THÈSE POUR OBTENIR LE GRADE DE DOCTEUR DE MONTPELLIER SUPAGRO

En Biotechnologie et Microbiologie

École doctorale : GAIA – Biodiversité, Agriculture, Alimentation, Environnement, Terre, Eau
Portée par l'Université de Montpellier

Unités de recherche : Laboratoire de Biotechnologie de l'Environnement (LBE-INRAE UR 0050)
&
UMR Gestion de l'Eau, Acteurs, Usages (INRAE-UMR G-Eau)

Caractérisation du colmatage biologique des systèmes d'irrigation goutte-à-goutte alimentés avec des eaux usées traitées

Présentée par Kévin LEQUETTE
Le 9 Septembre 2020

Sous la direction de Nathalie WERY
et encadrée par Nassim AIT-MOUHEB

Devant le jury composé de

Brigitte BRUNEL, Professeure, Institut Agro - Montpellier	Présidente
Laurence MATHIEU, Maitre de Conférences, EPHE-PSL - Nancy	Rapporteur
Jean-Denis MATHIAS, Directeur de Recherche, INRAE - Clermont-Ferrand	Rapporteur
Nicolas DERLON, Group Leader , EAWAG - Suisse	Examinateur
Nathalie WERY, Directrice de Recherche, INRAE - Narbonne	Directrice de thèse
Nassim AIT-MOUHEB, Chargé de Recherche, INRAE - Montpellier	Encadrant

UNIVERSITÉ DE MONTPELLIER

Montpellier SupAgro

"Imagination is more important than knowledge. For knowledge is limited to all we now know and understand, while imagination embraces the entire world, and all there ever will be to know and understand."

Albert Einstein

RÉSUMÉ

Sur le bassin méditerranéen, des sécheresses intenses et plus fréquentes sont attendues, ainsi qu'une hausse des températures (+2,2 à 3,5 °C d'ici 2040) accompagnée de la modification du régime des précipitations. L'association de la réutilisation des eaux usées traitées au système d'irrigation goutte à goutte apparaît donc pertinente pour faire face à la raréfaction de la ressource et aider au maintien de l'activité. Le colmatage biologique des systèmes d'irrigation goutte à goutte est une des limites de l'utilisation des eaux usées traitées. L'objectif était d'étudier l'influence du type d'eau usée et de l'hydrodynamique sur la formation des biofilms dans des systèmes complexes millifluidiques, ainsi que de tester deux types de traitement, la chloration et la purge. Les cinétiques de colonisation ont été suivies par tomographie en cohérence optique. La caractérisation des communautés microbiennes des biofilms se développant dans les réseaux d'irrigation et dans les effluents a été réalisée par séquençage haut débit en utilisant les gènes codant pour l'ARNr 16S et l'ARNr 18S comme marqueurs taxonomiques. Enfin, l'effet de ces paramètres (type d'eau, hydrodynamique, traitement) sur les contaminants microbiologiques véhiculés par l'eau usée traitée a été étudié.

L'écoulement varie le long d'un système d'irrigation goutte à goutte (conduite, goutteur) mais également entre les différents types de goutteurs testés. L'entrée, la zone de retour ainsi que les zones de recirculation étaient les zones les plus sensibles au colmatage. Ceci s'explique par le fait que les vitesses et l'énergie cinétique de turbulence sont plus faibles dans ces zones, favorisant le développement des biofilms. Les goutteurs avec un faible diamètre hydraulique étaient les plus sensibles au colmatage. Les différences d'écoulement induisent des spécificités au niveau de la structure des communautés microbiennes des biofilms qui ont été décrites pour la première fois. L'influence du traitement par lagunage sur les communautés responsables du colmatage a également été mise en évidence par comparaison des eaux usées non traitée *versus* eaux usées traitées. En particulier, les résultats illustrent le rôle clef des Chloroflexi, qui incluent des bactéries filamenteuses, dans le colmatage des goutteurs.

Des moyens couramment utilisés en agriculture pour limiter le colmatage ont été évalués. La chloration combinée à la purge permet de diminuer statistiquement le niveau de colmatage des goutteurs, notamment dans l'écoulement principal du labyrinthe, où la vitesse est la plus élevée. À l'inverse, l'utilisation de la purge seule ne permet pas de réduire le colmatage des goutteurs. La chloration réduit, mais ne supprime pas totalement les biofilms aux concentrations utilisées. Les bactéries résistantes à la chloration ont été identifiées, telles que les membres de la famille des Comamonadaceae ou *Pseudomonas*.

Enfin, les espèces pathogènes opportunistes *Pseudomonas aeruginosa*, *Aeromonas hydrophila* et *Legionella pneumophila* sont présentes dans les biofilms des goutteurs, colonisant préférentiellement les biofilms des réseaux, comparativement aux indicateurs de contamination fécale (*Enterococcus* spp., *E. coli*).

MOTS-CLES : Réutilisation des eaux usées traitées, irrigation goutte-à-goutte, biofilm, tomographie en cohérence optique, microbiote, pathogènes

TABLE DES MATIERES

REMERCIEMENTS ---- **13**

PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS ---- **15**

LISTE DES ABBRÉVIATIONS ---- **17**

TABLE DES FIGURES ---- **19**

TABLE DES TABLEAUX ---- **25**

TABLE DES ÉQUATIONS ---- **29**

INTRODUCTION : DE LA RARÉFACTION DE L'OR BLEU À L'OPTIMISATION DE L'UTILISATION DES EAUX USÉES TRAITÉES ET AUX PROBLÈMES DE COLMATAGE DES SYSTÈMES D'IRRIGATION ---- **31**

I. Du stress hydrique à la réutilisation des eaux usées ---- *33*

A. Raréfaction de l'or « Bleu » ---- 33

B. Utilisation des eaux usées traitées en irrigation ---- 37

1. Apports de l'irrigation avec des EUT ---- 37

2. Risques associés à l'utilisation des EUT ---- 38

3. Réglementation ---- 53

II. Méthodes d'irrigation en agriculture ---- *59*

A. Efficience et systèmes d'irrigation ---- 59

1. Irrigation de surface ---- 60

2. Irrigation par aspersion ---- 60

B. Micro-irrigation ---- 61

1. Définition ---- 61

2. Les goutteurs ---- 62

3. Relation Débit-Pression ---- 64

4. Hydrodynamiques et comportement de l'écoulement dans un goutteur non autorégulant ---- 65

III. Micro-irrigation et colmatage ---- *69*

A. Définition du colmatage ---- 69

B. Origine du colmatage ---- 69

1. Le colmatage physique ---- 69
2. Le colmatage chimique ---- 70
3. Le colmatage biologique ---- 71
C. Paramètres influençant le développement du colmatage ---- 72
1. Écoulement et géométrie des labyrinthes ---- 72
2. Qualité de l'eau ---- 73
IV. Les Biofilms ---- 77
A. Définition ---- 77
B. Formation des biofilms ---- 78
1. Phase d'adhésion ---- 79
2. Phase d'agrégation et de maturation ---- 80
3. Phase de détachement ---- 81
C. Facteurs influençant le développement des biofilms en micro-irrigation ---- 81
1. Les paramètres hydrodynamiques ---- 82
2. La qualité de l'effluent ---- 84
D. Méthode de contrôle des biofilms en micro-irrigation ---- 84
1. Traitement chimique ---- 84
2. Purge hydrique ---- 85
E. Caractérisation microbiologique des biofilms des systèmes de micro-irrigation ---- 86
V. Contexte et objectif de la thèse ---- 91
A. Contexte de la thèse : La REUT en Méditerranée ---- 91
B. Objectifs de la thèse ---- 93
MATÉRIELS ET MÉTHODES ---- 97
I. Caractérisation de l'effluent ---- 100
A. Caractérisation physico-chimique des effluents ---- 101
1. Paramètres mesurés ---- 101
2. Résultats ---- 102
B. Paramètres microbiologiques des effluents ---- 102
1. Paramètres mesurés ---- 102
2. Résultats ---- 104
II. Dispositif expérimental ---- 104

A. Expérimentations à l'échelle Laboratoire : « Écoulement » & « Nettoyage » ---- 104
1. Caractéristiques des goutteurs utilisés ---- 105
2. Dispositif expérimental avec accès optique ---- 106
3. Banc d'essai ---- 107
a. Expérimentation Écoulement ---- 107
a. Expérimentation Nettoyage ---- 109
B. Expérimentation Terrain ---- 109
1. Parcelle agricole ---- 109
2. Serre : Expérimentation « Qualité de l'eau » ---- 110
III. Caractérisation des biofilms ---- 111
A. Tomographie en Cohérence Optique ---- 112
1. Principe ---- 114
2. Acquisition et traitement de l'image ---- 115
3. Quantification du biofilm ---- 117
B. Caractérisation microbiologique des biofilms et des effluents ---- 118
1. Échantillonnage ---- 118
2. Extraction de l'ADN ---- 118
3. Caractérisation des communautés microbiennes ---- 119
a) Séquençage haut débit illumina ---- 119
(1) Amplification de la banque d'ADN ---- 120
(2) Traitement des données de séquençage ---- 121
(3) Traitement statistique des données de séquençage ---- 121
(4) Recherche dans les données de séquençage des genres comprenant des espèces pathogènes 122
b) PCR en temps réel ou PCR quantitative ---- 124
(1) Principe ---- 124
(2) Espèces ciblées par qPCR et cycle d'amplification ---- 125
(3) Préparation des gammes d'étalonnage et limite de quantification ---- 129
(4) Traitement des données ---- 129

CHAPITRE 1 : EFFET DU TRAITEMENT DE L'EAU D'IRRIGATION SUR LA COMPOSITION MICROBIENNE DES BIOFILMS DES GOUTTEURS ---- 133

I. Introduction ---- *135*

II. Matériels et Méthodes spécifiques à l'étude ---- *136*

A. Mise en place expérimentale ---- 136

B. Qualité physico-chimique et microbiologique des effluents ---- 136

C. Analyse des communautés bactériennes ---- 137

1. Échantillonnages ---- 137

2. Séquençage Illumina, qPCR et analyse des données ---- 137

III. Résultats ---- *138*

A. Évolution des débits ---- 138

B. Composition et structure des communautés bactériennes ---- 139

1. Structure des communautés bactériennes des biofilms des goutteurs et des effluents ---- 140

2. Effet de la colonisation du réseau sur la structure de la communauté bactérienne de l'eau sortant des goutteurs ---- 145

3. Quantification des indicateurs entériques et des pathogènes opportunistes ---- 145

IV. Discussion ---- *148*

V. Conclusion ---- *150*

CHAPITRE 2 : COLMATAGE BIOLOGIQUE DES SYSTÈMES D'IRRIGATION AU GOUTTE-À-GOUTTE AVEC DES EAUX USÉES TRAITÉES : SÉLECTION BACTÉRIENNE RÉVÉLÉE PAR UN SÉQUENÇAGE À HAUT DÉBIT ---- 155

CHAPITRE 3 : INFLUENCE DE L'ÉCOULEMENT SUR L'ENCRASSEMENT BIOLOGIQUE ET SUR LES COMMUNAUTÉS BACTÉRIENNES DANS LES SYSTÈMES D'IRRIGATION AU GOUTTE-À-GOUTTE ALIMENTÉS PAR DES EAUX USÉES TRAITÉES. ---- 173

PARTIE 1: HYDRODYNAMIC EFFECT ON BIOFOULING OF MILLI-LABYRINTH CHANNEL AND BACTERIAL COMMUNITIES IN DRIP IRRIGATION SYSTEMS FED WITH RECLAIMED WASTEWATER ---- 175

PARTIE 2 : EFFET DE L'ÉCOULEMENT SUR LA PRÉSENCE DE MICROORGANISMES PATHOGÈNES ---- 189

I. Matériels et Méthodes ---- *189*

II. Résultats ---- *189*

A. Influence du débit sur les indices de diversité et de richesse des OTUs associés aux genres incluant des espèces pathogènes ---- 189
B. Effet du type de goutteur sur la structure de la sous-communauté bactérienne regroupant des genres incluant des espèces pathogènes ---- 190
C. Indicateurs et espèces pathogènes dans les biofilms des goutteurs et dans l'eau de la lagune ---- 196
III. Discussion ---- 198
IV. Conclusion ---- 200

CHAPITRE 4 : EFFET DE LA CHLORATION ET DE LA PURGE SUR LE COLMATAGE DES GOUTTEURS ALIMENTES PAR LES EAUX USÉES TRAITÉES ---- 205

PARTIE 1 : EFFECT OF CHLORINATION AND PRESSURE FLUSHING OF DRIPPERS FED BY RECLAIMED WASTEWATER ON BIOFOULING 207
I. Introduction ---- 208
II. Materials and Methods ---- 210
A. Experimental setup ---- 210
1. Experimental setup and irrigation procedure ---- 210
2. Physicochemical and microbiological quality of TWW ---- 212
B. Cleaning procedures ---- 212
C. Image acquisition and processing ---- 213
1. Image acquisition ---- 213
2. Image analysis ---- 214
D. Analysis of microbial communities ---- 215
1. DNA extraction ---- 215
2. Bacterial quantification by qPCR ---- 215
3. Illumina sequencing ---- 215
E. Statistical analyses ---- 216
III. Results ---- 217
A. Biofouling kinetic analysis ---- 217
1. Dynamic changes for outflow ratio variation of drippers ---- 217
2. Chlorination combined with pressure flushing decreased biofouling ---- 218
3. Biofouling level and bacterial quantification ---- 222

B. Bacterial Community Structure Analysis ---- 223
1. Structure of bacterial communities ---- 223
2. Composition of bacterial communities in RWW and dripper biofilms ---- 225
3. Composition of eucaryotic communities in dripper biofilms ---- 228
4. Impact of the interruption of the cleaning method on the bacterial community composition ---- 228
IV. Discussion ---- *230*
V. Conclusion ---- *235*
PARTIE 2 : EFFET DES MÉTHODES DE NETTOYAGE SUR LA PRÉSENCE DE MICROORGANISMES PATHOGÈNES DANS LES SYSTÈMES D'IRRIGATION ALIMENTÉS AVEC DES EAUX USÉES TRAITÉES ---- 236
I. Matériels et Méthodes ---- *236*
II. Résultats ---- *236*
A. Impact des traitements sur les genres incluants des espèces pathogènes ---- 236
B. Effet de la chloration sur la structure des communautés microbiennes incluant des espèces pathogènes 238
C. Diversité et composition de l'effluent sortant des goutteurs pendant le traitement ---- 243
D. Quantification d'espèces pathogènes bactériennes ---- 244
1. Dans l'effluent et dans les biofilms ---- 244
2. En sortie de goutteur ---- 246
III. Discussion ---- *247*
IV. Conclusion ---- *252*
DISCUSSION GÉNÉRALE & CONCLUSION ---- 256
I. Rappel des Objectifs de la thèse ---- *258*
II. Avantages et limites de l'approche expérimentale ---- *259*
A. Méthodes moléculaires ---- 259
B. Dispositif optique ---- 261
C. Échelle expérimentale : approche terrain versus approche laboratoire ---- 263
III. Écoulement, microbiote et transfert de matière ---- *265*
A. Écoulement et microbiote ---- 265
B. Écoulement et transfert de matière ---- 266

IV. Les principaux acteurs du colmatage biologique des goutteurs ---- 268

V. Colmatage et risques sanitaires ---- 270

A. Qualité de l'effluent et présence de pathogènes ---- 270

B. Les biofilms : réservoirs à pathogènes ? ---- 271

VI. Conclusion ---- 273

RÉFÉRENCES ---- 276

ANNEXES ---- 326

ANNEXES « INTRODUCTION » ---- 327

ANNEXES « MATÉRIELS ET MÉTHODES » ---- 328

ANNEXES CHAPITRE « QUALITÉ » ---- 332

ANNEXES CHAPITRE « PARCELLE » ---- 333

ANNEXES CHAPITRE « ECOULEMENT » ---- 341

ANNEXES CHAPITRE « NETTOYAGE » ---- 351

REMERCIEMENTS

La thèse de doctorat représente un travail s'inscrivant dans la durée, et pour cette raison, constitue le fil conducteur d'une tranche de vie de son auteur, parfois au crépuscule de la candeur étudiante, et souvent à l'aube de la maturité scientifique. De nombreuses personnes se sont ainsi retrouvées de manière fortuite ou non, pour le pire ou le meilleur, entre moi, doctorant ou « apprenti chercheur », et mon doctorat. Ce sont ces personnes que j'aimerais mettre en avant dans ces remerciements.

En premier lieu, je tiens à remercier ma directrice de thèse, Madame Nathalie Wéry (INRAE-LBE), pour la confiance que tu m'as accordée en acceptant d'encadrer ce travail doctoral, pour tes multiples conseils et pour toutes les heures que tu as consacrée à diriger cette recherche. Merci également pour ta grande disponibilité et tes qualités humaines d'écoute et de compréhension tout au long de ce travail doctoral. Parmi les nombreux moments échangés, je garderai en mémoire cette phrase : « Profite de ce moment ! », juste avant ma première présentation orale internationale où le stress était relativement palpable. Merci.

Je remercie également mon encadrant de thèse, Monsieur Nassim Ait-Mouheb (INRAE UMR G-Eau). Je sais à présent à quel point il a été compliqué pour toi de faire comprendre à un microbiologiste comme moi, les lois de l'hydrodynamique. Merci pour ta patience, tes conseils et pour ces heures consacrées à l'encadrement de ces travaux. Je pense que, comme pour toi, l'un des « moments phares » de cette thèse aura été l'effondrement de la halle expérimentale à la suite de cet épisode neigeux à Montpellier, tout juste prêt à accueillir nos expérimentations. « Try again ! »

Durant ces années de thèse, j'ai aussi eu la chance de recevoir de nombreux conseils de la part des membres de mon comité de suivi de thèse qui m'ont servi à garder le cap et à guider mes recherches. Ainsi, je tiens à remercier à Yann Héchard, Nicolas Bernet, Nicolas Forquet, Marc Héran, Nicolas Roche, Gilles Belaud et Bruno Molle. Merci également à Jean-François Bonicel et Guillaume Guizard pour leur précieuse aide pour la mise en place du dispositif expérimental qui m'a permis de réaliser une bonne partie de ces recherches. Merci à Geoffrey Froment, Marine Muffat-Jeandet, François Liron, Valérie Bru-Adan, Anaïs et Gaëlle pour leur soutien

technique. Merci à Annabelle Mange également. Le ramassage des salades à 4h du matin n'a plus de secret pour nous !

Merci aux indispensables Annie, Sylvie, Nadine et Alexandra qui ont toujours répondu présentes pour aider à régler des problèmes administratifs et bien d'autres. Difficile de faire tourner la boutique sans vous.

Merci à tou(te)s les doctorant(e)s et à mes collègues de bureau : Sarah, Claire, Hélène, Aurélie, Kévin, Marie et Diane. Merci à tous, car je pense que nous serons d'accord pour dire que sans de bons collègues de bureaux (et ami(e)s), il est parfois difficile de garder les épaules à bonne hauteur. Heureusement, quand c'est comme ça, il y a le garde-manger pas loin (bonbons, chocolat et autres victuailles) ou bien une petite randonnée montage qui se profile voire un petit footing avec Julie, Noémie, Dominique et Quentin. Merci à Danielle également pour avoir réussi chaque semaine à faire en sorte que mon bureau soit le plus accueillant possible, malgré l'entassement progressif des documents.

Merci également à Audrey Bigourdan, stagiaire M2 que j'ai eu la chance d'encadrer durant cette thèse de doctorat.

Merci à ma team de master CBS : Kévin, Nadia, Anouk, Raphaël et France, CBS un jour, CBS toujours ! À mes ami(e)s Saskia, Simon, Cécile, Marie, Damien, Laurent et Iris pour leur soutien.

Et merci à ma famille, et à toi, Rachelle… enfin Nicolas, qui a accepté de devenir mon époux, il y maintenant un peu plus d'un an. Gloire à l'anneau unique !

PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS

ARTICLES SCIENTIFIQUES

Publiés :

Lequette K, Ait-Mouheb N, Wéry N. 2019. Drip irrigation biofouling with treated wastewater: bacterial selection revealed by high-throughput sequencing. Biofouling [Internet]. 35:1–13. Available from: https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/08927014.2019.1591377

Lequette K, Ait-Mouheb N, Wéry N. 2020. Hydrodynamic effect on biofouling of milli-labyrinth channel and bacterial communities in drip irrigation systems fed with reclaimed wastewater. Sci Total Environ [Internet].139778. Available from: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0048969720332988

Lequette K, Ait-Mouheb N, Adam N, Muffat-Jeandet M, Bru-Adan V, Wéry N. 2020. Effects of chlorination and pressure flushing of drippers fed by reclaimed wastewater on biofouling. Sci Total Environ. Available from : https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.143598

COMMUNICATIONS ORALES

Nationales :

Lequette K, Mange A, Ait-Mouheb N, Wéry N, Bacterial communities of biofilms developed in micro-irrigation systems supplied with treated wastewater, *Journée des Doctorants*, Ecole Doctorale GAIA-APAB, Université de Montpellier, Montpellier, France, 13 Juin 2019

Lequette K, Ait-Mouheb N, Wéry N, Biofouling of drip irrigation systems supplied by reclaimed wastewater: Effect of flow and cleaning methods, *Réseau National Biofilms*, Nancy, France, 3-4 Décembre 2019

Internationales :

Lequette K, Ait-Mouheb N, Wéry N, Microirrigation biofouling: Influence of hydrodynamic conditions on the structure and microbial communities of biofilms. *Managing water scarcity in*

river basins: Innovation & Sustainable development Globaqua, Agadir, Maroc, 4-6 Octobre 2018

Lequette K, Ait-Mouheb N, Wéry N, Drip irrigation with treated wastewater: sanitary issues of biofouling, *20th International Symposium on Health Related Water Microbiology*, Vienne, Autriche, 15-20 Septembre 2019

Lequette K, Ait-Mouheb N, Wéry N, International REUSE MUSE Workshop: Agricultural Water Reuse how to address health and environmental challenges?, *MUSE REUSE*, Montpellier, France, 2-4 Octobre 2019

COMMUNICATIONS AFFICHEES

Nationales :

Lequette K, Ait-Mouheb N, Wéry N, Biofilms en micro-irrigation alimentés avec des eaux usées traitées, *Réseau National Biofilms*, Université de Clermont-Ferrand, France, 5-6 Décembre 2017

Lequette K, Mange A, Ait-Mouheb N, Wéry N, Bacterial communities of biofilms developed in micro-irrigation systems supplied with treated wastewater, *IM2E*, Université de Montpellier, Montpellier, France, 22 Mars 2018

Lequette K, Mange A, Ait-Mouheb N, Wéry N, Bacterial communities of biofilms developed in micro-irrigation systems supplied with treated wastewater, *Journée des Doctorants*, Ecole Doctorale GAIA-APAB, Université de Montpellier, Montpellier, France, 15 Juin 2018

Internationales :

Lequette K, Ait-Mouheb N, Wéry N, Drip irrigation biofouling with treated wastewater: Influence of hydrodynamic conditions, *12th IWA International Conference on Water Reclamation and Reuse*, Berlin, Allemagne, 16-20 Juin 2019

LISTE DES ABBREVIATIONS

ADN: Acide DésoxyriboNucléique

ANSES: Agence Nationale de sécurité sanitaire, environnement et travail

BASR: Bactéries Anaérobies Sulfito-réductrices

CFD: Computational Fluid Dynamics

DCO: Demande chimique en oxygène (en anglais, COD)

EH: Equivalent Habitant

EUB: Eau usée brute (non traité)

EUT: Eau usée Traitée (en anglais, 'TWW': 'Treated wastewater' ou 'RWW': 'Reclaimed wastewater')

EPS: Extracellular Polymeric Substance

LOD: Limit Of Détection

LOQ: Limit Of Quantification

MES: Matière en suspension (en anglais, TSS: Total suspended solids)

NPP: Nombre le Plus Probable (en anglais, MPN: Most Probable Number)

OMS: Organisation Mondiale de la Santé (en anglais, WHO: World Health Organization)

PLFAs: Phospholipid-derived fatty acids

ppm: partie par million

q-PCR: PCR quantitative

REUT: Réutilisation des Eaux Usées Traitées

TCO: Tomographie en Cohérence Optique (en anglais, OCT: Optical Coherence Tomography)

TABLE DES FIGURES

Introduction

Figure 1. Nombre de mois par an sous stress hydrique. 333

Figure 2. Prévisions des zones touchées par le stress hydrique en 2040. 344

Figure 3. Surface agricole irriguée avec des eaux usées par pays (en milliers d'ha). 355

Figure 4. Cartographie des projets de réutilisation des eaux usées en France. 366

Figure 5. Principaux pathogènes rencontrés dans les eaux usées et principaux indicateurs microbiologiques de contamination. 544

Figure 6. Irrigation de surface. L'eau s'écoule librement sous l'action de la gravité. 60

Figure 7. Irrigation par aspersion. 611

Figure 8. Micro-irrigation en goutte-à-goutte. 622

Figure 9. Exemple de types de goutteur. 633

Figure 10. Catégories des goutteurs. 644

Figure 11. Variation du débit en fonction de la pression pour des goutteurs avec différents x 655

Figure 12. Simulation numérique (modèle k–ε) de la distribution de la pression (mH2O) de l'écoulement dans des canaux de forme rectangulaire, trapézoïdale et triangulaire. 66

Figure 13. Simulation numérique (modèle k–ε) de la distribution de la vitesse ($m.s^{-1}$) de l'écoulement dans des canaux partiels dans des canaux de forme rectangulaire, trapézoïdale et triangulaire. 666

Figure 14. Colmatage physique dans les goutteurs. 70

Figure 15. Précipitation chimique en sortie de conduite. 71

Figure 16. Goutteur colmaté par un biofilm. 722

Figure 17. Étapes de formation d'un biofilm bactérien. 793

Figure 18. Illustration schématique des différents paramètres influençant l'adhésion bactérienne et le développement des biofilms. 822

Figure 19. Évolution du colmatage au cours du temps (A) et de l'épaisseur du biofilm dans un millicanal observés en Tomographie en Cohérence Optique (OCT) (B). 833

Figure 20. Micrographies au microscope électronique à balayage du biofilm développé dans une conduite d'irrigation alimentée avec des eaux traitées. 877

Figure 21. Voies d'élimination des pollutions organique, azotée et phosphorée par lagunage .933

Matériels et Méthodes

Figure 22. Schéma bilan des différentes expérimentations réalisées pendant la thèse. 999

Figure 23. Schéma de la station d'épuration des eaux usées de la commune de Murviel-les-Montpellier. 100

Figure 24. Goutteurs utilisés. 1055

Figure 25. Conception des dispositifs 'goutteur' permettant l'accès optique. 1077

Figure 26. Banc d'essai utilisé pour les expérimentations 'Écoulement' et 'Nettoyage'. 108

Figure 27. Goutteur utilisé pendant l'expérimentation Parcelle. 1100

Figure 28. Schéma d'alimentation du banc d'essai lors de l'expérimentation sous serre. 1111

Figure 29. Techniques permettant d'étudier la structure des biofilms à différentes échelles. 1133

Figure 30. Schéma du principe de la tomographie à cohérence optique. 1155

Figure 31. Schéma du canal des goutteurs. 1166

Figure 32. Processus de traitement des données OCT du biofilm dans les goutteurs. 1177

Figure 33. Principe du séquençage Illumina. 12020

Figure 34. Chimies de détection pour la qPCR : (A) SYBR Green et (B) TaqMan. 1255

Chapitre 1: Expérimentation 'Qualité'

Figure 35. Débit moyen (et erreur-type) selon le type d'effluent utilisé. _ **Erreur ! Signet non défini.**8

Figure 36. Quantification du nombre de copies du gène codant pour l'ARNr 16S au cours du temps dans A) l'eau de la lagune, B) les biofilms des goutteurs et C) l'eau sortant des goutteurs. 13939

Figure 37. PCoA des communautés bactériennes des effluents et des goutteurs alimentés en EUB et EUT. 1411

Figure 38. Heatmap des genres majoritaires présents dans les effluents (A) et dans les biofilms des goutteurs (B). 1444

Figure 39. Concentration des bactéries (16S ADNr), d'*Enterococcus* spp. (23S ADNr), *E. coli* (*iudA*), *P. aeruginosa* (*regA*) et *A. hydrophila* (*aha1*) par unité de volume ou par goutteur au cours du temps dans A) l'eau de la lagune, B) les biofilms des goutteurs et C) l'eau sortant des goutteurs. 1477

Chapitre 2: Expérimentation 'Parcelle' (Article publié)

Figure 1. Online drippers used in the current study. 158

Figure 2. Evolution of the flow rate from drippers after 81 days. 161

Figure 3. Mean relative abundance according to the habitat. 162

Figure 4. PCoA ordination plot of bacterial diversity of pipe biofilms, dripper biofilms and, TWW samples. 163

Figure 5. Relative abundance of genera containing pathogenic species in pipe and dripper biofilms. 164

Chapitre 3: Expérimentation 'Écoulement'

Partie 1 **(Article publié)**

Figure 1. Dripper system and the test bench. 177

Figure 2. Schematic diagram of the geometric channel from the drippers. 178

Figure 3. Mean flow rate according to the dripper type. 179

Figure 4. Biofilm thickness measured using OCT at the inlet of the 1, 2 and 4 $l.h^{-1}$ after 1 and 4 months. 180

Figure 5. Relative abundance of bacterial phyla in dripper biofilms and in reclaimed wastewater. 182

Figure 6. PCoA ordination plot of bacterial communities found in 1, 2 and 4 $l.h^{-1}$ dripper biofilms after 32, 72 and 115 days. 183

Partie 2

Figure 40. Abondances relatives des principaux genres incluant des espèces bactériennes pathogènes dans l'effluent de la lagune alimentant le banc d'essai (A) et dans les biofilms des goutteurs (B). 1922

Figure 41. PCoA des sous-communautés bactériennes des biofilms regroupant les genres avec des espèces pathogènes à 32 jours (A), 72 jours (B) et 115 jours (C). 1954

Figure 42. Concentration des bactéries (ADNr 16S), d'*Enterococcus* spp. (23S ADNr), *E. coli* (*iudA*), *P. aeruginosa* (*regA*) et *A. hydrophila* (*aha1*) dans la lagune (A) et dans les biofilms des goutteurs (B). 1977

Chapitre 4: Expérimentation 'Nettoyage'

Partie 1 **(Article publié)**

Figure 1. Dripper system and the test bench. 211

Figure 2. Discharge ratio variation according to the cleaning procedure used. _____ 218

Figure 3. Evolution over time of the biofilm volume according to the cleaning method used. _____ 219

Figure 4. Biofilm thickness at the inlet of drippers under C (Control), PF (Pressure flushing), Cl (Chlorination) and PFCl (Pressure flushing/Chlorination) conditions measured after 3, 10 and 15 weeks. _____ 220

Figure 5. Means and standard deviation of pixels associated with biofouling in the middle and on the edges of the inlet dripper channel after 10 weeks of treatment. _____ 221

Figure 6. Evolution of the bacterial quantity by dripper according to the cleaning method used and the biofilm volume. _____ 222

Figure 7. Principal coordinate analysis (PCoA) of microbial communities from dripper biofilms at genus level. _____ 225

Figure 8. Relative abundance of bacterial phyla in dripper biofilms over time and in reclaimed wastewater. _____ 226

Figure 9. Heat map of bacterial genera from dripper biofilms._____ 229

Partie 2

Figure 43. Relation entre la diversité la communauté bactérienne globale et la diversité de la sous-communauté des genres incluant des espèces pathogènes pendant la période de traitement. _____ 238

Figure 44. PCoA des communautés bactériennes des genres contenant des espèces pathogènes des biofilms à 29 et 71 jours._____ 239

Figure 45. Concentration des bactéries (ADNr 16S), d'*Enterococcus* spp. (ADNr 23S), *E. coli* (*iudA*), *P. aeruginosa* (*regA*) et *A. hydrophila* (*aha1*) dans l'effluent de la lagune (A) et dans les biofilms des goutteurs (B). 245

Figure 46. Concentration des bactéries (ADNr 16S), d'*Enterococcus* spp. (23S ADNr), *E. coli* (*iudA*), *P. aeruginosa* (*regA*) et *A. hydrophila* (*aha1*) dans l'effluent de la lagune en sortie de goutteur non chloré et chloré pendant la période de traitement. 247

TABLE DES TABLEAUX

Introduction

Tableau 1. Impacts environnementaux potentiels de l'irrigation avec des eaux usées traitées _____ .40

Tableau 2. Principaux pathogènes d'origine entérique retrouvés dans les eaux usées. _____ 45

Tableau 3. Pathogènes opportunistes retrouvés dans les eaux usées. _____ 50

Tableau 4. Paramètres décrivant les niveaux de qualité des eaux usées traitées pour la réutilisation des eaux résiduaires urbaines traitées, en fonction des usages (Réglementation française, Arrêté du 25 Juin 2014). _____ 555

Tableau 5. Degrés de risque de colmatage associés à différents constituants des eaux usées traitées. _____ 744

Tableau 6. Composition des biofilms._____ 788

Tableau 7. Récapitulatif des paramètres et kits utilisés. _____ 101

Tableau 8. Abattement des organismes pathogènes et indicateurs dans les systèmes de bassins de stabilisation. _____ 1033

Matériels et Méthodes

Tableau 9. Réactions enzymatiques impliquées dans les tests Idexx Colilert-18 (coliformes et *E. coli*) et Enterolert-E (entérocoques)._____ **Erreur ! Signet non défini.**4

Tableau 10. Paramètres des goutteurs. _____ 1066

Tableau 11. Paramètres des goutteurs utilisés (Expérimentation ‘Parcelle’). 1100

Tableau 12. Oligomères utilisés pour les séquençages. 1233

Tableau 13. Systèmes de qPCR utilisés. 1277

Chapitre 1: Expérimentation 'Qualité'

Tableau 14. Caractéristiques physico-chimiques des eaux usées brutes (EUB) et des eaux usées traitées (EUT). 137

Tableau 15. Estimation des indices de richesse et de diversité dans les biofilms des goutteurs alimentés avec EUB et EUT au cours du temps. 14040

Tableau 16. Estimation des indices de richesse et de diversité dans les biofilms des goutteurs alimentés avec EUB et EUT au cours du temps. 14045

Chapitre 2: Expérimentation 'Parcelle' (Article publié)

Table 1. Physico-chemical characteristics of the treated wastewater. 147

Table 2. Species richness estimates and diversity indices in dripper, pipe and treated wastewater. 161

Table 3. Most abundant bacteria for each habitat. 160

Table 4. Bacterial populations that contribute the most to explaining differences among samples. 163

Chapitre 3: Expérimentation 'Écoulement'

Partie 1 **(Article publié)**

Table 1. Dripper parameters. 176

Table 2. Physico-chemical characteristics of the RWW. _____ 177

Table 3. DNA concentration and quantification of acteria by qPCR in dripper biofilms. __ 181

Table 4. Estimated species richness and diversity indices according to the dripper flow rate and the RWW. _____ 14781

Partie 2

Tableau 17. Indices de richesse et de diversité des genres incluant des espèces pathogènes. _____ 1909

Tableau 18. Diversité des espèces de légionelles présentes dans les biofilms des goutteurs après 115 jours dans les 1 et 2 $l.h^{-1}$. _____ 1954

Chapitre 4: Expérimentation 'Nettoyage'

Partie 1 **(Article soumis)**

Table 1. Dripper parameters. _____ 211

Table 2. Physico-chemical and microbiological characteristics of the RWW. _____ 212

Table 3. Analysis and sampling schedule. _____ 214

Table 4. Richness and diversity indices according to the cleaning method. _____ 223

Partie 2

Tableau 19. Indices de richesse et de diversité des genres incluant des espèces pathogènes. _____ 2376

Tableau 20. Abondances relatives des OTUs dominants (>0,1% de la communauté globale) dans les biofilms des goutteurs et dans la lagune. _____ 241

Tableau 21. Diversité des espèces de légionnelles présentent dans les biofilms des goutteurs après 71 jours de traitement. _____ 243

TABLE DES ÉQUATIONS

Équation 1. Cacul de l'efficience des systèmes d'irrigation. _____ 59

Équation 2. Calcul du débit. _____ 64

Équation 3. Détermination de l'exposant. _____ 64

Équation 4. Calcul de la concentration en MES. _____ 101

Équation 6. Calcul du Nombre de Reynolds. _____ 105

Équation 7. Calcul du diamètre hydraulique. _____ 106

Équation 8. Calcul du volume de biofilm. _____ 117

INTRODUCTION : DE LA RAREFACTION DE L'OR BLEU A L'OPTIMISATION DE L'UTILISATION DES EAUX USEES TRAITEES ET AUX PROBLEMES DE COLMATAGE DES SYSTEMES D'IRRIGATION

I. DU STRESS HYDRIQUE À LA RÉUTILISATION DES EAUX USÉES

A. Raréfaction de l'or « Bleu »

Les questions associées à la consommation et à la disponibilité de la ressource en eau douce augmentent dramatiquement dans de nombreuses parties du monde. Dès les années 2000, plusieurs régions arides et semi-arides affichaient leur vulnérabilité et souffraient de stress hydrique, voire étaient déjà en situation de pénurie (ex. Afrique saharienne, Afrique Australe, Moyen-Orient, Asie Centrale, l'Inde, etc.) (Ait-Mouheb *et al.*, 2020 ; WWAP, 2017). Pour autant, le stress hydrique touche également des zones moins soumises à la sécheresse (Figure 1). À l'heure actuelle, un peu moins de la moitié de la population mondiale, soit 3,6 milliards de personnes (≈47 %), vit dans des régions qui souffrent de pénurie d'eau au moins un mois par an (Mekonnen and Hoekstra, 2016; World Water Assessment Programme, 2018). En Europe, cela concerne principalement le bassin méditerranéen (Ait-mouheb *et al.*, 2020). La raréfaction de l'eau douce est liée à plusieurs facteurs tels que l'hétérogénéité de répartition de la ressource, l'augmentation de la population ainsi que de la demande alimentaire (Becerra-Castro *et al.*, 2015) et s'aggravera dans les années à venir en réponse aux changements climatiques (UNESCO World Water Assessment Programme, 2020) (Figure 2).

