

Charges minérale et bactériologique des biofilms formés à l'intérieur de canalisations d'eau potable

G.P. HUSSON¹, M. LECSO², F. HUI⁴, J. LÉDION³

¹Université Paris-Descartes, Laboratoire d'hydrologie - 4, avenue de l'Observatoire 75270 Paris Cedex 6

² Université Paris Descartes, Bactériologie, 4 av. de l'Observatoire 75270 Paris Cedex 06

³ARTS 151, boulevard de l'Hôpital 75013 Paris

⁴ CNRS, UPR 15, 4, place Jussieu 75252 Paris Cedex 05

G.P.Husson, Tél / Fax 01.43.26.24.98

Messagerie : gilles.husson@parisdescartes.fr

Abstract: Research of mineral matters and bacteria of the biofilm in the pipe of drinkable water .

A biofilm is a heterogeneous bacterial community from the metabolic activities and growth point of view. For most researchers, the biofilm is just considered under its "organic" aspect. They define the biofilm as a "structured organism of micro-organisms in a matrix of polysaccharides and proteins which are protective and nutritive, adherent to a surface".

In the simplest case, the biofilm would be composed of bacteria cells and their metabolites. Such a biofilm would have generally a very porous structure (more than 80% of water) and would also contain a part more or less important of inorganic particles trapped in the exopolymers. Moreover, within the biofilm, more evolved organisms, such as algae and protozoans would cohabit with the bacteria.

The inorganic matters are just mentioned by the way, perhaps in the concern to be complete and to forget nothing in the enumeration and this for well underline the complexity of the biofilm. Nevertheless, some rare researchers are interested in the relations between minerals and bacteria in the biofilm. In spite of all, the contribution remains less important. That is why we propose to show how the use of the infrared absorption spectrometry allows to characterise, with a relatively simple way, the different inorganic compounds presented in the biofilms.

The infrared absorption spectrometry is now a very classical method which is largely used by numerous laboratories. Although it is an old method, it has gotten a great interest by using Fourier Transformed mode. Nevertheless, its applications are usually limited to organic compounds but not to the analysis of inorganic matters, even though some pioneers such J. Lecomte, had described in detail, in the middle of the last century, the interest of the infrared absorption spectrometry to both the organic and inorganic compounds.

Nowadays, the obtaining of complete spectrums are more quickly by offering the information about the compounds hydration and the different types of organic and inorganic matters. Of course, the method has also its limits, but they are not restricting for the study of the mineral fraction of the films.

However, the interpretation of the obtained spectra can be difficult when there is interference among absorption picks of several compounds. This is why we usually regrind the pastille, after saving the spectrum, then calcine the pastille at a suitable temperature. This calcination is for objective of the transformation of a substance which has poor absorbance in IR into another one which gives a strong absorbance (e.g. the sulphide can be transformed into the sulphate). The re-calcination can be also used for the elimination of organic matters at 550 °C. After the re-calcination, a new pastille is made and it is analysed in the same conditions.

The obtained results after the calcinations have showed indisputably that the studied biofilms contained effectively mineral matters which are by far to be of a minority: on one of them, a proportion of 43% of mineral matters has been obtained after calcinations during 17 hours at 550 °C (the biofilm having been dried previously during 1 h at 60 °C. In addition, these mineral matters can be characterised and measured either directly by a characteristic absorbance or by comparison of absorbance before and after calcination. Moreover, during a study on the kinetics of biofilms formation, we can combine these analyses with the characterisation (by culture) of micro-organisms developed in the biofilms.

Biofilms developing in the pipes of drinkable water raise a real problem of public health in addition to the phenomena of corrosion or head losses which they cause. Understanding finely the mechanisms which underlie the bacterial stuck to the abiotic support, allows developing new fighting strategies against biofilms. A microbiological study by bacterium culture was realized aiming a better understanding of the important role played by the support in the phenomenon of the biofilm formation and stabilization (stuck).

Key words: biofilm, inorganic biofilm, microbiology biofilm

Kursfassung: Studie der anorganischem und bakteriologischen Belastung von Biofilmen in Trinkwasserrohren

Ein Biofilm ist im Hinblick auf die metabolischen Aktivitäten und das Wachstum eine heterogene Bakterienkultur.

Im einfachsten Fall setzt sich der Biofilm aus Bakterienzellen und ihren Metaboliten zusammen. Solch ein Biofilm hat normalerweise eine sehr poröse Struktur (mehr als 80 % Wasser) und enthält auch einen mehr oder weniger bedeutenden Anteil anorganischer Partikel, die in den Exopolymeren eingeschlossen sind. Darüber hinaus leben im Biofilm höherentwickelte Organismen wie Algen und Protozoen mit den Bakterien zusammen.

Biofilme, die sich in Trinkwasserrohren entwickeln, stellen ein echtes Problem für die öffentliche Gesundheit dar. Dazu gesellen sich die Phänomene Korrosion und Druckabfall, die sie verursachen. Ein genaues Verständnis der Mechanismen hinter den Bakterien, die auf dem abiotischen Träger haften, gestatten die Entwicklung neuer Bekämpfungsstrategien gegen Biofilme.

Eine mikrobiologische Studie anhand von Bakterienkulturen wurde durchgeführt. Sie hatte ein besseres Verständnis der wichtigen Rolle zum Ziel, die der Träger für das Phänomen der Biofilmbildung und -stabilisierung (Anhaftung) spielt.

Schlüsselwörter: Biofilm, anorganischer Biofilm, mikrobiologischer Biofilm

Résumé :

Pour la plupart des auteurs, le biofilm est considéré sous son aspect « organique ». Ils définissent le biofilm comme une « organisation structurée de microorganismes dans une matrice polysaccharidique et protéique, protectrice et nutritive, adhérant à une surface ». Dans le cas le plus simple, ce biofilm serait composé de cellules bactériennes et de leurs métabolites. Un tel biofilm aurait généralement une structure très poreuse (plus de 80% d'eau) et comporterait également une part plus ou moins importante de particules inorganiques piégées dans des exopolymères.

Les études des relations minéraux / bactéries sont peu nombreuses, c'est pourquoi cette publication se propose de montrer comment l'utilisation de la spectrométrie d'absorption infra rouge permet d'accéder de manière relativement simple aux différents composés inorganiques présents dans les biofilms à côté des bactéries qui seront également recherchées. Après calcination et rebroyage de la pastille on peut avoir la transformation d'une substance peu visible en IR en une autre qui absorbe avec plus de netteté (par exemple les sulfures, qui peuvent être transformés en sulfates), ou bien l'élimination des matières organiques par calcination à 550°C en atmosphère oxydante.

