régime stationnaire

L'électrode recouverte de la couche de gélatine est transférée dans la seconde solution constituée de KCl 1M et polarisée sur le plateau limite de diffusion de réduction l'oxygène à -900 mV/ECS. Le courant de réduction de l'oxygène en régime stationnaire est enregistré en fonction de la vitesse angulaire avec et sans le film de gélatine. A partir l'équation §2.16, une procédure d'ajustement des données permet de déterminer les paramètres i_o , i_∞^{-1} et K^{-1} (tableau §3.6). Sur la figure §3.8, les données sont présentées sous la forme $\frac{1}{i - i_o} = f\left(\frac{1}{\sqrt{\Omega}}\right)$.

	i_o (μA)	i_∞^{-1} (μA^{-1})	K^{-1} ($\mu\text{A}^{-1} \cdot (\text{tr} \cdot \text{min}^{-1})^{-0,5}$)
Sans gélatine	10,0	0,0	0,29
Avec gélatine	7,6	$6,6 \cdot 10^{-3}$	0,31

Tableau §3.6 : Paramètres i_o , i_∞^{-1} et K^{-1} ajustés à partir des données expérimentales pour une électrode avec et sans une couche de gélatine (traceur oxygène).

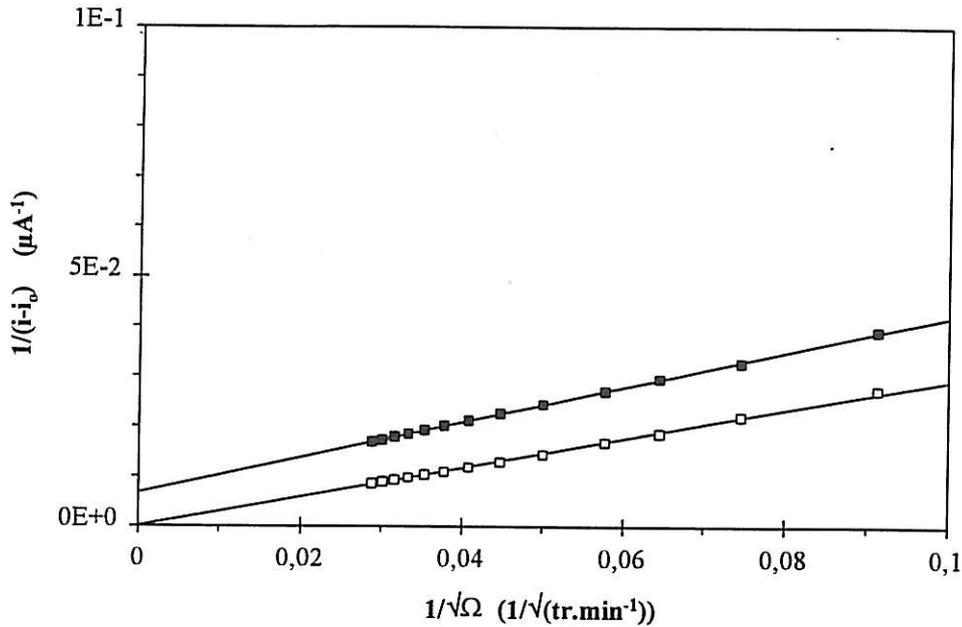


Figure §3.8 : Mesure en régime stationnaire présentée sous la forme $\frac{1}{i-i_0} = f\left(\frac{1}{\sqrt{\Omega}}\right)$ sur une électrode en or dans une solution KCl 1M avec et sans couche de gélatine. Les symboles correspondent aux points expérimentaux □ sans gélatine et ■ avec gélatine et les droites aux valeurs ajustées par régression (traceur oxygène).

Dans le cas de l'*électrode nue*, le courant non diffusionnel i_0 n'est pas nul. Ce courant correspond à la réduction de l'eau en hydrogène. La courbe $\frac{1}{i-i_0} = f\left(\frac{1}{\sqrt{\Omega}}\right)$ est une droite passant par l'origine ce qui correspond bien à une épaisseur de couche nulle. La pente expérimentale est égale à $0,29 \mu A^{-1} \cdot (tr.min^{-1})^{-0,5}$. La pente théorique est de $0,28 \mu A^{-1} \cdot (tr.min^{-1})^{-0,5}$ à partir de l'équation §2.19 en prenant :

- Nombre d'électrons mis en jeu dans la réaction rédox $n = 4$
- Surface de l'électrode $S = 0,196 \text{ cm}^2$
- Coefficient de diffusion dans la solution électrolytique $D = 1,3 \cdot 10^{-5} \text{ cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ calculé à partir du nombre de Schmidt
- Viscosité cinématique $\nu = 10^{-2} \text{ cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$
- Concentration du traceur dans la solution $c_\infty = 2 \cdot 10^{-4} \text{ M}$

Dans le cas de l'*électrode recouverte par la couche de gélatine*, le courant non diffusionnel diminue.

Une raison possible pour la variation du paramètre i_0 pourrait être que la présence du film modifie le pH à l'interface métal/film. En supposant que le courant non diffusionnel est dû à la réduction de l'eau en hydrogène, la diminution de i_0 en présence de la gélatine pourrait indiquer une augmentation du pH.

La courbe $\frac{1}{i - i_0} = f\left(\frac{1}{\sqrt{\Omega}}\right)$ est une droite ne passant pas par l'origine. Cette ordonnée à l'origine correspond au paramètre i_∞^{-1} . Celui-ci est correctement déterminé par ajustement des données expérimentales.

2. Impédance EHD

Des mesures d'impédance EHD ont été réalisées sur l'électrode recouverte d'une couche de gélatine à différentes vitesses de rotation : 120, 300, 600 et 1200 tr/min. Les diagrammes de Bode (fig. §3.9) sont déplacés vers des valeurs plus basses quand la vitesse de rotation de l'électrode augmente et la phase n'est plus limitée à 180° mais tend vers des valeurs supérieures. Ce comportement confirme le caractère poreux de la couche de gélatine.

3. Traitement des données

A partir de la valeur de i_∞^{-1} , la vitesse de diffusion dans la couche poreuse $\frac{D_f}{\delta_f}$ est calculée :

$$\frac{D_f}{\delta_f} = 9,9 \cdot 10^{-3} \text{ cm.s}^{-1}$$

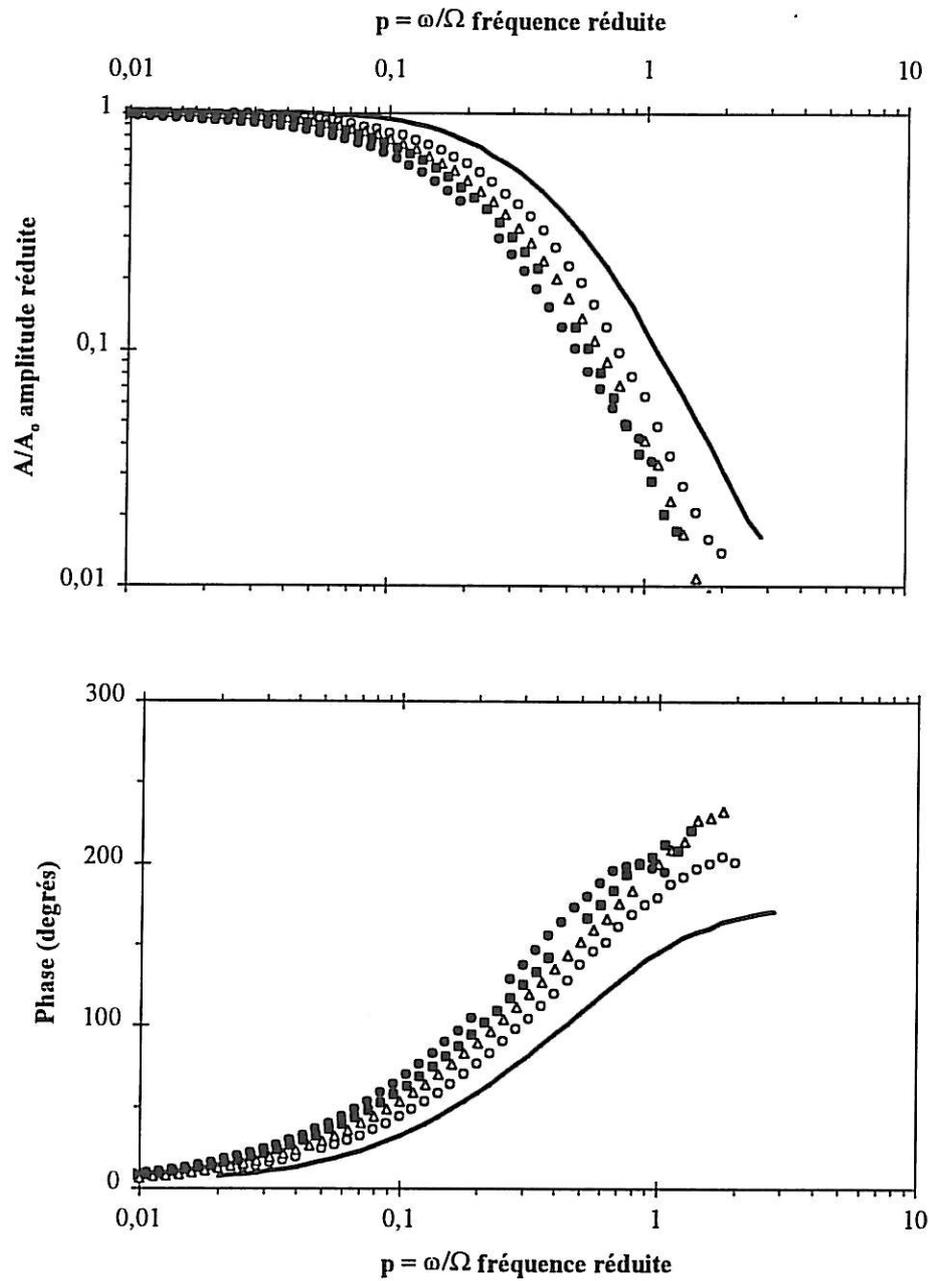


Figure §3.9 : Impédance EHD représentée dans le plan de Bode dans une solution KCl 1M à différentes vitesses de rotation \circ 120, \triangle 300, \blacksquare 600 et \bullet 1200 tr.min⁻¹ pour une EDT en or recouverte d'une couche de gélatine comparée au diagramme obtenu pour une électrode nue — (traceur oxygène).

Les données EHD sont ajustées au modèle analytique (éq. §2.36) en fixant le nombre de Schmidt $Sc = 800$ et la vitesse de diffusion $\frac{D_f}{\delta_f} = 9,9 \cdot 10^{-3} \text{ cm.s}^{-1}$ qui ont été déterminés précédemment. La régression des données permet alors de déterminer le temps de diffusion $\frac{\delta_f^2}{D_f}$ du traceur oxygène dans la couche poreuse. Pour chaque vitesse de rotation, les valeurs obtenues sont reportées dans le tableau §3.7.

Ω (tr.min ⁻¹)	$\frac{\delta_f^2}{D_f}$ (s)
120	$8,41 \cdot 10^{-2}$
300	$1,07 \cdot 10^{-1}$
600	$9,59 \cdot 10^{-2}$
1200	$8,95 \cdot 10^{-2}$

Tableau §3.7 : Paramètres $\frac{\delta_f^2}{D_f}$ ajustés à partir des données expérimentales pour une électrode recouverte d'une couche de gélatine (traceur oxygène).

La valeur moyenne du temps de diffusion est $9,4 \pm 0,9 \cdot 10^{-2}$ s. La vitesse et le temps de diffusion permettent d'atteindre l'épaisseur de la couche poreuse ainsi que le coefficient de diffusion du traceur oxygène dans cette même couche.

$\delta_f = 9 \pm 1 \text{ } \mu\text{m}$ $D_f = 9 \pm 1 \cdot 10^{-6} \text{ cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$
--

A partir de l'expression §3.2, la porosité du film de gélatine est de 0,8. Ce résultat confirme les résultats obtenus avec le traceur ferricyanure et la nature hautement hydratée de la couche.

C. Comparaison des résultats obtenus avec les traceurs ferricyanure et oxygène

Les résultats obtenus avec les deux traceurs sont rassemblés dans le tableau §3.8 suivant :

Traceurs	δ_f (μm)	D_f ($\text{cm}^2.\text{s}^{-1}$)	Sc	D ($\text{cm}^2.\text{s}^{-1}$)	ϵ
$\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$	$9,3 \pm 0,2$	$3,77 \pm 0,07 \cdot 10^{-6}$	1500	$6,4 \cdot 10^{-6}$	0,8
Oxygène	9 ± 1	$9 \pm 1 \cdot 10^{-6}$	800	$1,3 \cdot 10^{-6}$	0,8

Tableau §3.8 : Résultats obtenus sur une même couche de gel avec deux traceurs différents (oxygène et $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$.)

L'épaisseur ainsi que la porosité déterminées avec les deux traceurs sont identiques. La valeur de porosité confirme que le film de gélatine est très poreux et hautement hydraté.

Le coefficient de diffusion de chaque traceur dans la couche poreuse est légèrement inférieur au coefficient de diffusion D dans la solution électrolytique. La diffusivité n'étant pas affectée localement, le coefficient de diffusion mesuré est un coefficient de diffusion apparent qui contient un facteur de tortuosité.

Les caractéristiques de la couche poreuse obtenues avec le ferricyanure sont en accord avec celles déterminées avec l'oxygène bien que les résultats obtenus avec l'oxygène soient plus dispersés.

Une des principales raisons pouvant être invoquées est la différence de concentration entre les traceurs. La concentration du ferricyanure est de $10^{-2}M$ alors que celle de l'oxygène est de $2 \cdot 10^{-4}M$ soit un facteur 50 entre les deux traceurs. La possibilité d'utiliser une concentration relativement importante en $Fe(CN)_6^{3-}$ est avantageuse car elle permet de contrôler la qualité de la mesure en jouant sur le rapport signal sur bruit. La concentration en oxygène dissous dans les solutions aqueuses dépend de la salinité, de la pression atmosphérique et de la température. Ainsi, l'eau de mer possède une concentration en oxygène dissous peu importante. La qualité de la mesure (rapport signal sur bruit) est liée à cette concentration.

De plus, la réaction de réduction de l'oxygène est plus lente que la réaction de réduction du ferricyanure. Un facteur cinétique peut entrer en jeu dans les résultats. Les modèles analytiques ont été définis en partant du postulat d'une réaction rédox rapide.

Les résultats obtenus n'en demeurent pas moins identiques. Il est donc possible d'utiliser les deux traceurs lors de la caractérisation de couches poreuses. L'emploi du traceur oxygène, naturellement présent en milieu naturel, est possible. Il présente un avantage indéniable dans le cas de mesure en milieu naturel tel qu'en eau de mer ou eau potable.

V. CONCLUSION

Cette étude a permis l'élaboration d'une couche poreuse modèle composée de gélatine alimentaire ainsi que le développement d'un protocole expérimental ayant pour objet la caractérisation de ce film par analyse des propriétés de transport.

Dans ce travail, les propriétés de transport dans le milieu poreux ont été analysées à l'aide de deux techniques électrochimiques : l'impédance électrohydrodynamique et la mesure du courant limite de diffusion en fonction de la vitesse de rotation. Le protocole utilisé peut être résumé par le schéma §3.10.

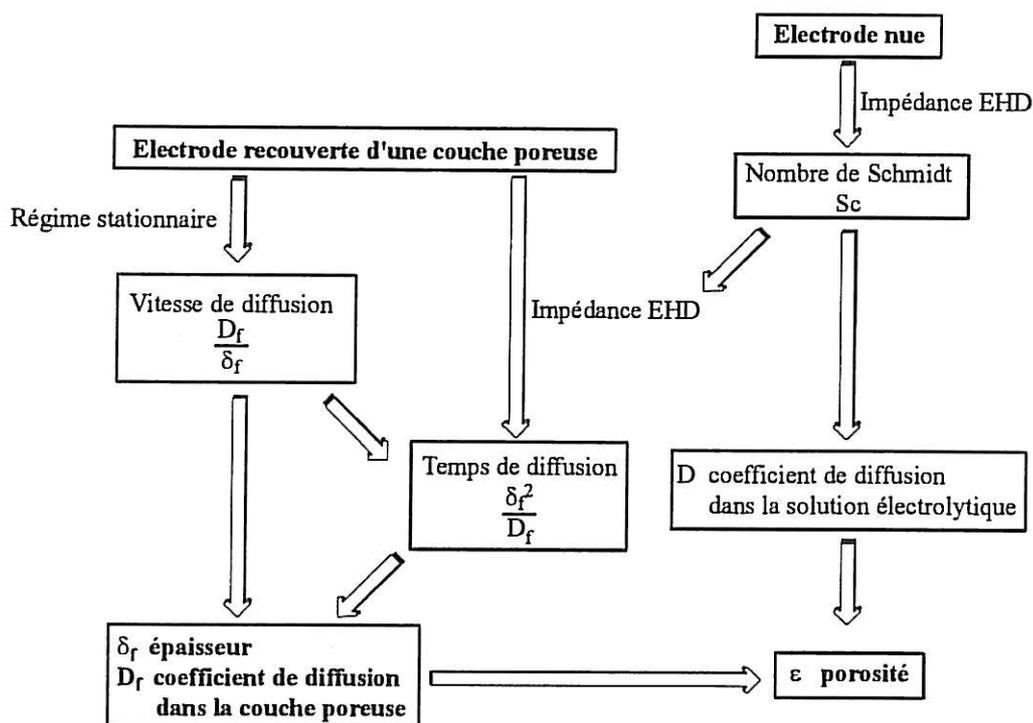


Figure §3.10 : Résumé du protocole utilisé pour la caractérisation d'une couche poreuse.

Conclusion

Les deux traceurs (oxygène et ferricyanure) ont donné des résultats identiques. La caractérisation de la couche poreuse est donc bien indépendante du traceur rédox. L'emploi du traceur oxygène, naturellement présent dans les eaux étudiées, est possible.

La prochaine étape doit être l'adaptation du protocole dans le but de suivre *in-situ* l'évolution d'un biofilm développé en milieu naturel tel que l'eau de mer ou l'eau douce.

Chapitre 4

Caractérisation physique de biofilms formés en milieu naturel

- I. Caractérisation de biofilms formés
en eau de mer
- II. Caractérisation de biofilms formés
en eau douce

Le chapitre précédent présentait l'élaboration et la caractérisation d'une couche modèle d'un voile biologique. C'est une étape préalable qui a permis de développer une technique de caractérisation *in-situ* d'une biomasse formée en milieu naturel en terme d'épaisseur et de porosité.

Adapter le protocole expérimental à un biofilm comporte des difficultés inhérentes à la complexité des milieux aqueux naturels et à la structure même du voile biologique.

L'objectif affiché de cette étude est de ne pas s'arrêter à un seul type d'eau. La technique doit pouvoir être utilisée pour des biomasses développées aussi bien en milieu marin qu'en eau douce^(a). Il s'est vite avéré que son adaptation est plus aisée en milieu marin. La composition de l'eau de mer avec sa forte salinité est un excellent support électrolytique pour des mesures électrochimiques. De plus, un des problèmes apparus lors d'études électrochimiques en eau douce naturelle est l'entartrage. Lors de la réaction de réduction de l'oxygène dans les milieux riches en carbonates et calcium tels que certaines eaux douces, ce phénomène peut être particulièrement marqué et rapide. Par contre, la vitesse d'entartrage est nettement moins rapide en eau de mer.

Le développement de cette technique en milieu marin sera le premier objectif. Cette étape doit être abordée comme un but en soi mais aussi comme une étape qui aidera à aplanir les difficultés propres à l'eau douce.

L'étude réalisée en milieu marin se déroule en trois étapes.

Dans un premier temps, l'adaptation du protocole développé pour une couche de gélatine est réalisée sur des biofilms relativement épais. Dans ce but, les conditions d'exposition des électrodes sont modifiées : augmentation de la température et de la concentration des nutriments.

Une fois ce premier point accompli, une étude est réalisée en milieu stérile afin de disposer d'une référence.

(a) *Eau douce* : Le terme 'eau douce' est utilisé en opposition au terme 'eau de mer'.

Enfin, la technique est appliquée dans le cas d'un biofilm développé en eau de mer sans apport extérieur de nutriment et à température ambiante.

A chaque étape, des observations (MEB, cultures, épifluorescence, MLBC) sont réalisées pour valider les résultats obtenus.

I. CARACTERISATION DE BIOFILMS FORMES EN EAU DE MER

Dans cette étude, l'eau de mer est à la fois le milieu d'exposition où se développent les biofilms et le milieu de mesure.

L'eau de mer est un milieu riche et complexe contenant en poids 3,5% de composés dissous (fig. §4.1). Onze espèces principales constituent 99,99% des composés dissous dont la proportion par rapport à la salinité est peu variable, excepté aux embouchures des fleuves (Aminot et Chaussepied, 1983). C'est un cadre propice pour le développement de la flore bactérienne.

A. Caractérisation d'un biofilm formé en eau de mer additionnée d'un nutriment

1. Conditions expérimentales

Le biofilm est développé sur quatre électrodes exposées dans une eau de mer prélevée en Rade de Brest (Océan Atlantique). Cette eau possède les caractéristiques suivantes :

- Salinité 35 ‰
- pH 8,2
- Oxygène naturellement dissous 8,5 mg.L⁻¹ (méthode de dosage Winkler, cf. Annexe)

Le *milieu d'exposition* des électrodes (fig. §4.2, photos §4.1) est continuellement renouvelé avec un débit 3 L.min⁻¹ ($\approx 0,3$ m.s⁻¹) et est protégé de la lumière du jour.

Afin d'améliorer le développement bactérien, de l'extrait de levure (élément nutritif) est additionné à l'eau de mer à un taux de 3,5 mg.L⁻¹. De plus, dans la même optique, la température de l'eau a été amenée à 18°C.

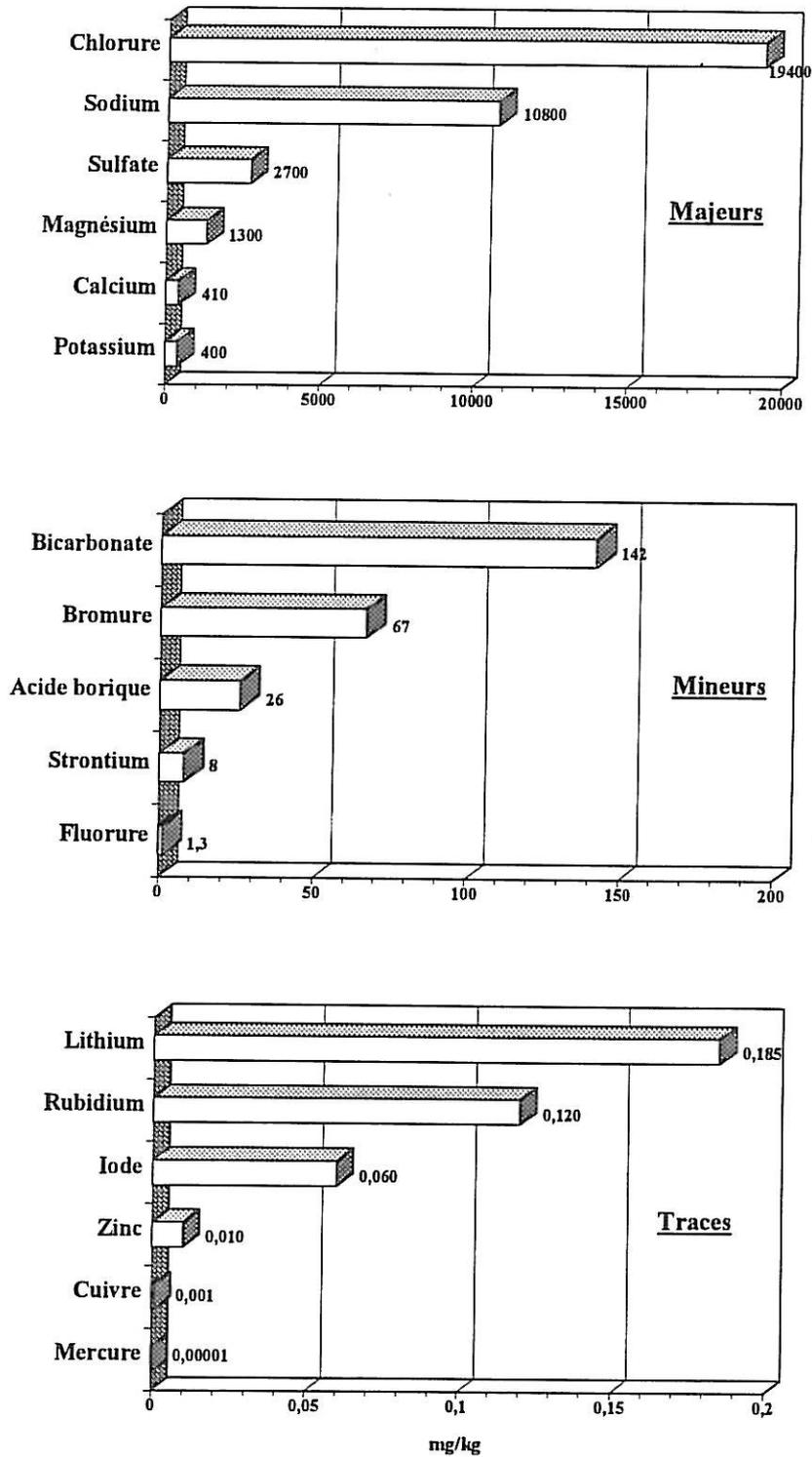


Figure §4.1: Grandes classes de composés dissous dans l'eau de mer naturelle (Aminot et Chaussepied, 1983).

Les *mesures* sont également réalisées à 18°C avec deux traceurs. Deux des électrodes sont testées avec le ferricyanure alors que les deux autres électrodes ont été testées avec l'oxygène. Les conditions expérimentales sont présentées dans le tableau §4.1.

Traceur $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$	Traceur oxygène
Eau de mer + $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6/\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ 10^{-2}M	Eau de mer Oxygène dissous $8,5 \text{ mg.L}^{-1}$
Potentiel de polarisation 0 mV/ECS	Potentiel de polarisation -900 mV/ECS

Tableau §4.1 : Conditions expérimentales lors des mesures électrochimiques.

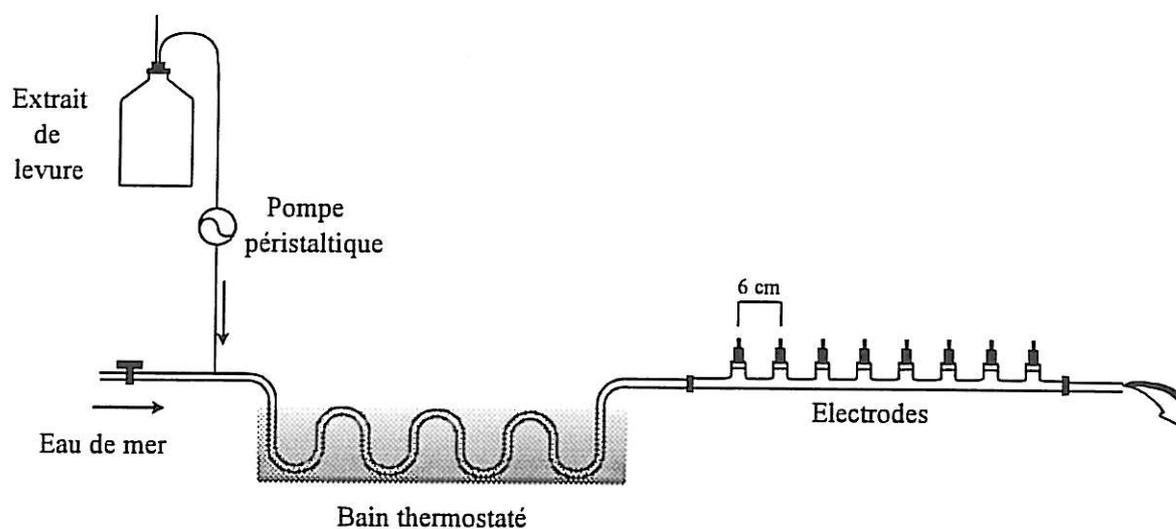
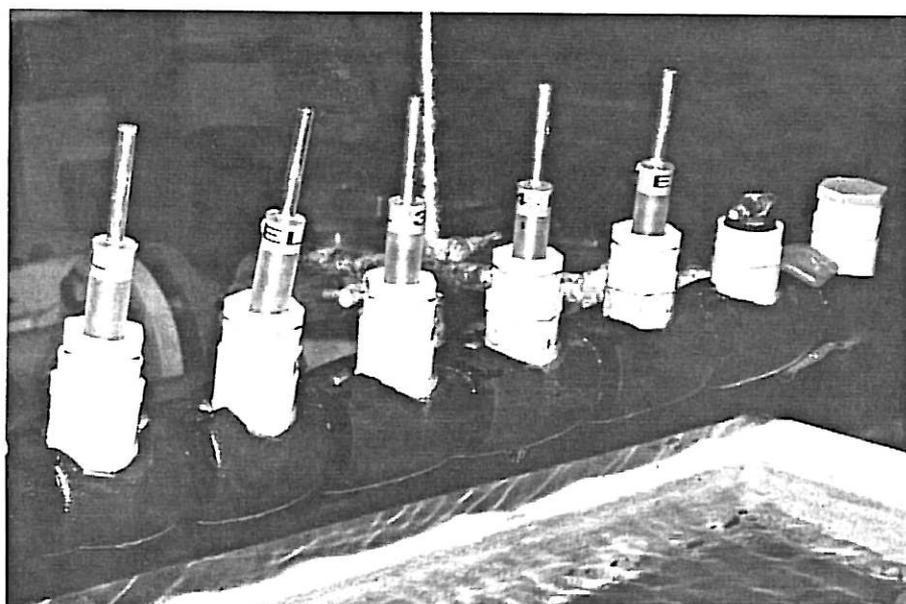
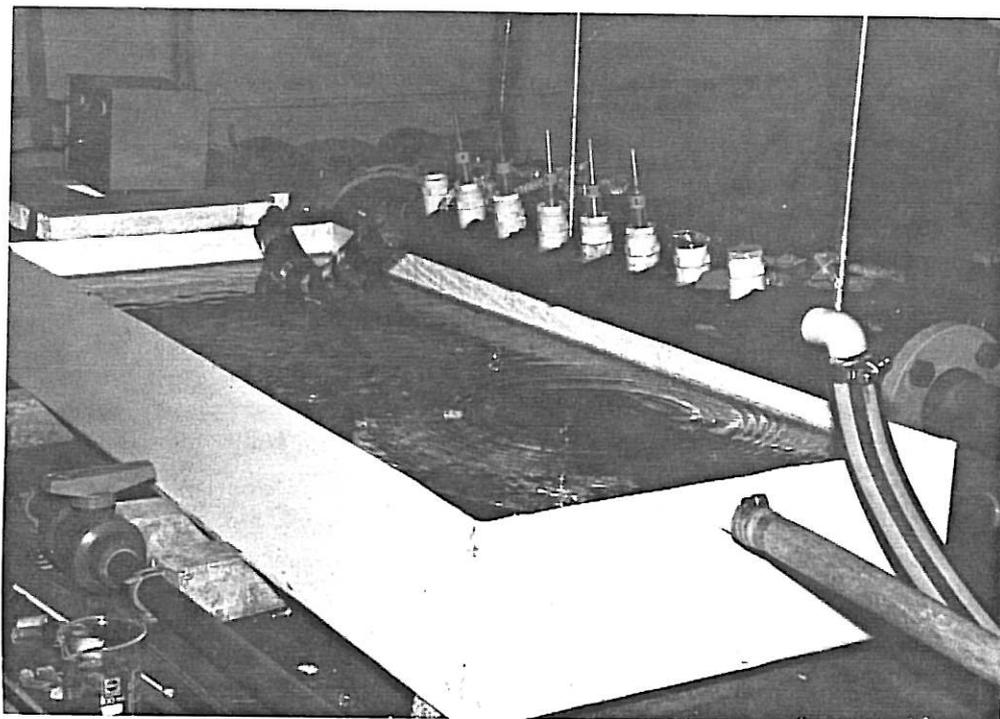


Figure §4.2 : Dispositif d'exposition des électrodes.



Photos §4.1 : Dispositif d'exposition des électrodes.

Le fait d'ajouter un produit chimique au milieu aurait pu aussi être un inconvénient notamment par son impact sur les espèces vivantes présentes dans le milieu d'étude. Cependant, une étude préliminaire réalisée au CIRSEE ^(b) / Lyonnaise des Eaux a montré l'innocuité $K_3Fe(CN)_6/K_4Fe(CN)_6$ vis à vis du monde bactérien (cf. Annexe).

L'oxygène, quant à lui, a l'avantage d'être naturellement présent dans la plus part des milieux d'étude : eau de mer, eaux douces naturelles, milieu biologique... et ne possède pas de toxicité particulière pour le biofilm.

2. Résultats et discussion

a) Traceur ferricyanure

➤ Régime stationnaire

Le courant limite de réduction de $Fe(CN)_6^{3-}$ en régime stationnaire est enregistré en fonction de $\sqrt{\Omega}$ à différents temps d'immersion.

Durant la période d'exposition, la gamme des courants mesurés diminue fortement. Les courants maxima obtenus pour une vitesse de rotation de 1200 tr.min^{-1} passent de 880 à $190 \mu\text{A}$ pendant que les courants minima mesurés pour des vitesses de rotation de 120 tr.min^{-1} passent de 260 à $90 \mu\text{A}$ (fig. §4.3). Les courants mesurés baissent fortement les 4 premiers jours. Une légère remontée peut être observée suivie d'une forte redescente des courants mesurés.

Les paramètres i_0 , i_{∞}^{-1} et K^{-1} sont déterminés par ajustement des données expérimentales au modèle et tracés en fonction du temps dans la figure §4.4.

(b) CIRSEE : Centre International de Recherche Sur l'Eau et l'Environnement

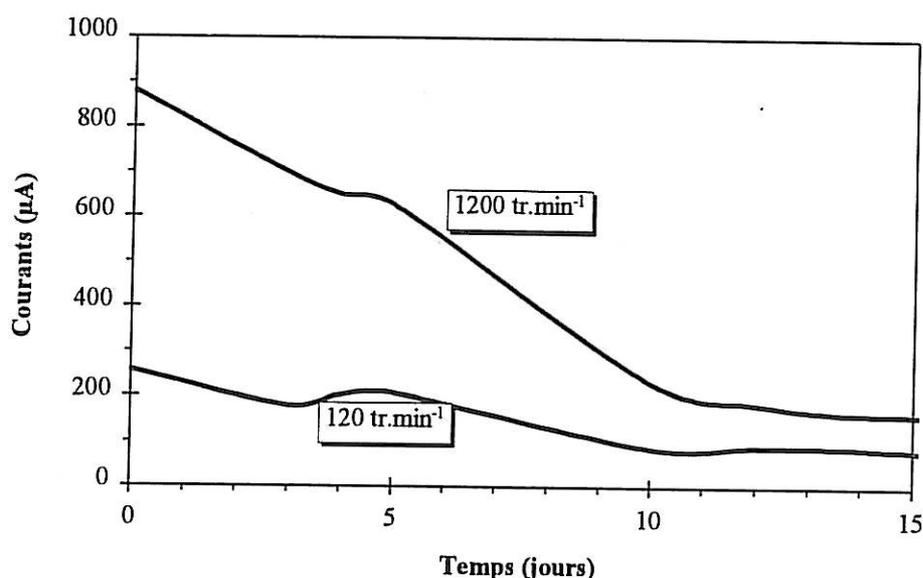


Figure §4.3 : Gamme des courants mesurés pour des vitesses de rotation s'échelonnant entre 120 et 1200 tr.min⁻¹ en fonction du temps d'immersion dans de l'eau de mer additionnée d'extrait de levure. Mesures réalisées dans une solution d'eau de mer + K₃Fe(CN)₆/K₄Fe(CN)₆ 10⁻²M (traceur Fe(CN)₆³⁻).

Sur la figure §4.4, un courant non diffusionnel i_0 apparaît puis augmente de manière significative lors des cinq premiers jours pour atteindre un plateau d'environ 40 µA. Le paramètre i_{∞}^{-1} , proportionnel à $\frac{\delta_f}{S D_f}$, monte régulièrement vers une valeur limite de $5 \cdot 10^{-3} \mu A^{-1}$. L'inverse du coefficient de Levich K^{-1} reste constant pendant 5 jours à une valeur de $0,04 \mu A^{-1} \cdot (\text{tr} / \text{min})^{-0,5}$ puis augmente pour atteindre une valeur moyenne $0,15 \mu A^{-1} \cdot (\text{tr} / \text{min})^{-0,5}$.

L'apparition d'un courant non diffusionnel peut avoir plusieurs explications. Une raison plausible est la production d'espèces chimiques électroactives par les microorganismes s'adsorbant sur la surface de l'électrode.

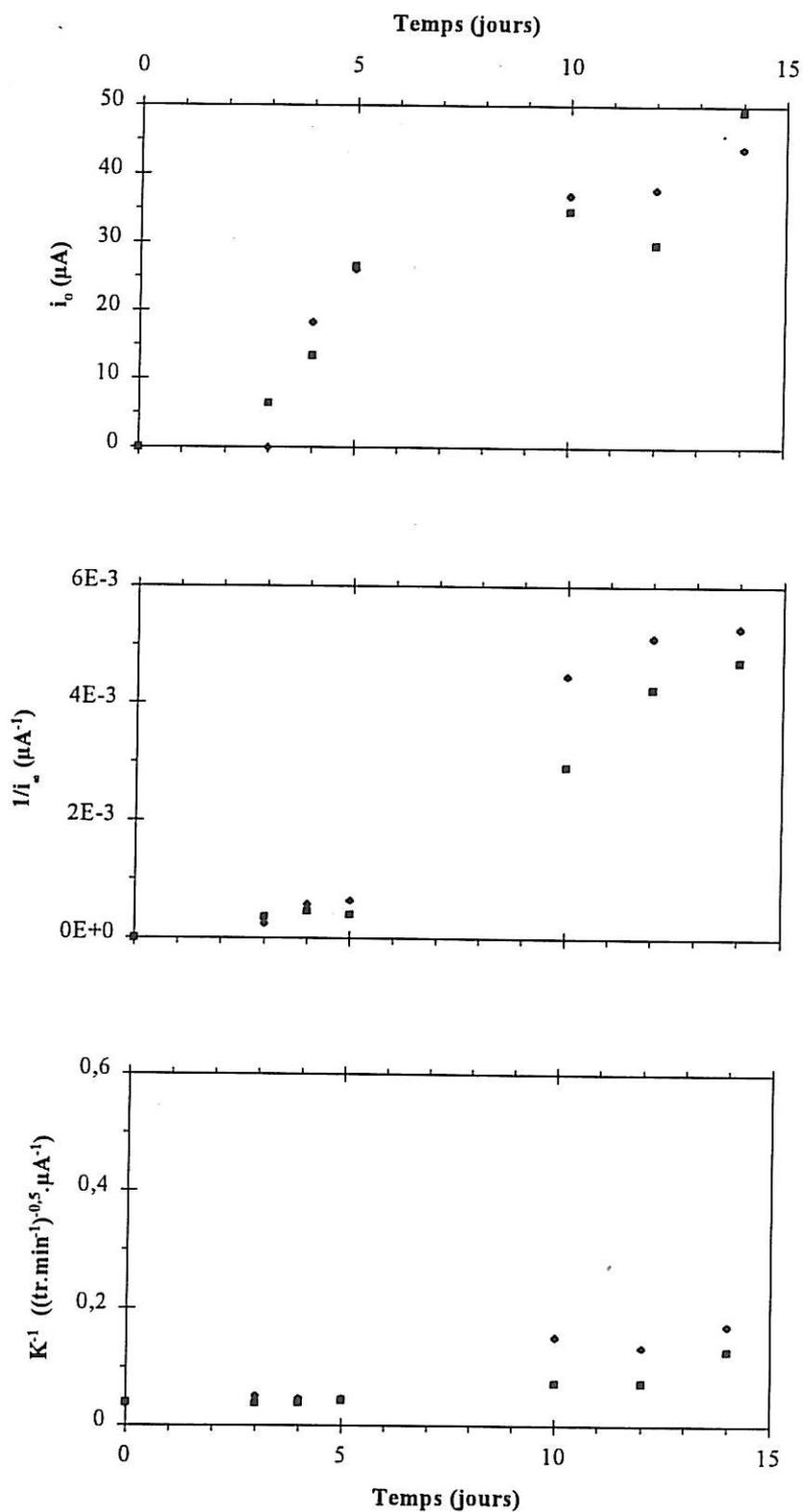


Figure §4.4 : i_0 , i_0^{-1} et K^{-1} en fonction du temps d'immersion dans l'eau de mer additionnée d'extrait de levure. Mesures réalisées dans une solution d'eau de mer + $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6/\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ 10^{-2}M (traceur $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$). Les symboles \blacklozenge et \blacksquare distinguent 2 électrodes différentes.

Le paramètre K^{-1} étant inversement proportionnel à la surface active apparente, son augmentation est vraisemblablement due à un blocage progressif de la surface de l'électrode. Dans le cas d'une électrode nue, l'inverse du coefficient de Levich peut rester inchangé alors que la surface est bloquée à plus de 50%. Par contre dans le cas d'une électrode recouverte d'une couche poreuse, ce coefficient est beaucoup plus sensible au blocage car il n'y a pas de convection dans la couche.

Ce blocage de la surface active peut être dû à l'adsorption sur la surface d'espèces chimiques produites par les microorganismes, de l'extrait de levure ou d'une substance présente naturellement dans l'eau.

