



**HAL**  
open science

# Transport bactérien en milieux poreux : modélisation et application aux cas d'épandages d'effluents

Albert Jacobs

► **To cite this version:**

Albert Jacobs. Transport bactérien en milieux poreux : modélisation et application aux cas d'épandages d'effluents. Sciences du Vivant [q-bio]. Université d'Avignon et des Pays de Vaucluse, 2007. Français. NNT : . tel-02823729

**HAL Id: tel-02823729**

**<https://hal.inrae.fr/tel-02823729>**

Submitted on 6 Jun 2020

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

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

**Université d'Avignon et des Pays de Vaucluse**

*Numéro d'ordre : .....*

**THESE**

---

**Transport bactérien en milieux poreux**  
**Modélisation et application aux cas d'épandages d'effluents**

---

*Pour l'obtention du grade de*

Docteur de l'université d'Avignon

Faculté des Sciences et Agronomie

Discipline Hydrogéologie

Présenté et soutenu publiquement par

**Albert JACOBS**

le 9 Novembre 2007

**Jury :**

Mme M.N. BELLON-FONTAINE	Directrice de Recherche INRA (Massy)	Rapporteur
Mme L. JOCTEUR-MONROZIER	Chargée de Recherche CNRS (Lyon)	Rapporteur
M. J.J. GODON	Directeur de Recherche INRA (Narbonne)	Examineur
M. J. ROSE	Directeur de Recherche CNRS (Aix en Provence)	Examineur
M. J. MARTINS	Chargé de Recherche	Examineur
M. F. LAFOLIE	Chargé de recherche INRA (Avignon)	Directeur de thèse
Mme. I. DESPORTET	Ingénieur ADEME (Angers)	Examineur
M. D. BLANCHET	Ingénieur IFP (Reil Malmaison)	Examineur



## Résumé

L'étude du transport bactérien en milieux poreux est un enjeu important pour la protection des nappes phréatiques contre des contaminations microbiologiques. La pratique d'épandage des effluents des stations d'épuration est une source importante de bactéries pathogènes dans l'environnement dont le déplacement dans le sol constitue un risque pour la santé publique. Le transport d'une bactérie dans une matrice porale est soumis à une compétition entre processus de déplacement, d'adhésion et de blocage. Des expériences avec une large gamme de bactéries aux propriétés de surface cellulaire différentes ont révélé que le comportement de transport et d'adhésion n'est pas identique pour toutes les souches mais dépend de leurs caractéristiques hydrophobes et électrophorétiques respectives. L'adhésion des bactéries dans un milieu poreux empêche leur transport mais n'est pas un phénomène irréversible. La modélisation de transport bactérien en milieu poreux capable de reproduire les observations expérimentales a nécessité la prise en compte de deux types de détachements cellulaires : lents et rapides. Les cellules retenues par les interactions de faibles intensités (Lifshitz-van der Waals) peuvent se décrocher sous l'effet des forces hydrodynamiques ou par des répulsions électrostatiques dont la portée et l'intensité augmentent lorsque la force ionique de la solution diminue. Ces résultats ont souligné la forte dépendance du transport bactérien aux interactions électrostatiques. Les conditions de transport étant d'autant plus favorable que les répulsions électrostatiques entre cellules et surface solide sont élevées. L'observation *in situ* du déplacement de cellules d'*Escherichia coli* dans des pores a mis en évidence le coinçage des cellules bactériennes par des rugosités de surface et les zones de contacts entre grains d'un milieu poreux. Dans les milieux homogènes comme le sable le transport bactérien est principalement gouverné par les interactions électrostatiques. Cependant dans les milieux hétérogènes tel qu'un sol les caractéristiques hydrodynamiques et porales sont plus importantes. Notamment dans les sols non saturés où la filtration des bactéries par les petits pores réduit considérablement leur transport. L'étude du devenir d'une communauté bactérienne des boues de stations d'épuration dans un sable et un sol a montré que parmi les espèces capable d'être transportées se trouvaient des coliformes fécaux. Les résultats de cette étude ont permis de définir des précautions liées à l'épandage des effluents des stations d'épurations.

## Abstract

The study of bacterial transport in porous media is an important stake for the protection of ground water resources against microbial contaminations. Disposal of waste water plants effluents is an important source of pathogenic bacteria in the environment whose displacement in the ground may cause health concerns. The transport of a bacterium in a porous matrix is subjected to a competition between displacement, adhesion and blocking processes. Experiences with a broad range of bacteria with variable cellular surface properties revealed that the transport and adhesion behaviour is not identical for all the strains but depended on their respective hydrophobic and electrophoretic cell characteristics. Bacterial adhesion in porous media prevents their transport but is not an irreversible phenomenon. A model of bacterial transport in porous media able to reproduce correctly the experimental observations required to take into account two types of cell detachments: slow and fast. The cells retained by weak interactions (Lifshitz-van der Waals) can be detached by hydrodynamic forces or electrostatic repulsions whose range and intensity increase when the ionic force of a solution decreases. These results showed also that bacterial transport relied heavily on electrostatic interactions. Transport conditions are enhanced by higher electrostatic repulsions between cells and solid surface. *In situ* observations of *Escherichia coli* cells moving through pores highlighted the wedging of the bacterial cells by surface roughness and at zones of contact between porous media grains. In homogeneous mediums such as sand bacterial transport is mainly controlled by electrostatic interactions. However in heterogeneous mediums such as a soil hydrodynamics and porosity are more important. In particular for unsaturated soils where filtration of cells by small pores considerably reduces bacterial transport. The study of the fate in sand and soil media of bacterial communities from waste water plant sludge showed that faecal coliforms were among the species able to be transported. The results of this study made it possible to define safety rules related to waste water plants effluents spreading practices.

## Remerciements

Cette thèse a été cofinancée par l'Institut National de Recherche Agronomique (INRA) et par l'Agence de l'Environnement et de la Maîtrise de l'Energie (ADEME). L'ensemble des travaux ont été réalisés au sein de l'équipe « Couplages entre transferts et cycles biogéochimiques » de l'UMR 1114 Climat Sol et Environnement à l'INRA d'Avignon.

Tout d'abord j'adresse mes remerciements au Dr André CHANZY directeur de l'Unité Climat Sol et Environnement pour m'avoir accueilli dans son unité de recherche.

J'exprime ma gratitude à Marie-Noëlle BELLON-FONTAINE et Lucille JOCTEUR-MONROZIER qui ont accepté d'être rapporteurs de ma thèse et de juger ce travail.

Je remercie également les examinateurs de ma thèse Jean MARTINS, Jean Jacques GODON, Jérôme ROSE et Denis BLANCHET qui ont accepté de faire partie du jury de thèse.

Mes remerciements et mes reconnaissances les plus sincères vont à mon directeur de thèse François LAFOLIE qui m'a encadré tout au long de ces trois années, m'a formé au métier de chercheur et m'a permis de travailler dans d'excellentes conditions. Merci François pour ton écoute, ta gentillesse, pour toutes les réponses et explications à mes questions incessantes, pour ton soutien moral et le grand intérêt que tu as manifesté à l'égard de cette thèse. Merci pour ta bienveillance sur le bon déroulement de ce travail, pour les nombreuses discussions scientifiques (et comment mieux protéger l'environnement) et toutes les corrections de mes « œuvres ». Enfin je voudrais remercier François pour m'avoir ouvert le monde merveilleux de la modélisation, la physique des milieux poreux et pour m'avoir permis d'aller au delà de mes compétences de microbiologiste.

Je remercie également Isabelle DEPORTES ingénieur ADEME pour avoir accepté ma candidature à cette thèse et ses conseils pour le bon déroulement du projet.

Je tiens à adresser toute ma reconnaissance à l'ensemble des chercheurs ayant contribué à cette thèse : Odile BERGE (CEA, Cadarache) pour ses nombreux conseils, sa gentillesse et pour m'avoir appris la technique DGGE. Jean Jacques GODON (INRA de Narbonne) pour son accueil, son enseignement de la technique SSCP, et son partage des connaissances en écologie microbienne. Eric MICHEL (INRA Avignon) pour ses nombreux conseils, les discussions sur la théorie DLVO, son savoir faire en chimie des colloïdes et pour m'avoir prêté et aider à utiliser le simulateur de pluie. Jérôme ROSE pour m'avoir accueilli au CEREGE (Aix en Provence) et pour m'avoir permis de mesurer le potentiel zêta de mes bactéries dans son laboratoire. Romain BRIANDET pour m'avoir enseigné la joie de la microscopie confocal, sa patience, son accueil à l'INRA de Massy, la relecture de notre article et sa bonne humeur. Je remercie également tout les autres chercheurs qui sont intervenu pour me venir en aide : Yves DUDAL, Pierre RENAULT, Frédéric CARLIN, Véronique BROUSSOLLE, Julien BRILLARD et Marie Hélène GUINE BRETIERE.

Je voudrais également remercier l'ensemble du personnel technique pour leur contribution à ce travail : Micheline DEBROUX (Inra, Avignon), Jean Marie HERRY (Inra, Massy), Caroline MICHAUD (Inra, Avignon), Isabelle Bornard (Inra, Avignon), Ghislain SEVRIER (Inra, Avignon), Valérie BRU (Inra, Narbonne), Franck TISON (Inra, Avignon) et le secrétariat.

Merci à tout les stagiaires (et particulièrement Ludovic), thésards et post docs pour la bonne ambiance. Parmi eux je voudrais citer Mohammed, Sreedhar, Tuba, Jasmina, Katrin, et Iyad.

Lors de mes nombreux séjours réalisés dans le cadre de cette thèse j'ai eu l'occasion de connaître de nombreuses personnes mais qui ne sont peut être pas citées ici. Que chaque membre du personnel, chercheur, technicien, stagiaire...trouvent ici le témoignage de ma gratitude.

Enfin je voudrais remercier tous les membres de ma famille et tout particulièrement mes parents et mon épouse Ouassila.





## Sommaire

Remerciements.....	3
Sommaire.....	7
<b>INTRODUCTION GENERALE .....</b>	<b>29</b>
<b>CHAPITRE 1 : ETAT DE L'ART</b>	
CONTEXTE HISTORIQUE .....	37
<b>A. LE TRANSPORT MICROBIEN EN MILIEU POREUX.....</b>	<b>39</b>
<b>1. Adhésion bactérienne.....</b>	<b>39</b>
1.1. Les étapes de l'adhésion bactérienne.....	39
1.1.1. Etape 1 : le transport.....	41
1.1.2. Etape 2 : adhésion initiale.....	41
1.1.3. Etape 3 : l'attachement.....	42
1.2. L'approche physicochimique.....	43
1.2.1. La théorie DLVO .....	43
1.2.2. Théorie DLVO étendue (ou XDLVO).....	47
1.2.3. Applications .....	53
1.2.4. Sensibilité des interactions électrostatiques à l'environnement.....	59
1.3. DLVO en microbiologie: critiques et limites.....	66
1.3.1. Facteurs physiques affectant la théorie DLVO.....	66
1.3.2. Les facteurs chimiques affectant la théorie DLVO.....	67
1.3.3. Facteurs biologiques affectant la théorie DLVO .....	67
1.3.4. La théorie DLVO remise en cause.....	70
1.4. Les facteurs biologiques .....	71

1.4.1. Polymères de la surface cellulaire.....	71
1.4.2. Motilité cellulaire et transport bactérien en milieux poreux.....	75
1.4.3. Etat et condition physiologique .....	76
1.4.4. Densité cellulaire .....	77
<b>2. La filtration.....</b>	<b>77</b>
2.1. Le milieu poreux :.....	78
2.2. La morphologie des bactéries .....	81
2.3. L'obstruction des pores.....	81
2.4. Saturation en eau et charge hydraulique en milieu poreux .....	82
<b>3. Forces Hydrodynamiques .....</b>	<b>83</b>
3.1. Les forces de cisaillement et vitesse de l'écoulement .....	83
3.2. Les zones mortes.....	85
<b>B. LA MODELISATION DU TRANSPORT MICROBIEN EN MILIEU POREUX 86</b>	
<b>1. Les mécanismes .....</b>	<b>86</b>
1.1. Transport dans la phase aqueuse.....	86
1.2. Rétention sur la phase solide.....	87
1.2.1. Détermination de l'efficacité d'interception $\eta_0$ .....	88
1.2.2. Détermination de l'efficacité d'attachement $\alpha$ .....	89
<b>2. La théorie ne reflète pas la réalité .....</b>	<b>91</b>
2.1. Déviation du modèle de filtration classique.....	91
2.2. Déposition en conditions non favorables.....	91
2.3. Profil de déposition non log-linéaires .....	92
<b>C. LE TRANSPORT DE BACTERIES PATHOGENES EN MILIEU POREUX.....</b>	<b>94</b>
<b>1. Introduction.....</b>	<b>94</b>
<b>2. Le sort des bactéries pathogènes entérique dans un sol.....</b>	<b>95</b>

2.1.	La survie.....	95
2.2.	Le déplacement.....	95
2.3.	Détection de pollutions fécales.....	96

## **CHAPITRE 2 : Vitesse d'adhésion de cellules bactériennes sur du sable: propriété de surface et vitesse d'adhésion**

<b>1.</b>	<b>Introduction.....</b>	<b>102</b>
<b>2.</b>	<b>Materials and methods.....</b>	<b>103</b>
2.1	Bacterial strains and solid phase.....	103
2.2	Surface properties of cells and porous medium.....	103
2.3	Evaluation of hydrophobicity: MATS method.....	105
2.4	Kinetic of bacterial cells adhesion to sand.....	105
2.5	Adsorption study: batch adhesion tests.....	105
<b>3.</b>	<b>Theory.....</b>	<b>105</b>
3.1	The free energy of interaction.....	105
3.2	Modelling the batch experiment.....	106
<b>4.</b>	<b>Results.....</b>	<b>106</b>
4.1	Zeta potential.....	106
4.2	Hydrophobic and hydrophilic character of bacterial cells.....	107
4.3	Bacterial and sand thermodynamic properties.....	108
4.4	Batch experiments.....	108
4.5	Correlations.....	108
<b>5.</b>	<b>Discussion.....</b>	<b>108</b>
5.1	Adhesion percentage.....	108
5.2	Straining.....	108
5.3	Nanometer and micrometer roughness of sand particles.....	108

5.4	Secondary energy minimum.....	109
5.5	Population heterogeneity.....	110
5.6	Rate of adhesion.....	110
<b>6.</b>	<b>Conclusion.....</b>	<b>110</b>
<b>CHAPITRE 3 : Impact de la force ionique, des caractéristiques du milieu poreux et des forces de traînées sur le transport d'<i>Escherichia coli</i> analysé par imagerie confocale</b>		
<b>1.</b>	<b>Introduction.....</b>	<b>121</b>
<b>2.</b>	<b>Material and Methods .....</b>	<b>123</b>
2.1.	Strain, plasmid and fluorescent labeling.....	123
2.2.	The electrostatic free energy of interaction. ....	123
2.3.	Column experiments. ....	125
2.4.	Fluorence time lapse confocal imaging .....	127
<b>3.</b>	<b>Results and discussion .....</b>	<b>129</b>
3.1.	Ionic strength and electrostatic repulsions.....	129
3.2.	Breakthrough curves .....	129
3.3.	Spatial and temporal fluorescens confocal imaging .....	131
3.3.1.	Ionic strength impact.....	131
3.4.	Porous media characteristics impact.....	135
3.5.	Drag torque calculations .....	135
<b>4.</b>	<b>Illustrations supplémentaires : .....</b>	<b>140</b>
<b>CHAPITRE 4 : Transport d'<i>E. coli</i> en milieux poreux complexes et artificiels : expérimentations et modélisations</b>		
<b>1.</b>	<b>Introduction.....</b>	<b>149</b>

<b>2. Material and methods.....</b>	<b>151</b>
2.1. Strain, plasmid and fluorescent labeling.....	151
2.2. Electrophoretic surface properties of cells and porous medium measurements 153	
2.3. Saturated column experiments.....	153
2.4. Undisturbed columns with rain simulation.....	155
2.5. Model development .....	155
<b>3. Results and discussion .....</b>	<b>159</b>
3.1. Saturated column experiments.....	159
3.2. Undisturbed columns experiments.....	163
3.3. Model comparisons.....	165
<b>4. Conclusions.....</b>	<b>168</b>
<b>5. Résultats complémentaires : .....</b>	<b>171</b>
5.1. Le transport microbien dans une colonne de sol non saturée. ....	171
5.2. Le transport de <i>Rhizobium</i> YAS3401 dans différentes conditions .....	173
5.2.1. Matériel et méthode .....	173
5.2.2. Résultats.....	175
5.2.3. Discussion .....	175
5.3. 1 <sup>ère</sup> Expérience : vérification de l'effet centrifugation sur le transport de <i>Rhizobium</i> YAS3401 sur du sable .....	177
5.4. 2 <sup>ème</sup> Expérience : vérification de l'effet des conditions de culture sur le transport de <i>Rhizobium</i> YAS3401 sur du sable.....	179
5.5. Conclusion .....	180

## **CHAPITRE 5 : Transport et devenir d'une communauté bactérienne issue de boues de stations d'épuration en milieux poreux**

<b>1. Introduction.....</b>	<b>187</b>
-----------------------------	------------

<b>2. Material and methods.....</b>	<b>189</b>
2.1. Saturated column experiments.....	189
2.2. Bacterial counting and detection methods.....	191
2.3. DNA extraction.....	193
2.4. DNA analysis.....	193
2.5. SSCP capillary electrophoresis.....	193
2.6. M-FC agar grown colonies identification.....	195
<b>3. Results.....</b>	<b>197</b>
3.1. Bacterial counting.....	197
3.2. SSCP pattern analysis.....	197
3.3. Identification of M-FC Agar blue colonies.....	201
<b>4. Discussion.....</b>	<b>201</b>
<b>5. Conclusions.....</b>	<b>203</b>
<b>6. Résultats complémentaires.....</b>	<b>205</b>

## CHAPITRE 6 : Synthèse des résultats

<b>1. Analyse et synthèse des principaux acquis.....</b>	<b>209</b>
1.1. Les facteurs régissant le transport bactérien en milieu poreux.....	209
1.1.1. Les interactions physicochimiques.....	209
1.1.2. Le milieu poreux.....	211
1.2. Le phénomène de désorption des bactéries au cours du transport.....	213
1.3. Modélisation.....	215
<b>2. Répercussion des acquis scientifique sur les pratiques d'épandage et d'irrigation avec eaux usées.....</b>	<b>215</b>
<b>3. Perspectives.....</b>	<b>217</b>
3.1. Quelques aspects méthodologiques.....	217

---

3.1.1. Caractérisation des bactéries.....	217
3.1.2. Conditions du transport dans des milieux poreux.....	218
3.1.3. Que mesurer ? .....	218
3.2. Nouvelles voies de recherche.....	219
3.2.1. La problématique de l'hétérogénéité des populations .....	219
3.2.2. Milieux hétérogènes.....	220
3.2.3. L'origine du phénomène de la désorption lente des bactéries .....	220
3.2.4. Transport en milieux non saturés.....	221
<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES .....</b>	<b>223</b>

## **ANNEXES**

<b>ANNEXE 1 : Méthode et principe de mesure du potentiel zêta des cellules bactériennes</b> .....	249
<b>ANNEXE 2 : Mesure de l'angle de contact pour les bactéries .....</b>	253
<b>ANNEXE 3 : Mesure de l'angle de contact pour le solide .....</b>	255
<b>ANNEXE 4 : Microscope confocal et visualisation des bactéries dans un milieu poreux</b> .....	259
<b>ANNEXE 5 : Comptage des cellules bactériennes au cytomètre à flux .....</b>	263





## Liste des paramètres et abréviations

Paramètre	Définition	Unité
<b><u>A</u></b>		
A	Constante d'Hamaker	J
$\alpha$	Efficacité de collision (des colloïdes avec la surface solide)	-
AB	Interactions Lewis Acide Base	-
$a_p$	Diamètre de la particule	m
$A_s$	Paramètre de porosité	-
ASM	American Society of Microbiology	-
<b><u>C</u></b>		
C	Concentration cellulaire ou colloïdes	Cell.ml <sup>-1</sup>
$C_0$	Concentration cellulaire initiale (injectée)	Cell.ml <sup>-1</sup>
CCD	Charged Couple Device	-
CFU	Colony Forming Unit	-
CEREGE	Centre Européen de Recherche et d'Enseignement des Géosciences de l'Environnement	-
<b><u>D</u></b>		
DLVO	Théorie de DeJarguin-Landau-Verwey-Overbeek	-
Dsred	Protéine fluorescente (rouge) produit par le corail <i>Discosoma</i>	-
D	Coefficient de dispersion hydrodynamique	L <sup>2</sup> .T <sup>-1</sup>
$D_\infty$	Coefficient de diffusion du liquide	-
$D_h$	Dispersion hydrodynamique	L <sup>2</sup> .T <sup>-1</sup>
$d_c$	Diamètre des grains du milieu poreux	m
$d_p$	Diamètre de la particule	m
$d_{max}$	Diamètre maximale d'une pore	m
$\Delta G^{TOT}$	Energie libre d'interaction totale de Gibbs	J.m <sup>-2</sup> ou kT
$\Delta G^{AB}$	Energie libre d'interaction de Lewis Acide Base	J.m <sup>-2</sup> ou kT

$\Delta G^{LW}$	Energie libre d'interaction de Lifshitz-van de Waals	J.m <sup>-2</sup> ou kT
$\Delta G^{EL}$	Energie libre d'interactions électrostatiques	J.m <sup>-2</sup> ou kT
<b><u>E</u></b>		
EL	Interactions électrostatiques	-
$\varepsilon$	Constante diélectrique du milieu	C.m.V <sup>-1</sup>
$\varepsilon_r$	Permittivité diélectrique relative de l'eau : 78.55	-
$\varepsilon_0$	Permittivité sous vide : 8.854e10 <sup>-2</sup>	C.m.V <sup>-1</sup>
e	charge électrique d'un électron : -1.6e10 <sup>-19</sup>	C
EPS	Exopolysaccharide	-
EPA	Environment Protection Agency	
<b><u>F</u></b>		
FEP	Fluoroéthylènepropylène	-
FITC	Fluorescein isothiocyanate	-
FISH	Fluorescent In Situ Hybridization	-
<i>f</i>	Fraction de bactéries déposées qui sont relâchées	-
<b><u>G</u></b>		
g	Constante de gravité	-
$\gamma_0$	Distance minimale d'approche ou de contact : 1.57	Å
$\gamma_L$	Tension de surface du liquide	J.m <sup>-2</sup>
$\gamma^{AB}$	Composante Lewis acide base de la tension de surface	J.m <sup>-2</sup>
$\gamma^{LW}$	Composante Lifshitz-van der Waals de la tension de surface	J.m <sup>-2</sup>
$\gamma^+$	Composante donneur d'électrons	J.m <sup>-2</sup>
$\gamma^-$	Composante accepteur d'électrons	J.m <sup>-2</sup>
$\gamma$	Distance de séparation cellule-solide	m
<b><u>H</u></b>		
h	hauteur	m

**I**

IHP	Inner Helmholtz plane	-
IS	Ionic Strength	-

**K**

k	constante de Boltzmann : $1.38 \times 10^{-23}$	J.K <sup>-1</sup>
kT	Unité d'énergie obtenue en divisant des joules par le produit kT (k la constante de Boltzmann et T la température en K)	kT
$k$	Longueur de Debye	m
$k_d$	Constante de déposition	h <sup>-1</sup>
$k_r$	Constante de relâchage	h <sup>-1</sup>
k	Constante de partition	cm <sup>3</sup> .g <sup>-1</sup>

**L**

LW	Interactions Lifshitz-van der Waals	-
$\lambda$	Longueur d'influence des interactions Lewis acide base	m
LPS	Lipopolysaccharide	-

**M**

M	Masse	g
$\mu$	Viscosité du fluide	kg.m <sup>-1</sup> .s <sup>-1</sup>
MATS	Microbial Adhesion To Solvents	-
MFC	Modèle de Filtration Classique	-

**N**

$N_{pe}$	Nombre de Peclet	-
$N_{vdW}$	Nombre de Lifshitz-van der Waals	-
$N_A$	Nombre d'attraction	-
$N_G$	Nombre gravitationnel	-
$N_R$	Rapport de taille entre le diamètre de colloïde et le diamètre des grains du milieu poreux	-

$n_i$	nombre d'ions par $\text{cm}^3$ de liquide	$\text{ions.cm}^{-3}$
$\eta_0$	Efficacité d'interception des grains d'un milieu poreux	-
$N_{\text{Pore}}$	Nombre de pore par section de colonne	-
<b><u>Q</u></b>		
OHP	Outer Helmholtz Plane	-
OMS	Organisation Mondiale de la Santé	-
$\omega$	Taux d'adhésion	$\text{h}^{-1}$
<b><u>Q</u></b>		
$\psi_{s/b}$	Potentiel de surface du solide ou de la bactérie	V
q	Flux de la phase liquide	$\text{L}^3.\text{L}^{-2}.\text{T}^{-1}$
<b><u>P</u></b>		
P	Source à l'origine des mécanismes de rétention et de détachement des colloïdes en milieux poreux	-
<b><u>R</u></b>		
R	Rayon de particule	m
$\rho_p$	Densité de la particule	$\text{g.m}^{-3}$
$\rho_f$	Densité du fluide	$\text{g.m}^{-3}$
$\rho$	Masse volumique	$\text{M.L}^{-3}$
$R_E$	Rayon moyen d'un pore	m
<b><u>S</u></b>		
S	Concentration cellulaire sur la phase solide	$\text{cells.g}^{-1}$
SSCP	Single-Strand Conformation Polymorphism	-
<b><u>T</u></b>		
t	le temps	s
T	Température	K

$\theta$	Porosité	-
$\theta$	Angle de contact	degré
<b><u>U</u></b>		
U	Vitesse d'approche de la phase liquide	m.s <sup>-1</sup>
<b><u>V</u></b>		
v	Vitesse de Darcy	m.s <sup>-1</sup>
V <sub>p</sub>	Volume porale	L <sup>3</sup>
V <sub>t</sub>	Volume Totale	L <sup>3</sup>
V <sub>b</sub>	Volume hors volume porale (tuyaux, réservoir...)	L <sup>3</sup>
<b><u>X</u></b>		
XDLVO	Théorie de Dejarguin-Landau-Verwey-Overbeek étendue	-
<b><u>Z</u></b>		
z	Distance de transport	m
z	Distance entre le plan de glissement et la surface du colloïde	m
ζ	Potentiel électrique de surface	V



## Liste des figures

### CHAPITRE 1

<b>Figure 1</b> : Représentation schématique des 4 étapes de la colonisation d'une surface par des microorganismes.....	40
<b>Figure 2</b> : Energie libre d'interactions entre une surface plane et une particule sphérique.....	46
<b>Figure 3</b> : Energie libre d'interactions entre une surface plane hydrophobe et une particule sphérique hydrophile.....	50
<b>Figure 4</b> : Illustration schématique de la double couche électronique à la surface d'un solide chargée négativement.....	58
<b>Figure 5</b> : Energie libre d'interactions entre une surface plane et une particule sphérique.....	64
<b>Figure 6</b> : Illustration schématique de l'accessibilité à une surface plane d'un colloïde sphérique lisse (A) et d'un colloïde sphérique de diamètre identique mais présentant des excroissances de faible diamètre à sa surface. (Inspiré de Van Oss, 2003).....	68
<b>Figure 8</b> : Illustration d'un lipopolysaccharide.....	72
<b>Figure 9</b> : illustration du blocage d'une cellule bactérienne au niveau de la zone de contact entre deux grains d'un milieu poreux.....	80
<b>Figure 10</b> : Figures supplémentaires.....	113

### CHAPITRE 2

<b>Figure 1</b> : Results for the MATS method.....	108
<b>Figure 2</b> : Three contrasted examples of evolution of the bacterial cell concentration in the batch solution.....	108
<b>Figure 3</b> : Correlation between potential zeta (mV) and the first-order rate constant $\omega^{-1}$ (min).....	109
<b>Figure 4: (A)</b> $\Delta G^{AB}$ as a function of bacterial adhesion (%) on sand during the adhesion tests (black boxes) and the column experiments (grey quares).....	109
<b>Figure 4: (B)</b> $\zeta$ potential (mV) as a function of bacterial adhesion (%) on sand.....	109



<b>Figure 5:</b> Correlation (linear regression) between the results obtained with adhesion tests and the column experiments.....	110
<b>Figure 6:</b> Roughness of a Fontainebleau sand grain used in this study. Observation performed with a scanning electron microscope.....	110

### CHAPITRE 3

<b>Figure 1:</b> Free energy of interaction as a function of distance between sand and the PHL1314 strain in different ionic strengths ( $\text{mol.l}^{-1}$ ), calculated according to the classical DLVO theory.....	126
<b>Figure 2:</b> Effluent concentration curves for <i>E. coli</i> PHL1314 from (A) glass beads and (B) sand in two different ionic strengths.....	128
<b>Figure 3:</b> Bacterial breakthrough from (A) glass beads filled column and (B) sand filled column as lower ionic strength incoming solutions were injected. ....	130
<b>Figure 4:</b> Bacterial adhesion in sand and glass beads media with two different ionic strengths after 15minutes:.....	132
<b>Figure 5:</b> Time lapse bacterial detachment from a sand matrix by lowering the ionic strength (IS) visualized with a confocal microscope:.....	132
<b>Figure 6:</b> Fluorescence intensity (au) measured as a function of time for attached cells and free cells. ....	133
<b>Figure 7:</b> Wedging: examples of bacterial cells blocked by grain-grain junctions and narrow gates.....	134
<b>Figure 8:</b> Example of <i>E. coli</i> PHL1314 cells trapped in a dead end path (sand matrix). ....	134
<b>Figure 9:</b> Bacterial cells retained by sand surface asperities as opposed to smooth characteristics of glass beads. ....	134
<b>Figure 10 :</b> Un grain de sable avec ses crevasses à la surface dans lesquelles des bactéries (tâches noires) sont piégées. ....	140
<b>Figure 11 :</b> Cellules d' <i>E. coli</i> PHL1314 « collées » à la surface de billes de verre.....	141
<b>Figure 12 :</b> Photo prise pendant le transport dans le sable d' <i>E. coli</i> PHL1314 montrant une zone en forme de fourche.....	141

**Figure 13 :** Illustration du blocage de cellules au niveau d'une zone de contact entre 2 billes de verre.....142

**Figure 14 :** Illustration des trajectoires et des vitesses de déplacement des cellules bactériennes dans un sable.....142

#### CHAPITRE 4

**Figure 1 :** Tracer and *E. coli* breakthrough curves for the glass beads columns.....158

**Figure 2:** Tracer and *E. coli* breakthrough curves for the sand columns.....158

**Figure 3:** Tracer and *E. coli* breakthrough curves for the columns packed with aggregates...160

**Figure 4:** Comparison of *E. coli* breakthrough curves for the various aggregates sizes at an ionic strength of 0.01M.....162

**Figure 5:** Comparison of *E. coli* breakthrough curves for the various aggregates sizes at an ionic strength of 0.1M.....162

**Figure 6:** Comparison of observed and simulated breakthrough curves for the various porous medium (a) glass beads, (b) sand, (c) 0.3-1mm aggregates, (d) 1-3 mm aggregates, (e) 3-5 mm aggregates. ....164

**Figure 7:** Water flow and observed and measured cell concentrations at the outlet of the two undisturbed soil columns: (a) Input flow is 30mm/h (b) Input flow is 20mm/h .....166

**Figure 8 :** Transport de la souche *E. coli* PHL1314 dans un sol Poirson (3-5mm) saturée et non saturée. ....170

**Figure 9 :** Transport de la souche *Rhizobium* YAS3401 dans des colonnes de sable à 10-2M de NaCl.....174

**Figure 10 :** Impact de la diminution de la force ionique sur le transport de la souche *Rhizobium* YAS3401 dans du verre et du sable.....176

#### CHAPITRE 5

**Figure 1:** SSCP patterns of PCR amplified 16S rRNA gene fragments from bacterial communities of sludge A, B and C.....196

**Figure 2:** SSCP patterns of PCR amplified 16S rRNA gene fragments from bacterial communities of sludge A, B and C after their transport through sand or soil media.....198

**ANNEXES**

**Figure 1 :** Schéma du principe de l'électrophorèse microscopique LASER .....248

**Figure 2 :** Illustration de la mesure d'angle de contact de cellules bactériennes.....252

**Figure 3 :** Montée capillaire de l'eau dans le sable en centimètres en fonction du temps.....256

**Figure 4 :** Hauteur de la montée capillaire en centimètres (de l'eau dans le sable) au carré en fonction du temps.....256

**Figure 6 :** Illustration de la cellule d'écoulement (Ibidi) utilisé et son système de raccordement.....260

**Figure 7 :** Visualisation d'un même site dans le sable à 3 profondeurs différentes. A : 6µm, B : 50µm et C : 100µm .....260

**Figure 8 :** Cytomètre de flux EPICS XL de Beckman Coulter utilisé pour les comptages .....262

**Figure 9 :** Comptage des cellules *P. polymycea* au cytomètre à flux.....264

**Figure 10 :** Comptage de cellules *E. coli* PHL1314 au cytomètre à flux. ....266



## Liste des tableaux

### ETAT DE L'ART

<b>Tableau 1 :</b> Composantes Lifshitz (LW) , acide – base(AB) de la tension de surface et paramètres donneurs ( $\gamma^-$ ) et accepteurs ( $\gamma^+$ ) d'électrons de plusieurs liquide .....	54
<b>Tableau 2 :</b> Exemples de longueurs de Debye en fonction de différentes forces ioniques et espèces chimiques. ....	60

### CHAPITRE 2

### CHAPITRE 3

<b>Table 1:</b> Porous media and column characteristics .....	124
<b>Table 2:</b> Results of potential zeta (mV) measurements for porous media and the PHL1314 strain for different ionic strengths .....	124
<b>Table 3:</b> Bacterial transport rate (BTR) obtained at different ionic strengths with both sand and glass column experiences.....	124

### CHAPITRE 4

<b>Table 1:</b> Porous media and column characteristics .....	152
<b>Table 2:</b> Mean percentage of bacteria recovered at the outlet of the columns for the various porous media and ionic strength used. ....	156
<b>Table 3:</b> Fitted model parameters for the various experiences: $\theta_{\text{tracer}}$ is the water content fitted from the tracer experiments.....	156
<b>Table 4:</b> Pourcentage de cellules de <i>Rhizobium</i> YAS récupérées en sortie de colonne dans différents milieux poreux (sable, verre et sol Poirson).....	174
<b>Tableau 5 :</b> Résultats du transport en mini colonne de sable de la souche <i>Rhizobium</i> YAS3401 en fonction de différentes conditions de culture. ....	178

### CHAPITRE 5

<b>Table 1:</b> Porous media characteristics and hydrodynamics .....	188
<b>Table 2:</b> PCR primers and amplification conditions used in this study. ....	192

<b>Table 3:</b> Results of bacterial counting with flow cytometer method and results of thermo tolerant coliform counting on m-FC agar plates at 44°C.....	196
<b>Table 4:</b> Simpson indexes obtained from SSCP pattern analysis for each out coming solution from the sand and the soil columns.....	200



## **Introduction Générale**





Les conséquences liées aux déplacements bactériens dans un profil sol concernent de nombreuses thématiques environnementales, agronomiques et de santé. Aussi l'intérêt pour cette problématique est grandissant car les perspectives d'application sont nombreuses. Ainsi certaines souches sont spécialisées dans la dégradation de polluants (biodégradation), d'autres capables de rééquilibrer un écosystème ou encore d'apporter des sources d'azote à des plantes de culture. L'apport et le transfert de ces microorganismes dans un sol pourraient donc servir à la protection de l'environnement. Le potentiel est énorme mais encore peu étudié. Cependant les déplacements de microbes dans un sol peuvent aussi être nuisibles. Le transfert de bactéries pathogènes, exogènes ou génétiquement modifiées dans la zone non saturée peut aboutir à la contamination de nappes phréatiques ou à la perturbation d'un écosystème. De plus les bactéries peuvent être vecteurs pour le transport de polluants tel que des métaux lourds, des éléments radioactifs ou des pesticides. De nombreux déchets pouvant contenir des concentrations élevées en bactéries entériques pathogènes sont régulièrement répandus à la surface de sols. Des études récentes ont montré que le sol pouvait jouer un rôle important dans la transmission de maladies entériques. Dans les pays en voie de développement les eaux usées domestiques non traitées sont utilisées à des fins d'irrigation en agriculture. Cette méthode est une source de prolifération de souches pathogènes dans les sols et de contamination des nappes phréatiques, des puits ou des eaux de récréations. Mais cette pratique commence également à se répandre dans les pays développés notamment dans les régions souffrant de déficits hydriques importants. Par exemple dans l'Arizona de nombreux parcs municipaux sont irrigués avec des eaux usées. Les données sur le déplacement de souches pathogènes dans un profil sol sont encore rares dans la littérature. La possibilité que le sol puisse être un réservoir et un lieu de transport de bactéries pathogènes n'a été que peu étudiée. Il semble logique de penser que des bactéries apportées à un sol peuvent atteindre les nappes phréatiques grâce à la circulation de l'eau dans les pores du sol. Cependant le lien entre l'origine des maladies entériques et le sol n'a pas encore été parfaitement établi.

Aujourd'hui il est admis que deux mécanismes principaux empêchent le déplacement de cellules microbiennes dans un sol : l'adhésion bactérienne et la filtration. Les phénomènes d'adhésion sont contrôlés par des interactions physicochimiques entre la bactérie et la phase solide. Néanmoins cette approche nécessite une caractérisation de la surface des cellules et des grains du milieu poreux qui est complexe. De plus l'adhésion bactérienne est couplée à des processus biologiques propre à la nature des bactéries. En effet de nombreuses espèces bactériennes produisent des composés extracellulaires dont le rôle est soit de promouvoir soit d'empêcher l'adhésion. De ce fait, le caractère vivant des cellules microbiennes complique beaucoup l'étude de l'adhésion bactérienne en milieux poreux. Le second mécanisme qui s'oppose au transport microbien est la filtration. Ce facteur est très dépendant de la composition et de la porosité des milieux poreux. Aussi le choix des milieux poreux utilisés pour ce type d'études est-il primordial.

De nombreuses connaissances sur le transport de bactéries à travers des milieux poreux ont été obtenues à partir d'expériences en colonne au laboratoire. Mais des inconnues demeurent quand à l'effet de certains facteurs qui influent sur la rétention de cellules bactériennes dans une matrice porale. Parmi ceux-ci on trouve la nature du milieu poreux (artificiel, naturel, caractéristiques de la porosité, propriétés chimiques de surface...), le flux hydrique (intensité, hétérogénéité, ...) et les caractéristiques des cellules (morphologie, hydrophobicité, charge électrique, production d'exopolymères de surface...).

Bien que la théorie de la stabilité colloïdale soit généralement utilisée, il n'y a pas de consensus et de modèle pour expliquer l'adhésion et le détachement de cellules sur une surface solide. De même, les modèles mathématiques développés pour simuler le transport bactérien en milieux poreux sont souvent limités à des conditions expérimentales très spécifiques et très souvent pour ne pas dire exclusivement mis en œuvre pour des milieux poreux homogènes.

Il nous a donc semblé que les points suivants pouvaient constituer des objectifs intéressants :

- tester la théorie de la stabilité colloïdale pour une large gamme de bactéries,

- visualiser à une échelle microscopique les phénomènes de rétention et de libération
- conduire des expériences en colonnes pour des milieux présentant des porosités aux propriétés contrastées
- essayer de caractériser les modifications de diversité microbienne par passage à travers une matrice poreuse et tenter de relier ces modifications aux résultats précédents.

Ce mémoire présente l'ensemble des résultats obtenus. Il est structuré en 6 parties.

Le premier chapitre est consacré à une étude bibliographique qui synthétise les connaissances actuelles sur le transport microbien en milieux poreux, la modélisation et le devenir de bactéries pathogènes dans un sol.

Dans une seconde partie nous avons étudié l'influence des caractéristiques morphologiques et physicochimiques d'un large panel de souches bactériennes sur leur comportement adhésif dans un milieu poreux simple : le sable.

La troisième partie a été destinée à recueillir des données à partir d'observations visuelles à l'échelle microscopique pour mieux comprendre la rétention et la libération d'une cellule bactérienne dans un pore.

Dans une quatrième partie des expériences de transport d'*Escherichia coli* sur des milieux poreux très différents (nature, porosité et composition) et pour des forces ioniques différentes ont été réalisées. L'ensemble des données collectées a servi à évaluer un modèle de déplacement.

Le cinquième chapitre correspond à la partie appliquée de la thèse. Dans cette partie nous sommes attachés à étudier le devenir des populations bactériennes provenant de boues de stations d'épuration lors du transport dans un milieu poreux en utilisant des outils de biologie moléculaire.

Enfin la sixième partie constitue la conclusion de ce mémoire. Ce chapitre permet d'avoir une vue d'ensemble sur le travail effectué pendant cette thèse et les avancées scientifiques dans le domaine du transport bactérien en milieu poreux. Enfin ce chapitre expose les perspectives de recherche à la lumière des résultats de la thèse.



## **CHAPITRE 1 : Etat de l'Art**



## Contexte historique

Les premières études sur le transport microbien en milieux poreux remontent aux années 70 (Gerba 1975; Rajagopalan 1976). Pendant les années 90 le nombre d'articles augmente considérablement impliquant des scientifiques de disciplines très diverses. En effet les processus mis en jeu dans les déplacements de bactéries sont très nombreux et complexes. La modélisation et la compréhension du déplacement microbien en milieux poreux est typiquement un couplage entre des mécanismes physiques (filtration, forces hydrodynamiques...), chimiques (hydrophobicité, liaisons faibles...) et biologiques (caractéristiques membranaire, mobilité...). Cette dernière composante complique beaucoup l'étude du transport microbien dans un profil sol à cause du caractère vivant des bactéries.

Les premiers travaux ont principalement porté sur deux axes : les interactions des bactéries avec la surface solide (Marshall 1976; Marshall 1980; Marshall *et al.* 1971) et la modélisation du transport (Rajagopalan 1976; Yao 1971). En effet les interactions des cellules avec le milieu poreux peuvent aboutir à l'adhésion des bactéries et empêcher leur transport. Ces interactions ont également étudiées dans le cadre de la problématique des biofilms (Costerton *et al.* 1978; Costerton *et al.* 1995; Costerton 1985; Costerton *et al.* 1999; Lappin-Scott 1989; Marshall *et al.* 1971). C'est la raison pour laquelle la littérature est très riche dans ce domaine et propose de nombreuses explications sur les phénomènes d'adhésion cellulaires. Dans l'étude pionnière par Marshall *et al.* (1971) les auteurs suggèrent que la sorption de bactéries à la surface implique une étape initiale de sorption réversible suivi par une sorption plus lente dépendant de la surface conduisant à une adsorption irréversible (Marshall 1971). Marshall *et al.* sont les premiers à utiliser la théorie DeJarguin-Landau-Verwey-Overbeek (DLVO ou théorie de la stabilité colloïdale) dans le cadre de la microbiologie (Marshall *et al.* 1971). Cette approche physicochimique sera reprise dans de nombreuses études dans les années 80 (Absolom *et al.* 1983; Busscher 1984; Marshall 1980; Marshall 1986; Rosenberg 1984; van Loosdrecht *et al.*



1987; van Loosdrecht *et al.* 1987; van Loosdrecht *et al.* 1990; van Loosdrecht 1990; van Loosdrecht 1989) En effet un nombre croissant d'études suggère que le transport microbien est fortement influencé par la physicochimie des surfaces cellulaires (Chen et Strevett 2001; Chen et Strevett 2002; Chen et Strevett 2003; DeFlaun *et al.* 1999; Gannon 1991; Hermansson 1999; Redman *et al.* 2004). Cependant les seules interactions physicochimiques de la théorie DLVO ne suffisent pas à décrire le comportement de cellules bactériennes dans un milieu poreux et de nombreux articles ont décrit l'importance des forces hydrodynamiques (Smith 1985) ou encore les caractéristiques du milieu poreux traversé (Corapcioglu 1984; Pekdeger 1983). A cela il faut ajouter que le comportement des bactéries dans un milieu poreux peut varier d'une espèce à l'autre en fonction de ses caractéristiques morphologiques (Corapcioglu 1984), de surface cellulaire (Ward 1980) ou sa capacité de survie.

Cette synthèse bibliographique propose un état actuel des connaissances sur le déplacement de bactéries dans un milieu poreux. Tout d'abord une attention particulière sera portée sur les 3 mécanismes principaux qui régissent le transport bactérien en milieu poreux : l'adhésion, la filtration et les forces hydrodynamiques. Puis sera abordé la question de la modélisation. Enfin des précisions seront apportées sur le déplacement de souches pathogènes dans un sol.

## A. Le transport microbien en milieu poreux

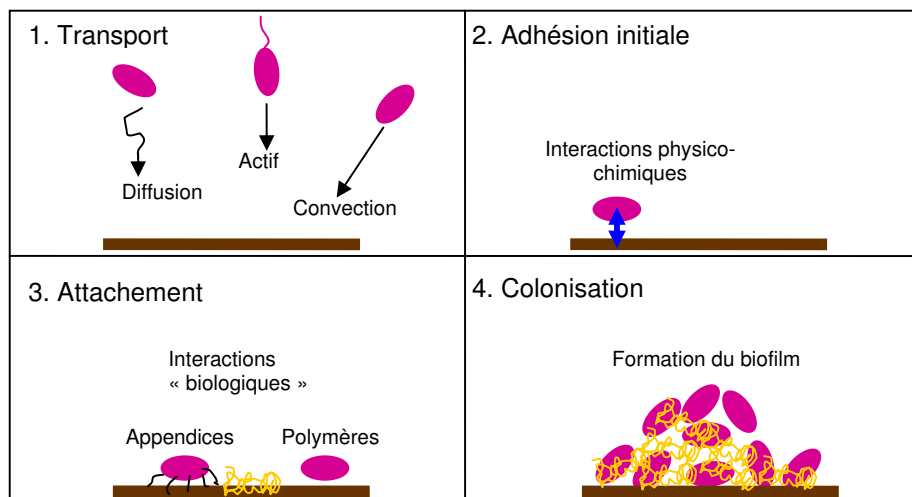
L'approche générale pour prédire le transport microbien en milieu poreux requiert de comprendre l'immobilisation des cellules bactériennes. Deux mécanismes principaux sont responsables de l'immobilisation des bactéries dans un milieu poreux : l'adsorption et la filtration. Les forces hydrodynamiques, parfois négligées, influent également sur le déplacement des bactéries en milieux poreux.

### 1. Adhésion bactérienne

L'étude de l'adhésion bactérienne est devenu un enjeu crucial depuis que de nombreuses observations ont montré que 99,9% des bactéries vivent attachées à une surface (Costerton *et al.* 1995). Les communautés bactériennes attachées à une surface sont appelées biofilms. En 1995, Costerton *et al.* ont soutenu que les biofilms pouvait adhérer à des surfaces et les uns aux autres, incluant dans cette définition les populations adhérentes dans les milieux poreux (Costerton *et al.* 1995). Tout comme pour les biofilms il est essentiel de comprendre ces phénomènes d'adhésion dans un milieu poreux qui peuvent ralentir les cellules dans leur progression à travers un sol. Etudier l'adhérence de cellules bactériennes en milieux poreux revient à étudier les étapes initiales du développement d'un biofilm.

#### 1.1. Les étapes de l'adhésion bactérienne

La formation d'un biofilm à lieu en 4 étapes (figure1) (van Loosdrecht *et al.* 1990):  
(i) Accès à la surface : dépend du mode de transport qui permet à une cellule bactérienne d'atteindre la surface. Ce mode de transport peut être par diffusion (mouvement Brownien ou sédimentation), par convection (flux du liquide) ou actif si la cellule dispose de moyens de propulsion. Dans ce dernier cas le chimiotactisme



**Figure 1 :** Représentation schématique des 4 étapes de la colonisation d'une surface par des microorganismes.

Inspiré de Van Loosdrecht *et al.* (1990)

joue également un rôle. (ii) Adhésion initiale : procédé essentiellement physico-chimique qui peut être réversible. (iii) Attachement : grâce à des appendices cellulaires (fibrilles, polymères...) qui forment des liaisons fortes entre la cellule et la surface, liaisons qui peuvent être irréversibles (iv) Colonisation de la surface : il s'agit de la formation du biofilm proprement dit. Dans cette étude on s'intéressera exclusivement aux 3 premières étapes car elles jouent un rôle déterminant pour le transport bactérien en milieux poreux.

#### 1.1.1. Etape 1 : le transport

Avant d'adhérer la cellule doit être transportée vers la surface et plusieurs mécanismes permettent le déplacement bactérien dans un sol pour augmenter les opportunités de contact (Marshall 1986) : (i) Les particules colloïdales sont animées de mouvements aléatoires causées par le mouvement brownien. Les bactéries, qui peuvent être assimilées à des particules colloïdales, présentent un mouvement brownien non négligeable ( $40\mu\text{m}\cdot\text{h}^{-1}$  en moyenne (Marshall 1976)) visible sous microscope. Le phénomène du mouvement brownien contribue à augmenter les opportunités de contact entre particules solides du sol et cellules bactériennes (Marshall 1976; Marshall 1986). (ii) Les mouvements de diffusion/sédimentation sont lents par rapport aux vitesses d'écoulement de l'eau du sol. Les forces de cisaillements créées par l'écoulement peuvent faciliter le rapprochement de la cellule vers une surface du sol (pour l'adsorption) (Rijnaarts 1993) ou au contraire arracher la cellule adsorbée (McClaine et Ford 2002). (iii) Enfin certaines bactéries ont leur propre mobilité grâce à la présence appendices spécifiques (flagelles...) (Becker *et al.* 2004; Camesano et Logan 1998; McCaulou 1995; McClaine et Ford 2002) et peuvent répondre à des stimuli chimiotactique (Olson *et al.* 2004). L'ensemble de ces phénomènes contribue à la mobilité des bactéries dans un milieu poreux et influent en conséquence sur leur déplacement dans un sol.

#### 1.1.2. Etape 2 : adhésion initiale

L'adhésion résulte d'interactions physicochimiques entre la cellule et la phase solide. (Absolom *et al.* 1983). Un nombre croissant de publications suggère que la rétention des cellules microbiennes est fortement influencé par des caractéristiques de la paroi des

cellules (Gannon 1991). Dans les années 80 plusieurs études établissent un rapport entre les propriétés physico-chimiques de la surface cellulaire, l'énergie libre d'interaction et le phénomène d'adhésion cellulaire (Busscher 1984; van Loosdrecht 1989). Dans ce cas l'adhésion serait gouvernée par l'équilibre des énergies libres d'interaction entre les systèmes bactérie/solide, bactérie/liquide et liquide/solide. On parle aussi d'interactions à « longue distance » car la distance qui sépare la cellule de la surface est alors supérieure à 1nm (van Loosdrecht 1989). Marshall *et al.* suggéraient que les effets de la concentration en électrolyte sur la phase initiale réversible pouvaient être expliqués par la théorie de stabilité colloïdale DeJarguin-Landau-Verwey-Overbeek (DLVO) (Marshall 1976; Marshall 1971). Plus tard les interactions Lewis acide-base sont intégrées à la théorie DLVO (van Oss 1989) (van Oss 2003). Par la suite la théorie DLVO sera fréquemment utilisée pour tenter d'expliquer l'adhésion initiale des bactéries sur une surface.

### 1.1.3. Etape 3 : l'attachement

La phase d'attachement est d'ordre biologique avec l'implication d'appendices cellulaires (Vidal *et al.* 1998) (pilis, curlis..) et/ou la production de biopolymères (exopolysaccharides...) faisant office de colle. Lorsque les macromolécules de surface ont une affinité pour la surface un pontage peut se former ce qui a pour effet d'ancrer la bactérie à la surface. Dans ce cas la notion de sorption irréversible est employée bien qu'il s'agisse d'un abus de langage. La désorption reste possible mais est beaucoup plus difficile comparée à la sorption réversible. A noter que certains composants extracellulaires au contraire empêchent l'adhésion à cause d'interactions stériques répulsives (Liu *et al.* 2007; Rijnaarts *et al.* 1999; van Loosdrecht *et al.* 1990). La phase d'attachement concerne donc seulement les interactions stériques attractives (ou interactions de « pontage »).

## 1.2. L'approche physicochimique

### 1.2.1. La théorie DLVO

La théorie DLVO de la stabilité colloïdale a été développée par Derjaguin et Landau en 1941 et par Verwey et Overbeek en 1948 et stipule que les interactions entre particules colloïdales dépendent de l'énergie d'interaction totale entre celles-ci. Cette énergie d'interaction a plusieurs sources. La théorie développée par Derjaguin et Landau et par Verwey et Overbeek considère les interactions de type Lifshitz-van der Waals et les interactions électrostatiques. L'énergie libre d'interaction totale entre une cellule et une surface solide ( $\Delta G^{\text{TOT}}$ ) est la somme des interactions de type Lifshitz-van der Waals ( $\Delta G^{\text{LW}}$ ) et des interactions électrostatiques ( $\Delta G^{\text{EL}}$ ):

$$\Delta G^{\text{TOT}} = \Delta G^{\text{LW}} + \Delta G^{\text{EL}} \quad [1]$$

$\Delta G^{\text{TOT}}$  est exprimée en ( $\text{J} \cdot \text{m}^{-2}$ ).

Les forces Lifshitz-van der Waals sont généralement attractives et résultent d'un moment dipolaire créé par la rotation des électrons autour du noyau. Elles permettent des liaisons faibles entre atomes. Pour un système plan – sphère que l'on peut utiliser pour représenter les interactions entre une bactérie et la phase solide du sol on a une énergie d'interaction qui est de la forme :

$$\Delta G_{bs}^{\text{LW}}(y) = \frac{AR}{6y} \quad [2]$$

Dans cette expression,  $A$  est la constante de Hamaker,  $R$  est le rayon hydrodynamique effectif de la bactérie et  $y$  la distance de la bactérie au solide. Dans tout ce qui suit, les indices  $_{b,w,s}$  indiquent que la constante est celle de la bactérie, de l'eau et du solide, respectivement. On a donc une décroissance en  $1/y$  des interactions. Le rayon hydrodynamique effectif de la bactérie peut être obtenu par des expériences de diffusion des microorganismes. Meinders (1995) donne des valeurs pour diverses bactéries. La constante de Hamaker peut être obtenue à partir des mesures d'angle de contact entre un

lit de bactérie et un liquide (cf. § 1.2.3) Dans cette configuration (plan – plan) on a la relation :

$$\Delta G_{bs}^{LW}(y) = \frac{A}{12\pi y^2} \quad [3]$$

Si on note  $\Delta G_{y_0}^{LW}$  l'énergie d'adhésion obtenue à la distance  $y_0$  dite « distance de contact », la valeur de 1.57 Angström est généralement utilisée pour  $y_0$ , on en déduit la constante de Hamaker :

$$A = 12\pi y_0^2 \Delta G_{y_0}^{LW} \quad [4]$$

L'énergie libre d'interaction  $\Delta G_{y_0}^{LW}$  est reliée aux composantes Lifshitz-van der Waals des tensions de surfaces du solvant, de la bactérie et du solide par la relation :

$$\Delta G_{y_0}^{LW} = -2 \left( \sqrt{\gamma_w^{LW}} - \sqrt{\gamma_s^{LW}} \right) \left( \sqrt{\gamma_w^{LW}} - \sqrt{\gamma_b^{LW}} \right) \quad [5]$$

On voit donc que si les termes  $\left( \sqrt{\gamma_w^{LW}} - \sqrt{\gamma_s^{LW}} \right)$  et  $\left( \sqrt{\gamma_w^{LW}} - \sqrt{\gamma_b^{LW}} \right)$  sont de même signe, la constante d'Hamaker sera négative, ce qui donnera une énergie d'interaction liée aux forces Lifshitz-van der Waals négative. En utilisant cette expression de la constante de Hamaker dans l'équation pour l'interaction sphère – plan on obtient :

$$\Delta G_{swb}^{LW}(y) = 2\pi \Delta G_{y_0}^{LW} \frac{y_0^2 R}{y} \quad [6]$$

Dans cette expression,  $2\pi y_0 R$  représente la surface par laquelle se font les interactions entre la bactérie et le solide. L'énergie libre  $\Delta G_{swb}^{LW}(y)$  entre une cellule et le solide s'exprime donc en Joules.

Les forces électrostatiques sont définies par les interactions de Coulomb entre entités chargées. Elles peuvent être répulsives et attractives selon le signe des charges portées par les surfaces en présence. Les surfaces naturelles sont souvent chargées négativement

mais des charges positives existent (oxydes métalliques par exemple). Les bactéries étant généralement chargées négativement, on peut donc avoir des répulsions électrostatique aussi bien que des attractions entre le solide et la surface cellulaire (Marshall 1986).

Les interactions électrostatiques entre une bactérie et la phase solide dans une phase aqueuse peuvent être décrites par :

$$\Delta G_{swb}^{EL}(y) = \pi R \epsilon_r \epsilon_0 \left( 2\psi_b \psi_s \ln \left( \frac{1 + e^{-ky}}{1 - e^{-ky}} \right) + (\psi_b^2 + \psi_s^2) \ln(1 - e^{-2ky}) \right) [7]$$

avec  $y$  la distance entre la bactérie et le solide,  $\epsilon_r \epsilon_0$  la permittivité diélectrique du liquide,  $\psi_{b,s}$  les potentiels à la surface de la bactérie et du solide et  $k$  la longueur de Debye-Hückel qui est calculée à partir de la composition de la solution du sol.

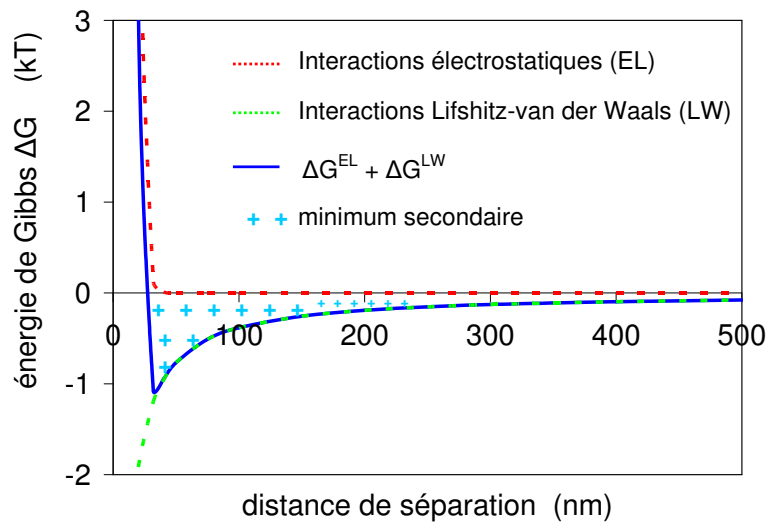
Dans l'équation, les longueurs sont en mètres, les potentiels sont en volts (V) et la permittivité diélectrique du vide est en  $C.V^{-1}.m^{-1}$ . On a donc pour les dimensions un résultat qui est en :  $m.C.V^{-1}.m^{-1}.V^2 = C.V=J$ . L'énergie libre d'interaction électrostatique entre une cellule et le solide s'exprime donc en Joules.  $\Delta G_{swb}^{EL}(y)$  et  $\Delta G_{swb}^{LW}(y)$  sont souvent exprimées en « kT » en divisant les Joules par le produit  $kT$  où  $k$  est la constante de Boltzman (J/K) et  $T$  est la température (K). A 25C, le produit  $kT$  vaut  $4.11 \cdot 10^{-21}$ .

Les potentiels  $\psi_{s,b}$  à la surface du solide et de la bactérie sont calculés à partir de l'équation suivante faisant intervenir le potentiel  $\zeta$  obtenu à partir d'expériences de mobilité électrophorétique:

$$\psi_{s,b} = \zeta_{s,b} (1 + z/R) e^{kz} [8]$$

Dans cette expression,  $z$  est la distance entre le plan de glissement et la surface du colloïde,  $R$  le rayon du colloïde et  $k$  la longueur de Debye-Hückel.





**Figure 2 :** Energie libre d'interactions entre une surface plane et une particule sphérique.

Toutes les deux sont chargées négativement en fonction de la distance résultant de l'addition des forces LW et EL (théorie DLVO)

L'importance des interactions électrostatiques est très dépendante de la présence d'ions dans le milieu (van Loosdrecht 1989) (force ionique et espèce) ce qui n'est pas le cas des forces de Lifshitz-van der Waals. L'énergie d'interaction de Gibbs entre une surface plane et un colloïde sphérique en fonction de la distance de séparation est illustrée dans la figure 2 dans le cas où le colloïde et la surface ont des charges de même signe et présentent aussi des interactions Lifshitz-van der Waals négatives.

Le colloïde est attiré vers la surface lorsque  $\Delta G$  est négatif et inversement. Parce que les bactéries et les grains des milieux poreux ont généralement une charge électrique globale de même signe (négatifs)  $\Delta G^{EL}$  est positif et empêche l'adhésion. En revanche les interactions Lifshitz-van der Waals contribuent à la rétention des bactéries près de la surface puisque  $\Delta G^{LW}$  est négatif. Il se forme un puits à quelques dizaines de nanomètres de la surface dont la profondeur diminue au fur et à mesure que la distance de séparation colloïde-surface augmente. Ce puits est appelé minimum secondaire et est responsable de la rétention réversible de colloïdes sur une surface solide.