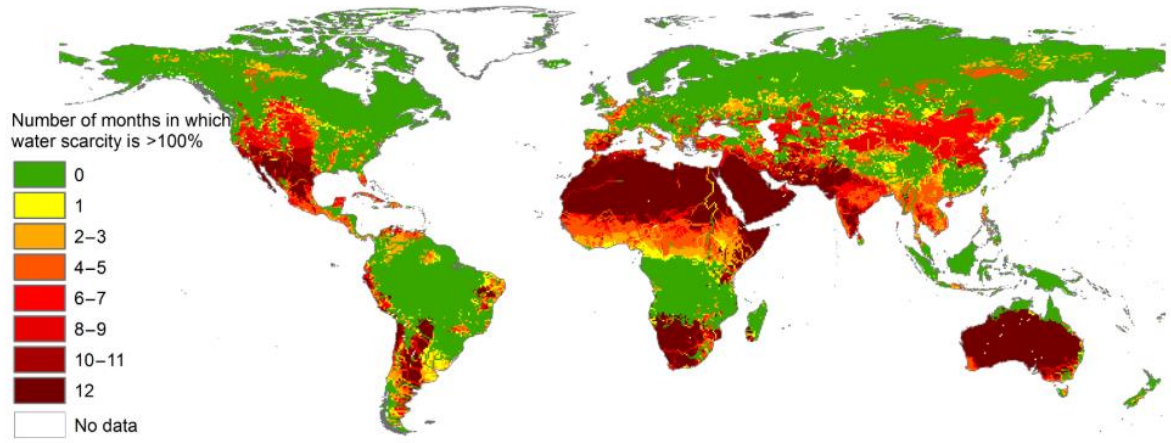


Figure 1 Nombre de mois par an sous stress hydrique (Mekonnen and Hoekstra, 2016)

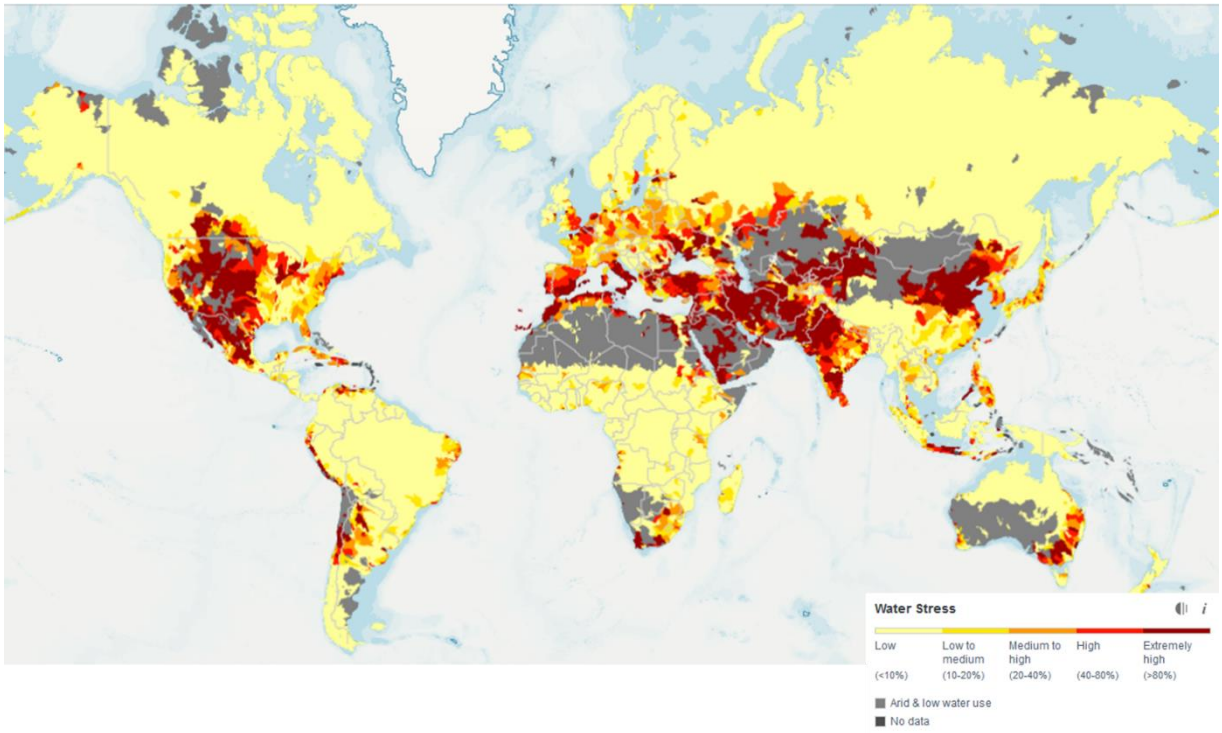


Figure 2 Prévisions des zones touchées par le stress hydrique en 2040 (https://www.wri.org/applications/aqueduct)

Les principaux consommateurs de l'eau sont les secteurs de l'industrie, les usages domestiques et l'irrigation pour l'agriculture. L'agriculture représente près de 70 % de la consommation, voire 90 % dans certains cas (FAO, 2013; Kalavrouziotis and Koukoulakis, 2011). Ensemble, la consommation de ces trois domaines d'activité est de 4600 km^3 d'eau par an, un chiffre qui devrait augmenter de 20 à 30 % d'ici 2050 et qui sera supérieur aux capacités de renouvellement des réserves (UNDP, 2006). Cette augmentation se fera conjointement à l'augmentation de la population mondiale qui devrait atteindre entre 9,4 et 10,2 milliards de personnes ainsi qu'à celle des besoins alimentaires qui augmenteront de près de 60 % (World Water Assessment Programme, 2018).

Dans ce contexte marqué à la fois par la menace d'une crise alimentaire mondiale (et donc potentiellement par une incitation à étendre les surfaces irriguées) et par une réduction inquiétante des ressources en eau disponibles dans un nombre croissant de pays, l'usage économe de l'eau dans l'agriculture ne peut donc pas être surestimé. Ainsi, face à la raréfaction de la ressource, il apparaît nécessaire de trouver des solutions afin de maintenir l'activité du secteur pour répondre aux besoins. Plusieurs pays se sont tournés, à des degrés divers, vers la réutilisation des eaux usées pour l'irrigation tels que la Jordanie, Israël, l'Italie, l'Espagne, les

États-Unis ou la France (Aquarec, 2007 ; Drechsel *et al.*, 2011 ; EPA, 2012 ; JRC, 2017 ; Kalavrouziotis *et al.*, 2015 ; Kellis *et al.*, 2013 ; Pedrero *et al.*, 2010), pour limiter la pénurie, préserver la ressource naturelle et contribuer à la gestion intégrée de l'eau. Actuellement, on estime que 36 millions d'hectares dans le monde (environ 12 % des terres irriguées) reçoivent des eaux usées urbaines ; cependant, seulement 15 % environ de cette eau sont considérées comme traitées de manière adéquate (Thebo *et al.*, 2017, 2014, Figure 3).

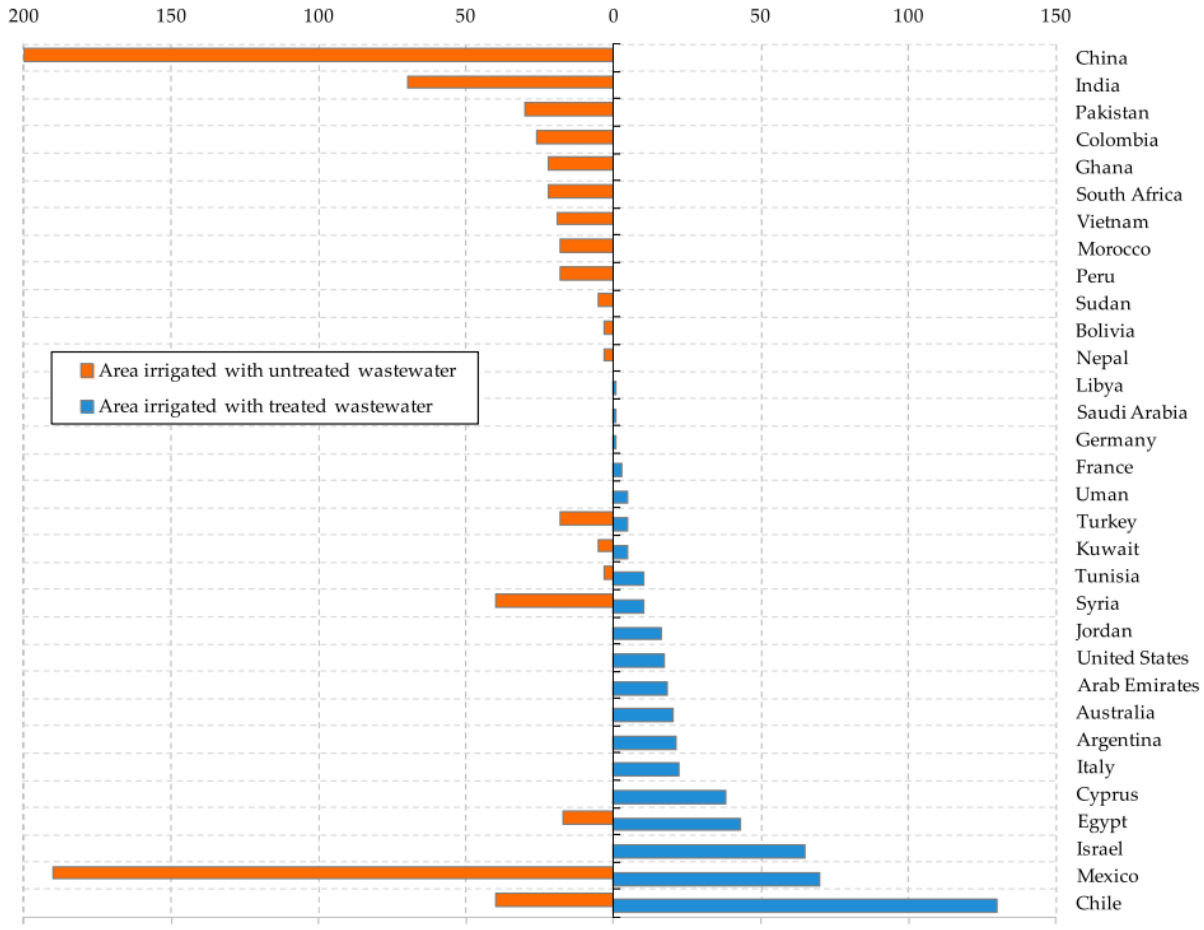


Figure 3 Surface agricole irriguée avec des eaux usées par pays (en milliers d'ha) (Jimenez and Asano, 2015)

Certains pays sont considérés comme des pionniers pour la réutilisation des eaux usées traitées. Par exemple, en Jordanie, l'utilisation des eaux usées traitées pour l'irrigation est pratiquée depuis les années 90 (Al-Nakshabandi *et al.*, 1997) et peut représenter plus de 90 % des ressources en eau pour l'irrigation (Qdais *et al.*, 2019). En France, on estime qu'en 2014, le volume quotidien moyen d'eaux usées réutilisées était estimé à 19 200 m^3 ce qui représente

environ 0,1 % du total des eaux usées produites et moins de 0,3 % de toute l'eau utilisée pour l'irrigation (Ait-mouheb *et al.*, 2020). Même si ce volume paraît négligeable, l'utilisation des eaux usées traitées en France a montré ses bénéfices dans le cas d'irrigation de golf et des espaces verts à Les Mathes St-Palais (2008) ou à Fort-Mahon plage (1992). On peut également citer les cultures d'olivier sur l'île de Porquerolles ou de produits AOP irriguées avec des eaux usées traitées comme la pomme de terre sur les îles de Ré, de Noirmoutier, ou d'Oléron. Pionnière de la réutilisation des eaux usées traitées pour l'irrigation, l'Asa (Association syndicale autorisée) Limagne noire irrigue dans la région de Clermont-Ferrand, depuis 1996, 750 ha de cultures avec des eaux usées traitées. Ainsi, on constate une augmentation des projets de réutilisation des eaux usées (Figure 4), principalement au niveau du bassin méditerranéen et proche de la côte Atlantique qui sont les zones les plus touchées par le manque d'eau en période estivale. Avant 2000, la motivation pour entreprendre un projet de REUT était principalement pour éviter des rejets en milieu sensible. À présent, on constate de plus en plus une volonté de maximiser l'utilisation de l'eau avant le rejet en milieu naturel (p. ex. orienter l'eau traitée pour un usage agricole ou de voirie) et de réserver l'eau potable pour un usage eau potable.

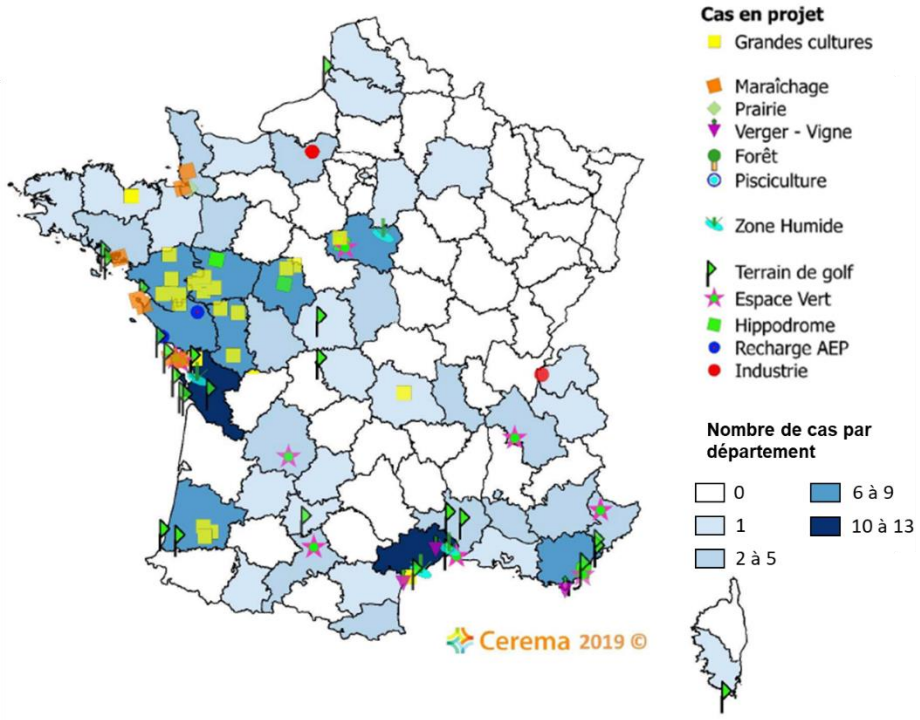


Figure 4 Cartographie des projets de réutilisation des eaux usées en France[1] (Source: Cerema 2019)

[1] https://www.cerema.fr/system/files/documents/2020/02/ceremace_reut_cgle21.pdf

B. Utilisation des eaux usées traitées en irrigation

Les eaux usées sont de plus en plus vues comme une partie de la solution au manque d'eau pour l'agriculture. Les eaux usées sont générées par diverses activités humaines (domestiques, industrielles, abattoirs, établissements commerciaux, etc.) et sont ensuite dirigées vers une station de traitement dans le but de répondre à des normes de qualité. Après traitement dans la station d'épuration, incluant des traitements de désinfection complémentaires si besoin, les eaux usées traitées utilisées pour l'irrigation vont apporter de l'eau et des nutriments aux cultures. Dans cette partie, les apports et les impacts potentiels liés à l'utilisation des eaux usées traitées en agriculture sont présentés. Puis, les aspects réglementaires de l'utilisation de ces eaux sont abordés.

1. Apports de l'irrigation avec des EUT

Le principal avantage de la REUT tient dans le fait que la ressource est disponible tout au long de l'année avec toutefois des variations en matière de charge. Les eaux usées traitées sont principalement composées de particules et de matières organiques dissoutes ainsi que des macros- (N, P, K) et micronutriments (Na, Ca, Mg, Cl et B) (Barreto *et al.*, 2013; Qadir *et al.*, 2007; Varela and Manaia, 2013). L'utilisation de l'eau usée traitée peut alors permettre d'assurer voire augmenter le rendement surtout dans les régions touchées par le stress hydrique (Keraita *et al.*, 2008 ; Lal *et al.*, 2013 ; Marinho *et al.*, 2014, 2013 ; Matheyarasu *et al.*, 2016). Elle permet également d'améliorer les propriétés physico-chimiques du sol notamment par l'apport de matières fertilisantes (azote, phosphore) (Kiziloglu *et al.*, 2007), de limiter son appauvrissement, et de réduire l'utilisation d'engrais (Abusam and Al-anzi, 2011 ; Almuktar *et al.*, 2015 ; Corcoran *et al.*, 2010 ; Drechsel *et al.*, 2011 ; Khurana and Singh, 2012 ; Plauborg *et al.*, 2010 ; Sato *et al.*, 2013). Par exemple, Cirelli *et al.* (2012) ont montré que les eaux usées traitées pouvaient être utilisées sans apport de fertilisants sur les champs en Méditerranée et autres zones arides/semi-arides soumis aux déficits en eau et ont obtenu un rendement supérieur (environ 20 %) pour la culture des tomates avec des eaux usées comparées à l'eau de surface. Alkhamisi *et al.*, (2011) ont également observé que les rendements sur les plants de culture de maïs étaient plus élevés lors de l'irrigation avec des eaux usées traitées (3,65 kg/m^3 de matière sèche) que celles irriguées avec l'eau douce (2,91 kg/m^3 de matière sèche). Il y a d'autres avantages : production agricole moins sujette aux aléas climatiques, réduction de la pression

sur les eaux de bonne qualité (Bixio and Wintgens, 2006; Candela *et al.*, 2007; Toze, 2006), etc.

L'utilisation des eaux usées traitées a aussi des avantages économiques (Hidalgo and Irusta, 2005; Loubier and Declercq, 2014; Stefania *et al.*, 2017; Tran *et al.*, 2016). Par exemple, Loubier et Declercq, (2014) ont montré que l'utilisation des eaux usées traitées au lieu de l'eau de surface pour l'arrosage des golfs demandait un investissement de 2 millions d'euros pour la mise en place d'un système de traitement, mais qu'une économie de 5,9 millions d'euros était réalisée en ce qui concerne l'entretien des golfs (p. ex. approvisionnement en eau, utilisation en tant que fertilisant). Stefania *et al.*, (2017) ont réalisé une analyse coût-bénéfice de l'utilisation des eaux usées traitées pour l'irrigation à Puglia (Sud de l'Italie) et ont montré que cela permettrait d'augmenter de 60 million de m^3 d'eau par an, soit près de 10 % de la demande en eau globale, réduisant ainsi la pression et les prélèvements d'eau souterraine ou de surface.

2. Risques associés à l'utilisation des EUT

Les principaux risques liés à la réutilisation des eaux usées traitées pour l'irrigation peuvent être classés en trois catégories :

- Risques sanitaires
- Risques agronomiques
- Risques environnementaux

Les impacts potentiels sur l'environnement sont décrits dans le Tableau 1. Bien que les eaux usées traitées contiennent de la matière organique et inorganique favorable au développement des cultures, des concentrations trop élevées peuvent devenir nuisibles et altérer la physico-chimie du sol (Becerra-Castro *et al.*, 2015 ; Marinho *et al.*, 2014) ainsi que la vie microbienne du sol (Habteselassie *et al.*, 2013; Henze and Comeau, 2008). Le pH, la salinité, la matière organique (p. ex. concentrations en azote et phosphore trop élevées), les éléments traces, les métaux lourds et des micropolluants organiques sont autant de paramètres pouvant altérer l'état du sol (ex. salinité, capacité d'infiltration, compaction du sol), sa vie microbienne, mais aussi les plantes et le rendement de la culture (Jaramillo and Restrepo, 2017; Kalavrouziotis and Koukoulakis, 2011) (Tableau 1). En ce qui concerne les sels, dans des conditions arides ou semi-arides, ils peuvent s'accumuler dans la zone des racines en raison de l'absence de lessivage qui se produit lorsque les précipitations hivernales dépassent la capacité de rétention

d'eau du sol. Avec le temps, l'absence de lixiviation peut avoir des effets néfastes sur l'activité biologique et chimique du sol et donc sur le rendement des cultures. Concernant les polluants organiques, il ne faut pas oublier que les plantes peuvent aussi assurer un rôle de traitement supplémentaire de certains polluants par phytotransformation. La phytotransformation, également appelée phytodégradation, est la décomposition des composés organiques soit par des processus métaboliques des plantes, soit par des enzymes produites par les plantes (Singh *et al.*, 2018).

Les impacts sanitaires sont liés pour l'essentiel à la présence de microorganismes pathogènes et la réglementation est axée principalement sur la maîtrise du risque microbiologique. Globalement, la majeure partie des études visant à évaluer le risque sanitaire de l'utilisation des eaux usées traitées pour l'irrigation ciblent les bactéries. Pour autant, ces eaux usées contiennent également des virus et des protozaires qui peuvent réprésenter un risque pour la santé humaine. La présence de Composés Traces Organiques ou micropolluants chimiques peut également affecter la santé humaine. Effectivement, plusieurs études montrent que l'irrigation des eaux usées traitées constitue une voie par laquelle les produits pharmaceutiques par exemple peuvent entrer, et devenir omniprésents dans les systèmes agricoles. Ces composés peuvent s'accumuler dans les plantes, le bétail et la faune représentant ensuite un risque pour la santé des cultures et humaine (Carter *et al.*, 2019). Ils peuvent également favoriser le développement de l'antibiorésistance (Piña *et al.*, 2020) en favorisant le transfert de gène de résistance *(*Hong *et al.*, 2018).

La présence de nutriments, de particules solides ou de sels dans les eaux usées augmente les risques de colmatage (physique, chimique et biologique) des systèmes d'irrigation (Bounoua *et al.*, 2016 ; Gamri *et al.*, 2014 ; Rizk *et al.*, 2017). Ce colmatage peut rapidement entraîner une diminution significative des performances des systèmes de distribution (Bounoua *et al.*, 2016 ; Oliveira *et al.*, 2017) et augmenter les coûts de maintenance. Ces informations sont rarement prises en considération lors de la conception et l'installation des équipements (système d'irrigation, dispositif de filtration, etc.) ou dans les protocoles de maintenance des systèmes d'irrigation (par chloration ou acidification) (Ait-mouheb *et al.*, 2020). Ceci se traduit alors par une perte rapide d'investissements et de subventions pour l'installation de systèmes d'irrigation ou par le remplacement et l'utilisation massive de dispositif de distribution (ex. goutteurs jetables).

Tableau 1 Impacts environnementaux potentiels de l'irrigation avec des eaux usées traitées

Constituant	Paramètres mesurés	Motifs de préoccupation	Effets sur le sol		
			Propriétés physico-chimiques et biochimiques du sol	**Microbiologie du sol**	**Références**
Matières en suspension	Matières en suspension (MES),	Les MES peuvent entraîner le développement de dépôts de boues conduisant à des conditions anaérobies dans le milieu aquatique. Des quantités excessives de solides en suspension provoquent le colmatage et des systèmes d'irrigation.	• Réduction de la conductivité hydraulique du sol • Réduction de la porosité du sol • Favorise la compaction des sols	• Augmente les risques de persistance de pathogènes	(Chahal *et al.*, 2016; Ragusa *et al.*, 1994; Vinten *et al.*, 1983)
Matière organique	Demande Biochimique en Oxygène, Demande Chimique en Oxygène	La décomposition biologique peut entraîner l'épuisement de l'oxygène dissous dans les eaux réceptrices et le développement de conditions septiques.	• Altère l'agrégation et la stabilisation de la structure du sol • Diminution de la rétention de l'eau • Modifie le contenu en nutriments (N, P et K) • Capacité d'échange cationique • Augmente la disponibilité des contaminants organiques et inorganiques	• Pression de sélection sur la communauté du sol • Activité enzymatique	(Lauber *et al.*, 2009; Smit *et al.*, 2001; Sun *et al.*, 2014; Torsvik and Øvreås, 2002)
Nutriments	Azote, Phosphore, Potassium	Lorsqu'ils sont rejetés dans le milieu aquatique, l'azote et le phosphore peuvent entraîner la croissance d'une vie aquatique indésirable. Lorsqu'il est rejeté en quantités excessives sur les sols, l'azote peut également entraîner la pollution des eaux souterraines.	• Modification de la fertilité du sol • Cycle N, P K • Lessivage vers les eaux souterraines/surface et risques de contamination (eutrophisation)	• Déséquilibre des communautés microbiennes du sol • Modification de l'activité microbienne	(DeForest *et al.*, 2004; Habteselassie *et al.*, 2013; Haynes and Naidu, 1998; Ramirez *et al.*, 2012; Swathi A. *et al.*, 2013; Wu, 1999; Zörb *et al.*, 2014)

Tableau 1 Impacts environnementaux potentiels de l'irrigation avec des eaux usées traitées (Suite)

Constituant	Paramètres mesurés	Motifs de préoccupation	Effets sur le sol		
			Propriétés physico-chimiques et biochimiques du sol	Microbiologie du sol	Références
Composés organiques stables (réfractaires)	Composés spécifiques (par exemple, phénols, pesticides, hydrocarbures chlorés, résidus pharmaceutiques)	Certains composés organiques sont résistants aux méthodes conventionnelles de traitement des eaux usées et toxiques pour l'environnement.	• Accumulation et lessivage • Fertilité du sol • Contamination des produits de culture	• Modification des Communautés microbiennes • Augmente la tolérance microbienne aux contaminants et/ou biodégradation • Favorise l'antibiorésistance	(Chee-Sanford *et al.*, 2009; Correa *et al.*, 2010; Ding and He, 2010; Fahrenfeld *et al.*, 2013; Sánchez-Peinado *et al.*, 2010; Swartjes, 2011)
Ions hydrogène	pH	Le pH des eaux usées affecte la solubilité des métaux ainsi que l'alcalinité des sols. La plage normale de pH dans les eaux usées municipales est de 6,5 à 8,5, mais la présence de déchets industriels peut modifier le pH de manière significative.	• Disponibilités en nutriments et éléments traces • Minéralisation de la matière organique • Réduction de la capacité d'échange cationique	• Modification de la richesse et de la diversité microbienne	(Fierer and Jackson, 2006; Lauber *et al.*, 2009; Rousk *et al.*, 2010; White and Greenwood, 2013)
Métaux lourds	Éléments spécifiques (par exemple, Cd, Zn, Ni, Hg)	Certains métaux lourds s'accumulent dans l'environnement et sont toxiques pour les plantes et les animaux.	• Accumulation dans les sols • Transfert vers les plantes	• Réduction de l'activité microbienne et enzymatique • Modification des communautés microbiennes des sols	(Chu, 2018; Lal *et al.*, 2013; Sridhara Chary *et al.*, 2008)

Tableau 1 Impacts environnementaux potentiels de l'irrigation avec des eaux usées traitées (Suite)

Constituant	Paramètres mesurés	Motifs de préoccupation	Effets sur le sol		
			Propriétés physico-chimiques et biochimiques du sol	**Microbiologie du sol**	**Références**
Substances inorganiques dissoutes	Conductivité (salinité), éléments spécifiques (par exemple, Na, Ca, Mg, Cl, B)	Une salinité excessive peut endommager certaines cultures. Des ions spécifiques tels que le chlorure, le sodium, le bore sont toxiques pour certaines cultures. Le sodium peut poser des problèmes de perméabilité du sol.	• Salinisation — Sodification des sols • Diminue la structure et la stabilité du sol • Augmente la compaction des sols (imperméabilisation) • Modifie le pH du sol • Diminue la fertilité des sols • Lessivage des métaux	• Modification de la diversité et de l'activité microbienne	(Ayers and Wescot, 1976; Lauber *et al.*, 2009; Rietz and Haynes, 2003; Smit *et al.*, 2001; Urbano *et al.*, 2017; Wong *et al.*, 2008)
Chlore résiduel	Chlore libre et combiné	Une quantité excessive de chlore libre disponible (> 0,05 $mg.l^{-1}$ Cl_2) peut endommager certaines cultures sensibles. Cependant, la majorité du chlore présent dans les eaux usées récupérées est sous une forme combinée non dommageable pour les cultures. Certaines préoccupations sont exprimées concernant la contamination des eaux souterraines.	• Réduis la croissance des plantes	• Modification de la structure et diminution des activités enzymatiques microbiennes du sol	(Lonigro *et al.*, 2017; Song *et al.*, 2019a)

Les eaux usées contiennent un grand nombre de microorganismes dont certains peuvent être pathogènes : bactéries, virus, protistes et helminthes (EPA, 2012; Ibekwe and Murinda, 2019; Rusiñol *et al.*, 2020b). Les pathogènes entériques sont présents dans les matières fécales et peuvent conduire à des contaminations de l'homme ou de l'animal (zoonoses). Un pathogène est un microorganisme qui cause une maladie à l'hôte. Le tableau 2 présente les principaux pathogènes d'origine intestinale (ou entérique) rencontrés dans les eaux usées. Les pathogènes rencontrés dépendent de l'état sanitaire du pays considéré et des filières de traitements des rejets urbains. La principale voie d'exposition aux pathogènes, dans le contexte de la réutilisation des eaux usées, inclut l'ingestion ou le contact avec les eaux usées traitées par le vecteur main-bouche (Adegoke *et al.*, 2018; EPA, 2012). L'utilisation des eaux usées pose donc des questions sanitaires puisqu'elles sont généralement considérées comme hébergeant divers agents pathogènes humains, et les rejets dans le milieu naturel peuvent présenter des risques d'exposition directe ou indirecte (EPA, 2012; Ibekwe and Murinda, 2019; Rusiñol *et al.*, 2020). La comparaison des estimations issues d'analyses quantitatives des risques microbiens et d'études épidémiologiques a suscité des inquiétudes concernant les risques sanitaires liés à l'irrigation des eaux usées (Hamilton *et al.*, 2018; Mara *et al.*, 2007). De nombreux rapports étaient principalement axés sur les indicateurs fécaux tels que les coliformes fécaux et *Escherichia coli* pour évaluer les risques potentiels pour la santé, négligeant les bactéries pathogènes, les virus et les groupes de protozoaires (De Giglio *et al.*, 2017; Rusiñol *et al.*, 2020; Seto *et al.*, 2016). Park *et al.*, (2012) ont identifié les facteurs de risque microbiens dans les fruits et légumes avant la récolte concernant *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* et *Escherichia coli* O157:H7 à travers l'étude de la littérature, et ont démontré que l'eau contaminée était un problème crucial pour la sécurité microbiologique des produits frais. Cependant, avec un niveau de traitement des eaux usées approprié, l'utilisation des EUT ne présente pas risques avérés (Jaramillo and Restrepo, 2017; Rahman *et al.*, 2018; Vivaldi *et al.*, 2013).

Certains de ces pathogènes sont dits « opportunistes » et se retrouvent également dans les eaux usées (Tableau 3). Un germe opportuniste est un agent pathogène bactérien, viral ou fongique qui profite d'un hôte dont le système immunitaire est faible comme des patients immunodéprimés[2]. La plupart du temps, ces agents pathogènes ne provoquent pas de maladie chez un individu sain dont le système immunitaire est normal. Les pathogènes opportunistes sont présents dans l'environnement et en particulier dans les environnements aquatiques et ne

[2] https://www.omicsonline.org/scholarly/opportunistic-pathogens-journals-articles-ppts-list.php

sont pas spécifiques des eaux usées traitées. Certaines espèces de légionelles sont des pathogènes opportunistes dont l'espèce la plus référencée étant *Legionella pneumophila*. Les légionelles sont recherchées dans le cadre de l'irrigation par aspersion du fait des risques d'exposition aux bioaérosols (De Giglio *et al.*, 2019; Hamilton *et al.*, 2018).

Les eaux usées peuvent également contenir des champignons, moisissures et levures, qui proviennent des fèces ou de l'environnement, et des toxines (cyanobactéries, bactéries Gram positifs) (ANSES, 2012). Ainsi, plusieurs études ont rapporté la présence de contamination des cultures irriguées avec des eaux usées traitées ou non (Amoah *et al.*, 2018; Blumenthal *et al.*, 2000; Cui and Liang, 2019; Ibekwe and Murinda, 2019; Jongman and Korsten, 2018; Park *et al.*, 2012; Vivaldi *et al.*, 2013).

La pollution des parties comestibles des plantes dépend non seulement de la qualité de l'eau, mais aussi de la quantité appliquée au sol, du type de culture et de la méthode d'irrigation (Adegoke *et al.*, 2018). L'autre voie d'exposition est par inhalation des bioaérosols contaminés par les pathogènes. L'utilisation de l'irrigation par aspersion génère des aérosols qui peuvent conduire à une contamination à la fois des cultures et des agriculteurs (Kulkarni *et al.*, 2018). Ainsi, des réglementations sont mises en place afin de définir la qualité physico-chimique et microbiologique à atteindre pour l'utilisation de ces eaux en agriculture.

Tableau 2 Principaux pathogènes d'origine entérique retrouvés dans les eaux usées

Principaux genres bactériens retrouvés dans les eaux usées (ANSES, 2012; Boutin, 2009; EPA, 2012; Ibekwe and Murinda, 2019; Narasimhan *et al.*, 2006; Numberger *et al.*, 2019; Rusiñol *et al.*, 2020b; Toze, 1997)			**Voies de contamination**	**Dose infectieuse (nb de cellules)**	**Concentrations dans les effluents urbains**		**Références**
Genres	**Espèces pathogènes**	**Maladie**			Effluent	Concentration (Log10/unité de volume)	
Bactéries							
Salmonella	*S. enterica*	Salmonellose	VOF [a]	10^4 - 10^7	EUB	1-7 (UFC/L) <4 (gc*/ml)	(Boutin *et al.*, 2009; Ibekwe and Murinda, 2019; Kothary and Babu, 2001; Lin *et al.*, 2016; Wéry *et al.*, 2008)
Shigella	*S. dysenteriae* *S. flexneri*	Dysenterie bacillaire	VOF[a]	10^1 - 10^2	EUB	1-4 (UFC /L)	(Boutin *et al.*, 2009; Cofie *et al.*, 2016; Ibekwe and Murinda, 2019; Kothary and Babu, 2001)
Escherichia	*E. coli O157:H7*	Gastro-entérite	VOF[a]	<100	EUT EUT EUB	<8 (UFC /L) <4 (gc*/ml) <8 (gc*/ml)	(Adegoke *et al.*, 2018; Cofie *et al.*, 2016; Kothary and Babu, 2001; Lin *et al.*, 2016; Park *et al.*, 2012)
Campylobacter	*C. jejuni,* *C. coli*	Gastro-entérite, syndrome de Guillain-Barré	VOF[a]	$<10^{2-3}$	EUB	<5(UFC /L) <3 (gc*/ml)	(Banting *et al.*, 2016; Boutin *et al.*, 2009; Ibekwe and Murinda, 2019; Kothary and Babu, 2001; Wéry *et al.*, 2008)

Arcobacter	*A. butzleri*, *A. cryaerophilus* *A. skirrowii*	Entérites et bactériémies	VOF[a]	-	EUB	3-4 (gc*/ ml)	(Webb *et al.*, 2016)
Bacillus	*B. weihenstephanensis*	Diarrhée	VOF[a]	10^4 - 10^9	EUB EUT	5-8 (gc*/L) 8-10 (gc*/L)	(Cui and Liang, 2019; Logan, 2012)
Enterobacter	*E. cloacae*	Infections des voies urinaires et respiratoires	VOF[a]	-	EUT		(Keller *et al.*, 1998; Orlofsky *et al.*, 2015)
Enterococcus	*E. casseliflavus*	Septicemia	VOF[a]	-	EUB	6–7,5 (UFC /L)	(Adegoke *et al.*, 2018; Choi *et al.*, 2004; Harwood *et al.*, 2001; Obayomi *et al.*, 2019a)
	E. faecalis	Endocardite, infections des voies biliaires et urinaires	VOF[a]	-	EUT	0-5 (UFC /L) <3 (NPP/100ml)	
Helicobacter	*H. pylori*	Gastrite chronique, ulcères, cancer gastrique	VOF[a]	-	EUB	<2 (gc*/ml)	(Bai *et al.*, 2016)
Klebsiella	*K. pneumoniae*	Pneumonie, infections du sang, des plaies	VOF[a] /Inhalation	10^8	EUB	5–6 (UFC)	(Podschun and Ullmann, 1998)
Yersinia	*Y. enterocolitica, Y. pseudotuberculosis*	Ulcères, Gastro-entérites	VOF[a]	-			
Vibrio	*V. cholerae*	Choléra	VOF[a]	10^3-10^8	EUB	<5 (UFC /L)	(Podschun and Ullmann, 1998)

Protozoaires							
Entamoeba	*E. histolytica, E. coli*	Amibiase	VOF[a]	1 kyste	EUB	<5 (UFC /L)	(Cofie *et al.*, 2016; Ibekwe and Murinda, 2019; Kothary and Babu, 2001; Rusiñol *et al.*, 2020)
Giardia	*G. intestinalis*	Gardiase	VOF[a]	1-100 kystes	EUB	5 (oocyste/L)	(Boutin *et al.*, 2009; Cofie *et al.*, 2016; Domenech *et al.*, 2018; Ibekwe and Murinda, 2019)
Cryptosporidium	*C. parvum* , *C. perfringens*	Cryptosporidiose, diarrhée, fièvre	VOF[a]		EUT EUT EUB	<4 (oocyste/L) <4 (gc*/ml) <4 (gc*/ml)	(Domenech *et al.*, 2018; Ibekwe and Murinda, 2019; Wéry *et al.*, 2008)
Microsporidie	*Enterocytozoon bieneusi*	Diarrhée	VOF[a]		EUT EUB		(Galván *et al.*, 2013)
Cyclospora	*C. cayetanensis*	Cyclosporose	VOF[a]		EUT EUB		(Galván *et al.*, 2013)
Toxoplasma	*T. gondii*	Toxoplasmose	VOF[a]		EUB		(Barceló, Damià, Petrovic, 2011; Percival *et al.*, 2014)

VOF[a]: voie fécale orale; gc*: copies de gene (données de qPCR); CFU: Unité Formant Colonie, EB: eau usée brute, EUT: eau usée traitée, NGS: 'Next Generation Sequencing' données issues de séquençages

Helminthes							
Ascaris	*A. lumbricoides*	Ascariose	VOF[a]	Quelques unités	EUB	<3 (oeufs /L)	(Boutin *et al.*, 2009; Cofie *et al.*, 2016; Ibekwe and Murinda, 2019)
Ancylostoma	*A. duodenale*	Ankylostomose	VOF[a]		EUB	<3 (oeufs /L)	(Cofie *et al.*, 2016; Ibekwe and Murinda, 2019)
Necator	*N. americanus*	Necatoriase	VOF[a] et contact		EUB	<3 (oeufs /L)	(Cofie *et al.*, 2016)
Toxocara sp.		Fièvre, troubles digestifs					
Strongyloides	*S. stercoralis*	Strongyloïdase	VOF[a] et contact		EUB	1 (oeufs/L)	(Hajjami *et al.*, 2012)
Schistosoma	*S. mansoni*	Infection du foie, vessie et intestins			EUB	1 (oeufs/L)	(Hajjami *et al.*, 2012)
Trichuris	*T. trichiura*	Trichuriose	VOF[a]		EUB	<2 (oeufs /L)	(Cofie *et al.*, 2016; Ibekwe and Murinda, 2019)
Taenia	*T. saginata*	Taeniose	VOF[a]	1			(Boutin *et al.*, 2009)
Enterobius	*E. vermicularis*	Enterobiose	VOF[a]				
Hymenolepis sp.		Troubles digestifs	VOF[a]				
Echinococcus	*E. granulosus*	Hydatidose	VOF[a]				

VOF[a]: voie fécale orale; gc*: copies de gene (données de qPCR); CFU: Unité Formant Colonie, EB: eau usée brute, EUT: eau usée traitée, NGS: 'Next Generation Sequencing' données issues de séquençages

Virus							
Enteroviruses (polio, echo, coxsackie)		Gastro-entérite, maladies cardiaques, méningites	VOF[a]	$<10^2$	EUB	<6 (gc*/ml)	(Boutin *et al.*, 2009; Ibekwe and Murinda, 2019; La Rosa *et al.*, 2010)
Picornavirus		Gastro-entérite	VOF[a]		EUB EUT	NGS	(Rusiñol *et al.*, 2020)
Hépatite A et E		Hépatite	VOF[a]		EUB	<4 (gc*/L)	(Masclaux *et al.*, 2013)
Adenovirus		Maladies respiratoires, gastro-entérites	VOF[a]		EUB	NGS <6 (gc*/ml)	(Haramoto *et al.*, 2007; Ibekwe and Murinda, 2019; Rusiñol *et al.*, 2020)
Rotavirus		gastro-entérites	VOF[a]		EUB	<6,5 (gc*/ml)	(Boutin *et al.*, 2009; Ito *et al.*, 2019)
Parvovirus		gastro-entérites	VOF[a]		EUB	NGS	(Rusiñol *et al.*, 2020)
Astrovirus		gastro-entérites	VOF[a]		EUB EUT	NGS 4-6 (gc*/L)	(López-Gálvez *et al.*, 2018; Rusiñol *et al.*, 2020)
Calicivirus (Norovirus, Sapovirus)		Gastro-entérites	VOF[a]		EUB EUT	<9 (gc*/ml) 4-7 (gc*/ml)	(Ibekwe and Murinda, 2019; López-Gálvez *et al.*, 2018; Rusiñol *et al.*, 2020)
Coronavirus		Gastro-entérites, maladies respiratoires	VOF[a] / inhalation		EUB	<10 (gc*/ml)	(Oliver *et al.*, 2020)

VOF[a]: voie fécale orale; gc*: copies de gene (données de qPCR); CFU: Unité Formant Colonie, EUB: eau usée brute, EUT: eau usée traitée, NGS: 'Next Generation Sequencing' données issues de séquençages

Tableau 3 Pathogènes opportunistes retrouvés dans les eaux usées

Principaux genres bactériens retrouvés dans les eaux usées (ANSES, 2012; Boutin, 2009; EPA, 2012; Ibekwe and Murinda, 2019; Narasimhan *et al.*, 2006; Numberger *et al.*, 2019; Rusiñol *et al.*, 2020b; Toze, 1997)			**Voies de contamination**	**Dose infectieuse (nb de cellules)**	**Concentrations dans les effluents**		**Références**
Genres	**Exemple d'espèces pathogènes**	**Maladie**			Effluent	Concentration (Log10/unité de volume)	
Acinetobacter	*A. baumeni*	Infections de la peau et des voies respiratoires	contact ou inhalation	10^6 - 10^8	EUT		(Rusin *et al.*, 1997)
	A. iwoffii	Infections de la peau		-	EUT	NGS	(Obayomi *et al.*, 2019b)
	A. ursingii	Bactériémie		-	EUT	NGS	(Obayomi *et al.*, 2019b; Wong *et al.*, 2017)
Aeromonas	*A. hydrophila*	Diarrhée	VOF[a]	10^{10}	EUT	3 (NPP/100ml) 5-6 (gc*/L)	(Rusin *et al.*, 1997)
Haemophilus	*H. parainfluenzae*	Endocardite, pneumonie	VOF[a]	-			(Kosikowska *et al.*, 2016)
Legionella	*L. feeleii* *L. pneumophila*	Légionellose et fièvres de Pontiac	Inhalation	-	EUT	6-7 (gc*/L) *(L. pneumophila)*	(Brissaud *et al.*, 2008; Cui and Liang, 2019; Hamilton *et al.*, 2018; Kulkarni *et al.*, 2018)
Pseudomonas	*P. aeruginosa*	Infections nosocomiales	Contact - inhalation	10^6 - 10^{10}	EUT	<4 (NPP/100ml)	(Jjemba *et al.*, 2010; Lequette *et al.*, 2019; Obayomi *et al.*, 2019b; Rusin *et al.*, 1997; Suzuki *et al.*, 2013a)

	P. alcaligenes	Bactériémie	Contact	-	EUT		(Obayomi *et al.*, 2019b)
	P. stutzeri	Infections de la peau	Contact	-	EUT		(Chahal *et al.*, 2016; Lalucat *et al.*, 2006)
Ralstonia	*R. insidiosa*	Infections nosocomiales	VOF[a] - Contact - inhalation	-	EUT		(Becerra-Castro *et al.*, 2015; Ryan and Adley, 2013)
	R. mannitolilytica	Ostéomyélite, méningite, infection cutanée	VOF[a] - Contact - inhalation	-			
	R. pickettii	Infection pulmonaire et gastro-intestinale	VOF[a] - Contact - inhalation	-			
Serratia	*S. maresens*	Infection des voies respiratoires infection du sang, des plaies, méningite		-	EUT EUB		(Ajithkumar *et al.*, 2003; Rusiñol *et al.*, 2020; Tanaka *et al.*, 2004)
Staphylococcus	*S. aureus*	Peau, tissus mous, infection nosocomiale	Contact	$>10^5$	EUB		(Becerra-Castro *et al.*, 2015) (Schmid-Hempel and Frank, 2007) (Tevell *et al.*, 2017) (Mendoza-Olazarán *et al.*, 2013)
	S. capitis	Bactériémie	Contact	-			
	S. sciuri	Bactériémie	Contact	-			
Stenotrophomonas	*S. maltophilia*	Pneumonie, infection des voies urinaires et du sang	VOF[a]	-	EUT		(Brooke, 2012; Ibekwe and Murinda, 2019; Lequette *et al.*, 2019)
Streptococcus	*S. oralis*	Endocardite, syndrome de détresse respiratoire de l'adulte, choc streptococcique	VOF[a]	-			(Do *et al.*, 2009)

Moraxella	*M. nonliquefaciens*	Maladies respiratoires	Contact - Inhalation	-			(Rusin *et al.*, 1997)
Pantoea	*P. agglomerans*	Infections du sang, des plaies et des voies urinaires	VOF[a]	-			(Rezzonico *et al.*, 2009)

VOF[a]: voie fécale- orale; gc*: copie de gene (données de qPCR); UFC: Unité Formant Colonie, EUB: eau usée brute, EUT: eau usée traitée

3. Réglementation

À l'heure actuelle, l'intérêt principal de la réutilisation des eaux usées en agriculture est de pallier au déficit hydrique et d'augmenter les rendements de la production agricole par un apport adéquat et de qualité (nutriments) d'eau d'irrigation. Pour cela, il est nécessaire d'atteindre un niveau de qualité de l'eau approprié pour l'utilisation attendue et qui est conservatif vis-à-vis de la santé humaine et de l'environnement.