Par ailleurs, lors de étude sur la cinétique de formation de biofilm, on peut coupler ces analyses en infra rouge, avec la caractérisation (par culture), au cours du temps, des microorganismes qui se développent : on trouve notamment : *Pseudomonas Aëromonas*, *Sphingomonas Paucimobilis* et *Pseudomonas .fluorescens*

Différents matériaux ont été étudiés comme le titane, le caoutchouc, le cuivre et le **Polyéthylène** et l'acier inoxydable austénitique.

Le titane développe le minimum de biofilm car c'est un métal lisse, inerte et non nutritif. Inversement c'est le caoutchouc qui laisse développer à sa surface un important biofilm du fait de nombreuses anfractuosités et de sa nature plus nutritive que les autres matériaux.

La présence d'une flore dominante peut gêner la détection d'autres espèces, en quantités plus faibles ou bien encore inhiber leur culture en synthétisant des molécules toxiques (bactériocines). Pour mettre en évidence ces sous-populations, nous avons effectué des essais sur des milieux différents une gélose TS additionnée d'Aztréonam, un antibiotique inhibant *P. aeruginosa* mais peu actif sur la plupart des autres bacilles à Gram négatif oxydatifs. Ce milieu nous a permis d'isoler d'autres espèces. De même l'emploi d'un milieu comme celui de R2A, pauvre en matières nutritive permet le développement de bactéries comme *Sphingomonas paucimobilis* ou *Aëromonas Hydrophila*

Cette étude permet également de comprendre plus finement les mécanismes qui sous-tendent l'adhésion bactérienne à un support abiotique suggérant de nouvelles stratégies de lutte contre les biofilms.

Mots clés : biofilm, matière minérale biofilm, microbiologie biofilm

INTRODUCTION

Les exigences des normes appliquées à l'eau potable ont conduit les distributeurs d'eau, les industriels, les responsables d'établissements de santé ou encore les exploitants de circuits d'eau à usages domestiques à s'intéresser de plus en plus à la « matière organique fixée » sur les parois des matériaux placés au contact de l'eau, appelée par les spécialistes « biofilm ».

Le biofilm étant défini comme une organisation structurée de microorganismes dans une matrice polysaccharidique et protéique, protectrice et nutritive adhérant à une surface [1].

Il est composé de cellules bactériennes et de leurs métabolites, avec une structure très poreuse (plus de 80% d'eau) et comporte également une part importante de particules inorganiques piégées dans les exopolymères. De plus des organismes plus évolués comme des algues, des protozoaires pourraient cohabiter avec les bactéries au sein des biofilms.

Les études sur les interactions minéraux / bactéries sont peu nombreuses, c'est pourquoi on se propose de montrer, dans cette étude, comment l'utilisation de la spectrométrie d'absorption infra rouge permet d'accéder de manière relativement simple aux différents composés inorganiques présents dans les biofilms, tout en estimant la quantité de matière organique présente. Cette technique étant complétée par la recherche des bactéries présentes dans le biofilm.

I - MATÉRIEL ET MÉTHODES

1. Eau utilisée

Le dispositif de formation des biofilms est alimenté par le réseau public de Paris, sans aucun traitement préventif et ni de réchauffement de l'eau en hiver. Les valeurs qui caractérisent l'eau utilisée (eau de Seine) sont présentées ci-dessous au Tableau 1. Seule la température varie avec la saison, mais se situe toujours au-dessous de 25°C

2. Dispositif pour la formation des biofilms

Afin de disposer de biofilms formés dans des conditions hydrauliques identiques, on utilise un bac de 400 L avec, des débits d'appoint et de purge quasi identiques, correspondants à 1,85 L/h (le facteur de concentration du circuit est alors négligeable), un ensemble de 12 tubes de 10 cm de long, montés en série, dans lesquels circule l'eau destinée à la consommation humaine, en circuit semi-ouvert, avec le débit de la pompe de recirculation réglé à 368 L/h. Les tubes sont immergés dans le bac de telle manière que l'on peut former des biofilms en eau quasi stagnante à l'extérieur des tubes, et des biofilms en eau circulante à l'intérieur des tubes (Fig. 1). Il est

important de noter qu'il n'y a pas d'insémination par des microorganismes (d'origine extérieure) ni de déchloration de l'eau (autre que celle qui se produit naturellement dans le dispositif).

Paramètre	Valeurs moyennes
Température (°C)	23
Conductivité (µS/cm) à 25 °C	516
pH	7,63
Turbidité (NFU)	0,15
T.H. – titre alcalimétrique complet (degré F)	24,5
Titre Alcalimétrique Complet (degré F)	18,5
Calcium (mg/L)	92,0
Magnésium (mg/L)	3,2
Sodium (mg/L)	7,7
Potassium (mg/L)	2,4
Hydrogénocarbonate (mg/l)	226,0
Sulfate (mg/L)	20,0
Chlorure (mg/L)	23,0
Nitrate (mg/L)	30,0
Carbone organique total (COT) (mg/L)	0,4

Tableau 1 : Paramètres de l'eau utilisé

Les tubes utilisés, d'un diamètre d'un demi-pouce, ont été choisis, en matériaux divers : intérieur caoutchouc/extérieur polyéthylène, polyéthylène BD, acier inoxydable austénitique, titane et cuivre. On a utilisé les tubes bicouches (extérieur en polyéthylène et intérieur en caoutchouc) et les tubes en polyéthylène afin de voir comment les biofilms se développent sur des matériaux nutritifs. Les tubes en acier inoxydable austénitique et en titane ont été choisis pour étudier leur formation sur des matériaux à la fois inertes en matière de corrosion, mais aussi non nutritifs et non toxiques pour les micro-organismes. Le cuivre a été testé pour son action plus ou moins bactéricide. De plus, lors de l'analyse, il ya des interférences avec les produits de corrosion et un ralentissement possible des colonisations.

Tout le dispositif a été placé dans une salle fermée, sans présence de lumière, pour éviter le développement d'algues.

Après une phase préliminaire de mise en place des biofilms, d'une durée de 2 mois, des prélèvements mensuels, puis plus espacés, de tous les tubes mentionnés ci-dessus ont été effectués ; on a donc pu suivre l'évolution du biofilm dans dix situations différentes, à savoir sur la partie interne et externe des 5 matériaux sélectionnés.