Van Loosdrecht *et al.* (van Loosdrecht 1989) ont utilisé la théorie pour expliquer l'adhésion de microorganismes sur différentes surfaces. Ainsi l'adhésion de cellules bactérienne à du polystyrène a pu être décrite quantitativement à l'aide de la théorie DLVO. Les auteurs ont estimé une énergie de Gibbs d'adhésion de 2 à 3 kT par cellule. Cette valeur remarquablement faible correspond à une adhésion dans le minimum secondaire comme le décrit la théorie DLVO. C'est dans ce minimum que se produit l'adhésion réversible selon Redman (Redman *et al.* 2004).

### 1.2.2. Théorie DLVO étendue (ou XDLVO)

La théorie DLVO classique se limite aux interactions apolaires de Lifshitz-van der Waals et les interactions électrostatiques entre surfaces immergées dans un liquide. Cependant lorsque ce liquide est polaire (comme l'eau) une autre catégorie



d'interactions non covalentes entre en jeu : les interactions Lewis acide base découvertes par Lewis en 1923. Les interactions Lewis Acide Base (AB) sont responsables de toutes les interactions non électrostatiques, non covalentes et polaires dans l'eau (van Oss 1993). En milieu aqueux les interactions AB peuvent être attractives (attractions hydrophobes) ou répulsives (répulsions hydrophiles). Dans un système totalement hydrophobe les interactions AB sont nulles. Van Oss a largement développé et discuté le rôle des interactions AB en milieux aqueux (van Oss 1993).

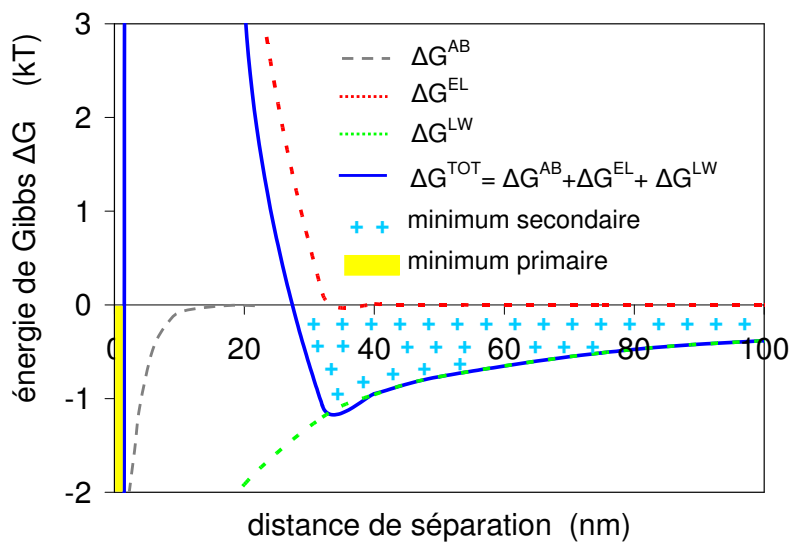
En 1989 van Oss propose une « extension » de la théorie DLVO dans laquelle les interactions hydrophiles/hydrophobes et osmotiques sont prises en compte (van Oss 1989). Les interactions osmotiques sont négligeables dans le cas des cellules si bien que l'énergie d'adhésion totale ( $\Delta G^{\text{TOT}}$ ) peut être exprimée par la formule suivante :

$$\Delta G^{\text{TOT}} = \Delta G^{\text{LW}} + \Delta G^{\text{EL}} + \Delta G^{\text{AB}} \quad [9]$$

$\Delta G^{\text{LW}}$  et  $\Delta G^{\text{EL}}$  correspondent respectivement aux interactions Lifshitz-van der Waals et électrostatiques (voir équation [1]) et  $\Delta G^{\text{AB}}$  aux interactions Lewis acides bases (van Oss 1989). Selon van Oss les interactions AB sont de 10 à 100 fois plus fortes que les interactions LW ( $\Delta G^{\text{LW}}$ ) lorsque des surfaces sont en contact direct (van Oss 1989) A noter que Van Oss considère que les surfaces en interactions ne peuvent pas réellement être en contact «direct» mais ont une distance d'approche minimale qu'il évalue à 0.157nm (van Oss 1994). Tout comme les interactions LW et EL l'intensité des interactions AB diminue lorsque la distance cellule surface augmente (van Oss 1995) :

$$\Delta G_{swb}^{\text{AB}}(y) = 2\pi R y_0 \Delta G_{y_0}^{\text{AB}} e^{(y_0 - y)/\lambda} \quad [10]$$

Comme précédemment,  $R$  est le rayon de la bactérie,  $y_0$  est la distance d'approche minimale,  $y$  est la distance entre la bactérie et le solide et  $\lambda$  est la



**Figure 3 :** Energie libre d'interactions entre une surface plane hydrophobe et une particule sphérique hydrophile.

Toutes les deux sont chargées négativement en fonction de la distance résultant de l'addition des forces AB, LW et EL (théorie XDLVO)

longueur caractéristique d'influence des interactions acide-base. Cette longueur est prise égale à 0.6nm (van Oss 1995). La décroissance exponentielle et la faible valeur de  $\lambda$  font que les interactions acide-base jouent un rôle à très courte distance uniquement. L'énergie libre d'interaction au contact,  $\Delta G_{y_0}^{AB}$  est reliée aux composantes acide-base de la tension de surface du solvant, de la bactérie et du solide selon :

$$\Delta G_{swb}^{AB} = 2\left(\sqrt{\gamma_s^+ \gamma_w^-} + \sqrt{\gamma_b^+ \gamma_w^-} + \sqrt{\gamma_s^- \gamma_w^+} + \sqrt{\gamma_b^- \gamma_w^+} - \sqrt{\gamma_s^+ \gamma_b^-} - \sqrt{\gamma_s^- \gamma_b^+} - 2\sqrt{\gamma_w^+ \gamma_w^-}\right) [11]$$

Dans cette expression,  $\gamma^+$  indique la composante accepteur d'électron et  $\gamma^-$  la composante donneur.

La figure 3 illustre l'énergie d'interaction entre une surface plane (hydrophobe) et un colloïde sphérique en fonction de la distance de séparation calculée avec la théorie DLVO étendue.

Comme pour la figure 2 un puits d'énergie ( $\Delta G^{\text{TOT}} < 0$ ) se forme à quelque dizaine de nanomètres de la surface résultant de l'addition des répulsions électrostatiques et des attractions dues aux interactions LW (à cette distance les interactions AB sont nulles). Les interactions AB agissent pour des distances de séparation entre colloïdes de quelques nanomètres seulement. Si  $\Delta G^{AB}$  est largement négatif il se forme un autre puits d'énergie appelé «minimum primaire». Lorsqu'une particule est retenue à la surface dans le minimum primaire on parle d'adhésion irréversible à cause du caractère puissant de ces forces hydrophobes. En effet il est important de relativiser les différentes interactions mises en jeu : si l'interaction d'énergie libre au minimum secondaire ne mesure que quelque kT, l'énergie d'interaction de la barrière électrostatique et le minimum primaire peuvent atteindre plusieurs milliers de kT. Cela plaide pour attribuer un caractère réversible au minimum secondaire et un caractère irréversible au minimum primaire.



Meinders *et al.* ont comparé la théorie DLVO classique avec la théorie DLVO étendue pour l'adhésion de 3 souches bactériennes sur 3 surfaces différentes (Meinders *et al.* 1995). Selon les auteurs la théorie DLVO classique ne prédisait pas d'adhésion des bactéries sur une surface hydrophobe (le FEP ou fluoroéthylènepropylène) alors que la théorie DLVO étendue prédisait au contraire une adhésion très forte à cette surface. Les expériences ont montré qu'il y avait bien une adhésion de bactéries sur le FEP. La prise en compte des interactions hydrophobes dans la théorie XDLVO a donc permis une meilleure évaluation de l'adhésion bactérienne sur des surfaces hydrophobes. Les auteurs concluent que les interactions acides bases sont nécessaires dans la théorie DLVO. Enfin, Meinders *et al.* affirment que l'adhésion bactérienne initiale peut être expliquée en termes de propriétés physicochimique de surface et qu'elle est gouvernée par l'existence d'un minimum secondaire réversible (Meinders *et al.* 1995).

### 1.2.3. Applications

#### A. Méthode de détermination des interactions LW et AB

La tension superficielle (aussi appelé énergie d'interface ou énergie de surface) est la tension qui existe à la surface de séparation de deux milieux ou composés. La composante apolaire  $\gamma_{12}^{LW}$  et la composante polaire  $\gamma_{12}^{AB}$  de la tension superficielle entre deux matériaux 1 et 2 s'écrivent respectivement:

$$\gamma_{12}^{LW} = \left( \sqrt{\gamma_1^{LW}} - \sqrt{\gamma_2^{LW}} \right)^2 \quad [12]$$

$$\gamma_{12}^{AB} = 2 \left( \sqrt{\gamma_1^+} - \sqrt{\gamma_2^+} \right) \left( \sqrt{\gamma_1^-} - \sqrt{\gamma_2^-} \right) \quad [13]$$

Avec  $\gamma_{1,2}^{LW}$  ( $\text{mJ.m}^{-2}$ ) la composante Lifshitz-van der Waals de la tension de surface pour les matériaux 1 et 2 respectivement.  $\gamma_{1,2}^+$  et  $\gamma_{1,2}^-$  ( $\text{mJ.m}^{-2}$ ) sont les composantes accepteurs/donneur d'électrons de la tension de surface des matériaux 1 et 2. Les composantes de l'énergie de surface  $\gamma^{LW}$  et  $\gamma^{AB}$  peuvent être obtenues à partir de mesures d'angles de contact selon la méthode décrite par Grasso *et al.* (Grasso *et al.* 1995)



Liquides	$\gamma^{LW}$ (mJ.m <sup>-2</sup> )	$\gamma^{AB}$ (mJ.m <sup>-2</sup> )	$\gamma^+$ (mJ.m <sup>-2</sup> )	$\gamma^-$ (mJ.m <sup>-2</sup> )
Eau	21.8	51.0	25.5	25.5
Formamide	39.0	19.0	39.6	2.3
1-bromonaphtalène	44.4	0	0	0
Chloroforme	27.2	3.8	3.8	0
Hexadécane	27.2	0	0	0
Décane	23.9	0	0	0
Ethyl acétate	23.9	19.4	0	19.4

**Tableau 1 :** Composantes Lifshitz (LW) , acide – base(AB) de la tension de surface et paramètres donateurs ( $\gamma^-$ ) et accepteurs ( $\gamma^+$ ) d'électrons de plusieurs liquides utilisés habituellement pour réaliser des mesures d'angles de contact.

L'équation de Dupré-Young relie l'angle de contact formé par une goutte de liquide déposé sur une surface plane (voir annexe 2 page 253) à la tension superficielle entre un liquide et un solide (van Oss 1994) :

$$(1 + \cos \theta) \gamma_L = 2 \left( \sqrt{\gamma_S^{LW} \gamma_L^{LW}} + \sqrt{\gamma_S^+ \gamma_L^-} + \sqrt{\gamma_S^- \gamma_L^+} \right) \quad [14]$$

$\gamma_L$  est la tension de surface du liquide ( $\text{mJ.m}^{-2}$ ) utilisé pour les mesures de l'angle de contact  $\theta$ . La tension de surface  $\gamma_L$  est reliée aux composantes Lifshitz-van der Waals et Lewis acide-base par la formule suivante :

$$\gamma_L = \gamma_L^{LW} + 2\sqrt{\gamma_L^- \gamma_L^+} \quad [15]$$

Le tableau 1 donne quelques exemples de composantes  $\gamma_L^{LW}$  et  $\gamma_L^{AB}$  ainsi que les paramètres donneur ( $\gamma_L^-$ ) et accepteur d'électrons ( $\gamma_L^+$ ) de 4 liquides habituellement utilisés pour les mesures d'angles de contact. A noter que pour des composés totalement hydrophobes les paramètres  $\gamma^-$  et  $\gamma^+$  sont nuls.

Les paramètres  $\gamma_B^{LW}$ ,  $\gamma_B^+$  et  $\gamma_B^-$  caractéristiques de la cellule peuvent être déterminés par le calcul, si on dispose de trois mesures d'angles de contact avec trois liquides différents (tableau 1). A noter que plusieurs travaux ont montré que  $\gamma_B^{LW}$  est environ égal à  $40\text{mJ/m}^2$  pour de nombreuses bactéries (van der Mei *et al.* 1998; van Oss 1994). De plus, cette composante de la tension de surface ne varie pas significativement de l'état logarithmique à l'état stationnaire et à l'état de dégénérescence de la culture bactérienne comme le montre plusieurs travaux (Chen et Strevett 2001; Grasso 1996; Strevett et Chen 2003). De même la littérature suggère que la grande majorité des cellules bactérienne présente une surface mono polaire négative ( $\gamma^-$  dix fois plus important que  $\gamma^+$ ) et hydrophile (van der Mei *et al.* 1998; van Oss 1994). De nombreux auteurs ont trouvé une bonne corrélation entre mesures d'angles de contact et adhésion bactérienne et ont appliqué ce concept à leurs travaux (Absolom *et al.* 1983; Busscher *et al.* 1984; Norde 1989).



### B. Détermination de l'hydrophobicité

Ayant déterminé les composantes de la tension de surface, l'hydrophilicité ou l'hydrophobicité d'une surface microbienne peut être estimée en calculant, l'énergie libre totale d'interaction  $\Delta G_{bwb}^{TOT}$  entre cellules microbiennes immergées dans l'eau.  $\Delta G_{bwb}^{TOT}$  est la somme de  $\Delta G_{bwb}^{LW}$ , interactions Lifshitz-van der Waals et  $\Delta G_{bwb}^{AB}$ , interactions acides bases (van Oss 1994). Les énergies d'interaction Lifchitz et Lewis sont données par :

$$\Delta G_{bwb}^{LW} = -2\left(\sqrt{\gamma_w^{LW}} - \sqrt{\gamma_b^{LW}}\right)^2 \quad [16],$$

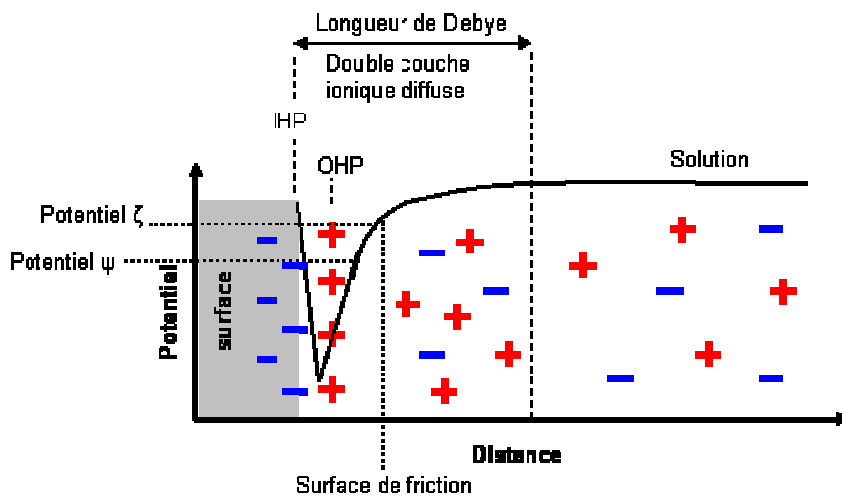
$$\Delta G_{bwb}^{AB} = -4\left(\sqrt{\gamma_b^+} - \sqrt{\gamma_w^-}\right)\left(\sqrt{\gamma_{b1}^-} - \sqrt{\gamma_w^+}\right) \quad [17]$$

Selon van Oss (van Oss 1994), une surface microbienne est hydrophile si  $\Delta G_{bwb}^{TOT}$  est supérieur à zéro et hydrophobe si  $\Delta G_{bwb}^{TOT}$  est inférieur à zéro. Le degré d'hydrophilicité ou d'hydrophobicité peut être estimé à partir de la valeur absolue de  $\Delta G_{131}^{TOT}$ . Ainsi van der Mei et ses collègues ont déterminé l'hydrophobicité de la surface cellulaire de plusieurs souches microbiennes à partir d'angles de contact (van der Mei *et al.* 1998). Leurs résultats indiquent que la majorité des microorganismes sont hydrophiles, mais surtout que les surfaces cellulaires ont un fort caractère donneur d'électrons et très peu accepteur d'électrons.

### c. Interactions cellule/surface selon la théorie XDLVO

L'adhésion de cellule bactériennes à une surface solide peut être évaluée en utilisant  $\Delta G_{bws}^{TOT}$ , l'énergie libre totale des interactions entre la surface des cellules bactériennes, la surface des particules constituant le milieu poreux et l'eau (van Oss 1994) calculée comme indiquée précédemment à la distance de d'approche minimum. (Equations 6, 7, 9 et 10)

Au début des années 2000 Chen et Strevett ont publié une série d'articles montrant une bonne corrélation entre les paramètres de rétention des cellules dans



**Figure 4 :** Illustration schématique de la double couche électrique à la surface d'un solide chargé négativement.

un milieu poreux et les énergies d'interaction prédites par la théorie XDLVO (Chen *et al.* 2003; Chen et Strevett 2001; Chen et Strevett 2002; Chen et Strevett 2003; Chen et Strevett 2003; Chen et Strevett 2003). Les auteurs ont constatés une proportionnalité entre attachement microbien sur différents supports poreux et les valeurs de  $\Delta G_{bws}^{TOT}$ . D'après les travaux de Chen et Strevett  $\Delta G_{bws}^{TOT}$  n'est donc pas seulement un indicateur qualitatif pour l'adsorption bactérienne sur une surface mais serait aussi une grandeur pouvant être reliée à des paramètres intervenant dans la modélisation de la rétention. Mais les auteurs soulignent que différentes interactions ont été calculées pour une distance à l'équilibre où les interactions électrostatiques peuvent être négligées (van Loosdrecht 1989). Ces résultats sont en contradiction avec d'autres travaux qui insistent sur l'importance des interactions électrostatiques et leur sensibilité à l'environnement chimique.

#### 1.2.4. Sensibilité des interactions électrostatiques à l'environnement

##### *a. La force ionique*

Les interactions électrostatiques de la théorie DLVO sont très sensibles à la force ionique et aux espèces ioniques de l'environnement. Cela est du à la longueur de Debye, (ou double couche électronique aussi appelé double couche ionique diffuse) dont l'épaisseur dépend de la quantité et de la qualité des ions présents dans la solution. En effet la longueur de Debye intervient dans les équations [7] et [8] pour calculer le potentiel de surface et  $\Delta G^{EL}$ . Le potentiel  $\zeta$  des particules ou des surfaces immergées dans un liquide contenant des ions dissous est le potentiel mesuré à la surface de friction de la couche limite par des méthodes telles que l'électrophorèse ou le potentiel d'écoulement. La figure 4 illustre la double couche ionique diffuse ainsi que la surface de friction. (Pour une surface solide dont la charge globale est négative) Les cations attirés vers les charges négatives de la surface solide pour assurer la neutralité électrique sont appelés cations compensateurs. On appelle IHP (Inner Helmholtz Plane) le lieu défini par les charges négatives à la surface du solide et OHP (Outer Helmholtz plane) le plan défini par les cations compensateurs. On trouve aussi pour la région définie par ces

Solution	Force ionique (mol.l <sup>-1</sup> )	1/k en nm
H <sub>2</sub> O	0	1000
NaCl	10 <sup>-5</sup>	100
NaCl	10 <sup>-3</sup>	10
NaCl	10 <sup>-1</sup>	1
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	10 <sup>-5</sup>	56
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	10 <sup>-3</sup>	5,6
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	10 <sup>-1</sup>	0,56
MgSO <sub>4</sub>	10 <sup>-5</sup>	48
MgSO <sub>4</sub>	10 <sup>-3</sup>	4,8
MgSO <sub>4</sub>	10 <sup>-1</sup>	0,48

Par Gouy (1910) et Henry (1931) publié dans (van Oss 1994)

**Tableau 2 :** Exemples de longueurs de Debye en fonction de différentes forces ioniques et espèces chimiques.

deux plans le terme de couche de Stern. Au-delà de la couche de Stern ou, ce qui est équivalent, au de la du OHP, on trouve une couche avec des cations mobiles, qui constitue la couche diffuse. La couche de Stern et la couche diffuse constituent la double couche du colloïde. L'épaisseur de la double couche ou longueur de Debye est calculée avec l'équation suivante :

$$1/\kappa = \left[ (\epsilon k T) / (4\pi e^2 \sum v_i^2 n_i) \right]^{1/2} \quad [18]$$

$\epsilon$  étant la constante diélectrique du milieu liquide (pour l'eau  $\epsilon = 80$ ),  $k$  la constante de Boltzmann ( $k = 1,38 \cdot 10^{-23} \text{ J.K}^{-1}$ ),  $T$  la température absolue en degrés Kelvin,  $e$  la charge de l'électron ( $e = -1,6 \cdot 10^{-19} \text{ C}$ ),  $v_i$  la valence de chaque espèce ionique et  $n_i$  le nombre d'ions de chaque espèce par  $\text{cm}^3$  de liquide.

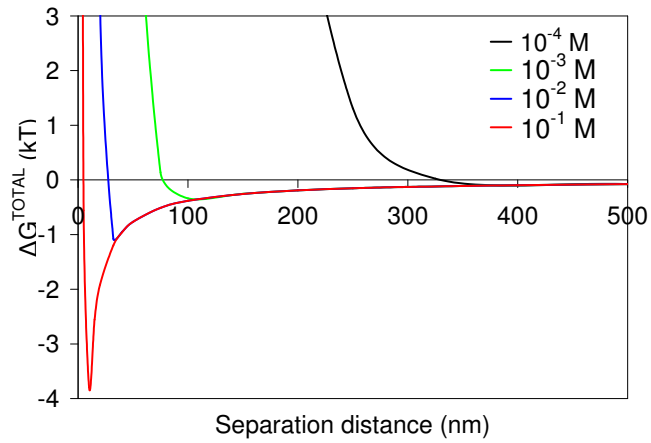
Par conséquent, d'après l'équation [18], toute augmentation de la force ionique s'accompagne d'une diminution de l'épaisseur de la double couche diffuse et de la longueur de Debye. De même la longueur de Debye est diminuée par des ions de valence élevée. Le tableau 2 illustre la valeur de Debye pour quelques solutions d'électrolytes aqueux. D'après l'équation [7], une diminution de la longueur de Debye va se traduire par une atténuation plus rapide de l'influence du potentiel de surface et donc une possibilité d'approche accrue pour les colloïdes vers les surfaces.

Plusieurs articles montre la relation entre force ionique, forces électrostatiques et adhésion cellulaire sur différentes surfaces (Li et Logan 2004; Rijnaarts *et al.* 1999; van Loosdrecht 1989). Selon la conclusion de ces études l'augmentation de la force ionique inhibe les répulsions électrostatiques augmentant ainsi l'adhésion et inversement (Rijnaarts 1995). La relation entre force ionique, interactions électrostatiques et transport microbien en milieux poreux a également été étudiée (Choi *et al.* 2007; Johnson *et al.* 1996; Li et Logan 1999; Redman *et al.* 2004; Rijnaarts *et al.* 1999). Ces publications mettent en évidence l'importance du rôle des électrolytes sur l'adhésion et par conséquent le déplacement de cellules bactériennes à travers une matrice poreuse.





Récemment Choi *et al.* ont étudié le transport de *Pseudomonas aeruginosa* à travers des colonnes de sable (Choi *et al.* 2007). Différentes conditions de force ionique (KCl) et de vitesse de Darcy (vitesse de la solution dans les pores) ont été testées. Pour une même vitesse de Darcy, l'augmentation de la force ionique résultait en une forte diminution du nombre de cellules récupérées en sortie de colonne : à 0mM 85% des cellules ont traversé le sable alors qu'à 0,56mM et 1,13mM seulement 56% et 16% des cellules ont été récupérées respectivement. Les auteurs en concluent que la longueur de Debye, fortement réduite par la molarité élevée de la solution, a réduit les répulsions électrostatiques entre les cellules de *P. aeruginosa* et les grains de sables (tous les deux chargés négativement). Dans de telles conditions l'environnement est favorable à l'adhésion des cellules sur la matrice de sable empêchant ainsi leur transport. Lorsque la molarité de la solution est nulle la double couche électronique est très épaisse ce qui se traduit par de fortes répulsions électrostatiques entre les bactéries et le sable créant ainsi des conditions défavorable pour l'adhésion. Dans de telles conditions le transport bactérien en milieu poreux est favorisé. En théorie, en considérant que les répulsions électrostatiques empêchent toute interaction entre les cellules et le sable, 100% des bactéries devraient être récupérées à la sortie de la colonne. Or 15% des cellules ont été retenue par la matrice de sable. En réalisant des observations au microscope à balayage électronique Choi *et al.* notent la présence de cellules dans les crevasses microscopiques de la surface des grains de sable. Ils en concluent donc qu'en présence de répulsions électrostatiques le piégeage physique des cellules dans le sable est responsable des 15% de bactéries qui n'ont pas été transportées (Choi *et al.* 2007). Cependant ce mécanisme, vérifié par des observations au microscope, n'est seul responsable de la rétention que dans des solutions de forces ioniques très faibles (0mM dans le cas de l'article de Choi *et al.*). En effet Redman *et al.* ont mis en évidence un autre facteur responsable de la rétention d'*Escherichia coli* dans une matrice de sable : le minimum secondaire (Redman *et al.* 2004).



**Figure 5 :** Energie libre d'interactions entre une surface plane et une particule sphérique.

Toutes les deux sont chargées négativement en fonction de la distance et de la force ionique résultant de l'addition des forces LW et EL (théorie DLVO).

*b. Le rôle du minimum secondaire et force ionique*

Redman *et al.* constatent le transport seulement partiel d'*E. coli* à travers une colonne de sable malgré la présence de la barrière électrostatique (Redman *et al.* 2004). Ils suggèrent que les cellules qui n'ont pas été transportées sont retenues dans le minimum secondaire. Pour vérifier cette hypothèse ils diminuent la force ionique du milieu pour éliminer le minimum secondaire. Les interactions de Lifshitz-van der Waals n'étant pas influencées par la composition et la concentration de la solution, les interactions électrostatiques peuvent devenir prépondérantes lorsque la force ionique est inférieure à  $10^{-3}\text{M}$ , jusqu'à éliminer le minimum secondaire (figure 5).

Redman *et al.* constatent alors qu'en diminuant la force ionique l'ensemble des bactéries retenue dans le sable sortent de la colonne. Ils en déduisent que ces bactéries étaient retenues dans le minimum secondaire éliminé par la diminution de la force ionique. Tong et Johnson ont obtenu des résultats similaires avec des microsphères (Tong et Johnson 2006)

*c. L'effet du pH de la solution sur les interactions électrostatiques*

L'adhésion bactérienne est sensible au changement de pH du milieu (Hamadi *et al.* 2005). La plupart des études montrent une meilleure adhésion lorsque le pH de la suspension bactérienne est proche du point isoélectrique (PIE) (Webb *et al.* 1999). Le PIE est la valeur du pH pour laquelle la charge électrique nette d'une surface est nulle. Rijnaarts *et al.* ont utilisé le PIE des bactéries comme un indicateur de présence de polymères à la surface cellulaire qui inhibent l'adhésion (Rijnaarts *et al.* 1995). Leurs résultats montrent aussi que le PIE des bactéries est généralement inférieur à 3. Van der Wal *et al.* ont montré que les groupements anioniques à la surface des cellules bactériennes dominent les groupements cationiques (van der Wal *et al.* 1997). Cela explique pourquoi lorsque le pH augmente (i) le potentiel  $\zeta$  des bactéries diminue (ii) le PIE des bactéries se situe généralement en pH très acide. Or dans bien des cas, le transport bactérien concerne des environnements avec des pH proches de la neutralité (entre 6 et 8) valeurs bien supérieures au PIE des bactéries. Si on fait exception des

environnements extrêmes, la charge électrique nette d'une cellule bactérienne dans un sol est donc généralement négative.

### 1.3. DLVO en microbiologie: critiques et limites

Plusieurs études ont montré des écarts entre l'adhésion bactérienne prédite par la théorie XDLVO et les données expérimentales (Dong *et al.* 2002; Li et Logan 2004). La principale limite de la théorie XDLVO est que les particules en interactions sont considérées solides, parfaitement sphériques ou planes et qu'elles n'évoluent pas au cours du temps. Les bactéries ne sont pas des particules colloïdales inertes mais plutôt un « système colloïdal vivant ». Les caractéristiques de leurs surfaces cellulaires peuvent changer en fonction de modifications des conditions environnementales et ce point n'est habituellement pas pris en compte. Par exemple l'augmentation du flux de substrat qui détermine la croissance peut modifier l'hydrophobicité de la surface cellulaire (van Loosdrecht *et al.* 1987). De nombreux facteurs physiques (rugosités de la surface, problèmes d'hétérogénéité...) et biologiques (appendices cellulaires, hétérogénéité de la population...) peuvent conduire à des écarts entre la théorie et la réalité. Il est également important de garder à l'esprit que les interactions relatives à la théorie XDLVO se font à l'échelle du nanomètre alors qu'une cellule bactérienne mesure typiquement de l'ordre du micromètre.

#### 1.3.1. Facteurs physiques affectant la théorie DLVO

Récemment plusieurs auteurs ont constaté qu'ignorer les rugosités de surface nanométrique peut conduire à des calculs XDLVO erronés (Bhattacharjee *et al.* 1998; Hoek et Agarwal 2006; Hoek *et al.* 2003). Les rugosités de surface à l'échelle du nanomètre existent quasi systématiquement mais sont ignorées pour des raisons pratiques. Or ce type de rugosité augmente la distance de séparation entre les surfaces en interactions et par conséquent réduit les énergies libres d'interactions (Hoek et Agarwal 2006). Bhattacharjee *et al.* ont montré que l'écart entre le profil d'énergie d'interaction DLVO pour des surfaces rugueuses, et le profil d'énergie d'interaction DLVO pour des

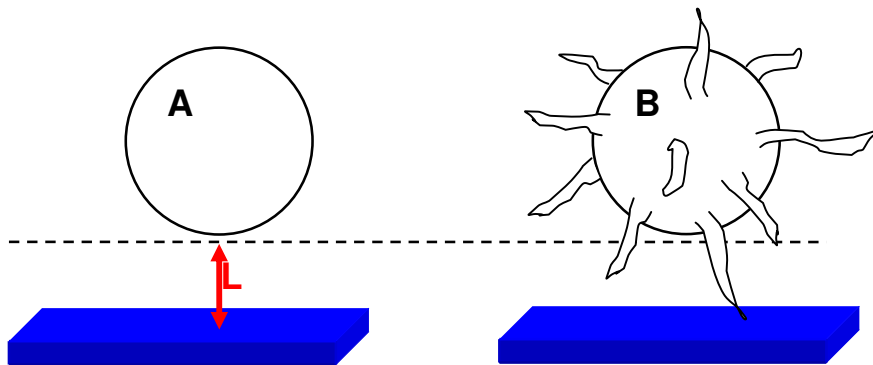
surfaces parfaitement lisse (théorique) est significatif (Bhattacharjee *et al.* 2000; Bhattacharjee *et al.* 1998). L'effet est d'autant plus important lorsque la distance de séparation entre les deux surfaces en interaction diminue (Bhattacharjee *et al.* 1998).

### 1.3.2. Les facteurs chimiques affectant la théorie DLVO

Dans un système idéal les cellules bactériennes tout comme une surface inorganique comme le quartz sont chargés négativement si bien qu'il y a répulsion entre les deux. Cependant des oxydes métalliques chargés positivement peuvent se trouver sur des surfaces inorganiques ce qui augmente considérablement la rétention des bactéries dans un milieu poreux (Johnson *et al.* 1996). La présence d'oxydes métalliques n'est pas révélée par des mesures d'électrophorèse et la charge globale du milieu poreux reste négative. Les aquifères sont également plus complexes que des systèmes idéalisés. Les sols peuvent contenir toutes sortes de métaux ainsi que de la matière organique ce qui rend la prédiction des interactions bactérie – phase solide encore plus difficile. Par exemple Johnson et Logan ont montré que la présence d'oxyde de fer sur le quartz augmente de 160% l'adhésion des bactéries dans une matrice de sable (par rapport à du quartz sans oxyde de fer). Lorsque ils ajoutent de la matière organique dans les colonnes ils constatent que l'effet des oxydes de fer est annulé (Johnson et Logan 1996). La matière organique élimine les charges positives des métaux dans les aquifères et diminue ainsi l'attachement des bactéries (Scholl et Harvey 1992).

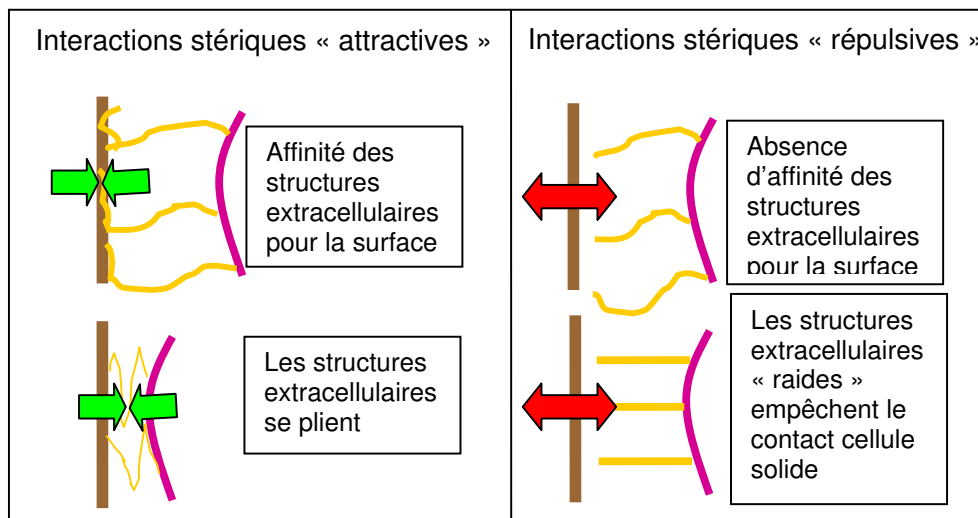
### 1.3.3. Facteurs biologiques affectant la théorie DLVO

Des études précédentes ont montré que le type de cellule bactérienne (Gram plus ou moins), les lipopolysaccharides (LPS), les fimbriæ ou les exopolysaccharides (EPS) peuvent interférer avec les forces de la théorie XDLVO.



**Figure 6 :** Illustration schématique de l'accessibilité à une surface plane d'un colloïde sphérique lisse (A) et d'un colloïde sphérique de diamètre identique mais présentant des excroissances de faible diamètre à sa surface. (Inspiré de Van Oss, 2003).

La ligne en pointillé indique la limite d'approche (L) pour les colloïdes A et B. Le colloïde hydrophile et lisse (A) ne peut pas établir un contact avec la surface hydrophile plane à cause des répulsions hydrophiles qui maintient une distance de séparation L d'environ 4 à 5nm. Il en est de même pour la particule B sauf que les appendices peuvent s'affranchir de la barrière de répulsion (échelle macroscopique) grâce à leurs faibles diamètres et ainsi établir des contacts spécifiques.



**Figure 7 :** Les différents types d'interactions stériques et leurs effets sur l'adhésion d'une cellule bactérienne à une surface

Par exemple, selon Van Oss, le faible diamètre des appendices extracellulaires permet facilement de pénétrer le champ de répulsion et d'établir un contact avec la surface et ainsi ancrer la cellule comme illustré dans la figure 6 (van Oss 2003).

Les structures extracellulaires sont responsables d'interactions stériques qui peuvent aussi bien contribuer à l'adhésion qu'à la prévenir (Rijnaarts *et al.* 1999). Bos *et al.* affirment que les interactions courtes AB sont non opérationnelles car des hétérogénéités structurales et chimiques de surface maintiennent une distance entre les deux surfaces en interactions supérieure au champ d'opération des interactions AB (Bos et Busscher 1999). Il a été postulé que les polymères de surface empêchent les cellules d'atteindre le « minimum primaire » car cela nécessite leur compression et leur repliement entre la bactérie et la surface (Rijnaarts *et al.* 1996). D'autres au contraire affirment que certains polymères favorisent l'adhésion bactérienne grâce à l'adsorption de ces polymères sur la surface solide (Jucker *et al.* 1998). Suivant la rigidité et l'affinité de ces structures extracellulaires pour la surface, l'interaction entre la bactérie et la surface peut être différente (Jucker *et al.* 1997). Dans le cas où les polymères de surface contribuent à l'adhésion de la cellule il est probable que ces polymères ont une forte affinité pour la surface (Rijnaarts *et al.* 1996). Si le polymère a la capacité de se replier la distance de séparation cellule-surface diminue et augmente la capacité d'adhésion cellulaire (Rijnaarts *et al.* 1996). La figure 7 illustre les différents types d'interactions stériques et leurs effets sur l'adhésion bactérienne à une surface.

Tong *et al.* (Tong *et al.* 2005) ont constaté que le transport de leur souche DA001 (*Comamonas* DA001) dans du sable était remarquable et que le taux de rétention était très faible malgré l'absence de barrière électrostatique (le potentiel  $\zeta$  de cette souche varie entre -2mV et -0,5mV en fonction de la force ionique). Des mesures de forces d'interactions entre la souche DA001 et du nitrure de silicium (considéré par les auteurs comme un substitut raisonnable pour la sable) à l'aide d'un microscope à force atomique ont révélé (i) la présence de polymères de surface de 59,8nm d'épaisseur (ii) une faible affinité pour le nitrure de silicium. Les répulsions stériques dues aux polymères de surface sont considérées comme responsables pour la faible affinité de la bactérie pour le



nitru de siliciu. Les auteurs en concluent que les interactions stériques dues à la couche de polymères qui recouvrent la bactérie empêchent l'adhésion sur les grains de sables et favorise donc le transport de cette souche. L'ensemble de ces publications (non exhaustifs) indique clairement l'interférence des polymères de surface avec les interactions XDLVO. La difficulté est liée à la grande diversité des structures extracellulaires impliquées dans les processus d'adhésion bactérienne. Selon Bos *et al.* pour la validité de la théorie DLVO il est nécessaire de prendre en compte la très large panoplie de structures cellulaires de surface (Bos *et al.* 1999). L'influence de la production de polymères à la surface des cellules sur l'adhésion des bactéries en milieu poreux sera développée dans la partie facteurs biologiques (§1.4).

#### 1.3.4. La théorie DLVO remise en cause

En 1998 D.Y. Kwok remet en cause la relation entre interactions LW et AB et les composantes de tensions de surface (Kwok 1999). Selon l'auteur l'approche proposée par Van Oss ne permet pas de prédire correctement les tensions de surface et les tensions interfaciales pour plusieurs systèmes liquide-solide et liquide-liquide. Kwok évoque trois idées communément admises qu'il considère comme fausses : (i) Les composantes de tensions de surface sont des propriétés de matériaux spécifiques et qui se manifestent par des forces intermoléculaires spécifiques. (ii) La connaissance des composantes de tension de surface permet une meilleure compréhension des interactions moléculaires. (iii) Les mesures d'angles de contact donne des informations sur les forces intermoléculaires. Pour un solide donné, l'angle de contact dépend uniquement de la tension de surface du liquide et pas directement des forces intermoléculaires. En remettant en cause la relation entre angle de contact et composantes  $\gamma^+$  et  $\gamma^-$  utilisé dans la théorie XDLVO (voir équation 11) l'article de Kwok met en doute la fiabilité de l'approche de Van Oss (Kwok 1999). Cependant de nombreux articles ont continué à utiliser la théorie XDLVO pour étudier l'adhésion bactérienne longtemps après l'article de Kwok publié en 1998.

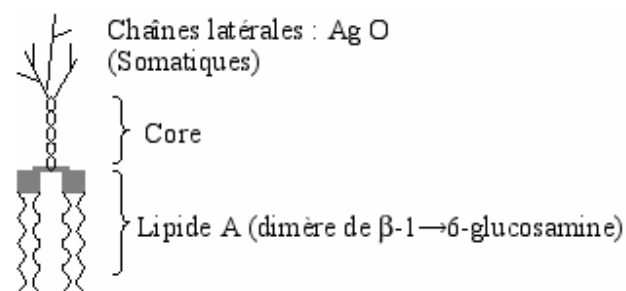
## 1.4. Les facteurs biologiques

La composition chimique d'une surface cellulaire est complexe et évolue au cours du temps. Les membranes peuvent être modifiées en fonction de l'environnement, du stress ou encore de l'apport nutritionnel (Sanin *et al.* 2003). Or les propriétés d'adhésion sont en partie déterminées par les caractéristiques physicochimiques (hydrophobicité, potentiel zêta...) de la membrane cellulaire (van Loosdrecht *et al.* 1987; van Loosdrecht 1990). De plus de nombreuses espèces bactériennes sont capables de produire des composés et/ou des appendices extracellulaires qui peuvent à leur tour modifier les propriétés d'adhésion des cellules (Iwabuchi *et al.* 2003; Zita et Hermansson 1997). A cause de l'implication de ces caractéristiques biologiques des cellules dans la formation de biofilms la littérature est très riche et propose de nombreuses études. En revanche l'influence des facteurs biologiques (polymères de surface, motilité cellulaire et conditions physiologique) sur le transport microbien en milieu poreux a reçu moins d'attention.

### 1.4.1. Polymères de la surface cellulaire

#### *a. Les polymères extracellulaires (ou EPS)*

Les EPS sont composés d'une mixture de macromolécules très diverses telles que des polysaccharides, des protéines ou des composés lipidiques (Nielsen *et al.* 1997). Les EPS sont impliqués dans la formation et le développement de biofilms (Costerton *et al.* 1995). Cependant le rôle exact des EPS dans les phénomènes d'adhésion reste encore mal connu. En effet la composition chimique des EPS est très hétérogène et leur production varie en fonction des souches modifiant ainsi les propriétés d'adhésion (Tsuneda *et al.* 2003). Certaines études mentionnent l'effet positif des EPS sur l'adhésion bactérienne (Costerton 1985; Dufrene *et al.* 1996) tandis que d'autres mentionnent le contraire (Gomez-Suarez *et al.* 2002). Quelques études ont été menées pour comprendre



**Figure 8 :** Illustration d'un lipopolysaccharide

l'influence des EPS sur le transport bactérien en milieu poreux (Liu *et al.* 2007; Tong *et al.* 2005; Tsuneda *et al.* 2003). Les travaux de Liu *et al.* illustrent parfaitement la difficulté de comprendre l'impact des EPS sur les interactions des bactéries avec un milieu poreux (Liu *et al.* 2007). Le transport de trois souches de *Pseudomonas aeruginosa* (PAO1, PAO1 *psl pel* et PDO300) aux capacités de production d'EPS différentes a été étudié sur des colonnes de billes de verre. La souche PAO1 fabrique des EPS riches en carbohydrates tandis que la souche PAO1 *psl pel* produit le même EPS mais en plus faibles quantités. PDO300 fabrique des EPS riches en acides uroniques. Liu *et al.* ont constaté que les souches PAO1 et PDO300 sont mieux retenues en sortie de colonne qu'à l'entrée. Par contre l'adhésion de la souche PAO1 *psl pel* est homogène tout au long de la colonne. Leurs résultats montrent aussi qu'une partie des EPS faiblement attachés à la surface des cellules PAO1 et PDO300 reste collée à la surface des billes de verre en entrée des colonnes (par des phénomènes d'attachement et de détachement). Les auteurs en concluent que les billes de verre ainsi conditionnées par un film d'EPS deviennent moins propice à l'adhésion des cellules ce qui explique pourquoi les souches PAO1 et PDO300 sont moins retenue en entrée de la colonne que plus en aval là où la déposition d'EPS n'a pas eu lieu (Liu *et al.* 2007). Cependant les différences de transport observées pour les trois souches étudiées ne sont pas très importantes.

#### *b. les Lipopolysaccharides (LPS)*

Les lipopolysaccharides sont des macromolécules constituées d'une chaîne polysaccharidique attachée à la membrane cellulaire par une partie lipidique (lipide A). La figure 8 illustre les 3 parties constituant une molécule LPS :

Les chaînes latérales (ou antigène O) sont de nature polysaccharidique et sont spécifiques à chaque souche. Le « core » est également de nature saccharidique. Il y a plus de 3,5 millions de molécules LPS sur la face externe de la membrane des cellules GRAM négatif. Les LPS contribuent à la charge négative de la cellule. L'impact des LPS sur le transport microbien en milieu poreux a été abondamment abordé (Abu-Lail et Camesano 2003; DeFlaun *et al.* 1999; Liu *et al.* 2007; Walker et Redman 2004; Walker *et al.* 2004). DeFlaun *et al.* ont comparé l'adhésion et le transport d'une souche sauvage de

*Burkholderia cepacia* G4 (pseudomonas du sol) avec un mutant ENV435 sur 3 sols différents (DeFlaun *et al.* 1999). Le mutant a été sélectionné sur colonne de sable pour ses caractéristiques de déficience d'adhésion. Les 3 sols utilisés sont le sable et 2 sédiments aquifères dont les compositions en sable, argile et limon sont différents. Les résultats montrent que le transport de la souche sauvage a été sévèrement retardé par rapport au mutant et au traceur à travers les 2 types de sédiments. Une analyse chromatographique d'interaction hydrophobe a révélé que la souche sauvage était significativement plus hydrophobe que le mutant. Puis une électrophorèse sur gel d'acrylamide a révélé des différences importantes au niveau des antigènes O des LPS des deux souches étudiées. Les auteurs soutiennent l'hypothèse que la différence au niveau de ce polymère de surface pourrait expliquer la diminution de l'adhésion du mutant ENV435 par rapport à la souche sauvage. Une simple mutation au niveau de la synthèse des polymères de surface pourrait donc modifier profondément la thermodynamique de la surface cellulaire et par conséquent la vitesse de déplacement de la cellule dans un sol. Cette étude souligne l'importance du rôle joué par certains biopolymères de surface mais aussi leurs complexités. Dans une étude plus récente Liu *et al.* ont montré que le transport à travers du sable de 3 bactéries potentiellement pathogènes était ralenti lorsque les grains de sable étaient enduits d'une couche de LPS (Liu *et al.* 2007).

### *c. Les Pili*

Le pilus (ou fimbriae, pili au pluriel) est un appendice se situant à la surface de la paroi de nombreuses bactéries à Gram négatif (et exceptionnellement des bactéries à Gram positif) et qui peut mesurer jusqu'à 2 $\mu$ m. On en distingue deux types : les pili communs et les pili sexuels. Les pili communs peuvent intervenir dans les phénomènes d'adhésion spécifique notamment avec des récepteurs situés à la surface des cellules eucaryote (Bullitt et Makowski 1998). Le caractère hydrophobe des pili pourrait être à l'origine des propriétés adhésives qu'on leur attribue généralement (Ward 1980). Cependant la littérature ne mentionne aucune étude de l'impact des pili sur le transport microbien en milieu poreux.

#### 1.4.2. Motilité cellulaire et transport bactérien en milieux poreux

Certaines cellules bactériennes possèdent leurs propres moyens de propulsion grâce des appendices extracellulaires appelés flagelles. Ces structures extracellulaires agissent comme des hélices ou des nageoires. Plusieurs études ont été menées pour connaître l'influence de la motilité bactérienne sur leur transport en milieu poreux (Camesano et Logan 1998; Camper *et al.* 1993). Certaines comparaisons entre bactéries motiles et non motiles en chambre à écoulement (flow cell) (McClaine et Ford 2002) ou sur colonnes (Becker *et al.* 2004) montre que le taux d'attachement est plus élevé pour les cellules mobiles alors que d'autres études obtiennent des résultats contraires (Camesano et Logan 1998). Gannon *et al.* n'ont pas constaté d'influence de la motilité des cellules sur le transport bactérien en milieu poreux (Gannon 1991). Le mécanisme par lequel la motilité bactérienne influe sur le déplacement des cellules dans un milieu poreux demeure inconnu mais de nombreuses hypothèses ont été faites. La mobilité bactérienne pourrait par exemple augmenter le taux de collision avec la surface du milieu poreux et donc augmenter les chances d'adhésion de la bactérie (van Loosdrecht 1989). L'énergie cinétique de la motilité pourrait permettre à la bactérie de vaincre la barrière électrostatique répulsive et faciliterait ainsi l'adhésion (van Loosdrecht 1989). Mc Caulou *et al.* affirment le contraire ; la motilité bactérienne augmenterait le taux de désorption grâce à la force de locomotion qui permet à la cellule de se détacher de la surface (McCaulou 1995). Ces auteurs en déduisent que le transfert de bactéries motiles vers des aquifères profond serait significativement accru grâce à leur motilité propre. Enfin, McClaine et Ford suggèrent que le comportement de détachement de bactéries motile est très influencé par la vitesse d'écoulement du fluide (McClaine et Ford 2002). Les flagelles pourrait aider à augmenter l'attachement ou faciliter le détachement des bactéries de la surface selon les forces hydrodynamiques du système (McClaine et Ford 2002). L'ensemble des ces résultats parfois contradictoires pourrait être lié à des conditions expérimentales différentes. En dépit de ces observations parfois opposées il ressort que la motilité bactérienne affecte d'une manière ou d'une autre le transport de bactéries en milieux poreux en modifiant les cinétiques d'attachement et de détachement.

Dans certaines conditions le chimiotactisme peut influencer sur le transport microbien en milieu poreux en modifiant la direction de déplacement des cellules motiles (Sen *et al.* 2005). En effet certaines bactéries motiles peuvent se déplacer vers un environnement plus favorable en réponse à un stimulus. Par exemple ce type de bactéries est capable de se diriger vers une zone où la concentration en nutriments bénéfiques est élevée ou de s'éloigner de substances nuisibles. Olson *et al.* ont montré que le chimiotactisme peut jouer un rôle important dans le déplacement microbien dans les aquifères (Olson *et al.* 2004). Plusieurs auteurs ont intégré le facteur chimiotactisme dans leurs modèles pour prédire le transport microbien dans un profil sol (Barton et Ford 1997; Nelson et Ginn 2001; Sen *et al.* 2005). Barton et Ford n'ont observé aucune différence significative du transport microbien (en colonne de sables) en présence ou absence d'un gradient chimique (Barton et Ford 1995). Cependant les auteurs attribuent cette absence d'effet du chimiotactisme au gradient chimique trop faible utilisé pendant leurs expériences (Barton et Ford 1997).

#### 1.4.3. Etat et condition physiologique

L'état physiologique d'une bactérie peut influencer les caractéristiques physicochimiques de la surface des cellules et par conséquent les propriétés d'adhésion. Par exemple l'hydrophobicité de la cellule peut être modifiée par la phase de croissance et le taux de multiplication cellulaire (McEldowney 1986). Van Loosdrecht *et al.* ont observé que les bactéries deviennent plus hydrophobes pendant la phase de croissance exponentielle (van Loosdrecht *et al.* 1987). La nutrition des cellules peut également modifier les propriétés d'adhésion des cellules (Sanin *et al.* 2003). Chen et Strevet ont mis en évidence l'impact des sources nutritives (ratio de carbone sur azote) sur les propriétés de surface d'une souche d'*E. coli* (Chen et Strevett 2003). Les mêmes auteurs observent par ailleurs que la phase de croissance, la phase stationnaire et la phase de dégénérescence n'ont pas d'effet significatif sur les propriétés de surface (en particulier  $\gamma^{LW}$ ) des souches de *E. coli*, *Pseudomonas fluorescense* et *Bacillus subtilis* (Chen et Strevett 2001). Grasso *et al.* ont fait le même constat (Grasso 1996). Smet *et al.* ont étudié l'impact de l'état physiologique de *P. fluorescense* sur l'adhésion et le transport à travers des colonnes

remplies de billes de verre (Smets *et al.* 1999). Les trois états physiologiques testés ont été définis par phase de croissance, la phase stationnaire et la phase de dégénérescence. Les cellules en phase exponentielle adhèrent mieux sur le verre que les cellules en phase stationnaire ou en dégénérescence. Les auteurs constatent également que les cellules en phase exponentielle sont le plus hydrophiles, en contradiction avec les travaux cités ci-dessus. Ceci est d'autant plus surprenant que cette hydrophilicité augmente les répulsions AB entre le verre et les cellules bactériennes et devrait donc théoriquement diminuer l'adhésion. L'explication pourrait venir du potentiel zêta plus faible des cellules en phase de croissance. En effet les auteurs suggèrent que les cellules en phase exponentielle, du fait de leur faible potentiel zêta, sont vraisemblablement retenues dans un minimum secondaire qui est pour cette phase de croissance plus important que pour les autres états physiologiques.

#### 1.4.4. Densité cellulaire

Il a été postulé que plus la concentration en cellules est élevée, plus le taux d'adsorption bactérienne sera élevé. Bengtsson et Lindqvist ont constaté que lorsque la concentration cellulaire dans la phase liquide augmente la quantité de cellules attachées aux particules de sol augmente également jusqu'à ce que la surface disponible à l'adhésion arrive à saturation (Bengtsson et Lindqvist 1995). Il est à noter que Bradford et Battahar, utilisant des colloïdes artificiels, ont observé une diminution de la rétention quand la concentration d'injection augmente (Bradford et Bettahar 2006). Les auteurs postulent des interactions répulsives entre colloïdes en solutions et adsorbés pour expliquer leurs observations.

## 2. La filtration

Le mécanisme de filtration correspond à un blocage physique des cellules par des pores dont la taille est inférieure à celles des cellules bactériennes (Corapcioglu 1984). Les facteurs qui influent sur la filtration dans un milieu poreux sont : la forme et la taille



des cellules, le niveau de saturation en eau du milieu poreux et l'obstruction éventuelle des pores (Stevik *et al.* 2004).

## 2.1. Le milieu poreux :

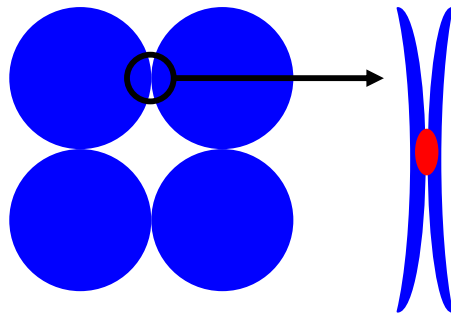
La taille des grains constituant le milieu poreux est un facteur important dans le transport microbien comme l'attestent plusieurs travaux (Ausland *et al.* 2002; Bradford *et al.* 2006; Fontes *et al.* 1991; Stevik *et al.* 1999). Plus la taille des grains est petite plus la taille des pores est réduite limitant ainsi le passage des bactéries. L'argile, le limon et le sable fin induisent des tailles de pores de l'ordre de grandeur de la plupart des cellules bactériennes. La filtration peut ainsi être un mécanisme limitant le mouvement bactérien à travers ce type de matériaux (Matthess 1985). La présence de macro pores et de fractures dans une matrice poreuse au contraire facilite le transport microbien (Artz *et al.* 2005; Natsch *et al.* 1996). La présence de galeries formées par des vers de terre par exemple facilite le transport d'*E. coli* O157:H7 tandis que le compactage du sol limite son transport (Artz *et al.* 2005). Ibaraki et Sudicky ont réalisé des simulations numériques de transport colloïdal par un réseau de fractures dans un milieu poreux (grès et argile) (Ibaraki et Sudicky 1995). Leurs travaux montrent que le manque de données sur les réseaux de fractures et les coefficients de filtration augmentent l'incertitude de prédiction du transport colloïdal pour des applications à grande échelle. En effet lorsque l'eau coule dans les pores de grande taille les vitesses d'écoulement sont plus rapides augmentant la vitesse et la distance de transport.

Bradford *et al.* ont publié récemment une série d'articles insistant sur l'importance de l'effet filtration sur le transport des colloïdes ou de bactéries en milieu poreux (Bradford et Bettahar 2005; Bradford *et al.* 2005; Bradford *et al.* 2006; Bradford *et al.* 2006; Bradford *et al.* 2002) En testant le transport de la souche *E. coli* O157:H7 dans des colonnes de sables de porosité variables Bradford *et al.* ont clairement mis évidence l'influence de la taille des grains de sable. Ainsi les sables fins (240 et 150 $\mu$ m) filtrent d'avantage de cellules que les sables plus gros (360 et 710 $\mu$ m) (Bradford *et al.* 2006). Dans ce type d'étude les sédiments utilisés ont généralement des tailles de grain très uniforme. Cependant, la plupart des sédiments normaux ont une distribution de la taille

des grains fortement non uniforme : dans les sédiments naturels 10% des pores sont assez petits ( $>1\mu\text{m}$ ) pour gêner transport bactérien (Jordan *et al.* 2004). Brown *et al.* ont également constaté l'influence de la forme des grains de sables sur le transport microbien, les grains ovales étant moins propice au transport que les grains ronds (Brown *et al.* 2002).

Plusieurs travaux ont tenté d'établir un ratio entre la taille des bactéries et la taille des pores (ou encore tailles des grains) à partir duquel la filtration opère (Matthess 1985). Mais ce ratio varie beaucoup en fonction des auteurs. Brouwer estime que la filtration débute lorsque le diamètre des grains constituant le milieu poreux est inférieur ou égal à 5 fois le diamètre des colloïdes en suspension (Brouwer 1984). Selon Bradford *et al.* la filtration se produit quand le ration entre le diamètre des particules en suspension ( $d_e$ ) et le diamètre moyen des grains ( $d_{50}$ ) est supérieur à 0.0017 (Bradford *et al.* 2002). Bradford *et al.* utilisent le même calcul ( $d_e/d_{50}$ ) pour déterminer que la filtration d'*E. coli* O157:H7 par des sables fins se produit lorsque  $d_e/d_{50}$  est supérieur à 0.005 (Bradford *et al.* 2006).

Un autre phénomène qui peut être assimilé à la filtration par un milieu poreux est le blocage des colloïdes au niveau des zones de contact entre grains constituant la matrice poreuse (Bradford *et al.* 2005; Bradford *et al.* 2003; Bradford *et al.* 2002) (voir figure 9 page 80). Plus récemment le blocage de colloïdes par des zones de contact entre grains d'un milieu poreux a pu être visualisé et est considéré comme un mécanisme important de déposition (Li *et al.* 2006) Il a aussi été montré de façon théorique que le phénomène de blocage dans un matrice porale peut se produire même en présence d'une barrière d'énergie (Johnson *et al.* 2007).



**Figure 9 :** illustration du blocage d'une cellule bactérienne au niveau de la zone de contact entre deux grains d'un milieu poreux

## 2.2. La morphologie des bactéries

Les études sur l'influence de la forme et de la taille des bactéries sur la filtration sont peu nombreuses. Gannon *et al.* ont trouvé une bonne corrélation entre la filtration et la taille des cellules (Gannon 1991). Weiss *et al.* ont étudié l'influence de la morphologie cellulaire (en calculant le ratio largeur sur longueur cellulaire) de 14 souches sur le transport microbien en milieu poreux (Weiss *et al.* 1995). Le résultat de leurs études suggère que les bacilles allongés sont les plus filtrés par le sable. De même ils montrent que les plus petites cellules sont les mieux transportés. Plus récemment Salerno *et al.* ont utilisé des microsphères de latex artificiellement déformées pour étudier l'effet de la morphologie des colloïdes sur la filtration en milieux poreux (Salerno *et al.* 2006). Des microsphères en latex de 1 $\mu$ m de diamètre (témoin) ont été allongées par la chaleur de façon à obtenir deux colloïdes tels que leur ratio longueur sur largeur soit de 2:1 et 3:1. Les résultats montrent que la filtration dans les colonnes remplies de billes de verre (diamètre 40 $\mu$ m) est d'autant plus élevée que le ratio longueur sur largeur est grand. Le contraste est surtout remarquable avec les colloïdes témoins qui sont parfaitement sphériques. A noter que la chimie de surface et le potentiel zêta ne jouent pas un rôle discriminant dans cette expérience puisque ces caractéristiques sont identiques pour tous les colloïdes utilisés. Les auteurs concluent que la forme allongée de certaines particules, telles que les bactéries de type bacille, est un facteur fortement impliquée dans les phénomènes de rétention en milieu filtrant (Salerno *et al.* 2006).

## 2.3. L'obstruction des pores

La diminution du volume poral par l'obstruction des pores peut être une cause de filtration dans un environnement poreux. Une des causes majeures de l'obstruction peut être la formation de biofilms (Thullner *et al.* 2002) ou des cellules agrégées (Bradford *et al.* 2006) qui remplissent les pores. D'après Bradford *et al.* des cellules d'*E. coli* non agglomérées peuvent se déposer au niveau d'étranglement de pores et s'agglomérer pour former un bouchon. Les cellules agglomérées peuvent ensuite être relâchées dans la

phase aqueuse sous l'effet de forces hydrodynamiques (Bradford *et al.* 2006). Iliuta et Larachi ont simulé l'agrégation de cellules de *Pseudomonas putida* dans un bioréacteur (lit poreux alimenté goutte à goutte avec des eaux usées) (Iliuta et Larachi 2006). Dans leur modèle ils supposent que le détachement des cellules se produit par mouvement Brownien lorsque le rayon de l'agrégat est inférieur à  $2\mu\text{m}$  et grâce aux forces de cisaillements lorsque le rayon de l'agrégat est supérieur à  $2\mu\text{m}$ . Leur travaux montrent l'impact de l'obstruction des pores par des agrégats bactériens (Iliuta et Larachi 2006). Rijnaarts *et al.* ont constaté que l'obstruction des pores par des cellules bactériennes dépend de la taille cellulaire et de la possibilité d'agrégation des cellules (Rijnaarts *et al.* 1996).

