



HAL
open science

Monitoring de la croissance de bactéries / biofilms bactériens via une sonde coaxiale

Matthieu Longo, Stéphane Rioual, Philippe Talbot, Fabienne Fay, Claire
Hellio, Benoît Lescop

► To cite this version:

Matthieu Longo, Stéphane Rioual, Philippe Talbot, Fabienne Fay, Claire Hellio, et al.. Monitoring de la croissance de bactéries / biofilms bactériens via une sonde coaxiale. 17èmes Journées de Caractérisation Microondes et Matériaux (JCMM 2023), Apr 2023, Tours, France. hal-04143676

HAL Id: hal-04143676

<https://hal.univ-brest.fr/hal-04143676>

Submitted on 27 Jun 2023

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

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

Monitoring de la croissance de bactéries / biofilms bactériens via une sonde coaxiale

Matthieu Longo^{1,2}, Stéphane Rioual¹, Philippe Talbot¹, Fabienne Fay³, Claire Hellio² et Benoît Lescop¹

¹ Univ Brest, Lab-STICC, CNRS, UMR 6285, F-29200 Brest, France.

² Univ Brest, LEMAR, CNRS, UMR 6539, F-29200 Brest, France.

³ UBS, LBCM, F-56100 Lorient, France.

e-mail : benoit.lescop@univ-brest.fr, matthieu.longo81@gmail.com

Résumé — Le but de ce travail est de développer une sonde radiofréquence pour le suivi du développement de bactéries et/ou de biofilm bactérien. Il s'agit d'une sonde coaxiale ouverte plongée dans un réservoir rempli d'une solution. Des simulations HFSS ont été effectuées afin de vérifier la faisabilité de la sonde. Le suivi de la prolifération de deux bactéries modèles a été testé avec succès. La détermination de la présence d'un biofilm est aussi possible. Ces suivis peuvent être obtenus à une fréquence unique permettant un suivi temps réel à faible coût.

I. INTRODUCTION

Lorsqu'une surface est immergée, elle est rapidement colonisée par divers micro-organismes sous la forme d'un film biologique appelé biofilm. Ce film est initialement constitué de bactéries et de microalgues reliées entre elles par une matrice d'EPS (Exo-Polysaccharides). Au bout de quelques jours, le biofilm se développe à l'échelle macroscopique via la présence d'autres organismes telles que des macro-algues, des invertébrés ... Dans l'eau de mer, les biofilms sont connus pour présenter des effets néfastes tels que l'alourdissement des structures marines (éoliennes flottantes, bateaux), la détérioration des filets de pêche, des éléments d'aquaculture, la biocorrosion [1,2] ...

Il est donc fondamental de détecter le biofilm à un stade précoce. En effet, le suivi de la croissance du biofilm permettrait de faciliter les actions préventives (nettoyage et surveillance de structures, ...) mais aussi de tester de nouveaux produits anti-fouling. Dans ce cadre, l'objectif de ce travail consiste à faire croître des biofilms bactériens puis de caractériser leur permittivité diélectrique complexes à l'aide d'une sonde coaxiale.

II. MATERIEL ET METHODES

A. Croissance des bactéries / biofilms

Deux souches de bactéries (*Pseudomonas aeruginosa* (PAO1) et *Vibrio natriegens* (ATCC 14048)) ont été utilisées. Elles ont été inoculées, à partir d'un stock congelé sur cryobilles à -80°C, dans un tube en téflon contenant 50 mL de milieu nutritif Tryptic Soy Broth (TSB – *P. aeruginosa*) ou de Nutrient Broth (NB – *V. natriegens*). La salinité du milieu NB a été ajustée à 1,5 % par ajout de chlorure de sodium. Les cultures ont ensuite été incubées sous agitation (50 rpm) pendant une nuit à 37°C pour *P. aeruginosa* et à 28°C pour *V. natriegens*. Les suspensions bactériennes initiales ont été ajustées à 2×10^7 UFC/mL pour *P. aeruginosa* et à 2×10^5 UFC/ mL pour

V. natriegens. Le développement rapide de *V. natriegens* justifie la concentration de départ plus faible. Les cinétiques de croissance bactérienne ont été réalisées parallèlement par mesure automatisée de la densité optique (DO_{600nm}) au spectrophotomètre.

La sélection de ces souches est basée sur le taux de croissance rapide de *Vibrio natriegens* et la production conséquente d'EPS pour *Pseudomonas aeruginosa*.