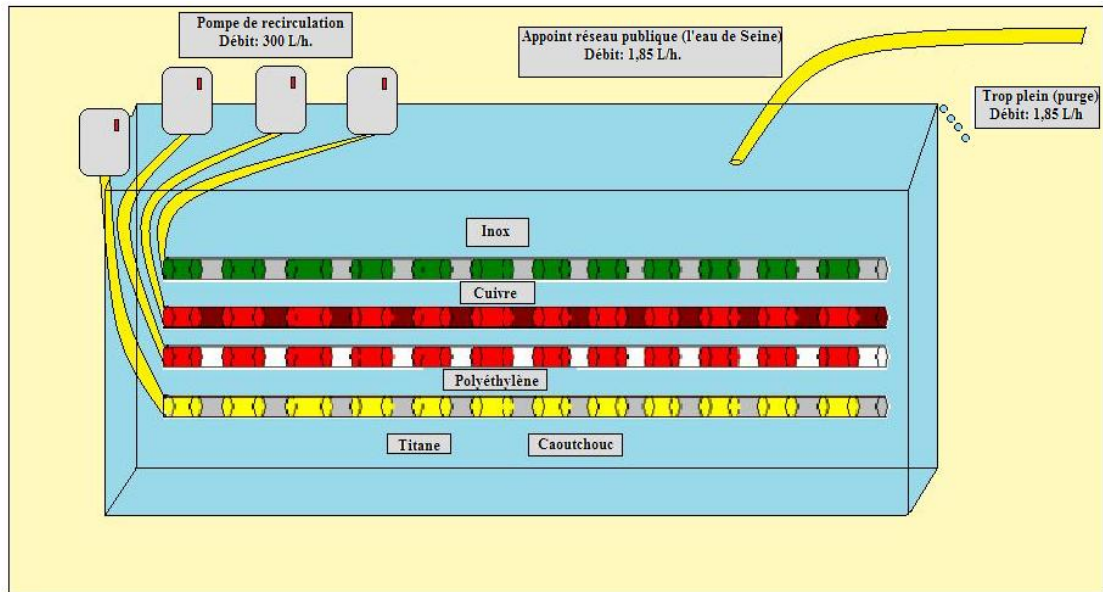


Fig. 1: Dispositif utilisé pour le développement de biofilms

3. Méthode d'analyse chimique des biofilms formés

Dans cette étude, on utilise la spectrométrie d'absorption infrarouge qui ne fait, dans son principe, aucune différence entre composés organiques et inorganiques. Elle voit seulement les mouvements (vibrations par exemple) des atomes les uns par rapport aux autres. L'intérêt est que les informations concernant les divers types de composés se trouvent être séparées, la fréquence dépendant de la masse des atomes aussi bien que de la longueur des liaisons. Ces informations peuvent être traitées indépendamment. Au-delà d'une approche qualitative, des mesures quantitatives sont possibles. Pour plus de détail on se reportera à la bibliographie [2]. [3]. [4]. Rappelons toutefois que, pour obtenir un spectre représentatif du biofilm étudié, il est nécessaire de faire le prélèvement de manière rigoureuse. La première opération consiste à procéder à un lavage du biofilm à l'eau déminéralisée, de manière à éliminer au maximum l'eau du réseau qui l'imbibe et les "sels" qu'elle contient. Un séchage modéré à l'étuve, de 30 min à 60°C, suffit alors à éliminer l'excès d'humidité sans dénaturer le produit à analyser. La seconde opération est le prélèvement proprement dit. Lorsque le biofilm est abondant, on peut utiliser une technique de micro-abrasion à l'aide de petits outils en acier inoxydable. S'il est invisible à l'œil nu, on procède par contact : du bromure de césium en poudre fine est frotté sur la surface et se pollue par le biofilm. C'est ce bromure enrichi en biofilm qui est alors analysé.

4. Obtention des spectres infrarouges

Les biofilms, après pastillage, sont analysés avec un spectromètre Perkin-Elmer *Spectrum BX* à transformée de Fourier, avec une résolution de 4 ou 8 cm^{-1} , en accumulant 120 spectres (conditions de routine). Tous les spectres sont enregistrés en mode absorbance, donnant ainsi une échelle linéaire pour les mesures quantitatives. L'appareil est équipé d'un système de réduction du trajet optique dans l'air afin de minimiser les perturbations liées à l'air ambiant (humidité, CO_2). Le dépouillement des spectres obtenus peut se heurter à diverses difficultés lorsqu'il y a interférence entre les bandes d'absorption de plusieurs produits. C'est pourquoi on peut, après enregistrement du spectre, rebroyer la pastille, puis la calciner à une température appropriée. Cette calcination peut avoir pour objet la transformation d'une substance peu visible en IR en une autre qui absorbe avec plus de netteté (par exemple les sulfures, qui peuvent être transformés en sulfates), ou bien l'élimination des matières organiques par calcination à 550°C en atmosphère oxydante. Après calcination on reconstitue une pastille, qui est passée dans les mêmes conditions dans le spectromètre. La figure 2 donne un exemple de spectres de biofilm obtenus avant et après calcination à 550°C .

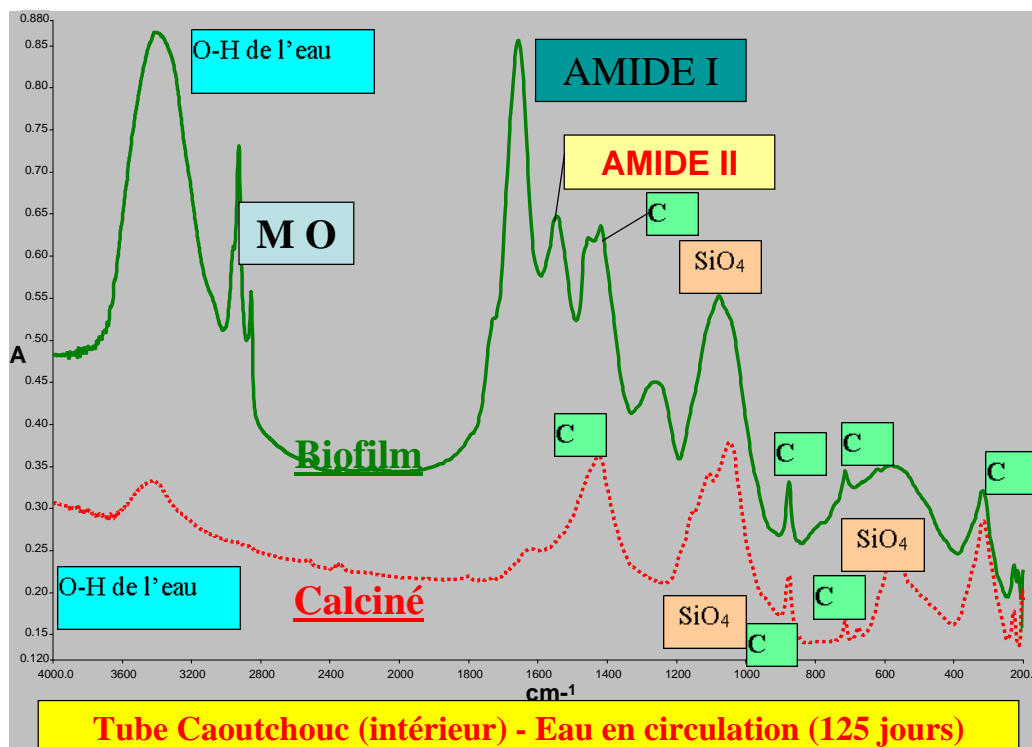


Fig.2: Exemple de spectres de biofilm, avant et après calcination de 30min à 550°C