#### **2.4. Saturation en eau et charge hydraulique en milieu poreux**

Lorsque le flux hydrique appliqué à la surface d'un milieu poreux insaturé est faible (c.a.d. inférieur à la conductivité hydraulique à saturation) l'eau circule préférentiellement dans les petits pores favorisant ainsi les phénomènes de filtration. Quand le flux appliqué est suffisamment élevé pour augmenter le niveau de saturation en eau du milieu poreux, l'eau circule préférentiellement à travers les pores les plus grands (loi de Poiseuille). Dans ces conditions les phénomènes de filtrations sont réduits (Smith 1985). Une augmentation du flux hydrique contribue donc au transport microbien en milieu poreux. De plus en conditions non saturées, la présence d'air dans le milieu poreux crée des interfaces air-eau. Depuis les années 70 plusieurs études montrent que les bactéries ou les colloïdes ont tendance à s'accumuler à l'interface eau-air (Blanchard 1972; Corapcioglu et Choi 1996; Powelson et Mills 1996; Schafer *et al.* 1998). Wan *et al.* ont même visualisé l'accumulation de cellules bactérienne au niveau d'interfaces eau-air après le transport de bactéries à travers des colonnes de sables insaturées (Wan *et al.* 1994). Ces études suggèrent fortement que la présence d'air dans un sol joue un rôle de rétention lors du transport bactérien.

### 3. Forces Hydrodynamiques

De nombreuses études ont montré que le transport des bactéries à travers des milieux poreux est amélioré lorsque les vitesses d'écoulement augmentent (Camper *et al.* 1993; Sarkar *et al.* 1994; Tan *et al.* 1994). Ainsi Huysman et Verstraete (Huysman et Verstraete 1993) ont constaté que le transport bactérien à travers des filtres était beaucoup plus élevé avec un flux d'eau de  $4,7\text{cm.h}^{-1}$  qu'avec un flux d'eau de  $0,8\text{cm.h}^{-1}$ . Comme expliqué précédemment (voir § 2.4) l'effet de la filtration est amoindri lorsque le flux d'eau à la surface du milieu filtrant augmente. A l'intérieur des pores les forces hydrodynamiques peuvent être responsables du détachement de bactéries (phénomènes de cisaillement) mais également de la rétention des cellules dans des zones mortes.

#### 3.1. Les forces de cisaillement et vitesse de l'écoulement

L'augmentation des forces hydrodynamiques est aussi synonyme de forces de cisaillements susceptibles d'arracher des bactéries qui ont adhéré sur la matrice poreuse (Bradford *et al.* 2006). Bergendahl et Grasso ont étudié le détachement de colloïdes de polystyrènes ( $1\mu\text{m}$  de diamètre) retenus dans un milieu poreux constitué de billes de verre sous l'effet de différentes force hydrodynamiques (Bergendahl et Grasso 2000). Cinq flux d'eau ( $5, 25, 50, 75$  et  $100\text{ml.min}^{-1}$  correspondant à des vitesses de pore allant de  $0.36$  à  $7.28$  mm/s) ont été séquentiellement injectés dans les colonnes et ce pour 3 forces ioniques différentes ( $1\text{mM}, 0.01\text{M}$  et  $0.1\text{M}$  de NaCl). La quantité de colloïdes détachés augmente systématiquement lorsque le flux appliqué augmente mais devient surtout importante lorsque le flux est supérieur à  $50\text{ml.min}^{-1}$ . Il est intéressant de noter que la force ionique n'a pas eu d'influence sur le détachement des colloïdes pendant leurs expériences, vraisemblablement parce que les colloïdes de polystyrène sont hydrophobes et retenus dans le minimum primaire (Bergendahl et Grasso 2000). Dans des travaux similaire Li *et al.* ont étudié le rôle des forces dues aux traînées hydrodynamiques sur la déposition et le relâchement de colloïdes dans un milieu poreux (Li *et al.* 2005). Des expériences d'attachement et de détachement de colloïdes ( $1,1\mu\text{m}$ ) ont été réalisées en colonnes de sable et de billes de verre en présence d'une barrière électrostatique ou non.

Leurs résultats ont montré qu'en absence de répulsions électrostatiques entre colloïdes et matrice poreuse, la déposition des colloïdes dans le milieu poreux est augmentée par une élévation du flux, ce qui est en accord avec la théorie de la filtration. Il y a toutefois de nombreuses références qui présentent des résultats inverses, à savoir qu'une augmentation du flux hydrique s'accompagne d'un meilleur transport des colloïdes à travers un système filtrant (Choi *et al.* 2007). Tong et Johnson ont obtenu des résultats similaires à ceux de Li et ses collègues (Tong et Johnson 2006). Cependant lorsque Li *et al.* répètent la même expérience en présence de répulsions électrostatiques ils constatent le contraire : la déposition des colloïdes sur le milieu poreux diminue lorsque le flux augmente, ce qui alors est en contradiction avec la théorie de la filtration (Li *et al.* 2005). Les auteurs en concluent dans un premier temps que l'effet des forces hydrodynamiques causé par le flux sur la déposition des colloïdes est faible. En revanche ils démontrent habilement que les traînées hydrodynamiques jouent un rôle significatif dans les phénomènes de détachement de colloïdes en milieu poreux (Li *et al.* 2005). Ainsi en présence de répulsions électrostatiques le détachement des colloïdes augmente lorsque le flux augmente ce qui n'est pas le cas sans répulsions électrostatiques. Les auteurs attribuent ce résultat à la déposition des colloïdes via le minimum secondaire lorsqu'il y a des répulsions électrostatiques. En effet les traînées hydrodynamiques étant plus fortes que le minimum secondaire, les forces de cisaillement sont vraisemblablement responsables des phénomènes de détachement des colloïdes observés par les auteurs. Sans répulsions électrostatiques lors de la phase d'attachement, les colloïdes sont retenus dans le minimum primaire. Or le minimum primaire constitue une force de rétention dans le milieu poreux bien supérieure aux forces d'entraînement expliquant l'effet nul des traînées hydrodynamiques sur le détachement des colloïdes dans ces conditions. A noter que les détachements observés de Li *et al.* (Li *et al.* 2005) pour le cas sans répulsion électrostatique sont en contradiction avec les résultats obtenues par Bergendahl et Grasso (Bergendahl et Grasso 2000) cités plus haut. Toutefois, les conditions expérimentales n'étaient pas les mêmes, en particulier les vitesses de pore dans les cas de Li et al. étaient environ 1000 fois plus faible que dans l'étude de Bergendahl et Grasso.

### **3.2. Les zones mortes**

Un facteur qui a longtemps été ignoré dans le transport microbien sont les zones mortes en milieu poreux aussi appelé zones de stagnation où les flux hydriques sont nuls. Tong et Johnson (Tong et Johnson 2006) affirment qu'une partie des particules peut être retenue dans des zones mortes (ou zones d'eau immobiles). Dans un article plus récent Johnson *et al.* (Johnson *et al.* 2007) démontrent à l'aide d'un modèle mécaniste à l'échelle microscopique que la rétention mécanique de colloïdes dans une matrice poreuse peut être du : (i) au blocage pur et simple des particules au niveau des zones de contact entre grains constituant le milieu poreux (ii) à la rétention des particules dans des zones mortes. Par contre cette hypothèse ne semble pas encore avoir été testée avec des cellules bactériennes à ce jour.



## B. La modélisation du transport microbien en milieu poreux

La modélisation du transport microbien en milieu poreux est un enjeu important pour la mise au point d'outils de prédiction de déplacements bactérien dans un profil sol. Un grand nombres de modèles ont été développé par le passé (Bhattacharjee *et al.* 2002; Chen *et al.* 2003; Chen et Zhu 2004; Corapcioglu et Choi 1996; Johnson *et al.* 1995; Sen *et al.* 2005; Tian *et al.* 2002) (liste non exhaustive).

### 1. Les mécanismes

Les modèles de simulation du transport de bactéries en milieux poreux prennent en compte les phénomènes de transport, de rétention sur la phase solide et de détachement. De plus certains modèles incluent des mécanismes de croissance et de mortalité ainsi que des mécanismes de chimiotactisme (Sen *et al.* 2005). On se consacre ici essentiellement au transport sur des temps courts ou à des situations nutritives permettant d'ignorer les phénomènes de croissance et de mortalité.

#### 1.1. Transport dans la phase aqueuse

Le transport de bactéries et de colloïdes inertes dans la phase aqueuse est généralement modélisé par le biais d'une équation de convection dispersion. Par exemple les modèles utilisés par (Bradford *et al.* 2006; Chen *et al.* 2003; Li *et al.* 2005) pour n'en citer que quelques uns, reposent tous sur la modélisation suivante du transport :

$$\frac{\partial C}{\partial t} = D \frac{\partial^2 C}{\partial z^2} - v \frac{\partial C}{\partial z} + P \quad [19]$$

avec  $C$  (cell/L<sup>3</sup>) la concentration en colloïdes dans la phase aqueuse,  $D$  le coefficient de dispersion hydrodynamique (L<sup>2</sup>.T<sup>-1</sup>),  $v$  la vitesse de Darcy (L.T<sup>-1</sup>),  $t$  le temps,  $z$  la distance et  $P$  un terme puits/source à définir pour rendre compte des mécanismes de rétention et de remise dans l'écoulement des colloïdes. Les modèles diffèrent essentiellement sur la modélisation de ce terme puits/source.

## 1.2. Rétention sur la phase solide

L'attention s'est focalisée dans le passé sur la modélisation de la déposition des colloïdes sur la phase solide. La théorie de la filtration classique (Yao 1971) décrit le transfert de masse de colloïdes de la phase liquide vers la matrice poreuse (phase solide) par un processus du premier ordre avec une constante de temps  $k_d$  (Ryan et Elimelech 1996). Cela conduit à l'équation suivante décrivant l'évolution de la concentration adsorbée en fonction du temps :

$$\frac{\rho}{\theta} \frac{\partial S}{\partial t} = k_d C \quad [20]$$

$\rho$  est la masse volumique du milieu poreux (M.L<sup>-3</sup>),  $\theta$  est la porosité,  $C$  la concentration dans la phase aqueuse (cell.L<sup>-3</sup>) et  $S$  la concentration sur la phase solide (cell.M<sup>-1</sup>). La relation suivante est habituellement utilisée pour calculer  $k_d$  :

$$k_d = \frac{3}{2} \frac{(1-\theta)}{d_c \theta} v \alpha \eta_0 \quad [21]$$

avec  $\theta$  la porosité du milieu,  $v$  la vitesse de la phase liquide,  $d_c$  la taille des grains du milieu poreux,  $\eta_0$  l'efficacité d'interception des grains de solide et  $\alpha$  un paramètre décrivant l'efficacité des collisions. On voit donc que la constante de temps est liée aux propriétés géométriques du milieu poreux et de l'écoulement ( $\theta$ ,  $d_c$ ,  $v$ ), et fait apparaître deux paramètres :  $\eta_0$  qui fait intervenir la taille des colloïdes et l'écoulement et  $\alpha$  qui traduit l'effet des interactions entre le colloïde et le solide.

### 1.2.1. Détermination de l'efficacité d'interception $\eta_0$

Le problème a été abordé par Rajagopalan et Tien (Rajagopalan 1976) qui ont proposé l'expression suivante pour des particules non Browniennes :

$$\eta_0 = \frac{3}{2} A_S N_R \quad [22]$$

avec  $A_S$  est un paramètre qui dépend de la porosité et qui peut être calculé par :

$$A_S = \frac{2(1-\gamma^5)}{2-3\gamma+3\gamma^5-2\gamma^6} \quad [23]$$

$\gamma$  étant donné par  $\gamma = (1-\theta)^{1/3}$

Le nombre adimensionnel  $N_R$  qui intervient dans l'expression de  $\eta_0$  est simplement un rapport de taille :

$$N_R = \frac{d_p}{d_c} \quad [24]$$

dans lequel ( $d_p$ ) désigne le diamètre des colloïdes et ( $d_c$ ) le diamètre des grains (collecteurs) constituant le milieu poreux.

La relation a été largement utilisée par la suite pour prédire la filtration en milieux artificiels ou naturels. Toutefois, considérant que cette corrélation ne prend pas en compte de nombreuses autres forces agissant sur les colloïdes, une expression différente a été développée par Tufenkji et Elimelech (Tufenkji et Elimelech 2004) à partir d'une équation de transport prenant en compte divers mécanismes agissant sur un colloïde au voisinage d'un grain de collecteur et en particulier les forces hydrodynamiques et celles dues aux interactions de type Lifshitz-van der Waals. Ils aboutissent à l'expression suivante :

$$\eta_0 = 2,4 A_S^{1/3} N_R^{-0,081} N_{Pe}^{-0,715} N_{vdW}^{0,052} + 0,55 A_S N_R^{1,675} N_A^{0,125} + 0,22 N_R^{-0,24} N_G^{1,11} N_{vdW}^{0,053} \quad [25]$$

qui outre le ratio  $N_R$ , défini précédemment, fait intervenir les nombres adimensionnels suivants :

Paramètre	Equation	Signification
$N_{Pe}$	$N_{Pe} = \frac{Ud_c}{D_\infty}$ [26]	Nombre de Peclet correspond au ratio entre transport convectif et transport par diffusion
$N_{vdW}$	$N_{vdW} = \frac{A}{kT}$ [27]	Nombre de Lifshitz-van der Waals correspond au ratio de la constante d'Hamaker sur l'énergie thermique de la particule.
$N_A$	$N_A = \frac{A}{12\pi\mu a_p^2 U}$ [28]	Nombre d'attraction : représente l'influence combinée des forces Lifshitz-van der Waals et de la vitesse de la phase liquide sur la déposition des particules par des mécanismes d'interception
$N_G$	$N_G = \frac{2 a_p^2 (\rho_p - \rho_f) g}{9 \mu U}$ [29]	Nombre gravitationnel : ratio entre la vitesse de sédimentation de la particule (Stokes) et la vitesse d'approche du fluide.

avec :  $d_c$  le diamètre des grains du milieu poreux,  $U$  est le vitesse d'approche de la phase liquide,  $D_\infty$  le coefficient de diffusion de la phase liquide (d'après l'équation de Stokes et Einstein),  $A$  la constante d'Hamaker,  $a_p$  le diamètre de la particule,  $\rho_p$  la densité de la particule,  $\rho_f$  la densité du fluide,  $\mu$  la viscosité du fluide et  $g$  la constante gravitationnelle.

La comparaison de cette corrélation avec celle proposée par Rajagopalan et Tien et des résultats expérimentaux montre qu'elle prédit sensiblement mieux le coefficient  $\eta_0$ .

### 1.2.2. Détermination de l'efficacité d'attachement $\alpha$ .

La probabilité pour la particule de rester attachée à la phase solide lors qu'elle a été interceptée est exprimée par l'efficacité d'attachement  $\alpha$ . Une valeur de 1 indique que chaque interception résulte en un attachement, alors qu'une valeur de 0 indique que

l'adhésion ne se fait pas malgré les rencontres avec la phase solide. Comparativement à  $\eta_0$ , la détermination de  $\alpha$  a reçu moins d'attention.

Le coefficient d'attachement  $\alpha$  est généralement déterminé expérimentalement à partir de courbes d'élution. Pour un système avec injection continue de colloïdes, la constante de déposition est donnée par (Tufenkji et Elimelech 2004):

$$k_d = -\frac{v}{\theta L} \ln(C/C_0) \quad [30]$$

$C$  étant la concentration à la sortie de la colonne dans la phase « plateau » et  $C_0$  la concentration d'injection. En combinant avec la relation donnée pour  $k_d$  (Eq. 21 ) on a l'expression :

$$\alpha = -\frac{2}{3} \frac{d_c}{(1-\theta)L\eta_0} \ln(C/C_0) \quad [31]$$

Il semble alors logique d'essayer de corréler  $\alpha$  aux propriétés de surface des cellules et du milieu poreux. C'est ce qu'ont essayé de faire certains auteurs (Chen et Strevett 2003; Gross et Logan 1995). Dong *et al.* ont récemment tenté de déterminer un  $\alpha$  théorique à partir des propriétés de surface des bactéries et des grains du milieu poreux en utilisant le théorie XDLVO (Dong *et al.* 2002). Les auteurs ont comparé la valeur théorique de  $\alpha$  calculé avec des valeurs expérimentales. Ils concluent qu'il est possible de prédire le coefficient d'attachement  $\alpha$  à partir des propriétés de surface connue des cellules et de la matrice poreux. Toutefois, la grande dispersion des coefficients  $\alpha$  mesurés pour la souche utilisée (variation dans un rapport de 1 à 10) nous semble poser un problème quant à l'évaluation du modèle proposé.

## 2. La théorie ne reflète pas la réalité

### 2.1. Déviation du modèle de filtration classique

Un nombre croissant de travaux a montré qu'il existe des écarts entre les observations et les prédictions réalisées avec le modèle de la filtration classique (MFC). Les principales déviations observées sont d'une part de la rétention de colloïdes dans des conditions à priori non favorables à leur rétention (Li *et al.* 2005; Tong et Johnson 2006) et d'autre part des profils de déposition qui ne présentent pas une diminution log linéaire avec la profondeur comme il est prédit par la théorie (Brown et Abramson 2006; Li *et al.* 2004; Liu *et al.* 2007; Simoni *et al.* 1998; Tufenkji et Elimelech 2005; Tufenkji *et al.* 2003). Les écarts entre la réalité et la prédiction par le MFC peuvent aussi être causés par d'autres facteurs comme le blocage (Bradford et Bettahar 2005; Bradford *et al.* 2005; Bradford *et al.* 2002), l'hétérogénéité du milieu poreux ou de la population bactérienne (Bolster *et al.* 1999; Harter *et al.* 2000; Shellenberger et Logan 2002), la mobilité cellulaire (Camper *et al.* 1993), les rugosités de surface (Shellenberger et Logan 2002), les forces hydrodynamiques (Li *et al.* 2005) ou le détachement de colloïdes (Kim et Tobiasson 2004; Li *et al.* 2004).

### 2.2. Déposition en conditions non favorables.

Le constat général est que la déposition de colloïdes ou de cellules bactériennes en milieu poreux est surestimée par le MFC en condition non favorable (Li *et al.* 2004; Tufenkji et Elimelech 2005). La présence d'une barrière énergétique devrait en théorie empêcher toute rétention de colloïdes dans un milieu poreux. Cependant en dépit des conditions non favorables de nombreux auteurs ont observé la déposition de colloïdes en milieu poreux (Li *et al.* 2004; Li *et al.* 2005; Tong *et al.* 2005; Tong et Johnson 2006). Johnson *et al.* ont avancé une explication en se basant sur des simulations d'un modèle de transport en milieu poreux à un échelle microscopique. Les auteurs ont simulé le passage de colloïdes ( $\varnothing = 1\mu\text{m}$ ) à travers un pore constitué par l'empilement de 4 billes de verre. Ils considèrent que les colloïdes, comme les billes de verre sont chargées négativement

pour imiter des conditions non favorables de déposition. Leurs travaux ont montré que la déposition de colloïdes dans un milieu poreux en condition non favorable de déposition peut se produire grâce à deux phénomènes : (i) le blocage au niveau du contact entre grains du milieu poreux (voir figure 9 page 80) et (ii) les zones de stagnation (zones où la vitesse d'écoulement de la phase liquide est nulle).

### 2.3. Profil de déposition non log-linéaires

D'après le MFC la concentration de colloïdes dans la phase liquide diminue exponentiellement avec la distance lors du transport dans un milieu poreux. Mais un nombre croissant de travaux suggère que la filtration de particules bactérienne par un milieu poreux n'obéit pas à cette loi, surtout en condition de déposition non favorable (Simoni *et al.* 1998; Tufenkji et Elimelech 2005; Tufenkji *et al.* 2003). Pour démontrer que le profil de déposition des bactéries ne décroît pas exponentiellement plusieurs auteurs ont entrepris de mesurer la concentration de colloïdes retenue par la phase solide (Bolster *et al.* 1999; Camesano et Logan 1998; Li *et al.* 2004). Dans ce type d'expérience une colonne contenant un milieu poreux est découpée en tranches horizontales après avoir reçu un pulse de colloïdes en entrée. La quantité de colloïde de chaque tranche de milieu poreux est ensuite déterminée (cytométrie de flux, comptage au microscope ou radiodétection). Ces travaux ont mis en évidence que la déposition de bactéries dans un milieu poreux en conditions non favorable dévie de la déposition prédite par la MFC. Typiquement la quantité de cellules retenues par la phase solide décroît plus rapidement avec la distance que le prédit la MFC. Ceci implique qu'une portion de la population est capable de voyager plus profond dans un milieu que les prédictions habituelles (Simoni *et al.* 1998). Plusieurs explications ont été élaborées tel que la hétérogénéité de la population cellulaire ou encore l'hétérogénéité de la surface des grains du milieu poreux (Dong 2002). Une distribution du coefficient d'attachement  $\alpha$  qui reflète ces hétérogénéités a été proposée afin d'améliorer le MFC (Brown et Abramson 2006). Bolster *et al.* ont montré qu'une distribution bimodale de  $\alpha$  pouvait passer inaperçue sur des colonnes courtes mais pouvait apparaître sur des distances de transport plus longues (Bolster 2000). Les auteurs montrent aussi que la bi-modalité des coefficients d'adhésion

pour une population bactérienne conduit à une migration cellules bien plus importante que prédite en supposant une constante de déposition unique. Tufenkji et Elimelech ont développé un modèle qui reprend ce concept de dualité avec deux modes de déposition : un rapide et un autre lent (Tufenkji et Elimelech 2005). Les auteurs supposent que malgré la déposition en condition non favorable (qu'ils considèrent lente) il peut exister des conditions exceptionnelles de déposition favorable (rapides). Ces conditions de déposition favorables seraient dues à des interactions spécifiques entre les macromolécules de la paroi des cellules et la surface des billes de verre. L'étude de Liu *et al.* révèle également un profil bimodal du transport bactérien qui pourrait expliquer le rôle des EPS dans ce phénomène (Liu *et al.* 2007). En testant le transport de 3 souches de *Pseudomonas aeruginosa* avec des capacités de fabrication d'EPS variables il est apparu que seulement les mutants fabriquant des EPS avaient un profil de déposition qui dévie de celui prédit par le MFC. De plus les cellules ayant perdu leur EPS pendant le transport (EPS restés collés sur les billes de verre en entrée de colonne) adhèrent mieux aux billes de verre. Il apparaît alors comme une dualité de comportement de transport dans une population clonale : le comportement des cellules avec EPS et celui des cellules ayant perdu des EPS.



## C. Le transport de bactéries pathogènes en milieu poreux

### 1. Introduction

Il existe plusieurs sources de bactéries pathogènes susceptibles de contaminer des nappes phréatiques ou des eaux de baignades après transport à travers un sol. Parmi les sources les plus souvent citées on trouve les eaux usées (Stevik *et al.* 2004), les boues des stations d'épuration ou le fumier des élevages intensifs (Cools *et al.* 2001). Plusieurs auteurs ont fait le point sur les études faites en matière de transport de souches pathogènes dans des environnements aquifères (Ferguson *et al.* 2003; Santamaria et Toranzos 2003; Stevik *et al.* 2004). Cependant la littérature comporte un nombre limité de travaux sur les conséquences liées au déplacement microbien dans un sol. Unc et Goss relatent l'événement tragique de mai 2000 à Walkerton (Ontario, Canada) où l'eau du robinet fut contaminée par les souches pathogènes *Escherichia coli* 0157:H7 et *Campylobacter* (Unc et Goss 2004). Cette contamination a entraîné l'hospitalisation de 2300 personnes dont 7 sont décédées sur un total de 5000 habitants que compte la ville de Walkerton. L'enquête sur les origines du drame a montré que la contamination était vraisemblablement due à des bactéries issues de lisiers qui ont réussi à atteindre l'aquifère.

Dans les zones rurales l'utilisation de systèmes d'assainissement des eaux usées autonome se développe rapidement. Aux Etats-Unis 25% de la population bénéficie de ce type de système (US Environmental Agency, (1997). Les eaux usées sont d'abord stockées dans une fosse septique pour permettre la décantation de la phase solide. Le surnageant est envoyé dans le sol via un réseau de drains. Ce type d'assainissement a été conçu en considérant que le sol agit comme un filtre. En effet des expériences ont

démontré que les microorganismes issus de ce type de système d'assainissement sont filtrés sur des distances relativement courtes en milieu poreux insaturé (Hagedorn 1981). Cependant Gerba *et al.* ont constaté que des bactéries coliformes pouvait être transportées jusqu'à une distance de 450 mètres à partir du point de contamination (Gerba 1975). La migration de souches pathogènes peut ainsi aboutir à la contamination des réserves en eaux potables et porter atteinte à la santé publique. Selon Scandura et Sobsey les effluents des fosses septiques sont une source importante responsable de la contamination des nappes phréatiques (Scandura et Sobsey 1997). Les bactéries pathogènes importante dans ce type de contamination sont : *Salmonella* sp., *Shigella* sp., *Vibrio cholerea*, *Yersinia enterocolitica*, *Y. pseudotuberculosis*, *Leptospira* sp., *Francisella tularensis*, *Dyspepsia coli*, et des souches productrices d'entérotoxines comme *E. coli* et *Pseudomonas* (Matthess 1985).

## **2. Le sort des bactéries pathogènes entérique dans un sol**

### **2.1. La survie**

Les bactéries entériques vivent normalement exclusivement dans le tractus digestif des mammifères. De ce fait ces microorganismes sont peu adaptés à la survie dans d'autres environnements et en particulier le sol. Néanmoins plusieurs auteurs ont constaté que des coliformes fécaux issues de stations d'épuration pouvaient survivre plusieurs mois dans un sol (Ngole 2006; Pourcher 2007). Une augmentation de l'humidité du sol (Ngole 2006), la diminution de la température ou encore la quantité de matière organique disponible favoriserait la survie des souches entériques.

### **2.2. Le déplacement**

L'argile favoriserait la réduction du transport de bactéries entériques dans un sol par filtration et adsorption. En effet l'argile est constitué de particules très fines (<2µm) bloquant ainsi le passage des cellules bactériennes (Huysman et Verstraete 1993). De plus la présence de groupements chargés positivement sur les particules d'argile favorise l'adhésion électrostatique des bactéries généralement de charge opposée (Fletcher 1979).

Scandura et Sobsey soutiennent également que des sols avec au moins 15% d'argile sont capable de retenir des bactéries et des virus et réduisent fortement les risques de contamination (Scandura et Sobsey 1997). Cependant Conboy et Goss en réalisant une surveillance de plusieurs puits ont remarqué que les sols riches en argile sont les plus susceptibles à permettre une contamination bactérienne d'origine fécale (Conboy 2000). Les événements pluvieux favoriseraient le déplacement de bactéries entériques dans un sol. Plusieurs auteurs ont observé le déplacement de coliformes sur plus de 150 mètres lors d'épisodes pluvieux importants (Celico *et al.* 2004; Gerba 1984).

### **2.3. Détection de pollutions fécales**

Traditionnellement les coliformes fécaux (aussi appelés coliformes thermo tolérants) ont été utilisés comme indicateur de contamination fécale. Plus récemment l'Agence de Protection de l'Environnement des Etats-Unis (EPA) et l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) proposent d'utiliser *E. coli* et les entérocoques de l'intestin comme indicateurs de pollution fécale. De plus, des techniques de biologie moléculaire ont été développées pour la détection d'*E. coli* dans des environnements comme le sol (Sabat 2000) ou les eaux usées (Bertrand 2007). Bertrand et Roig ont développé une technique PCR pour détecter spécifiquement la souche pathogène *E. coli* 0157 H7 avec une sensibilité de 200CFU/litre (Bertrand 2007). La conférence annuelle de la Société Américaine de Microbiologie (ASM) de 2007 (Toronto, Ontario, Canada) a montré l'essor de méthodes de détection de souches pathogènes dans l'environnement (Esseilli 2007; Haffar 2007; Hallier-Soulier 2007). Plusieurs études ont donc permis de détecter des pollutions fécales dans l'environnement au moyen de ces techniques. Cependant la littérature ne mentionne pas de lien clair entre une pollution fécale et le transport de bactéries fécales en milieu poreux.





## **Chapitre 2**

Vitesse d'adhésion de cellules bactériennes sur du sable : propriété de surface et vitesse d'adhésion.

Le chapitre 2 correspond à l'article

**Kinetic adhesion of bacterial cells to sand:**

**Cell surface properties and adhesion rate.**

**Colloids and Surfaces B : Biointerfaces, volume 59 (2007), p. : 35-45**

**A. Jacobs, F. Lafolie, J.M. Herry et M. Debroux**



### **Avant propos**

Comme on pu le constater dans le chapitre état de l'art, l'adhésion des cellules bactériennes sur un support joue un rôle important dans leur transport en milieu poreux. La littérature montre l'implication des propriétés de surface des cellules et de la phase solide dans ce phénomène. Par propriétés de surface on entend les propriétés physicochimiques (hydrophobicité et charge électrique de la surface cellulaire et du support). De nombreux auteurs ont utilisé la théorie DLVO pour quantifier les interactions physicochimiques entre cellules bactériennes et un support solide avec plus ou moins de succès. Cependant la plupart des études se sont focalisées sur quelques souches bactériennes seulement (essentiellement *E. coli*, *P. aeruginosa* et *Bacillus subtilis*) avec des propriétés de surface assez proches. Aussi dans cet article nous avons voulu étudier la relation entre l'adhésion (sur du sable) et les interactions physicochimiques d'un large panel de bactéries. Le choix des souches s'est effectué afin d'obtenir une gamme étendue de propriété physicochimiques. La très grande diversité microbiologique des stations d'épuration laisse supposer aussi une grande diversité au niveau des caractéristiques de surface cellulaire. L'objectif de cette étude était donc de quantifier l'adhésion de bactéries à un solide bien défini et d'évaluer par le biais de la théorie DLVO dans quelle mesure l'adhésion (quantité et cinétique) peut être reliée à leurs propriétés physicochimiques de surface.





## Kinetic adhesion of bacterial cells to sand: Cell surface properties and adhesion rate

A. Jacobs<sup>a</sup>, F. Lafolie<sup>a,\*</sup>, J.M. Herry<sup>b</sup>, M. Debroux<sup>a</sup>

<sup>a</sup> I.N.R.A., Unité Climat Sol Environnement, Bâtiment Sol, Domaine Saint-Paul, Site Agroparc, 84914 Avignon Cedex 9, France

<sup>b</sup> UMR I.N.R.A. E.N.S.I.A., Bioadhésion et Hygiène des Matériaux, 25 Avenue de la République, 91744 Massy Cedex, France

Received 12 January 2007; received in revised form 28 March 2007; accepted 11 April 2007

Available online 24 April 2007

### Abstract

Correlation between microbial surface thermodynamics using the extended DLVO (XDLVO) theory and kinetic adhesion of various bacterial cells to sand was investigated. Two experimental setups were utilized. Adhesion tests were conducted in batch reactors with slow agitation. Also, bacteria were circulated through small sand columns in a closed loop and the results were analyzed with a simple model which accounted for the rate of the adhesion phenomena ( $\omega$  in  $\text{h}^{-1}$ ) and adhesion percentage. Cells surface properties were derived from contact angle measurements. The wicking method was utilized to characterize the sand. Zeta potentials were measured for the sand and the cells. Kinetic of bacterial retention by the porous media was largely influenced by the electrostatic interactions which are correlated with  $\omega$  from the model ( $R^2 = 0.71$ ). Negative zeta potentials resulted in electrostatic repulsions occurring between the sand and the bacterial cells which in result delayed bacterial adhesion. While no correlation was found between the adhesion percentage and the total interaction energy calculated with the XDLVO theory the respective behavior of hydrophobic and hydrophilic bacteria as well as the importance of electrostatic interactions was evidenced. All the bacterial strains studied adhered more in the column experiments than in the adhesion tests, presumably due to enhanced collision efficiency and wedging in porous media, while filtration could be ignored except for the larger *Bacillus* strains. Approximate XDLVO calculations due to solid surface nanoscale roughness, retention in a secondary minimum and population heterogeneity are discussed. Our results obtained with a large variety of different physicochemical bacterial strains highlights the influence of both surface thermodynamics and porous media related effects as well as the limits of using the XDLVO theory for evaluating bacterial retention through porous media.

© 2007 Elsevier B.V. All rights reserved.

**Keywords:** Bacteria; Adhesion; Transport; Sand; XDLVO

### 1. Introduction

The transport and fate of microbial particles in subsurface environments is a significant stake in both bioremediation and drinking water contamination [1]. The consequences related to the displacement of bacterial cells in the soil can cause many environmental [2–7], agronomic [8] and health related problems [9]. Several contaminations of water sources with micro-organisms were most likely due to bacterial transport through the unsaturated zone [3]. However the displacement of micro-organisms in a soil profile is still poorly understood. Increasing experimental evidences suggest that bacterial transport is strongly influenced by cell characteristics [10]. Cell

surface physicochemical properties and its biochemical composition seem to be closely related to the surface thermodynamics which are well known to play an important role in cell to solid surface interactions which will affect bacterial transport [11,12]. Marshall and colleagues [13] in a pioneering work were the first to use the classical Derjaguin–Landau–Verwey–Overbeek (DLVO) theory to describe microbial adhesion to solid surfaces. The DLVO theory has been widely used since that time to estimate the net interaction between bacteria cells and inert surfaces resulting from the addition of Lifshitz–van der Waals (LW) and electrostatic interactions (EL). Later Van Oss developed the extended DLVO theory (XDLVO) by adding the Lewis acid–base interactions (AB) [14]. The polar Lewis acid–base or electron-acceptor/electron-donor interactions are responsible for all non-electrostatic, non-covalent, polar interactions occurring in water [15]. LW, AB and EL interactions can be influenced by cell modifications and properties such as the physicochemi-

\* Corresponding author. Tel.: +33 4 32 72 22 16; fax: +33 4 32 72 22 12.  
E-mail address: [jacobs@avignon.inra.fr](mailto:jacobs@avignon.inra.fr) (F. Lafolie).

cal state [16], extracellular polymeric substance (EPS) [17–19], C/N ratio in nutrients [20], lipopolysaccharides (LPS) production [21,22], motility [23,24] or shape [25]. The surface of living cells is chemically complex and heterogeneous which complicates the physicochemical approach for the comprehension of bacterial adsorption phenomena on a solid surface. It has already been demonstrated that hydrophobicity, which can be described by AB interactions for biological compounds, is the driving force for bacterial deposition and is usually one order of magnitude greater than EL or LW interactions [26,27]. However contradictory reports show that correlation between the XDLVO theory and bacterial transport can either be good [28,29] or poor [30,31]. Although not investigated in this paper, physical factors (porous media, temperature, flow velocity) and chemical factors (ionic strength, ion species, pH) are also well known for their impact on bacterial adsorption mechanisms.

Predicting the transport of bacterial cells or colloids in a porous media requires the attachment and detachment processes as well as the straining and liberation mechanisms to be modeled. Most studies [12,28] employ transport models based on the convection dispersion with various types of adhesion sites. Usually, one type is assumed to be instantaneously and reversibly in equilibrium with the aqueous concentration leading to the concept of retardation factor [28]. Adsorption on other sites is kinetic, and can be reversible or not [12]. The latter process is often referred as *deposition* and the coefficient controlling its rate is usually fitted together with other parameters (partition coefficients for equilibrium and kinetic site types) so that the model correctly reproduces the observed breakthrough curves [28]. The deposition coefficient can also be simply obtained experimentally from the fraction of micro-organisms recovered at the outlet of the soil column [32]. This method was used by Chen and Strevett [27]. As pointed out by Tufenkji et al. [33], the deposition factor may vary with time and space due to coverage of solid particle by attaching cells; which modifies the interactions between the cells and the porous medium. Chen and Strevett [27,28] and Chen et al. [34] reported laboratory experiments that clearly illustrate that bacterial cells transport through porous medium is largely controlled by adhesion (instantaneous and kinetic) and also that the deposition coefficient varies from a bacteria to another. In addition, they found that the total free energy of interaction evaluated by the DLVO was correlated with the deposition coefficient obtained from their column experiments.

In this study we are interested to further investigate how surface properties of a large number of bacteria influence attachment kinetics to sand. This work differs from previous column experiments in that a large variety of strains with different physicochemical properties (i.e. hydrophobicity and electrophoresis characteristics) were used. Our goal was to relate the rate of adhesion and the percentage of adhesion to Lifshitz–van der Waals, Lewis acid–base and electrostatic interactions. The impact of cell size and shape on retention in the porous media was also analyzed. In order to measure porous media related effects on bacterial adsorption, simple adhesion tests (batch with gentle agitation) and small column experiments were compared. Our goal is also to evaluate the possibility of using an experimental setup that requires less time and work

than a traditional column experiment for evaluating bacterial cells deposition in a porous medium.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Bacterial strains and solid phase

All the bacterial strains and their origins used in this work are listed in Table 1. Some of the strains listed are uncommon to soil environments such as bacteria from the *Streptococcus* and the *Lactococcus* families but their particular membrane properties (i.e. hydrophobicity and low zeta potential) were chosen in order to obtain a large variety of cell surface characteristics. All the *Streptococcus* strains were kindly given by the National Institute for Agricultural Research in Paris (INRA, France). The *L. lactis* NDCO2118 strain used in this study was isolated from frozen peas and was given by the National Collection of Dairy Organisms (France). Cell size measurements were performed with a Canon BX microscope. Results are listed in Table 1.

The bacteria were grown in half diluted Luria–Bertani (1/2LB) media or M17 with 10% lactose media for the lactic acid bacteria at 30 °C. The bacteria were first cultivated in 10 ml of their respective media for 6 h. About 0.1 ml of the first culture was used to inoculate 50 ml of 1/2LB or M17 and incubated for overnight culture.

The porous media used in this study was a sand called “sand of Fontainebleau” (south Paris, France) (Merck, grain size: Ø 230–310 µm). This sand is very homogeneous (over 99.6% silica) and is composed of quartz grains. Before use, the sand was thoroughly rinsed with milliQ water on a 40 µm filter (VWR international, 11 cm, type 417) then heat treated and oven dried for at least 2 h at 120 °C. For each experiment the sand was renewed in the columns.

### 2.2. Surface properties of cells and porous medium

Bacterial and sand surface thermodynamic properties can be described by their surface energy. According to the extended DLVO theory, bacterial and sand surface tension is mainly composed of an apolar component (i.e. Lifshitz–van der Waals: LW), a polar component (i.e. Lewis acid/base: AB) and an electrical component (EL) [35]:

$$\Delta G = \Delta G^{\text{AB}} + \Delta G^{\text{LW}} + \Delta G^{\text{EL}}$$

Attraction between two surfaces occurs when  $\Delta G$  is negative and repulsion occurs when  $\Delta G$  is positive. Bacterial LW and AB components of surface energy were estimated by contact angle measurements following the method described by Grasso et al. [36]. The Dupré–Young equation relates the contact angle made by a drop of liquid (L) deposited on a flat solid (S), to the surface energy and the interfacial tension of the liquid and the flat solid:

$$(1 + \cos \theta)\gamma_{\text{L}} = 2 \left( \sqrt{\gamma_{\text{S}}^{\text{LW}} \gamma_{\text{L}}^{\text{LW}}} + \sqrt{\gamma_{\text{S}}^{\text{+}} \gamma_{\text{L}}^{\text{-}}} + \sqrt{\gamma_{\text{S}}^{\text{-}} \gamma_{\text{L}}^{\text{+}}} \right) \quad (1)$$

Table 1  
GRAM, size and source of the bacterial strains used in this study

Strains	GRAM (G) and known particularity	Size <sup>a</sup>	Source or reference
<i>Azospirillum lipoferum</i> Sp59b <sup>T</sup>	G–	4.2/1	Collection <sup>b</sup>
<i>Azospirillum brasilense</i> Sp7 <sup>T</sup>	G–	2.7/1.1	Collection <sup>b</sup>
<i>Bacillus cereus</i> LMG 69	G+	4.6/1.6	Collection <sup>b</sup>
<i>Bacillus subtilis</i> LMG	G+	10.8/1.6	Collection <sup>b</sup>
<i>E. coli</i> K-12 PHL565gfp	(Curlis production +)	1.2/0.5	Collection <sup>c</sup>
<i>E. coli</i> K-12 PHL1314	Mutant ompR234 (curlis production ++)	1.2/0.5	Collection <sup>c</sup>
<i>L. lactis</i> NDCO2118	G+	0.85	Collection <sup>d</sup>
<i>Pantoea agglomerans</i> ATCC 27155 <sup>T</sup>	G–	4/1	Collection <sup>b</sup>
<i>Paenibacillus graminis</i> RSA19 <sup>T</sup>	G+	5.3/1	Collection <sup>b</sup>
<i>Paenibacillus polymycae</i> CF43	G+	5.2/1	Collection <sup>b</sup>
<i>Paenibacillus polymycae</i> SBO3	G+	4.7/1	Collection <sup>b</sup>
<i>Pseudomonas corrugata</i> ATCC 29736 <sup>T</sup>	G–	1.7/0.5	Collection <sup>b</sup>
<i>Pseudomonas fluorescens</i> AK15	G–	2.8/1	Collection <sup>c</sup>
<i>Rahnella aquatilis</i> ATCC33071 <sup>T</sup>	G–	1.2	Collection <sup>b</sup>
<i>S. salivarius</i> JIM8777	G+	1.2	Collection <sup>d</sup>
<i>S. salivarius</i> JIM8780	G+	1	Collection <sup>d</sup>
<i>S. thermophilus</i> CNRZ1066	G+	1.1	Collection <sup>d</sup>
<i>S. thermophilus</i> LMG18311	G+	1	Collection <sup>d</sup>
<i>S. thermophilus</i> JIM8732	G+	1	Collection <sup>d</sup>
<i>S. thermophilus</i> JIM8752	G+	1	Collection <sup>d</sup>
<i>S. thermophilus</i> JIM8749	G+	1	Collection <sup>d</sup>

<sup>a</sup> Cell sizes are in  $\mu\text{m}$ , the rod shaped cells are indicated by length/width, cocci shaped cells by their diameter.

<sup>b</sup> Strains listed in Table 1 were kindly provided by O. Berge (CEA Cadarache, France).

<sup>c</sup> Strains listed in Table 1 were kindly provided by P. Lejeune (INSA LYON, France).

<sup>d</sup> Strains listed in Table 1 were kindly provided by P. Renault (INRA Jouy en Josas, Paris, France).

<sup>e</sup> Strains listed in Table 1 were kindly provided by Y. Dudal (INRA Avignon, France).

where the subscripts S and L indicate the solid (bacteria) and the liquid, respectively,  $\theta$  the contact angle ( $^\circ$ ) between the bacterial layer and the liquid,  $\gamma_L$  the surface energy of the liquid used for the measurement ( $\text{mJ m}^{-2}$ ),  $\gamma_L^{\text{LW}}$  the Lifshitz–van der Waals component of the surface energy ( $\text{mJ m}^{-2}$ ), and  $\gamma^+$  and  $\gamma^-$  are the electron-acceptor and the electron-donor parameters of the Lewis acid/base component of surface energy ( $\text{mJ m}^{-2}$ ). The liquid surface energy  $\gamma_L$  is calculated as

$$\gamma_L = \gamma_L^{\text{LW}} + \gamma_L^{\text{AB}} = \gamma_L^{\text{LW}} + 2\sqrt{\gamma_L^+ \gamma_L^-} \quad (2)$$

Water, 1-bromonaphtalene and formamide (Sigma–Aldrich, MO, USA) were used to obtain three contact angles. Their Lifshitz–van der Waals and Lewis acid base properties are listed in Table 2. Bacterial cells collected from the stationary growth state were first centrifuged (5 min, 5000 rpm), washed and suspended in 0.01 M NaCl and then vacuum filtered through nitrocellulose membranes filters (0.45  $\mu\text{m}$ , type HA, Millipore<sup>®</sup>,

Table 2  
The surface free energies components of MATS solvents and contact angle liquids

Liquids	$\gamma_L^{\text{LW}}$ ( $\text{mJ m}^{-2}$ )	$\gamma_L^{\text{AB}}$ ( $\text{mJ m}^{-2}$ )	$\gamma^+$ ( $\text{mJ m}^{-2}$ )	$\gamma^-$ ( $\text{mJ m}^{-2}$ )
Water	21.8	51.0	25.5	25.5
Formamide	39.0	19.0	39.6	2.3
1-bromonaphtalene	44.4	0	0	0
Chloroform	27.2	3.8	3.8	0
Hexadecane	27.2	0	0	0
Decane	23.9	0	0	0
Ethyl acetate	23.9	19.4	0	19.4

USA) to create a bacterial layer. For each strain three contact angle measurements per liquid were performed on two bacterial layers obtained from separate cultures. Contact angles were measured with a G40 goniometer (Krtls, Palaiseau, France). For each strain, mean measured contact angles were used in equation [1] to calculate the  $\gamma_L^{\text{LW}}$ ,  $\gamma^+$  and  $\gamma^-$  components of the surface energy.

Lifshitz–van der Waals and Lewis acid–base component of the surface energy for the sand were obtained by the wicking method. The wicking method consists in measuring the progression of the wetting front as a function of time during a capillary liquid penetration experiment. The Washburn equation describes the position of the wetting front as a function of liquid and porous media properties:

$$h^2 = (R_e t \gamma_L \cos \theta) (2\mu)^{-1} \quad (3)$$

where  $R_e$  (m) is the average pore radius,  $t$  the time (s),  $h$  (m) the height of capillary rise of the wicking liquid,  $\mu$  ( $\text{N s m}^{-2}$ ) the viscosity of the liquid,  $\theta$  the contact angle between the liquid and the solid and  $\gamma_L$  ( $\text{mJ m}^{-2}$ ) is the liquid surface energy. The mean pore radius was estimated with a liquid such that  $\cos \theta = 1$  (i.e. hexadecane). Next, measurements were made with three liquids to obtain three values of  $\theta$  and Eq. (1) was used to calculate the components of the surface tension of the solid. For each liquid, ten measurements were carried out. For each experiment, the contact angle is calculated by fitting Eq. (1) to experiments. Our setup was made of small glass tubes ( $L = 10$  cm,  $\varnothing = 0.5$  cm) filled with the sand. The weight of the liquid absorbed by the sand was measured as a function of time to obtain the liquid capillary rise velocity.

$\zeta$  potentials (V) of bacteria were determined by micro-electrophoresis using a Zetaphoremeter model (II) (CAD Instrumentation, Limours, France). The electrophoretic mobility was measured with the bacteria collected after overnight culture, suspended in a 0.01 M NaCl of pH 7 solution at room temperature. Bacterial cells were placed in a measurement cell under a microscope equipped with a CCD camera. Their displacements in response to an applied electric field of  $8 \text{ V cm}^{-1}$  were recorded and the velocity of individual cells was calculated. The  $\zeta$  potentials were calculated with the conventional Smoluchowski theory for each cell. The displacements of about one hundred cells were recorded at each measurement. For each strain, the experiment was made three times from separate cultures. The electro kinetic properties of the sand were measured by a streaming potential analyzer ZetaCad (CAD Instrumentation, Limours, France) in a 0.01 M NaCl of pH 7 solution. The zeta potential was calculated from the streaming potential experiments as described by Elimelech et al. [37].

### 2.3. Evaluation of hydrophobicity: MATS method

The MATS method has been described in detail previously [38]. Briefly this method is based on the comparison between microbial affinity to a monopolar solvent and a apolar solvent. The two solvents must have the same Lifshitz–van der Waals component of surface energy. The monopolar solvent can be either acidic (electron acceptor) or basic (electron donor). *n*-Alkane solvents have neither electron donor nor electron acceptor properties. The following pairs of polar and non-polar solvents were selected on the basis of the MATS method requirements:

- Chloroform, an acidic solvent (electron acceptor) and hexadecane, an *n*-alkane.
- Ethyl acetate, a strongly basic solvent (electron donor) and decane, an apolar solvent.

All solvents used in this study were obtained from Sigma–Aldrich (MO, USA) and were of the highest purity grade (99.9%). The surface properties of the liquids used in this study are listed in Table 2. The MATS method was performed in a high ionic strength solution to avoid the influence of electrostatic interactions [38]. Experimentally, 2.4 ml of a 0.1 M potassium phosphate buffer was vortex-mixed with 0.4 ml of the solvent under investigation for 90 s. To ensure complete separation of the two phases the mixture stands at rest for 15 min before a sample of 2 ml was removed from the aqueous phase and its absorbance measured at 400 nm. The affinity of microbial cells to a solvent was calculated by

$$\% \text{adhesion} = \left( \frac{1 - A}{A_0} \right) \times 100 \quad (4)$$

where  $A_0$  is the absorbance of the aqueous phase at 400 nm before mixing and  $A$  is its absorbance after mixing.

### 2.4. Kinetic of bacterial cells adhesion to sand

The experimental setup consisted in a small Plexiglas column ( $\varnothing = 18 \text{ mm}$ , length = 33 mm) filled with the sand. For all the experiments and strains, the column was filled with 13.38 g of dry sand leading to a porosity of 0.4. Next the column was saturated with sterilized water (0.01 M NaCl of pH7) (3.4 mL). Physical factors (porosity, flow rate, temperature) and chemical factors (ionic strength, pH) remained constant for all the experiments. Bacterial cells were collected during the stationary growth stage, centrifuged for 5 min at 5000 rpm and suspended in a sterile 0.01 M solution of NaCl with pH = 7. Prior to use, 10 ml of solution (0.01 M NaCl, pH = 7) with bacterial concentrations in the range of  $10^6$  to  $10^7$  cells  $\text{ml}^{-1}$  was prepared. Circulation of this bacterial solution in a closed loop through the column was obtained by mean of a peristaltic pump Ismatec SA reglo digital MS-4 (Switzerland). The flow rate was  $3.5 \text{ mL min}^{-1}$  which allowed a mean residence time in the column lower than 1 min. Consequently, the bacterial concentration in the solution could be assumed uniform throughout the column and hydrodynamic effects could be ignored. Bacterial concentration in the batch solution was measured by taking 0.5 ml samples at the following times during the experiment: 0, 1, 2, 4, 6, 8, 10, 15, 20 and 30 min. Each sample was stained with a nucleic acid dye (Bacterial counting kit, B-7277, Molecular Probes) for flow cytometer enumeration. The flow cytometer (Beckman Coulter, EPIC XL) settings were as follows: excitation source 488 nm, fluorescence detection on FL1 channel (emission 510–530 nm), analysis time 1 min, no compensation was used.

### 2.5. Adsorption study: batch adhesion tests

Because physical straining can be an important factor in bacterial retention by porous media, we also carried out adsorption tests where filtration could not occur. The same settings were used as in the column experiments: 13.68 g of sand was mixed for 30 min with 10 ml of a bacterial solution in 50 ml Falcon<sup>®</sup> tubes. This solution (0.01 M NaCl, pH = 7) had a bacterial concentration of about  $10^7$  cells  $\text{ml}^{-1}$ . Tubes were placed horizontally in an orbital shaker running at 60 rpm. A control was prepared as for the samples described above but without the sand. Cell counting using the cytometer (as described in the column experiments section) was performed at the beginning and at the end of the experiment.

## 3. Theory

### 3.1. The free energy of interaction

$\Delta G_{y_0}^{\text{LW}}$  and  $\Delta G_{y_0}^{\text{AB}}$  are the Lifshitz–van der Waals and Lewis acid/base free energy of interaction between the bacteria (1) and a sand grain (2) immersed in water (3) at closest approach ( $y_0$ ).  $\Delta G_{y_0}^{\text{LW}}$  can be calculated with the following equation:

$$\Delta G_{y_0}^{\text{LW}} = -2 \left( \sqrt{\gamma_3^{\text{LW}}} - \sqrt{\gamma_2^{\text{LW}}} \right) \left( \sqrt{\gamma_3^{\text{LW}}} - \sqrt{\gamma_1^{\text{LW}}} \right) \quad (5)$$

and  $\Delta G_{y_0}^{AB}$  can be evaluated by

$$\Delta G_{y_0}^{AB} = 2 \left( \sqrt{\gamma_1^+ \gamma_3^-} + \sqrt{\gamma_2^+ \gamma_3^-} + \sqrt{\gamma_1^- \gamma_3^+} + \sqrt{\gamma_2^- \gamma_3^+} - \sqrt{\gamma_1^+ \gamma_2^-} - \sqrt{\gamma_1^- \gamma_2^+} - 2\sqrt{\gamma_3^+ \gamma_3^-} \right) \quad (6)$$

The electrostatic interaction free energy as a function of distance  $y$  between a spherical bacterium (1), and a flat plate sand grain (2), immersed in water (3) can be calculated from the following equation [28]:

$$\Delta G_{132}^{EL}(y) = \pi R \varepsilon_r \varepsilon_0 \left( 2\psi_{01} \psi_{02} \ln \left( \frac{1 + e^{-ky}}{1 - e^{-ky}} \right) + (\psi_{01}^2 + \psi_{02}^2) \ln(1 - e^{-2ky}) \right) \quad (7)$$

where  $\varepsilon$  and  $\varepsilon_0$  are the relative dielectric permittivity of water (78.55 at 25 °C) and permittivity under vacuum ( $8.854 \cdot 10^{-12} \text{ C m V}^{-1}$ ), respectively,  $R$  the bacterial radius (m),  $1/\kappa$  the Debye–Hückel length,  $y$  the distance between the spherical bacterium and the flat plate sand grain (m), and  $\psi_{01}$  and  $\psi_{02}$  are the potentials at the bacterial and the sand surfaces estimated by [35]:

$$\psi_0 = \zeta \left( \frac{1+z}{R} \right) e^{\kappa z} \quad (8)$$

with  $\zeta$  is the zeta potential (V) measured at the slipping plate,  $z$  the distance measured from the particle surface to the slipping plate (m) and  $R$  is the radius of the particle. The length  $z$  is generally of the order of 0.5 nm [35]. The Debye–Hückel length (or double layer thickness),  $\kappa^{-1}$  value is 3.2 nm in a 0.01 M solution of a 1:1 salt which was used here. EL interactions were calculated at a distance of 6.4 nm corresponding to the electric double layers of both the sand grains and the bacterial cell.

### 3.2. Modelling the batch experiment

Several approaches have been used when modeling cells adsorption on a solid. The filtration theory has been widely used [12,28]. This approach assumes that the rate of bacterial cells deposition on the solid is proportional to the cell concentration in the fluid. The deposition coefficient incorporates porous media characteristics, flow velocity and cells surface properties by means of a collision efficiency factor. This model assumes irreversible adhesion of cells. Transport models incorporating the filtration model, also use a retardation factor which means that instantaneous and reversible adsorption sites are also present [12,28]. So, these models are in fact two-sites type models with one type of sites being kinetic and irreversible and the other type being instantaneous and reversible. Chen et al. [34] used a model with a retardation factor and with reversibility of adsorption for kinetic sites. In their model, the first-order rate coefficient is identical for adsorption and detachment.

In our case, we suppose that adsorption occurs only on sites for which adsorption is kinetic and reversible. At any time the

following mass balance equation is verified:

$$(V_p + V_b)C(t) + MS(t) = C_0 V_b \quad (9)$$

where  $C(t)$  (cells  $\text{ml}^{-1}$ ) is the concentration in the aqueous phase,  $S(t)$  the concentrations of bacteria immobilized on the solid ( $\text{cell g}^{-1}$ ),  $M$  (g) the amount of solid,  $V_p$  (ml) the volume of solution in the porosity of the small column initially free of cells and  $V_b$  (ml) is the external volume of solution containing the cells at the beginning of experiments.  $C_0$  is the initial concentration of the batch solution. Upon derivation of Eq. (9) with respect to time one has

$$V_t \frac{dC}{dt} + M \frac{dS}{dt} = 0 \quad (10)$$

where we noted  $V_t = V_p + V_b$ . Assuming that deposition of bacteria on the solid is reversible and obeys a first-order equation we have

$$\frac{dS}{dt} = \omega(kC - S) \quad (11)$$

where  $\omega$  ( $\text{h}^{-1}$ ) is the first-order rate constant and  $k$  ( $\text{cm}^3 \text{g}^{-1}$ ) is the partition constant. From Eq. (9), the following expression for  $S$  is obtained:

$$S(t) = \frac{V_b C_0}{M} - \frac{V_t}{M} C(t) \quad (12)$$

Using Eqs. (11) and (12) in Eq. (10) we get the following ordinary differential equation relating the changes of the concentration in the solution to the adsorption process:

$$\frac{dC}{dt} = -\frac{A}{V_t} C(t) + \frac{B}{V_t} \quad (13)$$

with  $A = \omega(V_t + kM)$  and  $B = \omega V_b C_0$ . The solution of this equation is then:

$$C(t) = \left( C_0 - \frac{B}{A} \right) e^{-At/V_t} + \frac{B}{A} \quad (14)$$

The solution was used with a least-squares minimization algorithm to evaluate parameters  $\omega$  and  $k$ .

## 4. Results

### 4.1. Zeta potential

All strains showed negative  $\zeta$ -potentials in these conditions but varied from  $-0.5$  to  $-48 \text{ mV}$  (Table 3). Most  $\zeta$ -potentials determined here are in agreement with those reported in other studies. In general bacterial cells are negatively charged in a low ionic solution of pH 7. It is well known that  $\zeta$ -potentials of living cells are modified by ionic strength [39,40] and/or the pH [41,42] of the environment but this was not investigated in our study. No significant differences were observed between Gram positive and Gram negative cells although some gram positive bacteria were the only to show  $\zeta$ -potentials close to zero.

Table 3  
The surface free energies components and zeta potentials for the bacterial strains studied and the sand

Strains	$\zeta$ (mV)	S.D. $\zeta$	$\gamma^+$	$\gamma^-$	$\gamma^{LW}$	$\Delta G^{LW}$	$\Delta G^{AB}$	$\Delta G^{EL}$	$\Delta G^{AB+LW}$	Col <sup>a</sup>	Adh <sup>a</sup>	$k$	$\omega$ (h <sup>-1</sup> )
<i>Azospirillum lipoferum</i> Sp59b <sup>T</sup>	-11.15	0.36	2.78	53.59	31.74	-0.63	10.42	1.29	9.78	78.5	52.0	4	10
<i>Azospirillum brasilense</i> Sp7 <sup>T</sup>	-15	0.43	2.74	53.48	32.07	-0.65	10.36	1.71	9.70	88.0	54.7	6	7.56
<i>Bacillus cereus</i> LMG69	-27.25	1.28	1.35	51.45	36.81	-0.92	8.97	4.93	8.05	95.0	0.0	22	5.25
<i>Bacillus subtilis</i> LMG	-31.5	0.90	0.80	56.00	44.60	-1.32	10.60	3.76	9.28	95.0	0.0	37	4.23
<i>E. coli</i> K-12 PHL565gfp	-48.86	0.37	0.98	54.18	38.28	-1.00	9.94	5.67	8.95	29.0	3.5	1	2.33
<i>E. coli</i> K-12 PHL1314	-44.5	0.99	0.72	51.98	40.34	-1.10	8.86	6.30	7.76	23.4	0.0	1	2.18
<i>L. lactis</i> NDCO2118	-14.52	0.93	1.53	50.00	35.99	-0.87	8.42	1.65	7.54	46.8	30.8	1	2.68
<i>Pantoea agglomerans</i> ATCC 27155 <sup>T</sup>	-23.45	0.74	0.57	55.51	32.72	-0.69	10.25	2.74	9.56	95.0	44.0	21	9.22
<i>Paenibacillus graminis</i> RSA19 <sup>T</sup>	-23.05	0.68	2.46	54.69	30.78	-0.58	10.77	2.69	10.20	81.0	40.7	4	7.13
<i>Paenibacillus polymycae</i> CF43	-5.6	0.09	1.46	65.15	29.76	-0.52	14.56	0.82	14.05	13.0	0.0	1	9.14
<i>Paenibacillus polymycae</i> SBO3	-5.45	0.15	1.66	63.98	29.51	-0.50	14.20	0.77	13.70	13.0	0.0	1	9.62
<i>Pseudomonas corrugata</i> ATCC 29736 <sup>T</sup>	-14.5	0.83	4.06	55.70	31.00	-0.59	11.67	2.71	11.08	96.0	64.0	35	4.04
<i>Pseudomonas fluorescens</i> AK15	-23.43	0.39	1.37	57.15	36.20	-0.88	11.36	2.19	10.48	95.0	63.9	171	7.11
<i>Rahnella aquatilis</i> ATCC33071 <sup>T</sup>	-25.3	1.22	0.86	56.42	37.45	-0.95	10.81	2.97	9.85	36.0	21.8	1	6.08
<i>S. salivarius</i> JIM8777	-13.96	0.37	2.28	20.23	40.70	-1.12	-7.18	1.63	-8.30	100.0	89.0	1000	9.79
<i>S. salivarius</i> JIM8780	-15.31	0.32	2.18	20.35	41.00	-1.14	-7.14	0.91	-8.27	100.0	89.5	1000	10.21
<i>S. thermophilus</i> CNRZ1066	-3.29	0.41	1.51	42.06	36.73	-0.91	4.79	0.15	3.88	99.1	74.4	635	10.28
<i>S. thermophilus</i> LMG18311	-0.4	0.87	1.68	41.86	36.50	-0.90	4.77	-0.01	3.87	97.6	74.0	184	10
<i>S. thermophilus</i> JIM8732	-27.64	0.32	2.26	22.28	39.04	-1.04	-5.82	0.00	-6.85	100.0	91.2	802	13.68
<i>S. thermophilus</i> JIM8752	-2.44	0.30	1.72	47.20	36.73	-0.91	7.26	-0.02	6.34	100.0	76.0	794	12.7
<i>S. thermophilus</i> JIM8749	-1.11	1.24	1.34	52.77	37.01	-0.93	9.53	0.26	8.60	98.6	72.0	664	8.48
Porous media sand	-42.11		3.85	20.4	24.97								

Results for free energies of interaction between bacteria and sand are listed as  $\Delta G^{LW}$ ,  $\Delta G^{AB}$ ,  $\Delta G^{EL}$  and  $\Delta G^{AB+LW}$  (mJ m<sup>-2</sup>). Results for column experiments, batch adhesion tests and fitted parameters from the model are, respectively, listed as Col, Adh,  $k$  and  $\omega$ .