Afin de maîtriser les risques sanitaires qui sont essentiellement liés à la présence de microorganismes pathogènes, des réglementations internationales ont été mises en place pour établir des concentrations maximales ou des abattements minimaux à atteindre pour des pathogènes ou des indicateurs. Ces suivis permettent de rendre compte de l'efficacité du traitement des eaux usées traitées en station d'épuration (Drechsel *et al.*, 2011; OMS, 2006) et permettre de définir l'usage de l'eau après traitement. Ces objectifs de qualité d'eau sont complétés par des contraintes de distance et de terrain. L'utilisation des EUT impose la mise en place d'un programme de surveillance de la qualité des eaux usées traitées et de la qualité des sols qui seront irrigués, ainsi que la traçabilité des opérations d'irrigation. Les contraintes d'usage sont liées à la nature des végétaux irrigués et des risques associés. Des contraintes de distances ont également été établies afin de protéger certaines activités sensibles (baignades, conchyliculture, etc.).

Les indicateurs microbiologiques sont utilisés comme prédicteurs de la présence de microorganismes pathogènes (indicateurs de contamination fécale) ou de l'efficacité du traitement (De Giglio *et al.*, 2017; Seto *et al.*, 2016). La plupart des risques microbiologiques sont associés à des organismes issus des fèces, d'où l'intérêt de tracer la contamination fécale. Les indicateurs les plus couramment utilisés dans les réglementations sont *Escherichia coli*, les coliformes fécaux et les entérocoques. *E. coli* est une espèce de coliformes fécaux. C'est l'espèce la plus utilisée pour statuer d'une contamination fécale (OMS, 2006). *E. coli* est plus sensible aux stress environnementaux ainsi qu'aux traitements de désinfection que certains pathogènes (OMS, 2006). C'est pourquoi l'indicateur *E. coli* ne peut être utilisé seul pour évaluer l'efficacité d'un traitement sur l'ensemble des pathogènes. Une combinaison de plusieurs indicateurs montrant des capacités de survie dans l'environnement différentes est donc utilisée (Figure 5), éventuellement complétée par la mesure directe de certains pathogènes (helminthes). Les entérocoques sont plus résistants dans l'environnement et indiquent la présence des virus entériques (Uyttendaele *et al.*, 2015) et de certains protozoaires. Les coliphages ARN-F spécifiques sont utilisées en tant qu'indicateur de la présence des virus

entériques, car ils sont présents en grande quantité dans les eaux usées (Dryden *et al.*, 2006). Les spores des bactéries sulfito-réductrices (BASR) sont utilisés en tant qu'indicateur de la présence de *Cryptosporidium* et *Giardia*, car elles sont résistantes aux traitements.

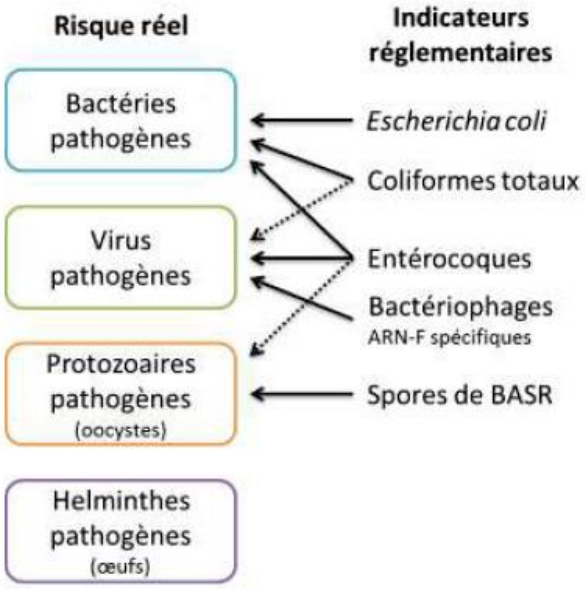


Figure 5 Principaux pathogènes rencontrés dans les eaux usées et principaux indicateurs microbiologiques de contamination (Carre, 2017)

En France, l'Arrêté du 2 août 2010, modifié par l'arrêté du 25 juin 2014, fixe les normes d'utilisations des eaux résiduaires urbaines traitées (et non les eaux issues de l'industrie, de l'élevage agricole, etc.). Celles-ci sont classées en quatre niveaux de qualité suivant différents paramètres (Tableau 4) et prennent en compte des paramètres physico-chimiques (MES, DCO) et microbiologiques (*Escherichia coli*, les entérocoques fécaux, les phages ARN-F spécifiques et les spores des bactéries sulfito-réductrices). Cette réglementation est celle qui était en vigueur au cours de la thèse.

Tableau 4 Paramètres décrivant les niveaux de qualité des eaux usées traitées pour la réutilisation des eaux résiduaires urbaines traitées, en fonction des usages (Réglementation française, Arrêté du 25 juin 2014)

PARAMÈTRES	NIVEAU DE QUALITÉ DES EAUX USÉES TRAITÉES			
	A **Sans restriction**	**B** **Sauf produits consommés crus**	**C** **Pépinières, céréales, arboricultures sans aspersion**	**D** **Forêts sans aspersion**
Physico-chimie				
Matières en suspension (MES) (mg/L)	< 15	Conforme à la réglementation des rejets d'eaux usées traitées pour l'exutoire de la station hors période d'irrigation		
Demande chimique en oxygène (DCO) (mg/L)	< 60			
Microbiologie				
Escherichia coli (UFC/100mL)	≤ 250	≤ 10 000	≤ 100 000	-
Entérocoques fécaux (abattement en log)	≥ 4	≥ 3	≥ 2	≥ 2
Phages ARN F-spécifiques (abattement en log)	≥ 4	≥ 3	≥ 2	≥ 2
Spores de bactéries anaérobies sulfito-réductrices (abattement en log)	≥ 4	≥ 3	≥ 2	≥ 2

Toutefois, la présence et les concentrations des indicateurs microbiologiques ne sont pas toujours corrélées à celles des pathogènes (Harwood *et al.*, 2005; Jjemba *et al.*, 2010; Landre *et al.*, 1998; Le Dantec *et al.*, 2002). Les concentrations en virus sont en particulier mal estimées par les indicateurs couramment utilisés (Hata *et al.*, 2016). Par ailleurs, des phénomènes de recroissance peuvent se produire après un traitement UV ou au chlore (X. Wang *et al.*, 2012) ainsi que durant le stockage des eaux usées (Jjemba *et al.*, 2010; Kerim and Banu, 2015). À cela s'ajoute le manque de données concernant le devenir des pathogènes (entériques et/ou non entériques) une fois dans le réseau de distribution (Verbyla *et al.*, 2016) et à l'effet de la colonisation du système d'irrigation par des biofilms, sur la qualité de l'eau au point d'usage (Pachepsky *et al.*, 2012; Sánchez *et al.*, 2014; Yao and Habimana, 2019). Bien que d'un point de vue sanitaire, la micro-irrigation ou irrigation goutte à goutte est souvent vue comme la

méthode permettant de limiter au maximum les contacts entre l'eau, la plante et l'agriculteur (Adegoke *et al.*, 2018; Marinho *et al.*, 2013), des études ont montré que des pathogènes pouvaient s'installer dans les biofilms colonisant les réseaux de distribution (Meier and Bendinger, 2016; Shelton *et al.*, 2013; Van Der Kooij *et al.*, 2005) et dégrader la qualité de l'eau d'irrigation (Pachepsky *et al.*, 2012).

- La réutilisation de l'eau usée traitée pour l'agriculture est vue comme une partie de la solution pour lutter contre le manque d'eau et aider à maintenir l'activité économique, notamment dans les régions touchées par le stress hydrique.

- L'utilisation des eaux usées traitées présente de nombreux avantages: agronomique, sociétal, économique. Cependant, des risques sont à considérer, tant pour l'environnement que pour la santé humaine.

- Des réglementations et recommandations, nationales et internationales, sont mises en place afin d'encadrer leur utilisation.

II. MÉTHODES D'IRRIGATION EN AGRICULTURE

L'amélioration de la gestion des ressources en eau et des pratiques, la recherche de ressources alternatives (p. ex. eaux usées) et l'adoption de techniques d'irrigation optimales sont nécessaires pour préserver la ressource en eau et améliorer l'efficience de son utilisation. Ces travaux de thèse s'intègrent dans le cadre de l'utilisation conjointe de l'irrigation goutte à goutte, définis comme le système d'irrigation avec la meilleure efficience, à la réutilisation des eaux traitées. Dans cette partie, la présentation des différents systèmes d'irrigation est abordée, présentant leurs avantages et leurs inconvénients. Le principe de fonctionnement et les solutions techniques de l'irrigation goutte à goutte sont ensuite abordés plus en détail.

A. Efficience et systèmes d'irrigation

Les systèmes d'irrigation sont généralement divisés en deux catégories : l'irrigation gravitaire et l'irrigation sous pression (p. ex. aspersion et goutte-à-goutte). Le choix de la technique sera fonction de plusieurs paramètres tels que la performance, le coût et les contraintes de mise en place et de fonctionnement, l'impact sur la santé (différents niveaux d'exposition) ainsi que l'efficience du système dans l'utilisation de l'eau. Cette efficience est définie comme étant la quantité d'eau apportée et consommée par la plante par rapport à la partie non utilisée (Howell, 2003) et se calcule de la façon suivante :

Équation 1 Cacul de l'efficience des systèmes d'irrigation

$$e = \frac{Ec \times Ea}{100}$$

Avec

e : Efficience du schéma d'irrigation (%)

Ec : Efficacité du transport (%)

Ea : Efficacité des applications sur le terrain (%)

L'efficacité de l'application au champ (Ea) dépend principalement de la méthode d'irrigation et des adaptations et pratique des agriculteurs. L'efficacité du transport (Ec) dépend principalement de la longueur des canaux, du type de sol ou la perméabilité des berges des canaux et l'état des canaux (Howell, 2003). Un schéma d'irrigation est considéré comme bon en matière d'efficience lorsque celui est compris entre 50-60 %, raisonnable à 40 % et mauvais en dessous de 30 % (FAO Annex : Irrigation efficiencies, 1989).

1. Irrigation de surface

L'irrigation de surface (par ruissellement, par planches, à la raie, ou par bassins) fonctionne par gravité et est la technique la plus ancienne et la plus utilisée dans le monde (Figure 6). Elle concerne environ 80 % de la surface irriguée mondiale (Lazarova and Bahri, 2005, FAO 2012). L'eau est distribuée par gravité à travers un réseau de canaux à l'air libre à partir duquel elle s'infiltre le sol. La distribution de l'eau est assurée par la topographie et les propriétés d'infiltration du sol. Cette technique a un faible coût d'investissement, une très faible consommation d'énergie et une bonne adaptation à la distribution des eaux usées (limitation des risques de contact par projection, pas de colmatage des systèmes d'irrigation). Cette méthode convient en particulier si l'eau n'est pas le facteur limitant de la production agricole. En revanche, dans les pays arides et semi-arides où l'eau est une ressource limitante, l'utilisation de cette méthode dont l'efficience est comprise entre 50-80 % (Bjorneberg, 2013) ne permet pas une utilisation raisonnée de la ressource (FAO, 2003).

Figure 6 Irrigation de surface[3]. L'eau s'écoule librement sous l'action de la gravité.

2. Irrigation par aspersion

L'irrigation par aspersion (Figure 7) apporte l'eau sous forme de pluie plus ou moins dispersée au-dessus des plantations. Cette méthode a une meilleure efficience que l'irrigation de surface (75 à 95 %) (Bjorneberg, 2013) mais augmente la demande en énergie et les besoins matériels. Les exigences en matière de pression à l'entrée du système varient entre 1,5 et 5,5

[3] https://irrigazette.com/fr/articles/les-techniques-dirrigation-agricole

bars. Différents dispositifs sont utilisés pour ce type d'irrigation y compris le système de bobines, l'arrosage à couverture totale et l'irrigation à pivot central ou linéaire.

Un des désavantages associés à cette technique est que la pluie formée par les asperseurs va être soumise aux aléas des vents (Demirel and Sener, 2009). Les petites gouttes vont être plus facilement dispersées par le vent et affectées par la température, perturbant la distribution de l'eau (Stevenin *et al.*, 2016; Zazueta, 2011). De plus, les pertes par évaporations seront plus importantes avec la formation de petites gouttes (McLean, 2000). Les gouttes les plus grosses ont davantage d'énergie cinétique, laquelle est transférée au sol, et va favoriser la formation d'agrégats aux sols et modifier la capacité d'infiltration par la formation d'une croûte en surface (Montero *et al.*, 2003). Enfin, plusieurs études ont été menées sur la présence du pathogène *Legionella pneumophila*, dont la voie de contamination préférentielle est l'inhalation, dans les gouttelettes des systèmes d'aspersions (De Giglio *et al.*, 2019).

Figure 7 Irrigation par aspersion[4]

B. Micro-irrigation

1. Définition

La micro-irrigation a été développée vers la fin des années 60 et est surtout utilisée dans la fruiticulture, la viticulture et l'horticulture, notamment dans les pays arides et semi-arides où la priorité est l'optimisation de l'usage de l'eau (Darouich *et al.*, 2014). Par rapport aux méthodes d'irrigation dites de surface, l'irrigation au goutte-à-goutte s'est révélée être une

[4] http://soverdi.fr/quel-systeme-irrigation-choisir

technologie efficace pour économiser l'eau et augmenter le rendement des cultures (Aujla *et al.*, 2007; Ibragimov *et al.*, 2007; Singandhupe *et al.*, 2003; Tilman *et al.*, 2002). L'irrigation goutte à goutte améliore l'efficacité de l'irrigation, comprise entre 70 et 95 % (Bjorneberg, 2013; Campaoré, 2006; Lamm *et al.*, 2007), en fournissant de l'eau précisément aux racines des cultures (par le biais de « goutteurs ») (Figure 8) et en réduisant les pertes d'eau liées à l'évaporation de surface, le ruissellement et la percolation (Li *et al.*, 2003; Maisiri *et al.*, 2005; Singandhupe *et al.*, 2003). L'utilisation de cette méthode pour l'irrigation varie fortement d'un pays à l'autre[5].

Bien qu'un investissement soit nécessaire au départ, cette technique permet de diminuer la consommation en eau de 30 à 50 % par rapport à l'irrigation de surface (Darouich *et al.*, 2014; FAO, 2002; Sohou *et al.*, 2017). Néanmoins, la performance de l'irrigation est au mieux un objectif intermédiaire pour les agricultures. Effectivement, la performance d'irrigation n'est pas une valeur statique, mais un processus en évolution rapide, lié à la capacité (perçue) des agriculteurs à changer les pratiques d'irrigation et à renouveler le matériel d'irrigation (Benouniche *et al.*, 2014; Grafton *et al.*, 2018).

Figure 8 Micro-irrigation en goutte-à-goutte

2. Les goutteurs

Les goutteurs sont les dispositifs principaux de cette technique d'irrigation. Ils permettent de distribuer l'eau via un réseau de canalisations sous faible pression et de la délivrer en des

[5] https://www.icid.org/sprinklerandmircro.pdf

quantités contrôlées au plus près des cultures sous forme de goutte-à-goutte. Ils sont fixés ou intégrés (Figure 9) à intervalle régulier le long de la conduite d'irrigation, classiquement constituée de polyéthylène (Rieul and Ruelle, 2003). Globalement, le débit des goutteurs est compris entre 1 à 8 $l.h^{-1}$ pour des pressions comprises entre 0.5 et 4 bars (Al-Muhammad, 2016). On distingue deux types de goutteurs : les goutteurs intégrés et les goutteurs rapportés (Figure 9). Les goutteurs intégrés sont injectés dans la conduite lors de la fabrication. Les goutteurs intégrés peuvent être cylindriques utilisables pour des pressions moyennes, ou plats pour des plus petites pressions. Les goutteurs rapportés se rajoutent sur la conduite d'irrigation. Ils sont « piqués » dans la conduite et sont donc visibles à l'extérieur. Ces derniers présentent l'avantage d'avoir un espacement de goutteurs sur mesure.

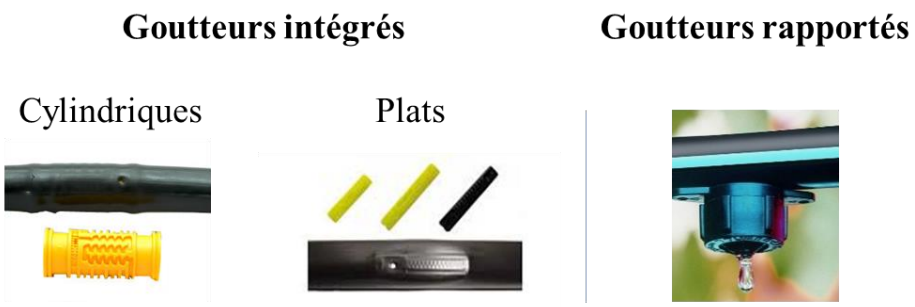
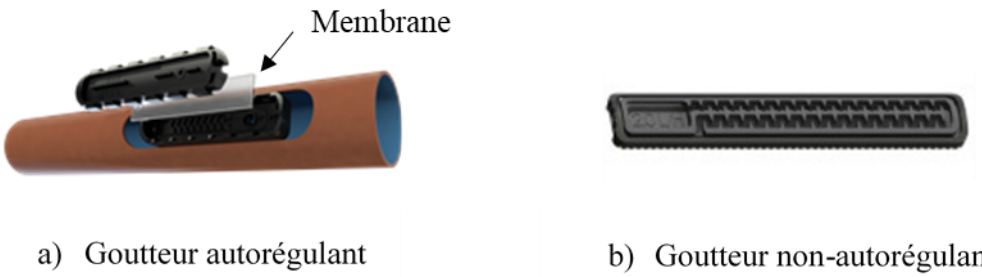


Figure 9 Exemples de types de goutteur

Les goutteurs peuvent être à « pression compensée » (ou autorégulant) ou non (Figure 10). Les goutteurs à pression compensée facilitent le contrôle de l'apport de l'eau par la présence d'une membrane ou « diaphragme » en silicone qui va se déformer en réponse à des variations de pression. Cette déformation va permettre de maintenir le débit attendu (par ex. 2 $l.h^{-1}$) limitant ainsi toute sur- ou sous-alimentation en eau (Goyal, 2017). Les goutteurs non autorégulant (Figure 10) sont les plus utilisés. C'est pourquoi ce type de goutteur a été utilisé au cours de ces travaux de recherches. Cependant, ces goutteurs sont sensibles aux variations de pression. Effectivement, le débit de ce type de goutteur sera fonction de la pression d'entrée. Ils sont constitués de canaux en labyrinthe de faibles sections d'écoulement (de l'ordre du mm^2) qui favorisent la perte de charge, la dissipation de l'énergie cinétique de turbulence et diminuent la pression de l'eau en sortie du goutteur (Al-Muhammad *et al.*, 2016; Feng *et al.*, 2018). Les changements brusques de direction du liquide dus au labyrinthe provoquent des pertes de charge

locales qui s'ajoutent au frottement le long des parois pour générer les pertes de pression (Goyal, 2017).



a) Goutteur autorégulant b) Goutteur non-autorégulant

Figure 10 Catégories des goutteurs. Le goutteur autorégulant ou « à pression compensée » (a) est composé d'une membrane en silicone permettant de maintenir le débit attendu, quelle que soit la pression en entrée. Les goutteurs non autorégulant (b) se composent d'un labyrinthe qui va favoriser la perte de charge et l'énergie de turbulence, permettant de délivrer le débit attendu en sortie.

3. Relation Débit-Pression

Comme indiqué ci-dessus, le débit de sortie du goutteur est intrinsèquement lié à la pression, principalement pour les goutteurs non autorégulant. Ainsi, la relation entre le débit et la pression à l'entrée du goutteur suit une loi exponentielle (Karmeli, 1977; Figure 11) :

Équation 2 Calcul du débit

$$q = k_d \Delta P^x$$

Où : q est le débit en sortie de goutteur ($L.h^{-1}$) ; k_d est une constante associée à chaque goutteur ; ΔP est la pression (Pa) et x est l'exposant de la courbe débit-pression.

Pour déterminer K et x, les débits (q_1, q_2) à deux pressions de fonctionnement différentes (P_1, P_2) doivent être connus. La valeur de l'exposant x dépend de la conception et de la géométrie du goutteur et est déterminée par la pente de logΔP en fonction de q (Équation 3),

Équation 3 Détermination de l'exposant

$$x = \frac{log\frac{q_1}{q_2}}{log\frac{P_1}{P_2}}$$

L'allure de la courbe débit-pression caractérise également le régime de l'écoulement dans le goutteur et est fonction du goutteur utilisé (Merkley and Allen, 2003). En général, les goutteurs à pression non autorégulant sont caractérisés par un x variant entre 0,38 et 0,8 (Rieul and Ruelle, 2003). Plus la valeur de x est basse, moins le débit sera affecté par les variations de pression. En écoulement turbulent, x = 0,5 et en écoulement laminaire, x = 1,0. Les goutteurs non autorégulant sont toujours totalement turbulents avec x = 0,5, en supposant que la perte de pression soit entièrement liée à l'augmentation de la vitesse. À l'inverse, les goutteurs autorégulant ont un x proche de 0 (Figure 11).

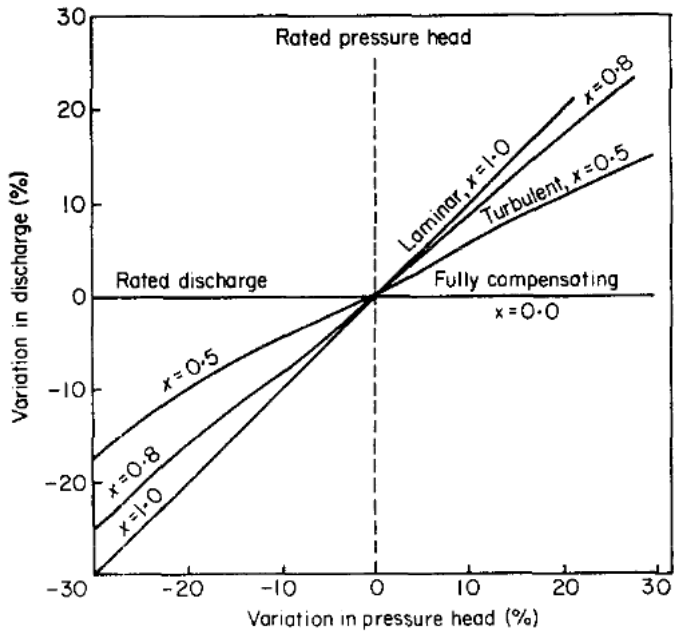


Figure 11 Variation du débit en fonction de la pression pour des goutteurs avec différents x (Karmeli, 1977)

4. Hydrodynamiques et comportement de l'écoulement dans un goutteur non autorégulant

Classiquement, l'écoulement est étudié par Mécanique des Fluides Numériques (MFN ou CFD : « Computational Fluid Dynamic »). Cette méthode permet d'établir les relations entre l'évolution de la pression et le débit (Al-Muhammad *et al.*, 2019, 2016; Feng *et al.*, 2020). En mécanique des fluides, l'écoulement laminaire est le mode d'écoulement d'un fluide où l'ensemble du fluide s'écoule plus ou moins dans la même direction, sans que les différences locales se contrarient (par opposition au régime turbulent, qui fait des tourbillons ou « vortex »

qui se confrontent mutuellement). Ainsi, à cause de la géométrie du labyrinthe et à l'échelle millifluidique du labyrinthe, on considère que le régime est turbulent dans un goutteur (Li *et al.*, 2006; Zhang *et al.*, 2016).

Lorsque le flux arrive au niveau des coins de la chicane, le changement de direction du flux entraîne une perte importante de pression locale et favorise la dissipation de l'énergie cinétique de turbulence (Feng *et al.*, 2020; Haosu *et al.*, 2016) (Figure 12). Les rotations brusques du labyrinthe vont modifier les lignes de courant et influencer la formation de zones de vortex ou zones de stagnation (Al-Muhammad *et al.*, 2019) (en bleu dans la Figure 13). Les vitesses de l'écoulement, le taux de cisaillement et l'énergie cinétique de turbulence sont réduites dans ces zones, et sont souvent identifiées comme favorisant le dépôt de particules et la croissance des micro-organismes (Adin and Sacks, 1991; Wei, 2011; Yan *et al.*, 2009) (Figure 13). Ainsi, dans les labyrinthes des goutteurs, l'écoulement est classiquement divisé en deux parties comprenant une région avec une vitesse élevée (écoulement principal) et des zones à faible vitesse (zones de vortex) (Figure 13).

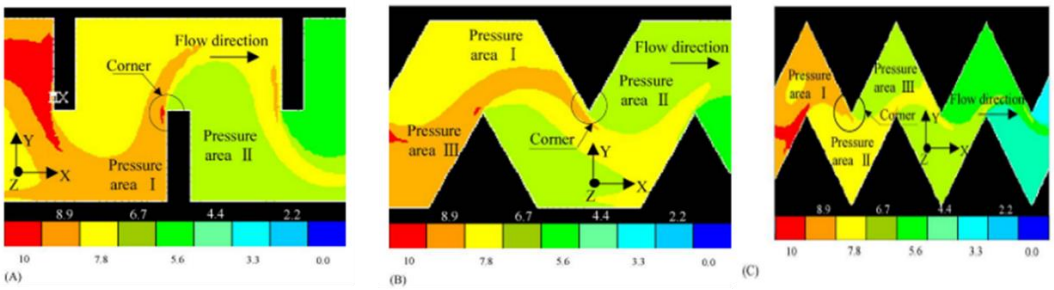


Figure 12 Simulation numérique (modèle k–ε) de la distribution de la pression (mH2O) de l'écoulement dans des canaux de forme rectangulaire (A), trapézoïdale (B) et triangulaire (C) (Wei *et al.*, 2006).

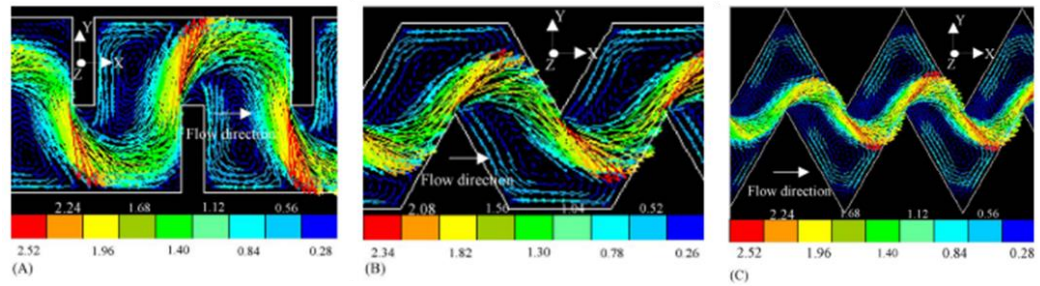


Figure 13 Simulation numérique (modèle k–ε) de la distribution de la vitesse (m.s^{-1}) de l'écoulement dans des canaux partiels dans des canaux de forme rectangulaire (A), trapézoïdale (B) et triangulaire (C) (Wei *et al.*, 2006).

- Plusieurs systèmes d'irrigation (irrigation de surface, aspersion, micro-irrigation) peuvent être utilisés conjointement à l'utilisation des eaux usées traitées. Cependant, l'efficience de l'eau sera dépendante du système utilisé.

- L'irrigation goutte à goutte est la méthode qui permet la meilleure utilisation de l'eau (c.-à-d. fréquence et quantité optimisée) pour la croissance de la culture. L'eau est délivrée au voisinage de la plante sous faible pression par des goutteurs.

- Les goutteurs non autorégulant sont les plus utilisés et possèdent un labyrinthe, de faibles sections (≈ 1 mm^2), qui permet la perte de charge pour délivrer le débit attendu.

- Suivant la géométrie du labyrinthe, deux types d'écoulements vont se mettre en place : un écoulement principal où la vitesse et le cisaillement sont élevés, et des zones de vortex (dans les coins des chicanes). Ces zones de vortex où la vitesse et le cisaillement sont réduits sont favorables aux dépôts.

III. MICRO-IRRIGATION ET COLMATAGE

Bien que la micro-irrigation soit la méthode la plus efficace pour fournir de l'eau sur le plan de l'efficience, les performances en matière d'efficacité de l'irrigation et d'uniformité de distribution sur le terrain sont souvent très différentes de celle obtenue dans des conditions expérimentales. Les écarts dépendent de la capacité des agriculteurs à modifier les pratiques d'irrigation qui s'ajoute à des raisons économiques et sociales (Benouniche *et al.,* 2014). De plus, un des principaux problèmes de l'utilisation de cette technique, notamment dans le cadre de l'utilisation des eaux usées, est qu'ils vont se colmater au cours du temps conduisant à une détérioration de l'homogénéité de distribution de l'eau et à l'augmentation des opérations de maintenance (Pitts *et al.*, 1990).

Dans cette partie, l'origine des différents types de colmatage est décrite (chimique, physique et biologique), suivie des principaux paramètres favorisant le colmatage. Les facteurs de développement des biofilms sont abordés plus en détail dans la partie IV.

A. Définition du colmatage

Le colmatage correspond à l'accumulation de matière (organique ou minérale) dans les conduites dans les goutteurs et induit une diminution du flux d'écoulement à la sortie. Généralement, le colmatage des goutteurs est évalué au travers du maintien des débits en sortie. Un goutteur est considéré comme colmaté quand il y a une reduction ou une augmentation de 25 % par rapport au débit initial (ISO, 2003; J. Li *et al.*, 2010). Quatre mécanismes interconnectés ont été identifiés comme responsables du colmatage dans les systèmes d'irrigation :

i- Dépôts des particules dans les labyrinthes étroits des goutteurs dus à la présence de solides en suspension dans l'eau,
ii- Précipitation de sels solubles,
iii- Formation de biofilm et présence d'algues.

B. Origine du colmatage

1. Le colmatage physique

Le colmatage physique est dû aux particules solides en suspension dans l'eau et qui se déposent dans le labyrinthe du goutteur (Figure 14). Ce type de colmatage est considéré comme le plus commun dans le cas des eaux de surface (Niu *et al.*, 2013) et représente 55 % des

goutteurs colmatés (Gilbert *et al.*, 1981). Ce sont notamment des particules sableuses et argileuses allant de 2 à 200 µm qui sont responsables du colmatage. Ces particules peuvent bloquer directement le labyrinthe ou s'agréger, conduisant à la formation d'amas venant colmater le canal du goutteur (Of and Plugging, 2011; Puig-Bargués *et al.*, 2005), principalement dans les premières chicanes (Lavanholi *et al.*, 2018). Elles se déposent souvent dans les zones à faible vitesse où elles coagulent pour former des masses suffisamment grandes pour obstruer les labyrinthes des goutteurs (Ait-Mouheb *et al.*, 2018). Et ceci malgré le fait que l'eau ait été filtrée par différentes méthodes (p. ex. sédimentation, écran à mailles, filtre à sable) (Niu *et al.*, 2013).

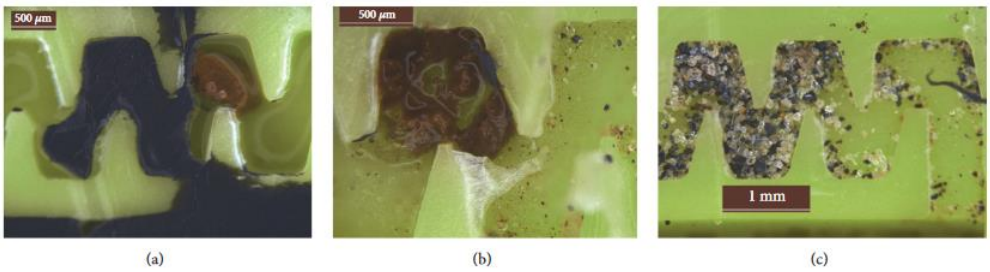


Figure 14 Colmatage physique dans les goutteurs. Ce colmatage peut être dû à l'agglomération de fines (a-b) ou/et plus grosses particules (c). (Lavanholi *et al.*, 2018)

2. Le colmatage chimique

Les eaux usées contiennent un nombre considérable de composants chimiques dissous. Ces éléments, suivant les conditions de température ou de pH, vont pouvoir précipiter et participer au colmatage d'origine chimique des goutteurs (Rav-Acha *et al.*, 1995). Par exemple, le dioxyde de carbone (CO_2) se dissout dans l'eau, et va se transformer en acide carbonique. Celui-ci va ensuite entrer en réaction avec des composés minéraux comme le carbonate de calcium $CaCO_3$ qui va engendrer la formation de bicarbonate de calcium $Ca(HCO_3)_2$ (Rizk, 2017; Zhou *et al.*, 2018). Les variations de température, de pH et de pression durant le stockage ou le pompage peuvent alors favoriser la précipitation du calcium (Campaoré, 2006; Eroglu *et al.*, 2012; Lamm *et al.*, 2007). D'autres éléments peuvent également précipiter tels que le magnésium, le fer ou encore le manganèse (Lili *et al.*, 2016; Liu *et al.*, 2017; Pitts *et al.*, 1990). Ceci va former des dépôts, favorisant la corrosion des conduites, et qui vont bloquer le flux d'eau et boucher partiellement ou totalement le goutteur (Figure 15).

Figure 15 Précipitation chimique en sortie de conduite[6]

3. Le colmatage biologique

Le colmatage biologique des goutteurs est causé par la présence de nombreux micro-organismes dans les eaux usées. Une haute concentration en matière organique dissoute et la présence de bactéries vont induire la formation de biofilm (Figure 16). Les bactéries s'attachent à la surface et produisent une matrice d'exo polymères permet de résister à différents facteurs défavorables à leurs survies et de faciliter l'accès aux nutriments adsorbés à la surface (Flemming *et al.*, 2016). La formation des biofilms dans les systèmes d'irrigation est une source importante de colmatage. En effet, sa présence augmente l'adhérence des dépôts physiques et chimiques tels que le carbonate de calcium ou les particules qui sont en suspension dans l'eau d'irrigation (Adin and Sacks, 1991; Eroglu *et al.*, 2012; Gilbert *et al.*, 1981) ce qui accentue le problème de colmatage. Ainsi, la compréhension des mécanismes participant à la mise en place du colmatage biologique est considérée comme un facteur clé afin d'optimiser les méthodes de contrôle.