La chute des courants mesurés devient telle au-delà du 15^e jour d'exposition que l'ajustement des données en régime stationnaire par rapport au modèle n'est plus possible. Ce phénomène marque une limitation actuelle de la technique.

➤ Impédance EHD

Les diagrammes de Bode obtenus en impédance EHD avec une électrode nue permettent de vérifier la réductibilité par la fréquence adimensionnelle p (fig. §4.5).

Les diagrammes obtenus pour un biofilm âgé de 12 jours (fig. §4.6) montrent que les données ne sont plus réductibles par la fréquence p . Les courbes sont déplacées vers de plus basses valeurs quand la vitesse de rotation de l'électrode augmente. De plus, les phases ne tendent pas vers une valeur limite lorsque la fréquence tend vers l'infini : elles restent des fonctions croissantes de la fréquence.

Ce comportement est cohérent avec une diffusion à travers une couche poreuse.

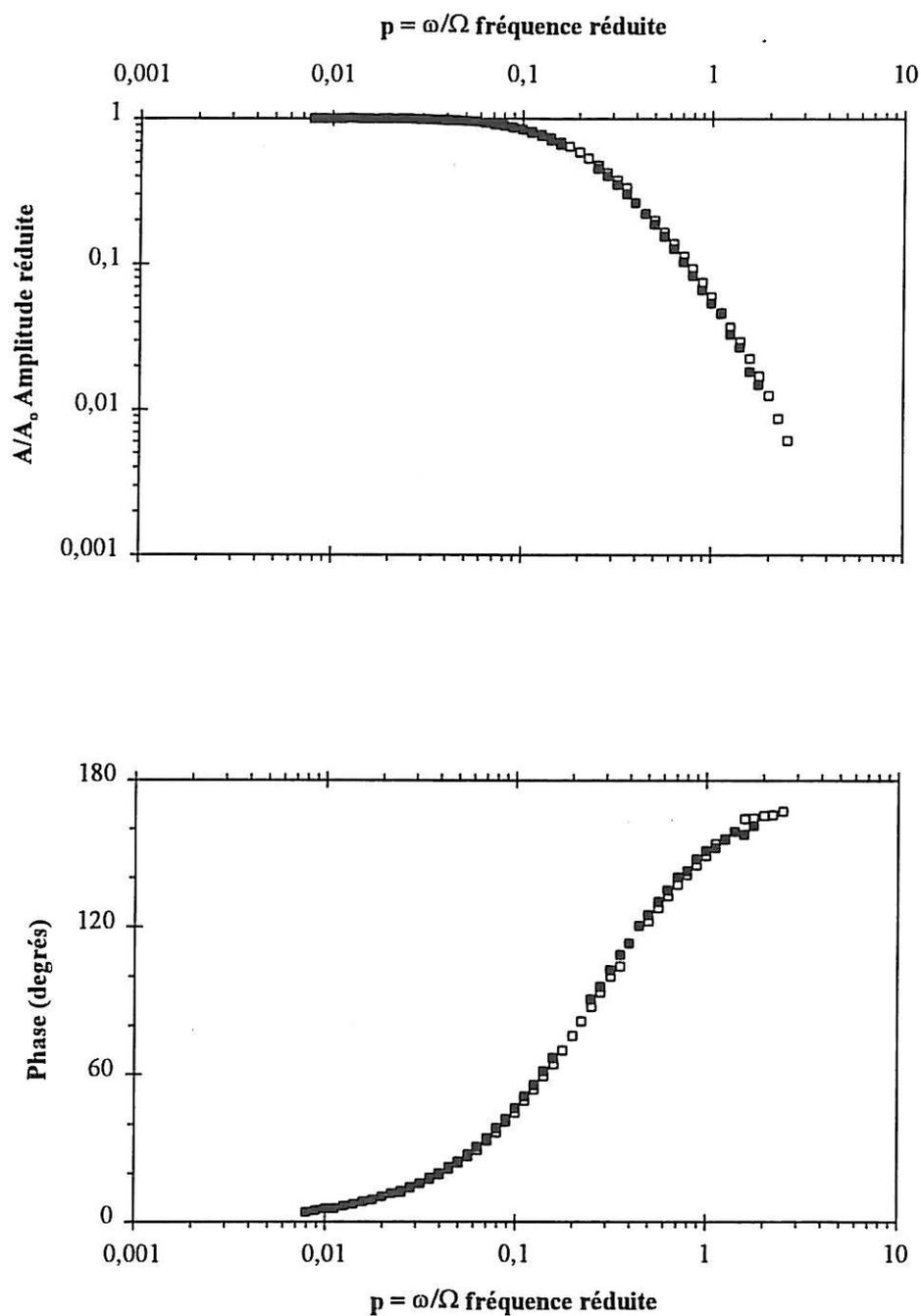


Figure §4.5 : Impédance EHD d'une électrode nue dans une eau de mer additionnée $K_3Fe(CN)_6/K_4Fe(CN)_6$ à différentes vitesses de rotation \square 600 et \blacksquare 1200 tr.min⁻¹. Mesures réalisées dans une solution d'eau de mer + $K_3Fe(CN)_6/K_4Fe(CN)_6$ 10⁻²M (traceur $Fe(CN)_6^{3-}$).

➤ Traitement des données

Dans le protocole élaboré pour l'étude de la couche de gélatine, le nombre de Schmidt Sc du traceur est déterminé préalablement afin de pouvoir le fixer lors de l'ajustement des données expérimentales EHD en présence de la couche poreuse.

A partir de l'inverse du coefficient de Levich, il est possible d'atteindre le coefficient de diffusion du ferricyanure ($5,6 \cdot 10^{-6} \text{ cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$) dans l'eau de mer et ainsi d'obtenir le nombre de Schmidt correspondant. Le nombre de Schmidt de 1800 ainsi déterminé est ensuite vérifié par ajustement des données obtenues en impédance EHD pour une électrode nue.

$Sc_{\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}} = 1800$ $D = 5,6 \cdot 10^{-6} \text{ cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$

En prenant $i_{\infty}^{-1} = 5 \cdot 10^{-3} \mu\text{A}^{-1}$ déterminé pour une électrode donnée au jour 12, l'équation §2.18 donne la vitesse de diffusion $\frac{D_f}{\delta_f} = 1,0 \cdot 10^{-3} \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}$. En fixant $Sc_{\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}}$ et $\frac{D_f}{\delta_f}$ suivant les valeurs prédéterminées, l'analyse des données EHD suivant l'expression §2.36 permet de calculer le temps de diffusion $\frac{\delta_f^2}{D_f}$ pour chaque vitesse de rotation (tableau §4.1).

Ω (tr.min ⁻¹)	$\frac{\delta_f^2}{D_f}$ (s)
600	4,24
1200	5,96

Tableau §4.1 : Temps de diffusion $\frac{\delta_f^2}{D_f}$ ajustés à partir des données expérimentales pour une électrode recouverte d'un biofilm de 12 jours (traceur $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$).

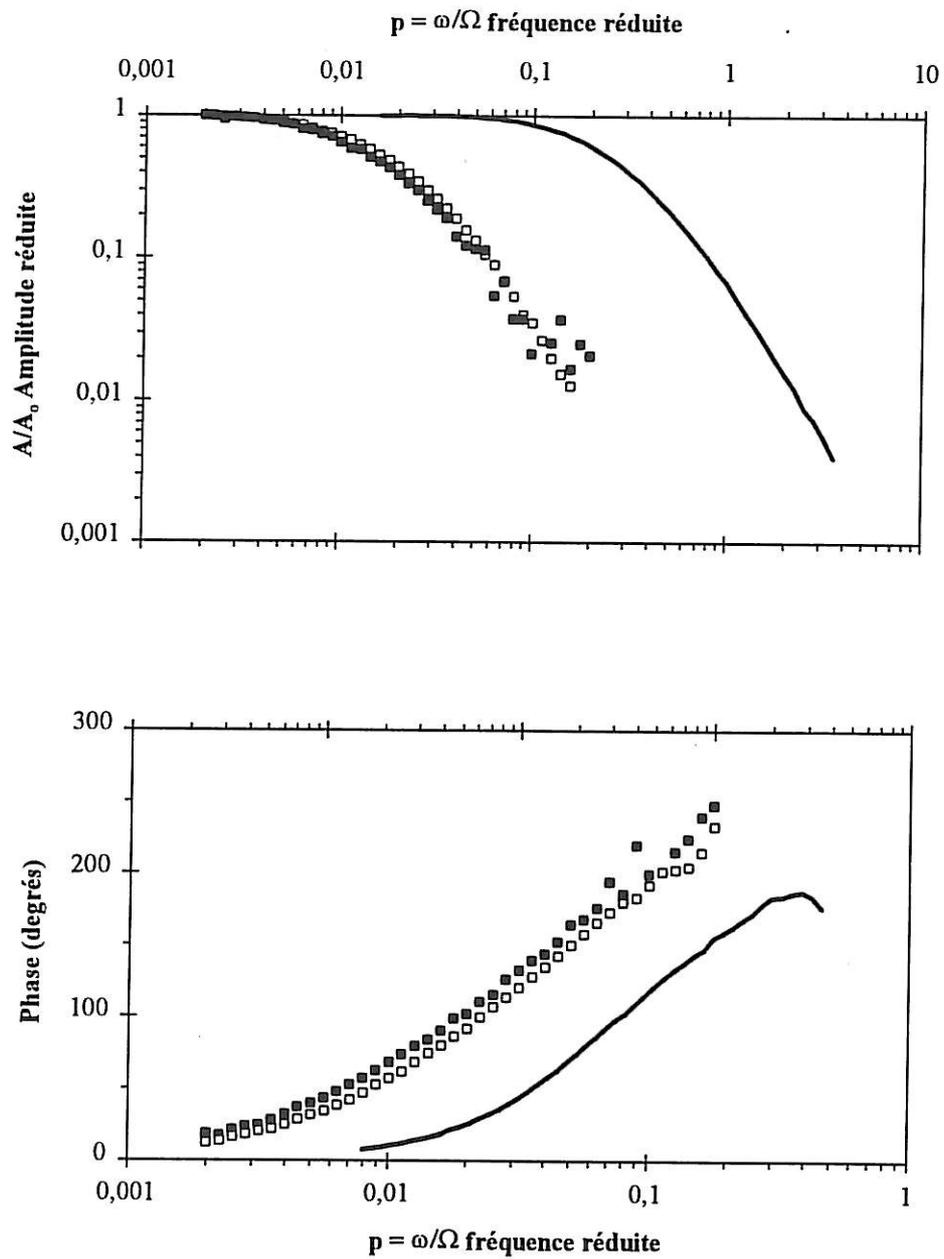


Figure §4.6 : Impédance EHD d'une électrode d'or exposée 12 jours dans une eau de mer additionnée d'extrait de levure à différentes vitesses de rotation \square 600, \blacksquare 1200 $\text{tr}\cdot\text{min}^{-1}$ comparée au diagramme obtenu pour une électrode nue — aux mêmes vitesses de rotation. Mesures réalisées dans une solution d'eau de mer + $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6/\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ 10^{-2}M (traceur $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$).

Néanmoins, connaissant le temps et la vitesse de diffusion dans la couche poreuse ainsi que le nombre de Schmidt, l'épaisseur, le coefficient de diffusion du traceur dans le film peuvent être alors calculés (tableau §4.2).

Ω (tr.min ⁻¹)	δ_f (μm)	D_f (cm ² .s ⁻¹)
600	60	6,0 10 ⁻⁶
1200	43	4,3 10 ⁻⁶

Tableau §4.2 : Epaisseur et coefficient de diffusion calculés à partir des données expérimentales pour une électrode recouverte d'un biofilm de 12 jours (traceur Fe(CN)₆³⁻).

Les valeurs calculées du coefficient de diffusion dans la couche sont distribuées et la valeur de 6,0 10⁻⁶ cm².s⁻¹ est surestimée car elle ne peut être supérieure à celle du coefficient de diffusion dans la solution. La valeur moyenne du coefficient de diffusion du traceur dans la couche poreuse 5,1 ± 0,9 10⁻⁶ cm².s⁻¹ est voisine de celle mesurée dans la solution électrolytique qui est de 5,6 10⁻⁶ cm².s⁻¹. Ceci est cohérent avec une très grande porosité ϵ qui est ici d'environ 0,95 (éq. §3.2). Ce résultat est en accord avec le fait que la biomasse contient plus de 95% d'eau (Christensen et Characklis, 1990).

Dans ce travail, compte tenu de la précision accessible, les coefficients de diffusion dans le biofilm et l'eau de mer seront considérés comme équivalents et égaux à 5,6 10⁻⁶ cm².s⁻¹.

$$D_f = D = 5,6 \cdot 10^{-6} \text{ cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$$

Il est alors possible de suivre l'évolution de l'épaisseur du voile biologique dans le temps à partir de la détermination de la vitesse de diffusion obtenue avec de simples mesures stationnaires. A partir de l'équation §2.16 et en prenant :

- $n = 1$

- $S = 0,196 \text{ cm}^2$
- $D_f = 5,6 \cdot 10^{-6} \text{ cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$
- $c_\infty = 10^{-5} \text{ M}$

les épaisseurs sont déterminées et représentées en fonction du temps d'exposition dans la figure §4.7.

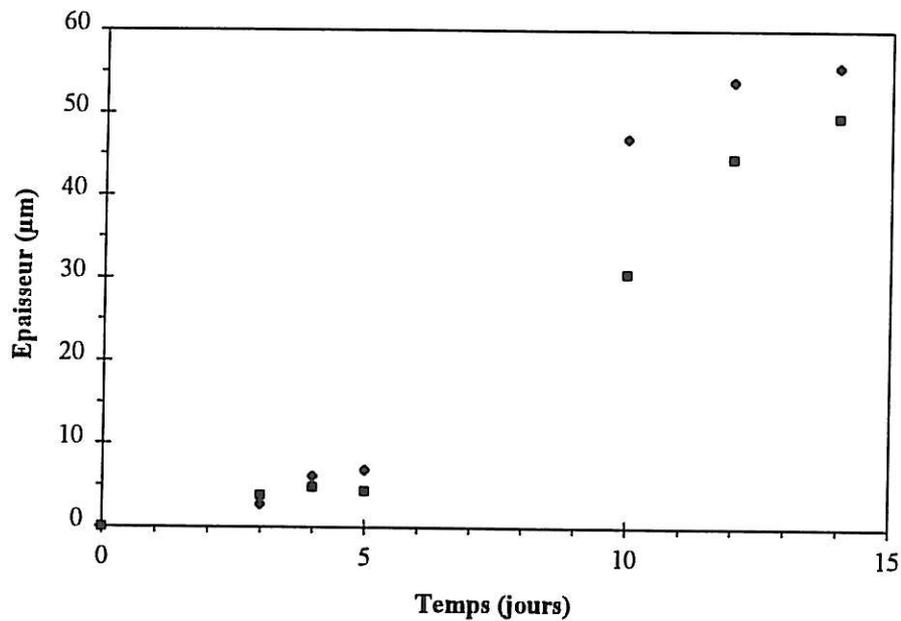


Figure §4.7 : Épaisseur du biofilm en fonction du temps d'exposition en eau de mer additionnée d'extrait de levure. Mesures réalisées dans une solution d'eau de mer + $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6/\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ 10^{-2} M (traceur $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$). Les symboles ♦ et ■ distinguent 2 électrodes différentes.

Ce calcul est réalisé en prenant comme hypothèse que la surface active S de l'électrode est constante dans le temps.

Il est possible de prendre comme hypothèse que dans le cas d'une électrode recouverte d'une couche poreuse, K^{-1} est proportionnelle à la surface apparente active. En effet, une électrode dont la surface est partiellement bloquée et non recouverte d'une couche poreuse présente un coefficient K^{-1} identique à celui déterminé avec une électrode

active. Par contre, dans le cas d'une électrode recouverte d'une couche poreuse, la variation de K^{-1} peut être attribuée à la diminution de la surface active.

En prenant l'inverse du coefficient de Levich (fig. §4.3) inversement proportionnel à la surface active apparente, S diminue durant la période d'exposition. En considérant qu'au jour 0, la surface est complètement active c'est-à-dire égale à $0,196 \text{ cm}^2$, il est possible de calculer l'évolution de la surface en fonction du temps d'immersion (fig. §4.8). La surface ne représente plus que 20 à 30% de sa valeur initiale après 2 semaines d'exposition.

La surface S intervient dans l'expression §2.16 exprimant i_{∞}^{-1} . La prise en compte de cette variation de la surface active apparente amène à recalculer l'épaisseur du biofilm durant la période d'exposition (fig. §4.9). Les épaisseurs ainsi déterminées sont plus faibles par rapport aux premières estimations avec des valeurs maximales d'environ $15 \mu\text{m}$.

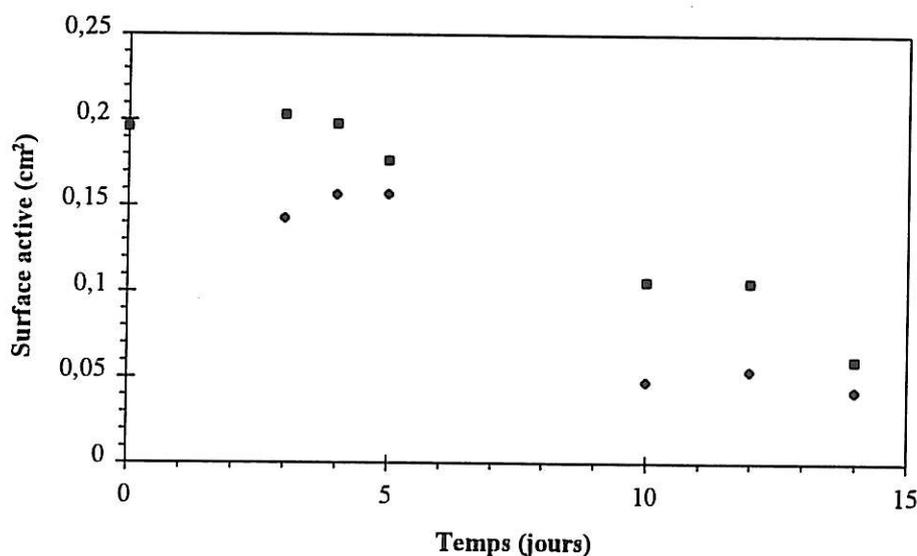


Figure §4.8 : Surface active apparente de l'électrode en fonction du temps d'exposition en eau de mer additionnée d'extrait de levure. Mesures réalisées dans une solution d'eau de mer + $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6/\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ 10^{-2}M (traceur $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$). Les symboles \blacklozenge et \blacksquare distinguent 2 électrodes différentes.

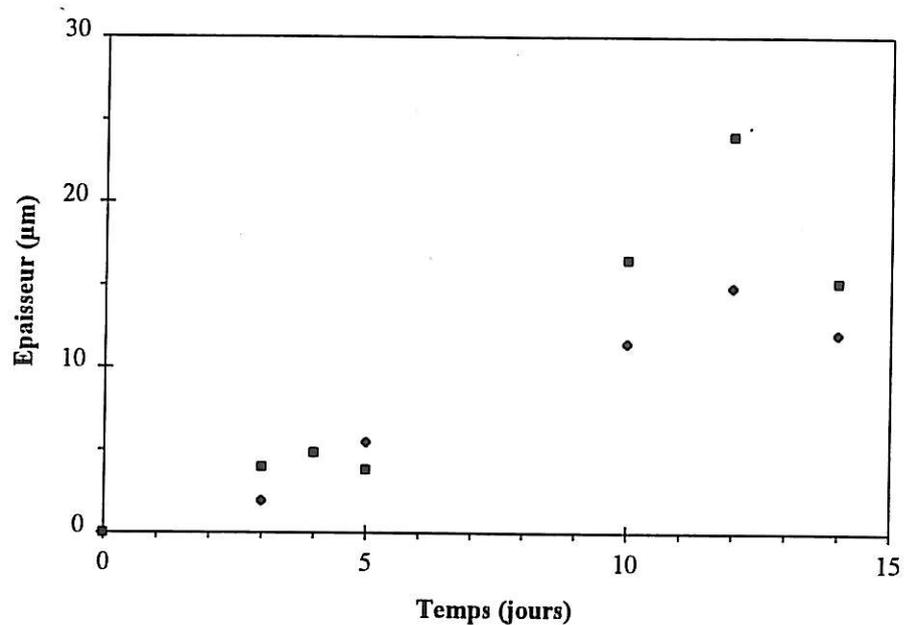


Figure §4.9 : Epaisseur du biofilm en fonction du temps d'exposition en eau de mer additionnée d'extrait de levure. Calculs réalisés en tenant compte de la surface active apparente de l'électrode à partir de mesures réalisées dans une solution d'eau de mer + $K_3Fe(CN)_6/K_4Fe(CN)_6$ $10^{-2}M$ (traceur $Fe(CN)_6^{3-}$). Les symboles ♦ et ■ distinguent 2 électrodes différentes.

b) Traceur oxygène

➤ Régime stationnaire

Une procédure identique à celle décrite pour le traceur $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$ est réalisée avec le traceur oxygène.

Durant la période d'exposition, la gamme des courants mesurés (fig. §4.10) diminue fortement dans un phénomène semblable à celui décrit pour le traceur $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$. Les courants maxima obtenus pour une vitesse de rotation de 1200 tr.min^{-1} passent de 160 à $40 \mu\text{A}$ pendant que les courants minima mesurés pour une vitesse de rotation de 120 tr.min^{-1} passent de 50 à $20 \mu\text{A}$. Les courants mesurés baissent les 4 premiers jours puis réaugmentent pour ensuite rediminuer de nouveau. La remontée des courants observée entre le jour 3 et le jour 5 est très marquée.

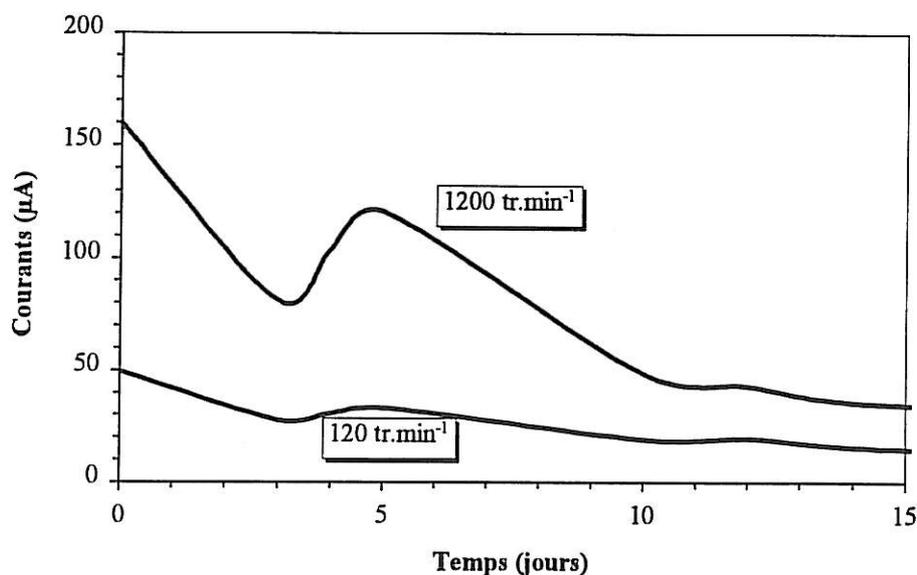


Figure §4.10: Gamme des courants mesurés pour des vitesses de rotation s'échelonnant entre 120 et 1200 tr.min^{-1} en fonction du temps d'immersion pour des électrodes immergées dans de l'eau de mer additionnée d'extrait de levure. Mesures réalisées dans une solution d'eau de mer (traceur oxygène).

Les 3 paramètres i_0 , i_{∞}^{-1} et K^{-1} ont été déterminés par ajustement des données expérimentales en régime stationnaire et tracés en fonction du temps (fig. §4.11).

Le courant non diffusionnel i_0 subit une augmentation dans les cinq premiers jours d'immersion pour atteindre un plateau d'environ $6 \mu\text{A}$. La valeur de i_0 obtenue pour une électrode nue au jour 0 est proche de zéro montrant ainsi une contribution très faible du courant de réduction des protons. Sur la même période, le paramètre i_{∞}^{-1} monte régulièrement pour atteindre une valeur limite de $3 \cdot 10^{-2} \mu\text{A}^{-1}$. L'inverse du coefficient de Levich K^{-1} augmente régulièrement d'une valeur de $0,19 \mu\text{A}^{-1} \cdot (\text{tr} / \text{min})^{-0,5}$ pour atteindre une valeur moyenne de $0,77 \mu\text{A}^{-1} \cdot (\text{tr} / \text{min})^{-0,5}$.

Ces observations confirment le blocage de la surface active apparente déjà observé dans le cas des électrodes testées avec le $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$. De plus, comme dans le cas du ferricyanure, le courant non diffusionnel augmente durant le temps de l'expérience. Les arguments avancés dans le cas du traceur précédent expliquent ce phénomène.

➤ Traitement des données

En se basant sur les résultats obtenus avec le traceur $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$, les coefficients de diffusion de l'oxygène dans le biofilm et dans la solution électrolytique sont supposés identiques. Cette hypothèse postule une très grande porosité du biofilm.

Le coefficient de diffusion de l'oxygène est évalué à $1,4 \cdot 10^{-5} \text{cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ (c'est-à-dire $Sc_{\text{O}_2} = 700$) à partir du paramètre K^{-1} .

$$\begin{array}{l} Sc_{\text{O}_2} = 700 \\ D_f = D = 1,4 \cdot 10^{-5} \text{cm}^2 \cdot \text{s}^{-1} \end{array}$$

Tout comme les calculs réalisés pour le traceur $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$, il est alors possible de suivre l'évolution de l'épaisseur du voile biologique dans le temps à partir de la détermination de la vitesse de diffusion obtenue avec de simples mesures stationnaires.

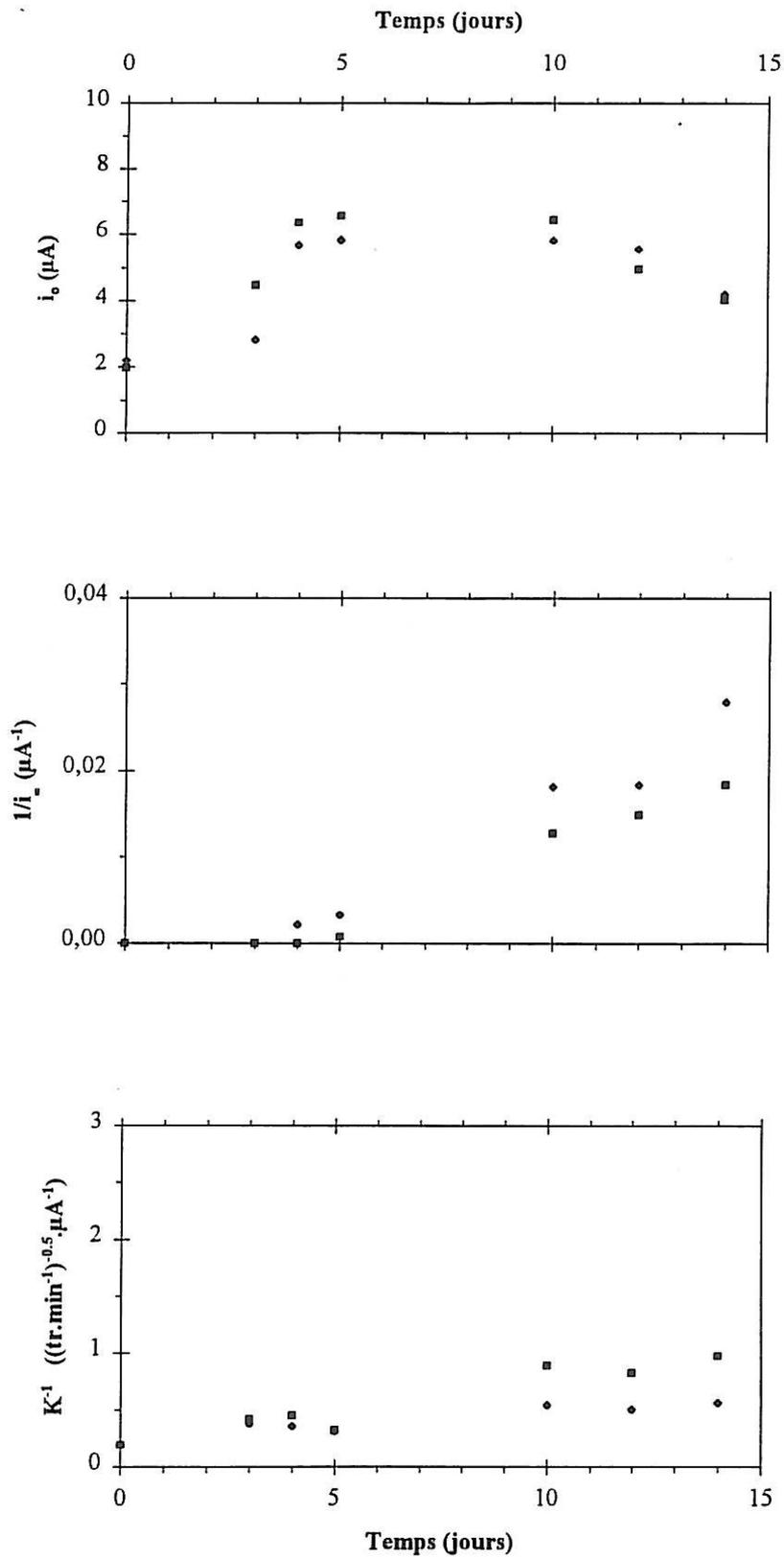


Figure §4.11 : i_0 , i_0^{-1} et K^{-1} en fonction du temps d'immersion dans l'eau de mer additionnée d'extrait de levure. Mesures réalisées dans une solution d'eau de mer (traceur oxygène). Les symboles ♦ et ■ distinguent 2 électrodes différentes.

L'inverse du coefficient de Levich étant inversement proportionnel à la surface active apparente, S diminue durant la période d'exposition. En considérant qu'au jour 0, la surface est complètement active, il est possible de calculer l'évolution de la surface en fonction du temps d'immersion. (fig. §4.12).

A partir de l'expression §2.17 exprimant i_{∞}^{-1} et en tenant compte de la variation de la surface active, l'épaisseur du biofilm est calculée durant la période d'exposition (fig. §4.13).

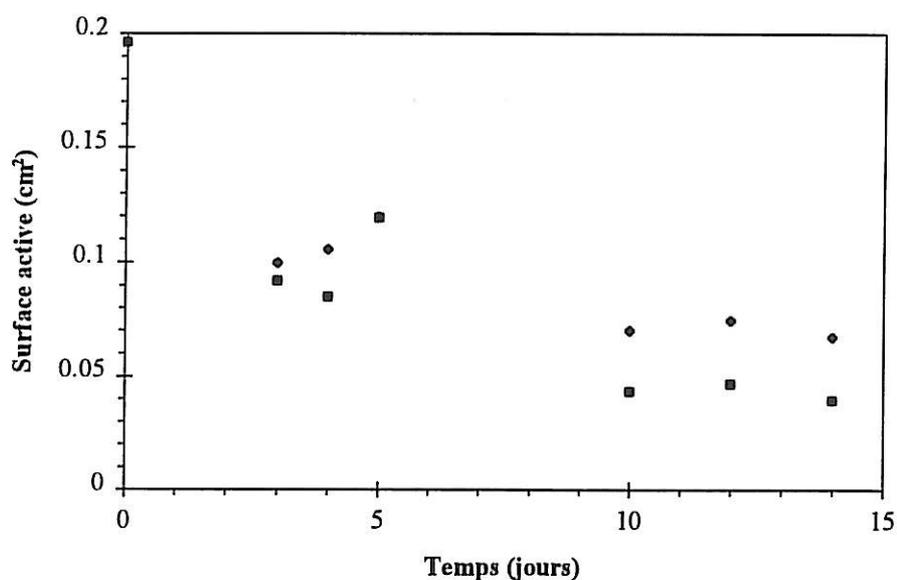


Figure §4.12 : Surface active apparente de l'électrode en fonction du temps d'exposition en eau de mer additionnée d'extrait de levure. Mesures réalisées dans une solution d'eau de mer (traceur oxygène).

c) Comparaison des épaisseurs obtenues avec les deux traceurs

Les résultats obtenus avec les deux traceurs, l'oxygène et le ferricyanure, sont comparés sur la figure §4.14.

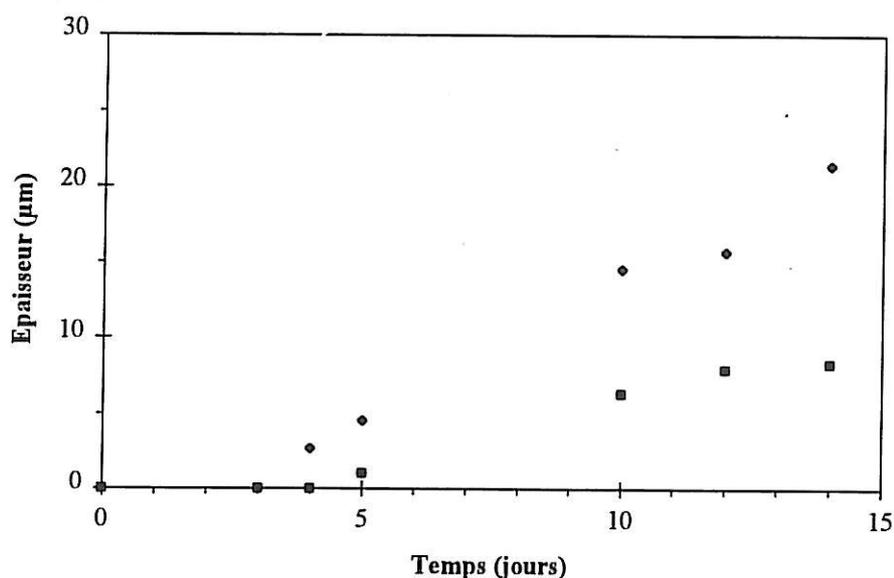


Figure §4.13 : Epaisseur du biofilm en fonction du temps d'exposition en eau de mer additionnée d'extrait de levure. Calculs réalisés à partir mesures réalisées dans une solution d'eau de mer (traceur oxygène) en tenant compte de la surface active apparente de l'électrode.

A la précision des mesures près, les épaisseurs relevées sont en bon accord. La dispersion des mesures peut être attribuée en premier lieu à un développement différent de la biomasse sur les électrodes testées. Les conditions expérimentales ne sont pas rigoureusement analogues d'un emplacement à l'autre dans le système d'exposition. Les films bactériens ne sont pas identiques d'une surface à l'autre.

A partir des épaisseurs calculées avec les deux traceurs, l'allure générale de l'évolution de la biomasse en fonction du temps d'exposition en eau de mer est donnée sur la figure §4.14. Ce diagramme est comparable à la figure §1.1 présentant les différentes étapes de formation du biofilm (Characklis, 1990).

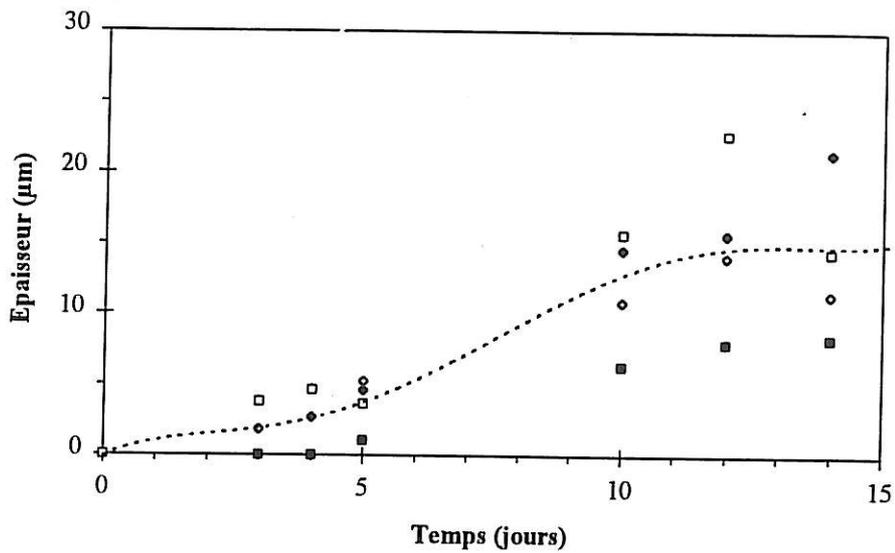


Figure §4.14 : Comparaison des épaisseurs du biofilm en fonction du temps d'exposition en eau de mer additionnée d'extrait de levure testées avec les traceurs $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$ (symboles blancs) et oxygène (symboles noirs). Les symboles correspondent aux points expérimentaux et la courbe en pointillée à l'allure générale de l'évolution de l'épaisseur du biofilm.

➤ Observations au MEB

Des observations au Microscope Electronique à Balayage (photos §4.2) sur la surface des électrodes ont fait apparaître une population bactérienne importante et de types morphologiques variés :

- formes coccoïdes
- formes en bâtonnet de tailles variables
- formes filamenteuses
- formes phytoplanctoniques et zooplanctoniques.

L'aspect général de la surface montre des dépôts importants de matière particulaire. Le biofilm est épais et compacté sous forme d'une croûte visible dans l'arrière plan des photos. Cet écrasement de la biomasse peut être attribué à la technique de préparation des

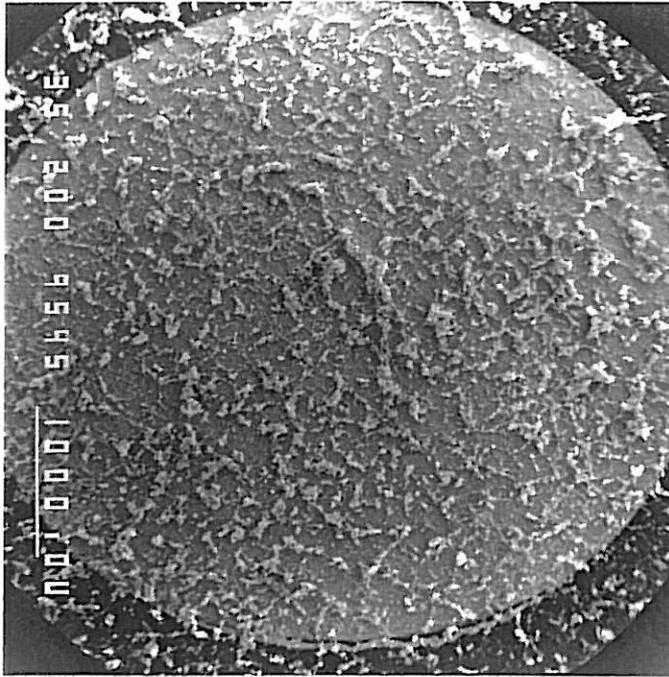
échantillons (protocole, cf Annexe). Des formes filamenteuses et des formes "en baguette" au contour bien défini recouvrent le biofilm compacté. Ces corps en baguette peuvent correspondre à des formes cristallines ou plus probablement à des algues unicellulaires de type diatomée pennée.

Des cultures ont été réalisées à partir de prélèvements effectués sur les électrodes. Les densités bactériennes sur la surface des électrodes sont de :

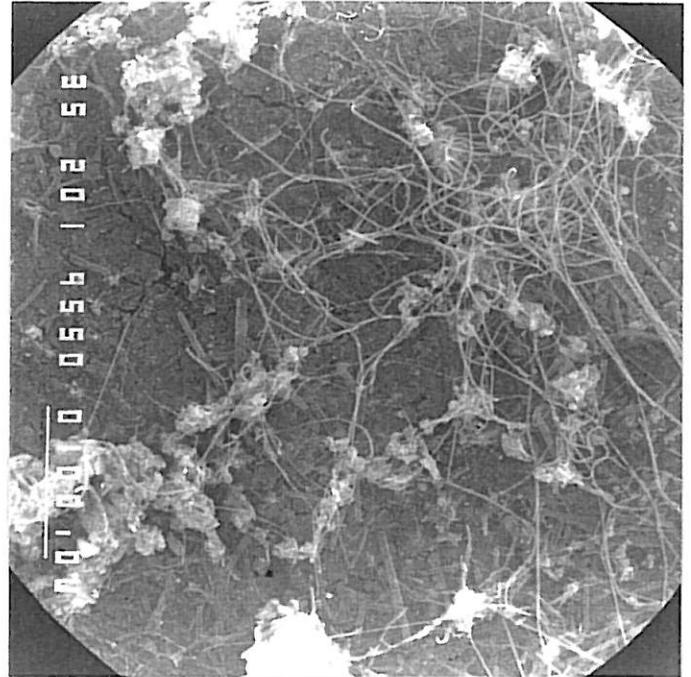
• microflore aérobie	4,8 10 ⁸ /cm ²
• microflore anaérobie facultative	7,9 10 ⁶ /cm ²
• microflore anaérobie stricte	7,0 10 ⁴ /cm ²
• traces de champignons	5,5 10 ² /cm ²

Ces observations au MEB confirment la présence d'un biofilm relativement épais détecté à l'aide de la méthode électrochimique. Le voile biologique montre une homogénéité globale. Les petits amas constituant la biomasse peuvent expliquer le blocage de la surface.