<sup>a</sup> "Col" and "Adh", respectively, corresponds to the percentage of cell adhesion in the Column experiments and the Adhesion tests.  $\gamma^+$ ,  $\gamma^-$ ,  $\gamma^{LW}$ ,  $\Delta G^{LW}$ ,  $\Delta G^{AB}$ ,  $\Delta G^{LW+AB}$  and  $\Delta G^{EL}$  are expressed in mJ m<sup>-2</sup>.  $k$  is the partition constant at equilibrium (cm<sup>3</sup> g<sup>-1</sup>).

#### 4.2. Hydrophobic and hydrophilic character of bacterial cells

Fig. 1 presents the adhesion of bacterial cells to various solvents-interfaces obtained with the MATS method. Most of the strains studied showed higher affinity for chloroform than for hexadecane whereas their adhesion to ethyl acetate was generally very low. Thus these results indicated that the microbial cells surfaces were strongly electron donating and weakly electron accepting, leading to the concept of "monopolar surfaces" [43]. Only four strains (i.e. *S. salivarius* JIM8780 and JIM8077, *S. thermophilus* JIM8032 and *P. corrugata*) adhered strongly to hexadecane and to decane and appeared to be very hydrophobic. Several strains (i.e. *Bacillus cereus* and *Bacillus subtilis*, *Lactococcus lactis* NDCO2118 as well as *Paenibacillus polymycae* CF43 and SB03) had very low affinity for all the hydrophobic solvents used in this study which means that their cell surface were the most hydrophilic of all the strains studied. The bacterial strains studied were mainly hydrophilic as they adhered less than 40% to the non-polar solvents used.

#### 4.3. Bacterial and sand thermodynamic properties

Bacterial and sand surface thermodynamic properties obtained with the contact angle measurements and the wicking method are listed in Table 3. Most of the strains showed a strong electron donating character with high  $\gamma^-$  values around 50 mJ m<sup>-2</sup> and with a small  $\gamma^+$  electron acceptor component. These results are in agreement with the concept of monopolar particles which is often used to qualify bacterial cells. Both *S. salivarius* strains and *S. thermophilus* JIM8732 appeared to be hydrophobic according to the contact angle measurements. This is also in agreement with the results of the MATS method. A biological surface is considered to be hydrophobic when both electron donating and accepting characters  $\gamma^-$  and  $\gamma^+$  are greater or lesser than those of water (i.e.  $\gamma_{\text{water}}^- = \gamma_{\text{water}}^+ = 25.5$  mJ m<sup>-2</sup>) [26]. Only *P. corrugata* which is hydrophobic according to our MATS results appeared as hydrophilic with the contact angle experiments. Sand from Fontainebleau (South Paris, France) is composed of quartz particles and was slightly hydrophilic (Table 3).

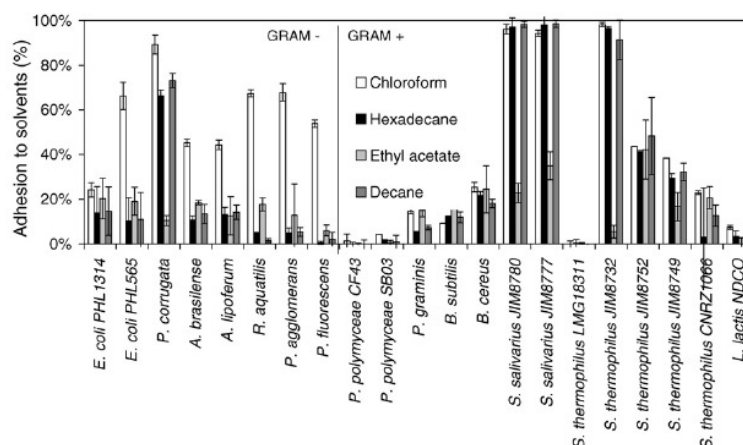


Fig. 1. Results for the MATS method obtained with chloroform (white), hexadecane (black), ethyl acetate (grey light) and decane (grey). The standard deviation (bars) was calculated from 4 measurements realized on two independent cultures. Gram negative bacteria are presented on the left, Gram positive bacteria are on the right. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of the article.)

Free energy of interaction between bacterial cells and the sand was estimated using Eqs. (5)–(7) in order to calculate the LW, AB and EL components (Table 3). LW interactions showed negative values for all the bacterial strains and therefore contribute to bacterial adhesion to the sand. Interestingly only the hydrophobic cells showed negative  $\Delta G^{AB}$  values in contrast with hydrophilic strains which showed positive AB interactions. The addition of LW and AB interaction at 0.157 nm (distance of closest approach according to Van Oss [35]) was noted as  $\Delta G^{LW+AB}$ . As it can be seen from Table 3,  $\Delta G^{LW+AB}$  varied from  $-8.30$  to  $14.05 \text{ mJ m}^{-2}$ . Hydrophobic strains (*S. thermophilus* JIM8732, and both *S. salivarius* JIM8780 and JIM8777) were the only bacteria with negative  $\Delta G^{LW+AB}$  values in the range  $-8.30$  to  $-6.85 \text{ mJ m}^{-2}$ .  $\Delta G^{EL}$  calculated at 6.4 nm (Eq. (5)) was nearly always positive (ranging from 0 to  $6.30 \text{ mJ m}^{-2}$ ) which promoted repulsion between the cells and the sand.

#### 4.4. Batch experiments

Fig. 2 shows three contrasted examples of measured bacterial cell log concentrations during the column experiments as a function of time and their respective reproductions by the model. For all the strains, concentrations displayed kinetics similar to those presented. Differences between strains are: i/ the rate of concentration decrease in the solution (parameter  $\omega$  in the model) and ii/ the concentration reached when the steady state is achieved (parameter  $k$  in the model). Some species disappeared nearly completely from the solution (e.g. *S. salivarius* JIM8777, *S. salivarius* JIM8780, all of the *S. thermophilus* strains). Others species reached an equilibrium concentration larger than 0.

Fitting the parameters  $k$  and  $\omega$  in Eq. (14) provided a good restitution by the model of observations whatever the species. Fitted parameters are given in Table 3. The higher the value of  $k$  the more bacteria were retained by the sand matrix. The parameter  $k$  varied from  $0.54$  to  $1000 \text{ cm}^3 \text{ g}^{-1}$ . Hydrophobic

strains showed the highest  $k$  values (from  $802$  to  $1000 \text{ cm}^3 \text{ g}^{-1}$ ) while bacteria with zeta potentials close to zero showed  $k$  values from  $170$  to  $796 \text{ cm}^3 \text{ g}^{-1}$ . Hydrophilic strains with zeta potentials under  $-5 \text{ mV}$  showed  $k$  values lower than  $40 \text{ cm}^3 \text{ g}^{-1}$  (except *P. fluorescens*). Thus the hydrophobic strains were the best retained by the sand, followed by low charged cells while hydrophilic cells with low zeta potentials adhered the least to the porous media.

Parameter  $\omega$  represents the first-order rate constant for the retention process. The higher  $\omega$  the faster bacteria adhered to the sand matrix. Values for  $\omega$  varied from  $2.18$  to  $13.68 \text{ h}^{-1}$  (Table 3). The largest  $\omega$  values, i.e. strains that adhered the fastest, corresponded to bacteria that have the largest  $\zeta$ -potentials (*A. lipoferum* for example), while strains with the lowest  $\zeta$ -potentials (*E. coli* for example) were retained more slowly.

As predicted with the XDLVO theory hydrophobic and/or low charged bacteria are better retained by the sand matrix than highly negatively charged hydrophilic bacteria. However according to our results  $\Delta G^{\text{TOT}}$  ( $\Delta G^{AB} + \Delta G^{LW} + \Delta G^{EL}$ ) was

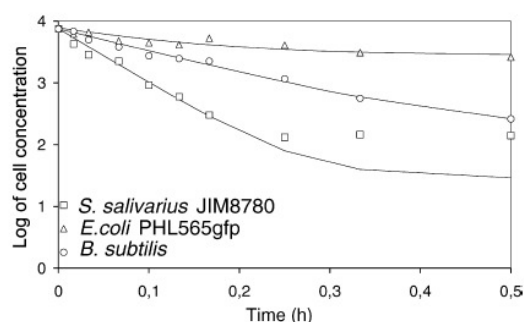


Fig. 2. Three contrasted examples of evolution of the bacterial cell concentration in the batch solution. Experimental results are respectively represented by the squares (*S. salivarius* JIM8780), circles (*B. subtilis*) and triangles (*E. coli* PHL565gfp). Full lines correspond to the fitted models of each strain.

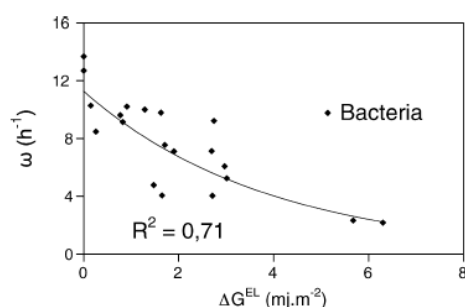


Fig. 3. Correlation between potential zeta (mV) and the first-order rate constant  $\omega^{-1}$  (min). Curve shows the correlation for the eye.

always positive (i.e. repulsive) for hydrophilic cells which mean that adhesion on the sand matrix should theoretically never happen. Despite this repulsive energy barrier adhesion to sand of hydrophilic cells occurred in both batch adhesion tests and column experiments which is discussed in detail in the Discussion section.

#### 4.5. Correlations

We looked for correlations between the bacterial/sand thermodynamic properties (variables  $\Delta G^{LW+AB}$  and  $\Delta G^{EL}$ ) and the adhesion percentage and  $\omega$  (rate of adhesion) obtained from columns and adhesion tests experiments. A significant corre-

lation was found between  $\omega$  and  $\Delta G^{EL}$  ( $R^2 = 0.71$ ,  $p < 0.0001$ ) (Fig. 3): low zeta potentials of both bacterial cells and sand particles resulted in higher  $\Delta G^{EL}$  values (i.e. the electrostatic barrier) which delayed adhesion with lower  $\omega$  values (rate of adhesion).

Fig. 4A shows the relation between the percentage of adhesion and  $\Delta G^{LW+AB}$  for both types of adhesion experiments (column and batch). From Fig. 4A: most bacterial strains showed similar  $\Delta G^{LW+AB}$  around  $10 \text{ mJ m}^{-2}$  but very different adhesion behaviours. Both *P. polymycea* CF43 and SB03 had the highest  $\Delta G^{LW+AB}$  values ( $14 \text{ mJ m}^{-2}$ ) and the lowest adhesion percentage to sand, whereas the *S. salivarius* strains and *S. thermophilus* JIM8732 strains had the lowest  $\Delta G^{LW+AB}$  (around  $-8 \text{ mJ m}^{-2}$ ) and the highest adhesion percentage. So it seems that only extreme values of  $\Delta G^{LW+AB}$  influence significantly the adhesion. Interestingly, the  $\zeta$ -potentials enabled to explain adhesion percentage differences among the bacterial cells displaying similar  $\Delta G^{LW+AB}$  values. In Fig. 4B the zeta potential of the 14 strains with similar  $\Delta G^{LW+AB}$  values was plotted with their respective adhesion percentages in both adhesion and column experiments. The zeta potential was well correlated with the adhesion percentage obtained from the batch adhesion experiments ( $R^2 = 0.77$ ,  $p < 0.0001$ ), despite a less significant correlation with the results obtained from the small column experiments ( $R^2 = 0.37$ ,  $p < 0.0001$ ).

### 5. Discussion

#### 5.1. Adhesion percentage

Our hydrophobic strains have a negative total energy of interaction with the solid and display a high percentage of adhesion. This is in agreement with the extended DLVO theory and with Van Oss [15] who pointed out the importance of “hydrophobic attraction” between hydrophobic and hydrophilic surfaces in aqueous media. The calculated total energy of interaction was positive for all our hydrophilic bacteria. Although adhesion of hydrophilic cells on sand occurred in our experiments, which do not agree with the theory, we noted these bacterial strains had less affinity for the sand than the hydrophobic strains. Similar results have been observed in other studies [44,45] Hence, our results show that, for strains with negative and low  $\Delta G^{AB}$  values bacterial adhesion is eased, whereas a positive high  $\Delta G^{AB}$  obstructs bacterial adhesion to the sand matrix but without fully preventing it (Fig. 4A). Retention of bacteria in porous media under unfavourable conditions has already been observed for particular strains [46]. Several mechanisms have been proposed to explain this: straining, solid particle roughness effects, retention in a secondary energy minimum or heterogeneity of the population.

#### 5.2. Straining

According to Bradford et al. [47] filtration occurs when particle diameter is higher than  $5 \times 10^{-3}$  times the mean diameter of porous media grains. Using this criteria with our porous material, bacterial cells with a diameter smaller than  $1.5 \mu\text{m}$  should

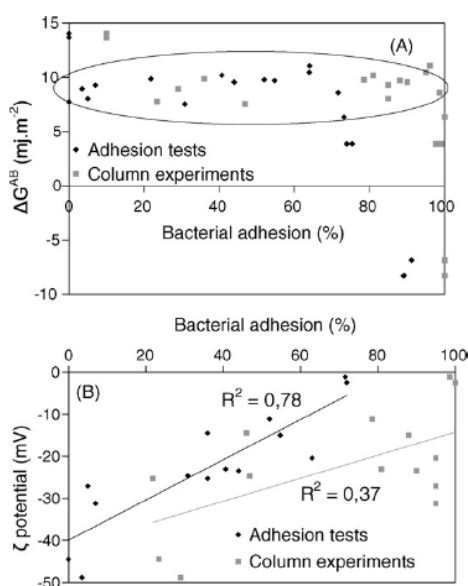


Fig. 4. (A)  $\Delta G^{AB}$  as a function of bacterial adhesion (%) on sand during the adhesion tests (black boxes) and the column experiments (grey squares). Bacteria with similar  $\Delta G^{AB}$  values are represented inside the circle. (B)  $\zeta$  potential (mV) as a function of bacterial adhesion (%) on sand during the adhesion tests (black boxes) and the column experiments (grey squares) for bacteria with similar  $\Delta G^{AB}$  values. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of the article.)



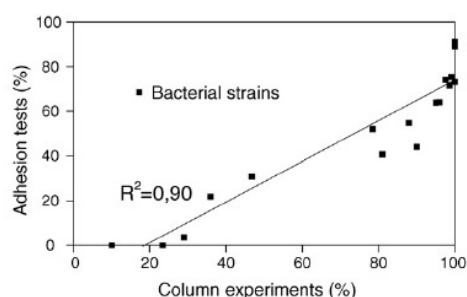


Fig. 5. Correlation (linear regression) between the results obtained with adhesion tests and the column experiments. Note that the results for the *Bacillus* strains are not included as those bacteria were likely retained by filtration during the column experiments.

not be strained. *Bacillus* strains set apart, all the bacteria studied were thinner than  $1.5\ \mu\text{m}$  (Table 1) and thus filtration should be minimal. Some of our cells are rod shaped and as long as  $5\ \mu\text{m}$ . Previous studies report filtration for long rod-shaped cells [10,25]. However, in our case, we observed that rod shaped cells such as *P. polymycae* strains ( $5\ \mu\text{m}$  long and  $1\ \mu\text{m}$  thick) were very little retained in our column experiments. Thus we think that filtration should be negligible for any smaller cells, which is the case for all of the other strains used except the *Bacillus* strains. For the largest bacteria (i.e. the *Bacillus* strains were  $5\text{--}10\ \mu\text{m}$  long and  $1.5\text{--}2\ \mu\text{m}$  thick) filtration might have occurred and be the main cause for retention. In deed, *Bacillus subtilis* and *Bacillus cereus* did not stick to sand particles in the batch adhesion tests but 95% of the cells were retained in the column experiments. Not considering *Bacillus* strains for which straining was important, adhesion percentages measured with the two methods for all others bacteria are linearly correlated with a determination coefficient of 0.9 (Fig. 5). The good correlation found between the adhesion and column experiments for the adhesion percentage suggests that filtration was certainly not the main factor for bacterial retention in our column experiments.

Still the adhesion percentage was always higher in the column experiments than in the batch adhesion tests (Table 3). We believe that enhanced collision efficiency in the column experiments (bacterial cells travelled through the column about 30 times increasing probability to encounter sand grain surfaces) and several porous media related effects such as wedging (discussed hereafter) may explain the better adhesion evidenced in the column experiments. So, i/ our observations are consistent with the results predicting filtration from the size of soil particles and cells (Bradford et al.) and ii/ the comparison of the two types of experiment allows to conclude that, for all the strains except the largest, retention of cells in the porous media is not due to filtration.

### 5.3. Nanometer and micrometer roughness of sand particles

Some authors pointed out the effect of surface roughness (nanometer scale) on DLVO calculations [48–50]. In our calculations of the free energy of interaction, we considered the

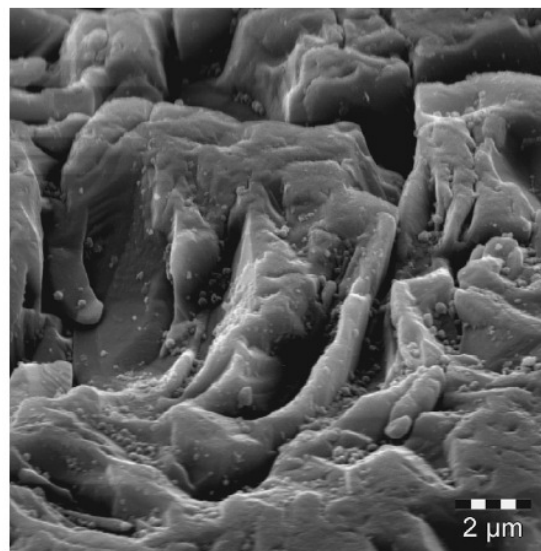


Fig. 6. Roughness of a Fontainebleau sand grain used in this study. Observation performed with a scanning electron microscope. “Caves” and “valleys” on bacterial cell scale are possible locations where bacteria can be trapped inside and prevent their transport.

bacterial cells as perfectly smooth spheres and the sand grains as flat planes as assumed by the XDLVO theory. Hoek and Agarwal [49] found that surface roughness causes significant reduction in the repulsive (or attractive) interaction energy. Surface heterogeneities create greater particle-substrate separation distance which causes the reduction of interaction energy. The authors concluded that because the generally attractive LW interactions are stronger at long range, (where both AB and EL interactions are negligible or null) rough surfaces might be favorable for colloid deposition.

Moreover mechanical trapping of cells by sand grains interstices during the column experiments are possible phenomena that may explain bacterial retention on the sand matrix without involvement of XDLVO interactions [51]. Sand grain topography on a microscopic scale (i.e. bacterial cell scale) is made of “valleys” and “caves” as it can be seen from Fig. 6. Bacteria may be blocked inside these asperities. Cells might also be trapped by sand grain-grain junction as Bradford et al. recently pointed out [52]. Also, Johnson and colleagues simulated colloids behaviour at a microscale in a porous media by means of a model accounting for the various forces experienced by the particles [53]. They showed that colloid retention in presence of an energy barrier could happen due to wedging and retention in zones of flow stagnation [53]. The better adhesion found in our column experiments (compared to the adhesion tests) might be explained by their findings (Fig. 5).

### 5.4. Secondary energy minimum

Redman et al. pointed out the importance of LW interactions in bacterial transport through porous media [46]. LW interac-

tions are generally negative (i.e. attractive) long range forces that can act up to 25 nm from the surface which provide the secondary minimum where bacteria can be “trapped”. At such distances AB interactions are null and EL interactions negligible. The calculated secondary energy minimum for our conditions (porous medium, cells and ionic strength) are located at about 30 nm from the solid surface and range from  $-0.2$  to  $-1$  kT with most values close to  $-0.5$  kT which is of about  $(2 \times 10^{-21} \text{ mJ m}^{-2})$ . These values are low and similar to values calculated by Redman et al. for *E. coli* at an ionic strength of 0.01 M. In such conditions Redman et al. observed a high percentage of detachment when a 0.1 mM solution was applied [46]. They attributed this high percentage of detachment to the retention of their cells in the secondary minimum. To evaluate to which extent retention of our cells was due to secondary minimum, we selected five bacteria with surface charges spanning the whole range of our set of strains: *E. coli* ( $-48$  mV), *R. aquatilis* ( $-25.3$  mV), *A. brasilense* ( $-15$  mV), *S. salivarius* JIM8777 ( $-14$  mV) and *S. thermophilus* CNRZ1066 ( $-3.2$  mV) to carry out detachment experiments. At the end of the attachment mini-column experiments, the solution was removed and replaced by milliQ water which was circulated through the columns for 30 min after what the concentration of cells in the solution was measured. These experiments showed that the amount of cells detached amounted to 25, 10 and 12% of previously attached cells for *E. coli*, *R. aquatilis* and *A. brasilense*, respectively. These percentages are significantly lower than those obtained by Redman et al. with a strain displaying a surface charge similar to ours. Due to very weak electrostatic repulsion, the low charged bacteria *S. thermophilus* CNRZ1066 ( $-3.2$  mV) was not detached when the ionic strength was lowered. *S. salivarius* JIM8777 displayed negative AB interactions with sand (Table 3) which means it is likely firmly retained in the primary minimum. So the observed absence of detachment was expected and the result is in accordance with the measured characteristics of the strain. In light of these results, we believe that, in our conditions, and the hydrophobic bacteria set apart, retention in the secondary minimum is only the case for a small part of a given population.

### 5.5. Population heterogeneity

Low standard deviations of the measured bacterial zeta potentials (Table 3) (calculated with mean values of different electrophoretic mobility measurements from separate cultures) were obtained which suggest homogeneous electrophoretic characteristics for each strain. However each of our electrophoretic measurements is the average of at least 100 individual bacterial cells. In our case the standard deviation calculated from these individual measurements turned out to be up to 10 mV in some pure cultures (results not shown). Thus the standard deviations shown in Table 3 do not reflect the real  $\zeta$ -potential distribution that can exist within a single strain microbial population. As van der Mei and Busscher [54] pointed out in their mini review the standard deviation calculated from individual electrophoretic cell measurements reflects a high degree of heterogeneity and may reveal the existence of subpopulations within a pure culture. Hence, cells from the same strain prob-

ably experience energy barriers with different intensities when approaching the solid. In consequence only a part of the population may be in conditions favorable for retention. This may also explain different adhesion rates for cells of the same strain during the experiments (Fig. 2).

### 5.6. Rate of adhesion

A correlation ( $R^2 = 0.71$ ,  $p < 0.0001$ ) was found between the  $\omega$  parameter describing the rate of adhesion and the  $\Delta G^{\text{EL}}$  of the strains studied (Fig. 3). This result indicates that high values of  $\Delta G^{\text{EL}}$  can temporally prevent bacterial cells from approaching the solid phase close enough to be trapped. It should be kept in mind that  $\Delta G^{\text{EL}}$  depends on the  $\zeta$  potential of both the cells and the soil and also that the  $\zeta$  potential of the cells is strongly linked to environmental factors such as the pH and the ionic strength of the soil solution. Several studies pointed out that  $\zeta$  potential of living cells is lowered by higher ionic strengths (larger than 0.1 M NaCl) which eliminate the electrostatic barrier. In the same way most bacterial cells have isoelectric points below pH 4.0 [55]. Studies by the same author have shown that anionic groups dominate over cationic groups which mean that an increase of the pH of the environment would increase the  $\zeta$  potential and thus  $\Delta G^{\text{EL}}$ . However in soil environments ionic strengths are very often lower than 0.01 M and the pH is mild. So, in such conditions, electrostatic interactions should remain important and delay bacteria adhesion to the soil matrix, which is favourable to their transport through the porous medium.

## 6. Conclusions

In this study we investigated the influence of cell surface properties on attachment kinetics using the extended DLVO theory. Zeta potential of both the porous media and the bacterial cells played a significant role in bacterial adhesion behaviour through the sand matrix. Low zeta potentials resulted in electrostatic repulsions which delays bacterial adhesion. In such conditions bacterial transport is enhanced. Different adhesion behaviour onto sand between hydrophobic and hydrophilic cells was mainly due to AB interactions. Hydrophobic strains were better retained by the sand matrix than hydrophilic strains. However we could not relate cell retention to the free energy of interaction as calculated with the XDLVO theory. This failure has certainly many origins among which cell trapping by mechanisms in porous media not accounted for by the XDLVO theory. It appears that bacterial adhesion phenomena depends on both physicochemical interactions and porous media related effects.

## Acknowledgements

This study was partly funded by the ADEME (French agency for Environment and Energy control) and the INRA (French National Institute for Agriculture Research). The authors thank E. Moustier for his help during the electrophoretic measurements and I. Bornard for her help providing the SEM pictures of sand grains.

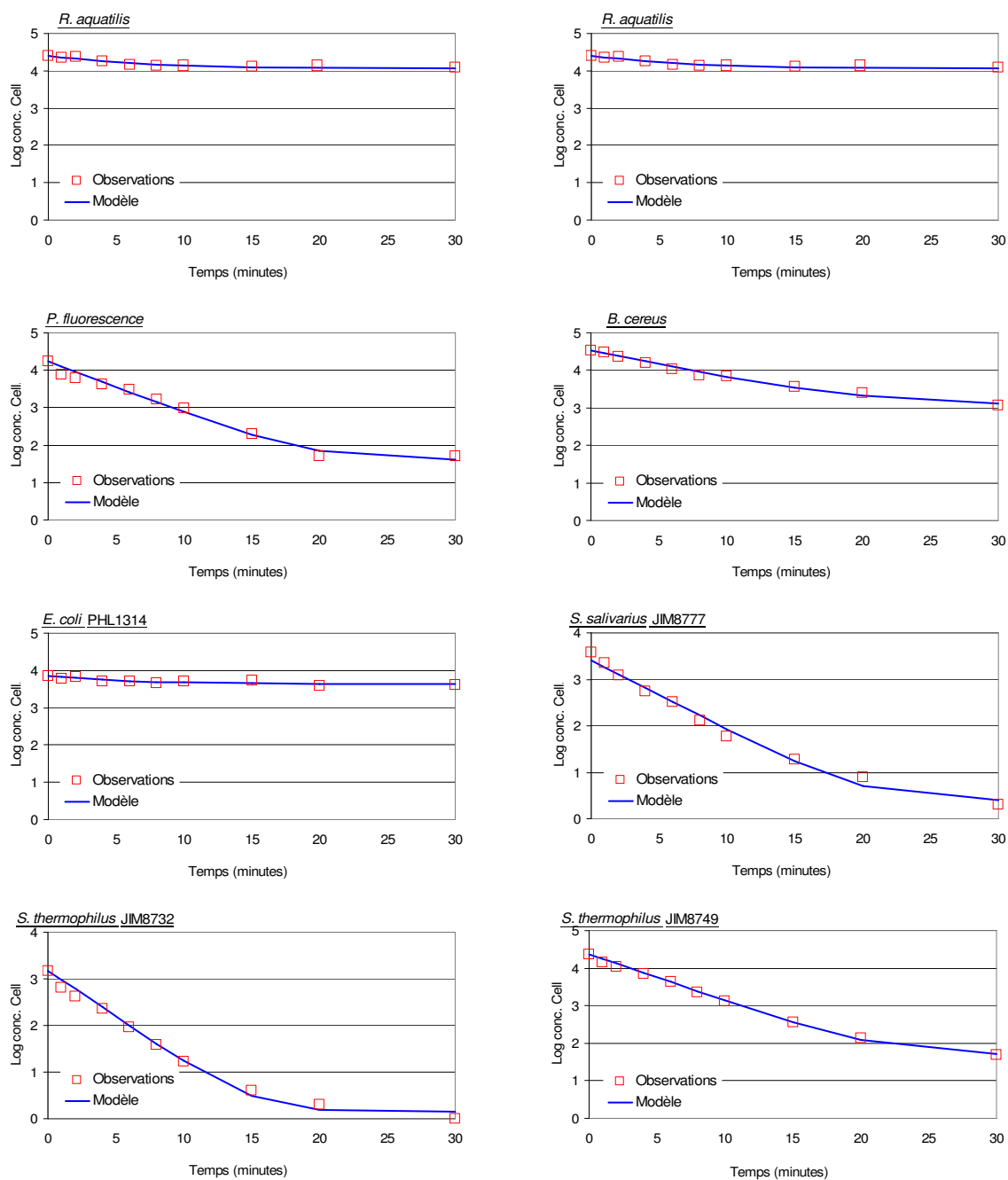
## References

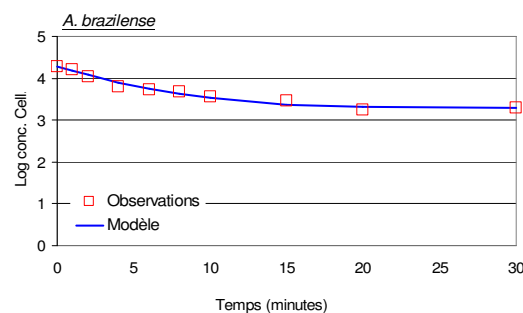
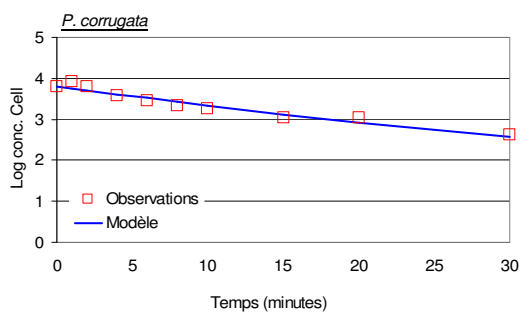
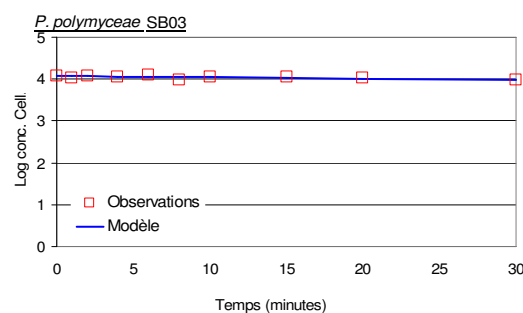
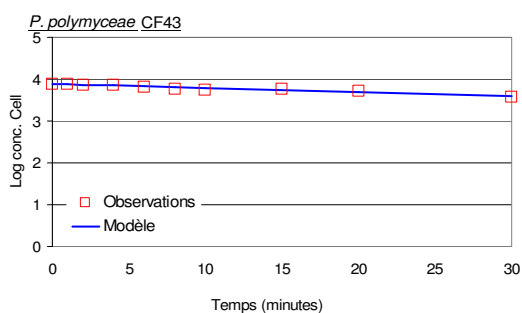
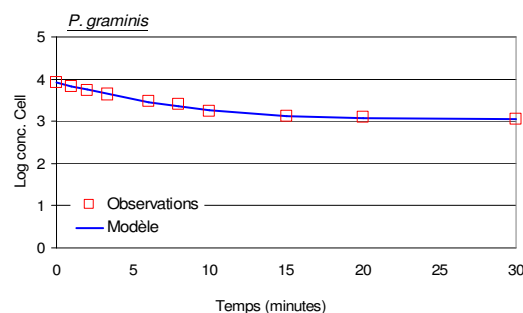
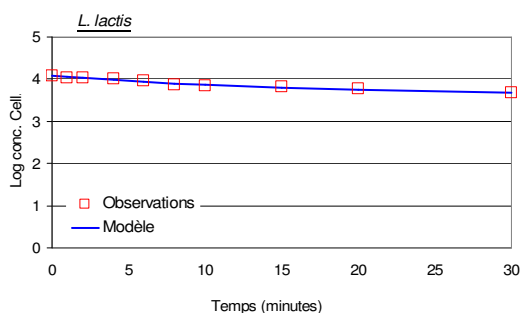
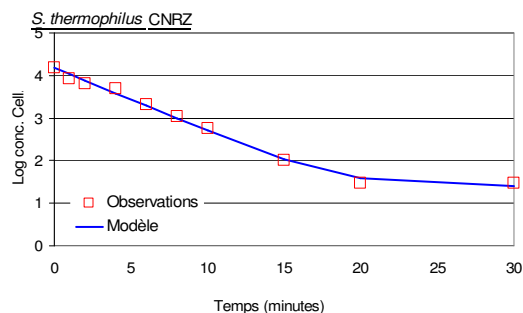
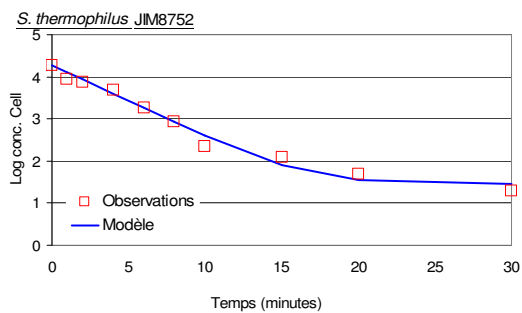
- [1] D.E. Fontes, A.L. Mills, G.M. Hornberger, J.S. Herman, *Appl. Environ. Microbiol.* 57 (1991) 2473.
- [2] R.R.E. Artz, J. Townend, K. Brown, W. Towers, K. Killham, *Environ. Microbiol.* 7 (2005) 241.
- [3] A. Unc, M.J. Goss, *Appl. Soil Ecol.* 25 (2004) 1.
- [4] B.M. Brunninger, D.M.S. Mano, I. Scheunert, T. Langenbach, *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 44 (1999) 154.
- [5] J.F. McCarty, J.M. Zachara, *Environ. Sci. Technol.* 23 (1989) 496.
- [6] S.B. Kim, M.Y. Corapcioglu, *J. Contam. Hydrol.* 59 (2002) 267.
- [7] M.Y. Corapcioglu, S.H. Kim, *Water Resour. Res.* 31 (1995) 2639.
- [8] T. Mattiliasandholm, G. Wirtanen, *Food Rev. Int.* 8 (1992) 573.
- [9] F. Celico, M. Varcamonti, M. Guida, G. Naclerio, *Appl. Environ. Microbiol.* 70 (2004) 2843.
- [10] J.T. Gannon, V.B. Manilal, M. Alexander, *Appl. Environ. Microbiol.* 57 (1991) 190.
- [11] M.C.M. van Loosdrecht, J. Lyklema, W. Norde, A.J.B. Zehnder, *Microb. Ecol.* (1989) 1.
- [12] G. Chen, K.A. Strevett, *Environ. Eng. Sci.* 20 (2003) 237.
- [13] K.C. Marshall, R. Stout, R. Mitchell, *Can. J. Microbiol.* 17 (1971) 1413.
- [14] C.J. van Oss, *Cell Biophys.* 14 (1989) 1.
- [15] C.J. van Oss, *J. Mol. Recognit.* 16 (2003) 177.
- [16] B.F. Smets, D. Grasso, M.A. Engwall, B.J. Machinist, *Coll. Surf. B* 14 (1999) 121.
- [17] C. Gomez-Suarez, J. Pasma, A.J. van der Borden, J. Wingender, H.C. Flemming, H.J. Busscher, H.C. van der Mei, *Microbiology* 148 (2002) 1161.
- [18] N. Iwabuchi, M. Sunairi, H. Anzai, H. Morisaki, M. Nakajima, *Coll. Surf. B* 30 (2003) 51.
- [19] S. Tsuneda, J. Jung, H. Hayashi, H. Aikawa, A. Hirata, H. Sasaki, *Coll. Surf. B* 29 (2003) 181.
- [20] G. Chen, K.A. Strevett, *Coll. Surf. B* 28 (2003) 135.
- [21] M.F. DeFlaun, S.R. Oppenheimer, S. Streger, C.W. Condee, M. Fletcher, *Appl. Environ. Microbiol.* (1999) 759.
- [22] N.I. Abu-Lail, T.A. Camesano, *Environ. Sci. Technol.* 37 (2003) 2173.
- [23] T.A. Camesano, B.E. Logan, *Environ. Sci. Technol.* 32 (1998) 1699.
- [24] M.W. Becker, S.A. Collins, D.W. Metge, R.W. Harvey, A.M. Shapiro, *J. Contam. Hydrol.* 69 (2004) 195.
- [25] T.H. Weiss, A.L. Mills, G.M. Hornberger, J.S. Herman, *Environ. Sci. Technol.* 29 (1995) 1737.
- [26] C.J. Van oss, *Coll. Surf. B* 5 (1995) 91.
- [27] G. Chen, K.A. Strevett, *Environ. Microbiol.* 3 (2001) 237.
- [28] G. Chen, K.A. Strevett, *J. Environ. Eng.* 128 (2002) 408.
- [29] G. Chen, H.L. Zhu, *Coll. Surf. B* 44 (2005) 41.
- [30] S.E. Truesdail, J. Lukasik, S.R. Farrah, D.O. Shah, R.B. Dickinson, *J. Colloid Interface Sci.* 203 (1998) 369.
- [31] B.K. Li, B.E. Logan, *Coll. Surf. B* 36 (2004) 81.
- [32] C.H. Bolster, G.M. Hornberger, A.L. Mills, J.L. Wilson, *Environ. Sci. Technol.* 32 (1998) 1329.
- [33] N. Tufenkji, J.A. Redman, M. Elimelech, *Environ. Sci. Technol.* 37 (2003) 616.
- [34] G. Chen, M. Rockhold, K.A. Strevett, *Res. Microbiol.* 154 (2003) 175.
- [35] C.J. van Oss, *Interfacial Forces in Aqueous Media*, Dekker, New York, 1994.
- [36] D. Grasso, B.F. Smets, K.A. Strevett, B.D. Machinist, C.J. VanOss, R.F. Giese, W. Wu, *Environ. Sci. Technol.* 30 (1996) 3604.
- [37] M. Elimelech, M. Nagai, C.H. Ko, J.N. Ryan, *Environ. Sci. Technol.* 34 (2000) 2143.
- [38] M.N. BellonFontaine, J. Rault, C.J. vanOss, *Coll. Surf. B* 7 (1996) 47.
- [39] H.H.M. Rijnaarts, W. Norde, E.J. Bouwer, J. Lyklema, A.J.B. Zehnder, *Coll. Surf. B* (1995) 5.
- [40] A.R. Shashikala, A.M. Raichur, *Coll. Surf. B* 24 (2002) 11.
- [41] H.C. Vandermei, J. Devries, H.J. Busscher, *Appl. Environ. Microbiol.* 59 (1993) 4305.
- [42] F. Hamadi, H. Latrache, M. Mabrouki, A. Elghmari, A. Outzourhit, M. Ellouali, A. Chtaini, *J. Adh. Sci. Technol.* 19 (2005) 73.
- [43] C.J. van Oss, *Coll. Surf. A* 78 (1993) 1.
- [44] M.C. van Loosdrecht, J. Lyklema, W. Norde, G. Schraa, A.J. Zehnder, *Appl. Environ. Microbiol.* 53 (1987) 1898.
- [45] F. Huysman, W. Verstraete, *Soil Biol. Biochem.* 25 (1993) 83.
- [46] J.A. Redman, S.L. Walker, M. Elimelech, *Environ. Sci. Technol.* 38 (2004) 1777.
- [47] S.A. Bradford, S.R. Yates, M. Bettahar, J. Simunek, *Water Resour. Res.* 38 (2002), Art. No. 1327.
- [48] S. Bhattacharjee, C.H. Ko, M. Elimelech, *Langmuir* 14 (1998) 3365.
- [49] E.M.V. Hoek, G.K. Agarwal, *J. Colloid Interface Sci.* 298 (2006) 50.
- [50] E.M.V. Hoek, S. Bhattacharjee, M. Elimelech, *Langmuir* 19 (2003) 4836.
- [51] N. Tufenkji, G.F. Miller, J.N. Ryan, R.W. Harvey, M. Elimelech, *Environ. Sci. Technol.* 38 (2004) 5932.
- [52] S.A. Bradford, J. Simunek, M. Bettahar, M.T. van Genuchten, S.R. Yates, *Water Resour. Res.* 42 (2006) (Art. No. W12S15).
- [53] W.P. Johnson, X.Q. Li, G. Yal, *Environ. Sci. Technol.* 41 (2007) 1279.
- [54] H.C. van der Mei, H.J. Busscher, *Appl. Environ. Microbiol.* 67 (2001) 491.
- [55] A. van der Wal, W. Norde, A.J.B. Zehnder, J. Lyklema, *Coll. Surf. B* 9 (1997) 81.

### Figures supplémentaires :

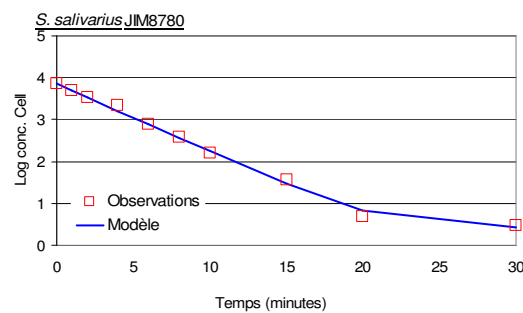
Par manque de place la figure 2 page 108 de l'article ne présente que les résultats du transport en colonne de sable des souches *E. coli* PHL565gfp, *Bacillus subtilis* et *S. salivarius* JIM8780. Les résultats des autres souches sont présentés ici.

**Figure 10** : Figures supplémentaires





La figure 2 de l'article contient des valeurs erronées des résultats de la souche *S. salivarius* JIM8780, la figure en face correspond à la version corrigée :



**Précisions complémentaires :**

Les souches *S. thermophilus* JIM8752, *S. thermophilus* JIM8749 et *S. thermophilus* CNRZ fabriquent des quantités d'EPS différents. Bien que non vérifiées par nos propres soins, selon le laboratoire de provenance (centre INRA Jouy en Josas, Paris, France) les souches JIM8752 (delta *epsE*) et JIM8749 (delta *epsB*) sont des mutants EPS de *S. thermophilus* CNRZ1066. Le mutant *epsE* ne produit pas d'EPS et le mutant *epsB* en produit 2 fois moins que la souche sauvage. Le mutant *epsB* a aussi une taille légèrement plus petite que la souche sauvage. Malgré ces caractéristiques physiologiques différentes, les mutants présentaient un comportement de transport dans le sable et des propriétés de surface presque identiques. Toutefois à cause de l'absence de quantification de la production d'EPS chez ces mutants pendant les expériences aucune interprétation n'a pu être faite.

Il en est de même pour les souches d'*E. coli* dont la quantité de curlis fabriquée est différente : la souche PHL1314 est un mutant (*ompR* 234) de la souche PHL565 et fabrique des curlis en plus grande quantité. Les curlis seraient impliqué dans la formation de biofilms et dans l'adhésion des bactéries sur des cellules épithéliales d'un organisme hôte. Mais l'absence de quantification de la production de curlis pendant les expériences ne permet pas de conclure sur un quelconque effet des curlis.



## Chapitre 3

Impact de la force ionique, des caractéristiques du milieu poreux et des forces de traînées sur le transport d'*E. coli* analysé par imagerie confocale

Le chapitre 3 correspond à un article soumis à la revue Environmental Science and Technology

**Impact of Ionic Strength, drag force and Porous media characteristics on *Escherichia coli* transport analyzed by *in situ* fluorescens time lapse confocal imaging.**

**A. Jacobs, R. Briandet et F. Lafolie**





### **Avant propos**

Le chapitre 2 a montré l'importance des caractéristiques physicochimiques de la surface cellulaire sur l'adhésion et le déplacement de bactéries dans du sable. Les bactéries hydrophiles et fortement chargées négativement sont les mieux transportées. La souche *E. coli* PHL1314 a présenté une des meilleures capacités de déplacement dans le sable parmi toutes les bactéries étudiées. Cette souche sera donc utilisée pour la suite de l'étude d'autant plus qu'il s'agit d'un bon indicateur de contamination fécale. Mais la partie discussion du chapitre 2, tout comme la littérature suggère que les interactions physicochimiques ne sont pas seules à influencer sur le transport bactérien en milieu poreux. De nombreux auteurs supposent également l'importance des phénomènes de blocage des cellules dans une matrice porale et les effets des forces hydrodynamiques. Aussi nous avons voulu mieux comprendre et vérifier le phénomène de blocage physique des cellules dans un milieu poreux en visualisant ce phénomène par des techniques de microscopie confocale. Nous avons ainsi pu observer l'attachement et le détachement des cellules ainsi que leur rétention par blocage physique. L'effet de la morphologie irrégulière des grains de sables sur le transport bactérien a été mis en évidence par comparaison avec des billes de verres parfaitement sphériques. Les forces de traînées hydrodynamiques ont été évaluées et leur influence sur la rétention ou le détachement dans un pore discuté. Enfin nous avons étudié le transport de la souche PHL1314 en présence et en absence d'une barrière électrostatique en variant la force ionique de l'environnement.

## Abstract

Bacterial transport through porous media has received increasing attention because of its implication in drinking water contamination and bioremediation applications. In the present study *Escherichia coli* PHL1314 transport through sand and glass porous media in different ionic strength (IS) was investigated. Competition between electrostatic interactions, Lifshitz-van der Waals (referred as the secondary minimum) and drag forces were analysed. Classical column experiments were complemented by *in situ* confocal microscope observations to visualize bacterial cell behaviour inside the porous media. Both the PHL1314 strain and the porous media used were negatively charged and as a result repel each other. Transport was negligible at  $10^{-1}$ M NaCl while 89% and 95% of the *E. coli* cells were transported at  $10^{-2}$ M NaCl through the sand and the glass matrix respectively. In  $10^{-1}$ M solution the secondary minimum is stronger (-3.69kT) than the minimum drag forces (3.31kT) creating favourable conditions for bacterial retention. On the contrary in lower ionic environment the secondary minimum is weakened and bacterial retention is less likely. Decreasing the IS by injecting successively lower ionic solutions starting from  $10^{-1}$ M NaCl caused 18% and 40% of the cells to be released from the secondary minimum for the sand and the glass columns respectively. It come into sight that the electrostatic barrier thickness was responsible for the release of the PHL1314 strain in porous media as it increased dramatically from 4nm to 400nm and caused the secondary minimum to be attenuated. Irreversibly retained bacteria were likely blocked by other phenomena such as wedging or surface roughness as the confocal microscope observations pointed out. *In situ* time lapse fluorescens imaging demonstrated how particle geometry of sand grains was more likely to trap and retain bacterial cells than smooth glass beads. These results confirm the importance of electrostatic interactions in bacterial transport through porous media phenomena but also the impact of porous media outline characteristics.

## 1. Introduction

Bacterial transport through porous media is an important issue in environmental stakes such as bioremediation or protecting drinking water sources (Fontes *et al.* 1991). *Escherichia coli* presence in ground water is a common indicator for faecal contamination (Tian *et al.* 2002) and understanding its transport in subsurface environments is of great interest in preventing water wells from harmful contamination (Krapac *et al.* 2002; Unc et Goss 2004). Bacterial transport has commonly been studied with the colloid filtration theory (Yao 1971) based on laboratory and field scale experimental data (Brown et Abramson 2006). According to Yao's conceptual model retention of colloids in porous media is the result of mass transfer from the bulk fluid to the collector grains surface controlled by interception, sedimentation and diffusion mechanics. Bacterial transport is predicted with the classical colloid filtration theory by calculating the anticipated rate of adhesion  $k_d$  which is dependent on porous media porosity, fluid flow velocity, collectors grain diameter and single-collector contact efficiency ( $\eta_0$ ) (6). Recently Tufenkji and Elimelech provided an updated equation to calculate  $\eta_0$  (Tufenkji et Elimelech 2004). But in unfavorable conditions (i.e. presence of repulsive energy between colloids and porous marix) the deposition coefficient is largely reduced (Cail et Hochella 2005; Li *et al.* 2005). In fact most bacterial cells (or colloids) and sediments are typically negatively charged at groundwater low ionic strength and mild pH resulting in electrostatic repulsions occurring between bacterial cells and soil particles and so creating unfavorable conditions for deposition. Despite repulsive energy several authors found colloid deposition occurred nevertheless (Cail et Hochella 2005; Liu *et al.* 2007; Tong et Johnson 2006). Several discrepancies between experimental data and colloid transport predicted by theories like DLVO or clean bed filtration were presumably caused by surface roughness (Bhattacharjee *et al.* 1998; Bhattacharjee *et al.* 1998; Shellenberger et Logan 2002), hydrodynamics (Bergendahl et Grasso 2000; Li *et al.* 2005) and colloid detachment. Colloid detachment from packed beds has received significant attention although bacterial detachment received less interest (Rijnaarts *et al.* 1996).

In fact bacterial transport is complexed due to the living nature of microbes (Abu-Lail et Camesano 2003). Moreover porous media are too much idealized for practical reasons causing bacterial deposition to be underestimated. Multiple mechanisms like the secondary minimum (Redman *et al.* 2004), zones of flow stagnation (Johnson *et al.* 2007), surface charge and heterogeneity (Li et Logan 2004; Vadillo-Rodriguez et Logan 2006) may create locally favorable deposition conditions complicating bacterial transport predictions. Johnson and colleagues simulated colloids behaviour at a microscale in a porous media by means of a model accounting for the various forces experienced by the particles (Johnson *et al.* 2007). They showed that colloid retention in presence of an energy barrier could happen due to wedging and retention in zones of flow stagnation (Johnson *et al.* 2007). In other work Johnson *et al.* found that colloid retention in porous media was much higher than in a jet impulse system suggesting porous media structure effects on colloid retention (Tong et Johnson 2006). However the impact of porous matrix effects on bacterial transport is still badly understood and needs further investigation.

The global aim of the study was to bring some insights in the attachment and detachment phenomena of a bacterial cell (*E. coli.*) transported in a porous medium. We carried out bacterial transport experiments in columns filled with two material (sand or glass beads) having similar size and surface charges but differing by their roughness and geometry. In complement an original experimental setup using micro-flowcells, genetically engineered fluorescent *E. coli* cells and fluorescens in situ time lapse confocal imaging made spatial and temporal visualization of the attachment and detachment phenomena possible. Favourable and unfavourable conditions were used for deposition experiments. For detachment, the ionic strength of the solution was progressively lowered. Filtration theory, DLVO theory and the drag forces experienced by the cells are considered when analysing the results. Results are also analyzed in light of recent mechanistic simulations on colloids retention in porous medium (Johnson *et al.* 2007) .

## 2. Material and Methods

### 2.1. Strain, plasmid and fluorescent labeling

The bacterial strain used in this study was *Escherichia coli* K12 MG1655 *ompR234* (Vidal *et al.* 1998) (PHL1314) and was kindly given by P. Lejeune (French Institute of Applied Science, Lyon, FRANCE). This strain was selected for its astonishing mobility capacities in porous media as described previously (Jacobs *et al.* 2007). PHL1314 transport behavior was presumably due to the hydrophilic negatively charged outer cell surface characteristics (Jacobs *et al.* 2007). The *E. coli* strain used in this study was genetically fluorescently labeled using the pDsred-express plasmid (Clontech, USA). Cells were transformed using the chemical TSS method (Transformation Storage Solution: PEG3350 10%, MgCl<sub>2</sub> 10mM, MgSO<sub>4</sub> 10mM, DMSO 5%). The pDsred-express plasmid inserted is carrying the *dsred* gene which encodes for the red fluorescent protein from *Discosoma* sp. reef coral. Dsred maximum excitation wavelength is 556nm and maximum emission is 586nm. The bacterial cells were fluorescently labeled in order to perform cytometry counting and in situ confocal imaging. The pDsred-express plasmid also provides resistance to ampicillin antibiotic. Prior experiments, bacteria were cultivated overnight in 100ml of half diluted Luria Bertani media at 30°C, 100rpm. 100mg.L<sup>-1</sup> of ampicillin was added to ensure the selection of cells carrying the pDsred-express plasmid.

### 2.2. The electrostatic free energy of interaction.

To be able to quantify the influence of ionic strength on bacterial interaction with the porous media the electrostatic free energy of interaction from the classical DLVO theory was calculated. The DLVO theory also includes Lifshitz-van der Waals interactions and has been calculated in our previous study (Jacobs *et al.* 2007). Although a raw approximation, for practical reasons we consider porous media grains as flat plates and the bacteria as spherical colloids since porous media grains are at least 100 times greater than bacterial cells. The electrostatic interaction free energy as a function of distance  $y$  between a spherical bacterium (1), and a flat plate (2), immersed in water (3)

Characteristics	Glass beads	Sand
Grain Size ( $\mu\text{m}$ )	250	230-310
Manufacturer	Merck	Merck
Column volume ( $\text{cm}^3$ )	294,5	294,5
Dry solid mass(g)	455	480
Density ( $\text{g.cm}^3$ )	2,5	2,65
Column density ( $\text{g.cm}^3$ )	1,54	1,63
Porosity	0,382	0,385
Pore Volume ( $\text{cm}^3$ )	112,5	113,4
$N_{\text{pore}}$	$2.24 \times 10^4$	NC
$d_c$ (m)	$9.74 \times 10^{-5}$	NC
$d_{\text{max}}$ (m)	$2.09 \times 10^{-4}$	NC
Pump flow ( $\text{cm.ml}^{-1}$ )	3,01	3,03

**Table 1:** Porous media and column characteristics

NaCl ( $\text{mol.L}^{-1}$ )	PHL1314 strain	glass beads	sand
$10^{-1}$	-23	-18	-17
$10^{-2}$	-48	-41	-42
$10^{-3}$	-55	-46	-48
$10^{-4}$	-65	-50	-51

**Table 2:** Results of potential zeta (mV) measurements for porous media and the PHL1314 strain for different ionic strengths

Ionic strength ( $\text{mol.L}^{-1}$ )	Sand			Glass beads		
	V/Vp	BTR (%)	SD (%)	V/Vp	BTR (%)	SD (%)
$10^{-2}$	0	<b>89,8</b>	2,75	0	<b>94,93</b>	4,34
$10^{-1}$	0	<b>0</b>	0	0	<b>0,8</b>	0.06
$10^{-2}$ (*)	1,15	1,3		1,77	2,0	
$10^{-3}$ (*)	3,01	4,8		3,54	13,9	
$10^{-4}$ (*)	5,36	7,1		5,32	13,0	
Distilled Water (*)	7,62	5,1		7,08	10,9	
<b>total (*)</b>		<b>18,2</b>			<b>40,5</b>	

**Table 3:** Bacterial transport rate (BTR) obtained at different ionic strengths with both sand and glass column experiences.

(\*) corresponds to the experiences with decreasing ionic strengths inside the columns starting from  $10^{-1} \text{ mol.L}^{-1}$ . Moments of injections are expressed in pore volumes (V/Vp).

can be calculated from (Chen et Strevett 2002).  $\zeta$  potentials (V) of bacteria were determined by micro-electrophoresis using a Zetaphoremeter model (II) (CAD Instrumentation, Limours, France). The electrophoretic mobility was measured with the bacteria collected after overnight culture, suspended in either  $10^{-1}\text{M}$ ,  $10^{-2}\text{M}$ ,  $10^{-3}\text{M}$  and  $10^{-4}\text{M}$  NaCl solutions at pH7. Bacterial cells were placed in a measurement cell under a microscope equipped with a CCD camera. Their displacements in response to an applied electric field of  $8\text{V}\cdot\text{cm}^{-1}$  were recorded and the velocity of individual cells was calculated. The  $\zeta$  potentials were calculated with the conventional Smoluchowski theory for each cell. The displacements of about one hundred cells were recorded at each measurement. The experiment was repeated three times from separate cultures for every ionic strength.

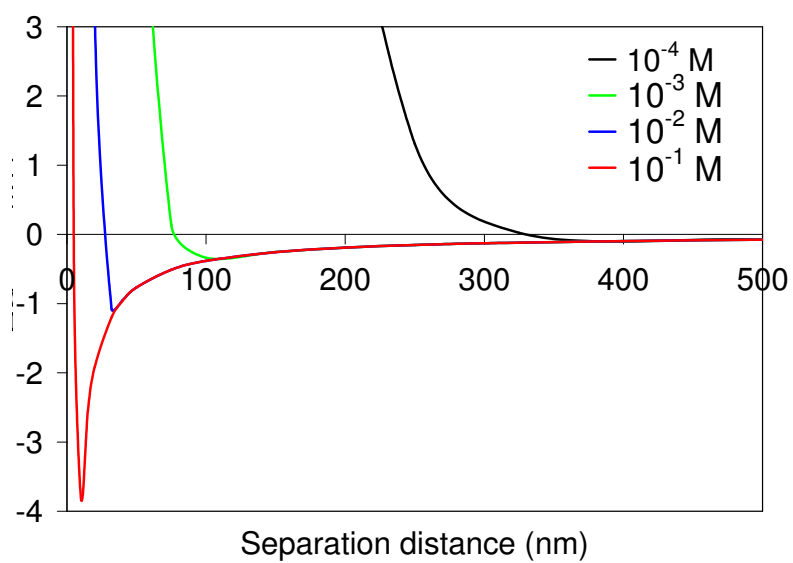
The electro kinetic properties of the sand and the glass beads were measured by a streaming potential analyzer Zetacad (CAD Instrumentation, Limours, France) in a either  $10^{-1}\text{M}$ ,  $10^{-2}\text{M}$ ,  $10^{-3}\text{M}$  and  $10^{-4}\text{M}$  NaCl solutions at pH7. The zeta potential was calculated from the streaming potential experiments as described by Elimelech *et al.* (Elimelech *et al.* 2000).

### 2.3. Column experiments.

The experimental setup consisted in Plexiglas columns ( $\text{Ø} = 50\text{mm}$ , length = 150mm) filled either with clean sand or glass beads. Porosity and porous media characteristics are listed in table 1. The sand used in this study is called “sand of Fontainebleau” (south Paris, France) and is very homogeneous (over 99.6% silica). Before use, both porous media were thoroughly rinsed with milliQ water on a  $40\mu\text{m}$  filter (VWR international, 11cm, type 417) then sterilized and oven dried for at least 2 hours at  $120^\circ\text{C}$ . Next the columns were saturated with sterilized water ( $10^{-1}\text{M}$  or  $10^{-2}\text{M}$  NaCl pH7). For each experiment porous media were renewed in the columns.