La structure des biofilms se développant dans les systèmes de micro-irrigation a été évaluée en microscopie à balayage (SEM) (Yan *et al.*, 2010, 2009) ou par l'étude de la topographie du biofilm (Li *et al.*, 2012). Ces études ont montré que l'épaisseur du biofilm était plus élevée dans les zones de recirculation et que le colmatage diminuait le long du labyrinthe, la zone d'entrée étant la plus colmatée.

[6] https://ucanr.edu/blogs/blogcore/postdetail.cfm?postnum=18145

Figure 16 Goutteur colmaté par un biofilm (Gamri *et al.*, 2014)

C. Paramètres influençant le développement du colmatage

Plusieurs facteurs influencent le développement du colmatage des goutteurs tels que le type de goutteurs utilisés (autorégulant, non autorégulant) (Baeza and Contreras, 2020; Zhou *et al.*, 2014, 2013), les conditions hydrodynamiques dans les labyrinthes (Adin and Sacks, 1991; Taylor *et al.*, 1995; Wei, 2011; Yang *et al.*, 2020), la qualité de l'eau usée utilisée (Bucks *et al.*, 1979; Lamm *et al.*, 2007; Puig-Bargués *et al.*, 2005; Ravina *et al.*, 1992) ainsi que le type de filtration utilisé (Capra and Scicolone, 2005, 2004).

1. Écoulement et géométrie des labyrinthes

Les paramètres géométriques des labyrinthes (p. ex. section de l'écoulement, longueur du labyrinthe, géométrie des chicanes) des goutteurs sont étroitement liés aux risques de colmatage (Adin and Sacks, 1991; Feng *et al.*, 2018; Li *et al.*, 2019, 2013a, 2008a; Qingsong *et al.*, 2008, 2006; Yan *et al.*, 2009; Zhou *et al.*, 2014). Globalement, les approches utilisées pour limiter le colmatage consistent soit à optimiser l'écoulement principal (Y. Li *et al.*, 2008 b; Palau Salvador *et al.*, 2004; Zhang *et al.*, 2007), soit à optimiser l'auto nettoyage des zones de vortex en augmentant l'énergie de turbulence dans ces zones (Niu *et al.*, 2010; Wei *et al.*, 2005; Yu and Mei, 2014) (II.B.4). Des études ont montré qu'un débit élevé (1,75 *versus* 8,5 $l.h^{-1}$) et une grande section transversale du labyrinthe (0,52 *versus* 2,58 mm^2) réduisaient le colmatage des goutteurs (Duran-Ros *et al.*, 2009). Li *et al.*, (2019) ont mis en évidence que la vitesse moyenne au niveau de la section transversale (v) était négativement corrélée au degré de colmatage. Les goutteurs ayant un v élevé conduiraient à des turbulences locales plus importantes, et par conséquent la contrainte de cisaillement plus importante à proximité de la paroi accélérerait le détachement du biofilm. Cependant, l'évaluation de ces paramètres sur le colmatage des goutteurs est globalement réalisée au travers de la mesure des débits des goutteurs en pratique

et il y a peu d'information concernant les cinétiques de formation du colmatage au cours du temps. Ceci s'explique par le fait que pour visualiser et analyser la composition du colmatage, les goutteurs sont extraits de la gaine d'irrigation, ne permettant plus de suivre son évolution dans le temps.

2. Qualité de l'eau

Le niveau de qualité de l'eau d'irrigation en sortie de traitement va être déterminant dans les risques de colmatage et dans la formation des biofilms (Adin and Sacks, 1991; Capra and Scicolone, 2004; Liu and Huang, 2009; Puig-Bargués *et al.*, 2005; Qian *et al.*, 2017). La qualité de l'effluent est évaluée au travers de la mesure de plusieurs paramètres tels que la quantité de matière en suspension, les nutriments ainsi que la quantité de micro-organismes présents (Tableau 5). Capra and Scicolone (1998) ont mis en évidence une augmentation du colmatage suite à une augmentation de plusieurs paramètres : concentration en solides en suspension ainsi qu'en fer, en calcium, manganèse et magnésium, et une augmentation de l'électro conductivité. La salinité est un facteur important de la qualité de l'eau dans l'irrigation, mais ne contribue pas à l'encrassement des goutteurs, à moins que les ions dissous n'interagissent entre eux pour former des précipités ou favoriser la croissance des biofilms. Elle est généralement décrite par la conductivité électrique (EC). Lorsque l'eau d'irrigation contient des sels solubles, des croûtes de sel se forment lorsque l'eau s'évapore entre les irrigations, favorisant le colmatage d'origine chimique. Les facteurs qui contribuent aux précipitations chimiques sont les concentrations élevées de calcium et de magnésium et d'ions bicarbonate, ainsi qu'un pH élevé de l'eau. La température de l'eau et le pH peuvent favoriser la solubilisation des composants chimiques tels que le calcium, le manganèse ou les carbonates (Hills *et al.*, 1989; Qian *et al.*, 2017; Rizk, 2017).

D'autres recherches ont noté que la demande biologique en oxygène et les solides en suspension étaient positivement corrélés à la réduction des débits et à l'augmentation du colmatage (Capra and Scicolone, 2007).

Tableau 5 Degrés de risque de colmatage associés à différents constituants des eaux usées traitées. (Ayers and Wescot, 1976; Couture, 2006; Megh R. Goyal *et al.*, 2015; Nakayama and Bucks, 1991; Pitts *et al.*, 1990)

			Degré de risque		
Paramètre	**Symbole**	**Unité**	**Faible**	**Moyenne**	**Élevée**
Matière en suspension		$mg.l^{-1}$	<50	50-100	>100
pH	pH	1 à 14	<7,0	7-8	>8,0
Conductivité	EC_w	$dS.m^{-1}$	<0,75	0,75-3,0	>3,0
Matière solide dissoute	TDS	$mg.l^{-1}$	<500	500-2000	>2000
Rapport d'adsorption de sodium	SAR	$mg.l^{-1}$	<3	3-9	>9
Carbonate de Sodium résiduel	RSC	$mg.l^{-1}$	<1,24	1,25-2,5	>2,5
Alcalinité		$mg.l^{-1}$	<120	120-200	>200
Bactéries		nbre/ml	$<1.10^5$	1.10^5-5.10^5	$>5.10^5$
Bicarbonate	HCO_3^-	$mg.l^{-1}$	<90	90-520	>520
Chlore	Cl^-	$mg.l^{-1}$	<142	142-355	>355
Boron	B	$mg.l^{-1}$	<0,5	0,5-2,0	>2,0
Nitrate	NO_3-N	$mg.l^{-1}$	<5	5–30	>30
Fer	Fe	$mg.l^{-1}$	<0,1	0,1-1,5	>1,5
Sulfite d'hydrogène	H_2S	$mg.l^{-1}$	<0,2	0,2-2,0	>2,0
Manganèse	Mn^{2+}	$mg.l^{-1}$	<0,1	0,1-1,5	>1,5

- La principale limite l'utilisation conjointe de l'irrigation goutte à goutte avec les eaux usées traitées est le colmatage. Ce colmatage (physique, chimique, biologique) conduit à une forte hétérogénéité de distribution de l'eau et réduit l'efficience du système.

- Le colmatage biologique par la formation des biofilms est actuellement celui qui est le moins bien compris et le moins bien maîtrisé.

- Plus la vitesse au niveau de la section du labyrinthe est élevée, plus l'énergie de turbulence et le cisaillement sont élevés ce qui limite la formation de l'encrassement et favorise son détachement.

- Les paramètres géométriques des labyrinthes des goutteurs et la composition de l'eau usée traitée ont été identifiés comme des paramètres clés dans le colmatage des goutteurs.

- Ces travaux de thèse se sont principalement concentrés sur le colmatage d'origine biologique qui est aujourd'hui le moins bien compris et qui est décrit comme étant un facteur clé dans le colmatage des systèmes d'irrigation goutte à goutte utilisant des eaux usées traitées (J. Li *et al.*, 2010; J. S. Li *et al.*, 2012; Song *et al.*, 2017; Wang *et al.*, 2017).

IV. LES BIOFILMS

Bien que l'optimisation du design des goutteurs ou des traitements complémentaires sur l'eau usée secondaire permette de mieux contrôler le colmatage des goutteurs, cela ne permet pas de le supprimer totalement. Comme indiqué précédemment, le colmatage biologique des goutteurs par la formation des biofilms est considéré comme ayant un rôle clé dans le colmatage des systèmes d'irrigation (Yan *et al.*, 2009). Pour autant, les paramètres influençant la cinétique de mise en place du biofilm dans les goutteurs ainsi que la composition microbienne restent peu étudiés.

Dans cette partie, la mise en place et le développement des biofilms sont présentés suivis des facteurs influençant leur développement ainsi que des méthodes de contrôle dans le cas de l'irrigation goutte à goutte.

A. Définition

Les biofilms sont des systèmes complexes hébergeant une communauté de microorganismes installée dans une matrice protectrice extracellulaire associée à une surface. Ils peuvent être formés à partir d'une ou plusieurs espèces (Flemming and Wingender, 2010). Ces biofilms fonctionnent comme des « super-organismes », ce qui sous-tend un haut niveau d'organisation et la mise en place de mécanismes de communication et d'interaction entre les cellules afin de maintenir l'intégrité de ces structures microbiennes. Les biofilms constituent le mode de vie privilégié des bactéries dans la nature, alors que la phase planctonique ne serait qu'un passage permettant la dissémination vers de nouvelles surfaces (Kolter and Greenberg, 2006).

La matrice extracellulaire est essentiellement composée d'eau (jusqu'à 97 %), et de substances polymériques sécrétées par les microorganismes (EPS, Extracellular Polymeric Substances) rassemblant des polysaccharides, des protéines, des d'acides nucléiques (ADN, ARN), des phospholipides et des acides humiques, ainsi que des produits de dégradation et de substances provenant du milieu extérieur (Mansour and Elshafei, 2017). Le Tableau 6 présente un exemple des concentrations des différents composants présents dans un biofilm. Les EPS aident à la formation du biofilm en créant des ponts avec les cations multivalents et par le maintien des interactions hydrophobes. Ils jouent un rôle dans les phases d'adhérence du biofilm à la surface et assurent la protection des bactéries face aux conditions environnementales défavorables. Ils influencent aussi la capture des nutriments de l'environnement externe au biofilm par les bactéries (Flemming *et al.*, 2016). Des canaux et

des pores permettent l'écoulement de l'eau et le transfert des ions et des nutriments dans les différentes couches des biofilms.

Tableau 6 Exemple de la composition des biofilms (Mansour and Elshafei, 2017)

Composant	Pourcentage dans la matrice
Cellules microbiennes	2-5 %
ADN et ARN	< 1-2 %
Protéines et Enzymes	< 1-2 %
Polysaccharides	< 1-2 %
Eau	≤ 97 %

B. Formation des biofilms

Durant les processus de formation du biofilm, les bactéries vont alterner entre deux différents phénotypes : sessiles et planctoniques. Ceci permet de coloniser d'autres environnements lorsque les conditions sont nécessaires (besoin de nutriments, forte compétitivité, etc.). La formation des biofilms est bien connue, et se divise en plusieurs étapes (Flemming and Wingender, 2010; Richards and Melander, 2009; Tremblay *et al.*, 2014). La Figure 17 présente le modèle type de développement au cours du temps d'un biofilm. Ces différentes phases de formation du biofilm mettent en jeu des mécanismes intrinsèquement liés à la coopération et à la compétition cellulaire.

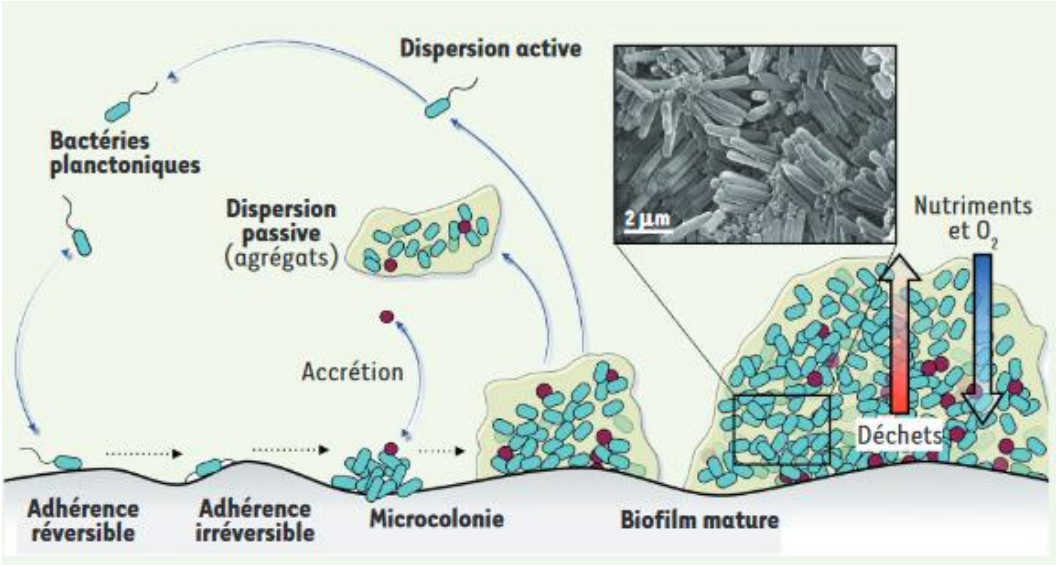


Figure 17 Étapes de formation d'un biofilm bactérien (Lebeaux and Ghigo, 2012). Après les phases d'adhérence réversible puis irréversible, la bactérie fonde une microcolonie qui produit une matrice extracellulaire (en jaune) et qui peut accueillir d'autres espèces microbiennes par accrétion. Le biofilm mature est le site de gradients inverses en nutriments (flèche bleue) et en déchets (flèche rouge) définissant des niches physiques et chimiques. Il peut se disperser et libérer des bactéries mobiles (dispersion active) ou des agrégats bactériens entourés de matrice (dispersion passive). Une photographie de microscopie électronique d'un biofilm d'*E. coli* développé in vivo sur cathéter est présentée en insert.

1. Phase d'adhésion

L'adhérence des bactéries à la surface nécessite un rapprochement qui est assuré par leur transport du fluide à la surface. Dans un système hydrodynamique, le transfert des bactéries à la surface se fera à la fois par convection et par diffusion (Busscher and Van Der Mei, 2006). Ce transfert sera rapide et influencé par la vitesse et la nature du flux. Dans ce cas, plus la vitesse du fluide est élevée, plus le transport par convection sera important. Durant la première phase de formation, la phase d'attachement (réversible puis irréversible), les microorganismes avec un phénotype planctonique vont passer à un phénotype sessile. Les caractéristiques de la paroi cellulaire des microorganismes (caractère hydrophile/hydrophobe, charge, forces et liaisons physiques et électrostatiques) vont influencer leurs capacités d'adhésion à la surface (Figure 18). L'adhésion à la surface sera également influencée par les caractéristiques du matériau telles que les propriétés physico-chimiques de celui-ci (Lehtola *et al.*, 2004), la rugosité (De-la-Pinta *et al.*, 2019; Yu *et al.*, 2010) et l'hydrophobicité (Donlan, 2002). Par exemple, l'augmentation de la rugosité des matériaux réduit les forces répulsives et favorise l'adhésion à la surface (Saur *et al.*, (2017).

Les matériaux hydrophobes sont généralement plus propices à l'adhésion des bactéries que les surfaces hydrophiles (Achinas *et al.*, 2019). Généralement, les conduites d'irrigation ainsi que les goutteurs sont fabriqués avec du polyéthylène (PE) ou en polychlorure de vinyle (PVC). Verrier *et al.*, (1987) ont montré, que le PE est plus hydrophobe que le PVC, expliquant pourquoi le développement du biofilm est plus important dans le cas de l'utilisation de PE que de PVC dans les réseaux d'eau potable (30 à 40 % plus élevé, d'après Yu *et al.*, 2010) ou que dans le cas des systèmes d'irrigation alimentés avec de l'eau usée traitée (Gamri *et al.*, 2015). Gamri *et al.* (2015) ont montré que la biomasse moyenne des biofilms alimentés avec de l'eau usée traitée et attachée une conduite d'irrigation en PE était entre 24 et 40 % supérieure par rapport à une conduite en PVC. Cai *et al.*, (2019) ont étudié l'adhésion de plusieurs espèces de bactéries en fonction de l'utilisation de PE ou de PVC et ont montré que la concentration bactérienne par unité de surface était plus de 10 fois supérieure dans le cas du PE comparativement au PVC.

2. Phase d'agrégation et de maturation

Une phase d'agrégation cellulaire va progressivement se mettre en place. Les microorganismes vont commencer à s'agréger, se multiplier et à former des microcolonies et synthétiser des molécules (Flemming and Wingender, 2010). La phase de croissance du biofilm est caractérisée par la production d'exopolymères (EPS) qui vont permettre l'ancrage à la surface d'autres bactéries ce qui va augmenter l'épaisseur du biofilm. Une fois mature, le biofilm prend une structure en 3D et atteint son épaisseur maximale. La formation et le développement du biofilm, sa morphologie et sa topographie continuent d'évoluer dans le temps et seront fonction des paramètres environnementaux (Figure 18). Des structures se mettent en place, notamment des cavités et des canaux qui traversent le biofilm et qui vont assurer l'acheminement de l'eau (permettant le déplacement des microorganismes à phénotypes planctoniques) et des nutriments du milieu environnant vers l'intérieur du biofilm. Cette phase se caractérise également par un équilibre entre la croissance de la biomasse et le détachement du biofilm sous l'action des paramètres hydrodynamiques (p. ex. cisaillement, énergie de turbulence). Les cellules et les fragments du biofilm vont alors pouvoir adhérer et coloniser le reste du système. En outre, la surface du biofilm peut adsorber les éléments en suspension dans l'eau (particules d'argile, de sable ou autres) entraînant progressivement l'obstruction totale des goutteurs (Gilbert *et al.*, 1981).

3. Phase de détachement

La dernière étape du cycle de développement du biofilm est la phase de détachement. Le manque de nutriment, l'âge du biofilm, le taux de biomasse, le stress physico-chimique et biologique ainsi que les conditions hydrodynamiques jouent un rôle important dans l'étape de détachement du biofilm et de sa dispersion (Mahfoud *et al.*, 2009) et impactent la structure, la densité et les phénomènes de transfert (Choi and Morgenroth, 2003; Wäsche *et al.*, 2002). Le décrochage de parties du biofilm peut être le résultat de plusieurs mécanismes tels que l'érosion, l'abrasion ou encore le détachement (ou « sloughing ») (Choi and Morgenroth, 2003). Le détachement concerne des fragments de biofilms de tailles plus importantes que pour l'érosion ou l'abrasion. L'évolution des conditions environnementales (disponibilité en nutriments, concentration en oxygène) peut influencer le détachement du biofilm (Hunt *et al.*, 2004) et conduire à une structure hétérogène. Le détachement du biofilm peut aussi être favorisé par des changements brusques dans les conditions hydrodynamiques. Par exemple, Horn *et al.*, (2003) ont effectué des mesures des matières en suspension à la sortie de tuyaux dans lesquels un biofilm s'est développé et a atteint une épaisseur de 1000 µm. L'augmentation de la vitesse de 0,6 à 4,8 $m.s^{-1}$ induit une diminution de l'épaisseur du biofilm à près de 0 µm dans les secondes qui suivent la variation des conditions hydrodynamiques.

Ces phénomènes de détachement sont un réel problème dans le domaine de l'irrigation goutte à goutte. Des fragments de biofilms qui se sont développés dans les conduites d'irrigation vont se détacher et pouvoir atteindre les goutteurs et colmater les labyrinthes comme démontré par Li *et al.* (2012). De plus, comme indiqué précédemment, des questions sanitaires persistent concernant la présence de microorganismes pathogènes dans l'eau usée traitée. Le détachement des biofilms colonisant le réseau d'irrigation (conduite, goutteur, filtre) pourrait augmenter les risques de détériorations de la qualité de l'eau comme démontré dans le cas des biofilms de distribution d'eau potable (Fish *et al.*, 2017, 2016).

C. Facteurs influençant le développement des biofilms en micro-irrigation

Plusieurs paramètres peuvent conditionner l'adhésion et le développement des biofilms tels que le pH, la température de l'eau, la quantité de nutriments, les paramètres hydrodynamiques, les propriétés de surface des matériaux utilisés (Figure 18) (Chen *et al.*, 2005; Clivot *et al.*, 2014, 2013; Donlan, 2002; Goller and Romeo, 2008; Sheng *et al.*, 2008; Simões *et al.*, 2010; Simon *et al.*, 2009; Stoodley *et al.*, 1997). La température de l'eau régule directement l'activité métabolique, la croissance des microorganismes et leurs activités et donc

joue un rôle essentiel dans l'activité globale des biofilms (Brunke and Gonser, 1997; Friberg *et al.*, 2013; González-Escalona *et al.*, 2009; Romaní *et al.*, 2016; Ylla *et al.*, 2014). La température dans les conduites d'irrigation peut atteindre plus de 50 °C sur le terrain (Gamri *et al.*, 2014). Ces variations de température peuvent modifier le développement des biofilms, la structure microbienne des biofilms, l'activité enzymatique, le métabolisme global du biofilm et les interactions entre les microorganismes (Ferreira and Chauvet, 2011; Herald and Zottola, 1988; Krasowska and Sigler, 2014; Qian *et al.*, 2017; Romaní *et al.*, 2014).

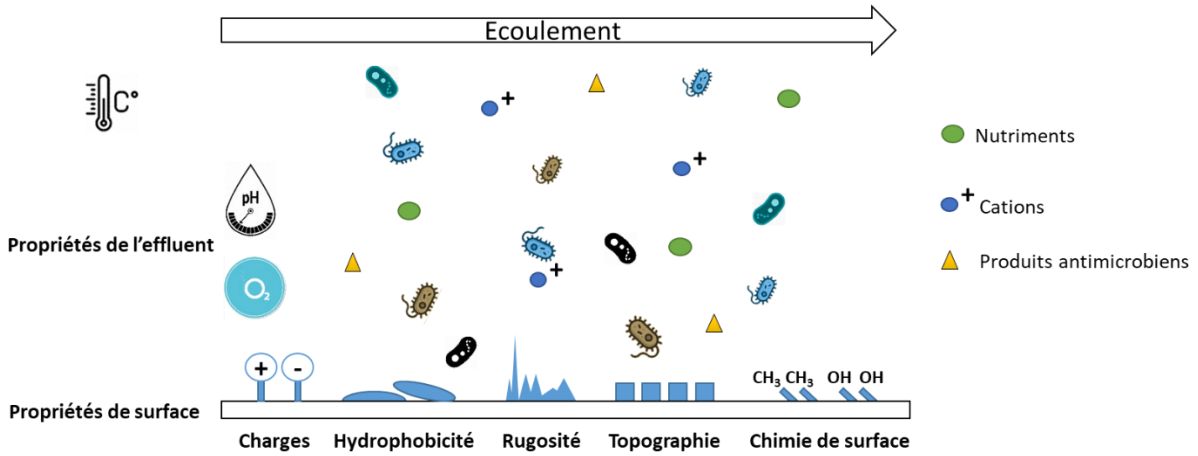


Figure 18 Illustration schématique des différents paramètres influençant l'adhésion bactérienne et le développement des biofilms.

1. Les paramètres hydrodynamiques

Les propriétés de l'écoulement vont influencer le développement des biofilms (Augspurger and Ku, 2010; Lehtola *et al.*, 2006). De nombreuses recherches ont été réalisées sur l'effet des paramètres hydrodynamiques sur la formation des biofilms dans les réseaux de distribution d'eau.

Les conditions hydrodynamiques évoluent suivant la position le long d'un système de micro-irrigation (conduite, goutteur). Li *et al.* (2012) ont trouvé que les paramètres de formation du biofilm dans des conduites étaient influencés par le transport des nutriments et des particules en suspension jusqu'à une vitesse critique de 0,45 $m.s^{-1}$. Au-dessus, la formation du biofilm est davantage reliée aux forces de cisaillement. Dans un goutteur, la géométrie des labyrinthes des goutteurs induit la formation d'un écoulement complexe et hétérogène qui va également influencer le développement des biofilms. La croissance et le détachement des biofilms sont

alors influencés par les caractéristiques de l'écoulement de l'eau dans les labyrinthes des goutteurs, tels que la vitesse d'écoulement, la turbulence (nombre de Reynolds) et le cisaillement (Y. K. Li *et al.*, 2012). Ces facteurs peuvent influencer la diversité microbienne qui colonise une surface (Rochex *et al.*, 2008). Plusieurs études ont montré que les biofilms se développent préférentiellement dans les zones où les vitesses d'écoulement et l'énergie de turbulence sont plus faibles comme au niveau de l'entrée et la fin du labyrinthe (Cararo *et al.*, 2006; G. B. Li *et al.*, 2012) ainsi que dans les zones de vortex (Ait-Mouheb *et al.*, 2018; Qian *et al.*, 2017) (Figure 19 B) avec une épaisseur diminuant le long du canal (Li *et al.*, 2013b). La géométrie et la section de l'écoulement, conditionnant l'écoulement dans le labyrinthe, vont aussi conditionner le développement du colmatage et des biofilms (Feng *et al.*, 2018; Y. Li *et al.*, 2019a; Qingsong *et al.*, 2008; Zhou *et al.*, 2014).

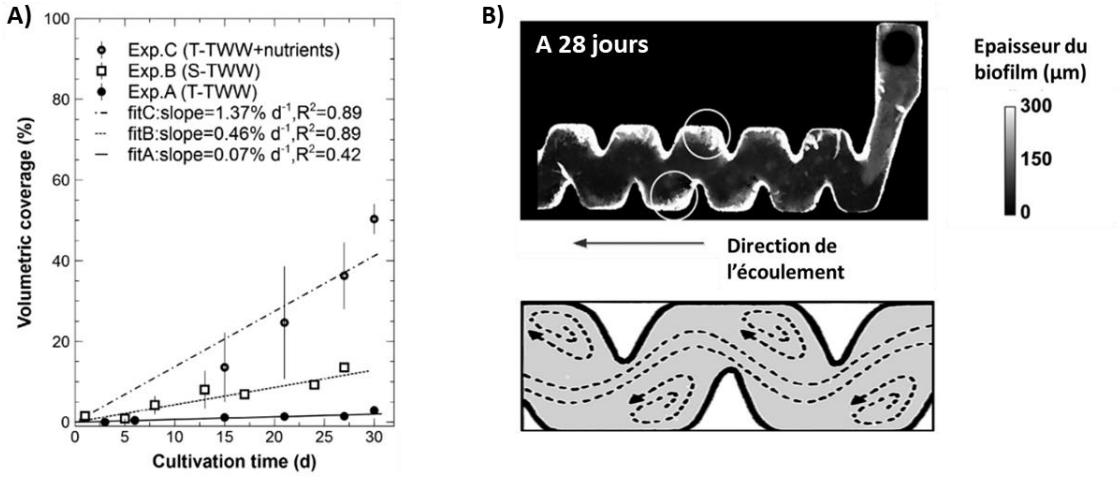


Figure 19 Évolution du colmatage au cours du temps (A) et de l'épaisseur du biofilm dans un millicanal observés en Tomographie en Cohérence Optique (OCT) (B). Le système millifluidique était alimenté avec de l'eau usée traitée après un traitement secondaire (S-TWW), tertiaire (T-TWW) ou tertiaire et supplémenté en nutriment (T-TWW nutrients). Les cercles blancs (B) indiquent les zones de recirculations. Le schéma illustre les lignes d'écoulement dans le labyrinthe des goutteurs. Les flèches indiquent les zones de vortex. (Qian *et al.*, 2017)

Cependant, certains mécanismes ont été identifiés permettant aux biofilms de résister à des augmentations du cisaillement, notamment par la production de certaines substances polymères extracellulaires assurant le maintien des biofilms attachés aux surfaces (Costerton, 1995; Gerbersdorf *et al.*, 2008). L'augmentation de l'énergie cinétique de turbulence augmente le taux de transport des nutriments dans le biofilm (Beer and Stoodley, 2006; Wäsche *et al.*, 2002), la densité, et la force d'attachement des cellules à la surface. D'autres recherches ont

également mis en évidence que les couches inférieures du biofilm résistaient mieux à l'augmentation de l'énergie de turbulence et du cisaillement (Derlon *et al.*, 2008).

2. La qualité de l'effluent

Les eaux usées contiennent des nutriments qui peuvent être utilisés comme substrat pour le développement d'un biofilm. Ainsi, le niveau de traitement de l'effluent va être déterminant dans le colmatage des systèmes de micro-irrigation et le développement du colmatage biologique (Lamm *et al.*, 2007), en influençant les concentrations en nutriments (C, N, P), qui conditionnent l'adhésion, le développement, la composition microbienne et la structure des biofilms (Chen *et al.*, 2005; Larned, 2010; Raskin *et al.*, 1996; Teodósio *et al.*, 2011; Wijeyekoon *et al.*, 2004). Plusieurs études ont montré que la limitation en azote favorisait l'attachement (Pun, 2000) et qu'un ratio C/N/P égal à 100/10/1 était favorable au développement des biofilms (Kujundzic *et al.*, 2007; Thompson *et al.*, 2006). Dans le cadre de la reuse, Qian *et al.*, (2017) ont montré que l'utilisation d'un effluent tertiaire (NH_4^+ : 0,3 $mg.l^{-1}$) par rapport à un effluent secondaire (NH_4^+ : 9,7 $mg.l^{-1}$) diminuait le niveau de biofilm dans un canal millifluidique mimant le labyrinthe des goutteurs (Figure 19 A). Wijeyekoon *et al.*, (2004) a confirmé qu'une faible concentration en nutriments favorise un biofilm poreux avec des phénomènes de transfert plus importants, mais qu'une concentration élevée favorise le développement d'un biofilm compact de faible porosité.

D. Méthode de contrôle des biofilms en micro-irrigation

1. Traitement chimique

La chloration ou l'adjonction d'acide dans l'eau d'irrigation sont les méthodes les plus utilisées pour contrôler et éliminer les colmatages d'origines biologique et chimique (Al-Nakshabandi *et al.*, 1997). L'adjonction d'acide dans l'eau d'irrigation a pour but d'abaisser le pH afin de prévenir et dissoudre la précipitation chimique (Zhang *et al.*, 2017) tandis que la chloration est utilisée en tant que biocide. Par ailleurs, la chloration favorise le détachement du biofilm par la rupture des liaisons hydrogène (Xue and Seo, 2013). Bien que la chloration ait été reconnue comme la méthode la moins coûteuse pour traiter le colmatage d'origine biologique, les schémas de chloration recommandés (concentration, fréquence d'injection) et d'agents chimiques (hypochlorite de sodium (NaOCl), hypochlorite de calcium ($Ca(OCl)_2$), chlore gazeux (Cl_2)) diffèrent d'une étude à l'autre (Megh R. Goyal *et al.*, 2015; Rav-Acha *et al.*, 1995). En effet, la chloration peut être appliquée de 0,4 $mg.l^{-1}$ (Batista *et al.*, 2009) à plus

de 100 mg.l^{-1} (Chauhdary *et al.*, 2015). Cependant, l'application d'une forte concentration de chlore peut intensifier le colmatage favorisant le détachement du biofilm attaché à la paroi de la conduite d'irrigation (Rav-Acha *et al.*, 1995) et peut induire des effets négatifs sur la croissance des cultures, car une forte concentration de chlore dans le sol peut entraîner une toxicité (Li and Li, 2009; Song *et al.*, 2019a). Par consensus, l'utilisation de faibles concentrations (1-2 mg.l^{-1} mesurée en fin de conduite d'irrigation) à fréquences répétées (1-2 fois par semaine) est à privilégier (Katz *et al.*, 2014; Li *et al.*, 2009; Rav-Acha *et al.*, 1995; Ravina *et al.*, 1992; Song *et al.*, 2019a, 2019 b).

L'effet de la chloration sur les cinétiques de formation des biofilms a été peu étudié dans les systèmes d'irrigation. Une des rares études sur le sujet a montré que, malgré l'efficacité de la chloration à maintenir les débits et à étendre la durée de vie du système d'irrigation, elle ne permet pas de supprimer totalement le biofilm qui peut, en cas d'arrêt des procédures de traitement, recroître plus rapidement (Katz *et al.*, 2014).

La présence de biofilm dans des environnements traités au chlore est souvent associée à la résistance des microorganismes aux désinfectants. Ainsi, Song *et al.*, (2019) a montré une diminution de la concentration en acides gras phospholipidiques (PLFAs, utilisés comme biomarqueurs) dans les biofilms des goutteurs alimentés avec des eaux usées traitées, mais une augmentation de l'abondance relative des Firmicutes au fil du temps, connu pour inclure des bactéries résistantes au chlore (Wang *et al.*, 2015; Zhao *et al.*, 2020). Identifier les microorganismes résistants à la chloration apparaît nécessaire pour comprendre les limites de ce traitement. Le développement des biofilms dans les systèmes de micro-irrigation alimentés en eau usée traitée et sous conditions chlorées sera abordé dans le chapitre 4.

2. Purge hydrique

Une autre méthode permettant de maintenir l'efficience du système et d'étendre sa durée de vie est de purger le système en ouvrant les vannes placées en fin de ligne d'irrigation de façon à éliminer les particules (physiques et biologiques) passées au travers du filtre et contenues dans le réseau. Globalement la vitesse de l'eau à atteindre dans la conduite d'irrigation de 0,3-0,6 m.s^{-1} fait consensus (Lamm *et al.*, 2007; Li *et al.*, 2018; J Puig-Bargués *et al.*, 2010b). L'ouverture de ces vannes permet d'augmenter la vitesse de l'eau ainsi que les forces de cisaillement dans la conduite d'irrigation, favorisant le détachement du biofilm. Augmenter la pression permet également de favoriser la purge au niveau des goutteurs et de maintenir le débit attendu (Yu *et al.*, 2018b; Zhang *et al.*, 2017). Ainsi, Yu *et al.*, (2018) ont

montré qu'en augmentant la pression de 0,1 MPa (pression de fonctionnement des goutteurs) à 0,3 MPa pendant 2 minutes permettent d'atteindre les débits attendus en éliminant les particules piégées dans le labyrinthe. Cependant, l'augmentation du cisaillement par la purge peut aussi favoriser le développement d'un biofilm plus dense et cohésif, permettant de mieux résister aux évènements de purge (P. Stoodley *et al.*, 1999). Cette résistance augmente avec la profondeur du biofilm (Derlon *et al.*, 2008).

Comme pour la chloration, la fréquence de la purge (hebdomadaire à mensuelle) influence directement l'efficacité de la méthode et la durée de vie du système (Lamm, 2013; Li *et al.*, 2015, 2018; J Puig-Bargués *et al.*, 2010a). Il est donc recommandé de purger le système aussi souvent que possible (Lamm *et al.*, 2007), mais cela peut favoriser le développement d'un biofilm résistant (Li *et al.*, 2015). Ceci s'explique par la résistance de certains microorganismes face à l'augmentation des forces de cisaillements et à la capacité du biofilm à s'adapter face à des conditions environnementales défavorables. Li *et al.*, (2015) ont observé que la concentration en EPS des biofilms était plus faible avec une purge bihebdomadaire plutôt qu'hebdomadaire, mais que l'activité microbienne des biofilms était plus élevée avec une purge hebdomadaire. Ils n'ont cependant observé aucun effet significatif sur la composition microbienne de ces biofilms analysée par la caractérisation des PLFAs.

E. Caractérisation microbiologique des biofilms des systèmes de micro-irrigation

La composition des populations microbiennes qui colonisent les systèmes de micro-irrigation utilisant des eaux usées traitées a été peu étudiée, mais les études se font plus nombreuses depuis une dizaine d'années. Les biofilms sont principalement constitués de bactéries. Le phylum des Protéobactéries est généralement le phylum prédominant, lié à une large capacité de colonisation de la surface, d'adaptation aux changements de nutriments et de capacité à proliférer dans des conditions oligotrophes (Chen *et al.*, 2004; Feng *et al.*, 2017; Hörsch *et al.*, 2005). Les genres *Pseudomonas*, *Flavobacterium*, *Cytophaga*, *Micrococcus*, *Acinetobacter*, *Brevibacterium*, *Vibrio* et *Bacillus* ont ainsi pu être identifiés sur les biofilms d'irrigation avec des eaux de surface (Gilbert *et al.*, 1982). Des champignons (ex. *Trichoderma*) ainsi que des algues (p. ex. *Chlorophyta*, *Chrysophyta*) sont également présents dans les biofilms des systèmes d'irrigation (Kreij *et al.*, 2003; Lamm *et al.*, 2007). Les algues ne s'y développent normalement pas et leur présence est fonction de l'efficacité de la préfiltration, de la qualité de l'eau d'irrigation et des conditions de stockage (par exemple, réservoirs couverts ou non

couverts). La figure 20 présente un exemple de biofilm développé à l'intérieur d'un tuyau d'irrigation au goutte-à-goutte, illustrant la diversité microbienne.

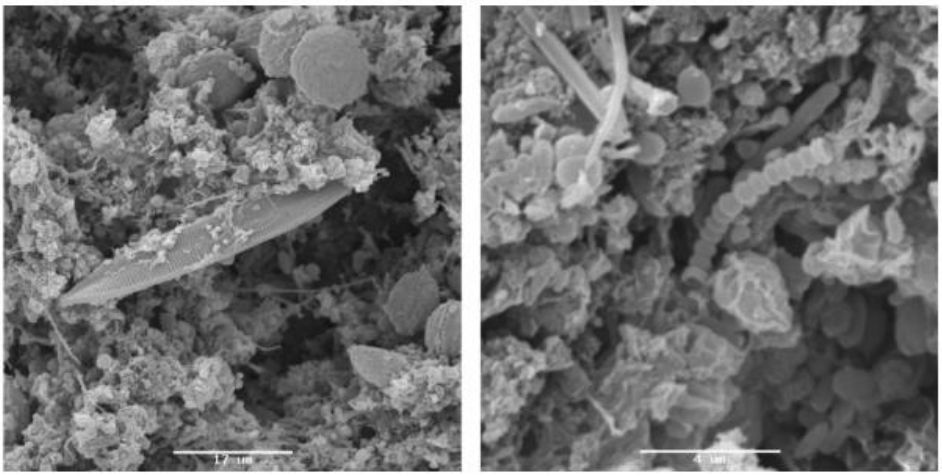


Figure 20 Micrographies au microscope électronique à balayage du biofilm développé dans une conduite d'irrigation alimentée avec des eaux traitées. (Dosoretz *et al.*, 2010)

Quelques études ont également exploré la composition microbiologique des biofilms directement dans les goutteurs alimentés avec des eaux traitées en utilisant la quantification et la caractérisation des acides gras phospholipidiques (PLFAs) (Yan *et al.*, 2010, 2009). La méthode des PLFAs et la quantification des EPS ont été reprises dans de nombreuses études pour comprendre la mise en place du colmatage biologique dans les goutteurs (Y. Li *et al.*, 2019a; Song *et al.*, 2017; Yan *et al.*, 2010; Zhou *et al.*, 2017b, 2015, 2013). Les PLFAs les plus abondants étaient d'origine bactérienne et étaient significativement corrélés à la réduction des débits des goutteurs, au même titre que la concentration en EPS. Il a été montré que la diversité des PLFAs augmentait au cours du temps avec le degré de colmatage des goutteurs (Zhou *et al.*, 2017). La concentration des PLFAs diminue avec la vitesse de l'écoulement, elle-même dépendante des dimensions de la section de l'écoulement (Y. Li *et al.*, 2019a). Elle a également été utilisée pour évaluer l'effet des méthodes de prévention du développement du colmatage telles que la chloration (Song *et al.*, 2017) ou la purge hydrique (Li *et al.*, 2015). Song *et al.*, (2017) ont montré que les concentrations et la diversité en PLFAs dans les biofilms fixés dans le canal du labyrinthe ont été réduites par les traitements de chloration (2,5 ppm pendant 2 heures). Li *et al.*, (2015) ont observé que purger une fois toutes les deux semaines permettait de diminuer le contenu en PLFA, mais n'influençait pas la distribution des PLFAs dominants. Cependant, cette méthode ne permet pas d'identifier les espèces présentes dans les échantillons (Douterelo *et al.*, 2014). C'est pourquoi plusieurs auteurs recommandent l'utilisation des

méthodes de séquençage ADN haut débit afin de mieux caractériser les espèces microbiennes responsables du colmatage et d'optimiser les méthodes de contrôle (Yan *et al.*, 2010; Yao and Habimana, 2019; Zhou *et al.*, 2017b). Sánchez *et al.*, (2014) ont étudié les communautés microbiennes colonisant un système d'irrigation au goutte-à-goutte (conduite et goutteur) en utilisant l'électrophorèse sur gel à gradient dénaturant et le séquençage de l'ARNr 16S. Une dominance de microorganismes thermophiles (p. ex. Firmicutes) a été observé ce qui pourrait être lié aux températures élevées dans la serre. Ces études permettent d'obtenir des informations détaillées et essentielles pour identifier les microorganismes présents dans ces biofilms et ainsi, optimiser les méthodes de contrôles du colmatage. Cependant, la caractérisation des microorganismes présents dans les biofilms est rarement réalisée simultanément à une observation directe du colmatage dans les goutteurs au cours du temps, et ne permet donc pas de relier la dynamique de formation du colmatage à la concentration de ces microorganismes. De plus, bien que non explorés dans les cas des biofilms des conduites et des goutteurs des systèmes de micro-irrigation, les techniques de séquençage de l'ADN permettent également de mettre en évidence la présence de microorganismes pathogènes dans les systèmes utilisant des eaux traitées. Par exemple, Obayomi *et al.*, (2019a, 2019 b) ont montré la présence de séquences d'ADN associées à plusieurs espèces pathogènes telles que *Acinetobacter lwoffii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas alcaligenes* ou encore *Ralstonia mannitollytica* dans les eaux traitées, le sol et sur les produits à consommer (concombre, melon) irrigués avec ces eaux. Les concentrations étaient cependant similaires à celles retrouvées en irriguant avec des eaux de surface. Étant donné que la présence de ces pathogènes peut altérer la qualité de l'eau d'irrigation comme montrée dans le cas des biofilms des systèmes de distribution d'eau potable, l'utilisation des méthodes de séquençage haut débit apparaît pertinente pour détecter les microorganismes pathogènes présents dans les biofilms colonisant les systèmes de micro-irrigation.