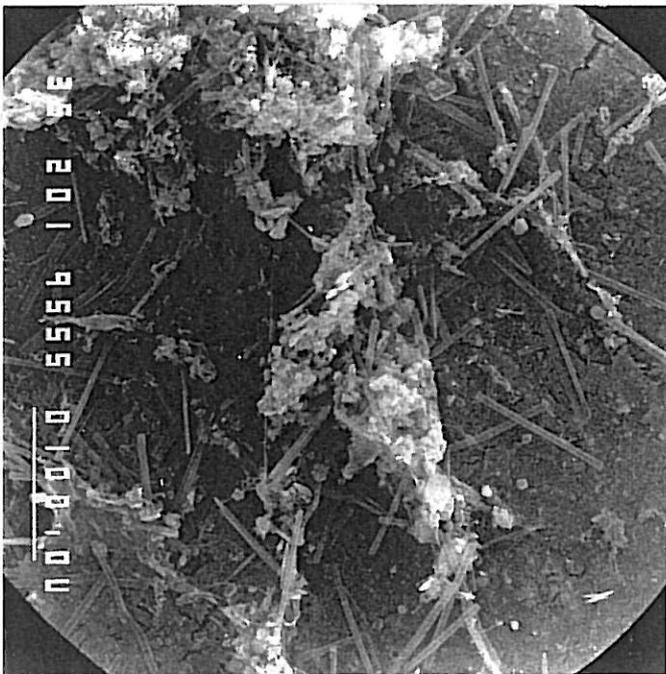
Les observations au MEB des biofilms n'apportent pas des renseignements comparables avec ceux déterminés par la technique électrochimique développée dans cette étude. Le MEB permet l'observation de la répartition des amas bactériens mais a l'inconvénient de modifier la morphologie du biofilm lors de la phase de préparation des échantillons.



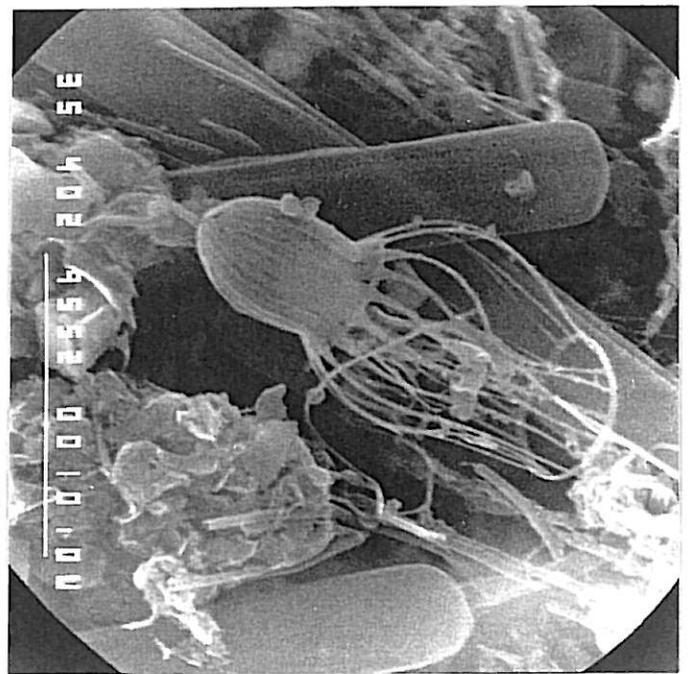
(a)



(b)



(c)



(d)

Photo §4.2 : Observations au MEB de la surface d'une électrode après 19 jours d'exposition en eau de mer additionnée d'extrait de levure : (a) Aspect générale de la surface, (b), (c) et (d) détails. L'échelle représentée sur la partie gauche des photos par un trait blanc correspond à une dimension de 1000 μm prise pour la photo (a) , de 100 μm pour les photo (b) et (c) et de 10 μm pour la photo (d).

B. Etude en milieu stérile

La technique mise au point avec la couche modèle et expérimentée avec un biofilm nécessite comme toute méthode de mesure à être étalonnée. Pour cela, il est indispensable de déterminer le *zéro* et la sensibilité de la technique. La vérification du zéro est bien sûr faite à l'aide d'une électrode nue, immédiatement après immersion. Par contre, les éventuelles fluctuations de l'état de surface de l'électrode et de sa réactivité en fonction du temps d'exposition ne peuvent être quantifiées que si celle-ci reste exempte de couche poreuse. Cette condition ne peut être réalisée que dans un milieu stérile. Ces modifications se traduisent par une incertitude sur la valeur des paramètres calculés et fournissent le seuil de détection de la méthode.

La mise en oeuvre des mesures en milieu stérile n'est pas aisée. Plusieurs impératifs doivent être pris en compte :

- Etablissement, maintien et contrôle du milieu stérile
- Réalisation des mesures électrochimiques

L'établissement et le contrôle des conditions de stérilité nécessitent à la fois des connaissances, un savoir-faire et des équipements propres à un laboratoire de microbiologie. Aussi ce travail a été effectué au Laboratoire d'Océanographie Biologique d'Arcachon de l'Université de Bordeaux I.

1. Conditions expérimentales

a) Montage expérimental

La principale difficulté vis à vis de la stérilité du milieu était l'étanchéité de la cellule tout en laissant possible la rotation de l'électrode tournante. Il a été nécessaire d'imaginer et de réaliser une cellule électrochimique adaptée à ces contraintes. Cette cellule a été conçue par le service Bureau d'Etude et Conceptions Prototypes de l'IFREMER (Brest) et réalisée à la Verrerie Prémont (Bordeaux).

Le principe de la cellule réside dans la mise en place d'un joint tournant liquide (fig. §4.15). Une gorge a été réalisée dans le couvercle de la cellule autour de l'orifice servant à l'insertion de l'électrode de travail. Les bords d'un cylindre fixé de manière étanche sur cette électrode viennent s'insérer dans la gorge remplie d'alcool.

La cellule comporte différents circuits permettant le renouvellement de l'eau de mer stérile, l'aération de la cellule et la régulation de la température du milieu. De plus, deux accès ont été aménagés dans le corps de la cellule pour permettre l'introduction de l'électrode de référence et de la contre-électrode. L'étanchéité entre le corps de la cellule et son couvercle ainsi que des différents accès est assurée par des joints Sovirel et par application de graisse silicone.

La cellule électrochimique est incluse dans un dispositif permettant le renouvellement du milieu à raison de 10% par heure par l'intermédiaire de pompes péristaltiques (fig. §4.16).

Un flacon stérile de 10 L d'eau de mer stérile alimente le circuit. Cette eau de mer est aérée à l'aide d'une pompe et d'un bulleur. L'air est filtré à l'aide d'un filtre de 0,3 μm . Tous les 10 jours, le circuit est arrêté pendant 24 h lors du remplacement du flacon d'alimentation. Deux raccords munis de clapets d'arrêt sont ajoutés au flacon d'alimentation pour permettre les prélèvements et les additions.

Les rejets sont récupérés dans un second flacon stérile d'une contenance de 10 L comportant une entrée pour la récupération des effluents et une sortie d'air avec un filtre de 0,3 μm .

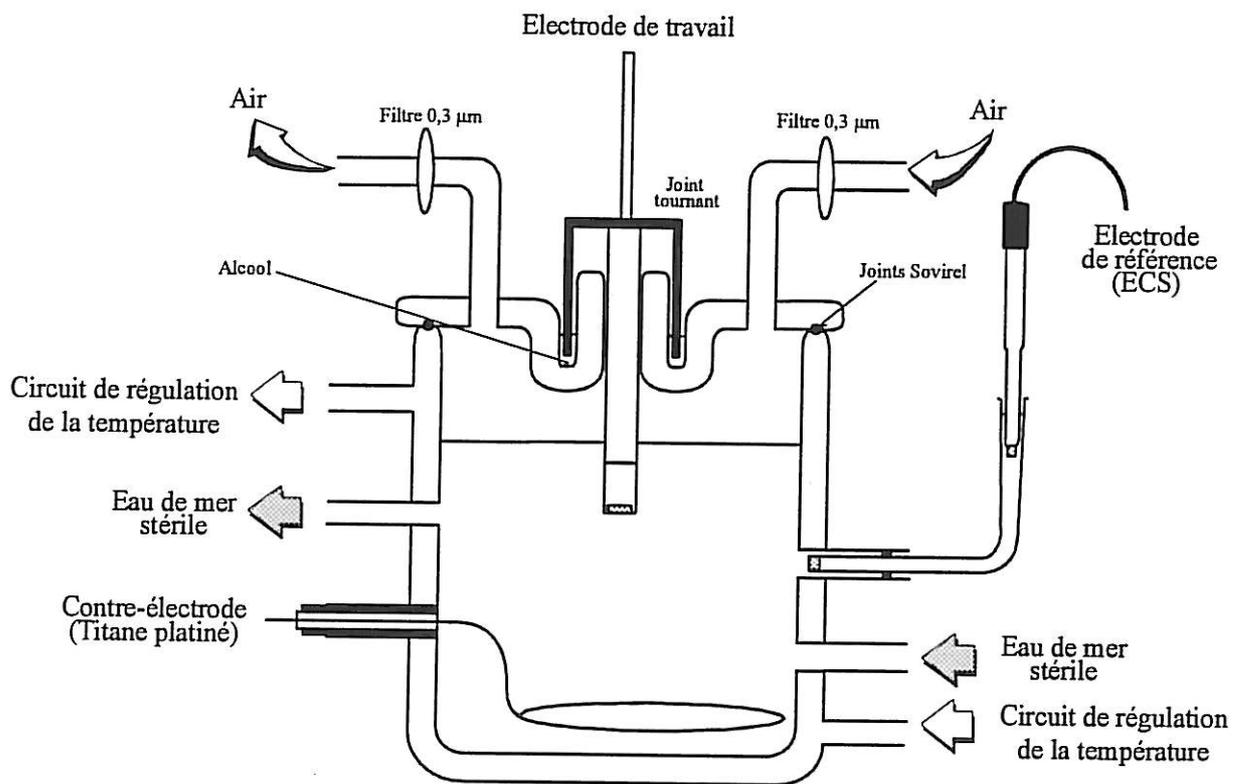


Figure §4.15: Cellule électrochimique pour réaliser des mesures à l'aide d'une électrode à disque tournant en milieu stérile.

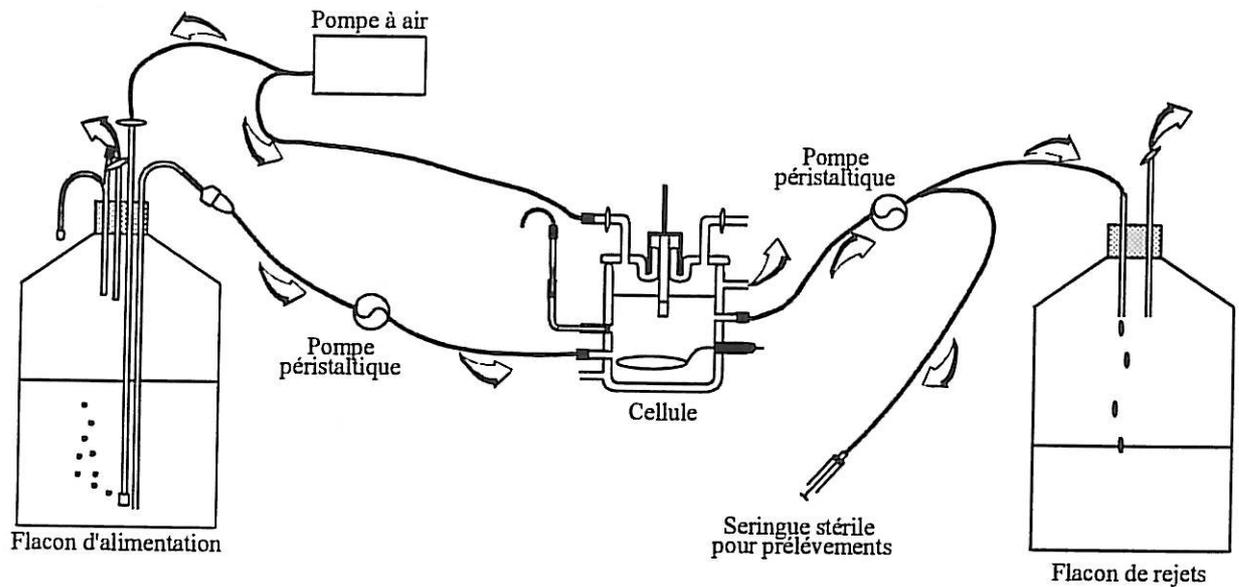


Figure §4.16: Circuit de renouvellement du milieu comportant un flacon d'alimentation et un flacon de rejets, une cellule électrochimique et des pompes à air et péristaltiques.

b) Procédures de stérilisation

Le protocole de *stérilisation du montage* est identique pour les flacons, la cellule électrochimique, les tuyaux de raccordement et les électrodes de travail et auxiliaire.

Les ouvertures sont fermées à l'aide de coton cardé et de papier aluminium et les raccords ont été protégés à l'aide de papier aluminium. Tous ces éléments sont alors autoclavés pendant une période de 20 min à une température de 121°C et sous une pression de 1 bar (Brock et Madigan, 1991). Après autoclavage, le dispositif est installé sous hotte à flux laminaire à proximité d'une flamme, la hotte étant stérilisée par rayons UV.

La méthode de *stérilisation de l'eau de mer* utilisée dans le Laboratoire d'Océanographie Biologique d'Arcachon est basée sur une technique proposée par Little *et al.* (1987).

L'eau de mer est prélevée dans le Bassin d'Arcachon (Océan Atlantique) à marée montante. La turbidité de cette eau provenant du large est moins élevée que celle prélevée dans le fond du Bassin d'Arcachon. De plus, une décantation de 2 à 3 jours permet d'éliminer une part importante des particules en suspension dans le prélèvement. Le pH de la solution est alors mesuré.

La stérilisation de l'eau de mer se déroule en deux temps :

- *filtration*
- *autoclavage*

L'eau est passée successivement sur des filtres 0,45 μm et 0,2 μm . Cette première étape permet l'élimination des précipités éventuellement présents dans l'eau et de la majorité des bactéries, la taille des microorganismes étant généralement supérieure à 0,2 μm .

Toutefois, la seconde étape de la stérilisation, l'autoclavage, est nécessaire pour détruire les bactéries ayant pu échapper à la filtration. L'autoclavage s'effectue à 121°C pendant une période de 2 h sous une pression de 1 bar. Cette seconde opération est souvent à l'origine de la précipitation de composés contenus dans l'eau de mer (carbonates, phosphates...) due à une augmentation du pH. Ce phénomène peut cependant être évité par l'addition de 2 mL d'HCl 1M par litre de milieu avant l'autoclavage.

Le retour de l'eau de mer à la température ambiante s'effectue en environ 12 h sous bullage d'air. Cet apport d'oxygène permet de retrouver une concentration en oxygène dissous proche la valeur d'équilibre (7 mg.L^{-1}) à température ambiante.

L'autoclavage provoque l'élimination des carbonates qui sont en équilibre avec le dioxyde de carbone atmosphérique et nécessite par la suite l'addition de carbonates (environ 4 mM) dans le milieu. Le pH est alors réajusté à la valeur mesurée avant filtration par addition soit d'acide chlorhydrique soit de soude stériles.

L'eau de mer stérilisée possède les caractéristiques suivantes :

- salinité 35 ‰
- pH 8,2-8,3
- température 25°C .
- oxygène dissous 7 mg.L^{-1}

c) Contrôles de stérilité

Pendant toute la période de l'expérience, tous les 2 jours, des prélèvements sont effectués afin de contrôler la stérilité du milieu. Différents types de contrôles sont employés :

- Observations d'une goutte du milieu montée entre lame et lamelle au *microscope à contraste de phase* (objectif 100 à immersion)
- *Cultures* en boîtes de Pétri sur marine agar (préparation, cf. Annexe)
- *Dénombrement, par épifluorescence, des cellules obtenues par filtration d'un volume donné du milieu* (protocole, cf. Annexe).

De plus, un *dénombrement, par épifluorescence, des cellules présentes sur la surface* de l'électrode de travail est accompli à la fin de la période d'immersion (protocole, cf. Annexe).

2. Résultats et discussion

a) Maintien de la stérilité

Pendant toute la durée de l'immersion de l'électrode dans le milieu stérile, des prélèvements sont réalisés tous les 2 jours afin de contrôler la stérilité du milieu.

Les observations au *microscope à contraste de phase* révèlent la présence de quelques objets immobiles de forme arrondie. Leur nombre est toujours inférieur à 10 par lame tout au long des prélèvements. L'immobilité de ces objets tend à les identifier comme des contaminants plutôt que comme des bactéries présentes dans le milieu.

Les *cultures* sur marine agar montrent quelques fois un développement bactérien. Une colonie est isolée à partir des prélèvements effectués les 12^e et 17^e jours ainsi que dans les cultures témoins des 3^e et 19^e jours. Chaque culture correspond à l'étalement de 0,1 mL du milieu ou du témoin stérile. Une colonie dénombrée dans une boîte de Pétri revient donc à considérer 10 bactéries.mL⁻¹.

Cependant, l'observation de colonies dans les milieux de culture est ponctuelle et non confirmée par le prélèvement pratiqué 2 jours plus tard. De plus, les colonies observées sont peu importantes. Tout ceci concourt à suggérer une contamination accidentelle lors de l'étalement pour expliquer ces développements bactériens. La présence de colonies dans les boîtes de cultures témoins vient également renforcer cette hypothèse. Considérer ces microorganismes comme venant de l'eau de mer circulant dans la cellule signifierait qu'ils ne sont pas viables dans un tel milieu et par conséquent, incapables d'être à l'origine d'une contamination.

Quelques bactéries sont, elles aussi, détectées *par épifluorescence sur les filtres après filtration d'un volume donné du milieu* circulant dans la cellule (fig. §4.17). Néanmoins, leur nombre reste faible.

Les courbes des échantillons prélevés dans le milieu et des témoins sont très semblables. Les densités bactériennes obtenues sont négligeables et relativement faibles

avec des valeurs d'environ 10 à 10^2 cellules.mL⁻¹. Cependant, des valeurs plus élevées sont relevées les 17^e et 19^e jours pour atteindre une fourchette comprise entre 10^2 et 10^3 cellules.mL⁻¹.

Les densités bactériennes mesurées sont inférieures à la limite de détection de la technique d'observation. Les valeurs déterminées pourront donc être considérées comme suffisamment faible pour simuler un milieu stérile.

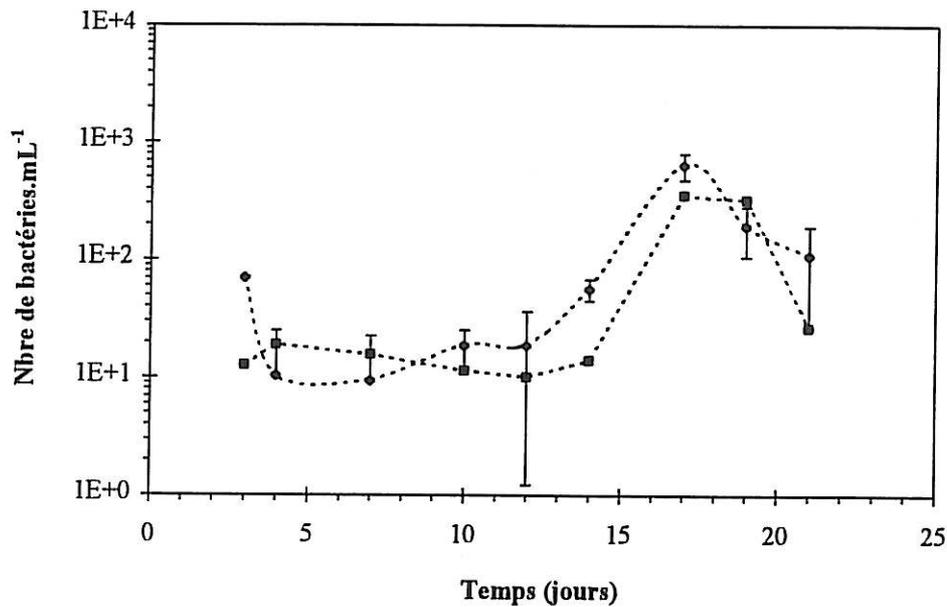


Figure 4.17 : Dénombrement bactérien, par épifluorescence, obtenu par filtration d'un volume de 10 mL du milieu circulant dans la cellule électrochimique (♦ échantillons, ■ témoins).

Les observations effectuées par *épifluorescence sur la surface de l'électrode* à la fin de la période d'immersion révèlent des formes arrondies fluorescentes de taille relativement importante, quelques dizaines de μm , et en nombre peu important, avec une densité bactérienne de 10^2 entités.cm⁻². Cette faible concentration est inférieure au seuil de détection et le milieu peut donc être considéré comme stérile.

b) Régime stationnaire

Cette étude en milieu stérile a pour objectif de suivre les éventuelles fluctuations de l'état de surface l'électrode et de sa réactivité en fonction du temps d'exposition à partir de la technique électrochimique développée. Un seuil de détection pourra ainsi être déduit de ces mesures.

Dans une première étape, le plateau limite de diffusion de réduction de l'oxygène dans la solution d'eau de mer stérilisée est déterminé (fig. §4.18). Le potentiel retenu pour réaliser les mesures en milieu stérile est de -900 mV/ECS.

La courbe de polarisation obtenue dans la solution d'eau de mer stérilisée est différente de la courbe obtenue en eau de mer naturelle non stérilisée. La modification de la courbe de polarisation peut être attribuée à la technique de stérilisation de l'eau de mer qui altère les propriétés physico-chimiques de celle-ci.

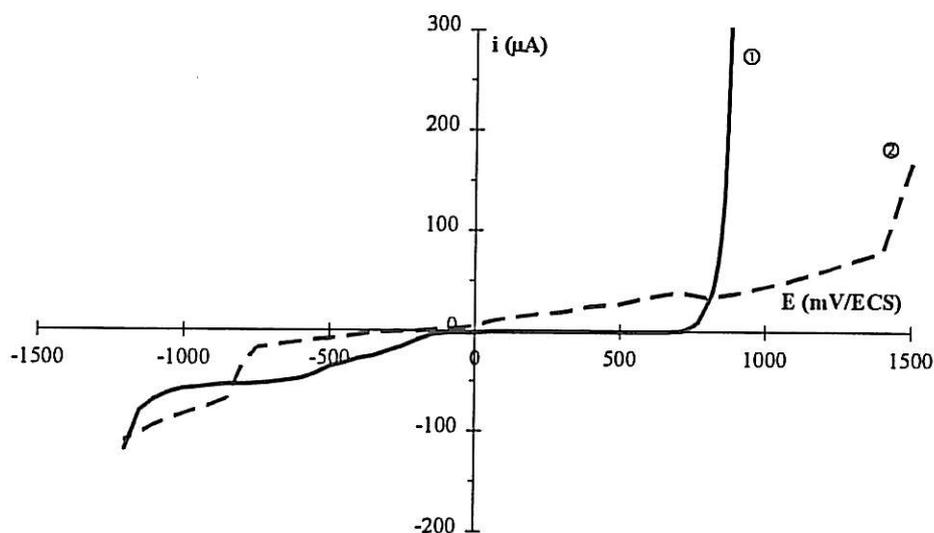


Figure §4.18 : Courbes de polarisation sur une électrode nue en eau de mer naturelle non stérilisée ① et stérilisée ② à 120 tr. min^{-1} en régime stationnaire.

Des mesures en régime stationnaire ont été effectuées quotidiennement afin de suivre l'évolution de la formation éventuelle d'un biofilm durant une période de trois semaines. L'évolution des trois paramètres i_0 , i_∞^{-1} et K^{-1} , déterminés par ajustement des données expérimentales, est présentée en fonction du temps dans la figure §4.19.

Le courant non diffusionnel i_0 reste stable sur la période couvrant les deux premières semaines d'exposition de l'électrode dans le milieu stérile. La hausse de la valeur du paramètre i_0 , qui peut être observée à partir du 14^e jour, coïncide avec le rajustement du pH dans le flacon d'alimentation. Le paramètre i_∞^{-1} varie peu dans une fourchette allant de 0 à $1,8 \cdot 10^{-3} \mu A^{-1}$ pendant la période d'exposition. L'inverse du coefficient de Levich K^{-1} reste stable pendant l'expérience en se distribuant autour de $0,20-0,25 \mu A^{-1} \cdot (tr \cdot min^{-1})^{-0,5}$. De plus la gamme des courants mesurés reste stable dans le temps.

L'addition d'acide chlorhydrique pour réajuster le pH a provoqué une augmentation du courant non diffusionnel correspondant ici au courant de réduction des protons. Les valeurs atteintes par i_0 sont relativement importantes pour un potentiel de polarisation de -900 mV/ECS (autour 50-60 μA). La stérilisation modifie les propriétés de l'eau de mer non seulement biologiques mais physico-chimiques (Little *et al.*, 1989).

La filtration peut avoir plusieurs actions telles que retenir un certain nombre de composés organiques et minéraux mais aussi lyser^(c) certains organismes libérant ainsi leur contenu intracellulaire. L'autoclavage peut, quant à lui, provoquer la dénaturation des substances protéiques de l'eau de mer. Toutes ces modifications du milieu lors de la stérilisation peuvent être invoquées pour expliquer cette valeur importante du courant non diffusionnel.

Supposons qu'un éventuel biofilm se soit formé à la surface de l'électrode. L'étude concernant le biofilm formé en eau de mer additionnée d'extrait de levure a montré que la porosité d'un biofilm est très proche de 1 c'est-à-dire que les coefficients de diffusion dans le biofilm et dans la solution électrolytique sont identiques.

(c) *Lyser* : Destruire des éléments organiques (tissus : histolyse; cellules : cytolyse; micro-organismes : bactériolyse, etc.) sous l'action d'agents physiques, chimiques ou biologiques.

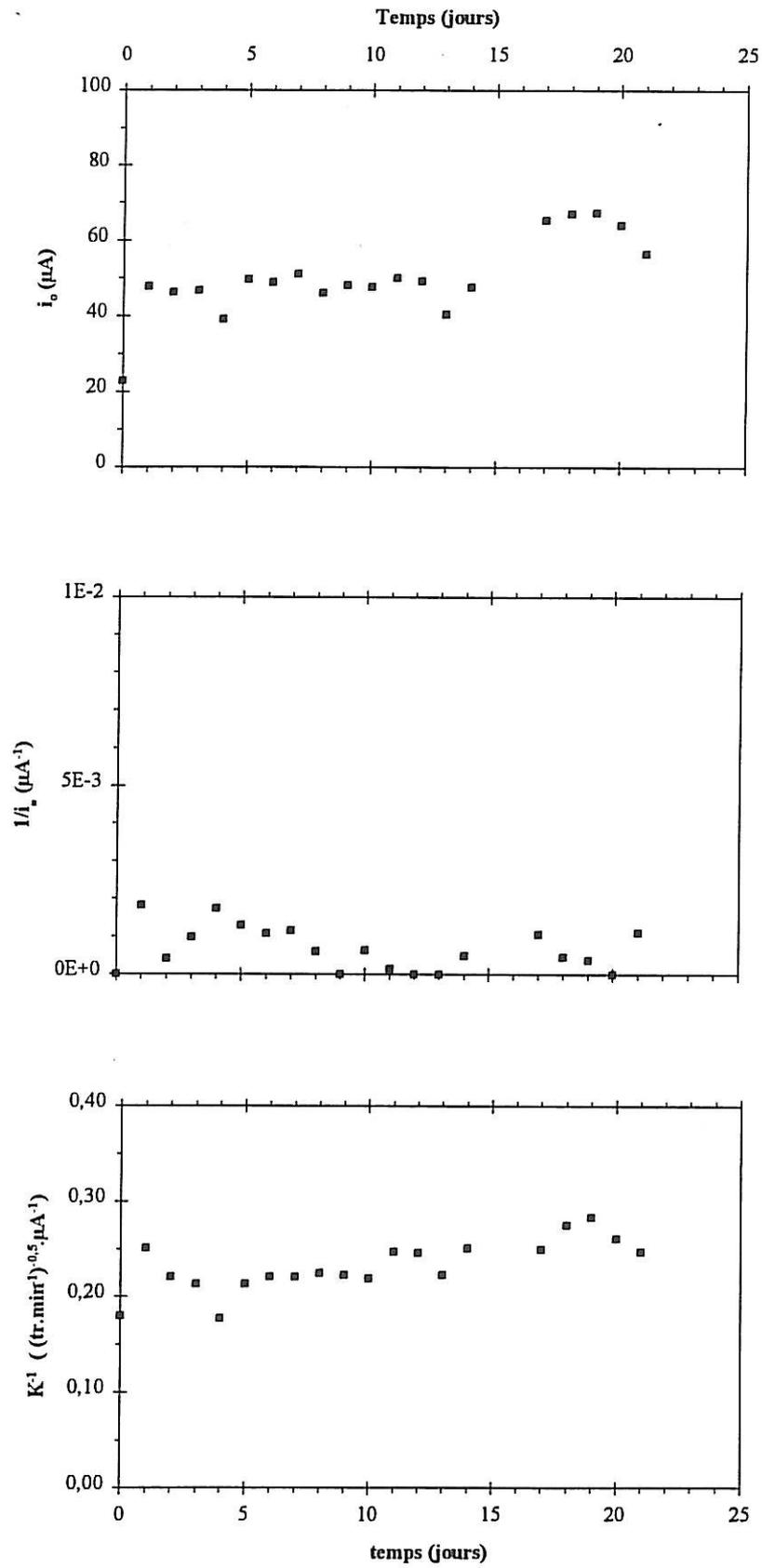


Figure §4.19 : i_o , i_o^{-1} et K^{-1} en fonction du temps d'immersion en eau de mer stérile (traceur oxygène).

A partir de K^{-1} , le coefficient de diffusion de l'oxygène peut être estimé à $1,5 \cdot 10^{-5} \text{ cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ dans la solution d'eau stérilisée à 25°C . Il est alors possible de calculer l'évolution de l'épaisseur dans le temps (fig §4.20).

L'épaisseur moyenne calculée est à $1,5 \pm 1,5 \mu\text{m}$. Cette épaisseur correspond à la limite de détection inférieure pouvant être atteinte à l'aide de cette technique avec le traceur oxygène. Les bactéries ont une taille moyenne de $1 \mu\text{m}$. Abaisser le seuil de détection n'est donc pas nécessaire. En milieu vivant, une détermination inférieure ou égale à $3 \mu\text{m}$ correspondra donc à l'absence de voile biologique.

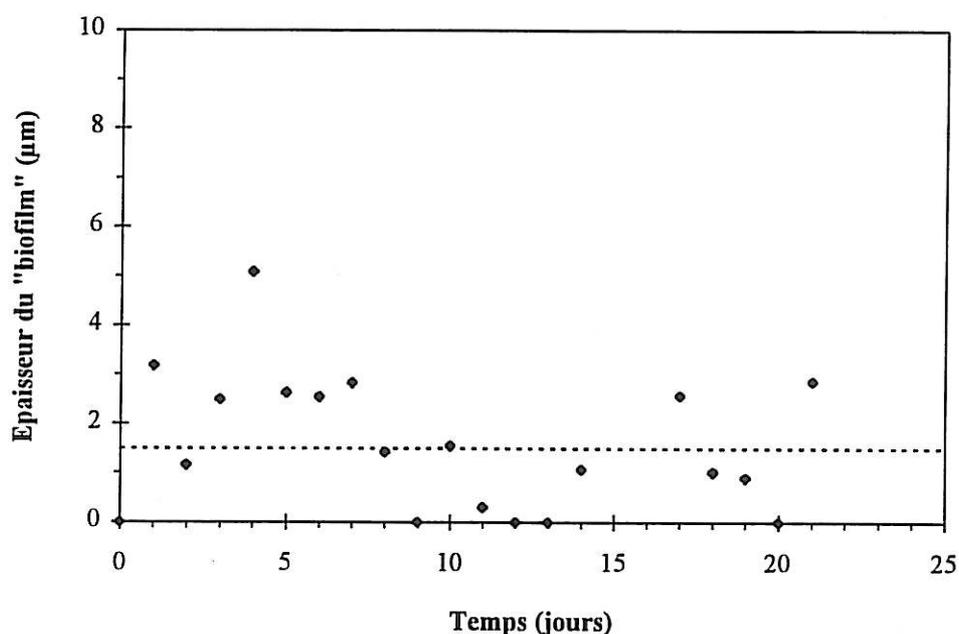


Figure §4.20 : Épaisseur d'un éventuel biofilm formé sur l'électrode à disque tournant dans un milieu marin stérile en fonction du temps d'exposition : \blacklozenge points expérimentaux, - - - - moyenne (traceur oxygène).

Contrairement à l'étude réalisée en eau de mer additionnée d'extrait de levure, l'augmentation progressive du courant non diffusionnel i_0 n'est pas observée. L'activité biologique de la biomasse semble donc pouvoir être invoqué dans l'apparition de ce

courant. De plus, la surface active apparente de l'électrode est demeurée stable durant les trois semaines d'exposition dans le milieu stérile.

3. Conclusion

Tous les contrôles effectués tendent à montrer que le milieu est demeuré stérile pendant toute la durée de l'exposition.

Le seuil de détection de la méthode pour l'épaisseur du biofilm est d'environ 3 μm . En milieu vivant, une détermination inférieure ou égale à cette valeur correspond donc à une épaisseur pouvant être considérée comme nulle. Cette épaisseur correspond à la limite inférieure pouvant être atteinte à l'aide de cette technique avec le traceur oxygène. Compte tenu des comparaisons déjà effectuées entre les mesures obtenues avec l'oxygène et le ferricyanure, le seuil de détection de 3 μm déterminé avec l'oxygène pourra être considéré comme un majorant pour le seuil de détection avec le ferricyanure.

L'apparition du courant non diffusionnel i_0 dans l'étude en eau de mer additionnée d'extrait de levure n'est pas observée en milieu stérile. Ce courant était attribué, en eau de mer nourrie, à la production d'espèces électroactives par le biofilm.

De plus, le blocage progressif de la surface active en eau de mer nourrie n'est pas non plus décrit en eau de mer stérile. Cette réduction de la surface était attribuée à l'adsorption sur l'électrode d'espèces chimiques produites par les microorganismes, de l'extrait de levure ou d'une substance présente naturellement dans l'eau.

A partir de cette étude en milieu stérile, l'activité biologique du biofilm semble pouvoir être invoquée dans l'apparition du courant non diffusionnel ainsi que dans le blocage de la surface active de l'électrode.

C. Caractérisation d'un biofilm en eau de mer naturelle

Suite aux études précédentes, le protocole élaboré est appliqué à une biomasse développée dans une eau de mer naturelle, c'est-à-dire non additionnée d'un nutriment.

1. Conditions expérimentales

Les six électrodes sont exposées dans de l'eau de mer prélevée en Rade de Brest. Les caractéristiques de cette eau sont décrites au paragraphe §4.I.A.1. Les *conditions d'exposition* sont les suivantes :

- Débit 2 L.min⁻¹ (0,2 m.s⁻¹)
- Température 21°C
- Oxygène naturellement dissous 8,5 mg.L⁻¹ (méthode de dosage Winkler, cf. Annexe)
- Saison automne

Les *mesures* sont réalisées à 20°C avec deux traceurs : le ferricyanure et l'oxygène. Trois électrodes sont testées avec chaque traceur. Les conditions expérimentales sont présentées dans le tableau §4.3.

Traceur Fe(CN) ₆ ³⁻	Traceur oxygène
Eau de mer + K ₃ Fe(CN) ₆ /K ₄ Fe(CN) ₆ 10 ⁻² M	Eau de mer Oxygène dissous 8,6 mg.L ⁻¹
Potentiel de polarisation $\left\{ \begin{array}{l} \text{Stat.+EHD } 0 \text{ mV/ECS} \\ \text{AC (1200 tr.min}^{-1}\text{) } 150 \text{ mV/ECS} \end{array} \right.$	Potentiel de polarisation $\left\{ \begin{array}{l} \text{Stat.+EHD } -900 \text{ mV/ECS} \\ \text{AC (1200 tr.min}^{-1}\text{) } -350 \text{ mV/ECS} \end{array} \right.$

Tableau §4.3 : Conditions expérimentales lors des mesures électrochimiques.

2. Résultats et discussion

a) Traceur ferricyanure

➤ Régime stationnaire

Trois électrodes sont testées avec le traceur ferricyanure. Le courant limite de réduction de $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$ en régime stationnaire est enregistré en fonction de $\sqrt{\Omega}$ à différents temps d'immersion.

La chute des courants mesurés entre 120 et 1200 $\text{tr}\cdot\text{min}^{-1}$ est moins importante par rapport aux courants mesurés en eau de mer additionnée de nutriment, mais celle-ci est néanmoins réelle (fig. §4.21). Le phénomène décrit vers le 4^e jour d'exposition en eau de mer additionnée d'extrait de levure est ici aussi observé. Le courant chute dès le second jour d'immersion pour retrouver une valeur avoisinant sa valeur initiale quelques jours plus tard.

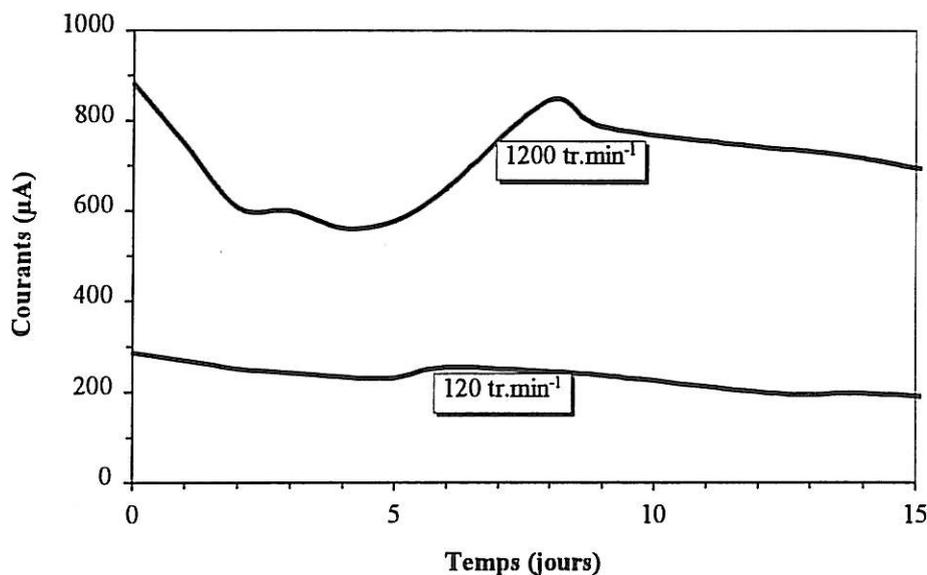


Figure §4.21 : Gamme des courants mesurés pour des vitesses de rotation d'échelonnant entre 120 et 1200 $\text{tr}\cdot\text{min}^{-1}$ en fonction du temps d'immersion dans une eau de mer naturelle. Mesures réalisées dans une solution d'eau de mer + $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6/\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ 10^{-2}M (traceur $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$).

Les paramètres i_0 , i_∞^{-1} et K^{-1} sont déterminés par ajustement des données expérimentales à la loi §2.16 et tracés en fonction du temps dans la figure §4.22.

Comme dans le cas du biofilm formé en eau de mer additionnée d'extrait de levure, un courant non diffusionnel i_0 apparaît dès les premiers jours d'immersion. A temps égal d'exposition, le courant non diffusionnel est bien moins important dans une eau de mer naturelle par rapport à une eau additionnée de nutriment.

Le paramètre i_∞^{-1} augmente régulièrement pour atteindre une fourchette comprise entre 0,5 et $1 \cdot 10^{-3} \mu A^{-1}$. Ces valeurs inférieures sont à celles déterminées pour le biofilm nourri qui étaient d'environ de $5 \cdot 10^{-3} \mu A^{-1}$ au bout de 2 semaines. L'inverse du coefficient de Levich K^{-1} augmente peu lors des dix premiers jours pour augmenter plus fortement par la suite. La surface active apparente diminue au cours du développement du biofilm.

➤ Impédance EHD

Les diagrammes obtenus en impédance EHD avec une électrode nue permettent de vérifier la réductibilité des données par la fréquence adimensionnelle $p = \frac{\omega}{\Omega}$ (fig. §4.23).

Les courbes obtenues pour 300, 600 et $1200 \text{ tr. min}^{-1}$ pour un biofilm de 13 jours ne sont pas tout à fait réductibles par la fréquence p (fig. §4.24). La petite translation observée au jour 13 entre les courbes à différentes vitesses de rotation montre que le coefficient de diffusion du traceur ferricyanure dans la couche poreuse est très proche du coefficient dans l'eau de mer.

Sur la figure §4.25, les courbes d'impédance EHD obtenues à $1200 \text{ tr. min}^{-1}$ à différents temps d'exposition ont été rassemblées. La translation des courbes dans le temps est due à l'augmentation du temps de diffusion. Ces mesures sont cohérentes avec les résultats décrits en régime stationnaire.