Bacterial cells were collected after overnight culture, centrifuged for 5min at 5000tr/min and suspended in a sterile  $10^{-1}\text{M}$  or  $10^{-2}\text{M}$  NaCl pH7 solution. Before use, concentration of the bacterial solution was adjusted approximatively to  $5\cdot 10^7$  cells/ml. Injection of the bacteria in the column lasted 10 minutes at the approximate flow rate of  $3\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$  (flow rates are listed in table 1). Circulation of the bacteria through the column was obtained by mean of a peristaltic pump (Ismatec SA reglo digital MS-4,





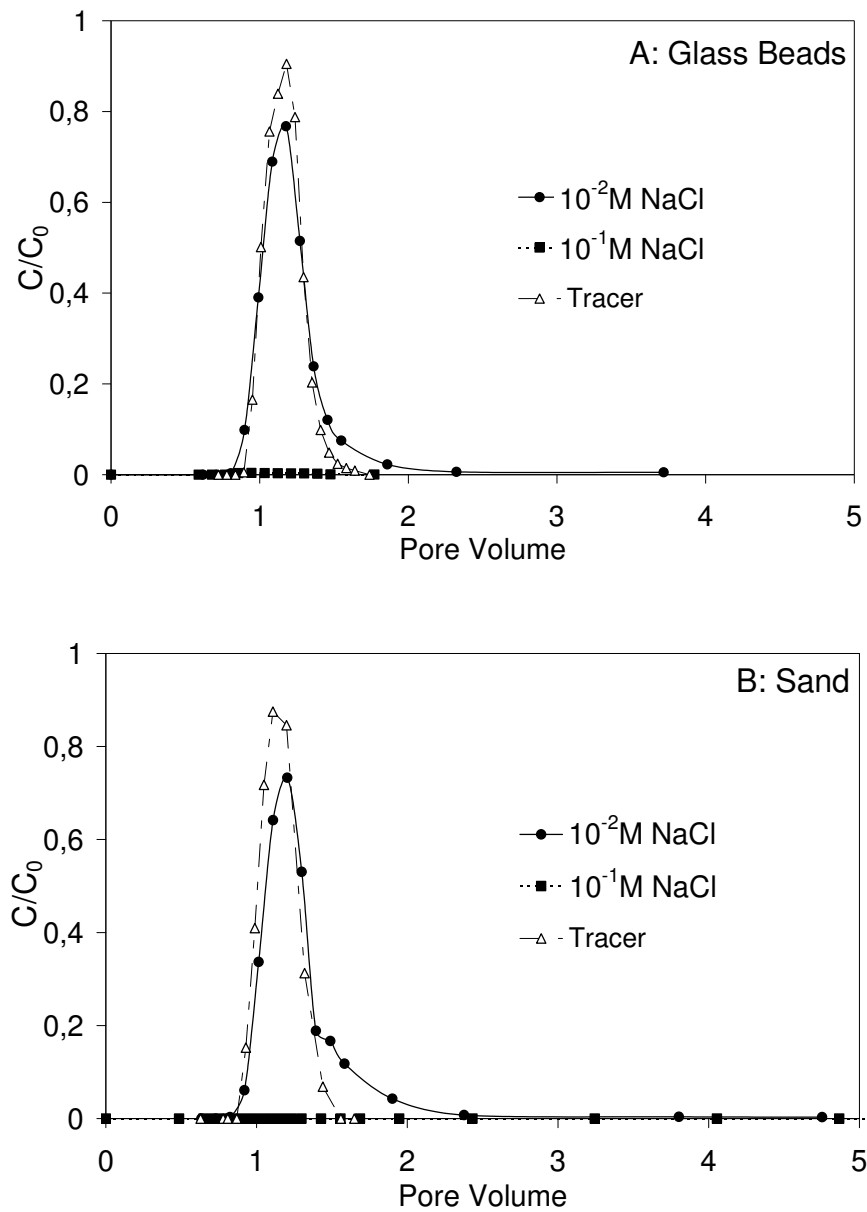
**Figure 1:** Free energy of interaction as a function of distance between sand and the PHL1314 strain in different ionic strengths ( $\text{mol.l}^{-1}$ ), calculated according to the classical DLVO theory.

Attraction occurs when  $\Delta G$  is negative, repulsion occurs when  $\Delta G$  is positive.

Switzerland). Each column experiment was repeated four times with bacteria cells from separate cultures. Experiments were also carried out with decreasing the ionic strength (IS) of NaCl ( $10^{-1}$ M,  $10^{-2}$ M,  $10^{-3}$ M,  $10^{-4}$ M and finally milliQ water). These experiments were repeated two times with cells from independent cultures for both the sand and the glass beads columns. Times of IS change of injected solutions are listed in table 3 (indicated in pore volumes). Bacterial concentration was measured by taking 0.5ml samples at the outlet of the column for flow cytometer enumeration. The flow cytometer (Beckman Coulter, EPIC XL, Fullerton, USA) settings were as follows: excitation source 488nm, fluorescence detection on FL2 channel (emission 510-530nm), analysis time 1 minute, no compensation was used.

#### **2.4. Fluorescence time lapse confocal imaging**

Bacterial displacement through the two porous media (sand and glass beads) was observed with a LEICA SP2 AOBS spectral confocal microscope (Leica Microsystems, France) at the MIMA2 microscopic platform (<http://voxel.jouy.inra.fr/mima2>). A single channel micro-flowcell (length: 50mm volume:  $250\text{mm}^3$ , Ibidi, Germany) was filled with sand or glass beads and connected to a peristaltic pump (Watson-Marlow, serie200, UK) running at  $8.5\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$  to obtain about the same flow rate as in the column experiments. The fluid running through the porous media was a pH7  $10^{-1}$ M or  $10^{-2}$ M NaCl solution to visualize IS effect on bacterial adhesion/detachment phenomena. Once the bacteria were attached to the matrix with  $10^{-1}$ M NaCl solution, distilled water was also injected in the flow cell. Bacterial concentration of the injected solution was approximately  $10^6\text{cells}\cdot\text{ml}^{-1}$ . Since both sand particles and glass beads are not fluorescent FITC was added to the bulk fluid when necessary to create a negative fluorescent staining. FITC is a green fluorescent molecule with maximum excited/emission wavelengths of 506/529nm. For time lapse series, a fluorescent picture was taken every 3 seconds from a same field to view the dynamic of bacterial adhesion/detachment process *in situ* and in real time. We also looked for specific sites favorable for adhesion and wedging in both porous media such as particle-particle junctions, dead end paths or cell scale furrows where bacteria might be trapped. LSClite v2.5 software (Leica Microsystems, Germany) was used to quantify the fluorescence from the time series obtained.



**Figure 2:** Effluent concentration curves for *E. coli* PHL1314 from (A) glass beads and (B) sand in two different ionic strengths.

Relative effluent concentrations of bacterial cells ( $C/C_0$ ) are plotted as a function of pore volumes. Tracer corresponds to effluent of bromide.

### 3. Results and discussion

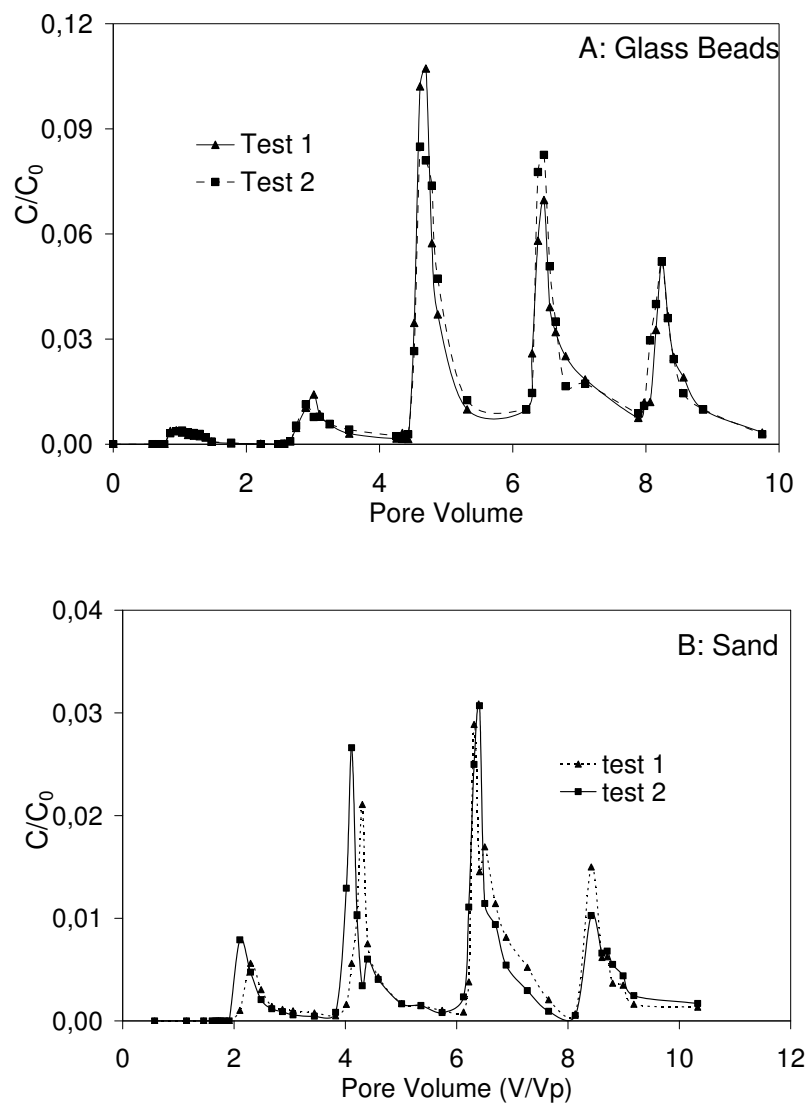
#### 3.1. Ionic strength and electrostatic repulsions

Both the PHL1314 strain and the porous media studied showed negative potential zeta values in all the ionic solutions (see table 2). Zeta potentials of the sand grains and the glass beads were nearly the same whatever the IS. The Gibbs free energies of interaction (i.e.  $G^{EL} + G^{LW}$ ) between the sand and the PHL1314 cells as a function of distance and ionic strength was calculated using the classical DLVO theory (see figure 1). In the highest ionic conditions ( $10^{-1}$ M NaCl, pH7) electrostatic repulsions between the bacteria and the porous media were the lowest (404kT). Lowering the IS causes a decrease of the zeta potential of both the cells and the porous media and consequently an increase of electrostatic repulsions. At  $10^{-4}$ M NaCl electrostatic repulsions were the highest (2300kT). Lowering the IS also increased the range of electrostatic interactions from 4nm at  $10^{-1}$ M NaCl to 350nm in  $10^{-4}$ M NaCl solutions. The secondary minimum provided by LW interactions was extremely weak compared to the electrostatic barrier and ranged from -3.69kT to -0.04kT. Moreover increasing the electrostatic barrier when the IS was decreased caused the secondary minimum to be attenuated (see figure 1).

#### 3.2. Breakthrough curves

For both porous media studied ionic strength was a main factor for transport behavior of the PHL1314 strain and results are listed in table 3. In a  $10^{-1}$ M NaCl solution transport of the PHL1314 strain was negligible for both the sand and the glass beads. In 10 fold lower ionic conditions the cells were significantly better transported: 89.8% (SD=2%) on the sand and 94.9% (SD=4%) on the glass beads. The bacteria breakthrough peak approximatively corresponded to the breakthrough peak of the tracer and was similar for the sand and the glass columns (about 1 pore volume, see figure 2).

To further investigate the influence of electrostatic interactions on bacterial adhesion in porous media the ionic strength was progressively decreased inside the column by



**Figure 3:** Bacterial breakthrough from (A) glass beads filled column and (B) sand filled column as lower ionic strength incoming solutions were injected.

The experiences were repeated two times.

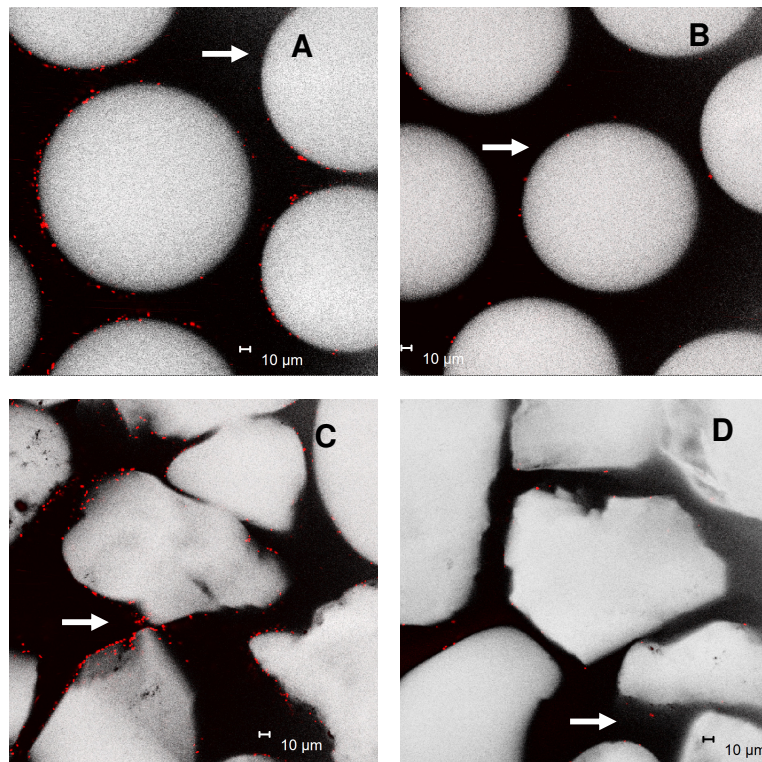
injecting consecutively lower NaCl concentrated solutions starting at  $10^{-1}$ M NaCl (pH remained constant at 7). Each time the IS was lowered variable amounts of bacteria cells were removed from the porous media (figure 3). The percentages of removed bacteria are given in table 3. Lowering the IS had a stronger effect in the glass beads column than in sand columns: 42% of the cells were released from the glass beads but only 18% from the sand matrix. Moreover it is interesting to notice that the amount of removed cells varied with the IS of the incoming solutions. Bacterial detachment was much better using the  $10^{-3}$ M or  $10^{-4}$ M solutions than with the  $10^{-2}$ M solution (figure 3 and table 3). However lowering the IS does not enable to transport as many cells as with a low ionic solution on its own: for example 89% of the cells were transported through sand with a  $10^{-2}$ M solution whereas only 2% of the cells traveled through the sand matrix when the IS was lowered from  $10^{-1}$ M to  $10^{-2}$ M (table 3).

### **3.3. Spatial and temporal fluorescens confocal imaging**

#### **3.3.1. Ionic strength impact**

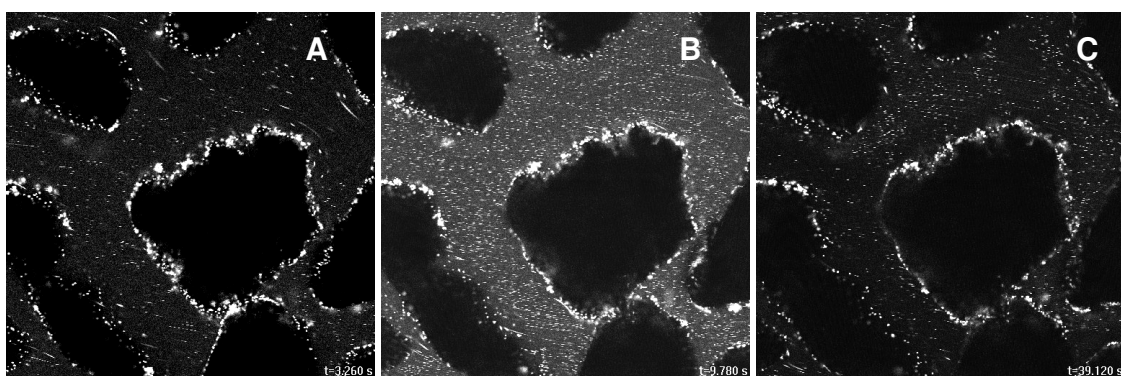
Bacterial transport through porous media was visualized using confocal microscopy. Figure 4 shows that bacterial adhesion on both the sand grains and the glass beads was much higher in a  $10^{-1}$ M NaCl solution as it was also evidenced with the column experiments. In a  $10^{-2}$ M solution only a few cells adhered to both porous media studied. Pictures shown in figure 4 were chosen as an example from among other essays with similar results. Even if the pictures from figure 4 were not taken from a same spot (since all experiences were performed independently) the impact of ionic strength was clearly observed. It is also interesting to notice that bacterial deposition occurred nearly systematically on the face exposed to the flow (figure 4).

The impact of lowering the IS on bacterial cell releasing inside the porous media was also analyzed with time lapse confocal imaging (see figure 5, supporting information). When the IS collapses suddenly due to the injection of distilled water in the flow cell, attached bacteria are released in the bulk fluid. Figure 6 shows the fluorescence intensity as a function of time during the IS lowering event. The fluorescence of attached cells was reduced by about 30%. It can also be seen from figure 5c that most of the bacterial cells could not be detached from the sand grains which is in agreement with our



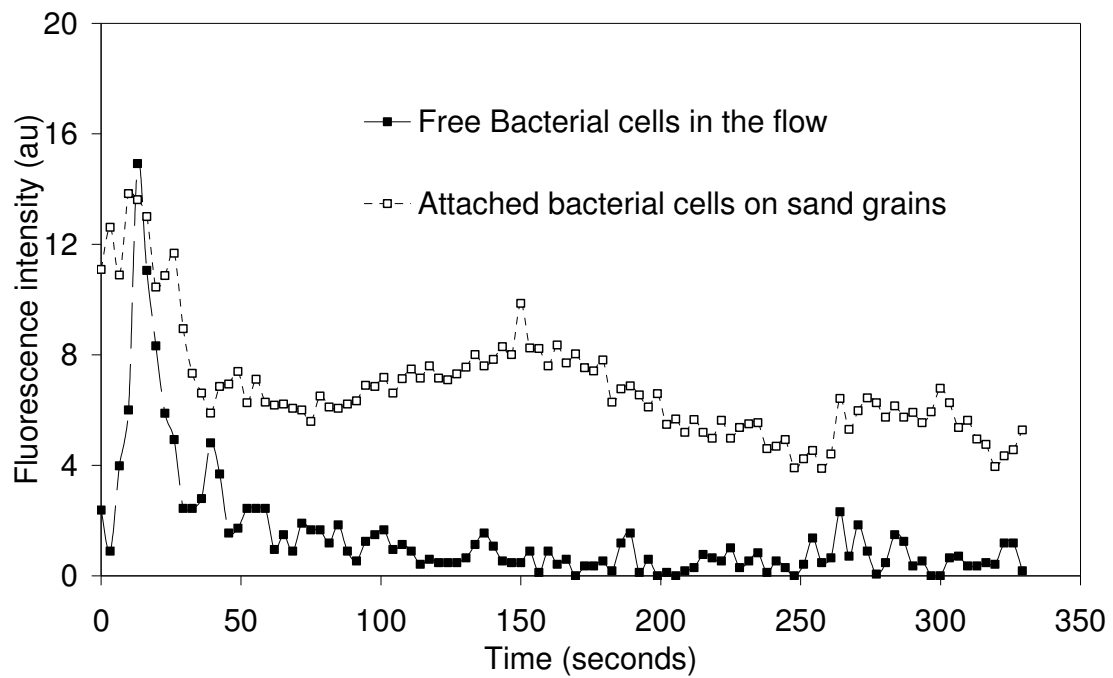
**Figure 4:** Bacterial adhesion in sand and glass beads media with two different ionic strengths after 15 minutes:

(A) Glass beads  $10^{-1}$ M NaCl (B) Glass beads  $10^{-2}$ M NaCl (C) Sand  $10^{-1}$ M NaCl (D) Sand  $10^{-2}$ M NaCl. Pictures were taken  $70\mu\text{m}$  inside the porous media at the end of the experiment (15 minutes). Arrows indicate flow direction.



**Figure 5:** Time lapse bacterial detachment from a sand matrix by lowering the ionic strength (IS) visualized with a confocal microscope:

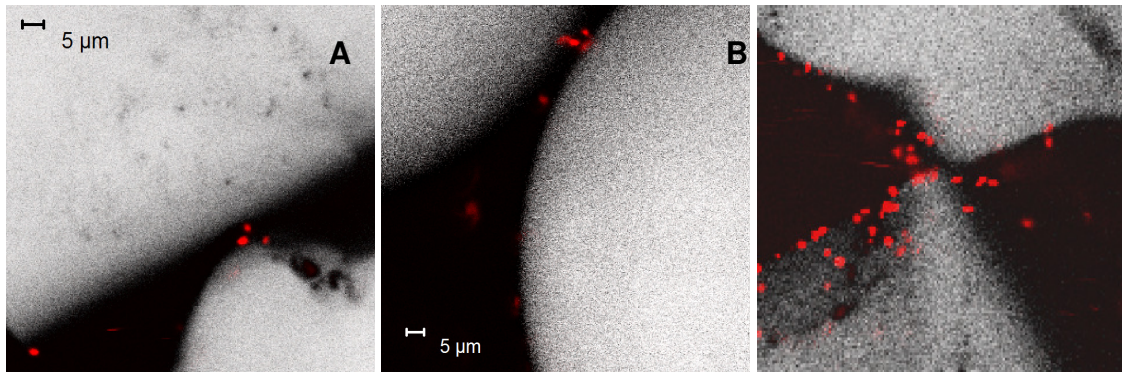
(A) Before the IS decreases ( $t=3\text{sec.}$ ) (B) During the IS collapse ( $t=9\text{sec.}$ ) (C) After the IS was decreased ( $t=39\text{sec.}$ ).



**Figure 6:** Fluorescence intensity (au) measured as a function of time for attached cells and free cells.

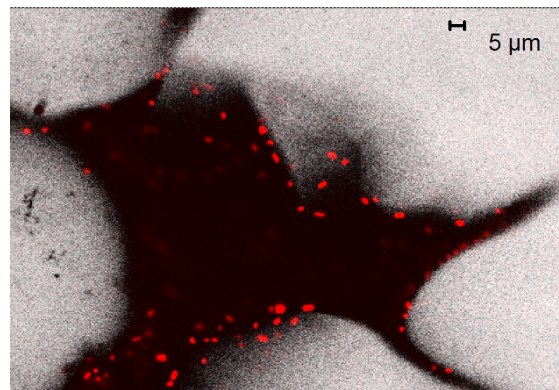
Measurements were performed using LSCLite v2.5 software (Leica Microsystems, Germany) when distilled water was injected in the flow cell.



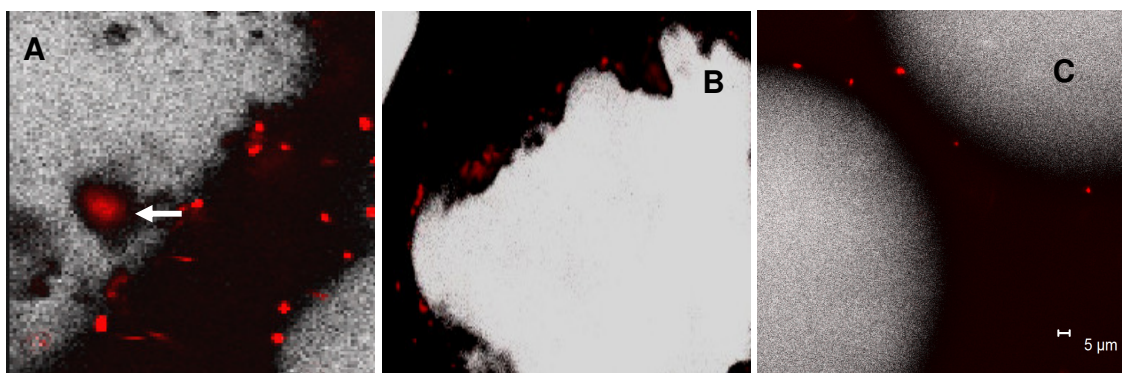


**Figure 7:** Wedging: examples of bacterial cells blocked by grain-grain junctions and narrow gates.

(A) Sand  $10^{-2}$ M NaCl; (B) Glass  $10^{-2}$ M NaCl; (C) Sand  $10^{-1}$ M NaCl



**Figure 8:** Example of *E. coli* PHL1314 cells trapped in a dead end path (sand matrix).



**Figure 9:** Bacterial cells retained by sand surface asperities as opposed to smooth characteristics of glass beads.

(A) Bacterial cell blocked in sand grain cavity (arrow) (B) bacterial cells retained inside sand grain asperities (C) Bacterial cells attached to smooth glass beads.

column experiments results (table 3). Similar results were observed for the glass beads (results not shown).

### 3.4. Porous media characteristics impact

Figures 7 to 9 illustrates how the matrix of a porous media can be responsible for blocking bacterial transport. Figure 7 is an example of wedging: bacterial cells blocked by grain-grain junctions and/or narrow gates inside the porous media. The phenomenon was visible in both the glass and the sand matrix but it seemed to happen more often in the sand media. Moreover higher ionic strength conditions seemed to enhance the blocking effect with an accumulation of cells resulting in a “traffic jam” (figure 7c). Figure 8 illustrates a dead end paths were the cells were trapped preventing their transport. Dead end paths were solely observed in the sand matrix but such structures were quite rare. Sand grain surface topography is rough showing cell-scale asperities and furrows where bacteria can be retained as figure 9a and 9b evidence. On the other hand glass beads are perfectly smooth spheres and thus are less likely to retain bacterial cells as they are simply deposited (figure 9c).

### 3.5. Drag torque calculations

The irregular shape of sand grains prevented us from calculating drag torque in the sand media as the equations only apply to model porous media such as packed glass beads. These calculations were performed according to the relationships given by Bergendahl and Grasso (Bergendahl et Grasso 2000) with a cell radius  $a_{\text{cell}} = 500\text{nm} \pm 55\text{nm}$  (Cell size measurements were performed with a Canon BX microscope). The values of  $d_c$ ,  $d_{\text{max}}$  and  $N_{\text{pore}}$  are listed in table 1 (see supporting information). Drag torque ranged from 3.35kT to 32.80kT which is slightly higher than LW interactions but much lower than EL interactions which ranged from 404 to 2300kT. For the most part of the pore the drag force is lower than 10kT.

The transport of *E. coli* PHL1314 strain was largely impacted by ionic strength of the solution in both porous media studied. The PHL1314 strain is repelled from the collector's grain surface by an electrostatic barrier because both bacterial cells and porous media are negatively charged. Nearly opposite transport behaviors for the PHL1314

strain were observed at  $10^{-1}\text{M}$  and  $10^{-2}\text{M}$  ionic strength (table 3). At  $10^{-1}\text{M}$  the electrostatic barrier of  $404\text{kT}$  is only  $4\text{nm}$  wide and LW interactions could act easily with a “deep” secondary minimum of  $-3.69\text{kT}$  creating favorable conditions for bacterial adhesion as is demonstrated by both column and confocal experiments. When the electrostatic barrier is very thin (like at  $10^{-1}\text{M}$ ) bacterial cells might come close enough to the solid surface so that either reversible attachment in a “deep” secondary minimum or irreversible attachment becomes possible (see figure 1, supporting information). On the contrary at  $10^{-2}\text{M}$  the secondary minimum is less important ( $-1.08\text{kT}$ ) and distance of closest approach increases dramatically ( $32\text{nm}$  thick electrostatic barrier) with less possibilities for bacterial deposition resulting in unfavorable conditions for bacterial retention in porous media. Differences between favorable and unfavorable conditions for bacterial retention in porous media were most likely due to the electrostatic barrier thickness as it not only increased separation distance from  $4$  to  $32\text{nm}$  but also considerably reduced the secondary minimum depth. Moreover calculated minimum drag forces ( $3.39\text{kT}$ ) were inferior to the secondary minimum depth at  $10^{-1}\text{M}$  ( $-3.69\text{kT}$ ) creating favorable possible conditions for bacterial retention while at  $10^{-2}\text{M}$  drag forces overcome LW interactions ( $-1.08\text{kT}$ ) worsening conditions for bacterial retention. It is interesting to notice that the mechanism of bacterial deposition is decided at only a few nanometers from the collectors grain surface which is very little when put in comparison with the size of bacterial cells.

To know in what proportion the bacterial cell population was either reversibly (i.e. secondary minimum) or irreversibly retained by both porous media studied in high ionic conditions ( $10^{-1}\text{M}$ ) the IS was progressively lowered inside the columns. Bacterial detachment from both porous media studied resulted in very sharp breakthrough curves for each lower IS incoming solution (figure 3). These results suggest no dispersion occurred and that the detached cells migrated with the progression of the incoming solution through the columns. This can be evidenced from figure 6 which shows an important increase of fluorescence of the free cells in the flow when the distilled water runs through the spot as witnessed in figure 5b: this excess of fluorescence corresponds to the bacteria which were released upstream from the spot and which progresses with the distilled water front through the sand matrix. As a result bacterial concentration increases suddenly and consequently the amount of fluorescence (figure 6). The amount of attached

cells diminished as the amount of fluorescence decreased just after the passage of the distilled water front. Interestingly the variable amount of cells detached for each incoming IS solution suggests the bacteria from a same population experience different level of interactions with the porous matrix (figure 3). Heterogeneity of the population or collector's grain surface may explain these results. Van der Mei and Busscher (2001) pointed out previously that the deviation calculated from individual electrophoretic cell measurements reflects a high degree of heterogeneity and may reveal the existence of subpopulations within a pure culture (van der Mei et Busscher 2001). If bacterial cells from a same population have different electrophoretic properties they will experience different EL and LW interactions with the porous matrix resulting in variable transport behaviors. Such heterogeneity in the bacterial population may explain why for each new incoming IS solution new portion of cells were released from the columns (figure 3). Other authors also suggested how cell membrane heterogeneity among a same bacterial population possibly affected bacterial transport through porous media (Liu *et al.* 2007; Simoni *et al.* 1998).

Bacterial cells were released from the porous media when the IS of the solution decreased (figure 3). Redman *et al.* obtained similar results although they used only a  $10^{-3}$ M solution to decrease ionic strength (Redman *et al.* 2004). The authors concluded that the released bacterial cells were previously retained by LW interactions, referred as the secondary minimum. It should be kept in mind that as the electrostatic barrier thickens (i.e. when IS decreases) and moves the cells away from the surface, at the same time the LW interactions weaken (figure 1). As a result bacterial cells might be released because the secondary minimum becomes too weak to ensure bacterial retention. Moreover the minimum calculated drags forces (3.39kT) overcome LW interactions (<1kT) in low ionic strength and may help for cells to be released. Several authors pointed out the importance of hydrodynamic drag on colloid deposition and detachment in porous media environments (Li *et al.* 2005) ((Bergendahl et Grasso 2000). Theoretically since drag forces were far superior to LW retention forces in low ionic strength solutions all the bacterial cells retained in the secondary minimum should have been released. However increasing electrostatic interactions was not enough to recover completely the cells initially injected: only 40% of the bacteria were recovered from the glass matrix and 18% from the sand matrix. Hence, it seems that most of the cells were not retained in the

secondary minimum. On one hand our drag force calculations do not include zones of flow stagnation where bacterial cells could be retained as Johnson and colleagues recently pointed out (Johnson *et al.* 2007). On the other hand the cells which could not be released by lowering the IS might be irreversibly attached due to higher energy of interaction with the solid surface than those presented here. Using atomic force microscopy (AFM) measurements Cail and colleagues showed that interaction energy could be largely underestimated by classical DLVO equations (Cail et Hochella 2005). Interestingly, they used a solid phase and cells similar to ours and measured large (<0 attractive) interaction forces *once* cells are attached on the surface, which may explain why not all the cells could be detached from the porous matrix. Moreover omitting nanoscale surface roughness can lead to approximate DLVO calculations and LW interactions to be underestimated (Bhattacharjee *et al.* 1998). Nanoscale roughness is usually omitted for practical reasons but might not be neglected as several authors pointed out (Bhattacharjee *et al.* 1998; Hoek et Agarwal 2006; Hoek *et al.* 2003).

Confocal microscope observations revealed porous media geometry also affected transport of the PHL1314 strain. Two times more cells were detached from the glass media than from the sand grains despite similar characteristics (zeta potential, pore size, homogeneity...). Glass beads and sand grains mainly differ from their respective surface geometrical shape. Bradford *et al.* pointed out how bacterial transport can be hindered due to cell blocking by grain-grain junctions (Bradford *et al.* 2006). Such junctions are probably more current in a sand matrix than in a glass beads matrix as sand grains are geometrically very irregular. As a result piled sand grains form a network of pore constrictions likely able to trap more bacteria than a matrix of perfectly spherical glass beads. Our confocal microscopy observations suggest mechanical trapping by porous media network of glass beads or sand grains with two types of retention: (i) wedging and straining at grain-grain junctions or narrow gates; (ii) blocking phenomena by surface asperities which only accounted for sand grains. Johnson and colleagues simulated colloids behaviour at a microscale in a porous media by means of a model accounting for the various forces experienced by the particles (Johnson *et al.* 2007). They showed that colloid retention in presence of an energy barrier could happen due to wedging and retention in zones of flow stagnation (Johnson *et al.* 2007). The irreversibly retained bacterial cells found in our column experiments might be explained by their findings.

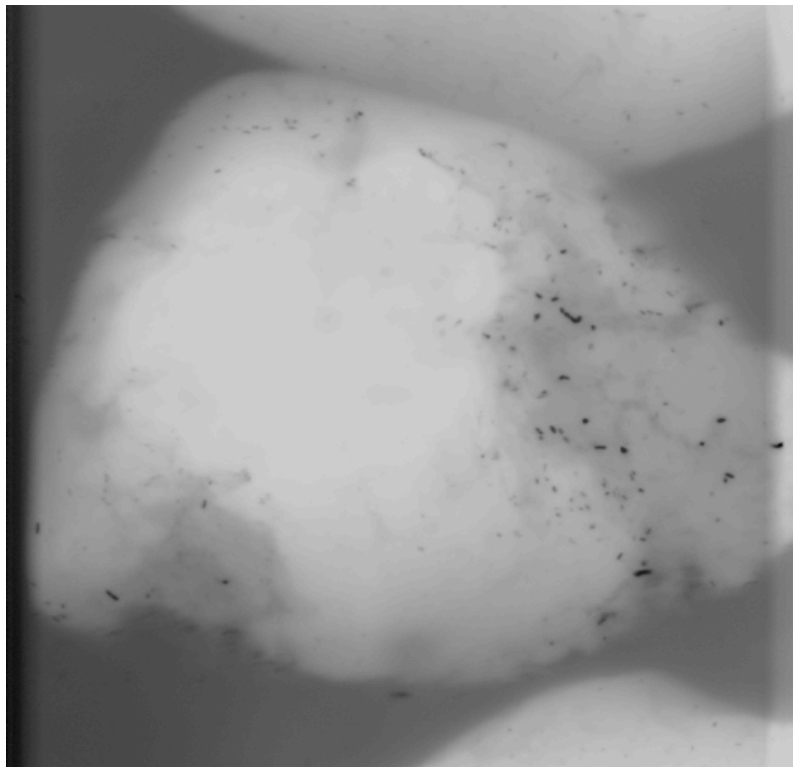
In summary *E. coli* PHL1314 transport was largely enhanced in low ionic strength environments. In soil environments ionic strengths are mostly very low and the pH is mild. Subsurface environments can thus be favourable for bacterial transport. These findings also showed the importance of porous media structure and geometry which modify bacterial transport behaviour. As a result geology of the soil can play an important role in preventing transport of pathogens towards drinking water sources. Moreover the experimental setup for *in situ* fluorescens time lapse confocal imaging was successful applied for our model, and may be used for other purposes.

### **Acknowledgements**

This study was partly funded by the ADEME (French agency for Environment and Energy control) and the INRA (French National Institute for Agriculture Research). The authors would like to thanks the department of Essonnes for the financial support of a laser confocal microscope (ASTRE n°A02137).

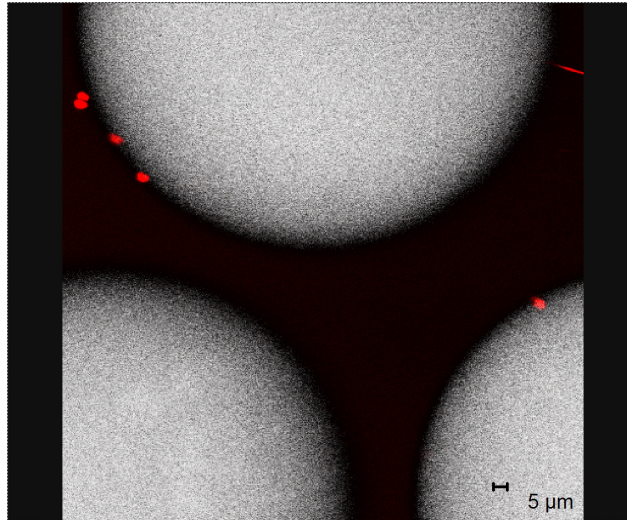
#### 4. Illustrations supplémentaires :

Les expériences réalisées au microscope confocal (voir Annexe 4 p. 259) ont permis de faire un très grand nombre de films et de photos dont certaines sont présentées ici. Le but de ces expériences était de visualiser l'attachement et le détachement des cellules d'*E. coli* PHL1314 dans deux milieux poreux différents : le sable et les billes de verre.



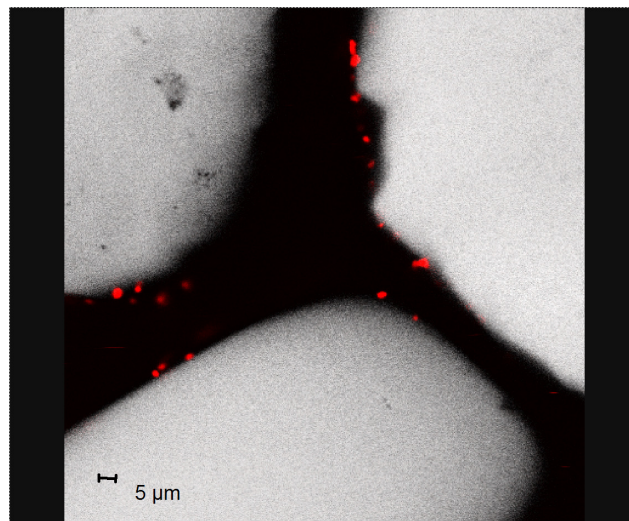
**Figure 10 :** Un grain de sable avec ses crevasses à la surface dans lesquelles des bactéries (tâches noires) sont piégées.

Cette image en 3D a été reconstituée par ordinateur à partir de coupes 2D empilées perpendiculaires à l'axe z.



**Figure 11 :** Cellules d'*E. coli* PHL1314 « collées » à la surface de billes de verre.

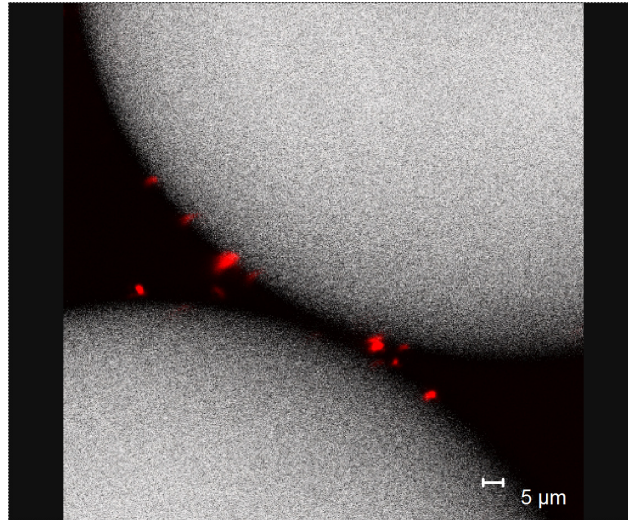
(Force ionique du milieu :  $10^{-2}$  M NaCl)



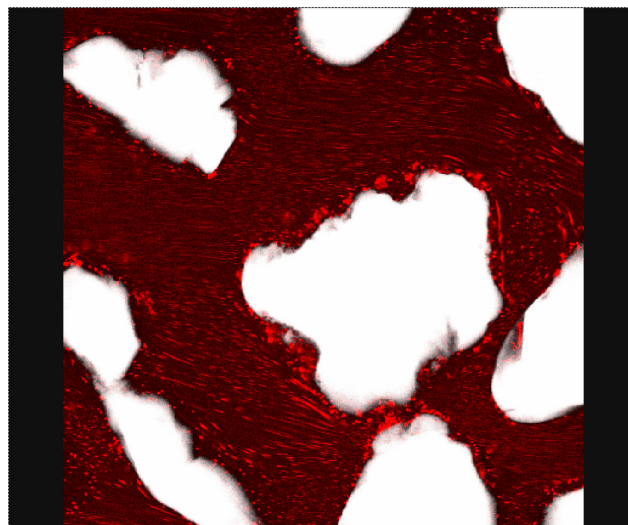
**Figure 12 :** Photo prise pendant le transport dans le sable d'*E. coli* PHL1314 montrant une zone en forme de fourche.

Ce type de zone semble favorable à l'adhésion des cellules sur les parois du milieu poreux.





**Figure 13 :** Illustration du blocage de cellules au niveau d'une zone de contact entre 2 billes de verre.



**Figure 14 :** Illustration des trajectoires et des vitesses de déplacement des cellules bactériennes dans un sable.

Il s'agit d'une photo dont le temps de prise est de plusieurs secondes ce qui explique les effets de traînées. Chaque traînée correspond à une cellule. Les vitesses de courant sont d'autant plus rapides que l'on s'éloigne de la surface des grains.





## **Chapitre 4**

Transport d'*E. coli* en milieux poreux complexes et artificiels : Expérimentations et modélisations.

Le chapitre 4 correspond à un article soumis pour publication dans la revue

Contaminant Hydrology :

***Escherichia coli* transport in artificial and complex porous media: experiments and modelling**

**A. Jacobs et F. Lafolie**



**Avant propos**

Le chapitre 3 a révélé l'impact des caractéristiques d'un milieu poreux sur le transport bactérien. Ainsi la forme irrégulière des grains de sables permet de coincer d'avantage de cellules que des billes de verre parfaitement sphériques. Ce résultat soulève la problématique de la simplification des conditions expérimentales par rapport à la réalité du terrain. Qu'en est-il pour des environnements encore plus complexes comme un véritable sol ? En effet dans la littérature comme pour les travaux des chapitres 2 et 3 le transport bactérien est généralement étudié dans des systèmes artificiels : billes de verre ou grains de sables de taille et de caractéristiques bien définies. En revanche l'étude du transport de cellules bactériennes dans des conditions plus réalistes est beaucoup plus rare. Des expériences ont été menées pour comparer le transport bactérien en milieu artificiel (billes de verre et sable calibré) avec le transport en milieu complexe (colonnes de sol avec des agrégats de diverses tailles et sol non remanié). Les objectifs sont d'évaluer la compétition entre les phénomènes hydrodynamiques et physicochimiques. L'ensemble des données obtenues a également permis de tester un modèle de transport bactérien en milieu poreux.

## Abstract

The transport of a single negatively charged bacterial strain (*E. Coli*) was examined for columns made up of glass beads, sand, soil aggregates of various sizes and undisturbed soil. Experiments were performed at two ionic strengths relevant to environmental conditions and the water flow was adjusted so as to have similar velocities whatever the porous media porosities. Bacterial enumeration in the effluents was obtained by flow cytometry. Tracer breakthrough curves were obtained to characterize the porosity and flow patterns of the various columns. Modeling of experiments accounted for kinetic deposition and release of cells. The model offers the possibility to account for two types of sites differing by their rates (fast and slow). Tracer and cells breakthrough curves indicate that the cells are transported at a rate similar to the tracer for the glass beads and the sand columns. For the columns packed with aggregates, the bacterial cells are transported much faster than the tracer. Also, cells retention in the glass beads and the sand columns depends largely on ionic strength, while this dependence is weak in the columns packed with soil aggregates. In all the porous media, breakthrough curves display long tails revealing a slow release of bacterial cells. Modeling of the breakthrough curves indicates that retention occurs in two types of sites. One is exchanging rapidly with the flow and could correspond to stagnant flow regions or sites with weak interaction. These sites are responsible for the curvature of the breakthrough curve immediately before the tail begins. The second type is associated with classical deposition and characterized by slower rates and in particular release from these sites explains the long tails.

## 1. Introduction

Understanding and predicting bacterial transport in porous media has become an important subject of research for its applications in domains such as water source protection and bioremediation (Fontes *et al.* 1991). Since soils are supposed to act as a filter groundwater has been assumed to be free of pathogenic bacteria, but several contaminations of water sources with micro-organisms were possibly linked to bacterial transport through the unsaturated zone (Krapac *et al.* 2002). (Unc et Goss 2004). Controlling bacterial fate in soils has also interesting prospects for agronomic issues such as bio control with plant growth promoting strains (Amarger 2002). Concerns are also growing about the use of waste water for irrigation in Mediterranean regions suffering water shortages. Indeed waste water carrying pathogenic strains could contaminate drinking wells when used for irrigation. Thus understanding the mechanisms involved in bacterial displacement and modeling are important for practical applications. During the last two decades several models have been developed to describe micro organism transport in porous media (Chen et Strevett 2003; Johnson *et al.* 1995; Sen *et al.* 2005; Tian *et al.* 2002; Tufenkji *et al.* 2003). Among all the phenomena involved in bacteria displacement, one important mechanism is the deposition on the solid phase. This has been studied for a long time and the deposition rate has been shown to depend on several parameters among which: flow velocity, solid grain diameter, bacterial dimension, collector efficiency, etc... Correlations have been proposed to relate collector efficiency to elementary mechanisms controlling colloid approach to the solid (Rajagopalan 1976; Tufenkji et Elimelech 2004). In simple porous media made up of glass beads or sand grains, and under favourable conditions (i.e. absence of repulsive electrostatic barrier) the deposition rate has been shown to adequately predict bacterial retention. However, it remains the problem of estimating the collision efficiency under unfavourable conditions (Dong *et al.* 2002). Many experiments have shown that retention could happen in situation presenting unfavourable conditions (repulsive electrostatic energy barrier) (Tong et Johnson 2006). Experiments have also shown that bacteria were not retained although the conditions seemed favourable (Tong *et al.* 2005). Hence, the deposition rate is still a subject of study. The release rate of previously retained bacteria is another problem that is being analyzed (Tong *et al.* 2005). As well, heterogeneity of bacterial





population properties and in particular of surface charges are also being considered to explain deposition or transport deviation from theory (Brown et Abramson 2006; Li *et al.* 2004; Simoni *et al.* 1998; Tong *et al.* 2005). Sand or glass beads columns are porous medium with very simple and homogeneous porosity patterns in which chemical effects are important determinants of bacterial displacement. Transport experiments of colloids or bacteria in porous media presenting more complicated porosity patterns are scarce (Artz *et al.* 2005; Dong *et al.* 2002; Fuller *et al.* 2000).

This paper presents transport experiments at two ionic strengths, in order to obtain favourable and unfavourable conditions for deposition, with a single bacterial strain. Porous media ranged from glass beads and sand columns to columns repacked with soil aggregates of increasing size and ultimately to undisturbed soil columns. Results are analyzed with a model previously proposed (Li *et al.* 2005) and with a model accounting for two types of deposition sites. Results show that physical mechanisms can be dominant over chemical mechanisms when the complexity of the porosity patterns increases.

## 2. Material and methods

### 2.1. Strain, plasmid and fluorescent labeling

The bacterial strain used in this study was *Escherichia coli* K12 MG1655 *ompR234* (Vidal *et al.* 1998) (PHL1314) and was kindly given by P. Lejeune (French Institute of Applied Science, Lyon, FRANCE). This strain was selected for its ability to be transported in porous media as described previously (Jacobs *et al.* 2007). PHL1314 surface tension components were described in (Jacobs *et al.* 2007). The *E. coli* strain used in this study was genetically fluorescently labeled using the pDsred-express plasmid (Clontech, USA). Cells were transformed using the chemical TSS method (Transformation Storage Solution: PEG3350 10%, MgCl<sub>2</sub> 10mM, MgSO<sub>4</sub> 10mM, DMSO 5%). The pDsred-express plasmid inserted is carrying the *dsred* gene which encodes for the red fluorescent protein from *Discosoma* sp. reef coral. Dsred maximum excitation wavelength is 556nm and maximum emission is 586nm. The bacterial cells were fluorescently labeled in order to perform flow cytometry enumeration. The pDsred-express plasmid also provides resistance to ampicillin antibiotic. Prior to transport

<b>Characteristics</b>	<b>Glass beads</b>	<b>Sand</b>	<b>Soil (0.3-1) mm</b>	<b>Soil (1-3) mm</b>	<b>Soil (3-5) mm</b>
Grain Size ( $\mu\text{m}$ )	250	230-310			
Column volume ( $\text{cm}^3$ )	294,5	294,5	294,5	294,5	294,5
Dry solid mass(g)	467	480	340	340	340
Solid density ( $\text{g.cm}^3$ )	2,52	2,65	2,65	2,65	2,65
Column bulk density ( $\text{g.cm}^3$ )	1,59	1,63	1,15	1,15	1,15
Total porosity	0,371	0,385	0,566	0,566	0,566
Inter aggregates porosity	-	-	0,342	0,342	0,342
Total pore volume ( $\text{cm}^3$ )	109,2	113,4	166	166	166
Water flux ( $\text{cm}^3.\text{mn}^{-1}$ )	3,3	3,6	2	2	2

**Table 1:** Porous media and column characteristics

experiments, bacteria were cultivated overnight in 100ml of half diluted Luria Bertani media at 30°C, 100rpm. Ampicillin (100mg.L<sup>-1</sup>) was added to ensure the selection of cells carrying the pDsred-express plasmid.

## **2.2. Electrophoretic surface properties of cells and porous medium measurements**

$\zeta$  potentials (mV) of bacteria were determined by micro-electrophoresis using a Zetaphoremeter model (II) (CAD Instrumentation, Limours, France). The electrophoretic mobility was measured with the bacteria collected after overnight culture, suspended in two NaCl ionic strength (10<sup>-1</sup> and 10<sup>-2</sup> mol.l<sup>-1</sup>) adjusted at pH7. Bacterial cells were placed in a measurement cell under a microscope equipped with a CCD camera. Their displacements in response to an applied electric field of 8V/cm were recorded and the velocity of individual cells was calculated. The  $\zeta$  potentials were calculated with the conventional Smoluchowski theory for each cell. About one hundred cells were followed at each measurement. The experiment was repeated three times for each of six separate cultures.

The electro kinetic properties of the sand and the glass beads used in transport experiments were measured by a streaming potential analyzer Zetacad (CAD Instrumentation, Limours, France) in two NaCl solutions (10<sup>-1</sup> and 10<sup>-2</sup> mol.l<sup>-1</sup>). The zeta potential was calculated from the streaming potential experiments as described by Elimelech *et al.* (Elimelech *et al.* 2000). Due to the soil heterogeneity it was impossible to measure its zeta potential.

## **2.3. Saturated column experiments**

The experimental setup consisted in Plexiglas columns ( $\varnothing = 50$ mm, length = 150mm) filled either with glass beads, sand, or soil aggregates. Porosity and porous media characteristics are listed in table 1. In the case of the soil three types of columns were realized. We used three different sizes of aggregates (0.3 to 1mm, 1 to 3mm and 3 to 5mm) to obtain columns having the same total porosity, the same total inter-aggregates porosity but different patterns of this porosity. The columns packed with the smallest aggregates displayed a fine porosity approaching that obtained with the sand. Inversely,

the columns packed with the largest aggregates displayed large inter-aggregates voids as can be met in undisturbed soils. Before packing into the columns, soil aggregates were rewetted on a suction table at a water potential of -30 hPa. Next, the aggregates were compacted by layers of 3cm in the column. The bulk densities are given in table 1. Last, the columns were vacuum saturated with sterile solutions. For glass beads and sand, the columns were filled under water. Experiments were carried out at  $10^{-1}$ M and  $10^{-2}$ M NaCl concentrations for the background solution. Water fluxes used are given in table 1.

Bacterial cells were collected during the stationary growth stage, centrifuged for 5min at 5000tr/min and suspended in a sterile  $10^{-1}$ M or  $10^{-2}$ M NaCl solution. Before use, concentration of the bacterial solution was adjusted approximately to  $5 \cdot 10^7$  cells.ml<sup>-1</sup>. Injection of the bacteria in the column lasted 10 to 12 minutes depending on the columns which corresponded to 0.3, 0.33, 0,12 pore volume for the glass bead, the sand and the soil columns, respectively. Application of bacteria was followed by the injection of 4 to 5 pore volumes of the background solution. Upward circulation of the solution through the column was obtained by mean of a peristaltic pump Ismatec SA reglo digital MS-4 (Switzerland). Each column experiment was repeated at least three times with bacteria cells from separate cultures. Bacterial concentration was measured by taking 0.5ml samples at the outlet of the column for flow cytometer immediate enumeration. Standard microspheres (Bacterial Counting Kit, Molecular Probes, Oregon, USA) were used for cytometer calibration. The flow cytometer (Beckman Coulter, EPIC XL, Fullington, USA) settings were as follows: excitation source 488nm, fluorescence detection on FL2 channel (emission 560-590nm), analysis time 1minute, no compensation was used.

Breakthrough curves with a tracer (Potassium Bromide) were also obtained for the various porous media. The breakthrough curves were measured for two purposes. First, tracer breakthrough curves reveal the porosity patterns and thus the differences between the porous medium. Second, a comparison of these curves with those obtained for bacteria is useful for revealing phenomena involved in bacteria displacement and in particular the competition between physical and chemical mechanisms. A convection dispersion model was used to analyze the breakthrough curves obtained on sand and glass beads columns. Curves obtained on columns packed with aggregates were analyzed with a two-regions (mobile-immobile water) model.

#### 2.4. Undisturbed columns with rain simulation

In order to get closer to conditions occurring in the field, bacterial transport experiments through intact soil columns in response to a rain fall were carried out. Two undisturbed soil columns (15 cm in diameter and length of 30 cm) were extracted from the surface layer of a nearby field (Avignon, FRANCE). The soil (calcisol) extracted contained randomly distributed roots, worm holes or some stones. Soil composition is 11% clay, 37% loam and 52% sand. A rain simulator consisting of 57 hypodermic needles was used to apply water. De-ionized water was used. The application rate was 20mm/h for one column and 30mm/h for the other and lasted 1 hour for both columns. In the seconds preceding the rain, a solution containing the bacteria (10 ml and concentration of about  $5 \cdot 10^8$  cells.ml<sup>-1</sup>) was carefully and as homogeneously as possible distributed at the soil surface. As for saturated experiments, solution samples were collected at the bottom of the column and cells enumerated with the flow cytometer. Samples were taken at regular time increments except during the decrease of the flows.

#### 2.5. Model development

The transport models used for simulating bacterial cells displacement in porous media combine the convection dispersion equation with various representations of the attachment and detachment processes. Deposition of cells on the solid is usually modeled with a first-order equation, the rate constant of the process being either calculated with the classical correlations or fitted to breakthrough curves. Detachment kinetic of the deposited cells is included in some models (Becker *et al.* 2004; Bradford et Bettahar 2006; Chen et Strevett 2003; Mallen *et al.* 2005; Tong et Johnson 2006). Among these models, (Becker *et al.* 2004) proposed a detachment rate decreasing when the residence time of the cell on the solid increases. Instantaneous reversible adsorption is sometimes used (Chen *et al.* 2003; Chen et Strevett 2002; Mallen *et al.* 2005).

The model we developed considers that two types of sites can be involved in bacterial cells retention. As usual, we assume that there are sites where bacteria can be kinetically deposited and eventually detached. Deposition and release rates can be different. In addition, we assume there are sites or regions where bacteria can be temporarily retained but that, at these sites, they do not experience strong interaction with the solid phase, thus

Porous medium	Ionic Strength : 0.01M	Ionic Strength : 0.1M
Glass beads	94.9 (3.8)	0.85 (0.01)
Sand	90.4 (2.6)	0.0 (0.0)
Aggregates (0.3 – 1)mm	10.5 (1.5)	0.27 (0.07)
Aggregates (1 – 3)mm	40.2 (2.8)	22.25 (1.2)
Aggregates (3 – 5)mm	50.7 (6.4)	31.8 (4.9)

**Table 2:** Mean percentage of bacteria recovered at the outlet of the columns for the various porous media and ionic strength used.

The standard deviation is given between the parentheses.

Experiments	$k(\text{cm}^3/\text{g})$	$\omega(\text{h}^{-1})$	$k_d(\text{h}^{-1})$	$k_r(\text{h}^{-1})$	$\theta$	$\theta_{\text{tracer}}$	$\lambda(\text{cm})$
GB 0.01M	0,0155 (0,009)	16,7 (11,02)	0,125 (0,01)	0,068 (0,018)	0,352 (0,015)	0,373 (0,007)	0,042
GB 0.1M	0,07 (0,0144)	5,42 (1,33)	9,545 (0,015)	0,01 (0)	0,35		
SAND 0.01M	0,0334 (0,0052)	5,93 (0,9)	0,21 (0,045)	0,098 (0,03)	0,38 (0,003)	0,37 (0,014)	0,046
SAND 0.1M	ND	ND	40	ND	0,38		
(0.3 – 1) 0.01M	0,0692 (0,03)	6,2 (3,7)	7,48 (0,7)	0,016 (0,016)	0,15	0,36	0,13
(0.3 – 1) 0.1M	0,46 (0,2)	0,115 (0,06)	12,87 (0,63)	0,03	0,244 (0,017)		
(1 – 3) 0.01M	0,0345 (0,0097)	17,2 (7)	2,67 (0,5)	0,0187 (0,003)	0,158	0,325	0,415
(1 – 3) 0.1M	0,086 (0,01)	48,2 (21,7)	7,16 (0,77)	0,03	0,15		
(3 – 5) 0.01M	0,063 (0,003)	16,5 (5,7)	2,48 (0,62)	0,063 (0,016)	0,15	0,339	0,559
(3 – 5) 0.1M	0,072 (0,01)	62,7 (35,6)	4,38 (0,44)	0,03	0,14		
Undisturbed (20 mm/h)	0	0	13,8	3,67	0,03		
Undisturbed (30 mm/h)	0	0	13,7	3,94	0,03		

**Table 3:** Fitted model parameters for the various experiences:  $\theta_{\text{tracer}}$  is the water content fitted from the tracer experiments.

For the glass beads (GB) and sand columns the C-D model was used to analyse tracer experiments. For the columns made up of aggregates,  $\theta_t$  corresponds to the mobile water fitted by the MIM model. Numbers between parentheses are SD.

making their release in the flow an easy and relatively rapid process. Exchange between the bulk flow and these retention sites is also assumed to obey a first order process. We do not consider instantaneous reversible adsorption.

Assuming that the transport is modeled by the convection dispersion equation, the mass balance equation writes:

$$\theta \frac{\partial C}{\partial t} = \theta D_h \frac{\partial^2 C}{\partial z^2} + q \frac{\partial C}{\partial z} - \rho \left( \frac{\partial S_1}{\partial t} + \frac{\partial S_2}{\partial t} \right)$$

with  $t$  time (T),  $z$  depth (L),  $\theta$  water content ( $L^3.L^{-3}$ ),  $\rho$  bulk density ( $M.L^{-3}$ ),  $q$  water flow ( $L^3.L^{-2}.T^{-1}$ ),  $D_h$  hydrodynamic dispersion ( $L^2.T^{-1}$ ),  $C$  (cells. $L^{-3}$ ) the amount of cells in the solution and  $S_1$ ,  $S_2$  (cells. $M^{-1}$ ) the quantity of bacteria on the weak interaction sites and deposited on the solid, respectively.

The equation for type 1 sites is:

$$\frac{\partial S_1}{\partial t} = \omega_1 (kC - S_1)$$

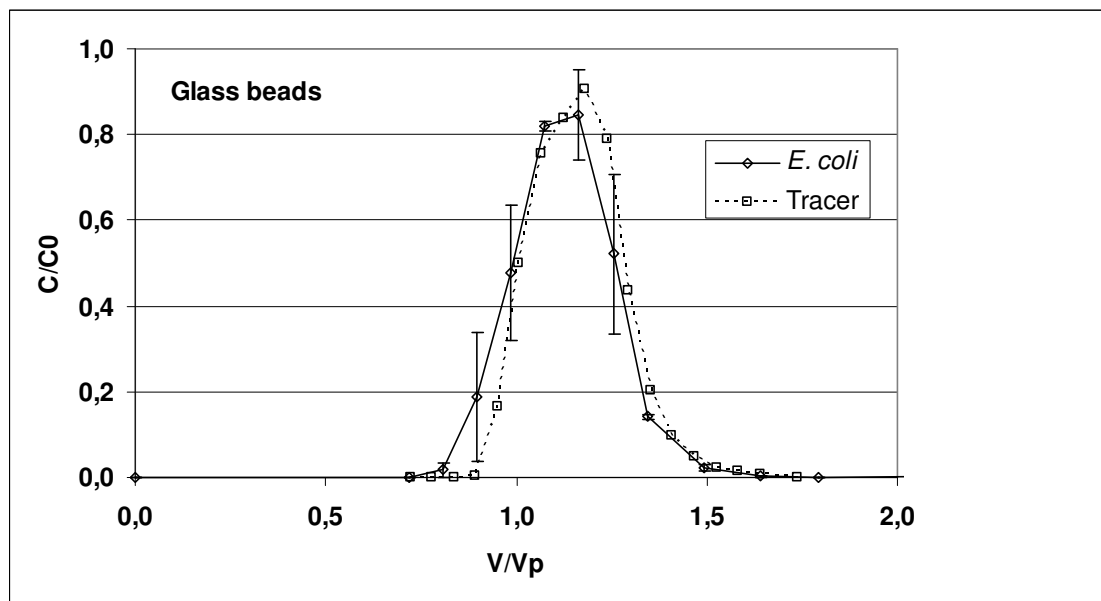
with  $k$  the partition constant ( $L^3.M^{-1}$ ) and  $\omega_1$  ( $T^{-1}$ ) the rate constant for reversible exchange. For sites of the second type we have the following equation:

$$\rho \frac{\partial S_2}{\partial t} = k_d \theta C - k_r \rho f S_2$$

with  $k_d$  ( $T^{-1}$ ) the rate constant for deposition,  $k_r$  ( $T^{-1}$ ) the rate constant for release and  $f$  the fraction of deposited bacteria that can be released. Note that we assume that for sites of the first type (weak interaction between the cells and the solid) the rate constant is the same for attachment and detachment, while for the sites of the second type (deposition) the attachment and detachment rate constants may be different and in particular, setting  $k_r$  ( $T^{-1}$ ) to 0 allows irreversible deposition. Also, setting parameter  $\omega_1$  to zero, the model reduces the model proposed by (Tong et Johnson 2006).