- La formation des biofilms est un processus non linéaire complexe faisant intervenir des facteurs biotiques (c.-à-d. type de microorganismes, interactions entre les microorganismes) et abiotiques (c.-à-d. température, pH, quantité de nutriments, caractéristiques des matériaux, conditions hydrodynamiques).

- Le développement des biofilms dans les systèmes de micro-irrigation est influencé par les conditions de l'écoulement dans le labyrinthe. Plus la vitesse, l'énergie de turbulence et le cisaillement sont élevés, moins il y aura de biofilms. En effet, l'augmentation du cisaillement favorise le détachement du biofilm.

- L'augmentation de l'énergie cinétique de turbulence et du cisaillement favorise le développement d'un biofilm moins épais, mais plus stable en augmentant la densité et la cohésivité, notamment au niveau des couches les plus proches de la surface.

- Bien que des méthodes existent pour limiter le colmatage des systèmes de micro-irrigation (chloration, purge hydrique) et allonger la durée de vie du système, ces méthodes ne permettent pas de le supprimer totalement et des mécanismes de résistance des microorganismes semblent se mettre en place.

- Les microorganismes responsables du développement des biofilms dans les systèmes de micro-irrigations alimentés avec des eaux usées traitées sont peu étudiés. Cependant, cette caractérisation reste indispensable pour optimiser les méthodes de contrôle.

V. CONTEXTE ET OBJECTIF DE LA THÈSE

A. *Contexte de la thèse : La REUT en Méditerranée*

Avec environ 20 000 stations d'épuration dont 3500 de plus de 2000 EH (équivalent habitant), la France dispose d'un important potentiel de développement. Sur le bassin méditerranéen, des sécheresses intenses et plus fréquentes sont attendues, ainsi qu'une hausse des températures (+2,2 à 3,5 °C d'ici 2040) accompagnée de la modification du régime des précipitations (Réseau MedECC, 2019). Ces impacts illustrent la vulnérabilité du bassin Rhône-Méditerranée et la nécessité d'économiser les ressources en eau et de réduire la pression polluante sur les eaux de surface et souterraines, tout en conservant une production agricole en adéquation avec la future démographie et ses besoins alimentaires.

Plusieurs projets de réutilisation des eaux usées traitées en zone méditerranéenne ont montré la faisabilité à utiliser ces eaux. Ces projets sont principalement financés soit par l'État, soit par les collectivités locales pour des problématiques ponctuelles comme le projet Irri-Alt'Eau (2013 – 2015, 1525 k€) financé par l'agglomération du Grand Narbonne et la région Languedoc-Roussillon. L'objectif de ce projet était de développer une pratique raisonnée, durable et économiquement viable de l'irrigation en goutte-à-goutte de la vigne avec des eaux usées traitées. Le projet NOWMMA (New process for Optimizing Wastewater reuse from Mauguio to the Mediterranean Area in support of the French Reuse Directive, 2011-2015, 2.2 M€) avait pour objectif de développer une filière complète de REUT transposable en France et dans le bassin Méditerranée, facilement adaptable aux situations locales, et pour laquelle la maîtrise des risques sanitaires et technologiques est démontrée.

Le projet financé par l'Agence de l'Eau Rhône-Méditerranée-Corse dans lequel s'intègre cette thèse de doctorat regroupe un consortium de laboratoires de recherches comprenant le Laboratoire de Biotechnologie de l'Environnement (LBE) et l'UMR Gestion de l'Eau et de ses Usages (G-EAU) de l'Institut National de Recherche pour l'Agriculture, l'Alimentation et l'Environnement (INRAE), l'Institut européen des Membranes (IEM), HydroSciences Montpellier (HSM) ainsi que Montpellier Méditerranée Métropole (3 M), afin d'étudier la faisabilité technique au sein d'une plateforme expérimentale et d'évaluer les impacts agronomiques, sanitaires et environnementaux d'une filière de réutilisation des eaux usées traitées pour l'irrigation en goutte-à-goutte.

Au sein du bassin Méditerranéen, la commune de Murviel-lès-Montpellier (75ha) se situe en zone de déficit en eau. Autour de cette commune, certaines parcelles sont allouées à la production de vignes et sont classées en Appellation d'Origine Contrôlée (AOC). Le maintien

de l'agriculture dans cette zone est primordial pour une commune située en bordure d'une métropole en développement. Depuis de nombreuses années, de nombreuses parcelles sont abandonnées du fait d'un manque d'eau. Les cultures les plus impactées sont l'arboriculture et la vigne. L'accès à l'eau est donc vital pour les agriculteurs de la commune. La réutilisation des eaux usées traitées apparaît comme une réelle solution pour réduire les tensions à la fois sur l'eau, mais aussi sur le devenir de la viticulture dans la zone.

L'effluent utilisé durant ces travaux provenait de la station de traitement des eaux usées de Murviel-lès-Montpellier qui a été choisie, car l'accès à l'eau pour l'irrigation conditionnera dans un avenir proche le maintien de l'activité agricole, et de la viticulture en particulier autour de la commune. La station d'épuration rejette également d'importantes quantités d'azote et de phosphore dans le milieu (Annexe « Introduction », Tableau S1), considéré comme sensible, et accroît la pression de pollution. Dans ce contexte, la réutilisation des eaux usées traitées pour l'irrigation apparaît comme une solution pertinente pour diminuer la pollution et préserver le milieu sensible, faciliter l'accès des agriculteurs à la ressource en eau pour l'irrigation et valoriser les nutriments des eaux usées à des fins agronomiques. Le traitement de l'eau usée de la station de traitement des eaux usées de Murviel-lès-Montpellier se fait par lagunage.

En 2008, 31 % des stations de moins de 2000 EH privilégiaient des stations par lagunage (Eaufrance, 2011). Ce type de traitement est l'un des plus adaptés pour les petites et moyennes communes et est recommandé pour les zones à climat chaud et les pays en développement, car c'est un procédé biologique simple (Figure 21), écologique, rustique, fiable et peu onéreux du fait de son fonctionnement non mécanisé (Ho *et al.*, 2017). De plus, le climat des zones arides et semi-arides (température et ensoleillement élevés) permet d'optimiser les performances du traitement (Von Sperling, 2015).

Les bassins dits « facultatifs » favorisent la croissance des algues et des microorganismes hétérotrophes, qui dégradent la matière organique présente dans l'eau. Les microalgues assimilent une partie de l'azote et du phosphore contenus dans les eaux usées, tout en produisant de l'oxygène par photosynthèse, lequel permet l'activité des bactéries aérobies et la photo-oxydation (Reinoso *et al.*, 2008) au niveau de la couche supérieure. La dégradation de composés organiques complexes (tels que les hydrates de carbone, les graisses et les protéines) par les bactéries aérobies produit des substances inorganiques plus simples : dioxyde de carbone (CO_2), ammoniac (NH_3), nitrates (NO_3), nitrites (NO_2), phosphates (PO_4) et autres nutriments nécessaires aux microalgues. En revanche, le fond sédimentaire est pauvre en oxygène dû à l'absence de photosynthèse. On va retrouver des microorganismes anaérobies permettant une

dénitrification partielle des nitrites et conduit à des réactions de fermentation anaérobie (production d'hydrogène sulfuré). Les organismes aérobies et anaérobies travaillent ensemble pour atteindre des réductions de la demande chimique en oxygène (DCO) allant jusqu'à 85 %. Les bassins de maturation ou de clarification sont moins profonds (environ 1 m) et sont essentiellement conçus pour l'élimination des pathogènes et la rétention des solides en suspension. Les principaux mécanismes d'élimination des bactéries fécales dans les bassins de maturation et les bassins facultatifs sont le temps de rétention, la température, un pH élevé (> 9) et une forte intensité lumineuse. Les performances de traitement seront fortement liées au taux de radiation (ensoleillement) au cours du temps (effet saison, alternance jour/nuit), au vent, à la pluie et à la température de l'air qui vont influencer la croissance des algues, de la production en oxygène, du pH ainsi que l'abattement de l'azote et du phosphore (Ho *et al.*, 2018).

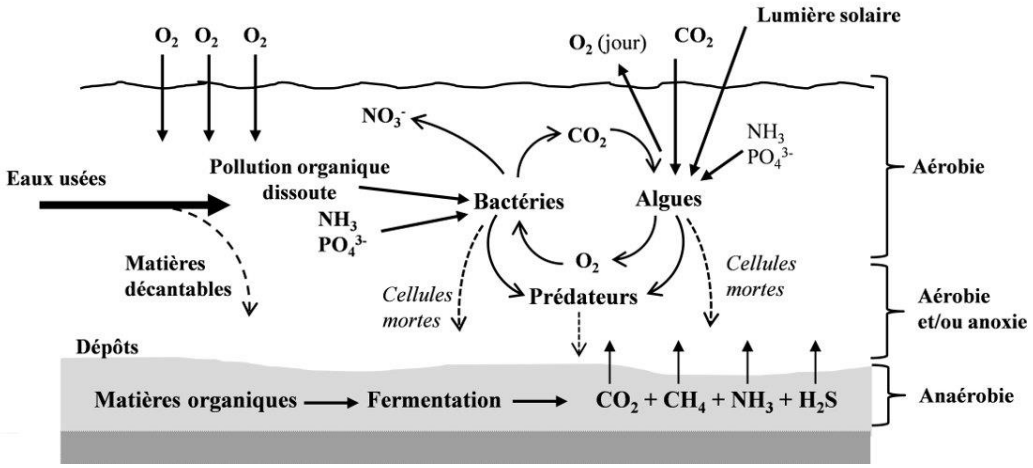


Figure 21 Voies d'élimination des pollutions organique, azotée et phosphorée par lagunage

B. Objectifs de la thèse

Lors de l'irrigation avec des eaux usées traitées, le colmatage dépend de la qualité de l'eau et notamment des matières en suspension présentes, du développement du biofilm et des précipitations chimiques. Contrairement aux systèmes de distributions d'eau potable et aux procédés de traitements des eaux usées, les facteurs, biotiques et abiotiques, influençant le développement du biofilm dans les systèmes d'irrigation sont peu connus.

En particulier, l'étude bibliographique a montré :

- Une méconnaissance de l'effet de l'écoulement dans un goutteur et de la qualité de l'eau sur la mise en place du colmatage
- Une méconnaissance des impacts des technologies de traitement sur les communautés microbiennes
- La difficulté d'avoir des études cinétiques de développement des biofilms et des communautés microbiennes en parallèle
- Le potentiel sous-exploité des techniques moléculaires
- Un manque d'information concernant les impacts sanitaires du colmatage

L'objectif de ce travail de thèse est d'apporter des éléments de compréhension concernant les processus en jeu dans la formation des biofilms des systèmes de micro irrigation à travers des expérimentations sur le terrain, mais aussi en conditions contrôlées au laboratoire. L'originalité de ce travail réside dans les paramètres étudiés (écoulement dans le labyrinthe, qualité de l'eau) et dans la méthodologie, combinant l'étude de la composition microbienne des biofilms des goutteurs par des techniques moléculaires (qPCR et séquençage haut débit) et la caractérisation de la cinétique de colmatage par Tomographie en Cohérence Optique (TCO). L'effet des méthodes de prévention (chloration, purge hydrique) du développement du colmatage sur la cinétique et la composition microbienne des biofilms a été étudié dans le but de mieux comprendre les mécanismes de résistance. La caractérisation des communautés microbiennes a également pour objectif de répondre aux questions concernant le rôle potentiel des biofilms pouvant héberger des microorganismes pathogènes, ce qui n'a pas encore été étudié.

Ainsi, 4 expérimentations ont été mises en place en laboratoire et sur le terrain :
(1) L'impact de la qualité de l'eau (eau usée brute versus eau usée traitée) sur la mise en place du colmatage des systèmes de micro-irrigation. Trois types de traitement étaient initialement prévus dans le projet dans lequel s'intègre la thèse, mais suite à des difficultés de mise en œuvre des traitements alternatifs ou complémentaires (traitement UV et bioréacteur à membrane), seules les eaux usées brutes et traitées en sortie de lagunage ont été comparées (Chapitre 1). L'hypothèse initiale était que le niveau de colmatage sera plus important lors de l'utilisation d'eau usée non traitée et que la composition microbienne des biofilms sera dépendante du traitement de l'effluent.
(2) Une étude sur le terrain a aussi été menée afin de faire un premier état des lieux des microorganismes associés au colmatage d'un système de micro-irrigation alimenté en eau usée traitée en conditions réelles. Les biofilms des goutteurs et de la conduite ont été comparés,

l'hypothèse étant que les conditions hydrodynamiques très différentes entre conduite et goutteur influencent la structure et la composition des communautés microbiennes des biofilms (Chapitre 2).

(2) La seconde étude a pour objectif d'étudier à l'échelle laboratoire l'effet de l'écoulement sur la cinétique de mise en place et la composition microbienne des biofilms des goutteurs. Pour cela, 3 types de goutteurs avec des caractéristiques d'écoulements spécifiques (débit, géométrie du labyrinthe) ont été choisis. Le postula est que la cinétique de développement sera fonction de l'écoulement et que les microorganismes impliqués dans la mise en place du biofilm varient d'un type de goutteur à l'autre, illustrant l'effet de sélection induit par les caractéristiques de l'écoulement (Chapitre 3).

(3) La dernière étude a eu pour objectif d'étudier l'effet des méthodes de nettoyages (chloration et purge hydrique, combinées ou non) sur le contrôle du colmatage. Plusieurs études ont mis en évidence que bien que ces méthodes soient efficaces pour rallonger la durée de vie des systèmes de micro-irrigation, elles ne permettent pas de supprimer le biofilm du fait des mécanismes d'adaptation et de résistances des bactéries que nous avons cherché à décrire en comparant les microbiotes traités à une ligne témoin ne recevant aucun traitement. L'hypothèse de travail est que la purge comme la chloration vont induire une sélection des microorganismes sensibles ou non au traitement. Enfin un objectif opérationnel a été de définir le meilleur traitement : purge, chloration, ou la combinaison des deux (Chapitre 4).

MATERIELS ET METHODES

Ce chapitre présente la méthodologie adoptée au cours de ce travail de thèse. Des expérimentations sur le terrain (parcelle expérimentale et serre) ont été réalisées et ont permis d'étudier et d'analyser le développement du colmatage dans les conditions les plus proches de la réalité. Afin de comprendre les mécanismes et processus sous-jacents au développement du colmatage, des expérimentations à l'échelle laboratoire sous conditions contrôlées ont été réalisées (banc d'essai) (Figure 22). Les dispositifs expérimentaux et les protocoles utilisés pour l'étude du développement des biofilms dans les goutteurs et conduites des systèmes d'irrigation sont détaillés. Les techniques de suivi et de mesure communs à l'ensemble des expérimentations, utilisés pour la caractérisation du biofilm (Tomographie en Cohérence Optique) et la caractérisation des communautés microbiennes (Séquençage Illumina, qPCR) y sont également développés. Les protocoles spécifiques à une expérimentation tels que ceux pour quantifier les groupes microbiens d'intérêt sanitaire, sont décrits dans le chapitre correspondant.

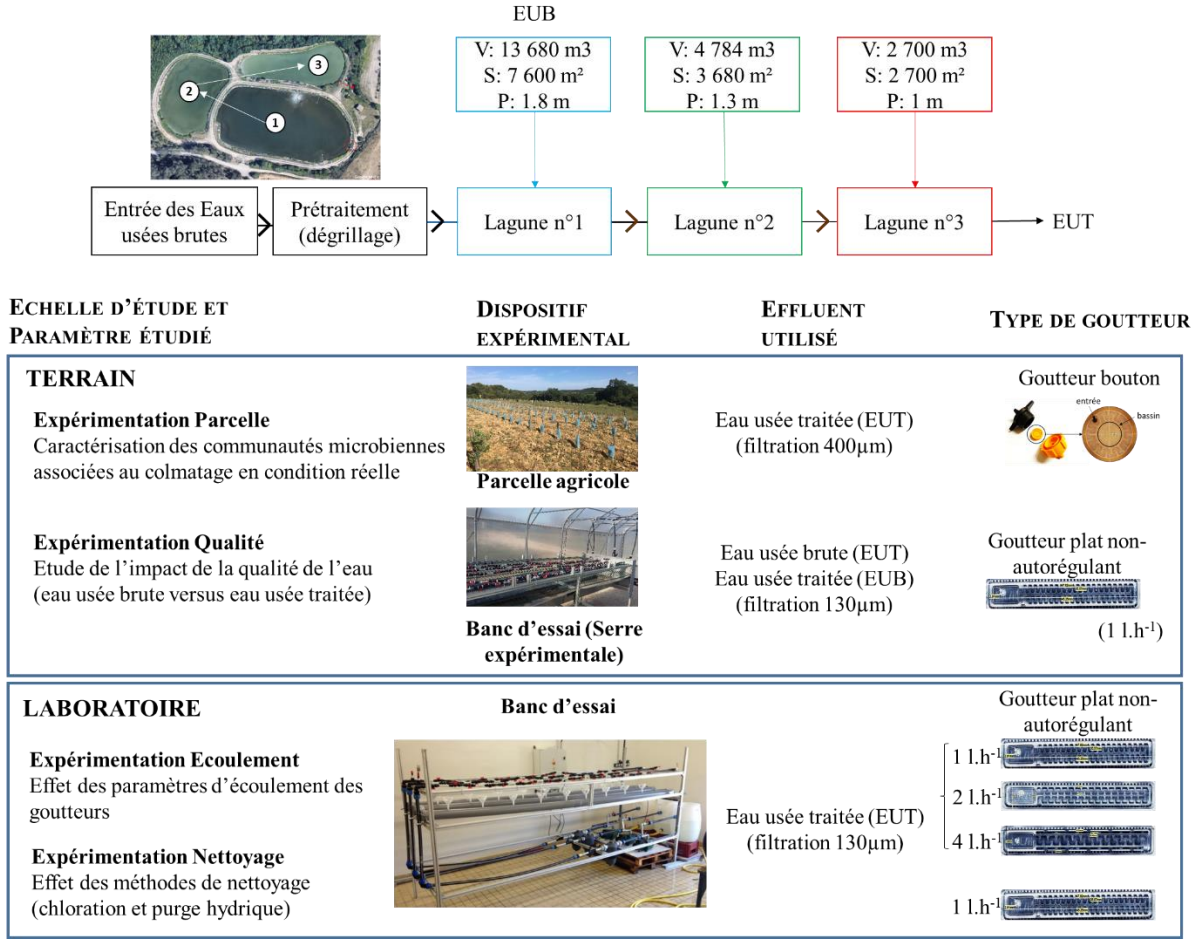


Figure 22 Schéma bilan des différentes expérimentations réalisées pendant la thèse. V : volume, S : Surface, P : profondeur.

I. CARACTÉRISATION DE L'EFFLUENT

La station de traitement des eaux usées de Murviel-lès-Montpellier (43.605034° N, 3.757292° E), mise en service en 1995, repose sur le principe du lagunage naturel (sans aération forcée). La station de traitement des eaux usées de Murviel-lès-Montpellier dispose d'une capacité nominale de 1 500 EH. Le débit annuel moyen journalier entrant en eaux usées brutes était de 240 m^3/jour en moyenne en 2018 (1490 EH). Il est constitué de 3 bassins successifs (2 bassins facultatifs et 1 bassin de maturation) (Figure 23).

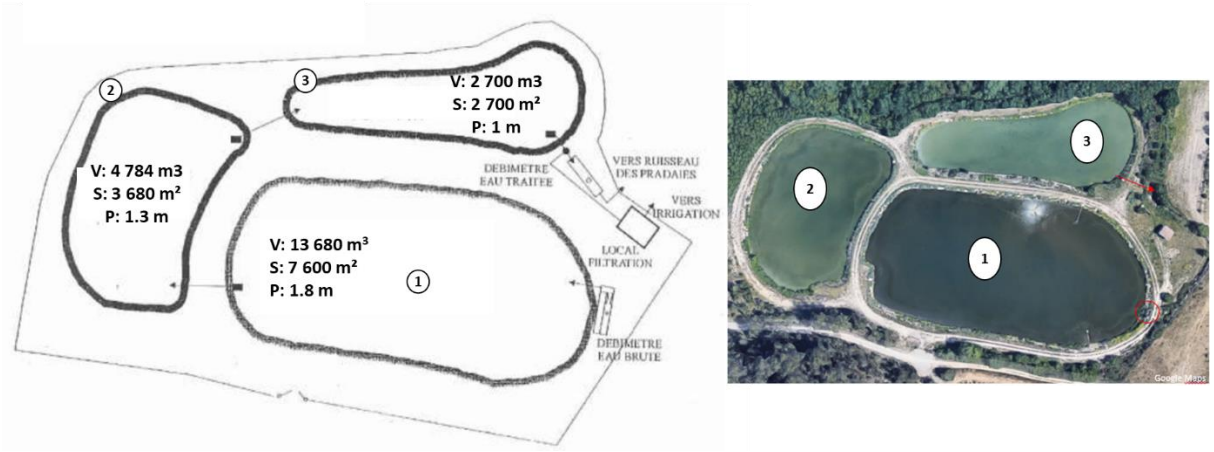


Figure 23 Schéma de la station d'épuration des eaux usées de la commune de Murviel-les-Montpellier. Les lagunes 1 et 2 sont des lagunes dites « facultatives ». La lagune 3 est un bassin de maturation. V : volume; S : surface; P : profondeur.

Les effluents utilisés arrivant (effluent brut) et sortant de la station (effluent traité) ont été réalisés pour les différentes expérimentations. Contrairement à des eaux synthétiques, les eaux usées sont hétérogènes d'un point de vue physico-chimique et microbiologique. C'est pourquoi des analyses physico-chimiques et microbiologiques ont été effectuées régulièrement. L'eau traitée alimentant les bancs d'essai a été prélevée dans un bac tampon situé après la dernière lagune à l'aide d'une pompe vide cave. Pour l'expérimentation qualité de l'eau, l'eau usée brute (lagune n° 1, en bleu) et l'eau usée traitée (sortie de la lagune n° 3) ont été utilisées. L'eau brute et l'eau traitée ont été filtrées avant d'alimenter le banc d'essai et la parcelle agricole afin de supprimer les grosses particules et de respecter le niveau de filtration recommandé par le fabricant pour les goutteurs utilisés.

A. Caractérisation physico-chimique des effluents

1. Paramètres mesurés

Des analyses physico-chimiques ont été effectuées pour évaluer la qualité des eaux usées en entrée et en sortie du lagunage au regard de la réglementation en vigueur. Des prélèvements de l'effluent de la sortie ont été réalisés au minimum toutes les deux semaines durant les périodes expérimentales afin d'étudier la variabilité au cours du temps des caractéristiques de l'effluent. La demande chimique en oxygène (DCO), la quantité de matière en suspension, les concentrations en ammonium, en nitrates et en phosphore (mg l^{-1}) ont été mesurées avec un spectrophotomètre (DR1900, Hach Company, Loveland, CO, USA) en utilisant les réactifs Hach® (Tableau 7). La conductivité et le pH ont été mesurés avec des sondes (TetraCon® 925 et pH -Electrode Sentix® 940, WTW, Wilhelm, Allemagne).

Tableau 7 Récapitulatif des paramètres et kits utilisés

Paramètre	Formule	Unité	Kit	Mesure après	Longueur d'onde (λ)
DCO		$mg.l^{-1}$	LCK 614	148°C —120 min	448
Phosphore	PO_4^-	$mg.l^{-1}$	LCK 350	100°C —60 min	714
Ammonium	NH_4^+	$mg.l^{-1}$	LCK 303	T°C $_{ambiante}$ — 15 min	694
Nitrate	NO_3^-	$mg.l^{-1}$	LCK 339	T°C $_{ambiante}$ — 15 min	345

Les matières en suspension (MES, en $mg.l^{-1}$) sont définies comme l'ensemble des particules retenues par un filtre de porosité spécifique, 1,2 µm. Cette mesure était réalisée suivant la norme NF EN 872 (AFNOR 2005). Un filtre en fibre de verre (1,2 µm), préalablement pesé (M0), est déposé sur un dispositif de filtration relié à une pompe d'aspiration sous vide. Le volume filtré (V) est généralement compris entre 100 et 300 ml selon la teneur en MES. Les filtres sont placés à l'étuve à 105°C pendant environ 4 h puis pesés en utilisant une balance de précision (± 0,001 g) (M1). La teneur en matière en suspension contenue dans l'échantillon est ainsi égale à la différence entre la masse du filtre sec avant et après la filtration :

Équation 4 Calcul de la concentration en MES

$$MES = \frac{M1-M0}{V}$$

2. *Résultats*

Les principales caractéristiques de l'effluent traité sont présentées dans l'Annexe "Matériels et Méthodes" Figure S1. Concernant l'expérimentation « Qualité », les niveaux de DCO et de MES dans les eaux usées brutes sont divisées par 2 à 3 dans les eaux usées après traitement (DCO_{EUB} : 450 ± 31,3, DCO_{EUT} : 206,4 ± 20,4 ; MES_{EUB} : 175,6 ± 64.6, MES_{EUT} : 54,8 ± 30,7) mais restaient supérieurs au niveau de recommandation pour la qualité A.

Pour toutes les expérimentations, la concentration en MES et DCO dans les EUT étaient supérieures à celles fixées pour atteindre la qualité A de la réglementation française. Ces valeurs limites sont celles attendues après un traitement des eaux usées par boues activées contre <125 $mg.l^{-1}$ et <150 $mg.l^{-1}$ pour la DCO et les MES respectivement dans le cas du lagunage naturel (Boutin *et al.*, 2009)**.** Les valeurs de MES indiquent un risque élevé de colmatage (Chapitre « Introduction », Tableau 5). Les résultats de la station de Murviel-les-Montpellier pour l'abattement de la DCO et des MES confirme qu'avec ce type de traitement, il est difficile d'atteindre un niveau de qualité A pour l'irrigation.

B. Paramètres microbiologiques des effluents

1. *Paramètres mesurés*

Dans le cas d'un traitement par lagune naturel, les agents pathogènes sont éliminés des eaux usées ou inactivés par une série de mécanismes différents qui se produisent à des rythmes différents. L'efficacité de ces mécanismes dépend d'un certain nombre de facteurs environnementaux, de la conception et du fonctionnement de la station d'épuration (Tableau 8). Le facteur le plus important pour l'élimination des agents pathogènes viraux et bactériens est l'exposition à la lumière du soleil, bien que d'autres facteurs tels que la température, l'oxygène dissous et le pH soient également importants. La sédimentation, l'efficacité hydraulique, l'exposition à la lumière du soleil (UV), la sédimentation et les facteurs physico-chimiques (y compris la température et le pH) sont tous des facteurs importants pour l'élimination des protozoaires pathogènes. Les différents types d'agents pathogènes qui sont éliminés par le même mécanisme ne sont pas nécessairement éliminés au même rythme par ce mécanisme. Par exemple, les virus et les bactéries sont tous deux endommagés par la lumière du soleil, mais les virus sont généralement plus résistants que les bactéries (Davies-Colley *et al.*, 2005; Kohn *et al.*, 2016). Le tableau 8 présente les abattements classiquement observés en fonction des indicateurs.

Tableau 8 Abattement des organismes pathogènes et indicateurs dans les systèmes de bassins de stabilisation (source Von Sperling, 2015)

	Efficacité d'abattement dans les bassins		
Paramètres	**Facultatif**	**Anaérobie**	**Maturation**
Coliformes	1-2 log	1-2 log	3-6 log
Bactéries pathogènes	1-2 log	1-2 log	3–6log
Virus	< 1 log	< 1 log	2-4 log
Protozoaires (spores)	100 %	100 %	100 %
Helminthes (œufs)	100 %	100 %	100 %

Des analyses par un laboratoire prestataire accrédité ont été réalisées sur les quatre paramètres microbiologiques de la réglementation en vigueur au moment des expérimentations, afin de vérifier l'efficacité du traitement (analyses des eaux brutes et de l'eau usée traitée) (Annexe « Matériels et Méthodes », Tableau S1). De plus, un suivi des indicateurs de contamination fécale a été réalisé en routine pendant les périodes expérimentales au laboratoire par méthode Idexx (coliformes totaux, *E. coli* et entérocoques) et par PCR quantitative (*E. coli*, *Enterococcus* spp) (Annexe « Matériels et Méthodes », Figure S2). La méthode PCR quantitative est décrite dans le chapitre « Matériels et Méthodes ».

Principes de la méthode IDEXX: Les coliformes fécaux, *E. coli* et les entérocoques ont été quantifiés à l'aide de la méthode IDEXX (Colilert18 et Enterolert, IDEXX Laboratories, Westbrook, ME) conformément aux recommandations du fournisseur. Facile à mettre en place en routine, elle permet de suivre la qualité microbiologique d'un effluent. Cette méthode colorimétrique est basée sur l'hydrolyse spécifique d'un substrat par l'espèce ou le groupe de microorganismes recherchés (Tableau 9).

La quantification des microorganismes ciblés est réalisée par la méthode du Nombre le Plus Probable (NPP). Pour cela, l'échantillon à analyser est réparti dans des puits sur une plaque scellée (Quanti-tray 2000). La limite de quantification est 1 NPP/100 ml. La méthode du NPP est basée sur deux hypothèses principales :

- Les microorganismes sont distribués aléatoirement au sein du volume
- Un puit sera positif si au moins un microorganisme cible est présent

Une table de calcul est fournie avec la méthode.

Tableau 9 Réactions enzymatiques impliquées dans les tests Idexx Colilert-18 (coliformes et *E. coli*) et Enterolert-E (entérocoques) (ISO, 2014)

Microorganismes cibles	**Enzyme recherchée**	**Substrat spécifique**	**Produit de la dégradation**	**Incubation**
Coliformes	β-D-galactosidase	ortho-nitrophényl-β-galactopyranoside (OPNG)	O-nitrophényl (ON) — coloration jaune	18h – 36°C
Escherichia coli	β-D-glucuronidase	4-méthylumbélliféryl-β-D-glucuronide (MUG)	Méthylumbelliferone (MUF) — fluorescent sous UV	
Entérocoques	β-D-glucosidase	4-méthylumbélliféryl-β-D-glucoside (MUD)		24h – 41°C

2. Résultats

Au regard de la réglementation en vigueur, la qualité de l'effluent traitée est C à D. Les abattements entre l'entrée et la sortie sont de l'ordre de 2,7 à 4,5 log pour les entérocoques et 2,6 à plus de 3 log pour les bactériophages ARN-F (Tableau S1, "Matériels et Méthode") correspondant à ce qui peut être attendu avec ce type de traitement (Von Sperling, 2015). Par contre, le suivi des spores des bactéries sulfito-réductrices (SBASR) tels que *Clostridium perfringens* montrait un faible abattement avec le système de traitement par lagune. Liu, Hall and Champagne (2020) ont montré que *C. perfringens* était capable de résister à des modifications de pH et de température, expliquant le faible abattement.

II. DISPOSITIF EXPÉRIMENTAL

A. Expérimentations à l'échelle Laboratoire : « Écoulement » & « Nettoyage »

La formation d'un biofilm dans les goutteurs commerciaux ne peut pas être observée dans le temps, car les goutteurs sont directement placés dans la conduite d'irrigation. Ainsi, pour analyser la composition et la structure du colmatage des goutteurs, il est nécessaire d'ouvrir la gaine et d'en extraire le goutteur. Cependant, cette extraction ne permet pas de suivre le développement du colmatage dans le temps et peut endommager le biofilm. C'est pourquoi un

dispositif permettant un accès optique *in situ* tout en utilisant des goutteurs réels a été développé.

1. *Caractéristiques des goutteurs utilisés*

Des goutteurs à pression non compensés (NPC) (modèle D2000, Rivulis Irrigation SAS, Lespinasse, France) avec différents débits (1, 2 et 4 $l.h^{-1}$) (Figure 24) ont été utilisés pour l'ensemble des expérimentations en laboratoire. Ce type de goutteur (non autorégulant) est le plus utilisé en agriculture. En plus de faire partie de la gamme des débits les plus couramment utilisés, ces débits ont permis d'étudier l'effet de l'écoulement sur la mise en place du colmatage des goutteurs.

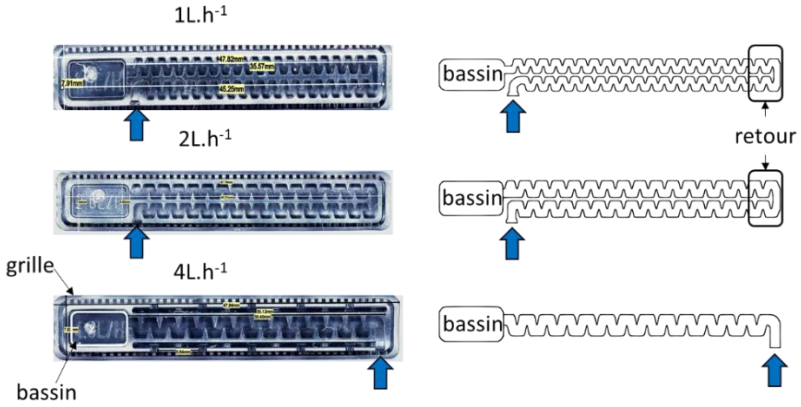


Figure 24 Goutteurs utilisés. Les goutteurs font 45,2 mm de longueur et 5,8 mm de largeur. Avant d'arriver au niveau de l'entrée du labyrinthe (flèche bleue), l'eau passe à travers une grille directement associée au goutteur qui joue le rôle d'un filtre, permettant de réduire les risques de colmatage liés à de grosses particules. L'eau finit par arriver au niveau du bassin connecté à l'extérieur permettant de délivrer l'eau sous forme de goutte-à-goutte. À droite figure la géométrie du labyrinthe de ces goutteurs. Contrairement au goutteur 4 $l.h^{-1}$, le labyrinthe des goutteurs 1 et 2 $l.h^{-1}$ est plus long et possède une zone de retour.

Le tableau 10 énumère les caractéristiques des goutteurs utilisés. L'écoulement est caractérisé par le nombre de Reynolds (Re). Suite à la géométrie du goutteur, ce nombre va varier le long du goutteur. C'est pourquoi celui-ci est défini ici au niveau de la zone d'entrée. Le nombre de Reynolds (Re) a été calculé à l'aide de la formule suivante :

Équation 5 Calcul du Nombre de Reynolds

$$Re = \frac{\rho v Dh}{\mu}$$

où ρ est la densité de l'eau ($kg.m^{-3}$), v la vitesse de l'eau à l'entrée du canal ($m.s^{-1}$), D_h le diamètre hydraulique (m), et μ la viscosité dynamique de l'eau (Pa s).

Le diamètre hydraulique, Dh, a été calculé pour une section rectangulaire :

Équation 6 Calcul du diamètre hydraulique

$$Dh = \frac{4A}{P}$$

où A : surface (mm²) et P pour le périmètre (mm).

Le Re des goutteurs utilisés est compris entre 305 et 926 en entrée du labyrinthe. Ce Re correspond à un régime laminaire dans le cas des conduites droites. Cependant, dû à la géométrie du labyrinthe et la section millimétrique du canal, il est admis qu'à partir de Re > 300 en entrée dans les goutteurs, cela correspond à un régime turbulent (Li *et al.*, 2006; Zhang *et al.*, 2016). Cette transition au régime turbulent dans une conduite droite correspond à un Re >2000 (Karmeli 1977).

Tableau 10 Paramètres des goutteurs. *L* : longueur du labyrinthe, *W* : largeur du labyrinthe, *h* : profondeur du labyrinthe, q : débit, D_h : diamètre hydraulique, x : exposant, CV : coefficient de variation

q ($l.h^{-1}$)	*L* (mm)	*W* (mm)	*h* (mm)	D_h	Volume du labyrinthe (mm^3)	Re (entrée)	v ($m.s^{-1}$)	. x	CV (%)	Schéma du labyrinthe
1	103,4	1,01	0,8	1,02	127	305	0,34	0,4	1,4	
2	94,1	1,03	0,9	1,12	142	579	0,60	0,4	1,9	
4	47,4	1,35	1,1	1,17	129	926	0,78	0,4	2,5	

L'expérimentation « Écoulement » a montré que les goutteurs 1 $l.h^{-1}$ étaient les plus sensibles au colmatage (Chapitre 3). C'est pourquoi seuls ces goutteurs ont été utilisés dans le cas de l'étude suivante sur l'impact des méthodes de nettoyages (Chapitre 4) sur la mise en place et le développement du colmatage.

2. Dispositif expérimental avec accès optique

Les goutteurs NPC sont placés dans un tube transparent (diamètre interne 15 mm, TubClair, Vitry-le-François, France), ce qui permet d'avoir un accès optique et de suivre le

développement du biofilm le long du canal dans le temps (Figure 25). Un tube solide creux d'un diamètre interne de 19 mm (ABS+, Stratasys U-print SE plus, Stratasys Ltd, Eden Prairie, Minnesota, États-Unis) a été utilisé afin de bloquer le goutteur contre les parois du tube transparent. Enfin, un trou de sortie (diamètre interne de 2 mm) a été percé dans le tube transparent au niveau du bassin permettant à l'eau de sortie. Pour chaque étude, neuf goutteurs ont été reliés entre eux à l'aide d'un tube en polyéthylène (longueur 10 cm, diamètre interne 20mm) et de valves (diamètre interne 20mm) permettant de mimer des gaines d'irrigation (longueur totale 3m). Les valves ont été utilisées pour maintenir les goutteurs en eau lorsqu'ils étaient déconnectés de la ligne d'irrigation pour être analysés optiquement. À chaque période de prélèvements pour l'analyse des communautés microbiennes des biofilms, 3 goutteurs étaient sélectionnés permettant d'apprécier la variabilité des paramètres mesurés.