B. Sonde coaxiale

Une sonde électromagnétique a été conçue pour l'analyse des bactéries / biofilms. Elle consiste en une ligne coaxiale ouverte plongée dans un réservoir pouvant recueillir la solution bactérienne. La ligne a été fabriquée à partir d'un câble SMA encerclé dans une pièce en laiton illustré à la figure 1. Les diamètres de l'âme coaxiale, de l'isolant et du cylindre extérieur de laiton sont respectivement de 1,24, 4,0 et 18,2 mm. La hauteur de la sonde est de 15 mm. Le réservoir en téflon permet de tester des solutions de volume 120 ml. Pour faciliter la stérilisation du capteur et éviter les contaminations, un second réservoir en inox a été fabriqué. La mesure de réflexion (paramètre S_{11}) a été obtenue par un VNA portable (MasterTM MS2037C, Anritsu) sur des durées comprises entre 20 et 50 h à raison de 1 mesure par demi-heure. Pour éviter des contaminations bactériennes / fongiques mais aussi l'évaporation de la solution, le réservoir est refermé par un couvercle.



Fig. 1. Sonde coaxiale ouverte incluant un réservoir.

III. RÉSULTATS ET DISCUSSION

A. Simulations HFSS

Initialement, la permittivité de solutions contenant plusieurs concentrations de bactéries ou microalgues a été mesurée pour des fréquences comprises 100 MHz et 3 GHz [3,4]. Ces données ont montré que la croissance des bactéries modifie peu la valeur réelle de la permittivité (proche de celle de l'eau) mais conduit à une augmentation forte de la partie complexe aux basses fréquences attribuable à l'augmentation de la conduction électrique. Néanmoins, les constituants majeurs des biofilms qui sont les exo-polysaccharides conduisent à des variations faibles de la permittivité complexe [3].

Fort de ces résultats, des simulations HFSS ont été effectuées en modélisant la sonde et une solution. Nous avons étudié le paramètre S_{11} pour différentes valeurs de conductivité électrique et de permittivité comme présenté à la figure 2.

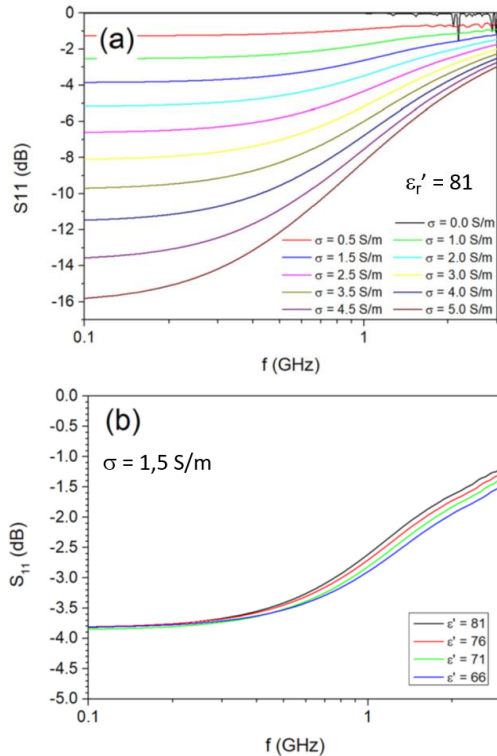


Fig. 2. Paramètre de réflexion S_{11} calculé par des simulations HFSS.

La figure 2a montre l'évolution du paramètre de réflexion avec l'augmentation de la conductivité. Pour ces calculs, la permittivité relative est choisie comme fixe à 81. La valeur maximale de la conductivité est celle de l'eau de mer tandis que celle des solutions nutritives est de l'ordre de 1,5 S/m. On peut noter une forte chute du paramètre de réflexion avec la hausse de la conductivité pour les fréquences basses.

La figure 2b montre l'évolution du paramètre de réflexion avec la diminution de la permittivité relative. La conductivité est fixée à celle d'une solution nutritive. Les

valeurs de permittivité testées ne modifient que faiblement le paramètre de réflexion S_{11} aux fréquences élevées.

B. Mesures expérimentales

La figure 3 présente le suivi du paramètre S_{11} lors de la croissance de la bactérie *V. natriegens*. Les valeurs initiales de S_{11} (vers -8 dB) sont faibles, ceci est dû à la salinité de la solution nutritive. Nous observons clairement la diminution progressive du paramètre S_{11} en fonction du temps. Cette évolution est cohérente avec les données HFSS pour une augmentation de la conductivité électrique de la solution. Pour mieux visualiser le processus, des mesures à des fréquences fixes ont été effectuées (Figure 3b). Le comportement est identique pour toutes les fréquences : le paramètre S_{11} baisse lors des 5 premières heures puis se stabilise. Nous pouvons noter que la variation relative est identique pour toutes les fréquences étudiées. Des mesures de densité optique ont été effectuées en parallèle [5]. Ces observations sont cohérentes avec les mesures RF : elles montrent que la densité cellulaire présente une croissance forte lors des 5 premières heures avant de se stabiliser. Nous pouvons supposer que pour des temps supérieurs, sa concentration finira par diminuer du fait de la consommation des nutriments.

