

Dédicace

A mes parents, HASSAN et ZAHRA;

A ma femme MARIEM;

A mon fils CHADI

A mes frères et sœurs ;

A tous ceux que je ne nomme pas ;

mais qui se reconnaîtront....

Remerciements

« La recherche est une école où l'on apprend l'importance du dialogue, de la confrontation des idées, du respect d'autrui (...). La démarche scientifique n'est pas seulement porteuse d'espoir pour la compréhension du monde qui nous entoure (...). Elle apporte aussi à ceux qui la pratiquent un enrichissement intellectuel et moral. »

Claude Cohen-Tannoudji.

C'est par cette pensée que j'adresse mes remerciements à mes chers professeurs Hassan LATRACHE, Mme Hafida ZAHIR, et Mr. Mostafa ELLOUALI pour m'avoir aidé à réaliser ce projet de doctorat et pour leurs conseils, leurs critiques constructives et leurs soutiens moraux et financiers dans mes moments de difficulté.

Mes remerciements s'adressent particulièrement à ma femme Maryem le meilleur soutien moral du monde et mon compagnon.

J'adresse mes remerciements à l'ensemble de mes chers collègues de l'équipes bioprocédés & bio-interfaces pour leur esprit d'ouverture, leur enthousiasme, leur disponibilité et leurs conseils de soutien.

A tous mes Amis, à tous mes chers frères et sœurs, je ne vous citerai pas tous, car nombreux vous êtes ! Vous qui avez toujours été à mes côtés, vous avec qui j'ai traversé cette période essentielle de ma vie, je vous dis infiniment merci.

Enfin, un infini merci à ma famille, à mon papa, à ma chère Maman, à tous mes frères et ma petite sœur qui m'ont soutenu durant toute ma carrière, et malgré la distance, ils étaient toujours à mes côtés.

Résumé

L'adhésion est la première étape du processus de formation d'un biofilm, la protection des eaux contre la contamination par les biofilms peut être envisagée par deux stratégies distinctes ; une stratégie préventive qui vise à empêcher leur formation qui se réalise généralement par le contrôle et la connaissance des facteurs environnementaux et l'utilisation du chlore, ou une stratégie curative qui consiste à les éradiquer après leur formation où des agents anti-biofilms sont utilisés. Cependant, ces stratégies n'assurent pas toujours une bonne qualité de l'eau pour les consommateurs. En effet, cela est due à une analyse non complète de tous les facteurs environnementaux et leurs interactions avec les microorganismes de l'eau et/ou une mauvaise évaluation de l'influence du chlore sur l'adhésion et l'état après adhésion des microorganismes. D'autre part, Les stratégies curatives sont coûteuses ce qui implique la nécessité de rechercher d'autres alternatives des agents anti-biofilms.

Deux souches pathogènes opportunistes ont été sélectionnées pour ce travail de thèse ; *Pseudomonas aeruginosa* et *Escherichia coli*. D'une part, *P. aeruginosa* a été sélectionné car il s'agit d'une bactérie pathogène opportuniste, naturellement insensible aux antibiotiques et qui provoque de nombreuses infections chez les gens et les plantes, en raison de sa présence naturelle dans la flore bactérienne de l'eau potable. En outre, elle est recommandée comme indicateur de traitement pour vérifier à la fois l'efficacité du traitement et celle de l'action désinfectante résiduelle (décret de 7 Avril 1981). D'autre part, *E. coli* a été sélectionné car c'est le principal indicateur de la contamination fécale de l'eau potable (Abberton et al. 2016).

Deux facteurs environnementaux ; la température et la composition chimique de l'eau ont été investigués pour leurs effets sur l'adhésion prédictive et expérimentale sur quelques matériaux utilisés en plomberie et en conditions dynamiques assurées par un dispositif conçu au laboratoire. En outre, ce travail de thèse présente des tests anti-biofilm d'hypochlorite de sodium (NaOCl) et du chlorure de sodium (NaCl) en tant que substance qui pourra être utilisée pour le traitement des canalisations de l'eau potable afin de limiter les risques sanitaires liés à l'hypochlorite de sodium.

En comparaison avec l'eau distillée, l'eau du robinet a eu un effet remarquable sur les propriétés de surface des souches bactériennes, notamment l'hydrophobicité et le caractère donneur d'électrons. Par conséquent, l'adhésion prédictive et expérimentale ont été influencé fortement par l'eau de robinet.

Par ailleurs, les résultats ont montré que l'augmentation de la température a provoqué des modifications considérables dans les énergies de surfaces des deux souches bactériennes. En effet, à des températures supérieures à 30°C, des niveaux élevés d'adhésion ont été observés.

L'hypochlorite de sodium (NaOCl) est connu comme étant la substance la plus célèbre pour le traitement des eaux potables. Les tests ont montré que NaOCl a pu inhiber l'adhésion d'*E. coli* mieux que *P. aeruginosa*. Cependant, les cellules adhérentes de *P. aeruginosa* ont été trouvées capables de se multiplier sauf que cette faculté a été influencée par les concentrations de NaOCl tandis que les cellules d'*E. coli* ont carrément perdu ce pouvoir.

Les biofilms des canalisations d'eau sont des structures difficiles à arracher et à éliminer, surtout que les traitements sont dirigés vers l'inactivation des microorganismes et non pas leurs biofilms. Par ailleurs, le chlorure de sodium (NaCl) est une substance connue depuis longtemps par son contribution aux propriétés organoleptiques et à la préservation de plusieurs aliments. Cependant, son effet sur l'arrachement des biofilms n'est pas encore étudié. En effet, les tests ont montré que NaCl a été merveilleusement efficace contre les biofilms de *P. aeruginosa* et *E. coli* alors que NaOCl n'a eu aucun effet sur ces biofilms. Ainsi, l'arrachage des biofilms a été complet après une heure de traitement par NaCl. En revanche, les cellules détachées commencent à ré-adhérer et forment des microcolonies.

MOTS-CLÉS : Eau, adhésion, conditions environnementales, physico-chimie de surface, théorie XDLVO, conditions dynamiques, hypochlorite de sodium, chlorure de sodium.

Abstract

Adhesion is the first step in the process of biofilm formation, the protection of water against biofilm contamination can be considered by two distinct strategies; a preventive strategy that aims to prevent their formation which is generally achieved by the control and knowledge of environmental factors and the use of chlorine, or a curative strategy that consists in eradicating them after their formation where anti-biofilm agents are used. However, these strategies do not always ensure good water quality for consumers. Indeed, this is due to a non complete analysis of all environmental factors and their interactions with the microorganisms in the water and/or a poor establishment of the influence of chlorine on the adhesion and post-adhesion state of the microorganisms. On the other hand, curative strategies are costly which implies the need to search for other alternatives of anti-biofilm agents.

Two opportunistic pathogenic strains were selected for this thesis work; *Pseudomonas aeruginosa* and *Escherichia coli*. On the one hand, *P. aeruginosa* was selected because it is an opportunistic pathogenic bacterium, naturally insensitive to antibiotics and causes many infections in people and plants, due to its natural presence in the bacterial flora of drinking water. In addition, it is recommended as an indicator of treatment to verify both the effectiveness of the treatment and that of the residual disinfectant action (Decree of April 7, 1981). On the other hand, *E. coli* was selected because it is the main indicator of fecal contamination of drinking water (Abberton et al. 2016).

Deux facteurs environnementaux ; la température et la composition chimique de l'eau ont été investigués pour leurs effets sur l'adhésion prédictive et expérimentale sur quelques matériaux utilisés en plomberie et en conditions dynamiques assurées par un dispositif conçu au laboratoire. En outre, ce travail de thèse présente des tests anti-biofilm d'hypochlorite de sodium (NaOCl) et du chlorure de sodium (NaCl) en tant que substance qui pourra être utilisée pour le traitement des canalisations de l'eau potable afin de limiter les risques sanitaires liés à l'hypochlorite de sodium.

Compared to distilled water, tap water had a remarkable effect on the surface properties of the bacterial strains, including hydrophobicity and electron donating character. As a result, predictive and experimental adhesion were strongly influenced by tap water.

Furthermore, the results showed that the increase in temperature caused considerable changes in the surface energies of the two bacterial strains. Indeed, at temperatures above 30°C, high levels of adhesion were observed.

Sodium hypochlorite (NaOCl) is known as the most famous substance for drinking water treatment. The tests showed that NaOCl was able to inhibit the adhesion of *E. coli* better than *P. aeruginosa*. However, the adhered *P. aeruginosa* cells were found to be able to multiply except that this ability was influenced by NaOCl concentrations while the *E. coli* cells lost this power altogether.

Biofilms in water pipes are difficult structures to remove, especially since treatments are directed at inactivating the microorganisms and not their biofilms. Sodium chloride (NaCl) has long been known for its contribution to the organoleptic properties and preservation of many foods. However, its effect on the removal of biofilms has not yet been studied. Indeed, tests have shown that NaCl was wonderfully effective against *P. aeruginosa* and *E. coli* biofilms while NaOCl had no effect on these biofilms. Thus, the removal of biofilms was complete after one hour of NaCl treatment. In contrast, the detached cells began to re-adhere and form microcolonies.

KEYWORDS : Drinking water, bioadhesion, environmental conditions, surface physico-chemistry, XDLVO theory, dynamic conditions, sodium hypochlorite, sodium chloride.

خلاصة

الالتصاق هو الخطوة الأولى في عملية تكوين الأغشية الحيوية، ويمكن حماية مياه الشرب من التلوث الناجم عن هاته الأغشية من خلال استراتيجيتين متميزتين: من خلال رصد ومعرفة العوامل البيئية واستخدام الكلور، أو من خلال استراتيجية علاجية للقضاء عليها باستخدام التداوير المضادة. ومع ذلك، فإن هذه الاستراتيجيات لا تضمن دائماً جودة مياه جيدة للمستهلكين. ويرجع ذلك إلى تحليل غير حصري لجميع العوامل البيئية وتفاعلاتها مع الكائنات الحية الدقيقة المائية و/أو إلى تحديد تأثير الكلور على التصاق الكائنات الحية الدقيقة وحالة ما بعد الالتصاق. من ناحية أخرى، فإن الاستراتيجيات العلاجية مكلفة، مما يعني الحاجة إلى البحث عن بدائل أخرى مضادة للأغشية الحيوية.

تم اختيار بكتيريتان لهذه الأطروحة وهما بالاساس *Pseudomonas aeruginosa* و *Escherichia coli*. تم اختيار *P. aeruginosa* لأنها بكتيريا مرضعة انتهازية، وغير حساسة بشكل طبيعي للمضادات الحيوية وتسبب العديد من الالتهابات للناس والنباتات، وذلك بسبب وجودها الطبيعي في مياه الشرب. وبالإضافة إلى ذلك، يوصى بها كمؤشر للتحقق من فعالية معالجة وتطهير المياه. وبالإضافة إلى ذلك، تم اختيار *E. coli* كمؤشر رئيسي عن تلوث مياه الشرب بواسطة فضلات الحيوانات.

تم فحص عاملان بيئيان؛ درجة الحرارة والتركيب الكيميائي للمياه لتأثيرهما على الالتصاق النظري والتجريبي على بعض المواد المستخدمة في السباكة وفي ظل ظروف ديناميكية يوفرها جهاز مصمم في المختبر. بالإضافة إلى ذلك، تقدم هذه الأطروحة اختبارات لهيبوكلوريت الصوديوم (NaOCl) وكلورور الصوديوم (NaCl) كمادة يمكن استخدامها لمعالجة أنابيب مياه الشرب للحد من المخاطر الصحية المرتبطة بالأغشية الحيوية.

بينت النتائج انه بالمقارنة مع المياه المقطرة، كان لمياه الصنبور تأثير ملحوظ على الخصائص السطحية للسلاطات البكتيرية، بما في ذلك خاصية النفور من الماء ومنح الإلكترونات. ونتيجة لذلك، تأثر الالتصاق النظري والتجريبي بشدة بماء الصنبور. علاوة على ذلك، أظهرت النتائج أن الزيادة في درجة الحرارة تسببت في تغيرات كبيرة في الطاقات السطحية لكنتا السلالتين البكتيريتين. زيادة على ذلك، لوحظت مستويات عالية من الالتصاق في درجات حرارة أعلى من 30 درجة مئوية.

يُعرف هيبوكلوريت الصوديوم (NaOCl) بأنه أشهر مادة لمعالجة مياه الشرب. أظهرت الاختبارات أن NaOCl كان قادراً على تثبيط التصاق *E. coli* بشكل أفضل من *P. aeruginosa*. ومع ذلك، تم العثور على الخلايا الملتصقة لـ *P. aeruginosa* قادرة على التكاثُر باستثناء أن هذه القدرة قد تأثرت بتركيزات NaOCl بينما فقدت خلايا *E. coli* قدرتها على التكاثُر تماماً.

إن أغشية أنابيب المياه الحيوية هي هياكل يصعب إزالتها والقضاء عليها، خاصة وأن العلاجات موجهة نحو تعطيل الكائنات الحية الدقيقة وليس أغشيتها الحيوية. يُعرف كلورور الصوديوم (NaCl) منذ فترة طويلة بمساهمته في الخصائص العضوية والحفاظ على العديد من الأطعمة في حين إن تأثيره على إزالة الأغشية الحيوية لم تتم دراسته بعد. أظهرت الاختبارات أن NaCl كان فعالاً بشكل رائع ضد غشاء *P. aeruginosa* و *E. coli* الحيوان، بينما لم يكن لـ NaOCl أي تأثير على هذه الأغشية الحيوية حيث اكتملت إزالة الأغشية الحيوية بعد ساعة واحدة من العلاج بواسطة NaCl. من ناحية أخرى، تبدأ الخلايا المنفصلة في إعادة الالتصاق وتشكيل مستعمرات صغيرة.

الكلمات الرئيسية: الماء، الالتصاق، الظروف البيئية، الفيزيائية السطحية، نظرية XDLVO، الظروف الديناميكية، هيبوكلوريت الصوديوم، كلوريد الصوديوم.

Table des matières

<i>Dédicace</i> -----	I
<i>Remerciements</i> -----	II
Résumé -----	III
Abstract -----	IV
خلاصة -----	V
Liste des figures -----	VI
Liste des tableaux -----	VII
Introduction générale : -----	1
Partie I : REVUE BIBLIOGRAPHIQUE -----	3
Chapitre 1 : Mécanismes et approches théoriques de l'adhésion microbienne -----	4
1. Introduction :-----	4
2. Théories de l'adhésion bactérienne :-----	5
2.1. Modèle conventionnel basé sur la théorie DLVO :-----	5
2.2. Approche thermodynamique et la théorie XDLVO :-----	7
2.3. Complexité de l'adhésion bactérienne réelle :-----	8
3. Conclusion :-----	9
Chapitre 2 : Facteurs influençant l'adhésion bactérienne dans les réseaux d'eau -----	11
1. Introduction :-----	11
2. Facteurs d'influence :-----	11
2.1. Matériaux de plomberie :-----	11
2.2. Température :-----	13
2.3. Vitesse d'eau :-----	14
2.4. Structure de la surface cellulaire :-----	15
3. Conclusion :-----	15
Chapitre 3 : Microorganismes dans les réseaux de distribution d'eau potable -----	16
1. Introduction :-----	16
2. Définition d'un biofilm :-----	17
3. Stages de développement d'un biofilm :-----	17
4. Biofilms des réseaux de distribution d'eau potables :-----	19
5. Sources de contamination des eaux des réseaux de distribution d'eau :-----	20
5.1. Différents problèmes liés au biofilms :-----	21
5.2. Pollution biologique :-----	22
5.3. Facteurs de survie des micro-organismes :-----	22
6. Contrôle du développement des biofilms des réseaux d'eau :-----	23

7.	Présence de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> dans les réseaux d'eau potable :-----	24
8.	Présence d' <i>Escherichia coli</i> dans les réseaux d'eau potable :-----	25
9.	Conclusion :-----	26
Chapitre 4 : Désinfection des réseaux de distribution d'eau -----		27
1.	Introduction :-----	27
2.	Désinfection et biofilms des réseaux d'eau :-----	28
3.	Résistance aux désinfectants :-----	29
4.	Sous-produits des désinfectants associés aux effets néfastes sur la santé humaine :-----	30
5.	Conclusion :-----	31
Objectif et contexte du travail -----		32
Partie II : TRAVAIL EXPERIMENTALE -----		34
A- Adhésion de <i>P. aeruginosa</i> et d'<i>E. coli</i> sur des matériaux couramment utilisés en canalisation d'eau -----		35
Chapitre 1 : Adhésion prédictive de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> et <i>Escherichia coli</i> sur des matériaux de plomberie en présence d'eau distillée et du robinet -----		36
<i>Résumé</i> :-----		36
1.	Introduction :-----	36
2.	Matériels et méthodes :-----	38
2.1.	Préparation des souches :-----	38
2.2.	Préparation des substrats solides :-----	39
2.3.	Caractérisation physicochimique des surfaces:-----	39
2.4.	Calcul des énergies libres d'adhésion en utilisant la théorie XDLVO :-----	39
3.	Résultats :-----	40
3.1.	Caractérisation physicochimique des surfaces bactériennes :-----	40
3.2.	Caractérisation physicochimique des surfaces de supports abiotiques :-----	42
3.3.	Adhésion prédictive de <i>P. aeruginosa</i> et <i>E. coli</i> aux supports :-----	42
4.	Discussion :-----	43
5.	Conclusion :-----	45
Chapitre 2 : Relation entre la composition chimique de l'eau potable et la capacité adhésive de <i>P. aeruginosa</i> et d'<i>E. coli</i> en conditions de turbulence -----		47
<i>Résumé</i> :-----		47
1.	Introduction :-----	47
2.	Matériel et méthodes :-----	49
2.1.	Préparation des suspensions bactériennes :-----	49
2.2.	Nettoyage des coupons :-----	49
2.3.	Exposition des bactéries et des supports aux eaux :-----	49
2.4.	Caractérisation physicochimique d'une surface :-----	49

2.5.	Expériences d'adhésion :-----	50
3.	Résultats-----	51
3.1.	Caractérisation physicochimique des surfaces des supports et des souches bactériennes :	51
3.2.	Effet de l'eau sur l'adhésion des souches bactériennes sur le verre, le PVC et l'acier inoxydable :-----	53
4.	Discussion :-----	54
5.	Conclusion :-----	57
Chapitre 3 : Influence de la température saisonnière sur les propriétés physicochimiques des cellules et l'adhésion en conditions dynamiques :-----		58
<i>Résumé</i> :-----		58
1.	Introduction :-----	58
2.	Matériel et méthodes :-----	59
2.1.	Préparation des suspensions bactériennes :-----	59
2.2.	Nettoyage des coupons :-----	60
2.3.	Caractérisation physicochimique des surfaces :-----	60
2.4.	Expériences d'adhésion :-----	61
3.	Résultats :-----	61
3.1.	Caractérisation physicochimique des surfaces des matériaux et des bactéries :-----	61
3.2.	Adhésion de <i>P. aeruginosa</i> ATCC27853 en conditions de turbulence :-----	62
4.	Discussion :-----	64
5.	Conclusion :-----	67
Chapitre 4 : Effet de la désinfection par le chlore sur l'adhésion et la cultivabilité post-adhésive de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> et <i>Escherichia coli</i>-----		69
<i>Résumé</i> :-----		69
1.	Introduction :-----	69
2.	Matériels et méthodes :-----	71
2.1.	Préparation des suspensions bactériennes :-----	71
2.2.	Nettoyage des surfaces de verre :-----	71
2.3.	Essais d'adhésion et révélation des résultats :-----	71
2.4.	Prise des photos par microscopie optique :-----	72
2.5.	Analyse statistique :-----	72
3.	Résultats :-----	72
3.1.	Effet du NaOCl sur l'adhésion des cellules :-----	72
3.2.	Effet du NaOCl sur la cultivabilité des cellules adhérentes :-----	74
4.	Discussion :-----	76
5.	Conclusion :-----	79
B.	Effet anti-biofilm de NaCl et NaOCl sur les biofilms formés par <i>P. aeruginosa</i> et <i>E. coli</i>---	80

Chapitre 1 : Recherche de la concentration efficace de NaCl contre les biofilms de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> et <i>Escherichia coli</i> :	81
<i>Résumé :</i>	81
1. Introduction :	81
2. Matériel et méthodes :	82
2.1. Préparation des suspensions bactériennes :	82
2.2. Préparation des lames de verre :	83
2.3. Caractérisation physicochimique d'une surface :	83
2.4. Formation des biofilms et traitement par NaCl et NaOCl :	84
3. Résultats :	85
3.1. Propriétés physicochimiques des souches en présence de NaCl :	85
3.2. Propriétés physicochimiques du verre en présence de NaCl :	86
3.3. Effet de NaCl sur les biofilms de <i>P. aeruginosa</i> et <i>E. coli</i> :	86
4. Discussion :	87
5. Conclusion :	89
Chapitre 2 : Comparaison de l'effet anti-biofilm de NaCl et NaOCl :	90
<i>Résumé :</i>	90
1. Introduction :	90
2. Matériel et méthodes :	92
2.1. Préparation des suspensions bactériennes :	92
2.2. Préparation des lames de verre :	93
2.3. Caractérisation physicochimique d'une surface :	93
2.4. Formation des biofilms et traitement par NaCl et NaOCl :	95
3. Résultats :	95
3.1. Caractérisation physicochimique des surfaces bactériennes et du verre :	95
3.2. Effet de NaCl sur le biofilm de <i>P. aeruginosa</i> et d' <i>E. coli</i> :	98
3.3. Pourcentage de la surface occupée par le biofilm de <i>P. aeruginosa</i> et d' <i>E. coli</i> :	102
4. Discussion :	102
5. Conclusion :	106
Chapitre 3 : Cinétique du comportement des biofilms de <i>P. aeruginosa</i> et d'<i>E. coli</i> en présence de NaCl :	108
<i>Résumé :</i>	108
1. Introduction :	108
2. Matériels et méthodes :	110
2.1. Préparation des suspensions bactériennes :	110
2.2. Préparation des lames de verre :	110

2.3.	Caractérisation physicochimique d'une surface :-----	110
2.4.	Formation des biofilms de <i>P. aeruginosa</i> et <i>E. coli</i> et traitement par NaCl : -----	111
3.	Résultats :-----	112
3.1.	Effet du NaCl sur les biofilms de <i>P. aeruginosa</i> et d' <i>E. coli</i> :-----	112
3.2.	Caractérisation physicochimique des surfaces du verre, de <i>P. aeruginosa</i> et d' <i>E. coli</i> :	113
4.	Discussion :-----	115
5.	Conclusion :-----	119
Conclusion et discussion générales et perspectives -----		121
Bibliographie -----		126

Liste des figures

Figure 1: Énergie totale d'interaction entre une cellule bactérienne et une surface en fonction de la force ionique.	5
Figure 2: Schémas du processus d'adhésion bactérienne. (A) processus d'adhésion habituel en deux étapes. (B) modèle d'adhésion en une étape médié par les nanofibres.	6
Figure 3: Les principales étapes de la formation d'un biofilm.	18
Figure 4: Les biofilms du système de traitement et de distribution.	20
Figure 5: Schéma du circuit d'eau conçu au laboratoire créant la turbulence.	50
Figure 6: Nombre de cellules adhérentes de <i>P. aeruginosa</i> pour chaque eau. Les barres d'erreur représentent les écarts types du comptage des bactéries.	53
Figure 7: Nombre de cellules d' <i>E. coli</i> adhérentes pour chaque eau. Les barres d'erreur représentent les écarts types du comptage des bactéries.	54
Figure 8: Corrélation entre l'adhésion et le caractère de donneur d'électrons d' <i>E. coli</i> et de <i>P. aeruginosa</i>	56
Figure 9: Corrélation entre l'adhésion et l'hydrophobicité quantitative d' <i>E. coli</i> et de <i>P. aeruginosa</i>	56
Figure 10: Nombres de bactéries <i>P. aeruginosa</i> adhérentes sur le verre, l'acier inoxydable et le PVC en fonction de la température.	63
Figure 11: Nombres de bactéries d' <i>E. coli</i> adhérentes sur le verre, l'acier inoxydable et le PVC en fonction de la température.	63
Figure 12: Corrélation exponentielle entre le nombre de bactéries <i>P. aeruginosa</i> adhérentes et la température.	64
Figure 13: Images d'adhésion de <i>P. aeruginosa</i> (x 400) après exposition aux différentes concentrations de NaOCl ; Témoin 0% (a), 0.025% (b), 0.05% (c), 0.075% (d), 0.1% (e), 0.125% (f), et 0.15% (g).	73
Figure 14: Images d'adhésion d' <i>E. coli</i> (x400) après exposition aux différentes concentrations de NaOCl ; Témoin 0% (a), 0.025% (b), 0.05% (c), 0.075% (d), 0.1% (e), 0.125% (f), et 0.15% (g). ...	74
Figure 15: Nombre de cellules adhérentes sur le verre en l'absence d'hypochlorite de sodium.	75
Figure 16: Cultivabilité des cellules adhérentes de <i>P. aeruginosa</i>	75
Figure 17: Cultivabilité des cellules adhérentes d' <i>E. coli</i>	76
Figure 18: Effet de différentes concentrations de NaCl sur le biofilm de <i>P. aeruginosa</i>	87
Figure 19: Effet de différentes concentrations de NaCl sur le biofilm de surface d' <i>E. coli</i>	87
Figure 20: Pourcentages (%) de la surface occupée par le biofilm de <i>P. aeruginosa</i> et d' <i>E. coli</i> après traitement par des concentrations croissantes de NaCl.	88
Figure 21: Images (x400) du biofilm de <i>P. aeruginosa</i> traité par NaCl (27,22 g/L) après 0 min (A) témoin, 6 min (B), 12 min (C), 18 min (D), 24 min (E), 30 min (F), 36 min (G), 42 min (H) et 48 min (I).	99
Figure 22: Images (x400) du biofilm de <i>P. aeruginosa</i> traité par NaOCl (0,002 g/L) après 0 min (A) témoin, 6 min (B), 12 min (C), 18 min (D), 24 min (E), 30 min (F), 36 min (G), 42 min (H) et 48 min (I).	100
Figure 23: Images (x400) du biofilm d' <i>E. coli</i> traité par NaCl (27,22 g/L) après 0 min (A) (témoin), 6 min (B), 12 min (C), 18 min (D), 24 min (E), 30 min (F), 36 min (G), 42 min (H) et 48 min (I).	101
Figure 24: Images (x400) du biofilm d' <i>E. coli</i> traité par NaOCl (0,002 g/L) après 0 min (A) (témoin), 6 min (B), 12 min (C), 18 min (D), 24 min (E), 30 min (F), 36 min (G), 42 min (H) et 48 min (I).	102

Figure 25. Pourcentages (%) de la surface occupée par le biofilm de <i>P. aeruginosa</i> au cours du temps (48 min) sous l'effet de NaCl (27.22g/L) et NaOCl (0.002 g/L).....	105
Figure 26. Pourcentage (%) de la surface occupée par le biofilm d' <i>E. coli</i> au cours du temps (48 min) sous l'effet de NaCl (27.22g/L) et NaOCl (0.002 g/L).....	105
Figure 27 : Cinétique du développement du biofilm de <i>P. aeruginosa</i> traité par NaCl.	112
Figure 28. Cinétique du développement du biofilm d' <i>E. coli</i> traité par NaCl.....	113
Figure 29. Cinétique du développement du pourcentage (%) de la surface occupée par les biofilms de <i>P. aeruginosa</i> et d' <i>E. coli</i>	117
Figure 30. Corrélation entre les énergies de surface du verre et le pourcentage de surface occupée par <i>P. aeruginosa</i> et <i>E. coli</i>	118

Liste des tableaux

Tableau 1: Caractéristiques énergétiques (mJ/m^2) des liquides purs utilisés pour mesurer les angles de contact selon Van der Mei and Busscher (1997).	39
Tableau 2: Caractérisation physicochimique des surfaces de <i>P. aeruginosa</i> et d' <i>E. coli</i> en suspension dans différents eaux. Les valeurs entre parenthèses () indiquent les écart-types.....	41
Tableau 3. Caractérisation physicochimique des matériaux de plomberie sélectionnés pour cette étude. Les valeurs entre parenthèses () indiquent les écart-types.	42
Tableau 4. Énergie libre totale ΔG^{Total} ($\text{mJ}\times\text{m}^{-2}$) d'adhésion théorique des souches aux matériaux de plomberie testés.	43
Tableau 5. Caractérisation physicochimique des surfaces des supports intacts et après immersion dans les deux eaux.....	52
Tableau 6. Caractérisation physicochimique des surfaces des souches après suspension dans les deux eaux.....	53
Tableau 7. Caractérisation physicochimique des surfaces du verre, de l'acier inoxydable, et du PVC.....	61
Tableau 8. Caractéristiques physicochimiques de surfaces de <i>P. aeruginosa</i> dans les quatre températures.....	62
Tableau 9: Caractéristiques physicochimiques de surfaces d' <i>E. coli</i> dans les quatre températures. 62	
Tableau 10. Effet de la température sur le pH de l'eau.	66
Tableau 14: Caractéristiques énergétiques (mJ/m^2) des liquides purs utilisés pour mesurer les angles de contact selon Van der Mei and Busscher (1997).	83
Tableau 11. Effet de NaCl sur les propriétés physicochimiques de surface de <i>P. aeruginosa</i>	85
Tableau 12. Effet de NaCl sur les propriétés physicochimiques de surface d' <i>E. coli</i>	85
Tableau 13: Effet de NaCl sur les propriétés physicochimique de la surface du verre.	86
Tableau 14: Caractéristiques énergétiques (mJ/m^2) des liquides purs utilisés pour mesurer les angles de contact selon Van der Mei and Busscher (1997).	94
Tableau 15: Propriétés physicochimiques de surface de <i>P. aeruginosa</i> sous effet de NaCl (27,2 g/L)	96
Tableau 16: Propriétés physicochimiques de surface d' <i>E. coli</i> sous effet de NaCl (27,2 g/L).....	96
Tableau 17: Propriétés physicochimiques de surface de <i>P. aeruginosa</i> sous effet de NaOCl (0,002 g/L).	96
Tableau 18: Propriétés physicochimiques de surface d' <i>E. coli</i> sous effet de NaOCl (0,002 g/L).	97
Tableau 19: Propriétés physicochimiques de la surface du verre sous effet de NaCl (27,2 g/L).	97
Tableau 20: Propriétés physico-chimiques de la surface du verre sous effet de NaOCl (0.002 g/L). 98	
Tableau 21. Cinétique du développement des propriétés de la surface de <i>P. aeruginosa</i> sous effet du NaCl (27,2 g/L).	114
Tableau 22. Cinétique du développement des propriétés de la surface d' <i>E. coli</i> sous effet du NaCl (27,2 g/L).....	114
Tableau 23. Cinétique du développement des propriétés de la surface du verre sous effet du NaCl (27,2 g/L).....	115

Introduction générale :

L'eau est la ressource la plus importante et est vitale pour toute vie sur terre. Le bien-être et le développement de notre société dépendent de la disponibilité de l'eau. La ressource la plus précieuse est parfois rare, parfois abondante et toujours très inégalement répartie.

Dans l'ancien temps, l'homme avait besoin d'eau pour boire, se laver, cuisiner, etc. Cependant, avec l'avancement de la civilisation, l'utilité de l'eau a énormément augmenté. L'eau est un bon vecteur de maladies et de germes, et peut être responsable des maladies d'origine hydrique. Par conséquent, l'eau qui est requise par le public devrait être saine et exempte d'agents pathogènes (World Health Organization 2007).

Les maladies d'origine hydrique se répartissent en cinq catégories, selon la nature des organismes qui causent la maladie ; les bactéries, les protozoaires, les vers, les virus et les champignons. Les maladies d'origines hydriques sont généralement la fièvre typhoïde, la fièvre paratyphoïde, la dysenterie la dysenterie bacillaire et le choléra. Il est donc très important que les traitements des eaux éliminent les bactéries de l'eau et la rendre saine.

Les produits chimiques utilisés pour la désinfection sont généralement des composés chlorés (World Health Organization 2007). En revanche, le monde microbien développe toujours des résistances contre les produits de traitement, d'où l'adhésion et la formation de biofilms.

La formation d'un biofilm, sauf exceptions, est un phénomène rencontré sur la majorité des matériaux en présence d'humidité. Sa présence dans divers domaines (industriel, médical, environnemental...) entraîne souvent des conséquences indésirables et de plus en plus souvent identifiées comme la source récurrente de problèmes souvent lourds de conséquences et parfois dramatiques. Les réseaux de distribution d'eau potable sont, comme ces environnements aqueux, colonisables par les biofilms du fait de la simple adhésion initiale de microorganismes, ce qui constitue pour eux une forme de résistance contre les agressions physiques (forces de cisaillements, absence de lumière...) ou chimiques (présence d'agents biocide circulant, faible concentration en éléments nutritifs ...). Ces biofilms consistent le plus souvent en une association de plusieurs espèces : bactéries, champignons, algues, protozoaires, contenues au sein de dépôts de débris particuliers et de produits de corrosion. L'origine de ces microorganismes est souvent mal cernée. Ils peuvent à la fois être d'origine interne (microorganismes qui ont pu échapper au traitement de désinfection d'eau) ou d'origine externe (par retour d'eau lors de travaux et intervention sur le réseau, à travers des fissurations dues au vieillissement des conduites, ou à travers des orifices mal protégés).

Dans le secteur des eaux potables, différents problèmes peuvent être reliés à la formation et au développement d'un biofilm sur les parois des canalisations d'eau potable. En effet, des phénomènes d'arrachage depuis le biofilm développé sur les parois internes des canalisations, peuvent alors avoir lieu et être l'origine d'une remise en solution de microorganismes, et donc d'une contamination microbiologique du réseau et beaucoup d'autres problèmes économiques (Gilbert 2003; Byun *et al.* 2007).

Dans une première partie bibliographique, nous rappellerons les mécanismes et les interactions qui interviennent dans le phénomène d'adhésion, les différentes approches physico-chimiques qui permettent de comprendre et de prédire l'adhésion, ainsi que les différents facteurs physiques et chimique influencent l'adhésion dans les systèmes d'eau potable. Ensuite, nous exposerons la désinfection de l'eau potable par l'hypochlorite de sodium et ses répercussions. Dans une deuxième partie expérimentale, - mené dans des conditions de « turbulence » - nous déterminerons d'abord les changements causés par quelques facteurs environnementaux comme la composition chimique de l'eau et la température sur les propriétés physicochimiques de surface bactérienne à savoir l'hydrophobie, le caractère donneur/accepteur d'électrons et la charge électrostatique ainsi que l'adhésion sur quelques matériaux de plomberie. D'autre part, nous testerons l'effet de l'hypochlorite de sodium (NaOCl) sur l'adhésion et la "viabilité-cultivabilité" des cellules adhérees. Finalement, nous nous sommes intéressés à tester le chlorure de sodium pour son effet détachant et désorganisant des biofilms de *P. aeruginosa* et *E. coli* au cours du temps.

Partie I : REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

Chapitre 1 : Mécanismes et approches théoriques de l'adhésion microbienne

1. Introduction :

L'adhésion microbienne est l'étape initiale de la colonisation et de la formation d'un biofilm. Les biofilms peuvent être nuisibles à la fois à la vie humaine et aux processus industriels :

- En provoquant infection associée aux implants médicaux (Dankert 1986),
- Interaction des agents pathogènes avec les cellules hôtes (Soto & Hultgren 1999),
- Parodontite ou carie dentaire (Quirynen & Bollen 1995; Marsh *et al.* 2009),
- Contamination des aliments par les équipements de transformation (Notermans *et al.* 1991),
- Renforcement de la corrosion des métaux (Tanji *et al.* 1999),
- Formation de biofilms marins sur les coques de navires (Cooksey & Wigglesworth-Cooksey 1995), etc.

Cependant, l'adhésion microbienne peut également être bénéfique, par exemple :

- Dans la dégradation de produits chimiques dangereux pour l'environnement dans le sol (Bouwer & Zehnder 1993; Macdonald *et al.* 1993) ou Dans les bioréacteurs pour le traitement des eaux usées (Marjaka *et al.* 2003) ou le traitement des effluents gazeux (Hori *et al.* 2001),
- Dans les utilisations agricoles des bactéries de nodules racinaires dans la rhizosphère (Espinosa-Urgel *et al.* 2000),
- Dans la dégradation des biopolymères tels que la cellulose (Rakotoarivonina *et al.* 2002),
- Dans les biofloculants utilisés pour la séparation des particules de charbon (Raichur *et al.* 1996).

Par conséquent, il y a deux objectifs opposés pour le contrôle de l'adhésion microbienne et de la formation de biofilms : l'un est la prévention et l'inhibition des biofilms et l'autre est leur amélioration et leur promotion. Le développement de matériaux et de technologies pour la modification et le traitement des surfaces est souhaité pour contrôler l'adhésion microbienne et la formation de biofilms. À cette fin, il est nécessaire d'élucider les mécanismes qui sous-tendent l'adhésion microbienne. Dans ce chapitre, les théories de l'adhésion bactérienne sont exposées sur la base de deux approches physico-chimiques, la théorie Derjaguin Landau-

Verwey-Overbeek (DLVO) et l'approche thermodynamique, puis la complexité du processus d'adhésion des bactéries réelles est décrite. Ensuite, les structures de surface des cellules bactériennes sont présentées pour mieux comprendre le mécanisme moléculaire de l'adhésion des bactéries, car elles jouent un rôle important dans le processus d'adhésion à l'échelle nanométrique.

2. Théories de l'adhésion bactérienne :

2.1. Modèle conventionnel basé sur la théorie DLVO :

Parmi les microorganismes, les bactéries sont les principaux constituants des biofilms et ont une taille d'environ 0,5 à 2 nm, soit presque celle des particules colloïdales. Par conséquent, l'adhésion bactérienne a été décrite par la théorie DLVO (Marshall *et al.* 1971), qui décrivait à l'origine l'interaction d'une particule colloïdale avec une surface. Selon cette théorie, l'interaction totale entre une surface et une particule est la somme de leurs interactions de Van der Waals et de Coulomb (Hiemenz & Rajagopalan 2016). Comme la force d'attraction de Van der Waals est dominante au voisinage d'une surface, les particules ne peuvent pas se séparer de la surface par brownian motion, et donc y adhérer de manière irréversible. En revanche, l'interaction de Coulomb devient dominante à distance de la surface car la force de van der Waals diminue fortement avec la distance.

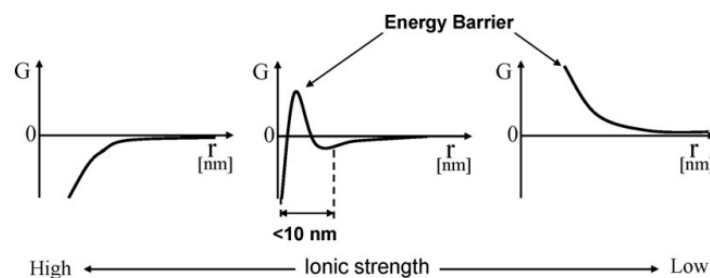


Figure 1: Énergie totale d'interaction entre une cellule bactérienne et une surface en fonction de la force ionique.

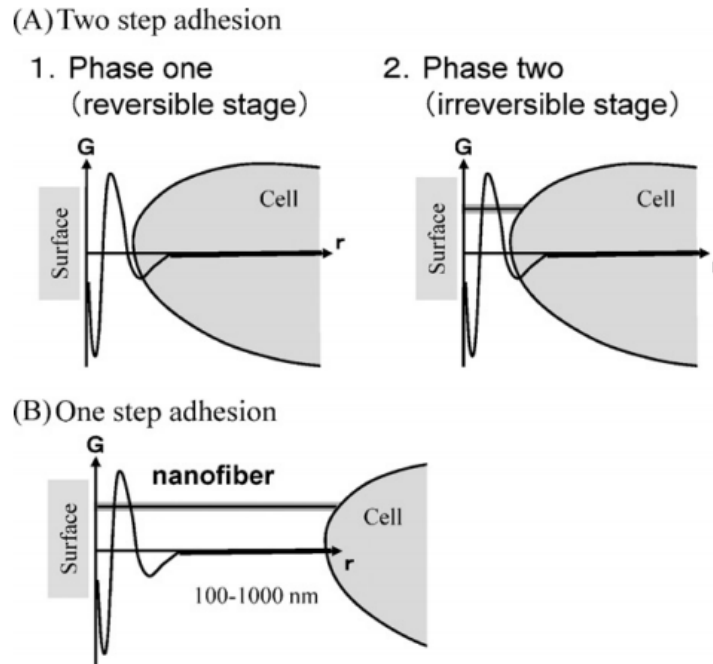


Figure 2: Schémas du processus d'adhésion bactérienne. (A) processus d'adhésion habituel en deux étapes. (B) modèle d'adhésion en une étape médié par les nanofibres.

En présence d'une particule chargée dans une solution aqueuse, les contre-ions contre la charge de surface sont attirés par la particule, formant ainsi une double couche électrique. Comme les bactéries et les surfaces naturelles en solution aqueuse sont généralement chargées négativement (van Loosdrecht *et al.* 1989), l'énergie électrostatique répulsive est causée par le chevauchement des doubles couches électriques des cellules bactériennes et du substrat (!!! INVALID CITATION !!! (Marshall *et al.* 1971; Van Loosdrecht *et al.* 1987a; van Loosdrecht *et al.* 1989; Bos *et al.* 1999; Ong *et al.* 1999)). Cette énergie répulsive augmente lorsque la force ionique d'une solution aqueuse diminue, car le blindage des charges de surface par les ions dans les doubles couches électriques diminue. À faible force ionique, lorsqu'une cellule bactérienne s'approche d'une surface, il y a une barrière d'énergie que les cellules bactériennes ne peuvent pas surmonter en nageant ou en faisant des mouvements browniens (Marshall *et al.* 1971; Jones & Isaacson 1982; Quirynen & Bollen 1995). Dans ces conditions, il y a un minimum d'énergie secondaire peu profond en dehors de la barrière énergétique. La distance entre la surface et le minimum d'énergie secondaire est généralement de plusieurs nanomètres, en fonction de la force ionique. Dans la première étape de l'adhésion cellulaire, une cellule bactérienne arrive à cette position par sa motilité ou mouvement brownien, et adhère à la surface de façon réversible (Figure 2). Dans l'étape suivante, la cellule bactérienne utilise des nanofibres, telles que les pili et les flagelles, ou produit des substances exopolymères (EPS), qui peuvent percer la barrière énergétique grâce à leurs petits rayons, pour faire le pont entre

la cellule et la surface. Cependant, lorsque la barrière énergétique s'éloigne du substrat à des forces ioniques plus faibles, il devient difficile pour les nanofibres et les EPS d'atteindre le substrat, et les cellules bactériennes deviennent incapables d'y adhérer. Au contraire, à des forces ioniques élevées, la barrière énergétique disparaît et les cellules bactériennes atteignent facilement et rapidement une adhérence irréversible. De nombreux chercheurs ont trouvé un lien entre la diminution de l'adhésion bactérienne et la diminution de la force ionique, ce qui est conforme à la théorie du DLVO (Bolster *et al.* 2001; Abu-Lail & Camesano 2003).

2.2.Approche thermodynamique et la théorie XDLVO :

L'approche thermodynamique est basée sur les énergies libres des surfaces en interaction (D.R. Absolom *et al.* 1983 ; H.J. Busscher *et al.* 1984), qui sont calculées à l'aide de l'équation suivante:

$$\Delta G_{adh} = \gamma_{sm} - \gamma_{sl} - \gamma_{ml} \quad (1)$$

Où sm , sl et ml sont respectivement les énergies libres interfaciales solide-microorganisme, solide-liquide et microorganisme-liquide. L'adhésion est favorisée si l'énergie libre est négative du fait de l'adhésion. Cependant, il convient de noter que la thermodynamique suppose principalement que le processus est réversible, ce qui n'est souvent pas le cas (Hermansson & Biointerfaces 1999). Sur la base de la théorie DLVO, l'adhésion bactérienne a été décrite comme un processus à deux phases, comprenant une phase physique initiale, instantanée et réversible (phase un) et une phase moléculaire et cellulaire dépendant du temps et irréversible (phase deux) (An & Friedman 1998). Cependant, l'approche thermodynamique ne peut pas être appliquée à l'adhésion en phase un au minimum d'énergie secondaire, où une nouvelle interface cellule-substrat n'est pas formée (Hermansson & Biointerfaces 1999; Katsikogianni & Missirlis 2004). Ainsi, l'approche thermodynamique, dans laquelle la formation d'une nouvelle interface cellule-substrat au détriment des interfaces substrat-moyen et cellule-moyen est calculée, contraste avec la théorie DLVO, dans laquelle l'énergie d'interaction dépend de la distance. Cependant, l'approche thermodynamique permet d'expliquer une observation commune : les bactéries ayant une surface cellulaire hydrophobe préfèrent les surfaces de matériaux hydrophobes ; celles ayant une surface cellulaire hydrophile préfèrent les surfaces hydrophiles (phase deux) (An & Friedman 1998).

De toute évidence, l'hydrophobie est un facteur important qui affecte grandement l'adhésion des bactéries et l'auto-agglutination des cellules bactériennes (An & Friedman 1998; Olofsson *et al.* 1998; Katsikogianni & Missirlis 2004). L'interaction hydrophobe entre deux fragments apolaires immergés dans l'eau est la seule conséquence de l'énergie de cohésion des molécules

d'eau entourant ces fragments qui lie l'hydrogène (Van Oss & Biointerfaces 1995). La liaison hydrogène peut être considérée comme une forme d'interaction plus générale donneur/accepteur d'électrons, à savoir les interactions de Lewis acide-base (Van Oss 1991). Selon van Oss *et al.* (1987), la tension superficielle (γ) se compose du composant LW de Lifshitz-Van der Waals et du composant AB acide-base de Lewis. Le composant LW comprend la force de dispersion de Londres, la force dipôle-dipôle de Keesom et la force dipôle induite par le dipôle de Debye. Monsieur Van Oss a développé la théorie DLVO étendue (XDLVO), dans laquelle les interactions hydrophobes/hydrophiles et l'interaction osmotique sont également incluses (Van Oss 1989; Van Oss *et al.* 1993). Comme l'interaction osmotique est négligeable en ce qui concerne l'adhésion bactérienne, l'énergie totale d'adhésion peut être exprimée comme suit :

$$\Delta G^{adh} = \Delta G^{vdw} + \Delta G^{dl} + \Delta G^{AB} \quad (2)$$

Où ΔG^{vdw} est l'interaction Lifshitz-van der Waals, ΔG^{dl} est l'interaction électrique à double couche, et ΔG^{AB} concerne les interactions acide-base. Ce dernier élément introduit une composante qui, en principe, décrit des interactions hydrophobes attrayantes et des effets d'hydratation répulsifs. L'influence des interactions acide-base est énorme par rapport aux interactions électrostatiques et de Lifshitz-van der Waals. Dans certains cas, la théorie XDLVO semble prédire qualitativement les résultats expérimentaux d'adhésion mieux que la théorie DLVO classique ; la théorie XDLVO prédit une très forte interaction due aux interactions acide-base conduisant à un minimum extrêmement profond sans barrière énergétique, alors que l'adhésion ne devrait pas se produire selon la théorie DLVO classique (Meinders *et al.* 1995; Hermansson & Biointerfaces 1999; Ong *et al.* 1999). Cependant, la dépendance à la distance des interactions acide-base est également relativement courte. Les interactions acide-base et l'interaction électrique double couche diminuent de façon exponentielle par rapport à la valeur au contact étroit (Van Oss *et al.* 1993), et les calculs ont montré qu'une distance entre les surfaces en interaction de moins de 5 nm est nécessaire avant que les interactions acide-base puissent devenir opérationnelles (Ong *et al.* 1999).

2.3. Complexité de l'adhésion bactérienne réelle :

L'adhésion bactérienne réelle est un processus extrêmement compliqué et s'écarte fréquemment des modèles d'adhésion décrits ci-dessus. Habituellement, les matériaux solides dans divers environnements n'exposent pas les surfaces nues, et diverses matières organiques et inorganiques s'adsorbent sur les surfaces avant que les micro-organismes n'adhèrent, formant des couches appelées films de conditionnement (Schneider *et al.* 1994; Ong *et al.*

1999; Brading *et al.* 2003). Les propriétés physicochimiques des films de conditionnement sont très différentes des surfaces nues d'origine, et les interactions des micro-organismes avec les films de conditionnement diffèrent également en conséquence (Schneider & science 1996). Ceci doit être pris en considération lors du développement de matériaux qui empêchent la formation de biofilms.

Contrairement aux simples particules colloïdales, une surface bactérienne est structurellement et chimiquement hétérogène. Par exemple, les bactéries Gram-négatives ont une membrane externe constituée d'une bicouche lipidique contenant un lipopolysaccharide (LPS) à la couche externe de la membrane externe avec des variations significatives dans la densité de couverture et la distribution locale (Kotra *et al.* 1999; Walker *et al.* 2004; Atabek & Camesano 2007). Différents types de protéines de la membrane externe sont incorporés de manière hétérogène dans la membrane externe et beaucoup d'entre eux font saillie hors des cellules, se transformant en appendices cellulaires. Les pili et les flagelles sont des appendices cellulaires typiques, d'une longueur allant de centaines de nanomètres à plusieurs micromètres, formant de longues structures fibreuses d'un diamètre de plusieurs nanomètres à des dizaines de nanomètres. Ces nanofibres bactériennes non seulement percent la barrière énergétique décrite par la théorie DLVO et/ou attachent un corps cellulaire à des surfaces, mais provoquent également une déviation du comportement d'adhésion cellulaire par rapport à celui prédit par la théorie DLVO. En outre, bien que différentes structures sur une même cellule contribuent individuellement au caractère net de la cellule, elles sont souvent décrites en termes de leur contribution combinée aux propriétés cellulaires globales. Une partie hydrophobe localisée au niveau d'une nanofibre bactérienne contre la surface hydrophile de la cellule principale oriente spécifiquement la cellule à l'interface.

3. Conclusion :

La théorie DLVO et l'approche thermodynamique sont à la base des aspects physico-chimiques de l'adhésion bactérienne. Le modèle simple de l'adhésion bactérienne peut être décrit en appliquant le potentiel de surface des cellules bactériennes obtenu à partir de la théorie des particules molles d'Oshima à la théorie DLVO étendue. Cette information est importante et utile pour le contrôle de l'adhésion bactérienne et de la formation de biofilms, comme décrit en ce qui concerne la modification de surface et les méthodes électro-assistées. Les appendices cellulaires fonctionnent non seulement comme des ponts entre les cellules et les surfaces dans les modèles d'adhésion conventionnels, mais provoquent aussi parfois la déviation de l'adhésion cellulaire réelle par rapport aux modèles. Les informations

moléculaires sur les appendices des cellules bactériennes qui servent de médiateurs à l'adhésion cellulaire sont de plus en plus nombreuses. Si les structures moléculaires détaillées responsables de la force d'adhésion et des interactions individuelles entre les sites responsables des appendices et des surfaces adhésives sont élucidées à l'avenir, cela permettrait de mettre au point de nouvelles méthodes pour le contrôle de l'adhésion bactérienne et des biofilms.

Chapitre 2 : Facteurs influençant l'adhésion bactérienne dans les réseaux d'eau

1. Introduction :

L'adhésion des microorganismes est une caractéristique écologique commune. L'adhésion de surface et le développement de biofilms est une stratégie de survie employée par pratiquement toutes les bactéries et affinée sur des millions d'années (Dunne Jr 2002). Divers matériaux organiques et inorganiques ainsi que des méthodes sont utilisés pour l'immobilisation des microorganismes. L'adhésion microbienne se produit à la fois sur des surfaces rugueuses et lisses, y compris le verre (Mitik-Dineva *et al.* 2009). Les matériaux de plomberie sont aussi des sites fondamentaux pour l'adhésion microbienne.

L'adhésion microbienne est un processus complexe impliquant des interactions au niveau de la surface cellulaire. L'adhésion primaire entre les bactéries et les surfaces abiotiques se fait généralement par des interactions « hydrophobes » non spécifiques, par exemple acide-base (Rochex *et al.* 2004; Pezron *et al.* 2005). L'adhésion dépend de plusieurs facteurs physique liés à l'environnement (la température, les matériaux de la tuyauterie, la vitesse de l'eau...) ou chimiques lié au microorganisme lui-même (la composition chimique de la paroi cellulaire) ce qui produit la charge de surface, l'hydrophilie/hydrophobie, la porosité, la rugosité et la microtopographie.

Afin de compléter la compréhension du phénomène de l'adhésion, ce chapitre propose d'exposer les différents facteurs affectant l'adhésion des microbes au sein des canalisations d'eau potable.

2. Facteurs d'influence :

2.1. Matériaux de plomberie :

Le cuivre et le plastique sont les matériaux les plus couramment utilisés dans les systèmes de plomberie domestiques (Lehtola *et al.* 2005). Le fer galvanisé et l'acier inoxydable ont été utilisés dans une certaine mesure en Europe et en Asie.

Plusieurs études sur l'effet des matériaux de plomberie sur la formation de biofilms ont été menées. Lehtola *et al.* (2004) ont étudié les modifications de la qualité de l'eau et la formation de biofilms dans les matériaux de plomberie domestiques, notamment les tuyaux en cuivre, en plastique et en polyéthylène (PE). Les auteurs ont rapporté que la formation de biofilm était plus élevée dans les tuyaux en PE que dans les tuyaux en cuivre pendant une courte période d'étude. Cependant, après une période plus longue (plus de 200 jours), la formation de biofilm dans les tuyaux en cuivre a continué à augmenter jusqu'à atteindre un niveau similaire à celui

formé dans les tuyaux en PE. Leurs résultats suggèrent que bien que le niveau global de formation du biofilm dans les tubes en cuivre et en PE soit fondamentalement le même, la formation du biofilm dans les tubes en cuivre est plus lente que dans les tubes en PE. Les auteurs attribuent cette différence à l'effet inhibiteur potentiel du cuivre dans la formation du biofilm (Lehtola *et al.* 2004). Cependant, Zacheus *et al.* (2000) et Pedersen (1990) ont démontré qu'il n'y avait pas de différence significative dans la capacité du polyvinyle (PVC), du PE et de l'acier inoxydable à favoriser la formation d'un biofilm.