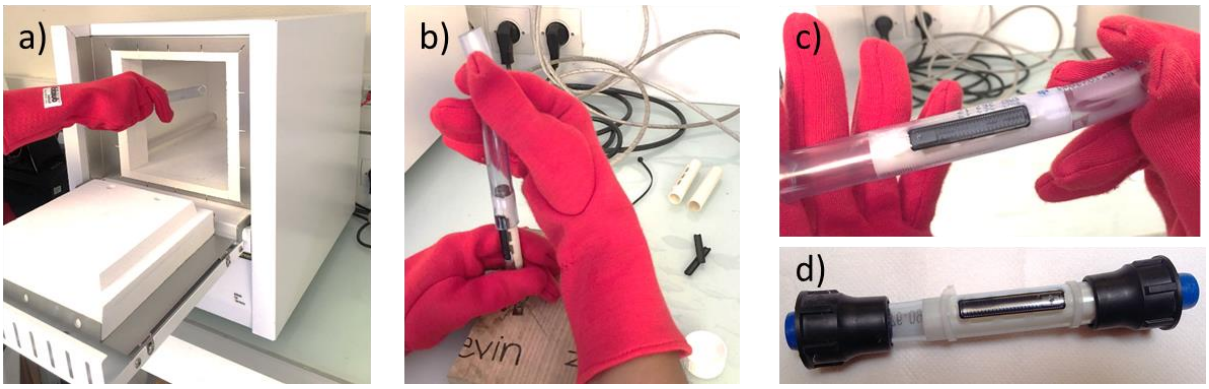


Figure 25 Conception des dispositifs « goutteur » permettant l'accès optique. a) le tube est chauffé quelques secondes afin de faciliter l'insertion b) insertion du tube creux, support du goutteur jusqu'à l'alignement de la partie bassin des goutteurs avec le trou de sortie c). d) Les valves sont ensuite connectées et permettront de relier les systèmes entre eux par l'intermédiaire de fragments de conduite d'irrigation réelle.

3. Banc d'essai

a. Expérimentation Écoulement

Les lignes d'irrigation ont été placées sur le banc d'essai alimenté avec de l'eau usée traitée prélevée en sortie de station d'épuration (Figure 26). Les lignes sont placées sur une structure métallique d'une hauteur de 1,5 mètre et d'une longueur de 4 mètres avec une pente de 10 % de manière à éviter tout piégeage d'air dans les conduites. Chacune des lignes a été connectée à un réservoir indépendant (volume total 60 l) et à une pompe (JetInox 82M, DAB, Saint-Quentin-Fallavier, France). Vu les volumes nécessaires pour alimenter le banc, les essais à l'échelle laboratoire fonctionnaient en recirculation.

La pression d'entrée a été réglée à 0,08 MPa à l'aide d'un réducteur de pression et contrôlée par un manomètre. Un filtre à tamis (maillage de 0,13 mm) a été installé pour réduire le colmatage physique des goutteurs, conformément aux recommandations techniques de ce type de goutteur. Une gouttière a été installée sous chaque ligne pour recueillir l'eau sortant des goutteurs. Les gouttières renvoyaient l'eau vers les réservoirs respectifs, permettant le recyclage de l'eau. Afin de limiter l'effet de la colonisation du système sur la composition de l'effluent stocké, l'eau de la cuve a été changée deux fois par semaine lors du premier essai (Expérimentation « Écoulement ») de façon à se rapprocher au maximum des conditions réelles. De plus, les cuves de stockage étaient nettoyées entre deux changements d'eau afin de limiter l'effet de la colonisation de la cuve sur la composition et la structure microbienne de l'eau changée.

La mesure de la DCO dans la cuve de stockage avant le renouvellement de l'effluent a montré une diminution relativement faible (DCO moyenne avant le changement : 136 ± 22 $mg.l^{-1}$, 97 ± 8 $mg.l^{-1}$ avant le renouvellement). C'est pourquoi, pour l'expérimentation « Nettoyage », l'eau de la cuve de stockage était changée une fois par semaine.

Les conduites étaient alimentées deux fois par jour, cinq jours sur sept, pendant 1h à température ambiante, avec un intervalle de 6h de repos afin d'accélérer la colonisation du système par rapport à des cycles d'irrigation classique. Les réservoirs et les lignes étaient recouverts d'un film opaque permettant de limiter l'exposition des systèmes (goutteur et réservoir) à la lumière pour reproduire l'environnement des conduites d'irrigation et pour prévenir le développement d'algues. Le débit de sortie des goutteurs était mesuré chaque semaine pour évaluer le colmatage des goutteurs. Les goutteurs sont considérés comme bouchés lorsqu'il y a une diminution ou une augmentation d'au moins 25 % du débit initial (Zhou *et al.*, 2017a).

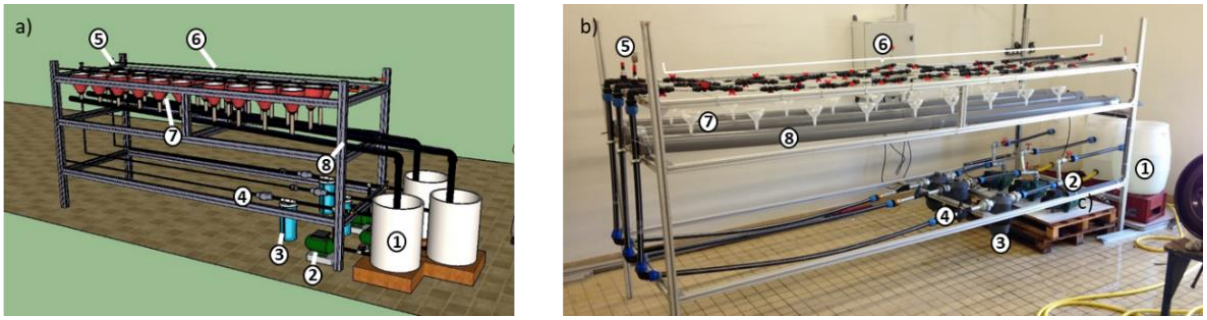


Figure 26 Banc d'essai utilisé pour les expérimentations « Écoulement » et « Nettoyage ». Composé d'un réservoir de 60 l (1), d'une pompe (2) ; un filtre à tamis à mailles de 0,13 mm (3) ; un réducteur de

pression (4); un manomètre (5); la ligne d'irrigation avec les systèmes goutteurs situés à intervalles de 10 cm (6); un collecteur (entonnoir) (7); une gouttière (8).

a. Expérimentation Nettoyage

Le même banc d'essai a été utilisé afin d'étudier l'effet des méthodes de nettoyage sur les cinétiques de formation du colmatage des goutteurs et sur la composition microbienne des biofilms. Au cours de cette expérimentation, les goutteurs 1 $l.h^{-1}$, identifié comme les plus sensibles au colmatage ont été utilisés afin d'évaluer l'effet des méthodes de nettoyage (Chloration et purge hydrique). Quatre lignes d'irrigation, composées de 9 systèmes goutteurs chacune, ont été installées sur le banc d'essai et alimentées indépendamment par de l'eau usée traitée contenue dans une cuve de 60 l : une ligne contrôle (sans traitement), une ligne chloration (1,5 ppm), une ligne purge (augmentation de la pression de 0,8 bar à 1,8 bar) et une dernière ligne combinant les deux méthodes. Les lignes ont été traitées une fois par semaine pendant 1 heure durant 2 mois. La concentration en chlore et la fréquence d'application (chloration et purge) utilisée sont référencées comme étant les plus efficaces pour limiter le colmatage des goutteurs (J. Li *et al.*, 2010; Lamm, 2013; J. S. Li *et al.*, 2012; Li *et al.*, 2015, 2018; J. Puig-Bargués *et al.*, 2010; Song *et al.*, 2017). Après cette période, les traitements ont été stoppés afin d'étudier la reprise du colmatage et l'effet de cette interruption sur la composition microbienne des biofilms.

B. Expérimentation Terrain

1. Parcelle agricole

L'objectif a été de caractériser les communautés bactériennes associées au système micro-irrigation (conduite et goutteur) alimenté avec de l'eau usée traitée à une échelle réelle. La parcelle agricole est située à Murvièl-Les-Montpellier (Hérault, France). Un tuyau d'irrigation (16 mm de diamètre) en polyéthylène de longueur 9,5 m a été placé sur cette parcelle. Dix-huit goutteurs non autorégulants (NPC J-Turbo Key Plus Dripper, Jain©), fonctionnant à un débit de 2 $l.h^{-1}$ à une pression nominale de 1 bar, ont été placés sur la conduite, espacés les uns des autres de 50 cm (Tableau 11). Ces goutteurs ont été choisis, car il était possible de les ouvrir afin de visualiser le colmatage du labyrinthe de ces goutteurs (Figure 27). Pour autant, il n'a pas été possible de suivre la formation du colmatage en continu avec ce type de goutteur.

Un manomètre a été installé à l'entrée de la ligne d'irrigation pour vérifier la pression de fonctionnement. L'eau traitée alimentant cette conduite d'irrigation était stockée dans un réservoir pendant 7 jours avant chaque irrigation et était filtrée à 400µm avec un filtre à tamis. Le débit de chaque goutteur a été mesuré une fois par semaine pour évaluer l'évolution du colmatage dans le temps. Le tableau 11 présente les caractéristiques des goutteurs utilisés. La ligne d'irrigation fonctionnait une fois par semaine pendant 1 heure pour irriguer de jeunes plants de vigne (12 semaines au total).

Tableau 11 Paramètres des goutteurs utilisés (Gamri *et al.*, 2014)

Paramètre	**Valeur**
Débit ($l.h^{-1}$)	2 à 100 kPa
Pression de fonctionnement (kPa)	50 à 120
Coefficient de variation	≤ 3 %
Filtration recommandée (µm)	130
Longueur du labyrinthe (mm)	12
Diamètre de la partie centrale (mm)	6
Largeur minimum (mm)	0,8
Profondeur (mm)	0,61
Nombre de Reynolds	220

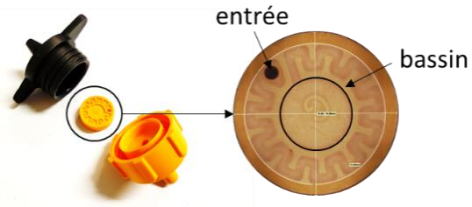


Figure 27 Goutteur utilisé pendant l'expérimentation Parcelle

2. Serre : Expérimentation « Qualité de l'eau »

L'objectif de cette étude a été d'évaluer l'impact du traitement de l'eau usée sur la mise en place et le développement du colmatage des systèmes de micro-irrigation en comparant des lignes irriguées avec des eaux brutes et des eaux traitées. Les systèmes permettant l'accès optique ont été utilisés avec des goutteurs 1 $l.h^{-1}$, identifiés comme sensibles au colmatage.

Un banc d'essai (Figure 28), similaire à celui utilisé pour les expérimentations en laboratoire a été placé sous une serre expérimentale connectée à la station d'épuration de Murviel-les-Montpellier, permettant ainsi une alimentation directe du banc et l'absence de recyclage de l'eau. Deux types d'effluents ont été utilisés : l'eau usée brute (après dégrillage, première lagune) et l'eau traitée (3ème lagune) après lagunage. Chacun de ces effluents alimentait des

lignes mimant des conduites d'irrigation installées sur un banc d'essai 2 fois par jour pendant 1 h à température ambiante. Chaque ligne comprenait 18 goutteurs (2 x 9 goutteurs par type d'effluent, pression de fonctionnement : 0,8 bar) permettant de prélever 3 goutteurs par temps d'échantillonnage pour le suivi optique et microbiologique du colmatage. En amont des lignes d'irrigations étaient placés 2 filtres à tamis (500 µm puis 130 µm) afin de respecter les normes de filtrations recommandées par le fabricant pour réduire les risques de colmatage liés aux particules physiques. La pression de fonctionnement était contrôlée par un manomètre. L'eau de sortie des systèmes goutteurs alimentés par des eaux usées traitées revenait dans le milieu tandis que l'eau brute en sortie des goutteurs était récupérée dans un bac de stockage puis rejetée dans la première lagune (lagune qui recevant les eaux brutes). Pendant son fonctionnement, le banc était placé dans le noir afin de mimer les conditions environnementales des lignes d'irrigation et de limiter le développement des algues. Les débits étaient mesurés une fois par semaine.

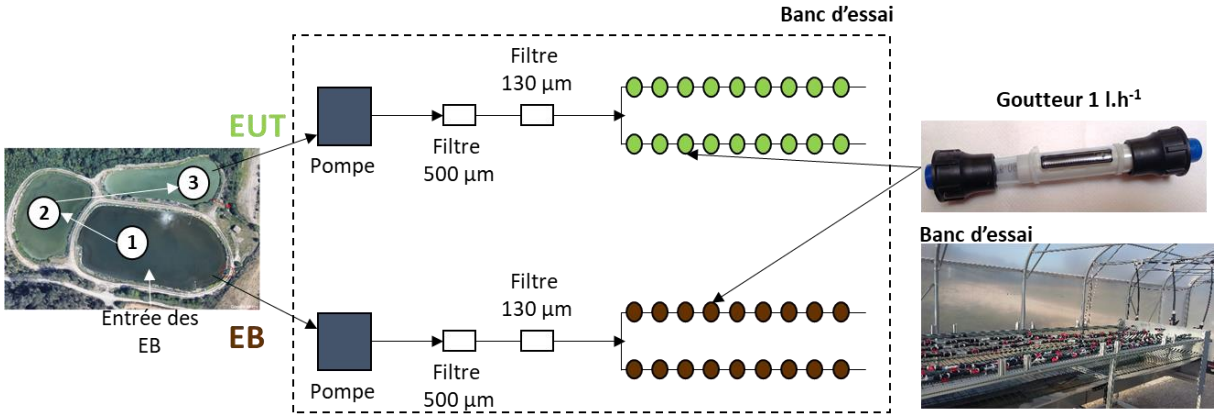


Figure 28 Schéma d'alimentation du banc d'essai lors de l'expérimentation sous serre. EB : eau usée brute, EUT : Eau traitée. Des goutteurs plats avec un débit nominal de 1 $l.h^{-1}$ ont été placés dans un tube transparent permettant de suivre l'évolution du colmatage dans les labyrinthes des goutteurs. Ces dispositifs ont été reliés les uns aux autres permettant de mimer une conduite d'irrigation et placées sur un banc d'essai alimenté avec EB (lagune 1) et EUT (lagune 3) filtrées en amont à 500 µm et 130 µm.

III. CARACTÉRISATION DES BIOFILMS

L'objectif de ces travaux était à la fois de (1) de suivre optiquement la cinétique de formation des biofilms dans des goutteurs réels sans les altérer et (2) de caractériser les communautés

microbiennes associées à ce colmatage dans le but de dégager les mécanismes de développement des biofilms.

A. Tomographie en Cohérence Optique

La microscopie électronique à balayage (SEM) est l'une des techniques les plus utilisées pour caractériser la morphologie des biofilms. Elle permet de mettre en relation la topographie des biofilms avec la surface. D'autres technologies ont été développées incluant la microscopie confocale laser à balayage (CLSM), l'imagerie par résonnance magnétique (IRM) et la microscopie à transmission aux rayons X (STXM). Dans le cas du développement des biofilms dans les systèmes de micro-irrigation, des études antérieures utilisant la microscopie électronique à balayage (SEM) ont montré que le dépôt était un mélange de bactéries, de substances polymères extracellulaires (EPS) ainsi que de particules inorganiques s'accumulant dans le labyrinthe du goutteur (Tarchitzky *et al.*, 2013; Yan *et al.*, 2009). Cependant, ces méthodes permettent de détecter et de suivre le biofilm à une échelle locale plutôt que globale (Wagner *et al.*, 2010) (Figure 29). De plus, ces méthodes sont souvent invasives et non conservatrices vis-à-vis de l'échantillon, ce qui ne permet pas de suivre les cinétiques de développement du biofilm. Morgenroth and Milferstedt (2009) ont abordé l'importance des propriétés structurelles du biofilm à la mésoéchelle (gamme millimétrique), en particulier lorsque les biofilms doivent être compris plus en détail, par exemple, en ce qui concerne les aspects de la structure du biofilm, de sa fonction et des mécanismes de développement du biofilm. L'OCT permet de travailler à cette échelle (Figure 29).

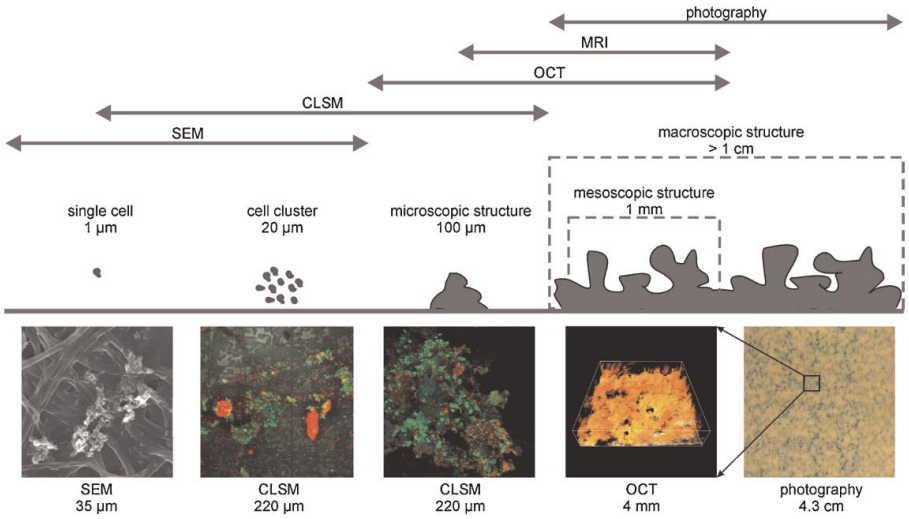


Figure 29 Techniques permettant d'étudier la structure des biofilms à différentes échelles. Notez que la résolution diminue de gauche à droite alors que le champ de vision augmente. MEB, Microscopie électronique à balayage; CLSM, Microscopie confocale à balayage laser ; TCO ou « OCT », Tomographie par cohérence optique. (Wagner *et al.*, 2010).

Avant les travaux de thèse, la cinétique de formation des biofilms dans les goutteurs réels n'avait pas pu être déterminée *in situ* de façon non invasive que ce soit au niveau de la forme de prélèvement des biofilms ou de la méthode d'observation utilisée. Effectivement, les goutteurs commerciaux étant insérés directement dans les conduites d'irrigation, il est nécessaire de couper et d'extraire les goutteurs pour analyser le contenu du colmatage. Ainsi, il est fort probable que cette extraction altère et modifie la structure et la composition des biofilms. C'est pourquoi d'autres méthodes émergent permettant de suivre le développement des biofilms de façon non invasive et non destructive telles que la Tomographie en Cohérence Optique (Li *et al.*, 2016b; Qian *et al.*, 2017; Shen *et al.*, 2015; Valladares Linares *et al.*, 2016). De plus, cette méthode permet l'étude des biofilms à une méso-échelle (de l'ordre du millimètre, Figure 29). Les labyrinthes des goutteurs utilisés au cours de ces travaux ont des dimensions de l'ordre du millimètre. Cette méthode permettait donc d'étudier le développement des biofilms à une échelle globale dans le labyrinthe des goutteurs. Sachant que le type de matériaux peut influencer le développement des biofilms (Hyun-Jung *et al.*, 2011), le développement des systèmes goutteurs au cours de ces travaux de recherche a permis de suivre de façon non destructive par le biais de la méthode OCT le développement des biofilms dans un goutteur réel.

1. Principe

La tomographie par cohérence optique (TCO ou OCT en anglais) est une technologie d'imagerie biologique in situ, non invasive, et à haute résolution (Bouma and Tearney, 2002) et est considérée comme l'analogue optique de l'imagerie ultrasonore. La méthode OCT repose sur le principe de l'interféromètre de Michelson d'une source lumineuse de faible cohérence pour détecter le contraste de diffusion dans un échantillon à partir d'un faisceau de référence (Figure 30). Un A-scan (i.e. une colonne de l'image) est obtenu en déplaçant axialement le miroir de référence, ce qui permet d'analyser l'échantillon biologique en profondeur (Wagner *et al.*, 2010). Un B-scan (i.e. l'image complète) est constitué de A-scans et est obtenu en orientant le miroir de manière à parcourir tout l'échantillon (Wagner *et al.*, 2010). Ainsi, il est possible de reconstituer la structure tridimensionnelle d'un échantillon et d'acquérir des informations spatiales sur la microstructure de l'échantillon biologique. La méthode OCT est devenu une technologie prometteuse pour l'étude du développement des biofilms et permet de suivre le développement de la structure bi — et tridimensionnelle à mésoéchelle des biofilms *in situ* de manière non invasive, sans marquage et en temps réel (Derlon *et al.*, 2012; Dreszer *et al.*, 2014; Haisch and Niessner, 2007; Li *et al.*, 2016a; Qian *et al.*, 2017; Wagner *et al.*, 2010; West *et al.*, 2016). Ainsi, il est possible de suivre l'évolution du volume, de l'épaisseur, de la porosité et de la densité du biofilm (Qian *et al.*, 2017; Wagner *et al.*, 2010). L'OCT peut également être utilisé pour étudier les propriétés rhéologiques du biofilm (Blauert *et al.*, 2015; Picioreanu *et al.*, 2018).

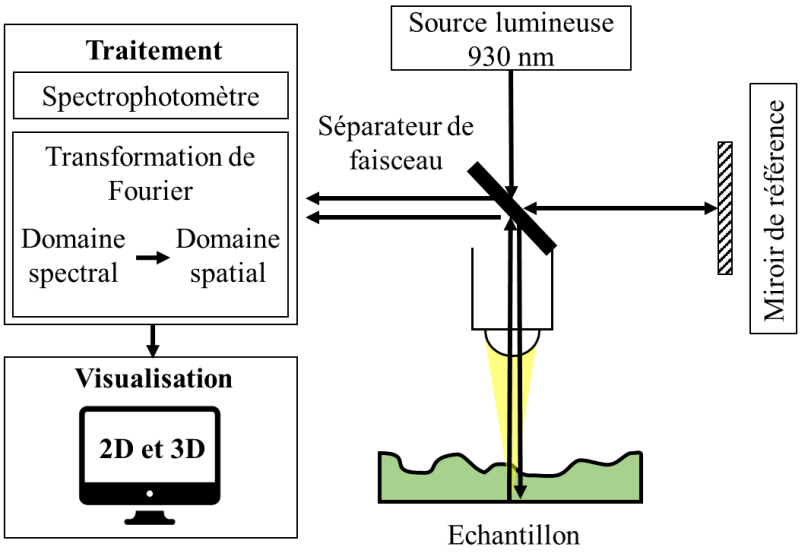
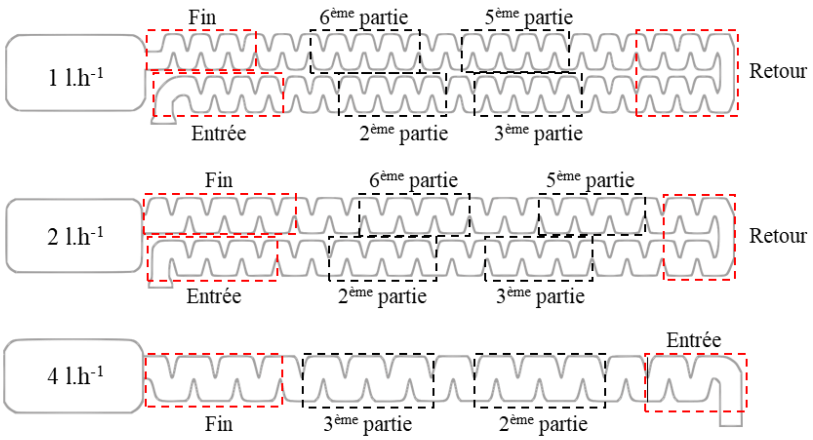


Figure 30 Schéma du principe de la tomographie à cohérence optique. Une lumière blanche est émise et partagée en deux bras via un interféromètre (miroir semi-réfléchissant). Un bras éclaire une surface de référence (miroir de référence), le deuxième éclaire l'échantillon cible. La somme des rayons réfléchit par le miroir et l'échantillon crée des interférences qui sont perçues par un photodétecteur puis analysées sur un ordinateur (adapté de Rosenthal *et al.* 2015).

2. Acquisition et traitement de l'image

Les acquisitions ont été effectuées *in situ* à travers le tube transparent et ont démarré après environ 3 semaines de fonctionnement. Ce délai était nécessaire pour ne pas perturber la phase d'initiation de la formation du biofilm et pour que le biofilm atteigne une épaisseur suffisante pour être visualisé (50 µm). Pour les mesures, les valves situées à chaque extrémité des systèmes goutteurs étaient fermées pour maintenir les goutteurs en eau. Les systèmes étaient ensuite déconnectés de la ligne d'irrigation. Les mesures à l'OCT ont été prises au moins une fois toutes les deux semaines et à chaque fois, tous les goutteurs ont été analysés. Après analyse, chaque goutteur était replacé sur le banc d'essai à son emplacement initial.

Les mesures d'OCT ont été acquises à l'aide d'un OCT GANYMEDE II de Thorlabs (lentille LSM03, résolution latérale : 8 µm; Thorlabs GmbH, Lübeck, Allemagne). La taille du voxel axial dans l'eau (n = 1,333) de GANYMEDE II est de 2,1 µm. La longueur d'onde était de 930 nm. La taille totale des goutteurs (longueur : 45.2 mm, largeur : 5.8 mm) ne permettait pas d'étudier l'ensemble du labyrinthe en une seule acquisition (taille maximale de l'acquisition : 10 mm x10 mm). C'est pourquoi les acquisitions ont été réalisées par zone dans les labyrinthes de façon à suivre le colmatage sur l'ensemble du labyrinthe (Figure 31).



Dimension longueur (L) x largeur (l) en mm

Goutteur ($l.h^{-1}$)	Entrée		2ème partie		3ème partie		Retour		5ème partie		6ème partie		Fin	
	L	l	L	l	L	l	L	l	L	l	L	l	L	l
1	9.5	2.5	9.5	2.5	9.5	2.5	5.2	5	8	2.5	9.8	2.5	9.4	2.5
2	9.4	2.5	8	2.5	8	2.5	4.5	5	8	2.5	8	2.5	9	2.5
4	5.5	3.7	9.9	3	9.8	3	-	-	-	-	-	-	9	3

Figure 31 Schéma du canal des goutteurs. Les cases en pointillés correspondent aux différentes zones analysées en OCT. Les zones en rouge correspondent aux zones présentées dans le manuscrit et qui correspondent aux zones de développement préférentielles du colmatage.

La procédure de traitement des acquisitions OCT a été développée pendant la thèse. L'ensemble des données OCT en 3D ont été traitées dans un premier temps en utilisant Fidji (fonctionnant sur ImageJ version 1.50b, Schindelin *et al.*, (2009)) et convertis en niveaux de gris (8 bits). Les jeux de données ont été découpés de haut en bas en piles d'images. Les parties extérieures au labyrinthe ont été considérées comme le fond (noir). Ensuite, un code a été utilisé pour détecter les pixels associés au tube en plastique et retirés à l'aide de MATLAB R2018r (MathWorks®, version 2018b). Un seuil (adapté à chaque ensemble de données) a été appliqué pour binariser l'ensemble des données afin de faire la distinction entre le colmatage et le reste du labyrinthe (Figure 32).

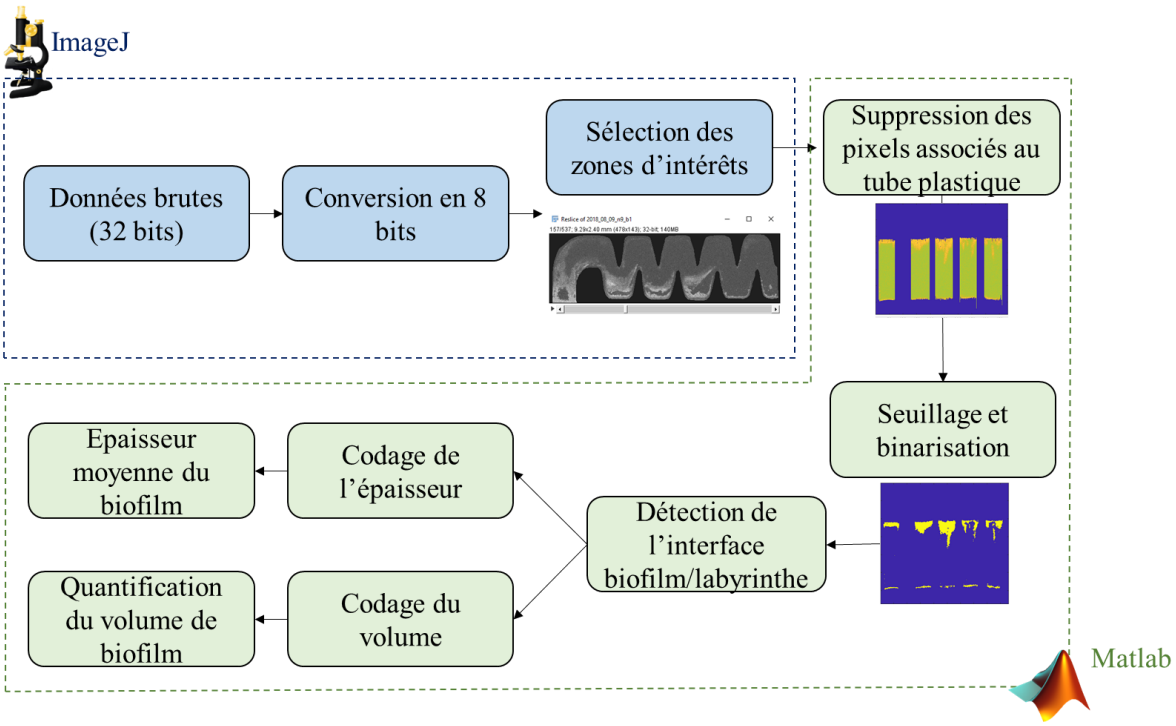


Figure 32 Processus de traitement des données OCT du biofilm dans les goutteurs.

3. *Quantification du biofilm*

Pour chaque position (x, y), les pixels associés au biofilm (supérieur au seuil) ont été additionnés (sur z) puis projetés sur un graphique 2D (x-y). L'épaisseur (en pixel) a été normalisée par la hauteur réelle du labyrinthe pour obtenir l'épaisseur en mm.

Dans le cas du calcul du volume de biofilm occupé dans le canal (%), l'ensemble des pixels supérieurs au seuil ont été sommés et normalisés par la quantité de pixels totaux de la zone d'intérêt. Connaissant la taille réelle du pixel (en mm), le volume du biofilm occupant la zone étudiée a été déterminé à partir de la formule suivante :

Équation 7 Calcul du volume de biofilm

$$\boldsymbol{Volume\ de\ biofilm}\ (\%) = \frac{\boldsymbol{V_{biofilm}}}{\boldsymbol{V_{zone\ d'intérêt}}} \times \mathbf{100}$$

où $V_{biofilm}$ correspond au volume de biofilm et $V_{zone\ d'intérêt}$ est le volume réel de la zone étudiée. Les volumes à différents temps et sous différentes conditions ont été comparés statistiquement à l'aide d'un test non paramétrique (Kruskal-Wallis).

B. Caractérisation microbiologique des biofilms et des effluents

Durant ces travaux de thèse, l'objectif a aussi été de décrire la structure et la composition du microbiote pour identifier les microorganismes responsables du colmatage des goutteurs et l'effet des paramètres étudiés, tout en reliant cela aux données OCT. Des microorganismes d'intérêt sanitaire ont également été recherchés pour évaluer leur concentration en fonction des paramètres étudiés lors de la thèse.

1. Échantillonnage

Durant les expérimentations à l'échelle laboratoire et sous la serre, 3 goutteurs par temps de prélèvements et par conditions étaient extraits de la gaine transparente et placés directement dans les tubes destinés à l'extraction à l'aide de pinces stériles.

Pour l'expérimentation sur la parcelle, seule la partie avec le labyrinthe a été placée dans le tube d'extraction. Les biofilms des fragments de conduite (628 cm^2) reliant les systèmes goutteurs ont également été échantillonnés en utilisant des écouvillons stériles.

Des prélèvements des effluents (eau traitée par lagunage, eau brute) ainsi que des eaux sortant des goutteurs ont été réalisés. Des volumes compris entre 20 et 50 ml ont été filtrés à 0,2 µm (Supor® 200 PES Membrane Disc Filter, Pall Corporation). Le filtre était ensuite placé dans le tube d'extraction. Les tubes étaient stockés à -20°C jusqu'à l'extraction de l'ADN.

2. Extraction de l'ADN

L'ADN a été extrait en utilisant le kit DNeasy PowerWater® DNA Isolation Kit (Qiagen, Hilden, Germany) selon les recommandations du fabricant. Ce kit a été choisi, car il est adapté pour de faibles quantités de matière et a été testé et validé au laboratoire sur plusieurs matrices dont les eaux usées. Les échantillons (filtres et biofilms) étaient placés dans les tubes d'extraction contenant des billes de différentes tailles. Les microbilles incluses dans les tubes permettent de décrocher le biofilm des différents supports et de casser les cellules pendant une période d'agitation. La concentration et la pureté de l'ADN étaient mesurées par spectrophotométrie (Infinite NanoQuant M200, Tecan, Austria). L'ADN est ensuite stocké à -20°C.

La quantité d'ADN dans un échantillon est directement proportionnelle à l'absorbance à 260 nm. La pureté de l'ADN est mesurée et est fonction du ratio de l'absorbance A260/A280. Ce ratio renseigne sur une contamination de l'extrait ADN par des protéines. Idéalement, il est de

1.8. La concentration en ADN mesurée dans les biofilms des goutteurs se situait entre 3 et 350 ng.µl^{-1}, entre 15 et 600 ng.µ l^{-1} dans les biofilms des conduites d'irrigation, entre 66 et 178 ng.µ l^{-1} pour les eaux usées brutes et 24 et 265 ng.µ l^{-1} pour les eaux usées traitées.

3. Caractérisation des communautés microbiennes

a) Séquençage haut débit illumina

Avant le démarrage de la thèse, les données sur les communautés microbiennes des biofilms des systèmes d'irrigation goutte à goutte provenaient presque exclusivement de l'analyse des acides gras phospholipidiques PFLAs (Y. Li *et al.*, 2019a; Yan *et al.*, 2009; Zhou *et al.*, 2015, 2013). Cependant, cette méthode n'est pas assez discriminante pour identifier les différentes espèces faisant partie des biofilms. C'est pourquoi plusieurs auteurs recommandent l'utilisation des techniques de metabarcoding ou de metagénomique pour procéder à une analyse complète et détaillée de la composition et de la structure microbienne des biofilms associée au colmatage des goutteurs (Zhou *et al.*, 2017a).

Le développement des séquençages haut débit depuis 2010, a permis de caractériser des microbiotes complexes avec un haut niveau de discrimination et a remplacé les techniques d'empreintes moléculaires (DGGE, TGGE, SSCP, RFLP) (Reuter *et al.*, 2015). Ces méthodes ont été utilisées pour décrire les communautés microbiennes des biofilms impliqués dans les traitements des eaux (Biswas and Turner, 2012; Stoeck *et al.*, 2018; Zhu *et al.*, 2015) ainsi que dans le suivi de microorganismes pathogènes (Cui and Liang, 2019; Obayomi *et al.*, 2019b). La technologie choisie est Illimina (Figure 33) pour son taux d'erreur global inférieur à 1 % (Dohm *et al.*, 2008).

Le processus de séquençage implique l'amplification clonale de fragments d'ADN liés à des adaptateurs sur la surface d'une lame de verre (Bentley *et al.*, 2008). La spécificité de cette technologie repose sur une amplification en pont (« bridge PCR ») des fragments à séquencer qui a lieu sur une surface de verre appelée flowcell. L'ADN simple brin modifié par un adaptateur est ajouté à la cellule et immobilisé par hybridation. L'amplification par pont génère des amas ou « clusters » amplifiés par clonage. Les clusters sont dénaturés et clivés ; le séquençage est initié par l'ajout d'une amorce, d'une polymérase (POL) et de 4 nucléotides (A, C, T, G) avec des fluorochromes terminaux réversibles. À chaque incorporation, le fluorochromes est clivé, permettant l'ajout d'un nouveau nucléotide. La fluorescence post-incorporation est enregistrée et permet d'identifier quelle base a été incorporée (Figure 33).

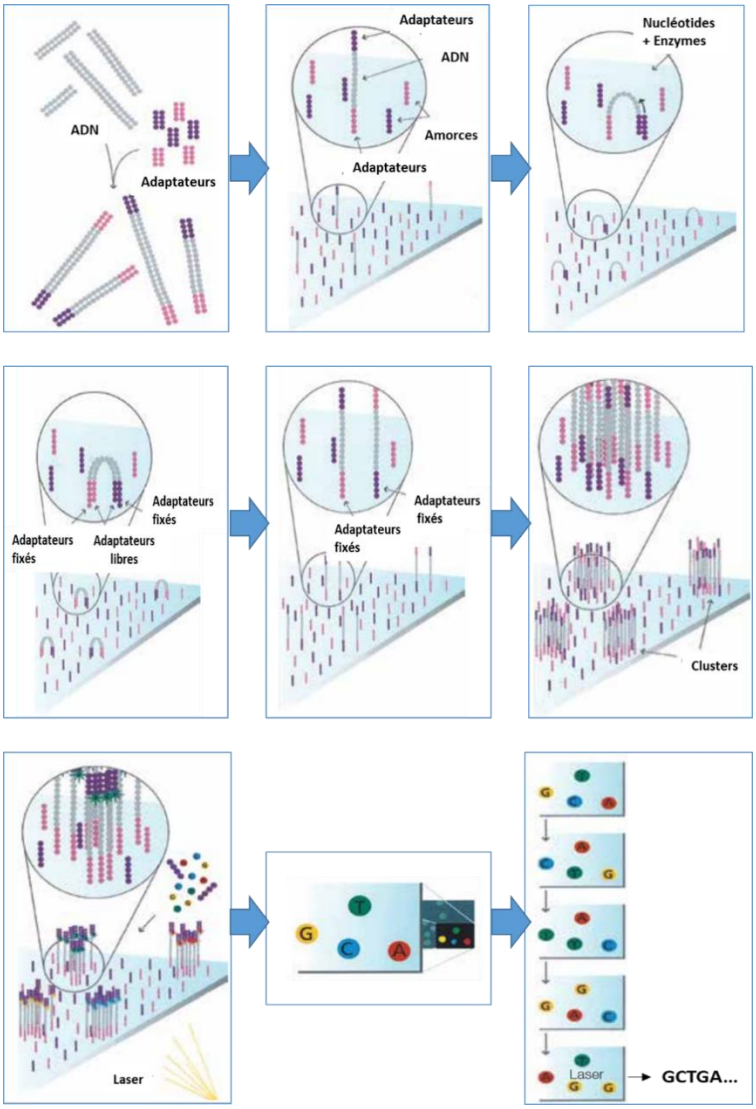


Figure 33 Principe du séquençage Illumina. (Voelkerding *et al.*, 2009)

(1) Amplification de la banque d'ADN

Les marqueurs taxonomiques utilisés lors de la thèse sont la petite sous-unité du gène de l'ARN ribosomique (SSU rRNA) ou ARNr 16S pour les bactéries et l'ARNr 18S pour les eucaryotes, qui sont les marqueurs de référence en microbiologie (Gong and Marchetti, 2019; Liu *et al.*, 2012) Les régions variables, V1-V9, des gènes ARNr 16S (ADNr) permettent ainsi d'identifier les bactéries présentes dans un échantillon au niveau taxonomique du genre, voire de l'espèce (Lane *et al.*, 1985). Les primers utilisés au laboratoire appartiennent à la région V4-V5 (Claesson *et al.*, 2010).