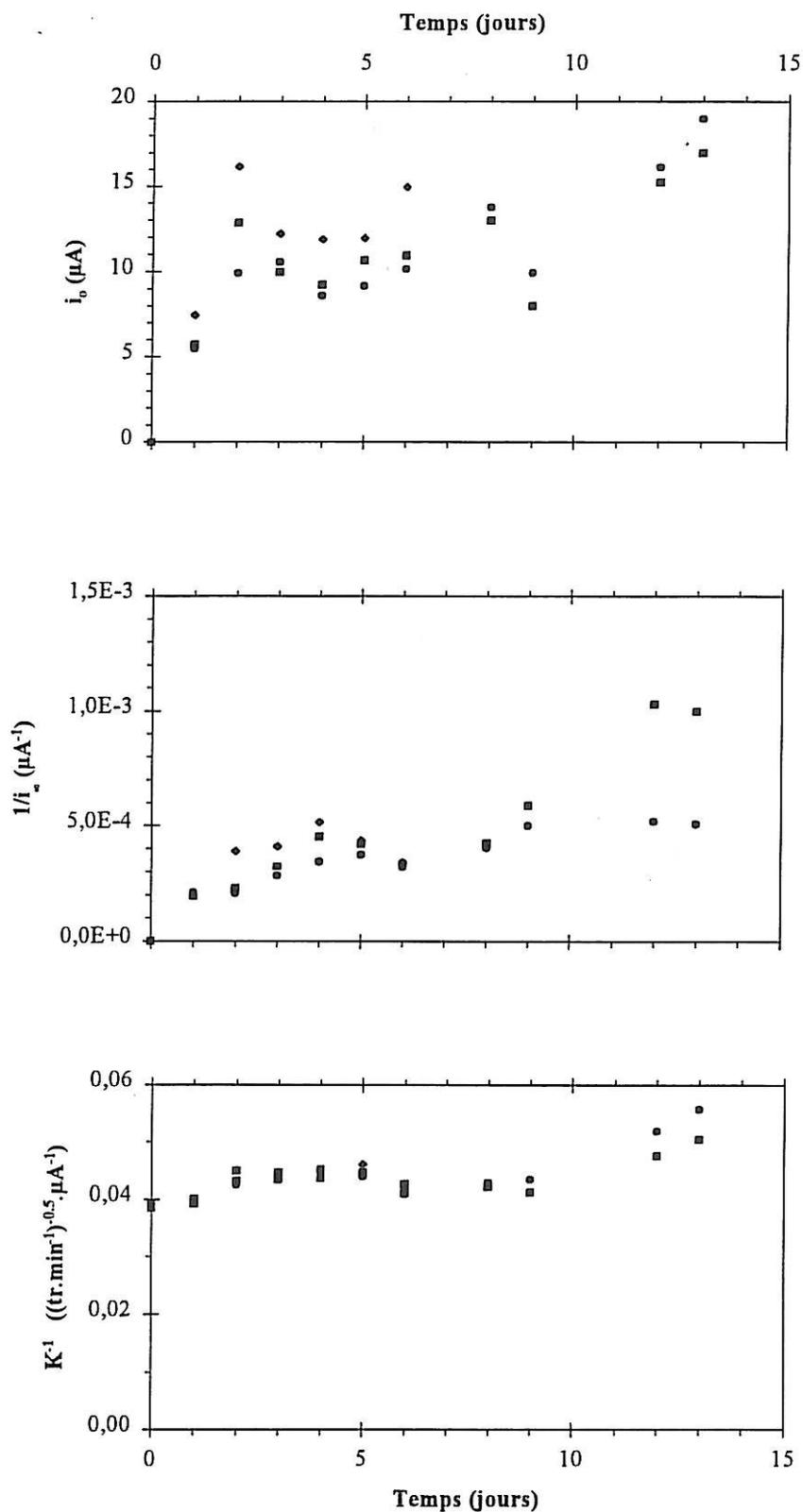


Figure §4.22 : i_0 , i_∞^{-1} et K^{-1} en fonction du temps d'exposition en eau de mer naturelle. Mesures réalisées dans une solution d'eau de mer + $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6/\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ 10^{-2}M (traceur $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$). Les symboles \blacklozenge , \blacksquare et \bullet distinguent 3 électrodes différentes.

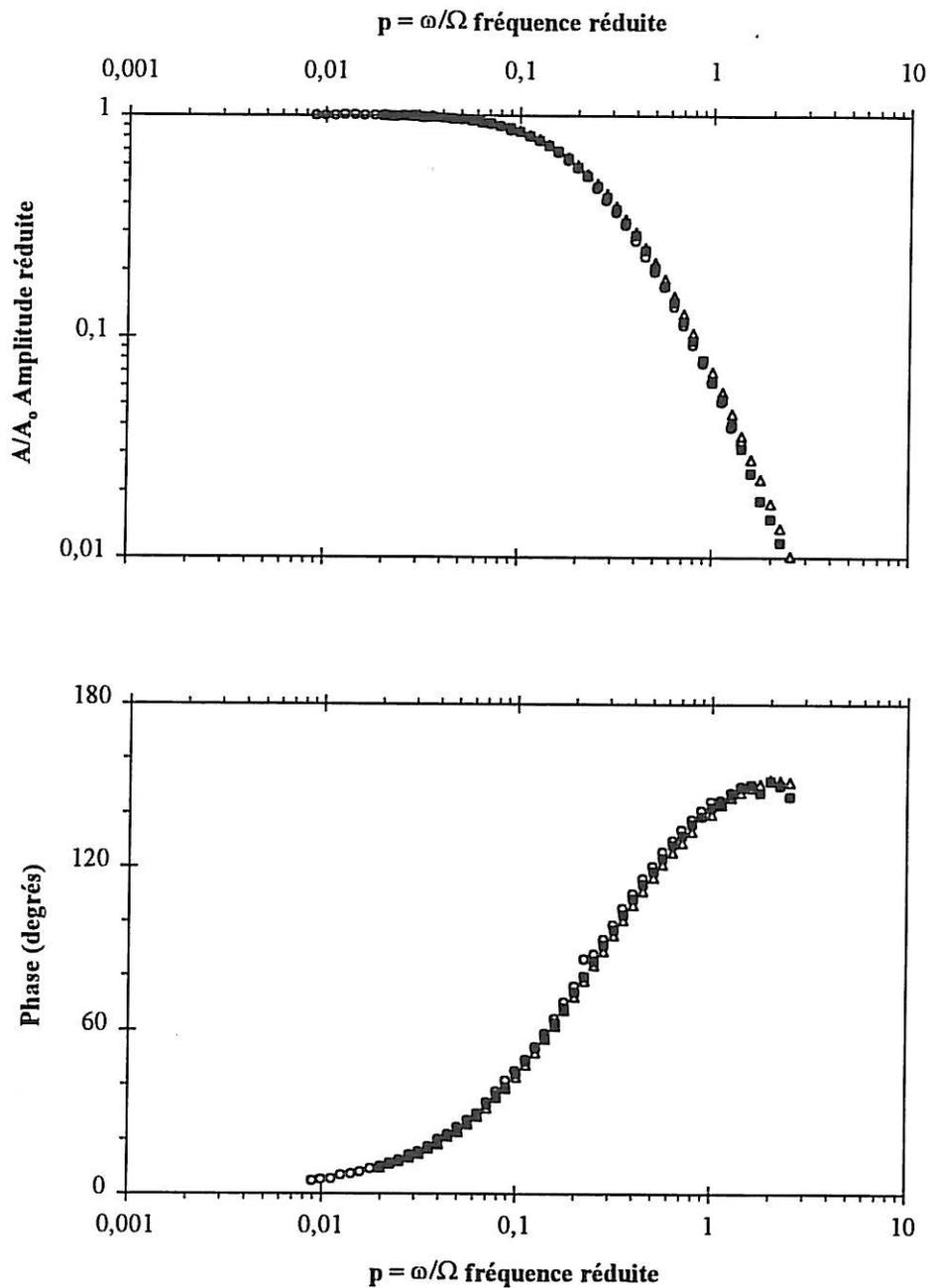


Figure §4.23 : Impédance EHD d'une électrode nue dans une eau de mer additionnée $K_3Fe(CN)_6/K_4Fe(CN)_6$ à différentes vitesses de rotation Δ 300, \blacksquare 600 et \circ 1200 tr.min⁻¹. Mesures réalisées dans une solution d'eau de mer + $K_3Fe(CN)_6/K_4Fe(CN)_6$ 10⁻²M (traceur $Fe(CN)_6^{3-}$).

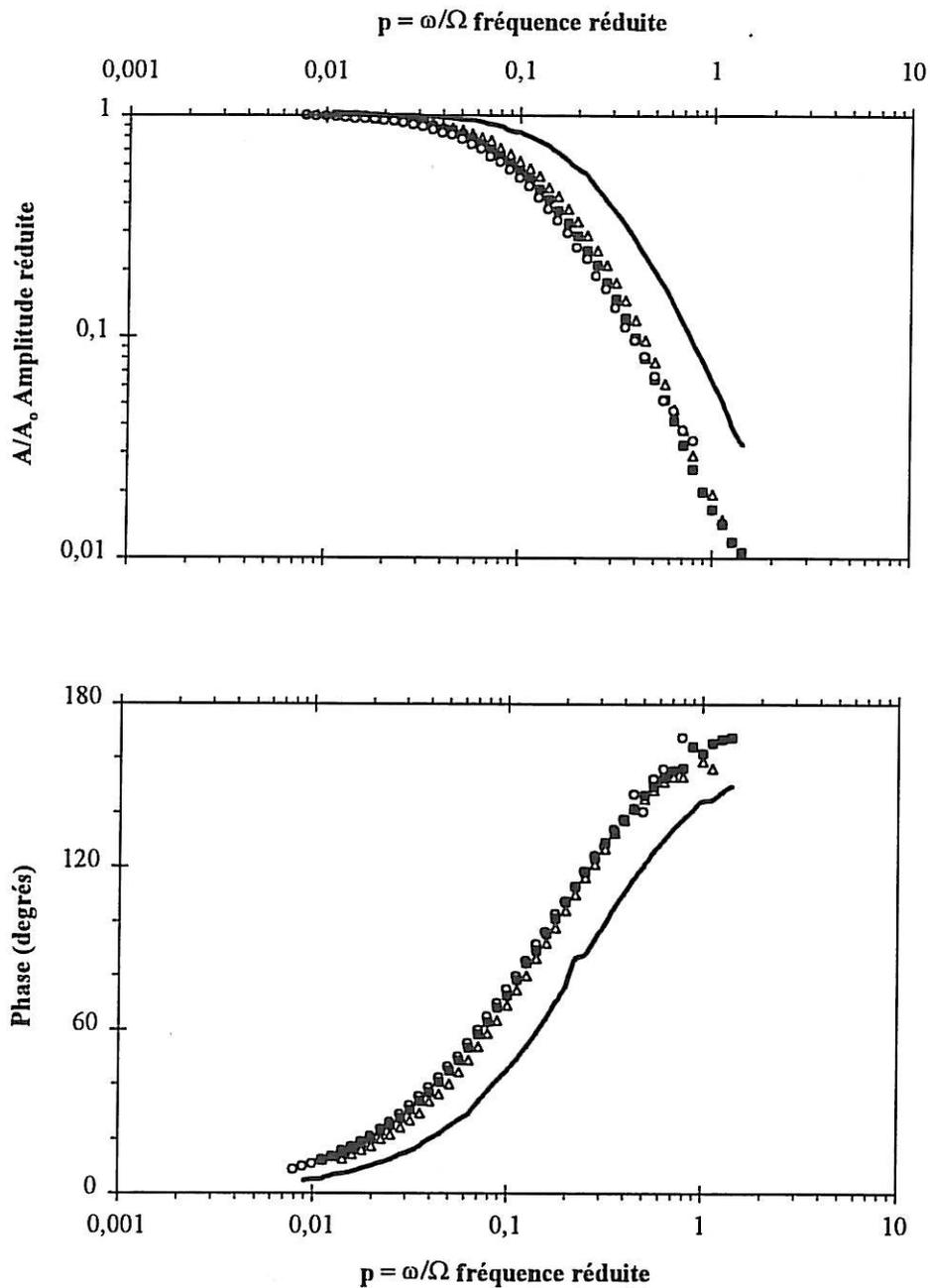


Figure §4.24 : Impédance EHD d'une électrode d'or exposée 13 jours en eau de mer à différentes vitesses de rotation Δ 300, \blacksquare 600 et \circ 1200 tr.min⁻¹ comparée au diagramme obtenu pour une électrode nue — aux mêmes vitesses de rotation. Mesures réalisées dans une solution d'eau de mer + $K_3Fe(CN)_6/K_4Fe(CN)_6$ 10⁻²M (traceur $Fe(CN)_6^{3-}$).

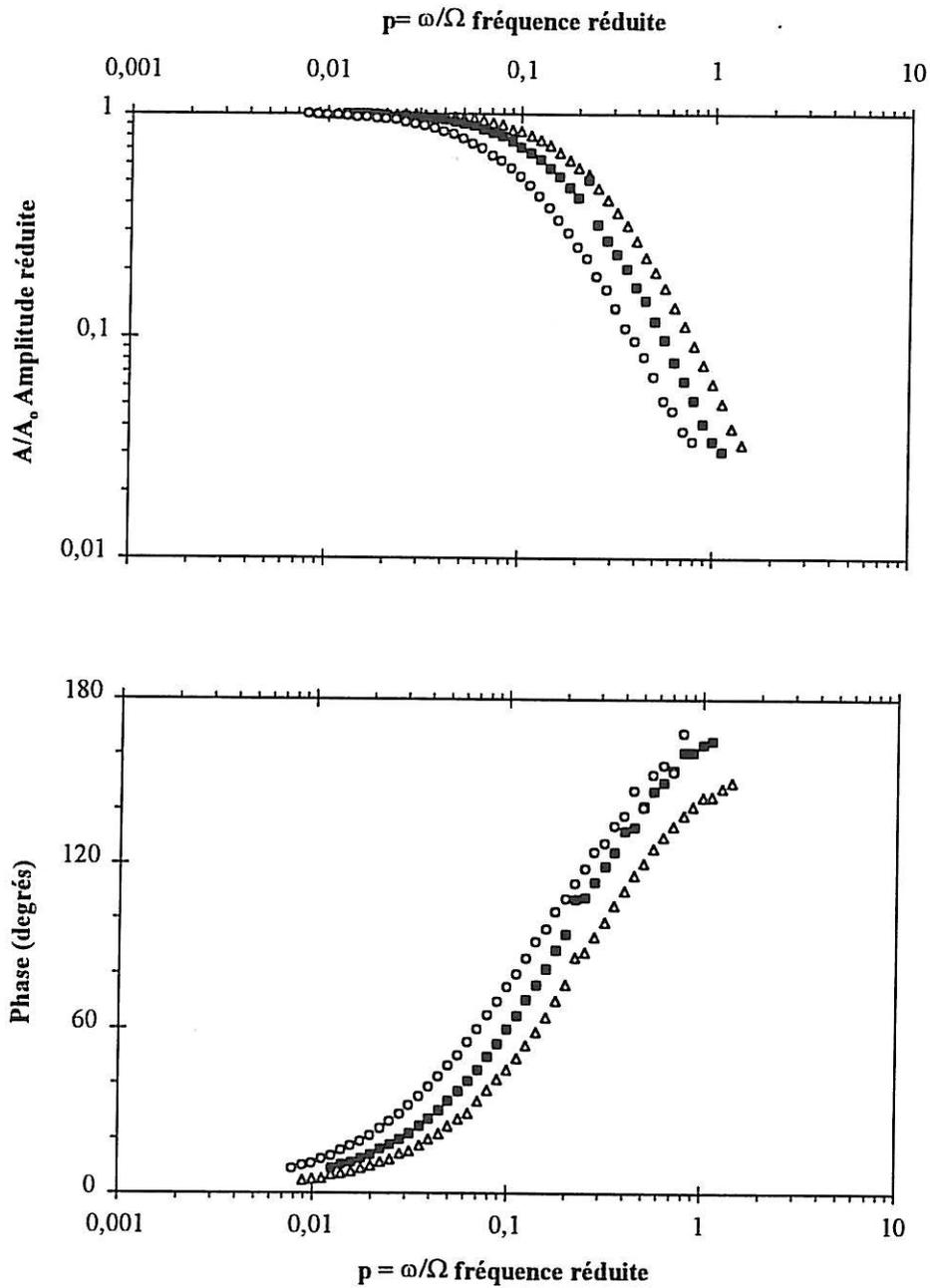


Figure §4.25 : Impédance EHD pour un biofilm développé en eau de mer au jour d'exposition Δ 0, \blacksquare 5 et \circ 13 à 1200 $\text{tr}\cdot\text{min}^{-1}$. Mesures réalisées dans une solution d'eau de mer + $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6/\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ 10^{-2}M (traceur $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$).

➤ Impédance AC

Les mesures d'impédance AC ont été réalisées à une vitesse de rotation de 1200 tr.min^{-1} à différents temps d'exposition (fig. §4.26).

Dans les cinq premiers jours, la résistance de transfert de charge, R_{tc} , augmente fortement alors (de 100 à 220Ω) que la boucle correspondant à la diffusion est peu modifiée. Puis dans un second temps, entre les 5^e et 20^e jours, l'arc correspondant au transport de matière augmente considérablement pendant que R_{tc} reste constant.

Entre le jour 0 et le jour 5, l'augmentation de la résistance de transfert de charge indique que la surface active de l'électrode diminue. L'effet de ce blocage partiel de la surface n'est cependant pas observé avec les mesures d'impédance EHD car il est masqué par le biofilm. Le gradient de diffusion se situe essentiellement au niveau de la solution électrolytique. Le biofilm est uniforme vis à vis du transport du traceur.

Au jour 20, la résistance de transfert de charge demeure identique. La surface active réelle reste donc constante par rapport au jour 5.

➤ Traitement des données

A partir des données en régime stationnaire, en impédances EHD et AC, il est possible de suivre l'évolution du biofilm dans le temps.

Dans l'étude concernant la gélatine et le biofilm nourri, le temps de diffusion $\frac{\delta_f^2}{D_f}$ du traceur dans le voile biologique a été évalué à partir de l'ajustement des données EHD. L'incertitude des déterminations était importante mais il a été possible de montrer que les coefficients de diffusion du ferricyanure dans la biomasse et dans la solution électrolytique sont identiques. Le biofilm obtenu en eau de mer naturelle étant plus mince, l'incertitude sur les ajustements a été augmentée. Seul un examen qualitatif des données EHD a été possible.

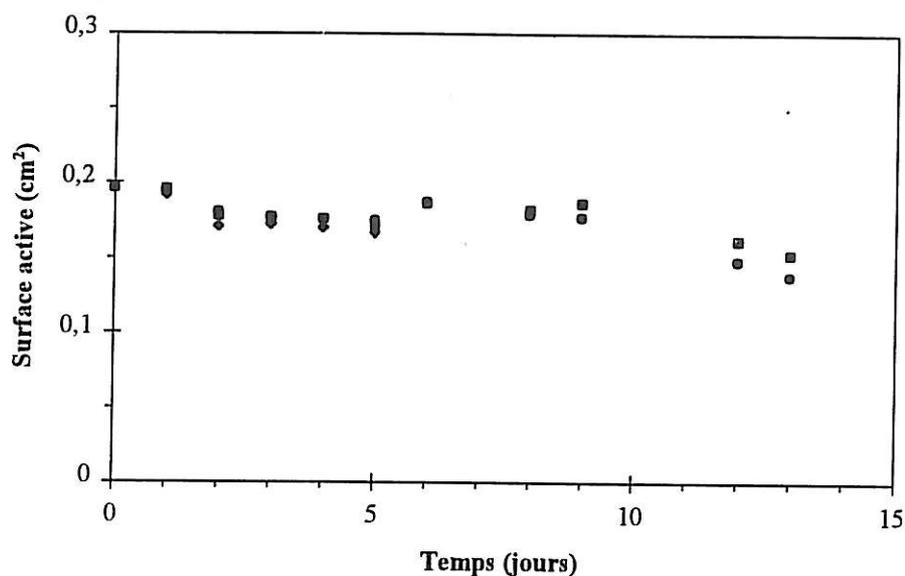


Figure §4.27 : Surface active apparente de l'électrode en fonction du temps d'exposition en eau de mer naturelle. Mesures réalisées dans une solution d'eau de mer + $K_3Fe(CN)_6/K_4Fe(CN)_6$ $10^{-2}M$ (traceur $Fe(CN)_6^{3-}$). Les symboles ◆, ■ et ● distinguent 3 électrodes différentes.

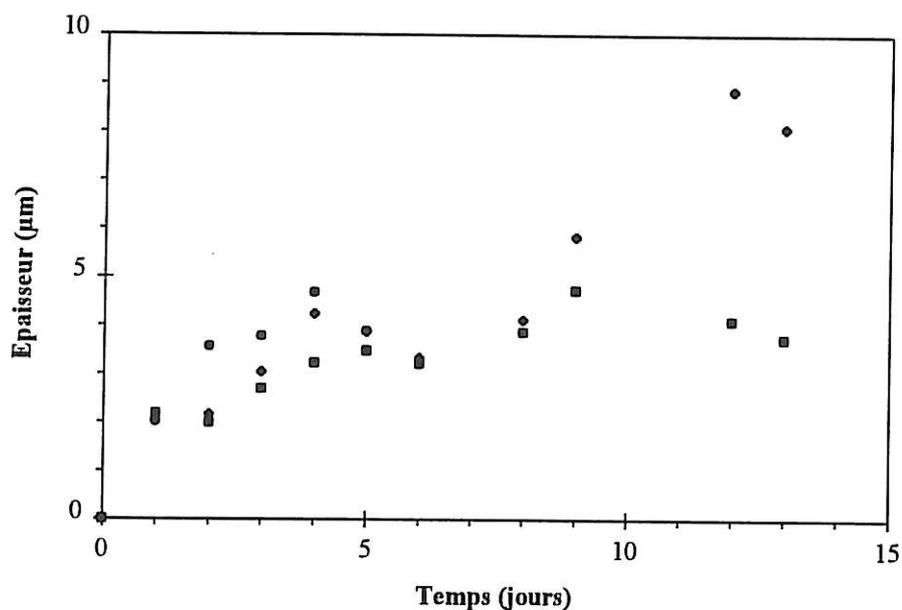


Figure §4.28 : Epaisseur du biofilm en fonction du temps d'exposition en eau de mer naturelle. Calculs réalisés en tenant compte de la surface active apparente de l'électrode. Mesures réalisées dans une solution d'eau de mer + $K_3Fe(CN)_6/K_4Fe(CN)_6$ $10^{-2}M$ (traceur $Fe(CN)_6^{3-}$). Les symboles ◆, ■ et ● distinguent 3 électrodes différentes.

b) Traceur oxygène

➤ Régime stationnaire

Trois électrodes sont testées avec le traceur oxygène. Le courant limite de réduction de l'oxygène en régime stationnaire est enregistré en fonction de la vitesse de rotation à différents temps d'immersion pour chaque électrode. Les paramètres i_0 , i_{∞}^{-1} et K^{-1} sont alors déterminés par ajustement des données expérimentales à la loi §2.16 (fig. §4.29).

Le courant non diffusionnel i_0 augmente légèrement dans le temps en passant d'environ 2 à 5 μA . Sur la même période, le paramètre i_{∞}^{-1} monte régulièrement pour atteindre des valeurs d'environ $2 \cdot 10^{-3} \mu\text{A}^{-1}$ et l'inverse du coefficient de Levich K^{-1} reste constant montrant ainsi que la surface active apparente reste inchangée.

La sensibilité de la méthode ne permet la caractérisation que pendant 8 jours. La sensibilité de la technique est meilleure avec le traceur ferricyanure. Les électrodes testées avec le traceur ferricyanure ont pu être testées pendant 13 jours. Le biofilm formé est différent suivant l'emplacement des électrodes dans le système d'exposition. Les biomasses testées avec l'oxygène étaient placées dans la première partie de la canalisation et celles testées avec l'autre traceur étaient regroupées dans la seconde partie.

➤ Impédance EHD

Dans un premier temps, la réductibilité des données EHD suivant la fréquence adimensionnelle $p = \omega/\Omega$ a été vérifiée dans le cas d'une électrode nue (fig. §4.30).

Sur la figure §4.31, les diagrammes EHD obtenus pour une électrode immergée 13 jours montrent une réductibilité des données en fonction de p qui n'est plus parfaite. Il y a un déplacement léger mais significatif vers les basses fréquences avec l'augmentation de la vitesse de rotation.

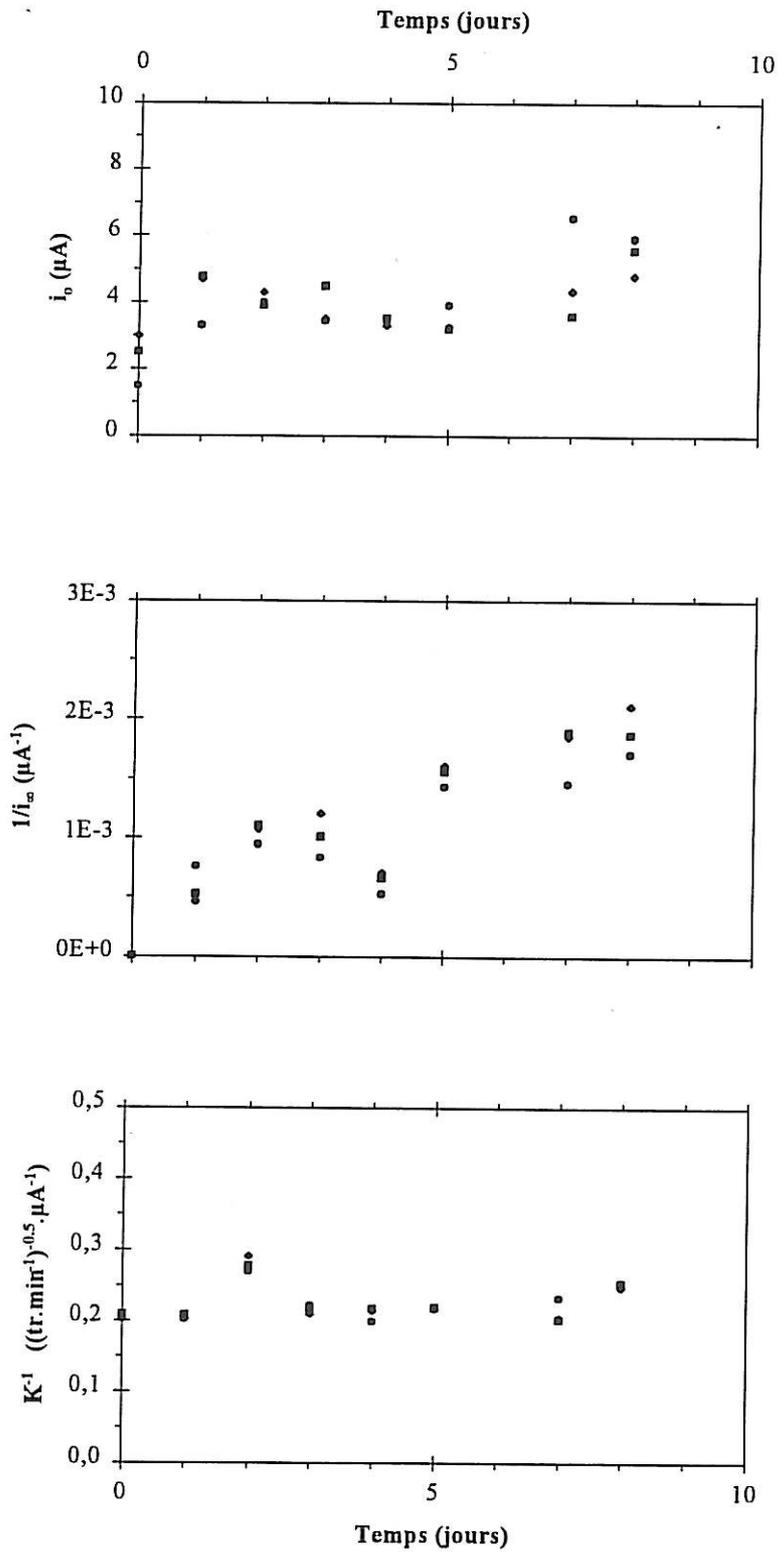


Figure §4.29 : i_o , i_o^{-1} et K^{-1} en fonction du temps d'exposition en eau de mer naturelle. Mesures réalisées dans une solution d'eau de mer (traceur oxygène). Les symboles \blacklozenge , \blacksquare et \bullet distinguent 3 électrodes différentes.

Ce glissement des courbes EHD est confirmé par la figure §4.32 où sont représentés les diagrammes EHD enregistrés à une vitesse de rotation de 1200 tr.min^{-1} pour une électrode à 0, 5 et 13 jours d'exposition.

Le biofilm âgé de 13 jours montre donc un comportement de couche poreuse (fig. §4.32). Les courbes à 0 et 5 jours montrent que le temps de diffusion de l'oxygène dans la couche est pratiquement nul. La couche est donc très ténue au jour 5. Par contre, au 13^{ème} jour, la translation de la courbe est visible. Un temps de diffusion dans la couche est observable.

➤ Impédance AC

Les mesures AC avec le traceur oxygène sont plus difficilement exploitables compte tenu du couplage entre la cinétique et le transport (fig. §4.33). Il est toutefois possible de noter la forte augmentation de la résistance de transport de matière et du transfert de charge au jour 13. La forte augmentation de la résistance de transport et la déformation faible des courbes est en accord avec les courbes EHD entre les jours 0 et 5.

➤ Traitement des données

De la même façon que pour le traceur ferricyanure, seul un examen qualitatif des données EHD est envisageable. L'équivalence des coefficients de diffusion dans et hors de la couche est néanmoins confirmée. Le coefficient de diffusion de l'oxygène dans le biofilm et dans la solution a été évalué à $1,3 \cdot 10^{-5} \text{ cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ (c'est-à-dire $Sc_{O_2} = 750$) à partir du paramètre K^{-1} .

$$D_f = D = 1,4 \cdot 10^{-5} \text{ cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$$

Tout comme les calculs réalisés pour le biofilm nourri, l'évolution de l'épaisseur du biofilm dans le temps est déterminée à partir du paramètre i_{∞}^{-1} en tenant compte de la surface active de l'électrode. Les résultats obtenus sont présentés dans la figure §4.34. Au bout de 8 jours, les épaisseurs atteignent des valeurs de 4 à 5 μm .

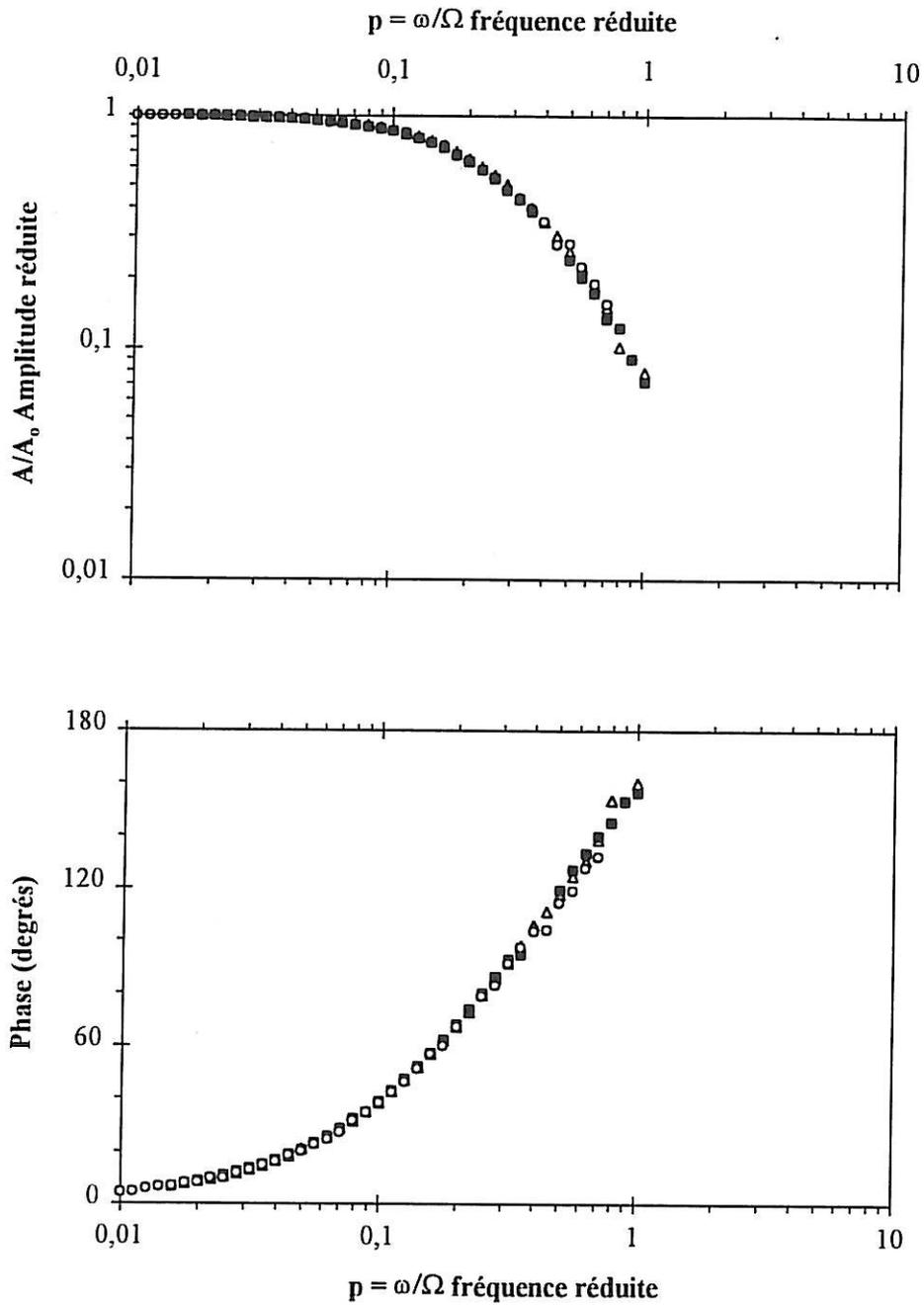


Figure §4.30 : Impédance EHD d'une électrode nue dans une eau de mer naturelle à différentes vitesses de rotation \triangle 300, \blacksquare 600 et \circ 1200 tr.min⁻¹. Mesures réalisées dans une solution d'eau de mer (traceur oxygène).

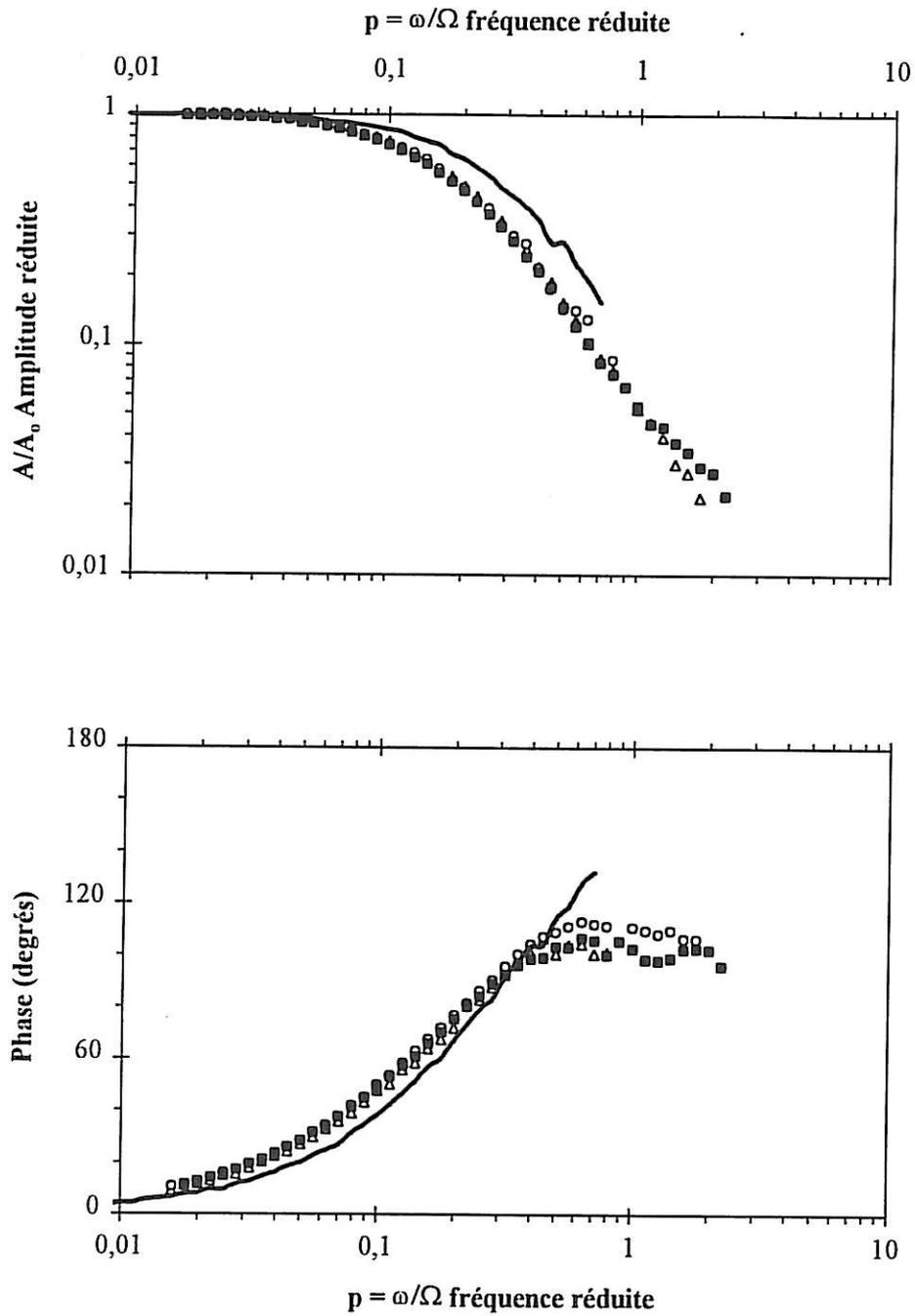


Figure §4.31 : Impédance EHD d'une électrode d'or exposée 13 jours en eau de mer naturelle à différentes vitesses de rotation Δ 300, \blacksquare 600 et \circ 1200 tr.min⁻¹ comparée au diagramme obtenu pour une électrode nue — aux mêmes vitesses de rotation. Mesures réalisées dans une solution d'eau de mer (traceur oxygène).

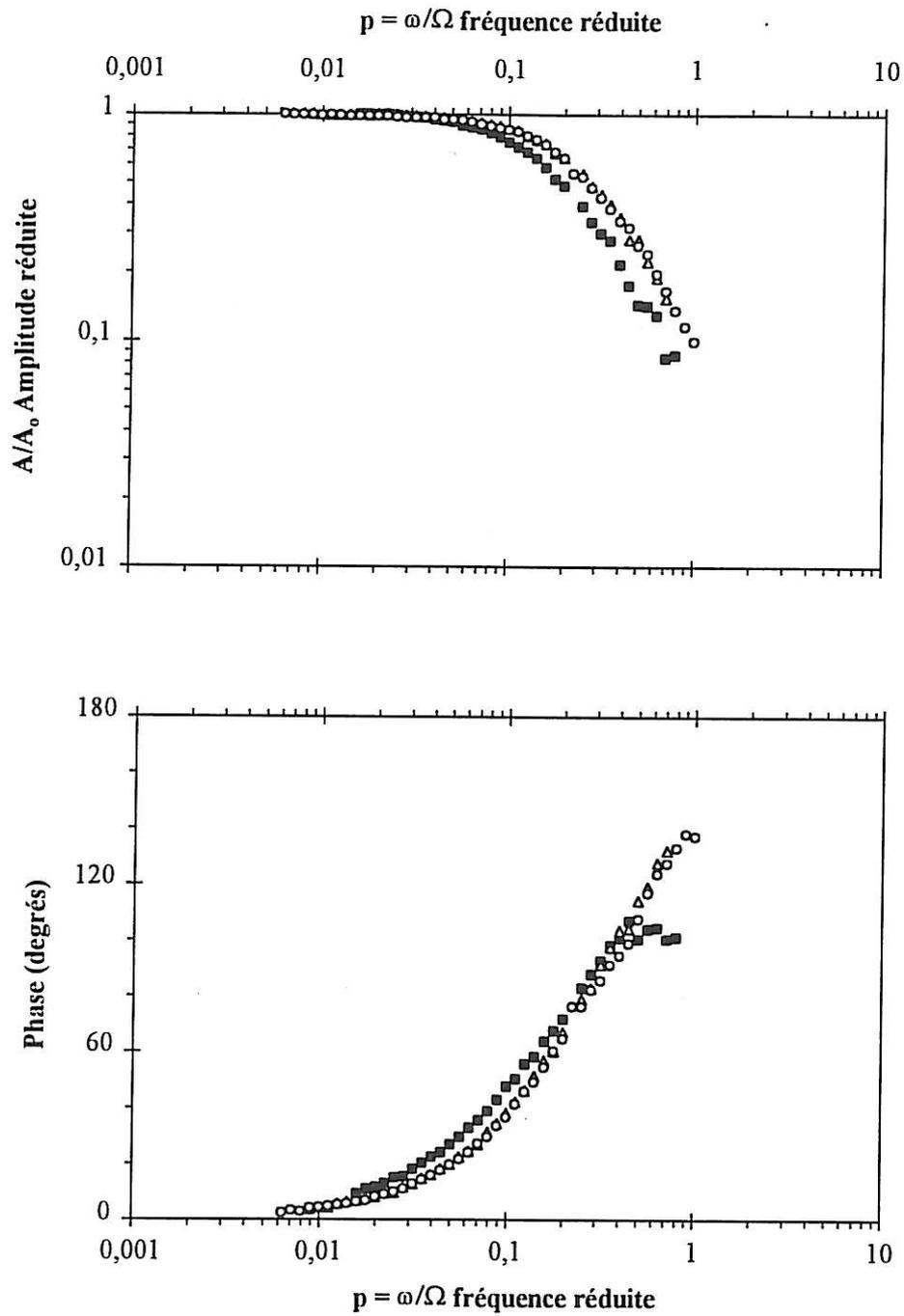


Figure §4.32 : Impédance EHD pour un biofilm développé en eau de mer naturelle au jour Δ 0, \circ 5 et \blacksquare 13 jours à $1200 \text{ tr}\cdot\text{min}^{-1}$. Mesures réalisées dans une solution d'eau de mer (Traceur oxygène).