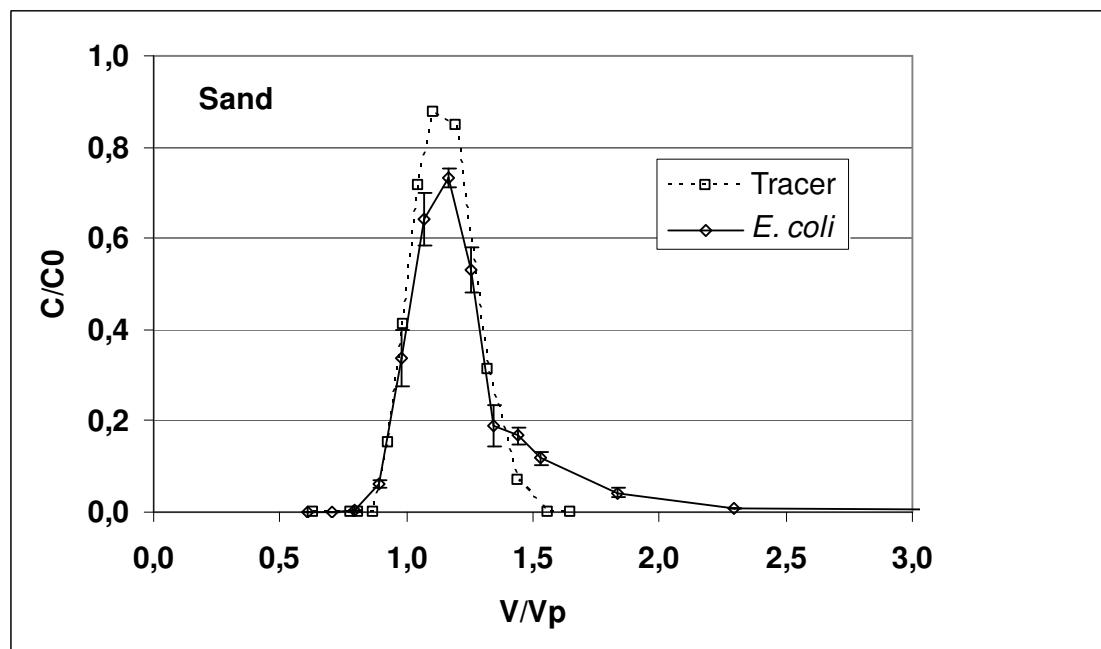
These equations are solved with an implicit finite difference schema. The solution was coupled with a least-squares minimization algorithm for estimation of parameters.





**Figure 1 :** Tracer and *E. coli* breakthrough curves for the glass beads columns.

Error bars indicate the range of observed cells concentrations.



**Figure 2:** Tracer and *E. coli* breakthrough curves for the sand columns.

Error bars indicate the range of observed cells concentrations.

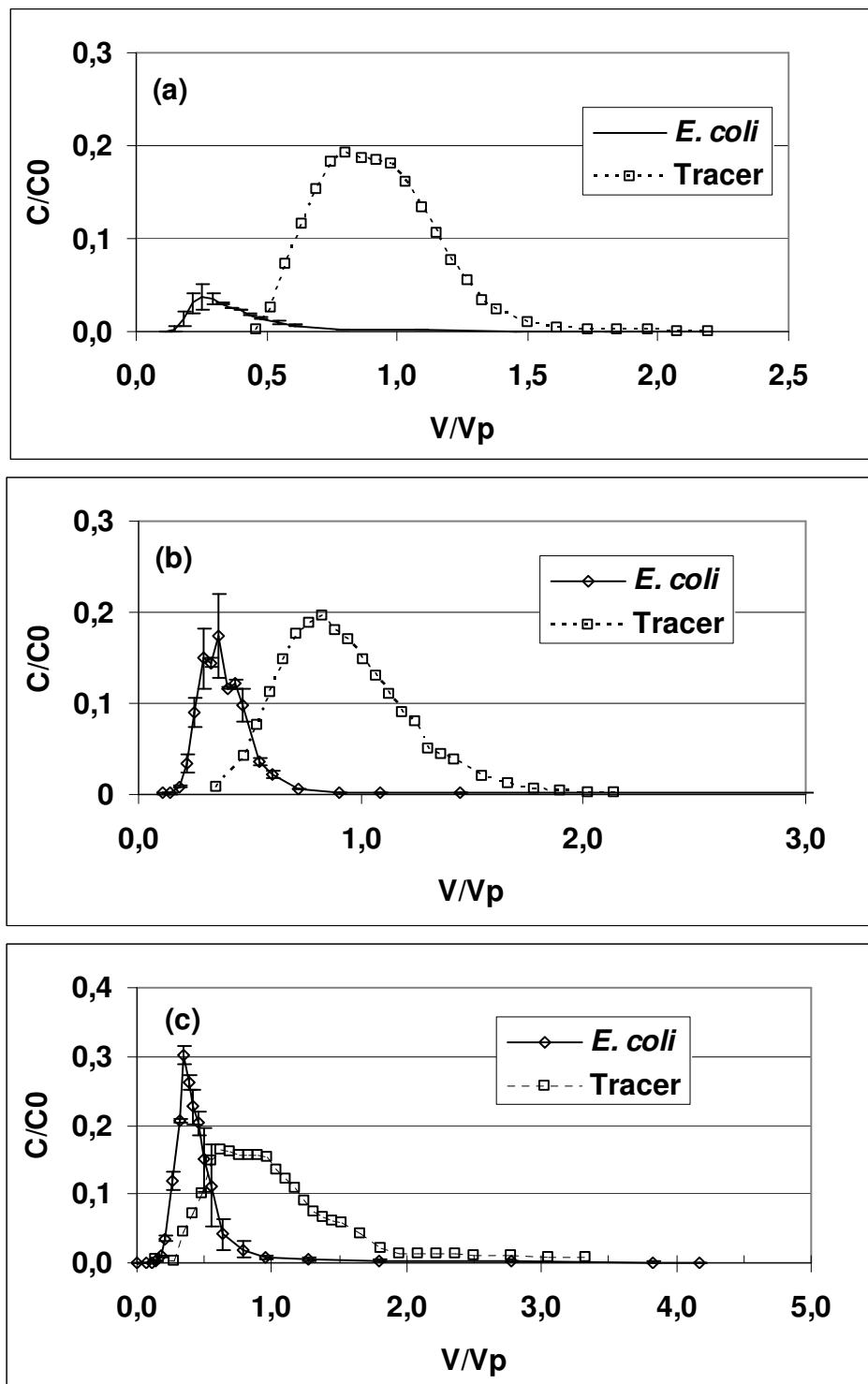
### 3. Results and discussion

#### 3.1. Saturated column experiments

Whatever the porous medium and the ionic strength, bacterial cells transport experiments were very repeatable (Table 2, Fig. 1, 2, 3, 4, and 5).

The breakthrough curves recorded for the tracer in the columns made up of glass beads and sand were similar (Fig. 1, 2). This was expected as the sizes of sand grains and glass beads were almost the same. So, any differences in observed bacterial cells transport between these two porous media can only originate from differences in retention processes (intensity and/or mechanisms). For the glass beads, the bacterial cells breakthrough curves recorded at an ionic strength of 0.01M are very similar to the tracer breakthrough curves (Fig.1). Only a slight shift to the left is observed indicating a possible exclusion from a part of the porosity. Longer columns would be required to make sure that this is really the case. This differential advection has been reported for transport of an adhesion deficient bacteria through undisturbed cores (30 cm in length) (Dong *et al.* 2002) although their observations also display cases where differential advection is not noticeable. Observations reported by (Mallen *et al.* 2005) for in situ transport of *E. coli* and *P. putida* do not display any accelerated cells transport as compared to the tracer. The amount of recovered bacteria (table 2) is large. Only a small part remains in the porous medium. Filtration is not responsible for this retention (Jacobs *et al.* 2007). Given their negatives charges, the bacteria and the solid particles experienced high repulsive interactions. In the condition of the experiment (ionic strength and surface charge of solid and bacteria), the secondary minimum calculated with the DLVO theory is shallow (1kT) and can be easily overcome by drag forces as calculated according to the work of Bergendahl and Grasso (Bergendahl et Grasso 2000). Hence, we think that the bacteria retained in the porous media are not retained in secondary minima, but blocked at beads junctions (Choi *et al.* 2007; Johnson *et al.* 2007).

For the sand columns, the behavior is slightly different (Fig. 2). The bacterial cells breakthrough curve is similar to the tracer breakthrough curve but display a tail indicating that bacteria are temporarily retained in the porous media and are being reversibly

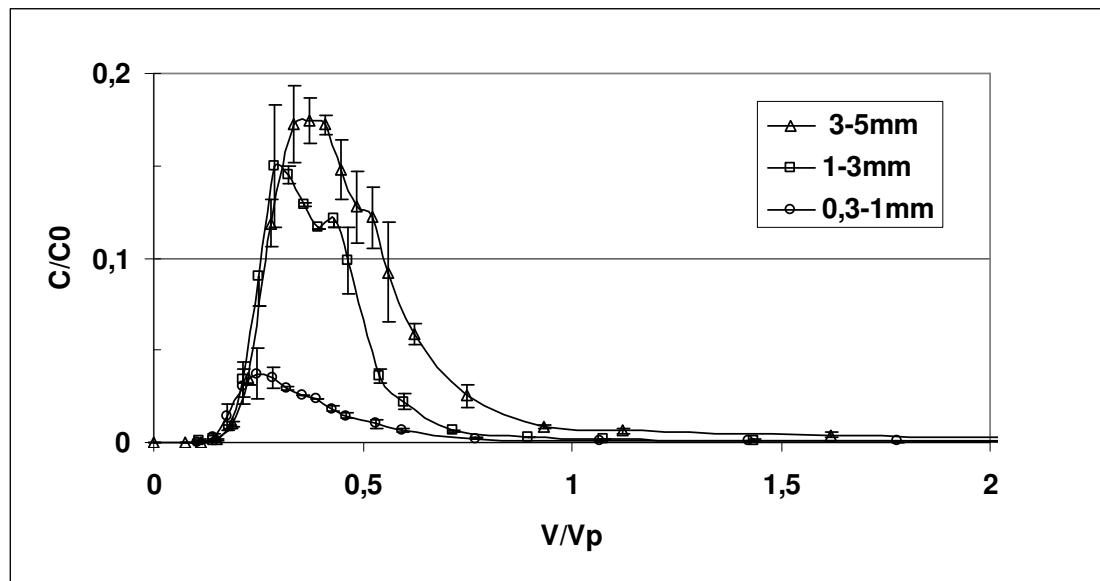


**Figure 3:** Tracer and *E. coli* breakthrough curves for the columns packed with aggregates.

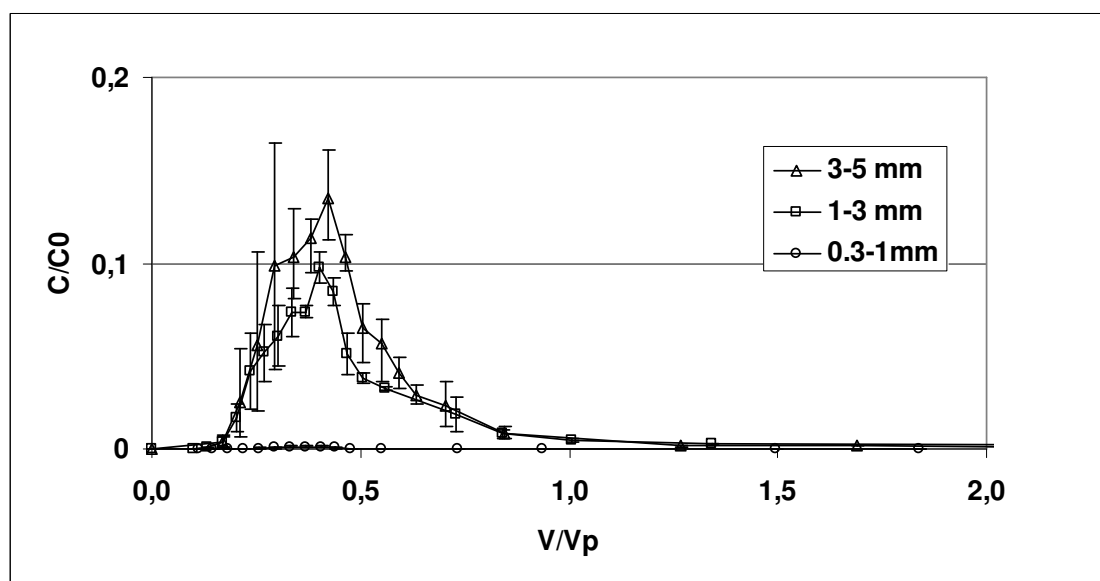
(a) 0.3 – 1mm, (b) 1 – 3 mm, (c) 3 – 5 mm. Error bars indicate the range of observed cells concentrations.

exchanged between the bulk flow and retention regions. In addition, the amount of bacteria irreversibly retained is slightly larger than for the glass beads columns (table 2). These differences originate from the roughness properties of the sand grains that enhance retention as compared to the smooth glass beads. This behavior has already been observed at a microscopic scale (Choi *et al.* 2007) and predicted by a small scale modeling of colloids interactions with the solid phase (Johnson *et al.* 2007). The breakthrough curves indicate also that there are two retention mechanisms acting in parallel: irreversible or slowly reversible trapping revealed by the recovery percentage and relatively fast reversible exchange revealed by the shape of the curve (curvature just before the tail).

The breakthrough curves measured for the tracer in the columns made up of aggregates correspond to weakly structured porous media with early breakthrough and tailing being more and more apparent as the size of the aggregates increases (Fig. 3a, b, c). For all the columns with soil aggregates, the breakthrough curves of the cells are markedly shifted to the left of the tracer curves. This indicates that transport of cells occurs in a portion only of the soil water. Differential advection is important in these cases. The columns were packed to obtain the same intra and inter aggregate porosities. As a consequence, the first bacteria were detected at the outlet of the columns at similar times (0.1 pore volume) (Fig. 3a, b, c). Also, the curves are asymmetrical with a sharp increase followed by a tail. This indicates that a fraction of the bacteria are being exchanged between reversible retention sites and the bulk flow as for the sand columns. At the ionic strength of 0.01M, the amount of bacteria retained in the porous media depends largely on the size of the aggregates (Fig. 4, table 2). The quite large retention measured for the columns made up of small aggregates indicates the existence of favorable sites within the soil. As compared with the sand and glass beads columns, the electrostatic repulsions are probably not so important in this type of porous media. At least, one may think that there are sites with positive charges for which the interaction energy with the bacteria is negative (attraction). However, despite the presence of favorable sites, a part of the bacteria are not retained. When the size of the aggregates increases, the amount of bacteria retained decreases markedly. This indicates that retention of bacteria in a porous medium depends not only on the chemical properties of the solid and the cells, but also on the flow pattern.



**Figure 4:** Comparison of *E. coli* breakthrough curves for the various aggregates sizes at an ionic strength of 0.01M.



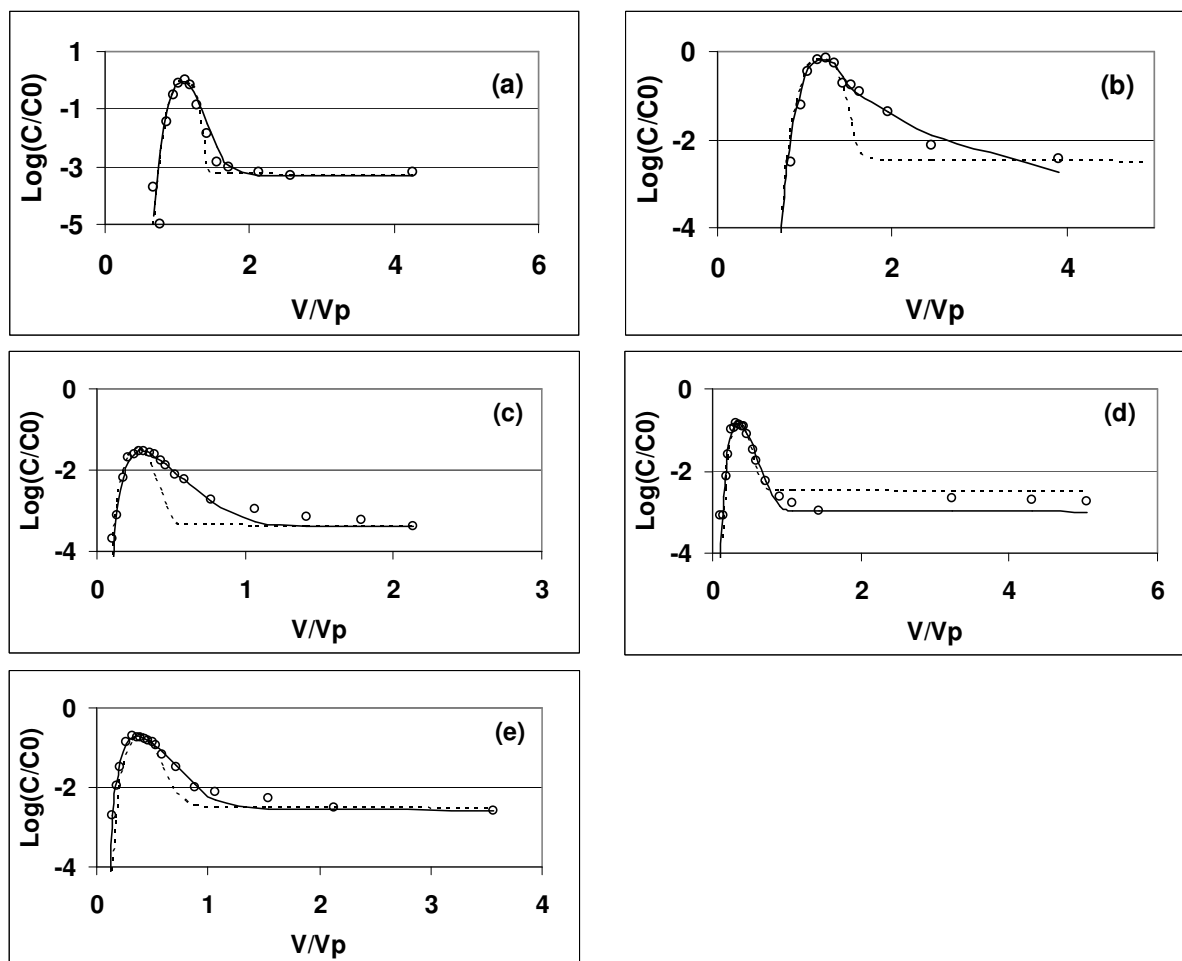
**Figure 5:** Comparison of *E. coli* breakthrough curves for the various aggregates sizes at an ionic strength of 0.1M.

At an ionic strength of 0.1M, the behavior is completely different. For the sand and glass beads columns, retention of bacteria is almost complete (Table 2). Despite the unfavorable conditions, (positive free energy of interaction), the bacteria are trapped in the porous media. The free energy of interaction between the cells and the solid were calculated using the DLVO theory (van Oss 1994) and the previously determined cell and porous media surface properties (Jacobs *et al.* 2007). The depth of the secondary minimum is of about  $-3kT$  in these conditions, which is not very large, but the Debye-Huckel length is severely reduced as compared with the 0.01M conditions. So despite the high electrostatic repulsive forces, the bacteria can approach the solid phase close enough to have the opportunity to establish contact and to have physical interactions. It should be noted that filtration is not the mechanism responsible for retention. One argument for this is that the bacteria are not retained at 0.01M. In addition, the size of the cells and of the solid grains were such that filtration should not occur (Bradford *et al.* 2002). For the columns made up of aggregates, retention is only slightly improved when the ionic strength is increased (Table 2, Fig. 5). For the smallest aggregates, bacteria are almost completely retained, but still about 1% of the injected cells are recovered at the outlet. For the larger aggregates, the percentage of recovery is still larger than 20%. So, for the soil, the role of the ionic strength is not as important as observed for retention in the sand and glass beads columns. These observations show that in porous medium displaying a porosity network not as simple as in sand or glass beads columns; the flow pattern plays a major role among the mechanisms determining cells retention.

All the breakthrough curves obtained, whatever the solid phase and the ionic strength, display a long tail with very low concentration ( $10^{-3}$  to  $10^{-4}$  times the input concentration). Figure 6 a,b,c,d,e illustrate this phenomena. These tails indicate that a fraction of the bacteria, which were retained in the porous medium, are slowly released in the bulk flow.

### 3.2. Undisturbed columns experiments

Figure 7a, b show the bacterial concentration and the water flux measured at the outlet of the two columns as a function of time. At the end of drainage, the cumulative quantity of



**Figure 6:** Comparison of observed and simulated breakthrough curves for the various porous medium (a) glass beads, (b) sand, (c) 0.3-1mm aggregates, (d) 1-3 mm aggregates, (e) 3-5 mm aggregates.

The circles are the observations, the solid line is the two-site model and the dashed line the model assuming that the fast sites are not present.

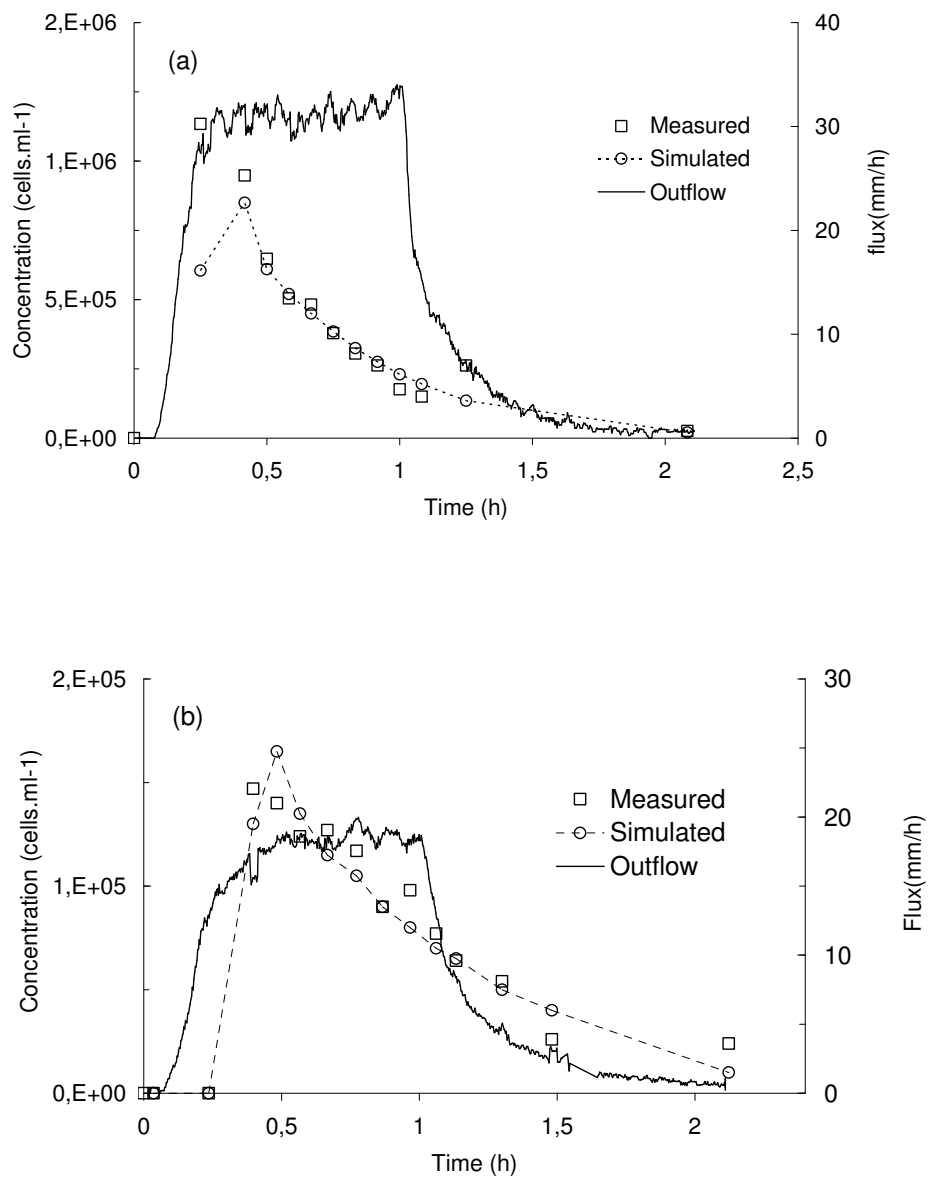
bacteria recovered was 1% and 5.5% of the injected amount for the 20mm.h<sup>-1</sup> and the 30mm.h<sup>-1</sup> columns, respectively. For both columns, the peak of concentration appeared very early. For the 30mm.h<sup>-1</sup> column it corresponded to the first water sample collected and to the second water sample for the 20mm.h<sup>-1</sup> column. In both cases, the peak was followed by a slow decrease of the concentration. For the highest flow rate the peak was one order of magnitude higher than for the other column. Hence it seems that bacteria retention diminishes when the flow rate increases. In both case the water content participating to transport is very low. Using the measured outflow curves and knowing the flux applied, one can assess this water content as the difference between the cumulated input and cumulated output when the plateau is reached. These values are 0.03 and 0.04 for the 20mm.h<sup>-1</sup> and 30mm.h<sup>-1</sup> columns. These values are close to those obtained when fitting a kinematics waves dispersion model (Di Pietro *et al.* 2003) which gives a mobile water content of about 0.02. So with these experimental conditions (high velocity and low ionic strength), a large amount of bacteria could be expected at the outlet. The small quantity recovered and the curves indicate that bacteria are rapidly trapped and then released at a decreasing rate.

### 3.3. Model comparisons

The fitted parameters were the water content  $\theta$ , the partition constant  $k$  (L<sup>3</sup>.M<sup>-1</sup>) and the rate constant  $\omega$  (T<sup>-1</sup>) for fast reversible sites, the rate constant for deposition  $k_d$  (T<sup>-1</sup>) and the rate constant for detachment  $k_r$  (T<sup>-1</sup>). The parameter  $f$  was taken equal to unity. The model with the two sites successfully represented the various breakthrough curves observed. Figures (6abcde) present some examples of the model restitution for the saturated columns. Simulation results are also presented in figure 7 for the undisturbed soil columns. The fitted parameters are given in table 3. For the sand column at a 0.1M ionic strength experiments, the deposition coefficient  $k_d$  was set to the lower value for which the model predicted a zero concentration at the outlet.

The water content that were fitted for the experiments carried out with the glass beads and the sand are very close to those obtained from the tracer experiments. They are also almost identical to the porosity calculated from the mass of solid (0.371 and 0.385 for glass beads and sand columns respectively). This confirms that in sand and glass





**Figure 7:** Water flow and observed and measured cell concentrations at the outlet of the two undisturbed soil columns: (a) Input flow is 30mm/h (b) Input flow is 20mm/h

beads columns, the volume of water transporting the bacteria is close to that for the tracer. For the columns made up of soil aggregates, the mobile water content fitted for the tracer agrees with the inter-aggregates porosity. For the cells, the fitted water content is significantly lower than the inter-aggregates porosity, indicating that the transport occurs mainly in a reduced fraction of the mobile water. The fitted water content is almost the same whatever the size of the aggregates at 0.01M and amounts to about half the mobile water calculated with the tracer. A slightly larger value was obtained at 0.1M for the small aggregates.

Although no clear trend seems to emerge from the parameters  $k$  and  $\omega$  obtained for the various columns the following points may be underlined. These parameters allow accounting for a rapid and reversible exchange of bacteria between the bulk flow and retention sites with weak solid-bacteria interaction. If they are set to zero, the other parameters being fitted, the model cannot reproduce the part of the curves just before the tail. Figure 6 illustrates this point. The effect is most visible for the sand and for the small aggregates. The values fitted for  $\omega$  indicate that it is a relatively rapid process as compared to deposition. Also, the  $k$  values seem to be larger for the 0.1M ionic strength experiments. This can be explained by temporary retention in a secondary minimum energy that is deeper due to compression of the electrical double layer when the ionic strength is high. Bacteria retained in secondary minimum can be easily released in the flow as they have not established strong links with the solid phase. This is in agreement with previous observations (Jacobs *et al.* 2007; Redman *et al.* 2004).

The fitted deposition coefficients show a strong dependence on ionic strength, especially for the glass beads and the sand. The deposition rate coefficient in a porous medium can be estimated as:

$$k_d = \frac{3}{2} \frac{(1-\theta)}{d_c} \alpha \eta v$$

where  $\theta$  is porosity,  $d_c$  is collector grain diameter,  $v$  is velocity and  $\alpha$  is collision efficiency. Correlations (Rajagopalan 1976; Tufenkji et Elimelech 2004) are available for estimating  $\eta$ . For the sand, the deposition coefficient in favorable condition ( $\alpha=1$ ) calculated with the above relationship was  $k_d=31.3 \text{ h}^{-1}$  (R-T) or  $k_d=19.2 \text{ h}^{-1}$  (T-E). These estimations agree with the fitted value for the 0.1M ionic strength experiments ( $k_d > 20 \text{ h}^{-1}$

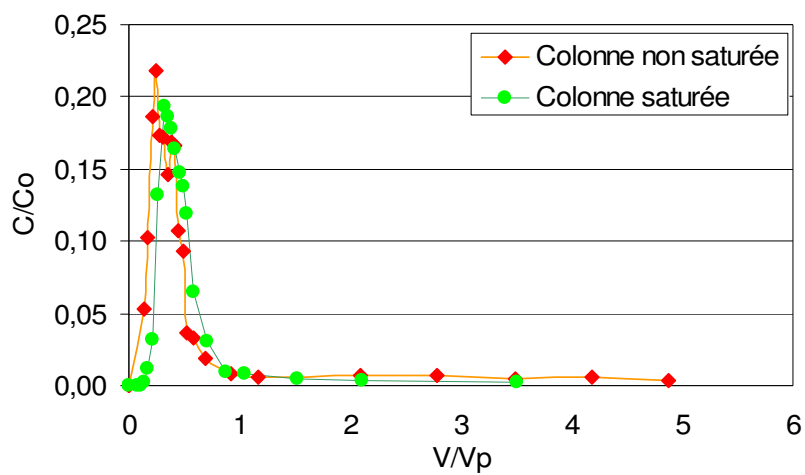
<sup>1</sup>). For the glass beads at an ionic strength of 0.1M, the fitted deposition coefficient ( $k_d = 9.5 \text{ h}^{-1}$ ) is lower than the values calculated from the correlations indicating a collision efficiency lower than unity. At this ionic strength the electrostatic repulsions are still present but the width of the electrical double layer is of about 1nm, hence allowing the cells to approach closely the solid phase. Despite the presence of the energy barrier, the retention observed in these columns can be explained by cells being trapped at grain junctions (Tong et Johnson 2006), this mechanism being more efficient with irregular and rough sand grains than with spherical and smooth glass beads. For the soil columns, the deposition depends largely on the size of aggregates; the smaller the aggregates the better the deposition. In addition, the effect of the ionic strength is not as important as for the sand and the glass beads. In particular the deposition that is already important at an ionic strength of 0.01M with the small aggregates is only slightly improved when the ionic strength is 0.1M. This reveals a relative dominance of physical versus chemical effects on the transport of cells in porous media with complex flow structure as opposed to what is observed in porous media made up of identical particles. The release coefficient does not show any clear trend as function of solid or ionic strength.

#### 4. Conclusions

The measured breakthrough curves indicate that the volume of water involved in the transport of bacterial cells can vary considerably from one media to another. While this volume is very similar to that of a tracer in sand and glass beads columns it is much lower than mobile water in aggregated porous media probably because the diffusion of the cells is orders of magnitude lower than that of the ions. Hence, one must be careful when modeling the transport of these colloids in heterogeneous porous media.

For all the porous media, the breakthrough curves and the comparison with the model indicate that two types of retention sites are present. One type is characterized by a rapid and reversible exchange of bacteria and explains the curvature of the breakthrough curves just before the tail begins. This temporary retention is probably related to stagnant flow regions and low energy secondary minima. The second type corresponds to usual deposition with slow release of the cells. Also, for all the porous media, a tail was observed corresponding to the release of deposited cells.

The effect of the ionic strength is very apparent for the glass beads and the sand. In these media with fine grains and a simple hydrodynamics, retention is almost complete (collision efficiency factor close to 1) for an ionic strength of 0.1M while it is very weak at an ionic strength of 0.01M. Conversely, the effect is much less for the columns packed with aggregates. In these porous media characterized by a more complicated hydrodynamics and larger particles, transport seems to be the dominant factor. In addition, the experiments on sand and glass beads columns confirm that retention is possible in presence of a high energy barrier; wedging being the anticipated phenomena. The model with the two types of site correctly reproduced the various experiments while the model considering deposition only was unable to provide a reasonable restitution of the observed curves. The fitted deposition parameters in favourable conditions (high ionic strength) agree with those calculated from classical correlations.



**Figure 8 :** Transport de la souche *E. coli* PHL1314 dans un sol Poirson (3-5mm) saturée et non saturée.

Le graphique présente la concentration cellulaire normalisée en fonction des volumes de pores.

## 5. Résultats complémentaires :

Toutes les expériences de transport en colonnes n'apparaissent pas dans l'article. Cette partie présente une série d'expériences qui n'ont pas fait l'objet d'une publication. La première série est dédiée à des expériences en colonnes de sol non saturée. La seconde concerne le transport en milieu poreux de la souche *Rhizobium* YAS3401 dans différentes conditions.

### 5.1. Le transport microbien dans une colonne de sol non saturée.

Les résultats présentés dans l'article montraient une série d'expériences de transport de bactérien dans des colonnes de sol Poirson saturée. Dans ce cas de figure il n'y a que 2 phases : le sol et la solution. Pour obtenir de telles conditions expérimentales les colonnes ont été saturées sous vide afin d'éviter le piégeage d'air dans les pores du sol. Cependant lors de premières expériences, la mise sous vide de la colonne a échoué par deux fois donnant un sol non saturé. Il existe alors 3 phases : l'eau, le sol et l'air. La littérature a montré que les bactéries pouvaient être piégées aux interfaces eau air (voir § 2.4 du chapitre état de l'art). Malgré la présence d'air dans les colonnes le transport de la souche *E. coli* PHL1314 a été réalisé et les résultats sont présentés ici. Ces résultats n'ont toutefois pas fait l'objet d'une publication car il était impossible de localiser et de mesurer la taille des bulles d'air piégées.

Les expériences ont été réalisées dans des colonnes de sol Poirson avec des agrégats de 3 à 5mm. Les dispositions expérimentales sont identiques à celles décrites dans la section matériel et méthode de l'article. La figure 8 montre la comparaison entre le transport d'*E. coli* PHL1314 dans un milieu saturé et un milieu non saturé.

En colonne non saturée 77% des cellules d'*E. coli* ont été récupérées contre seulement 50% dans la colonne saturée. De plus le transport de la bactérie est plus rapide dans la colonne non saturée. La présence d'air dans les pores diminue le volume poral ce qui a eu deux effets : (i) réduction des chances de rencontre entre les cellules et la surface des agrégats du sol, (ii) augmentation de la vitesse de circulation de la solution. Ces



deux effets contribuent à la sortie plus rapide des bactéries dans le milieu non saturé par rapport au milieu saturé et à une diminution de la quantité retenue. En outre l'augmentation de la vitesse peut aussi induire une augmentation des forces de cisaillement et ainsi diminuer l'adhésion des bactéries sur les agrégats du sol.

Les résultats obtenus ne vont pas dans le sens de ce qui est rapporté dans la littérature (plus de rétention en non saturé). Cette différence est peut-être la conséquence de l'augmentation de la vitesse qui entre en compétition avec la cinétique d'attachement.

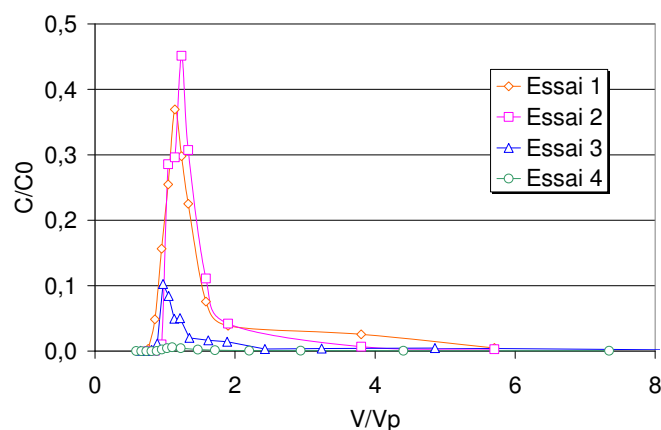
## 5.2. Le transport de *Rhizobium* YAS3401 dans différentes conditions

Tout comme pour la souche *E. coli* PHL1314 nous avons entrepris d'étudier le transport de la souche *Rhizobium* YAS3401 dans du verre, du sable et le sol Poirson du fait que cette souche présentait un comportement d'adhésion très différent de *E. coli* PHL1314 (cf Chapitre 1). La souche *Rhizobium* YAS3401 a été fournie par le Laboratoire d'Ecologie Microbienne de la Rhizosphère et d'environnements extrêmes (LEMIRE) du CEA de Cadarache. Cette souche avait été transformée au LEMIRE avec un plasmide portant le gène *gfp* codant pour la protéine fluorescente GFP permettant le comptage des cellules par cytométrie de flux. Cette souche a été isolée de la rhizosphère du tournesol et a la particularité de pouvoir produire de grandes quantités d'EPS (Alami *et al.* 2000).

### 5.2.1. Matériel et méthode

Le mode opératoire des expériences de transport en milieu poreux est identique à la méthode expliquée dans l'article de ce chapitre. Pour rappel des colonnes de sables, de verre et de sol Poirson ont été préparées et saturées avec une solution NaCl  $10^{-1}$ M ou  $10^{-2}$ M stérile. Puis une solution de *Rhizobium* YAS3401 (environ  $7.10^7$  cellules.ml<sup>-1</sup>) a été injectée pendant 10 minutes dans chaque milieu poreux avec un débit de 3ml.min<sup>-1</sup> environ. La culture de *Rhizobium* YAS3401 a été réalisée en milieu LB adapté (dilué 5 fois, sans NaCl et contenant 15mg.l<sup>-1</sup> de Kanamycine pour sélectionner les cellules contenant le plasmide) à 30°C pendant une nuit. La culture a ensuite été centrifugée à 5000rpm pendant 5 minutes. Le culot de cellules obtenu est remis en suspension avec une





**Figure 9 :** Transport de la souche *Rhizobium* YAS3401 dans des colonnes de sable à  $10^{-2}M$  de NaCl.

Le graphique présente la concentration cellulaire normalisée en fonction des volumes de pores. Les 4 essais correspondent à des cultures indépendantes

Milieu poreux	Pourcentage de cellules transportées
Sable E1	79.89
Sable E2	24.51
Sable E3	2.90
Sable E4	19.05
Verre E1	39.15
Verre E2	40.53
Sol E1	77.39
Sol E2	65,12

**Table 4:** Pourcentage de cellules de *Rhizobium* YAS récupérées en sortie de colonne dans différents milieux poreux (sable, verre et sol Poirson).

Transport bactérien réalisé à  $10^{-2}M$  NaCl avec pour chaque essai des cellules issues de cultures indépendantes.

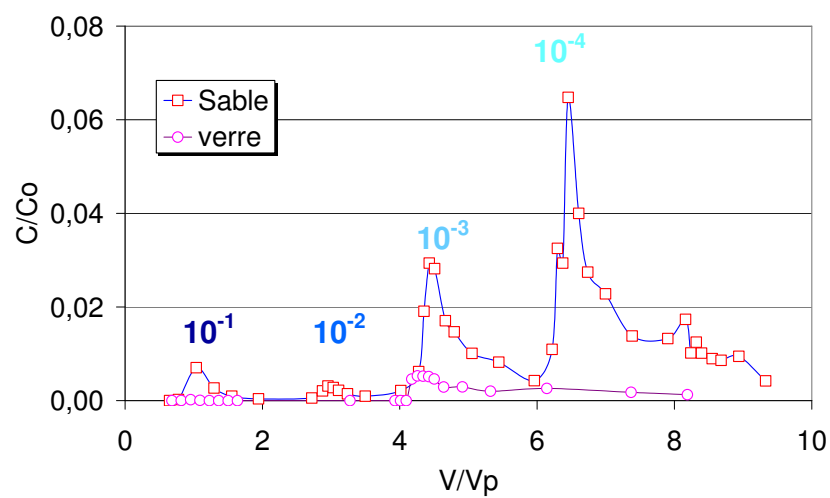
solution de NaCl  $10^{-1}$ M ou  $10^{-2}$ M stérile. Le comptage des cellules en sortie de colonne a été effectué au cytomètre de flux comme pour *E. coli* PHL1314.

### 5.2.2. Résultats

La figure 9 présente 4 essais de transport de *Rhizobium* YAS3401 dans des colonnes de sables à  $10^{-2}$ M de NaCl. Chaque essai correspond à une culture différente. L'ensemble des résultats de transport de *Rhizobium* YAS3401 pour le sable, le verre et le sol Poirson sont résumés dans le tableau 4. On constate que les résultats sont peu reproductibles et différents de la souche *E. coli* PHL1314. En effet contrairement à *E. coli* PHL1314, *Rhizobium* YAS3401 circule mieux dans le sol Poirson et moins bien dans le verre. Mais tout comme pour la souche *E. coli* PHL1314, le transport en milieu poreux de *Rhizobium* YAS est très sensible aux variations de la force ionique de la solution (figure 10). Dans le verre comme dans le sable une diminution de la force ionique provoque le décrochage des cellules vraisemblablement retenue dans le minimum secondaire comme expliqué dans l'article du chapitre 2. Il est intéressant de noter que *Rhizobium* YAS3401 est mieux transporté dans le sable qu'à travers une colonne remplie de billes de verre. Un résultat qui est également très différent de celui obtenue avec la souche *E. coli* PHL1314 et peu vraisemblable. L'ensemble de ces observations peu cohérentes entre elles, nous a amené à remettre en question la reproductibilité des propriétés de surface de cellules issues de cultures différentes et en conséquence à nous intéresser au rôle des EPS sur le transport.

### 5.2.3. Discussion

Les résultats de transport obtenus avec *Rhizobium* YAS3401 sont peu reproductibles et souvent inconsistant avec le comportement de la souche *E. coli* PHL1314 dans les mêmes conditions expérimentales. On suppose que le niveau de production d'EPS par la souche *Rhizobium* YAS3401 est à l'origine des résultats obtenus. En effet on a remarqué que lors de certaines cultures le culot bactérien était tantôt « d'aspect gluant », tantôt très « sec ». Lorsque le culot était « gluant », attestant a priori d'une production abondante d'EPS par les cellules, la bactérie était mieux transportée sur le sable. Dans le cas contraire avec un culot « sec » les cellules sont d'avantage retenues par les milieux poreux testés. Nous avons alors émis l'hypothèse que de petites variations dans les conditions de cultures ou



**Figure 10** : Impact de la diminution de la force ionique sur le transport de la souche *Rhizobium* YAS3401 dans du verre et du sable.

A chaque diminution de la force ionique du milieu une portion de cellules se décroche et se manifeste par un pic à la sortie de colonne.

de centrifugation étaient peut être à l'origine des quantités variables d'EPS sur les cellules et donc d'un comportement différent lors du transport en colonne. Deux protocoles expérimentaux ont été mis au point pour vérifier ces hypothèses. Le premier pour mesurer l'effet de la centrifugation (possibilité de perte d'EPS par les cellules sous l'effet de la centrifugation), le second sur les conditions de cultures.

### 5.3. 1<sup>ère</sup> Expérience : vérification de l'effet centrifugation sur le transport de *Rhizobium* YAS3401 sur du sable

- Culture de *Rhizobium* YAS3401 en milieu LB adapté (dilué 5 fois, sans NaCl, 15mg.l<sup>-1</sup> Kanamycine) pendant une nuit à 30°C et sous agitation (100rpm).
- Le lendemain la culture est divisée en 2 parties. Uniquement une des deux parties est centrifugée (5000rpm pendant 5 minutes).
- Le culot issu de la centrifugation est repris dans 50ml d'une solution de NaCl 10<sup>-2</sup>M stérile. Puis une suspension cellulaire ajustée à environ 1.10<sup>7</sup> cellules.ml<sup>-1</sup> est préparée à partir de la solution mère.
- Environ 1ml est prélevé de la partie non centrifugée et dilué dans 100ml d'une solution de NaCl 10<sup>-2</sup>M de NaCl. La solution est ensuite ajustée à environ 1.10<sup>7</sup> cellules.ml<sup>-1</sup>.
- Circulation des deux préparations microbiennes à travers des minis colonnes de sable en circuit fermé pendant 30 minutes avec un débit d'environ 3.5ml.min<sup>-1</sup>. Ce mode opératoire est identique aux expériences en mini colonne utilisées dans l'article du chapitre 1.
- Comptage des cellules dans la solution à la fin de l'expérience.

#### *Résultats et interprétations*

Le culot obtenu pour la partie centrifugée avait un aspect « gluant » suggérant la production d'EPS par les cellules. Après le transport en mini colonne 42% des cellules ont été retenu dans le sable pour la solution bactérienne ayant subit la centrifugation. Pour la solution bactérienne n'ayant pas subit de centrifugation seulement 31% des cellules ont été retenues par le sable. Bien que peu significative cette différence pourrait

---

<b>Culture</b>	<b>Glucose</b>	<b>Durée</b>	<b>Aspect culot</b>	<b>cellules retenues</b>
culture 1	Avec	15h	gluant	37%
culture 2	Sans	15h	gluant	45%
culture 3	Sans	18h	sec	74%
culture 4	Sans	21h	sec	71%

---

**Tableau 5 :** Résultats du transport en mini colonne de sable de la souche *Rhizobium* YAS3401 en fonction de différentes conditions de culture.

indiquer un léger effet de la centrifugation sur la physiologie des cellules et induire un changement de comportement du transport en milieu poreux. Toutefois par manque de temps aucune répétition de cette expérience n'a été faite. De plus la quantification des EPS produits par les cellules et de la quantité d'EPS éventuellement perdus sous l'effet de la centrifugation n'a pu être réalisée.

#### **5.4. 2<sup>ème</sup> Expérience : vérification de l'effet des conditions de culture sur le transport de *Rhizobium* YAS3401 sur du sable**

- 4 Cultures de *Rhizobium* YAS3401 en milieu LB adapté (dilué 5 fois, sans NaCl, 15mg.l<sup>-1</sup> Kanamycine) sont préparées au même moment à 30°C sous agitation (100rpm). La durée des cultures varient (15h, 18h ou 21h) et une des cultures est enrichie avec 0.2% de glucose (pour favoriser la production des EPS). Chaque culture est ensuite centrifugée (5000rpm pendant 5minutes) et l'aspect du culot est inspecté pour vérifier la présence d'EPS.
- Des suspensions cellulaires ajustées à environ 1.10<sup>7</sup> cellules.ml<sup>-1</sup> sont préparées à partir des culots obtenus à l'étape précédente
- Circulation de chaque suspension cellulaire à travers les minis colonnes de sable en circuit fermé pendant 30 minutes avec un débit d'environ 3.5ml.min<sup>-1</sup>. Ce mode opératoire est identique aux transports en mini colonne utilisé dans l'article du chapitre 1.
- Comptage des cellules dans les solutions à la fin de l'expérience

##### *Résultats et interprétations*

Le tableau 5 montre les résultats obtenus. Premier constat : les cultures les plus courtes (15 heures) ont donné des culots d'aspect gluant suggérant une production abondante d'EPS par la bactérie dans ces conditions. Les cultures plus vieilles (18 heures et 21 heures) ont donné des culots secs indiquant à priori des quantités d'EPS bien moindres. Il est possible que dans les cultures 3 et 4 les sources carbonées aient été épuisées incitant les bactéries à consommer les EPS.

Une différence de comportement de transport significative apparaît entre les cellules d'un culot sec et les cellules d'un culot gluant. En effet les cellules issues de la culture 1 ou 2 sont presque 2 fois moins retenues dans le sable que celles issues des cultures 3 et 4. De plus la culture 1, enrichie en glucose pour favoriser la production d'EPS, est la moins retenue. Ces résultats suggèrent que la présence d'EPS diminue la capacité d'adhésion des cellules de *Rhizobium* YAS3401 et favorise leur transport. Dans ce cas les EPS pourraient être à l'origine d'interactions stériques répulsives entre la cellule bactérienne et la surface des grains de sables comme expliqué par la figure 6 page 32.

### **5.5. Conclusion**

Ces premiers résultats constituent des pistes intéressantes sur l'implication des EPS dans les phénomènes d'adhésion et de transport bactérien en milieu poreux. Pour continuer ces travaux une quantification des EPS à la surface des cellules est indispensable en utilisant par exemple le marquage au calcofluor. Il faudra également être capable d'enlever les EPS des cellules et disposer d'un mutant ne produisant pas d'EPS pour avoir un témoin négatif. Enfin il faudra déterminer la composition chimique des EPS qui peut avoir une importance comme l'atteste la littérature. Par manque de temps et de moyens techniques ces travaux n'ont pu être réalisés.







## **Chapitre 5**

Transport et devenir en milieux poreux  
d'une communauté bactérienne issue  
de boues de stations d'épuration

Le chapitre 5 correspond à un article à soumettre pour publication dans la revue

FEMS: Microbial Ecology

**Transport and fate of a sludge bacterial community in porous media.**

**A. Jacobs, F. Lafolie, J.J. Godon and O. Berge**



**Avant propos**

Le chapitre 5 correspond à la partie appliquée de la thèse. Les chapitres 2, 3 et 4 ont permis d'aborder certains mécanismes qui régissent le transport bactérien en milieux poreux. Comment ces mécanismes influent-ils sur la communauté bactérienne issue de boues de stations d'épuration lors de son transport en milieux poreux? Y-a-t-il une migration différentielle des bactéries comme le laisse penser les résultats précédents? Peut-on isoler certaines souches transportées et identifier leurs propriétés de surface? Est-ce cohérent avec nos résultats sur l'adhésion et le transport?

Pour cela des expériences de transport ont été réalisées avec des boues prélevées à la station d'épuration de Caromb (Vaucluse, France). Des méthodes de biologie moléculaire ont été utilisées pour analyser la modification de diversité microbienne après transport et tenter d'identifier des souches transportées.

**Abstract**

Sludge from waste water plant contains bacteria which may contaminate drinking water sources when transported through soils. In this study the fate of microbial communities from three different sludge samples in saturated porous media was investigated. Microbial communities were analysed using SSCP techniques before and after their transport through either sand or soil media. Bacterial counting was performed with flow cytometer while thermo tolerant coliforms were counted on m-FC medium and identified by sequencing. Results showed that the abundance of species in the bacterial communities was severely reduced by transport through both porous media used. Simpson diversity indexes of the sludge decreased from over 6 to 4. Less than 40% and 10% of the bacteria were able to travel through the sand and the soil respectively. Despite the porous media acting as a efficient barrier against bacterial transport for a major part of the microbial communities studied still some species travelled through both sand and soil media. One strain, identified as *Rhodococcus sp.* Represented almost 7 to 9% of the SSCP patterns. Moreover three different *E. coli* strains and a *Enterococcus sp.* Were also identified from blue colonies on the m-FC agar plates. The consequences of these results on waste water effluents spreading are discussed.

## 1. Introduction

Spreading of sludge from waste water treatment units on open fields is widely practiced in France and other countries. Such process may diminish the volume of pollutants throw back directly to natural water resources of rivers or lakes. However waste water plant effluents are rich in pathogenic microorganisms and other bacteria uncommon to soil environments (Dumontet 2001). As a result spreading of sludge can cause drinking water contamination or modification of the soil ecology by bacterial transport through aquifers. Coliforms are commonly found in waste water plants and some are often responsible for gastrointestinal infection outbreaks (Crockett 2007). Coliform bacteria are microorganisms that primarily originate from the intestines of warm-blooded animals but can survive in other environments. By testing for coliforms, especially the well known thermotolerant coliform *Escherichia coli*, one can determine if the water has probably been exposed to fecal contamination (Tian *et al.* 2002; Unc et Goss 2004). The WHO (World Health Organisation) recommends *E. coli* detection in water to track fecal contamination. Bacteria from sludge able to travel through soils can thus negatively impact human health and the environment if not under control. Bacterial transport studies usually focus on one type of bacterial strain instead of an entire bacterial community like in sludge (Abu-Lail et Camesano 2003; Bradford *et al.* 2006; Stevik *et al.* 1999). Most of such studies describe two main mechanisms that are responsible for preventing bacterial transport: filtration and adsorption (Stevik *et al.* 2004). Filtration typically involves the physical blocking of bacterial movement through small pores. Filtration depends on the cell to porous media grain size ratio (Bradford *et al.* 2006), water degree saturation (Smith 1985) or clogging (Rijnaarts *et al.* 1996). Adsorption involves the bacterial cells to be attracted towards the porous media grain surface and to stick on it. Many approaches have been used to explain bacterial adhesion on solid surfaces. Among them the physicochemical approach which can be interpreted using the DLVO theory (van Loosdrecht 1989). Hydrophobic attraction and electrostatic repulsions have been reported to be major factors influencing bacterial adhesion (Li et Logan 2004; van Loosdrecht 1990). It has been widely admitted that most bacterial cells and sediments are typically negatively charged at groundwater low ionic strength and mild pH, resulting in electrostatic repulsions occurring between bacterial cells and soil particles

<b>Characteristics</b>	<b>Sand</b>	<b>Soil</b>
Grain Size ( $\mu\text{m}$ )	230-310	300-1000
Column volume ( $\text{cm}^3$ )	294,5	294,5
Dry solid mass(g)	480	340
Solid density ( $\text{g.cm}^3$ )	2,65	2,65
Column bulk density ( $\text{g.cm}^3$ )	1,63	1,15
Total porosity	0,385	0,566
Inter aggregates porosity	-	0,342
Total pore volume ( $\text{cm}^3$ )	113,4	166
Water flux ( $\text{cm}^3.\text{mn}^{-1}$ )	3,6	2

**Table 1:** Porous media characteristics and hydrodynamics

(Choi *et al.* 2007). In such conditions bacterial transport is enhanced. Jacobs *et al.* showed that differences in transport behaviours through sand among various bacterial strains were partly due to the physicochemical cell surface properties (Jacobs *et al.* 2007). They concluded that small bacterial cells with hydrophilic and negatively charged surface characteristic are most likely to be transported on long distances. Despite the increasing number of bacterial transport related articles, the literature lacks any reference about the fate of bacterial sludge community in soil environments. Waste water plant sludge is known for housing riche bacterial communities suggesting all sorts of transport behaviours depending on each bacterial strain. In this paper we are interested in studying the transport and fate of bacterial sludge community through two porous media (sand and soil). SSCP was used to characterize the community before and after transport through the porous media. We also looked for the presence of thermo tolerant coliforms as it is a valuable tool used for tracking recent fecal contamination.

## 2. Material and methods

### 2.1. Saturated column experiments

The experimental setup consisted in Plexiglas columns ( $\text{\O} = 50\text{mm}$ , length = 150mm) filled either with sand or soil aggregates. Porosity and porous media characteristics are listed in table 1. Before use, the sand was thoroughly rinsed with milliQ water on a 40 $\mu\text{m}$  filter (VWR international, 11cm, type 417) then heat treated and oven dried for at least 2 hours at 120°C. For sand, the columns were filled under water. Before packing into the columns, soil aggregates were rewetted on a suction table at a water potential of -30 hPa. Next, the aggregates were compacted by layers of 3cm in the column. Last, these columns were vacuum saturated with sterile solutions. The bulk densities are given in table 1. Experiments were carried out with a sterile  $10^{-4} \text{ mol.l}^{-1} \text{ CaCl}_2$  background solution. Upward circulation of the solution through the column was obtained by mean of a peristaltic pump Ismatec SA reglo digital MS-4 (Switzerland).

Each column experiment was repeated two times with each sample of sludge. Three samples of sludge were obtained from a rural waste water plant (Caromb, south of





France) in November 2006, January and February 2007 respectively. Each sample of sludge was used for the experiments the day it was produced at the waste water plant. For each experiment 1g of sludge was mixed with 20ml of the  $10^{-4}$  mol.l<sup>-1</sup> CaCl<sub>2</sub> solution (referred as sludge solution) and injected in the column at about 2ml.min<sup>-1</sup> (corresponding to about 60mm.h<sup>-1</sup>) followed by the bacterial free solution ( $10^{-4}$  mol.l<sup>-1</sup> CaCl<sub>2</sub>). Each experiment lasted 90 minutes which corresponds to about 3 pore volumes of the porous media used. Controls consisted of the same column experiments as described above but without the sludge. For each experiment, enumeration and other molecular biological techniques were carried out on aliquots of the whole water recovered at the outlet of the columns.

## **2.2. Bacterial counting and detection methods**

Two methods to count bacterial cells were used: mFC Agar (Fluka, Sigma-Aldrich, St Louis, USA) was used for the detection and enumeration of thermo tolerant coliforms on agar plates. Flow cytometer techniques were used to count stainable cells with the green fluorescent SYTO<sup>TM</sup> BC dye (Bacterial counting kit B-7277, Molecular Probes<sup>TM</sup>, Oregon, USA). Bacterial counting with both methods was performed on the sludge solutions prior to the experiments and on the solutions recovered at the outlet of the columns at the end of the experiments. For the enumeration of thermo tolerant coliforms samples were diluted  $10^1$  to  $10^5$  times and each dilution was incubated at 44.5°C for 24h. Each dilution was repeated three times. For the enumeration with the flow cytometer (EPICS XL, Beckman Coulter, Fullerton, USA) the samples were diluted  $10^2$  times prior to the analysis and filtered (40µm filter, 11cm, type 417, VWR international) to avoid obstruction of the device. Samples of 1ml were stained with the 1µl of the SYTO BC dye and counted using latex Standard Beads following instructions from the manufacturer (Bacterial Bacterial Counting Kit, Molecular Probes, Oregon, USA). The flow cytometer settings were as follows: excitation source 488nm, fluorescence detection on FL1 channel (emission 510-530nm), analysis time 1minute, no compensation was used.

Primers	Sequences	Amplification conditions
w49	5' ACGGTCCAGACTCCTACGGG 3'	1 cycle : 94°C 2minutes
w104	5' <i>FAM</i> -TTACCGCGGCTGCTGGCAC 3'	25 cycles : 94°C 30 seconds 61°C 30 seconds 72°C 30 seconds
w31	5' TTACCGCGGCTGCTGGCAC 3'	final cycle : 72°C 10 minutes
T7	5' TAATACGACTCACTATAGGG 3'	1 cycle : 94°C 2minutes
T3	5' ATTAACCCTCACTAAAGGGA 3'	25 cycles : 94°C 30 seconds 61°C 30 seconds 72°C 30 seconds
		final cycle : 72°C 10 minutes
S1	5' AGAGTTTGATC (A, C) TGGCTCAG 3'	1 cycle : 94°C 3minutes
S2	5' GG (A,C)TACCTTGTTACGA(T,C)TTC 3'	25 cycles : 94°C 40 seconds 55°C 50 seconds 72°C 1 minute
		final cycle : 72°C 10 minutes

**Table 2:** PCR primers and amplification conditions used in this study.

### 2.3. DNA extraction

The recovered solutions from the column experiments were vacuum filtered with Nalgene<sup>®</sup> filter units (Nalgene<sup>®</sup>, Rochester, USA) on 0.22 $\mu$ m filters (type GS, Millipore<sup>®</sup>, Bedford, USA) to collect bacterial cells. Next the filters were cut to fit into 1.5ml eppendorf tubes under sterile condition to start DNA extraction. DNA extraction was performed using Kit amp<sup>™</sup> (Qiagen<sup>®</sup>, Germany) and according to instructions of the manufacturer. Extracted DNA was frozen until analysis.

### 2.4. DNA analysis

Bacterial community from the sludge solutions and the recovered solutions from the column experiments were analysed using SSCP techniques (Single Strand Conformation Polymorphism). The total DNA extracted as explained previously was amplified with one set of primers: W49 and W104 (table 2). Reverse primer W104 was labelled with 5' fluorescein phosphoramidite 6FEM. All primers were synthesized by Eurogentec<sup>®</sup> (Liège, Belgium). Pfu turbo Dna polymerase (Stratagene, Europe, Amsterdam Zuidoost, Netherlands) was used for these PCR amplifications. PCR was performed in a total volume of 50 $\mu$ l containing 36.9 $\mu$ l of pure water, 5 $\mu$ l of 10X Pfu Turbo buffer, 4 $\mu$ l of dNTP mix (2.5mM), 1.3 $\mu$ l of each primer (100ng. $\mu$ l<sup>-1</sup>), 1 $\mu$ l of the DNA extract and 0.5 $\mu$ l of the pfu turbo (2.5U. $\mu$ l<sup>-1</sup>). All the reaction mixtures were subjected to 30 amplification cycles in a thermocycler (thermocycler 2720, AB applied Bioscience, Foster City, USA). Further PCR amplification conditions are reported in table 2. PCR products (expected band strip of 200pb) were controlled by electrophoresis on 0.8% agarose gel and visualised with UV light.