Sur ces spectres, on visualise la matière organique (MO), les bandes amide I et II qui sont liées aux protéines présentes dans le biofilm (avant calcination) ainsi que différents minéraux : calcite repérée (C) et aluminosilicates et/ou phosphates repérés (SiO_4). L'eau, présente après calcination

correspond à la reprise par hygroscopie lors du second pastillage.) On vérifie, ainsi, que les biofilms ont, en plus de la matière organique, une importante composante minérale [4]. [5].

3. Etude bactériologie des biofilms

Les biofilms sont prélevés sur les mêmes tuyaux que ceux utilisés pour l'analyse chimique. Le décrochage par sonication et l'analyse du biofilm formé ont été effectués sur un prélèvement d'une petite section de tuyau de 10 cm de long.

• *Sonication*

Un cm du tuyau recouvert du biofilm à analyser est découpé à l'aide d'un bistouri stérile puis immergé dans 25 ml d'eau tryptone-sel. Le flacon contenant l'échantillon est ensuite mis sous ultrasons (240) deux fois deux minutes. Quelques millilitres de cette suspension sont ensuite mis en culture dans des boîtes de Pétri afin de réaliser un comptage des bactéries totales puis l'identification de certaines espèces par repiquage.

• *Culture des bactéries du biofilm*

La quantité de bactéries présentes dans le biofilm étant inconnue, il est nécessaire d'effectuer des dilutions en cascades d'une puissance de 10. Différents milieux sélectifs sont ensemencés à raison de 100 µl par boîte de Pétri contenant le milieu :

- Le milieu TS est ordinaire et permet le développement des germes non exigeants. C'est une gélose non sélective, qui ne contient pas d'indicateur coloré et dont le principal substrat est le glucose. Les milieux TS sont mis à 22°C.

- Le milieu R₂A, pour l'isolement des bactéries à croissance lente, a une faible concentration en extrait de levure, hydrolysate de caséine, peptone et glucose, permettant à un large éventail de bactéries de se développer sans que les bactéries à croissance rapide inhibent le développement des bactéries à croissance lente (comme c'est le cas pour des milieux plus riches en milieu nutritif, comme pour le TS). Les milieux R₂A sont mis à 30°C.

- Le milieu Drygalski est utilisé pour l'isolement des bactéries à gram négatif non exigeantes, il contient du désoxycholate de sodium qui inhibe la lecture de la plupart des bactéries à gram positif. Il contient un indicateur coloré de pH pour mettre en évidence l'acidification liée à une éventuelle utilisation du lactose par la bactérie. Les milieux Drygalski sont mis à 37°C.

• *Repiquage des colonies*

Afin d'isoler les souches à identifier, il est nécessaire de les repiquer sur un milieu TS stérile, avec la méthode par épuisement de l'inoculum.

● *Tests biochimiques*

Pour l'identification des bactéries de cette étude deux tests biochimiques ont été effectués : l'oxydase et la catalase.

- L'oxydase est un test essentiel pour orienter l'identification des bacilles et coques gram négatif.
- La catalase est un test fondamental pour orienter l'identification des bacilles et des coques gram positif.

● *Coloration de gram*

Ce test permet de caractériser la paroi bactérienne. (Violet de gentiane, Lugol, alcool, Fuchsine




- Bactéries Gram- colorées en rose.
- Bactéries Gram+ toujours colorées en violet.

● *Test de Hugh et Leifson*

C'est un milieu nutritif glucosé, contenant du bleu de bromothymol comme indicateur coloré, et permettant de différencier les bactéries se développant par voie fermentative ou oxydative, en aérobie ou en anaérobie.

● *Observation au microscope optique*

Une fois la coloration de gram terminée, l'observation permet de distinguer :

- les bactéries sphériques appelées coques, de 1 à 2 μm de diamètre ○
- les bactéries en forme de bâtonnets appelées bacilles de 1 à 10 μm ▭
- les bactéries incurvées appelées vibrions 
- les bactéries en forme de fuseau appelées fusiformes 
- les bactéries spirilles. 

● **Identification par galeries**

L'emploi de galeries API après une période d'incubation donnée permet l'identification de l'espèce des bactéries mises en évidence précédemment.

II – RÉSULTATS OBTENUS SUR DIVERS BIOFILMS

Ces résultats sont relatifs à une campagne d'obtention de biofilms d'une durée de 2 ans (toujours en cours) pour lesquels les analyses chimiques ont été faites, dans un premier temps, tous les mois du 2^{ème} mois au 6^{ème} mois.

2.1. Proportions entre matières organiques et produits minéraux

Dans le tableau 2, on a reporté les rapports d'absorbance des divers éléments caractéristiques des biofilms qui ont été formés à l'issue de 4 mois d'essai. L'eau étant le constituant majoritaire

des biofilms, les rapports matières organiques/eau, amide/eau, silicates/eau sont ainsi des indicateurs de l'importance du biofilm formé.

	M.O/eau	AmideI/eau	Al.Silicate/eau	M.O/Al.Silicate	Al.Silicate/AmideI
Caoutc - 130j	0,76	1,54	0,56	1,36	0,36
PE(ext) - 130j	0,70	1,56	0,62	1,14	0,40
Titane(int) - 130j	0,49	1,05	0,67	0,73	0,64
Titane(ext)- 130j	0,57	0,85	0,46	1,25	0,54
PE B.(int) - 130j	0,68	1,44	0,69	0,98	0,48
PE B.(ext) - 130j	1,18	1,88	0,44	2,67	0,24
Inox(int) - 131j	0,46	1,20	0,63	0,73	0,52
Inox(ext) - 131j	1,02	1,20	1,79	0,57	1,49

Tableau 2: Rapports d'absorbance des composants du biofilm après quatre mois.