Niquette *et al.* (2000) ont démontré que différents matériaux de plomberie (PVC, PE, acier cimenté, amiante-ciment, fonte cimentée, acier goudronné et fonte grise) influençaient la formation de biofilms. Les auteurs ont montré que la formation de biofilm était la plus faible pour les matériaux plastiques, le PVC et le PE. La plus grande quantité de formation de biofilm (mesurée par l'activité exoprotéolytique potentielle ; Laurent and Servais (1995) a été observée dans les matériaux de plomberie fabriqués à partir de fonte grise. Les auteurs ont suggéré que l'augmentation de la formation d'un biofilm dans les tuyaux en fonte grise pourrait être due à l'effet de la corrosion sur la porosité et la rugosité du matériau. D'autres matériaux de plomberie utilisés dans cette étude ont eu un effet intermédiaire sur la formation de biofilm ; leur classement croissant en terme de contamination est le suivant (Niquette *et al.* 2000) :

PVC/PE < Acier cimenté < Amiante-ciment < Fonte cimentée < Acier goudronné < Fonte grise

Bien que Niquette *et al.* (2000) aient montré que des quantités similaires de biofilm étaient présentes sur les matériaux en PVC et en PE, Van der Kooij *et al.* (2001) ont ensuite observé que le PE favorise davantage la formation de biofilm et la croissance des *légielles* que le PVC. Les capacités du cuivre, de l'acier inoxydable et du polyéthylène réticulé (PEX) à favoriser la formation d'un biofilm dans un système modèle d'eau chaude ont été comparées par Van der Kooij *et al.* (2005). La quantité de biofilm formé a été déterminée en mesurant la quantité d'adénosine triphosphate présente. Les auteurs ont observé une quantité similaire de biofilm sur le cuivre et l'acier inoxydable, tandis que le PEX présentait la concentration de biofilm la plus élevée.

En 2007, Manuel *et al.* (2007) ont étudié l'effet des matériaux polymères (PVC, PEX, polyéthylène haute densité et polypropylène) sur la formation de biofilms. Les auteurs suggèrent que les différences entre les matériaux polymères utilisés ne se reflètent pas dans la quantité de biofilm formé à la même vitesse d'écoulement et à la même température.

Cloete *et al.* (2003) ont rapporté l'influence de quatre matériaux de plomberie (amiante-ciment, fonte, acier galvanisé et PVC) sur la formation d'un biofilm. Contrairement aux

résultats rapportés par Niquette *et al.* (2000), le PVC s'est avéré être le promoteur le plus important de la formation d'un biofilm, l'acier galvanisé étant le promoteur le plus faible. Aucune différence significative dans les biofilms formés sur l'amiante-ciment et la fonte n'a été observée. Le classement des matériaux de plomberie dans la réduction des biofilms est le suivant (Cloete *et al.* 2003) :

Acier galvanisé < Amiante-ciment Fonte < PVC

Les deux rapports contradictoires de Niquette *et al.* (2000) et Cloete *et al.* (2003) peuvent être le résultat de facteurs autres que le matériau du tuyau, tels que la période d'incubation du biofilm, la température de l'eau de source et la vitesse du fluide. Cloete *et al.* (2003) ont rapporté l'influence de quatre matériaux de plomberie sur la formation d'un biofilm sur une période de 23 jours, et Niquette *et al.* (2000) ont rapporté leurs résultats basés sur une période d'incubation du biofilm allant jusqu'à deux mois. Niquette *et al.* (2000) ont en outre montré que la quantité de biofilm formé sur de la fonte cimentée pendant une période d'un mois était deux fois plus importante que celle constatée lors d'une étude de deux mois, bien qu'aucune différence significative n'ait été constatée pour le reste des matériaux de plomberie.

En plus de la quantité de biofilm trouvée, il a également été démontré que les matériaux de plomberie affectent la composition ainsi que l'activité métabolique des microbes présents dans le biofilm. Norton *et al.* (2000) ont observé des différences significatives dans la croissance et la composition des biofilms formés dans les tuyaux en fer ainsi que leur capacité à résister aux désinfectants par rapport aux biofilms formés dans les tuyaux en PVC. Les auteurs ont constaté que les tuyaux en fer supportent des communautés microbiennes plus hétérogènes que les tuyaux en PVC (Norton *et al.* 2000).

Sur la base de la discussion précédente, il devient évident que les différences entre les matériaux de plomberie ne tiennent pas pleinement compte des quantités relatives de biofilm formées dans la plomberie domestique. Il est probable que d'autres facteurs tels que l'âge du biofilm, la communauté microbienne, la température et la vitesse d'écoulement de l'eau doivent être pris en compte lors de ces études.

2.2. Température :

La température de l'eau est un facteur déterminant de la croissance des microbes et du biofilm dans les systèmes de distribution d'eau. Elle peut également contrôler l'efficacité du désinfectant, la corrosion des tuyaux et d'autres paramètres qui peuvent influencer les biofilms. Hallam *et al.* (2001) ont observé une diminution de 50% de l'activité du biofilm lorsque la température était réduite de 17 à 7°C. Silhan *et al.* (2006) ont étudié l'effet des

matériaux des tuyaux (acier galvanisé, PEX, tuyaux en cuivre, ou PE) ainsi que de la température sur la formation de biofilms en utilisant des échantillons prélevés dans des installations domestiques. Les auteurs ont démontré que la quantité de biofilm était plus élevée pour les tuyaux incubés à 35°C que pour les tuyaux incubés à 15°C. L'augmentation la plus importante de la formation de biofilm a été observée sur les matériaux plastiques, ce qui est en accord avec les études de Hallam *et al.* (2001) et Cloete *et al.* (2003), comme nous l'avons vu précédemment. Ces résultats concordent également avec les travaux antérieurs de Bagh *et al.* (2002); Bagh *et al.* (2004) qui ont surveillé les biofilms formés dans les systèmes d'eau froide et chaude d'un immeuble de 100 appartements. Les auteurs ont observé qu'à 37°C, la numération des plaques hétérotrophes était environ 250 fois supérieure à celle de l'eau froide.

La température peut également influencer la composition du biofilm dans les systèmes de plomberie domestiques. Par exemple, Hageskal *et al.* (2006) ont isolé des microbes dans des robinets d'eau froide, des robinets d'eau chaude et des douches dans des maisons privées en Norvège. Les auteurs ont isolé 46 espèces dans les robinets d'eau froide, sept espèces dans les robinets d'eau chaude et 44 espèces dans les douches. *Aspergillus fumigatus*, *A. ustus*, *Phialophora verrucosa*, *Phoma sp.* et *Trichoderma sp.* étaient les microbes dominants au sein des communautés microbiennes trouvées dans les robinets d'eau chaude. Le genre *Penicillium*, qui a été principalement isolé dans les robinets d'eau froide et les douches, n'était pas présent dans les robinets d'eau chaude.

Bref, la température est un facteur important pour la contamination des réseaux d'eau potable gouvernant l'adhésion et la formation de biofilm de manière indirecte. En effet, son impact sur d'autres paramètres rend son rôle difficile à cerner.

2.3.Vitesse d'eau :

La vitesse de l'eau peut influencer la formation de biofilms dans les systèmes de distribution d'eau et les systèmes de plomberie domestiques. On s'attendait généralement à ce qu'une augmentation du débit réduise la formation de biofilms en raison de taux de cisaillement plus élevés (Percival *et al.* 1999). Cependant, la relation entre la vitesse de l'eau et la formation de biofilms fait l'objet d'une controverse. Par exemple, Donlan and Pipes (1988) ont montré qu'une augmentation du débit entraîne une diminution du nombre de bactéries dans les biofilms. Cependant, Percival *et al.* (1999) ont étudié l'effet de la vitesse de l'eau sur la formation d'un biofilm sur l'acier inoxydable et ont montré qu'une augmentation du débit dans

un tuyau de 20 mm de diamètre de 6,0 à 33,0 L/min entraînait une augmentation des communautés bactériennes présentes dans la formation du biofilm.

De plus, il a été constaté qu'une modification de la vitesse de l'eau influençait la composition de la communauté microbienne présente dans les biofilms (Percival *et al.* 1999). Les *Corynebacterium/Arthrobacter spp.* ont été principalement isolés des biofilms soumis à 6,0 L/min, tandis que les *Pseudomonas* dominaient la communauté microbienne présente dans les biofilms soumis à des débits de 18,1 et 33,0 L/min. Des résultats similaires ont été récemment observés par Lehtola *et al.* (2006), qui ont montré qu'une augmentation du débit de l'eau de 0,2 à 0,8 L/min entraînait un développement accru du biofilm dans les tuyaux en cuivre et en plastique.

Évidemment, la vitesse de l'eau engendre des forces qui vont réduire et parfois inhiber l'adhésion et la formation des biofilms. Cependant, des rapports précédemment cités montrent que ce paramètre est assez complexe où son effet est dépendu.

2.4. Structure de la surface cellulaire :

Comme décrit auparavant, les structures de surface des cellules affectent directement l'adhésion des microbes aux surfaces solides. Les exopolysaccharides (EPS) et les appendices cellulaires protéiques ont des fonctions de liaison entre le corps cellulaire et un substrat. Alors que la PSE est importante pour le développement de la structure du biofilm plutôt que pour l'adhésion cellulaire, les appendices cellulaires protéiques sont souvent essentiels pour l'interaction initiale entre les cellules et un substrat, et fonctionnent comme de l'adhésine.

3. Conclusion :

Les micro-organismes sont dynamiques dans la nature et capables de résister à des conditions environnementales défavorables en formant des biofilms. Les études précédentes sur les biofilms se sont concentrées sur les systèmes de distribution d'eau potable. Cependant, les biofilms sont également présents dans les systèmes de plomberie domestique, et les études sur les communautés microbiennes présentes dans ces biofilms ont permis d'identifier des bactéries pathogènes et non pathogènes. Il a été démontré que plusieurs facteurs, dont la température, le matériau des tuyaux, la vitesse de l'eau et les désinfectants, influent sur la formation de biofilms, avec souvent des rapports contradictoires sur ce qui favorise ou freine cette formation. En général, l'augmentation de la température et l'augmentation du débit augmentent la capacité du biofilm, et les deux semblent influencer la composition du biofilm. Les matériaux de la plomberie domestique affectent non seulement le taux de croissance du

biofilm mais aussi l'efficacité de la désinfection. A court terme, les biofilms semblent se former plus lentement sur le cuivre que sur le plastique ; cependant, une capacité de biofilm similaire a été trouvée sur les deux matériaux à long terme.

Chapitre 3 : Microorganismes dans les réseaux de distribution d'eau potable

1. Introduction :

Dans la nature, les bactéries existent généralement dans deux états principaux : la forme planctonique libre, caractéristique d'une minorité de bactéries, dans laquelle les organismes unicellulaires flottent ou nagent indépendamment dans un environnement fluide, et respectivement, la forme majoritaire, dans laquelle les cellules s'attachent fermement les unes aux autres et aussi à une surface formant une structure solide. Cette dernière pourrait être considérée comme un mécanisme de survie car à l'intérieur de cette structure, les bactéries sont protégées des composés toxiques, des facteurs de stress, etc. (Costerton *et al.* 1987; Johnson 2008; Flemming *et al.* 2009). Dans les environnements aqueux, les biofilms se développent sur toutes les surfaces solides et interfaces exposées et leur structure dépend de la composition en espèces du microbiote de la zone concernée, de leur activité microbienne et des conditions environnementales. Les biofilms des écosystèmes aqueux sont des communautés complexes et dynamiques avec une biodiversité microbienne considérable, composées de différentes espèces de bactéries, de diatomées et de protozoaires incorporées dans une matrice polymère protectrice. Une préoccupation majeure des distributeurs d'eau est de maintenir la qualité de l'eau potable depuis la station d'épuration jusqu'au robinets des consommateurs. D'un point de vue biologique, l'eau doit être caractérisée par une croissance bactérienne stable. Cependant, les réseaux de distribution d'eau potable sont continuellement exposés à un débit d'eau variable, contenant des substances organiques biodégradables et des micro-organismes, qui proviennent soit des biofilms naturels développés à l'intérieur des stations de traitement de l'eau, soit de certains incidents apparus dans le réseau de distribution. Certains de ces microorganismes (en particulier les bactéries hétérotrophes) peuvent se développer dans cet environnement et coloniser l'ensemble du réseau de distribution d'eau potable, la plus forte densité de microorganismes se trouvant à la surface de la paroi de la conduite, organisée en microcolonies dispersées, mélangées à des produits de corrosion et des précipités inorganiques (Block & Brennan 1993; September *et al.* 2007; Ibrahim *et al.* 2012). L'objectif de ce chapitre est de présenter les caractéristiques des biofilms microbiens présents

dans les écosystèmes aqueux en mettant l'accent sur leurs rôles à la fois négatifs et bénéfiques pour le traitement et la qualité de l'eau.

2. Définition d'un biofilm :

Les biofilms bactériens sont apparus il y a environ 3,25 milliards d'années et représentent un mode de croissance qui protège les cellules et leur permet de survivre dans des environnements hostiles (Hall-Stoodley *et al.* 2004). On pourrait donc affirmer que le développement de biofilms est une forme primitive du cycle de vie des bactéries et aussi, un facteur clé pour leur survie dans divers environnements. Les biofilms se trouvent partout dans la nature (Hall-Stoodley *et al.* 2004) ; dans l'eau de pluie, les eaux thermales, les eaux marines et les océans, sur divers supports naturels solides (pierre, bois, sol), et sur des surfaces synthétiques également sous forme de tuyaux, de cathéters médicaux, etc. et ont un impact majeur tant sur la santé des personnes que sur les processus écologiques et industriels (Chifiriuc *et al.* 2011).

Les biofilms représentent une communauté microbienne structurée qui adhère à une surface inerte ou vivante intégrée dans une matrice polymère auto-sécrtée (Zarnea & Popescu 2011). Il présente une structure hétérogène, les cellules incorporées dans cette matrice présentant un phénotype modifié, notamment en ce qui concerne le taux de croissance et la transcription des gènes, et une composition mono- ou, le plus souvent, multispécifique, régulée par de multiples mécanismes de signalisation dépendant de la densité cellulaire, appelés systèmes de détection et de réponse (QS) (Donlan 2002; Flemming *et al.* 2009; Lazăr & Chifiriuc 2010).

3. Stages de développement d'un biofilm :

Le développement du biofilm représente un mode de croissance qui confère la protection des cellules microbiennes, la survie en milieu hostile mais aussi la possibilité pour les cellules de se détacher du biofilm, de passer au phénotype planctonique, de se disperser et de coloniser de nouvelles niches. Le mécanisme de développement du biofilm microbien (Figure 1) passe par plusieurs étapes. La phase initiale commence par une fixation réversible de micro-organismes libres sur une surface. Ces premières espèces qui colonisent une surface adhèrent mal par les forces de Van der Waals. Cette étape est suivie par la fixation irréversible des bactéries à la surface si les premiers colons ne sont pas immédiatement retirés de la surface ; ils peuvent s'ancrer fermement en utilisant des structures d'adhésion cellulaire, comme des substances polymères extracellulaires ou des composants structurels comme des piliers. La première

bactérie facilite l'adhésion d'autres espèces bactériennes en fournissant divers sites d'adhésion et la sécrétion de la matrice polymère. Certaines espèces ne sont pas capables de s'attacher à travers leur surface, mais sont souvent capables de s'ancrer à la matrice ou directement aux premières bactéries adhérentes. Pendant la colonisation, ces cellules sont capables de communiquer par l'intermédiaire de molécules QS (C Chifiriuc *et al.* 2014). Une fois la colonisation initiée, le biofilm se développe par une combinaison de processus, notamment la division cellulaire et le recrutement de nouvelles cellules planctoniques. Cette étape du développement du biofilm est connue sous le nom de maturation, au cours de laquelle le biofilm est stable et peut subir des changements uniquement en termes de taille et de forme. Au cours de la dernière étape, les cellules du biofilm se dispersent, ce qui leur permet de se répandre et de coloniser de nouvelles surfaces (Finkel & Mitchell 2011).

Le biofilm est soutenu et protégé par une matrice de composés polymériques synthétisés par ses composants. Cette matrice protège les cellules et facilite la communication entre elles par le biais de signaux biochimiques. Presque toutes les espèces microbiennes possèdent des mécanismes spécifiques qui leur permettent d'adhérer aux surfaces et entre elles.

Les micro-organismes appartenant au biofilm sont physiologiquement distincts de leurs homologues libres appelés cellules planctoniques. Lorsqu'une cellule passe à la croissance du biofilm, elle subit des modifications phénotypiques, l'expression des gènes étant régulée différemment (An & Parsek 2007). Les micro-organismes qui forment les biofilms répondent à de nombreux facteurs, qui peuvent inclure : la reconnaissance de sites d'adhésion spécifiques ou non spécifiques à une surface, l'indice nutritionnel, ou dans certains cas à la présence de gradients de substances nocives (par exemple, des concentrations d'antibiotiques sub-inhibitrices, des biocides, des métaux lourds) (Karatan *et al.* 2009).

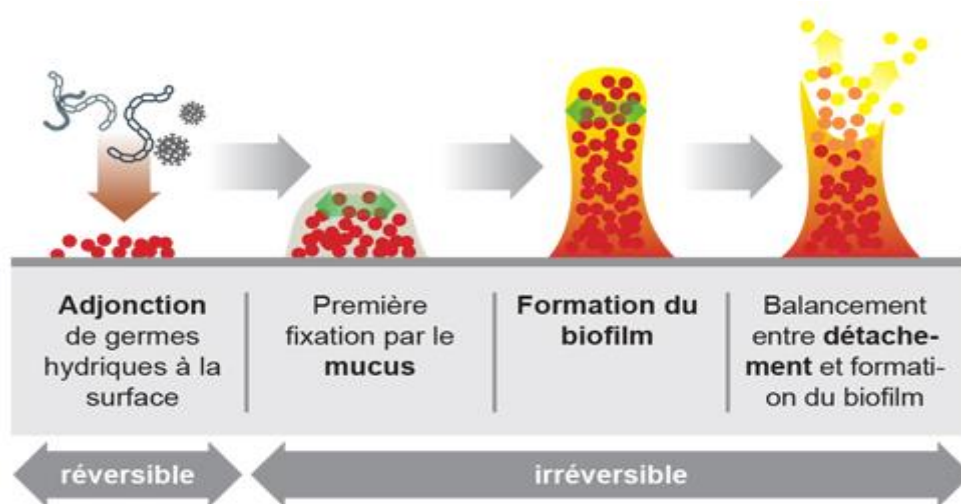


Figure 3. Les principales étapes de la formation d'un biofilm.

4. Biofilms des réseaux de distribution d'eau potables :

Avec le développement de la civilisation humaine, la technologie des systèmes de distribution d'eau potable a évolué. Ces systèmes de distribution représentent les nouveaux environnements aquatiques que les biofilms bactériens ont colonisés au fil du temps, depuis l'époque des aqueducs romains jusqu'aux systèmes les plus modernes d'aujourd'hui. Les biofilms formés sur les conduites d'eau sont constitués de bactéries (espèces de *Pseudomonas*, *Escherichia*, *Sphingomonas*, *Flavimonas*, *Flavobacterium*, *Acinetobacter*, *Aeromonas*, *Legionella*, coliformes), de certaines mycobactéries atypiques (*Aquabacterium*), de virus, d'amibes et de parasites, tels que *Cryptosporidium* et *Giardia* (Squinazi 2004). Les biofilms formés dans les systèmes d'eau potable consistent le plus souvent en une combinaison de plusieurs espèces, notamment des bactéries, des champignons, des algues, des protozoaires, mais aussi des particules de débris et des produits résultant de la corrosion.

Le phénomène d'accumulation de biofilm (biofouling) se produit sans exception dans tous les systèmes de production, de stockage et de distribution d'eau (Figure 3), malgré un milieu relativement défavorable, en raison de l'oligotrophie, des basses températures, de la présence de désinfectants et des conditions hydrauliques (Moritz 2011). Les dépôts ont pour origine les matières en suspension transportées par l'eau, l'activité microbienne et les réactions physico-chimiques de l'interface et de la masse de l'eau.

La présence de biofilms bactériens adhérant à la surface des conduites d'alimentation en eau dans les réseaux de distribution d'eau pourrait représenter une source de non-conformité aux réglementations standard en matière de qualité de l'eau potable et peut être une structure adaptée à la constitution d'un réservoir de bactéries potentiellement pathogènes.

La dynamique bactérienne dans les systèmes de distribution est complexe car elle dépend de différents paramètres, tels que la fraction biodégradable du carbone organique, la présence d'un désinfectant résiduel, les matériaux et l'état de la paroi de la conduite. Par conséquent, le développement de biofilms dans les systèmes de distribution d'eau peut être considéré comme un processus dynamique et évolutif dans lequel les composés et les micro-organismes interagissent les uns avec les autres. La prolifération et le détachement de la biomasse des matériaux de surface qui entrent en contact avec l'eau potable peuvent entraîner une contamination microbienne des systèmes de distribution d'eau (LeChevallier *et al.* 1996). La qualité microbiologique de l'eau potable peut être dégradée de manière significative pendant le transport dans les réseaux de distribution, principalement en raison

de la dispersion des bactéries à partir des biofilms développés sur la surface interne des tuyaux.

Pour diminuer la contamination microbiologique, il est nécessaire d'utiliser des désinfectants chimiques, comme le chlore, qui agissent sur les micro-organismes ou de nouvelles technologies, qui éliminent le risque de contamination bactérienne en diminuant la concentration de substances organiques du réseau de distribution. En outre, afin de prévenir tout risque de croissance bactérienne dans le réseau de distribution, il convient de conserver en permanence un désinfectant résiduel (chlore, dioxyde de chlore, monochloramine). Cependant, certaines bactéries peuvent s'adapter à cet environnement et plus encore, proliférer.

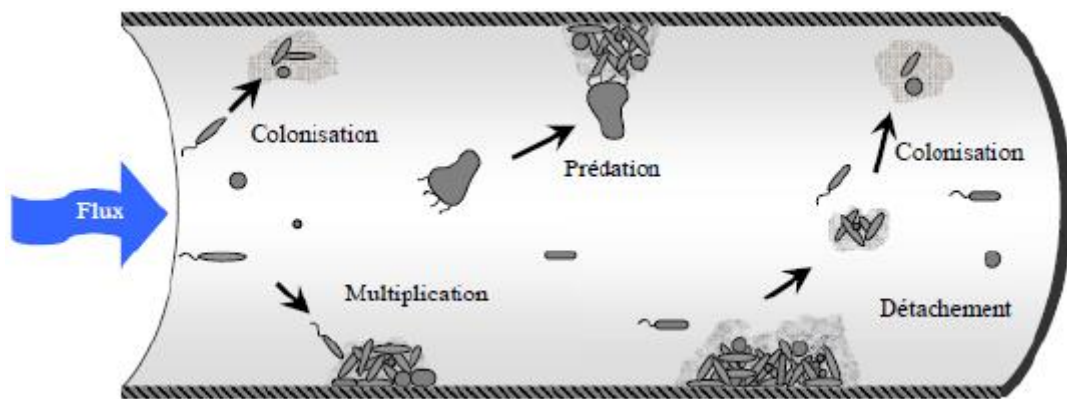


Figure 4. Les biofilms du système de traitement et de distribution.

5. Sources de contamination des eaux des réseaux de distribution d'eau :

Le microbiote naturel de l'eau se compose d'espèces indigènes, caractéristiques de l'écosystème concerné, mais aussi d'espèces non indigènes, potentiellement pathogènes, provenant du sol et forées par l'eau de pluie, ou de différentes sources de contamination représentées par les eaux usées des ménages, riches en sulfates provenant des détergents, les eaux usées des éleveurs de bétail, de l'industrie chimique, minière ou métallurgique, l'accumulation d'engrais excédentaires, les substances organiques et les minéraux provenant de l'érosion du sol. Les eaux souterraines sont partiellement contaminées par des métaux lourds provenant de l'industrie extractive/pétrolière, des produits de type pétrole-phénol des raffineries, des installations de forage, des activités agricoles (Lazar et al., 2015).

5.1. Différents problèmes liés au biofilms :

Divers problèmes peuvent être directement liés à la formation et au développement de biofilms sur les parois des conduites d'eau potable. Ces conséquences peuvent affecter le réseau de distribution lui-même, ou avoir un effet négatif sur la consommation du réseau d'eau contaminée.

Ces conséquences sont multiples et concernent à la fois les populations bactériennes et les caractéristiques physiques du réseau :

- Les bactéries accumulées dans les biofilms constituent le premier maillon d'une chaîne trophique et favorisent ainsi le développement des micro-organismes ;
- Certains types de bactéries peuvent induire une augmentation de la turbidité, un changement de goût et d'odeur de l'eau en raison de leur présence ou de leur activité métabolique ;
- Certaines bactéries peuvent accélérer la corrosion ;
- Une réduction de la capacité du réseau de distribution due à une augmentation des forces de résistance induites par la présence du biofilm ;
- Une augmentation du nombre de non-conformités par rapport aux critères de qualité microbiologique de l'eau destinée au consommateur ;
- Le développement de bactéries de nitrification dans les zones anoxiques peut également entraîner des non-conformités en dépassant les concentrations maximales autorisées pour les nitrates (Gauthier *et al.* 2001).

La présence de la biomasse dans le flux constant des systèmes de distribution d'eau et sa prolifération posent un problème en termes de santé publique. En effet, le système est continuellement inoculé de bactéries dont la plupart sont inconnues, mais qui sont des organismes potentiellement pathogènes. De plus, les conditions du réseau de distribution peuvent permettre de maintenir ou d'augmenter le niveau de contamination et donc les normes pour l'eau potable ne seront pas respectées.

Sur les 300 à 500 millions de cas de maladies diarrhéiques aiguës enregistrés chaque année dans le monde, plus de 60 % touchent les enfants des zones rurales des pays sous-développés, où le choléra, la fièvre typhoïde, la parasitose causent 20 millions de décès, et on estime que dans le monde entier plus de 25 000 personnes meurent chaque jour à cause du manque d'eau potable (Ali *et al.* 2012). En outre, l'OMS estime que les cas officiellement déclarés ne représentent qu'une faible proportion (5 à 10 %) du nombre réel de cas survenant chaque année dans le monde (Lanata *et al.* 2002). Ces derniers temps, la dégradation généralisée de la

qualité de l'eau par des rejets incontrôlés (eaux usées et autres eaux résiduaires des activités industrielles ou agricoles et du bétail) suscite de nombreuses inquiétudes.

5.2. Pollution biologique :

La pollution biologique de l'eau, en particulier des eaux de surface, peut être causée directement par des agents pathogènes (pollution fécaloïde, ou par les eaux dans lesquelles les animaux malades boivent, se baignent, ou l'eau remplie d'animaux morts) ou indirectement (par l'air, le sol, la nourriture, en cas d'inondation, de pluie, de tremblements de terre, de cataclysmes, de décontamination inadéquate/inefficace, ou par l'utilisation de sources d'eau non hygiéniques). La pollution biologique de l'eau pourrait favoriser :

- Le développement d'un support nutritionnel pour les agents pathogènes ;
- La défaillance du processus de déminéralisation de l'eau en bloquant l'échange d'ions utilisé comme matériau filtrant dans les installations de traitement de l'eau ;
- Un ralentissement des processus de déferrisation et de démanganisation (utilisés comme moyens de traitement de l'eau) ;
- Une corrosion plus importante des conduites des installations de traitement, de transport et de distribution de l'eau ;
- Des modifications des propriétés organoleptiques ;
- L'apparition de composés halogénés potentiellement cancérigènes dans le processus de chloration de l'eau ;
- La présence de composés organiques en petites quantités qui peuvent être toxiques ou cancérigènes ;
- Des coûts élevés du traitement de l'eau.

5.3. Facteurs de survie des micro-organismes :

La survie des microorganismes dans les écosystèmes aquatiques dépend des propriétés physico-chimiques de l'habitat aquatique. La survie et le maintien de la virulence des bactéries pathogènes sont liés à un ensemble de facteurs exogènes (efficacité du traitement par les stations d'épuration, volume et fréquence des rejets d'eau contaminée par des fèces) et endogènes (température de l'eau, pH, concentration en oxygène, présence de composés organiques, irradiation solaire, concurrence avec les micro-organismes indigènes, présence de bactériophages, etc.).

Une seule goutte d'eau contaminée contient plus de 50 millions de bactéries et autres microorganismes, y compris des agents pathogènes qui pourraient être des agents étiologiques de certaines maladies infectieuses transmises par l'eau. Le risque de transmission d'un agent pathogène par l'eau dépend (Lazar *et al.* 2015) :

- De l'espèce microbienne ;
- Du degré de contamination de la source d'eau ;
- Du degré de résistance des pathogènes dans le milieu aquatique ;
- De la nature de la source d'eau (par exemple fontaine située près des latrines) ;
- La composition chimique de l'eau, le pH, la température, le niveau d'oxygénation ;
- Le niveau de rayonnement solaire ;
- La composition du microbiote saprotrophe ;
- La densité des bactériophages ;
- La densité des protozoaires bactériovores ;
- Le degré et la fréquence de rafraîchissement de la couche d'eau ;
- La fréquence et la nature de la décontamination des sources d'eau ;
- Les conditions sanitaires ;
- Les mesures de surveillance épidémiologique.

6. Contrôle du développement des biofilms des réseaux d'eau :

Il est difficile d'éliminer les biofilms dans les systèmes de distribution d'eau et les systèmes de plomberie domestiques. Les stratégies de lutte contre les biofilms doivent être basées sur les facteurs connus pour contribuer à la formation de biofilms. Par exemple, la croissance du biofilm peut être limitée dans les salles de bains, les cuisines et autres endroits similaires en améliorant la ventilation dans les zones touchées afin de réduire l'humidité et de retenir les surfaces sèches. L'élimination des résidus de produits de nettoyage et d'hygiène personnelle peut également réduire la croissance du biofilm. Cependant, il existe de nombreuses théories dans la littérature concernant les biofilms dans la plomberie domestique. Par conséquent, les stratégies de contrôle peuvent dépendre de la compréhension des biofilms dans les systèmes de distribution (qui pourrait être applicable à la plomberie domestique) et de la communication avec les représentants de l'industrie. L'utilisation de désinfectants et de traitements physiques appropriés est cruciale pour contrôler les biofilms. Bien que le chlore soit le désinfectant chimique le plus couramment utilisé, il devient évident que des biofilms se développent encore même après un traitement au chlore. Des études ont montré que les

monochloramines et les chloramines, qui sont moins réactives, sont plus persistantes que le chlore et se sont avérées plus efficaces pour réduire la croissance du biofilm (LeChevallier *et al.* 1990). Ces désinfectants sont capables de pénétrer dans les biofilms et de persister plus longtemps que le chlore dans le réseau de distribution d'eau. Thomas *et al.* (2004), en utilisant un système d'eau domestique à échelle pilote, ont montré que le dioxyde de chlore était le désinfectant le plus efficace pour contrôler *L. pneumophila*. Une étude menée par Loret *et al.* (2005) sur un modèle de réseau d'eau domestique a également montré que le dioxyde de chlorure permettait de traiter efficacement les biofilms. Cependant, contrairement aux conclusions de Thomas *et al.* (2004), le chlore s'est avéré plus efficace pour traiter les biofilms. La différence entre l'efficacité du chlore et celle du dioxyde de chlore n'est pas concluante, car la concentration de dioxyde de chlore (0,5 mg/l) était nettement inférieure à celle du chlore (2,5 mg/l). Aussi, les matériaux de plomberie domestique affectent non seulement le taux de croissance du biofilm mais aussi l'efficacité de la désinfection. À court terme, les biofilms semblent se former plus lentement sur le cuivre que sur le plastique ; cependant, une capacité de biofilm similaire a été trouvée sur les deux matériaux à long terme. La désinfection au chlore s'est avérée être une stratégie d'élimination efficace lorsque le polyéthylène (PE) est utilisé. Pour les matériaux en cuivre, l'efficacité de la désinfection au chlore a été limitée au point d'introduction du chlore. Malheureusement, il existe encore des rapports contradictoires quant au meilleur désinfectant à utiliser pour prévenir les biofilms. Par conséquent, afin de contrôler le développement des biofilms dans les systèmes de plomberie domestiques, il est primordial de prendre en compte les influences des facteurs environnementaux et matériels.

7. Présence de *Pseudomonas aeruginosa* dans les réseaux d'eau potable :

P. aeruginosa est une bactérie naturelle du sol et de l'eau, et elle est importante en tant que pathogène opportuniste chez l'homme (Bressler *et al.* 2009). Elle peut être présente sporadiquement dans les systèmes publics d'eau potable et les installations domestiques, où elle provient de la source d'eau ou peut être introduite, par exemple, lors de travaux de construction (Hamsch *et al.* 2004). Une fois établie, *P. aeruginosa* est souvent difficile à éliminer des systèmes d'eau. L'une des raisons peut être la persistance de *P. aeruginosa* dans les biofilms comme habitats protégés. Des études en laboratoire ont montré que *P. aeruginosa* peut former des biofilms mono-espèce sur des matériaux en métal, en plastique et en caoutchouc (Bourion & Cerf 1996). En outre, des chercheurs ont observé que *P. aeruginosa* était occasionnellement présent dans les biofilms de l'eau potable, ce qui indique la capacité

de *P. aeruginosa* à persister dans ces environnements (Rogers *et al.* 1994; Kilb *et al.* 2003). Ainsi, entre <2,0 et 24,1% des échantillons d'eau du robinet étudiés contenaient *P. aeruginosa* ; les niveaux détectés allaient de 0 à 2 300 UFC/mL. Cette bactérie a été trouvée dans des échantillons de distributeurs automatiques d'eau avec une fréquence de 16,1%, et à des concentrations de 0,002-0,16 UFC/mL ; dans l'eau en bouteille, la fréquence était <0,4-18,8%, et les concentrations variaient de 0 à 10 UFC/mL.

8. Présence d'*Escherichia coli* dans les réseau d'eau potable :

Escherichia coli est le principal indicateur de la contamination fécale de l'eau potable et, par déduction, indique la probabilité que des agents pathogènes fécaux d'origine hydrique aient pénétré dans le réseau d'eau potable (Abberton *et al.* 2016). Un nombre important de défaillances de la qualité de l'eau est dû à la détection d'*E. coli* au-dessus des normes réglementaires, c'est-à-dire dépassant la politique de tolérance zéro par 100 ml d'eau pour *E. coli* dans un réseau d'eau potable, mise en œuvre par les agences de surveillance de l'État (USEPA 2002; Page *et al.* 2006). Bien qu'*E. coli* soit actuellement utilisé comme un organisme indicateur d'une contamination fécale récente, on sait peu de choses sur son devenir une fois qu'il a pénétré dans l'eau potable et les systèmes de distribution d'eau - combien de temps peut-il survivre, peut-il repousser dans l'eau, peut-il s'abriter ou se répliquer dans un biofilm de paroi de tuyau? En outre, la fiabilité d'*E. coli* en tant qu'organisme indicateur fécal a été remise en question par des rapports sur la survie à long terme d'*E. coli* dans les sols, les sédiments et l'eau dans les régions tropicales et tempérées (Byappanahalli *et al.* 1998; Fujioka & Byappanahalli 2001; Hartz *et al.* 2008; Brennan *et al.* 2010). En effet, dans beaucoup de ces régions, *E. coli* est maintenant reconnu comme faisant partie du biote du sol. La présence d'*E. coli* persistants dans le sol (Brennan *et al.* 2010) met en évidence une source de contamination par *E. coli* non prise en compte auparavant, provenant du sol environnant dans lequel sont enterrées les canalisations.

La contamination de l'eau potable par *E. coli* est traditionnellement détectée par des méthodes de culture. Celles-ci sont simples à réaliser et permettent de détecter des organismes viables. Cependant, ces méthodes sont également lentes, et le comptage des colonies ne prend en compte que les bactéries cultivables capables de se diviser à un rythme suffisant pour former des colonies (Boulos *et al.* 1999). Dans de nombreux cas, la quantité d'organismes viables peut être sous-représentée par la culture, car les bactéries non cultivables (Ward *et al.* 1990), endommagées par la léthargie (Blackburn & McCarthy 2000) et les cellules viables mais non cultivables (Keer & Birch 2003; Juhna *et al.* 2007) ne seront pas détectées. En revanche, les

techniques moléculaires peuvent être utilisées pour détecter et surveiller les changements temporels et spatiaux subtils dans la dynamique d'*E. coli* au sein d'une communauté microbienne mixte, sans qu'il soit nécessaire de procéder à une culture, de manière rapide, sensible et précise.

9. Conclusion :

Les biofilms dans les réseaux d'eau potable sont responsables de plusieurs effets indésirables sur la qualité de l'eau distribuée. L'un des principaux inconvénients des biofilms est leur potentiel à servir de niche protectrice pour les agents pathogènes d'origine hydrique qui sont responsables de plusieurs épidémies dues à la consommation d'eau contaminée. La connaissance des principaux problèmes résultant de la formation de biofilms dans les réseaux d'eau potable est essentielle pour améliorer les stratégies de contrôle actuelles et/ou pour développer des alternatives plus efficaces. L'utilisation de la technologie membranaire pour contrôler la qualité de l'eau potable va certainement augmenter, même si elle est coûteuse, en particulier pour les applications à grande échelle. En revanche, elle est très intéressante pour les dispositifs d'eau potable au point d'utilisation. La désinfection au chlore est la principale stratégie utilisée dans les réseaux d'eau potable pour le contrôle microbien et il est concevable que les futures stratégies de désinfection des réseaux d'eau potable continuent à utiliser le chlore pour des raisons économiques et de sécurité du produit final. Cependant, la résistance accrue des biofilms aux processus de désinfection conventionnels, ainsi que les effets bien connus des sous-produits de désinfection sur la santé publique, indiquent clairement que de nouveaux moyens de désinfection des eaux usées et de contrôle des biofilms sont nécessaires. Les progrès de la chimie combinatoire, l'utilisation de nanostructures et l'invention de méthodes de criblage à haut débit pour l'évaluation d'un grand nombre de produits chimiques ayant une activité désinfectante fourniront certainement de nouveaux désinfectants efficaces pour l'eau potable.

Chapitre 4 : Désinfection des réseaux de distribution d'eau

1. Introduction :

Le processus de désinfection est pratiqué régulièrement depuis l'aube du 20^{ème} siècle pour éradiquer et inactiver les agents pathogènes de l'eau utilisée à des fins de consommation. Les désinfectants, en plus d'éliminer les agents pathogènes de l'eau potable, servent d'oxydants dans le traitement de l'eau. Ils sont également utilisés pour :

- Eliminer le goût et la couleur ;
- Oxyder le fer et le manganèse ;
- Améliorer la coagulation et l'efficacité de la filtration ;
- Prévenir la croissance des algues dans les bassins de sédimentation et les filtres,

Le chlore et ses composés sont les désinfectants les plus couramment utilisés pour le traitement de l'eau. La popularité du chlore n'est pas seulement due à son faible coût, mais aussi à son potentiel oxydant plus élevé, qui assure un niveau minimum de chlore résiduel dans tout le système de distribution et protège contre la ré-contamination microbienne. Le processus de désinfection est affecté par différents facteurs physico-chimiques et biologiques et son efficacité peut être caractérisée par la dose et l'intensité (Gates 1998). L'efficacité de la désinfection est le produit du désinfectant résiduel et du temps de contact du chlore dans l'eau. Ce produit est utilisé comme paramètre de conception de l'installation de désinfection. Les désinfectants ont des capacités variables pour inactiver ou tuer les agents pathogènes. Les types et la nature des organismes ainsi que les conditions du processus, notamment la température et le pH, ont également une incidence sur la désinfection. En général, l'inactivation des organismes augmente avec l'augmentation de l'efficacité de la désinfection. Le pH a des effets différents sur les différents désinfectants, mais en général, à un pH plus faible, le chlore est plus efficace contre les organismes que dans des conditions alcalines. En général, l'efficacité de la désinfection nécessaire à l'inactivation des micro-organismes est plus faible dans l'eau chaude que dans l'eau froide. Pour un temps de contact spécifique, les doses de chlore nécessaires à la désinfection sont donc plus élevées en hiver qu'en été. Cependant, dans la plupart des services d'eau potable, l'application d'un désinfectant (comme le chlore) en plus maintien des résidus suffisants pour éviter la réapparition des micro-organismes dans le réseau de distribution d'eau. Les résidus de désinfectant s'épuisent rapidement lorsque la température de l'eau est élevée, ce qui explique la difficulté de maintenir un niveau résiduel minimum dans les grands réseaux de distribution en été. De plus,

l'activité microbienne dans les systèmes de distribution est plus élevée dans les eaux chaudes que dans les eaux froides (Arora 1997). Pour maintenir un niveau adéquat de désinfectant résiduel dans le réseau de distribution, des doses de désinfectant plus élevées sont appliquées pendant l'été. En général, les conditions affectant l'efficacité de la désinfection et les exigences de maintien des résidus de désinfectant dans les réseaux de distribution affectent simultanément la formation de sous-produits du désinfectant.

2. Désinfection et biofilms des réseaux d'eau :

L'eau potable est généralement désinfectée afin de réduire la croissance microbienne. Des désinfectants chimiques tels que le chlore, l'oxyde de chlore, les chloramines et l'ozone, ainsi que des désinfectants non chimiques tels que la lumière ultraviolette (UV) sont fréquemment utilisés pour traiter l'eau potable (Momba *et al.* 1998). Après traitement, l'eau du réseau de distribution contient généralement un résidu de désinfectant qui limite la croissance des microbes dans l'eau. Bien qu'un résidu de désinfectant soit très efficace pour empêcher la repousse de micro-organismes vivant librement, il ne protège pas le réseau de distribution contre la recontamination par de l'eau polluée ou des biofilms (Van der Kooij *et al.* 1999). L'utilisation de désinfectants chimiques peut également entraîner la formation de sous-produits de désinfection ou favoriser la formation de substances biodégradables, qui peuvent affecter le goût et l'odeur de l'eau et servir de source d'énergie pour les microbes, favorisant ainsi la formation de biofilms dans le réseau de distribution (Van der Kooij *et al.* 2005).

Lehtola *et al.* (2005) ont montré que la désinfection par UV n'est pas efficace pour éliminer les biofilms formés sur les tuyaux en polyéthylène et en cuivre et ont constaté que le chlore élimine efficacement les biofilms dans les tuyaux en polyéthylène. Dans les tuyaux en cuivre, le chlore n'élimine les biofilms qu'au point où le chlore est introduit dans le tuyau. Les auteurs suggèrent que les différences d'efficacité du chlore entre les tuyaux en polyéthylène et en cuivre peuvent être le résultat d'une diminution plus rapide du chlore dans les tuyaux en cuivre que dans les tuyaux en polyéthylène.

Plusieurs études ont montré que la formation d'un biofilm est influencée par la concentration en désinfectant. Lu *et al.* (1999) ont observé que la demande fixe en chlore du biofilm dans les systèmes de distribution d'eau dépend de la période d'incubation et de la qualité de l'eau d'essai. Les auteurs ont en outre suggéré que le facteur le plus important pour prédire la consommation de chlore sous forme de biofilm était le carbone organique dissous biodégradable. Holden *et al.* (1995) ont montré que la concentration de chlore peut influencer la formation du biofilm, où une diminution du chlore résiduel est corrélée à une augmentation

de la concentration du biofilm. Cette conclusion est conforme à celle de Momba *et al.* (1998). Par conséquent, il est primordial que le résidu de désinfectant libre persiste dans tout le réseau de distribution d'eau afin de réduire la formation de biofilm dans les systèmes de plomberie domestiques. Cependant, le maintien du chlore libre résiduel dans tout le réseau de distribution n'élimine pas complètement les biofilms (LeChevallier *et al.* 1990). Une quantité plus importante de chlore résiduel est nécessaire pour réduire les biofilms établis. L'augmentation de la quantité de chlore peut entraîner une augmentation des sous-produits qui peuvent affecter la qualité de l'eau ainsi qu'une augmentation de la capacité des micro-organismes à l'intérieur des biofilms à résister aux désinfectants.

Les résidus de désinfectants chimiques tels que la monochloramine et le peroxyde d'hydrogène qui persistent pendant de longues périodes dans les systèmes de distribution d'eau sont plus adaptés pour réduire la croissance du biofilm que d'autres désinfectants tels que le chlore, l'ozone et les UV (Momba *et al.* 1998). La chloramine, qui est un désinfectant moins réactif que le chlore, a tendance à pénétrer plus efficacement dans le biofilm (LeChevallier *et al.* 1990). Thomas *et al.* (2004) ont montré que le dioxyde de chlore conservait une activité résiduelle plus longue que le chlore dans un système d'eau domestique à échelle pilote et qu'il était donc plus efficace pour contrôler le biofilm de *L. pneumophila*.

3. Résistance aux désinfectants :

Les communautés microbiennes dans les systèmes de distribution d'eau sont généralement contrôlées par l'utilisation de désinfectants tels que le chlore. Cependant, plusieurs études ont montré que certains microorganismes existent dans le système de distribution d'eau même en présence d'un désinfectant résiduel (Lechevallier *et al.* 1988). Cela est dû au fait que les micro-organismes développent des mécanismes de résistance à ces désinfectants en formant des biofilms, qui sont moins sensibles aux désinfectants que les microbes qui existent en tant qu'entité unique. Les deux principaux mécanismes qui seraient impliqués dans la résistance du biofilm aux désinfectants sont décrits (Costerton *et al.* 1995) :

- Les désinfectants sont incapables de pénétrer complètement les biofilms en raison de la présence d'une multicouche de cellules et de matériaux extracellulaires. Comme le désinfectant ne peut tuer que les bactéries de la couche extérieure du biofilm, les bactéries à l'intérieur du biofilm restent viables.
- La réduction des nutriments disponibles pour les cellules du biofilm entraîne une croissance lente. Des études ont montré que les bactéries en mode de croissance lente, qui

se produit lorsque les nutriments sont limités, présentent une résistance accrue aux désinfectants (Steed *et al.* 2006).

Stewart *et al.* (1992) ont montré que la limitation des nutriments influençait la capacité de *Klebsiella pneumoniae* à résister à la monochloramine inorganique. Lorsque *K. pneumoniae* était cultivé dans un milieu Ristroph dilué à 1, 10^{-2} et 10^{-3} , les concentrations de désinfectant nécessaires pour inactiver 99 % des cellules étaient respectivement de $4,6 \pm 0,2$, $9,6 \pm 0,4$ et $24 \pm 7,0$ mg/L. En outre, l'épuisement des nutriments peut modifier la chimie de la surface des cellules et, à son tour, peut contribuer à la capacité du biofilm à résister aux désinfectants. Steed *et al.* (2006) ont comparé la résistance au chlore de *Mycobacterium avium* et de *Mycobacterium* cultivées en suspension à celle d'un biofilm. Comme prévu, la résistance au chlore des cellules au sein des biofilms était deux à trois fois plus élevée que celle des cellules cultivées en suspension. Une bonne corrélation entre la résistance au chlore et l'hydrophobicité de la surface des cellules a été trouvée.

4. Sous-produits des désinfectants associés aux effets néfastes sur la santé humaine :

Les lois sur la sécurité de l'eau potable exigent que l'**Agence de protection de l'environnement des États-Unis** (*Environmental Protection Agency ou EPA*) élabore plusieurs nouvelles réglementations sur l'eau potable. Les réglementations relatives aux SPD font partie de la règle sur les sous-produits de désinfection microbienne (EPA 1999). La réglementation sur les sous-produits des désinfections est basée sur les preuves de leurs effets néfastes sur la santé humaine, en particulier le cancer et les troubles de la reproduction (Cantor *et al.* 1998; Graves *et al.* 2001). Il existe une littérature beaucoup plus riche qui fait état d'effets néfastes sur la santé par le biais d'études toxicologiques en laboratoire.

L'Organisation mondiale de la santé (1993) a publié des recommandations pour l'eau potable concernant quelques sous-produits des désinfections, notamment les trihalométhanes, les acides haloacétiques, les haloacétonitriles, le chlorite, l'hydrate de chloral, le formaldéhyde et le chlorure de cyanogène. En plus des lignes directrices individuelles sur les trihalométhanes, l'OMS a également suggéré que la somme des rapports entre les teneurs en trihalométhanes et les valeurs des lignes directrices ne dépasse pas 1 ppm. Ces lignes directrices ne sont pas officiellement reconnues aux États-Unis ou au Canada. L'EPA (2002) a fixé la teneur maximale admissible en contaminants à 0,08 mg/l pour les trihalométhanes totaux et à 0,06 mg/l pour les AHA5 (Alpha Hydroxy Acides). Le bromate et le chlorite sont également réglementés par l'EPA (2002). Santé Canada (2001) a fixé à 0,10 mg/L la concentration

maximale acceptable de trihalométhanes totaux, qui sert de ligne directrice pour les réglementations provinciales.

5. Conclusion :

La désinfection au chlore s'est avérée être une stratégie d'élimination efficace lorsque le polyéthylène est utilisé. Pour les matériaux en cuivre, l'efficacité de la désinfection au chlore était limitée au point d'introduction du chlore. Malheureusement, il existe encore des rapports contradictoires sur le meilleur désinfectant à utiliser pour prévenir les biofilms. Par conséquent, afin de contrôler le développement des biofilms dans les systèmes de plomberie domestique, il est primordial de prendre en compte l'influence des facteurs environnementaux et matériels ou de chercher d'autres produits de désinfection.

Objectif et contexte du travail

L'adhésion des microorganismes et la formation de biofilms aux supports est un phénomène indésirable pour la majorité des secteurs, notamment celui des eaux potables. La présence des microorganismes adhérents aux canalisations d'eau représente une source de contamination pouvant être l'origine de plusieurs effets dramatiques sur les canalisations, la santé publique et l'économie. Il s'agit d'un phénomène interfacial nécessitant la mise en jeu de trois intervenants: le substrat, la cellule bactérienne et le milieu environnant. Ce dernier a une grande importance car il influence fortement la contamination des eaux potables. Cependant, très peu d'études ont été menées sur l'effet de l'environnement sur l'intensité de la contamination. Par ailleurs, ces études sont généralement effectuées dans des conditions statiques loin de la réalité. De plus, la flore des eaux potables est très diverse, toutefois, et malgré que *P. aeruginosa* et *E. coli* ne sont pas des bactéries d'origine hydrique, elles peuvent intégrer les canalisations d'eau potable par différentes voies. En effet, elles peuvent être à l'origine de plusieurs problèmes de santé ou même faciliter et garantir la survie d'autres espèces plus dangereuses.

La désinfection des eaux potables a été largement atteinte par des composés chimiques ayant des effets dramatiques sur la santé. Le monde microbien est très dynamique où il développe toujours des résistances aux antibiotiques et aux désinfectants d'où la recherche d'alternatives est primordiale. La maîtrise de la qualité microbiologique de l'eau potable aura des impacts socio-économiques positifs, que ce soit au niveau de la mise en conformité vis-à-vis de la réglementation ou de la protection de la santé publique.

Pour cela, les principaux objectifs de cette thèse sont :

- **Étudier l'adhésion théorique et expérimentale de *P. aeruginosa* et *E. coli* en fonction de quelques facteurs environnementaux en conditions dynamiques;**
- **Étudier l'influence de l'hypochlorite de sodium sur l'adhésion et la cultivabilité post-adhésive de *P. aeruginosa* et *E. coli* dans des conditions dynamiques;**
- **Étudier l'effet anti-biofilm de NaCl et NaOCl en conditions statiques.**

NB : Les chapitres de la partie expérimentale sont conçus de manière à simuler des articles publiés ou soumissionnés.

Partie II : TRAVAIL EXPERIMENTALE

A- Adhésion de *P. aeruginosa* et d'*E. coli* sur des matériaux couramment utilisés en canalisation d'eau

Chapitre 1 : Adhésion prédictive de *Pseudomonas aeruginosa* et *Escherichia coli* sur des matériaux de plomberie en présence d'eau distillée et du robinet

Résumé :

L'objectif principal de ce chapitre est de se faire une idée sur les matériaux les plus appropriés pour l'installation d'un système d'eau en fonction des caractéristiques de l'eau au cours de sa traversée. À cette fin, une étude a été menée sur l'effet de deux types d'eaux (eau distillée stérile eau du robinet stérile) sur les propriétés des surfaces bactériennes et l'adhésion théorique de deux bactéries (*Pseudomonas aeruginosa* et *Escherichia coli*) sur six matériaux de plomberie. Des mesures de l'angle de contact ont été utilisées pour déterminer les énergies de surface des bactéries et des matériaux. L'estimation des interactions entre les bactéries et tous les matériaux de plomberie a été faite sur la base de la théorie XDLVO. Les résultats obtenus ont montré que l'eau a un impact évident sur le caractère donneur d'électrons et l'hydrophobicité des surfaces bactériennes. En outre, de manière générale l'adhésion prédictive a montré que tous les matériaux testés pouvaient être colonisés par *P. aeruginosa* et *E. coli* ($\Delta G_{\text{XDLVO}}^{\text{Total}} < 0$). Cependant, la colonisation devient thermodynamiquement moins favorable ou défavorable (augmentation des valeurs $\Delta G_{\text{XDLVO}}^{\text{Total}}$) avec l'eau distillée stérile et l'eau de robinet stérile respectivement. Enfin, les résultats suggèrent que le choix du matériau le plus approprié pour une installation d'eau potable peut être lié à l'eau elle-même.