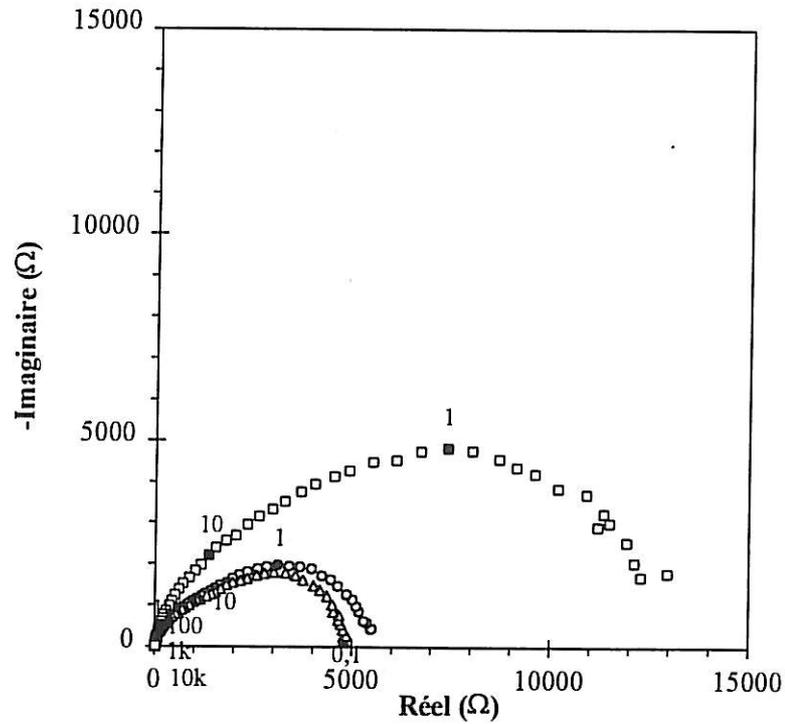


Figure §4.33 : Impédance AC pour un biofilm développé en eau de mer naturelle au jour Δ 0, \circ 5 et \square 13 jours à $1200 \text{ tr. min}^{-1}$. Mesures réalisées dans une solution d'eau de mer (Traceur oxygène).

c) Comparaison des épaisseurs obtenues avec les deux traceurs

Les résultats obtenus avec les deux traceurs, l'oxygène et le ferricyanure, sont comparés sur la figure §4.35. A la précision des mesures près, les épaisseurs relevées sont du même ordre de grandeur. A partir des épaisseurs calculées pour les deux traceurs, il est possible de tracer l'allure générale de l'évolution de la biomasse en fonction du temps d'exposition en eau de mer.

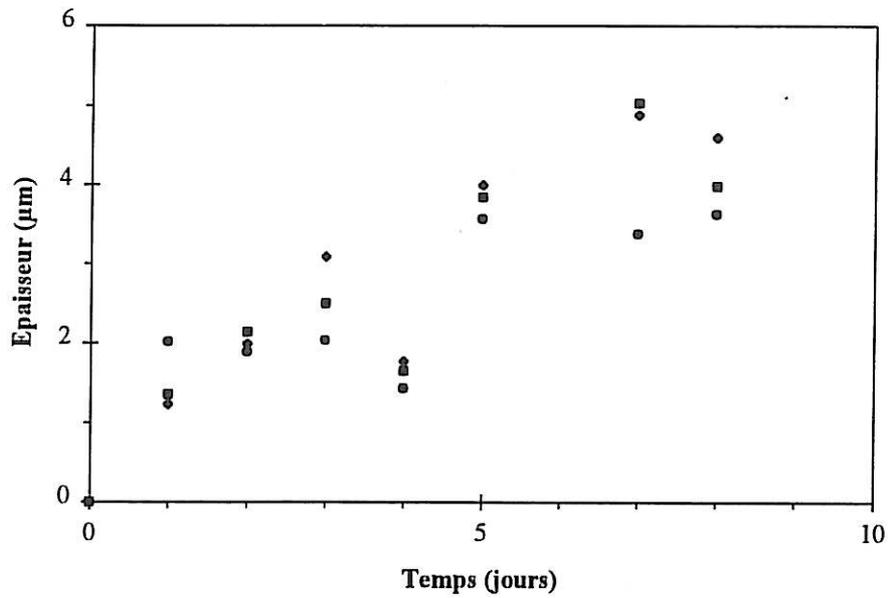


Figure §4.34 : Épaisseur du biofilm en fonction du temps d'exposition en eau de mer naturelle. Calculs réalisés en tenant compte de la surface active de l'électrode. Mesures réalisées dans une solution d'eau de mer (traceur oxygène). Les symboles ◆, ■ et ● distinguent 3 électrodes différentes.

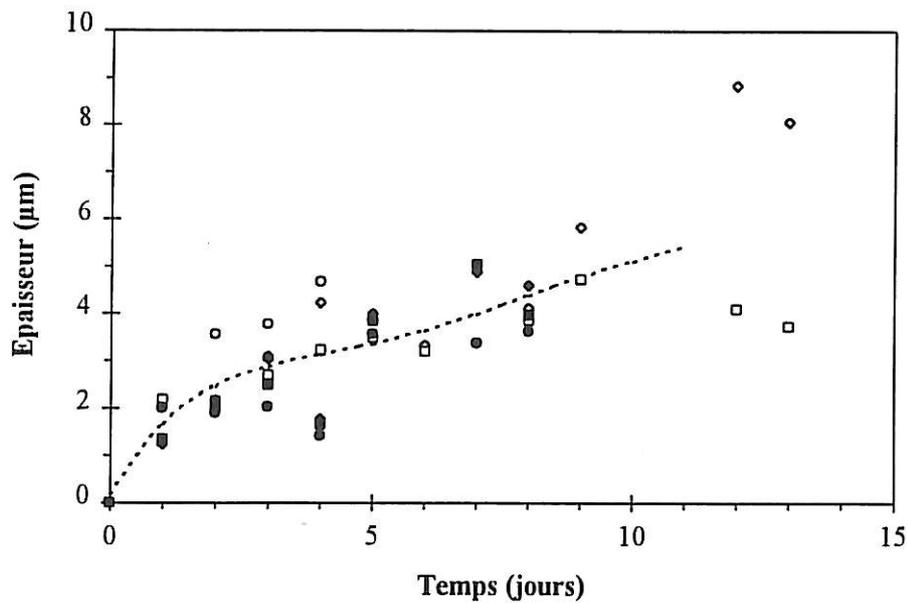


Figure §4.35 : Comparaison des épaisseurs du biofilm en fonction du temps d'exposition en eau de mer naturelle obtenues avec les traceurs $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$ (symboles blancs) et oxygène (symboles noirs). Les symboles correspondent aux points expérimentaux et la courbe en pointillée à l'allure générale de l'évolution de l'épaisseur du biofilm.

➤ Observation au Microscope Laser à Balayage Confocal (MLBC)

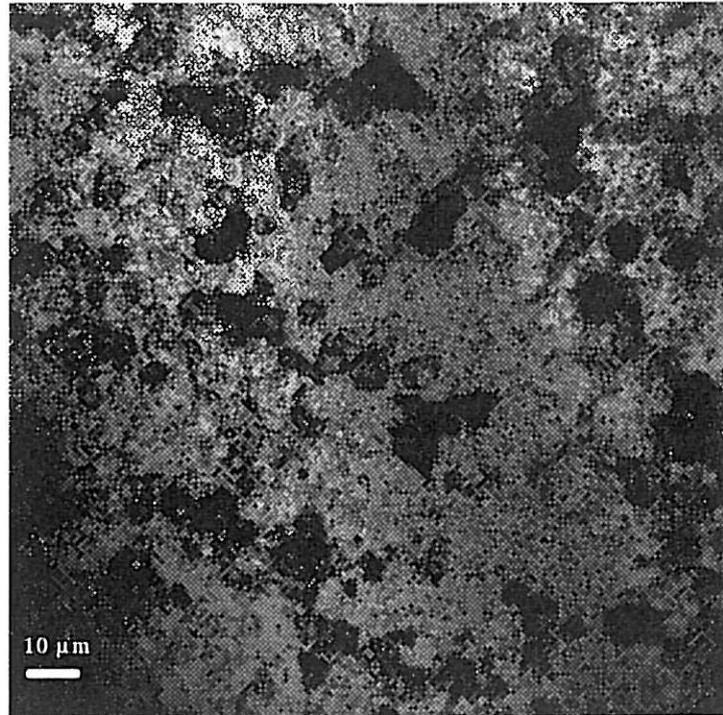
Des observations au Microscope Laser à Balayage Confocal sont effectuées sur la surface des électrodes au "Lehrstuhl für Wassergüte der TU Munchen" à Munich. Ce moyen d'étude permet l'examen de biofilms hydratés par une technique non intrusive en trois dimensions sur des biofilms vivants. Le MLBC a l'avantage de permettre l'observation des biomasses fixées sur des surfaces non transparentes telles que l'or. Il est notamment possible de déterminer l'épaisseur du voile biologique. La limite inférieure de la caractérisation est de 8 μm avec une précision de $\pm 3 \mu\text{m}$.

Il est nécessaire de concevoir un montage afin de pouvoir observer les embouts d'électrodes au MLBC. Dans le cas des échantillons, des observations sont effectuées afin d'obtenir des vues de face et de profil. Le premier type d'examen permet d'observer la répartition des masses du biofilm sur la surface et le second d'évaluer l'épaisseur du voile biologique. Les résultats présentés sont représentatifs de l'ensemble des électrodes étudiées.

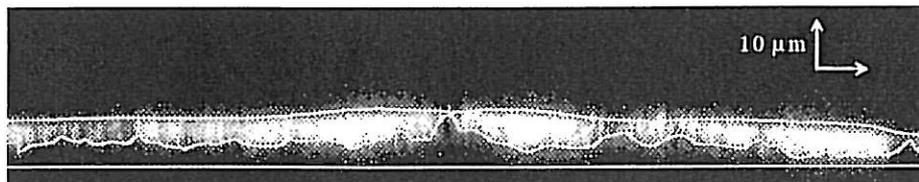
La vue de face de la photo §4.3a permet d'appréhender la répartition aléatoire et en petits amas du biofilm. Les parties sombres correspondent à la biomasse et les parties claires à la surface du métal.

La vue de profil §4.3b est réalisée en déposant une goutte de FMC-Dextrane d'un poids moléculaire de 580 000 sur la surface de l'électrode. Cette molécule est un composé fluorescent dont la taille ne lui permet pas de diffuser dans le biofilm. La goutte forme donc un film soulignant à la surface de la biomasse. A partir d'observations dans différents plans successifs, un ordinateur reconstitue une vue de profil permettant alors de déterminer l'épaisseur maximum du biofilm. L'épaisseur maximum des échantillons testés a été évaluée à environ 10 μm .

Cette détermination corrobore les évaluations faites avec la technique électrochimique. Le voile biologique présent sur les électrodes était donc très ténu.



(a) *vue de face*



(b) *vue de profil*

Photos §4.3 : Observations réalisées au MLBC d'une surface exposée 15 jours en eau de mer naturelle (objectif 100 à immersion). (a) vue de face et (b) vue de profil. Sur la vue de profil, il est possible de distinguer trois lignes blanches, du haut vers le bas, la surface du liquide fluorescent, la surface du biofilm et la surface de l'électrode.

3. Conclusion

La technique électrochimique développée a permis de mesurer l'épaisseur d'un biofilm formé en eau de mer "naturelle" c'est-à-dire sans addition d'un nutriment. Les épaisseurs déterminées sont comparables avec les mesures réalisées avec le Microscope Laser à Balayage Confocal. La faisabilité et la validité de la méthode ont été montrées dans le cas d'études en eau de mer.

Les phénomènes mis en évidence lors du développement du biofilm en eau de mer additionnée d'extrait de levure sont observés en eau de mer naturelle quoiqu'en moindre amplitude. Un courant non diffusionnel et le blocage de surface active sont observés. Le courant non diffusionnel est attribuable à la production d'espèces électroactives excrétées par les microorganismes. Le blocage de la surface est dû à l'adsorption de produits métaboliques des bactéries.

L'impédance AC a permis de montrer le blocage de la surface active réelle de l'électrode et la diffusion à travers la couche poreuse vers l'interface.

Dans le cas d'une électrode recouverte d'une couche poreuse, le blocage partiel de la surface ne peut être montré en impédance EHD car aucun modèle théorique correspondant n'a été développé jusqu'à ce jour.

La diminution de surface active apparente peut être mis en évidence à l'aide de mesures en régime stationnaire (variation de K^{-1}) et en impédance EHD.

D. Comparaison des épaisseurs des biofilms formés en eau de mer

Sur la figure §4.36 sont représentées les allures générales de l'évolution de l'épaisseur des biofilms développés dans les différentes eaux de mer : additionnée d'extrait de levure, naturelle et stérilisée.

L'importance des différentes épaisseurs entre elles est cohérente vis à vis des conditions expérimentales de développement. Plus l'activité biologique est favorisée par l'apport de nutriment, plus l'épaisseur de la couche poreuse augmente.

Suivant les conditions d'exposition, les constantes de temps de développement de la biomasse sont différentes. La formation du film bactérien est plus rapide avec l'apport d'un complément nutritif.

Ce diagramme est comparable à la figure §1.1 présentant les différentes étapes de formation du biofilm (Characklis, 1990).

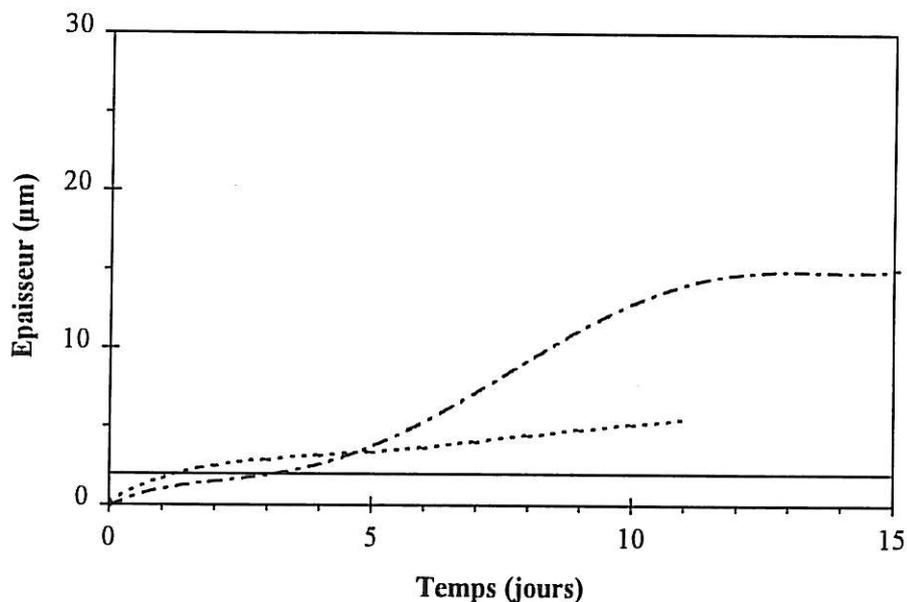


Figure §4.36 : Allures générales du développement des biofilms dans différentes eaux de mer : — — — additionnée d'extrait de levure, - - - - naturelle et ——— limite de détection.

E. Conclusion

La technique mise au point en eau de mer donne des résultats satisfaisants. Elle permet de suivre l'évolution de l'épaisseur de la biomasse ainsi que celle de la surface active de l'électrode lors de l'adhésion bactérienne.

Cette série d'expérience a permis de montrer que l'activité de la biomasse provoque le blocage de la surface active de l'électrode vraisemblablement par la production d'espèces chimiques s'adsorbant sur la surface. L'implication de l'extrait de levure dans le blocage de la surface est à exclure car celui-ci a lieu avec ou sans apport de ce nutriment.

Le blocage de la surface est plus marqué pour un biofilm nourri. Si on considère que la qualité de l'eau reste constante, l'adsorption d'une substance présente dans l'eau semble peu plausible car le courant observé et le blocage serait d'intensité comparable dans les deux milieux d'exposition.

Dès les premiers jours d'exposition apparaît un courant non diffusionnel qui croît avec le développement du biofilm. Ce courant n'existe pas en absence de biomasse lors de l'utilisation du traceur ferricyanure. Sa valeur est différente suivant le traceur utilisé car le potentiel de polarisation est différent. Les microorganismes génèrent des espèces électroactives.

Un biofilm nourri a une activité physiologique plus importante et génère plus de produits métaboliques. Le blocage de la surface et l'augmentation du courant non diffusionnel est en effet plus important en eau de mer additionnée d'extrait de levure. De plus, ce phénomène n'a pas été observé en milieu stérile où l'activité biologique est nulle.

Le biofilm développé est constitué de plusieurs types de microorganismes produisant eux-mêmes différentes espèces chimiques. Une étude polarographique devrait permettre d'établir quelles substances électroactives sont à l'origine du courant non diffusionnel.

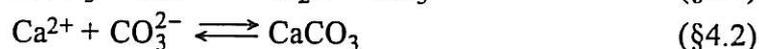
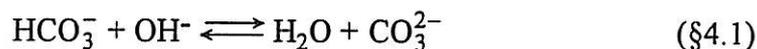
La prochaine étape est d'adapter cette méthode à des biofilms développés en eau douce.

II. CARACTERISATION D'UN BIOFILM FORME EN EAU DOUCE

La réglementation concernant l'utilisation du chlore dans les réseaux d'eau potable afin de contrôler la quantité de bactéries est plus en plus contraignante. Les bactéries planctoniques ne constituent qu'une très faible partie de la flore bactérienne vis à vis des bactéries sessiles présentes dans les biofilms. Les microorganismes planctoniques ne sont que des émissaires de colonies incluses dans des biofilms vers de nouveaux sites d'implantations. Contrôler le taux de bactéries dans l'eau doit passer obligatoirement par le contrôle du voile biologique et donc la connaissance de la quantité de biomasse dans les canalisations des réseaux d'eau potable.

Le but de ce travail est de transposer la méthode mise en place pour la caractérisation d'un biofilm développé en eau de mer en milieu eau douce. L'adaptation de la technique à ce nouveau milieu soulève des problèmes qui n'existent pas ou à bien moindre échelle en eau de mer.

La principale difficulté en eau douce est le risque de formation de dépôts calcaires ; l'eau douce contenant souvent une quantité importante de carbonates et calcium. Ces sels peuvent précipiter et former un dépôt calco-magnésien bloquant ainsi la surface active de l'électrode. Le dépôt ainsi formé bloque la surface active de l'électrode de façon très significative. Lors de la réaction de réduction de l'oxygène dans un milieu riche en carbonates et calcium, ce phénomène peut être particulièrement marqué et rapide. Il y a production de OH^- et par conséquent une augmentation du pH interfacial. Cette augmentation de l'alcalinité de l'interface déplace les équilibres chimiques suivants :



Ce qui entraîne le dépôt d'une couche de calcaire à l'interface.

Dans le cas d'un biofilm développé en eau douce, il n'était donc pas possible de réaliser les mesures électrochimiques dans l'eau du réseau d'eau potable. Le milieu de mesure devait limiter les risques de dépôt calco-magnésien sans toutefois perturber de

façon trop importante les micro-organismes présents dans le biofilm (par exemple : éclatement des parois bactériennes dû à la pression osmotique). Le choix s'est donc porté sur une eau du commerce peu minéralisée et contenant peu de calcium et de carbonates : l'eau de Volvic (Tableau §4.4). Cependant, ce choix apporte certains inconvénients. La résistance électrolytique R_e de l'eau de Volvic est importante et conduit à la prise en compte de la chute de tension dite *chute ohmique* entre l'électrode de référence et l'électrode de travail.

Cations	Concentration (mg.L ⁻¹)	Anions	Concentration (mg.L ⁻¹)
Ca ²⁺	9,9	Cl ⁻	8,4
Mg ²⁺	6,1	NO ₃ ⁻	6,3
Na ⁺	9,4	SO ₄ ²⁻	6,9
K ⁺	5,7	CO ₃ ²⁻	65,3

Tableau §4.4 : Principaux constituants minéraux de l'eau de Volvic.

A. Etude exploratoire en eau douce

1. Conditions expérimentales

Plusieurs électrodes sont immergées dans des bacs contenant différents milieux d'*exposition* d'eau douce sur le site du CIRSEE/Lyonnaise de Eaux (Le Pecq). Trois différents milieux sont testés :

- Eau du réseau Le Pecq
- Mélange 50/50 eau du réseau Le Pecq / eau de Seine filtrée sur sable
- Eau de Seine filtrée sur sable

L'eau du réseau d'eau potable du Pecq est une eau peu chargée du point de vue biologique, des matières organiques et des nutriments. Ce milieu est donc peu favorable de produire des biofilms.

L'eau de Seine filtrée sur sable est, quant à elle, une eau très chargée et peut produire des biofilms fortement développés.

Le mélange 50/50 de ces deux eaux devrait donc pouvoir donner des biomasses intermédiaires par rapport aux deux extrêmes décrites précédemment.

Des électrodes statiques ont été disposées dans des bacs contenant les différents milieux qui étaient continuellement renouvelés à raison de 10% par heure. La surface des électrodes était dirigée vers le bas et maintenue à l'abri de la lumière durant la phase de colonisation.

Différents paramètres physico-chimiques et biologiques durant la période d'exposition sont présentés dans le tableau §4.5.

Paramètres	Eau Le Pecq	50/50 Eau Le Pecq / Seine	Eau de Seine
Température (°C)	20 - 22	20 - 22	22 - 24
Turbidité (NTU)	0,3	7 - 23	15 - 44
UV (254 nm)	0,075 - 0,106	1,003 - 2,159	2,058 - 4,156
COD (mg.L ⁻¹)	0,8 - 1,3	1,8 - 2,4	2,6 - 3,8
CODB (mg.L ⁻¹)	0,1 - 0,2	0,3 - 0,5	0,6 - 0,9
R2A (ufc.mL ⁻¹)	1 - 30 000	100 - 200 000	3 000 - 400 000

Tableau §4.5 : Paramètres physico-chimiques et biologiques contrôlés durant la période d'exposition. COD carbone organique dissous, CODB carbone organique dissous biodégradable, R2A dénombrement bactérien à 22°C sur milieu R2A (cf. Annexe) et UFC unités formation colonie.

De plus, des billes de verre d'un diamètre de 2,8 mm² sont placées dans chaque bac avec les électrodes. Vingt billes sont prélevées dans chaque milieu à différents instants durant la période d'exposition des électrodes pour permettre une mesure d'ATP (protocole, cf Annexe).

Les *mesures* sont réalisées dans une eau de Volvic à une température de 25°C. Seules des mesures en régime stationnaire sont effectuées.

Dans le cas des milieux d'exposition eau réseau du Pecq et mélange eau du Pecq eau de Seine, le traceur électrochimique est l'oxygène. Par contre, dans le cas du milieu eau de Seine, deux traceurs sont utilisés : l'oxygène et le $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$. La composition des milieux de mesure est la suivante :

- *Traceur oxygène*

Eau de Volvic

Oxygène dissous 9,3 mg.L⁻¹

- *Traceur ferricyanure*

Eau de Volvic

$\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6/\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ 10⁻²M

L'eau de Volvic possède une résistance électrolytique importante, $R_e = 810 \Omega \cdot \text{cm}^2$ (mesurée par impédance AC), du fait de sa faible minéralisation. Dans cette première expérience exploratoire en eau douce, le choix est fait de ne pas corriger, même partiellement, cette chute ohmique.

La chute ohmique importante décale les potentiels interfaciaux par rapport aux potentiels imposés. De plus, la cinétique de réduction de l'oxygène dans l'eau de Volvic est à l'origine d'un plateau de diffusion de réduction de l'oxygène très mal défini. Toute la difficulté réside dans la détermination du potentiel de mesure. Afin d'estimer ce potentiel, des mesures en régime stationnaire sont réalisées sur une électrode nue à différents potentiels. L'ajustement des données expérimentales permet alors d'évaluer les paramètres i_o , i_∞^{-1} et K^{-1} . Le potentiel retenu est déterminé pour un courant non diffusionnel et un paramètre i_∞^{-1} les plus petits possibles ainsi que pour un inverse du coefficient de Levich le plus proche de sa valeur théorique.

Lors de l'utilisation du premier milieu de mesure, l'électrode est polarisée sur le plateau limite de diffusion de réduction de l'oxygène à -1300 mV/ECS (fig. §4.37).

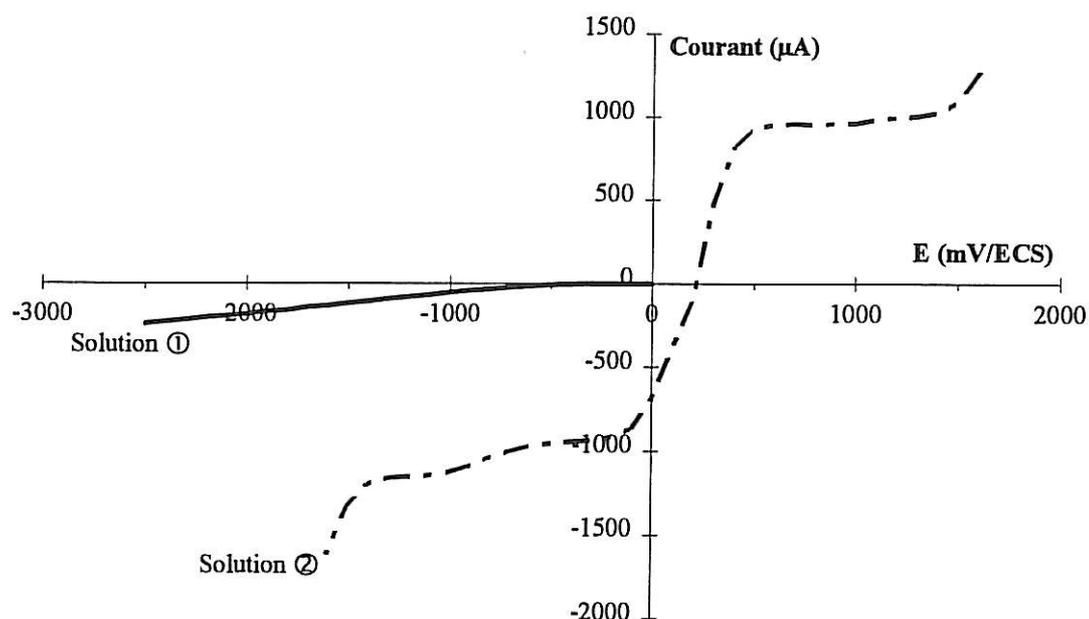


Figure §4.37 : Courbes de polarisation dans : ① Eau de volvic et ② Eau de volvic + $K_3Fe(CN)_6/K_4Fe(CN)_6$ $10^{-2}M$.

Dans le second milieu de mesure, l'électrode est polarisée sur le plateau limite de diffusion de réduction du $Fe(CN)_6^{3-}$ à -300 mV/ECS (fig. §4.37).

La résistance d'électrolyte de cette solution est de $R_e = 21 \Omega.cm^2$ (mesurée par impédance AC). Quoique la résistance d'électrolyte soit ici moins élevée que dans une solution d'eau de Volvic pure, ici aussi, la chute ohmique est à l'origine du déplacement du plateau de diffusion de réduction du $Fe(CN)_6^{3-}$ vers les valeurs plus négatives. Le potentiel de mesure est déterminé par la méthode décrite ci-dessus.

2. Résultats et discussion

➤ Régime stationnaire

Les paramètres i_0 , i_{∞}^{-1} et K^{-1} déterminés par ajustement des données expérimentales sont présentées figures §4.38, §4.39, §4.40 et §4.41.

Dans le cas du traceur oxygène, le courant non diffusionnel est nul et n'évolue pas dans le temps et cela quel que soit le milieu. Par contre, dans le cas du traceur ferricyanure, le courant non diffusionnel est élevé et augmente légèrement au cours du temps avec un phénomène semblable à celui décrit pour le biofilm développé en eau de mer. Le paramètre i_{∞}^{-1} , reste constant dans le temps quel que soit le traceur utilisé et les électrodes testées. Dans le cas du traceur oxygène, la valeur de i_{∞}^{-1} n'est pas nulle. Le paramètre K^{-1} reste constant dans le temps et d'une valeur proche de sa valeur théorique.

L'existence du courant i_0 avec le traceur ferricyanure dès le jour 0 d'exposition peut s'expliquer par l'existence de traces d'espèces électroactives dans l'eau de Volvic. Ce courant augmente dans le temps dans un phénomène analogue à celui décrit pour l'eau de mer. Le courant i_0 n'est pas observable avec le traceur oxygène. Cependant, le potentiel de polarisation est très différent et peut expliquer cette différence entre les résultats obtenus avec les deux traceurs. La hausse du courant i_0 avec le ferricyanure peut être attribuée à la sécrétion d'espèces électroactives par les microorganismes.

La composante cinétique de la réaction de réduction de l'oxygène se répercute sur i_{∞}^{-1} (éq. §2.10). En partant du principe que le jour 0 correspond à une électrode nue donc à une épaisseur nulle, la présence d'un biofilm n'a pas été mise en évidence.

Le coefficient de Levich reste constant durant toute l'expérience et est égal à sa valeur théorique. Ce fait indique que les mesures électrochimiques se sont bien déroulées.

La gamme des courants mesurés évolue peu sur 20 jours. Aussi, les paramètres i_0 , i_{∞}^{-1} et K^{-1} varient peu durant la période d'exposition. Les résultats obtenus avec les deux traceurs sont cohérents entre eux. Seule l'évolution du courant non diffusionnel avec le traceur ferricyanure permet de mettre en évidence une activité bactérienne pour les électrodes immergées en eau de Seine.

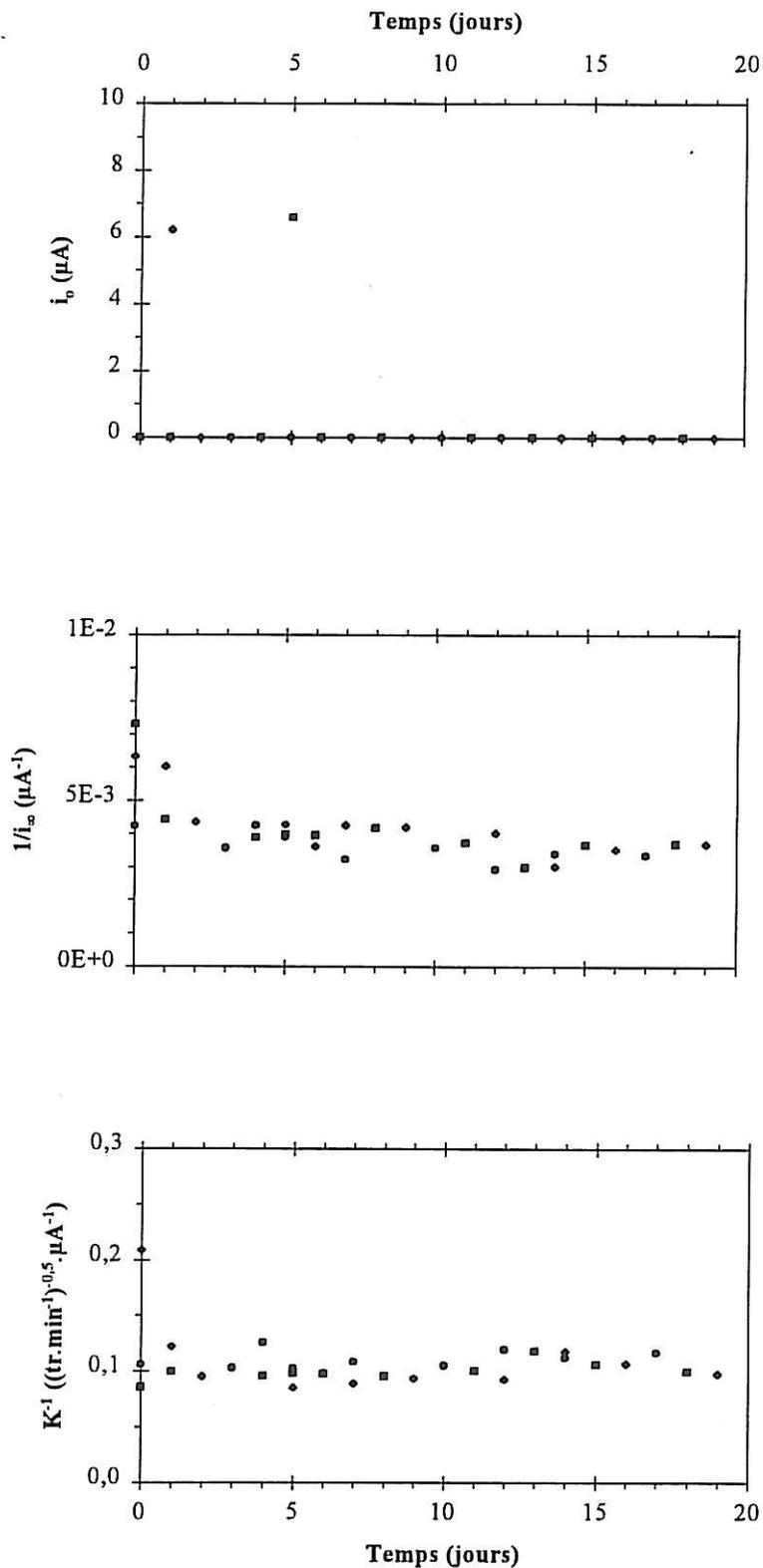


Figure §4.38 : i_0 , i_0^{-1} et K^{-1} en fonction du temps d'immersion dans l'eau du réseau Le Pecq. Mesures réalisées dans une solution de Volvic (traceur oxygène). Les symboles ■, ● et ◆ distinguent 3 électrodes différentes.

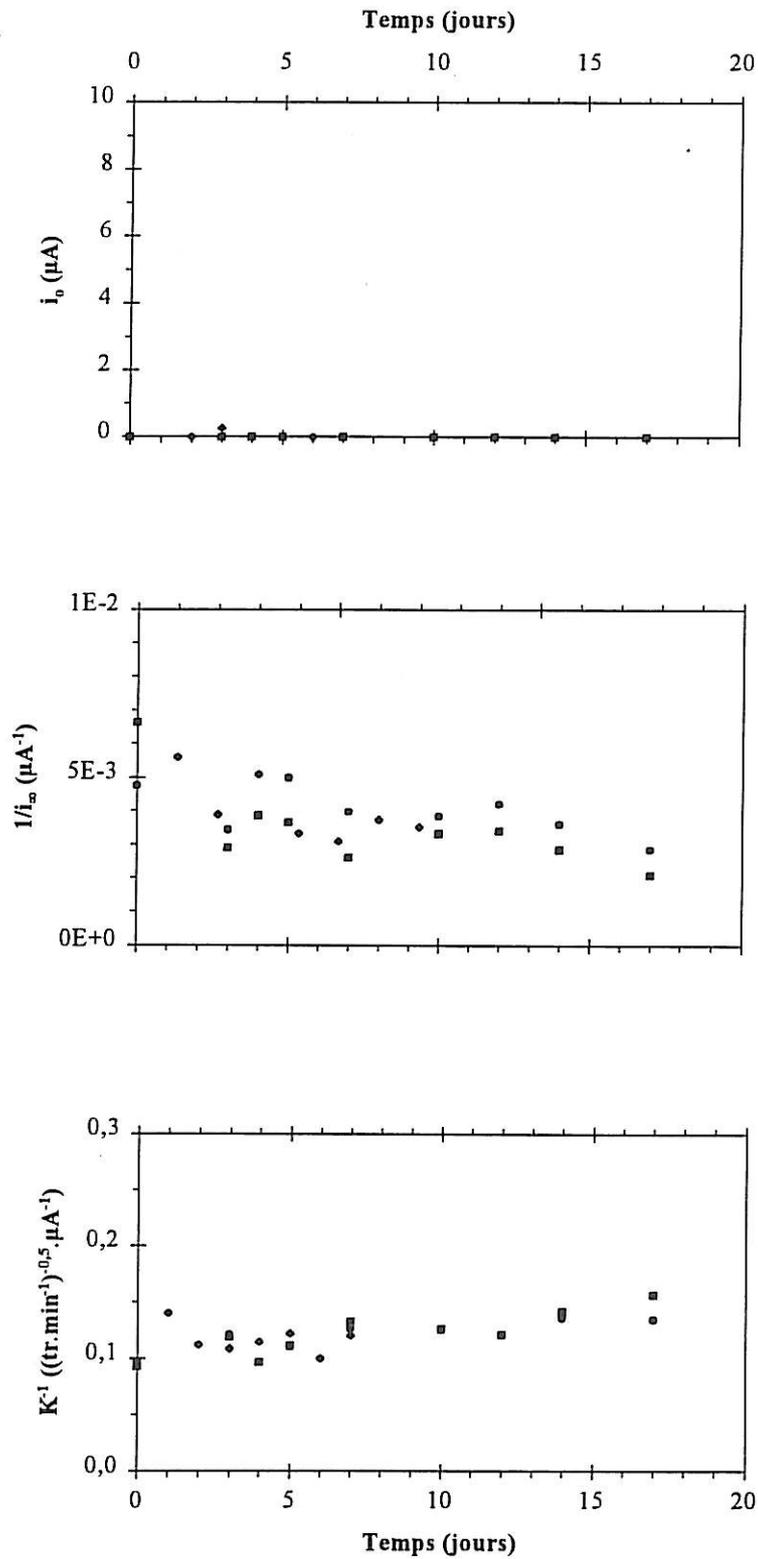


Figure §4.39 : i_0 , i_∞^{-1} et K^{-1} en fonction du temps d'immersion dans l'eau de Seine filtrée. Mesures réalisées dans une solution de Volvic (traceur oxygène). Les symboles \blacksquare , \bullet et \blacklozenge distinguent 3 électrodes différentes.

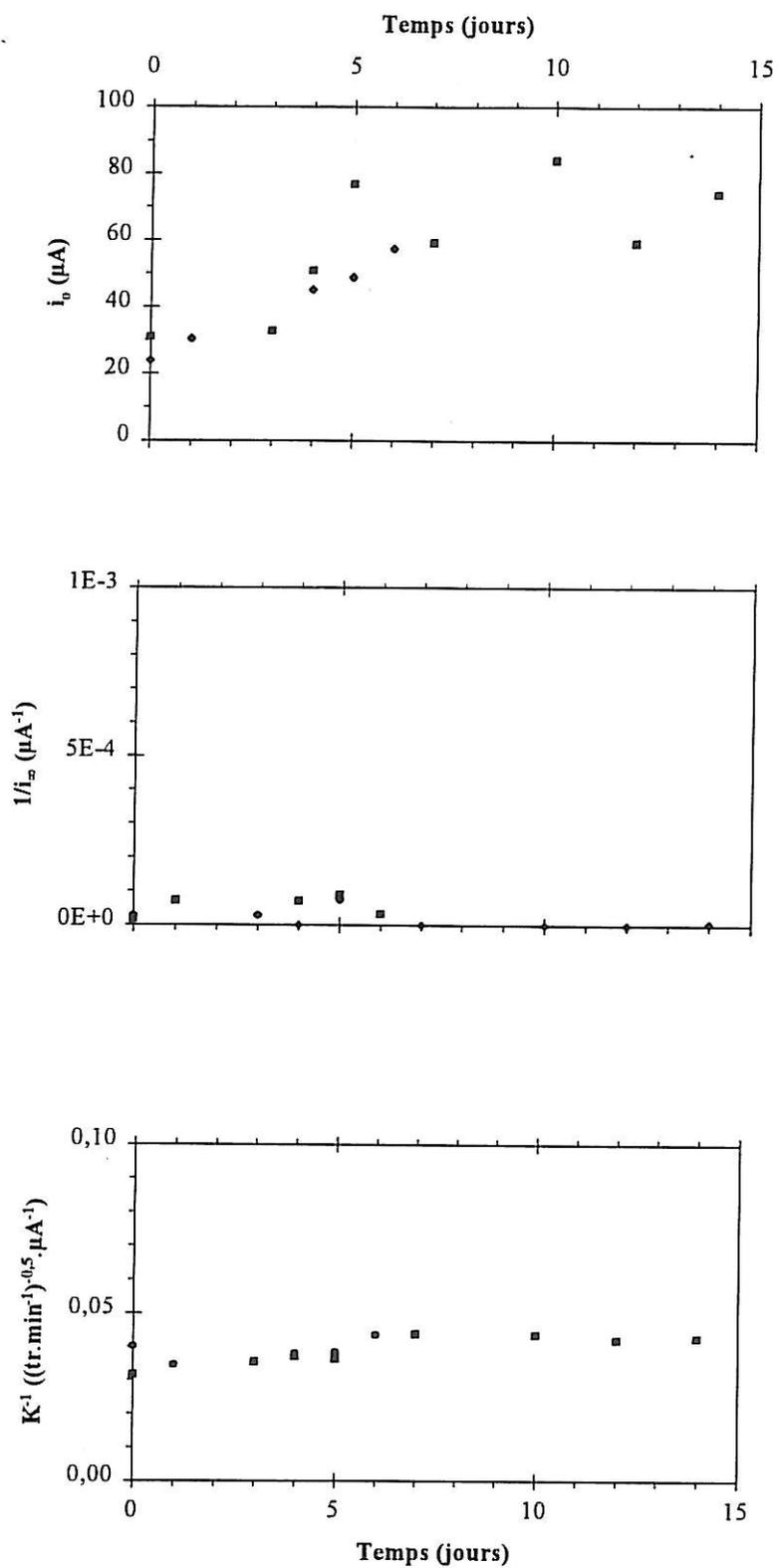


Figure §4.40 : i_0 , i_0^{-1} et K^{-1} en fonction du temps d'immersion dans l'eau de Seine filtrée. Mesures réalisées dans une solution de Volvic + $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6/\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ 10^{-2}M (traceur $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$). Les symboles ■ et ● distinguent 2 électrodes différentes.