On vérifie bien, sur le tableau 2, comme dans les études précédentes [4], que ce sont les matériaux nutritifs (caoutchouc, polyéthylène) qui donnent le plus de biofilm. De même on constate que les biofilms formés en écoulement sont plus stables et plus abondants que ceux qui sont formés en eau quasi-stagnante. Ces mesures de rapport d'absorbance permettent de suivre l'évolution des biofilms au cours du temps. La figure 3 montre cette évolution, pour trois paramètres, du biofilm formé en écoulement dans un tube en caoutchouc. La figure 4 donne le

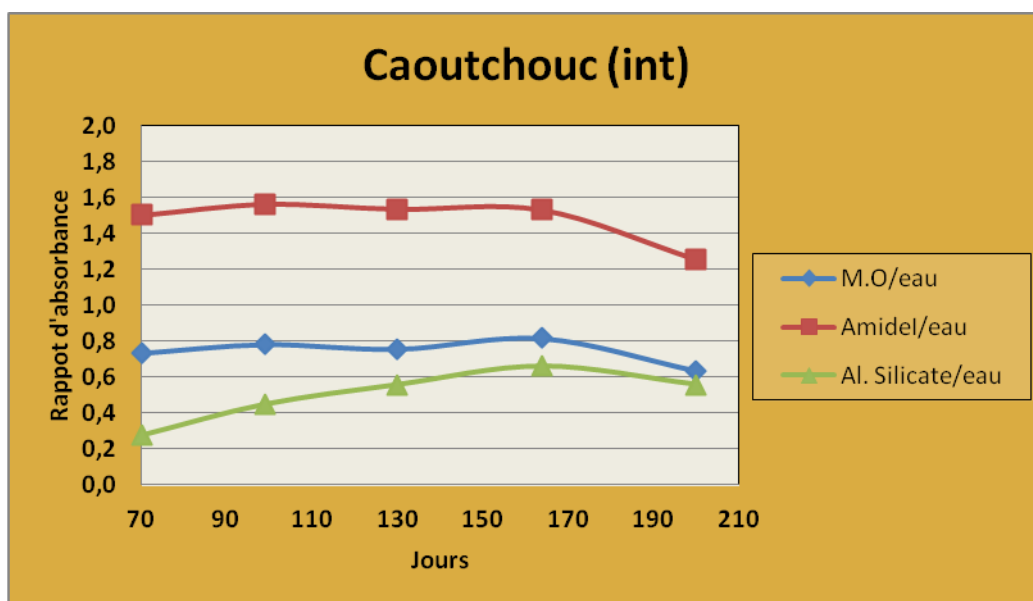


Fig.3: Evolution du biofilm à l'intérieur d'un tuyau en caoutchouc

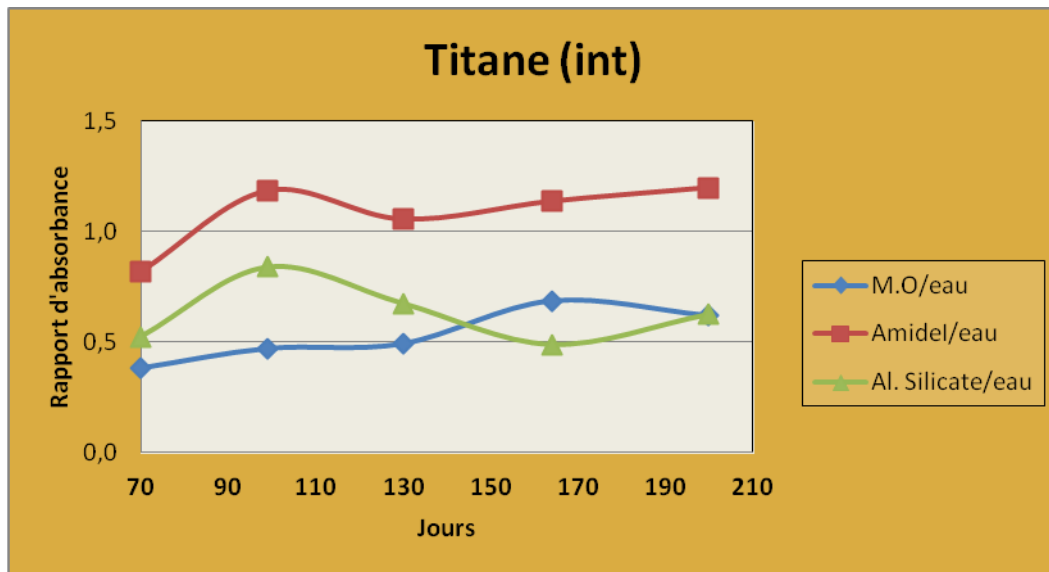


Fig.4: Evolution du biofilm à l'intérieur d'un tube en titane

même type de résultat pour le titane, matériau non nutritif. Les évolutions semblent légèrement différentes, mais compte-tenu de la précision des évaluations, on peut penser qu'il y a une certaine stabilité qui demandera à être confirmée à plus long terme. En ce qui concerne le cuivre, la présence de produits de corrosion perturbe la mise en place du biofilm et, en outre, empêche d'utiliser la même méthode de suivi. Cependant, on peut voir sur la figure 5 que la mise en place

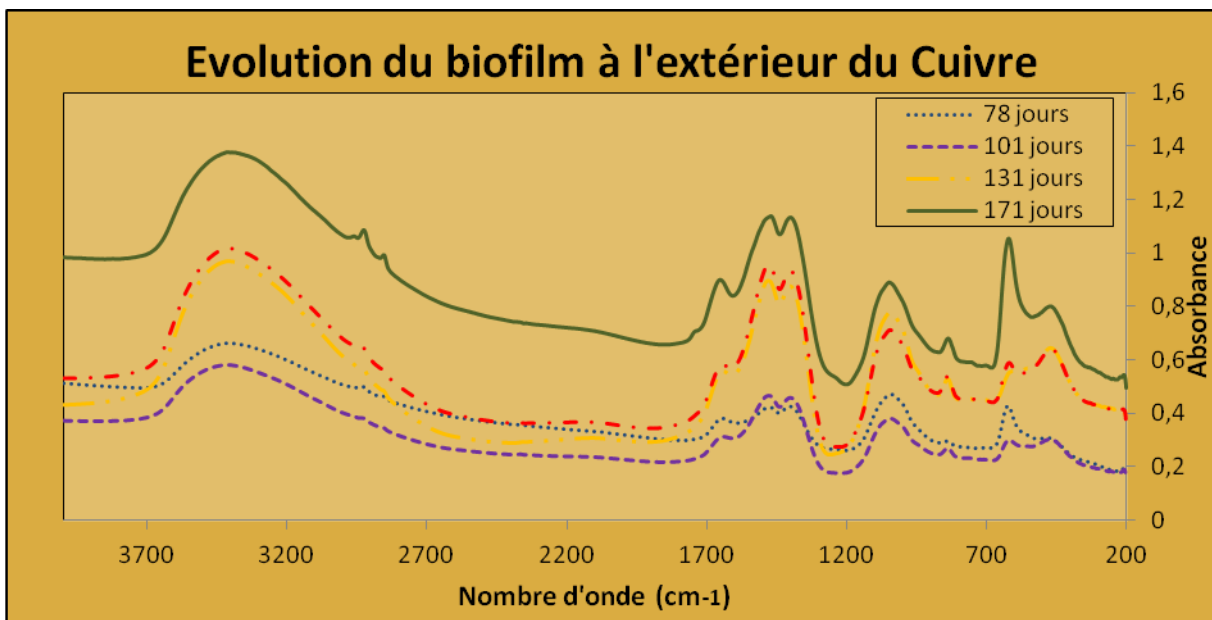


Fig.5: Spectres du biofilm formé à l'extérieur des tubes de Cuivre sur une période de 6 mois.

du biofilm est laborieuse et que les bandes de matières organiques et amide I n'apparaissent guère avant 6 mois.