La première étape du séquençage consiste à amplifier par PCR la région d'intérêt qui est fonction du type de microorganismes. Le Tableau 12 résume les différents systèmes et programmes PCR utilisés pour le séquençage. Une deuxième PCR est ensuite réalisée à la plateforme de séquençage Genotoul Lifescience Network Genome and Transcriptome Core Facility à Toulouse (get.genotoul.fr). Elle consiste à ajouter des adaptateurs pour le multiplexage des échantillons. Les produits obtenus ont été purifiés et chargés sur la cartouche Illumina MiSeq pour le séquençage de lectures appariées de 300 bp selon les instructions du fabricant (chimie v3).

Un séquençage spécifique ciblant le gène *mip* a aussi été réalisé afin d'étudier la diversité des légionelles dans les biofilms des goutteurs.

(2) TRAITEMENT DES DONNEES DE SEQUENÇAGE

Les fichiers en sortie du séquençage par la plateforme ont été analysés selon un pipeline automatisé développé au laboratoire. Mothur (version 1.39.5) (Schloss *et al.*, 2009) a été utilisé pour associer des séquences « reverse » et « forward ». Uchime (Edgar *et al.*, 2011) a été utilisé pour identifier et éliminer les chimères. Les séquences qui apparaissaient moins de trois fois dans l'ensemble des données ont été supprimées. Les séquences ont été alignées en utilisant SILVA SSURef NR99 version 128 (Schloss *et al.*, 2009). Enfin, les séquences présentant une similarité de 97 % ont été rassemblées en unités taxonomiques opérationnelles (OTU) (Nguyen *et al.*, 2016). Les séquences de chloroplastes ont été retirées des données brutes. Enfin, le programme BLAST (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/) a été utilisé afin d'identifier l'espèce associée à l'OTU. Un traitement similaire a été utilisé afin d'analyser les données de séquençages spécifiques aux eucaryotes.

(3) TRAITEMENT STATISTIQUE DES DONNEES DE SEQUENÇAGE

Les données de séquençage ont été traitées sous R v3.4 (www.r-project.org) à l'aide du package phyloseq de R-Studio (http://www.rstudio.com/) (McMurdie et Holmes, 2012). Des tests de Kruskal-Wallis ont été effectués pour comparer les indices de diversité et de richesse. Pour la comparaison de la structure de la communauté bactérienne, une matrice de dissimilarité (Bray-Curtis) a été réalisée et visualisée à l'aide de l'analyse des coordonnées principales (PCoA). Une analyse unidirectionnelle des similarités (ANOSIM) a été utilisée pour identifier les différences significatives dans la structure d'assemblage des communautés des échantillons en fonction de l'origine de l'échantillon (Clarke, 1993). Les OTUs et les genres qui ont le plus

contribué à la divergence entre deux conditions expérimentales ont été identifiés à l'aide de l'analyse du pourcentage de similarité (SIMPER) (Clarke, 1993).

(4) Recherche dans les donnees de sequençage des genres comprenant des especes pathogenes

Les OTUs associés à des genres incluant des espèces pathogènes (Annexe « Parcelle », « Table S1') ont été recherchés et les séquences associées ont été comparées à la base de données NCBI en utilisant le programme BLAST (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/) afin de tenter d'identifier l'espèce associée. Seuls les résultats avec au moins 98 % de similitudes et 100 % d'efficacité et pour lesquels une seule espèce était proposée ont été pris en considération.

Tableau 12 Oligomères utilisés pour les séquençages

	Gène ciblé	Primers	Concentration finale (nmol)	Taille de l'amplicon (bp)	Programme PCR	Référence
Séquençage « Eucaryote »	ADNr 18 S	5'-GCGGTAATTCCAGCTCCAA-3' 5'-TTGGCAAATGCTTTCGC-3'	300 300	438	Activation de l'enzyme : 2 min à 95°C 30 cycles : Dénaturation : 95°C - 60 sec Hybridation : 56°C - 60 sec Élongation : 72° C-60 sec Élongation finale : 72° C-10min	(Hadziavdic *et al.*, 2014)
Séquençage « Bactérie »	ADNr 16 S (V4-V5)	5′-GTGYCAGCMGCCGCGGTA-3 5′-CCCCGYCAATTCMTTTRAGT-3′	300 300	415	Activation de l'enzyme : 2 min à 95°C 30 cycles : Dénaturation : 95°C - 60 sec Hybridation : 65°C - 60 sec Élongation : 72° C-60 sec Elongation finale: 72°C-10min	(Wang and Qian, 2009)
Séquençage « *Legionella »*	*mip*	5'-AAGATTAGCCTGCGTCCGAT-3' 5'-GTCAACTTATCGCGTTTGCT-3'	300 300	438	Activation de l'enzyme : 2 min à 95°C 30 cycles : Dénaturation : 95°C - 60 sec Hybridation : 56°C - 60 sec Élongation : 72° C-60 sec Élongation finale : 72° C-10min	(Miyamoto *et al.*, 1997)

b) PCR en temps réel ou PCR quantitative

La PCR quantitative (qPCR), est devenue l'une des méthodes les plus utilisées pour la détection d'un large éventail de microorganismes, y compris des pathogènes (les virus, les bactéries et les parasites) (Law *et al.*, 2015; Sloots *et al.*, 2015). Elle a été utilisée lors des travaux de thèse pour quantifier des indicateurs de contamination fécale et des espèces pathogènes.

(1) PRINCIPE

La PCR en temps réel, aussi appelée PCR quantitative ou qPCR, est une méthode de détermination de la quantité d'une séquence cible ou d'un gène présent dans un échantillon. Cette quantification repose sur la détection et la quantification d'un émetteur fluorescent pendant le processus d'amplification et l'augmentation du signal d'émission fluorescente est directement proportionnelle à la quantité d'amplicons produits durant la réaction. La courbe de fluorescence permet, grâce à une gamme étalon, de déterminer le nombre de copies de gène initialement présent dans le puit de PCR.

Il existe de nombreuses méthodes de détection qui font appel à diverses molécules fluorescentes, notamment des colorants non spécifiques qui se lient à l'ADN, des sondes d'hydrolyse, des sondes d'hybridation, des sondes d'éclairage, des balises moléculaires et des amorces de scorpion (Lim *et al.*, 2011). Parmi les différentes chimies de détection, le SYBR Green I et les sondes TaqMan sont les plus utilisées dans les études actuelles et sont celles utilisées lors de la thèse (Kim *et al.*, 2013) (Figure 34).

SYBR Green : Le SYBR Green I est un fluorochrome qui se lie à l'ADN double brin de manière indépendante de la séquence, émettant une fluorescence 1000 fois plus importante que lorsqu'il n'est pas lié (Wittwer *et al.*, 1997). Le signal de fluorescence augmente donc au fur et à mesure que les amplicons s'accumulent pendant la PCR, ce qui permet de surveiller en temps réel l'augmentation de la concentration d'amplicon. L'inconvénient majeur de cette méthode est le caractère non spécifique du SYBR Green. Cependant, la spécificité de l'amplification peut être vérifiée par l'analyse de la courbe de dénaturation qui donne la température de fusion (Tm).

Chimie TaqMan : La chimie TaqMan fait intervenir un oligonucléotide supplémentaire, la sonde, en plus des deux amorces réalisant l'amplification PCR. Une sonde TaqMan porte un

double marquage avec un fluorochrome « reporter » à l'extrémité 5′ et un fluorochrome « quencher à l'extrémité 3′. Dans une sonde TaqMan intacte, où deux fluorochrome sont très proches l'un de l'autre, la fluorescence du rapporteur est absorbée par le fluorochrome « quencher » via le transfert d'énergie par résonance de fluorescence (FRET) (Giulietti *et al.*, 2001). Au cours de l'amplification par PCR, les sondes TaqMan, qui sont hybridées aux séquences complémentaires de l'ADN matrice, sont dégradées par l'activité d'exonucléase de l'ADN polymérase au fur et à mesure que l'élongation a lieu. Une fois rompue, le fluorochrome « reporter » est libéré du fluorochrome « quencher », et l'émission de fluorescence du « reporter » peut-être détectée. L'intensité de la fluorescence indique alors la quantité d'échantillons produits, ce qui permet de suivre en temps réel la progression de la PCR.

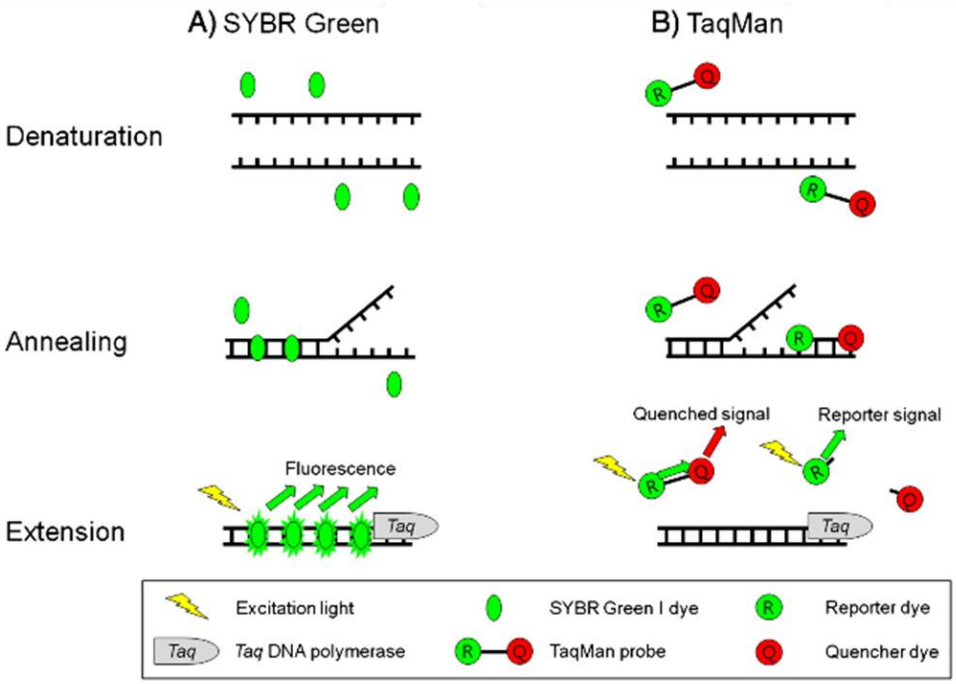


Figure 34 Chimies de détection pour la qPCR : (A) SYBR Green et (B) TaqMan (Kim *et al.*, 2013)

(2) Especes ciblees par qPCR et cycle d'amplification

Le tableau 13 rassemble l'ensemble des groupes et espèces bactériennes ciblées par qPCR lors de la thèse. La qPCR « Bactéries totales » ciblant le gène codant pour l'ARNr 16 S a permis de quantifier la concentration de bactéries présentes dans les effluents et dans les biofilms. *Escherichia coli* et *Enterococcus* font partie des indicateurs de contamination fécale utilisés pour évaluer la qualité des effluents dans la réglementation. HF 183 (Bacteroidetes) est un

indicateur de contamination fécale spécifique des contaminations humaines permettant de tracer spécifiquement les contaminations de la STEP dans l'environnement (Gourmelon *et al*., 2010). L'analyse des données de séquençage a mis en évidence la présence de séquences ADN associées aux genres *Legionella*, *Pseudomonas* et *Aeromonas*. C'est pourquoi, des qPCR spécifiques à 3 espèces pathogènes appartenant à ces genres, *Legionella pneumophila*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Aeromonas hydrophila* ont été réalisées dans le but de confirmer la présence d'espèces pathogènes.

Préparation du mix réactionnel

Les qPCR « Bactéries totales » ont été réalisées dans 12,5µl en utilisant des plaques 96 puits avec 6,5 Sybr® Green Supermix, 2µl d'ADN dilué ainsi que les sondes et amorces correspondantes (Tableau 13). Les autres qPCR ont été réalisées dans 25 µl avec 12,5µl de Biorad SsoAdvanced Universal Probes Supermix, 5 µl d'ADN dilué ainsi que les sondes et amorces correspondantes (Tableau 13).

Tableau 13 Systèmes de qPCR utilisés

	qPCR	Gène ciblé	Fonction	N° accession GenBank	Primers et Sondes	Concentration finale (nmol)	Taille de l'amplicon (bp)	Programme PCR	Référence
	Bactéries totales[a]	ARNr 16 S	ADNr 16 S (V9)	X80731	5'-ACTCCTACGGGAGGCAG-3' 5'-GACTACCAGGGTATCTAAT CC-3' Yakima Yellow – TGCCA GCAGC CGCGG TAATA C –TAMRA	100 250 50	488	Préincubation : 2 min à 95°C 40 cycles : Dissociation : 95° C-7 sec Hybridation et élongation : 60° C-25 sec	(Yu *et al.*, 2005)
Indicateurs de contamination fécale	*Escherichia coli*[b]	*iudA*	Glucuronidase	S69414	5'-GTCCAAAGCGGCGATTTG-3' 5'-CAGGCCAGAAGTTCTTTTTCCA-3' 5'ACGGCAGAGAAGGTA-3' 5'-AGAAATTCCAAACGAACTTG-3' 5'-CAGTGCTCTACCTCCATCATT-3' 5'-FAM-TGGTTCTCTCCGAAATAGCTTTAGGG CTA-Tamra-3'	200 200 100 300 300 80	103	Préincubation : 2 min à 95°C 40 cycles : Dissociation : 95° C-15 sec Hybridation et élongation: 60°C-60 sec	(Frahm and Obst, 2003)
	Enterococcus spp. [b]	ARNr 23S							
	HF183 (*Bacteroidetes*)[a]	ARNr 16S			5'-TACCCCGCCTACTATCTAATG-3' 5'-ATCATGAGTTCACATGTCCG-3'	200 200	186	Préincubation : 2 min à 95°C, 40 cycles : Dissociation : 95° C-15 sec Hybridation et élongation : 60° C-60 sec	(Gourmelon *et al.*, 2010)

Tableau 13 Systèmes de qPCR utilisés (Suite)

	qPCR	Gène ciblé	Fonction	N° accession GenBank	Primers et Sondes	Concentration finale (nmol)	Taille de l'amplicon (bp)	Programme PCR	Référence
Espèces pathogènes	*Legionella pneumophila*[b]	*mip*	Gène potentialisateur de l'infectivité des macrophages	*AF095230*	5' - ACCGATGCCACATCATTAGCT – 3' 5'- CCAAATCGGCACCAATGC-3' 5'-FAM- CAGACAAGGATAAGTTGTC - Tamra-3'	200 200 200	84	Pré-incubation : 2 min à 95°C 40 cycles : Dissociation : 95° C-15 sec Hybridation et élongation : 60° C-60 sec	(Lee *et al.*, 2006)
	Pseudomonas aeruginosa[b]	*regA*	Gène régulateur de la synthèse de la toxine A	*X12366*	5'- TGCTGGTGGCACAGGACAT – 3' 5'- TTGTTGGTGCAGTTCCTCATTG-3' 5'-FAM- CAGATGCTTTGCCTCAA - Tamra-3'	200 200 200	85		
	Aeromonas hydrophila[b]	*aha1*	Protéine de la membrane externe	AY165026	5'– ACCGCTGCTCATTACTCTGATG– 3' 5'- CCAACCCAGACGGGAAGAA-3' 5'-FAM- TGATGGTGAGCTGGTTG - Tamra-3'	200 200 200	69		

Système Sybr Green[a] et Taqman[b]

(3) Preparation des gammes d'etalonnage et limite de quantification

Les qPCR ont été réalisés sur un thermocycleur BioRad CFX Manager Sofware (version 3.1, Bio-Rad Laboratories, Inc). La gamme d'étalonnage permet de relier le Ct au nombre de copies présent initialement dans le puit de PCR. Cette valeur est ensuite utilisée pour obtenir la concentration dans l'échantillon de départ (en nombre de copies/ml pour les échantillons liquides et en nombre de copies/goutteur pour les biofilms). Cette gamme étalon est réalisée en utilisant une dilution en série d'un plasmide contenant le gène cible (10^8 à 10^0 copies de gène/puit – ou /µl).

Chaque extrait d'ADN était dilué au 1/10e et au 1/100e (sauf pour les bactéries totales où les ADN étaient dilués au 1/100e et 1/1000e) afin de vérifier l'absence d'inhibiteurs par comparaison des concentrations obtenues. La gamme étalon ainsi que chacune des dilutions des ADN extraits étaient déposées en triplicata. Des contrôles négatifs (remplacement de l'ADN dilué par de l'eau ultrapure) ont été déposés en triplicata également pour vérifier l'absence de contamination ou contrôle que les signaux mesurés sont bien supérieurs à ceux du contrôle (qPCR « bactéries totales »).

Les pentes des courbes d'étalonnage ainsi que le coefficient de régression (R^2) étaient utilisés pour rendre compte de l'efficacité de la qPCR. Le R^2 étaient toujours supérieurs à 0,97. La limite de quantification (LOQ) était calculée à partir du dernier point de la gamme étalon en l'absence de signal du contrôle négatif. Sinon, le signal du contrôle négatif était prise en compte pour le calcul de la LOQ. La limite de détection (LOD) correspond à un signal détecté, mais en dessous du dernier point de la gamme étalon. Les LOQ sont de l'ordre de 10^2-10^3/ml dans les échantillons « eau » et 10^3-10^4/ goutteur pour les biofilms des goutteurs.

(4) Traitement des donnees

Les résultats (courbes d'étalonnage, concentration/puit) sont obtenus avec le logiciel fourni avec le thermocycleur. Une moyenne et un écart-type sont calculés à partir des triplicatas d'analyse. La mise en forme et le traitement statistique des données sont réalisés avec R v3.4 (www.r-project.org) sous R-Studio (http://www.rstudio.com/).

Seuls des tests non paramétriques ont été utilisés lors de la comparaison des biofilms des goutteurs à un temps t du fait du faible nombre de données disponibles (n=3 par conditions). Ainsi, pour un nombre d'échantillons ≤ 3 et des distributions indépendantes, le test de Kruskal-

Wallis est utilisé et les différences par paires sont testées avec le test Conover-Iman avec la correction de Bonferroni. Le seuil de significativité retenu est de 0,05 (p-value < 0,05).

CHAPITRE 1 : EFFET DU TRAITEMENT DE L'EAU D'IRRIGATION SUR LA COMPOSITION MICROBIENNE DES BIOFILMS DES GOUTTEURS

PRÉAMBULE

La majorité des études sur la réutilisation des eaux usées se concentrent sur des cas de traitement des eaux usées de haute qualité et évaluent rarement l'impact des eaux usées peu ou pas traitées. Pour autant, l'utilisation d'eaux usées faiblement, voire non traitées, n'est pas une pratique rare. Aujourd'hui, entre 10-15 % de la superficie totale des terres irriguées dans le monde reçoivent des eaux usées non traitées ou partiellement traitées (Jaramillo and Restrepo, 2017; Thebo *et al.*, 2014).

L'objectif de ce chapitre était d'étudier l'effet du traitement de l'eau usée urbaine sur le colmatage et sur la composition microbiologique du colmatage des goutteurs dans des conditions « terrain ». En effet, le traitement va abattre la pollution (C, N, P) et conduire à un effluent moins chargé en nutriments, et également modifier les communautés microbiennes. L'idée de cette partie était également de voir les spécificités que pourrait amener le lagunage au niveau du colmatage des goutteurs. Enfin, afin d'évaluer le devenir des contaminants microbiologiques et leur concentration dans les goutteurs, deux indicateurs de contaminations fécales, *E. coli* et *Enterococcus* spp. et deux bactéries opportunistes, *Pseudomonas aeruginosa* et *Aeromonas hydrophila*, ont été quantifiées par qPCR dans les effluents et les biofilms.

Pour cela, des lignes d'irrigation constituées du « dispositif goutteur » ont été placées sur un banc d'essai et alimentées avec de l'eau usée traitée ou de l'eau usée brute (après dégrillage) pendant 3 mois (Chapitre Matériels et Méthodes). Le banc d'essai était placé sous une serre expérimentale afin de se rapprocher de condition terrain. Des prélèvements ont été réalisés dans le temps afin de suivre la dynamique des communautés microbiennes des biofilms des goutteurs suivant la nature de l'effluent utilisé. Ce chapitre est présenté sous un format article en français.

I. INTRODUCTION

Le canal du goutteur est extrêmement sensible au colmatage (Liu & Huang 2009 ; Niu *et al.* 2013) et l'obstruction qui en résulte diminue l'uniformité des applications d'eau (Dosoretz *et al.*, 2010) notamment lorsque ces systèmes utilisent des eaux usées ou de l'eau usée traitée (J. Li *et al.*, 2009; Ravina *et al.*, 1997). Le colmatage des goutteurs est étroitement lié à la qualité de l'eau d'irrigation et résulte de multiples facteurs, notamment des composantsphysiques, chimiques et biologiques (Lamm *et al.*, 2007; Y. Li *et al.*, 2019a; Oliveira *et al.*, 2017). Le colmatage dû à la formation d'un biofilm est un facteur majeur qui influe sur les performances des systèmes d'irrigation (Tarchitzky *et al.*, 2013). Capra and Scicolone (2005) ont montré que la quantité de matière en suspension, la demande biologique en oxygène (DBO_5) ainsi que le pH de l'eau étaient corrélées au niveau de colmatage des goutteurs. J. Li *et al.* (2009) ont montré que plus la DBO_5 était élevée (eau usée traitée : 40,3 $mg.l^{-1}$ versus eau de surface : 11,6 $mg.l^{-1}$), plus le risque de colmatage était grand avec une perte de débit de 26 %. Néanmoins, même avec l'utilisation d'un effluent tertiaire, un biofilm peut se développer (Qian *et al.*, 2017; Sánchez *et al.*, 2014).

En plus d'être un des problèmes majeurs de l'irrigation au goutte-à-goutte, ces biofilms peuvent être des réservoirs à pathogènes et augmenter les risques de contaminations. Pachepsky *et al.* (2012) ont alimenté une conduite d'irrigation par aspersion avec de l'eau de surface dans le but d'étudier l'effet du biofilm se développant dans la conduite sur la qualité microbiologique de l'eau en sortie de système. Pour cela, ils ont suivi les concentrations en *E. coli* dans les biofilms et dans l'eau entrant et sortant du système. Ils ont observé que les concentrations en *E. coli* augmentaient au cours du temps dans les biofilms de la conduite et que les concentrations en sortie étaient supérieures aux concentrations en entrée de la conduite. Néanmoins, l'impact de la qualité de l'eau usée sur la composition et la présence de microorganismes pathogènes dans les biofilms colonisant les systèmes d'irrigation goutte à goutte n'a pas été étudié.

La mise en place et la composition bactérienne des biofilms des goutteurs ont été caractérisées sur deux lignes alimentées par eau usée brute et l'eau usée traitée par lagunage. Le séquençage haut débit ainsi que la PCR quantitative ont été utilisés pour (1) décrire les communautés bactériennes des biofilms des goutteurs en fonction du type d'effluent utilisé et (2) évaluer la présence de bactéries pathogènes dans l'eau sortant de ces goutteurs.

II. MATÉRIELS ET MÉTHODES SPÉCIFIQUES À L'ÉTUDE

A. Mise en place expérimentale

Un banc d'essai a été placé sous la serre à la station d'épuration de Murviel-Les-Montpellier, dans le sud de la France. Quatre lignes d'irrigation étaient installées sur le banc d'essai et alimentées avec de l'eau usée brute (2 lignes, EUB) ou de l'eau usée traitée (2 lignes, EUT), préalablement filtré à 500 µm puis 130 µm afin de respecter les recommandations de filtration du fabricant des goutteurs. Le banc fonctionnait 2 fois par jour à 0,8 MPa. Chaque ligne était composée de 9 dispositifs goutteurs. L'eau de sortie des goutteurs alimentés avec EUT était directement rejetée dans le milieu tandis que l'eau usée brute (EUB) en sortie des goutteurs est récupérée dans un bac puis rejetée dans la première lagune. L'expérimentation s'est déroulée d'avril à juin 2019. La température moyenne sous la serre était de 21 °C, avec des écarts de températures pouvant aller jusqu'à 47,5 °C au cours de la journée (Annexe « Qualité », Figure S1).

B. Qualité physico-chimique et microbiologique des effluents

Chaque semaine (n = 9), des analyses physico-chimiques et microbiologiques ont été effectuées pour évaluer la qualité des eaux de surface, comme indiqué dans le chapitre « Matériels et Méthodes ». Les principales propriétés des effluents sont énumérées dans le Tableau 14.

Tableau 14 Caractéristiques physico-chimiques des eaux usées brutes (EUB) et des eaux usées traitées (EUT). Les différences significatives entre les deux types d'effluents sont indiquées en gras (n=9).

Paramètres	Unités	EUB	EUT
DCO	mg l^{-1}	**450 ± 31,3**	**206,4 ± 20,4**
Ammonium (NH_4^+)	mg l^{-1}	55,5 ± 6,1	52,2 ± 5,9
Nitrate (NO_3^-)	mg l^{-1}	1,2 ± 0,5	1,3 ± 0,6
Phosphore (PO_4^-)	mg l^{-1}	9,9 ± 0,7	9 ± 0,8
MES	mg l^{-1}	**175,6 ± 64,6**	**54,8 ± 30,7**
pH		7,6 ± 0,1	7,8 ± 0,1
O2 dissous	mg l^{-1}	1,7 ± 1,3	3,1 ± 0,9
Conductivité	µS cm^{-1}	1604,8 ± 55,2	1559,5 ± 24,2
Coliformes totaux	MPN/100ml	**$4,6 \pm 3,3.10^6$**	**$1,6 \pm 1,1.10^5$**
Escherichia coli	MPN/100ml	**$1,5 \pm 0,9.10^6$**	**$4,2 \pm 2,5.10^4$**
Enterococci	MPN/100 ml	$1,7 \pm 1,2.10^5$	$5,3 \pm 1,1.10^5$

C. Analyse des communautés bactériennes

1. Échantillonnages

Trois goutteurs dans chaque ligne ont été choisis à 22, 36, 50 et 64 jours et remplacés par de nouveau pour assurer le fonctionnement du système. Cependant, ces nouveaux goutteurs n'ont pas été analysés. Chaque goutteur du tube transparent a été extrait à l'aide de pinces stériles et placé directement dans un tube stérile et stocké à 20 °C jusqu'à l'extraction de l'ADN. L'effluent entrant EUT ou EUB a été filtré (20 à 50 ml) chaque semaine à 0,2 µm (Supor® 200 PES Membrane Disc Filter, Pall Corporation) pour analyser la communauté bactérienne dans les effluents. À 50 et 64 jours, l'eau sortant des goutteurs prélevés a aussi été prélevée (pendant 15 minutes) et filtrée à 0,2 µm. Les filtres ont été stockés à -20 °C jusqu'à l'extraction de l'ADN.

2. Séquençage Illumina, qPCR et analyse des données

Un séquençage de l'ARNr 16S a été réalisé sur les biofilms des goutteurs ainsi que sur les effluents (EB et EUT) entrant et sortant du système d'irrigation. Les séquences de chloroplastes ont été retirées des données brutes et représentaient 1,2 % des séquences totales.

Des qPCR ont également été réalisées afin de quantifier les indicateurs de contaminations fécales *E. coli* et *Enterococcus* ainsi que des espèces pathogènes *Legionella pneumophila*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Aeromonas hydrophila*.

III. RÉSULTATS

A. Évolution des débits

Le système d'irrigation au goutte-à-goutte, place sous la serre, a été alimenté pendant 9 semaines avec des eaux usées brutes et traitées.

Les débits des goutteurs ont été surveillés pour évaluer l'évolution du colmatage dans le temps (Figure 35). Le débit moyen des goutteurs alimentés avec les EUB a diminué jusqu'à se rapprocher du seuil de colmatage (diminution de 22 % en moyenne par rapport au débit attendu). À l'inverse, le débit des goutteurs alimentés en EUT est resté proche des 1 $l.h^{-1}$. Ceci indique que les goutteurs se colmataient moins rapidement dans les cas de l'utilisation de l'EUT. Pour les deux types d'effluents, les écarts-types augmentaient au cours du temps, indiquant l'augmentation de l'hétérogénéité de distribution entre les goutteurs.

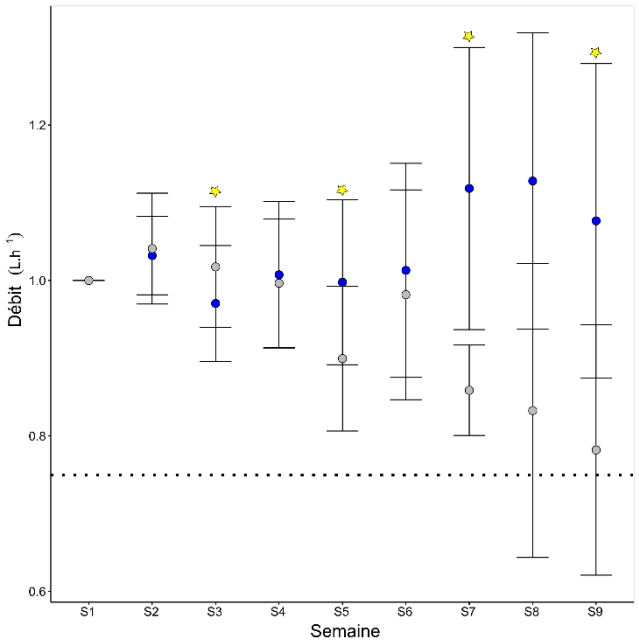


Figure 35 Débit moyen (et erreur type) selon le type d'effluent utilisé. EUB : eau usée brute ; EUT : eau usée traitée. En bleu : EUT, en gris, EUB. La ligne pointillée de débit 75 % correspond à la limite habituellement fixée pour considérer qu'un goutteur est colmaté. ★ indique les semaines de prélèvement des goutteurs (n=3/type d'effluent).

B. Composition et structure des communautés bactériennes

La concentration en bactéries exprimée en nombre de copies d'ADNr 16S dans les effluents était comprise entre 10^9-10^{10}/ml d'eau brute et 10^8-10^9/ml pour l'eau traitée (Figure 36). Globalement, les concentrations dans l'eau brute étaient supérieures à celle de l'effluent traité sauf à 2 temps sur les 8 temps analysés (29 et 50 jours). Les concentrations dans les biofilms des goutteurs alimentés avec de l'eau brute étaient comprises entre 10^8 et 10^{11}/goutteur et étaient significativement plus élevés que celles pour les goutteurs alimentés en EUT après 50 jours (Figure 36). L'augmentation des concentrations entre 22 et 64 jours est significative, montrant un développement des biofilms sur la période pour les deux types d'effluents. Ce développement reste limité (environ 1 log).

L'eau sortant des goutteurs a été prélevée à 50 et 64 jours (Figure 36). Les concentrations dans l'eau sortant des goutteurs alimentés avec de l'eau traitée étaient plus élevées que dans l'eau entrante à 50 et 64 jours, passant de 10^8 à 10^{10} environ. Cette observation était aussi valable pour l'eau sortant des goutteurs alimentés avec l'eau usée brute à 50 jours, passant de 10^9 à 10^{10} copies/goutteurs. Ceci suggère un effet de la colonisation du système sur les concentrations en sortie. Cependant cet effet n'est pas systématiquement observé (concentration similaire à 64 jours pour les EUB).

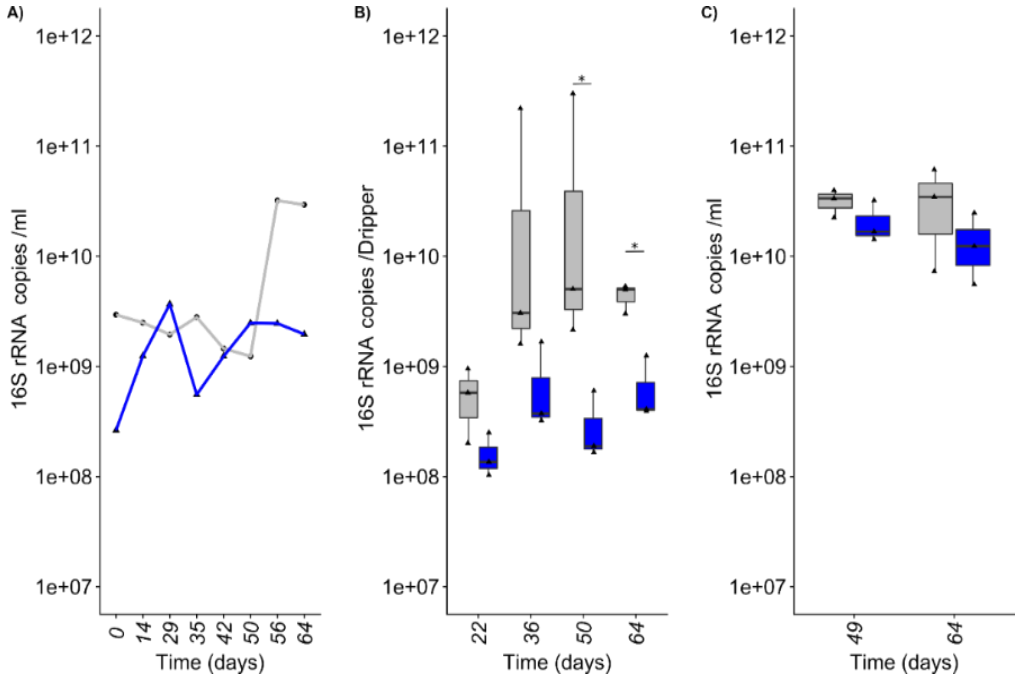


Figure 36 Quantification du nombre de copies du gène codant pour l'ARNr 16S au cours du temps dans A) l'eau de la lagune, B) les biofilms des goutteurs et C) l'eau sortant des goutteurs. Les lignes d'irrigation ont été alimentées avec l'eau brute (gris) ou l'eau traitée (bleu). Trois goutteurs sont prélevés par type d'effluent et par temps d'échantillonnages (B), l'eau en sortie provient des trois goutteurs prélevés (C). Les * indiquent une différence significative (conover test, p-value < 0,05).

1. Structure des communautés bactériennes des biofilms des goutteurs et des effluents

Bien que les indices de richesse et l'indice richesse de Shannon des biofilms des goutteurs étaient similaires entre les conditions EUB et EUT (Wilcoxon test, p-value > 0,05), ils augmentaient au cours du temps et étaient plus élevés après 64 jours d'alimentation qu'à 22 jours (p-value < 0,05) (Tableau 15). L'augmentation du nombre de copies d'ADNr 16S et des indices de diversité et de richesse entre 22 et 64 jours indique que de nouveaux OTUs s'installaient dans les biofilms au cours du temps.

Tableau 15 Estimation des indices de richesse et de diversité dans les biofilms des goutteurs alimentés avec EUB et EUT au cours du temps.

	Richesse				**Diversité**			
Temps	**Observé**		**Chao1**		**Shannon**		**1/Simpson**	
(Jours)	**EUB**	**EUT**	**EUB**	**EUT**	**EUB**	**EUT**	**EUB**	**EUT**
22	277,3 ± 17,1	251 ± 29,7	370,2 ± 25,2	351 ± 67,8	3,6 ± 0	3,6 ± 0,4	16,7 ± 1,7	19 ± 7,6
36	254 ± 20,7	267,7 ± 47,7	350,8 ± 44,6	394,3 ± 81,1	3,3 ± 0,4	3,7 ± 0,1	11,7 ± 6	19,2 ± 1
50	231,7 ± 11	270,5 ± 12	318,8 ± 24	367,7 ± 14,9	3,3 ± 0,2	3,6 ± 0	12,2 ± 2,2	19,1 ± 0
64	360,3 ± 29,9	354,7 ± 57,5	469,2 ± 34,1	448,9 ± 57,5	4 ± 0,3	3,9 ± 0,1	24,6 ± 8,9	20,5 ± 0,4

Ceci est confirmé par l'analyse PCOA qui montre que la structure des communautés des biofilms des goutteurs changeait au cours du temps et suivant le type d'effluent (Adonis test, R_{EUB}^2=0,37, R^2_{EUT}=0,38, p-value < 0,05) (Figure 37). La structure de la communauté bactérienne des biofilms des goutteurs était différente de celles de l'effluent et était dépendante du type de l'effluent utilisé (Figure 37, Adonis test, R^2=0,26, p-value < 0,05). Ainsi, même si les indices sont similaires, la structure des communautés bactérienne est bien différente entre les biofilms « EUB » et « EUT ».

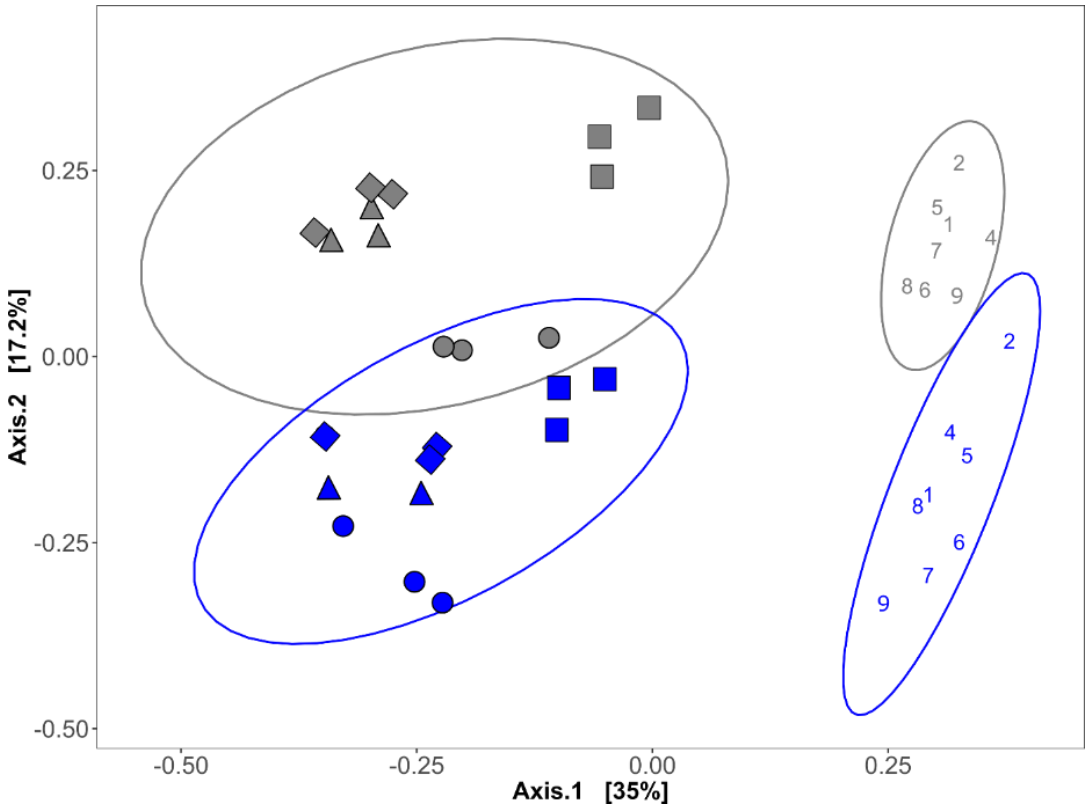


Figure 37 PCoA des communautés bactériennes des effluents (chiffre) et des goutteurs alimentés en EUB (gris) et EUT (bleu). Les goutteurs ont été prélevés à ■ : 22 jours, ◆ : 36 jours, ▲ : 50 jours et ● : 64 jours. L'analyse PCoA est basée sur une matrice de similarité Bray-Curtis. Les ellipsoïdes représentent un niveau de similarité de 95 % entre les échantillons. Les chiffres correspondent à la semaine d'échantillonnage de l'effluent pour l'analyse.