1. Introduction :

L'adhésion microbienne et la formation de biofilms sur les surfaces est un phénomène général pour tous les secteurs. Elles sont à l'origine de graves problèmes médicaux, industriels et écologiques. Les matériaux abiotiques sont des sites fondamentaux pour la formation de biofilms. Ces structures provoquent la destruction des surfaces auxquelles elles sont attachées, ou constituent de graves problèmes de contamination (Wirtanen *et al.* 1996). Dans les systèmes de distribution d'eau potable, les surfaces intérieures des canalisations sont susceptibles d'être colonisées par des micro-organismes (Kilb *et al.* 2003; Wingender *et al.* 2004). De nombreuses matières plastiques pourraient être des surfaces idéales pour la contamination par les micro-organismes car elles libèrent certains composés organiques fournissant des nutriments ou des sites d'attache pour les bactéries (Kilb *et al.* 2003). La microflore aquatique originale qui n'a aucun effet sur la santé humaine forme généralement

des biofilms des systèmes d'eau. Cependant, ces biofilms peuvent cacher des espèces pathogènes qui menacent la santé publique (Flemming *et al.* 2002; Keevil & Technology 2003). En effet, une fois intégrés, ils sont protégés contre les agressions et les stress externes tels que les forces hydrodynamiques et les désinfectants. De plus, en cas de stress environnemental, elles peuvent entrer dans un état de survie dit viable mais non cultivable (VBNC) (Oliver 2005) où les bactéries deviennent incapables de se multiplier à leur rythme normal, mais elles sont toujours vivantes. Les micro-organismes pathogènes opportunistes les plus courants qu'on trouve dans les conduites d'eau potable sont *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* et *Legionella* (Keevil & Technology 2003; Eboigbodin *et al.* 2008). Ces bactéries sont très fréquentes dans les systèmes d'eau domestique par rapport aux conduites d'eau principales (Wingender *et al.* 2004).

L'adhésion et la formation d'un biofilm sont des processus très complexes qui impliquent plusieurs paramètres et interactions énergétiques, parmi lesquels les plus remarquables sont les propriétés physiques et chimiques des surfaces bactériennes et des supports (Latrache *et al.* 1994; Latrache *et al.* 2002; Hamadi *et al.* 2005; Hamadi *et al.* 2008; Mohamed *et al.* 2011; Hamadi *et al.* 2012; Hamadi *et al.* 2014). Les interactions impliquées dans ce processus sont les suivantes : Lifshitz-Van Der Waals, interactions électrostatiques (Van Loosdrecht *et al.* 1987a) et Lewis (acide-base) (Vernhet *et al.* 1995). Dans la littérature, il a été signalé que l'hydrophobie (Van Loosdrecht *et al.* 1987b), la charge de surface (Gannon *et al.* 1991; Zhao *et al.* 2007) et le caractère de donneur/accepteur d'électrons peuvent jouer un rôle important dans le processus d'adhésion. Le monde microbien de l'eau potable développe encore une résistance contre les traitements chimiques et les forces générées par l'écoulement de l'eau. C'est pourquoi une étude théorique des interactions régissant le phénomène d'adhésion et la formation de biofilms est essentielle pour prévenir et contrôler ces risques. L'adhésion prédictive des bactéries aux surfaces abiotiques en métal et en plastique a fait l'objet de plusieurs études. Toutefois, à notre connaissance, aucune recherche n'a été signalée sur l'adhésion prédictive des bactéries indicatives de la qualité de l'eau dans les conduites d'eau potable domestiques sous l'effet de la chimie de l'eau. La théorie DLVO (Derjaguin, Landau, Verwey et Overbeek) a été largement utilisée pour évaluer et expliquer les interactions totales entre une entité sphérique et une surface solide, en tenant compte des répulsions électrostatiques et des forces de Van-Der Waals (Bos *et al.* 1999). Cette théorie a ensuite été étendue pour prendre en considération les interactions acide-base (AB), y compris les propriétés de donneur d'électrons et d'accepteur d'électrons qui ont donné naissance à la théorie XDLVO. La prise en compte des interactions AB dans l'approche DLVO a permis

d'expliquer certaines divergences entre les prédictions utilisant la DLVO et les remarques expérimentales (Dong *et al.* 2002; Dorobantu *et al.* 2009). Cependant, l'application de la théorie XDLVO pour expliquer l'adhésion des bactéries ne fonctionne pas toujours, même lorsque des surfaces inertes ont été étudiées (Roosjen *et al.* 2006; Boks *et al.* 2008). Cela est probablement dû au fait que les cellules bactériennes sont des organismes complexes et vivants, contrairement aux particules colloïdales idéales (Missirlis & Katsikogianni 2007). De plus, la détermination non précise des propriétés physicochimiques des cellules pour l'estimation des énergies d'interaction rend la prédiction de l'adhésion plus difficile par l'approche XDLVO (Hamadi *et al.* 2008).

Malgré cela, l'exploitation de cette théorie est très fondamentale car elle fournit de nombreuses idées sur l'adhésion microbienne et la stabilité des biofilms (Van Wey *et al.* 2011). Par conséquent, cette théorie reste l'approche la plus appropriée pour expliquer l'adhésion expérimentale (Soumya *et al.* 2013; Sadiki *et al.* 2015). L'adhésion prédictive sur plusieurs matériaux abiotiques plastiques et métalliques basée sur la théorie XDLVO a été largement utilisée. Le but de cette étude est d'évaluer et de quantifier l'effet de l'eau sur les surfaces cellulaires, puis de se faire une idée théorique sur la capacité d'adhésion de *P. aeruginosa* et d'*E. coli* sur certains matériaux de plomberie basés sur la théorie XDLVO. Grâce à cela, il sera assez facile de choisir le matériau le plus approprié pour l'installation des réseaux de plomberie en fonction des caractéristiques chimiques de l'eau.

2. Matériels et méthodes :

2.1. Préparation des souches :

Deux souches, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC27853 et *Escherichia coli* ATCC25922 ont été utilisées dans cette étude. La préparation des cellules bactériennes commence par une incubation de 24 heures à 37°C en milieu LB (Luria-Bertani). Après 24 heures d'incubation, les cellules sont collectées par grattage et mises en suspension dans une solution de KNO₃ (0,1M), lavées par deux centrifugations successives à 5000×g pendant 15 minutes en utilisant la même solution, et remises en suspension dans deux types d'eaux (eau distillée stérile et eau du robinet stérile [pH 7.5, conductivité 400.75 µS/cm, 6.15 mg/L de chlorates, 30.55 mg/L de magnésium, 53.40 mg/L de nitrates, 102.80 mg/L de nitrites, 5.10 mg/L d'oxygène dissous, 10.25 mg/L de potassium, 19.50 mg/L de sodium, et 5.66 mg/L de sulfates]) pendant 10 heures.

Les cellules bactériennes en suspension dans les deux types d'eau stérile ont été placées sur une membrane filtrante en acétate de cellulose (0,45 µm de diamètre d'orifice) et filtrées au

moyen d'une pression négative. Les filtres sur lesquels une couche de cellules bactériennes s'est formée ont été laissés à sécher à l'air libre pendant 10 à 15 minutes.

2.2. Préparation des substrats solides :

Les matériaux testés au cours de cette étude sont le verre et divers matériaux métalliques et plastiques couramment utilisés dans la fabrication des conduites d'eau potable domestiques, à savoir l'acier inoxydable, l'acier galvanisé, le cuivre, le chlorure de polyvinyle (PVC), le polyéthylène (PE) et le polypropylène (PP). Avant le nettoyage, les supports ont été découpés pour avoir des surfaces de 2cm×2cm, puis désinfectés pour éliminer les substances organiques déposées en les trempant dans une solution d'éthanol à 70% (vol/vol) pendant 15 minutes et rincés six fois à l'eau distillée stérile.

2.3. Caractérisation physicochimique des surfaces:

Les mesures de l'angle de contact ont été effectuées par un goniomètre (GBX instruments, France) en utilisant la méthode de la goutte sessile. Une seule goutte de liquide a été placée sur chaque support. Trois à six mesures de l'angle de contact ont été effectuées pour chaque surface (bactérie ou support solide) et par rapport aux trois liquides (eau, formamide 99 %, diiodométhane 99 %). Les mesures ont été répétées 5 fois et ont fait l'objet d'une moyenne dans le temps.

Tableau 1: Caractéristiques énergétiques (mJ/m^2) des liquides purs utilisés pour mesurer les angles de contact selon Van der Mei and Busscher (1997).

Liquides	γ^{LW} ($\text{mJ}\cdot\text{m}^{-2}$)	γ^+ ($\text{mJ}\cdot\text{m}^{-2}$)	γ^- ($\text{mJ}\cdot\text{m}^{-2}$)
Water	21,6	25,4	25,4
Formamide	38,7	2,3	39,4
Diiodomethane	50,5	0,7	0,0

2.4. Calcul des énergies libres d'adhésion en utilisant la théorie XDLVO :

Les tensions de surface, à savoir les forces de Lifshitz-Van der Waals (γ^{LW}) et les interactions acidobasiques (γ^{AB}), sont calculées par le système de trois équations à partir de l'application de l'équation de Young-Dupré à chaque liquide de la sonde :

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

Dans cette équation, θ représente l'angle de contact entre le liquide et la surface. γ^- est le caractère donneur d'électrons, γ^+ représente le caractère accepteur d'électrons, tandis que γ^{LW}

est l'énergie libre de Van der-Waals. S et L représentent respectivement les surfaces solide et liquide.

L'énergie libre est donnée par l'équation :

$$\gamma_S = \gamma_S^{LW} \gamma_S^{AB} \text{ (Equation 2)}$$

Où $\gamma_S^{AB} = 2\sqrt{\gamma_S^- \gamma_L^+}$ (Equation 3) est l'énergie libre des interactions acide-base.

L'hydrophobicité de la surface a été évaluée par des mesures d'angle de contact basées sur l'approche de Van Oss (1997). Selon cette approche, le degré d'hydrophobie est exprimé par l'énergie libre entre deux entités lorsqu'elles sont immergées dans l'eau ; il est noté ΔG_{iwi} et calculé à partir des composantes énergétiques des surfaces des entités en interaction à l'aide de la formule suivante :

$$\Delta G_{iwi} = -2\gamma_{iw} = -2 \left[\left(\sqrt{\gamma_i^{LW}} - \sqrt{\gamma_w^{LW}} \right)^2 + 2 \left(\sqrt{\gamma_i^+ \gamma_i^-} + \sqrt{\gamma_w^+ \gamma_w^-} - \sqrt{\gamma_i^+ \gamma_w^-} - \sqrt{\gamma_w^+ \gamma_i^-} \right) \right] \text{ (Equation 4)}$$

La surface est considérée comme hydrophobe lorsque l'interaction entre les deux entités de cette surface est plus forte que celle entre chaque entité et l'eau, où dans ce cas $\Delta G_{iwi} > 0$. Inversement, la surface est considérée comme hydrophile si l'interaction entre les deux entités de la surface est plus faible que celle entre chaque entité et l'eau, où $\Delta G_{iwi} < 0$.

L'énergie libre totale (ΔG^{Total}) est l'interaction totale entre un organisme et un substrat par l'intermédiaire de l'eau. ΔG^{Total} est donnée par la formule suivante :

$$\Delta G^{Total} = \Delta G^{LW} + \Delta G^{AB} + \Delta G^{EL} \text{ (Equation 5)}$$

Où ΔG^{LW} est l'interaction Lifshitz-Van der Waals, ΔG^{EL} est l'interaction électrique à double couche, et ΔG^{AB} concerne les interactions acide-base. Cependant, le ΔG^{EL} est négligé lorsque les bactéries sont remises en suspension dans une solution de KNO_3 (0,1M).

La valeur de ΔG^{Total} est un indicateur qui permet de prédire si l'adhésion sera thermodynamiquement favorable ($\Delta G^{Total} < 0$) ou défavorable ($\Delta G^{Total} > 0$).

3. Résultats :

3.1. Caractérisation physicochimique des surfaces bactériennes :

Au cours de cette étude, la caractérisation des surfaces bactériennes a été réalisée par la méthode de l'angle de contact. Selon cette technique, le degré d'hydrophobicité peut être estimé quantitativement selon l'équation 4. Les résultats présentés dans le tableau 2 montrent

que les propriétés d'hydrophobie (ΔG_{iwi}), de donneur d'électrons (γ^-) et d'accepteur d'électrons (γ^+) des surfaces bactériennes sont clairement influencées par le milieu de suspension. D'une part, la suspension des souches dans l'eau distillée stérile entraîne une augmentation de l'hydrophilie où elle varie de 34,94 mJ.m^{-2} à 41,6 mJ.m^{-2} (*P. aeruginosa*) et de 23,3 mJ.m^{-2} à 29,6 mJ.m^{-2} (*E. coli*). Le caractère de donneur d'électrons a également varié de 38,2 mJ.m^{-2} à 55,5 mJ.m^{-2} (*P. aeruginosa*) et de 49 mJ.m^{-2} à 50,6 mJ.m^{-2} (*E. coli*). L'eau de robinet stérile a eu le même impact que le l'eau distillée stérile sur les surfaces des souches, sauf que l'eau de robinet stérile a provoqué une augmentation très importante de l'hydrophilie (70,20 mJ.m^{-2} : *P.aeruginosa*, 49,80 mJ.m^{-2} : *E. coli*) et du caractère donneur d'électrons (106,81 mJ.m^{-2} : *P.aeruginosa*, 74 mJ.m^{-2} : *E. coli*). Un test T a confirmé que le type d'eau a un effet significatif sur l'hydrophobicité et le caractère donneur d'électrons des deux souches au niveau 0,05 ($P < 0,05$). En revanche, le caractère accepteur d'électrons n'a pas changé de manière significative pour *P. aeruginosa*, tandis que pour *E. coli*, il a diminué de 6 mJ.m^{-2} à 2,6 mJ.m^{-2} (L'eau distillée stérile) jusqu'à zéro (00 mJ.m^{-2} (l'eau de robinet stérile). Le même test T qu'auparavant a confirmé que le caractère accepteur d'électrons n'est pas influencé par le type d'eau au niveau 0,05 ($P > 0,05$).

Tableau 2: Caractérisation physicochimique des surfaces de *P. aeruginosa* et *E. coli* en suspension dans différents eaux. Les valeurs entre parenthèses () indiquent les écart-types.

Souches bactériennes	Contact angle (°)			Surface tensions (mJ/m ²)			ΔG_{iwi} (mJ/m ²)
	Θ Diiodomethane	Θ Formamide	Θ Water	γ^{LW}	γ^+	γ^-	
<i>P. aeruginosa</i> intacte	81 (1,6)	74 (1,2)	60 (0,5)	16,1	1,8	38,2	34,94
<i>P. aeruginosa</i> dans l'eau distillée stérile	53,00 (1,06)	36,30 (0,82)	27,6 (0,23)	32,60	0,80	55,50	41,60
<i>P. aeruginosa</i> dans l'eau de robinet stérile	64,20 (1,64)	65,4 (1,54)	19,0 (0,63)	26,11	0,98	106,81	70,20
<i>E. coli</i> intacte	71 (0,3)	20 (1,3)	16 (1,7)	22	6	49	23,3
<i>E. coli</i> dans l'eau distillée stérile	57,50 (0,7)	26,20 (0,38)	24,3 (1,31)	30,00	2,60	50,60	29,60
<i>E. coli</i> dans l'eau de robinet stérile	58,40 (0,95)	48,70 (0,14)	23,50 (0,61)	29,50	0,00	74,00	49,80

Notes : Caractérisation physicochimique des surfaces bactériennes de *P. aeruginosa* ATCC27853. Entre parenthèses () : écart-types.

3.2. Caractérisation physicochimique des surfaces de supports abiotiques :

Les supports solides ont été caractérisés de la même manière que les surfaces bactériennes. Le tableau 3 expose la caractérisation physicochimique des supports testés. Les résultats montrent que tous les supports testés sont hydrophobes ($\Delta G_{iwi} < 0$), sauf le verre. En effet, ces résultats sont en accord avec ceux d'Assaidi et al. (2018). En outre, la plupart des matériaux sont des donneurs d'électrons modérés ($\gamma_{Gal. steel}^- = 15,69 \text{ mJ.m}^{-2}$, $\gamma_{Copper}^- = 13,10 \text{ mJ.m}^{-2}$, $\gamma_{PVC}^- = 11,41 \text{ mJ.m}^{-2}$) et des accepteurs d'électrons faibles ($\gamma_{S. steel}^+ = 0,51 \text{ mJ.m}^{-2}$, $\gamma_{PEX}^+ = 0,06 \text{ mJ.m}^{-2}$, $\gamma_{PPR}^+ = 0,04 \text{ mJ.m}^{-2}$), tandis que le verre est un accepteur d'électrons élevé ($\gamma_{Glass}^+ = 40,36 \text{ mJ.m}^{-2}$).

Tableau 3. Caractérisation physicochimique des matériaux de plomberie sélectionnés pour cette étude. Les valeurs entre parenthèses () indiquent les écart-types.

Materials	Contact angle (°)			Surface tensions (mJ/m ²)			ΔG_{iwi} (mJ/m ²)
	Θ Diiodomethane	Θ Formamide	Θ Water	γ^{LW}	γ^+	γ^-	
Verre	46,4 (1,4)	45,8 (3,3)	36,5 (3,1)	36,3	40,36	1,54	15,00
Acier inoxydable	40,9 (2,1)	69,7 (1,2)	82,1 (1,9)	40,1	0,51	6,9	-49,60
Acier galvanisé	93,1 (1,5)	115,7 (2,1)	102,5 (1,9)	11,53	2,33	15,69	-17,01
Cuivre	68,1 (1,1)	79,4 (1,5)	85,9 (1,2)	22,24	0,082	13,10	-28,01
PVC	91,8 (0,7)	76,2 (1,4)	83,3 (0,9)	12,01	3,03	11,41	-2,50
PEX	42,3 (1,4)	58,0 (2,0)	79,1 (3,2)	38,40	0,06	6,96	-51,10
PPR	64,0 (2,0)	80,0 (2,0)	103 (1,7)	26,22	0,04	0,35	-86,75

3.3. Adhésion prédictive de *P. aeruginosa* et *E. coli* aux supports :

L'utilisation de modèles théoriques pour prédire l'adhésion microbienne a déjà été signalée, mais très peu d'études ont proposé de travailler avec l'approche XDLVO (Sharma *et al.* 2003; Hamadi *et al.* 2008). Le tableau 4 représente la quantification de l'adhésion théorique à l'aide de l'approche XDLVO. L'objectif de l'approche XDLVO est de quantifier théoriquement la probabilité d'adhésion d'une souche bactérienne à une surface en calculant l'entité ΔG_{XDLVO}^{Total} à l'aide de l'équation 5. La valeur positive de ΔG_{XDLVO}^{Total} indique que l'adhésion est thermodynamiquement défavorable. Inversement, l'adhésion est considérée comme favorable si la valeur de ΔG_{XDLVO}^{Total} est négative. À partir de l'équation 5, les énergies d'adhésion interfaciale d'*E. coli* et *P. aeruginosa* sur différents matériaux ont pu être calculées (tableau

4) ainsi que les contributions correspondant aux interactions Lifshitz-Van Der Waals et Acid-Base. Au cours de cette étude, trois milieux liquides (milieu LB, Eau distillée stérile, Eau de robinet stérile) ont été testés pour leurs effets sur les propriétés physico-chimiques des surfaces bactériennes. Le tableau 4 montre un effet très clair du type d'eau sur les propriétés énergétiques des surfaces bactériennes et par conséquent sur la valeur de ΔG_{XDLVO}^{Total} . De plus, les résultats montrent que l'adhésion devient généralement défavorable ou plus défavorable en raison de l'augmentation des valeurs de ΔG_{XDLVO}^{Total} observées avec l'eau distillée stérile et l'eau distillée stérile. Selon le tableau 4 le matériau qui devrait être le plus défavorable à l'adhésion est le cuivre $\Delta G_{P. aeruginosa}^{Total} = 38,67 \text{ mJ.m}^{-2}$ & $\Delta G_{E. Coli}^{Total} = 19,29 \text{ mJ.m}^{-2}$, suivi par l'acier galvanisé ($\Delta G_{P. aeruginosa}^{Total} = 29,56 \text{ mJ.m}^{-2}$ & $\Delta G_{E. Coli}^{Total} = 16,01 \text{ mJ.m}^{-2}$), et PEX ($\Delta G_{P. aeruginosa}^{Total} = 29,77 \text{ mJ.m}^{-2}$ & $\Delta G_{E. Coli}^{Total} = 7,35 \text{ mJ.m}^{-2}$), tandis que le verre reste le plus favorable à l'adhésion ($\Delta G_{P. aeruginosa}^{Total} = -45,97 \text{ mJ.m}^{-2}$ & $\Delta G_{E. Coli}^{Total} = -49,88 \text{ mJ.m}^{-2}$).

Tableau 4. Énergie libre totale ΔG^{Total} ($\text{mJ}\times\text{m}^{-2}$) d'adhésion théorique des souches aux matériaux de plomberie testés.

souches	Energies libres d'interaction ΔG_{XDLVO}^{Total} (mJ.m^{-2})						
	Matériaux de plomberie						
	Verre	Acier INOX	Acier Gal.	Cuivre	PVC	PEX	PPR
<i>P. aeruginosa</i> intacte	-29,44	-6,02	-1,69	0,25	-6,41	-5,04	-21,49
<i>P. aeruginosa</i> dans l'eau distillée stérile	-40,83	-2,90	10,52	10,83	4,51	-0,26	-14,77
<i>P. aeruginosa</i> dans l'eau de robinet stérile	-45,97	24,59	29,56	38,67	22,49	29,77	14,62
<i>E. coli</i> intacte	-25,01	4,16	8,18	11,13	4,31	6,06	-4,31
<i>E. coli</i> dans l'eau distillée stérile	-33,84	-1,55	9,13	9,71	4,12	0,68	-11,41
<i>E. coli</i> dans l'eau de robinet stérile	-49,88	3,69	16,01	19,29	8,47	7,35	-11,31

4. Discussion :

La principale cause de contamination des réseaux d'eau sont les biofilms (Berry *et al.* 2006). Ces structures sont généralement situées à l'interface entre une surface et une phase aqueuse (Donlan 2002; Hall-Stoodley *et al.* 2004). Certains types de matériaux de tuyauterie peuvent favoriser la formation de biofilms en raison de la libération de certains sous-produits qui fournissent les nutriments nécessaires aux microorganismes (Rogers *et al.* 1994). On a constaté que des bactéries presque cultivées, y compris des bactéries pathogènes opportunistes

identifiées dans les réseaux d'eau publics, sont associées à la surface et peuvent coloniser le biofilm sortant. *P. aeruginosa* et *E. coli* peuvent augmenter leurs résistances et s'adapter à des conditions environnementales stressantes et aux biocides. Il est généralement connu que les caractéristiques et les types de matériaux de plomberie peuvent affecter l'adhésion et la formation de biofilms bactériens dans les systèmes de distribution d'eau (Colbourne 1985). Une multitude d'ouvrages ont ainsi permis de caractériser l'adhésion des bactéries d'origine hydrique aux matériaux de plomberie. Toutefois, à notre connaissance, aucune étude n'a porté sur l'effet de l'eau sur les propriétés des surfaces bactériennes.

Au cours de cette étude, nous avons tenté de voir l'effet de deux types d'eaux sur la physico-chimie des surfaces bactériennes, puis nous avons proposé une approche pour choisir le bon matériau pour la construction d'un système d'eau domestique. Les différences entre les propriétés physico-chimiques observées sont probablement dues à la composition chimique des milieux de suspension et/ou des surfaces bactériennes. De nombreux travaux ont rapporté que l'hydrophobicité est liée à la concentration d'azote, de protéines ou de carbone sous forme d'hydrocarbures, alors que l'hydrophilie est liée à la présence d'oxygène et de polysaccharides exposés sur les surfaces bactériennes (Dufrene & Rouxhet 1996; Latrache *et al.* 2002). De plus, la différence de degré d'hydrophobie est liée à la composition chimique, en particulier à la structure externe de la composition moléculaire de la surface bactérienne (El Ghmari *et al.* 2002; Latrache *et al.* 2002; Hamadi *et al.* 2005). Cela peut expliquer les différences d'hydrophobie observées entre *E. coli* et *P. aeruginosa*. En outre, l'augmentation de l'hydrophilie des deux souches est probablement due à l'adsorption et à la fixation de molécules de chaux ($CaCO_3$) sur les surfaces bactériennes. La relation entre la composition chimique de la surface bactérienne et sa charge a été largement étudiée par plusieurs recherches (Mozes *et al.* 1989; Latrache *et al.* 1994; Van der Mei & Busscher 1997; Boonaert *et al.* 2000). Les groupes de phosphate avaient une fonction importante dans la génération des charges de surface, et le point isoélectrique élevé est lié à la concentration élevée de N/C comme l'ont rapporté certaines études (Mozes *et al.* 1989; Latrache *et al.* 1994). Les groupes carboxyles sont également des déterminants de la charge de la surface des bactéries (Hamadi *et al.* 2005; Hamadi *et al.* 2008). Le caractère donneur d'électrons varie également en fonction du type de milieu de suspension utilisé. Les propriétés acido-basiques sont importantes pour le phénomène d'adhésion (Henriques *et al.* 2004; Hamadi *et al.* 2005; Hamadi *et al.* 2009). Généralement, ces forces sont générées par les groupes fonctionnels exposés à la surface, à savoir les groupes carboxyliques, phosphoriques et aminés (Hong *et al.* 2006). En effet, Hamadi *et al.* (2012) ont trouvé une bonne corrélation entre le caractère donneur d'électrons et

le rapport P/C de la surface d'*E. coli*. Pour nos résultats, nous avons observé une augmentation du caractère donneur d'électrons, en particulier avec l'eau de robinet stérile. Cela est probablement dû à la prédominance des phospholipides et des lipopolysaccharides et à l'adsorption de groupes chargés négativement tels que le groupe carboxyle $RCOO^-$, le groupe phosphate PO_4 et le sulfure group SO_4^{2-} . Cependant, l'azote (N) a joué un rôle important dans la diminution du caractère accepteur d'électrons, car Hamadi *et al.* (2012) ont trouvé une corrélation négative ($R^2=-0,82$) entre le caractère d'accepteur d'électrons et le rapport N/C pour *E. coli*. Dans nos résultats, nous avons noté une disparition du caractère d'accepteur d'électrons d'*E. coli* lorsqu'il est en suspension dans l'eau de robinet, ce qui est probablement dû à l'adsorption de composés azotés, tels que les nitrates (NO_3^-) que l'on trouve habituellement dans l'eau potable. En outre, le caractère d'accepteur d'électrons augmente avec la concentration de polysaccharides à la surface de la bactérie (Hamadi *et al.* 2012). Nos données ont montré une diminution de cette caractéristique, ce qui suggère que l'adsorption des ions et/ou molécules d'eau chargés négativement et la neutralisation des groupes acides sont responsables de ces forces, en particulier les fonctions O=C et la diminution du rapport N/C.

Un nombre considérable de travaux ont été réalisés sur l'adhésion prédictive des microorganismes aux surfaces abiotiques sur la base de la théorie XDLVO. Cependant, pour la première fois, un examen de l'effet de l'eau sur l'installation d'un système d'eau potable a été réalisé sur la base de cette théorie. Les résultats montrent que le choix du matériau le plus hygiénique pourrait être lié à la teneur en ions et en molécules de calcaire dissous dans l'eau. En outre, l'étude actuelle suggère également que l'installation d'un réseau d'eau hygiénique nécessite une étude de la chimie de l'eau. En termes d'analyse des risques, il est possible de classer les risques de contamination de ces matériaux dans l'ordre suivant :

Verre > PPR > PVC > Acier S. 316L > PEX > Acier galvanisé > cuivre.

5. Conclusion :

Pour la première fois, une adhésion théorique de deux souches modèles de qualité de l'eau potable à des matériaux de plomberie sous l'influence de l'eau a été réalisée. Les résultats obtenus ont montré que les composés chimiques de l'eau potable avaient un grand effet sur les surfaces cellulaires. L'adhésion théorique est à son tour influencée par le type de matériau et surtout par les propriétés de surface des souches bactériennes. Cet apport théorique est d'une grande importance puisqu'il permet de choisir les matériaux les plus hygiéniques. Cette étude

principalement suggère que le choix du matériau de plomberie le plus hygiénique pourrait dépendre de la teneur en ions et en calcaire. Par conséquent, l'installation d'un système d'eau hygiénique nécessite une étude de la chimie de l'eau. En fin, il reste à vérifier l'effet de l'eau et ces composés chimiques sur l'adhésion expérimentale de *P. aeruginosa* et *E. coli* en conditions dynamiques.

Chapitre 2 : Relation entre la composition chimique de l'eau potable et la capacité adhésive de *P. aeruginosa* et d'*E. coli* en conditions de turbulence

Résumé :

Le but de ce chapitre est d'évaluer l'effet de l'eau sur les propriétés physico-chimiques de surface et l'adhésion de deux souches (*Pseudomonas aeruginosa* et *Escherichia coli*) au verre, au PVC et à l'acier inoxydable. *P. aeruginosa* et *E. coli* ont été exposés à deux types d'eau stériles (eau distillée et eau du robinet) pendant trois heures. Des mesures d'angle de contact ont été utilisées pour évaluer les propriétés de surface des deux souches et des coupons de matériaux. L'hydrophobicité et les propriétés de donneur d'électrons des souches bactériennes semblent augmenter lorsqu'elles sont exposées à l'eau de robinet stérile, tandis que la propriété d'accepteur d'électrons n'a pas été clairement modifiée. Les tests d'adhérence ont été effectués dans un circuit d'eau créant des conditions de turbulence. Le nombre de cellules adhérentes a été déterminé après leur détachement des coupons. Les résultats ont montré que le type d'eau qui affecte l'adhésion des deux souches devient plus fort pour l'eau du robinet que pour l'eau distillée. En outre, une corrélation entre les propriétés de surface et l'adhésion suggère que cette dernière est principalement régie par l'hydrophobie et la propriété de donneur d'électrons.

1. Introduction :

L'eau potable est un produit complexe caractérisé par sa composition diverse et dépendante. Lors de son transfert au consommateur, l'eau entre en contact avec les matériaux de la tuyauterie. Les réseaux d'eau potable domestiques sont une source majeure de contamination pour la santé publique, car ils sont probablement colonisés par des biofilms mono et multi-espèces. La contamination de l'eau peut se produire à partir de la flore en suspension. Cependant, les biofilms immobilisés sont la principale source de contamination de l'eau potable (Jefferson 2004; Abdel-Nour *et al.* 2013). En effet, Flemming *et al.* (2002), ont rapporté que 95% de la flore aquatique est fixée à la surface interne des conduites d'eau. Il apparaît donc que le biofilm est le mécanisme de survie utilisé par les bactéries contre tous les stress environnementaux (Aparna & Yadav 2008). Il est bien connu que les biofilms sont des structures très complexes et difficiles à éradiquer. En revanche, la prévention semble être l'approche la plus appropriée pour contrôler la bio-adhésion et la formation de biofilms. Ce phénomène est toujours précédé d'une étape d'adhésion. Nous pensons que les événements qui précèdent l'adhésion sont les clés pour comprendre ce phénomène, et donc pour le prévenir.

Une fois qu'une surface est exposée à un milieu aqueux de composition chimique variable, ses propriétés sont très souvent modifiées par l'adsorption de molécules organiques et/ou inorganiques du fluide environnant (Chmielewski *et al.* 2003; Somers & LEE WONG 2004; Sheng *et al.* 2008; Shakeri Fard 2010). Le phénomène d'adhésion dépend de plusieurs propriétés physico-chimiques, à savoir les propriétés énergétiques de la bactérie et des surfaces du substrat. Or, le milieu environnant joue un rôle crucial dans le processus d'adhésion. L'eau potable est un milieu hétérogène caractérisé par sa matrice chimique diverse et dépendante, principalement composée de calcaire ((Al^{3+} , Ca^{2+} , Fe^{2+} , Mg^{+} , Mn^{2+} , K^{+} , Na^{+} , NO_3^{-} , PO_4^{3+} , SO_4^{2-}), de gaz dissous (O_2 , CO_2), de plusieurs molécules organiques et de micro-organismes de différentes catégories. Dans un environnement aqueux tel que les réseaux d'eau potable, il est très probable qu'une fois qu'une bactérie entre en contact avec l'eau, sa surface est immédiatement recouverte de nouveaux composés, notamment des ions. Par conséquent, cette adsorption et cette fixation de nouveaux agents chimiques sur les surfaces bactériennes modifieraient probablement les propriétés de surface des bactéries ainsi que leur capacité à se fixer sur les surfaces intérieures des conduites d'eau. En effet, afin de comprendre et de contrôler pleinement l'adhésion dans les systèmes d'eau, il est d'abord nécessaire de se concentrer sur les événements qui la précèdent. Une multitude d'études ont testé la bio-adhésion des bactéries d'origine hydrique à la surface intérieure des tuyaux. Cependant, à notre connaissance, aucun travail n'a étudié cette adhésion basée sur l'adsorption des composants chimiques de l'eau à la surface des microorganismes. Le mécanisme d'adsorption dynamique doit être établi. En particulier, l'effet des ions et des molécules de l'eau qui s'adsorbent et se lient aux surfaces bactériennes doit être étudié plus en profondeur. En effet, l'étude de l'impact des changements physico-chimiques bactériens sur l'adhésion dans des conditions dynamiques semble plus importante. Ainsi, l'importance de cette étude vient du fait que nous testons deux types d'eau avec une probable différence dans leurs compositions chimiques. Par conséquent, les principaux objectifs de cette étude sont l'évaluation des propriétés de la surface des bactéries lorsqu'elles sont en suspension dans l'eau et l'effet sur l'adhésion. Ensuite, il sera tout à fait possible de se faire une idée sur le taux de contamination en fonction de la chimie de l'eau. *Pseudomonas aeruginosa* et *Escherichia coli* ont été testées dans cette étude car elles sont connues comme deux bactéries modèles pour la qualité de l'eau potable et leur nature pathogène. L'acier inoxydable et le PVC ont été utilisés au cours de cette étude car ils sont largement utilisés dans la fabrication des conduites d'eau potable domestiques.

2. Matériel et méthodes :

2.1. Préparation des suspensions bactériennes :

Les souches utilisées dans cette étude sont *Pseudomonas aeruginosa* ATCC27853, et *Escherichia coli* ATCC25922. La préparation des cellules bactériennes pour tous les tests commence par une incubation des bactéries pendant 24 heures à 37°C dans un milieu solide LB (Luria Bertani). Ensuite, les cellules sont grattées et mises en suspension dans une solution d'eau physiologique (9g/L NaCl) et lavées deux fois par centrifugation (5000×g pendant 15 min) par la même solution.

2.2. Nettoyage des coupons :

Les matériaux utilisés dans cette étude sont le verre, le PVC et l'acier inoxydable. Avant le nettoyage, les supports ont été découpés pour avoir des surfaces de 1cm². Les coupons ont été trempés pendant 15 minutes dans de l'éthanol à 70 % (vol/vol), puis rincés trois à six fois avec de l'eau distillée stérile et passés à l'autoclave à 120 °C pendant 15 minutes.

2.3. Exposition des bactéries et des supports aux eaux :

Après avoir été lavées deux fois par centrifugation, les souches sélectionnées ont été remises en suspension dans de l'eau distillée stérile ou de l'eau du robinet stérile pendant 3 heures. Les cellules bactériennes ont ensuite été placées sur une membrane filtrante en acétate de cellulose (0,45 µm de diamètre d'orifice) et filtrées au moyen d'une pression négative (Busscher *et al.* 1984). Les filtres, sur lesquels une couche de cellules bactériennes s'est formée, ont été laissés à sécher à l'air libre pendant 10 à 15 minutes. De même, les supports ont été mis en contact avec de l'eau pendant trois heures, puis rincés deux à trois fois avec de l'eau distillée stérile et laissés à sécher à l'air libre.

2.4. Caractérisation physicochimique d'une surface :

Les mesures de l'angle de contact ont été effectuées par un goniomètre (GBX instruments, France) par la méthode de la goutte sessile. Une à trois gouttes d'un liquide ont été placées sur chaque support solide ou sur une couche de cellules bactériennes (décrites au point 2.2). Trois à six mesures d'angle de contact ont été effectuées pour toutes les sondes de liquides, y compris l'eau, le formamide ou le diiodométhane.

Les composants Lifshitz-Van der Waals (γ^{LW}), donneur d'électrons (γ^-) et accepteur d'électrons (γ^+) de la surface bactérienne, du verre, de l'acier inoxydable et du PVC ont été

estimées selon l'approche proposée par Van Oss *et al.* (1988). Dans cette approche, l'angle de contact (θ) peut être exprimé comme suit :

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

Les composants acido-basiques de Lewis peuvent être identifiées par :

$$\gamma_S^{AB} = 2\sqrt{\gamma_S - \gamma_{L^+}}$$

L'approche de Van Oss *et al.* (1988) a également été utilisée au cours de cette étude pour déterminer l'hydrophobicité de surface. Cette approche explique l'hydrophobicité comme l'interaction d'énergie libre entre deux entités de ce matériau lorsqu'il est immergé dans l'eau, elle est notée ΔG_{iwi} . La surface est considérée comme hydrophobe ou hydrophile si cette énergie libre est respectivement négative ($\Delta G_{iwi} < 0$) ou positive ($\Delta G_{iwi} > 0$). ΔG_{iwi} peut être estimée grâce aux tensions des surfaces des entités en interaction, selon :

$$\Delta G_{iwi} = -2\gamma_{iw} = -2 \left[\left(\sqrt{\gamma_i^{LW}} - \sqrt{\gamma_w^{LW}} \right)^2 + 2 \left(\sqrt{\gamma_i^+ \gamma_i^-} + \sqrt{\gamma_w^+ \gamma_w^-} - \sqrt{\gamma_i^+ \gamma_w^-} - \sqrt{\gamma_w^+ \gamma_i^-} \right) \right]$$

2.5. Expériences d'adhésion :

Douze millilitres de chaque suspension bactérienne (10^8 CFU/ml) ont été ajoutés à un système d'eau où deux litres d'eau (eau distillée stérile ou eau du robinet stérile) sont en circulation.

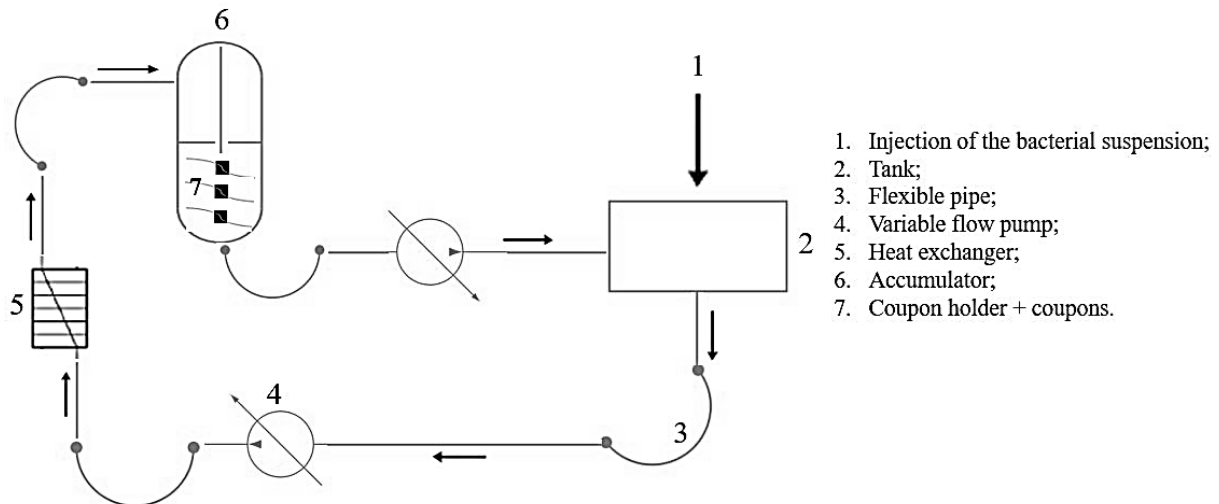


Figure 5: Schéma du circuit d'eau conçu au laboratoire créant la turbulence.

Après trois heures de circulation, les coupons ont été récupérés et rincés doucement trois fois avec de l'eau distillée stérile afin d'éliminer les bactéries libres. Chaque support a été immergé dans un tube à essai avec 10 ml d'eau physiologique stérile (NaCl : 9g/l). Les cellules adhérentes ont été détachées de chaque support à l'aide d'un bain de sonication pendant trois minutes. Le nombre de cellules adhérentes a été estimé par dénombrement sur milieu solide (LB).

3. Résultats

3.1. Caractérisation physicochimique des surfaces des supports et des souches bactériennes

:

Le tableau 5 représente la caractérisation physico-chimique des surfaces des matériaux. Le tableau 6 illustre également les caractérisations physico-chimiques des surfaces des souches bactériennes après avoir été exposées aux deux types d'eaux stériles à 25°C. L'hydrophobicité de la surface peut être déduite directement à partir de l'angle de contact avec l'eau (Oliveira *et al.* 2001). Le degré absolu d'hydrophobicité d'une surface (I) par rapport à l'eau (W) peut être déterminé (van Oss & science 1997). Selon l'approche de (van Oss & science 1997), les surfaces de *P. aeruginosa* et *E. coli* sont hydrophiles ($\Delta G_{iwi} > 0$), fortement donneuses d'électrons, et faiblement accepteur d'électrons. De même, le verre est une surface hydrophile ($\Delta G_{iwi} = 15 \text{ mJ/m}^2$), fortement accepteur d'électrons ($\gamma^+ = 40,36 \text{ mJ/m}^2$) et faiblement donneuse d'électrons ($\gamma^- = 1,54 \text{ mJ/m}^2$). En revanche, l'acier inoxydable et le PVC sont des surfaces hydrophobes ($\Delta G_{iwi} = -49,60 \text{ mJ/m}^2$; $\Delta G_{iwi} = -25,50 \text{ mJ/m}^2$), des donneurs d'électrons modérés ($\gamma^- = 6,9 \text{ mJ/m}^2$; $\gamma^- = 11,41 \text{ mJ/m}^2$) et des accepteurs d'électrons faibles ($\gamma^+ = 0,51 \text{ mJ/m}^2$; $\gamma^+ = 3,03 \text{ mJ/m}^2$). L'exposition de ces supports aux différents types d'eaux n'a apparemment aucun effet sur la physico-chimie de leur surface.

Tableau 5. Caractérisation physicochimique des surfaces des supports intacts et après immersion dans les deux eaux.

	Angle de contact (°)			Energies de surfaces (mJ/m ²)			ΔG_{iwi} (mJ/m ²)
	Θ Diiodomethane	Θ Formamide	Θ Water	γ^{LW}	γ^+	γ^-	
Substrats							
Verre	46,4 (1,4)	45,8 (3,3)	36,5 (3,1)	36,3	40,36	1,54	15,00
Verre Dans l'eau distillée stérile	47,2 (1,6)	44,9 (1,5)	34,7 (2,1)	35,8	39,3	1,81	17,2
Verre Dans l'eau de robinet stérile	47,9 (1,2)	44,1 (1,8)	34,1 (2,6)	35,11	39,21	1,78	17,5
Acier INOX	40,9 (2,1)	69,7 (1,2)	82,1 (1,9)	40,1	0,51	6,9	-49,60
Acier INOX Dans l'eau distillée stérile	40,1 (1,3)	70,2 (2,1)	80,3 (3,1)	41,2	1,01	6,81	-38,4
Acier INOX Dans l'eau de robinet stérile	41,3 (1,7)	70,0 (1,8)	80,6 (2,5)	41,5	1,02	6,88	-38,3
PVC	91,8 (0,7)	76,2 (1,4)	83,3 (0,9)	12,01	3,03	11,41	-25,5
PVC Dans l'eau distillée stérile	93,1 (1,8)	79,1 (1,5)	85,5 (1,2)	14,13	3,5	12,11	-16,6
PVC Dans l'eau de robinet stérile	93,7 (1,2)	80,0 (2,4)	86,2 (1,7)	14,5	4,1	13,8	-13,1

Notes : γ^{LW} : Les composantes de la tension superficielle de Lifshitz-Van der Waals. γ^- : Composant donneur d'électrons de la tension superficielle. γ^+ : Composant accepteur d'électrons de la tension superficielle. γ^{AB} : Composante de Lewis de la tension superficielle acide-base. ΔG_{iwi} : Énergie libre de l'interaction entre deux entités d'un matériau lorsqu'il est immergé dans l'eau. () : écart-types.

Des changements très nets ont été révélés sur les propriétés des surfaces bactériennes après l'exposition aux deux types d'eau. Les caractéristiques physico-chimiques de la surface sont généralement plus fortes lorsque les souches sont exposées à l'eau du robinet stérile. Au contraire, la surface bactérienne subit moins de changements au contact de l'eau distillée stérile. Nous avons constaté que l'eau du robinet stérile entraîne une augmentation significative des hydrophilicités ((*P. a*) 70,20 mJ/m², (*E. c*) 49,80 mJ/m²) et des propriétés de donneur d'électrons ((*P. a*) 106,81 mJ/m², (*E. c*) 74,00 mJ/m²) des surfaces des deux souches, tandis que le caractère accepteur d'électrons n'a pas été affecté. Il est clair que le degré de modification est lié au type d'eau. Ces modifications sont probablement dues aux différences de composition chimique de chaque type d'eau. En particulier, nous pouvons suggérer que le niveau de modifications de la surface dépend des différences de concentrations de calcaire et d'ions dissous dans l'eau. Par conséquent, il est possible d'établir une relation entre ces concentrations et les propriétés de surface des souches utilisées dans cette étude.

Tableau 6. Caractérisation physicochimique des surfaces des souches après suspension dans les deux eaux.

Souches	Angle de Contact (°)			Energies de Surface (mJ/m ²)			ΔG_{iwi} (mJ/m ²)
	Θ	Θ	Θ	γ^{LW}	γ^+	γ^-	
	Diiodométhane	Formamide	Eau				
<i>P. aeruginosa</i> Dans l'eau distillée stérile	53,00 (1,06)	36,30 (0,82)	27,6 (0,23)	32,60	0,80	55,50	41,60
<i>P. aeruginosa</i> Dans l'eau de robinet stérile	64,20 (1,64)	65,4 (1,54)	19,0 (0,63)	26,11	0,98	106,81	70,20
<i>E. coli</i> Dans l'eau distillée stérile	57,50 (0,7)	26,20 (0,38)	24,3 (1,31)	30,00	2,60	50,60	29,60
<i>E. coli</i> Dans l'eau de robinet stérile	58,40 (0,95)	48,70 (0,14)	23,50 (0,61)	29,50	0,00	74,00	49,80

3.2. Effet de l'eau sur l'adhésion des souches bactériennes sur le verre, le PVC et l'acier inoxydable :

L'adhésion de *P. aeruginosa* et d'*E. coli* dans les conditions décrites ci-dessus est illustrée respectivement dans les figures 6 et 7. Quel que soit le type d'eau qui circule dans le réseau, les deux souches bactériennes ont la capacité d'adhérer à tous les matériaux étudiés. Plus précisément, l'adhésion a été fortement stimulée par l'eau du robinet stérile dans des conditions de turbulence où l'acier inoxydable et le PVC étaient les plus colonisés.

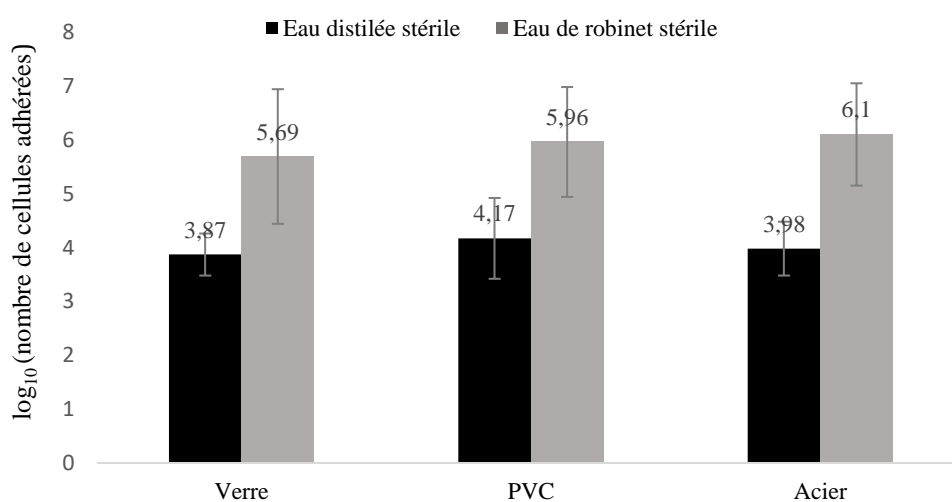


Figure 6: Nombre de cellules adhérentes de *P. aeruginosa* en fonction de l'eau. Les barres d'erreur représentent les écarts types du comptage des bactéries.

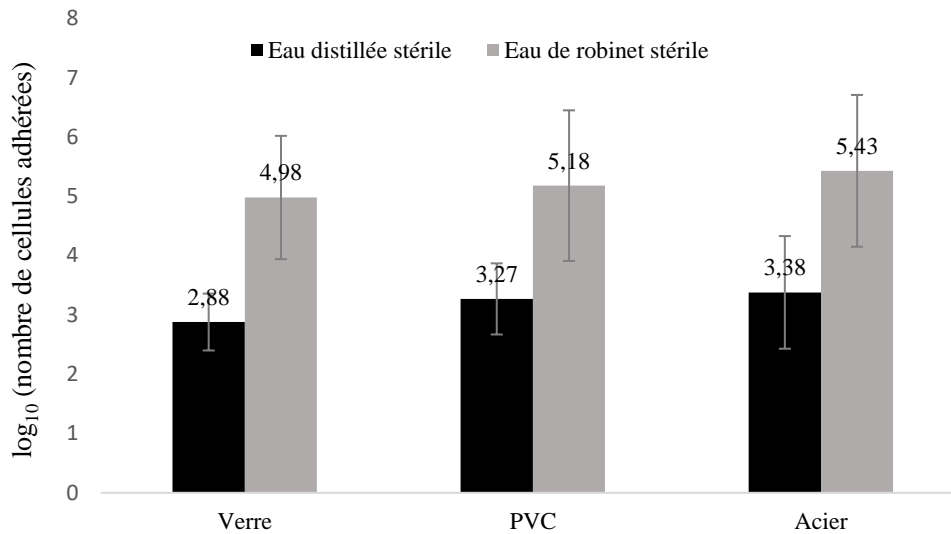


Figure 7. Nombre de cellules d'*E. coli* adhérentes en fonction de l'eau. Les barres d'erreur représentent les écarts types du comptage des bactéries.

4. Discussion :

Tout d'abord, l'objectif était de quantifier et d'expliquer les propriétés physico-chimiques de *Pseudomonas aeruginosa* et d'*Escherichia coli* après avoir été exposées à deux types d'eaux pendant trois heures. L'eau du robinet améliore significativement certaines caractéristiques de surface des deux souches bactériennes, mais pas au même degré (tableau 6). Les écarts observés sont très probablement dus à la composition de l'eau et aussi à la structure moléculaire des surfaces bactériennes. De nombreuses études ont montré que l'hydrophobicité est liée à la présence d'azote, de protéines ou de carbone sous forme d'hydrocarbures, alors que l'hydrophilie est liée à l'existence d'oxygène et de polysaccharides exposés à la surface des bactéries (Cowan *et al.* 1992; Cuperus *et al.* 1993; Dufrene & Rouxhet 1996; Latrache *et al.* 2002). Les différences physico-chimiques observées entre *E. coli* et *P. aeruginosa* pourraient être dues à la composition chimique des parois bactériennes, en particulier à la structure moléculaire externe, comme le rapportent certaines études (El Ghmari *et al.* 2002; Latrache *et al.* 2002; Hamadi *et al.* 2005). D'autre part, l'augmentation de l'hydrophilie des deux souches pourrait être le résultat de l'adsorption et de la fixation de certains composés de l'eau sur ces parois bactériennes.

La relation entre la structure chimique de la surface bactérienne et son énergie a été largement étudiée par différents scientifiques (Mozes *et al.* 1988; Mozes *et al.* 1989; Latrache *et al.* 1994; Van der Mei & Busscher 1997; Boonaert *et al.* 2000). Par exemple, un certain nombre d'études de recherche (Mozes *et al.* 1988; Mozes *et al.* 1989; Latrache *et al.* 1994) ont

rapporté que les groupes de phosphate jouent un rôle important dans la création d'énergie de surface. En outre, les groupes carboxyles sont en même temps décisifs pour l'énergie des surfaces microbiennes (Boonaert *et al.* 2000; Hamadi *et al.* 2005; Hamadi *et al.* 2008). La propriété acido-basique est également pertinente pour le phénomène d'adhésion (Henriques *et al.* 2004; Hamadi *et al.* 2005; Hamadi *et al.* 2008). Selon les résultats, le type d'eau affecte le caractère donneur d'électrons (base) des deux souches. Habituellement, ce caractère est généré par certains groupes fonctionnels exposés à la surface, à savoir les groupes carboxyliques, phosphoriques et aminés (Hong *et al.* 2006). En fait, Hamadi *et al.* (2012) ont trouvé une forte corrélation positive entre le caractère de donneur d'électrons et le rapport P/C de *E. coli*. Les résultats obtenus ont montré une augmentation du caractère donneur d'électrons avec de l'eau du robinet stérile, ce qui pourrait être lié à l'adsorption de certains groupes chargés négativement que l'on trouve parfois dans l'eau potable. D'autre part, l'azote (N) joue un rôle important dans la diminution de la propriété d'accepteur d'électrons (acide). En effet, Hamadi *et al.* (2012) ont également trouvé une corrélation négative entre la propriété d'accepteur d'électrons et le rapport N/C pour *E. coli*. Parmi nos conclusions, nous avons constaté une diminution de la propriété accepteur d'électrons d'*E. coli* lorsqu'elle est exposée à de l'eau du robinet stérile (tableau 6), qui est probablement causée par la liaison de composés azotés que l'on trouve couramment dans l'eau potable. De même, le caractère accepteur d'électrons augmente avec la quantité de polysaccharides concentrés sur la surface de la bactérie (Hamadi *et al.* 2012). Cependant, notre étude a révélé une réduction de cette propriété (tableau 6). L'adsorption d'ions et/ou de molécules chargés négativement et la stabilisation des radicaux acides liés à ces forces, en particulier les structures O=C et la réduction du rapport N/C, pourraient être à l'origine de la réduction de cette propriété.