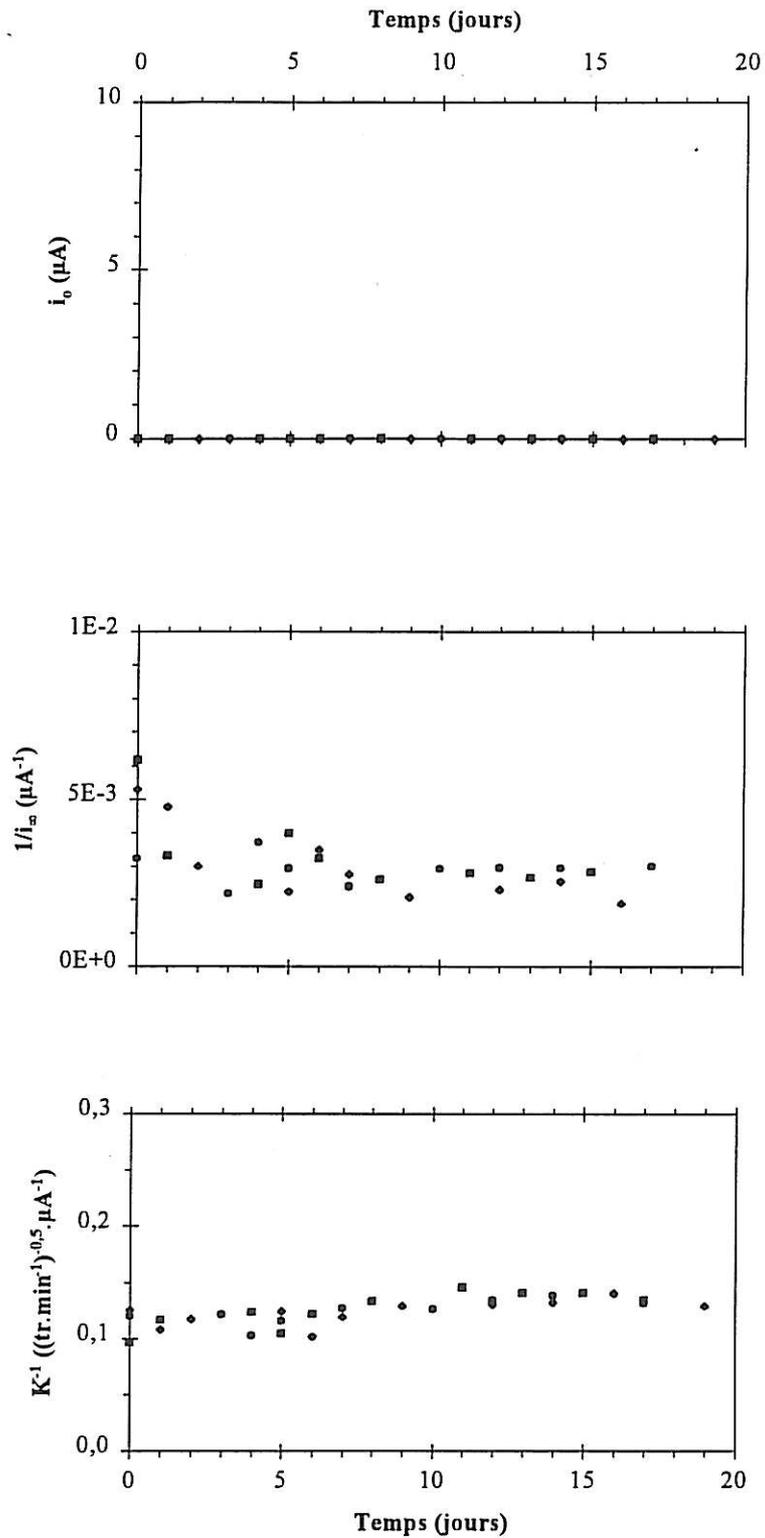


Figure §4.41 : i_0 , i_∞^{-1} et K^{-1} en fonction du temps d'immersion dans l'eau de Seine filtrée/réseau Le Pecq. Mesures réalisées dans une solution de Volvic (traceur oxygène). Les symboles ■, ● et ◆ distinguent 3 électrodes différentes.

➤ Mesures d'ATP

Les mesures d'ATP (fig. §4.42) montrent une hausse de l'activité biologique de la biomasse se développant sur les billes de verre exposées dans l'eau de la Seine et dans le mélange Seine/Le Pecq. Cette augmentation n'est pas observée sur les billes prélevées dans l'eau du Pecq. L'activité biologique observée est conforme aux attentes qui avaient été envisagées dans chaque milieu. Elle est proportionnelle aux nutriments présents dans l'eau

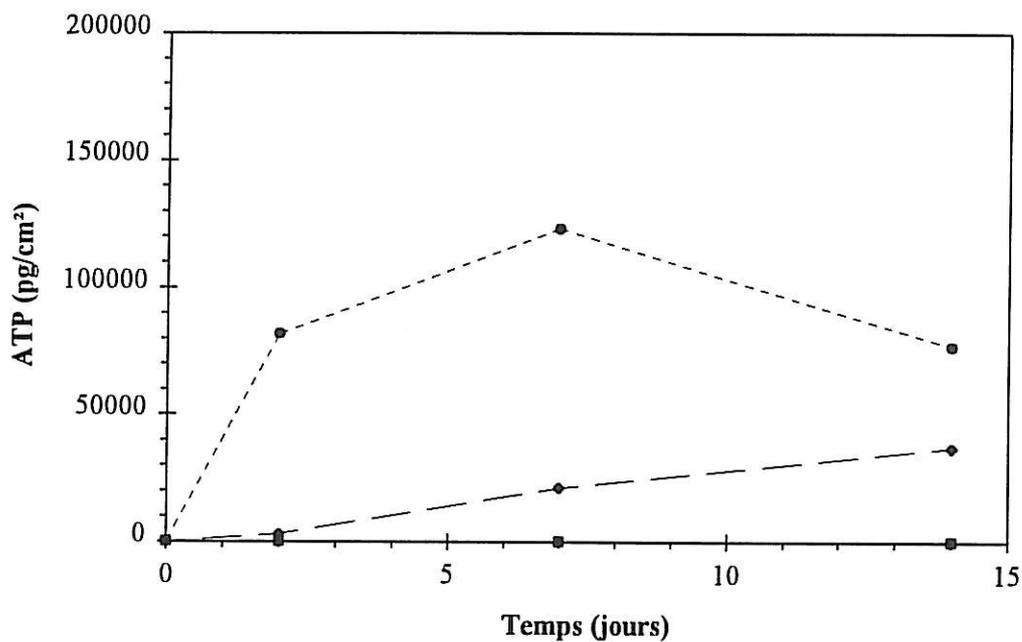


Figure §4.42 : Mesures d'ATP en fonction du temps d'immersion dans différents milieux (— ■ — Le Pecq, — ◆ — Seine/Le Pecq, - - - ● - - - Seine).

➤ Observations au MEB et en épifluorescence

Des observations par épifluorescence (protocole, cf. Annexe) et au MEB (protocole, cf. Annexe) sont réalisées sur la surface des électrodes à la fin du temps d'exposition afin d'évaluer l'importance de la biomasse :

• *Eau du Pecq* (Photos §4.4)

Densité bactérienne $> 7 \cdot 10^5$ bactéries.cm⁻² au MEB
 $1 \cdot 10^6$ bactéries.cm⁻² en épifluorescence

La surface des échantillons est peu colonisée avec des dépôts particuliers épars et quelques formes bactériennes pédonculées et coccoïdes.

• *Mélange eau du Pecq / eau de Seine*

Densité bactérienne non mesurée au MEB
 $> 9 \cdot 10^6$ bactéries.cm⁻² en épifluorescence

L'évaluation des densités bactériennes en épifluorescence est rendue difficile (limite de détection de la méthode).

• *Eau de Seine* (Photos §4.5)

Densité bactérienne $> 5 \cdot 10^6$ bactéries.cm⁻² au MEB
non mesurable en épifluorescence

L'évaluation des densités bactériennes au MEB est rendue difficile par la présence d'une forte concentration en matériel dendritique. L'aspect général de la surface est caractérisé par des dépôts particuliers importants, des débris organiques et des bactéries de type morphologique différent : filamenteux, bâtonnets longs ou trapus, coccoïdes.

3. Conclusion

Les observations au MEB et en épifluorescence ainsi que les mesures d'ATP montrent qu'il est indéniable qu'un grand nombre de bactéries s'est développé sur les électrodes. Les densités bactériennes évaluées au MEB et en épifluorescence sont du même ordre de grandeur. Les différences peuvent être attribuées aux erreurs d'estimation et aux préparations différentes des échantillons suivant la technique d'observation utilisée. Les estimations sont conformes aux densités bactériennes attendues entre elles dans les différents milieux.

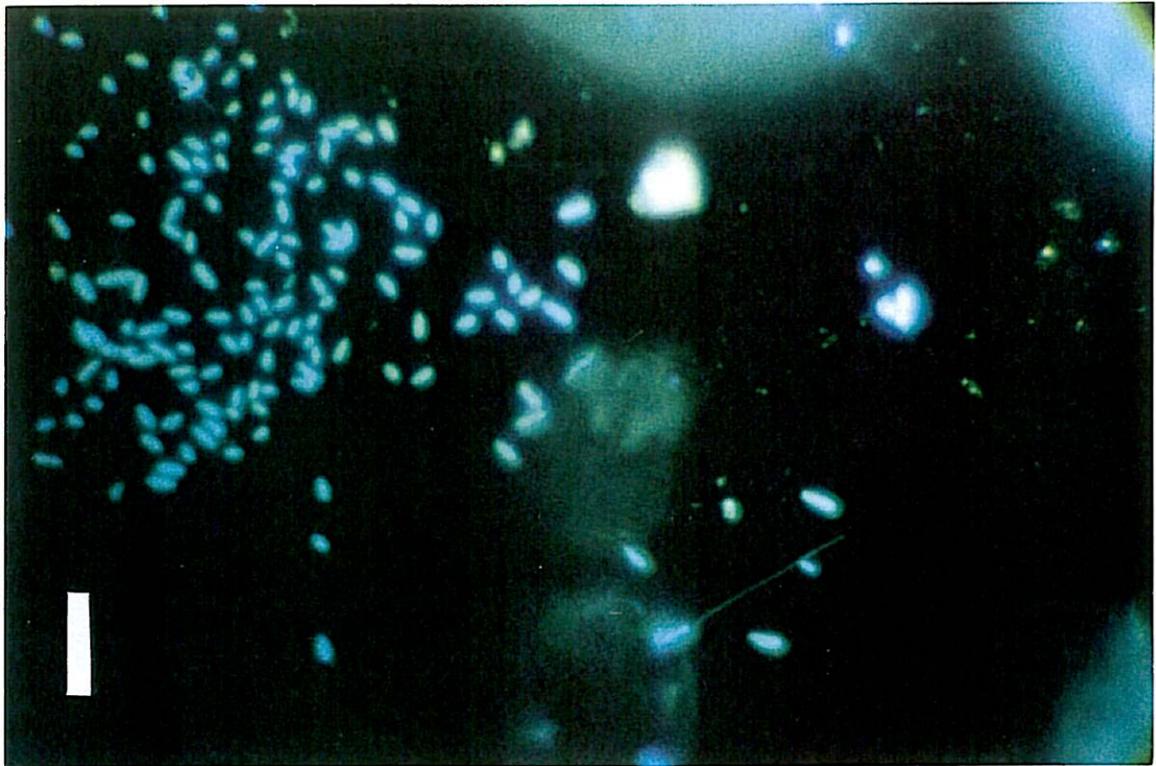
La méthode électrochimique n'a pas permis, quant à elle, de mettre en évidence la présence de couches poreuses sur les électrodes avec le traceur oxygène. En se basant sur les résultats obtenus en eau de mer, le courant non diffusionnel observé avec le traceur

ferricyanure montre l'existence de microorganismes sur les électrodes immergées en eau de Seine. L'épaisseur de ce biofilm est inférieure au seuil de détection.

Cependant, l'expérimentation de la méthode en eau de mer a montré sa faisabilité et la validité des résultats obtenus.

La structure du biofilm étudié dans cette étude peut être incriminée. Les électrodes ont été immergées dans des bacs où l'eau était renouvelée mais relativement stagnante. La structure des biofilms développés doit être très hétérogène et ne se présente pas comme une barrière de diffusion. Ce biofilm est donc très différent des biofilms développés en eau de mer. Il ne correspond pas au modèle physique de couche poreuse proposé.

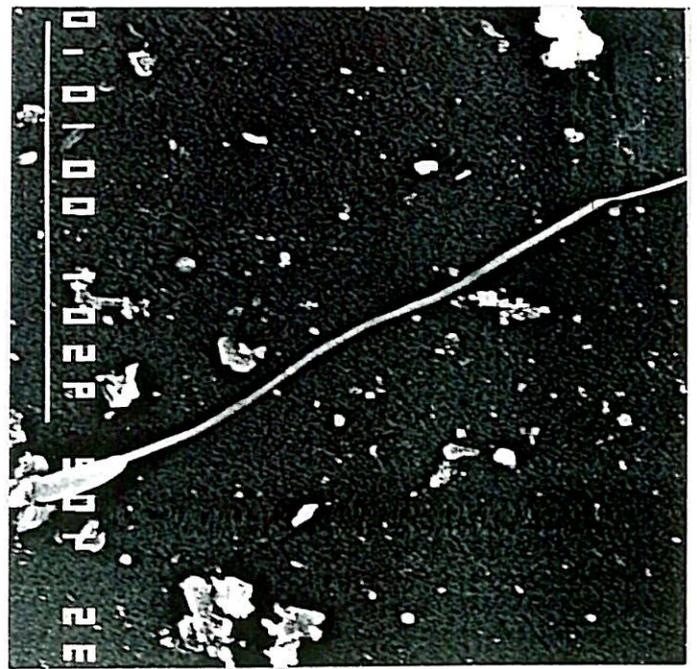
Compte tenu du désaccord entre les mesures électrochimiques et biologiques, une étude au Microscope Laser Confocal à Balayage semble être l'étude permettant de trancher sur cette divergence.



a

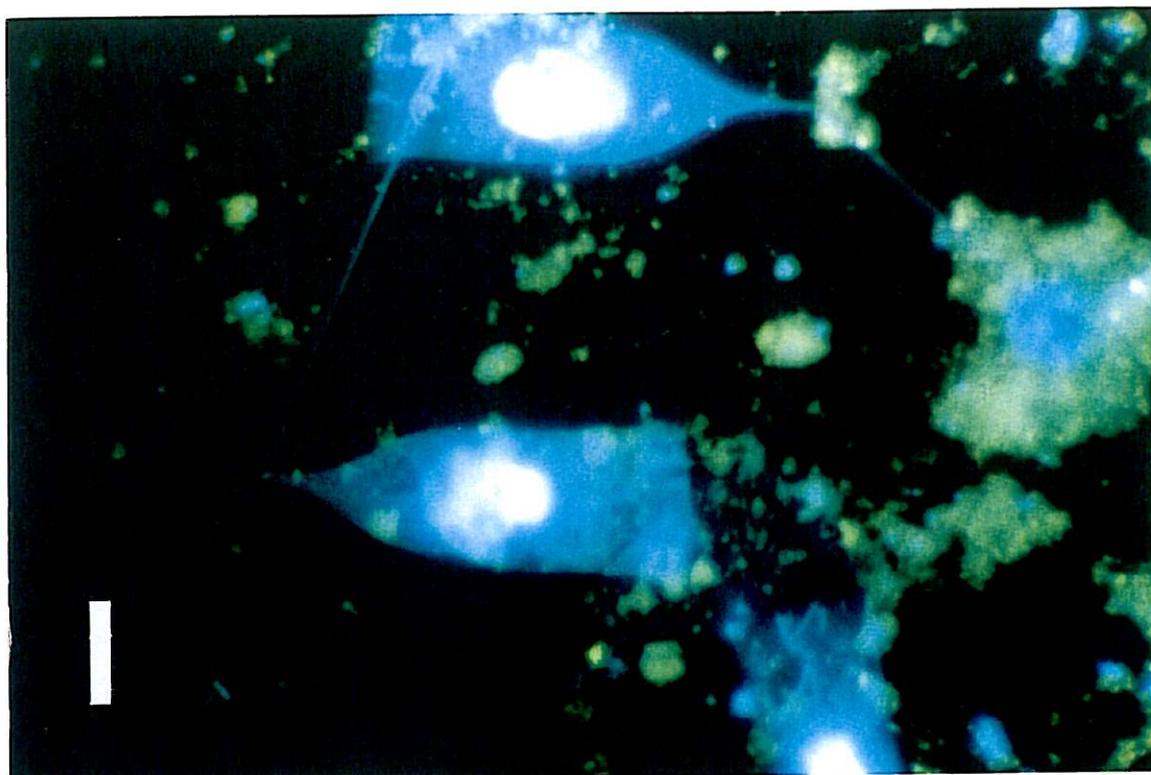


b

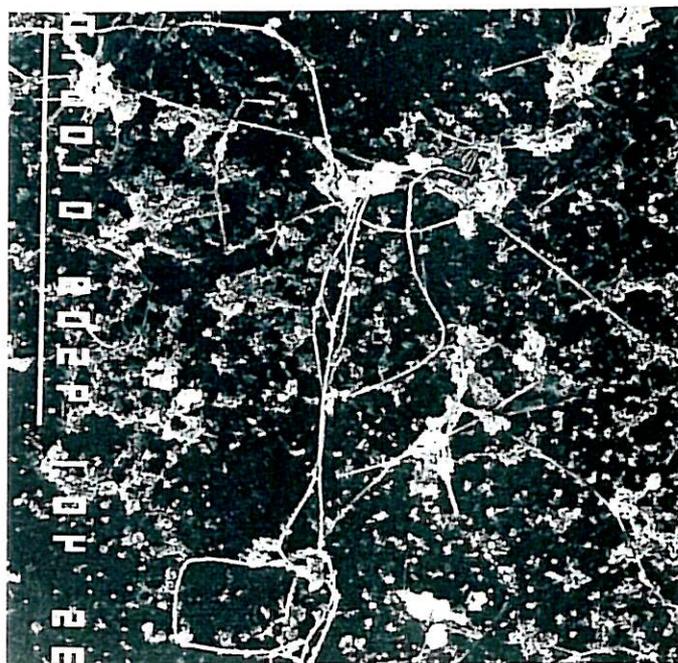


c

Photos §4.4 : Observations de la surface d'une électrode immergée 3 semaines dans l'eau du réseau Le Pecq : (a) aspect général en épifluorescence, (b) aspect général et (c) détail au MEB. L'échelle représentée sur la partie gauche des photos par un trait blanc correspond à une dimension de 10 μm pour la photo (a) prise en épifluorescence (objectif 100 à immersion), de 100 μm pour la photo (b) prise au MEB et de 1 μm pour la photo (c) prise au MEB.



a



b



c

Photos §4.5 : Observations de la surface d'une électrode immergée 3 semaines dans l'eau de la Seine : (a) aspect général en épifluorescence, (b) aspect général et (c) détail au MEB. L'échelle représentée sur la partie gauche des photos par un trait blanc correspond à une dimension de 10 μm pour la photo (a) prise en épifluorescence (objectif 100 à immersion), de 100 μm pour la photo (b) prise au MEB et de 10 μm pour la photo (c) prise au MEB.

B. Seconde étude réalisée en eau douce

L'étude préalable a montré que le biofilm développé en eau douce stagnante à une structure différente des biomasses formées en eau de mer. Le biofilm de l'étude précédente n'a pas une structure de couche poreuse et ne joue donc pas un rôle de barrière de diffusion.

Afin d'effectuer les mesures sur un biofilm plus épais, les conditions de culture de la biomasse sont changées. Le dispositif déjà décrit dans le paragraphe §4.A.I concernant le biofilm développé en eau de mer est utilisé. Ce système renouvelle le milieu en continu avec un débit relativement important permettant un meilleur apport nutritif. De plus, de l'extrait de levure est ajouté pour améliorer encore cet effet.

L'utilisation du traceur oxygène dans une solution de Volvic pure s'est avérée trop délicate lors de la première série de mesures et est abandonnée. Ici, seul le traceur ferricyanure est utilisé. La salinité de cette solution est plus importante, néanmoins, pour palier aux problèmes liés à la résistance électrolytique, la chute ohmique est corrigée partiellement pour améliorer les conditions de mesure.

1. Conditions expérimentales

Plusieurs électrodes sont immergées durant une période d'environ un mois dans l'eau potable du réseau de Brest. Les *conditions d'exposition* sont les suivantes :

- Eau potable (Brest)
- Extrait de levure 3,0 mg.L⁻¹
- Température 23-25°C
- Chlore libre 0,05 ppm
- Débit 1 L.min⁻¹ ($\approx 0.1 \text{ m.s}^{-1}$)

Le taux de chlore libre est mesuré par une méthode colorimétrique dont le protocole est présenté en Annexe. Sa faible concentration n'interfère pas avec le développement de la biomasse.

La *solution de mesure* est composée d'eau de Volvic additionnée de $K_3Fe(CN)_6$ / $K_4Fe(CN)_6$ $10^{-2}M$. La température est régulée à $20^\circ C$.

Trois types de mesures sont réalisées successivement : mesures en régime stationnaire, impédances EHD et AC. Durant toutes les mesures, la chute ohmique est corrigée. Les électrodes sont alors polarisées sur le plateau limite de diffusion de réduction de $Fe(CN)_6^{3-}$ durant les mesures en régime stationnaire et d'impédance EHD. Elles sont ensuite polarisées au potentiel correspondant à la moitié du courant évalué sur le plateau limite de diffusion de réduction de $Fe(CN)_6^{3-}$. Les mesures d'impédance AC sont réalisées à $1200 \text{ tr} \cdot \text{min}^{-1}$.

2. Résultat et discussion

a) Mesures en régime stationnaire

Sur une période d'un mois environ, des mesures en régime stationnaire sont réalisées régulièrement sur plusieurs électrodes. Les résultats de deux électrodes, appelées respectivement électrodes 1 et 2, sont développés ici et seront distinguées les uns aux autres dans cette présentation. La gamme des courants mesurés est présentée dans la figure §4.43. Les paramètres i_0 , i_∞^{-1} et K^{-1} en fonction du temps sont présentés dans la figure §4.44.

Le courant non diffusionnel i_0 augmente de manière significative dans la première semaine pour atteindre des valeurs pouvant aller jusqu'à plus de $60 \mu A$ puis redescend pour se stabiliser à environ $15-20 \mu A$ suivant l'électrode considérée. Le paramètre i_∞^{-1} déterminé dans le cas de l'électrode 1 croît régulièrement pour atteindre un maximum au jour 8 d'environ $8 \cdot 10^{-4} \mu A^{-1}$ pour ensuite se stabiliser à une valeur de 5 ou $6 \cdot 10^{-4} \mu A^{-1}$. Dans le cas de la seconde électrode, le paramètre i_∞^{-1} subit une brusque augmentation aux jours 3 et 4 pour ensuite redescendre à des valeurs oscillant entre 2 et $3 \cdot 10^{-4} \mu A^{-1}$. L'inverse du coefficient de Levich K^{-1} reste constant à une valeur de $0,04 \mu A^{-1} \cdot (\text{tr} / \text{min})^{-0,5}$. Seuls les

jours 3 et 4 pour l'électrode 2 présentent des valeurs très élevées pouvant atteindre $0,12 \mu\text{A}^{-1} \cdot (\text{tr} / \text{min})^{-0,5}$.

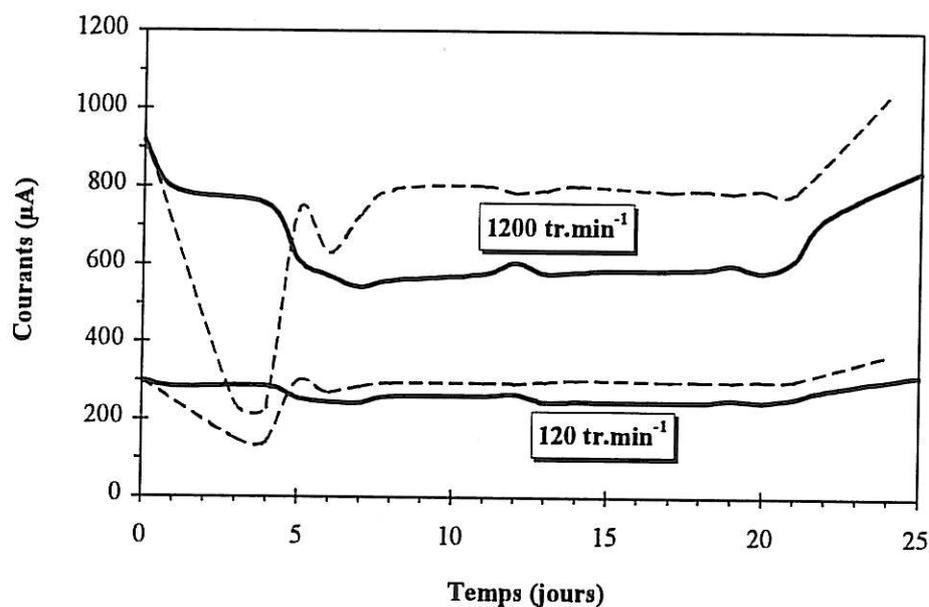


Figure 4.43 : Gamme des courants mesurés avec des vitesses allant de 120 à 1200 tr.min⁻¹ en fonction du temps d'immersion dans l'eau du réseau de Brest additionné d'extrait de levure pour deux électrodes 1 — et 2 — —. Mesures réalisées dans une solution d'eau de Volvic additionnée de $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6/\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ 10^{-2}M (traceur $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$).

Comme dans le cas des mesures en eau de mer, l'apparition du courant non diffusionnel au cours de la période d'immersion peut être attribuée à la production d'espèces électroactives par le biofilm. Les microorganismes se succédant lors de l'établissement de la biomasse semblent sécréter différents composés en quantité variable pouvant être réduits ou oxydés lors de la polarisation de l'électrode. Cette altération du milieu interfacial se traduit par l'existence même puis la modification de ce courant.

i_{∞}^{-1} étant proportionnel à δ_f / SD_f , cette soudaine élévation puis diminution de ce paramètre peut être attribuée à un brutal changement de δ_f , S et/ou D_f c'est-à-dire de l'épaisseur, la surface active apparente et/ou de la porosité de la couche poreuse.

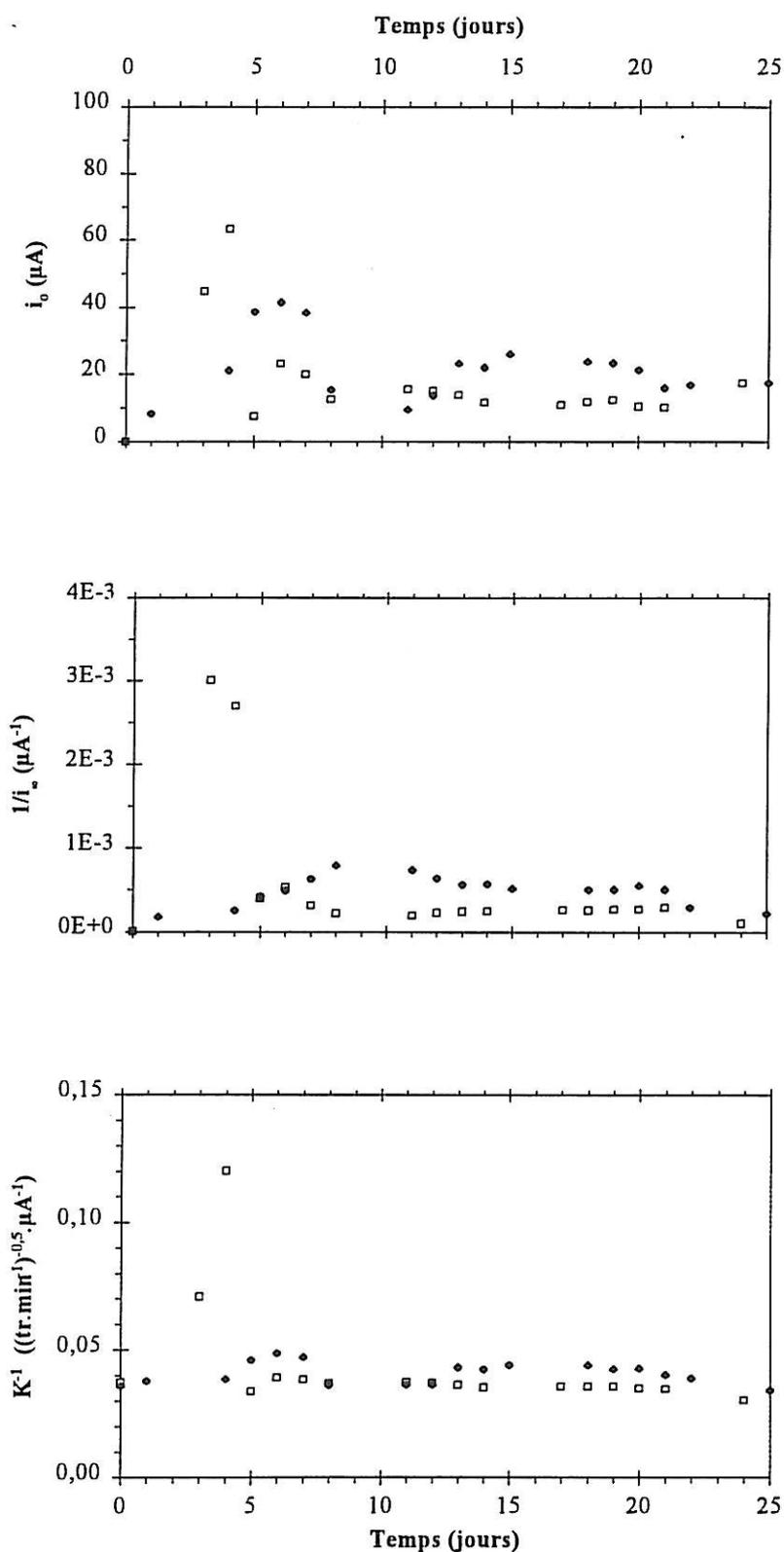


Figure §4.44 : i_0 , i_0^{-1} et K^{-1} en fonction du temps d'immersion dans l'eau du réseau de Brest additionné d'extrait de levure pour les électrodes 1 \diamond et 2 \square . Mesures réalisées dans une solution d'eau de Volvic additionnée de $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6/\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ 10^{-2}M (traceur $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$).

K^{-1} est inversement proportionnel à la surface active apparente de l'électrode. Cette brusque augmentation puis diminution pourrait être due à un blocage puis un déblocage de la surface.

Le phénomène ayant lieu les jours 3 et 4 pour l'électrode 2 se manifeste par une diminution de la vitesse de diffusion $\frac{D_f}{\delta_f}$ dans la couche poreuse ainsi que celle de la surface active de l'électrode. Au même moment, une forte baisse des courants mesurés peut être observée (fig. §4.43). La concentration du traceur dans la solution restant constante dans la solution de mesure, le blocage de la surface est alors confirmé. La structure de la couche recouvrant l'électrode est donc plus dense durant cette période. Un phénomène analogue, mais moins marqué, a pu être observé en eau de mer.

b) Impédance EHD

Les mesures en impédance EHD ont été réalisées à intervalle régulier durant la période d'exposition des électrodes. Dans un premier temps, au jour 0, les diagrammes de Bode obtenus ont permis de vérifier la réductibilité par la fréquence adimensionnelle p des courbes réalisées avec une électrode nue.

Par contre, les diagrammes obtenus après plusieurs jours d'immersion montrent que les données ne sont pas réductibles par la fréquence p . A titre d'exemple, les figures §4.45 et §4.46 donnent les courbes obtenues pour les deux électrodes au jour 14 à différentes vitesses de rotation (300, 600 et 1200 tr.min⁻¹). Les courbes sont déplacées vers les plus basses fréquences quand la vitesse de rotation de l'électrode augmente.

Sur les figures §4.47 et §4.48, les courbes obtenues à 1200 tr.min⁻¹ à différents moments durant la période d'exposition ont été superposées. Comme dans le cas des mesures en régime stationnaire, les deux électrodes 1 et 2 ont montré un comportement différent.

Dans le cas de l'électrode 1 (fig. §4.47), les données sont décalées vers de plus faibles valeurs de p par rapport à celles obtenues pour une électrode nue. La courbe du jour

4 est légèrement déplacée vers les basses fréquences puis les jours 7, 14 et 18 sont regroupées plus bas en fréquence. A partir du jour 7, les données sont translatées vers des plus faibles valeurs de p .

Dans le cas de l'électrode 2 (fig. §4.48), aux jours 4 et 7, la translation des données vers de plus faibles valeurs de p est beaucoup plus importante ce qui indique une couche poreuse beaucoup plus dense et recoupe les informations tirées des mesures en régime stationnaire. Les courbes aux jours 14 et 18 sont regroupées et légèrement déplacées vers les plus basses fréquences par rapport au jour 0. Par contre, les données sont fortement déplacées vers de plus faibles valeurs de p pour les jours 4 et 7.

La translation des courbes sur les figures §4.45 et §4.46 est cohérente avec une diffusion à travers une couche poreuse. Le temps de diffusion du traceur dans le biofilm est identique aux différents âges du biofilm. Quoiqu'il en soit, le déplacement des différentes courbes est relativement faible quel que soit l'âge du biofilm. La porosité de la biomasse est donc très proche de 1 et les coefficients de diffusion dans le biofilm et la solution électrolytique peuvent être considérés comme égaux.

Dans le cas de l'électrode 2 (fig. §4.48), aux jours 4 et 7, le temps de diffusion $\frac{\delta_f^2}{D_f}$ dans la couche poreuse est beaucoup plus important. Tout comme les mesures en régime stationnaire, l'impédance EHD montre que la structure de la couche poreuse est alors plus dense. Le biofilm montre ensuite un comportement identique au biofilm développé sur l'électrode 1. Les courbes aux jours 14 et 18 montrent une porosité de la biomasse proche de 1.

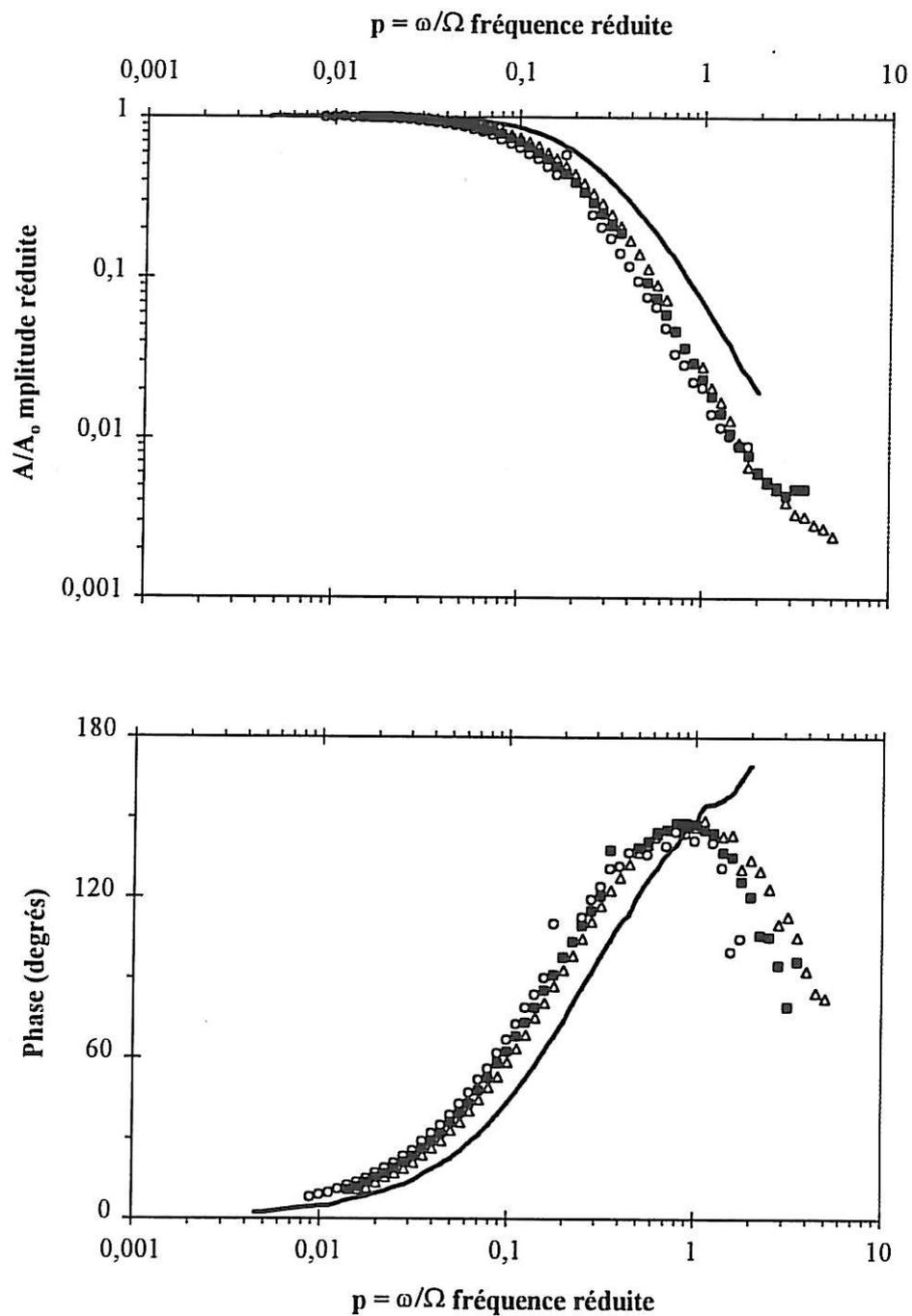


Figure 4.45 : Impédance EHD à différentes vitesses de rotation Δ 300, \blacksquare 600, \circ 1200 $\text{tr}\cdot\text{min}^{-1}$ pour un biofilm âgé de 14 jours développé en eau douce sur l'électrode 1 comparée au diagramme obtenu pour une électrode nue —. Mesures réalisées dans une solution d'eau de Volvic additionnée de $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6/\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ 10^{-2}M (traceur $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$).

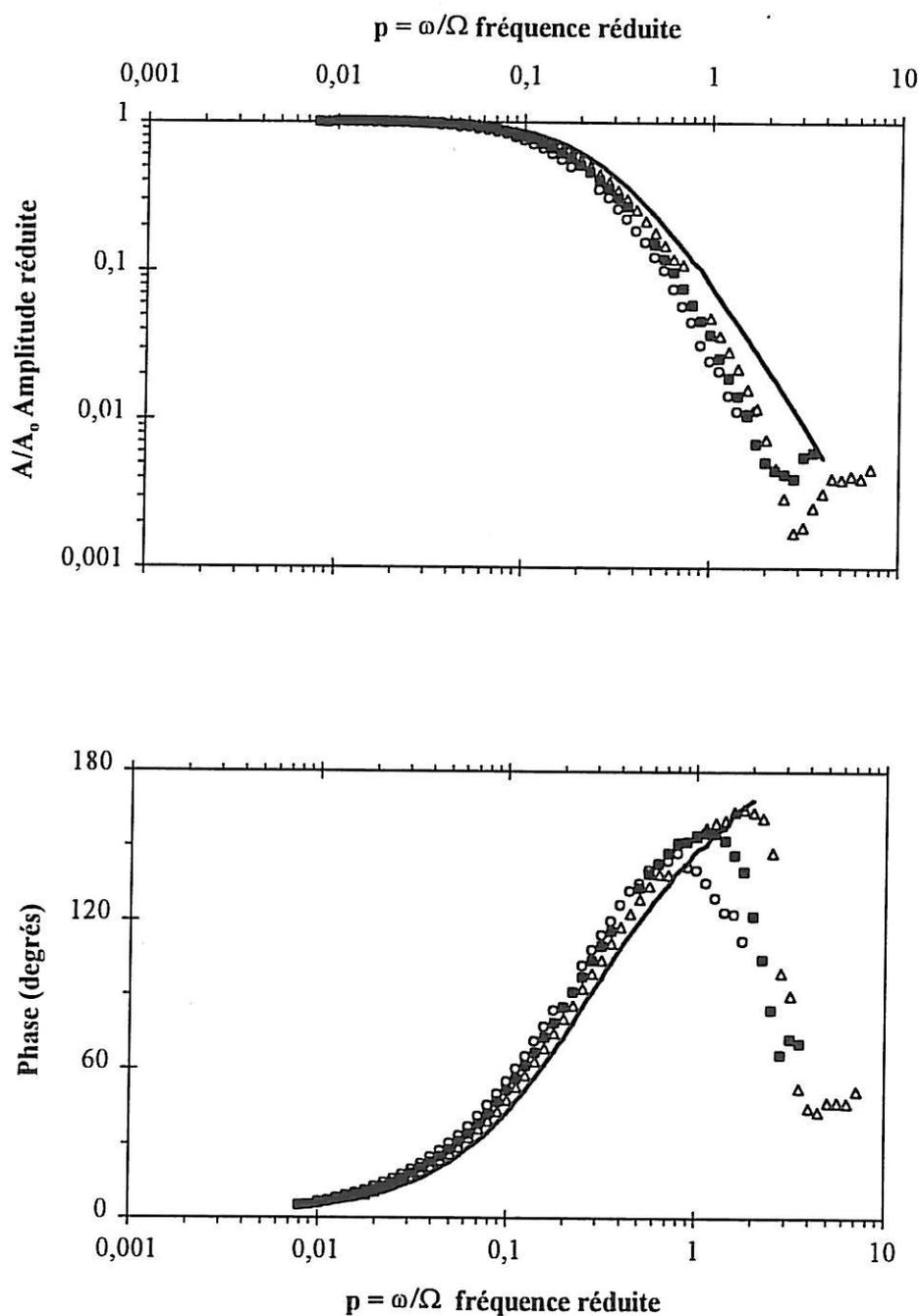


Figure 4.46 : Impédance EHD à différentes vitesses de rotation Δ 300, \blacksquare 600, \circ 1200 $\text{tr}\cdot\text{min}^{-1}$ pour un biofilm âgé de 14 jours développé en eau douce sur l'électrode 2 comparée au diagramme obtenu pour une électrode nue —. Mesures réalisées dans une solution d'eau de Volvic additionnée de $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6/\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ 10^{-2}M (traceur $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$).