La comparaison entre nos mesures de S_{11} et la densité optique montre un rapport de 0.95 dB/log(OD₆₀₀). En nous basant sur le niveau de bruit de nos mesures, le seuil de détection de la concentration bactérienne devrait être de 2×10^4 CFU/mL.

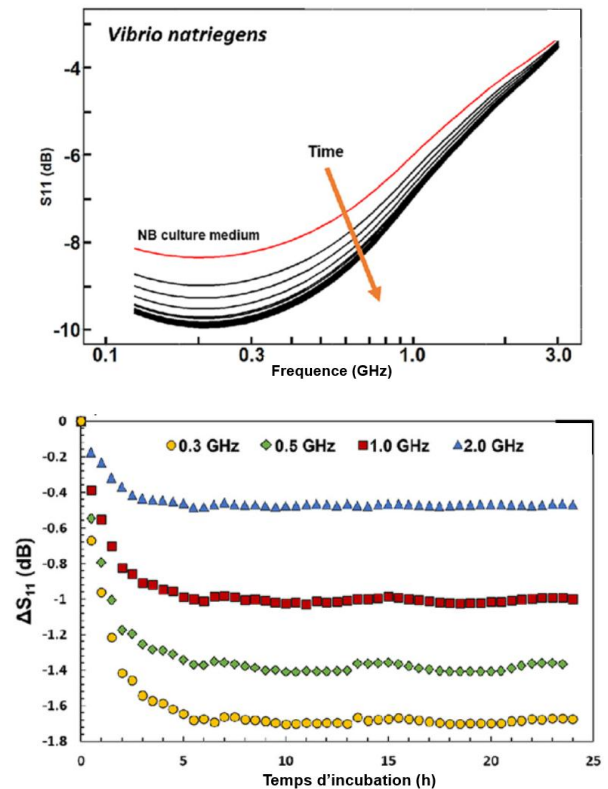


Fig. 3. Suivi du paramètre de réflexion S_{11} lors de la croissance de la bactérie *V. natriegens*.

La figure 4 présente le suivi du paramètre S_{11} lors de la croissance de la bactérie *P. aeruginosa*. Les valeurs initiales du paramètre S_{11} sont différents de ceux présenté figure 3. En effet, la conductivité de la solution nutritive utilisée (TSB) est plus faible que le NB. Cependant, comme dans le cas de la *Vibrio natriegens*, une diminution de ce paramètre de réflexion est observée au cours du temps.

Les mesures à fréquences fixes montrent que, pour cette bactérie, deux phases sont clairement observées. Lors des 8 premières heures, on observe une diminution progressive du paramètre S_{11} , qui peut être attribuée à la croissance de la bactérie.

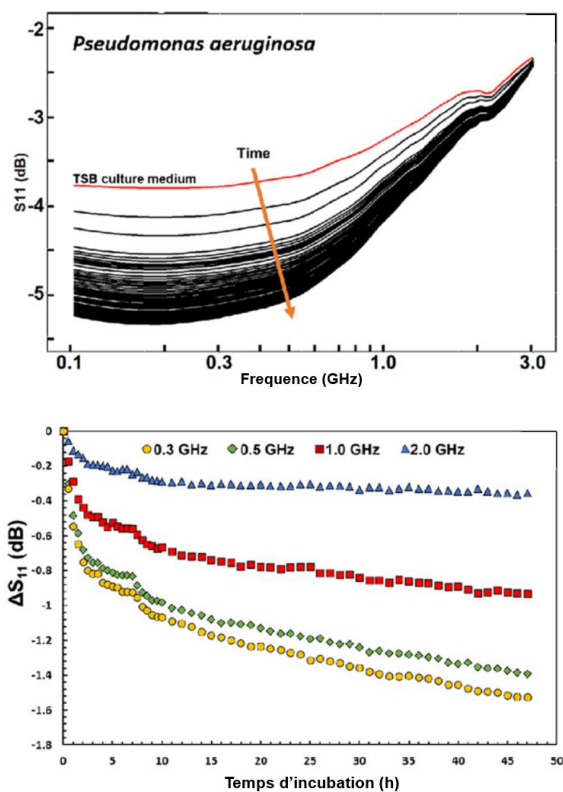


Fig. 4. Suivi du paramètre de réflexion S_{11} lors de la croissance de la bactérie *P. aeruginosa*.