Une étude de la capacité d'adhésion de *P. aeruginosa* et d'*E. coli* dans des conditions de turbulence sur le verre, le PVC et l'acier inoxydable a été réalisée. Les résultats ont montré que les composants cités ci-haut peuvent contribuer à réduire ou à augmenter l'adhésion des bactéries. Les résultats obtenus ont montré que les bactéries testées dans le cadre de cette étude peuvent adhérer facilement sur tous les matériaux, quel que soit le type d'eau, sauf que l'exposition des souches à de l'eau du robinet stérile augmente leur capacité d'adhésion. Plusieurs études ont rapporté que les propriétés physico-chimiques de la paroi bactérienne ainsi que celles du matériau, principalement l'hydrophobicité, la charge de surface et les propriétés de donneur d'électrons et d'accepteur d'électrons sont les paramètres clés de l'adhésion microbienne (Henriques *et al.* 2004; Hamadi *et al.* 2005; Hamadi *et al.* 2008; Silva *et al.* 2008; Teixeira *et al.* 2008). Au contraire, certains autres travaux de recherche n'ont pas

trouvé de relation entre l'adhésion et la physico-chimie des surfaces (Flint *et al.* 1997; Oliveira *et al.* 2006; Teixeira *et al.* 2007). Cependant, nos données montrent une bonne corrélation positive ($R^2=0,9042$, $R^2=0,7321$) entre l'hydrophobie, le caractère donneur d'électrons et l'adhésion des cellules (figures 8 et 9).

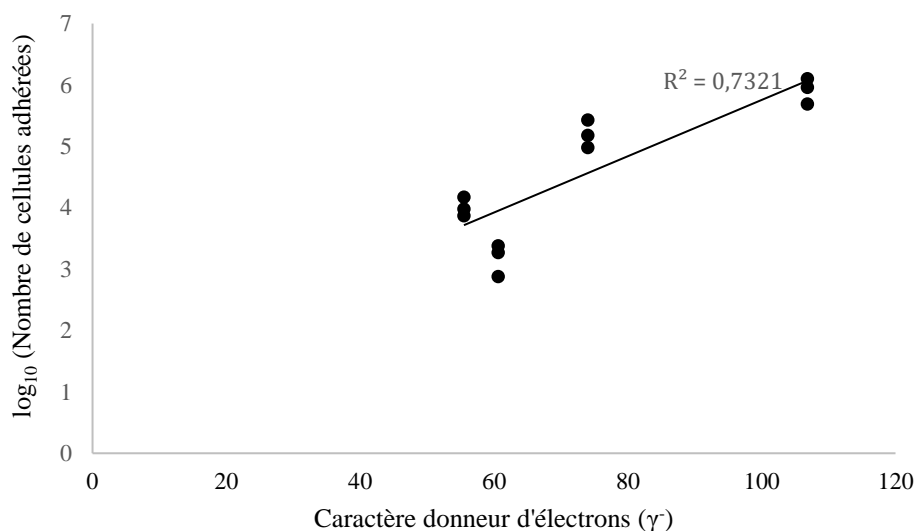


Figure 8. Corrélation entre l'adhésion et le caractère de donneur d'électrons d'*E. coli* et de *P. aeruginosa*.

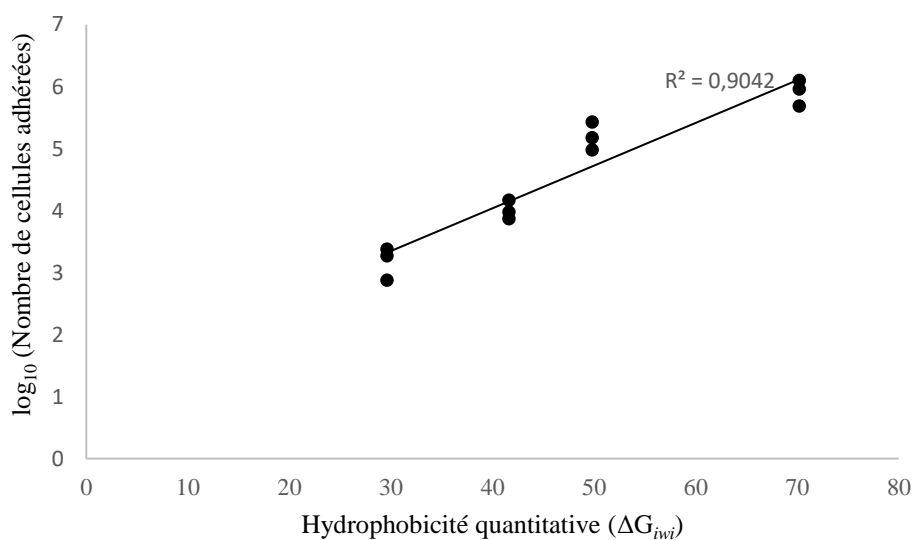


Figure 9. Corrélation entre l'adhésion et l'hydrophobicité quantitative d'*E. coli* et de *P. aeruginosa*.

Ces résultats suggèrent que l'adhésion pourrait être fortement régie par la propriété donneur d'électrons et d'hydrophobicité. En fait, une amélioration de ces deux propriétés physico-chimiques a été observée lorsque les souches bactériennes ont été exposées à l'eau du robinet stérile. En outre, cette amélioration s'est accompagnée d'une augmentation de la capacité

d'adhésion, qui est probablement due à l'adsorption de certains composés de l'eau tels que les ions et les molécules décrites ci-dessus. Dans les conditions étudiées, nous pouvons supposer qu'il existe une forte relation entre l'adhésion réel de *Pseudomonas aeruginosa* et d'*Escherichia coli* et le type d'eau dans des conditions de turbulence.

5. Conclusion :

Afin de prévenir et de développer des stratégies contre la contamination de l'eau potable, il est essentiel de comprendre la relation entre la qualité de l'eau et sa contamination. C'est pourquoi cette étude a été basée sur l'exposition de deux bactéries à deux types d'eaux différentes. Les résultats ont montré que l'eau du robinet améliore l'hydrophilie et la propriété donneur d'électrons des surfaces des souches bactériennes. De plus, la capacité d'adhésion des deux souches semble être plus forte en présence d'eau du robinet. Il est donc possible de supposer qu'il existe une relation étroite entre l'adhésion expérimentale de *P. aeruginosa* et d'*E. coli* et l'eau dans des conditions dynamiques. Autre que la composition chimique, l'adhésion dans les réseaux d'eau est très dépendante, où elle change en fonction des facteurs environnementaux, parmi lesquelles, la température peut soit favoriser soit inhiber l'adhésion du fait qu'elle influe sur plusieurs paramètres.

Chapitre 3 : Influence de la température saisonnière sur les propriétés physicochimiques des cellules et l'adhésion en conditions dynamiques :

Résumé :

Le but de ce chapitre était d'étudier l'effet de la température de l'eau (25, 30, 35 et 40°C) sur les propriétés physico-chimiques des surfaces et l'adhésion de *Pseudomonas aeruginosa* et *Escherichia coli* au verre, au PVC et à l'acier inoxydable dans des conditions de turbulence. La méthode de l'angle de contact a été utilisée pour estimer les caractéristiques physico-chimiques des surfaces des matériaux et bactériens. Le nombre de cellules adhérentes a été estimée par dénombrement sur gélose nutritive. Les résultats ont montré que la surface de *P. aeruginosa* et celle de *Escherichia coli* ont devenu moins donneur d'électrons, plus accepteur d'électrons et moins hydrophile au-dessus de 30°C. De plus, les surfaces en PVC et en acier inoxydable étaient des donneurs d'électrons modérés et des accepteurs d'électrons faibles avec une propriété hydrophobe claire, tandis que le verre était un donneur d'électrons faible, un accepteur d'électrons fort et hydrophile. En outre, les résultats ont montré que l'adhésion est fortement corrélée à la température de l'eau sur tous les matériaux, avec une augmentation particulièrement importante entre 35 et 40°C.

1. Introduction :

Un réseau de distribution d'eau potable domestique est un excellent exemple d'un environnement où la formation de biofilms mono et multi-espèces peuvent avoir lieu. En outre, 95% de la biomasse de l'eau est fixée à la surface intérieure des tuyaux sous forme de biofilms, tandis que 5% seulement sont constitués de populations microbiennes en suspension (Flemming *et al.* 2002) qui se rassemblent progressivement après une étape d'adhésion et sécrètent massivement des exoproduits pour se protéger contre les agressions physiques, mécaniques, et chimiques de l'environnement. Ainsi, l'adhésion et la formation de biofilms semblent être les stratégies de survie de la biomasse aquatique (Aparna & Yadav 2008). Les biofilms à la surface intérieure des conduites d'eau sont une source majeure de contamination de l'eau (Abdel-Nour *et al.* 2013) et constituent un risque significatif pour la santé publique (Byun *et al.* 2007). De nombreuses études ont rapportées sur la difficulté d'éliminer un biofilm attaché à une surface. La compréhension de ce phénomène, ainsi que des facteurs physiques et biologiques impliqués, aidera certainement à prévenir la formation de biofilms

dans l'eau. Selon de nombreuses études antérieures, les précurseurs de la bio-adhésion et de la formation de biofilms sont les interactions physico-chimiques entre la bactérie et le matériau. En outre, les plus notables sont les interactions électrostatiques, Van der Waals et Lewis acide-base (Krepesky *et al.* 2003; Pagedar *et al.* 2010; Hamadi *et al.* 2014). D'autres études ont montré que, outre les interactions entre les bactéries et le support, les propriétés du milieu de suspension (pH, température, hydrodynamique, etc.) sont des facteurs déterminants pour la capacité et l'intensité de l'adhésion (Bengourram *et al.* 2009). *P. aeruginosa* est un pathogène opportuniste et omniprésent et constitue une source potentielle de contamination de l'eau potable, d'autant plus qu'il se développe dans des environnements pauvres en nutriments (Carson *et al.* 1972), et qu'il est souvent détecté dans les systèmes d'eau d'institutions telles que les hôpitaux et les hôtels. Cette souche est considérée comme une bactérie modèle pour la qualité de l'eau potable. La littérature contient relativement peu d'informations sur la présence de *P. aeruginosa* et *E. coli* dans les conduites d'eau potable, en particulier dans des conditions de turbulence. Cette étude cherche donc à déterminer l'effet des températures saisonnières sur les propriétés physico-chimiques des surfaces de *P. aeruginosa* et, par conséquent, sur l'adhésion de la bactérie au verre et aux deux matériaux de plomberie (PVC et acier inoxydable) dans des conditions de turbulence.

2. Matériel et méthodes :

2.1. Préparation des suspensions bactériennes :

Les souches bactériennes utilisées dans cette étude sont *P. aeruginosa* ATCC27853 *Escherichia coli* ATCC25922. Les souches ont été ensemencées dans un milieu solide de Luria Bertani (LB) et incubées pendant 24 heures à 37°C. Après 24 heures d'incubation, les cellules ont été grattées et mises en suspension dans une solution de KNO₃ à 0,1 M, puis lavées deux fois par centrifugation à 8000×g pendant 15 minutes (Hamadi *et al.* 2009) et remises en suspension dans de l'eau distillée stérile.

Quatre échantillons de suspensions bactériennes de chaque souche ont été préparés et placés dans quatre bains à température contrôlée (25, 30, 35 et 40°C) pendant 3 heures. Ensuite, chaque échantillon a été filtré sur une membrane filtrante en acétate de cellulose (diamètre d'orifice de 0,45 µm) au moyen d'une pression négative. Les filtres, sur lesquels une couche de cellules bactériennes s'est formée, ont été laissés à sécher à l'air libre pendant 10 à 15 minutes.

Un autre échantillon de la suspension bactérienne de chaque souche (bactéries + eau distillée stérile) a été préparé pour les expériences d'adhésion.

2.2. Nettoyage des coupons :

Les matériaux utilisés au cours de cette étude sont le PVC et l'acier inoxydable largement utilisés pour la fabrication de raccords et de tubes pour les canalisations d'eau au Maroc ainsi que le verre (le verre a été utilisé dans cette étude comme matériau de référence en raison de sa structure moléculaire simple et de son caractère hydrophile clair). Les coupons de PVC et d'acier inoxydable testés ont été obtenus à partir de conduits neuves, tandis que les coupons de verre ont été obtenus à partir de lames de verre du microscope.

Avant le nettoyage, ils ont été découpés en coupons de 1cm×1cm de surface, qui ont été trempés pendant 15 minutes dans une solution d'éthanol à 70% (vol/vol), puis rincés 6 fois avec de l'eau distillée stérile et passés à l'autoclave pendant 15 minutes à 120°C (Hamadi *et al.* 2014; Assaidi *et al.* 2018).

2.3. Caractérisation physicochimique des surfaces :

Les mesures de l'angle de contact ont été effectuées à l'aide d'un goniomètre (GBX instruments, France) en utilisant la méthode de la goutte sessile. Une à trois gouttes de liquide ont été placées sur chaque matière solide et filtre bactérien (précédemment décrit). L'angle de contact pour chaque surface a été mesuré séparément par les liquides : eau, formamide et di-iodométhane (Hamadi *et al.* 2005; Assaidi *et al.* 2018).

L'approche de Van Oss *et al.* (1988) a été utilisée au cours de cette étude pour déterminer l'hydrophobicité. Cette approche explique l'hydrophobie comme l'énergie libre d'interaction entre deux matériaux lorsqu'ils sont immergés dans l'eau, désignée sous le nom de ΔG_{iwi} . La surface est considérée comme hydrophobe ou hydrophile si respectivement son énergie libre est négative ($\Delta G_{iwi} < 0$) ou positive ($\Delta G_{iwi} > 0$). L'énergie libre peut être estimée à partir des tensions superficielles des entités en interaction selon la formule ci-dessous :

$$\Delta G_{iwi} = -2\gamma_{iw} = -2 \left[\left(\sqrt{\gamma_i^{LW}} - \sqrt{\gamma_w^{LW}} \right)^2 + 2 \left(\sqrt{\gamma_i^+ \gamma_i^-} + \sqrt{\gamma_w^+ \gamma_w^-} - \sqrt{\gamma_i^+ \gamma_w^-} - \sqrt{\gamma_w^+ \gamma_i^-} \right) \right]$$

De même, les caractères donneur (γ^-) et accepteur d'électrons (γ^+) et les interactions Lifshitz-Van der Waals (γ^{LW}) ont été estimés par l'approche proposée par (Van Oss et al. 1988) ;

L'angle de contact peut être exprimé comme suit :

$$\cos \theta = -1 + 2 \frac{\sqrt{\gamma_S^{LW} \gamma_L^{LW}} + \sqrt{\gamma_S^+ \gamma_L^-} + \sqrt{\gamma_S^- \gamma_L^+}}{\gamma_L}$$

Enfin, les composants acido-basiques de Lewis peuvent être identifiés comme suit :

$$\gamma_S^{AB} = 2\sqrt{\gamma_S^- \times \gamma_S^+}$$

2.4. Expériences d'adhésion :

La suspension bactérienne de *P. aeruginosa* ATCC27853 et d'*Escherichia coli* ATCC25922 (avec une densité optique comprise entre 0,7 et 0,8) - 12 ml contenant environ 10^8 CFU/ml - a été versée dans 2l d'eau distillée stérile circulant dans le circuit d'eau (Figure 5) après une étape d'acclimatation pour assurer la température souhaitée. Le pH de l'eau a également été mesuré à la fin de chaque expérience.

Après 3 heures de circulation, les coupons ont été récupérés et rincés avec prudence trois fois avec de l'eau distillée stérile pour éliminer les bactéries non adhérees. Ensuite, ils ont été immergés dans un tube à essai contenant 10 ml d'eau physiologique (NaCl : 9g/l). Les cellules adhérees sont détachées des supports à l'aide d'un bain de sonication de 3 minutes. Le nombre de cellules adhérees est estimé par dénombrement sur milieu LB solide après incubation à 37°C pendant 24 heures. Les expériences sont répétées trois fois.

3. Résultats :

3.1. Caractérisation physicochimique des surfaces des matériaux et des bactéries :

Le tableau 7 illustre la caractérisation physico-chimique du verre par la méthode de l'angle de contact. Les résultats montrent que le verre est le seul matériau hydrophile ($15 \text{ mJ/m}^2 > 0$), tandis que l'acier inoxydable ($-49,60 \text{ mJ/m}^2 < 0$) et le PVC ($-25,5 \text{ mJ/m}^2 < 0$) ont un caractère hydrophobe très net. De plus, le PVC ($11,41 \text{ mJ/m}^2$) et l'acier inoxydable ($6,9 \text{ mJ/m}^2$) sont des donneurs d'électrons modérés, ainsi que des accepteurs d'électrons faibles. En revanche, le verre est faiblement accepteur d'électrons ($40,36 \text{ mJ/m}^2$) et faiblement donneur d'électrons ($1,54 \text{ mJ/m}^2$).

Tableau 7. Caractérisation physicochimique des surfaces du verre, de l'acier inoxydable, et du PVC.

Supports	Angle de contact (°)			Tensions des surface (mJ/m ²)			ΔG_{iwi}
	θ	θ	θ	γ^{LW}	γ^+	γ^-	
	Diiodomethane	Formamide	Water				
Verre	46,4 (1,4)	45,8 (3,3)	36,5 (3,1)	36,3	0,36	1,54	15,00
Acier INOX	40,9 (2,1)	69,7 (1,2)	82,1 (1,9)	40,1	0,51	6,9	-49,60
PVC	91,8 (0,7)	76,2 (1,4)	83,3 (0,9)	12,01	3,03	11,41	-25,50

Comme le montre le tableau 8 et 9, *P. aeruginosa* et *Escherichia coli* ont des surfaces hydrophiles (41,9 mJ/m², 24,1 mJ/m²), un caractère donneur d'électrons élevée (76 mJ/m², 48 mJ/m²), et un faible caractère d'accepteur d'électrons 0,1 mJ/m², 7,1 mJ/m²). En revanche, l'augmentation de la température a clairement influencé la surface des deux souches, où elles ont devenu plus hydrophobe (20,6 mJ/m², 4,1 mJ/m²), plus accepteur d'électrons (0,8 mJ/m², 7,4 mJ/m²) et moins donneur d'électrons (48, 1 mJ/m², 23,6 mJ/m²) au-dessus de 35°C.

Tableau 8. Caractéristiques physicochimiques de surfaces de *P. aeruginosa* ATCC27853 dans les quatre températures.

Température (°C)	Angle de contact (°)			Énergies de surfaces (mJ/m ²)			ΔG_{iwi}
	Θ	Θ	Θ	γ^{LW}	γ^+	γ^-	
	Diiodomethane	Formamide	Water				
25	63,1 (0,13)	61 (0,59)	34,3 (0,7)	26,8	0,1	76	41,9
30	55 (0,49)	55,7 (0,76)	25,7 (0,74)	31,4	0,3	82	37,3
35	54,8 (0,44)	37,7 (0,35)	29 (0,65)	31,6	0,8	55	21,1
40	42 (0,45)	29,8 (0,49)	29,9 (0,29)	38,6	0,6	48,1	20,6

Tableau 9: Caractéristiques physicochimiques de surfaces d'*E. coli* ATCC25922 dans les quatre températures.

Température	Angle de contact (°)			Tensions de surface (mJ/m ²)			ΔG_{iwi} (mJ/m ²)
	Θ	Θ	Θ	γ^{LW}	γ^+	γ^-	
	Diiodomethane	Formamide	Water				
25 (°C)	71,2 (0,2)	21,1 (0,8)	15,3 (0,4)	24,1	7,1	48	24,1
30 (°C)	63,1 (0,4)	15,6 (0,21)	6,9 (0,23)	20,1	7,5	57,3	19,8
35 (°C)	60,3 (0,6)	27,6 (0,4)	10,53 (0,8)	22,3	7,4	31,7	3,9
40 (°C)	55,3 (0,7)	11,5 (0,9)	11,5 (0,21)	30,6	7,1	23,6	4,1

3.2. Adhésion de *P. aeruginosa* ATCC27853 en conditions de turbulence :

La figure 10 et 11 illustrent l'adhésion de *P. aeruginosa* et *E. coli* au verre, au PVC et à l'acier inoxydable à quatre températures différentes. Bien que les niveaux d'adhésion varient d'un matériau à l'autre et d'une température à l'autre, les résultats montrent que *P. aeruginosa* et *E. coli* ont la capacité d'adhérer à tous les substrats quel que soit la température appliquée. En outre, il est bien clair que *P. aeruginosa* s'adhère mieux qu'*E. coli*.

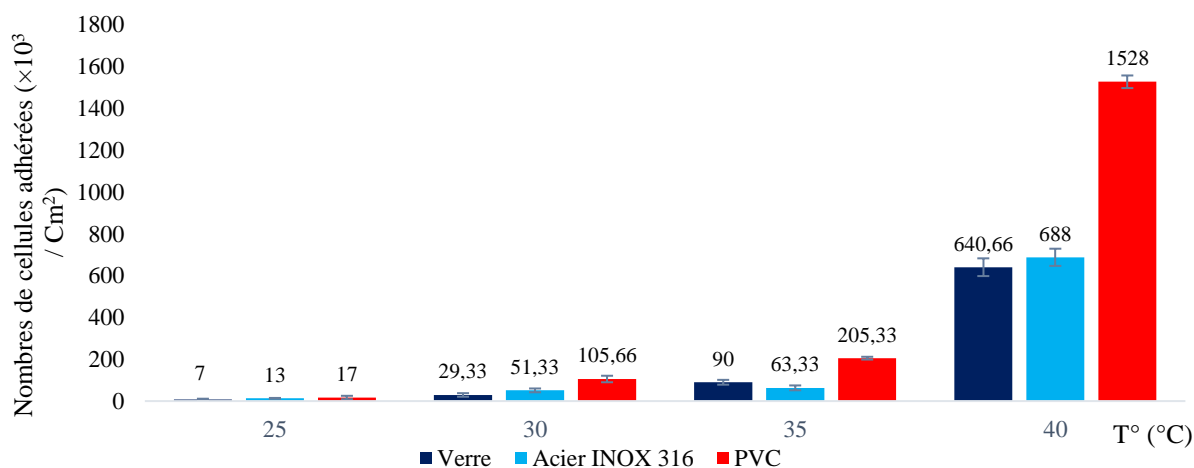


Figure 10. Nombres de bactéries *P. aeruginosa* adhérentes sur le verre, l'acier inoxydable et le PVC en fonction de la température.

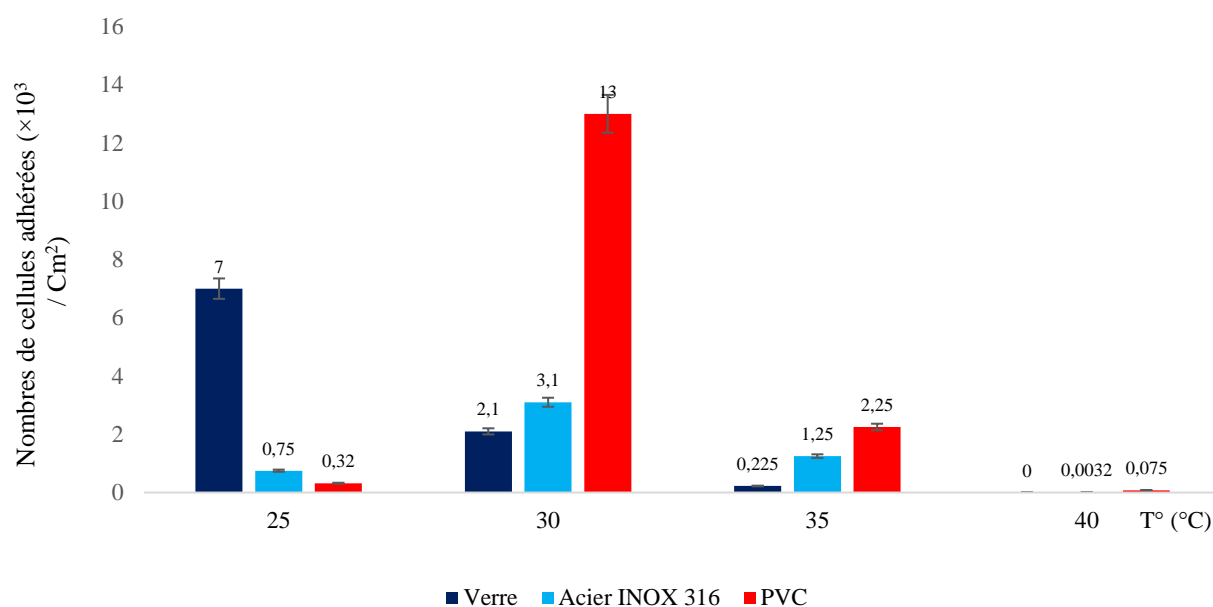


Figure 11: Nombres de bactéries *E. coli* adhérentes sur le verre, l'acier inoxydable et le PVC en fonction de la température.

Pour *P. aeruginosa* et *E. coli*, les niveaux d'adhésion les plus élevés ont été observés sur le PVC, suivi de l'acier inoxydable, tandis que le verre est le matériau le moins colonisé. Cependant, à 25°C le verre a été le plus colonisé par *E. coli* suivi par l'acier inoxydable et le PVC. En outre, le nombre de cellules adhérentes de *P. aeruginosa* a augmenté de manière significative avec l'augmentation de la température, en particulier lorsqu'elle atteint 40°C. au contraire, l'adhésion d'*E. coli* diminue significativement en augmentant la température de l'eau surtout à 40°C.

4. Discussion :

L'adhésion microbienne est un phénomène courant dans la plupart des environnements. Les réseaux de distribution d'eau potable sont un exemple de lieux où ce phénomène peut se produire. Il est bien connu que l'adhésion microbienne est régie par une multitude d'interactions physico-chimiques. Les plus notables sont les interactions Lifshitz-Van der Waals (hydrophobicité), acide-base de Lewis et électrostatiques. Certains auteurs considèrent que l'hydrophobie est le paramètre clé régissant l'adhésion des bactéries à des supports inertes (Jana *et al.* 1999; Cappello & Guglielmino 2006). Ces forces et énergies sont générées par les acteurs de l'adhésion : les surfaces bactériennes et des matériaux solides. En outre, les caractéristiques du milieu de suspension (pH, force ionique, température, charge biologique, etc.) jouent également un rôle important dans l'adhésion (Garrett *et al.* 2008). Une compréhension globale de l'adhésion repose sur l'établissement de la manière dont chacun de ces différents paramètres est impliqué. De nombreuses études ont établi des corrélations entre l'adhésion et ces interactions et paramètres (Henriques *et al.* 2004; Hamadi *et al.* 2005; Oliveira *et al.* 2006; Hamadi *et al.* 2008; Silva *et al.* 2008; Assaidi *et al.* 2018). Cependant, d'autres chercheurs n'ont pas trouvé de relation entre l'adhésion et les caractéristiques physico-chimiques des surfaces (Flint *et al.* 1997; Oliveira *et al.* 2006; Teixeira *et al.* 2007).

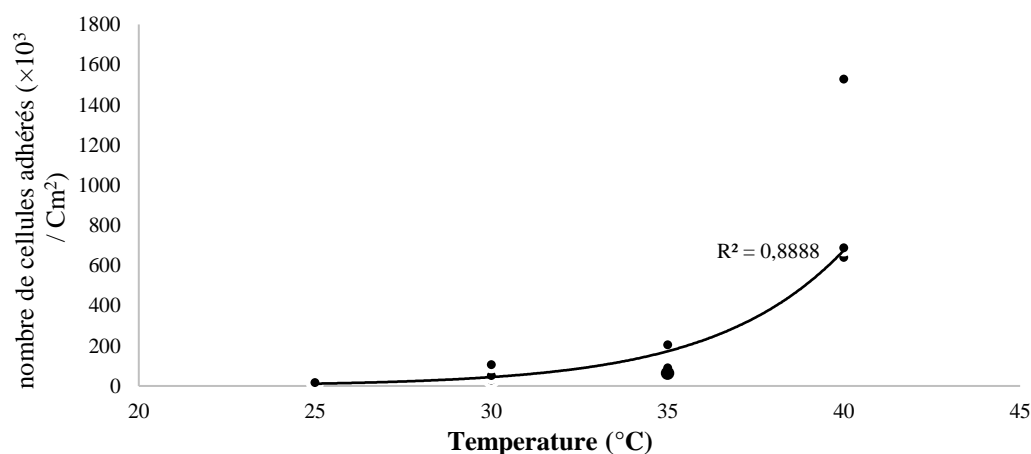


Figure 12. Corrélation exponentiel entre le nombre de bactéries *P. aeruginosa* adhérentes et la température.

Tout d'abord, cette étude visait à déterminer et à expliquer les différences entre un matériaux plastique et un autre métallique en terme de colonisation par *P. aeruginosa* et *E. coli* au sein

d'une installation d'eau potable dans des conditions de turbulence en évaluant les interactions physico-chimiques et les énergies de surface. Les résultats de l'angle de contact ont montré que l'acier inoxydable et le PVC ont des surfaces hydrophobes tandis que le verre a une surface hydrophile, ce qui concorde avec des travaux de recherche précédents (Teixeira *et al.* 1999; Boutaleb *et al.* 2008; Silva *et al.* 2008; Hamadi *et al.* 2014; Assaidi *et al.* 2018). De plus, les résultats montrent que le PVC est un donneur d'électrons modéré, alors que l'acier et le verre ont un caractère donneur d'électrons faible, pareillement apporté par des études précédentes (Boutaleb *et al.* 2008). Les résultats ont également montré que *P. aeruginosa* et *E. coli* ont la capacité d'adhérer aux trois matériaux testés (figure 10 et 11). Il est admis qu'une entité hydrophile a tendance à s'adsorber sur une autre entité hydrophile, et, de même, les entités hydrophobes ont tendance à s'adsorber les unes sur les autres (Hamadi *et al.* 2009). Ce point de vue n'explique pas nos conclusions, car *P. aeruginosa* a adhéré mieux aux surfaces hydrophobes qu'à la surface hydrophile du verre. Aussi, *E. coli* n'a pas adhéré mieux sur le PVC et l'acier inoxydable (hydrophobes) malgré que son caractère hydrophile a significativement diminué en augmentant la température (35 et 40°C). Comme le montre les tableaux 8, à des températures supérieures à 35°C, la surface de *P. aeruginosa* devient moins hydrophile, ce qui pourrait expliquer la forte adhésion sur les matériaux hydrophobes tels que l'acier et le PVC. De plus, le caractère donneur d'électrons élevé de *P. aeruginosa* et la propriété d'accepteur d'électrons faible des matériaux aident à expliquer les données de cette étude. En général, le PVC est le plus colonisé par *P. aeruginosa* et *E. coli*, suivi par l'acier, tandis que le verre est le moins colonisé. Assaidi *et al.* (2018) ont également constaté que le PVC est le matériau le plus colonisé par deux souches de *Legionella pneumophilla*, suivi par l'acier inoxydable, et le verre étant le moins colonisé. La forte adhésion sur le PVC s'explique probablement par sa capacité, en tant que matériau plastique, à libérer des composés organiques (additifs, impuretés, etc.), en particulier les vieilles canalisations en PVC. Ces composés peuvent être utilisés comme nutriments par les bactéries (Sadiki *et al.* 1996), ou provoquer des changements dans les caractéristiques physiques et chimiques de la surface du PVC, comme la rugosité et les énergies de surface. En outre, de nombreuses études ont rapportées sur l'importance de la rugosité dans le phénomène d'adhésion. En effet, Assaidi *et al.* (2018) ont constaté que l'adhésion était fonction de la rugosité, où le PVC étant le plus colonisé avec une rugosité de 23 nm, suivi de l'acier inoxydable (rugosité de 3 nm) et enfin le verre (rugosité de 0,4 nm), sans oublier les conditions de turbulence créées et la nature de la surface bactérienne recouverte de pili et de fimbriae. De plus, de nombreux chercheurs font

référence à l'importance des forces électrostatiques dans l'adhésion. Peut-être ces forces jouent-elles un rôle important dans l'adhésion dans ces conditions.

Tableau 10. Effet de la température sur le pH de l'eau.

Température (°C)	pH
25	8,35
30	8,30
35	7,85
40	7,66

L'influence de la température sur l'adhésion de *P. aeruginosa* et d'*E. coli* sur l'acier inoxydable et le PVC, généralement utilisés dans les conduites d'eau, était très claire. Les résultats ont montré que l'adhésion de *P. aeruginosa* augmente sur les trois substrats à mesure que la température augmente, comme le montre une fine corrélation exponentielle ($R^2 = 0,8888$) entre l'adhésion et la température (Figure 12). Selon Guillemot (2006), les variations saisonnières de température affectent la formation de biofilms dans les réseaux de distribution d'eau. En particulier, lorsque l'eau est d'origine superficielle, à des températures loin d'être optimales, le taux de multiplication des micro-organismes est ralenti. Ceci peut expliquer le comportement adhésif d'*E. coli* à 40°C (figure 11). De nombreuses études ont montré que la température est importante non seulement parce qu'elle affecte l'activité métabolique et enzymatique des bactéries, mais aussi parce qu'elle influence certains paramètres physiques et chimiques de l'eau tels que le pH (tableau 10) (Briandet *et al.* 1999; Gallardo-Moreno *et al.* 2002; Cappello & Guglielmino 2006). L'adhésion bactérienne peut varier avec le pH de l'eau, qui est influencé par la température (Gordon *et al.* 1981; Stanley 1983). Selon plusieurs chercheurs, le pH d'un milieu modifie la charge de surface des micro-organismes, ainsi que des supports solides, suite au déplacement des équilibres d'ionisation (protonation/déprotonation) des groupes fonctionnels exposés en fonction de leur pKa (Wu *et al.* 1994; Henriques *et al.* 2004; Gaboriaud *et al.* 2006). En conséquence, cela peut modifier les propriétés (γ^{LW} , γ^- , γ^+ , forces électrostatiques...) des groupes fonctionnels de la surface bactérienne, comme le montrent les résultats (tableau 8 et 9). Des études antérieures ont examiné l'influence de la solution de pH sur l'énergie interfaciale entre les surfaces. L'étude de Pashley and science (1981) sur les surfaces de mica a révélé que le pH influence

indirectement la force en modifiant la charge de surface, ce qui influe sur la quantité de sel adsorbé. Les mêmes chercheurs ont noté qu'une modification du pH de l'eau peut avoir un impact sur l'énergie interfaciale solide-eau. En effet, Hamadi *et al.* (2009) ont montré que le pH influence les propriétés de surface des matériaux solides, signalant qu'un matériau hydrophile (le verre) devient de moins en moins hydrophile, tandis qu'un matériau hydrophobe (le téflon) devient moins hydrophobe lorsque le pH diminue. Ceci peut être à l'origine de l'augmentation de l'adhésion observée dans nos résultats. De plus, Cappello and Guglielmino (2006) ont observé qu'une augmentation de la température provoque une augmentation de l'adhésion de *P. aeruginosa* au polystyrène en augmentant l'hydrophobicité de sa surface. Aussi, Gallardo-Moreno *et al.* (2002) ont observé que pour deux souches de *Candida parapsilosis* isolées du sang, l'adhésion était proportionnelle à l'hydrophobie de la souche et qu'une augmentation de la température contribue à augmenter cette hydrophobie, favorisant encore plus l'adhésion. Ainsi, la température affecte les propriétés de surface de *P. aeruginosa* et d'*E. coli* (Tableau 8 et 9). Cela pourrait donc expliquer la forte adhésion observée sur le PVC et l'acier. Cette étude prouve la grande influence de la température de l'eau sur le phénomène d'adhésion dans les réseaux d'eau, car elle affecte l'adhésion indirectement en modifiant plusieurs caractéristiques et paramètres physicochimiques. Selon cette étude, l'augmentation de l'adhésion est clairement liée à l'augmentation de la température, et les mécanismes par lesquels elle agit sont probablement liés aux changements provoqués soit dans la surface bactérienne, soit dans les propriétés physiques et chimiques de l'eau.

5. Conclusion :

En conclusion, cette étude montre que *P. aeruginosa* et *E. coli*, des opportunistes pathogènes omniprésents dans l'eau potable, peut adhérer aux surfaces des tuyaux en PVC et en acier inoxydable. La compréhension de ce phénomène est cruciale pour le développement de stratégies visant à prévenir la contamination de l'eau potable. Cette recherche a clairement décrit l'effet de la température sur les propriétés de surface et l'adhésion de *P. aeruginosa* et *E. coli* dans des conditions de turbulence. En effet, le PVC a été le plus colonisé, suivi par l'acier inoxydable. Cette adhésion est probablement liée aux interactions acide-base et à l'hydrophobie. De plus, pour tous les substrats, l'augmentation de la température de l'eau entraîne une augmentation des niveaux d'adhésion pour *P. aeruginosa* contrairement à *E. coli*, ce qui est probablement dû à des changements dans les caractéristiques de surface telles que l'hydrophobie. En outre, la température influence l'efficacité des traitements de désinfection,

d'où l'efficacité des traitements par le chlore. En effet, à chaque température un équilibre chimique distincte domine lors de l'introduction du chlore dans l'eau, par conséquent un effet différent sur les micro-organismes.

Chapitre 4 : Effet de la désinfection par le chlore sur l'adhésion et la cultivabilité post-adhésive de *Pseudomonas aeruginosa* et *Escherichia coli*

Résumé :

Le chlore est la substance la plus couramment utilisée pour la désinfection générale, en particulier pour le contrôle de la croissance microbienne dans les systèmes de distribution d'eau potable. L'objectif de cette étude est de comprendre les effets du chlore, sous forme d'hypochlorite de sodium (NaOCl), sur les capacités d'adhésion et de multiplication de deux modèles bactériens de la qualité de l'eau potable ; *Pseudomonas aeruginosa* et *Escherichia coli*. L'efficacité de différentes concentrations (0, 0,025, 0,05, 0,075, 0,1, 0,125 et 0,15%) de NaOCl a été testée sur l'adhésion et la cultivabilité des bactéries dans des conditions de turbulence fournies par un circuit d'eau. La microscopie optique a été utilisée pour visualiser la différence en adhésion. La cultivabilité des cellules adhérentes a été évaluée par leur ensemencement sur un milieu riche après leur détachement des coupons de verre à l'aide d'un bain de sonication. Les résultats ont montré que 0,025, 0,05 et 0,075% de NaOCl ont inhibés significativement la capacité d'adhésion d'*E. coli*, tandis que celle de *P. aeruginosa* a été affaiblie à 0,125 et 0,15%. De plus, les dénombrements post-adhésion ont montré que les cellules adhérentes de *P. aeruginosa* n'ont pas perdu leur capacité de culture (surtout à 0, 0,025, 0,075, 0,1 et 0,125 %), tandis que les cellules adhérentes d'*E. coli* l'ont perdue, sauf en absence de NaOCl.

1. Introduction :

Dans le monde entier, la désinfection de l'eau potable a été largement réalisée grâce à l'utilisation du chlore (Simoes *et al.* 2010; Pereira *et al.* 2013). Cependant, des bactéries indicatrices de la qualité de l'eau, telles qu'*Escherichia coli* et *Pseudomonas aeruginosa*, sont souvent détectées dans l'eau potable et particulièrement dans les eaux embouteillées. La présence d'agents pathogènes dans l'eau et leur transmission potentielle par l'utilisation et les applications, ainsi que l'existence de normes de qualité de l'eau, exigent une désinfection efficace de l'eau avant son utilisation par le consommateur. Le mécanisme précis d'inactivation des micro-organismes par le chlore n'est pas encore clairement élucidé. Cependant, certaines études ont montré que la membrane cellulaire bactérienne subit des modifications de perméabilité en présence de chlore et que la membrane est un facteur important pour déterminer la résistance des bactéries à la désinfection au chlore (Virto *et al.* 2005). Les connaissances actuelles sur le traitement inadéquat de l'eau et la persistance de

solides ou de particules et de matières organiques en suspension dans l'eau permettent d'assurer la protection des micro-organismes lors de la désinfection au chlore. En effet, il a été suggéré que la présence de substances organiques dans l'eau assure la protection des bactéries en stabilisant les membranes cellulaires, limitant l'accès du chlore aux composants cellulaires clés pour l'inactivation (Virto *et al.* 2005). En outre, les agrégats microbiens ou les micro-organismes fixés ou incorporés dans les particules sont plus résistants à l'inactivation par le chlore que les micro-organismes non fixés ou les micro-organismes planctoniques (Bohrerova & Linden 2006). Des procédés de traitement de l'eau bien conçus, y compris des technologies de désinfection, peuvent satisfaire aux réglementations sur la qualité de l'eau pour produire de l'eau potable. Cependant, maintenir la stabilité et la qualité de l'eau pendant sa distribution par une grande infrastructure de canalisations reste un défi (Conseil national de la recherche, 2006). Des problèmes nuisibles, notamment la prolifération de micro-organismes pathogènes opportunistes provoquée par la croissance microbienne dans les systèmes de distribution d'eau potable, peuvent entraîner des problèmes tels que l'accumulation de pathogènes (Berry *et al.* 2006; Liu *et al.* 2014; Lu *et al.* 2014) et la formation de biofilms. Malgré la présence continue d'un désinfectant dans les systèmes de distribution d'eau potable, les problèmes des biofilms persistent (Gomes *et al.* 2016). La source des bactéries planctoniques qui resteront présentes lorsque l'eau est fournie par le robinet d'un consommateur (Simoes & Simões 2013) est ces biofilms, qui agissent comme des réservoirs pour les pathogènes (Li *et al.* 2016). Les biofilms dans les systèmes de distribution d'eau potable peuvent réduire la qualité esthétique et entraîner une contamination à long terme de l'eau potable et augmenter le taux de corrosion des tuyaux (Niquette *et al.* 2000; Simoes *et al.* 2005). Dans de nombreux pays, un désinfectant résiduel est nécessaire pour lutter contre les agents pathogènes d'origine hydrique, en particulier lorsque les systèmes de distribution d'eau potable ne sont pas correctement entretenus (Rosario-Ortiz *et al.* 2016). La concentration de désinfectant résiduel dans la dernière partie du système de distribution d'eau potable, comme la plomberie d'un bâtiment, dépend de nombreux facteurs, notamment la durée de stagnation de l'eau (Rhoads *et al.* 2016). Selon la façon dont les consommateurs l'utilisent, l'eau des canalisations des bâtiments peut stagner pendant des heures jusqu'à des jours, entraînant des changements spectaculaires dans les communautés microbiennes (Ji *et al.* 2015; Proctor & Hammes 2015). Bien que le chlore soit le désinfectant le plus courant, sa réaction avec les matières organiques présentes dans l'eau entraîne la formation de sous-produits de désinfection (Richardson *et al.* 2007). Des niveaux accrus de sous-produits de désinfection dans les réseaux de distribution par rapport à l'eau potable traitée dans les usines avant la distribution ont été signalés

(Domínguez-Tello *et al.* 2015; Scheili *et al.* 2015; Delpla *et al.* 2016; Ioannou *et al.* 2016). Il semble que la désinfection de l'eau dans les réseaux de distribution soit un processus complexe comportant de nombreux paramètres. L'utilisation de concentrations élevées de chlore pourrait entraîner une désinfection inefficace et des risques pour la santé publique par la formation de sous-produits. Par conséquent, la lutte contre les désinfectants et les micro-organismes de l'eau est d'une importance capitale pour des raisons techniques, esthétiques, réglementaires et de santé publique.

Le but de ce chapitre est d'étudier et d'évaluer les effets du chlore, sous forme d'hypochlorite de sodium (NaOCl), sur la capacité d'adhésion de *Pseudomonas aeruginosa* et d'*Escherichia coli* et de tester la cultivabilité des cellules adhérentes.

2. Matériels et méthodes :

2.1. Préparation des suspensions bactériennes :

Les souches testées dans cette étude sont *Pseudomonas aeruginosa* ATCC27853 et *Escherichia coli* ATCC25922. La préparation des suspensions bactériennes pour les tests d'adhérence commence par une incubation des souches dans le milieu LB (Luria-Bertani) à 37°C pendant 24 heures. Ensuite, les cellules de chaque souche sont recueillies par grattage et mises en suspension dans 12 millilitres d'eau physiologique (9g/L NaCl) et lavées deux fois par centrifugation (5000×g pendant 15 min).

2.2. Nettoyage des surfaces de verre :

Le matériau utilisé au cours de cette étude est le verre. Le choix du verre pour cette étude a été basé sur ses caractéristiques énergétiques simple et sur sa susceptibilité -en terme de risque de colonisation- d'être coloniser mieux que les autres matériaux de plomberie prouvée par l'étude de l'adhésion prédictive. Les feuilles de verre ont été découpées en surfaces de 1cm². Les coupons de verre ont été désinfectés pour éliminer toutes les substances organiques et/ou inorganiques déposées en les trempant dans de l'éthanol à 70 % (vol/vol). Ensuite, ils ont été rincés trois à six fois avec de l'eau distillée stérile et passés à l'autoclave à 120°C pendant 15 minutes.

2.3. Essais d'adhésion et révélation des résultats :

Les tests d'adhérence ont été effectués dans un circuit d'eau. 12 millilitres de la suspension bactérienne plus 25 millilitres de la solution d'hypochlorite de sodium (avec une concentration précise : 0, 0,025, 0,05, 0,075, 0,1, 0,125 et 0,15%) ont été ajoutés au circuit d'eau dans lequel

2 litres d'eau du robinet stérile circuleront pendant 3 heures (figure 5). Le choix des concentrations ici a pris en considération la concentration résiduelle du chlore (2×10^{-4} %) dans les eaux potables afin d'avoir un effet clair sur l'adhésion et l'état des cellules adhérentes.

Après trois heures, les coupons ont été collectés et doucement rincés trois fois avec de l'eau distillée stérile pour éliminer les bactéries libres. Chaque coupon a été immergé dans un tube à essai contenant 10 ml d'eau physiologique stérile (9g/l de NaCl). Les bactéries adhérentes ont été éliminées des coupons à l'aide d'un bain de sonication pendant 5 minutes. Le contenu de chaque tube à essai a été dilué (10^{-1} à 10^{-7}) et le nombre de cellules adhérentes a été estimé par dénombrement sur un milieu LB solide.

2.4. Prise des photos par microscopie optique :

Après les tests d'adhérence, certains des coupons de verre ont été colorés pour être analysés au microscope optique. Les images des coupons de verre colonisés ont été prises à l'aide d'un microscope optique couplé à un logiciel d'imagerie informatique (Optica). Les images prises ont été traitées à l'aide du logiciel MATLAB pour la détermination du nombre de cellules.

2.5. Analyse statistique :

Afin de confirmer la différence d'effet des concentrations de NaOCl utilisées contre *P. aeruginosa* et *E. coli*, une analyse statistique utilisant la version 20 du logiciel SPSS a été effectuée. Une analyse de variance (ANOVA) a été utilisée pour comparer les moyennes des $\log_{10}(\text{CFU}/\text{cm}^2)$ après application de chaque concentration de NaOCl ($P < 0,05$).

3. Résultats :

3.1. Effet du NaOCl sur l'adhésion des cellules :

Le chlore est souvent utilisé comme désinfectant dans les systèmes de distribution d'eau potable. Les concentrations résiduelles retenues le long des réseaux de distribution d'eau potable sont essentielles pour assurer leur sécurité microbiologique. Le chlore sous forme de NaOCl a été utilisé dans cette étude comme agent antimicrobien contre *P. aeruginosa* et *E. coli*. Les résultats de l'adhésion de *P. aeruginosa* et *E. coli* sont donnés dans les figures 13 et 14.

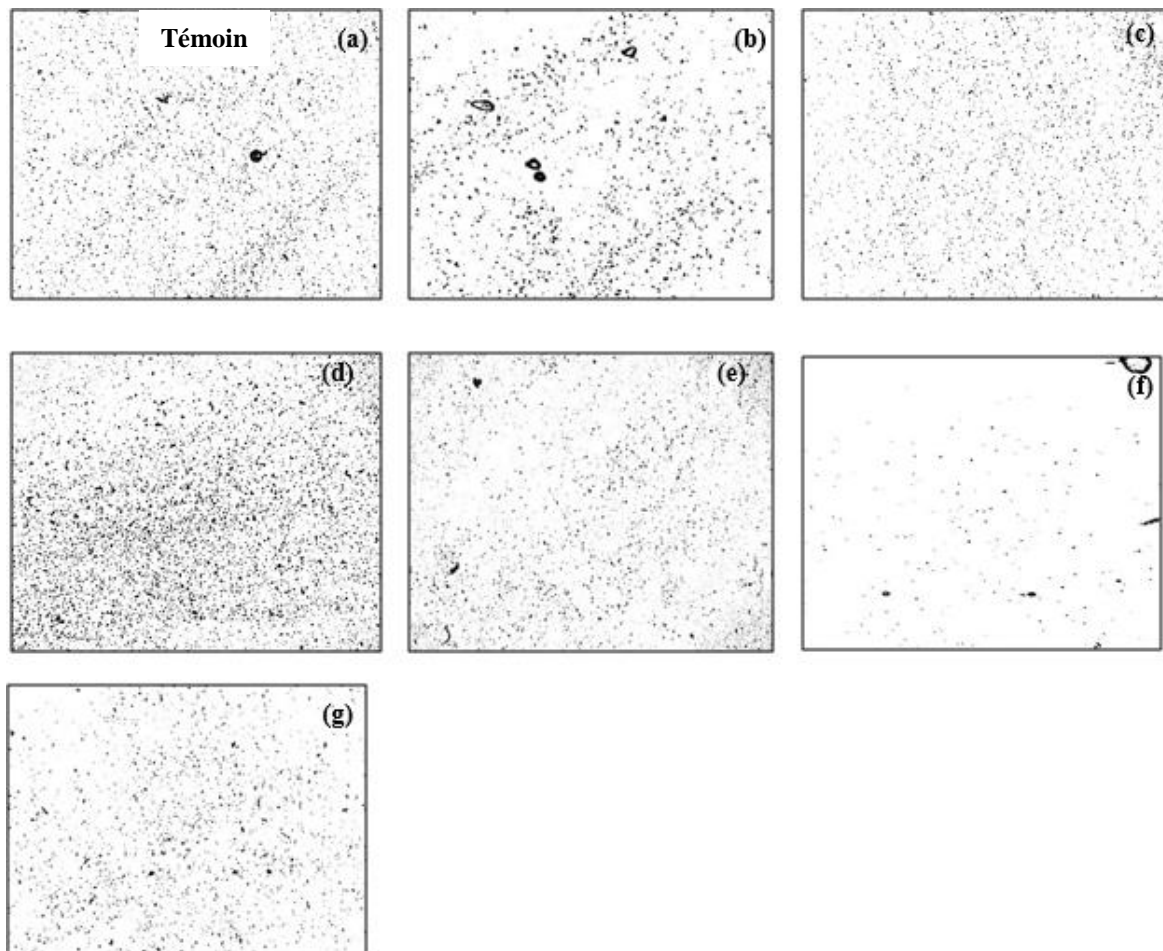


Figure 13. Images d'adhésion de *P. aeruginosa* (x 400) après exposition au différentes concentrations de NaOCl ; Témoin 0% (a), 0.025% (b), 0.05% (c), 0.075% (d), 0.1% (e), 0.125% (f), et 0.15% (g).

Selon les résultats de la microscopie optique, *P. aeruginosa* a pu mieux adhérer qu'*E. coli* pour toutes les concentrations de NaOCl sauf 0,125%. En général, la capacité d'adhésion de *P. aeruginosa* semble ne pas être affectée par les faibles concentrations de NaOCl (0.1, 0.075, 0.05 et 0.025 %), alors que des concentrations élevées (0,125 et 0,15 %) diminuent considérablement cette capacité d'adhésion. De même, la capacité adhésive d'*E. coli* n'a pas été affectée par les faibles concentrations de NaOCl (0.075, 0.05 et 0.025 %), tandis que les concentrations élevées (0.1, 0.125 et 0.15 %) augmentent l'adhésion d'*E. coli*.