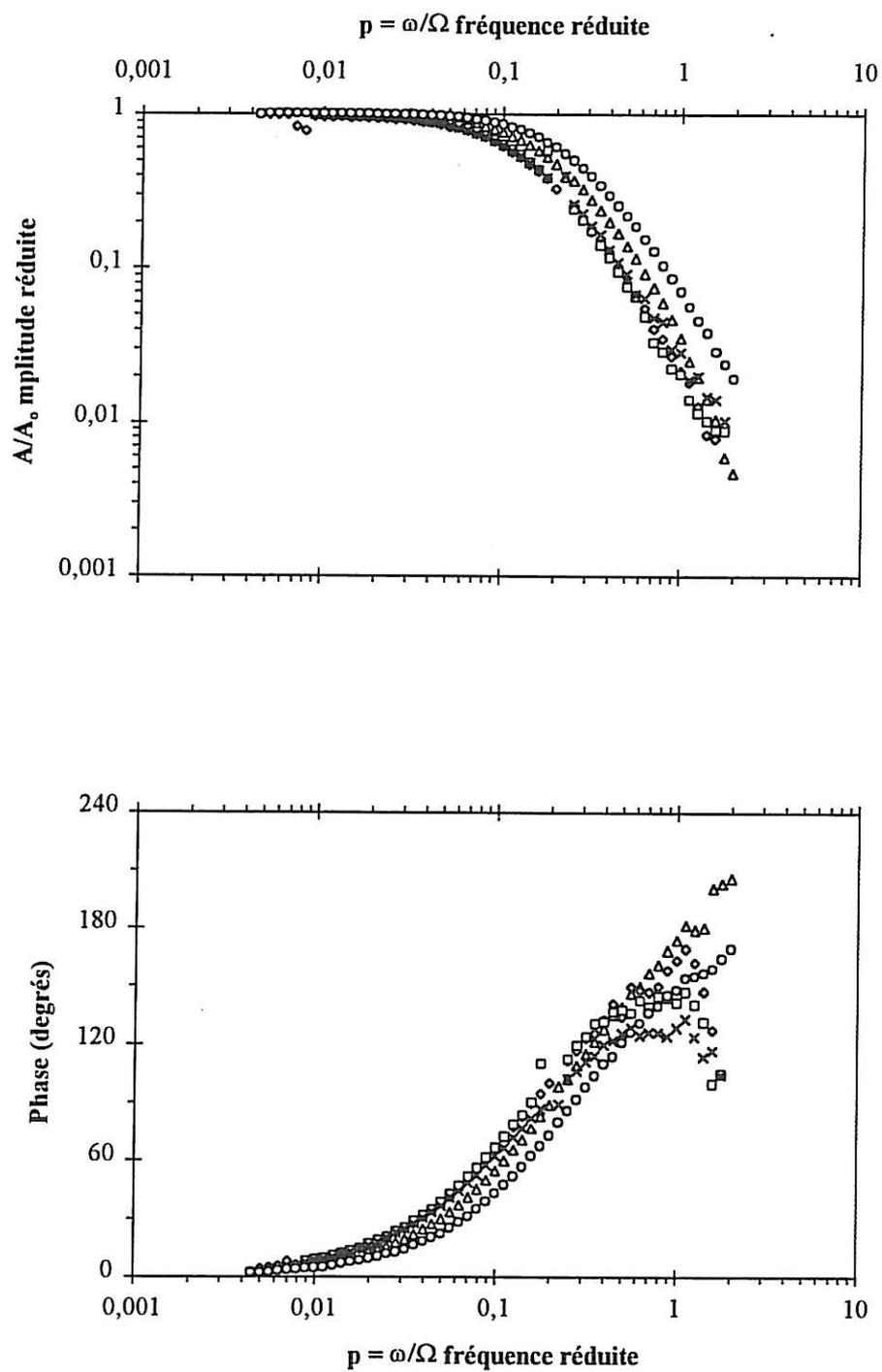


Figure §4.47 : Impédance EHD pour un biofilm développé en eau douce sur l'électrode 1 au jour \circ 0, Δ 4, \diamond 7, \square 14 et \times 18 à 1200 tr.min⁻¹. Mesures réalisées dans une solution d'eau de Volvic additionnée de $K_3Fe(CN)_6/K_4Fe(CN)_6$ 10⁻²M (traceur $Fe(CN)_6^{3-}$).

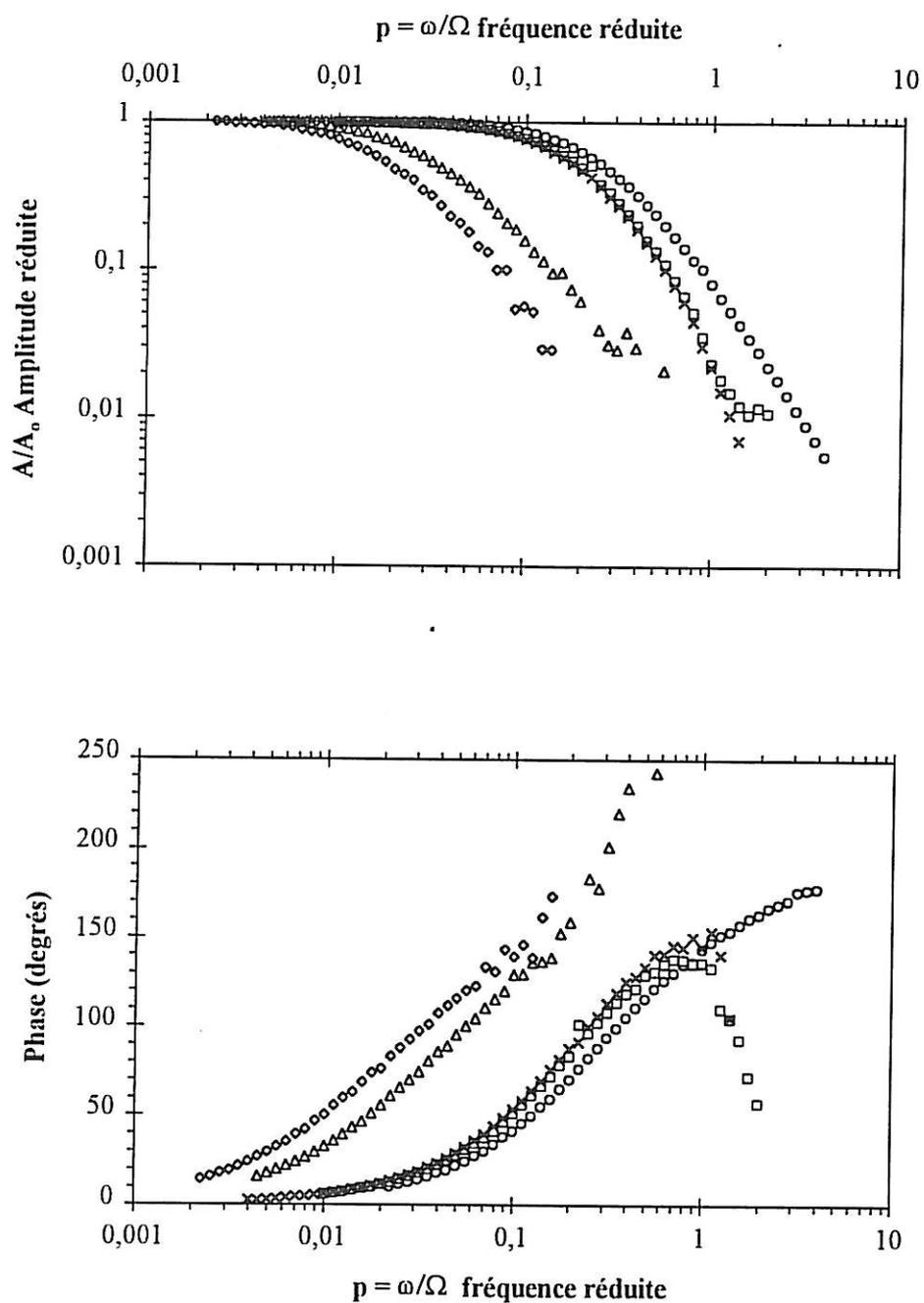


Figure §4.48 : Impédance EHD pour un biofilm développé en eau douce sur l'électrode 2 au jour \circ 0, \triangle 4, \diamond 7, \square 14 et \times 18 à 1200 tr.min⁻¹. Mesures réalisées dans une solution d'eau de Volvic additionnée de $K_3Fe(CN)_6/K_4Fe(CN)_6$ $10^{-2}M$ (traceur $Fe(CN)_6^{3-}$).

c) Impédance AC

Les résultats obtenus en impédance AC à différents temps d'exposition sont présentés dans les figures §4.48 et §4.49.

Pour l'électrode 1, au jour 4, la boucle correspondant au transport de matière voit son diamètre augmenter pendant que la résistance de transfert de charge, R_{tc} , croît aussi en passant de 300 à 650 Ω . La R_{tc} atteint son maximum avec une valeur de 850 Ω au jour 7 puis reste stable. La résistance de transport de matière atteint sa valeur maximale le 14^e jour pour ensuite légèrement rediminuer et rester stable.

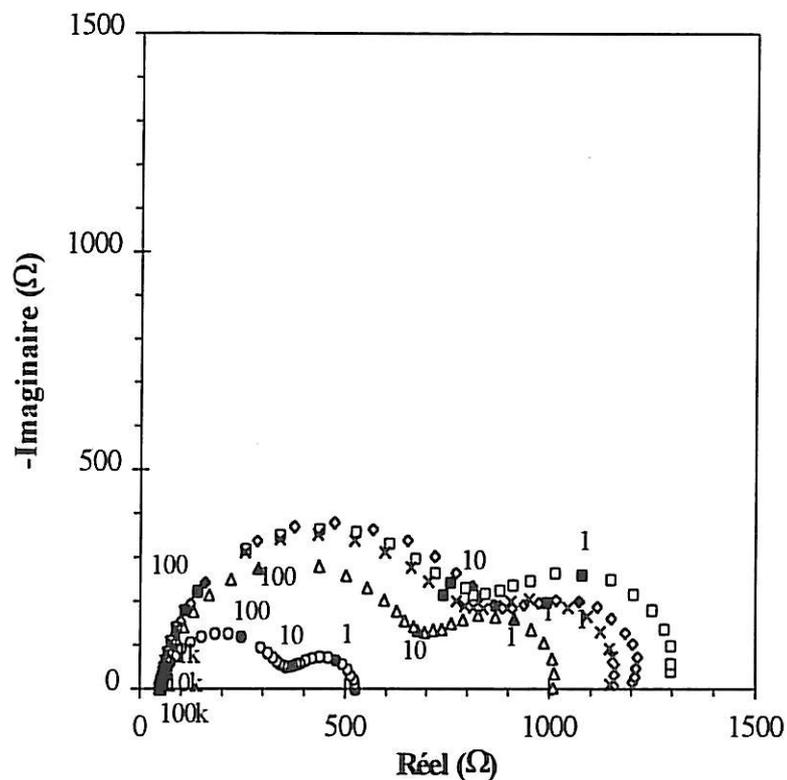


Figure §4.48 : Impédance AC pour un biofilm développé sur l'électrode 1 au jour \circ , Δ , \diamond , \square 14 et \times 18 à 1200 tr.min⁻¹. Mesures réalisées dans une solution d'eau de Volvic additionnée de $K_3Fe(CN)_6/K_4Fe(CN)_6$ 10⁻²M (Traceur $Fe(CN)_6^{3-}$).

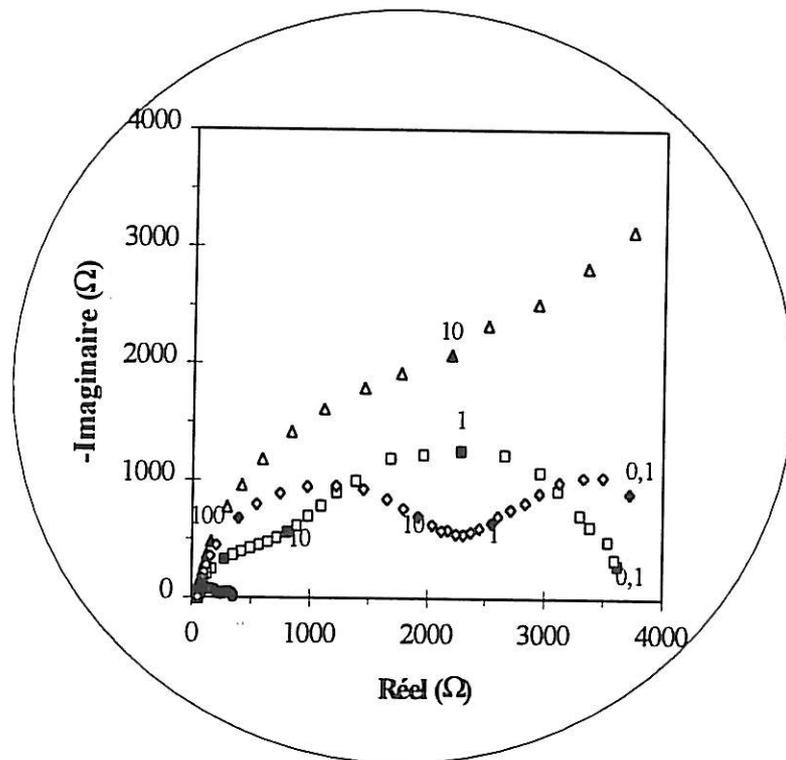
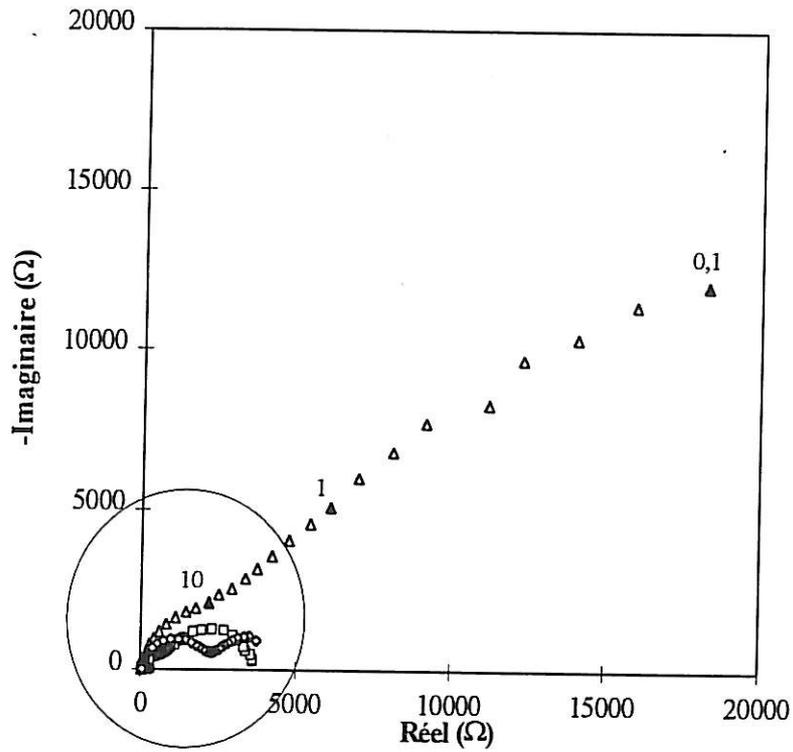


Figure §4.49 : Impédance AC pour un biofilm développé sur l'électrode 2 au jour ○ 0, △ 4, ◇ 7 et □ 14 à 1200 tr/min. Mesures réalisées dans une solution d'eau de Volvic additionnée de $K_3Fe(CN)_6/K_4Fe(CN)_6$ $10^{-2}M$ (Traceur $Fe(CN)_6^{3-}$).

Dans le cas de l'électrode 2, la résistance de transfert de charge et la boucle contrôlée par le transport de matière varient fortement durant le temps d'exposition. La résistance de transfert de charge commence par augmenter du jour 0 au jour 4 en passant de 250 Ω à plus de 6000 Ω , diminue ensuite pour atteindre une valeur d'environ 1300 Ω au jour 14. Dans le même temps, la boucle contrôlée par la diffusion commence par s'agrandir jusqu'au jour 4 puis décroît.

Pour ces mêmes électrodes, K^{-1} reste invariant en montrant bien que l'inverse du coefficient de Levich est proportionnel à une surface active apparente et non pas à une surface active réelle.

La réponse de l'électrode 1 en impédance AC est cohérente avec les informations obtenues par les méthodes précédentes. L'analyse est identique à celle décrite pour l'eau de mer. Dans un premier temps, la surface est bloquée partiellement par le biofilm. Au bout du 7^e jour, la surface de l'électrode ne varie plus. Le processus de diffusion dans le voile biologique est visible dès le 4^e jour. La biomasse se développe en épaisseur puis atteint un plateau.

L'électrode 2 se distingue encore dans son comportement vis à vis de l'électrode 1. Dès le 4^e jour, la surface se bloque partiellement et la boucle de diffusion augmente fortement montrant ainsi qu'une couche de forte épaisseur et dense s'est formée. Ces observations confirment les résultats obtenus en impédance EHD et en régime stationnaire. Du jour 4 au jour 7, la surface se débloque et l'épaisseur du biofilm diminue. Par la suite, la surface décroît encore alors que son épaisseur fluctue légèrement.

d) Traitement des données

La valeur moyenne du paramètre K^{-1} au jour 0 déterminée en régime stationnaire est d'environ $0,037 \left(\sqrt{\text{tr. min}^{-1}} \cdot \mu\text{A} \right)^{-1}$. A partir de cette dernière, il est possible de déterminer un coefficient de diffusion de $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$ de $6,0 \cdot 10^{-6} \text{ cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ pour une température de mesure de 20°C comme lors de la procédure suivie pour les biofilms formés en eau de mer. Cette valeur est légèrement supérieure à celle déterminée pour de

l'eau de mer car la solution eau de Volvic + $K_3Fe(CN)_6/K_4Fe(CN)_6$ a une salinité inférieure.

$$D = D_f = 6,0 \cdot 10^{-6} \text{ cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$$

En prenant $D = D_f = 6,0 \cdot 10^{-6} \text{ cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$, l'épaisseur de la biomasse se formant sur les électrodes est déterminée à partir du coefficient i_{∞}^{-1} puis son évolution est tracée en fonction du temps (fig. §4.50).

Les courbes obtenues montrent une forte augmentation de l'épaisseur dans les premiers jours d'exposition. Pour chaque électrode, un plateau est ensuite atteint. La valeur limite obtenue au bout de 3 semaines est assez proche de la valeur obtenue dans le cas des biofilms formés en eau de mer additionnée de nutriment. La forte augmentation de l'épaisseur correspond à la forte chute des courants observés sur la figure §4.43. Des phénomènes analogues mais beaucoup moins marqués ont été observés en eau de mer.

A partir de K^{-1} , il est possible de supposer que la surface reste constante sauf pour les jours 3 et 4 de l'électrode 2. Les points correspondant aux jours 3 et 4 pour l'électrode 2 correspondent à des valeurs de K^{-1} très importantes et qui peuvent être interprétées comme un fort blocage de la surface. Le biofilm doit être très dense et le coefficient de diffusion dans le biofilm doit être différent de celui-ci dans la solution. Un calcul prenant les coefficients de diffusion dans et hors de la couche comme égaux et tenant compte de la surface active apparente conduit à des valeurs abhéroentes. Durant cette courte période, le biofilm doit être plus dense.

e) Observations en épifluorescence

Des observations au Microscope à épifluorescence (protocole, cf. Annexe) sur la surface des électrodes font apparaître une population bactérienne importante (photos §4.6).

La densité élevée des microorganismes et des exopolymères ne permet pas d'évaluer le nombre de bactéries sur la surface. Il est cependant possible de mettre en évidence un biofilm important.

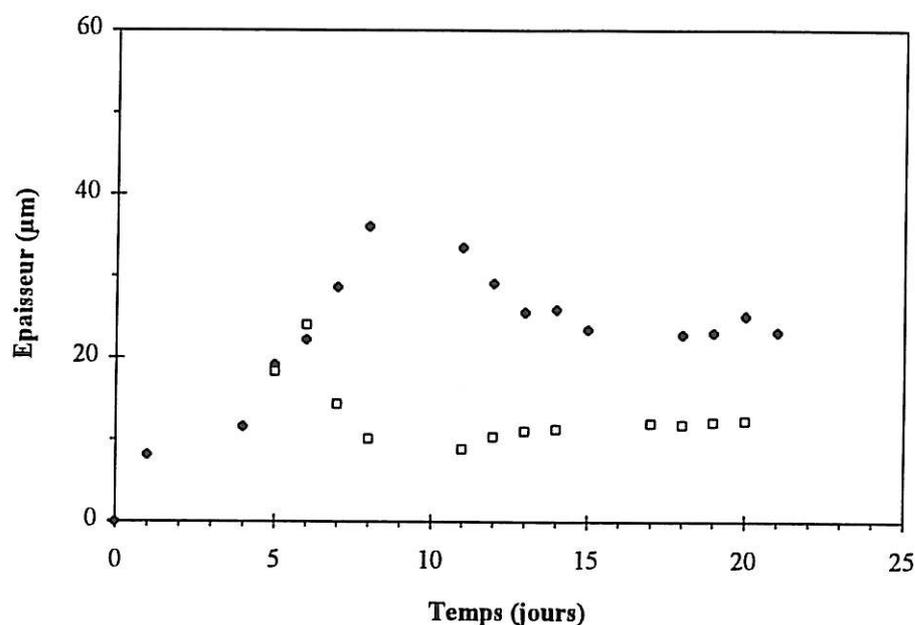


Figure §4.50 : Epaisseur en fonction du temps d'exposition dans l'eau du réseau de Brest additionnée d'extrait de levure pour deux électrodes 1 ♦ et 2 □. Mesures réalisées dans une solution d'eau de Volvic additionnée de $K_3Fe(CN)_6/K_4Fe(CN)_6$ $10^{-2}M$ (traceur $Fe(CN)_6^{3-}$).

3. Conclusion

La technique électrochimique mise en oeuvre pour évaluer la quantité de biomasse donne des résultats satisfaisants.

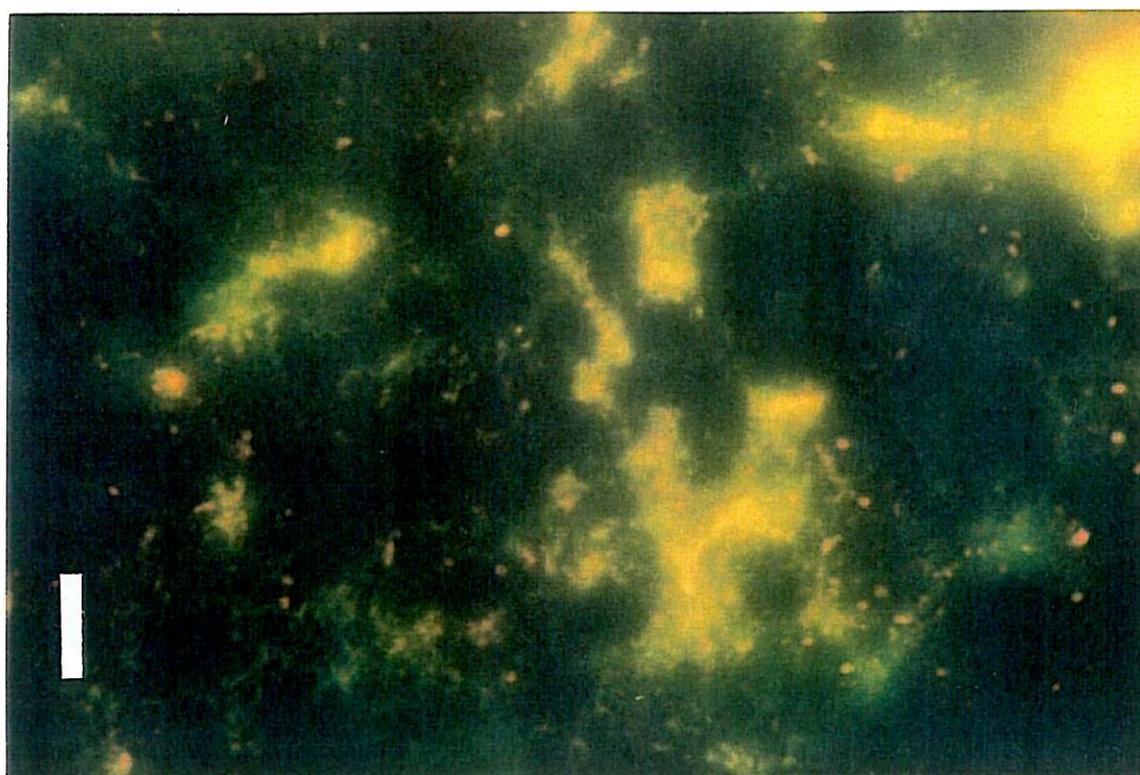
Cependant le protocole expérimental est plus complexe en eau douce qu'en eau de mer du fait de l'entartrage.

Il est nécessaire d'utiliser un milieu de mesure différent du milieu d'exposition. Le transfert des biofilms d'un milieu à un autre dont les caractéristiques sont différentes peuvent modifier le voile biologique.

Le protocole de mesure est plus complexe et le traitement des données est moins aisé qu'en eau de mer du fait de la chute ohmique.

L'évolution de l'épaisseur des biofilms formés en eau d'eau douce dans le cadre de cette étude n'est pas monotone. L'épaisseur atteint une valeur limite au bout de 2 semaines.

Comme dans le cas des biofilms développés en eau de mer, un courant non diffusif est aussi observé en eau douce. Ce courant peut être attribué à la production d'espèces électroactives par les microorganismes présents dans les biofilms.



Photos §4.6 : Observations en épifluorescence de la surface d'électrodes dans de l'eau douce du réseau d'eau potable additionnée d'extrait de levure. L'échelle représentée sur la partie gauche des photos par un trait blanc correspond à une dimension de 10 μm (objectif 100 à immersion).

Conclusion générale

Ce travail a permis d'élaborer une technique de caractérisation *in-situ* de biomasses formées en milieu naturel.

Cette technique part du postulat que le biofilm est une couche poreuse homogène, du point de vue du transport de matière, qui agit comme une barrière de diffusion. La variation de concentration d'une espèce électroactive, impliquée dans une réaction rédox rapide à l'interface électrode/couche poreuse, est distribuée entre :

- la couche poreuse où le transport est contrôlé par un processus de diffusion moléculaire
- la solution électrolytique où le transport est contrôlé par la diffusion convective

L'étude du transport de matière au voisinage d'une électrode recouverte par une couche poreuse non réactive repose sur l'analyse du courant limite de réduction ou d'oxydation d'un traceur électrochimique.

Une couche poreuse modèle d'un voile biologique composée de gélatine alimentaire a été élaborée. Il a alors été possible de développer un protocole expérimental ayant pour objet de caractériser ce film en terme d'épaisseur et de porosité. Celui-ci repose sur la mesure conjointe du courant limite stationnaire en fonction de la vitesse de rotation et de l'impédance électrohydrodynamique. Deux traceurs ont été employés : l'oxygène et le ferricyanure. L'obtention des mêmes caractéristiques géométriques (épaisseur et porosité) avec ces deux espèces rédox a permis de valider la méthode.

Le protocole a été ensuite adapté afin de suivre *in-situ* l'évolution du développement d'un biofilm formé en milieu naturel tel que l'eau de mer ou l'eau douce.

La technique a été appliquée pour l'étude de biofilms développés dans différents types d'eau de mer : additionnée de nutriment, stérile et naturelle.

L'addition d'extrait de levure à l'eau a permis d'obtenir des biomasses relativement épaisses facilitant ainsi l'adaptation du protocole expérimental.

L'expérimentation en milieu stérile a eu pour objet de déterminer le seuil de détection de la méthode.

Enfin, l'étude d'un biofilm développé en eau de mer naturelle, sans addition de nutriment, a été réalisée.

Le protocole a également été adapté pour des mesures en eau douce additionnée de nutriment. Afin d'éviter au maximum les problèmes d'entartrage, une solution d'eau de Volvic additionnée de ferri/ferrocyanure de potassium a été utilisée pour réaliser les mesures électrochimiques. Le milieu de mesure est alors différent du milieu de développement du biofilm.

Les voiles biologiques formés dans ces différents milieux ont été trouvés extrêmement poreux. Ces résultats sont en accord avec la littérature dans le chapitre bibliographique (De Beer *et al.*, 1994 ; Lawrence *et al.*, 1994). La porosité du biofilm pouvant être considérée comme égale à l'unité, seule l'épaisseur du biofilm reste à déterminer. Cette donnée a pu être obtenue simplement à partir d'une analyse du courant limite stationnaire de diffusion. Les épaisseurs de biofilm mesurées au Microscope Laser à Balayage Confocal sont en accord avec celles déterminées avec la technique décrite dans ce mémoire.

Par ailleurs, un courant non diffusif a été mis en évidence durant la formation du biofilm. Ce courant a été attribué à la production d'espèces électroactives par les microorganismes présents dans la biomasse. Son étude constitue une perspective d'étude pour ce travail.

Le blocage progressif de la surface active de l'électrode en or par le film bactérien a pu être mis en évidence par impédance AC. Cette technique contient l'ensemble des informations relatives au transport dans le biofilm et à la réactivité de la surface. Des études complémentaires sont nécessaires pour son utilisation comme méthode de mesure.

Le développement de capteurs permettant de suivre l'évolution des biomasses constitue la première application majeure de la technique décrite dans ce manuscrit. La

mise en oeuvre d'un tel capteur demande des études complémentaires afin d'automatiser les mesures et d'améliorer la sensibilité de la technique.

Le traceur oxygène offre l'avantage d'être naturellement présent dans le milieu. Son utilisation est tout indiquée pour le développement d'un capteur en milieu marin. Par contre, en raison de l'entartrage, l'oxygène n'est pas adapté pour les mesures électrochimiques en eau douce. Le développement d'un capteur en eau douce devra donc utiliser un traceur électrochimique tel que le ferricyanure injecté dans le milieu au voisinage du capteur.

Annexes

Dosage de l'oxygène dissous : Méthode de Winkler

Etude bactéricide de toxicité bactérienne du ferri/ferrocyanure de potassium

Préparation des échantillons destinés à l'observation en microscopie électronique à balayage

Observation au microscope en épifluorescence

Milieu culture Agar R2A

Milieu de culture et procédure utilisés dans le chapitre §4.I.B concernant l'étude en eau de mer stérile

Dosage de l'ATP

Dosage du chlore résiduel

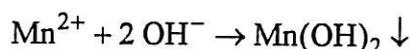
Ajustement des paramètres par la technique de simplexe

DOSAGE DE L'OXYGÈNE DISSOUS : METHODE DE WINKLER

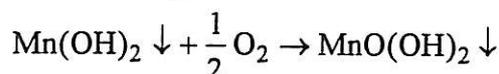
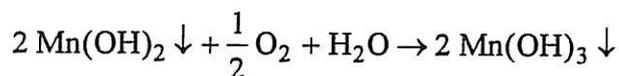
La dissolution de l'oxygène dans l'eau dépend de la pression atmosphérique, de la pression de vapeur saturante, de la température de l'eau et de la salinité. La solubilité de l'oxygène est de 9 mg.L⁻¹ en eau pure à 20°C. L'accroissement de la salinité réduit la solubilité à 7,4 mg.L⁻¹ à 20°C et pour une salinité de 35‰. Les processus biologiques ont une influence prépondérante sur la concentration en oxygène. Ainsi, les zones riches en composés organiques en décomposition telles que les estuaires peuvent être totalement anoxiques et les zones où un fort développement de phytoplancton est observé peuvent engendrer une sursaturation pouvant aller jusqu'à 150-200%.

La méthode chimique dite de Winkler est la méthode de référence pour le dosage de l'oxygène dissous. Cette méthode a été optimisée par Carpenter (1965) et Caritt et Carpenter (1966).

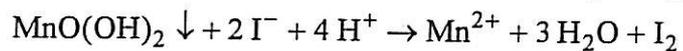
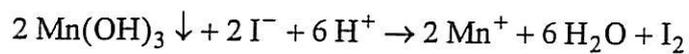
L'eau à analyser est ajoutée à une solution de manganèse(II) précipitée par une base forte :



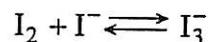
En milieu alcalin, l'oxygène réagit rapidement sur Mn(OH)₂ pour donner des oxydes de manganèse(III) et de manganèse(IV). Cette opération doit naturellement avoir lieu à l'abri de l'air.



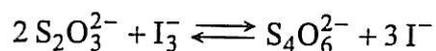
Une fois l'oxygène totalement fixé, le milieu est acidifié. Le précipité se redissout. Le manganèse est ramené au degré d'oxydation II en oxydant des ions iodures en iode.



Avec un excès d'ions iodure, l'équilibre suivant s'établit :



L'iode libéré est dosé à l'aide de thiosulfate :



Le point équivalent du dosage de l'iode par le thiosulfate est déterminé par potentiométrie.

Le domaine des concentrations mesurables par ce dosage est compris entre 0,05 à 63 mg.L⁻¹. La précision de la mesure est d'environ ± 0,02 mg.L⁻¹.

ETUDE BACTERICIDE DE TOXICITE BACTERIENNE DU FERRI/FERROCYANURE DE POTASSIUM

Cette étude a pour objet d'évaluer l'impact du ferri/ferrocyanure de potassium sur la flore bactérienne. Cette étude a été réalisée au CIRSEE / Lyonnaise des Eaux.

Une population bactérienne est mise en contact avec du ferri/ferrocyanure de potassium $10^{-2}M$ pendant 1 heure. L'eau de Seine (après dégrillage et filtration) a été choisie en raison de sa charge bactérienne naturellement élevée. Cette eau contient $6,44 \cdot 10^4$ ufc.mL⁻¹ mesurées par dénombrement des bactéries revivifiables sur gélose R2A (cf. Annexe milieu de culture) après incubation à 20°C pendant 7 jours.

Des solutions de $K_3Fe(CN)_3$ et $K_4Fe(CN)_6$ sont préparées à une concentration de $10^{-1}M$. Un volume de 10 mL de chaque solution est ajouté à 80 mL d'eau de Seine pour atteindre une concentration finale de $10^{-2}M$ de chaque produit.

La concentration bactérienne résiduelle mesurée par étalement sur gélose R2A est de $14,3 \cdot 10^4$ bactéries.mL⁻¹.

La densité bactérienne finale après contact avec le ferri/ferrocyanure de potassium est identique à la valeur initiale aux incertitudes près. Le ferri/ferrocyanure de potassium ne présente pas de toxicité vis à vis de la flore bactérienne de l'eau de Seine. Ces résultats montrent donc que le ferri/ferrocyanure de potassium n'a pas d'effet bactéricide.

PREPARATION DES ECHANTILLONS DESTINES A L'OBSERVATION EN MICROSCOPIE ELECTRONIQUE A BALAYAGE

Les échantillons sont fixés dans une solution de glutéraldéhyde 2,5% préparée en eau de mer filtrée sur 0,2 μm .

Ils sont ensuite rincés dans des bains de salinité décroissante (eau de mer artificielle stérile/eau distillée v/v : 100, 75/25, 50/50, 25/75, 0/100). L'eau de mer artificielle est préparée à une concentration 30 g/l de seasalt Sigma (mélange de sels proche de la composition des sels dissouts dans l'eau de mer).

Ils sont ensuite partiellement déshydratés dans des bains d'éthanol de degré croissant (25°, 50°, 70°, 95° et 100°). Cette déshydratation est complétée par un passage au point critique selon la méthode décrite par Anderson (1951).

La surface à observer est ensuite métallisée par une fine couche d'or (200-300 Å). L'observation est effectuée sur un Microscope Electronique à Balayage.

OBSERVATION AU MICROSCOPE EN EPIFLUORESCENCE

Le nombre de bactéries est déterminé en comptant les cellules fluorescentes après coloration au DAPI (4,6-diaminophénylindole) ou à l'acridine orange à une concentration finale de 0,1 % suivant une technique décrite par Troussellier *et al.* (1985).

Préparation des colorants

L'eau distillée est stérilisée par filtration sur un filtre Whatman humide de 25 mm de diamètre et de porosité 0,2 μm dans un erlenmeyer stérile avec une pression toujours inférieure à 10 cm de mercure. Cette eau distillée stérile peut être conservée au réfrigérateur (+ 4°C).

Une solution mère de DAPI à 1 mg.L⁻¹ est préparée et conservée au réfrigérateur. Cette solution est diluée au 1/100^e à l'aide d'eau distillée stérile pour obtenir une solution de DAPI à 10 $\mu\text{g.ml}^{-1}$ stable 1 mois à l'abri de la chaleur et de la lumière. Avant utilisation, le DAPI est stérilisé par filtration (0,2 μm).

Une solution mère d'acridine orange est préparée à une concentration de 10 g.L⁻¹. La solution finale est obtenue par dilution de la solution mère pour atteindre une concentration de 0,25%.

Préparation des échantillons

Dénombrement des cellules obtenues par filtration d'un volume donné d'un milieu

Sur un matériel préalablement stérilisé par autoclavage, 3 échantillons et un témoin de 10 mL sont filtrés sur filtre noir Isopore 0,2 μm . Les échantillons correspondent chacun

à une solution composée de 9 mL de milieu prélevé à la sortie de la cellule additionné de 1 mL de DAPI et le témoin à 9 mL d'eau distillée stérile additionné de 1 mL de DAPI à $10 \mu\text{g.mL}^{-1}$. Après cette filtration, le filtre noir isopore est séché puis monté entre lame et lamelle avec de l'huile à immersion non fluorescente.

Dénombrement des cellules présentes sur la surface de l'électrode

L'échantillon est fixé par immersion dans une solution de formol 2,5% pendant au moins 3 heures. L'embout est séché près de la flamme d'un bec Bunsen, plongé dans le bain de coloration à l'acridine orange ou au DAPI pendant quelques minutes et séché près de la flamme. Une goutte d'huile à immersion non fluorescente est placée sur la préparation qui est ensuite recouverte d'une lamelle. L'embout est observé au grossissement 40 ou 100 en immersion dans l'huile.

Dénombrement des cellules

Les observations de tels échantillons s'effectuent à l'aide d'un microscope à épifluorescence (objectif 100). Pour que l'estimation soit représentative de la réalité, il est nécessaire de réaliser un dénombrement bactérien sur un nombre assez grand de champs d'observation. Dans le cas présent, un nombre moyen de bactéries par champ a été déterminé à partir de 15 champs choisis de façon aléatoire sur la surface du filtre. La connaissance de la surface d'un champ ainsi que la surface du filtre permet d'atteindre le nombre de bactéries par mL de solution filtrée :

$$\text{Nbre de bactéries. mL}^{-1} = \frac{\text{Nbre de bactéries moyen par champ} \times \text{surface du filtre}}{\text{volume filtré} \times \text{surface du champ}}$$

MILIEU CULTURE AGAR R2A

Composition du milieu de culture Agar R2A par litre (Laboratoire Difco)

Extrait de levure bactérienne	0,5 g
Peptone protéose bactérien n°3	0,5 g
Acide casamine bactérien	0,5 g
Dextrose bactérien	0,5 g
Amidon soluble	0,5 g
Pyruvate de sodium	0,3 g
Phosphate de potassium	0,3 g
Sulfate de magnésium	0,05 g
Agar bactérien	15 g

**MILIEU DE CULTURE ET PROCEDURE UTILISES
DANS LE CHAPITRE §4.I.B
CONCERNANT L'ETUDE EN EAU DE MER STERILE**

Le milieu de culture composé de 55,1 g de marine agar 2216 (Difco) dissous dans 1 L d'eau distillée est porté à ébullition pour être homogénéisé. Cette préparation est ensuite autoclavée pendant 20 minutes à 121°C et 1 bar.

A la flamme, sous la hotte à flux laminaire auparavant stérilisée, le milieu de culture encore liquide est étalé dans des boîtes de Pétri stériles. Après refroidissement à température ambiante (12 h environ), les boîtes sont retournées et conservées au réfrigérateur (+ 4°C).

Les étalements sont réalisés sous la hotte stérile, à la flamme en étalant 0,1 mL d'échantillon (eau de mer prélevée à la sortie de la cellule) et 0,1 mL de témoin (eau distillée stérile) sur le milieu de culture. Puis, les boîtes de Pétri sont incubées dans une étuve à 35°C.

DOSAGE DE L'ATP (ADENOSINE TRIPHOSPHATE)

Le dosage de l'ATP est effectué à l'aide d'un Kit Microbial Biomass Test par mesure de luminescence.

Présentation du Kit

Un Kit permet d'effectuer cent analyses. Il comporte 4 flacons Lumit QM, 4 flacons de Lumit QM diluent et 1 flacon de NRM.

Lumit QM

Le lumit QM est un complexe luciférase/D. luciférine, lyophilisé, purifié et standardisé.