L'existence de cette phase de croissance exponentielle est confirmée par des mesures de densité optique [5]. La croissance de la bactérie se stabilise après environ 8 h.

Néanmoins, pour des temps supérieurs à 10 h, une variation linéaire du paramètre S_{11} est observée. Cette évolution correspond donc à un autre phénomène. Nous pouvons supposer qu'il s'agit de la formation d'un biofilm. Pour le vérifier, il a fallu séparer l'effet des bactéries du celui d'un éventuel biofilm. Pour cela, l'expérience suivante a été effectuée : après un temps d'incubation de 24 h, la solution a été remplacée par la solution nutritive initiale. Une variation du paramètre S_{11} par rapport à la valeur initiale a été reportée confirmant la présence d'un biofilm sur la sonde.

Des mesures de l'indice SBF (Formation Spécifique de Biofilm) et des observations de microscopie MEB ont confirmé que la seconde phase correspond effectivement à la formation du biofilm [6].

Des rétro-simulations ont été tentées sur HFSS mais il est difficile d'estimer l'épaisseur du biofilm du fait de son hétérogénéité, et donc de la détermination de sa permittivité complexe.

Parallèlement à ces mesures, une étude de la croissance de cette bactérie sur des électrodes de carbone a été effectuée par électrochimie (potentiel à l'abandon (OCP) et impédance basses fréquences) [6]. La mesure de l'OCP confirme l'existence des deux phases observées par la sonde coaxiale ouverte : croissance de la bactérie puis formation du biofilm. Pourtant, l'OCP est uniquement sensible à l'état de surface de l'électrode. Des simulations HFSS ont montré une sensibilité de la sonde coaxiale ouverte à partir de plusieurs dizaines de nm de biofilm. L'accord entre les différentes techniques est certainement dû au fait que les bactéries présentent des dimensions de l'ordre du μm . l'épaisseur minimale d'un biofilm bactérien est donc supérieur au μm .

La mesure du paramètre de réflexion S_{11} d'une solution incluant des bactéries par sonde coaxiale permet par conséquent de suivre en temps réel leur prolifération mais aussi la formation d'un biofilm. Il est à noter également que la croissance de bactéries présentes dans l'industrie agroalimentaire a aussi été suivie avec succès par notre dispositif. Notre étude a montré la faisabilité de la méthode, cependant il est nécessaire de compléter cette étude en évaluant l'évolution du paramètre S_{11} pour d'autres souches de bactéries et de microalgues.

IV. CONCLUSION

Ce travail porte sur la fabrication d'une sonde coaxiale ouverte pour le suivi de la croissance de bactéries mais aussi la formation d'un biofilm bactérien. Nous avons montré qu'il est possible de suivre ces phénomènes à une fréquence unique. Cette propriété nous permet d'étudier en temps réel le développement bactérien. Lors du congrès, nous présenterons aussi le monitoring de l'interaction bactérie / bactériophage, qui est un phénomène rapide entre une proie (bactérie) et un prédateur (bactériophage).

REFERENCES

- [1] D.M. Yebra, S. Kiil et K. Dam-Johansen, "Antifouling technology-past, present and future stepstowards efficient and environmentally friendly antifouling coatings", Prog. Org. Coat., vol. 50, pp 75-104, 2004.
- [2] H. Lee, Z. Lewandowski, P.H. Nielsen et W.A. Hamilton, "Role of sulfate-reducing bacteria in corrosion of mild steel: A review", Biofouling, vol. 8, pp. 165-194, 1995.
- [3] M. Longo, S. Rioual, P. Talbot, F. Fay, C. Hellio et B. Lescop, "Caractérisation hyperfréquence de biofilms marins", JCOMM 2020.

- [4] M. Longo, "*Elaboration d'une nouvelle méthode hyperfréquence pour la détection et le suivi de croissance de biofilms bactériens*", Thèse de doctorat 2023.
- [5] M. Longo, S. Rioual, P. Talbot, F. Fay, C. Hellio et B. Lescop, "*A high sensitive microwave sensor to monitor bacterial and biofilm growth* ", Sens. Biosens. Res., vol. 36, p. 100493, 2022.
- [6] J. Pellé, M. Longo, N. Le Poul, S. Rioual, C. Hellio et B. Lescop, "*Electrochemical monitoring of the Pseudomonas aeruginosa growth and the formation of a biofilm in TSB media*", BioElectroChemistry, vol. 150, p. 108344, 2023.