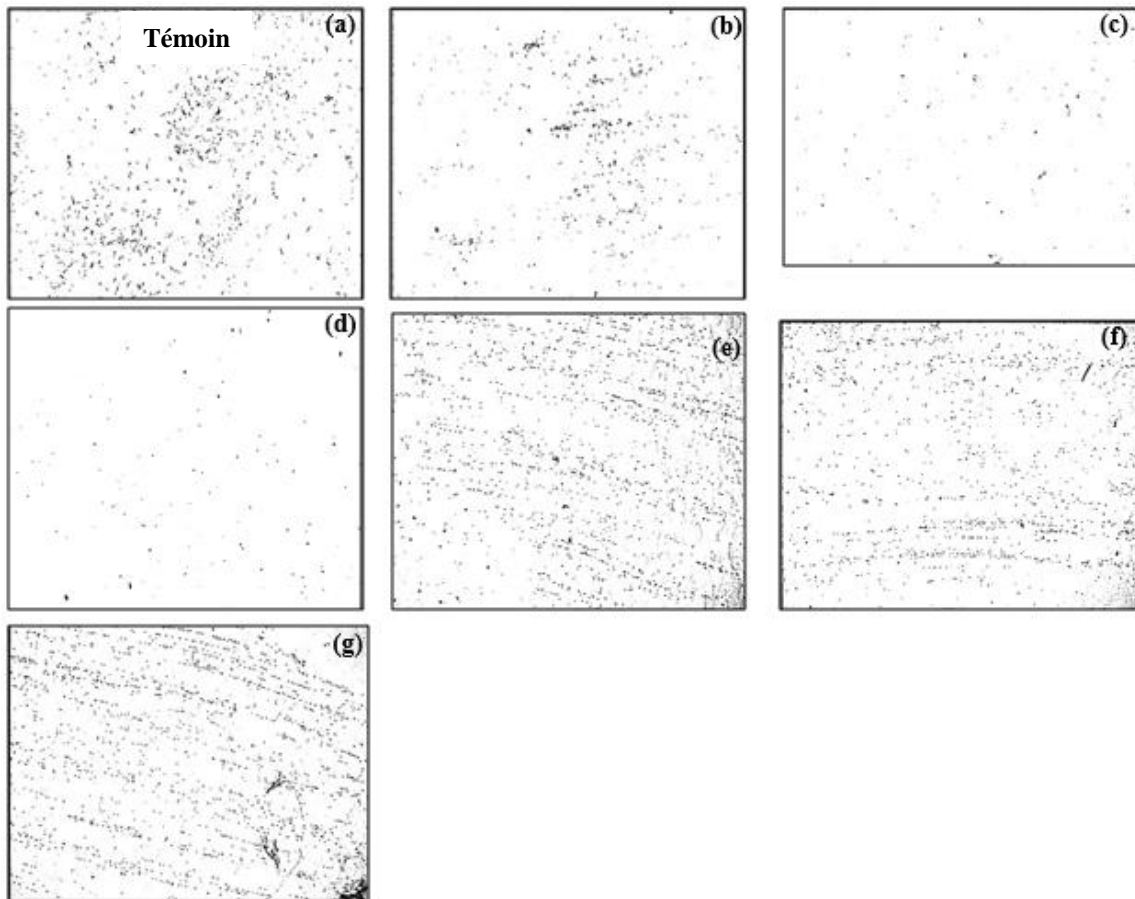


Figure 14. Images d'adhésion d'*E. coli* (x400) après exposition aux différentes concentrations de NaOCl ; Témoin 0% (a), 0.025% (b), 0.05% (c), 0.075% (d), 0.1% (e), 0.125% (f), et 0.15% (g).

3.2. Effet du NaOCl sur la cultivabilité des cellules adhérentes :

L'efficacité du NaOCl contre *P. aeruginosa* et *E. coli* dans leur état planctonique et la cultivabilité post-adhésion des cellules survivantes sur le verre a été étudiée. Le NaOCl s'est révélé efficace contre les cellules en suspension dans l'eau. Les résultats (figure 15) ont montré une différence très significative du nombre de cellules adhérentes des deux souches en l'absence de NaOCl (0%), où *P. aeruginosa* a une cultivabilité post-adhésive (\log_{10} (12,42) FCU/cm²) quatre fois plus grande que celle de *E. coli* (\log_{10} (3,54) FCU/cm²). À 0.05 et 0.15%, le nombre de cellules cultivables post-adhésives de *P. aeruginosa* a été réduit environ 4 fois par rapport au témoin (0%), alors qu'il a été réduit d'environ 2 fois à 0,1 et 0,125% après 3 heures de traitement (figure 16). Toutes les concentrations de NaOCl ont été efficaces contre *E. coli* (figure 17).

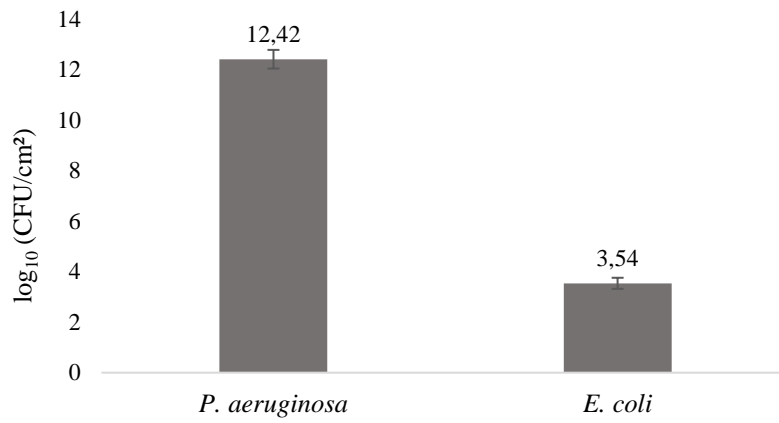


Figure 15. Nombre de cellules adhérees sur le verre en l'absence d'hypochlorite de sodium.

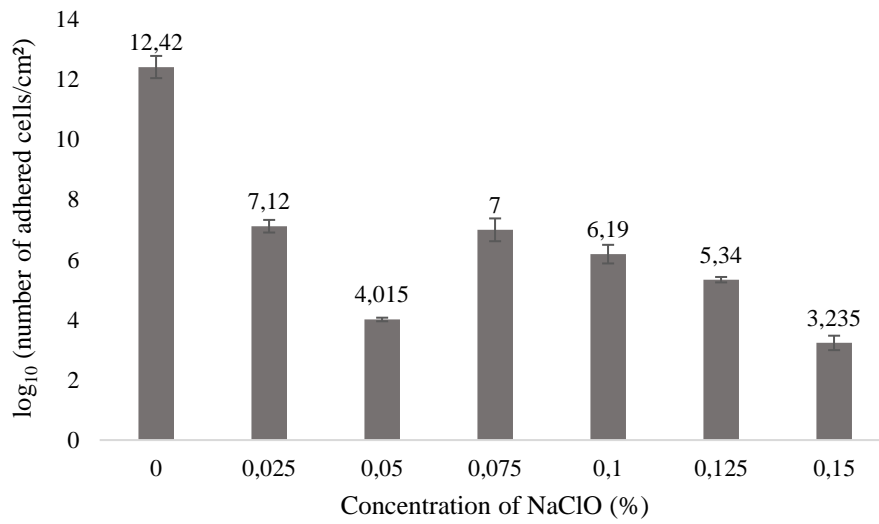


Figure 16. Cultuabilité des cellules adhérees de *P. aeruginosa*.

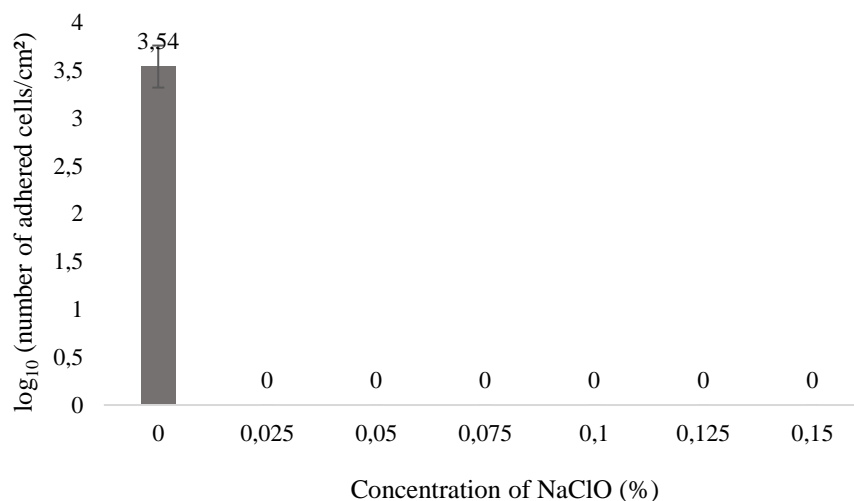


Figure 17. Cultivabilité des cellules adhérees d'*E. coli*.

Les figures 16 et 17 montrent l'effet du traitement par l'hypochlorite de sodium sur *P. aeruginosa* et *E. coli* dans leur état planctonique. L'analyse statistique ANOVA a montré qu'il y a une différence significative entre les moyennes log₁₀ des nombres de cellules cultivables post-adhérees ($P= 0,000215 < 0,05$), ce qui indique qu'il y a un effet significatif des concentrations de NaOCl sur la cultivabilité des cellules adhérees. Les résultats ont également montré que les cellules de *P. aeruginosa* sont capables de survivre à toutes les concentrations de NaOCl et sont toujours cultivables après le stade de l'adhésion, alors que les cellules d'*E. coli* ne le sont pas. En particulier, des concentrations de NaOCl de 0,05 et 0,15% sont capables de mieux inhiber la cultivabilité de *P. aeruginosa* après adhésion, d'où elles apparaissent comme des concentrations idéales pour la désinfection.

4. Discussion :

La contamination des systèmes de distribution d'eau potable est une menace pour la santé publique en raison de leur charge potentielle en microorganismes pathogènes (Li *et al.* 2016). La désinfection chimique reste la solution la plus pratique pour garantir, dans une certaine mesure, la qualité microbiologique de l'eau potable. Cependant, la concentration du désinfectant est un paramètre très important qui doit être contrôlé et optimisé, sinon l'eau perdra d'autres qualités et menacera la santé des consommateurs. Pour cela, il est important de comprendre l'adhésion des micro-organismes de l'eau et leurs réactions aux stratégies de contrôle. Dans cette étude, deux bactéries pathogènes opportunistes et modèles de qualité de l'eau potable ; *P. aeruginosa* et *E. coli*, ont été caractérisées en termes de capacité d'adhésion et de cultivabilité post-adhésion avant et après exposition à différentes concentrations

d'hypochlorite de sodium (NaOCl) dans des conditions de turbulence. D'après les résultats obtenus, il apparaît que *P. aeruginosa* est plus résistant aux traitements à base de NaOCl qu'*E. coli*. Nous avons constaté une augmentation de l'effet de désinfection à 0,125 et 0,15% de NaOCl, alors qu'à d'autres concentrations, *P. aeruginosa* reste capable d'adhérer et de se multiplier mieux. De même, *E. coli* est capable d'adhérer à de faibles concentrations de NaOCl (0.075, 0.05 et 0.025), tandis que des concentrations élevées (0.1, 0.125 et 0.15 %) augmentent son adhésion. Aussi, pour diverses bactéries à Gram négatif, la concentration minimale inhibitrice déterminée était comprise entre 0,01 et 0,05 % (DeQueiroz 2004). D'autres recherches ont montré que la concentration minimale inhibitrice de NaOCl contre les bactéries à Gram positif et à Gram négatif était de 0,1 à 0,4 % (Jaglic *et al.* 2012). En outre, Seier-Petersen *et al.* (2014) ont décrit une concentration inhibitrice minimale de 0,5 % contre *Bacillus subtilis*. Les différences de concentration minimale inhibitrice observées entre ces études sont apparemment liées non seulement à la sensibilité distincte des bactéries (variations moléculaires et structurelles des membranes cellulaires) ou à la méthode de détermination utilisée, mais aussi au milieu dans lequel les bactéries et le désinfectant réagissent. En milieu aqueux, le NaOCl se comporte comme selon l'équilibre chimique suivant : $\text{NaOCl} + \text{H}_2\text{O} \leftrightarrow \text{NaOH} + \text{HOCl} \leftrightarrow \text{Na}^+ + \text{OH}^- + \text{H}^+ + \text{OCl}^-$ (Gomes *et al.* 2016). La destruction des microorganismes commence par la chloration des substances lipoprotéiques qui existent dans les membranes cellulaires des bactéries pour former des composés chlorés toxiques qui provoquent la fuite de macromolécules des cellules (Kim *et al.* 2008). En outre, les acides aminés peuvent être neutralisés par le NaOH et former de l'eau et du sel. Les groupes aminés protéiques peuvent également réagir avec l'acide hypochloreux (HOCl) pour former des chloramines qui interfèrent avec le métabolisme cellulaire (Estrela *et al.* 2002). En outre, l'oxydation de certains acides aminés des protéines peut être provoquée par les HOCl et les ions hypochlorite (OCl⁻) (Pattison *et al.* 2007; Rosen *et al.* 2009). En ce sens, la mort cellulaire provient d'une forte réaction entre les composés oxydés avec la membrane bactérienne et provoque l'oxydation d'autres protéines de la membrane externe, qui est facilitée par l'oxydation des protéines intracellulaires (Arana *et al.* 1999). Dans cette étude, l'effet du NaOCl contre *P. aeruginosa* et *E. coli* dans leurs états planctoniques a été réalisé. Les différences observées dans les degrés d'adhésion sont probablement dues à des différences de concentrations de NaOCl, c'est-à-dire à l'équilibre chimique le plus dominant qui déterminera le degré de dommage de la membrane cellulaire, influençant ainsi l'adhésion bactérienne.

D'un point de vue énergétique, le contact du NaOCl ou d'un de ses sous-produits avec la membrane bactérienne est probablement capable de créer des changements dans la structure moléculaire de cette membrane et donc dans l'énergie de la membrane cellulaire. En effet, Gomes *et al.* (2016) ont montré que lorsque les bactéries sont exposées au NaOCl à l'état planctonique, leurs capacités d'adhésion au PVC changent en raison des modifications énergétiques des membranes bactériennes. En outre, la formation de HOCl (un sous-produit du NaOCl) peut entraîner une perte d'électrons de la membrane bactérienne et une altération ultérieure de la charge bactérienne (Peck *et al.* 2011). L'hydrophobicité est également importante, non seulement pour le phénomène d'adhésion des bactéries, mais aussi pour assurer le passage des métabolites à travers la membrane bactérienne (Moorman *et al.* 2008). L'hydrophobicité bactérienne peut être modifiée par les changements de la composition des acides gras et des protéines qui se produisent en réponse à des conditions de stress. La motilité bactérienne est également une caractéristique importante qui contribue au processus d'adhésion, en aidant le micro-organisme à atteindre l'environnement le plus favorable et à en tirer parti lorsqu'il est en concurrence avec d'autres micro-organismes en réponse à des conditions externes (Fenchel 2002; Stocker *et al.* 2008; Maes *et al.* 2013). Donlan (2002) a indiqué que l'exposition de *A. calcoaceticus* à NaOCl n'affectait que sa motilité, en réduisant la capacité de nage, ce qui signifie que le biocide peut d'une certaine manière altérer la capacité d'*A. calcoaceticus* à s'approcher de la surface et à surmonter les forces de répulsion. De même, *P. aeruginosa* est une bactérie mobile pour laquelle cette propriété de locomotion peut ne pas avoir été affectée à de faibles concentrations (0.025, 0.05, 0.075 et 0.1%) de NaOCl, ce qui peut justifier sa forte adhésion, alors qu'à des concentrations élevées (0,125 et 0,15%) il est très probable que la bactérie ait perdu cette caractéristique.

Les résultats de la microscopie optique ont également montré que, généralement *P. aeruginosa* et *E. coli* adhèrent au verre dans une mesure presque identique. Néanmoins, du point de vue de la cultivabilité post-adhésion, *P. aeruginosa* a pu être réensemencé quelle que soit la concentration de NaOCl, alors que *E. coli* ne l'a pas été. La sous-estimation du nombre total de cellules cultivables est probablement due à plusieurs raisons, à savoir la présence de cellules blessées, affamées ou potentiellement viables mais non cultivables, des conditions de culture inadéquates et une agrégation bactérienne qui peut conduire à la formation d'une colonie à partir de plus d'une cellule (Banning *et al.* 2002). Cependant, pour résoudre le problème de l'agrégation, les suspensions bactériennes ont été soniquées. La comparaison entre la microscopie optique et les résultats du dénombrement montre que la mort des bactéries et leur cultivabilité sont deux phénomènes distincts. En effet, le NaOCl a pu réduire

l'adhésion des cellules d'*E. coli* et les priver de leur capacité de reproduction. En outre, l'adhésion de *P. aeruginosa* a également été réduite par toutes les concentrations de NaOCl (surtout 0,05 et 0,15%) mais la plupart des cellules sont encore capables de se reproduire.

5. Conclusion :

Les résultats globaux ont montré que NaOCl réagit fortement avec *P. aeruginosa*, en réduisant sa capacité d'adhésion à des concentrations élevées, alors qu'à de faibles concentrations, il peut réduire la cultivabilité des cellules adhérentes. De plus, l'adhésion d'*E. coli* a été fortement réduite par des concentrations modérées de NaOCl (0,05 % et 0,075), tandis que sa cultivabilité a été totalement perdue à toutes les concentrations. Enfin, la connaissance de la sensibilité distincte et du comportement des micro-organismes en réaction aux désinfectants peut aider à améliorer les stratégies de contrôle de la flore aquatique et à assurer une bonne qualité de l'eau. Les stratégies préventives de lutte contre l'installation des biofilms au sein des canalisations d'eau potable ne sont pas toujours efficace. En effet, il est important d'aborder d'autres stratégies cette fois de correction qui consistera à éradiquer les micro-organismes après leur installation.

B. Effet anti-biofilm de NaCl et NaOCl sur les biofilms formés par *P. aeruginosa* et *E. coli*

Chapitre 1 : Recherche de la concentration efficace de NaCl contre les biofilms de *Pseudomonas aeruginosa* et *Escherichia coli* :

Résumé :

La désinfection des eaux potable a été largement réalisée par des produits chimiques présentent généralement des risques pour les consommateurs, surtout à des doses élevées. Cette étude a pour but de tester l'effet de quelques concentrations de chlorure de sodium (NaCl) sur les caractéristiques de surface de *P. aeruginosa* et d'*E. coli*, et leurs biofilms formés sur des lames de verre. Pour cela, les caractéristiques de surface du verre, d'*E. coli*, et de *P. aeruginosa* ont été estimées par la méthode de l'angle de contact. Ainsi, l'effet du NaCl sur les biofilms a été révélé par un microscope optique. Les images prises ont été traitées à l'aide du logiciel MATLAB (R2015a). Les résultats de l'angle de contact ont montré un effet modéré de NaCl sur la surface de *P. aeruginosa* et *E. coli* où elles deviennent moins hydrophiles à 3,38 g/L (8,5 mJ/m², 10,6 mJ/m²) et plus donneurs d'électrons surtout à haute concentrations 6,75, 13,51, 27,2 g/L. De plus, NaCl a diminuée l'hydrophilie de la surface du verre à 3,38 et 13,51 g/L (8,5 mJ/m² et 5,9 mJ/m²) et l'a inversée à 27,2 g/L (-31,7 mJ/m²), et a affaibli son caractère donneur d'électrons au même concentration (7,4 mJ/m²). Enfin, les résultats de la microscopie optique ont montré que NaCl a provoqué un détachement claire et progressive des biofilms.

1. Introduction :

L'étude des biofilms des canalisation d'eau potable est très essentielle du fait qu'elle peut résoudre plusieurs problèmes notamment ceux qui touche la santé publique et la détérioration des conduites d'eau. La formation et le détachement des biofilms sont influencés par plusieurs facteurs, à savoir la température, le pH, la salinité, la disponibilité des nutriments, ainsi que l'espèce bactérien mis en jeu (Hood & Zottola 1997; Chavant *et al.* 2002; Gorski *et al.* 2003; Römling & CMLS 2005; Shi *et al.* 2009; Simm *et al.* 2014). De plus, les biofilms sont des structures enrobées par une matrice de substances polymériques extracellulaires (EPS), des protéines et des acides nucléiques, permettant la survie des bactéries dans des conditions de stress, principalement la famine et les désinfectants (Marin *et al.* 2009; Steenackers *et al.* 2012; Srey *et al.* 2013; Bridier *et al.* 2015).

Le monde microbien développe toujours des résistances contre les traitements de désinfections. Ces traitements sont désignés vers l'inactivation des microorganismes dans leur

état planctonique (Augustin *et al.* 2004). Des moyens physiques (filtration, UV, radiation...) ou chimiques (chloration...) sont généralement employés tant qu'ils ne présentent aucun danger pour les consommateurs (McDonnell & Russell 1999). Cependant, des bactéries indicatrices de l'efficacité du traitement de l'eau, telles que *P. aeruginosa*, sont souvent détectées dans l'eau potable. Par conséquent, d'autres stratégies de désinfection sont nécessaires pour éliminer les micro-organismes fixés.

Le chlorure de sodium (NaCl) est une substance à beaucoup d'utilisations, notamment la contribution aux propriétés organoleptiques de nombreux produits alimentaires. En outre, cette matière constitue une source primaire du minéral Na⁺ (Mattes & Donnelly 1991). En outre, NaCl est connu pour sa capacité conservatrice des aliments en raison de sa capacité à augmenter la pression osmotique des aliments (Bidlas & Lambert 2008). De plus, Rode *et al.* (2012) ont montré que NaCl modifie les énergies de surface de plusieurs espèces bactériennes. En effet, Yoon (2013) a signalé que l'exposition de *Salmonella* au chlorure de sodium la rend thermorésistante. En revanche, l'effet du NaCl sur un biofilm bactérien déjà installé et les énergies de surface reste à investiguer. Par conséquent, le but de ce chapitre est de tester des concentrations croissantes de NaCl sur les caractéristiques physico-chimiques de la surface de *P. aeruginosa* et d'*E. coli*, et de tester leur efficacité sur le détachement de leurs biofilms.

2. Matériel et méthodes :

2.1. Préparation des suspensions bactériennes :

P. aeruginosa ATCC27853 et *E. coli* ATCC25922 ont été sélectionnées pour cette étude. Les souches sont incubées dans le milieu solide LB à 37°C pendant 12 heures pour recueillir les cellules dans leur phase exponentielle. Les cellules ont été raclées et mises en suspension dans une solution de KNO₃ (0.1 M). Ensuite, les suspensions bactériennes sont lavées deux fois par centrifugation (5000 g pendant 10 min) avec la même solution (Hamadi *et al.* 2014).

Des échantillons des suspensions bactériennes préparées ont été ré-centrifugés où le culot (cellules bactériennes) est remis en suspension dans des solutions de chlorure de sodium à différentes concentrations (3,38, 6,75, 13,51, et 27,2 g/L). L'idée ici est de choisir une concentration de NaCl proche celle de la mère (27,2 g/L) et faire des divisions successives (3,38, 6,75, et 13,51 g/L) afin de tester son eau –après microfiltration– sur le détachement des biofilms. Après une heure, les échantillons sont filtrés sur un filtre en acétate de cellulose (diamètre de pore de 0,45 µm) en utilisant la pression négative. Ainsi, une couche épaisse de cellules de *P. aeruginosa* ou d'*E. coli* se forme sur les filtres. Les filtres humides sont

soigneusement placés sur des supports plats et laissés sécher jusqu'à ce que l'on puisse mesurer l'angle de contact (Hamadi *et al.* 2009).

2.2. Préparation des lames de verre :

Des lames de verre ont été sélectionnées pour cette étude comme support pour la formation des biofilms. Le choix du verre a été basé sur sa composition simple et son caractère hydrophile. De plus, en terme de risques de contamination l'étude de l'adhésion prédictive a montré que le verre est le matériau le plus susceptible d'être colonisé. Avant d'être mises en contact avec les suspensions bactériennes, les lames de verre ont été immergées dans de l'éthanol à 70% (vol/vol) pendant 15 min afin de débarrasser leur surface de toute matière organique. Ensuite, les lames ont été rincées six fois avec de l'eau distillée stérile et autoclavées (120°C) pendant 15 min (Assaidi *et al.* 2018). Certaines des lames de verre propres ont été immergées dans les solutions de chlorure de sodium à différentes concentrations (3,38, 6,75, 13,51, et 27,2 g/L) pendant une heure et rincées à l'eau distillée stérile.

2.3. Caractérisation physicochimique d'une surface :

La caractérisation physico-chimique des surfaces a été réalisée par un goniomètre (GBX instruments, France). Cette méthode utilise la technique de la goutte sessile, où trois gouttes de chaque liquide (Eau, Formamide 99%, Di-Iodométhane 99%) (Tableau 13 sont déposées sur la surface des supports (filtres de *P. aeruginosa* ou lame de verre). Trois à six mesures des angles de contact formés entre le support et la goutte de chaque liquide ont été effectuées. Les mesures ont été répétées cinq à six fois et leur moyenne a été calculée.

Tableau 11: Caractéristiques énergétiques (mJ/m²) des liquides purs utilisés pour mesurer les angles de contact selon Van der Mei and Busscher (1997).

Solvants	γ^{LW} (mJ/m ²)	γ^+ (mJ/m ²)	γ^- (mJ/m ²)
Eau	21,6	25,4	25,4
Formamide	38,7	2,3	39,4
Diiodomethane	50,5	0,7	0,0

γ^{LW} ; forces de Lifshitz-Van der Waals (mJ/m²), γ^- ; caractère donneur d'électrons (mJ/m²), γ^+ ; caractère accepteur d'électrons (mJ/m²)

Les tensions de surface, à savoir les forces de Lifshitz-Van der Waals (γ^{LW}) et les interactions acide-base (γ^{AB}) sont calculées par le système de trois équations à partir de l'application de l'équation de Young-Dupré à chaque liquide sonde :

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

Dans cette équation, θ représente l'angle de contact entre le liquide et la surface. γ^- est le caractère donneur d'électrons, γ^+ est le caractère accepteur d'électrons, et γ^{LW} est l'énergie libre de Van der-Waals. S et L représentent respectivement les surfaces solides et liquides.

L'énergie libre est donnée par l'équation :

$$\gamma_S = \gamma_S^{LW} \gamma_S^{AB} \quad (\text{Equation 2})$$

où $\gamma_S^{AB} = 2\sqrt{\gamma_S^- \gamma_L^+}$ (Equation 3) est l'énergie libre des interactions acide-base.

L'hydrophobie des surfaces a été évaluée par des mesures d'angle de contact basées sur l'approche de Van Oss *et al.* (1986). Selon cette approche, le degré d'hydrophobie est exprimé par l'énergie libre entre deux entités lorsqu'elles sont immergées dans l'eau ; elle est notée ΔG_{iwi} et calculée à partir des composantes de l'énergie de surface des entités en interaction selon la formule suivante :

$$\Delta G_{iwi} = -2\gamma_{iw} = -2 \left[\left(\sqrt{\gamma_i^{LW}} - \sqrt{\gamma_w^{LW}} \right)^2 + 2 \left(\sqrt{\gamma_i^+ \gamma_i^-} + \sqrt{\gamma_w^+ \gamma_w^-} - \sqrt{\gamma_i^+ \gamma_w^-} - \sqrt{\gamma_w^+ \gamma_i^-} \right) \right] \quad (\text{Equation 4})$$

Une surface est considérée comme hydrophobe si les interactions entre les deux entités de la surface sont plus fortes que celles entre chaque entité et l'eau ($\Delta G_{iwi} > 0$). Inversement, une surface est considérée comme hydrophile si l'interaction entre les deux entités de la surface est plus faible que celle entre chaque entité et l'eau ($\Delta G_{iwi} < 0$).

2.4. Formation des biofilms et traitement par NaCl et NaOCl :

Les lames de verre propres sont immergées les suspensions bactériennes de *P. aeruginosa* ou *E. coli* (10^8 UFC/mL). Après 8 heures, les lames sont récupérées et rincées soigneusement avec de l'eau distillée stérile pour éliminer les bactéries non adhérentes. Le traitement des biofilms par les différentes concentrations de chlorure de sodium (NaCl) se fait par immersion des biofilms dans les solutions de chlorure de sodium. Le traitement dure une heure, où des photos du biofilm ont été prises avec un microscope optique informatisé. Les photos du biofilm sont traitées par MATLAB (R2015a). Le pourcentage de la surface occupée par le biofilm a également été déterminé pendant le traitement des images.

3. Résultats :

3.1. Propriétés physicochimiques des souches en présence de NaCl :

Tableau 12. Effet de NaCl sur les propriétés physicochimiques de surface de *P. aeruginosa* ATCC27853.

<i>P. aeruginosa</i>	Angle de contact (°)			Tensions de surface (mJ/m ²)			ΔG_{iwi} (mJ/m ²)
	Θ Diiodomethane	Θ Formamide	Θ Water	γ^{LW}	γ^+	γ^-	
Témoin 0 g/L	81 (1,6)	74 (1,2)	60 (0,5)	16,1	1,8	38,2	16,1
3,38 g/L	86,5 (0,59)	22,8 (0,21)	26,4 (0,11)	14,3	12,3	44,4	8,5
6,75 g/L	66 (0,53)	20,7 (0,33)	18,1 (0,09)	25,2	4,9	52,0	24,3
13,51 g/L	62,6 (0,42)	19,5 (0,08)	173 (0,07)	27,1	4,2	52,2	25,5
27,2 g/L	72,2 (0,72)	17,5 (0,52)	12,6 (0,06)	21,7	6,9	53,4	21,9

Le tableau 11 et 12 présentent les propriétés physicochimiques de surface de *P. aeruginosa* ATCC27853 et d'*E. coli* ATCC25922 en fonction des concentrations de NaCl. Les résultats ont montré que la surface de *P. aeruginosa* est naturellement hydrophile (16,1 mJ/m²), moyennement donneur d'électrons (38,2 mJ/m²), et faiblement accepteur d'électrons (1,8 mJ/m²). Cependant, son exposition à une solution de NaCl (3,38 g/L) a diminué son hydrophilie (8,5 mJ/m²) et a augmenté son caractère donneur d'électrons (44,4 mJ/m²) ainsi que son caractère accepteur d'électrons (12,3 mJ/m²). En outre, l'augmentation de la concentration (6,75, 13,51, et 27,2 g/L) a fortement augmenté l'hydrophilie (24,3, 25,5, et 21,9 mJ/m²), le caractère donneur d'électrons (52,0, 52,2, et 53,4 mJ/m²) de la surface de *P. aeruginosa*.

Tableau 13. Effet de NaCl sur les propriétés physicochimiques de surface d'*E. coli* ATCC25922.

<i>E. coli</i>	Angle de contact (°)			Tensions de surface (mJ/m ²)			ΔG_{iwi} (mJ/m ²)
	Θ Diiodomethane	Θ Formamide	Θ Water	γ^{LW}	γ^+	γ^-	
Témoin 0 g/L	71 (0,3)	20 (1,3)	16 (1,7)	22	6	49	23,3
3,38 g/L	86,0 (0,06)	21,2 (0,12)	21,4 (0,22)	14,5	11,9	48,1	10,6
6,75 g/L	75,1 (0,09)	19,6 (0,14)	25,6 (0,18)	20,1	8,4	44,3	13,8
13,51 g/L	68,4 (0,90)	18,1 (0,29)	18,0 (0,21)	23,8	6,0	50,5	21,3
27,2 g/L	60,9 (0,53)	17,3 (0,58)	16,3 (0,38)	28,1	4,1	51,9	25,2

De plus, la surface d'*E. coli* est naturellement hydrophile (23,3 mJ/m²), fortement donneur d'électrons (49 mJ/m²), et faiblement accepteur d'électrons (6 mJ/m²). Cependant, l'augmentation de la concentration (3,38, 6,75, 13,51, et 27,2 g/L) a diminué son hydrophilie (10,6, 13,8, 21,3, et 25,2

mJ/m²), et a augmenté son caractère accepteur d'électrons (11,9 mJ/m²) à 3,38 g/L de NaCl. En outre, le caractère donneur d'électrons de la surface d'*E. coli* a resté presque stable quel que soit la concentration appliquée.

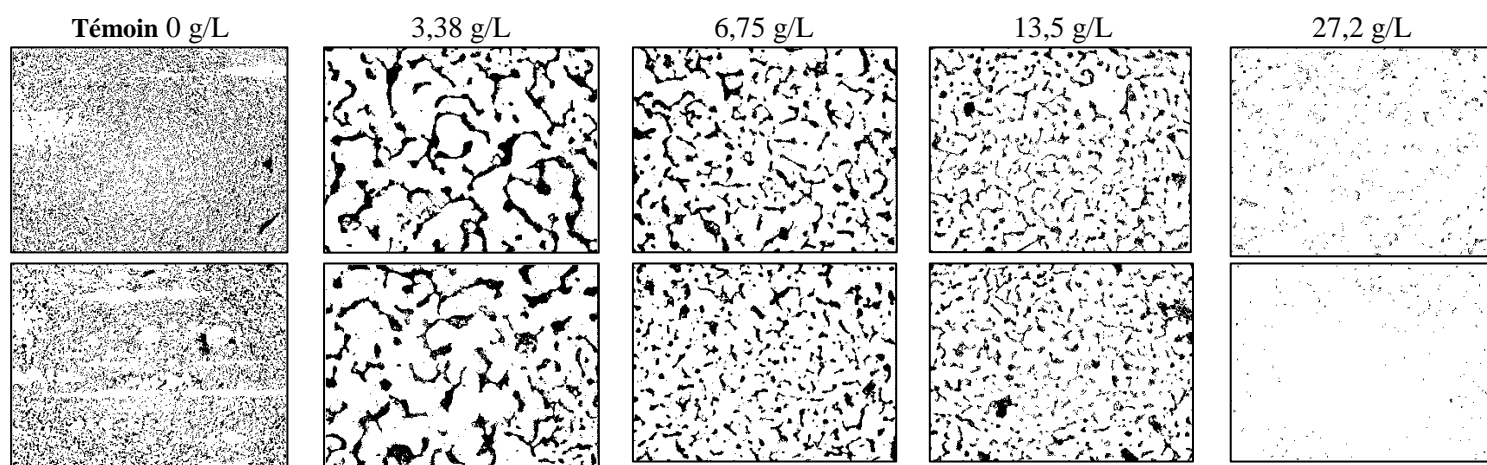
3.2. Propriétés physicochimiques du verre en présence de NaCl :

Le tableau 13 présent les propriétés physicochimiques de surface du verre en fonction des concentrations de NaCl. Le verre possède une surface naturellement hydrophile (40 mJ/m²), fortement donneur d'électrons (51,9 mJ/m²) et avec un caractère accepteur d'électrons nul (00 mJ/m²). Cependant, l'augmentation progressive de la concentration de NaCl (3,38, 6,75, 13,51, et 27,2 g/L) a diminué progressivement le caractère hydrophile du verre (8,1, 24,2, 5,9, -31,7 mJ/m²) et le caractère donneur d'électrons (33,3, 43,9, 30,5, 7,4 mJ/m²). En outre, le caractère accepteur d'électrons n'a connu aucune importante modification.

Tableau 14: Effet de NaCl sur les propriétés physicochimique de la surface du verre.

Verre	Angle de contact (°)			Tensions de surface (mJ/m ²)			ΔG_{wi} (mJ/m ²)
	Θ Diiodomethane	Θ Formamide	Θ Water	γ^{LW}	γ^+	γ^-	
Témoin 0 g/L	50,2 (0,8)	51,5 (1,15)	42,1 (0,24)	34,2	0,00	51,9	40,7
3,38 g/L	53,2 (0,11)	31,5 (0,35)	42,3 (0,17)	32,5	2,3	33,3	8,1
6,75 g/L	44,4 (0,65)	31,6 (0,05)	34,5 (0,24)	37,3	0,3	43,9	24,2
13,51 g/L	51,5 (0,49)	47,5 (0,26)	53,2 (0,44)	33,5	0,4	30,5	5,9
27,22 g/L	63,6 (0,22)	52,1 (0,32)	74,3 (0,27)	26,5	2,8	7,4	-31,7

3.3. Effet de NaCl sur les biofilms de *P. aeruginosa* et *E. coli* :



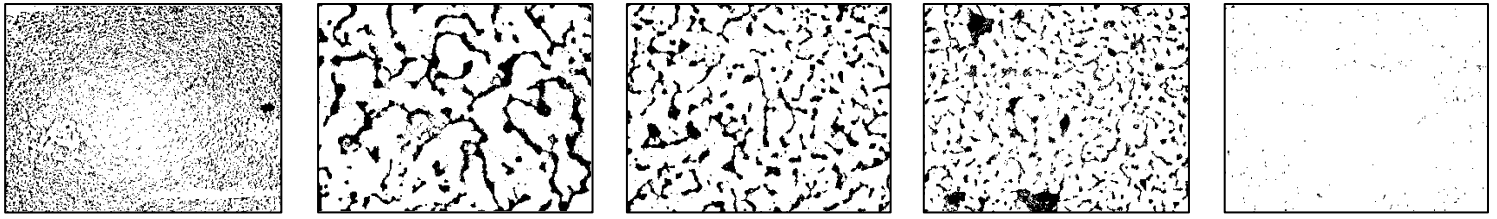


Figure 18. Effet de différentes concentrations de NaCl sur le biofilm de *P. aeruginosa* ATCC27853.

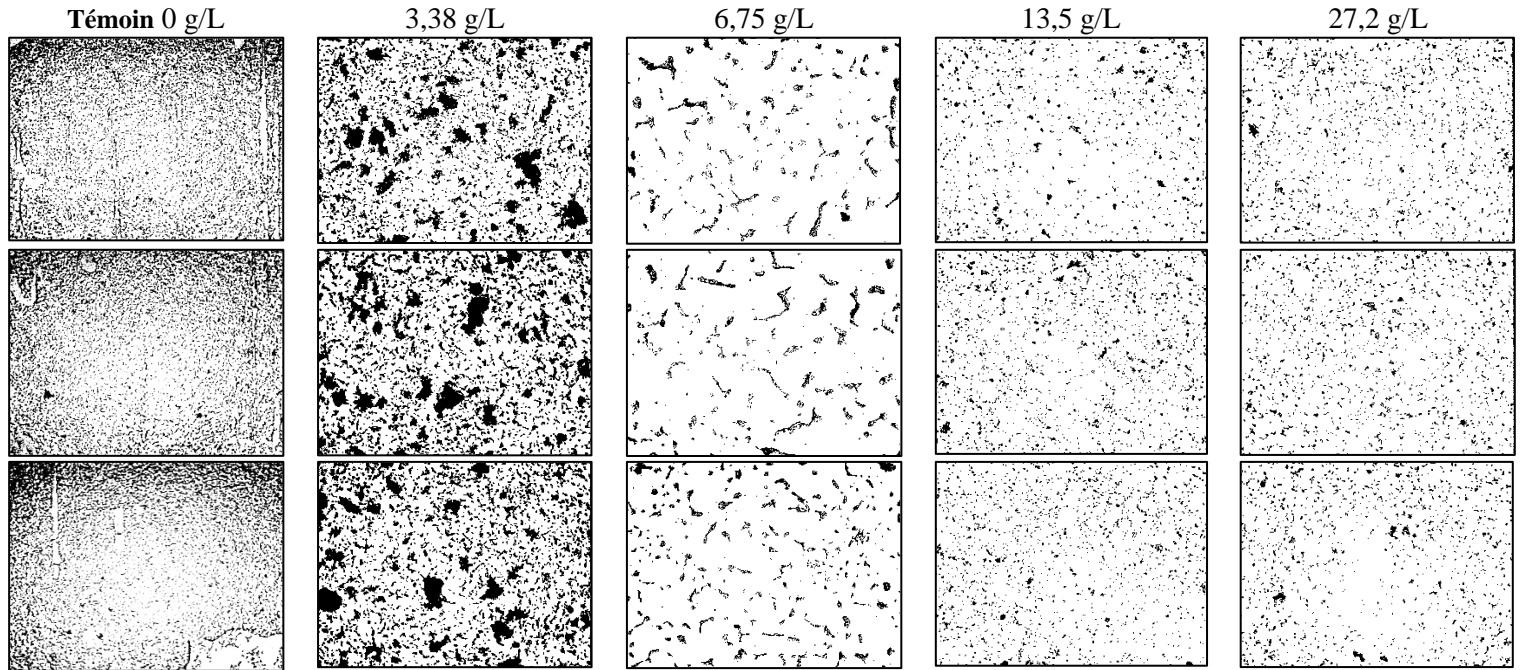


Figure 19. Effet de différentes concentrations de NaCl sur le biofilm de surface d'*E. coli* ATCC25922.

Selon les figures 18 et 19, les résultats de la microscopie optique ont montrés un effet très significatif de NaCl sur les biofilms de *P. aeruginosa* et *E. coli*. En effet, l'augmentation de la concentration cause la désorganisation et le détachement des biofilms. Ces résultats suggèrent que 27,2 g/L semble être la concentration la plus efficace dans cette collection.

4. Discussion :

Plusieurs sont les facteurs et les paramètres qui gouvernent l'installation et le détachement des biofilms. Ces derniers sont hétérogènes (McAuliffe *et al.* 2004) et très résistants aux traitements (Govan & Deretic 1996). La résistance des biofilms aux agents antimicrobiens est fortement liée à l'organisation tridimensionnelle des cellules bactériennes ainsi qu'aux matrices où les cellules sont enrobées (Díaz De Rienzo *et al.* 2016).

Cette recherche a montré que NaCl a pu provoquer le détachement des biofilms de *P. aeruginosa* et d'*E. coli* (figures 18, 19, et 20). Cependant, plusieurs études ont montrés que la présence de NaCl augmente l'adhésion et améliore la stabilité du biofilm (Mørretrø *et al.* 2003;

Jensen *et al.* 2007; Rode *et al.* 2007). En effet, Augustin *et al.* (2004) ont rapportés que les biofilms des bactéries Gram-négatives sont très résistant aux traitements de désinfections. En outre, plusieurs études ont montrés que l'exposition de *S. aureus* au NaCl renforce son biofilm (Kennedy & O'Gara 2004; Rode *et al.* 2007; Lee *et al.* 2014). Aussi, ont l'agrégation des cellules de *S. aureus* augmente avec l'exposition à des concentrations de NaCl supérieures à 100 g/L (Xu *et al.* 2010). Une autre étude a montré qu'une concentration élevée de NaCl était capable de renforcer le biofilm de *Salmonella*, sauf que la plupart des cellules sont mortes (Yoon 2013). Les divergences entre les résultats de cette étude et ces affirmations sont probablement dues à la nature des espèces bactériennes testées. En effet, Lee *et al.* (2014) ont trouvé que le degré de susceptibilité des cellules bactériennes au changements par NaCl a été une fonction de leurs natures.

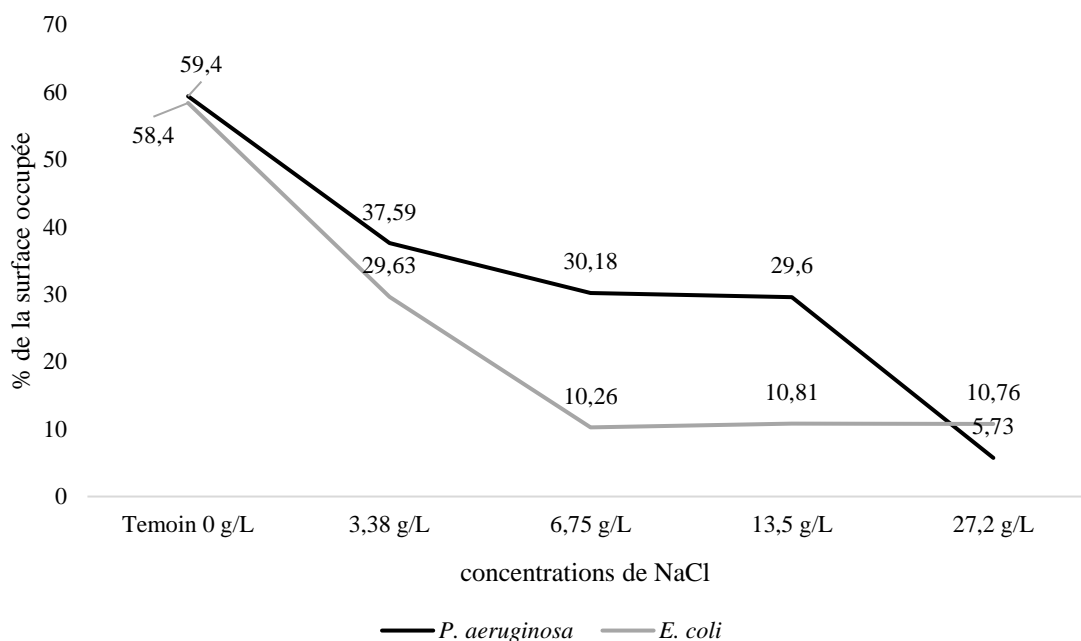


Figure 20: Pourcentages (%) de la surface occupée par le biofilm de *P. aeruginosa* et *E. coli* après traitement par des concentration croissantes de NaCl

les conditions de stress, peuvent modifier les propriétés de surface telles que la charge de surface et la composition de la membrane bactérienne (Bereksi *et al.* 2002; Chavant *et al.* 2002). Cette étude a révélé un effet remarquable du NaCl sur le biofilm de *P. aeruginosa* et *E. coli* qui pourrait être la conséquence d'une modification des propriétés des surfaces bactériennes et du support où le biofilm est installé. Cependant, Giaouris *et al.* (2015) ont montré qu'une concentration élevée de NaCl (105 g/L) a été capable de réduire fortement la population bactérienne de *Salmonella* déjà installée sur des coupons en acier inoxydable de

nature hydrophobe. Le verre a une surface facilement modifiable en raison de l'adsorption des molécules du milieu extérieur. En effet Hamadi et al. (2009) ont constaté que le verre était hydrophile à pH 5 et pH 9 et hydrophobe à d'autres valeurs de pH. De même, Koubali et al. (2020); (2021) ont constaté que l'hydrophilie du verre change après un traitement avec des surfactants. Cette étude montre que le verre a une surface naturellement hydrophile, sauf que son traitement par les concentrations de NaCl diminue fortement son caractère donneur d'électrons et son hydrophilie (tableau 13). Par conséquent, le détachement des biofilms dans ces conditions semble être logique en raison des répulsions électrostatiques entre les cellules d'*E. coli*, de *P. aeruginosa* et la surface du verre.

5. Conclusion :

Le chlorure de sodium est une substance très connue depuis l'antiquité pour son rôle conservateur des aliments et comme condiment. En outre, elle a été longtemps testée pour son effet sur l'adhésion et la formation des biofilms. En revanche, cette étude a présenté une investigation sur son effet sur un biofilm déjà installé. Les résultats ont montré que cette substance a pu provoquer un détachement important et progressive des biofilms de *P. aeruginosa* et *E. coli* avec l'augmentation de la concentration. Par conséquent, cette étude propose NaCl comme substance anti-biofilm. D'autre part, le chlore est la substance la plus célèbre de désinfection des eaux potables. Cependant, son effet sur les biofilms installés n'est jamais établi. Par conséquent, une comparaison entre l'effet anti-biofilm du chlore et de NaCl semble nécessaire.

Chapitre 2 : Comparaison de l'effet anti-biofilm de NaCl et NaOCl :

Résumé :

La désinfection de l'eau potable a été largement réalisée par des produits chimiques, ayant généralement des effets néfastes pour les consommateurs, surtout à des doses élevées. Cette étude a pour but de tester l'effet du chlorure de sodium (NaCl) et de l'hypochlorite de sodium (NaOCl) sur les caractéristiques de surface de *P. aeruginosa* et d'*E. coli* et leurs biofilms, d'où une nouvelle approche de désinfection pourra être suggérée. Pour cela, les caractéristiques de surface du verre, de *P. aeruginosa* et d'*E. coli* ont été estimées par la méthode de l'angle de contact. En outre, l'effet du NaCl et du NaOCl sur les biofilms ont été révélés par la microscopie optique couplée à ordinateur. Les images prises ont été traitées à l'aide du logiciel MATLAB (R2015a). Les données de l'angle de contact ont montré un effet modéré de NaCl et de NaOCl sur la surface de *P. aeruginosa* et d'*E. coli*. Les surfaces bactériennes ont devenu légèrement plus hydrophiles (*P. aeruginosa* : 21,9 mJ/m², 51,1 mJ/m² ; *E. coli* 30,1 mJ/m², 44,2 mJ/m²) et plus donneuse d'électrons (*P. aeruginosa* : 53,4 mJ/m², 54,3 mJ/m² ; *E. coli* 65,3 mJ/m², 68,5 mJ/m²). De plus, NaCl a inversé l'hydrophobie du verre (-31,7 mJ/m²) et affaibli son caractère donneur d'électrons (7,4 mJ/m²). D'autre part, NaOCl a augmenté l'hydrophobie du verre (49,3 mJ/m²) et son caractère de donneur d'électrons (62,7 mJ/m²). Enfin, les résultats de la microscopie optique ont montré que le NaCl a provoqué un détachement clair et progressif des biofilms de *P. aeruginosa* et d'*E. coli* alors que NaOCl n'a eu aucun effet.

1. Introduction :

Les bactéries sont des micro-organismes capables de détecter et de réagir aux changements de leur environnement. Les bactéries planctoniques subissent des changements phénotypiques et génotypiques pendant la formation du biofilm, y compris l'adhésion réversible, l'attachement irréversible, la maturation et le détachement (Dewanti & Wong 1995). Contrairement aux bactéries planctoniques, les bactéries sessiles sont connues d'être plus résistantes aux agressions environnementales telles que les biocides (Costerton *et al.* 1995; Kumar & Anand 1998). L'étude des biofilms revêt une importance considérable car elle touche les domaines de la microbiologie médicale, environnementale et alimentaire, ayant une relation directe avec la santé publique (Rode *et al.* 2007; Di Bonaventura *et al.* 2008b). La formation et le détachement des biofilms sont influencés par plusieurs facteurs, notamment la température, le pH, la salinité, la disponibilité des nutriments, ainsi que les propriétés de la surface

bactérienne (Hood & Zottola 1997; Poulsen & Technology 1999; Chavant *et al.* 2002; Gorski *et al.* 2003; Römling & CMLS 2005; Shi *et al.* 2009; Simm *et al.* 2014). En outre, les biofilms sont des structures sessiles enchâssées dans une matrice de substances polymères extracellulaires (EPS) telles que des exopolysaccharides, des protéines et des acides nucléiques permettant la survie des bactéries dans des conditions de stress, principalement la famine et les désinfectants (Marin *et al.* 2009; Steenackers *et al.* 2012; Srey *et al.* 2013; Bridier *et al.* 2015).

L'eau potable est l'élément vital le plus important pour toute vie sur terre. La disponibilité d'une eau potable exempte de contaminants pathogènes est la base de la santé et du développement de tout pays. Cependant, l'eau est un important vecteur de maladies (germes, maladies...) qui peuvent être responsables des contaminations de l'eau. En particulier, les micro-organismes pathogènes opportunistes les plus fréquemment détectés dans les réseaux d'eau potable sont *P. aeruginosa*, *E. coli* et *Legionella* (Keevil & Technology 2003; Eboigbodin *et al.* 2008). Ces bactéries se retrouvent plus fréquemment dans les systèmes d'eau domestiques que dans les conduites d'eau (Wingender *et al.* 2004) et représentent une indication de l'inefficacité du traitement de l'eau. D'autre part, il existe une obligation de présenter et de préserver une eau saine et dépourvue de pathogènes (Water & Organization 2006). L'eau potable est un élément relativement peu nutritif. Cependant, dans de nombreux cas, des conditions environnementales défavorables peuvent entraîner la formation de biofilms et l'acquisition d'une résistance microbienne (Rode *et al.* 2012; Giaouris *et al.* 2015). De plus, les biofilms encrassent les installations de traitement des eaux et les lignes de transformation des aliments, ce qui peut augmenter les coûts énergétiques et les problèmes de corrosion (Goode *et al.* 2013). En effet, dans les systèmes de distribution d'eau potable, les surfaces intérieures des tuyaux sont susceptibles d'être colonisées par des micro-organismes (Kilb *et al.* 2003; Wingender *et al.* 2004). Ainsi, la présence d'agents pathogènes dans l'eau et leur transmission potentielle par l'utilisation et les applications, ainsi que l'existence de normes de qualité de l'eau, exigent une désinfection efficace de l'eau avant sa distribution aux consommateurs. Cependant, les biofilms microbiens sont devenus difficiles à éradiquer par les antibiotiques et les désinfectants qui sont généralement plus efficaces contre les microorganismes à l'état planctonique (Augustin *et al.* 2004). En outre, la désinfection est un processus par lequel les micro-organismes planctoniques sont éliminés ou inactivés par des moyens physiques (filtration, UV, radiation...) ou chimiques (chloration...) tant qu'ils sont sans danger pour les consommateurs (McDonnell & Russell 1999). Cependant, des bactéries indicatrices de l'efficacité du traitement de l'eau, telles que *P. aeruginosa*, sont souvent

détectées dans l'eau potable. Par conséquent, de fortes concentrations de désinfectants ou d'autres stratégies de désinfection sont nécessaires pour éliminer les micro-organismes fixés. De nombreuses études ont été consacrées à la formation de biofilms dans les conduites d'eau. Cependant, il y a relativement peu de travaux sur la perturbation et le détachement de ces biofilms (Stoodley *et al.* 2001; Böhl *et al.* 2009). Malgré la présence continue d'un désinfectant résiduel dans les systèmes de distribution d'eau potable, le problème des biofilms persiste toujours (Gomes *et al.* 2016). En effet, ces biofilms se comportent comme des réservoirs de microorganismes et source des bactéries planctoniques qui seront délivrées par le robinet d'un consommateur (Simoes & Simões 2013; Gomes *et al.* 2016). Des procédés de traitement de l'eau bien conçus, y compris les technologies de désinfection, peuvent satisfaire aux réglementations sur la qualité de l'eau pour produire une eau potable sûre. Toutefois, le maintien et stabilité de la qualité de l'eau pendant sa distribution dans une vaste infrastructure de canalisations reste un défi (De Souza 2006). Dans le monde entier, la désinfection de l'eau potable a été largement réalisée par du chlore (NaOCl) (Simoes *et al.* 2010; Pereira *et al.* 2013). Pourtant, cette substance comporte de nombreuses menaces pour la santé des consommateurs, surtout à des doses élevées imposées par la résistance bactérienne. En effet, des niveaux accrus de sous-produits de désinfection dans les systèmes de distribution par rapport à l'eau potable traitée dans les usines avant la distribution ont été signalés (Domínguez-Tello *et al.* 2015; Scheili *et al.* 2015; Delpla *et al.* 2016; Ioannou *et al.* 2016). D'autre part, le chlorure de sodium (NaCl) est une substance polyvalente, qui contribue aux propriétés organoleptiques de nombreux produits alimentaires et constitue une source primaire du minéral Na⁺ (Mattes & Donnelly 1991). En outre, le NaCl est utilisé depuis longtemps pour la conservation des aliments en raison de sa capacité à augmenter la pression osmotique des aliments et comme condiment (Bidlas & Lambert 2008). De plus, le NaCl modifie les caractéristiques physiologiques de plusieurs espèces bactériennes (Rode *et al.* 2012). En effet, Yoon (2013) a signalé que l'exposition de *Salmonella* au chlorure de sodium la rend thermorésistante. Cependant, l'effet du NaCl sur un biofilm bactérien et les énergies de surface reste à établir. Par conséquent, le but de ce chapitre est de comparer l'effet du NaCl et du NaOCl sur les caractéristiques physico-chimiques de la surface de *P. aeruginosa* et d'*E. coli*, de tester leur efficacité contre leurs biofilms et de proposer une nouvelle stratégie de désinfection de l'eau.