2.2. Caractérisation de la flore bactérienne

La figure 6 montre une croissance rapide du biofilm à partir du 3^{ème} mois sur le tuyau en caoutchouc, dont on a montré qu'il était le matériau le plus nutritif. Ce phénomène de colonisation des parois de tuyaux par les bactéries est donc rapide dans un milieu qui, lui, est peu nutritif, puisqu'il s'agit d'eau potable chlorée.

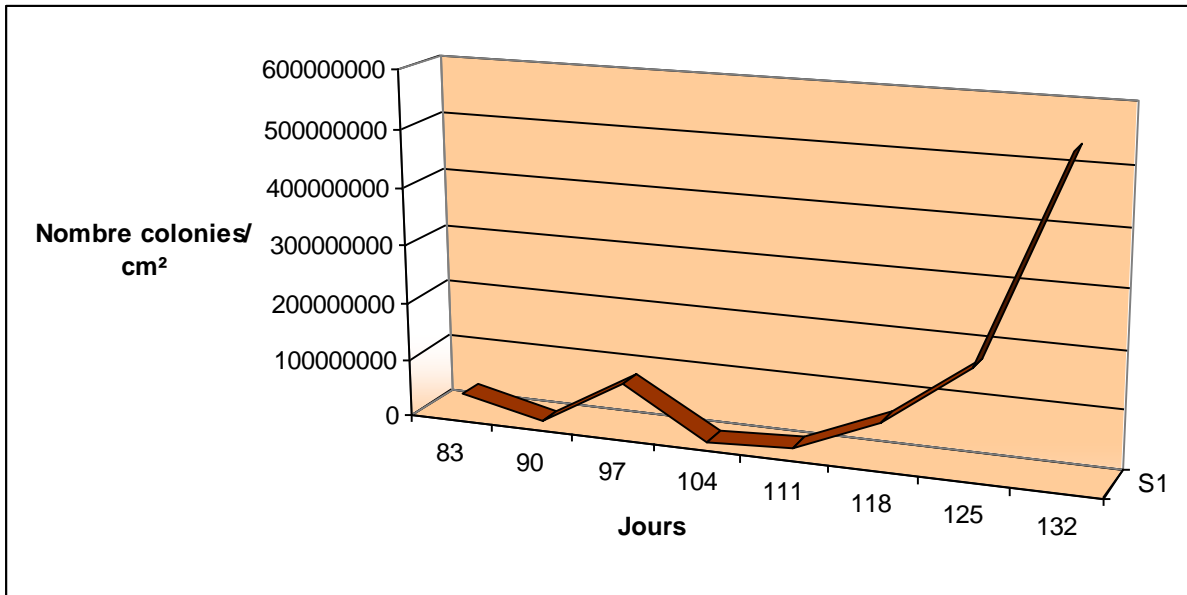


Figure 6: Cinétique de formation du biofilm sur un tuyau en caoutchouc durant les premières semaines de mise en eau

Cela prouve que le biofilm n'a pas besoin de beaucoup de nutriment pour se développer. On le vérifie en observant le dénombrement de la flore totale par cm² pour chacun des matériaux utilisés qui est reportée sur la figure 7. Même si la valeur trouvée pour l'acier inoxydable est suspecte, parce que très faible, on voit que tous les autres matériaux se colonisent sans problème, y compris le titane. Ceci en accord avec la bibliographie [6].

En ce qui concerne les espèces identifiées, les plus fréquentes qui sont isolées par les méthodes de culture traditionnelles, sont du type *pseudomonas* ou *sphingomonas*. Pour plus de détails on se reportera au tableau 3. Les espèces identifiées sont « normales » puisque faisant partie de la flore autotrophe des eaux de surface. Elles ne sont pas, bien entendu, pathogènes.

L'espèce la plus rencontrée lors de cette étude est *Pseudomonas fluorescens* : La plupart des *Pseudomonas* spp sont très ubiquitaires, isolées de l'environnement (eau, sol, poussières en suspension dans l'air et des végétaux). Les souches ubiquitaires ont généralement une très large versatilité nutritionnelle et peuvent vivre dans des niches écologiques très diverses

L'autre espèce identifiée est *Sphingomonas paucimobilis*. Elles ont pour habitat le milieu extérieur, mais elles sont également isolées lors de prélèvements cliniques et elles peuvent se comporter comme des bactéries pathogènes opportunistes.

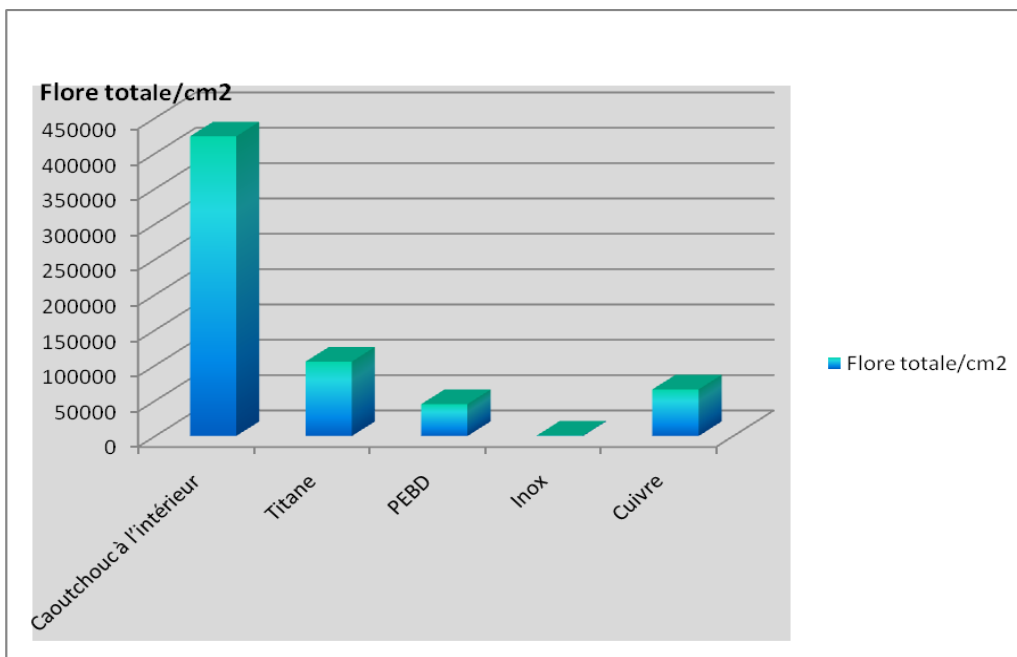


Figure 7 : Comparaison de la quantité de biofilm formée en fonction de la nature des matériaux.