### 2.5. SSCP capillary electrophoresis

PCR products were purified with a Strata Prep<sup>™</sup> PCR purification Kit (Stratagene Europe, Amsterdam Zuidoost, Netherlands) following the manufacturer's instructions. A mixture containing 18.75  $\mu$ l deionised formamide (Applied Biosystems, Foster City, USA), 0.25  $\mu$ l internal DNA molecular weight standard Genescan 400 HD Rox (Applied Biosystems, Foster City, USA) and 1  $\mu$ l purified PCR product was denatured for 5 min at



95 °C and immediately cooled on ice. The mixture was then electrophoresed by SSCP capillary electrophoresis on an ABI Prism 310 genetic analyser (Applied Biosystems, Foster City, USA) as described elsewhere (Duthoit 2003). Assignment of dominant peaks was performed as described hereafter.

Dominant peaks in the SSCP patterns were assigned by comparing their migration with the migration of cloned 16S RNA. A clone library was prepared using genomic DNA extracted from the recovered sand column solution A which showed the highest probability to identify the major peaks of the SSCP profiles. The 16S rRNA gene was amplified with universal primers w31 and w49. In a total volume of 50 µl, the PCR mixture contained containing 36.9µl of pure water, 5µl of 10X Expand High Fidelity enzyme buffer, 4µl of dNTP mix (2.5mM), 1.3µl of each primer (100ng.µl<sup>-1</sup>), 1µl of the DNA extract from the sand column and 1µl Expand High Fidelity DNA polymerase (2.5U.µl<sup>-1</sup>) from Roche Applied Science. All the reaction mixtures were subjected to 25 amplification cycles in a thermocycler (thermocycler 2720 AB applied Bioscience). Further PCR amplification conditions are reported in table 2. The amplified product was cloned into pCR 4-TOPO vector (TOPO TA cloning Kit for sequencing) and transformed in *Escherichia coli* cells (one shot TOPO 10 chemical competent *E. coli*) following the manufacturer's instructions (Invitrogen SARL, Cergy Pontoise Cedex, France). Transformed cells were cultivated for 24H at 37°C on Luria Bertani media containing Kanamycine. Plasmid inserts of 30 obtained clones were amplified by PCR with T7 forward and T3 reverse (see table 2) to identify the strains. Next, the obtained PCR product was amplified with w49 and w104 primers to allow SSCP analysis as explained above. Finally the 16S rRNA gene clones corresponding to dominant peaks of the SSCP patterns were sequenced. Each sequence was compared with sequences in the Genbank data base using the NCBI blast program.

## **2.6. M-FC agar grown colonies identification**

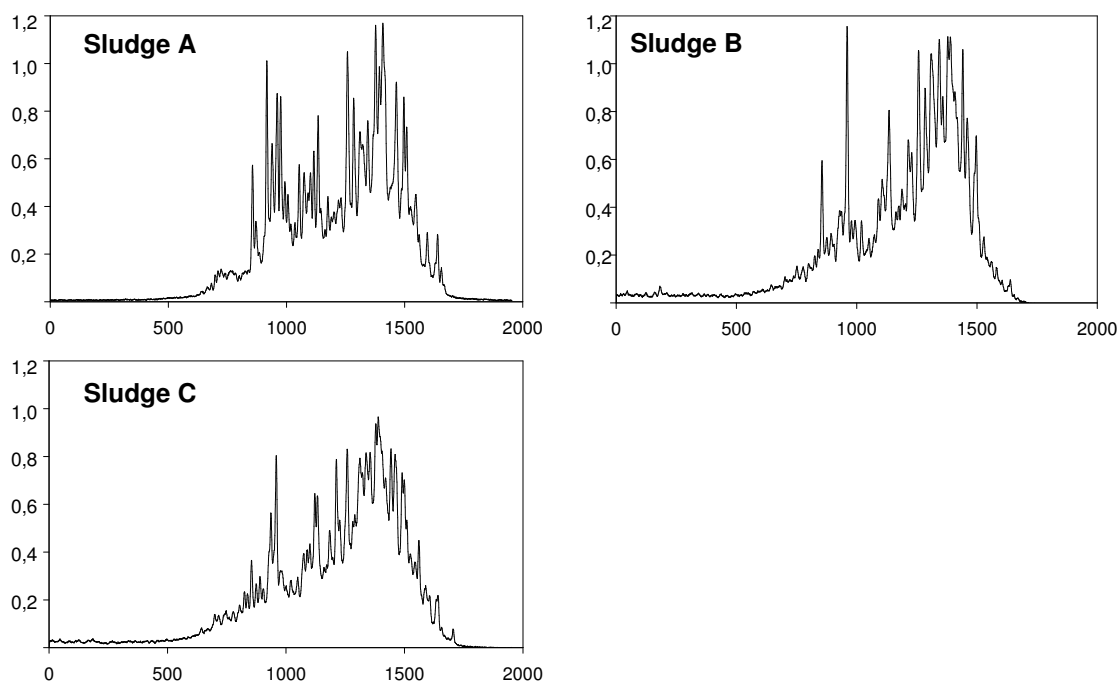
*E. coli* grow into bleu colonies on m-FC agar media. First Bleu colonies were frozen (-18°C) in ultra pure water. Then each colony was identified by amplifying and sequencing the RNA 16S using primers S1 and S2. Further PCR instructions are given in table 2.

		Sand			Soil		
		Injected	Outlet	Recovery (%)	Injected	Outlet	Recovery (%)
<b>Sludge A</b>	FCM	2.16e+09	7.02+08	32.50	NA	NA	NA
	m-FC 44°	1.48e+05	3.30e+03	2.23	1.48e+05	1.20e+03	0.81
<b>Sludge B</b>	FCM	2.89e+09	1.15e+09	39.79	2.89e+09	1.86e+08	6.44
	m-FC 44°	3.60e+04	7.66e+02	2.13	3.60e+04	4.60e+02	1.28
<b>Sludge C</b>	FCM	7.35e+09	6.34e+08	8.63	7.35e+09	1.75e+08	2.38
	m-FC 44°	5.11e+05	5.15e+03	1.01	5.11e+05	3.21e+02	0.06
<b>control (*)</b>	FCM	0	0	-	0	5.63e+06	-
	m-FC 44°	0	0	-	0	0	-

(\*) The injected solution for the control consisted of the sterile  $10^{-4}$  CaCl<sub>2</sub> solution without sludge  
FCM = Flow CytoMeter

**Table 3:** Results of bacterial counting with flow cytometer method and results of thermo tolerant coliform counting on m-FC agar plates at 44°C.

Results indicated correspond to an average obtained from duplicated column experiments.



**Figure 1:** SSCP patterns of PCR amplified 16S rRNA gene fragments from bacterial communities of sludge A, B and C.

### 3. Results

#### 3.1. Bacterial counting

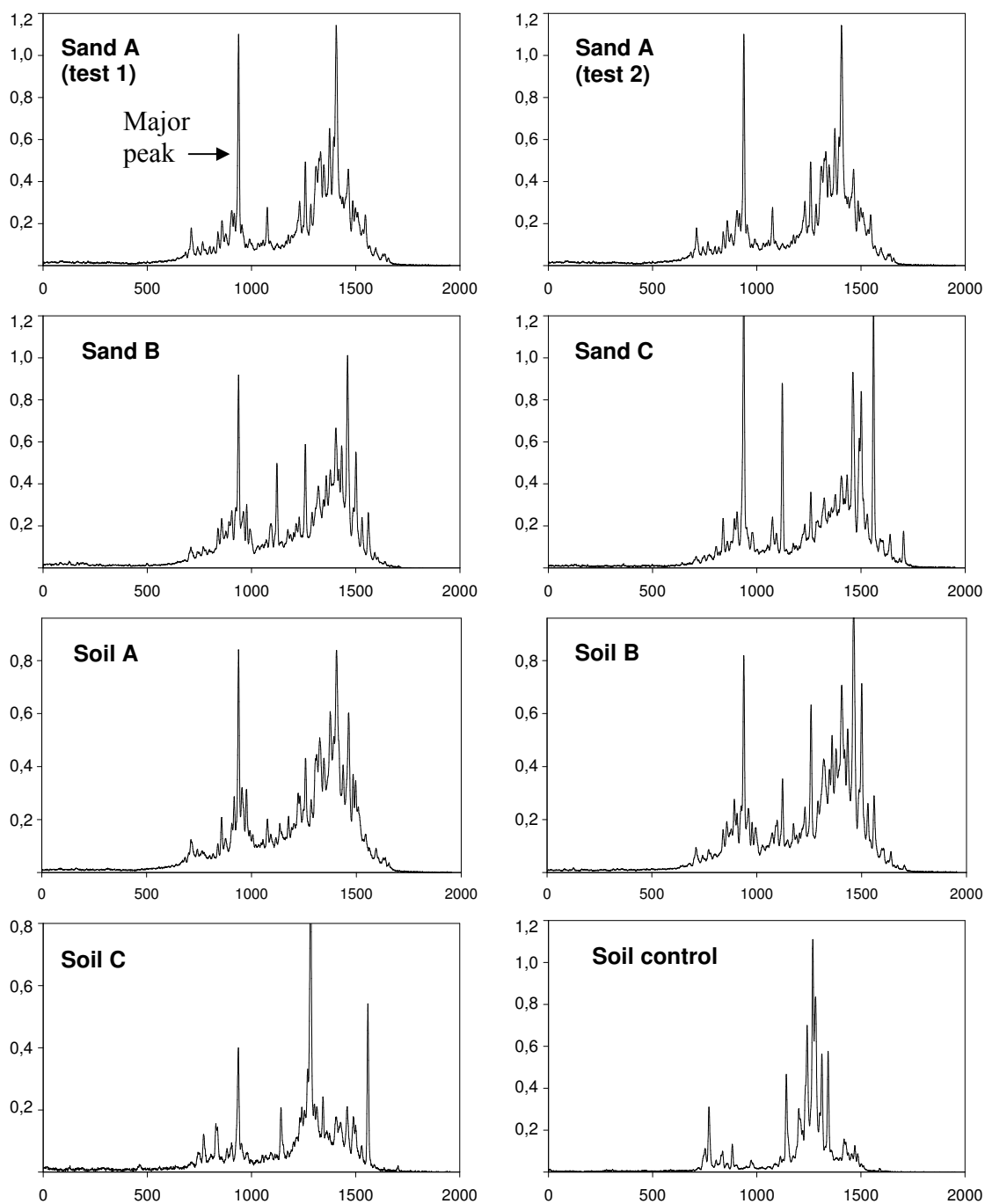
Both counting methods showed that the amount of bacterial cells in the sludge solutions were severely reduced after it was transported through both porous media used. Counting results are listed in table 3. Cell counting with the cytometer indicated that over 60% of the injected bacteria were retained by the sand and over 90% by the soil. About the same amounts of cells were transported for sludge A and sludge B meanwhile bacteria from sludge C were slightly less transported. Also more cells were counted with the cytometer in sludge C than A or B (table 3). Column experiments were repeated two times and counting results were repeatable (Results not shown). Flow cytometer counting did not detect any cells in the recovered control solution from the sand columns while the amount of cells from the soil was low (table 3).

The sludge solutions contained between  $3.6 \cdot 10^4$  and  $5.11 \cdot 10^5$  CFU.ml<sup>-1</sup> of bacteria able to grow on m-FC agar at 44.5°C. Only a few percent of these bacteria were recovered from either the sand or the soil columns (table 3). It's also interesting to notice that bacteria able to growth on m-FC agar at 44.5°C represented only a negligible fraction of the total amount of bacteria counted with the flow cytometer. The controls (transport experiment where the sludge solution was replaced with a sterile  $10^{-4}$ M CaCl<sub>2</sub> solution) indicated that the out coming solution from both porous media did not contain bacteria able to cultivate on m-FC agar (44°C).

#### 3.2. SSCP pattern analysis

SSCP patterns were obtained with the w49 and the w104 primers amplifying the V3 region of the 16S rRNA gene. Patterns were analyzed using GeneScan 3.1 Software (Applied Biosystems) and the results are compiled in figure 1 and 2. Simpson's Diversity Index was used as a measure of diversity and takes into account the number of species





**Figure 2:** SSCP patterns of PCR amplified 16S rRNA gene fragments from bacterial communities of sludge A, B and C after their transport through sand or soil media.

The Soil control corresponds to the same experiments but without sludge.

present, as well as the abundance of each species. Simpson index measurements results are listed in table 4. Bacterial communities of sludge A, B and C showed great diversity (figure 1) with Simpson indexes above 6 and over 32 major peaks. Sludge A and B were very alike with a Simpson index of 6.27 and 6.35 respectively. Sludge C presented a higher diversity with a Simpson index of 7.45 and 38 major peaks.

SSCP analysis showed that the bacterial sludge community was modified after transport on either sand or soil porous media. Figure 2 shows the SSCP patterns of out coming solutions. The Simpson indexes for the recovered solutions from the column experiments are summarized in table 3. During transport through sand porous media the microbial diversity of either A, B or C sludge was reduced (table 3 and 4). The greatest reduction of the microbial diversity occurred for sludge C whose Simpson index was decreased from 7.45 to 4.72. These results are in line with those obtained with the bacterial counting experiments which showed bacteria from sludge C were less transported than bacteria from sludge A and B. Microbial diversity reduction for sludge A and B on the sand column experiments were about the same (table 4). Also SSCP patterns entitled “sand A test 1” and “sand A test 2” in figure 2 were obtained from two distinct column experiments and illustrates that the results were repeatable (other duplicated column experiments are not shown but displayed similar repeatable results as for sand A).

Transport through the soil led to a microbial diversity reduction different from observed with the sand columns. It should be kept in mind that the soil was not sterile as opposed to the sand which was heat treated before use. While the control from the sand showed no SSCP signal (result not shown), the control of the soil had a Simpson index of 4.47 with 15 major peaks (figure 2). This result indicates that the out coming solution was containing autochthonous soil bacteria. However it was still possible to observe that transport through the soil media strongly modified the sludge bacterial communities (Soil A and Soil B and Soil C in figure 2).

All the SSCP patterns (excepted from the control) presented one identical dominant peak around abscissa 950 (Fig 2). This peak represented an estimated 5 to 8% of the total microbial population for all the recovered solutions. It showed that the bacterial strain

<b>Sludge solutions</b>		<b>Sand</b>	<b>Soil</b>
<b>Sludge A</b> (6.27)	column 1	5.60	6.52
	column 2	5.45	6.12
<b>Sludge B</b> (6.35)	column 1	5.62	5.35
	column 2	5.33	5.12
<b>Sludge C</b> (7.45)	column 1	4.72	4.69
	column 2	NA	4.69
<b>control</b>		0,00	4.47

**Table 4:** Simpson indexes obtained from SSCP pattern analysis for each out coming solution from the sand and the soil columns. Each experiments was repeated two times (column 1 + column 2), value in parenthesis indicate Simpson index of the respective sludge solutions. The control was performed without sludge solution.

corresponding to the peak is particularly well transported in porous media and was identified as *Rhodococcus sp.* However we failed to identify bacterial strains corresponding to other peaks.

### 3.3. Identification of M-FC Agar blue colonies

X bleu colonies isolated on mFC agar plates were assigned to a species, based on a >97% similarity between their partial 16S rRNA gene sequences and those in the databases (NCBI databases using the BLAST program). 3 different types of *E. coli* strains (*E. coli* HS, *E. coli* B ctg116 and *E. coli* UTI89) and 1 *Enterobacter sp.* were identified in all the out coming solutions from both porous media studied. No other thermo tolerant coliforms corresponded to the blue colonies grown on mFC agar. The same strains were identified in the all the three sludge samples.

## 4. Discussion

Both bacterial counting results and SSCP analysis showed great quantitative and qualitative reduction of bacterial sludge community when transported through soil or sand. Previous studies have shown that cell surface characteristics (Becker *et al.* 2004; Chen et Strevett 2001) (i.e. hydrophobicity, electrophoretic mobility, polymers...) and size (Gannon 1991) are important parameters influencing bacterial transport in porous media. Sludge from waste water plant contains thousands of different bacterial strains which display a wide range of cell characteristics. As a result transport behaviours through porous media of bacteria from sludge might be very variable depending on cell properties of each strain. More than 60% and 90% of the bacterial cells were not transported in the sand and soil media respectively. Thus we assume the majority of the bacteria displayed cell characteristics unfavourable for their transport through porous media. According to several authors, hydrophobicity, low electrophoretic mobility and increasing cell size contribute to bacterial deposition in porous media. Other authors described the influence of cell wall polymeric substances (EPS, LPS...) for preventing bacterial transport in a porous matrix (DeFlaun *et al.* 1999; Tsuneda *et al.* 2003). It should be kept in mind that with a  $10^{-4}$ M  $\text{CaCl}_2$  back ground solution conditions were

unfavourable for bacterial adhesion as low ionic strength result in strong electrostatic repulsions between the cells and the porous media grains. Despite these conditions bacterial retention in both porous media occurred nevertheless and other parameters than cell characteristics or physicochemical interactions are presumably involved.

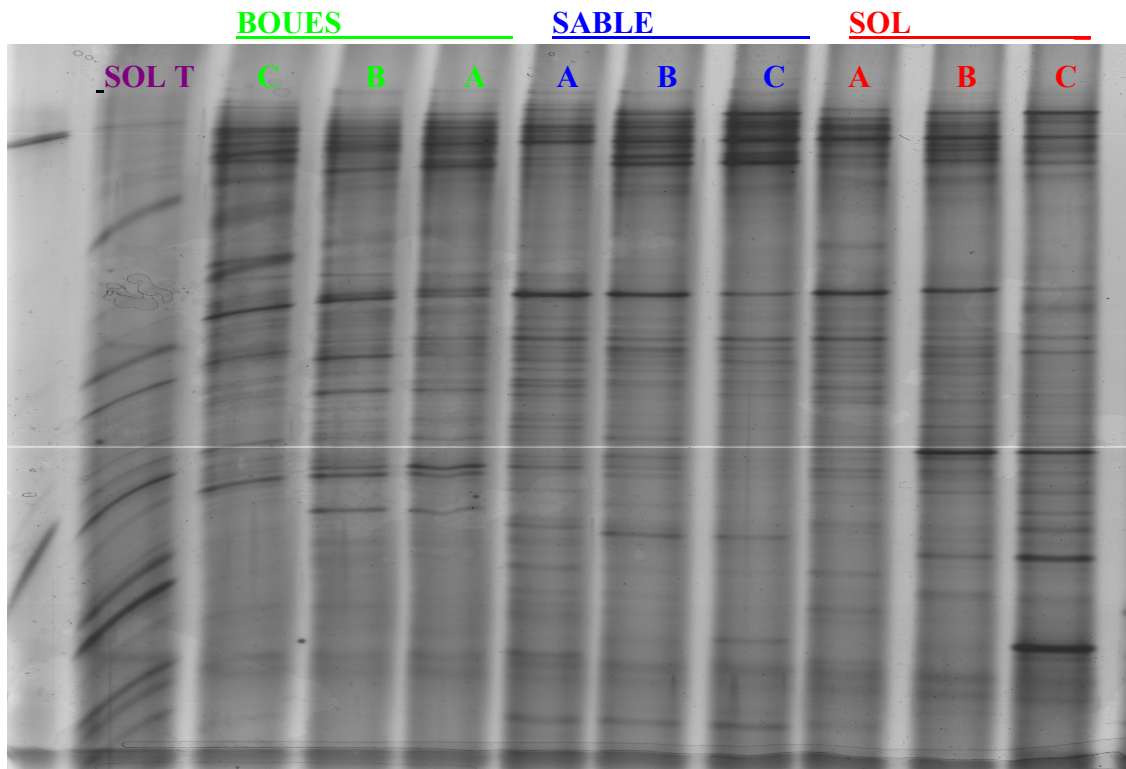
Flocculation of bacterial cells might also help for preventing bacterial transport. Bacterial cells sticking together will give shape to colloids with a great diameter and so filtration in porous media might occur. Flocculation in waste water treatment process is very common. Standing alone cells are not filtrated as their diameter is far inferior to the average diameter pore size of the porous media used. According to Bradford *et al.* filtration occurs when particle diameter is higher than  $5 \times 10^{-3}$  times the mean diameter of porous media grains (Bradford *et al.* 2002). Using this criteria with our porous material, bacterial cells with a diameter smaller than 2  $\mu\text{m}$  should not be strained.

Despite the majority of the cells being retained, the amount of bacterial strains able to travel through both the soil and the sand media should not be neglected. Several authors consider decreasing cell size and increasing negative electrophoretic mobility as the most important cell properties favourable for bacterial transport. One strain was identified as very capable of being transported through both porous media used as it represented 7 to 9% of the total bacterial communities in the out coming solutions: *Rhodococcus sp.*. *Rhodococcus sp.* transport in porous media has already been studied previously (Priestley 2006; Rijnaarts *et al.* 1996; Schafer *et al.* 1998). Under certain nutrient limited growth conditions, Priestley *et al.* observed almost 100% of the *Rhodococcus sp.* DN22 injected cells recovered at the outlet of the sand columns (Priestley 2006). Their results support our observations of *Rhodococcus sp.* transport behaviour through sand and soil media. Shafer *et al.* showed that their *Rhodococcus sp.* Strain (C125) displayed very negative zeta potential (-44mV in low ionic conditions) (Schafer *et al.* 1998). As most sediment have also negative surface strong electrostatic repulsion occur between such bacteria and the porous media grains which is a well known factor for enhancing bacterial transport. Moreover strong negative charged cell surface may avoid flocculation of *Rhodococcus sp.* cells with other bacteria as electrostatic repulsions also operate between cells (van Oss 1989). In a previous study we found a good correlation between the zeta potentials from 21 bacterial strains and their respective rate of adhesion on sand grains (Jacobs *et al.* 2007). We also found that two different *E. coli* strains showed the best transport capacity

in sand among the 21 bacterial strains studied, presumably because of their highly negatively charged cells surface. In this study three different *E. coli* strains were identified in the out coming solutions from both porous media. The zeta potentials of these three *E. coli* strains were measured according to the method described previously by Jacobs *et al.* (**Expériences en cours**). It seems that *E. coli* cells are easily transported through porous media which makes it a good indicator for fecal pollution of soils.

## 5. Conclusions

The majority of the bacterial strains from the sludge communities studied were retained by both the sand and the soil media. But despite the fact that porous media seems to act as an efficient barrier against bacterial transport still some strains were able to travel through the porous media used. Among them we identified *Rhodococcus sp.* and *E. coli* strains. Regular disposal of sludge from waste water plants may have a negative impact on the environment and on autochthonous soil bacteria if accumulation of bacteria from sludge in soils occurs. Moreover pathogenic organisms with cell characteristics close to the *E. coli* strains identified in this study are likely to be transported through soils and contaminate drinking water sources. Research should focus on these particular strains displaying great transport capabilities. In light of this study spreading of waste water effluents on fields is not without consequences and such practices should be better monitored.



**Figure 3:** Profils DGGE des Boues A, B et C de la station d'épuration de Caromb (Vaucluse) ainsi que des solutions A, B et C issues des colonnes de sable et du sol. Profils obtenue à partir d'ADN extrait. SOL T correspond au témoin sol.

## 6. Résultats complémentaires

Parallèlement à la technique SSCP une approche identique avec la méthode DGGE (Denaturing gradient gel electrophoresis) a été tentée. La DGGE est une technique d'électrophorèse permettant la séparation de molécules d'acides nucléiques (ADN ou ARN) de même taille mais de séquence nucléotidique différent. Le principe de séparation est basé sur l'ouverture des doubles brins par un agent dénaturant (par exemple l'urée) dont la concentration dans le gel augmente avec la distance de migration. L'ouverture du brin (qui dépend de la proportion de liaisons GC dans la séquence du brin) provoque l'arrêt de la migration.

La figure 3 illustre les profils DGGE obtenus pour l'extrait d'ADN des boues A, B et C ainsi que l'extrait d'ADN des solutions de boues A, B et C après leurs transport soit sur du sable soit sur le sol. Le sol témoin (Sol T) correspond à la solution transportée sur le sol sans boue.

On constate que les boues A et B ont des profils DGGE semblables mais différents de la boue C. Ce résultat est en concordance avec les résultats obtenus en SSCP. Le nombre de bandes détecté dans les profils des boues est plus importantes (une trentaine) que dans les solutions issues du sable ou du sol (une vingtaine). Ces résultats sont en analogies avec les profils SSCP qui ont montrés que la diversité microbienne d'une communauté bactérienne d'une boue diminue sensiblement après son transport sur du sable ou un sol.

Certaines bandes détectées dans les boues se retrouvent sur les profils DGGE des solutions issues des milieux poreux signifiant que les souches correspondant à ces bandes n'ont pas été retenu ni par le sable ni par le sol. Nous avons tenté de séquencer ces souches mais sans véritable succès. En effet il faut tenir compte que deux espèces peuvent correspondre à une seule bande si elles ont leurs brins d'ADN ont une proportions de liaisons GC identiques. Aussi nous avons décidé d'abandonner l'approche DGGE au profit de la méthode SSCP dont les résultats obtenus furent meilleurs.





## **Chapitre 6**

### **Synthèse des Résultats**



## **1. Analyse et synthèse des principaux acquis**

L'objectif de ce travail était d'étudier le transport de bactéries dans un milieu poreux. La finalité étant d'améliorer les connaissances qui permettent d'anticiper les risques de contamination microbiologiques liées au déplacement de bactéries dans le sol. Un point clé est donc d'identifier les facteurs physicochimiques et les caractéristiques cellulaires favorables au transport. Ceci permettant alors d'identifier des souches à risque. Pour atteindre ces objectifs nous avons cherché à caractériser et modéliser les phénomènes d'attachement et de détachement des cellules sur différents milieux poreux pendant leur transport.

### **1.1. Les facteurs régissant le transport bactérien en milieu poreux**

#### 1.1.1. Les interactions physicochimiques

Le phénomène d'adhésion est un processus cinétique dont la vitesse dépend des caractères physicochimiques de la surface des cellules et du milieu poreux traversé. Les expérimentations du second chapitre ont mis en évidence deux types de propriétés physicochimiques expliquant l'adhésion bactérienne : l'hydrophobicité et la charge électrique.

Conforme aux prédictions de la théorie XDLVO, les souches présentant des surfaces cellulaires hydrophobes adhèrent le plus rapidement sur le sable. Les interactions hydrophobes entre le sable et ces souches sont attractives et par conséquent favorisent l'adhésion de ce type de cellules dans le minimum primaire. Mais la théorie XDLVO ne permet pas de faire des prédictions d'adhésion correctes pour les souches bactériennes avec une surface cellulaire hydrophile. Selon les calculs les répulsions hydrophiles devraient empêcher toute adhésion des cellules hydrophiles sur le sable. Contrairement à cette prédiction obtenue avec la théorie XDLVO les observations ont montré que les souches hydrophiles adhèrent aux grains de sables. Ce résultat remet en doute l'utilisation de la théorie XDLVO pour prédire l'adhésion de cellules à un matériau pendant le

transport. Cette remise en cause est d'autant plus important que beaucoup de cellules bactériennes ont une surface hydrophile. Il est probable que les répulsions hydrophiles évoquées ici (XDLVO) sont insuffisantes pour empêcher l'adhésion bactérienne. La déposition des cellules hydrophiles est donc due à des mécanismes autres que ceux pris en compte par la théorie XDLVO.

La grande majorité de cellules bactériennes présentent une charge globale de surface négative tout comme le sable ou d'autres sédiments. Les interactions électrostatiques entre bactéries et le sable sont donc répulsives. Il faut cependant distinguer deux types de conditions environnementales pour lesquels l'effet des interactions électrostatiques est très différent. Les conditions favorables à l'adhésion sont causées par une force ionique élevée qui réduit fortement la portée des répulsions électrostatiques. Les conditions non favorables à l'adhésion sont causées par une force ionique faible ce qui augmente la distance d'influence des répulsions électrostatiques et par conséquent empêche les cellules d'aller au contact des grains du milieu poreux. C'est précisément dans ces conditions que les expérimentation du chapitre 2 ont révélé une corrélation significative ( $R^2 = 0.71$ ) entre la charge négative des souches bactériennes testées et la constante de temps pour la déposition. Autrement dit, plus une bactérie est chargée négativement plus l'adhésion sera retardée voir largement inhibée. Ce résultat montre donc que la propriété d'adhésion d'une souche bactérienne dépend de son potentiel zêta. A noter que la littérature mentionne également l'effet du pH sur les interactions électrostatiques. Néanmoins nous n'avons pas considéré ce facteur dans la mesure où la majorité des sols sont tamponnés entre 6 et 8.

La troisième force qui intervient dans les phénomènes d'adhésion sont les interactions Lifshitz-van der Waals. Les interactions Lifshitz-van der Waals ont la caractéristique d'être généralement attractives mais d'intensité relativement faibles par rapport aux interactions Lewis acide base ou électrostatiques (lorsqu'elles sont présentes). L'effet des interactions Lifshitz-van der Waals est fortement conditionné par la longueur de Debye comme l'attestent les résultats du troisième chapitre. Dans les conditions non favorables à l'adhésion, l'action des interactions Lifshitz-van der Waals est annulée par la barrière électrostatique. En revanche lorsque la portée des répulsions électrostatiques est

inférieure aux interactions Lifshitz-van der Waals (en conditions d'adhésion non favorable) il se forme une zone située à quelques nanomètres de la surface solide où l'énergie d'interaction est attractive. Cette zone d'énergie généralement très faible (quelques kT) est responsable de l'adhésion réversible dans le minimum secondaire. En effet les cellules bactériennes retenues par le minimum secondaire peuvent sortir de cette zone d'énergie à condition qu'une diminution de la force ionique soit suffisante pour augmenter la longueur de Debye et rendre les répulsions électrostatiques plus importantes que les interactions Lifshitz-van der Waals. Cet aspect réversible de l'adhésion dans le minimum secondaire a été démontré (chapitre 3) lors des expériences de transport dans le sable et les billes de verre avec *E. coli* PHL1314. Le phénomène peut aussi être observé au microscope confocal. Le résultat de ces expériences a révélé un autre aspect intéressant du minimum secondaire réversible. Pour chaque diminution de la force ionique une fraction de cellules retenues dans le minimum secondaire est décrochée. Cela signifie que chaque fraction de cellules décrochée était retenue par un minimum secondaire d'intensité énergétique différente. Ce résultat s'explique vraisemblablement par une hétérogénéité des caractères physicochimiques de surface pour des cellules pourtant issues d'une même culture. Une hétérogénéité de la surface des grains constituant le milieu poreux peut également expliquer ces observations.

En résumé, le transport bactérien est d'autant plus favorisé que les conditions de forces ioniques sont faibles. Il apparaît clairement que les interactions électrostatiques, conditionnées à la fois par la charge de surface des bactéries et du milieu poreux ainsi que par la force ionique de la solution, jouent un rôle majeur dans la possibilité d'adhésion et donc dans le déplacement bactérien dans un sol.

### 1.1.2. Le milieu poreux

Les résultats du chapitre 2, 3 et 4 ont permis de mettre en évidence des caractéristiques du milieu poreux qui influent sur le déplacement de bactéries à travers un sol. Et en particulier la compétition entre l'hydrodynamique et les interactions physicochimiques.

Le transport d'*E. coli* PHL1314 dans du sable et du verre n'a pas été influencé par la filtration comme l'attestent à la fois les observations au microscope confocal et les résultats en colonne (chapitre 3). Seules des bactéries exceptionnellement grandes comme les *Bacillus* sont susceptibles d'être retenue à cause de leur taille comme il a été observé dans les expériences du chapitre 2. En revanche les observations *in situ* du transport bactérien en milieu poreux (chapitre 3) ont attesté l'existence du blocage de cellules sur deux types de sites : (i) d'une part au niveau des aspérités définies par la topographie d'un grain, (ii) d'autre part au niveau des zones de contact entre grains là où le passage est réduit. Des grains de milieu poreux avec un aspect très irrégulier (comme le sable) présentent de nombreux sites que l'on peu assimiler à des pièges à bactéries comme l'attestent les observations au microscope confocal (chapitre 3). Les milieux poreux constitués de grains présentant ces caractéristiques sont donc moins favorables au transport bactérien.

Un autre point important à considérer dans un milieu poreux est la complexité de l'écoulement. En effet nombreux sont les travaux qui se limitent à l'étude de déplacement de bactéries dans des milieux poreux homogènes (billes de verre, sable). Le chapitre 4 présente des résultats de transport d'*E. coli* PHL1314 dans une série de matrices porales allant graduellement du système très homogène (billes de verre) au système hétérogène (sol non perturbé). La déposition des cellules bactérienne de la souche PHL1314 apparaît comme très dépendante de la force ionique dans les milieux homogènes (sable et billes de verre). Ce résultat est concordant avec ceux obtenus dans les chapitres 2 et 3 à savoir le rôle primordial des interactions électrostatiques dans les processus d'adhésion. En revanche le transport de la souche PHL1314 dans les colonnes de sol Poirson est nettement plus influencé par la taille des agrégats que par la force ionique. Les bactéries sont d'autant mieux transportées que la taille des agrégats est élevée. A noter que l'effet de la force ionique n'est pas nul mais moins marqué que dans les milieux homogènes. Il est probable que dans les milieux avec une large distribution de tailles de pores les chances de contact entre cellules et solide soient fortement réduit. Tout comme pour les milieux poreux simples il n'y a pas de filtration dans le sol Poirson. En effet les agrégats de sol sont constitués d'un réseau de petits pores dans lequel il pourrait y avoir filtration, mais dans les conditions expérimentales ces pores sont saturés en eau et donc la

circulation se fait essentiellement par les pores inter agrégats. Il est toutefois possible que les bactéries entrent par diffusion dans ces petits pores, cependant le coefficient de diffusion des bactéries est très faible et la quantité de cellules qui y diffusent est donc négligeable. L'élution avancée des cellules de la souche PHL1314 par rapport au traceur (dont le coefficient de diffusion permet de diffuser dans tous les pores) dans les colonnes de sol Poirson soutiennent ce point (chapitre 4). Malgré l'absence de filtration et une porosité supérieure aux matrices de sable ou de verre, la déposition de la souche PHL1314 dans le sol Poirson est très supérieure à celle observée pour les milieux homogènes. La présence de sites favorable à l'adhésion dans un milieu hétérogène comme un sol permet d'expliquer ces résultats. Dans le cas du sol non saturé (expériences avec le sol non perturbé, chapitre 4) une partie du flux d'eau appliqué va participer à la saturation en eau des petits pores entraînant avec lui des bactéries. Donc la filtration et le piégeage dans de petits pores est probablement favorisée dans ce type de milieu poreux avec un hydrodynamique complexe. Ces points pourraient expliquer les faibles quantités de bactéries transportées dans le sol non perturbé (chapitre 4).

Au regard de ces résultats le transport bactérien est fortement dépendant des propriétés physicochimiques du sol et les écoulements qui y ont lieu. Pour des milieux homogènes ce sont les interactions électrostatiques qui dominent le transport. En revanche pour les milieux plus complexes les caractéristiques hydrodynamiques et porales sont plus déterminantes. Pour les sols non saturés l'hydrodynamique est différente de celle des matrices saturées induisant de nouveaux mécanismes dont la filtration et le piégeage par entraînement dans les petits pores. Ces résultats montrent la nécessité de prendre en compte le caractère hétérogène d'un sol pour comprendre le comportement de transport de bactéries.

## **1.2. Le phénomène de désorption des bactéries au cours du transport**

Le mécanisme de déposition des bactéries dans un milieu poreux à lui tout seul ne permet pas de décrire les observations. En effet l'adsorption paraît comme partiellement réversible. Les expériences de transport dans tous les milieux poreux utilisées ont permis de constater qu'il existe deux types de désorption : La première peut être qualifiée de



rapide car correspondant à un décrochage de bactéries retenues très brièvement dans des zones de stagnation ou dans un minimum secondaire faible. Ce type de désorption est responsable de la sortie légèrement décalée de cellules par rapport au pic. L'absence de prise en compte de ce phénomène dans le modèle ne permet pas de reproduire correctement les courbes d'élutions observée. A noter que le pic de sortie correspond à la sortie de cellules qui n'ont pas eu d'interaction significative avec la phase solide ( $\alpha = 0$ ). La seconde désorption est beaucoup plus lente et correspond à un décrochage très faible mais continu des bactéries initialement déposées. La quantité de bactéries décrochées ne concerne qu'une fraction de la population totale. Néanmoins nos expériences n'ont pas duré assez longtemps pour savoir si le phénomène perdure jusqu'à sortir la totalité des cellules retenues. Il faut cependant souligner que si ce décrochage continue invariablement au taux observé il faudrait plusieurs heures pour décrocher l'ensemble des bactéries. L'origine de ce décrochage lent et continu est mal connue. En revanche le facteur biologique peut être exclu car le même phénomène a été observé pour des colloïdes artificiels (Li *et al.* 2005). Une hétérogénéité de la population ne permet pas d'expliquer la sortie retardée de plusieurs volumes de pores de certaines cellules. L'hydrodynamique très complexe d'un milieu poreux pourrait peut-être expliquer le phénomène. Nous suggérons que la distribution anormale du temps de séjour des cellules d'une même souche dans un milieu poreux est le résultat d'un déséquilibre fluctuant entre forces Lifshitz-van der Waals et hydrodynamiques. Les équations pour calculer les forces hydrodynamiques utilisées dans cette étude se limitent au milieu poreux très simplifié et en 2D (chapitre 3). Malgré ces limites les résultats de ces calculs ont permis de comparer les forces hydrodynamiques avec les forces physicochimiques de la théorie XDLVO. Les forces hydrodynamiques sont très inférieures aux répulsions électrostatiques mais très légèrement supérieures au minimum secondaire. Il est possible que des fluctuations des lignes de courant au niveau des zones de remous causent momentanément des stagnations du flux ou des courants plus faibles. Le minimum secondaire d'un site donné est constant mais des fluctuations des lignes de courant pourraient modifier la balance entre forces Lifshitz-van der Waals et hydrodynamiques. Une cellule (ou colloïde) piégée dans un tel site sera retardée par rapport au reste de la population. Aussi de légères fluctuations des forces hydrodynamiques pourraient localement et temporairement provoquer ou empêcher l'adhésion dans le minimum secondaire. Suivant le nombre de fois où une

cellule subirait ces fluctuations, la traversée du milieu poreux pourrait prendre plus ou moins de temps. Il n'existe à ce jour pas de moyens adéquats pour déterminer très précisément les lignes de courants dans un milieu poreux surtout si celui-ci est hétérogène. Toutefois, sans vouloir recourir à des modèles mécanistes très fin, il nous semble que l'hypothèse pourrait être testée avec un modèle faisant migrer un ensemble de bactéries sur un réseau de sites et en affectant à ces sites des forces de Lifshitz-van der Waals et des forces d'arrachement avec des lois de probabilité.

### **1.3. Modélisation.**

Le modèle utilisé pour analyser les expériences est classiquement basé sur du transport convectif dispersif. Sa particularité est de prendre en compte l'existence de deux types de sites d'adsorption ; des sites qui échangent « rapidement » avec l'écoulement et des sites plus « lents » pour lesquels la constante de temps de détachement va être différente de celle de l'attachement. L'introduction de cette dualité nous est vite apparue comme incontournable, le modèle avec un seul type de site étant incapable de reproduire les observations.

Au final le modèle reproduit correctement le transport bactérien dans tous les milieux poreux testés y compris le sol non perturbé. Nous revenons plus loin dans la partie « Perspectives » sur les évolutions souhaitables de la modélisation.

## **2. Répercussion des acquis scientifique sur les pratiques d'épandage et d'irrigation avec eaux usées.**

Les résultats du chapitre 5 ont révélé qu'une partie de la communauté bactérienne issue d'une boue de station d'épuration était capable de traverser un milieu poreux saturé. Ce résultat confirme les résultats du chapitre 2 : le transport en milieu poreux est loin d'être identique pour toutes les souches bactériennes. Le transport de coliformes fécaux a également été observé. Il y a donc un véritable risque de contamination des eaux souterraines ou de récréation par des bactéries fécales. Ce constat suggère un risque de santé publique lié à l'épandage de boues de stations d'épuration. Dans une moindre

mesure l'écosystème d'un sol peut être perturbé par l'apport de bactéries exogènes en grande quantité. Des études sont nécessaires pour étudier l'impact des apports de bactéries issues des stations d'épuration sur les écosystèmes du sol notamment sur le long terme.

Le recours croissant à l'utilisation des eaux usées à des fins d'irrigation de culture pose un risque de même nature que l'épandage des boues. En effet ces pratiques ont deux avantages : (i) « recyclage » de déchets encombrants et (ii) faire face aux déficits hydriques en agriculture. Les résultats de cette étude indiquent que des mesures de précautions peuvent être prises pour diminuer les risques :

- Contrôle microbiologique des déchets des stations d'épuration dans le but de déceler des souches à risques (bactéries pathogènes capable d'être transporté en milieu poreux). Les souches bactériennes avec une surface cellulaire hydrophile et négativement chargée sont le plus susceptibles de traverser un milieu poreux sur de longues distances. Ces souches doivent être considérées à risque car elles sont le plus aptes à atteindre une nappe phréatique. Les cellules présentant une surface hydrophobe et/ou peu chargée sont rapidement adsorbé sur le sol et présentent moins de risques.
- Etude des propriétés physicochimiques des sols pour déterminer sa capacité à limiter le transport bactérien.
- Localisation des points d'eau à protéger (nappes phréatiques peu profondes, cours d'eau ou lacs de récréation adjacents).
- Utilisation d'un modèle de prédiction de déplacement de bactéries dans un profil sol comme utilisé dans cet étude afin d'anticiper les situations à risques et de pouvoir évaluer la compétition entre processus de transport et de déposition.

### 3. Perspectives

#### 3.1. Quelques aspects méthodologiques

##### 3.1.1. Caractérisation des bactéries

L'approche physicochimique (basée sur la théorie DLVO) utilisée pour caractériser les bactéries dans cette étude a laissé apparaître certaines limites. Un des principaux obstacles de cette approche concerne la caractérisation des composantes de la tension de surfaces des bactéries à l'aide de la mesure d'angles de contact. Outre sa difficulté de mise en œuvre, la méthode même soulève des questions. En effet il s'agit d'une mesure très globale (la mesure de l'angle de contact étant effectuée sur un ensemble de cellules) qui ne peut tenir compte ni des hétérogénéités de surface ni de l'hétérogénéité de la population. Une alternative pourrait être la caractérisation des interactions avec la microscopie à force atomique qui a récemment été appliquée à la microbiologie (Fang 2000). La technique permet une mesure très précise des interactions entre une cellule bactérienne et une pointe montée sur un micro levier. La pointe montée sur le micro levier correspond à la matière sur laquelle on veut étudier l'adhésion bactérienne. Cette technique a l'avantage de pouvoir déterminer le profil de forces lors de l'approche de la cellule vers un solide et lors du détachement, ce qui permet d'étudier les deux mécanismes. Par ailleurs la microscopie à force atomique a aussi été utilisée pour déterminer l'influence de certains exo polymères de la surface cellulaire des bactéries (Gomez-Suarez *et al.* 2002; Liu *et al.* 2007). En effet la caractérisation de la surface des bactéries comprend également l'analyse des polymères de surface et leur influence sur le comportement d'adhésion. La littérature montre qu'il existe à l'heure actuelle encore de nombreuses lacunes dans ce domaine et il est indispensable de réaliser des études approfondies sur le rôle des polymères de surface dans les processus d'adhésion.

Dans l'intérêt de mieux contrôler le devenir de bactéries pathogènes présentes dans les eaux usées on peut envisager de caractériser leurs surfaces afin d'identifier les souches à risque (voir § 2 chapitre 6). Quelles sont les souches pathogènes à risques ? Les résultats de notre étude indiquent qu'une bactérie est d'autant mieux transportée en milieu poreux que la cellule est petite, hydrophile et chargée négativement. Des analyses

microbiologiques périodiques permettront par exemple de vérifier l'absence de souches pathogènes présentant ces caractéristiques et d'utiliser les eaux usées en toute sécurité. L'utilisation de techniques de biologie moléculaire (RT PCR, FISH...) conçu pour détecter et dénombrer des souches à risque permettront de classer une eau usée en différentes catégories en fonction de sa qualité microbiologique. On peut aussi envisager de déterminer les caractéristiques cellulaires de certaines souches observées pendant cette étude (exemple : *Rhodococcus* sp.) afin d'expliquer leur comportement de transport par rapport à leurs propriétés physicochimiques de surface.

### 3.1.2. Conditions du transport dans des milieux poreux

L'ensemble des expériences de transport bactérien de cette étude a été réalisé sur des distances très courtes (15 à 30cm). Les colonnes courtes ont été choisies pour limiter la durée des expériences. L'utilisation de colonnes significativement plus longues pourrait révéler de nouveaux mécanismes ou permettre de vérifier certaines hypothèses. En particulier cela permettrait de vérifier les phénomènes d'exclusion qui n'apparaissent pas clairement sur les colonnes courtes. Une connaissance précise de ce phénomène est nécessaire pour des études de migration sur de longues distances. De plus, si on est en présence de population présentant des capacités d'adhésion distribuées, la circulation sur des colonnes longues pourrait permettre de vraiment appréhender et vérifier l'étendue des effets de cette hétérogénéité.

Il serait également à envisager d'allonger la durée des expériences de transport pour étudier les phénomènes de désorption dans le temps. En effet, nous avons observé systématiquement des phénomènes de désorption avec des cinétiques lentes. Quelle est la quantité de cellules déposées qui finit par se décrocher ? Nos durées d'observations ne sont pas suffisantes pour comprendre l'origine et la pérennité de ce mécanisme.

### 3.1.3. Que mesurer ?

Récemment plusieurs études ont utilisé le découpage de colonne pour localiser la déposition des bactéries dans le milieu poreux. Cette distribution de la déposition des cellules dans la colonne est essentielle pour vérifier la validité du modèle. Des courbes d'élution seules ne permettent pas d'affirmer que la déposition est bien simulée.

L'information apportée par les profils de déposition est aussi essentielle pour évaluer l'effet de l'hétérogénéité des propriétés des cellules. Il semble donc que toute future étude ne doive pas se contenter de courbes d'élution mais prévoir aussi la mesure du profil de déposition. Cela posera bien entendu des problèmes de mesure et en particulier comment récupérer les bactéries déposées ?

### 3.2. Nouvelles voies de recherche

En plus des points évoqués auparavant, il nous semble que les problèmes suivants sont particulièrement importants :

- effet de l'hétérogénéité des propriétés de surface
- effet de l'hétérogénéité du sol aussi bien d'un point de vue physico-chimie que hydrodynamique
- désorption des bactéries
- transport en milieux non saturés
- devenir sur le long terme de populations provenant d'eaux usées ou de boues.

#### 3.2.1. La problématique de l'hétérogénéité des populations

L'hétérogénéité d'une population bactérienne peut être à l'origine de comportements de transport différents des cellules d'une même souche. La distribution en sous populations de bactéries d'une même culture concernant la charge de surface (potentiel zêta) a déjà été observée (van der Mei *et al.*, 2001 ; Dong *et al.* 2002). Par ailleurs, la prise en compte dans des modèles d'une distribution du coefficient d'efficacité d'interception  $\alpha$  conduit à des circulations très différentes de celles prédites en ayant un  $\alpha$  unique. Les travaux dans ce domaine sont essentiellement théoriques (Dong *et al.*, 2002). La question qui se pose est alors : comment relier des variations de propriétés de surface des cellules au coefficient  $\alpha$  ? A ce jour les tentatives ont été assez infructueuses. Si comme le laisse penser les modèles, une distribution de  $\alpha$  est à l'origine de déplacements bien plus importants que prédit avec un  $\alpha$  unique, il faut absolument pouvoir relier la distribution de  $\alpha$  à une ou des distributions des propriétés de surface des

cellules. Il y a là, à notre avis, un réel challenge qui par ailleurs va nécessiter des techniques pour caractériser l'hétérogénéité des populations. Le paramètre dont la mesure de distribution semble le plus accessible est le potentiel zêta des bactéries. Relier la distribution du potentiel zêta d'une population cellulaire à une distribution de  $\alpha$  pourrait être une première étape pour résoudre la problématique liée à l'hétérogénéité des populations bactériennes.

### 3.2.2. Milieux hétérogènes

La plus part des travaux sur le déplacement de bactéries ou de colloïdes se font sur des matériaux homogènes. Or, le transport bactérien en milieu homogène et en milieu hétérogène peut être très différent comme indiqué par nos résultats. Le rôle de l'hétérogénéité des sols dans le comportement de transport de bactéries est encore mal défini même si les résultats de cette étude et d'autres indiquent que l'hydrodynamique peut être un facteur déterminant. Comment les mécanismes de déposition ou de détachement sont-ils influencés par les écoulements qui ont lieu dans un sol ? Il nous semble qu'une piste à explorer est : quel est le poids de l'hydrodynamique forcément très complexe qui a lieu dans des milieux poreux (on peut imaginer des fluctuations des lignes courants, des fluctuations des force d'arrachement, etc...) sur les processus de détachement ? Comment prendre en compte l'hétérogénéité des phases solides présentes ? La quantification des sites favorable à la déposition (charges positives, culs de sac...) et défavorable à la déposition (charges négatives, écoulements préférentiels...) permettront une meilleure caractérisation des milieux hétérogènes.

### 3.2.3. L'origine du phénomène de la désorption lente des bactéries

La littérature est riche en travaux portant sur la déposition. Il semble que le problème du détachement a reçu beaucoup moins d'attention. Par exemple, alors qu'on dispose de relations pour évaluer la déposition en fonction de paramètres liés aux cellules, au milieu et à l'écoulement ; on n'a rien de similaire pour le détachement.

Les expériences de transport bactérien en colonnes ont permis de constater qu'il existe une désorption lente et continue de cellules bactériennes déposées dans les milieux poreux. D'autres on fait le même constat et indiquent ne pas trouver de lien entre un

paramètre cinétique rendant compte du phénomène et les paramètres caractérisant leurs milieux et leur cellules. Le où les mécanismes à l'origine de cette désorption sont inconnus et pourtant, dans une perspective de protection des ressources en eau, il semble bien nécessaire d'évaluer non seulement la capacité de rétention, mais aussi les causes de mise en circulation de bactéries préalablement retenues. Des analyses à échelle du pore serait peut-être à envisager pour caractériser les forces possibles à ces échelles. De plus la combinaison avec des modèles soit mécanistes, soit plus empiriques pourraient permettre de tester des hypothèses comme par exemple celle formulée dans le paragraphe 1.2 ci-dessus. Plus généralement, il nous semble que les efforts de modélisation pourraient porter sur la prise en compte des hétérogénéités qu'elles soient d'origine physique, chimiques ou liées aux populations microbiennes.

#### 3.2.4. Transport en milieux non saturés

Bien que les conditions saturées existent (nappe, sols engorgés) les conditions non saturées de loin les plus fréquentes pour les sols cultivés et les milieux naturels. Les études de transport en conditions non saturées sont très rares (Fuller *et al.* 2000). Il semble nécessaire d'étendre l'étude du transport bactérien à des conditions plus proches de la réalité ; c'est-à-dire un milieu non saturé avec des alternances dans les flux hydriques. Le passage à de telles conditions soulève bien entendu de nombreux problèmes expérimentaux et en particulier le suivi dans le milieu de souches cibles ainsi que la connaissance de la dynamique des ces populations. On peut penser que dans ce domaine les techniques de la biologie moléculaire (FISH, RT PCR, etc...) permettront des avancées

L'étape ultime serait l'étude au champ des répercussions sur l'environnement et la santé publique de la pratique d'épandage d'effluents provenant de stations d'épuration. Dans ce cas aussi, les outils de la biologie moléculaire seront essentiels pour suivre dans le temps et dans l'espace les populations microbiennes.





## **Références Bibliographiques**



## Références Bibliographiques

### A

- (1997). Response to congress on use of decentralized wastewater treatment systems. US Environmental Protection Agency. Washington, DC.
- Absolom, D. R., Lamberti, F. V., Policova, Z., Zingg, W., van Oss, C. J., Neumann, A. W., (1983).** Surface thermodynamics of bacterial adhesion. *Applied and Environmental Microbiology* 46(1):90-97.
- Abu-Lail, N. I., Camesano, T. A., (2003).** Role of lipopolysaccharides in the adhesion, retention, and transport of *Escherichia coli* JM109. *Environmental Science and Technology* 37(10):2173-2183.
- Alami, Y., Achouak, W., Marol, C., Heulin, T., (2000).** Rhizosphere soil aggregation and plant growth promotion of sunflowers by an exopolysaccharide-producing *Rhizobium* sp strain isolated from sunflower roots. *Applied and Environmental Microbiology* 66(8):3393-3398.
- Amarger, N., (2002).** Genetically modified bacteria in agriculture. *Biochimie* 84(11):1061-1072.
- Artz, R. R. E., Townend, J., Brown, K., Towers, W., Killham, K., (2005).** Soil macropores and compaction control the leaching potential of *Escherichia coli* O157 : H7. *Environmental Microbiology* 7(2):241-248.
- Ausland, G., Stevik, T. K., Hanssen, J. F., Kohler, J. C., Jenssen, P. D., (2002).** Intermittent filtration of wastewater - removal of fecal coliforms and fecal streptococci. *Water Research* 36(14):3507-3516.

### B

- Barton, J. W., Ford, R. M., (1995).** Determination of Effective Transport-Coefficients for Bacterial Migration in Sand Columns. *Applied and Environmental Microbiology* 61(9):3329-3335.

- Barton, J. W., Ford, R. M., (1997).** Mathematical model for characterization of bacterial migration through sand cores. *Biotechnology and Bioengineering* 53(5):487-496.
- Becker, M. W., Collins, S. A., Metge, D. W., Harvey, R. W., Shapiro, A. M., (2004).** Effect of cell physicochemical characteristics and motility on bacterial transport in groundwater. *Journal of Contaminant Hydrology* 69(3-4):195-213.
- Bengtsson, G., Lindqvist, R., (1995).** Transport of Soil Bacteria Controlled by Density-Dependent Sorption Kinetics. *water Resources research* 31(5):1247-1256.
- Bergendahl, J., Grasso, D., (2000).** Prediction of colloid detachment in a model porous media: hydrodynamics. *Chemical Engineering Science* 55(9):1523-1532.
- Bertrand, R., Roig B. , (2007).** Evaluation of enrichment-free PCR-based detection on the *rfbE* gene of *Escherichia coli* O157 - Application to municipal wastewater. *Water Research* 41:1280-1286.
- Bhattacharjee, S., Chen, J. Y., Elimelech, M., (2000).** DLVO interaction energy between spheroidal particles and a flat surface. *Colloids and Surfaces a-Physicochemical and Engineering Aspects* 165(1-3):143-156.
- Bhattacharjee, S., Elimelech, M., Borkovec, M., (1998).** DLVO interaction between colloidal particles: Beyond Derjaguin's approximation. *Croatica Chemica Acta* 71(4):883-903.
- Bhattacharjee, S., Ko, C. H., Elimelech, M., (1998).** DLVO interaction between rough surfaces. *Langmuir* 14(12):3365-3375.
- Bhattacharjee, S., Ryan, J. N., Elimelech, M., (2002).** Virus transport in physically and geochemically heterogeneous subsurface porous media. *Journal of Contaminant Hydrology* 57(3-4):161-187.
- Blanchard, D. C., and Syzdek, L.D., (1972).** Concentration of bacteria in jet drops from bursting bubbles. *Journal of Geophysic Research* 77:5087-5099.
- Bolster, C. H., Mills, A. L., Hornberger, G. M., Herman, J. S., (1999).** Spatial distribution of deposited bacteria following miscible displacement experiments in intact cores. *water Resources research* 35(6):1797-1807.

- Bolster, C. H., Mills, A.L., Hornberger, G., Herman, J., (2000).** Effect of intra-population variability on the long-distance transport of bacteria. *Journal of ground water* 38:370-375.
- Bos, R., Busscher, H. J., (1999).** Role of acid-base interactions on the adhesion of oral streptococci and actinomyces to hexadecane and chloroform - influence of divalent cations and comparison between free energies of partitioning and free energies obtained by extended DLVO analysis. *Colloids and Surfaces B-Biointerfaces* 14(1-4):169-177.
- Bos, R., van der Mei, H. C., Busscher, H. J., (1999).** Physico-chemistry of initial microbial adhesive interactions - its mechanisms and methods for study. *Fems Microbiology Reviews* 23(2):179-230.
- Bradford, S. A., Bettahar, M., (2005).** Straining, attachment, and detachment of *Cryptosporidium* oocysts in saturated porous media. *Journal of Environmental Quality* 34(2):469-478.
- Bradford, S. A., Bettahar, M., (2006).** Concentration dependent transport of colloids in saturated porous media. *Journal of Contaminant Hydrology* 82(1-2):99-117.
- Bradford, S. A., Simunek, J., Bettahar, M., Tadassa, Y. F., van Genuchten, M. T., Yates, S. R., (2005).** Straining of colloids at textural interfaces. *water Resources research* 41(10).
- Bradford, S. A., Simunek, J., Bettahar, M., Van Genuchten, M. T., Yates, S. R., (2003).** Modeling colloid attachment, straining, and exclusion in saturated porous media. *Environmental Science & Technology* 37(10):2242-2250.
- Bradford, S. A., Simunek, J., Bettahar, M., van Genuchten, M. T., Yates, S. R., (2006).** Significance of straining in colloid deposition: Evidence and implications. *water Resources research* 42(12):Art. No. W12S15.
- Bradford, S. A., Simunek, J., Walker, S. L., (2006).** Transport and straining of E-coli O157 : H7 in saturated porous media. *water Resources research* 42(12).
- Bradford, S. A., Yates, S. R., Bettahar, M., Simunek, J., (2002).** Physical factors affecting the transport and fate of colloids in saturated porous media. *water Resources research* 38(12):Art. No. 1327.

- Brouwer, H., (1984).** Ground water pollution microbiology. In: C.P., B. G. a. G., editor. Element of soil science and ground water hydrology. New York: Wiley. p 9-38.
- Brown, D. G., Abramson, A., (2006).** Collision efficiency distribution of a bacterial suspension flowing through porous media and implications for field-scale transport. *Water Research* 40(8):1591-1598.
- Brown, D. G., Stencel, J. R., Jaffe, P. R., (2002).** Effects of porous media preparation on bacteria transport through laboratory columns. *Water Research* 36(1):105-114.
- Bullitt, E., Makowski, L., (1998).** Bacterial adhesion pili are heterologous assemblies of similar subunits. *Biophysical Journal* 74(1):623-632.
- Busscher, H. J., Weerkamp, A. H., van der Mei, H. C., van Pelt, A. W., de Jong, H. P., Arends, J., (1984).** Measurement of the surface free energy of bacterial cell surfaces and its relevance for adhesion. *Appl Environ Microbiol* 48(5):980-983.
- Busscher, H. J., Weerkamp, A.H., van der Mei, H.C., van Pelt, A.W.J., de Jong, H.P. and, Arends J., (1984).** Measurement of the Surface Free Energy of Bacterial Cell Surfaces and its Relevance for Adhesion. *Applied and Environmental Microbiology* 48(5):980-983.

## C

- Cail, T. L., Hochella, M. F., (2005).** The effects of solution chemistry on the sticking efficiencies of viable *Enterococcus faecalis*: An atomic force microscopy and modeling study. *Geochimica Et Cosmochimica Acta* 69(12):2959-2969.
- Camesano, T. A., Logan, B. E., (1998).** Influence of fluid velocity and cell concentration on the transport of motile and nonmotile bacteria in porous media. *Environmental Science & Technology* 32(11):1699-1708.
- Camper, A. K., Hayes, J. T., Sturman, P. J., Jones, W. L., Cunningham, A. B., (1993).** Effects of Motility and Adsorption Rate Coefficient on Transport of Bacteria through Saturated Porous-Media. *Applied and Environmental Microbiology* 59(10):3455-3462.

- Celico, F., Varcamonti, M., Guida, M., Naclerio, G., (2004).** Influence of precipitation and soil on transport of fecal enterococci in fractured limestone aquifers. *Applied and Environmental Microbiology* 70(5):2843-2847.
- Chen, G., Rockhold, M., Strevett, K. A., (2003).** Equilibrium and kinetic adsorption of bacteria on alluvial sand and surface thermodynamic interpretation. *Research in Microbiology* 154(3):175-181.
- Chen, G., Rockhold, M., Strevett, K. A., (2003).** Equilibrium and kinetic adsorption of bacteria on alluvial sand and surface thermodynamic interpretation. *Research in Microbiology* 154:6.
- Chen, G., Strevett, K. A., (2001).** Impact of surface thermodynamics on bacterial transport. *Environmental Microbiology* 3(4):237-245.
- Chen, G., Strevett, K. A., (2002).** Surface free energy relationships used to evaluate microbial transport. *Journal of Environmental Engineering-Asce* 128(5):408-415.
- Chen, G., Strevett, K. A., (2003).** Impact of carbon and nitrogen conditions on *E. coli* surface thermodynamics. *Colloids and Surfaces B-Biointerfaces* 28(2-3):135-146.
- Chen, G., Strevett, K. A., (2003).** Microbial deposition in porous media: A surface thermodynamic investigation. *Environmental Engineering Science* 20(3):237-248.
- Chen, G., Strevett, K. A., (2003).** Microbial surface thermodynamics and interactions in aqueous media. *Journal of Colloid and Interface Science* 261(2):283-290.
- Chen, G., Zhu, H., (2004).** Bacterial deposition in porous medium as impacted by solution chemistry. *Research in Microbiology* 155(6):467-474.
- Choi, N. C., Kim, D. J., Kim, S. B., (2007).** Quantification of bacterial mass recovery as a function of pore-water velocity and ionic strength. *Research in Microbiology* 158(1):70-78.
- Conboy, M. J., and Goss, M.J., (2000).** Natural protection of groundwater against bacteria of fecal origin. *Journal of Contaminant Hydrology* 43:1-24.
- Cools, D., Merckx, R., Vlassak, K., Verhaegen, J., (2001).** Survival of *E. coli* and *Enterococcus spp.* derived from pig slurry in soils of different texture. *Applied Soil Ecology* 17(1):53-62.
- Corapcioglu, M. Y., and Haridas A., (1984).** Transport and fate of microorganisms in porous media: a theoretical investigation. *journal of hydrology* 72:149-169.