2. Matériel et méthodes :

2.1. Préparation des suspensions bactériennes :

P. aeruginosa ATCC27853 et *E. coli* ATCC25922 ont été sélectionnées pour cette étude. La préparation des suspensions bactériennes commence par une incubation dans le milieu solide Luria-Bertani à 37°C pendant 12 heures pour recueillir les cellules dans leur phase exponentielle. Les cellules ont été raclées et mises en suspension dans une solution de KNO₃ (0.1 M). Ensuite, les suspensions bactériennes sont lavées deux fois par centrifugation (5000 g pendant 10 min) avec la même solution (Hamadi *et al.* 2014).

Certains des échantillons des suspensions bactériennes préparées ont été ré-centrifugés où le culot (cellules bactériennes) est remis en suspension dans des solutions de chlorure de sodium (27,2 g/L) ou d'hypochlorite de sodium (0,002 g/L). Après 48 minutes, les échantillons ont été filtrés sur un filtre en acétate de cellulose (diamètre de pore de 0,45 µm) en utilisant la pression négative. Ainsi, une couche épaisse de cellules de *P. aeruginosa* ou d'*E. coli* se forme sur les filtres. Les filtres humides sont soigneusement placés sur des supports plats et laissés sécher jusqu'à ce que l'on puisse mesurer l'angle de contact (Hamadi *et al.* 2009). Le choix de la concentration de NaCl a été basé sur la capacité détachante des biofilms où 27,2 g/L est la concentration de NaCl la plus efficace prouvée par l'étude précédente. En outre, la concentration de NaOCl choisie est 0,002 g/L car c'est la concentration résiduelle dans un système d'eau après traitement.

2.2. Préparation des lames de verre :

Des lames de verre ont été sélectionnées pour cette étude comme support pour la formation des biofilms. Le choix de ce matériau a été basé sur sa composition simple et son caractère hydrophile. Avant d'être mises en contact avec les suspensions bactériennes, les lames de verre ont été immergées dans de l'éthanol à 70% (vol/vol) pendant 15 min afin de débarrasser leur surface de toute matière organique. Ensuite, les lames ont été rincées six fois avec de l'eau distillée stérile et autoclavées (120°C) pendant 15 min (Assaidi *et al.* 2018). Certaines des lames de verre propres ont été immergées dans des solutions de chlorure de sodium (27,2 g/L) et d'hypochlorite de sodium (0,002 g/L) pendant 50 minutes et rincées à l'eau distillée stérile.

2.3. Caractérisation physico-chimique d'une surface :

La caractérisation physico-chimique des surfaces a été réalisée par un goniomètre (GBX instruments, France). Cette méthode utilise la technique de la goutte sessile, où trois gouttes de chaque liquide (Eau, Formamide 99%, Di-Iodométhane 99%) (Tableau 13) sont déposées sur la surface des supports (filtres de *P. aeruginosa* ou lame de verre). Trois à six mesures des

angles de contact formés entre le support et la goutte de chaque liquide ont été effectuées. Les mesures ont été répétées cinq à six fois et leur moyenne a été calculée.

Tableau 15: Caractéristiques énergétiques (mJ/m²) des liquides purs utilisés pour mesurer les angles de contact selon Van der Mei and Busscher (1997).

Solvants	γ^{LW} (mJ/m ²)	γ^+ (mJ/m ²)	γ^- (mJ/m ²)
Eau	21,6	25,4	25,4
Formamide	38,7	2,3	39,4
Diiodomethane	50,5	0,7	0,0

γ^{LW} ; forces de Lifshitz-Van der Waals (mJ/m²), γ^- ; caractère donneur d'électrons (mJ/m²), γ^+ ;caractère accepteur d'électrons (mJ/m²)

Les tensions de surface, à savoir les forces de Lifshitz-Van der Waals (γ^{LW}) et les interactions acide-base (γ^{AB}) sont calculées par le système de trois équations à partir de l'application de l'équation de Young-Dupré à chaque liquide sonde :

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

Dans cette équation, Θ représente l'angle de contact entre le liquide et la surface. γ^- est le caractère donneur d'électrons, γ^+ est le caractère accepteur d'électrons, et γ^{LW} est l'énergie libre de Van der-Waals. S et L représentent respectivement les surfaces solides et liquides.

L'énergie libre est donnée par l'équation :

$$\gamma_S = \gamma_S^{LW} \gamma_S^{AB} \quad (\text{Equation 2})$$

où $\gamma_S^{AB} = 2\sqrt{\gamma_S^- \gamma_L^+}$ (Equation 3) est l'énergie libre des interactions acide-base.

L'hydrophobie des surfaces a été évaluée par des mesures d'angle de contact basées sur l'approche de Van Oss *et al.* (1986). Selon cette approche, le degré d'hydrophobie est exprimé par l'énergie libre entre deux entités lorsqu'elles sont immergées dans l'eau ; elle est notée ΔG_{iwi} et calculée à partir des composantes de l'énergie de surface des entités en interaction selon la formule suivante :

$$\Delta G_{iwi} = -2\gamma_{iw} = -2 \left[\left(\sqrt{\gamma_i^{LW}} - \sqrt{\gamma_w^{LW}} \right)^2 + 2 \left(\sqrt{\gamma_i^+ \gamma_i^-} + \sqrt{\gamma_w^+ \gamma_w^-} - \sqrt{\gamma_i^+ \gamma_w^-} - \sqrt{\gamma_w^+ \gamma_i^-} \right) \right] \quad (\text{Equation 4})$$

Une surface est considérée comme hydrophobe si les interactions entre les deux entités de la surface sont plus fortes que celles entre chaque entité et l'eau ($\Delta G_{iwi} > 0$). Inversement, une surface est considérée comme hydrophile si l'interaction entre les deux entités de la surface est plus faible que celle entre chaque entité et l'eau ($\Delta G_{iwi} < 0$).

2.4. Formation des biofilms et traitement par NaCl et NaOCl :

La formation des biofilms a été réalisée en plaçant les lames de verre propres dans des boîtes de Pétri et ajout des suspensions bactériennes de *P. aeruginosa* ou *E. coli* (10^8 UFC/mL). Après 8 heures, les lames ont été récupérées et rincées soigneusement avec de l'eau distillée stérile pour éliminer les bactéries non adhérentes. Le traitement des biofilms par le chlorure de sodium (NaCl) ou l'hypochlorite de sodium (NaOCl) commence par immersion des lames - recouvertes par les biofilms- dans une solution de chlorure de sodium (27,2 g/L) ou d'hypochlorite de sodium (0,002 g/L). Le traitement dure 48 minutes, pendant lesquelles des photos du biofilm ont été prises toutes les 6 minutes avec un microscope optique informatisé. Les photos du biofilm ont été traitées à l'aide du logiciel MATLAB (R2015a) pour obtenir des images claires. Le pourcentage de la surface occupée par le biofilm a également été déterminé pendant le traitement des images.

3. Résultats :

3.1. Caractérisation physicochimique des surfaces bactériennes et du verre :

Les tableaux 15, 16, 17 et 18 montrent l'effet du NaCl et du NaOCl sur les propriétés de surface de *P. aeruginosa* et d'*E. coli* ATCC25922. L'hydrophobie d'une surface peut être obtenue directement à partir de l'angle de contact avec l'eau (Oliveira *et al.* 2001). Cependant, le degré absolu d'hydrophobie (ΔG_{iwi}) d'une surface peut être calculé en utilisant l'approche de van Oss and science (1997) via l'équation 4. D'après cette approche, les surfaces de *P. aeruginosa* et d'*E. coli* ATCC25922 sont hydrophiles ($\Delta G_{iwi}=16,1$ mJ/m², $\Delta G_{iwi}=23,3$ mJ/m²), donneurs d'électrons modéré ($\gamma^- =38,2$ mJ/m², $\gamma^- =49$ mJ/m²), et faible accepteurs d'électrons ($\gamma^+ =1,8$ mJ/m², $\gamma^+ =6$ mJ/m²). Le contact des surfaces de *P. aeruginosa* et d'*E. coli* avec NaCl augmente légèrement son hydrophobie ($\Delta G_{iwi} =21,9$ mJ/m², $\Delta G_{iwi} =30,1$ mJ/m²), leurs caractères donneurs d'électrons ($\gamma^- =53,4$ mJ/m², $\gamma^- =65,3$ mJ/m²), et leurs caractères accepteurs d'électrons ($\gamma^+ =6,9$ mJ/m², $\gamma^+ =7,1$ mJ/m²). De même, NaOCl a eu le même effet sur la surface de *P. aeruginosa* et d'*E. coli* que NaCl, où il a augmenté considérablement l'hydrophilie des surfaces bactériennes ($\Delta G_{iwi} =51,1$ mJ/m², $\Delta G_{iwi} =44,2$ mJ/m²), et leurs caractères donneurs d'électrons ($\gamma^- =54,3$ mJ/m², $\gamma^- =68,5$ mJ/m²). En général, NaOCl avait un effet plus profond sur les propriétés de surface que NaCl.

Tableau 16: Propriétés physicochimiques de surface de *P. aeruginosa* ATCC27853 sous effet de NaCl (27,2 g/L)

<i>P. aeruginosa</i>	Angle de contact (°)			Energies de surfaces (mJ/m ²)			ΔG_{iwi} (mJ/m ²)
	Θ Diiodomethane	Θ Formamide	Θ Water	γ^{LW}	γ^+	γ^-	
Témoin (0 g/L)	81 (1,6)	74 (1,2)	60 (0,5)	16,1	1,8	38,2	16,1
27,2 g/L	72,2 (0,72)	17,5 (0,52)	12,6 (0,06)	21,7	6,9	53,4	21,9

Notes : γ^{LW} : les composantes Lifshitz-Van der Waals de la tension de surface. γ^- : composantes donneuses d'électrons de la tension superficielle. γ^+ : composantes acceptrices d'électrons de la tension superficielle. γ^{LW} : la composante de tension superficielle acide-base de Lewis. ΔG_{iwi} : l'énergie libre d'interaction entre deux entités de ce matériau lorsqu'elles sont immergées dans l'eau. () indique les écart-types.

Tableau 17: Propriétés physicochimiques de surface d'*E. coli* ATCC25922 sous effet de NaCl (27,2 g/L).

<i>E. coli</i>	Angle de contact (°)			Energies de surfaces (mJ/m ²)			ΔG_{iwi} (mJ/m ²)
	Θ Diiodomethane	Θ Formamide	Θ Water	γ^{LW}	γ^+	γ^-	
Témoin (0 g/L)	71 (0,6)	20 (0,3)	16 (0,7)	22	6	49	23,3
27,2 g/L	60,2 (0,7)	7,3 (0,2)	8,5 (0,6)	30,6	7,1	65,3	30,1

Notes : γ^{LW} : les composantes Lifshitz-Van der Waals de la tension de surface. γ^- : composantes donneuses d'électrons de la tension superficielle. γ^+ : composantes acceptrices d'électrons de la tension superficielle. γ^{LW} : la composante de tension superficielle acide-base de Lewis. ΔG_{iwi} : l'énergie libre d'interaction entre deux entités de ce matériau lorsqu'elles sont immergées dans l'eau. () indique les écart-types.

Tableau 18: Propriétés physicochimiques de surface de *P. aeruginosa* ATCC27853 sous effet de NaOCl (0,002 g/L).

<i>P. aeruginosa</i>	Angle de contact (°)			Energies de surface (mJ/m ²)			ΔG_{iwi} (mJ/m ²)
	Θ Diiodomethane	Θ Formamide	Θ Water	γ^{LW}	γ^+	γ^-	
Témoin (0 g/L)	81 (1,6)	74 (1,2)	60 (,5)	16,1	1,8	38,2	16,1
0,002 g/L	39,1 (0,25)	48,1 (0,7)	35,7 (0,11)	31,9	1,3	54,3	51,1

Notes : γ^{LW} : les composantes Lifshitz-Van der Waals de la tension de surface. γ^- : composantes donneuses d'électrons de la tension superficielle. γ^+ : composantes acceptrices d'électrons de la tension superficielle. γ^{LW} : la composante de tension superficielle acide-base de Lewis. ΔG_{iwi} : l'énergie libre d'interaction entre deux entités de ce matériau lorsqu'elles sont immergées dans l'eau. () indique les écart-types.

Tableau 19: Propriétés physicochimiques de surface d'*E. coli* ATCC25922 sous effet de NaOCl (0,002 g/L).

<i>E. coli</i>	Angle de contact (°)			Energies de surface (mJ/m ²)			ΔG_{iwi} (mJ/m ²)
	Θ Diiodomethane	Θ Formamide	Θ Water	γ^{LW}	γ^+	γ^-	
Témoin (0 g/L)	71 (1,3)	20 (1,3)	16 (9,7)	22	6	49	23,3
0,002 g/L	27,3 (0,5)	12,2 (0,7)	8,7 (0,1)	4,2	6,3	68,5	44,2

Notes : γ^{LW} : les composantes Lifshitz-Van der Waals de la tension de surface. γ^- : composantes donneuses d'électrons de la tension superficielle. γ^+ : composantes acceptrices d'électrons de la tension superficielle. γ^{LW} : la composante de tension superficielle acide-base de Lewis. ΔG_{iwi} : l'énergie libre d'interaction entre deux entités de ce matériau lorsqu'elles sont immergées dans l'eau. () indique les écart-types.

D'autre part, le contact des lames de verre avec le NaCl a eu un impact frappant sur leurs propriétés de surface. En effet, les tableaux 19 et 20 exposent certains des principaux changements énergétiques de la surface du verre. Naturellement, la surface du verre est très hydrophile ($\Delta G_{iwi} = 40,7$ mJ/m²), et fortement donneuse d'électrons ($\gamma^- = 51,9$ mJ/m²). Une concentration (27,2 g/L) de NaCl a suffi d'inverser son hydrophobie ($\Delta G_{iwi} = -31,7$ mJ/m²), et à diminuer fortement son caractère donneur d'électrons ($\gamma^- = 7,4$ mJ/m²). Au contraire, NaOCl a eu un faible impact sur l'hydrophobie de la surface ($\Delta G_{iwi} = 49,3$ mJ/m²), et son caractère donneur d'électrons ($\gamma^- = 62,7$ mJ/m²).

Tableau 20: Propriétés physicochimiques de la surface du verre sous effet de NaCl (27,2 g/L).

Glass	Angle de contact (°)			Energie de surface (mJ/m ²)			ΔG_{iwi} (mJ/m ²)
	Θ Diiodomethane	Θ Formamide	Θ Water	γ^{LW}	γ^+	γ^-	
Témoin (0 g/L)	50,2 (0,8)	51,5 (1,15)	42,1 (0,24)	34,2	0,00	51,9	40,7
27,2 g/L	63,6 (0,22)	52,1 (0,32)	74,3 (0,27)	26,5	2,8	7,4	-31,7

Notes: γ^{LW} : the Lifshitz-Van der Waals components of the surface tension. γ^- : electron donor components of the surface tension. γ^+ : electron acceptor components of the surface tension. γ^{LW} : the Lewis acid-base surface tension component. ΔG_{iwi} : the free energy of interaction between two entities of that material when immersed in water. () indique les écart-types.

Tableau 21: Propriétés physico-chimiques de la surface du verre sous effet de NaOCl (0.002 g/L).

Glass	Contact angle (°)			Surface tensions (mJ/m ²)			ΔG_{iwi} (mJ/m ²)
	Θ Diiodomethane	Θ Formamide	Θ Water	γ^{LW}	γ^+	γ^-	
Témoin (0 g/L)	50,2 (0,8)	5,5 (1,15)	42,1 (0,24)	34,2	0,00	51,9	40,7
0,002 g/L	41,3 (0,35)	45,7 (0,6)	30,4 (0,31)	38,9	0,1	62,7	49,3

Notes: γ^{LW} : the Lifshitz-Van der Waals components of the surface tension. γ^- : electron donor components of the surface tension. γ^+ : electron acceptor components of the surface tension. γ^{LW} : the Lewis acid-base surface tension component. ΔG_{iwi} : the free energy of interaction between two entities of that material when immersed in water. () indique les écart-types.

3.2. Effet de NaCl sur le biofilm de *P. aeruginosa* et d'*E. coli* :

L'exposition des biofilms de *P. aeruginosa* et d'*E. coli* au NaCl a eu un effet significatif sur leurs organisations et leurs détachements. En effet, les figures 21 et 22 montrent le développement des biofilms avant et pendant 48 minutes de contact avec la solution de NaCl. Les images illustrent une désorganisation progressive des biofilms au cours du temps jusqu'à ce que de petites microcolonies subsistent. Alors qu'après 48 minutes de contact, les figures 21 et 23 ne montrent aucun effet du NaOCl sur le biofilm de *P. aeruginosa* et celui d'*E. coli*.

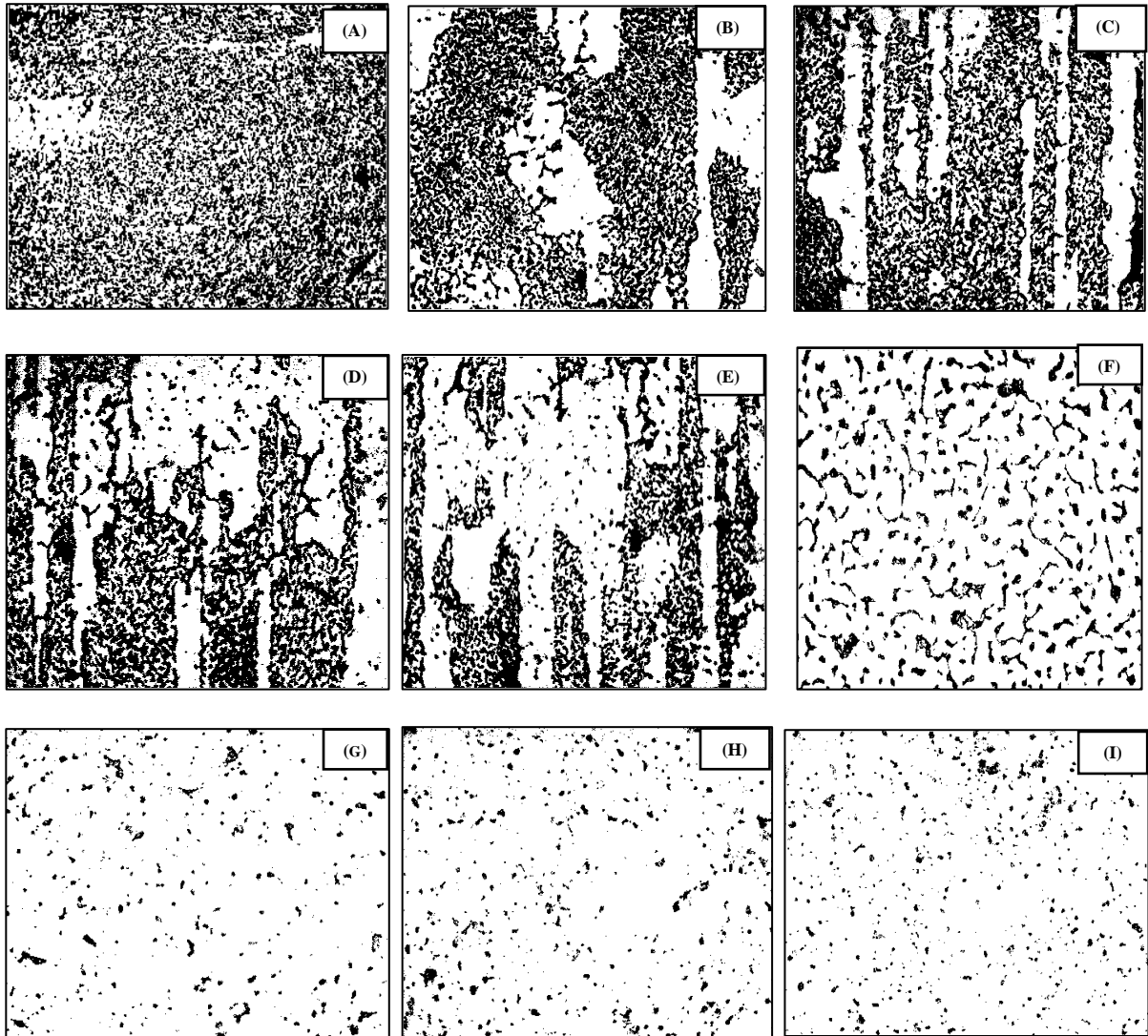


Figure 21. Images ($\times 400$) du biofilm de *P. aeruginosa* traité par NaCl (27,22 g/L) après 0 min (A) témoin, 6 min (B), 12 min (C), 18 min (D), 24 min (E), 30 min (F), 36 min (G), 42 min (H) et 48 min (I).

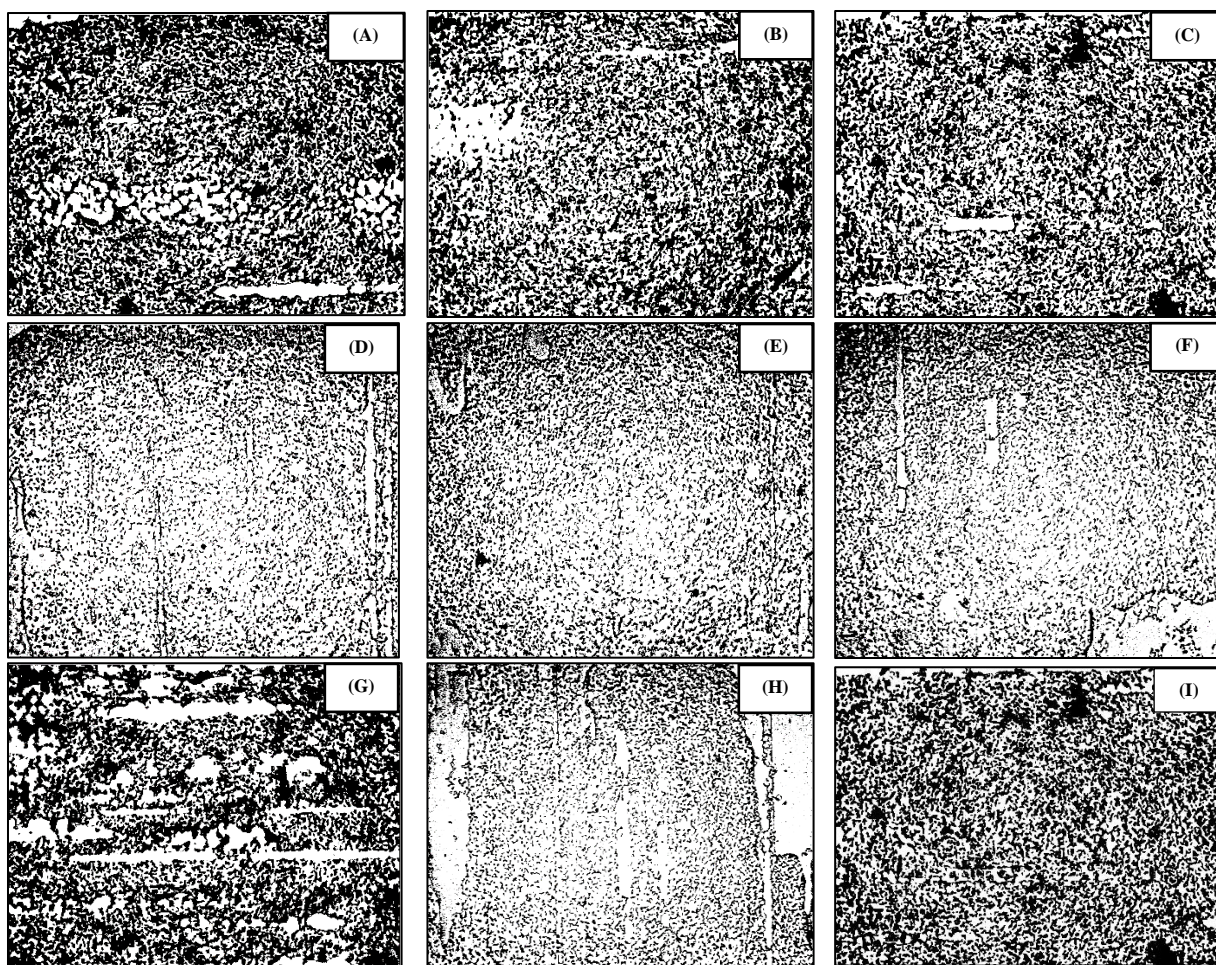


Figure 22. Images ($\times 400$) du biofilm de *P. aeruginosa* traité par NaOCl (0,002 g/L) après 0 min (A) témoin, 6 min (B), 12 min (C), 18 min (D), 24 min (E), 30 min (F), 36 min (G), 42 min (H) et 48 min (I).

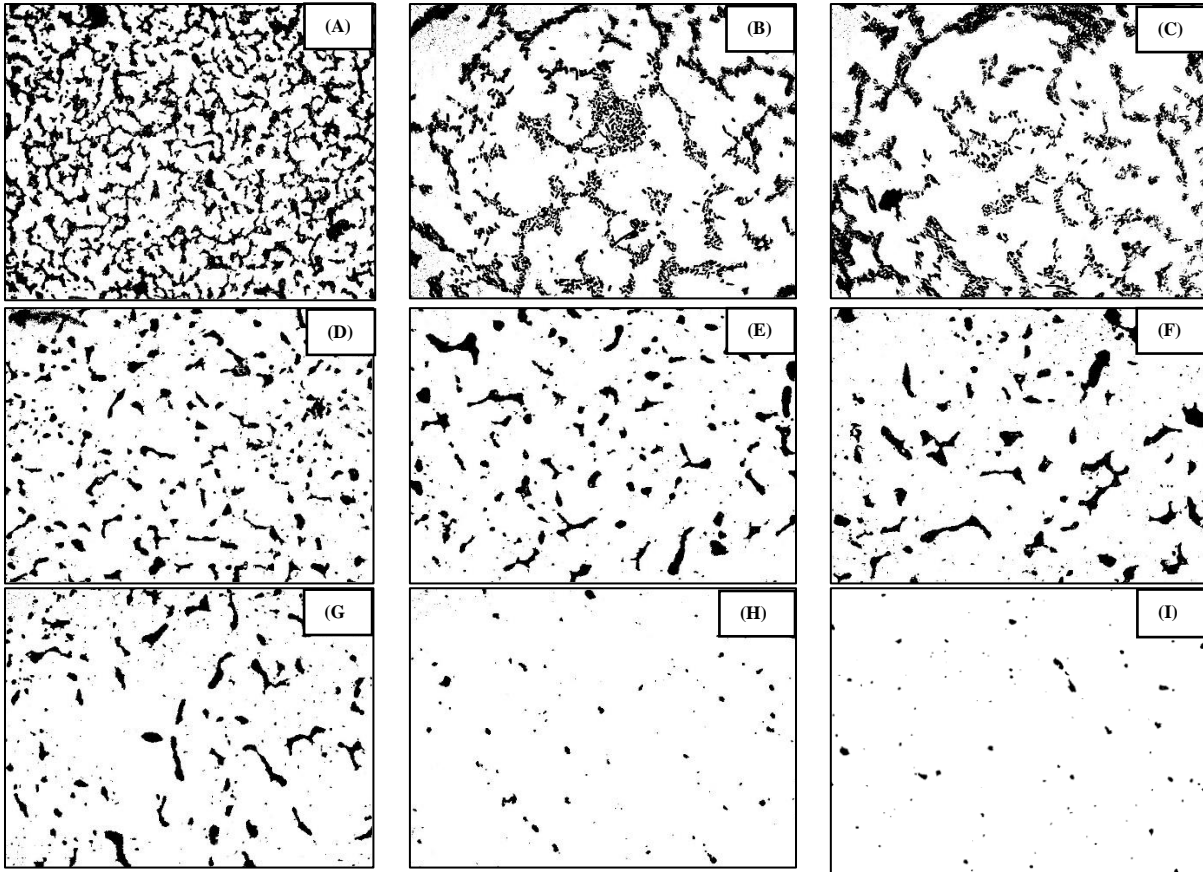


Figure 23. Images ($\times 400$) du biofilm d'*E. coli* traité par NaCl (27,22 g/L) après 0 min (A) (temoin), 6 min (B), 12 min (C), 18 min (D), 24 min (E), 30 min (F), 36 min (G), 42 min (H) et 48 min (I).

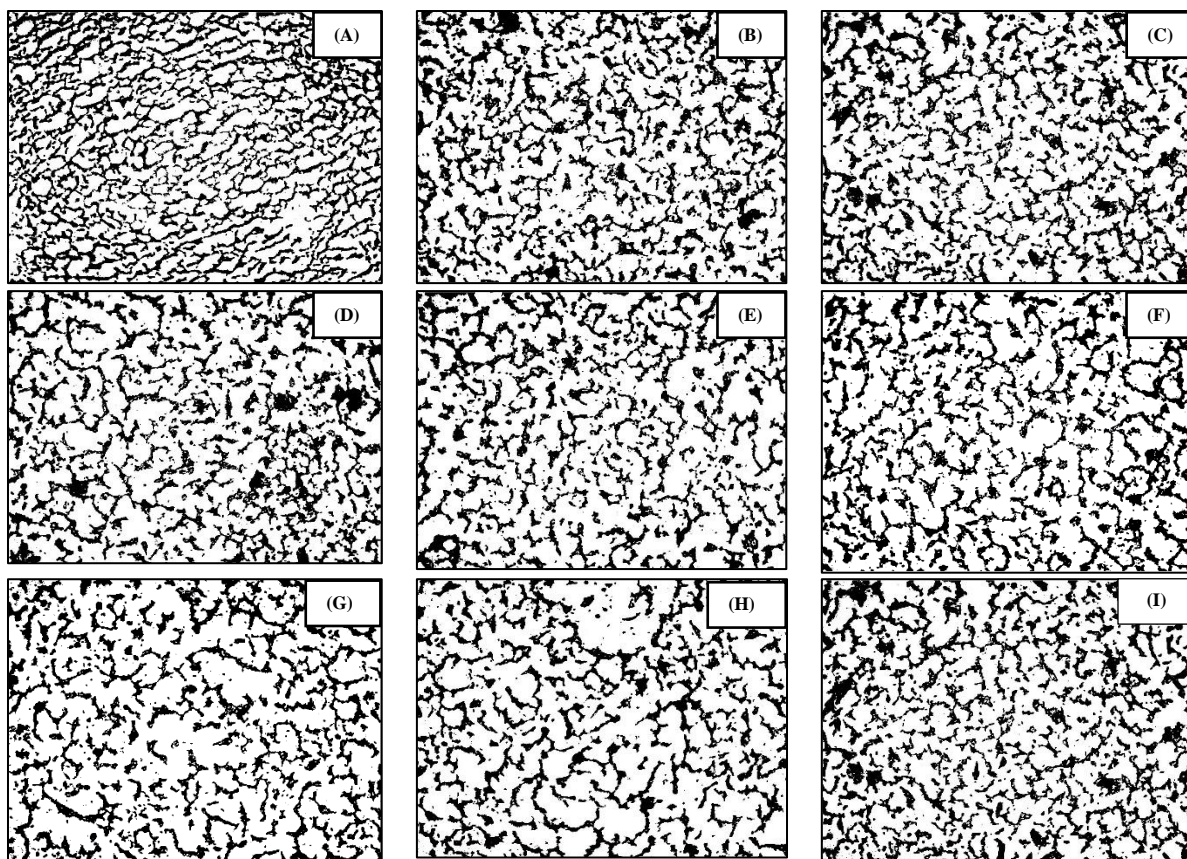


Figure 24. Images ($\times 400$) du biofilm d'*E. coli* traité par NaOCl (0,002 g/L) après 0 min (A) (temoin), 6 min (B), 12 min (C), 18 min (D), 24 min (E), 30 min (F), 36 min (G), 42 min (H) et 48 min (I).

3.3. Pourcentage de la surface occupée par le biofilm de *P. aeruginosa* et d'*E. coli* :

Afin de confirmer l'efficacité du NaCl et du NaOCl contre les biofilms de *P. aeruginosa* et d'*E. coli*, les pourcentages des surfaces occupées par ces biofilms ont été suivis dans le temps. La figure 23 et 24 montrent l'évolution de la surface des biofilms sur 48 minutes. En effet, un net rétrécissement de la surface du biofilm a été observé lors du contact avec le NaCl, prouvé par une grande diminution du pourcentage de surface occupée, alors que le NaOCl n'a eu quasiment aucun effet.

4. Discussion :

Le détachement et l'élimination d'un biofilm d'une surface est un mécanisme complexe et difficile car il comprend plusieurs facteurs. Il est connu depuis longtemps que les biofilms sont des structures hétérogènes (McAuliffe *et al.* 2004) et présentent une résistance élevée aux traitements biocides et antibiotiques (Govan & Deretic 1996). La résistance des biofilms aux agents antimicrobiens est intimement liée à l'organisation tridimensionnelle des cellules

bactériennes ainsi qu'aux matrices d'exopolysaccharides qui résultent de processus multifactoriels (Díaz De Rienzo *et al.* 2016).

Les résultats de cette étude montrent qu'un seul agent chimique peut déchirer et perturber un biofilm malgré sa concentration modérée. En effet, le NaCl a eu un effet très significatif contre le biofilm de *P. aeruginosa* et d'*E. coli* (Figure 25 et 26). Cependant, il a été démontré que les biofilms des bactéries Gram-négatives sont plus résistants que ceux des autres espèces (Augustin *et al.* 2004). En outre, plusieurs études ont signalé que l'exposition de *S. aureus* au NaCl renforce son biofilm (Kennedy & O'Gara 2004; Rode *et al.* 2007; Lee *et al.* 2014). En outre, Xu *et al.* (2010) ont montré que l'agrégation des cellules de *S. aureus* augmente lorsqu'elles sont exposées à des concentrations de NaCl supérieures à 100 g/L. Une autre étude a montré qu'une concentration élevée de NaCl était capable de renforcer le biofilm de *Salmonella*, tandis que la microscopie confocale à balayage laser a montré que la plupart des cellules sont mortes (Yoon 2013). Par conséquent, les divergences entre les résultats de cette étude et ces déclarations sont probablement dues aux changements physico-chimiques des surfaces causées par le contact avec le NaCl et le NaOCl, c'est-à-dire à la nature des espèces bactériennes testées. En effet, Lee *et al.* (2014) ont déclaré que l'effet du NaCl sur la cellule bactérienne est fonction de la bactérie en question. En général, lorsque la désinfection contre un biofilm n'est pas efficace, cela tient à deux causes. La première est une pénétration relative ou incomplète du biocide dans le biofilm. En effet, les mesures de pénétration des antibiotiques *in vitro* ont montré que certains antibiotiques pénètrent facilement dans le biofilm bactérien (Garner *et al.* 1996) alors que d'autres ne le font pas. La deuxième cause dépend d'une modification de l'environnement au sein du biofilm où Stewart and chemotherapy (1996) ont montré que l'oxygène peut être entièrement consommé à la surface des couches du biofilm, entraînant la création de niches anaérobies dans les couches profondes. En outre, les gradients de concentration des produits métaboliques pourraient limiter l'effet des substances désinfectantes (Augustin *et al.* 2004). De plus, l'accumulation locale de déchets acides peut créer une importante différence de pH entre l'intérieur du biofilm et le fluide environnant (De Beer *et al.* 1994), qui perturbe l'action du biofilm. Cette étude a révélé un effet remarquable du NaCl sur le biofilm de *P. aeruginosa* qui pourrait être la conséquence de sa bonne diffusion dans le biofilm. De plus, la jeunesse du biofilm peut être un facteur important dans sa susceptibilité à la perturbation par le NaCl en raison de la rareté ou de l'absence de métabolites limitant son NaCl.

D'autre part, le NaCl peut également affecter le matériel génétique des bactéries et influencer son expression, notamment les gènes inclus dans l'attachement au biofilm. Parmi ces gènes,

icaA code pour les protéines d'attachement intracellulaire (Cue *et al.* 2012). En outre, le gène *alt* est également responsable de la promotion de l'attachement des bactéries aux surfaces (Biswas *et al.* 2006). En effet, le gène le plus influencé par les concentrations de NaCl est *icaA*, dont l'expression a été multipliée par 9 et 20, respectivement à 40 g/L et 60 g/L de NaCl par rapport à 00 g/L (Lee *et al.* 2014). Bien que plusieurs études aient rapporté que la présence de NaCl augmente l'adhésion et améliore la stabilité du biofilm (Mørretrø *et al.* 2003; Jensen *et al.* 2007; Rode *et al.* 2007). Lee *et al.* (2014) ont rapporté qu'une diminution de la concentration en NaCl diminue l'expression du gène *icaA* et par conséquent la destruction des liens intercellulaires et la dégradation progressive du biofilm. En outre, Giaouris *et al.* (2015) ont réalisé une étude sur la formation d'un biofilm de *Salmonella* sur des coupons en acier inoxydable et ont constaté qu'une concentration élevée de NaCl (105 g/L) était capable de réduire fortement la population bactérienne. En plus, Vaezi *et al.* (2020) ont signalé qu'une concentration de NaCl supérieure à 60 g/L a eu un effet considérable sur la formation de biofilms de *S. aureus*. En outre, le NaOH peut neutraliser les acides aminés et former de l'eau et du sel. Les groupes amino des protéines peuvent également réagir avec l'acide hypochloreux (HOCl) pour former des chloramines qui interfèrent avec le métabolisme cellulaire (Estrela *et al.* 2002). L'oxydation de certains acides aminés dans les protéines peut être provoquée par les ions HOCl et hypochlorite (OCl⁻) (Pattison *et al.* 2007; Rosen *et al.* 2009). En ce sens, la mort cellulaire pourrait provenir d'une forte réaction entre les composés oxydés avec la membrane bactérienne et provoque l'oxydation d'autres protéines membranaires externes, ce qui est facilité par l'oxydation de protéines intracellulaires (Arana *et al.* 1999). La destruction des micro-organismes commence par la chloration des substances lipoprotéiques présentes dans les membranes des cellules bactériennes pour former des composés chlorés toxiques qui provoquent la fuite des macromolécules des cellules (Kim *et al.* 2008).

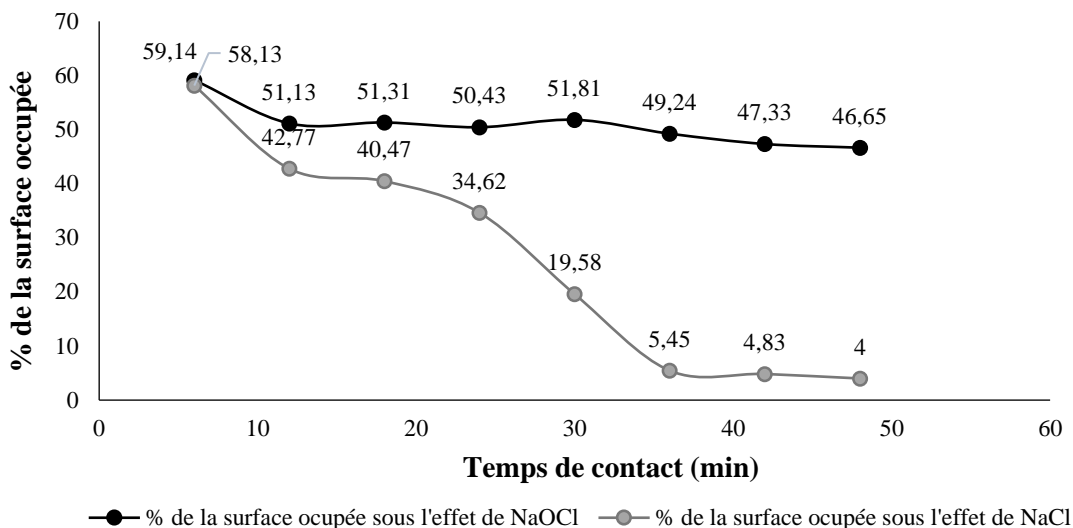


Figure 25. Pourcentages (%) de la surface occupée par le biofilm de *P. aeruginosa* ATCC27853 au cours du temps (48 min) sous l'effet de NaCl (27.22g/L) et NaOCl (0.002 g/L).

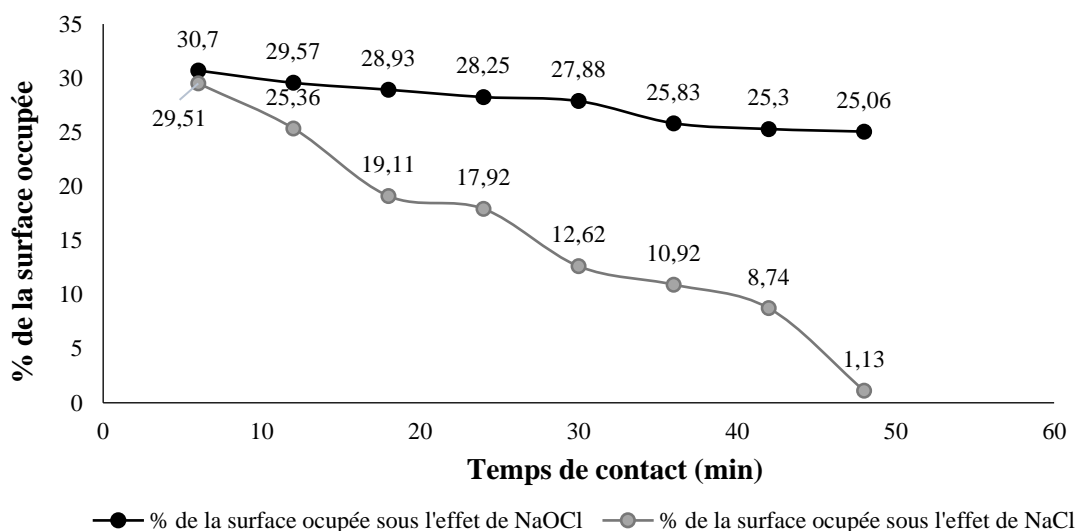


Figure 26. Pourcentage (%) de la surface occupée par le biofilm d'*E. coli* ATCC25922 au cours du temps (48 min) sous l'effet de NaCl (27.22g/L) et NaOCl (0.002 g/L).

Presque toutes les études citées précédemment indiquent que des concentrations élevées de NaCl favorisent la formation de biofilms et non pas le contraire. Il est donc nécessaire de se concentrer sur les propriétés de surface et le rôle du NaCl dans leurs modifications. En effet, les conditions de stress, principalement le NaCl, peuvent modifier les propriétés de surface telles que la charge de surface et la composition de la membrane bactérienne (Bereksi *et al.* 2002; Chavant *et al.* 2002). Par conséquent, l'hydrophobie des surfaces bactériennes change avec le changement de la concentration de NaCl (Dykes *et al.* 2003). De plus, l'hydrophobie est également importante, non seulement pour le phénomène d'adhésion bactérienne, mais aussi pour assurer le passage des métabolites à travers la membrane bactérienne (Moorman *et*

al. 2008). En outre, de nombreuses études ont montré que l'hydrophobie de la surface cellulaire est fortement liée à l'adhésion bactérienne et à la formation ou au détachement du biofilm (Hood & Zottola 1997; Chavant *et al.* 2002; Gorski *et al.* 2003; Di Bonaventura *et al.* 2008a). En effet, Xu *et al.* (2010) ont montré que *S. aureus*, *L. monocitogenes* et *S. typhimirium* avaient une hydrophobie élevée lorsqu'elles étaient exposées à de fortes concentrations de NaCl. D'autre part, plusieurs études ont trouvé que le verre a une surface facilement modifiable en raison de sa susceptibilité à être recouverte par les molécules du milieu extérieur. En effet, Hamadi *et al.* (2009) ont constaté que le verre était hydrophile à pH 5 et pH 9 et hydrophobe à d'autres valeurs de pH. De même, Koubali *et al.* (2020); (2021) ont constaté que l'hydrophobie du verre change après un traitement avec des surfactants. Cette étude montre que le verre, *E. coli* et *P. aeruginosa* avaient des surfaces naturellement hydrophiles. Cependant, après avoir été exposée au NaCl, la surface du verre et d'*E. coli* et de *P. aeruginosa* deviennent respectivement, plus hydrophobe et légèrement plus hydrophile. Par conséquent, d'un point de vue énergétique, le détachement du biofilm semble être logique en raison des éventuelles répulsions électrostatiques entre les cellules d'*E. coli*, de *P. aeruginosa* et la surface du verre.

La contamination des systèmes de distribution d'eau potable est une menace majeure pour la santé publique en raison de leur charge potentielle en microorganismes pathogènes (Li *et al.* 2016). Le NaOCl est connu pour être le désinfectant chimique le plus utilisable pour l'eau potable, en particulier pour les cellules planctoniques. Cependant, les concentrations de désinfectant sont un paramètre très important qui doit être contrôlé et optimisé, sinon l'eau perdra d'autres qualités et menacera la santé des consommateurs. Les résultats de la présente étude ont montré un grand effet du NaCl sur les biofilms de *P. aeruginosa* et d'*E. coli*, alors que le NaOCl ne l'était pas (figure 25 et 26). Par conséquent, une combinaison de NaCl et de NaOCl pourrait être possible pour une désinfection efficace de l'eau, précisément pour résoudre les problèmes des biofilms de *P. aeruginosa* et d'*E. coli* dans les réseaux d'eau.

5. Conclusion :

Le NaCl est une substance très réactive, connue pour son rôle dans l'alimentation, alors que son rôle anti-biofilms reste à établir. Pour cela, la présente étude a décrit l'effet anti-biofilm du NaCl et du NaOCl sur des biofilms complets de *P. aeruginosa* et d'*E. coli*. En effet, les résultats ont montré que le NaCl provoque une désorganisation et une disparition progressive des biofilms. De plus, le NaCl a montré un effet remarquable sur les propriétés de surface, où le verre et les deux souches deviennent respectivement entièrement hydrophobes et plus

hydrophiles. Ainsi, il semble que l'élimination du biofilm à l'aide de NaCl pourrait être un phénomène énergétique suite aux répulsions entre les surfaces des souches et celle du verre. En revanche, les résultats n'ont montré aucun effet du NaOCl sur ce biofilm avec un léger effet sur les propriétés de la surface. Par conséquent, et sachant que NaOCl est plus efficace contre les bactéries planctoniques, cette étude suggère une possible combinaison de NaCl et de NaOCl qui consiste à vider la canalisation d'eau et la remplir par la solution de NaCl à concentration idéale (27,2 g/L), après un duré la remplir par la solution de NaOCl. Par ailleurs, chaque traitement est toujours limité par quelques facteurs, où dans ce cas le temps de traitement semble être un facteur important car il conditionne l'efficacité désinfectante et économique de cette approche.

Chapitre 3 : Cinétique du comportement des biofilms de *P. aeruginosa* et d'*E. coli* en présence de NaCl :

Résumé :

Pseudomonas aeruginosa et *Escherichia coli* sont deux bactéries pathogènes opportunistes ayant une grande capacité de formation de biofilm et de développement de résistances. Le but de ce chapitre est de tester l'effet progressive d'une concentration modérée (27,22 g/L) de chlorure de sodium (NaCl) sur les propriétés de surfaces de *P. aeruginosa*, d'*E. coli* et du verre ainsi que les biofilms formés sur des lames de verre. Les caractéristiques énergétiques de surface du verre et des souches sont déterminées par la méthode de l'angle de contact. L'effet du NaCl sur les biofilms est révélé par la microscopie optique couplée à un ordinateur. Les images du biofilm ont été traitées par le software MATLAB (R2015a). D'une part, les données de l'angle de contact ont montré que les surfaces de *P. aeruginosa* et d'*E. coli* sont devenues moins hydrophiles. En outre, *P. aeruginosa* est devenue plus donneur d'électrons contrairement à *E. coli*. D'autre part, l'hydrophobicité du verre a été inversée par le NaCl où elle est devenue très hydrophobe et faiblement donneur d'électrons. Cependant, après une heure, le verre a commencé à récupérer progressivement ses propriétés de surfaces naturelles au bout de six heures de contact. En outre, les résultats de la microscopie optique ont montré une disparition claire du biofilm au bout d'une heure. Au-delà d'une heure, les cellules bactériennes détachées commencent à adhérer encore une fois et former des microcolonies.

1. Introduction :

Les biofilms microbiens ont fait l'objectif principale d'une infinité de travaux de recherches durant les années précédentes. Pour des raisons scientifiques, ces travaux ont été dirigés vers l'idée de savoir comment une bactérie arrive à s'attacher et vivre dans une communauté cellulaire. En outre, la formation des biofilms cause de sérieux problèmes dans les domaines médical et industriel, en raison de leur résistance aux traitements appliqués (Harmsen *et al.* 2010). Généralement, les biofilms testés sont formés aux laboratoires, probablement différente des biofilms de la nature. Cependant, les expériences effectuées sur ces biofilms fournissent des informations importantes à propos de leur formation, de leur développement,

et de leur dispersion sur une surface qui est peut-être pertinente en dehors des systèmes du laboratoire. Les biofilms sont des communautés de microorganismes attachés à une surface par des polysaccharides, des protéines, et des acides nucléiques (Sauer *et al.* 2007). *P. aeruginosa* et *E. coli* développent des biofilms suivant un processus complexe générant des structures complexes. Ces structures sont développées progressivement par un attachement réversible des cellules planctoniques à une surface, une transition d'attachement réversible à un attachement irréversible, un développement initial de l'architecture du biofilm, un développement de microcolonies vers un biofilm mature, et dispersion des cellules du biofilm vers l'état planctonique (Van Houdt & Michiels 2005). En effet, les cellules bactériennes fixées sont normalement plus résistantes aux stress de l'environnement que les cellules planctoniques (Kumar & Anand 1998). En revanche, Stopforth *et al.* (2002) ont trouvé que les cellules d'un biofilm sont assez fragiles que les cellules planctoniques.

Les biofilms ont pris une grande importance car ils touchent presque tous les domaines surtout le domaine alimentaire en raison de sa relation étroite avec la santé publique (Di Bonaventura *et al.* 2008a). Les réseaux où les eaux potables circulent est un environnement idéal et exemplaire pour la mise en place des biofilms mono ou multi espèces malgré qu'il est pauvre en nutriments. En effet, l'adhésion et la formation des biofilms est la stratégie de survie de la biomasse des eaux (Aparna & Yadav 2008) car elle leur confie la résistance contre les traitements d'éliminations, physiques et chimiques. Beaucoup de travaux ont mis le point sur les différents facteurs physicochimiques gouvernant la bio-adhésion et la formation des biofilms (Latrache *et al.* 1994; Latrache *et al.* 2002; Hamadi *et al.* 2005; Hamadi *et al.* 2008; Mohamed *et al.* 2011; Hamadi *et al.* 2012; Hamadi *et al.* 2014). Parmi ces facteurs, l'hydrophobicité de la surface bactérienne et celle du support est primordiale (Van Loosdrecht *et al.* 1987b). *P. aeruginosa* et *E. coli* sont des pathogènes opportunistes et omniprésents, connus pour la contamination des eaux potables surtout qu'elles ont la capacité de se développer dans des milieux pauvres en nutriments (Carson *et al.* 1972; Elgoulli *et al.* 2021). En outre, ces souches sont considérées comme modèles de l'efficacité des traitements d'eau. Les biofilms causent de sérieux problèmes écologiques, médicaux, et industriels où ils peuvent former des encrassements et des pertes de charge durant l'écoulement (Goode *et al.* 2013). D'une part, la désinfection des eaux en général, a été effectuée par l'hypochlorite de sodium (NaOCl) (Simoes *et al.* 2010; Pereira *et al.* 2013). Cependant, des bactéries pathogènes opportunistes comme *P. aeruginosa* et *E. coli* ont été encore détectées dans les eaux potables surtout celles en bouteille. En raison du développement des résistances par le monde bactérien, des doses supplémentaires sont devenues nécessaires pour une désinfection

efficace. D'autre part, le chlorure de sodium (NaCl) est une substance connue depuis l'antiquité et usée comme condiment et conservateur des aliments. En outre, Rode *et al.* (2012) ont rapporté que NaCl possède la capacité de changer les propriétés de surface de plusieurs souches bactériennes. Cependant, l'effet de NaCl sur un biofilm par le biais des changements des propriétés de surfaces n'est pas encore établi. Pour cela, l'objectif de ce travail est de découvrir l'effet d'une concentration élevée de chlorure de sodium sur les biofilms de *P. aeruginosa* et d'*E. coli* à travers son effet sur les propriétés de surface du verre et des deux souches.