Temps de séjour dans l'eau	Flore totale/cm ²	Colonies <i>Pseudo.</i> /cm ²	Surface de décrochage (cm ²)	Espèces bactériennes identifiées
83 jours	32,6. 10 ⁶	< 200	10,74	<i>Sphmon. paucimobilis</i> <i>Ps.fluorescens</i>
90 jours	0,98. 10 ⁶	< 200	12,56	<i>Sphmon. paucimobilis</i> <i>Ps.fluorescens</i>
97 jours	85. 10 ⁶	356	11,63	<i>Sphmon. paucimobilis</i> <i>Ps.fluorescens</i>
104 jours	0,34. 10 ⁶	0	12,56	<i>Sphmon. paucimobilis</i> <i>Ps.fluorescens</i>
111 jours	6,36.10 ⁶	/	12,56	<i>Sphmon. paucimobilis</i> <i>Ps.fluorescens</i>
118 jours	68,4.10 ⁶	/	12,56	<i>Sphmon. paucimobilis</i> <i>Ps.fluorescens</i>
125 jours	176.10 ⁶	0,18.10 ⁶	12,56	<i>Sphmon. paucimobilis</i> <i>Ps.fluorescens</i> <i>Steno. maltophilia</i>
132 jours	536.10 ⁶	3,02.10 ⁶	12,56	<i>Sphmon. paucimobilis</i> <i>Ps.fluorescens</i> <i>Steno. maltophilia</i>

Tableau 3 : Espèces identifiées du biofilm (tuyau en caoutchouc) au cours des premiers mois d'essai

2.2. Influence des milieux de culture sur la mise en évidence de la flore microbiologique des biofilms

La présence d'une flore dominante peut gêner la détection d'autres espèces, en quantités plus faibles ou bien encore inhiber leur culture en synthétisant des molécules toxiques (bactériocines). Pour mettre en évidence ces sous-populations, nous avons effectué un essai en utilisant une gélose TS additionnée d'Aztréonam, un antibiotique inhibant *P. aeruginosa*, mais peu actif sur la plupart des autres bacilles à Gram négatif oxydatifs. Ce milieu nous a permis d'isoler les espèces notées d'une * sur le tableau 4.

Les faibles concentrations en extrait de levure, hydrolysate de caséine, peptone et glucose (milieu de culture R2A) permettent à un large éventail de bactéries d'être cultivées sans que les bactéries à croissance rapide (*Pseudomonas*) inhibent le développement des bactéries à croissance lente (comme c'est le cas pour des milieux plus riches au niveau nutritif, comme par exemple le milieu TS).

L'expérience réalisée a révélée une différence significative sur les catégories de bactéries dénombrées avec le milieu R2A. Le type de bactéries isolées sur milieu R2A lors de cette étude est du genre Gram négatif, vivant dans l'environnement (eau douce, végétaux, poussières). Il peut donc être déduit que la flore bactérienne type *pseudomonas* n'est pas toujours prédominante sur le biofilm mais tend ainsi à l'envahir. Par ailleurs la flore totale ne semble qu'être très peu impactée par le milieu de culture (figure 8).

Matière	Flore totale/cm ²	Ufc/ml	Surface de décrochage (cm ²)	Espèces bactériennes identifiées
Caoutchouc à l'intérieur (TS)	3,7 10 ⁵	80010	5.33	<i>Burkhol cepacia</i> * <i>Ps.fluorescens</i>
Caoutchouc à l'intérieur (R2A)	3,7 10 ⁵	79525	5.33	<i>Sphmon.paucimobilis</i> <i>Chrysomonas luteola</i> * <i>Aer. salm. salmonicida</i>
Titane (TS)	1,0 10 ⁵	23800	5.65	<i>Brevun. Vesicularis</i> * <i>Chryso.indologene</i> * <i>Ps.fluorescens</i> <i>Chrysomonas luteola</i> *
Titane (R2A)	21475	5.65		<i>Chryso.indologene</i> * <i>Bacillus</i> <i>Aeromonas hydrophila/caviae</i>

Tableau 4 : Résultats de l'analyse du biofilm selon le milieu de culture R₂A et TS

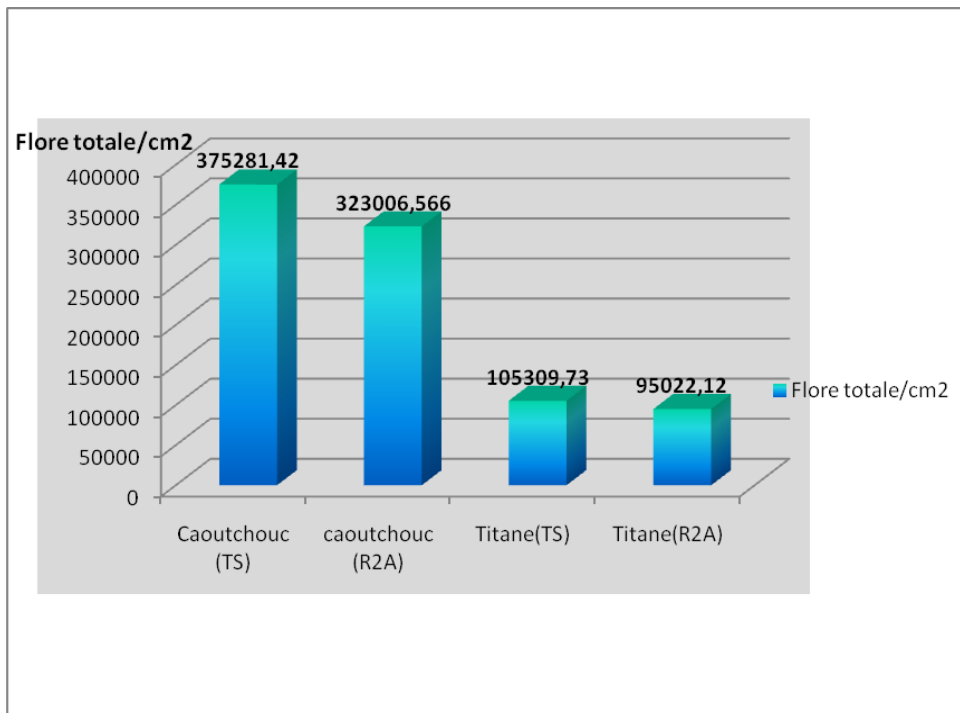


Figure 8: Comparaison de la quantité de biofilm formée en fonction du milieu de cultures utilisé

Les autres paramètres, pouvant influencer la croissance des biofilms ne doivent pas être négligés [7]. [8]. [9], mais dans cette étude il semble que leur rôle soit relativement secondaire.