La luciférase est une enzyme purifiée à partir de bactéries obtenues par génie génétique. La D. luciférine reproduit le phénomène de bioluminescence des lucioles. Elle catalyse une réaction lumineuse en présence d'ATP, de D. luciférine et d'ions Magnésium.

L'ensemble luciférase/D. luciférine est très rigoureusement contrôlé afin d'obtenir une bioluminescence standardisée avec une variation maximale de 10%. Le complexe est stabilisé avec un mélange de sérum albumine de bovin et de dithiothiéitol qui est un protecteur de groupement Sulphydryl des luciférases.

"Lumit QM diluent"

Le Lumit QM diluent contient un tampon HEPES pH 7,75, un stabilisateur de la réaction enzymatique, des ions Mg^{2+} ($MgSO_4$), une faible quantité d'azide de sodium ainsi qu'un agent chélatant (EDTA). Ce dernier composant permet d'éviter les interférences dues aux ions Ca^{2+} et aux ions métalliques inhibiteurs. Ce produit se conserve au réfrigérateur.

NRM (Nucleotide Releasing reagent for Microbial cells)

Le NRM est un agent tensioactif extractant de l'ATP total de l'échantillon. Il permet, par augmentation de la porosité bactérienne, une entrée massive d'eau dans la cellule et la sortie de l'ATP par diffusion. Il est fourni sous forme stérile et prêt à l'emploi. Il se conserve au réfrigérateur après ouverture.

Reconstitution du Réactif Lumit QM

La reconstitution du Lumit QM est effectuée en transvasant le flacon contenant le "Lumit QM diluent" dans le flacon contenant la poudre lyophilisée du Lumit QM puis de retourner très doucement une à deux fois le flacon rebouché pour s'assurer une complète dilution de l'enzyme. Une agitation trop rapide du mélange peut provoquer une perte d'activité de la luciférase.

Ce mélange peut se conserver 24 h au réfrigérateur ou 4 jours au congélateur à l'abri de la lumière. Une température trop élevée peut provoquer une perte d'activité de la luciférase.

Protocole

La première étape consiste à tracer une courbe d'étalonnage à l'aide d'une gamme étalon d'ATP standard.

Solution tampon de glycine à 10mM

Cette solution tampon est utilisée pour stabiliser la gamme étalon d'ATP pendant 1 h.

Dissoudre 750 mg de glycine dans 1 L d'eau distillée désionisée. Neutraliser avec de la soude à 0,1N et l'amener à un pH de 11. Fractionner la solution obtenue dans des tubes à essais pouvant être fermés puis autoclaver à 114°C pendant 30 min pour stériliser.

Cette solution mère est diluée pour obtenir un tampon glycine à 2 mM comme agent de dilution. Cette dilution est réalisée à l'aide d'un matériel stérile.

ATP Standard

L'ATP a un poids moléculaire de 507,2. Il est présenté en flacon contenant 10 µg d'ATP sous forme de sel disodique lyophilisé. L'ATP est reconstitué en ajoutant 5 ml d'eau distillée stérile. La solution mère obtenue a donc un titre de $2 \cdot 10^{-3} \text{ g.L}^{-1}$. L'ATP lyophilisé est stable 1 an à -22°C ou 6 mois à 4°C . La solution mère d'ATP se conserve 4 semaines à -22°C .

Pour la préparation de la gamme étalon d'ATP standard à de plus faibles concentrations, la solution mère est diluée dans une solution tampon de glycine 2 mM qui permet la stabilisation de la solution diluée d'ATP pendant 1 h.

Une gamme étalon d'ATP standard de 2000 à 1 pg/100µL est alors réalisée afin de tracer une droite d'étalonnage.

Echantillons (billes de verre)

Vingt billes de verre sont placées dans 10 mL d'eau stérile et passées au bain à ultrasons pendant 2 min. Cette opération est répétée 2 fois avec les mêmes billes. La quantité d'ATP dans la solution de 30 mL obtenue est alors mesurée.

DOSAGE DU CHLORE RESIDUEL METHODE A L'ORTHOTOLIDINE

L'addition d'orthotolidine à l'eau contenant du chlore résiduel provoque l'apparition d'une coloration jaune susceptible d'une comparaison spectrométrique.

Les lectures au spectromètre sont réalisées à la longueur d'onde de 440 nm. Une courbe d'étalonnage est réalisée à partir de solutions de chromate bichromate à différentes concentrations. Chaque concentration de chromate bichromate donne une coloration correspondant une concentration donnée de chlore.

Mode opératoire

Introduire 0,5 mL de solution d'orthotolidine à 0,1% dans un tube à essais. Ajouter 10 mL d'eau à analyser. Agiter. Attendre 3 min. Effectuer une lecture au spectromètre à 440 nm. Se reporter à la courbe d'étalonnage.

Réactifs

- Solution d'acide d'orthotolidine à 0,1%
135 mg de chlorhydrate d'orthotolidine dans 50 mL d'eau distillée puis ajouté dans 50 mL d'acide chlorhydrique à 30%
- Solution tampon mère de phosphates disodique et monopotassique
28,66 g de Na_2HPO_4 , 2 H_2O et 46,14 g de KH_2PO_4 dans 1 L d'eau distillée
- Solution tampon fille de phosphate à 0,1M
200 mL de la solution mère additionnée de 1 L d'eau distillée
- Solution de chromate-bichromate dont la coloration correspond à une teneur en chlore de 1 mg.L^{-1}
0,155 g de dichromate de potassium anhydre et 0,465 g de potassium anhydre dans 1 L de solution tampon fille

AJUSTEMENT DES PARAMETRES PAR LA TECHNIQUE DE SIMPLEXE

La méthode de simplexe est employée pour l'ensemble des ajustements de paramètres. A titre d'exemple, cette annexe illustre son fonctionnement pour la loi §2.17 comportant 3 paramètres i_0 , i_∞^{-1} et K^{-1} . Le but de la méthode SIMPLEXE est de trouver le meilleur jeu de paramètres (i_0 , i_∞^{-1} , K^{-1}) c'est-à-dire celui qui reproduit le mieux les résultats expérimentaux. Cette présentation expose le concept et l'illustration du programme SIMPLEXE. Ce programme a été développé à l'UPR15 du CNRS.

Principe du programme SIMPLEXE

Le programme, écrit en langage FORTRAN, possède de multiples options afin de s'adapter aux différentes utilisations. Les données peuvent être réelles ou complexes comme dans le cas de l'impédance.

L'expression arithmétique représentative des données expérimentales que l'on désigne par la fonction de lissage §2.17 peut être exprimée de façon générale par :

$$i(\Omega) = f_{th}(\Omega, p_1, p_2, p_3, \dots, p_j \dots p_s)$$

où p_j représente le paramètre de composant j (i_0 , i_∞^{-1} et K^{-1} dans cet exemple). Le programme fonctionne par itérations successives afin de minimiser l'écart global entre $i_{th}(\Omega)$ et $i_{exp}(\Omega)$ sur l'ensemble des points expérimentaux (soit n_f points).

L'écart total z entre la fonction expérimentale et celle de lissage peut alors être défini par :

$$z = \sum_{j=1, n_f} (Z_{th,j} - Z_{exp,j})^2$$

et la valeur quadratique moyenne des écarts est définie dans le cas général par :

$$\text{sqrt} = \sqrt{\sum_{j=1, n_f} \frac{(Z_{\text{th},j} - Z_{\text{exp},j})^2}{2n_d t_j^2}}$$

avec $n_d = n_{\text{th}} - n_{\text{exp}}$ = nombre de degré de liberté, les t_j sont les erreurs expérimentales *a priori* et où les indices "exp" et "th" indiquent respectivement les valeurs expérimentales et celles calculées selon la fonction de lissage.

La recherche de z s'effectue par itérations successives selon une stratégie qui repose sur deux points. D'une part, le jeu de paramètres p est considéré comme un vecteur de dimension $s(p)$ et le programme cherche l'azimuth où se localise un minimum. Ce minimum n'est malheureusement pas toujours le minimum recherché, c'est-à-dire le minimum global absolu mais seulement le minimum local. Le programme modifie simultanément tous les paramètres selon l'azimuth déterminé. D'autre part, le programme ajuste le pas de la variation du vecteur p , soit deux fois plus grand soit deux fois plus petit, suivant le cas.

Ceci permet d'atteindre rapidement le voisinage du minimum puis d'affiner le jeu de paramètres.

Les deux étapes qui viennent d'être décrites constituent un pas d'itération de SIMPLEXE. Le nombre d'itération est ici fixé à 200. Toutefois, si la variation de z d'une itération à l'autre devient inférieure à 10^{-14} , c'est-à-dire proche de la résolution numérique désirée, le calcul se termine alors spontanément une fois le jeu de paramètres ajustés. Le programme modifie la valeur initiale de chaque paramètre dans un large domaine puis effectue de nouveau le calcul itératif afin d'extraire le minimum local éventuel. Cette étape d'expansion est répétée trois à cinq fois selon le cas. En définitive, le programme SIMPLEXE appelle entre 2000 et 3000 fois le calcul de la fonction de lissage.

Références

-A-

- Anderson T.F., "Techniques for the preservation of three dimensional structures in preparing specimens for the electron microscope", *Trans. New York Acad. Sci.*, **13**, 1951, p. 13-130.
- Alleman J.E., E.K. Russel, W.L. Lantz et R.F. Wukash, "Biofilm cryopreparation for scanning electron microscopy", *Water Res.*, **19**, 1985, p. 1073-1078.
- Aminot A. et M. Chaussepied, "Manuel des analyses chimiques en milieu marin", Ed. CNEXO, 1983, pp. 395.
- Applegate L.E. et C.W. Erkenbrecher, "Monitoring and control of biological activity in permasep seawater RO plants", *Desalination*, **65**, 1987, p. 331-359.

-B-

- Baier R.E., "Substrata influences on adhesion of microorganisms and their resultant new surface properties", dans G. Bitton et K.C. Marshall (Eds.), *Advances of microorganisms to surfaces*, Wiley, New York, 1980, p. 59-104.
- Baier R.E. et L. Weiss, "Demonstrations of involvement of adsorbed proteins in all adhesion and cell growth on solid surfaces", dans E.E. Baier (Ed.), *Applied chemistry at protein interfaces*, Advances in chemistry series, **145**, Amer. Chem. Soc., Washington, 1975, p. 300-307.
- Bakke R. et P.Q. Olsson, "Biofilm thickness measurements by light microscopy", *J. Microbiol. Meth.*, **5**, 1986, p. 93-98.
- Barnett K.G., T. Cosgrove, B. Vincent, D.S. Sissons, et M. Cohen-Stuart, "Measurement of the polymer bound fraction at the solid-liquid interface by pulsed nuclear magnetic resonance", *macromolecules*, **14**, 1981, p. 1018-1020.
- Berk S.G., R. Mitchell, R.J. Bobbie, J.S. Nickels et D.C. White, "Microfouling on metal surface exposed to seawater", *International Biodeterioration Bulletin*, **17**, 1981, p. 29-37.
- Bobbie R.J., J.S. Nickels, W.M. Davis, D.C. White, D.F. Lott, R. Dyjak et J. Hollowell, "Measurement of microfouling mass and community structure during succession in

- OTEC simulators - A preliminary report", dans *Proc. OTEC Biofouling, Corrosion and Materials Workshop*, Rosslyn, VA, 1979, p. 101-120.
- Bobbie R.J. et D.C. White, "Characterization of benthic microbial community by high resolution gas chromatography", *Applied and environmental microbiology*, **39**, p. 1212-1222.
- Bremer P.J. et G.G. Geesey, "An evaluation of biofilm development utilizing non-destructive attenuated total reflectance Fourier transform infrared spectroscopy", *Biofouling*, **3**, 1991, p. 89-100.
- Bremer P.J., G.G. Geesey et B. Drake, "Atomic force microscopy examination of the topography of a hydrated bacterial biofilm on a copper surface", *Current microbiology*, **24**, 1992, p. 223-230.
- Brock T.D. et M.T. Madigan, "Biology of Microorganisms", 6th edition. Prentice Hall, Englewood Cliffs, New Jersey 07632, USA, 1991, pp.874.
- Bryers J.D. et W.G. Characklis, "Biofilm accumulation and activity : a process analysis approach", *Biofilms - Science and technology*, Ed. L.F. Melo, M.M. Fletche, T.R. Bott et B. Capdeville, Kluwer Acad. Publ., 1992, p. 221-239.
- Bryers J.D. et W.G. Characklis, "Early fouling biofilm formation in a turbulent flow system : overall kinetics", *Water Research*, **15**, 1981, p. 483-491.
- Bungay H.R., W.J. Whalen et W.M. Sanders, "Microprobe techniques for determining diffusivities and respiration rates in microbial slime systems", *Biotech. Bioeng.*, **11**, 1969, p.765-772.

-C-

- Carritt D.E. et J.H. Carpenter, "Comparison and evaluation of currently employed modifications of the Winkler method for determining dissolved oxygen in sea-water ; a NASCO Report", *J. Mar. Res.*, **24**, 1966, p. 286-318.
- Carpenter J.H., "The accuracy of the Winkler method for dissolved oxygen analysis", *Limnol. Oceanogr.*, **10**, 1965, p. 135-140.
- Chapman A.G. et D.W. Atkinson, "Adenosine nucleotide concentrations and turnover rates. Their correlation with biological activity in bacteria and yeast", *Advances in Microbial Physiology*, **15**, 1977, p. 253-306.
- Characklis W.G., "Biofilm development and destruction", Rapport final, EPRI CS-1554, Projet RP902-1, Electric Power Research Institute, Palo Alto, CA, 1980.

- Characklis W.G., "Fouling biofilm development : a process analysis", *Biotechnology and Bioengineering*, **23**, 1981, p. 1923-1960.
- Characklis W.G., "Microbial fouling and microbial biofouling control", *Biofilms*, Ed. W.G. Characklis et K.C. Marshall, New York, John Wiley & sons, 1990, p. 523-634.
- Characklis W.G., M.J. Nimmons et B.F. Picologlou, "Influence of fouling biofilms on heat transfer", *J. Heat Transfer Eng.*, **3**, 1981, p. 23-27.
- Christensen B.E. et W.G. Characklis, "Physical and chemical properties of biofilms", *Biofilms*, Ed. W.G. Characklis et K.C. Marshall, New York, John Wiley & sons, 1990, p. 93-130.
- Cohen Y., B.B. Jørgensen, N.P. Revsbech et R. Poplawski, "Adaptation to hydrogen sulfide of oxygenic and anoxygenic photosynthesis among cyanobacteria", *Appl. Env. Microbiol.*, **51**, 1986, p. 398-407.
- Corpe W.A., "Microfouling : the role of primary film-forming marine bacteria", dans *Proc. 3rd International Congress Marine Corrosion and Fouling*, Northwestern University Press, Evanston, IL, 1973, p. 598-609.
- Costerson J.W., K.-J. Cheng, G.G. Geesey, T.I. Ladd, J.C. Nickel, M. Dasgupta et T.J. Marrie, "Bacterial biofilms in nature and disease", *Ann. Rev. Microbiol.*, **41**, 1987, p. 435-464.
- Costerson J.W. et R.R. Colwell (Eds.), "Native aquatic bacteria : enumeration, activity and ecology", ASTM Press, Philadelphia, 1979.
- Costerton J.W., Z. Lewandowski, D.E. Caldwell, D.R. Korber et H.M. Lappin-Scott, "Microbial biofilms", *Annu. Rev. Microbiol.*, **49**, 1995, p. 711-745.

-D-

- De Beer D., P. Stoodley, F. Roe et Z. Lewandowski, "Effects of biofilm structures on oxygen distribution and mass transport", *Biotechnol. Bioeng.*, **43**, 1994, p. 1131-1138.
- Derjaguin B.V. et L.D. Landau, *Acta Physica Chimica*, USSR, **14**, p. 633.
- Deslouis C., I. Epelboin, M. Keddam et J.C. Lestrade, "Impédance de diffusion d'un disque tournant en régime hydrodynamique laminaire. Etude expérimentale et comparaison avec le modèle de Nernst", *J. Electroanal. Chem. Interfacial Electrochem.*, **28**, 1970, p.57-63.
- Deslouis C., O. Gil, B. Tribollet et G. Vlachos, "Oxygen as a tracer for measurement of steady and turbulent flows", *J. Applied Electrochem.*, **22**, 1992, p. 835-842.

- Deslouis C. et B. Tribollet, "None stationary mass transfer in the flow due to a disk rotating in an Ostwald fluid. Application to the measurement of the molecular diffusion coefficient in a polymer solution", *Electrochim. Acta*, **23**, 1978, p. 935-944.
- Deslouis C. et B. Tribollet, "Fundamental aspects of unsteady mass transfer by EHD and diffusion impedances", papier présenté à l'International Society of Electrochemistry, 35th Meeting, Berkeley, CA, 5-10 Août 1984.
- Deslouis C. et B. Tribollet, "Flow modulation in electrochemistry", *Advances in electrochemical science and engineering*, **2**, Ed. Tobias et Gerischer, VCH Weinheim, New York, 1991, p. 205-264.
- Deslouis C., B. Tribollet, M. Duprat et F. Moran, "Transient mass transfer at a coated rotating disk electrode - Diffusion and electrohydrodynamical impedances". *J Electrochem Soc.*, **134**, 1987, p. 2496-2501.
- Dexter S.C. et K.E. Lucas, "The study of biofilm formation under water by photoacoustic spectroscopy", *J. Coll. and Interface Sci.*, **104**, 1985, p.15-27.
- Dolowy K., "A physical theory of cell-cell and cell-substratum interactions", dans *Cell adhesion and mobility*, A.S.G. Curtis et J.D. Pitts, Cambridge University Press, London et New York, 1980, p. 39-63.
- Dudman W.F., "The role of surface polysaccharides in natural environments", dans *Surface carbohydrates of procaryotic cell*, Sutherland I.W. (ed.), Academic Press, New York, 1977, p. 357-414.
- Duic L., S. Srinivasan et P.N. Sawyer, "Electrochemical behavior of blood coagulation factors : prothrombin et thrombin", *J. Electrochem. Soc.*, **120**, 1973, p. 348-353.

-E-

- Ebersole R.C., R.P. Foss et M.D. Ward, "Piezoelectric cell growth sensor", *Biotechnology*, **9**, 1991, p. 450-454.

-F-

- Fletcher M., "Adherence of marine micro-organisms to smooth surfaces", dans *Bacterial adherence*, E.H. Beachey (Ed.), Chapman & Hall, **6**, 1980, p. 3347-374.

Fletcher M., "The physiological activity of bacteria attached to solid surfaces", *Adv. Microb. Physiol.*, **32**, 1991, p. 53-85.

Flemming H.-C., "Biofilms as a particular form of microbial life", *Biofouling and biocorrosion in industrial water systems*, Ed. H.-K. Flemming et G.G. Geesey, Springer, Heidelberg, 1991, p.1-9.

-G-

Gabrielli c., M. Keddad et R. Torresi, "Calibration of the electrochemical quartz crystal microbalance", *J. Electrochem. Soc.*, **138**, 1991, p. 2657-2660.

Gabrielli c., M. Keddad et H. Perrot, "L'impédance électrogravimétrique : une nouvelle technique d'investigations électrochimiques", *6^{ème} forum sur les impédances électrochimiques*, Montrouge, 26 nov 1992.

Geesey G.G., "Microbial exopolymers : ecological and economical considerations", *ASM News*, **48**, 1982, p.9-14.

Geesey G.G. et J.W. Costerton, "Bacterial biomass determinations in a Silt-Laden River : comparison of direct count epifluorescence microscopy and extractable adenosine triphosphohate techniques", dans *Native Aquatic Bacteria : enumeration, activity and ecology*, ASTM STP 695, J.W. Costerton et R.R. Colwell (Eds.), American Society for testing and materials, 1979, p. 117-127.

Geesey G.G., L. Jang, J.G. Jolley, M.R. Hankins, T. Iwaoka et P.R. Griffiths, "Binding of metal ions by extracellular polymers of biofilm bacteria", *Wat. Sci. Tech.*, **20**, 1988, p. 161-165.

Geesey G.G., R. Mutch, J.W. Costerson et R.B. Green, *Limnol. Oceanogr.*, **23**, 1978, p. 1214.

Gerchakov S.M., D.S. Marszalek, F.J. Roth, B. Sallman et L.R. Udey, "Observations on microfouling applicable to OTEC systems", dans *Proc. OTEC Biofouling and Corrosion Symposium*, Seattle, 1977, p. 63.

Gordon A.S., S.M. Gerchakov et F.J. Millero, "Effects of inorganic particles on metabolism by a periphytic marine bacterium", *Appl. Environ. Microbiol.*, **45**, 1983, p. 411-417.

-H-

- Hoehn R.C. et A.D. Ray, "Effect of thickness on bacterial film", *J. Wat. Poll. Cont. Fed.*, **45**, 1973, p. 2302-2320.
- Hobbie J.E., R.J. Daley et S. Jasper, "Use of nuclepore filters for counting bacteria by fluorescence microscopy", *Appl. and Environm. Microbiol.*, **33**, 1977, p. 1225-1228.

-J-

- Jørgensen B.B., Y. Cohen et N.P. Revsbech, "Transition from anoxygenic to oxygenic photosynthesis in a microleus chthoplastes cyanobacterial mat", *Appl. Env. Microbiol.*, **51**, 1986, p. 408-417.

-K-

- Kristoffersen A., G. Rolla, K. Skjorland, P.O. Glantz et B. Ivarson, "Evidence for the formation of organic films on metal surfaces in seawater", *J. Coll. and Interface Sci.*, **86**, 1982, p. 196-203.

-L-

- Lapin-Scott H.M., J. Jass et J.W. Costerton, "Microbial biofilm formation and characterization", dans *Microbial biofilms : formation and control*, The Society for applied bacteriology Technical series n°30, S.P. Denyed, S.P. Gorman et M. Sussman (Eds.), Oxford, 1993, p. 1-12.
- Lawrence J.R., G.M. Wolfaardt et D.R. Korber, "Determination of diffusion coefficients in biofilms by confocal laser microscopy", *Applied and environmental microbiology*, **60**, 1994, p. 1166-1173.
- Lauffer M.A., "Theory of diffusion in gels", *J. Biophys.*, **1**, 1961, p. 205-213.

- Lawrence J.R., D.R. Korber, B.D. Hoyle, J.W. Costerson et D.E. Caldwell, "Optical sectioning of microbial biofilms", *J. Bacteriol.*, **173**, 1991, p. 6558-6567.
- Lawrence J.R., D.R. Korber et D.E. Caldwell, "Behavior Analysis of *Vibrio parahaemolyticus* variants in high- and low-viscosity microenvironments by use of digital image processing", *J. of bacteriol.*, **174**, 1992, p. 5732-5739.
- Lawrence J.R., G.M. Wolfaardt et D.R. Korber, "Determination of diffusion coefficients in biofilms by confocal laser microscopy", *Applied and Environmental microbiology*, **60**, 1994, p. 1166-1173.
- Leech R. et R.J.W. Hefford, "The observation of bacterial deposition from a flowing suspension", dans *Microbial Adhesion to surfaces*, R.C.W. Berkeley, J.M. Lynch, J. Melling, P.R. Rutter et D. Vincent. (Eds.), Ellis Horwood, Chichester, 1980, p. 544-545.
- Levich V.G., *Physicochemical Hydrodynamics*, Prentice Hall, Inc., Englewood Cliffs, New Jersey, 1962.
- Lewandowski Z., "Dissolved oxygen gradients near microbially colonized surface", dans *Biofouling and biocorrosion in Industrial Water Systems*, Section III Biocorrosion, G.G. Geesey, Z. Lewandowski et H.-C. Flemming (Eds.), Lewis Publishers, 1994, p. 63-89.
- Lewandowski Z., S.A. Altobelli et E. Fukushima, "NMR and microelectrode studies of hydrodynamics and kinetics in biofilms", *Biotechnol. Prog.*, **9**, 1993, p. 40-45.
- Lewandowski Z., S.A. Altobelli, PD. Majors et E. Fukushima, "NMR imaging of hydrodynamics near microbially colonized surfaces", *Wat. Sci. Tech.*, **26**, 1992, p. 577-584.
- Lewandowski Z., G. Walser et W.G. Charaklis, "Reaction kinetics in biofilms", *Biotechnology and bioengineering*, **38**, 1991, p. 877-882.
- Little B., S. Gerchakov et L. Udey, "A method for sterilisation of natural seawater", *J. Microbiol. Meth.*, **7**, 1987, p. 193-200.
- Little B. et D. Lavoie, "Gulf of Mexico OTEC biofouling and corrosion experiment", dans *Proc. OTEC Biofouling, Corrosion and Materials Workshop*, Rosslyn, VA, 1979, p. 60.
- Little B., P. Wagner, J.S. Maki, M. Walsch et R. Mitchell, "Factors influencing the adhesion of microorganisms to surfaces", *J. Adhesion*, **20**, 1986, p. 187-210.
- Loeb G. I. et R.A. Neihof, "Marine conditioning films", dans *Applied Chemistry at protein interfaces*, Advances in Chemistry Series, R.E. Baier (Ed.), **145**, Amer. Chem. Soc., 1975, p. 319-335.

-M-

- Marshall K.C., R. Stout et R. Mitchell, "Mechanism of initial events in the sorption of marine bacteria to surfaces, *J. Gen. Microbiol.*, **68**, 1971, p. 337-348.
- Marshall K.C., "Bacterial adhesion in oligotrophic habitats", *Microb. Sci.*, **2**, 1985, p. 321-326.
- Marshall K.C., K.N. Power, M.I. Angles, R.P. Schneider et A.E. Goodman, "Analysis of bacterial behavior during biofouling of surfaces", *Biofouling structure and function : biofouling and biocorrosion*, Industrial Water Systems, G.G. Geesey, Z. Lewandowski et H.-C. Flemming (Ed.), Lewis Publishers, 1994, p. 15-25.
- Marshall K.C. et A.E. Goodman, "Effect of adhesion on microbial cell physiology", *Colloids and surfaces B : biointerfaces*, **2**, 1994, p. 1-7.
- McCoy W.F., "Immunofluorescence as a technique to study marine biofouling bacteria", Directed Research Project M699, University of Hawaii, 1979.
- McCoy W.F. et J.W. Costerson, "Fouling biofilm development in tubular flows systems", *Dev. Ind. Microbiol.*, **23**, 1982, p. 551-558.

-N-

- Nelson D.C., N.P. Revsbech et B.B. Jørgensen, "Microoxic-anoxic niche of *Beggiatoa* spp. : microelectrode survey of marine and freshwater strains", *Appl. Env. Microbiol.*, **52**, 1986, p. 161-168.
- Newman J.S., *Electrochemical Systems*, Chap. 21, Prentice Hall, Inc., Englewood Cliffs, NY, 1973.
- Newman J.S., "Porous electrodes", Chap. 22, *Electrochemical Systems*, Prentice Hall, Englewood Cliffs, NJ, sd ed., 1991, p.454-495.
- Nichols P.D., J.M. Henson, J.B. Guckert, D.E. Nivens et D.C. White, "Fourier transform-infrared spectroscopic methods for microbial ecology : analysis of bacteria, bacteria-polymer mixtures and biofilms", *J. Microbiological Methods*, **4**, 1985, p. 79-94.
- Nivens D.E., J.Q. Chambers et D.C. White, "Non destructive monitoring of microbial biofilms at solid-liquid interface using on-line devices", dans *Microbially Influenced Corrosion and Biodeterioration*, N.J. Dowling, M.W. Mittleman et J.C. Danko, 1991, p. 5/47-5/56.

Nivens D.E., J.Q. Chambers, T.R. Anderson et D.C. White, "Long-term, on-line monitoring of microbial biofilms using a quartz crystal microbalance", *Anal. Chem.*, **65**, 1993, p. 65-69.

Norrman G., W.G. Characklis et J.D. Bryers, *Dev. Ind. Microbiol.*, **18**, 1977, p. 581.

-O-

Orazem M.E., P. Agarwal, C. Deslouis et B. Tribollet, "Application of measurement models to electrohydrodynamic impedance spectroscopy", *J. Electrochem. Soc.*, **143**, 1996, p. 948-960.

-P-

Pethica B.A., "The physical chemistry of cell adhesion", *Exp. Cell Res. Suppl.*, **8**, 1961, p. 123-140.

Pethica B.A., "Microbial and cell adhesion", dans *Microbial Adhesion to surfaces*, R.C.W. Berkeley, J.M. Lynch, J. Melling, P.R. Rutter et D. Vincent (Eds.), Ellis Horwood, Chichester, 1980, p. 19-45.

Picologlou B.F., N. Zilver et W.G. Characklis, "Biofilm growth and hydraulic performance", *J. Hyd. Div. ACSE*, **106**(HY5), 1980, p. 733-746.

Powell M.S. et N.H.K. Slater, "Removal rates of bacterial cells from glass surfaces by fluid shear", *Biotech. Bioeng.*, **24**, 1982, p. 2527-2537.

Powell M.S. et N.H.K. Slater, "The deposition of bacterial cells from laminar flows onto solid surfaces", *Biotech. Bioeng.*, **25**, 1983, p. 891-900.

-R-

Ramasamy N., M. Ranganathan, L. Duic, S. Srinivasan et P.N. Sawyer, "Electrochemical behavior of blood coagulation factors", *J. Electrochem. Soc.*, **120**, 1973, p. 354-361.

Revsbech N.P., "Diffusion characteristics of microbial communities determined by use of oxygen microsensors", *J. of Microbiological methods*, **9**, 1989a, p. 111-122.

- Revsbech N.P., "Microsensors : spacial gradients in biofilms", dans *Structure and function of biofilms*, W.G. Characklis et P.A. Wilderer (Eds.), New York, John Wiley & sons, 1989b, p. 129-144.
- Rittman B.E. et P.L. McCarty, "Substrate flux into biofilms of any thickness", *J. Env. Eng. Div. ASCE*, **107**(EE4), 1981, p. 831-849.
- Robertson B., B. Tribollet et C. Deslouis, "Measurement of diffusion coefficient by DC and EHD Electrochemical Methods", *J. Electrochem. Soc.*, **135**, 1988, p. 2279-2284.
- Rutter P.R., "The physical chemistry of the adhesion of bacteria and other cells", dans *Cell adhesion and mobility*, A.S.G. Curtis et J.D. Pitts, Cambridge University Press, London et New York, 1980, p. 103-135.
- Rutter P.R. et B. Vincent, "The adhesion of microorganisms to surface : physicochemical aspects", dans *Microbial Adhesion to surfaces*, R.C.W. Berkeley, J.M. Lynch, J. Melling, P.R. Rutter et D. Vincent (Eds.), Ellis Horwood, Chichester, 1980, p. 79-92.

-S-

- Sanders W.M., III., "Oxygen utilisation by slime organisms in continuous culture", *Int. J. Air Wat. Poll.*, **10**, 1966, p. 253-276.
- Schantz E.J. et M.A. Lauffer, "Diffusion measurements in agar gel", *Biochemistry*, **1**, 1962, p. 659-663.
- Schoenen D., "Influence of materials on microbiological colonization of drinking water", *Microbiology in civil engineering*, Ed. P. Howsam, Chapman & Hall, London, p. 121-145.
- Siegrist H. et W. Gujer, "Mass transfer mechanisms in a heterotrophic biofilm", *Wat. Res.*, **19**, 1985, p. 1369-1378.
- Smidsrød O. et A. Haug, *Biopolymers*, **10**, 1971, p. 1213.
- Stenström T.A., "Bacterial hydrophobicity, an overall parameter for the measurement of adhesion potential to soil particules", *Appl. Environ. Microbiol.*, **55**, 1989, p. 142-147.
- Stoner G. et S. Srinivasan, "Adsorption od blood proteins on metals using capacitancetechniques", *The journal of Physical Chemistry*, **74**, 1970, p. 1088-1094.
- Sutherland I.W., "Microbial exopolysaccharides - their role in microbial adhesion in aqueous systems", **10**, CRC crit. Rev. Microbiol., p. 173-201.

-T-

- Tomlinson T.G. et D.H.M. Snaddon, "Biological oxidation of sewage by films of microorganisms", *Int. J. Air Wat. Poll.*, **10**, 1966, p. 865-881.
- Tribollet B. et J. Newman, "The modulated flow at a rotating disk electrode", *J. Electrochem. Soc.*, **130**, 1983, p. 2016-2026.
- Trousselier M., M. Albat, P. André, B. Baleux, "Dénombrements directs des bactéries dans les milieux aquatiques par microscopie en épifluorescence: distribution et précision des mesures", *Rev. Fr. Sc. de l'Eau*, **4**, 1985, p. 35-49.
- Trulear M.G., "Cellular reproduction and extracellular polymer formation in the development of biofilms", Thèse doctorale non publiée, Montana State University, Bozeman, MT, 1983.
- Trulear M.G. et W.G. Characklis, "Dynamics of biofilm processes", *J. Wat. Poll. Contr. Fed.*, **54**, 1982, p. 1288-1301.

-V-

- Verway E.J.W. et J.T.G. Overbeek, "Theory of stability of lyophobic colloids", Elsevier, Amsterdam, 1948.
- Vestal J.R. et D.C. White, "Lipid analysis in microbial ecology", *BioScience*, **39**, 1989, p. 535-541.

-W-

- Wanner O., "Modeling population dynamics", dans *Structure and function of biofilms*, W.G. Characklis et P.A. Wilderer (Ed.), Wiley, New York, 1989, p. 91-110.
- Wanner O. et W. Guyer, "A multispecies biofilm model", *Biotech. Bioeng.*, **28**, 1986, p. 314-328
- West A.C., "Comparison of modeling approaches for a porous salt film", *J. Electrochem. Soc.*, **140**, 1993, p. 403-408.
- White M.L. et G.H. Dorion, *J. Polymer Sc.*, **55**, 1961, p. 731.

Williamson K. et P.L. McCarty, "Verification studies of biofilm model for bacterial substrate utilization", *J. Wat. Pollut. Control Fed.*, **48**, 1976, p. 281-296.

Williamson K. et P.L. McCarty, *J. Wat. Pollut. Control Fed.*, **48**, 1976, p. 9-24.

-Y-

Yu J. et K.L. Pinder, "Diffusion of lactose in acidogenic biofilms", *Biotechnology and bioengineering*, **41**, 1993, p. 736-744.

-Z-

Zhang T.C. et P.L. Bishop, "Density, porosity and pore structure of biofilms", *Wat. Res.*, **28**, 1994, p. 2267-2277.

Zhang T.C. et P.L. Bishop, "Evaluation of tortuosity factors and effective diffusivities in biofilms", *Wat. Res.*, **28**, 1994, p. 2279-2287.

Zelver N., "Biofilm development and associated energy losses in water conduits", Master of Science thesis, Rice University, Houston, TX, 1979.

Zelver N., J.R. Flandreau, W.H. Spataro, K.R. Chapple, W.G. Characklis, F.L. Roe, "Analysis and monitoring of heat transfer tube fouling", 82-JPGC/Pwr-7, ASME, 1982.

Les travaux de recherche décrits dans cette thèse ont donné lieu aux publications et communications suivantes :

PUBLICATIONS

International

E. L'Hostis, C. Deslouis, B. Tribollet et D. Festy, "EHD and State Measurements for Characterisation of Transport Properties in a Gel Layer", *Electrochimica Acta*, **41(7/8)**, 1996, p. 1393-1399.

E. L'Hostis, C. Compère, D. Festy, B. Tribollet, C. Deslouis, "Characterisation of Biofilms formed on Gold in Natural Seawater by the Oxygen Diffusion Analysis", *Corrosion NACE* (in press).

Proceedings

E. L'Hostis, B. Tribollet et D. Festy, "Caractérisation d'un biofilm formé eau de mer par analyse du transport de matière", *Eurocorr'96*, 24-26 septembre 1996, Nice.

E. L'Hostis, B. Tribollet et D. Festy, "Caractérisation d'un Biofilm formé en Eau de Mer par Analyse du Transport de Matière", *9^{ème} Forum sur les Impédances Electrochimiques*, november 30 1995, Paris, France, p. 76-86.

E. L'Hostis, C. Compère, D. Festy, B. Tribollet, C. Deslouis, "Characterisation of Biofilms formed on Gold in Natural Seawater by the Oxygen Diffusion Analysis", *1995 International Conference on Microbially Influenced Corrosion*", May 8-10 1995, New Orleans, Louisiana, USA, p 60/1-60/11.

E. L'Hostis, B. Tribollet, C. Deslouis et D. Festy, "Caractérisation des Propriétés de Transport dans une Couche de Gel par Mesures en Régime Stationnaire et Impédance EHD", *8^{ème} Forum sur les Impédances Electrochimiques*, november 21 1994, Paris, France, p. 93-103.

A. Ambari, B. Tribollet, C. Compère, D. Festy et E. L'Hostis, "Detection and Characterisation of Biofilm in Natural Sea Water by Analysing Oxygen Diffusion under Controlled Hydrodynamic Conditions", *Third European Federation of Corrosion Workshop on Microbial Corrosion*, March 13-16 1994, Estoril, Portugal, p. 211-222.

COMMUNICATIONS

E. L'Hostis, B. Tribollet, L. Kiene and D. Festy, "Characterization of Biofilm by Mass Transport Analysis", *4th COST 511 workshop*, Project n°60, May 30-31 1996, Budapest, Hungary.

E. L'Hostis, C. Deslouis, B. Tribollet et D. Festy, "EHD and State Measurements for Characterization of Transport Properties in a Gel Layer", *3rd COST 511 workshop*, Project n°60, June 15-16 1995, Helsinki, Finlande.

R. Rousseau, E. L'Hostis, L. Roue, M. L'Her, "Etude du Transfert d'Electron et de Matière à l'aide d'une Microélectrode Liquide-Liquide", *Journées d'Electrochimie*, May 29 - June 1th 1995, Strasbourg, France.

E. L'Hostis, C. Deslouis, B. Tribollet et D. Festy, "EHD and State Measurements for Characterization of Transport Properties in a Gel Layer", *3rd International Symposium on Electrochemical Impedance Spectroscopy*, May 7-12 1995, Nieuwpoort, Belgique.

B. Tribollet, C. Compère, D. Festy et E. L'Hostis, "Modeling of Oxygen diffusion through Biofilm", *2nd COST 511 workshop*, Projet F3, June 30 - July 1th 1994, Brest, France.

Le développement de *biofilms* sur les surfaces immergées en milieu aquatique naturel a un impact très important sur la productivité et la compétitivité industrielle ainsi que sur la santé publique. L'objectif de ce travail est d'élaborer et de développer une technique de détection et de caractérisation des biofilms formés en milieux naturels d'un point de vue physico-chimique (porosité, épaisseur et coefficient de diffusion). Les biofilms peuvent être considérées comme une couche poreuse homogène, à l'échelle macroscopique, du point de vue du transport de matière. La méthode développée dans ce travail repose sur l'analyse du courant limite de réduction d'un traceur rédox contrôlé par le transport de matière. La variation de concentration de l'espèce diffusante est distribuée entre la couche poreuse où seule intervient la diffusion moléculaire et la solution électrolytique, siège de la diffusion convective. A partir des mesures du courant limite de diffusion en fonction des conditions hydrodynamiques, il est possible de distinguer les contributions respectives de ces processus diffusionnels et d'atteindre ainsi des paramètres propres à la couche. La première étape du travail expérimental est l'élaboration d'une couche poreuse modèle reproduisant le comportement d'un biofilm ainsi que le développement d'un protocole expérimental ayant pour objet la caractérisation de sa géométrie par analyse du transport de matière. La seconde étape est l'adaptation du protocole mis au point avec la couche modèle afin de suivre *in-situ* l'évolution d'un biofilm développé en milieu naturel tel que l'eau de mer ou l'eau douce. A chaque étape, des observations (Microscope Electronique à Balayage, cultures, épifluorescence, Microscope Laser à Balayage Confocal) sont réalisées pour permettre l'interprétation des résultats obtenus du point de vue de la biologie. Le prolongement naturel de cette étude sera le développement d'un capteur pour détecter *in-situ* les biomasses et de les caractériser par leur géométrie (épaisseur et porosité).

MOTS CLEFS : Electrochimie, Biofilm, Transport de matière, Couche poreuse, Impédances, Réduction de l'oxygène.

The *biofilm* development on immersed surfaces in a natural aquatic medium has a very important impact on industrial productivity and competitiveness as well as on public health. The objective of this work is to develop a detection and characterisation technique of biofilms formed in natural media using a physico-chemical approach (porosity, thickness and diffusion coefficient). Biofilms can be considered as homogeneous porous layers on a macroscopic scale for the mass transport. The method developed in this work is based on the analysis of the redox tracer reduction limit current which is controlled by the mass transport. The diffused species concentration variation is distributed between the porous layer where only the molecular diffusion takes place and the electrolytic solution where the convective diffusion occur. From the measurements of diffusion limit current as a function of hydrodynamic conditions, it is possible to distinguish the contributions of each diffusional process and to obtain the parameters of the layer. The first step of the experimental work is the production of a model porous layer reproducing the biofilm behavior, as well as the development of an experimental protocol for the characterisation of its geometry by mass transport analysis. The second step is the adaptation of the protocol in order to monitor *in-situ* the evolution of a biofilm developed in natural medium such as sea water or fresh water. For each step, some observations are made (Scanning Electronic Microscopy, cultures, epifluorescence, Confocal Laser Scanning Microscopy) for permitting the interpretation of the results obtained from a biological viewpoint. The natural prolongation of this study will be the development of a sensor for monitoring *in-situ* the biomass and to characterise it by its geometry (thickness and porosity).

KEY WORDS : Electrochemistry, Biofilm, Mass Transport, Porous Layer, Impedances, Oxygen reduction.