2. Matériels et méthodes :

2.1. Préparation des suspensions bactériennes :

Deux bactéries, *P. aeruginosa* ATCC27853 et *E. coli* ATCC25922, sont utilisées pour ce travail. Les bactéries ont étéensemencées et incubées pendant 12 h à 37°C dans le milieu solide Luria-Bertani pour les collecter en phase exponentielle. Les suspensions bactériennes sont préparées par raclage des cellules et mise en suspension dans une solution de KNO₃ (0.1 M). Puis, elles sont lavées deux fois par centrifugation (5000 g pendant 10 min) en utilisant la même solution (KNO₃ 0.1 M) (Hamadi *et al.* 2014).

Un échantillon de chaque suspension bactérienne préparée est filtré à l'aide de pression négative sur un filtre d'acétate de cellulose (0.45 µm de diamètre des pores). Un tapis de cellules bactériennes est formé après filtration sur le filtre. Les filtres humides sont placés avec précaution sur des supports plans et laissés sécher à l'air libre (Hamadi *et al.* 2008).

2.2. Préparation des lames de verre :

Des lames de verre ont été utilisées durant cette étude comme support sur lequel les biofilms de *P. aeruginosa* et d'*E. coli* seront formés. Ce matériau est choisi sur la base de sa composition simple et son caractère hydrophile. La préparation de ce support commence par immerger les lames dans de l'éthanol 70% (vol/vol) pendant 15 min pour nettoyer leurs surfaces de toute matière organique. Après, les lames sont rincées six fois par de l'eau distillée et stérilisées par autoclavage (120°C pendant 15 min) (Assaidi *et al.* 2018; Elgoulli *et al.* 2021).

2.3. Caractérisation physicochimique d'une surface :

Un goniomètre (GBX instruments, France), est utilisé pour la caractérisation physicochimique des surfaces. Cette méthode utilise la technique de la goutte sessile. Elle est basée sur le dépôt de trois gouttes de chacun de trois liquides (Eau, Formamide 99%, Di-Iodométhane 99%) sur

la surface des supports testés (filtres de *P. aeruginosa* ATCC27853 et d'*E.coli* ATCC25922 ou lames de verre). Les mesures de l'angle de contact entre le support et la goutte de chaque liquide sont répétées trois à six fois et leurs moyennes sont déterminées.

Le calcul des énergies de surface (forces de Lifshitz-Van der Waals (γ^{LW}) et les interactions acidobasiques (γ^{AB})) est performé par le système de trois équations à partir de l'application de l'équation de Young-Dupré à chaque liquide sonde :

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

θ représente dans cette équation, l'angle de contact entre le liquide et la surface. γ^- est le caractère donneur d'électrons, γ^+ est le caractère accepteur d'électrons, et γ^{LW} est l'énergie libre de van der-Waals. S et L représentent respectivement les surfaces solides et liquides.

L'énergie libre est donnée par l'équation :

$$\gamma_S = \gamma_S^{LW} \gamma_S^{AB} \quad (\text{Equation 2})$$

où $\gamma_S^{AB} = 2\sqrt{\gamma_S^- \gamma_L^+}$ (Equation 3) est l'énergie libre des interactions acide-base.

En se basant sur l'approche de Van Oss *et al.* (1986), l'hydrophobie des surfaces est évaluée par les mesures d'angle de contact. Selon cette approche, le degré d'hydrophobie est exprimé par l'énergie libre entre deux entités lorsqu'elles sont immergées dans l'eau ; elle est notée ΔG_{iwi} et calculée à partir des composantes énergétiques des surfaces des entités en interaction selon la formule suivante :

$$\Delta G_{iwi} = -2\gamma_{iw} = -2 \left[\left(\sqrt{\gamma_i^{LW}} - \sqrt{\gamma_w^{LW}} \right)^2 + 2 \left(\sqrt{\gamma_i^+ \gamma_i^-} + \sqrt{\gamma_w^+ \gamma_w^-} - \sqrt{\gamma_i^+ \gamma_w^-} - \sqrt{\gamma_w^+ \gamma_i^-} \right) \right] \quad (\text{Equation 4})$$

Si l'interaction entre les deux entités de la surface est plus forte que celle entre chaque entité et l'eau, la surface est considérée hydrophobe ($\Delta G_{iwi} > 0$). Inversement, une surface est considérée hydrophile si l'interaction entre les deux entités de la surface est plus faible que celle entre chaque entité et l'eau, où $\Delta G_{iwi} < 0$.

2.4. Formation des biofilms de *P. aeruginosa* et *E. coli* et traitement par NaCl :

La formation des biofilms de *P. aeruginosa* ATCC27853 et d'*E.coli* ATCC25922 sur les lames du verre commence par la mise des lames dans des boîtes de Petri stériles et ajout des suspensions bactériennes déjà préparées (10^8 UFC/mL). Après 8 heures de contact, les lames sont récupérées et doucement rincées 3 fois par de l'eau distillée stérile afin d'éliminer toute cellule non adhérente.

Le traitement du biofilm par le chlorure de sodium (NaCl) se fait par mise des lames sur lesquelles les biofilms sont formés dans des boîtes de Petri et ajout de la solution de chlorure de sodium (27,22 g/L de NaCl). Le traitement dure 4 heures. Des photos du biofilm sont prises chaque heure à l'aide de la microscopie optique couplée avec un ordinateur. Les photos sont ensuite traitées par le logiciel MATLAB (R2015a) pour avoir des images claires et avoir le pourcentage de la surface occupée par les bactéries à chaque stade du traitement.

3. Résultats :

3.1. Effet du NaCl sur les biofilms de *P. aeruginosa* et d'*E. coli* :

L'exposition du biofilm de *P. aeruginosa* ATCC27853 et d'*E. coli* ATCC25922 à la solution de chlorure de sodium (27,2 g/L) a un effet spectaculaire sur leurs détachements et réinstallations. Les figures 26 et 27 décrivent le développement progressif des biofilms avant et au bout de 4 h de contact avec NaCl. Les images montrent une disparition presque totale des biofilms des deux souches après 1 heure de traitement. Cependant, pour les deux souches, les biofilms commencent à se former par ré-adhésion et formation de microcolonies surtout dans le cas d'*E. coli*.

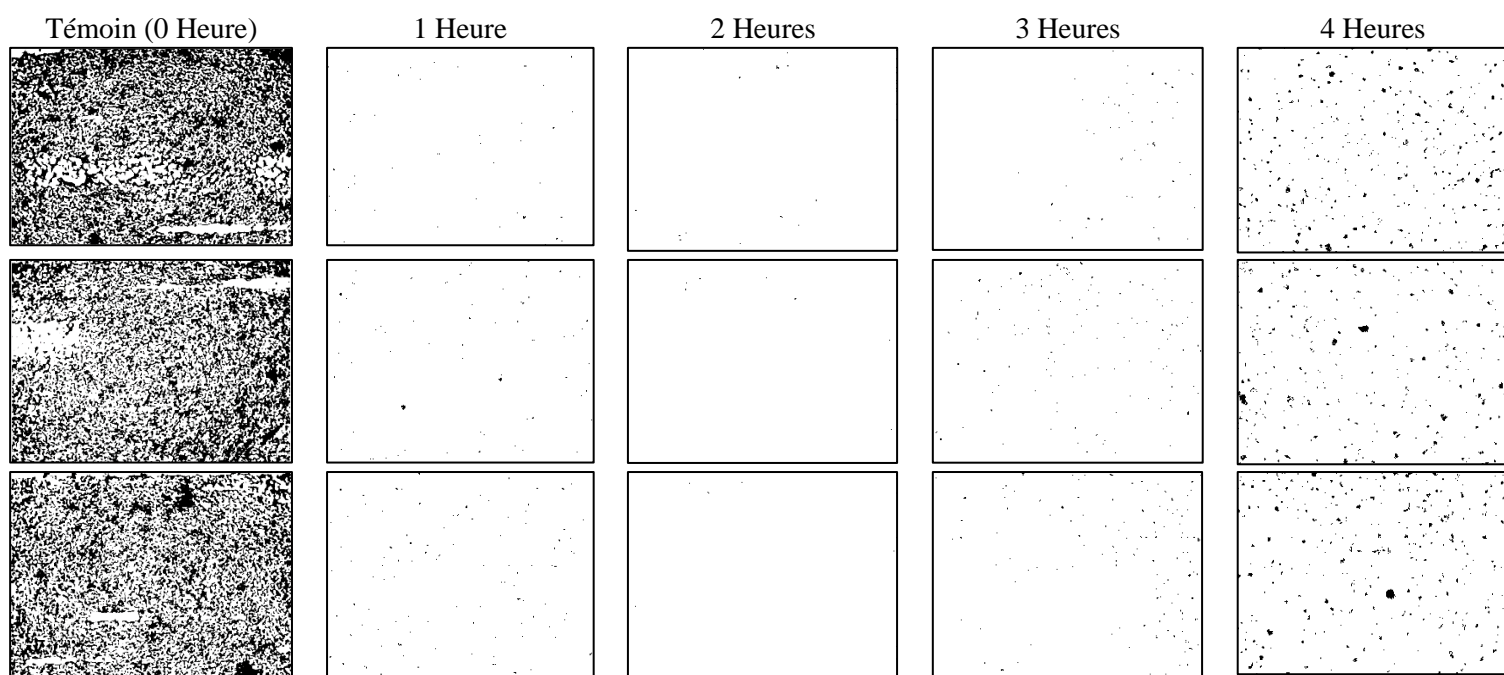


Figure 27 : Cinétique du développement du biofilm de *P. aeruginosa* traité par NaCl.

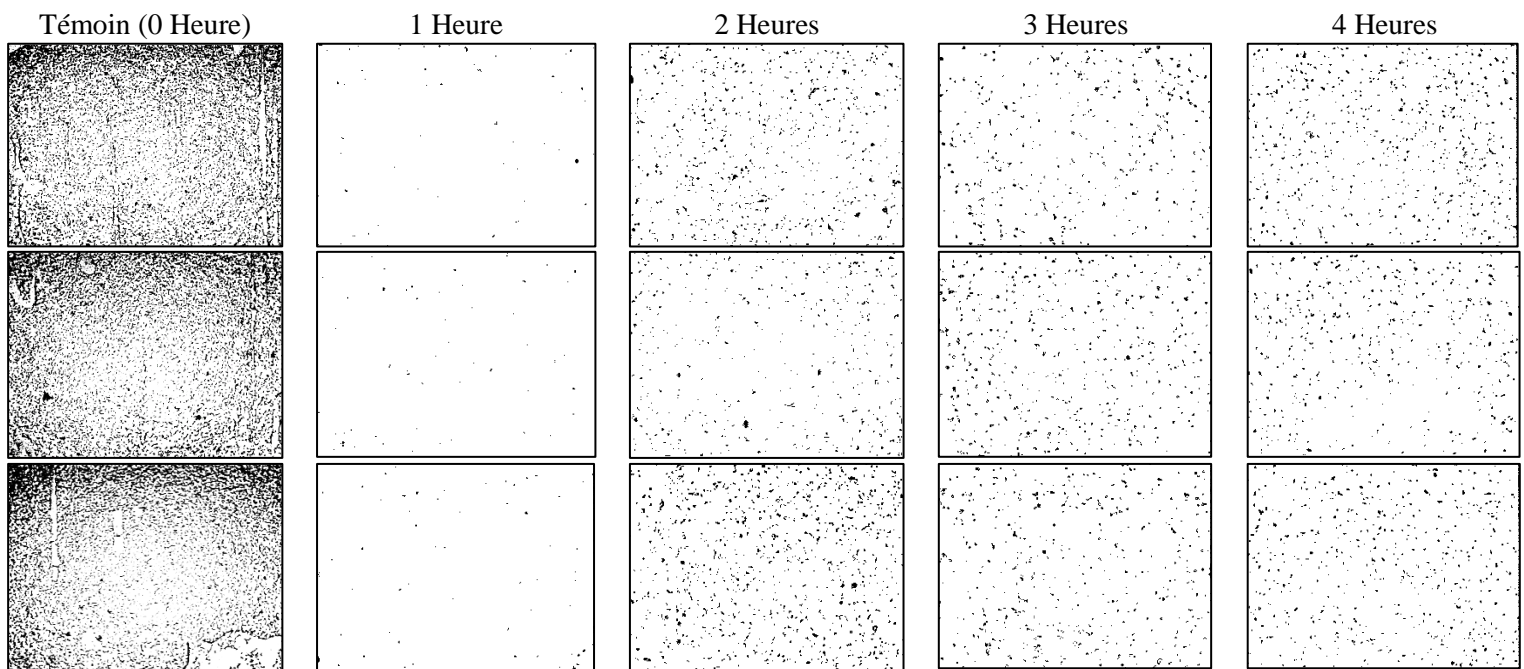


Figure 28. Cinétique du développement du biofilm d'*E. coli* traité par NaCl.

Afin de confirmer l'effet du chlorure de sodium sur les biofilms de *P. aeruginosa* ATCC27853 et d'*E. coli* ATCC25922, les pourcentages de la surface occupée par chacun ont été suivis au cours du temps. La figure 28 présente l'évolution de la surface du biofilm pendant 4 h de traitement. Une diminution brutale et claire du pourcentage de la surface occupée est constatée pour les deux biofilms après 1 h de traitement suivie d'une augmentation de la surface occupée progressive pour les deux souches.

3.2. Caractérisation physicochimique des surfaces du verre, de *P. aeruginosa* et d'*E. coli* :

Le tableau 21 présente l'effet de de NaCl (27,2 g/L) sur les propriétés de surface de *P. aeruginosa* ATCC27853. L'hydrophobicité d'une surface peut être obtenue directement à partir de l'angle de contact par rapport à l'eau (Oliveira *et al.* 2001). Aussi, le degré absolu d'hydrophobicité (ΔG_{iwi}) d'une surface par rapport à l'eau peut être calculé à l'aide de l'approche de Van Oss, (1997) via l'équation 4.

Tableau 22. Cinétique du développement des propriétés de la surface de *P. aeruginosa* sous effet du NaCl (27,2 g/L).

<i>P. aeruginosa</i>	Contact angle (°)			Surface tensions (mJ/m ²)			ΔG_{iwi} (mJ/m ²)
	Θ Diiodomethane	Θ Formamide	Θ Water	γ^{LW}	γ^+	γ^-	
Témoin (0 Heure)	81 (1,6)	74 (1,2)	60 (0,5)	16,1	1,8	38,2	34,94
1 Heure	60,77 (0,57)	18,53 (0,55)	20,7 (0,35)	28,17	4,1	49,2	23,00
2 Heures	57,43 (0,78)	18,73 (0,25)	17,97(0,25)	30,03	3,27	51,67	27,43
3 Heures	61,73 (0,38)	12,17 (0,5)	14,87 (0,31)	27,57	4,8	50,83	23,7
4 Heures	58,03 (0,9)	13,1 (0,35)	15,13 (0,38)	29,7	3,9	51,2	25,5

Notes: γ^{LW} : the Lifshitz-Van der Waals components of the surface tension. γ^- : electron donor components of the surface tension. γ^+ : electron acceptor components of the surface tension. γ^{LW} : the Lewis acid–base surface tension component. ΔG_{iwi} : the free energy of interaction between two entities of that material when immersed in water. () : indique les écarts types.

L'effet progressif d'une concentration modérée (27,2 g/L) de NaCl sur les propriétés de surface de *P. aeruginosa* est présenté dans le tableau 21. La surface de *P. aeruginosa* est hydrophile (34,94 mJ/m²), moyennement donneur d'électrons (38,2 mJ/m²), et faiblement accepteur d'électrons (1,8 mJ/m²). L'exposition de cette bactérie à NaCl a modifié légèrement ses propriétés de surfaces. En effet, l'hydrophobicité de la surface a diminué surtout après 1 heure et 3 heures (23 mJ/m² et 23,7mJ/m²) de contact avec NaCl. Par contre, le caractère donneur d'électrons (γ^-) a augmenté et reste presque constant durant toute la durée du traitement tandis que le caractère accepteur d'électrons n'a subi aucune modification significative.

Tableau 23. Cinétique du développement des propriétés de la surface d'*E. coli* ATCC25922 sous effet du NaCl (27,2 g/L).

<i>E. coli</i>	Contact angle (°)			Surface tensions (mJ/m ²)			ΔG_{iwi} (mJ/m ²)
	Θ Diiodomethane	Θ Formamide	Θ Water	γ^{LW}	γ^+	γ^-	
Témoin (0 Heure)	71 (0,3)	20 (1,3)	16 (1,7)	22	6	49	23,3
1 Heure	74,63 (0,4)	21,57 (1,31)	25,20 (0,53)	20,33	7,80	45,80	15,73
2 Heures	71,13 (0,46)	19,73 (0,71)	23,53 (0,32)	22,23	6,90	46,63	17,67
3 Heures	81,13 (0,32)	18,70 (0,61)	29,17 (0,7)	16,93	11,37	40	8,03
4 Heures	64,66 (0,4)	19,26 (0,3)	21,6 (0,45)	25,93	4,96	48,53	22

Notes: γ^{LW} : the Lifshitz-Van der Waals components of the surface tension. γ^- : electron donor components of the surface tension. γ^+ : electron acceptor components of the surface tension. γ^{LW} : the Lewis acid–base surface tension component. ΔG_{iwi} : the free energy of interaction between two entities of that material when immersed in water. () : indique les écarts types.

Les propriétés de surface d'*E. coli* ont aussi été influencées par l'exposition à NaCl (27.2 g/L). En effet, les données du tableau 22 montrent que la surface d'*E. coli* est normalement hydrophile (23,30 mJ/m²), fortement donneur d'électrons (49,00 mJ/m²), et faiblement accepteur d'électrons (6,00 mJ/m²). L'exposition de cette bactérie à NaCl a diminué son hydrophobicité de surface surtout après 3 heures (8,03 mJ/m²) de contact avec NaCl. Par contre, le caractère donneur d'électrons (γ^-) n'a pratiquement subi aucune modification significative. De même, le caractère accepteur d'électrons (γ^+) est resté presque stable durant le traitement sauf à 3 heures où une augmentation est remarquée (11,37 mJ/m²).

Tableau 24. Cinétique du développement des propriétés de la surface du verre sous effet du NaCl (27,2 g/L).

Verre	Contact angle (°)			Surface tensions (mJ/m ²)			ΔG_{iwi} (mJ/m ²)
	Θ Diiodomethane	Θ Formamide	Θ Water	γ^{LW}	γ^+	γ^-	
Témoin (0 Heure)	50,2 (0,8)	51,5 (1,15)	42,1 (0,24)	34,2	0,00	51,9	40,7
1 H	63,6 (0,22)	52,1 (0,32)	74,3 (0,27)	26,5	2,8	7,4	-31,7
2 H	71,8 (0,76)	30,3 (0,49)	57,2 (1,04)	21,9	9,3	14,0	-10,3
3 H	82,1 (0,66)	35 (0,42)	47,2 (0,40)	16,5	9,6	27,4	0,80
4 H	86,8 (0,9)	45 (0,52)	37,9 (0,58)	14,1	6,1	48,3	18,0

Notes: γ^{LW} : the Lifshitz-Van der Waals components of the surface tension. γ^- : electron donor components of the surface tension. γ^+ : electron acceptor components of the surface tension. γ^{LW} : the Lewis acid–base surface tension component. ΔG_{iwi} : the free energy of interaction between two entities of that material when immersed in water. () : indique les écarts types.

En revanche, la surface du verre est la plus influencée par le traitement du NaCl. Le tableau 23 expose les propriétés de surface des lames de verre. Le verre a une surface naturellement hydrophile (40,1 mJ/m²), fortement donneur d'électrons (51,9 mJ/m²), et avec un caractère accepteur d'électrons nul (00 mJ/m²). Après une heure de traitement, la surface du verre est devenue très hydrophobe (-31,7 mJ/m²), et faiblement donneur d'électrons (7,4 mJ/m²). Cependant, au bout de 2, 3, et 4 heures de traitement, la surface du verre récupère petit à petit son caractère hydrophile (-10,3 mJ/m², 0,80 mJ/m², 18,0 mJ/m²) et son caractère donneur d'électrons (14,0 mJ/m², 27,4 mJ/m², 48,3 mJ/m²).

4. Discussion :

Dans cette étude, nous avons testé l'effet du chlorure de sodium (NaCl) sur le détachement des biofilms de *P. aeruginosa* ATCC27853 et *E. coli* ATCC25922 formés auparavant sur des lames de verre. Pour cette raison, les caractéristiques énergétiques de surfaces des souches

ainsi que celle du verre ont été mesurer avant et après traitement avec NaCl. En effet, l'impact du NaCl sur les biofilms est aussi déterminé.

L'adhésion est le détachement des cellules bactériennes est liés à plusieurs paramètres. Ces paramètres incluent la topographie de la surface (Gallardo-Moreno *et al.* 2004), l'hydrophobie ou l'hydrophilie (Liu *et al.* 2014), la charge de la surface (Harkes *et al.* 1991), la chimie et l'énergie de la surface (Van Pelt *et al.* 1985; Karakeçili & Gümüşderehoğlu 2002; Zhao *et al.* 2007) ainsi que le milieu environnant. La modification des propriété de surface d'un substratum peut être arrivé par la présence de molécules étrangères (Parent *et al.* 2004; Harnet *et al.* 2006), la rugosité (Bengourram *et al.* 2009), des conditions expérimentaux (Gallardo-Moreno *et al.* 2003), et/ou le revêtement par différent composés chimiques (Hamadi *et al.* 2014). En outre, Il est bien admet qu'aucune modification des propriétés de surface ou le milieu environnant provoque automatiquement une modification de l'adhésion soit par renforcement ou détachement des cellules. En effet, beaucoup de chercheurs ont trouvés une bonne corrélation entre l'hydrophobicité, le caractère donneur d'électrons, et l'adhésion bactérienne (Henriques *et al.* 2004; Hamadi *et al.* 2005; Hamadi *et al.* 2008; Silva *et al.* 2008). Cependant, d'autres chercheurs ont rapportés qu'il n'y a aucune relation entre le détachement/ré-adhésion et les propriétés de surface (Flint *et al.* 1997; Oliveira *et al.* 2006; Teixeira *et al.* 2007).

Dans cette étude nous avons testé le chlorure de sodium (NaCl) pour son effet anti-biofilm, ce qui à imposer l'évaluation de son l'effet sur les propriétés de surface du substrat. Les résultats ont montré que l'hydrophobicité et le caractère donneur d'électrons du verre sont bien influencés par le traitement avec le NaCl (tableau 23). Par conséquent, les installations des biofilms de *P. aeruginosa* et d'*E. coli* ont été bien perturbées (figure 25).

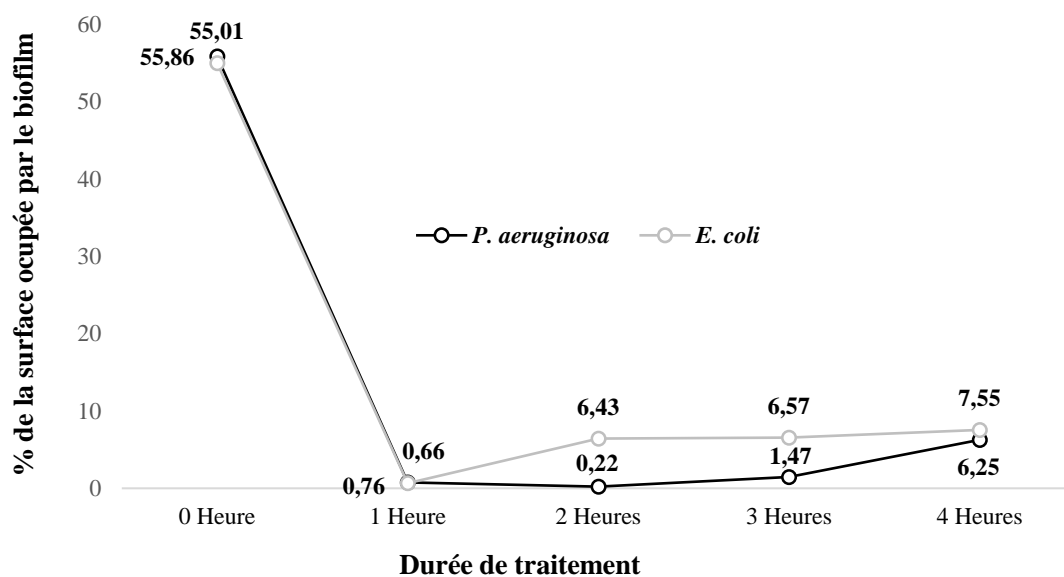


Figure 29. Cinétique du développement du pourcentage (%) de la surface occupée par les biofilms de *P. aeruginosa* et *E. coli*.

Dans le but de comprendre le phénomène de détachement et de ré-adhésion des cellules de *P. aeruginosa* et *E. coli*, nous avons examinés le rôle des caractéristiques de surface dans ce procès. En effet, les résultats de cette étude ont montré qu'il y'a une bonne relation entre les propriétés de surface, le détachement du biofilm de *P. aeruginosa*, *E. coli*, la ré-adhésion des souches et les propriétés de surfaces du verre.

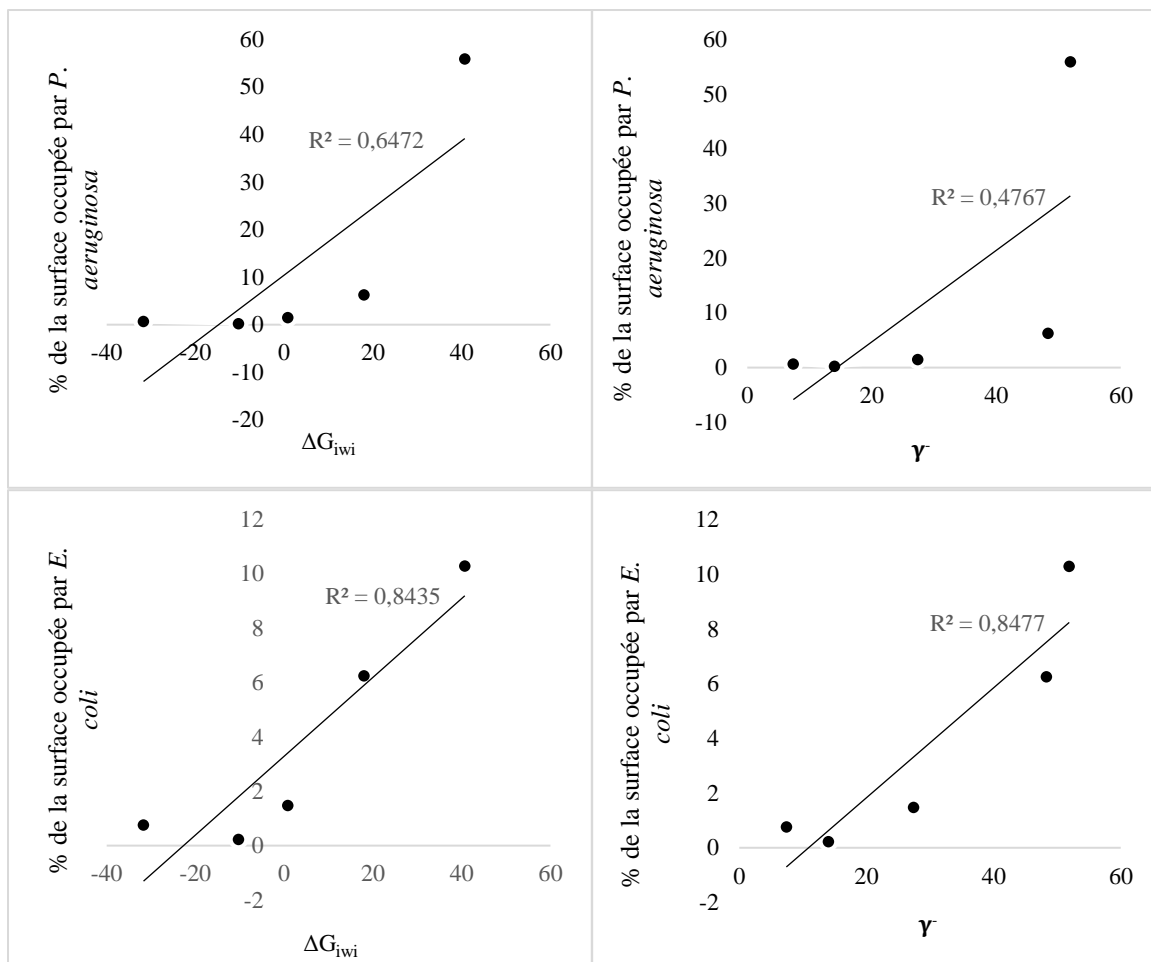


Figure 30. Corrélation entre les énergies de surface du verre et le pourcentage de surface occupée par *P. aeruginosa* et *E. coli*.

D'après les résultats du tableau 21 et 22, il apparaît que NaCl a modifié légèrement l'hydrophobicité et le caractère donneur d'électrons des surfaces bactériennes. Cependant, la physicochimie de la surface du verre a été fortement influencée par le contact avec la solution de NaCl. De même, Mozes *et al.* (1987) ont trouvé que l'hydrophobicité du verre change avec le changement des produits de nettoyage et de désinfection. En outre, Szlavik *et al.* (2012) ont montrés que le revêtement du verre par le lait homogénéisé renforce son caractère donneur d'électrons et diminue l'hydrophilie de sa surface. Aussi, Hamadi *et al.* (2009) et Hamadi *et al.* (2014) ont montrés que les caractéristiques énergétiques de surface du verre sont fortement influencées par des degrés de pH ou après traitement par différents types de laits. Il est chimiquement admis que les cellules hydrophobes ont tendance à adhérer à un substrat hydrophobe et que les cellules hydrophiles ont tendance à adhérer à un substrat hydrophile (Boulangé-Petermann *et al.* 1997; Kerr *et al.* 1999). Cette approche peut expliquer le comportement adhésif de *P. aeruginosa* et *E. coli* constaté dans ce travail, où les biofilms suivent Le même trajet (détachement et ré-adhésion) que les caractéristiques énergétiques du

verre. En effet, le détachement du biofilm au bout d'une heure de traitement par NaCl, peut être expliqué par la perte du caractère hydrophile naturelle du verre, tandis que la ré-adhésion progressive des cellules est probablement le résultat de la récupération progressive du caractère hydrophile par le verre. Aussi, la figure 29 montre une corrélation acceptable entre la surface occupée par les cellules bactériennes et les énergies de surfaces du verre, à savoir l'hydrophobicité quantitative (ΔG_{iwi}) et le caractère donneur d'électrons. Par conséquent, une combinaison des interactions acide-base et hydrophile-hydrophile est probablement responsable du détachement et de l'adhésion de *P. aeruginosa* ainsi que *E. coli* aux surface du verre ce qui explique les données de cette étude (figure 27 et 28). En outre, le phénomène d'adhésion et du détachement des cellules bactériennes est également influencé par la force ionique du milieu environnant. En effet, la force ionique provoque l'augmentation de l'adhésion des cellules bactériennes en réduisant les forces répulsives entre les bactéries chargées négativement et la surface (Otto *et al.* 1999; Garrett *et al.* 2008). Hamadi *et al.* (2005) ont expliqué que le dépôt de *Staphylococcus aureus* et la formation d'agrégats à une force ionique élevée sont dus à une forte attraction hydrophobe entre les cellules ou peut-être à une faible répulsion entre les cellules hydrophobes et le substrat hydrophile. D'après la littérature, une grande force ionique est toujours accompagnée par une diminution de la charge électrostatique. L'origine de cette diminution est l'adsorption des cations qui neutralisent les groupements présents à la surface des bactéries (Kovačević *et al.* 2016). Par conséquent, les interactions répulsives deviennent de plus en plus faible.

Tous les constats précédemment cités peuvent expliquer le phénomène de ré-adhésion des cellules bactériennes surtout que ces dernières ont acquis une charge négative supplémentaire (caractère donneur d'électrons élevé (tableau 21 et 22) sous l'effet de la force ionique. Finalement, le phénomène de détachement et de ré-adhésion des cellules révélé par cette étude apparaît d'être un phénomène purement énergétique où la solution de chlorure de sodium a pu manipuler les propriétés énergétiques des surfaces bactériennes et celle du verre.

5. Conclusion :

L'utilisation du chlorure de sodium (NaCl) pour la lutte contre les biofilms de *P. aeruginosa* et d'*E. coli* est une nouvelle approche de désinfection. Les résultats ont montré que le traitement du substrat par le NaCl altère fortement ses propriétés de surface et provoque un détachement et une ré-adhésion des cellules bactériennes. Après une heure de traitement, l'hydrophobicité du verre s'inverse carrément. Au-delà d'une heure de contact, le verre commence à récupérer ses propriétés d'origine. Par conséquent, le développement des

biofilms suit exactement le développement de l'hydrophobicité et le caractère donneur d'électrons. Ainsi, l'utilisation du NaCl comme agent de désinfection contre les biofilms de *P. aeruginosa* et d'*E. coli* doit prendre en considération le facteur temps.

Conclusions et discussion générales et perspectives

L'adhésion des microorganismes aux surfaces solides est un phénomène physico-chimique, qui fait intervenir trois éléments : le support solide, la cellule microbienne et le liquide de suspension. La compréhension de ce phénomène nécessite l'étude des caractéristiques de chacun de ces éléments. Cette étude nous a permis de comprendre l'intervention de quelques paramètres environnementaux dans l'adhésion et proposer des alternatives curatives pour la désinfection des réseaux d'eau.

Dans la première partie de cette thèse nous avons rappelé brièvement l'adhésion et la formation des biofilms dans les canalisations d'eau et les facteurs intervenants dans ce phénomène, les approches théoriques permettant de comprendre et de prédire l'adhésion aux surfaces solides. En fin nous avons présenté la relation entre l'adhésion et les propriétés physicochimiques de la surface des microorganismes et la désinfection des eaux potables et ses conséquences.

L'eau a eu un effet spectaculaire sur l'adhésion prédictive (basée sur la théorie XDLVO). Deux types d'eau (eau distillée et eau du robinet) ont été testés pour leurs effets sur les propriétés des surfaces bactériennes et l'adhésion prédictive et expérimentale de *P. aeruginosa* et *E. coli* sur le verre et six matériaux de plomberie. D'une part, les résultats ont montré que l'eau avait un impact très clair sur les énergies des surfaces bactériennes. En effet, l'hydrophobicité et le caractère donneur d'électrons des surfaces bactériennes augmentent lorsqu'elles sont en suspension dans l'eau de robinet, tandis que le caractère accepteur d'électrons n'a pas été clairement modifié. En outre, de manière générale l'adhésion prédictive a montré que tous les matériaux testés pouvaient être colonisés par *P. aeruginosa* et *E. coli* ($\Delta G_{XDLVO}^{Total} < 0$). Cependant, la colonisation devient thermodynamiquement moins favorable ou même défavorable. D'autre part, l'eau a eu un effet clair sur l'adhésion expérimentale de *P. aeruginosa* et *E. coli* en conditions dynamiques de l'eau. Les résultats ont exhibé une modification de l'adhésion, où elle devient plus en cas de l'eau du robinet que pour l'eau distillée. Encore, une corrélation entre les propriétés de surface et l'adhésion suggère que cette dernière est principalement régie par l'hydrophobicité et le caractère donneur d'électrons. Une multitude de travaux basés sur la théorie XDLVO ont été réalisés sur l'adhésion prédictive des microorganismes aux surfaces abiotiques. En revanche, pour la première fois, un examen de l'effet de l'eau sur l'installation d'un système d'eau potable a été réalisé. Les caractéristiques de la surface bactérienne et les types de matériaux de plomberie peuvent affecter l'adhésion bactériens dans une canalisation d'eau (Colbourne 1985). Les différences d'hydrophobicité

observées entre *E. coli* et *P. aeruginosa* sont probablement dues à la composition chimique des surfaces bactériennes, en particulier à la structure moléculaire externe (El Ghmari et al. 2002; Latrache et al. 2002; Hamadi et al. 2005). En effet, Latrache *et al.* (2002) ont montré que l'hydrophilie est liée à la présence d'oxygène et de polysaccharides sur les surfaces bactériennes, tandis que l'hydrophobie est attachée à la concentration d'azote, de protéines ou de carbone sous forme d'hydrocarbures. Aussi, les propriétés acido-basiques sont des énergies de surface gouvernant d'adhésion (Henriques et al. 2004; Hamadi et al. 2005; Hamadi et al. 2009). Ces propriétés sont produites par les molécules de la surface, où les groupes carboxyliques, phosphoriques et aminés (Hong et al. 2006) sont les plus remarquables. En effet, Hamadi et al. (2012) ont trouvé une bonne corrélation entre le caractère donneur d'électrons et le rapport P/C de la surface d'*E. coli*. En effet, la prédominance des phospholipides et des lipopolysaccharides et à l'adsorption de groupes chargés négativement tels que le groupe carboxyle $RCOO^-$, le groupe phosphate PO_4 et le sulfure group SO_4^{2-} pourrait être derrière l'augmentation du caractère donneur d'électrons, en particulier avec l'eau de robinet stérile. Le changement des caractéristiques énergétiques des surfaces bactériennes va certainement donner des changements dans l'adhésion soit prédictive ou expérimentale. Enfin, les résultats obtenus suggèrent que le choix du matériau le plus approprié pour une installation d'eau potable peut être lié à l'eau elle-même où il est très conseiller de faire une analyse chimique de l'eau avant la construction de son réseau de circulation.

La température et le pH de l'eau ont modifié les propriétés physico-chimiques des surfaces et ont augmenté l'adhésion de *P. aeruginosa* et *E. coli*. Les résultats obtenus ont montré que la surface de *P. aeruginosa* devient moins donneur d'électrons, plus accepteur d'électrons et moins hydrophile au-dessus de 30°C. Les surfaces du PVC et de l'acier inoxydable étaient des donneurs d'électrons modérés et des accepteurs d'électrons faibles, avec une propriété hydrophobe claire, tandis que le verre était un donneur d'électrons faible, un accepteur d'électrons fort et d'un caractère hydrophile. Les résultats ont aussi montré une forte corrélation entre l'adhésion et la température de l'eau sur tous les matériaux, avec une augmentation exponentielle particulièrement importante entre 35 et 40°C. Une multitude d'études ont montré que la température influence certains paramètres physiques et chimiques de l'eau tels que le pH (Briandet *et al.* 1999; Gallardo-Moreno *et al.* 2002; Cappello & Guglielmino 2006), influençant à son tour l'adhésion bactérienne (Gordon et al. 1981; Stanley 1983). En effet, le pH modifie les propriétés de surface des matériaux solides, où Hamadi et al. (2009) ont montré qu'une diminution du pH matériau hydrophile (le verre)

devient moins hydrophile, alors qu'un matériau hydrophobe (le téflon) devient moins hydrophobe lorsque le pH diminue, ce qui peut être à l'origine de l'augmentation de l'adhésion observée dans cette étude. Aussi, Gallardo-Moreno et al. (2002) ont observé que pour deux souches de *Candida parapsilosis* isolées du sang, l'adhésion était proportionnelle à l'hydrophobicité qui augmente avec l'augmentation de la température, favorisant ainsi l'adhésion. Par conséquent, les stratégies de prévention destinées vers la protection de la qualité des eaux potables doivent pris en considération la saison de l'année.

L'hypochlorite de sodium (NaOCl) a été tester pour son effet sur les capacités adhésives et la viabilité post-adhésive de *P. aeruginosa* ATCC27853 et *E. coli* ATCC25922 en conditions de turbulences. Cette étude a montré que 0.025, 0.05 et 0.075% de NaOCl ont pu inhiber significativement l'adhésion d'*E. coli*, tandis que celle de *P. aeruginosa* a été minimiser à 0,125 et 0,15%. De plus, les comptages post-adhésifs ont montré que la majorité des cellules adhérees de *P. aeruginosa* n'ont pas perdu leur viabilité post-adhésive (surtout à 0, 0.025, 0.075, 0.1 et 0.125 %), tandis que les cellules adhérees d'*E. coli* l'ont perdue, sauf à 0 %. Pour plusieurs bactéries à Gram négatif, la concentration minimale inhibitrice déterminée était comprise entre 0,01 et 0,05 % (DeQueiroz 2004). D'autres recherches ont décrit une concentration minimale inhibitrice de NaOCl contre les bactéries à Gram positif et négatif était de 0,1 à 0,4 % (Jaglic *et al.* 2012). En outre, Seier-Petersen *et al.* (2014) ont décrit une concentration inhibitrice minimale de 0,5 % contre *Bacillus subtilis*. Les différences de concentration minimale inhibitrice observées entre ces études sont apparemment liées non seulement à la sensibilité distincte des bactéries ou à la méthode de détermination utilisée, mais aussi au milieu dans lequel les bactéries et le désinfectant réagissent (Gomes et al. 2016). Dans cette étude, l'effet du NaOCl contre *P. aeruginosa* et *E. coli* dans leurs états planctoniques a été réalisé. Les différences observées dans les degrés d'adhésion sont probablement dues à des différences de concentrations de NaOCl, c'est-à-dire à l'équilibre chimique le plus dominant qui déterminera le degré de dommage de la membrane cellulaire, influençant ainsi l'adhésion bactérienne. En effet, la relation entre la concentration de NaOCl et l'adhésion de *P. aeruginosa* et *E. coli* n'est pas linéaire d'où la nécessité d'étudier l'équilibre chimique dominant entre l'eau et le désinfectant (NaOCl).

Les stratégies préventives ne sont pas toujours efficaces d'où les stratégies curatives peuvent prendre lieu. Pour cela, quatre concentrations de chlorure de sodium (NaCl : 3,38, 6,75, 13,51, et 27,2 g/L) ont été tester pour leur effet anti-biofilm. Les tests ont montré que 27,2 g/L est la concentration la plus efficace contre le biofilm de *P. aeruginosa* et *E. coli* déjà installés sur

des lames de verre. Ensuite, cet effet anti-biofilm de NaCl (27,2 g/L) a été comparé à celui de NaOCl (0,002 g/L). En effet, NaOCl n'a eu aucun effet sur le biofilm de *P. aeruginosa*, alors qu'au bout de moins d'une heure, NaCl l'a pu détacher. Cependant, en dépassant une heure de traitement les cellules commencent à se réinstaller et former des microcolonies. La résistance des biofilms aux traitements est généralement liée à l'organisation tridimensionnelle des cellules bactériennes ainsi qu'aux matrices d'exopolysaccharides qui les enrobent (Díaz De Rienzo et al. 2016). Cependant, il a été démontré que les biofilms des bactéries Gram-négatives sont plus résistants que ceux des autres espèces (Augustin et al. 2004). En outre, plusieurs études ont signalé que l'exposition de *S. aureus* au NaCl renforce son biofilm (Kennedy & O'Gara 2004; Rode et al. 2007; Lee et al. 2014). En outre, Xu et al. (2010) ont montré que l'agrégation des cellules de *S. aureus* augmente lorsqu'elles sont exposées à des concentrations de NaCl supérieures à 100 g/L. Une autre étude a montré qu'une concentration élevée de NaCl était capable de renforcer le biofilm de *Salmonella*, tandis que la microscopie confocale à balayage laser a montré que la plupart des cellules sont mortes (Yoon 2013). Par conséquent, les divergences entre les résultats de cette étude et ces déclarations sont probablement dues aux changements physico-chimiques des surfaces causées par le contact avec le NaCl et le NaOCl, c'est-à-dire à la nature des espèces bactériennes testées. En effet, Lee et al. (2014) ont déclaré que l'effet du NaCl sur la cellule bactérienne est fonction de la bactérie en question. En général, lorsque la désinfection contre un biofilm n'est pas efficace, cela tient à deux causes. La première est une pénétration relative ou incomplète du biocide dans le biofilm. Bien que plusieurs études aient rapporté que la présence de NaCl augmente l'adhésion et améliore la stabilité du biofilm (Mørretrø et al. 2003; Jensen et al. 2007; Rode et al. 2007). Lee et al. (2014) ont rapporté qu'une diminution de la concentration en NaCl diminue l'expression du gène *icaA* et par conséquent la destruction des liens intercellulaires et la dégradation progressive du biofilm. En outre, Giaouris et al. (2015) ont réalisé une étude sur la formation d'un biofilm de *Salmonella* sur des coupons en acier inoxydable et ont constaté qu'une concentration élevée de NaCl (105 g/L) était capable de réduire fortement la population bactérienne. En plus, Vaezi et al. (2020) ont signalé qu'une concentration de NaCl supérieure à 60 g/L a eu un effet considérable sur la formation de biofilms de *S. aureus*. Par conséquent, et sachant que NaOCl est plus efficace contre les bactéries planctoniques, cette étude suggère l'utilisation successive de NaCl et de NaOCl pour la désinfection et le nettoyage d'un réseau d'eau limité. Cette approche consiste à vider le réseau d'eau et le remplir par la solution de NaCl à concentration idéale (27,2 g/L) pour le détachement des cellules bactériennes attachées, après une durée (1 heure), le vider encore une fois et le

remplir par la solution de NaOCl afin de tuer les bactéries détachées. Par ailleurs, chaque traitement est toujours limité par quelques facteurs, où dans ce cas le temps de traitement semble être un facteur important car il conditionne l'efficacité désinfectante et l'économie de cette approche. En effet, cette étude a montré que la prolongation du traitement par NaCl au-delà d'une heure provoque une ré-adhésion des cellules déjà détachées et formation de microcolonies.

Les travaux développés durant cette thèse ouvrent d'amples perspectives :

- ✓ Etablir l'effet d'autres caractéristiques physiques de l'eau (dureté, conductivité, ...) sur les caractéristiques de surface et l'adhésion d'autres espèces microbiennes de l'eau.
- ✓ Etudier l'effet de la composition chimique de l'eau sur les caractéristiques énergétiques des surfaces et l'adhésion d'autres espèces microbiennes de l'eau ;
- ✓ Tester l'adhésion et la viabilité d'autres espèces microbiennes de la flore hydrique en présence de NaOCl;
- ✓ Tester le pouvoir anti-biofilm du NaCl sur des biofilms multi-espèces installés sur des matériaux de plomberie;
- ✓ Chercher la combinaison exacte, optimale et efficace de NaCl/NaOCl contre les biofilms des canalisations de l'eau potable;

Bibliographie

References

- (!!! INVALID CITATION !!! (Marshall et al. 1971; Van Loosdrecht et al. 1987a; van Loosdrecht et al. 1989; Bos et al. 1999; Ong et al. 1999)).
- Abberton C. L., Bereschenko L., van der Wielen P. W., Smith C. J. J. A. and microbiology e. (2016). Survival, biofilm formation, and growth potential of environmental and enteric *Escherichia coli* strains in drinking water microcosms. **82**(17), 5320-31.
- Abdel-Nour M., Duncan C., Low D. E. and Guyard C. J. I. j. o. m. s. (2013). Biofilms: the stronghold of *Legionella pneumophila*. **14**(11), 21660-75.
- Abu-Lail N. I. and Camesano T. A. J. B. (2003). Role of Ionic Strength on the Relationship of Biopolymer Conformation, DLVO Contributions, and Steric Interactions to Bioadhesion of *Pseudomonas putida* KT2442. **4**(4), 1000-12.
- Ali M., Lopez A. L., You Y., Kim Y. E., Sah B., Maskery B. and Clemens J. J. B. o. t. W. H. O. (2012). The global burden of cholera. **90**, 209-18.
- An D. and Parsek M. R. J. C. o. i. m. (2007). The promise and peril of transcriptional profiling in biofilm communities. **10**(3), 292-6.
- An Y. H. and Friedman R. J. J. o. b. m. r. (1998). Concise review of mechanisms of bacterial adhesion to biomaterial surfaces. **43**(3), 338-48.
- Aparna M. S. and Yadav S. J. B. J. o. I. D. (2008). Biofilms: microbes and disease. **12**(6), 526-30.
- Arana I., Santorum P., Muela A. and Barcina I. J. J. o. A. M. (1999). Chlorination and ozonation of waste-water: comparative analysis of efficacy through the effect on *Escherichia coli* membranes. **86**(5), 883-.
- Arora A. J. R. p. (1997). Patents, licensing, and market structure in the chemical industry. **26**(4-5), 391-403.
- Assaidi A., Ellouali M., Latrache H., Mabrouki M., Timinouni M., Zahir H., Tankiouine S., Barguigua A. and Mliji E. M. J. I. j. o. e. h. r. (2018). Adhesion of *Legionella pneumophila* on glass and plumbing materials commonly used in domestic water systems. **28**(2), 125-33.
- Atabek A. and Camesano T. A. J. J. o. b. (2007). Atomic force microscopy study of the effect of lipopolysaccharides and extracellular polymers on adhesion of *Pseudomonas aeruginosa*. **189**(23), 8503-9.
- Augustin M., Ali-Vehmas T. and Atroshi F. (2004). Assessment of enzymatic cleaning agents and disinfectants against bacterial biofilms.
- Bagh L. K., Albrechtsen H.-J., Arvin E. and Ovesen K. J. W. r. (2004). Distribution of bacteria in a domestic hot water system in a Danish apartment building. **38**(1), 225-35.
- Bagh L. K., Albrechtsen H.-J., Arvin E., Ovesen K. J. W. s. and technology (2002). Biofilm formation in a hot water system. **46**(9), 95-101.
- Banning N., Toze S. and Mee B. J. J. o. A. M. (2002). *Escherichia coli* survival in groundwater and effluent measured using a combination of propidium iodide and the green fluorescent protein. **93**(1), 69-76.
- Bengourram J., Hamadi F., Mabrouki M., Kouider N., Zekraoui M., Ellouali M. and Latrache H. J. P. C. N. (2009). Relationship between roughness and physicochemical properties of glass surface and theoretical adhesion of bacterial cells. **47**, 138-44.
- Bereksi N., Gavini F., Bénézech T. and Faille C. J. J. o. A. M. (2002). Growth, morphology and surface properties of *Listeria monocytogenes* Scott A and LO28 under saline and acid environments. **92**(3), 556-65.
- Berry D., Xi C. and Raskin L. J. C. o. i. b. (2006). Microbial ecology of drinking water distribution systems. **17**(3), 297-302.
- Bidlas E. and Lambert R. J. J. I. J. o. F. M. (2008). Comparing the antimicrobial effectiveness of NaCl and KCl with a view to salt/sodium replacement. **124**(1), 98-102.
- Biswas R., Voggu L., Simon U. K., Hentschel P., Thumm G. and Götz F. J. F. m. l. (2006). Activity of the major staphylococcal autolysin Atl. **259**(2), 260-8.

- Blackburn C. d. W. and McCarthy J. J. I. j. o. f. m. (2000). Modifications to methods for the enumeration and detection of injured *Escherichia coli* O157: H7 in foods. **55**(1-3), 285-90.
- Block W. M. and Brennan L. A. (1993). The habitat concept in ornithology. In: *Current ornithology*, Springer, pp. 35-91.
- Bohrerova Z. and Linden K. G. J. W. e. r. (2006). Ultraviolet and chlorine disinfection of *Mycobacterium* in wastewater: effect of aggregation. **78**(6), 565-71.
- Boks N. P., Norde W., van der Mei H. C. and Busscher H. J. J. M. (2008). Forces involved in bacterial adhesion to hydrophilic and hydrophobic surfaces. **154**(10), 3122-33.
- Böl M., Möhle R. B., Haesner M., Neu T. R., Horn H., Krull R. J. B. and Bioengineering (2009). 3D finite element model of biofilm detachment using real biofilm structures from CLSM data. **103**(1), 177-86.
- Bolster C. H., Mills A. L., Hornberger G. M. and Herman J. S. J. J. o. c. h. (2001). Effect of surface coatings, grain size, and ionic strength on the maximum attainable coverage of bacteria on sand surfaces. **50**(3-4), 287-305.
- Boonaert C. J., Rouxhet P. G. J. A. and microbiology e. (2000). Surface of lactic acid bacteria: relationships between chemical composition and physicochemical properties. **66**(6), 2548-54.
- Bos R., Van der Mei H. C. and Busscher H. J. J. F. m. r. (1999). Physico-chemistry of initial microbial adhesive interactions—its mechanisms and methods for study. **23**(2), 179-230.
- Boulangé-Petermann L., Rault J. and Bellon-Fontaine M. N. J. B. (1997). Adhesion of *Streptococcus thermophilus* to stainless steel with different surface topography and roughness. **11**(3), 201-16.
- Boulos L., Prevost M., Barbeau B., Coallier J. and Desjardins R. J. J. o. m. M. (1999). LIVE/DEAD® BacLight™: application of a new rapid staining method for direct enumeration of viable and total bacteria in drinking water. **37**(1), 77-86.
- Bourion F. and Cerf O. J. S. d. A. (1996). Disinfection efficacy against pure-culture and mixed-population biofilms of *Listeria innocua* and *Pseudomonas aeruginosa* on stainless steel, Teflon and rubber.
- Boutaleb N., Latrache H. and Sire O. J. T. S. M. (2008). Interactions bactéries-matériaux dans les canalisations d'eau potable-Rôle des propriétés physico-chimiques de surface sur le pouvoir d'adhésion. (11), 73-90.
- Bouwer E. J. and Zehnder A. J. J. T. i. b. (1993). Bioremediation of organic compounds—putting microbial metabolism to work. **11**(8), 360-7.
- Brading M. G., Jass J. and Lappin-Scott H. M. J. M. B. (2003). Dynamics of bacterial biofilm. **5**, 46.
- Brennan F. P., Abram F., Chinalia F. A., Richards K. G., O'Flaherty V. J. A. and Microbiology E. (2010). Characterization of environmentally persistent *Escherichia coli* isolates leached from an Irish soil. **76**(7), 2175-80.
- Bressler D., Balzer M., Dannehl A., Flemming H.-C., Wingender J. J. W. S. and Supply T. W. (2009). Persistence of *Pseudomonas aeruginosa* in drinking-water biofilms on elastomeric material. **9**(1), 81-7.
- Briandet R., Meylheuc T., Maher C., Bellon-Fontaine M. N. J. A. and microbiology e. (1999). *Listeria monocytogenes* Scott A: cell surface charge, hydrophobicity, and electron donor and acceptor characteristics under different environmental growth conditions. **65**(12), 5328-33.
- Bridier A., Sanchez-Vizueté P., Guilbaud M., Piard J.-C., Naitali M. and Briandet R. J. F. m. (2015). Biofilm-associated persistence of food-borne pathogens. **45**, 167-78.
- Busscher H. J., Weerkamp A. H., van der Mei H. C., Van Pelt A., de Jong H. P., Arends J. J. A. and microbiology e. (1984). Measurement of the surface free energy of bacterial cell surfaces and its relevance for adhesion. **48**(5), 980-3.
- Byappanahalli M., Fujioka R. J. W. S. and Technology (1998). Evidence that tropical soil environment can support the growth of *Escherichia coli*. **38**(12), 171-4.
- Byun M. W., Kim J. H., Kim D. H., Kim H. J. and Jo C. J. F. m. (2007). Effects of irradiation and sodium hypochlorite on the micro-organisms attached to a commercial food container. **24**(5), 544-8.
- C Chifiriuc M., M Grumezescu A. and Lazar V. J. C. O. C. (2014). Quorum sensing inhibitors from the sea: Lessons from marine symbiotic relationships. **18**(7), 823-39.