III –DISCUSSION - CONCLUSION

Dans cette étude, en utilisant un bac de 150 litres d'eau destinée à la consommation humaine (réseau de Paris) et des portions de tuyaux de 20 cm de long, immergés et à l'intérieur desquels l'eau circule, on a pu obtenir des biofilms dans des temps relativement courts, sans faire appel à la moindre inoculation de bactéries d'origine extérieure. On a ainsi pu vérifier les résultats d'études préliminaires [4], à savoir que les biofilms, outre le développement bactérien, s'enrichissent progressivement en produits minéraux, essentiellement des phosphates et des silicates présents dans l'eau. Les cultures, effectuées sur différents milieux nutritifs, ont montré que cette flore bactérienne était relativement complexe, mais toujours constituée de bactéries autotrophes.

Par ailleurs, on a vérifié que la sonification d'une faible portion de tuyau (1 cm de long) était une bonne méthode pour décrocher le biofilm et analyser la population bactérienne qu'il contient. L'utilisation systématique de caoutchouc a pour avantage de favoriser largement, et rapidement, la formation des biofilms, ce qui permet d'obtenir des résultats suffisamment rapides. Parmi les autres matériaux, le titane, utilisé à cause de sa très grande inertie chimique vis-à-vis de l'eau, permet de développer le même type de biofilm, avec les mêmes espèces bactériennes et les mêmes composants minéraux. Ceci montre, que la nature du matériau est un

facteur secondaire dans la formation du biofilm, si ce matériau est inerte vis-à-vis de l'eau. En revanche un matériau comme le cuivre qui, de par l'émission d'ions cuivre dans l'eau, a des propriétés anti-bactériennes se colonise moins rapidement. Ceci se manifeste à court terme (quelques mois) par un ralentissement de la colonisation de sa surface, mais, à long terme, son comportement se rapproche de celui des autres matériaux, car sa surface s'enrichit également en divers produits minéraux. Les polyéthylènes ont un comportement proche de celui du caoutchouc, car ils semblent suffisamment nutritifs pour entraîner une colonisation rapide.

Les bactéries identifiées dans les biofilms formés sur les différents matériaux de l'expérience, appartiennent à la flore microbienne classique de l'eau, telle que : *Burkhol cepacia*, *Aeromonas hydrophila/caviae*, *Aeromonas salmonicida subsp salmonicida*. Ce sont des bacilles à Gram négatif (BGN), leur développement est ralenti généralement par des *pseudomonas* à développement rapide empêchant ainsi leur identification. Les *Pseudomonas* sont très présents dans les biofilms analysés, ce sont des bactéries autochtones de l'eau, elles se présentent sur milieu TS comme étant des colonies très collantes difficiles à décrocher, elles produisent du glycocalyx. Ce sont des bactéries peu exigeantes. Elles passent facilement d'un état planctonique à l'état lié. Ceci montre qu'il est difficile de dire quels sont les espèces dominantes dans le biofilm, celui-ci étant lui-même un milieu de culture qui évolue au cours du temps et qui est différent des milieux de culture de laboratoire.

D'autre part, la lecture de la courbe de comparaison temporelle nous permet de conclure que la quantité du biofilms évolue en fonction du temps, quel que soit le matériau utilisé. L'utilisation de bactéricides (chlore ou autres) ne peut ralentir la colonisation qu'au début du développement du biofilm. En effet, lorsque celui-ci s'est développé, la présence abondante de produits minéraux très stables, comme les phosphates et les silicates, limite les possibilités de désinfection.

Ainsi, d'une manière générale, il est pratiquement impossible de conserver une conduite d'eau ou un réservoir sans biofilm. En revanche il est plus aisé de maîtriser la croissance du biofilm et des moyens faciles à mettre en œuvre existent, à condition de les utiliser rapidement dès la mise en eau.

BIBLIOGRAPHIE

[1] Costerton, J.W., "[A Short History of the Development of the Biofilm Concept](#)," In : Microbial Biofilms, Ghannoum, M.A. and G. O'Toole (Eds.) ASM Press, Washington, DC, pp. 4-19 (2004).

[2] J. Lecomte, Spectroscopie dans l'infrarouge, Handbuch der Physik, XXVI, Springer Verlag, Berlin (1958)

- [3] J.P. Labbé, J. Lédion, F.Hui, Infrared spectrometry for solid phase analysis: Corrosion rusts, *Corrosion Science* 50 (2008) 1228-1234
- [4] - F.Hui, J.Lédion, G-P. Husson, Caractérisation de biofilms formés à partir d'eaux destinées à la consommation humaine, Journées CEOCOR 2009, Wien, (26-29 mai 2009, pp B03 ;1-17)
- [5] J.H. Thomassin and N. Merlet, 2002, "Relation entre la composition des eaux et la structure des biofilms : associations minéraux/bactéries", *JIE*, vol 33, tome 2, p.63-1.
- [6] Enkiri F., Legrand J.Y., Squinazi F., Ponelle J.C., Leroy P.2006. Evaluation de l'aptitude de six matériaux utilisés dans les installations de distribution d'eau à promouvoir la croissance bactérienne. *Eur.j.water qual.*, 37, Fasc. 2, 175-188
- [7] Habouzit F., Gevaudan G. et Bernet N. 2008, Influence de la rugosité et de la tension de surface de matériaux. 3^{ème} Journée Thématique Biofilms. Approche expérimentales et moléculaires. Réseau National Biofilm. Dourdan.
- [8] Boutaleb N., 2007, Etude de la formation de biofilms sur les surfaces de matériaux couramment utilisés dans les canalisations d'eau potable. Thèse pour l'obtention du grade de docteur de l'université de Bretagne- Sud, Mention : chimie.
- [9] Sheng X., Ting Y.P.,Pehkanen S.O..2008. The influence of ionic strength, nutrients and pH on bacteria adhesion to metals. *Journal of colloid and interface Science* 321, 256-264.