- Corapcioglu, M. Y., Choi, H., (1996).** Modeling colloid transport in unsaturated porous media and validation with laboratory column data. *water Resources research* 32(12):3437-3449.
- Costerton, J. W., Geesey, G. G., Cheng, K. J., (1978).** How bacteria stick. *Scientific American* 238(1):86-95.
- Costerton, J. W., Lewandowski, Z., Caldwell, D. E., Korber, D. R., Lappin-Scott, H. M., (1995).** Microbial biofilms. *Annual Review of Microbiology* 49:711-745.
- Costerton, J. W., Marie, C. B., and Cheng K.J., (1985).** Phenomena of bacterial adhesion. In: Fletcher, D. C. S. a. M., editor. *Bacterial Adhesion*. New York: Plenum. p 3-43.
- Costerton, J. W., Stewart, P. S., Greenberg, E. P., (1999).** Bacterial biofilms: A common cause of persistent infections. *Science* 284(5418):1318-1322.
- Crockett, C., (2007).** The role of wastewater treatment in protecting water supplies against emerging pathogens. *Water environment research* 79(3):221-232.

## D

- DeFlaun, M. F., Oppenheimer, S. R., Streger, S., Condee, C. W., Fletcher, M., (1999).** Alterations in adhesion, transport, and membrane characteristics in an adhesion-deficient pseudomonad. *Applied and Environmental Microbiology*(2):759-765.
- Di Pietro, L., Ruy, S., Capowicz, Y., (2003).** Predicting water flow in soils by traveling-dispersive waves. *journal of hydrology* 278(1-4):11.
- Dong, H. L., (2002).** Significance of electrophoretic mobility distribution to bacterial transport in granular porous media *Journal of Microbiological Methods* 51:83-93.
- Dong, H. L., Onstott, T. C., Deflaun, M. F., Fuller, M. E., Streger, S. H., Rothmel, R. K., Mailloux, B. J., (2002).** Relative dominance of physical versus chemical effects on the transport of adhesion-deficient bacteria in intact cores from South Oyster, Virginia. *Environmental Science & Technology* 36:9.
- Dong, H. L., Onstott, T. C., Ko, C. H., Hollingsworth, A. D., Brown, D. G., Mailloux, B. J., (2002).** Theoretical prediction of collision efficiency between adhesion-

- deficient bacteria and sediment grain surface. *Colloids and Surfaces B-Biointerfaces* 24(3-4):229-245.
- Dufrene, Y. F., Boonaert, C. J. P., Rouxhet, P. G., (1996).** Adhesion of *Azospirillum brasilense*: Role of proteins at the cell-support interface. *Colloids and Surfaces B-Biointerfaces* 7(3-4):113-128.
- Dumontet, S., Scopa A, Kerje S, Krovacek K, (2001).** The importance of pathogenic organisms in sewage and sewage sludge. *Journal of the air and waste management association* 51(6):848-860.
- Duthoit, F., Godon J.J., Montel M.C., (2003).** Bacterial community dynamics during production of registered designation of origin Salers cheese as evaluated by 16S rRNA gene single-strand conformation polymorphism analysis. *Applied and Environmental Microbiology* 69(7):3840-3848.

## E

- Elimelech, M., Nagai, M., Ko, C. H., Ryan, J. N., (2000).** Relative insignificance of mineral grain zeta potential to colloid transport in geochemically heterogeneous porous media. *Environmental Science & Technology* 34(11):2143-2148.
- Esseilli, M., and Kassem I.I., (2007).** A new method to identify sources of fecal pollution: DGGE fingerprints of *E. coli* communities. ASM General Meeting. Toronto (Canada).

## F

- Fang, H. H. P., Chan K.Y., Xu L.C., (2000).** Quantification of bacterial adhesion forces using atomic force microscopy (AFM). *Journal of Microbiological Methods* 40(1):98-97.
- Ferguson, C., Husman, A. M. D., Altavilla, N., Deere, D., Ashbolt, N., (2003).** Fate and transport of surface water pathogens in watersheds. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology* 33(3):299-361.

- Fletcher, M., and, Loeb, G.I., (1979).** Influence of substratum characteristics on the attachment of marine *pseudomonas* to soil surfaces *Applied and Environmental Microbiology* 37:67-72.
- Fontes, D. E., Mills, A. L., Hornberger, G. M., Herman, J. S., (1991).** Physical and chemical factors influencing transport of microorganisms through porous media. *Applied and Environmental Microbiology* 57(9):2473-2481.
- Fuller, M. E., Dong, H. L., Mailloux, B. J., Onstott, T. C., DeFlaun, M. F., (2000).** Examining bacterial transport in intact cores from Oyster, Virginia: Effect of sedimentary facies type on bacterial breakthrough and retention. *water Resources research* 36(9):2417-2431.

## G

- Gannon, J. T., V.B. Manilal and M. Alexander, (1991).** Relationship between cell surface properties and transport of bacteria through soil. *Applied and Environmental Microbiology* 57(1):190-193.
- Gerba, C. P., and Bitton G., (1984).** Microbial pollutants : their survival and transport pattern to groundwater. In: Bitton, C., and Gerba, C.P., editor. *Groundwater pollution microbiology*. New York: Wiley. p 39-54.
- Gerba, C. P. W. C., and Melnick J.L., (1975).** Fate of wastewater bacteria and viruses in soil. *Journal of Irrigation and Drain Division* 101:157-174.
- Gomez-Suarez, C., Pasma, J., van der Borden, A. J., Wingender, J., Flemming, H. C., Busscher, H. J., van der Mei, H. C., (2002).** Influence of extracellular polymeric substances on deposition and redeposition of *Pseudomonas aeruginosa* to surfaces. *Microbiology* 148(Pt 4):1161-1169.
- Grasso, D., Smets, B. F., Strevett, K. A., Machinist, B. D., VanOss, C. J., Giese, R. F., Wu, W., (1996).** Impact of physiological state on surface thermodynamics and adhesion of *Pseudomonas aeruginosa*. *Environmental Science and Technology* 30(12):3604-3608.

**Gross, M. J., Logan, B. E., (1995).** Influence of Different Chemical Treatments on Transport of *Alcaligenes paradoxus* in Porous-Media. Applied and Environmental Microbiology 61(5):1750-1756.

## H

**Haffar, M., Handoko Y., Gilbride K., (2007).** The detection and enumeration of bacterial pathogens using FISH and quantitative Real-Time PCR. ASM General Meeting. Toronto (Canada).

**Hagedorn, C., McCoy E.L., Rahe T.M., (1981).** The potential for groundwater contamination from septic effluents. Journal of Environmental Quality(10):1-8.

**Hallier-Soulier, S., Racaud, and Chablain P., (2007).** Development of a duplex quantitative PCR test for the monitoring of fecal pollution in environmental waters. ASM General Meeting. Toronto (Canada).

**Hamadi, F., Latrache, H., Mabrouki, M., Elghmari, A., Outzourhit, A., Ellouali, M., Chtaini, A., (2005).** Effect of pH on distribution and adhesion of *Staphylococcus aureus* to glass. Journal of Adhesion Science and Technology 19(1):73-85.

**Harter, T., Wagner, S., Atwill, E. R., (2000).** Colloid transport and filtration of *Cryptosporidium parvum* in sandy soils and aquifer sediments. Environmental Science & Technology 34(1):62-70.

**Hermansson, M., (1999).** The DLVO theory in microbial adhesion. Colloids and Surfaces B-Biointerfaces 14(1-4):105-119.

**Hoek, E. M. V., Agarwal, G. K., (2006).** Extended DLVO interactions between spherical particles and rough surfaces. Journal of Colloid and Interface Science 298(1):50-58.

**Hoek, E. M. V., Bhattacharjee, S., Elimelech, M., (2003).** Effect of membrane surface roughness on colloid-membrane DLVO interactions. Langmuir 19(11):4836-4847.

**Huysman, F., Verstraete, W., (1993).** Water-Facilitated Transport of Bacteria in Unsaturated Soil Columns - Influence of Cell-Surface Hydrophobicity and Soil Properties. *Soil Biology and Biochemistry* 25(1):83-90.

## I

**Ibaraki, M., Sudicky, E. A., (1995).** Colloid-facilitated contaminant transport in discretely fractured porous media .2. Fracture network examples. *water Resources research* 31(12):2961-2969.

**Iliuta, I., Larachi, F., (2006).** Dynamics of cells attachment, aggregation, growth and detachment in trickle-bed bioreactors. *Chemical Engineering Science* 61(15):4893-4908.

**Iwabuchi, N., Sunairi, M., Anzai, H., Morisaki, H., Nakajima, M., (2003).** Relationships among colony morphotypes, cell-surface properties and bacterial adhesion to substrata in *Rhodococcus*. *Colloids and Surfaces B-Biointerfaces* 30(1-2):51-60.

## J

**Jacobs, A., Lafolie, F., Herry, J. M., Debroux, M., (2007).** Kinetic adhesion of bacterial cells to sand: Cell surface properties and adhesion rate. *Colloids and Surfaces B-Biointerfaces*(59).

**Johnson, W. P., Blue, K. A., Logan, B. E., Arnold, R. G., (1995).** Modeling Bacterial Detachment During Transport through Porous-Media as a Residence-Time-Dependent Process. *water Resources research* 31(11):2649-2658.

**Johnson, W. P., Li, X. Q., Yal, G., (2007).** Colloid retention in porous media: Mechanistic confirmation of wedging and retention in zones of flow stagnation. *Environmental Science and Technology* 41(4):1279-1287.

**Johnson, W. P., Logan, B. E., (1996).** Enhanced transport of bacteria in porous media by sediment-phase and aqueous-phase natural organic matter. *Water Research* 30(4):923-931.

- Johnson, W. P., Martin, M. J., Gross, M. J., Logan, B. E., (1996).** Facilitation of bacterial transport through porous media by changes in solution and surface properties. *Colloids and Surfaces a-Physicochemical and Engineering Aspects* 107:263-271.
- Jordan, F. L., Sandrin, S. K., Frye, R. J., Brusseau, M. L., Maier, R. M., (2004).** The influence of system complexity on bacterial transport in saturated porous media. *Journal of Contaminant Hydrology* 74(1-4):19-38.
- Jucker, B. A., Harms, H., Hug, S. J., Zehnder, A. J. B., (1997).** Adsorption of bacterial surface polysaccharides on mineral oxides is mediated by hydrogen bonds. *Colloids and Surfaces B-Biointerfaces* 9(6):331-343.
- Jucker, B. A., Harms, H., Zehnder, A. J. B., (1998).** Polymer interactions between five gram-negative bacteria and glass investigated using LPS micelles and vesicles as model systems. *Colloids and Surfaces B-Biointerfaces* 11(1-2):33-45.

## K

- Kim, J., Tobiason, J. E., (2004).** Particles in filter effluent: The roles of deposition and detachment. *Environmental Science & Technology* 38(22):6132-6138.
- Krapac, I. G., Dey, W. S., Roy, W. R., Smyth, C. A., Storrent, E., Sargent, S. L., Steele, J. D., (2002).** Impacts of swine manure pits on groundwater quality. *Environmental Pollution* 120(2):475-492.
- Kwok, D. Y., (1999).** The usefulness of the Lifshitz-van der Waals/acid-base approach for surface tension components and interfacial tensions. *Colloids and Surfaces a-Physicochemical and Engineering Aspects* 156(1-3):191-200.

## L

- Lappin-Scott, H. M., and Costerton, J.W., (1989).** Bacterial biofilms and surface fouling. *Biofouling*(1):332-342.
- Li, B. K., Logan, B. E., (2004).** Bacterial adhesion to glass and metal-oxide surfaces. *Colloids and Surfaces B-Biointerfaces* 36(2):81-90.

- Li, Q., Logan, B. E., (1999).** Enhancing bacterial transport for bioaugmentation of aquifers using low ionic strength solutions and surfactants. *Water Research* 33(4):1090-1100.
- Li, X., D., S. T., W.P., J., (2004).** Apparent decreases in colloid deposition rate coefficients with distance of transport under unfavorable deposition conditions : A general phenomenon. *Environmental Science & Technology* 38:10.
- Li, X. Q., Lin, C. L., Miller, J. D., Johnson, W. P., (2006).** Role of grain-to-grain contacts on profiles of retained colloids in porous media in the presence of an energy barrier to deposition. *Environmental Science & Technology* 40(12):3769-3774.
- Li, X. Q., Scheibe, T. D., Johnson, W. P., (2004).** Apparent decreases in colloid deposition rate coefficients with distance of transport under unfavorable deposition conditions: A general phenomenon. *Environmental Science & Technology* 38(21):5616-5625.
- Li, X. Q., Zhang, P. F., Lin, C. L., Johnson, W. P., (2005).** Role of hydrodynamic drag on microsphere deposition and re-entrainment in porous media under unfavorable conditions. *Environmental Science & Technology* 39(11):4012-4020.
- Liu, J. L., Xu, W. P., Zhao, Q. J., Qiao, M. Q., Zhang, H. Y., Chen, G., (2007).** Bacterial retention in lipopolysaccharide coated silica sand. *Separation Science and Technology* 42(5):1031-1047.
- Liu, Y., Yang, C. H., Li, J., (2007).** Influence of extracellular polymeric substances on *Pseudomonas aeruginosa* transport and deposition profiles in porous media. *Environmental Science and Technology* 41(1):198-205.

## M

- Mallen, G., Maloszewski, P., Flynn, R., Rossi, P., Engel, M., K.-P., S., (2005).** Determination of bacterial and viral transport parameters in a gravel aquifer assuming kinetic sorption and desorption. *journal of hydrology* 306:15.
- Marshall, K. C., (1976).** *Interfaces in microbial ecology.* Cambridge, Mass: Harvard University Press.

- Marshall, K. C., (1980).** Adsorption of Microorganisms to Soils and sediments. New-York: Wiley.
- Marshall, K. C., (1986).** Adsorption and adhesion processes in microbial growth at interfaces. *Advances in Colloid and Interface Science*(25):59-86.
- Marshall, K. C., R. Stout, and R. Mitchell, (1971).** *J Gen Microbiol*(68):329.
- Marshall, K. C., Stout, R., Mitchell, R., (1971).** Selective sorption of bacteria from seawater. *Canadian Journal of Microbiology* 17(11):1413-1416.
- Matthess, G., and Pekdeger A., (1985).** Survival and transport of pathogenic bacteria and viruses in groundwater. In: Ward, C. H., Giger, W., and McCarty, P.L., editor. *Ground water quality*. New York: Wiley. p 472-482.
- McCaulou, D. R., R.C., Bales, and, R.G., Arnold, (1995).** Effect of temperature-controlled motility on transport of bacteria and microspheres through saturated sediment. *Water Resources research* 31(2):271-281.
- McClaine, J. W., Ford, R. M., (2002).** Characterizing the adhesion of motile and nonmotile *Escherichia coli* to a glass surface using a parallel-plate flow chamber. *Biotechnology and Bioengineering* 78(2):179-189.
- McEldowney, S., and, Fletcher M., (1986).** The effect of growth conditions and surface characteristics of aquatic bacteria on their attachment on solid surfaces. *Journal of General Microbiology*(132):513-523.
- Meinders, J. M., vanderMei, H. C., Busscher, H. J., (1995).** Deposition efficiency and reversibility of bacterial adhesion under flow. *Journal of Colloid and Interface Science* 176(2):329-341.

## N

- Natsch, A., Keel, C., Troxler, J., Zala, M., VonAlbertini, N., Defago, G., (1996).** Importance of preferential flow and soil management in vertical transport of a biocontrol strain of *Pseudomonas fluorescens* in structured field soil. *Applied and Environmental Microbiology* 62(1):33-40.
- Nelson, K. E., Ginn, T. R., (2001).** Theoretical investigation of bacterial chemotaxis in porous media. *Langmuir* 17(18):5636-5645.



**Ngole, V., Mpuchane, S., Totolo, O., (2006).** Survival of faecal coliforms in four different types of sludge-amended soils in Botswana EUROPEAN JOURNAL OF SOIL BIOLOGY 42.

**Nielsen, P. H., Jahn, A., Palmgren, R., (1997).** Conceptual model for production and composition of exopolymers in biofilms. Water Science and Technology 36(1):11-19.

**Norde, W., and J. Lyklema, (1989).** Protein adsorption and bacterial adhesion to solid surfaces: A Colloid-Chemical Approach. Colloids and surfaces(38):1-13.

## O

**Olson, M. S., Ford, R. M., Smith, J. A., Fernandez, E. J., (2004).** Quantification of bacterial chemotaxis in porous media using magnetic resonance imaging. Environmental Science and Technology 38(14):3864-3870.

## P

**Pekdeger, A., and Matthess, G., (1983).** Factor of bacteria and virus transport in groundwater. Environmental Geology 5(49-52).

**Pourcher, A. M., Picard-Bonnau, F., Ferre V., Agnieszka, G., Vasilica, S., Moguedet G., (2007).** Survival of faecal indicators and enteroviruses in soil after land-spreading of municipal sewage sludge. Applied Soil Ecology 35:473-479.

**Powelson, D. K., Mills, A. L., (1996).** Bacterial enrichment at the gas-water interface of a laboratory apparatus. Applied and Environmental Microbiology 62(7):2593-2597.

**Priestley, J. T., Coleman N.V., Duxbury T., (2006).** Growth rate and nutrient limitation affect the transport of Rhodococcus sp strain DN22 through sand. Biodegradation 17(6):571-576.

**R**

- Rajagopalan, R., and C. Tien, (1976).** Trajectory analysis of deep bed filtration using the sphere in cell porous media model. *AIChE J*(22):523 à 533.
- Redman, J. A., Walker, S. L., Elimelech, M., (2004).** Bacterial adhesion and transport in porous media: role of the secondary energy minimum. *Environmental Science and Technology* 38(6):1777-1785.
- Rijnaarts, H. H. M., et al, (1993).** Bacterial adhesion under static and dynamic conditions. *Appl Environ Microbiol* 59(10):3255-3265.
- Rijnaarts, H. H. M., Norde, W., Bouwer, E. J., Lyklema, J., Zehnder, A. J. B., (1996).** Bacterial deposition in porous media related to the clean bed collision efficiency and to substratum blocking by attached cells. *Environmental Science & Technology* 30(10):2869-2876.
- Rijnaarts, H. H. M., Norde, W., Lyklema, J., Zehnder, A. J. B., (1995).** The Isoelectric Point of Bacteria as an Indicator for the Presence of Cell-Surface Polymers That Inhibit Adhesion. *Colloids and Surfaces B-Biointerfaces* 4(4):191-197.
- Rijnaarts, H. H. M., Norde, W., Lyklema, J., Zehnder, A. J. B., (1999).** DLVO and steric contributions to bacterial deposition in media of different ionic strengths. *Colloids and Surfaces B-Biointerfaces* 14(1-4):179-195.
- Rijnaarts, H. H. M., W. Norde, E.J. Bouwer, J. Lyklema, and A.J.B. Zehnder, (1995).** Reversibility and mechanism of bacterial adhesion. *Colloids and surfaces B: Biointerfaces*(4):5-22.
- Rosenberg, M., and S. Kjelleberg, (1984).** Hydrophobic interactions: role in bacterial adhesion. *Advances in Microbial Ecology* 9:353-393.
- Ryan, J. N., Elimelech, M., (1996).** Colloid mobilization and transport in groundwater. *Colloids and Surfaces a-Physicochemical and Engineering Aspects* 107:1-56.

**S**

- Sabat, G., Rose P., Hickey W.J., Harkin J.M., (2000).** Selective and sensitive method for PCR amplification of Escherichia coli 16S rRNA genes in soil. *Applied and Environmental Microbiology* 66:844-849.
- Salerno, M. B., Flamm, M., Logan, B. E., Velegol, D., (2006).** Transport of rodlike colloids through packed beds. *Environmental Science & Technology* 40(20):6336-6340.
- Sanin, S. L., Sanin, F. D., Bryers, J. D., (2003).** Effect of starvation on the adhesive properties of xenobiotic degrading bacteria. *Process Biochemistry* 38(6):909-914.
- Santamaria, J., Toranzos, G. A., (2003).** Enteric pathogens and soil: a short review. *International Microbiology* 6(1):5-9.
- Sarkar, A. K., Georgiou, G., Sharma, M. M., (1994).** Transport of Bacteria in Porous-Media .1. An Experimental Investigation. *Biotechnology and Bioengineering* 44(4):489-497.
- Scandura, J. E., Sobsey, M. D., (1997).** Viral and bacterial contamination of groundwater from on-site sewage treatment systems. *Water Science and Technology* 35(11-12):141-146.
- Schafer, A., Ustohal, P., Harms, H., Stauffer, F., Dracos, T., Zehnder, A. J. B., (1998).** Transport of bacteria in unsaturated porous media. *Journal of Contaminant Hydrology* 33(1-2):149-169.
- Scholl, M. A., Harvey, R. W., (1992).** Laboratory Investigations on the Role of Sediment Surface and Groundwater Chemistry in Transport of Bacteria through a Contaminated Sandy Aquifer. *Environmental Science & Technology* 26(7):1410-1417.
- Sen, T. K., Das, D., Khilar, K. C., Suraishkumar, G. K., (2005).** Bacterial transport in porous media: New aspects of the mathematical model. *Colloids and Surfaces a-Physicochemical and Engineering Aspects* 260(1-3):53-62.
- Shellenberger, K., Logan, B. E., (2002).** Effect of molecular scale roughness of glass beads on colloidal and bacterial deposition. *Environmental Science and Technology* 36(2):184-189.

- Simoni, S. F., Harms, H., Bosma, T. N. P., Zehnder, A. J. B., (1998).** Population heterogeneity affects transport of bacteria through sand columns at low flow rates. *Environmental Science and Technology* 32(14):2100-2105.
- Simoni, S. F., Harms, H., Bosma, T. N. P., Zehnder, A. J. B., (1998).** Population heterogeneity affects transport of bacteria through sand columns at low flow rates. *Environmental Science & Technology* 32(14):2100-2105.
- Smets, B. F., Grasso, D., Engwall, M. A., Machinist, B. J., (1999).** Surface physicochemical properties of *Pseudomonas fluorescens* and impact on adhesion and transport through porous media. *Colloids and Surfaces B-Biointerfaces* 14(1-4):121-139.
- Smith, G. W. T., R.E. White D. and Ritonga, (1985).** Transport of E. coli through intact and disturbed columns. *Journal of Environmental Quality* 14:87-91.
- Stevik, T. K., Aa, K., Ausland, G., Hanssen, J. F., (2004).** Retention and removal of pathogenic bacteria in wastewater percolating through porous media: a review. *Water Research* 38(6):1355-1367.
- Stevik, T. K., Ausland, G., Hanssen, J. F., Jenssen, P. D., (1999).** The influence of physical and chemical factors on the transport of E-coli through biological filters for wastewater purification. *Water Research* 33(18):3701-3706.
- Strevett, K. A., Chen, G., (2003).** Microbial surface thermodynamics and applications. *Research in Microbiology* 154(5):329-335.

## T

- Tan, Y., Gannon, J. T., Baveye, P., Alexander, M., (1994).** Transport of Bacteria in an Aquifer Sand - Experiments and Model Simulations. *water Resources research* 30(12):3243-3252.
- Thullner, M., Zeyer, J., Kinzelbach, W., (2002).** Influence of microbial growth on hydraulic properties of pore networks. *Transport in Porous Media* 49(1):99-122.
- Tian, Y. Q., Gong, P., Radke, J. D., Scarborough, J., (2002).** Spatial and temporal modeling of microbial contaminants on grazing farmlands. *Journal of Environmental Quality* 31(3):860-869.

- Tong, M. P., Camesano, T. A., Johnson, W. P., (2005).** Spatial variation in deposition rate coefficients of an adhesion-deficient bacterial strain in quartz sand. *Environmental Science & Technology* 39(10):3679-3687.
- Tong, M. P., Johnson, W. P., (2006).** Excess colloid retention in porous media as a function of colloid size, fluid velocity, and grain angularity. *Environmental Science and Technology* 40(24):7725-7731.
- Tsuneda, S., Aikawa, H., Hayashi, H., Yuasa, A., Hirata, A., (2003).** Extracellular polymeric substances responsible for bacterial adhesion onto solid surface. *Fems Microbiology Letters* 223(2):287-292.
- Tsuneda, S., Jung, J., Hayashi, H., Aikawa, H., Hirata, A., Sasaki, H., (2003).** Influence of extracellular polymers on electrokinetic properties of heterotrophic bacterial cells examined by soft particle electrophoresis theory. *Colloids and Surfaces B-Biointerfaces* 29:181-188.
- Tufenkji, N., Elimelech, M., (2004).** Correlation equation for predicting single-collector efficiency in physicochemical filtration in saturated porous media. *Environmental Science & Technology* 38(2):529-536.
- Tufenkji, N., Elimelech, M., (2005).** Spatial distributions of *Cryptosporidium oocysts* in porous media: Evidence for dual mode deposition. *Environmental Science and Technology* 39(10):3620-3629.
- Tufenkji, N., Redman, J. A., Elimelech, M., (2003).** Interpreting deposition patterns of microbial particles in laboratory-scale column experiments. *Environmental Science and Technology* 37(3):616-623.

## U

- Unc, A., Goss, M. J., (2004).** Transport of bacteria from manure and protection of water resources. *Applied Soil Ecology* 25(1):1-18.

## V

- Vadillo-Rodriguez, V., Logan, B. E., (2006).** Localized attraction correlates with bacterial adhesion to glass and metal oxide substrata. *Environmental Science & Technology* 40(9):2983-2988.
- van der Mei, H. C., Bos, R., Busscher, H. J., (1998).** A reference guide to microbial cell surface hydrophobicity based on contact angles. *Colloids and Surfaces B-Biointerfaces* 11(4):213-221.
- van der Mei, H. C., Busscher, H. J., (2001).** Electrophoretic mobility distributions of single-strain microbial populations. *Applied and Environmental Microbiology* 67(2):491-494.
- van der Wal, A., Norde, W., Zehnder, A. J. B., Lyklema, J., (1997).** Determination of the total charge in the cell walls of Gram-positive bacteria. *Colloids and surfaces B: Biointerfaces* 9(1-2):81-100.
- van Loosdrecht, M. C., Lyklema, J., Norde, W., Schraa, G., Zehnder, A. J., (1987).** Electrophoretic mobility and hydrophobicity as a measured to predict the initial steps of bacterial adhesion. *Applied and Environmental Microbiology* 53(8):1898-1901.
- van Loosdrecht, M. C., Lyklema, J., Norde, W., Schraa, G., Zehnder, A. J., (1987).** The role of bacterial cell wall hydrophobicity in adhesion. *Applied and Environmental Microbiology* 53(8):1893-1897.
- van Loosdrecht, M. C., Lyklema, J., Norde, W., Zehnder, A. J., (1990).** Influence of interfaces on microbial activity. *Microbiology Reviews* 54(1):75-87.
- van Loosdrecht, M. C., Norde, W., Lyklema, L. and Zehnder, J., (1990).** Hydrophobic and electrostatic parameters in bacterial adhesion. *Aquatic Science* 51(103-114).
- van Loosdrecht, M. C. M., J. Lyklema, W. Norde, and A.J.B. Zehnder, (1989).** Bacterial adhesion : A physicochemical approach. *Microbial Ecology*(17):1-15.
- van Oss, C. J., (1989).** *Cell Biophys*(14):1.
- van Oss, C. J., (1989).** Energetics of cell-cell and cell-biopolymer interactions. *Cell Biophysics* 14:1-16.

- van Oss, C. J., (1993).** Acid--base interfacial interactions in aqueous media. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* 78:1-49.
- van Oss, C. J., (1994).** Interfacial forces in aqueous media. *Interfacial forces in aqueous media*. New York: Dekker.
- van Oss, C. J., (1995).** Hydrophobicity of Biosurfaces - Origin, Quantitative-Determination and Interaction Energies. *Colloids and Surfaces B-Biointerfaces* 5(3-4):91-110.
- van Oss, C. J., (2003).** Long-range and short-range mechanisms of hydrophobic attraction and hydrophilic repulsion in specific and aspecific interactions. *Journal of Molecular Recognition* 16(4):177-190.
- Vidal, O., Longin, R., Prigent-Combaret, C., Dorel, C., Hooreman, M., Lejeune, P., (1998).** Isolation of an *Escherichia coli* K-12 mutant strain able to form biofilms on inert surfaces: Involvement of a new ompR allele that increases curli expression. *Journal of Bacteriology* 180(9):2442-2449.

## W

- Walker, S. L., Redman, J. A., (2004).** Bacterial transport and deposition in porous media: Role of cell surface lipopolysaccharides (LPS). *Abstracts of Papers of the American Chemical Society* 228:U606-U606.
- Walker, S. L., Redman, J. A., Elimelech, M., (2004).** Role of cell surface lipopolysaccharides in *Escherichia coli* K12 adhesion and transport. *Langmuir* 20(18):7736-7746.
- Wan, J. M., Wilson, J. L., Kieft, T. L., (1994).** Influence of the Gas-Water Interface on Transport of Microorganisms through Unsaturated Porous-Media. *Applied and Environmental Microbiology* 60(2):509-516.
- Ward, J. B., and Berkeley R.C.W., (1980).** The microbial cell surface and adhesion. In: Berkeley, R. C. W., Lynch J.M., Melling J., Rutter P.R. and Vincent D., editor. *Microbial adhesion to surfaces*. Chichester: Ellis Horwood. p 47-66.
- Webb, J. S., Van der Mei, H. C., Nixon, M., Eastwood, I. M., Greenhalgh, M., Read, S. J., Robson, G. D., Handley, P. S., (1999).** Plasticizers increase adhesion of the

deteriogenic fungus *Aureobasidium pullulans* to polyvinyl chloride. *Applied and Environmental Microbiology* 65(8):3575-3581.

**Weiss, T. H., Mills, A. L., Hornberger, G. M., Herman, J. S., (1995).** Effect of Bacterial-Cell Shape on Transport of Bacteria in Porous-Media. *Environmental Science and Technology* 29(7):1737-1740.

## **Y**

**Yao, K. M., Habibian, M.T., O'Melia, C.R., (1971).** Water and waste-water filtration: concepts and applications. *Environmental Science & Technology*(5):1105-1112.

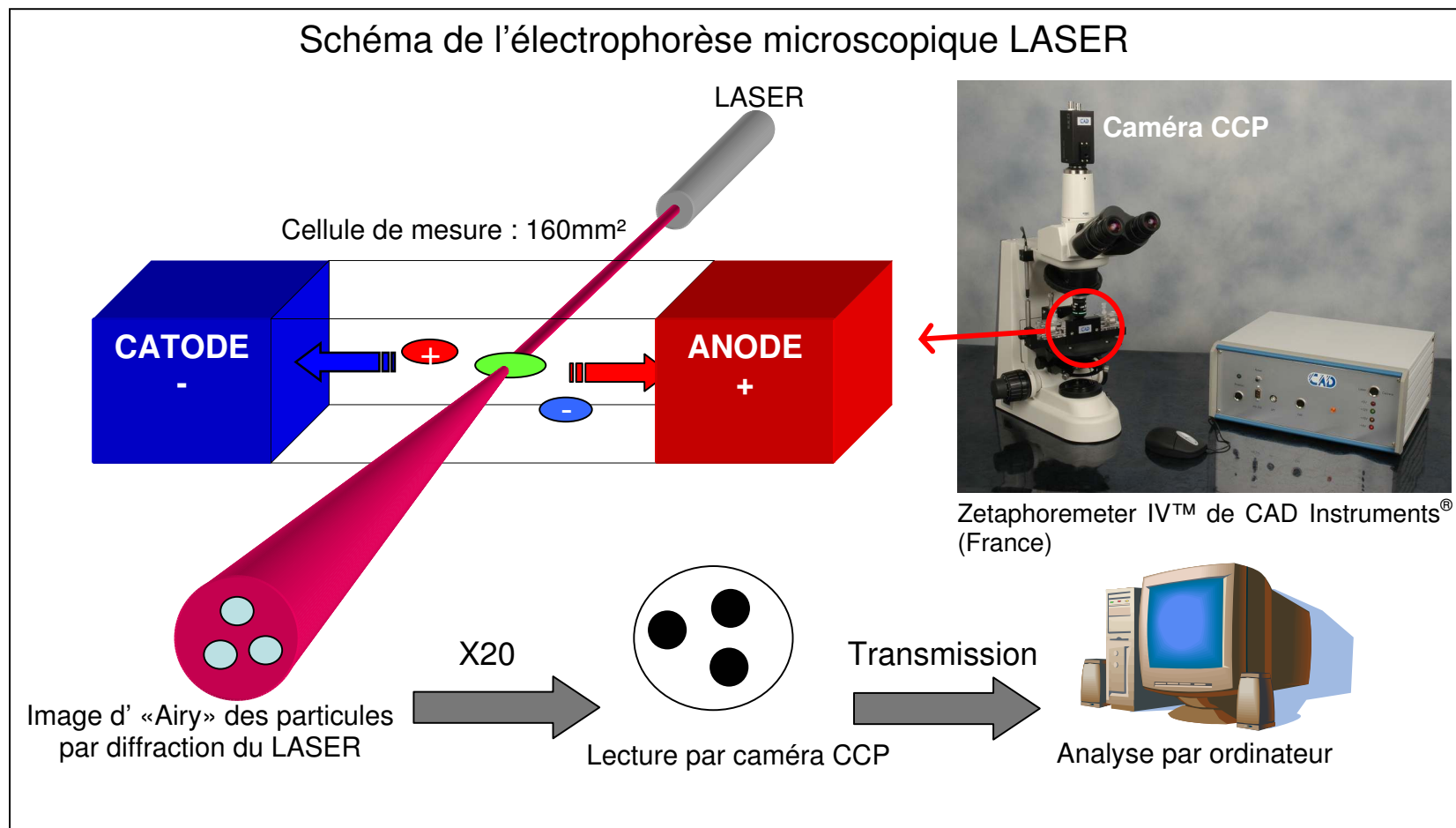
## **Z**

**Zita, A., Hermansson, M., (1997).** Effects of bacterial cell surface structures and hydrophobicity on attachment to activated sludge flocs. *Applied and Environmental Microbiology* 63(3):1168-1170.





## **Annexes**



**Figure 1** : Schéma du principe de l'électrophorèse microscopique LASER

## **ANNEXE 1 : Méthode et principe de mesure du potentiel zêta des cellules bactériennes**

La méthode utilisée est celle de l'électrophorèse LASER (voir schéma page 248 de l'annexe). L'appareil utilisé est un Zetaphoremeter II™ de CAD Instruments® (France) situé au CEREGE d'Aix-en-Provence. Le principe de la mesure est de placer les particules chargées dans un champ électrique. Elles vont donc être soumises à une force proportionnelle à leur charge et au champ ; ce qui va induire un déplacement. Les particules lors de leur déplacement seront aussi soumises à des forces de trainée hydrodynamique et à la friction électrophorétique. Lorsque ces forces sont en équilibre on a un déplacement à vitesse constante. La mesure de cette vitesse de déplacement permet donc d'accéder au potentiel  $\zeta$ .

### Les étapes opératoires :

- Après centrifugation de la culture bactérienne (5000rpm pendant 5 minutes) les cellules sont suspendues dans une solution de molarité et de pH définis. En effet le pH comme la molarité et l'espèce ionique du milieu influent grandement sur le potentiel zêta.
- La suspension bactérienne ainsi obtenue est placée dans une cellule de mesure de 160mm<sup>3</sup> dont chaque extrémité contient une électrode en palladium.
- Le microscope est ensuite réglé afin d'observer l'image « d'Airy » constituée par la lumière du Laser diffractée par les cellules bactérienne (voir schéma)
- Un champ électrique de 8V est ensuite appliqué successivement dans un sens puis dans l'autre.
- En fonction de leur potentiel zêta (charge électrique de surface globale) les cellules bactériennes se déplacent plus ou moins vite vers l'anode ou la cathode.

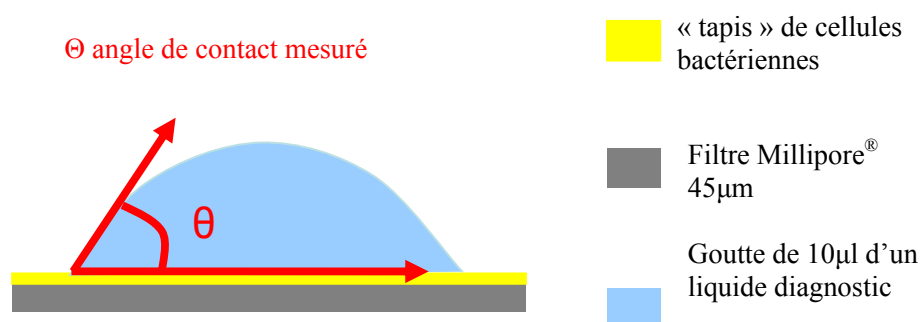
- La lumière diffracté du Laser par les bactéries constitue un empreinte visuelle (image de d'Airy) pour mesurer le sens et la vitesse de déplacement des bactéries à l'aide d'une caméra CCP placé sur le microscope.
- Le logiciel Zetawin analyse les images enregistrées par la caméra CCP : La vitesse de déplacement des cellules est calculée à partir des positions enregistrées à pas de temps discret. Connaissant cette vitesse, le logiciel calcule la mobilité électrophorétique  $u=v/E$  ( $V.s^{-1}$ ). L'équation de Smoluchowski permet ensuite de déterminer le potentiel zêta de chaque cellule dont la mobilité électrophorétique a été mesurée :

$$\zeta = \frac{4u\pi\eta}{\epsilon}$$

Avec  $\zeta$  le potentiel zêta de la cellule (V),  $\eta$  la viscosité du milieu ( $Pa.s^{-1}$ ) et  $\epsilon$  la constante diélectrique du milieu. L'équation de Smoluchowski est utilisée de préférence à celle de Hückel, car les bactéries sont grandes par rapport à l'épaisseur de leur double couche électrique.

- Le logiciel Zetawin fait ensuite une moyenne du potentiel zêta de l'ensemble des cellules bactériennes dont on a mesuré la vitesse électrophorétique (une centaine à la fois généralement). A noter que l'on a aussi accès à la distribution des potentiels  $\zeta$  mesurés.





**Figure 2 :** Illustration de la mesure d'angle de contact de cellules bactériennes

## ANNEXE 2 : Mesure de l'angle de contact pour les bactéries

Les mesures d'angles de contact sont nécessaires pour résoudre les équations permettant d'accéder aux composantes de la tension de surface (voir § 1.2.3 p. 55 du chapitre état de l'art).

Les mesures ont été réalisées avec un goniomètre G40 Krüs à l'INRA de Massy (Laboratoire de Bio - adhésion et Hygiène des Matériaux). Le principe consiste à obtenir un « tapis » de cellules bactériennes sur lequel est déposé une goutte de liquide diagnostic (tableau 1 p. 54) et de mesurer l'angle comme indiqué sur la figure 2:

### Les étapes opératoires :

- Après centrifugation de la culture bactérienne (5000rpm pendant 5 minutes) les cellules sont suspendues dans une solution d'eau physiologique.
- La solution bactérienne est ensuite filtrée sur une membrane de nitrocellulose (0.45µm, type HA, Millipore<sup>®</sup>, USA) à l'aide d'un module de filtration Nalgene<sup>®</sup> et d'une pompe manuelle. La pompe manuelle permet de créer une très faible dépression dans le module de filtration (-0.1Bar). La dépression doit être très faible pour créer un tapis bactérien homogène sur lequel la goutte de liquide diagnostic doit rester stable (Comm Pers. H.C. van der Mei)
- Une fois le tapis bactérien correctement créé, (plusieurs essais sont nécessaires pour maîtriser la technique) une goutte de 10µl d'un liquide diagnostic y est déposé (la goutte doit rester stable). Enfin l'angle de contact est mesuré comme indiqué dans le schéma.





### ANNEXE 3 : Mesure de l'angle de contact pour le solide

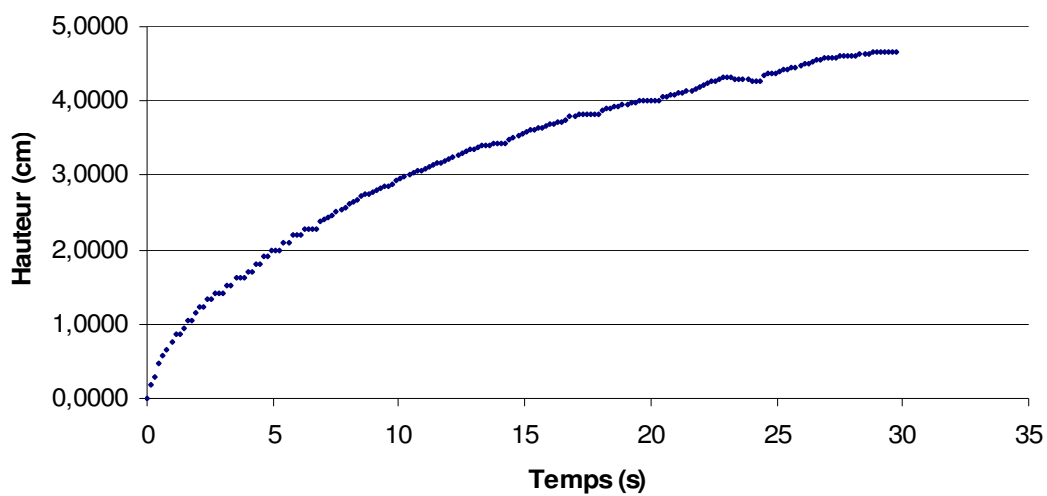
Cette méthode permet de déterminer les tensions de surface caractéristiques du sable et du verre utilisé pendant les expériences de transport bactérien. Le principe consiste à mesurer la vitesse de montée par capillarité d'un liquide (dont les caractéristiques Lifshitz-van der Waals et donneur/accepteur d'électrons sont connues) dans le milieu poreux analysé. L'équation de Washburn permet ensuite de remonter à l'angle de contact  $\theta$  entre le milieu poreux et le liquide utilisé pour la mesure. L'équation de Washburn spécifie qu'il existe une relation linéaire entre le carré de la hauteur atteinte par le liquide et le temps mis pour y arriver :

$$h^2 = \frac{R_e \gamma_L \cos \theta}{2\mu} t$$

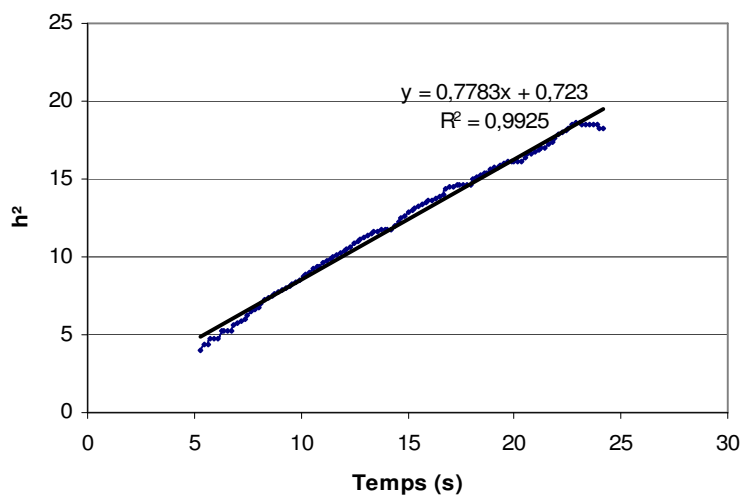
Avec  $R_e$  le rayon moyen des pores du milieu poreux (m),  $\gamma_L$  ( $\text{mJ.m}^{-2}$ ) la tension de surface du liquide utilisée pour la mesure,  $\theta$  l'angle de contact entre le liquide et le solide,  $\mu$  ( $\text{N.m}^{-2}$ ) la viscosité du liquide,  $t$  le temps (s) and  $h$  la hauteur de montée par capillarité du liquide (m). Pour déterminer le rayon moyen des pores  $R_e$  on utilise un liquide très mouillant (par exemple l'Hexadecane) de façon à avoir  $\cos \theta = 1$ .

#### Mode opératoire :

- Le dispositif expérimental est constitué de tubes de verre fins ( $L=10\text{cm}$   $\varnothing = 0.6\text{cm}$ ) remplis du milieu poreux. Pour tasser correctement les grains constituant le milieu poreux il est important de taper le tube de verre contre une surface solide jusqu'à obtention de la masse volumique souhaitée. Dans notre cas, une masse volumique de 1.664 était obtenue en mettant 2.35 grammes de sable sur une hauteur de 5 cm.
- Le bas du tube de verre est fermé avec un filtre ( $40\mu\text{m}$ , type 417, VWR international) pour retenir le milieu poreux et permettre le passage d'un liquide par capillarité.
- Le bas du tube est mis en contact avec un réservoir contenant le liquide, ce réservoir reposant sur une balance de précision.



**Figure 3 :** Montée capillaire de l'eau dans le sable en centimètres en fonction du temps



**Figure 4 :** Hauteur de la montée capillaire en centimètres (de l'eau dans le sable) au carré en fonction du temps

- Un logiciel créé au laboratoire (sous le système Labview) a permis l'acquisition rapide (pas de temps de 200ms) des pesées de la balance, ce qui permet de connaître la masse d'eau absorbée par la colonne au cours du temps.
- La mesure du poids peut être convertie en hauteur de montée capillaire en utilisant la masse volumique du liquide utilisé et la porosité du milieu poreux.
- La figure 3 illustre un exemple de montée capillaire de l'eau dans du sable. Les mêmes données sont présentées dans la figure 4 en représentant  $h^2$  en fonction du temps. On observe bien la linéarité de la relation aux erreurs expérimentales près.
- Un ajustement au sens des moindres carrés permet alors d'obtenir le coefficient directeur  $\alpha$  de la droite  $h^2 = \alpha t$  :

$$\alpha = \frac{R_e \gamma_L \cos \theta}{2\mu}$$

On peut alors en déduire

$$\cos \theta = \frac{2\alpha\mu}{R_e \gamma_L}$$

- En réalisant ces expériences de montée capillaires avec trois liquides différents on peut déterminer les caractères  $\gamma^{LW}$ ,  $\gamma^+$  et  $\gamma^-$  du milieu poreux (voir équations §1.2.3 p.55).

Nous avons réalisé les expériences avec de l'hexane pour déterminer le rayon moyen des pores.

Les autres liquides utilisés ont été de l'eau, du formamide et du bromonaphtalène.



**Figure 5 :** La plate forme MIMA2 est équipée avec un microscope confocal tel que celui-ci.

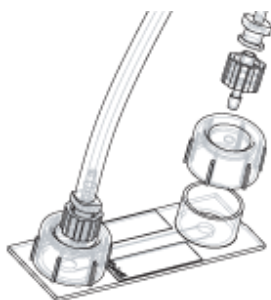
## **ANNEXE 4 : Microscope confocal et visualisation des bactéries dans un milieu poreux**

Un des objectifs majeurs de la thèse est de mieux comprendre l'influence d'une matrice porale et sa géométrie sur le transport microbien. Un dispositif expérimental original a été mis au point afin de visualiser l'effet de la forme des grains et de la force ionique sur le déplacement de cellules bactériennes à travers un système poral. Pour cela un microscope confocal (Leica TCS SP2 AOBS, Leica Microsystems, France) de la plate forme MIMA2 situé à l'INRA de Massy a été utilisé (figure 5). Pour plus d'informations sur la plate forme MIMA2 visitez le site <http://voxel.jouy.inra.fr/mima2>.

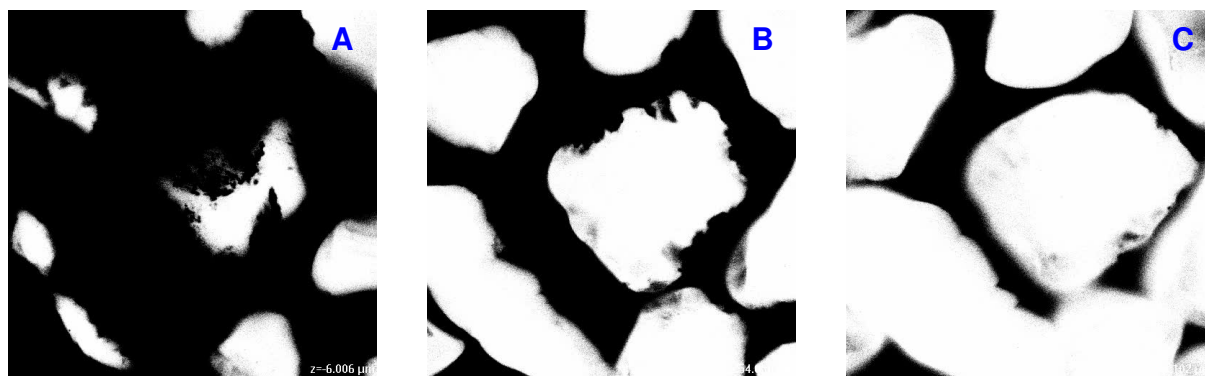
Le principe est basé sur l'utilisation d'une cellule d'écoulement remplie soit de billes de verres parfaitement sphériques soit de grains de sables d'aspect irrégulier. Le microscope confocal permet ensuite de visualiser *in situ* le comportement des cellules bactériennes lors de leur transport dans le milieu poreux étudié.

### Les étapes opératoires :

- Des cellules d'écoulement (Flow chamber uncoated, Ibidi, Allemagne, voir figure 6) sont remplies soit avec des billes de verre ( $\text{\O} 250\mu\text{m}$ ), soit avec des grains de sable de Fontainebleau ( $\text{\O}230\text{-}310\mu\text{m}$ ). La cellule d'écoulement est ensuite connectée à une pompe (Watson-Marlow, serie200, RU) afin de permettre une circulation continue des fluides (environ  $8.5\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ ). La vitesse de circulation dans la cellule d'écoulement a été calculée afin d'obtenir la même vitesse de circulation que dans les milieux poreux des grandes colonnes.
- Le microscope est alors ajusté sur un site en particulier. Cette étape permet de faire la mise au point. Les caractéristiques du microscope confocal permettent de visualiser jusqu'à  $70\mu\text{m}$  dans le milieu poreux.



**Figure 6 :** Illustration de la cellule d'écoulement (Ibidi) utilisé et son système de raccordement



**Figure 7 :** Visualisation d'un même site dans le sable à 3 profondeurs différentes. A : 6 $\mu\text{m}$ , B : 50 $\mu\text{m}$  et C : 100 $\mu\text{m}$

- Les contours du milieu poreux ont été révélés avec une solution de FITC (\*). Le FITC (dilué mille fois) est excité par un Laser 488nm (bleu) et restitue de la fluorescence verte (maximum à 520nm).
- Après révélation le milieu poreux est lessivé avec de l'eau milliQ pour enlever les traces de FITC(\*).
- Une solution d'*Escherichia coli* K12 ajustée à environ  $1.10^6$  cellules.ml<sup>-1</sup> et de force ionique définie est injectée dans la cellule d'écoulement. Le mouvement des cellules peut être observé pendant toute la durée de l'expérience (une vingtaine de minutes généralement). La souche d'*E. coli* utilisée a été préalablement transformée avec un plasmide portant le gène codant pour la protéine fluorescente DsRed.
- (\*) A noter que le FITC a été injecté dans la cellule d'écoulement tantôt avant l'injection des bactéries, tantôt après. Cependant le FITC n'a jamais été injecté dans la cellule d'écoulement en même temps que les bactéries étant donné les possibles interactions avec les propriétés d'adhésion des cellules et la modification de la force ionique du milieu.





**Figure 8 :** Cytomètre de flux EPICS XL de Beckman Coulter utilisé pour les comptages

## **ANNEXE 5 : Comptage des cellules bactériennes au cytomètre à flux**

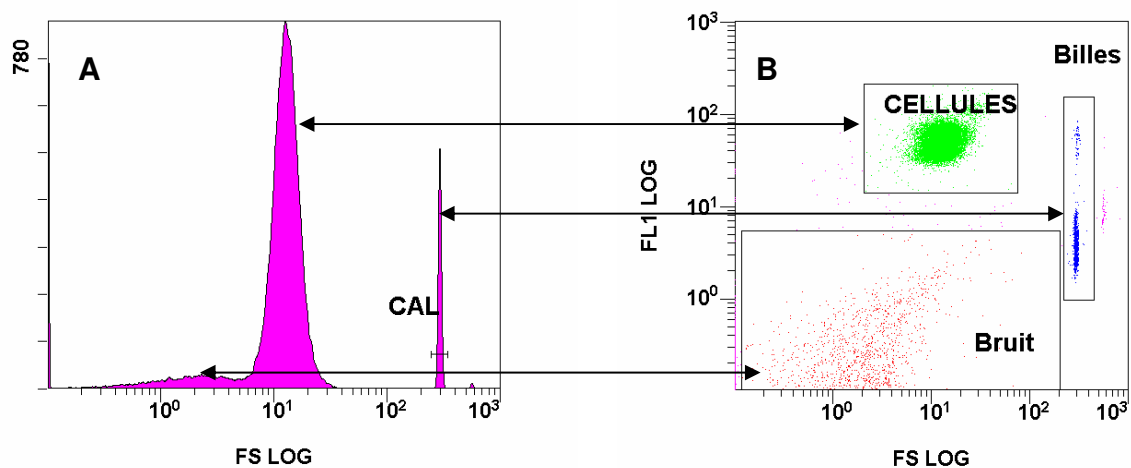
L'étude du transport microbien en milieu poreux nécessite des comptages rapides et nombreux de cellules bactériennes. Plus de 3000 comptages de cellules en solution ont été réalisés au cours de cette thèse, avec lors de certaines expériences seulement 2 minutes entre chaque comptage. Le cytomètre de flux est un outil de dénombrement particulièrement adapté à ces contraintes.

Le principe de la cytométrie de flux est basé sur les mesures de la diffraction et de l'émission de lumière causée par le passage de particules devant un faisceau laser. La diffraction et l'émission donnent trois informations sur les caractéristiques des particules analysées : la taille, la structure, la fluorescence. La fluorescence permet de trier les particules comptées par le cytomètre et donc de distinguer des bactéries de fluorescence connue d'autres colloïdes présents dans la solution. L'appareil utilisé est un Beckman Coulter EPICS XL (Fullerton, USA) comme illustré sur la figure 8.

L'utilisation d'un étalon de fluorescence, de taille et de concentration connue est toujours nécessaire pour déterminer la concentration des particules comptées. En effet si l'appareil est parfaitement capable de compter le nombre de particules en solution, le volume analysé est inconnu. On utilise donc généralement un étalon de billes de latex de concentration connue. Le comptage des billes de références par l'appareil permet de connaître le volume réellement analysé et donc la concentration bactérienne. De plus, la position des billes sur les diagrammes de sortie permet de vérifier qu'il n'y a pas de dérive du système optique de l'appareil. Pour cette étude c'est le Bacterial counting kit de Molecular Probes qui a été utilisé. Ce kit a été spécialement conçu pour dénombrer des cellules bactériennes par la cytométrie de flux. Le kit contient un étalon de billes de latex ( $\text{Ø} = 6\mu\text{m}$ ,  $1000\text{billes}\cdot\mu\text{l}^{-1}$ ) et un fluorochrome de type SYTO9 qui marque l'ADN des cellules. Ce fluorochrome est utilisé si les cellules à dénombrer ne sont pas fluorescentes.

### Mode opératoire :

- 1ml d'une solution bactérienne à dénombrer est placé dans un tube à analyse jetable compatible avec le cytomètre.



**Figure 9 :** Comptage des cellules *P. polymycae* SB03 au cytomètre à flux.

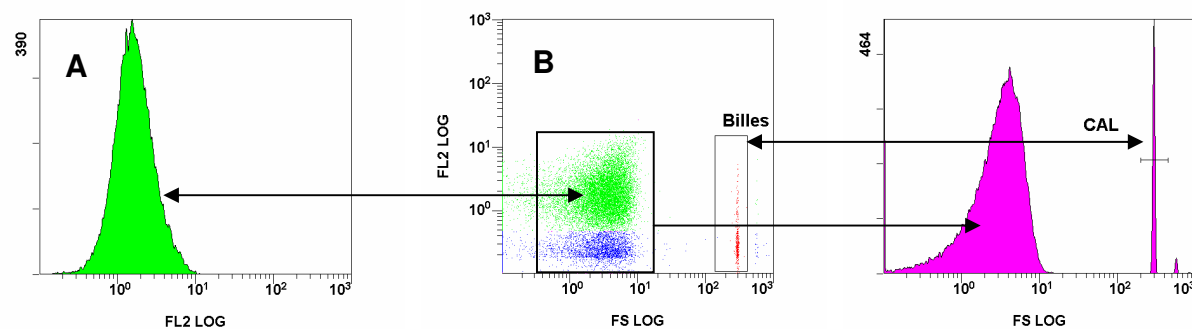
(A) Histogramme avec le nombre d'événements comptabilisés en fonction de la taille des particules. La borne CAL permet de situer le pic correspondant aux billes de calibration. (B) Graphique représentant la fluorescence (FL1) en fonction de la taille des particules comptabilisées (FS). Dans cet exemple le nombre de cellules comptabilisé (événements en vert à l'intérieur de la zone « cellules ») est de 7152 cells.μl<sup>-1</sup>.

- 1µl de la solution de marquage (SYTO BC™, Bacterial Counting Kit, Molecular Probes, Oregon, USA) est mélangée si nécessaire (bactéries non fluorescentes) à la solution bactérienne qui est ensuite laissée au repos pendant 5 minutes.
- la solution de calibration (5 µl) (Latex Standard Beads, Bacterial Bacterial Counting Kit, Molecular Probes, Oregon, USA) est ajoutée à la préparation de bactéries marquées, le tout étant vigoureusement agité juste avant analyse.
- Analyse de la solution. (les réglages de l'appareil dépendent de l'expérience)

#### Exemples d'analyses :

Comptage de cellules de *Peaenibacillus polymycae* SB03. Les cellules sont marquées avec un fluorochrome de type SYTO9 et la détection se fait sur la chaîne FL1 (510-550nm). La figure 9a illustre un histogramme indiquant le nombre d'événements comptabilisé par le cytomètre en fonction de la taille des particules (FS). Pour le grand pic on constate une distribution de la taille de type gaussienne étroite signifiant une bonne homogénéité de la taille des cellules. Il en est de même pour les billes (petit pic). Ce type de représentation graphique est utilisé pour valider la mesure car les billes de taille unique et connue doivent systématiquement apparaître à l'intérieur de la borne CAL. Cela permet également de vérifier que la culture est pure, en cas de contamination le pic ne présente pas une allure Gaussienne. La figure 9b montre la fluorescence (FL1) en fonction de la taille des particules (FS) dénombrées. La figure 9b permet d'isoler les cellules et les billes que l'on veut dénombrées des autres événements.

La méthode de comptage des cellules d'*E. coli* PHL1314 diffère un peu des autres bactéries. En effet la souche PHL1314 a été transformée par un plasmide pDsRed-Express (Molecular Probes, Oregon, USA). Ce plasmide porte un gène qui code pour une protéine fluorescente DsRed qui permet la détection des cellules PHL1314 par le cytomètre. Dans ce cas les bactéries ne sont pas marquées avec le cytochrome SYTO BC puisqu'elles sont « naturellement fluorescentes ». Le cytomètre est alors réglé sur la chaîne de détection FL2 (550-590nm) qui correspond au maximum d'émission de la DsRed. Cependant l'utilisation de la solution de calibration est indispensable pour le dénombrement. La figure 10 illustre un exemple de comptage



**Figure 10 :** Comptage de cellules E. coli PHL1314 au cytomètre à flux.

Les histogrammes A et C représente respectivement le nombre d'évènements en fonction de la fluorescence (FL2) et la taille (FS). B montre la fluorescence en fonction de la taille des particules.

de cellules PHL1314 après transport sur une colonne de sol. On remarque tout d'abord que le pic de billes se trouve dans la borne CAL validant ainsi la mesure (figure 10c). On constate également l'importance des événements « non cellules PHL1314 » en bleu sur la figure 10b. Cette particularité est liée aux expériences en colonnes de sol Poirson dont sortent de nombreux colloïdes et probablement des bactéries autres que la souche PHL1314 (les sols n'étaient pas stériles contrairement au sable et aux billes de verre). La taille ne permet pas de distinguer les cellules de la souche PHL1314 avec les autres particules dans le milieu (figure 10c). Le facteur discriminatoire pour compter uniquement les cellules de la souche PHL1314 va être la fluorescence de DsRed détectée par la chaîne FL2 (en vert figure 10 a et b).