- Cantor K. P., Lynch C. F., Hildesheim M. E., Dosemeci M., Lubin J., Alavanja M. and Craun G. J. E. (1998). Drinking water source and chlorination byproducts I. Risk of bladder cancer. 21-8.
- Cappello S. and Guglielmino S. P. J. B. J. o. M. (2006). Effects of growth temperature on polystyrene adhesion of *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853. **37**, 205-7.
- Carson L., Favero M., Bond W. and Petersen N. J. A. m. (1972). Factors affecting comparative resistance of naturally occurring and subcultured *Pseudomonas aeruginosa* to disinfectants. **23**(5), 863-9.
- Chavant P., Martinie B., Meylheuc T., Bellon-Fontaine M.-N., Hebraud M. J. A. and Microbiology E. (2002). *Listeria monocytogenes* LO28: surface physicochemical properties and ability to form biofilms at different temperatures and growth phases. **68**(2), 728-37.
- Chifiriuc M., Mihaescu G. and Lazar V. J. R. (2011). Medical Microbiology and Virology; University of Bucharest Publishing House: Bucharest. 745-52.
- Chmielewski R., Frank J. J. C. r. i. f. s. and safety f. (2003). Biofilm formation and control in food processing facilities. **2**(1), 22-32.
- Cloete T. E., Westaard D., Van Vuuren S. J. W. s. and technology (2003). Dynamic response of biofilm to pipe surface and fluid velocity. **47**(5), 57-9.
- Colbourne J. S. J. J. o. a. b. (1985). Materials usage and their effects on the microbiological quality of water supplies. **59**, 47S-59S.
- Cooksey K. and Wigglesworth-Cooksey B. J. A. m. e. (1995). Adhesion of bacteria and diatoms to surfaces in the sea: a review. **9**(1), 87-96.
- Costerton J. W., Cheng K., Geesey G. G., Ladd T. I., Nickel J. C., Dasgupta M. and Marrie T. J. J. A. R. i. M. (1987). Bacterial biofilms in nature and disease. **41**(1), 435-64.
- Costerton J. W., Lewandowski Z., Caldwell D. E., Korber D. R. and Lappin-Scott H. M. J. A. r. o. m. (1995). Microbial biofilms. **49**(1), 711-45.
- Cowan M., Van der Mei H., Rouxhet P. and Busscher H. J. M. (1992). Physico-chemical and structural properties of the surfaces of *Peptostreptococcus micros* and *Streptococcus mitis* as compared to those of mutants streptococci, *Streptococcus sanguis* and *Streptococcus salivarius*. **138**(12), 2707-14.
- Cue D. R., Lei M. G., Lee C. J. F. i. c. and microbiology i. (2012). Genetic regulation of the intercellular adhesion locus in staphylococci. **2**, 38.
- Cuperus P. L., van der Mei H. C., Reid G., Bruce A. W., Houry A. H., Rouxhet P. G., Busscher H. J. J. J. o. c. and science i. (1993). Physicochemical surface characteristics of urogenital and poultry lactobacilli. **156**(2), 319-24.
- Dankert J. J. C. C. R. B. (1986). Biomedical polymers: bacterial adhesion, colonization and infection. **2**, 219-301.
- De Beer D., Stoodley P., Roe F., Lewandowski Z. J. B. and bioengineering (1994). Effects of biofilm structures on oxygen distribution and mass transport. **43**(11), 1131-8.
- De Souza P. H. (2006). L'exercice de la participation populaire à travers le Conseil national de santé au Brésil dans les années 90.
- Delpla I., Scheili A., Guilherme S., Cool G., Rodriguez M. J. J. o. W. and Change C. (2016). Variations of disinfection by-product levels in small drinking water utilities according to climate change scenarios: a first assessment. **7**(1), 1-15.
- DeQueiroz G. (2004). *A new broad spectrum disinfectant suitable for the food industry*. Louisiana State University and Agricultural & Mechanical College.
- Dewanti R. and Wong A. C. J. I. j. o. f. m. (1995). Influence of culture conditions on biofilm formation by *Escherichia coli* O157: H7. **26**(2), 147-64.
- Di Bonaventura G., Piccolomini R., Paludi D., D'orio V., Vergara A., Conter M. and Ianieri A. (2008a). Influence of temperature on biofilm formation by *Listeria monocytogenes* on various food-contact surfaces: relationship with motility and cell surface hydrophobicity. *Journal of applied microbiology* **104**(6), 1552-61.
- Di Bonaventura G., Piccolomini R., Paludi D., D'orio V., Vergara A., Conter M. and Ianieri A. J. J. o. a. m. (2008b). Influence of temperature on biofilm formation by *Listeria monocytogenes* on various food-contact surfaces: relationship with motility and cell surface hydrophobicity. **104**(6), 1552-61.

- Díaz De Rienzo M., Stevenson P., Marchant R. and Banat I. M. J. J. o. A. M. (2016). Pseudomonas aeruginosa biofilm disruption using microbial surfactants. **120**(4), 868-76.
- Domínguez-Tello A., Arias-Borrego A., García-Barrera T., Gómez-Ariza J. L. J. E. m. and assessment (2015). Seasonal and spatial evolution of trihalomethanes in a drinking water distribution system according to the treatment process. **187**(11), 1-19.
- Dong H., Onstott T. C., Ko C.-H., Hollingsworth A. D., Brown D. G., Mailloux B. J. J. C. and Biointerfaces S. B. (2002). Theoretical prediction of collision efficiency between adhesion-deficient bacteria and sediment grain surface. **24**(3-4), 229-45.
- Donlan R. M. and Pipes W. O. J. J. A. W. W. A. (1988). Selected drinking water characteristics and attached microbial population density. **80**(11), 70-6.
- Donlan R. M. J. E. i. d. (2002). Biofilms: microbial life on surfaces. **8**(9), 881.
- Dorobantu L. S., Bhattacharjee S., Foght J. M. and Gray M. R. J. L. (2009). Analysis of force interactions between AFM tips and hydrophobic bacteria using DLVO theory. **25**(12), 6968-76.
- Dufrêne Y. F. and Rouxhet P. G. J. C. j. o. m. (1996). Surface composition, surface properties, and adhesiveness of Azospirillum brasilense—variation during growth. **42**(6), 548-56.
- Dunne Jr W. M. J. C. m. r. (2002). Bacterial adhesion: seen any good biofilms lately? **15**(2), 155-66.
- Dykes G., Sampathkumar B. and Korber D. J. I. j. o. f. m. (2003). Planktonic or biofilm growth affects survival, hydrophobicity and protein expression patterns of a pathogenic Campylobacter jejuni strain. **89**(1), 1-10.
- Eboigbodin K. E., Seth A. and Biggs C. A. J. J. A. W. W. A. (2008). A review of biofilms in domestic plumbing. **100**(10), 131-8.
- El Ghmari A., Latrache H., Hamadi F., El Louali M., El Bouadili A., Hakkou A. and Bourlioux P. J. T. n. m. (2002). Influence of surface cell structures on physicochemical properties of Escherichia coli. **25**(2), 173-8.
- Elgoulli M., Aitlahbib O., Tankiouine S., Assaidi A., Louali M. E., Zahir H. and Latrache H. (2021). The theoretical adhesion of Pseudomonas aeruginosa and Escherichia coli on some plumbing materials in presence of distilled water or tap water. *Folia Microbiologica*.
- EPA E. P. A. J. F. r. (2002). National primary drinking water regulations: long term 1 enhanced surface water treatment rule. Final rule. **67**(9), 1811-44.
- EPA U. (1999). Disinfection profiling and benchmarking guidance manual, Appendix A.
- Espinosa-Urgel M., Salido A. and Ramos J.-L. J. J. o. b. (2000). Genetic analysis of functions involved in adhesion of Pseudomonas putida to seeds. **182**(9), 2363-9.
- Estrela C., Estrela C. R., Barbin E. L., Spanó J. C. E., Marchesan M. A. and Pécora J. D. J. B. d. j. (2002). Mechanism of action of sodium hypochlorite. **13**, 113-7.
- Fenchel T. J. S. (2002). Microbial behavior in a heterogeneous world. **296**(5570), 1068-71.
- Finkel J. S. and Mitchell A. P. J. N. R. M. (2011). Genetic control of Candida albicans biofilm development. **9**(2), 109-18.
- Flemming H.-C., Murthy P. S., Venkatesan R. and Cooksey K. (2009). *Marine and industrial biofouling*. Springer.
- Flemming H.-C., Percival S., Walker J. J. W. s. and supply t. w. (2002). Contamination potential of biofilms in water distribution systems. **2**(1), 271-80.
- Flint S., Bremer P. and Brooks J. J. B. (1997). Biofilms in dairy manufacturing plant-description, current concerns and methods of control. **11**(1), 81-97.
- Fujioka R. and Byappanahalli M. (2001). Microbial ecology controls the establishment of fecal bacteria in tropical soil environment. In: *Advances in Water and Wastewater Treatment Technology*, Elsevier, pp. 273-83.
- Gaboriaud F., Dague E., Bailet S., Jorand F., Duval J., Thomas F. J. c. and Biointerfaces S. B. (2006). Multiscale dynamics of the cell envelope of Shewanella putrefaciens as a response to pH change. **52**(2), 108-16.
- Gallardo-Moreno A., Gonzalez-Martin M., Bruque J., Perez-Giraldo C., Sanchez-Silos R., Gomez-Garcia A. J. J. o. a. s. and technology (2003). Influence of the growth medium, suspending liquid and measurement temperature on the physico-chemical surface properties of two enterococci strains. **17**(14), 1877-87.

- Gallardo-Moreno A., Gonzalez-Martin M., Bruque J., Pérez-Giraldo C. J. C., Physicochemical S. A. and Aspects E. (2004). The adhesion strength of *Candida parapsilosis* to glass and silicone as a function of hydrophobicity, roughness and cell morphology. **249**(1-3), 99-103.
- Gallardo-Moreno A. M., González-Martín M. L., Pérez-Giraldo C., Bruque J. M., Gómez-García A. C. J. A. and microbiology e. (2002). Serum as a factor influencing adhesion of *Enterococcus faecalis* to glass and silicone. **68**(11), 5784-7.
- Gannon J., Manilal V., Alexander M. J. A. and microbiology e. (1991). Relationship between cell surface properties and transport of bacteria through soil. **57**(1), 190-3.
- Garner J., Jarvis W., Emori T., Horan T., Hughes J. and Olmsted R. J. S. L. M. (1996). APIC infection control and applied epidemiology: principles and practice.
- Garrett T. R., Bhakoo M. and Zhang Z. J. P. i. N. S. (2008). Bacterial adhesion and biofilms on surfaces. **18**(9), 1049-56.
- Gates D. J. D., CO, USA (1998). The chlorine dioxide handbook (Water disinfection series) American Water Works Association. 186.
- Gauthier S., Leduc A., Harvey B., Bergeron Y. and Drapeau P. J. N. C. (2001). Les perturbations naturelles et la diversité écosystémique. **125**(3), 10-7.
- Giaouris E., Nesse L. L. J. S. P., risk factors and options t. (2015). Attachment of *Salmonella* spp. to food contact and product surfaces and biofilm formation on them as stress adaptation and survival strategies. 111-36.
- Gilbert C. J. C. i. d. s. (2003). La fabrique des risques. (1), 55-72.
- Gomes I., Simões M. and Simões L. C. J. S. o. t. T. E. (2016). The effects of sodium hypochlorite against selected drinking water-isolated bacteria in planktonic and sessile states. **565**, 40-8.
- Goode K. R., Asteriadou K., Robbins P. T., Fryer P. J. J. C. R. i. F. S. and Safety F. (2013). Fouling and cleaning studies in the food and beverage industry classified by cleaning type. **12**(2), 121-43.
- Gordon A. S., Gerchakov S. M. and Udey L. R. J. C. j. o. m. (1981). The effect of polarization on the attachment of marine bacteria to copper and platinum surfaces. **27**(7), 698-703.
- Gorski L., Palumbo J. D., Mandrell R. E. J. A. and microbiology e. (2003). Attachment of *Listeria monocytogenes* to radish tissue is dependent upon temperature and flagellar motility. **69**(1), 258-66.
- Govan J. R. and Deretic V. J. M. r. (1996). Microbial pathogenesis in cystic fibrosis: mucoid *Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia cepacia*. **60**(3), 539-74.
- Graves C. G., Matanoski G. M., Tardiff R. G. J. R. T. and Pharmacology (2001). Weight of evidence for an association between adverse reproductive and developmental effects and exposure to disinfection by-products: a critical review. **34**(2), 103-24.
- Guillemot G. (2006). *Compréhension des mécanismes à l'origine de l'adhésion de Saccharomyces cerevisiae sur acier inoxydable: Implications pour l'hygiène des surfaces en industrie agroalimentaire*. Toulouse, INSA.
- Hageskal G., Knutsen A. K., Gaustad P., de Hoog G. S., Skaar I. J. A. and Microbiology E. (2006). Diversity and significance of mold species in Norwegian drinking water. **72**(12), 7586-93.
- Hall-Stoodley L., Costerton J. W. and Stoodley P. J. N. r. m. (2004). Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. **2**(2), 95-108.
- Hallam N., West J., Forster C. and Simms J. J. W. R. (2001). The potential for biofilm growth in water distribution systems. **35**(17), 4063-71.
- Hamadi F., Asserne F., Elabed S., Bensouda S., Mabrouki M. and Latrache H. J. F. C. (2014). Adhesion of *Staphylococcus aureus* on stainless steel treated with three types of milk. **38**, 104-8.
- Hamadi F., Latrache H., Mabrouki M., Elghmari A., Outzourhit A., Ellouali M., Chtaini A. J. J. o. a. s. and technology (2005). Effect of pH on distribution and adhesion of *Staphylococcus aureus* to glass. **19**(1), 73-85.
- Hamadi F., Latrache H., Zahir H., El Abed S., Ellouali M. and Saad I. K. J. R. J. o. M. (2012). The relation between the surface chemical composition of *Escherichia coli* and their electron donor/electron acceptor (acid-base) properties. **7**(1), 32.

- Hamadi F., Latrache H., Zekraoui M., Ellouali M., Bengourram J. J. M. S. and C E. (2009). Effect of pH on surface energy of glass and Teflon and theoretical prediction of Staphylococcus aureus adhesion. **29**(4), 1302-5.
- Hamadi F., Latrache H. J. C. and Biointerfaces s. B. (2008). Comparison of contact angle measurement and microbial adhesion to solvents for assaying electron donor–electron acceptor (acid–base) properties of bacterial surface. **65**(1), 134-9.
- Hambusch B., Sacré C. and Wagner I. J. I. j. o. f. m. (2004). Heterotrophic plate count and consumer's health under special consideration of water softeners. **92**(3), 365-73.
- Harkes G., Feijen J. and Dankert J. J. B. (1991). Adhesion of Escherichia coli on to a series of poly (methacrylates) differing in charge and hydrophobicity. **12**(9), 853-60.
- Harmsen M., Yang L., Pamp S. J., Tolker-Nielsen T. J. F. I. and Microbiology M. (2010). An update on Pseudomonas aeruginosa biofilm formation, tolerance, and dispersal. **59**(3), 253-68.
- Harnet S. J., Mercieca J. R. J. R. and Affairs P. (2006). Rhetorical Norms of Republicanism in Post-Revolutionary America, 1798-1801. **9**, 79-112.
- Hartz A., Cuvelier M., Nowosielski K., Bonilla T., Green M., Esiobu N., McCorquodale D. and Rogerson A. J. J. o. e. q. (2008). Survival potential of Escherichia coli and enterococci in subtropical beach sand: implications for water quality managers. **37**(3), 898-905.
- Henriques M., Azeredo J., Oliveira R. J. C. and Biointerfaces s. B. (2004). Adhesion of Candida albicans and Candida dubliniensis to acrylic and hydroxyapatite. **33**(3-4), 235-41.
- Hermansson M. J. C. and Biointerfaces s. B. (1999). The DLVO theory in microbial adhesion. **14**(1-4), 105-19.
- Hiemenz P. C. and Rajagopalan R. (2016). *Principles of Colloid and Surface Chemistry, revised and expanded*. CRC press.
- Holden B., Greetham M., Croll B., Scutt J. J. W. S. and Technology (1995). The effect of changing inter process and final disinfection reagents on corrosion and biofilm growth in distribution pipes. **32**(8), 213-20.
- Hong Y., Brown D. G. J. C. and Biointerfaces S. B. (2006). Cell surface acid–base properties of Escherichia coli and Bacillus brevis and variation as a function of growth phase, nitrogen source and C: N ratio. **50**(2), 112-9.
- Hood S. K. and Zottola E. A. J. I. j. o. f. m. (1997). Adherence to stainless steel by foodborne microorganisms during growth in model food systems. **37**(2-3), 145-53.
- Hori K., Yamashita S., ISHII S. I., Kitagawa M., Tanji Y. and Unno H. J. J. o. c. e. o. J. (2001). Isolation, characterization and application to off-gas treatment of toluene-degrading bacteria. **34**(9), 1120-6.
- Ibrahim H. T., Qiang H., Al-Rekabi W. S. and Qiqi Y. J. P. J. o. N. (2012). Improvements in biofilm processes for wastewater treatment. **11**(8), 610.
- Ioannou P., Charisiadis P., Andra S. S. and Makris K. C. J. S. o. t. T. E. (2016). Occurrence and variability of iodinated trihalomethanes concentrations within two drinking-water distribution networks. **543**, 505-13.
- Jaglic Z., Červinková D., Vlková H., Michu E., Kunová G. and Babak V. J. C. J. o. F. S. (2012). Bacterial biofilms resist oxidising agents due to the presence of organic matter. **30**(2), 178-87.
- Jana T., Srivastava A., Csery K. and Arora D. J. C. j. o. m. (1999). Influence of growth and environmental conditions on cell surface hydrophobicity of Pseudomonas fluorescens in non-specific adhesion. **46**(1), 28-37.
- Jefferson K. K. J. F. m. I. (2004). What drives bacteria to produce a biofilm? **236**(2), 163-73.
- Jensen A., Larsen M. H., Ingmer H., Vogel B. F. and Gram L. J. J. o. f. p. (2007). Sodium chloride enhances adherence and aggregation and strain variation influences invasiveness of Listeria monocytogenes strains. **70**(3), 592-9.
- Ji P., Parks J., Edwards M. A. and Pruden A. J. P. o. (2015). Impact of water chemistry, pipe material and stagnation on the building plumbing microbiome. **10**(10), e0141087.
- Johnson L. R. J. J. o. t. b. (2008). Microcolony and biofilm formation as a survival strategy for bacteria. **251**(1), 24-34.
- Jones G. W. and Isaacson R. E. J. C. C. r. i. m. (1982). Proteinaceous bacterial adhesins and their receptors. **10**(3), 229-60.

- Juhna T., Birzniece D., Larsson S., Zulenkovs D., Sharipo A., Azevedo N., Menard-Szczebara F., Castagnet S., Feliars C., Keevil C. J. A. and microbiology e. (2007). Detection of *Escherichia coli* in biofilms from pipe samples and coupons in drinking water distribution networks. **73**(22), 7456-64.
- Karakeçili A. G. and Gümüşderelioğlu M. J. J. o. B. S., Polymer Edition (2002). Comparison of bacterial and tissue cell initial adhesion on hydrophilic/hydrophobic biomaterials. **13**(2), 185-96.
- Karatan E., Watnick P. J. M. and reviews m. b. (2009). Signals, regulatory networks, and materials that build and break bacterial biofilms. **73**(2), 310-47.
- Katsikogianni M. and Missirlis Y. J. E. C. M. (2004). Concise review of mechanisms of bacterial adhesion to biomaterials and of techniques used in estimating bacteria-material interactions. **8**(3), 37-57.
- Keer J. and Birch L. J. J. o. m. m. (2003). Molecular methods for the assessment of bacterial viability. **53**(2), 175-83.
- Keevil C. J. W. S. and Technology (2003). Rapid detection of biofilms and adherent pathogens using scanning confocal laser microscopy and episcopic differential interference contrast microscopy. **47**(5), 105-16.
- Kennedy C. A. and O'Gara J. P. J. J. o. m. m. (2004). Contribution of culture media and chemical properties of polystyrene tissue culture plates to biofilm development by *Staphylococcus aureus*. **53**(11), 1171-3.
- Kerr A., Beveridge C., Cowling M., Hodgkiess T., Parr A. and Smith M. J. J. o. t. M. B. A. o. t. U. K. (1999). Some physical factors affecting the accumulation of biofouling. **79**(2), 357-9.
- Kilb B., Lange B., Schaule G., Flemming H.-C., Wingender J. J. I. j. o. h. and health e. (2003). Contamination of drinking water by coliforms from biofilms grown on rubber-coated valves. **206**(6), 563-73.
- Kim J., Pitts B., Stewart P. S., Camper A., Yoon J. J. A. a. and chemotherapy (2008). Comparison of the antimicrobial effects of chlorine, silver ion, and tobramycin on biofilm. **52**(4), 1446-53.
- Kotra L. P., Golemi D., Amro N. A., Liu G.-Y. and Mobashery S. J. J. o. t. A. C. S. (1999). Dynamics of the lipopolysaccharide assembly on the surface of *Escherichia coli*. **121**(38), 8707-11.
- Koubali H., Latrache H., Zahir H., El Louali M. J. J. o. S. and Detergents (2020). Kinetics of Adhesion *Staphylococcus aureus* on Glass in the Presence of Sodium Lauryl Sulfate.
- Koubali H., Louali M. E., Zahir H., Soufiani S., Mabrouki M., Latrache H. J. I. J. o. A. and Adhesives (2021). Physicochemical characterization of glass and polyethylene surfaces treated with different surfactants and their effects on bacterial adhesion. **104**, 102754.
- Kovačević D., Pratkanar R., Godič Torkar K., Salopek J., Dražić G., Abram A. and Bohinc K. J. P. (2016). Influence of polyelectrolyte multilayer properties on bacterial adhesion capacity. **8**(10), 345.
- Krepesky N., Ferreira R. B. R., Nunes A. P. F., Lins U. G. C., e Silva Filho F. C., de Mattos-Guaraldi A. L. and Netto-dosSantos K. R. J. C. m. (2003). Cell surface hydrophobicity and slime production of *Staphylococcus epidermidis* Brazilian isolates. **46**(4), 0280-6.
- Kumar C. G. and Anand S. K. J. I. j. o. f. m. (1998). Significance of microbial biofilms in food industry: a review. **42**(1-2), 9-27.
- Lanata C. F., Mendoza W. and Black R. E. J. G., Switzerland: World Health Organization (2002). Improving diarrhoea estimates.
- Latrache H., El G., Karroua M., Hakkou A., Ait M. H., El B. and Bourlioux P. J. T. n. m. (2002). Relations between hydrophobicity tested by three methods and surface chemical composition of *Escherichia coli*. **25**(1), 75-82.
- Latrache H., Mozes N., Pelletier C., Bourlioux P. J. C. and Biointerfaces s. B. (1994). Chemical and physicochemical properties of *Escherichia coli*: variations among three strains and influence of culture conditions. **2**(1-3), 47-56.
- Laurent P. and Servais P. J. C. j. o. m. (1995). Fixed bacterial biomass estimated by potential exoproteolytic activity. **41**(8), 749-52.
- Lazăr V. and Chifiriuc M. C. J. R. A. M. I. (2010). Architecture and physiology of microbial biofilms. **69**(2), 95-107.

- LeChevallier M. W., Cawthon C. D., Lee R. G. J. A. and microbiology e. (1988). Factors promoting survival of bacteria in chlorinated water supplies. **54**(3), 649-54.
- LeChevallier M. W., Lowry C. D. and Lee R. G. J. J. A. W. W. A. (1990). Disinfecting biofilms in a model distribution system. **82**(7), 87-99.
- LeChevallier M. W., Welch N. J., Smith D. B. J. A. and microbiology e. (1996). Full-scale studies of factors related to coliform regrowth in drinking water. **62**(7), 2201-11.
- Lee S., Choi K.-H. and Yoon Y. J. K. j. f. s. o. a. r. (2014). Effect of NaCl on biofilm formation of the isolate from *Staphylococcus aureus* outbreak linked to ham. **34**(2), 257.
- Lehtola M. J., Laxander M., Miettinen I. T., Hirvonen A., Vartiainen T. and Martikainen P. J. J. W. r. (2006). The effects of changing water flow velocity on the formation of biofilms and water quality in pilot distribution system consisting of copper or polyethylene pipes. **40**(11), 2151-60.
- Lehtola M. J., Miettinen I. T., Keinänen M. M., Kekki T. K., Laine O., Hirvonen A., Vartiainen T. and Martikainen P. J. J. W. r. (2004). Microbiology, chemistry and biofilm development in a pilot drinking water distribution system with copper and plastic pipes. **38**(17), 3769-79.
- Lehtola M. J., Miettinen I. T., Lampola T., Hirvonen A., Vartiainen T. and Martikainen P. J. J. W. r. (2005). Pipeline materials modify the effectiveness of disinfectants in drinking water distribution systems. **39**(10), 1962-71.
- Li W., Wang F., Zhang J., Qiao Y., Xu C., Liu Y., Qian L., Li W. and Dong B. J. S. o. t. T. E. (2016). Community shift of biofilms developed in a full-scale drinking water distribution system switching from different water sources. **544**, 499-506.
- Liu G., Bakker G., Li S., Vreeburg J., Verberk J., Medema G., Liu W., Van Dijk J. J. E. s. and technology (2014). Pyrosequencing reveals bacterial communities in unchlorinated drinking water distribution system: an integral study of bulk water, suspended solids, loose deposits, and pipe wall biofilm. **48**(10), 5467-76.
- Loret J., Robert S., Thomas V., Levi Y., Cooper A., McCoy W. J. J. o. w. and health (2005). Comparison of disinfectants for biofilm, protozoa and *Legionella* control. **3**(4), 423-33.
- Lu P., Zhang X., Zhang C., Niu Z., Xie S. and Chen C. J. J. o. E. S. (2014). Biostability in distribution systems in one city in southern China: characteristics, modeling and control strategy. **26**(2), 323-31.
- Lu W., Kiéne L. and Lévi Y. J. W. R. (1999). Chlorine demand of biofilms in water distribution systems. **33**(3), 827-35.
- Macdonald J. A., Rittmann B. E. J. E. s. and technology (1993). Performance standards for in situ bioremediation. **27**(10), 1974-9.
- Maes A., Gracia C., Bréchemier D., Hamman P., Chatre E., Lemelle L., Bertin P. N. and Hajnsdorf E. J. B. (2013). Role of polyadenylation in regulation of the flagella cascade and motility in *Escherichia coli*. **95**(2), 410-8.
- Manuel C. M., Nunes O. C. and Melo L. J. W. R. (2007). Dynamics of drinking water biofilm in flow/non-flow conditions. **41**(3), 551-62.
- Marin C., Hernandez A. and Lainez M. J. P. S. (2009). Biofilm development capacity of *Salmonella* strains isolated in poultry risk factors and their resistance against disinfectants. **88**(2), 424-31.
- Marjaka I. W., Miyayaga K., Hori K., Tanji Y. and Unno H. J. B. e. j. (2003). Augmentation of self-purification capacity of sewer pipe by immobilizing microbes on the pipe surface. **15**(1), 69-75.
- Marsh P. D., Lewis M. A., Williams D. and Martin M. V. (2009). *Oral microbiology e-book*. Elsevier health sciences.
- Marshall K., STOUT R. and Mitchell R. J. M. (1971). Mechanism of the initial events in the sorption of marine bacteria to surfaces. **68**(3), 337-48.
- Mattes R. and Donnelly D. J. J. o. t. A. C. o. N. (1991). Relative contributions of dietary sodium sources. **10**(4), 383-93.
- McAuliffe L., Kokotovic B., Ayling R. D. and Nicholas R. A. J. J. o. C. M. (2004). Molecular epidemiological analysis of *Mycoplasma bovis* isolates from the United Kingdom shows two genetically distinct clusters. **42**(10), 4556-65.
- McDonnell G. and Russell A. D. J. C. m. r. (1999). Antiseptics and disinfectants: activity, action, and resistance. **12**(1), 147-79.

- Meinders J., Van der Mei H., Busscher H. J. J. o. C. and Science I. (1995). Deposition efficiency and reversibility of bacterial adhesion under flow. **176**(2), 329-41.
- Missirlis Y. and Katsikogianni M. J. M. u. W. E., *Fertigung, Prüfung, Eigenschaften und Anwendungen technischer Werkstoffe* (2007). Theoretical and experimental approaches of bacteria-biomaterial interactions. **38**(12), 983-94.
- Mitik-Dineva N., Wang J., Truong V. K., Stoddart P., Malherbe F., Crawford R. J. and Ivanova E. P. J. C. m. (2009). Escherichia coli, Pseudomonas aeruginosa, and Staphylococcus aureus attachment patterns on glass surfaces with nanoscale roughness. **58**(3), 268-73.
- Mohamed M., Fatimazahra B., Hassan L., Abdellah H., Fatima H. and koraichi Saad I. J. M. (2011). Study of microbial adhesion on some wood species: theoretical prediction. **80**(1), 43-9.
- Momba M. N., Cloete T. E., Venter S. N., Kfir R. J. W. S. and Technology (1998). Evaluation of the impact of disinfection processes on the formation of biofilms in potable surface water distribution systems. **38**(8-9), 283-9.
- Moorman M. A., Thelemann C. A., Zhou S., Pestka J. J., Linz J. E. and Ryser E. T. J. J. o. f. p. (2008). Altered hydrophobicity and membrane composition in stress-adapted Listeria innocua. **71**(1), 182-5.
- Mørretrø T., Hermansen L., Holck A. L., Sidhu M. S., Rudi K., Langsrud S. J. A. and Microbiology E. (2003). Biofilm formation and the presence of the intercellular adhesion locus ica among staphylococci from food and food processing environments. **69**(9), 5648-55.
- Moritz M. (2011). *Integration of hygienically relevant bacteria in drinking water biofilms grown on domestic plumbing materials*. Duisburg, Essen, 2011.
- Mozes N., Amory D., Leonard A., Rouxhet P. J. C. and Surfaces (1989). Surface properties of microbial cells and their role in adhesion and flocculation. **42**(2), 313-29.
- Mozes N., Léonard A. and Rouxhet P. G. J. B. e. B. A.-B. (1988). On the relations between the elemental surface composition of yeasts and bacteria and their charge and hydrophobicity. **945**(2), 324-34.
- Mozes N., Marchal F., Hermesse M., Van Haecht J., Reuliaux L., Leonard A., Rouxhet P. J. B. and Bioengineering (1987). Immobilization of microorganisms by adhesion: interplay of electrostatic and nonelectrostatic interactions. **30**(3), 439-50.
- Niquette P., Servais P. and Savoir R. J. W. r. (2000). Impacts of pipe materials on densities of fixed bacterial biomass in a drinking water distribution system. **34**(6), 1952-6.
- Norton C. D., LeChevallier M. W. J. A. and Microbiology E. (2000). A pilot study of bacteriological population changes through potable water treatment and distribution. **66**(1), 268-76.
- Notermans S., Dormans J. and Mead G. J. B. (1991). Contribution of surface attachment to the establishment of micro-organisms in food processing plants: a review. **5**(1-2), 21-36.
- Oliveira K., Oliveira T., Teixeira P., Azeredo J., Henriques M. and Oliveira R. J. J. o. f. p. (2006). Comparison of the adhesion ability of different Salmonella Enteritidis serotypes to materials used in kitchens. **69**(10), 2352-6.
- Oliveira R., Azeredo J., Teixeira P. and Fonseca A. (2001). The role of hydrophobicity in bacterial adhesion.
- Oliver J. D. J. J. o. m. (2005). The viable but nonculturable state in bacteria. **43**(spc1), 93-100.
- Olofsson A.-C., Zita A. and Hermansson M. J. M. (1998). Floc stability and adhesion of green-fluorescent-protein-marked bacteria to flocs in activated sludge. **144**(2), 519-28.
- Ong Y.-L., Razatos A., Georgiou G. and Sharma M. M. J. L. (1999). Adhesion Forces between E. coli bacteria and biomaterial surfaces. **15**(8), 2719-25.
- Otto K., Elwing H. and Hermansson M. J. J. o. b. (1999). Effect of ionic strength on initial interactions of Escherichia coli with surfaces, studied on-line by a novel quartz crystal microbalance technique. **181**(17), 5210-8.
- Page D., Clinton F. and Crowe M. (2006). *The Quality of Drinking Water in Ireland: A Report for the Year 2005*. Environment Protection Agency.
- Pagedar A., Singh J. and Batish V. K. J. J. o. b. m. (2010). Surface hydrophobicity, nutritional contents affect Staphylococcus aureus biofilms and temperature influences its survival in preformed biofilms. **50**(S1), S98-S106.
- Parent M. E., Velegol D. J. C. and Biointerfaces S. B. (2004). E. coli adhesion to silica in the presence of humic acid. **39**(1-2), 45-51.

- Pashley R. J. J. o. c. and science i. (1981). DLVO and hydration forces between mica surfaces in Li⁺, Na⁺, K⁺, and Cs⁺ electrolyte solutions: A correlation of double-layer and hydration forces with surface cation exchange properties. **83**(2), 531-46.
- Pattison D. I., Hawkins C. L. and Davies M. J. J. B. (2007). Hypochlorous acid-mediated protein oxidation: how important are chloramine transfer reactions and protein tertiary structure? **46**(34), 9853-64.
- Peck B., Workeneh B., Kadikoy H., Patel S. J. and Abdellatif A. J. N. D. T. P. (2011). Spectrum of sodium hypochlorite toxicity in man—also a concern for nephrologists. **4**(4), 231-5.
- Pedersen K. J. W. R. (1990). Biofilm development on stainless steel and PVC surfaces in drinking water. **24**(2), 239-43.
- Percival S., Knapp J., Wales D., Edyvean R. J. J. o. i. M. and Biotechnology (1999). The effect of turbulent flow and surface roughness on biofilm formation in drinking water. **22**(3), 152-9.
- Pereira V., Marques R., Marques M., Benoliel M. and Crespo M. B. J. W. r. (2013). Free chlorine inactivation of fungi in drinking water sources. **47**(2), 517-23.
- Pezron I., Rochex A., Lebeault J. M., Clause D. J. J. o. d. s. and technology (2005). Determination of cellulose surface energy by imbibition experiments in relation to bacterial adhesion. **25**(6), 781-7.
- Poulsen L. V. J. L.-F. S. and Technology (1999). Microbial biofilm in food processing. **32**(6), 321-6.
- Proctor C. R. and Hammes F. J. C. O. i. B. (2015). Drinking water microbiology—from measurement to management. **33**, 87-94.
- Quirynen M. and Bollen C. J. J. o. c. p. (1995). The influence of surface roughness and surface-free energy on supra-and subgingival plaque formation in man: A review of the literature. **22**(1), 1-14.
- Raichur A., Misra M., Bukka K., Smith R. J. C. and Biointerfaces s. B. (1996). Flocculation and flotation of coal by adhesion of hydrophobic Mycobacterium phlei. **8**(1-2), 13-24.
- Rakotoarivonina H., Jubelin G., Hébraud M., Gaillard-Martinie B., Forano E. and Mosoni P. J. M. (2002). Adhesion to cellulose of the Gram-positive bacterium Ruminococcus albus involves type IV pili The EMBL accession number for the sequence reported in this paper is AJ416469. **148**(6), 1871-80.
- Rhoads W. J., Pruden A., Edwards M. A. J. E. S. W. R. and Technology (2016). Survey of green building water systems reveals elevated water age and water quality concerns. **2**(1), 164-73.
- Richardson S. D., Plewa M. J., Wagner E. D., Schoeny R. and DeMarini D. M. J. M. R. R. i. M. R. (2007). Occurrence, genotoxicity, and carcinogenicity of regulated and emerging disinfection by-products in drinking water: a review and roadmap for research. **636**(1-3), 178-242.
- Rochex A., Lecouturier D., Pezron I., Lebeault J.-M. J. A. m. and biotechnology (2004). Adhesion of a Pseudomonas putida strain isolated from a paper machine to cellulose fibres. **65**(6), 727-33.
- Rode T., Møretrø T., Langsrud S. and Holck A. J. N. S. P., NY (2012). Responses of Staphylococcus aureus to environmental stresses. 509-46.
- Rode T. M., Langsrud S., Holck A. and Møretrø T. J. I. j. o. f. m. (2007). Different patterns of biofilm formation in Staphylococcus aureus under food-related stress conditions. **116**(3), 372-83.
- Rogers J., Dowsett A., Dennis P., Lee J., Keevil C. J. A. and microbiology e. (1994). Influence of plumbing materials on biofilm formation and growth of Legionella pneumophila in potable water systems. **60**(6), 1842-51.
- Römbling U. J. C. and CMLS M. L. S. (2005). Characterization of the rdar morphotype, a multicellular behaviour in Enterobacteriaceae. **62**(11), 1234-46.
- Roosjen A., Busscher H. J., Norde W. and Van der Mei H. C. J. M. (2006). Bacterial factors influencing adhesion of Pseudomonas aeruginosa strains to a poly (ethylene oxide) brush. **152**(9), 2673-82.
- Rosario-Ortiz F., Rose J., Speight V., Von Gunten U. and Schnoor J. J. S. (2016). How do you like your tap water? **351**(6276), 912-4.
- Rosen H., Klebanoff S. J., Wang Y., Brot N., Heinecke J. W. and Fu X. J. P. o. t. N. A. o. S. (2009). Methionine oxidation contributes to bacterial killing by the myeloperoxidase system of neutrophils. **106**(44), 18686-91.
- Sadiki A.-I., Williams D. T., Carrier R. and Thomas B. J. C. (1996). Pilot study on the contamination of drinking water by organotin compounds from PVC materials. **32**(12), 2389-98.

- Sadiki M., Elabed S., Barkai H., Laachari F., Koraichi S. I. J. I. C. and Products (2015). The impact of *Thymus vulgaris* extractives on cedar wood surface energy: Theoretical and experimental of *Penicillium* spores adhesion. **77**, 1020-7.
- Sauer K., Rickard A. H. and Davies D. G. J. M.-A. S. f. M. (2007). Biofilms and biocomplexity. **2**(7), 347.
- Scheili A., Rodriguez M. and Sadiq R. J. S. o. t. T. E. (2015). Seasonal and spatial variations of source and drinking water quality in small municipal systems of two Canadian regions. **508**, 514-24.
- Schneider R. P., Marshall K. C. J. C. and Biointerfaces S. B. (1994). Retention of the Gramnegative marine bacterium SW8 on surfaces—effects of microbial physiology, substratum nature and conditioning films. **2**(4), 387-96.
- Schneider R. P. J. J. o. c. and science i. (1996). Conditioning film-induced modification of substratum physicochemistry—analysis by contact angles. **182**(1), 204-13.
- Seier-Petersen M. A., Jasni A., Aarestrup F. M., Vigre H., Mullany P., Roberts A. and Agersø Y. J. J. o. A. C. (2014). Effect of subinhibitory concentrations of four commonly used biocides on the conjugative transfer of Tn 916 in *Bacillus subtilis*. **69**(2), 343-8.
- September S., Els F., Venter S., Brözel V. J. J. o. w. and health (2007). Prevalence of bacterial pathogens in biofilms of drinking water distribution systems. **5**(2), 219-27.
- Shakeri Fard P. (2010). *Production and purification of biosurfactants and study of their influence on surface properties of stainless steel and Teflon*. Lille 1.
- Sharma P., Rao K. H. J. C. and Biointerfaces S. B. (2003). Adhesion of *Paenibacillus polymyxa* on chalcopyrite and pyrite: surface thermodynamics and extended DLVO theory. **29**(1), 21-38.
- Sheng X., Ting Y. P., Pehkonen S. O. J. J. o. C. and Science I. (2008). The influence of ionic strength, nutrients and pH on bacterial adhesion to metals. **321**(2), 256-64.
- Shi X., Zhu X. J. T. i. F. S. and Technology (2009). Biofilm formation and food safety in food industries. **20**(9), 407-13.
- Silhan J., Corfitzen C. B., Albrechtsen H.-J. J. W. S. and Technology (2006). Effect of temperature and pipe material on biofilm formation and survival of *Escherichia coli* in used drinking water pipes: a laboratory-based study. **54**(3), 49-56.
- Silva S., Teixeira P., Oliveira R. and Azeredo J. J. J. o. f. p. (2008). Adhesion to and viability of *Listeria monocytogenes* on food contact surfaces. **71**(7), 1379-85.
- Simm R., Ahmad I., Rhen M., Le Guyon S. and Römling U. J. F. m. (2014). Regulation of biofilm formation in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. **9**(11), 1261-82.
- Simoes L. C., Simoes M., Vieira M. J. J. A. and Microbiology E. (2010). Influence of the diversity of bacterial isolates from drinking water on resistance of biofilms to disinfection. **76**(19), 6673-9.
- Simoes L. C. and Simões M. J. R. A. (2013). Biofilms in drinking water: problems and solutions. **3**(8), 2520-33.
- Simoes M., Pereira M. O. and Vieira M. J. B. (2005). Validation of respirometry as a short-term method to assess the efficacy of biocides. **21**(1), 9-17.
- Somers E. B. and LEE WONG A. C. J. J. o. f. p. (2004). Efficacy of two cleaning and sanitizing combinations on *Listeria monocytogenes* biofilms formed at low temperature on a variety of materials in the presence of ready-to-eat meat residue. **67**(10), 2218-29.
- Soto G. E. and Hultgren S. J. J. J. o. b. (1999). Bacterial adhesins: common themes and variations in architecture and assembly. **181**(4), 1059-71.
- Soumya E., Saad I. K., Abdellah H., Hassani L. J. M. S. and C E. (2013). Experimental and theoretical investigations of the adhesion time of *Penicillium* spores to cedar wood surface. **33**(3), 1276-81.
- Squinazi F. J. L. d. h. d. l. v. d. P. (2004). Biofilm et matériaux des canalisations des réseaux de distribution d'eau.
- Srey S., Jahid I. K. and Ha S.-D. J. F. c. (2013). Biofilm formation in food industries: a food safety concern. **31**(2), 572-85.
- Stanley P. M. J. C. j. o. m. (1983). Factors affecting the irreversible attachment of *Pseudomonas aeruginosa* to stainless steel. **29**(11), 1493-9.

- Steed K. A., Falkinham III J. O. J. A. and Microbiology E. (2006). Effect of growth in biofilms on chlorine susceptibility of *Mycobacterium avium* and *Mycobacterium intracellulare*. **72**(6), 4007-11.
- Steenackers H., Hermans K., Vanderleyden J. and De Keersmaecker S. C. J. F. R. I. (2012). Salmonella biofilms: an overview on occurrence, structure, regulation and eradication. **45**(2), 502-31.
- Stewart M., Olson B. H. J. A. and microbiology e. (1992). Impact of growth conditions on resistance of *Klebsiella pneumoniae* to chloramines. **58**(8), 2649-53.
- Stewart P. S. J. A. a. and chemotherapy (1996). Theoretical aspects of antibiotic diffusion into microbial biofilms. **40**(11), 2517-22.
- Stocker R., Seymour J. R., Samadani A., Hunt D. E. and Polz M. F. J. P. o. t. N. A. o. S. (2008). Rapid chemotactic response enables marine bacteria to exploit ephemeral microscale nutrient patches. **105**(11), 4209-14.
- Stoodley P., Wilson S., Hall-Stoodley L., Boyle J. D., Lappin-Scott H. M., Costerton J. W. J. A. and microbiology e. (2001). Growth and detachment of cell clusters from mature mixed-species biofilms. **67**(12), 5608-13.
- Storph J., Samelis J., Sofos J., Kendall P. and Smith G. J. J. o. F. P. (2002). Biofilm formation by acid-adapted and nonadapted *Listeria monocytogenes* in fresh beef decontamination washings and its subsequent inactivation with sanitizers. **65**(11), 1717-27.
- Szlavik J., Paiva D. S., Mørk N., van den Berg F., Verran J., Whitehead K., Knøchel S. and Nielsen D. S. J. I. j. o. f. m. (2012). Initial adhesion of *Listeria monocytogenes* to solid surfaces under liquid flow. **152**(3), 181-8.
- Tanji Y., Morono Y., Soejima A., Hori K., Unno H. J. J. o. b. and bioengineering (1999). Structural analysis of a biofilm which enhances carbon steel corrosion in nutritionally poor aquatic environments. **88**(5), 551-6.
- Teixeira P., Lima J., Azeredo J., Oliveira R. J. I. j. o. f. s. and technology (2008). Adhesion of *Listeria monocytogenes* to materials commonly found in domestic kitchens. **43**(7), 1239-44.
- Teixeira P., Oliveira R. J. J. o. a. s. and technology (1999). Influence of surface characteristics on the adhesion of *Alcaligenes denitrificans* to polymeric substrates. **13**(11), 1287-94.
- Teixeira P., Silva S. C., Araújo F., Azeredo J. and Oliveira R. (2007). Bacterial adhesion to food contacting surfaces.
- Thomas V., Bouchez T., Nicolas V., Robert S., Loret J. and Levi Y. J. J. o. a. m. (2004). Amoebae in domestic water systems: resistance to disinfection treatments and implication in *Legionella* persistence. **97**(5), 950-63.
- USEPA (2002). Health risks from microbial growth and biofilms in drinking water distribution systems. In, USEPA Washington, DC.
- Vaezi S. S., Poorazizi E., Tahmourespour A. and Aminsharei F. J. M. p. (2020). Application of artificial neural networks to describe the combined effect of pH, time, NaCl and ethanol concentrations on the biofilm formation of *Staphylococcus aureus*. **141**, 103986.
- Van der Kooij D., Hein J., Van Lieverloo M., Schellart J. and Hiemstra P. J. J. A. W. W. A. (1999). Maintaining quality without a disinfectant residual. **91**(1), 55-64.
- Van der Kooij D., Veenendaal H. J. W. S. and Supply T. W. (2001). Biomass production potential of materials in contact with drinking water: method and practical importance. **1**(3), 39-45.
- Van der Kooij D., Veenendaal H. R. and Scheffer W. J. J. W. r. (2005). Biofilm formation and multiplication of *Legionella* in a model warm water system with pipes of copper, stainless steel and cross-linked polyethylene. **39**(13), 2789-98.
- Van der Mei H. and Busscher H. J. A. i. d. r. (1997). The use of X-ray photoelectron spectroscopy for the study of oral streptococcal cell surfaces. **11**(4), 388-94.
- Van Houdt R. and Michiels C. W. J. R. i. m. (2005). Role of bacterial cell surface structures in *Escherichia coli* biofilm formation. **156**(5-6), 626-33.
- Van Loosdrecht M., Lyklema J., Norde W., Schraa G., Zehnder A. J. A. and Microbiology E. (1987a). Electrophoretic mobility and hydrophobicity as a measured to predict the initial steps of bacterial adhesion. **53**(8), 1898-901.
- Van Loosdrecht M., Lyklema J., Norde W., Schraa G., Zehnder A. J. A. and microbiology e. (1987b). The role of bacterial cell wall hydrophobicity in adhesion. **53**(8), 1893-7.

- van Loosdrecht M. C., Lyklema J., Norde W. and Zehnder A. J. J. M. e. (1989). Bacterial adhesion: a physicochemical approach. **17**(1), 1-15.
- Van Oss C., Good R., Chaudhury M. J. J. o. c. and Science I. (1986). The role of van der Waals forces and hydrogen bonds in “hydrophobic interactions” between biopolymers and low energy surfaces. **111**(2), 378-90.
- van Oss C. J., Chaudhury M., Good R. J. J. A. i. c. and science i. (1987). Monopolar surfaces. **28**, 35-64.
- Van Oss C. J., Chaudhury M. K. and Good R. J. J. C. r. (1988). Interfacial Lifshitz-van der Waals and polar interactions in macroscopic systems. **88**(6), 927-41.
- Van Oss C. J. B. (1991). The forces involved in bioadhesion to flat surfaces and particles—Their determination and relative roles. **4**(1-3), 25-35.
- Van Oss C. J. C. and Biointerfaces S. B. (1995). Hydrophobicity of biosurfaces—origin, quantitative determination and interaction energies. **5**(3-4), 91-110.
- Van Oss C. J. C., Physicochemical S. A. and Aspects E. (1993). Acid—base interfacial interactions in aqueous media. **78**, 1-49.
- Van Oss C. J. J. C. b. (1989). Energetics of cell-cell and cell-biopolymer interactions. **14**(1), 1-16.
- van Oss C. J. J. C. o. i. c. and science i. (1997). Hydrophobicity and hydrophilicity of biosurfaces. **2**(5), 503-12.
- Van Pelt A., Weerkamp A. H., Uyen M. H., Busscher H. J., de Jong H. P., Arends J. J. A. and Microbiology E. (1985). Adhesion of *Streptococcus sanguis* CH3 to polymers with different surface free energies. **49**(5), 1270-5.
- Van Wey A. S., Cookson A. L., Roy N. C., McNabb W. C., Soboleva T. K., Shorten P. R. J. M. n. and research f. (2011). Bacterial biofilms associated with food particles in the human large bowel. **55**(7), 969-78.
- Vernhet A., Bellon-Fontaine M. J. C. and Biointerfaces s. B. (1995). Role of bentonites in the prevention of *Saccharomyces cerevisiae* adhesion to solid surfaces. **3**(5), 255-62.
- Virto R., Manas P., Alvarez I., Condon S., Raso J. J. A. and microbiology e. (2005). Membrane damage and microbial inactivation by chlorine in the absence and presence of a chlorine-demanding substrate. **71**(9), 5022-8.
- Walker S. L., Redman J. A. and Elimelech M. J. L. (2004). Role of cell surface lipopolysaccharides in *Escherichia coli* K12 adhesion and transport. **20**(18), 7736-46.
- Ward D. M., Weller R. and Bateson M. M. J. N. (1990). 16S rRNA sequences reveal numerous uncultured microorganisms in a natural community. **345**(6270), 63-5.
- Water S. and Organization W. H. (2006). Guidelines for drinking-water quality [electronic resource]: incorporating first addendum. Vol. 1, Recommendations.
- Wingender J., Flemming H.-C. J. W. S. and Technology (2004). Contamination potential of drinking water distribution network biofilms. **49**(11-12), 277-86.
- Wirtanen G., Husmark U. and Mattila-Sandholm T. J. J. o. F. P. (1996). Microbial evaluation of the biotransfer potential from surfaces with *Bacillus* biofilms after rinsing and cleaning procedures in closed food-processing systems. **59**(7), 727-33.
- Wu W., Giese Jr R., Van Oss C. J. C., Physicochemical S. A. and Aspects E. (1994). Linkage between ζ -potential and electron donicity of charged polar surfaces 1. Implications for the mechanism of flocculation of particle suspensions with plurivalent counterions. **89**(2-3), 241-52.
- Xu H., Zou Y., Lee H. Y. and Ahn J. J. J. o. F. S. (2010). Effect of NaCl on the biofilm formation by foodborne pathogens. **75**(9), M580-M5.
- Yoon H. J. M. s. t. S. W. s. U., Seoul, Korea (2013). Influence of NaCl on pathogenicity and biofilm formation of *Salmonella*.
- Zacheus O. M., Iivanainen E. K., Nissinen T. K., Lehtola M. J. and Martikainen P. J. J. W. R. (2000). Bacterial biofilm formation on polyvinyl chloride, polyethylene and stainless steel exposed to ozonated water. **34**(1), 63-70.
- Zarnea G. and Popescu O. (2011). Dictionary of general microbiology and molecular biology. In, Romanian Academy Publishing House, Bucharest.
- Zhao Q., Wang C., Liu Y., Wang S. J. I. J. o. A. and Adhesives (2007). Bacterial adhesion on the metal-polymer composite coatings. **27**(2), 85-91.

World Health Organization (WHO), Guidelines for drinking – water quality: incorporating first addendum.Vol.1 Recommendations – 3rd edition , ISBN 92 4 154696 4 , 1-18 (2006)