Les Proteobacteria, Bacteroidetes et Firmicutes étaient les principaux phyla des biofilms et des effluents (EUB et EUT). Néanmoins, l'abondance relative de ces phyla évoluait au cours du temps. L'abondance relative moyenne des Proteobacteria était plus élevée dans l'effluent EUB (45 % contre 31 % dans EUT, Wilcoxon-test, p-value < 0,05) alors que l'abondance relative moyenne des Bacteroidetes était plus élevée dans EUT, atteignant 50 % contre 37 % dans EUB (Wilcoxon-test, p-value < 0,05). De plus, le phylum des Actinobactéria était aussi majoritairement présent dans l'effluent EUT. Ceci est une première indication de l'impact du traitement par lagunage sur la composition et la structure des communautés bactérienne des effluents.

Le phylum des Proteobacteria était principalement dominé par le genre *Thiocapsa* (Figure 38) dont l'abondance relative moyenne était plus élevée dans les effluents et biofilms alimentés par l'effluent EUB que dans EUT (p-value < 0,05). Le genre *Thiocapsa* est le genre principal

participant à la séparation des communautés des effluents EUT et EUB avec une contribution de 19 % (Simper test, p-value < 0,05). À l'inverse, l'abondance relative moyenne de la famille des Alcaligenaceae était plus élevée dans l'effluent EUT (8 %) que EUB (1 %) ainsi que dans les biofilms des goutteurs alimentés par EUT (Figure 38) et contribuait à la séparation des communautés des effluents pour 6 % (p-value < 0,05).

Le phylum des Bacteroidetes était principalement représenté par les genres appartenant à la famille des Lentimicrobiaceae, *Sediminibacterium, Flavobacterium* ainsi que des genres non identifiés et appartenant aux groupes taxonomiques vadinBC27_wastewater-sludge_group et M2PB4-65_termite_group (Figure 38). Tout comme pour le phylum des Protéobacteries, certains genres majoritairement présents dans l'effluent EUB ou EUT étaient aussi présent dans les biofilms correspondants. Par exemple, l'abondance relative moyenne de la famille des Lentimicrobiaceae était plus élevée dans l'effluent EUB que dans EUT (Wilcoxon-test, p-value < 0,05) ainsi que dans les biofilms des goutteurs atteignant 13,4 % contre 9 % dans les biofilms EUT durant toute la période expérimentale. Les abondances relatives des genres *Sediminibacterium* et *Flavobacterium* étaient à l'inverse plus élevées dans l'effluent EUT et dans biofilms des goutteurs correspondants. Ceci indique que certains genres majoritaires appartenant au phylum des Protéobactéries et Bacteroidetes présent dans les effluents vont aussi être majoritaires dans les biofilms des goutteurs alimentés par ces effluents.

Cependant, d'autres genres vont être plus présents dans les biofilms des goutteurs que dans l'effluent. Par exemple, les abondances relatives des genres *Pseudoxanthomonas,* T*epidimonas*, *Aquabacterium* et *Tepidiphilus* (Proteobacteria) étaient plus élevées dans les biofilms des goutteurs EUT que dans l'effluent EUT (<1 %). Le genre *Proteiniphilum* (Bacteroidetes) était uniquement présent dans les biofilms des goutteurs EUB (1 à 2 %), bien que l'abondance relative fût inférieure à 1 % dans les deux types d'effluents. L'abondance relative moyenne des Firmicutes était similaire entre les effluents EUB et EUT durant la période expérimentale, atteignant environ (≈10 %) dans les effluents EUB et EUT et était majoritairement composé des genres *Acetoanaerobium* (4 % dans EUB vs <1 % dans EUT), Christensenellaceae_unclassifed (1,6 % dans EUB vs <1 % dans EUT), Ruminococcaceae_unclassifed (1 % dans EUB vs 1,6 % dans EUT). Bien que diminuant au cours du temps, l'abondance relative des Firmicutes était plus élevée dans les biofilms des goutteurs comparativement aux effluents (EUT : 17 % à 12 %; EUB : 26 à 8 %) avec pour

genres majoritaires *Soehngenia* et *Caloramator* (principalement dans les biofilms des goutteurs EUB). Ceci indique une sélection des genres capable de s'installer dans les goutteurs.

D'autres phyla étaient sous représentés dans les effluents, mais étaient majoritaires dans les biofilms des goutteurs tels que les phyla des Chloroflexi, Thermotogae et Spirochaetae (p-value < 0,05). Le phylum Thermotogae majoritairement présent dans les biofilms EUB était représenté par le genre *Fervidobacterium* (Figure 38). L'abondance relative moyenne du genre *Fervidobacterium* a augmenté de 9 à 23 % à 50 jours (conover test, p-value < 0,05) puis a diminué jusqu'à 4 % à 64 jours dans les biofilms des goutteurs EUB. Bien que minoritaire dans les effluents (<1 %), l'abondance relative du phylum des Chloroflexi a augmenté au cours du temps dans les biofilms des goutteurs EUB et EUT (conover test, p-value < 0,05), passant de <1 % à 5 % et <1 % à 6 en moyenne dans EUB et EUT respectivement. Les Chloroflexi étaient principalement représentés par les genres *Longilinea*, *Bellilinea*, *Levilinea* (de la famille des Anaerolineaceae). L'abondance relative des Spirochaetae, majoritairement composés du genre *Treponema*, a aussi augmenté au cours du temps dans les deux types de biofilms (EUB et EUT) passant de 1 à 4 % pour EUB et 1 % à 11 % dans les biofilms des goutteurs EUT.
L'analyse des phyla et des genres a montré des processus de sélection lors de la formation des biofilms dans les goutteurs avec des minoritaires des effluents qui colonisent efficacement les goutteurs (*Fervidobacterium*, *Longilinea*, *Bellilinea*, *Levilinea*, *Pseudoxanthomonas*, *Tepidimonas*, *Aquabacterium*, *Tepidiphilus* et *Proteiniphilum*), mais aussi des dominants des effluents qui s'installent tels que les genres appartenant à la famille des Lentimicrobiaceae ou *Thiocapsa*. Les principales différences entre les biofilms EUB et les biofilms EUT sont apportés par les genres *Fervidobacterium, Soehngenia, Tepidiphilus et Proteiniphilum*.

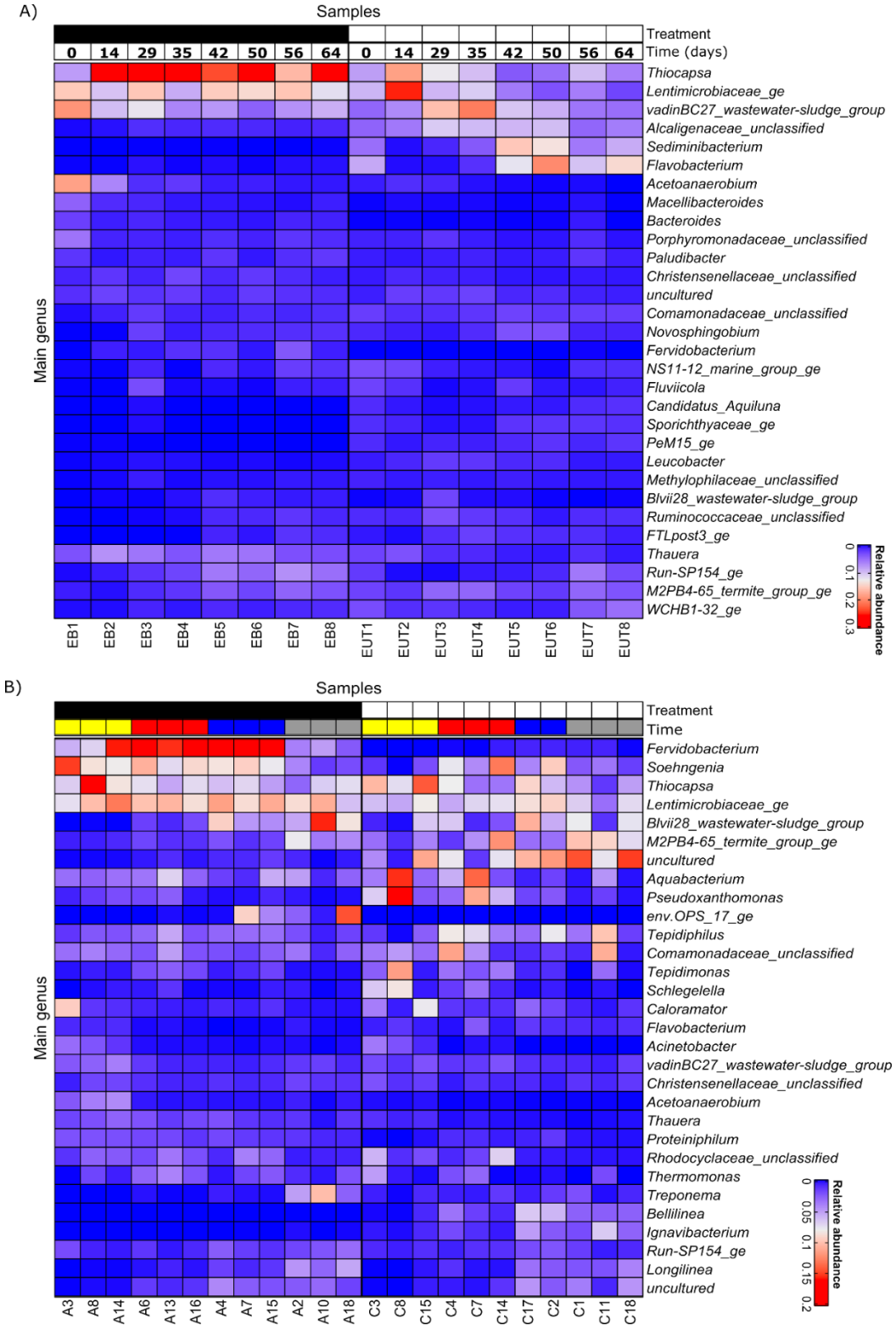


Figure 38 Heatmap des genres majoritaires présents dans les effluents (A) et dans les biofilms des goutteurs (B). Seuls les 30 genres les plus abondants sont représentés. Les goutteurs ont été prélevés à 22 jours (jaune), 36 jours (rouge), 50 jours (bleu) et 64 jours (gris).

2. Effet de la colonisation du réseau sur la structure de la communauté bactérienne de l'eau sortant des goutteurs

La structure des communautés et la composition bactérienne de l'eau sortant des goutteurs prélevés à 50 et 64 jours ont été comparées à celles des goutteurs et des effluents afin de savoir si la colonisation du système peut influencer la composition bactérienne globale de l'eau en sortie de système (Tableau 16). La richesse de l'eau sortant des goutteurs alimentés avec l'effluent EUT augmentait par rapport à l'eau entrant à 50 jours et était similaire à celle des biofilms des goutteurs, suggérant un effet de la colonisation du système sur la richesse de l'effluent EUT en sortie de système, mais pas sur la diversité. Cet effet n'est pas observé lors de l'irrigation avec des EUB.

Tableau 16 Évolutions des indices de diversité et de richesse de long de la ligne d'irrigation.

		EUB			EUT		
Temps (jours)	**Indices**	**Lagune (n=1)**	**Goutteur (n=3)**	**Sortie (n=3)**	**Lagune (n=1)**	**Goutteur (n=3)**	**Sortie (n=3)**
50	Observé	293,0	231,7 ± 11	318 ± 24	251,0	270,5 ± 12	273,7 ± 14,9
	Chao1	373,2	318,8 ± 52	421,2 ± 21,1	315,2	367,7 ± 4,5	411 ± 31,6
	Shannon	3,0	3,3 ± 0,2	3,3 ± 0	3,5	3,6 ± 0	3,5 ± 0
	1/Simpson	5,9	12.2 ± 2,2	9 ± 2,4	13,9	19.1 ± 0	14,2 ± 1,2
64	Observé	388,0	360,3 ± 29,9	376,7 ± 34,1	331,0	354,7 ± 57,5	346,3 ± 57,5
	Chao1	564,8	469.2 ± 57	533,5 ± 92,8	396,1	448,9 ± 26,4	445,3 ± 45,8
	Shannon	3,5	4 ± 0,3	3,6 ± 0	4,0	3,9 ± 0,1	4 ± 0
	1/Simpson	9,1	24.6 ± 8,9	12,5± 2,8	24,1	20.5 ± 0,4	22,5 ± 0,4

Une PCoA a été réalisée pour comparer la structure des communautés bactériennes entre l'eau entrant dans le système (EUB et EUT), les structures des communautés des biofilms des goutteurs et l'eau sortant de ces goutteurs à 50 et 64 jours. L'analyse a montré qu'il n'y avait pas de différences entre l'eau entrant (EUB ou EUT) dans le système et l'eau sortant des goutteurs et que la structure des communautés bactériennes de l'eau sortant des goutteurs était fonction du type d'effluent utilisé (Adonis test, R^2=0,26; p-value < 0,05).

3. Quantification des indicateurs entériques et des pathogènes opportunistes

Comme attendu, les concentrations des indicateurs *Enterococcus* spp. et *E. coli* étaient plus élevées dans les eaux usées brutes comparées aux eaux traitées (Figure 39), et correspondaient

aux concentrations moyennes déterminées par la méthode Idexx (Tableau S1 et Figure S2 « Matériels et Méthodes »). Les concentrations en *Enterococcus* spp. étaient significativement plus élevées dans les goutteurs alimentés en eau brute et étaient stables au cours du temps. En revanche, les concentrations en *E. coli* avaient tendance à diminuer au cours du temps et à être inférieures à la limite de quantification dans les goutteurs alimentés avec de l'eau usée traitée. Globalement, les concentrations en *Enterococcus* spp. et *E. coli* dans l'eau sortant des goutteurs étaient similaires aux concentrations entrant dans le système. Toutefois, à 49 jours, les concentrations en *Enterococcus* spp étaient plus élevées dans l'eau sortant du système que dans l'eau de la lagune. Ceci suggère que la colonisation du système peut avoir effet sur la qualité microbiologique de l'effluent sortant.

Aeromonas hydrophila était uniquement quantifiable dans les lignes alimentées par l'eau brute et les concentrations étaient similaires entre l'entrée du système et la sortie de goutteur. *Pseudomonas aeruginosa* était quantifiable jusqu'à 35 jours, principalement dans l'eau brute. Pour autant, ce pathogène était quantifiable dans les goutteurs alimentés avec de l'eau brute et de l'eau traitée tout au long de l'expérimentation. À 64 jours, la concentration de *P. aeruginosa* atteignait environ 10^3-$10^{4/}$goutteur dans les biofilms des goutteurs, mais n'était pas quantifiable dans l'eau entrant dans le système et sortant des goutteurs. Cette différence de comportement par rapport aux autres groupes microbiens peut s'expliquer par le fait que *P. aeruginosa* colonise préférentiellement le système d'irrigation.

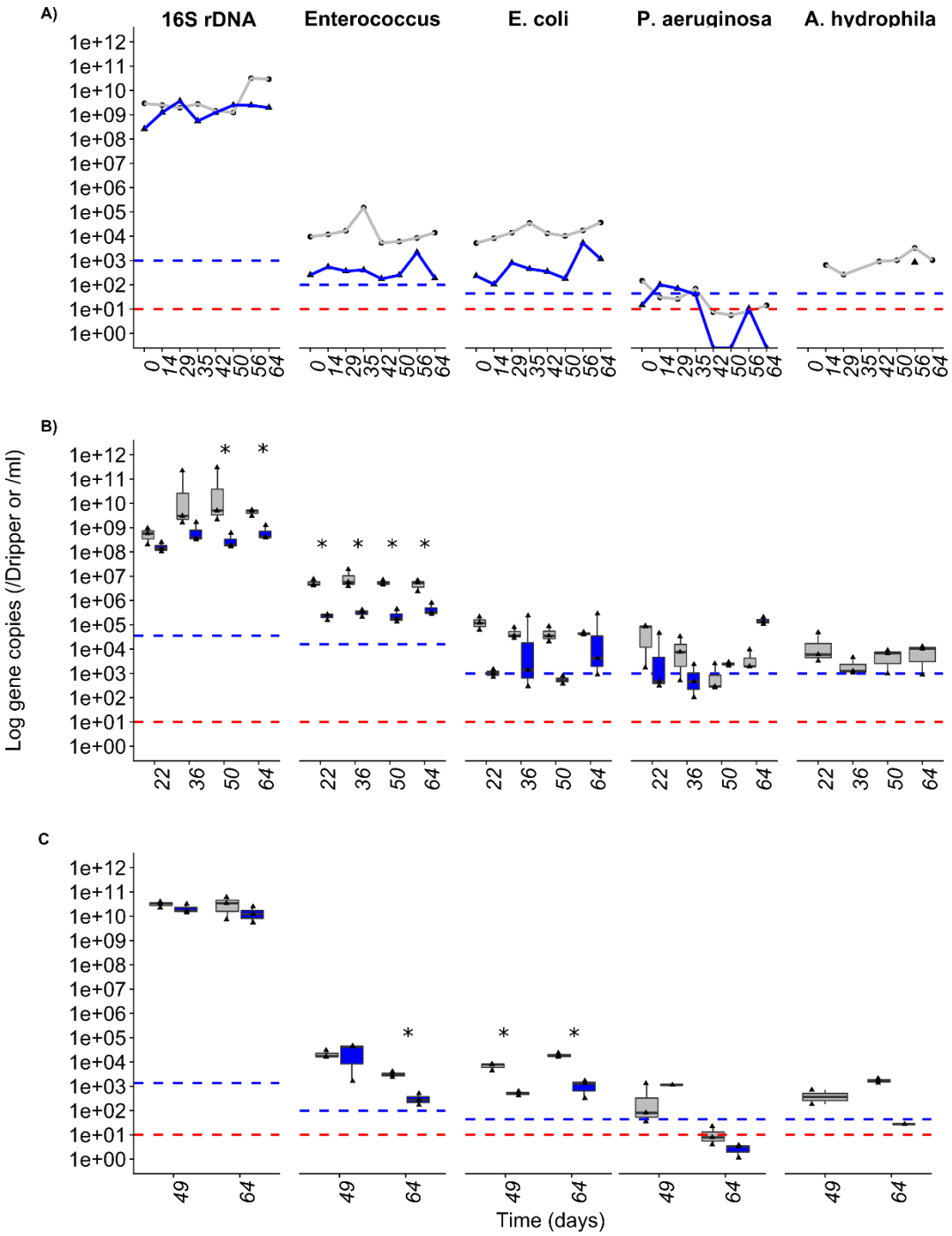


Figure 39 Concentration des bactéries (ADNr 16S), d'*Enterococcus* spp. (23S ADNr), *E. coli* (*iudA*), *P. aeruginosa* (*regA*) et *A. hydrophila* (*aha1*) par unité de volume ou par goutteur au cours du temps dans A) l'eau de la lagune, B) les biofilms des goutteurs et C) l'eau sortant des goutteurs. Les lignes d'irrigation ont été alimentées avec l'eau brute (gris) ou l'eau traitée (bleu). Trois goutteurs sont prélevés par type d'effluent et par temps d'échantillonnages (B), et l'eau en sortie des trois goutteurs prélevés (C). La ligne pointillée rouge indique la limite de détection, la verte : la limite de quantification. Lorsque la détection a eu lieu, mais à des concentrations inférieures au seuil de quantification (LOQ), les résultats sont représentés par des doubles flèches. Lorsque la concentration était inférieure au seuil de détection (LOD), les résultats sont représentés par des flèches simples. Les chiffres à côté des flèches indiquent le nombre d'échantillons inférieurs à la LOD ou LOQ. Les * indiquent une différence significative (conover test, p-value < 0,05).

IV. DISCUSSION

Dans cette expérimentation, les communautés bactériennes des biofilms des goutteurs ont été identifiées par séquençage à haut débit de l'ADNr 16S pour deux types d'eaux : les eaux usées brutes ou les eaux usées traitées par lagunage. Les effluents entrants, les biofilms des goutteurs ainsi que l'eau sortant de ces goutteurs ont été analysés afin de mettre en évidence un éventuel effet de la colonisation du réseau par les biofilms sur la qualité microbiologique de l'eau en sortie.

La mesure des débits a été réalisée une fois par semaine afin de suivre l'évolution du colmatage en fonction de l'effluent utilisé. Le débit des goutteurs diminuait plus rapidement dans le cas de l'utilisation des eaux usées brutes (EUB) que des eaux usées traitées (EUT). La DCO et la quantité de MES étaient 2 à 3 fois plus élevées dans les eaux usées brutes en moyenne que dans les eaux usées traitées ce qui favorise le colmatage (Ayers and Wescot, 1976; Couture, 2006; Nakayama and Bucks, 1991). De plus, le niveau de traitement de l'eau conditionne également le développement des biofilms dans les goutteurs. Qian *et al.*, (2017) ont montré que l'utilisation d'un effluent tertiaire plutôt que secondaire permettait de réduire la cinétique de formation des biofilms dans les goutteurs. Dans cette étude, la concentration en bactérie était inférieure de 1 à 2 log dans les biofilms des goutteurs alimentés avec EUT comparativement à ceux alimentés avec EUB, indiquant que l'utilisation d'EUT est à privilégier pour limiter le colmatage et la colonisation des systèmes d'irrigation.

Pour autant, durant cette expérimentation, la structure des communautés bactériennes des effluents était différente et influençait celle des biofilms des goutteurs. Certain phyla étaient minoritaires dans les effluents, mais majoritaires dans les biofilms des goutteurs tels les phyla Thermotogae (EUB) et Chloroflexi (EUT). L'abondance relative des Firmicutes était aussi plus élevée dans les biofilms des goutteurs que dans les effluents. Le phylum des Thermotogae, dominé par le genre *Fervidobacterium*, est composé de bactéries anaérobies, thermophiles et mésophiles qui sont entourées d'une enveloppe extérieure en forme de gaine (Rosenberg *et al.*, 2014). Le genre *Fervidobacterium* comprend de nombreuses espèces thermophiles (65-80°C) (Rosenberg *et al.*, 2014) et est présent dans les procédés de traitement des eaux usées (Yang *et al.*, 2014). Les Firmicutes sont des bactéries Gram-positives avec une paroi cellulaire rigide et regroupent de nombreuses espèces thermophiles (Desvaux *et al.*, 2006). Les genres *Acetoanaerobium, Soehngenia* et *Caloramator* (Firmicutes) étaient dominants dans les biofilms des goutteurs EUB et regroupent aussi des espèces thermophiles anaérobies strictes. Les biofilms des goutteurs sont donc majoritairement composés de genres bactériens thermophiles.

Ceci peut s'expliquer par les températures élevées sous la serre. Ce même constat a été fait par Sánchez *et al.*, (2014), qui ont montré que les phyla Bacteroidetes et Firmicutes étaient prédominants dans un système d'irrigation goutte-à-goutte installé sous une serre et alimentés avec de l'eau usée secondaire et tertiaires.

Contrairement aux biofilms des goutteurs EUB qui comprenaient des genres thermophiles anaérobies (p. ex. *Thiopcasa*, *Proteiniphilum*), les biofilms des goutteurs EUT comprenaient davantage de genres aérobies thermophiles tels que les genres *Aquabacterium* (Protéobactéries), *Pseudoxanthomonas* (Protéobactéries) et *Tepidiphilus* (Protéobactéries). Bien que la différence ne soit pas significative, la concentration en oxygène dissous dans l'effluent EUT tendait à être supérieure à celle de l'effluent EUB. Lors d'un traitement par lagunage, les algues vont produire de l'oxygène qui va ensuite être utilisé par les autres microorganismes. Ceci peut expliquer la présence de genres aérobies majoritaires dans l'effluent EUT et dans les biofilms des goutteurs EUT.

Le phylum des Chloroflexi était minoritaire dans les effluents, mais dominant dans les biofilms des goutteurs EUT notamment. Les Chloroflexi regroupent de nombreuses espèces filamenteuses tels que les genres *Bellilinea* et *Longilinea* identifiés dans les goutteurs qui sont chimiohétérotrophes anaérobies stricts et se développent plus. Ces deux genres produisent des filaments multicellulaires et ont une longueur supérieure à 100 µm et une largeur comprise entre 0,4 et 0,6 µm (Yamada and Sekiguchi, 2018a, 2018b) qui peuvent favoriser l'agrégation de particules et le colmatage des goutteurs. L'importance des Chloroflexi dans le colmatage des goutteurs est un résultat novateur par rapport à la littérature. Ce phylum intervient également dans le colmatage de systèmes permettant le traitement des eaux usées traitées tel que les bioréacteurs à membranes (Rehman *et al.*, 2020; Ziegler *et al.*, 2016).

L'analyse PCoA n'a pas mis en évidence un effet de la colonisation du système sur la communauté bactérienne en sortie de goutteure. Néanmoins, à 50 jours, les indices de richesse dans les eaux en sortie de la ligne irriguée par les EUT étaient supérieures à ceux en entrée, sans que les indices de diversité soient modifiés. Il semblerait que plus d'espèces soient présentes en sortie de goutteur, même si cette observation doit être confirmée.

Durant cette étude, les indicateurs de contamination fécale, *E. coli* et *Enteroccus* spp, ainsi que deux espèces pathogènes opportunistes, *P. aeruginosa* et *A. hydrophila*, ont été quantifiés dans les effluents entrant et sortant et dans les biofilms des goutteurs. *P. aeruginosa* et *A. hydrophila* ont à plusieurs reprises été détectés dans les effluents traités utilisés pour l'irrigation (Jjemba *et al.*, 2010; Obayomi *et al.*, 2019b). Les concentrations en *Enterococcus* spp. étaient plus élevées

à 50 jours en sortie de goutteurs alimentés par EUT par rapport à l'entrée, indiquant un effet de la colonisation sur les concentrations de cet indicateur. Dans le cas des pathogènes opportunistes *P. aeruginosa* et *A. hydrophila,* il n'y avait pas d'effet de la colonisation du système sur les concentrations en sortie de goutteur. Les concentrations étaient proches voire sous les limites de quantification, dans l'effluent traité. Cependant, *P. aeruginosa* était détectable et quantifiable dans les biofilms des goutteurs alimentés par EUB et EUT indiquant que ce pathogène opportuniste colonise préférentiellement le réseau. L'échantillonnage en sortie de goutteur n'a été réalisé que deux fois et il est possible que des évènements de détachement soient arrivés, comme suggéré avec l'augmentation de la concentration en entérocoques en sortie de goutteurs à 50 jours. Les évènements de détachement des biofilms sont difficilement prévisibles sur le terrain. C'est pourquoi il serait intéressant de valider l'absence d'effet de la colonisation du système sur la qualité microbiologique de l'eau d'irrigation ainsi que sur la composition globale sortant du système par granulométrie en ligne par exemple. Combiné au séquençage, cette méthode permettrait de caractériser la taille des fragments des biofilms et la fréquence du détachement des biofilms, et d'avoir une idée de la composition microbienne de ces fragments.

V. CONCLUSION

Pour la première fois, l'effet du traitement des eaux usées (eaux usées brutes ou traitées) sur les structures et la composition des communautés bactériennes associées au colmatage des goutteurs ont été étudiés. Les communautés bactériennes étaient différentes dans les biofilms alimentés par EUT ou EUB. Les biofilms des goutteurs EUB étaient principalement composés de bactéries thermophiles et anaérobies telles que *Fervidobacterium, Soehngenia, Caloramator* et *Thiocapsa*. À l'inverse, les biofilms des goutteurs EUT se composaient majoritairement de bactéries thermophiles aérobies telles que *Aquabacterium, Pseudoxanthomonas* et *Tepidiphilus*. Les températures élevées sous la serre expérimentale ont participé à la sélection de bactéries thermophiles. L'étude des fonctions de ces genres dans le développement du colmatage permettrait d'améliorer les stratégies de contrôle. De plus, dans cette étude, les eaux usées étaient traitées par lagunage. Il serait donc intéressant d'évaluer l'impact du traitement des eaux usées (boues activées, bioréacteur à membrane) sur la composition microbienne d'un biofilm.

Sur la base des résultats de cette étude, il n'y a pas d'effet de la colonisation du système sur la structure et la composition microbienne en sortie de système d'irrigation. Cependant, il a été observé à certains temps que les concentrations en entérocoques pouvaient être supérieures en sortie de système par rapport à l'entrée, et également une augmentation de la richesse de la communauté, suggérant un effet de la colonisation du système sur la composition microbiologique au point d'usage. Des études complémentaires sont nécessaires afin d'explorer le risque sanitaire associé au développement de ces biofilms dans les réseaux d'irrigation alimentés avec des eaux usées.

- L'utilisation d'un effluent urbain non traité réduisait l'efficacité du système d'irrigation, ce qui est visible par la réduction du débit moyen et de l'homogénéité de distribution des goutteurs.

- Les communautés bactériennes des biofilms étaient différentes de celles des effluents, avec une part non négligeable de bactéries thermophiles dans les biofilms des goutteurs (p. ex Thermotogae, Firmicutes). Ceci serait lié à une sélection due aux températures élevées sous la serre (max: 47°C).

- Les communautés bactériennes des biofilms étaient différentes suivant l'effluent utilisé. La principale différence entre les biofilms des goutteurs "eau non traitée" par rapport aux biofilms goutteurs "eau traitée" est liée à la presence de bactéries anaérobies dans les biofilms des goutteurs alimentés avec des eaux usées non traitées. Une autre différence est l'augmentation au cours du temps des bactéries appartenant au phylum des Chloroflexi (bactéries filamenteuses) dans les biofilms des goutteurs alimentés avec des eaux usées traitées alors que ce phylum est minoritaire dans les effluents.

- Les indicateurs de contamination fécale *E. coli* et *Enterococcus* sp. se comportent différemment dans les biofilms Les bactéries pathogènes *P. aeruginosa* et *A. hydrophila* étaient présentes principalement dans les biofilms des goutteurs alimentés avec les eaux usées non traitées.

CHAPITRE 2 : COLMATAGE BIOLOGIQUE DES SYSTEMES D'IRRIGATION AU GOUTTE-A-GOUTTE AVEC DES EAUX USEES TRAITEES : SELECTION BACTERIENNE REVELEE PAR UN SEQUENÇAGE A HAUT DEBIT

PRÉAMBULE

Le premier chapitre a mis en évidence une sélection bactérienne des bactéries de l'effluent lors de la colonisation des goutteurs (différences entre les communautés 'eaux usées' et 'biofilms'). Une sélection de bactéries thermophiles a également été mise en évidence. Pour aller plus loin, une seconde expérimentation à l'échelle du terrain a été réalisée, cette fois-ci à l'échelle de la parcelle. Les paramètres environnementaux dans la conduite d'irrigation et dans les goutteurs sont différents, notamment les conditions d'écoulement. Par ailleurs, les biofilms des conduites vont, par détachement, alimenter les microbiotes en aval dans les goutteurs. L'objectif de cette étude était d'étudier la composition microbiologique associée au colmatage le long d'un système d'irrigation complet, en considérant à la fois les conduites et les goutteurs dans des conditions terrain les plus proches de la réalité. Pour cela, une ligne d'irrigation sur laquelle des goutteurs boutons étaient fixés a été alimentée en eau usée traitée pendant 2 mois à la fréquence de 1 fois par semaine pendant 1 heure. Cette ligne permettait d'irriguer de jeunes plants de vigne. Jusqu'à présent, les communautés bactériennes associées au colmatage des systèmes d'irrigation goutte à goutte avaient été décrites au travers de l'analyse des PLFAs. Cependant, plusieurs auteurs ont recommandé d'utiliser des méthodes plus discriminantes pour étudier la composition microbienne des biofilms. C'est pourquoi, dans cette étude, le séquençage haut débit a été utilisé pour caractériser les communautés bactériennes.

Ce chapitre est présenté sous un format article, en anglais, publié le 02/04/2019 dans la revue *Biofouling*.

BIOFOULING
https://doi.org/10.1080/08927014.2019.1591377

Taylor & Francis
Taylor & Francis Group

Check for updates

Drip irrigation biofouling with treated wastewater: bacterial selection revealed by high-throughput sequencing

Kévin Lequette[a,b], Nassim Ait-Mouheb[b], and Nathalie Wéry[a]

[a]LBE, Univ Montpellier, INRA, Narbonne, France; [b]IRSTEA, UMR G-EAU, University of Montpellier, Montpellier, France

ABSTRACT

Clogging of drippers due to the development of biofilms weakens the advantages and impedes the implementation of drip irrigation technology. The objective of this study was to characterise the bacterial community of biofilms that develop in a drip irrigation system supplied with treated wastewater. High-throughput sequencing of 16S rRNA gene amplicons indicated that the bacterial community composition differed between drippers and pipes, mainly due to changes in the abundance of the genus *Aquabacterium*. Cyanobacteria were found to be involved in the biological fouling of drippers. Moreover, bacterial genera including opportunistic pathogenic bacteria such as *Legionella and Pseudomonas* were more abundant in dripper and pipe biofilms than in the incoming water. Some genera such as *Pseudomonas* were mostly recovered from drippers, while others (ie *Bacillus*, *Brevundimonas*) mainly occurred in pipes. Variations in the hydraulic conditions and properties of the materials likely explain the shift in bacterial communities observed between pipes and drippers.

ARTICLE HISTORY
Received 17 January 2019
Accepted 3 March 2019

KEYWORDS
treated wastewater reuse; biofilm; 16S rRNA; opportunistic pathogenic bacteria; drip irrigation

Introduction

Due to the scarcity of water resources, water-saving irrigation techniques and alternative water resources need to be developed. The reuse of treated wastewater (TWW) appears to be an efficient way of mitigating the issue of water resource rarefaction, especially in arid and semi-arid countries (Worako 2015). Indeed, the reuse of TWW presents several benefits such as the reduction of pressure on freshwater sources and the supply of nutrients (eg nitrogen, phosphorus) for plant growth (Lazarova & Bahri 2005). Drip irrigation systems for the irrigation of crops offer the best water efficiency (up to 90%) compared with other irrigation systems (Lamm et al. 2007). However, dripper clogging remains one of the major issues in drip irrigation. Inside a dripper, the water follows a more or less complex and long pathway with a channel section of about 1 mm^2 in an emitter, which causes a head loss. However, this milli-channel is extremely sensitive to clogging (Liu & Huang 2009; Niu et al. 2013) and the resulting obstruction of the dripper channel decreases the uniformity of water applications (Dosoretz et al. 2010), increases maintenance operations and weakens the interest farmers have for this type of system.

Dripper clogging processes are complex. They are related to the geometry of the dripper (creation of vortex zones favouring particle deposition) (Al-Muhammad et al. 2016), to the quality of the irrigation water (suspended particle load, chemical composition) (Lamm et al. 2007) and to biological processes (biofilm growth) (Katz et al. 2014; Rizk et al. 2017). Among all of these factors, biofilm development is the most difficult one to control (Lamm et al. 2007).

Biofilms enhance the adhesion of physical and chemical deposits (Adin & Sacks 1991; Goyal et al. 2015) and are present throughout the whole irrigation system (eg filters, pipes and drippers), causing clogging of the irrigation systems (Yan et al. 2010). Even though biofilm research has progressed in several fields, very little is known about biofilms in agriculture and particularly in irrigation systems supplied with treated wastewater. Little is known about the microbial composition of these biofilms, despite such information being a prerequisite for developing effective strategies in dealing with clogging. A few studies, even if limited to laboratory and greenhouse experiments, have provided the first answers to this question (Zhou et al. 2017) by using phospholipid fatty acids (PLFAs) as bacterial biomarkers. These studies reported that Gram-negative bacteria, such as the genus *Pseudomonas*, can play a significant role in

CONTACT Nathalie Wéry nathalie.wery@inra.fr
© 2019 Informa UK Limited, trading as Taylor & Francis Group

biofilm development. Sánchez et al. (2014) examined the bacterial diversity of dripper biofilms from a greenhouse- enclosed drip irrigation system experiment and characterised the composition of these biofilms using denaturing gradient gel electrophoresis. It was found that thermophilic bacteria, such as the genus *Firmicute*, were dominant (reaching 53% of the global bacterial community) in these biofilms. Nevertheless, despite the relevance of these studies, the methods used were not sufficiently discriminating for analysing the entire structure of microbial communities within the biofilms. The present authors have recommended the use of high-throughput sequencing methods for a more comprehensive and detailed analysis of the microbial community (Zhou et al. 2017). Over the last few decades, the development of next-generation sequencing (NGS) techniques have allowed complex microbiomes to be characterised at a higher level of discrimination and these approaches have been employed for characterising the microbial communities of activated sludge (Stoeck et al. 2018) or biofilms from a moving bed biofilm reactor fed by wastewater (Biswas & Turner 2012). NGS methods have been also applied for monitoring pathogens (Reeves et al. 2011). To the authors' knowledge no study using modern high-throughput sequencing to reveal bacterial diversity in dripper biofilms has been published.

The microbial quality of irrigation water attracts substantial attention due to an increase in gastrointestinal illnesses caused by contaminated products (Pandey et al. 2014). Urban wastewater contains many microorganisms, including pathogens (OMS 2006; USEPA 2012). Some of these organisms persist despite wastewater treatment. The regrowth of *Salmonella* and *Escherichia coli* in water reclamation and distribution systems has recently been demonstrated using viable bacterial detection assays (Lin et al. 2016), although no data are available as to the outcome of these bacteria once in a drip irrigation system. Dripper and pipe biofilms could offer a favourable habitat for these and other pathogenic bacteria. The search for pathogenic bacteria was also performed in the current study to assess whether these biofilms might represent a reservoir of pathogens. Indeed, the latter could entail sanitary risks in cases of biofilm detachment.

The aim of the current research was to explore the composition of the bacterial community responsible for biofilm development in a drip irrigation system. This work was carried out at real scale in the field, using the most powerful technique for studying bacterial communities, ie high throughput sequencing. Drippers and connecting pipes were collected and the bacterial diversity was analysed and compared between both types of habitats.

Materials and methods

Site and experimental device

The agricultural parcel was located at Murviel-Les-Montpellier (Hérault, France). A 9.5 m polyethylene irrigation pipe (inner diameter: 16 mm) was installed on this site. Seventeen non-compensate drippers (NPC J-Turbo Key Plus Dripper, Jain Irrigation System Ltd, Jalgaon, Maharashtra, India, Figure 1), working at a flow rate of $2\,l\,h^{-1}$ with an inlet pressure of 1 bar, were placed every 50 cm along the pipe. A manometer was connected to the entrance of the irrigation line in order to monitor the working pressure.

The manufacturing characteristics of drippers are summarised in Gamri et al. (2014). The flow is characterised by a dimensionless number called the Reynolds number (*Re*), computed using the following formula:

$$Re = \frac{\rho v D}{\mu} \quad (1)$$

where ρ is the water density ($kg\,m^{-3}$), v the water velocity across the pipe ($m\,s^{-1}$), D the internal diameter (m), and μ the water viscosity (Pa s). In this study, *Re* in the irrigation pipe was equal to 795, thus indicating a laminar regime. In the drippers, *Re* was equal to 220 (Gamri et al. 2014).

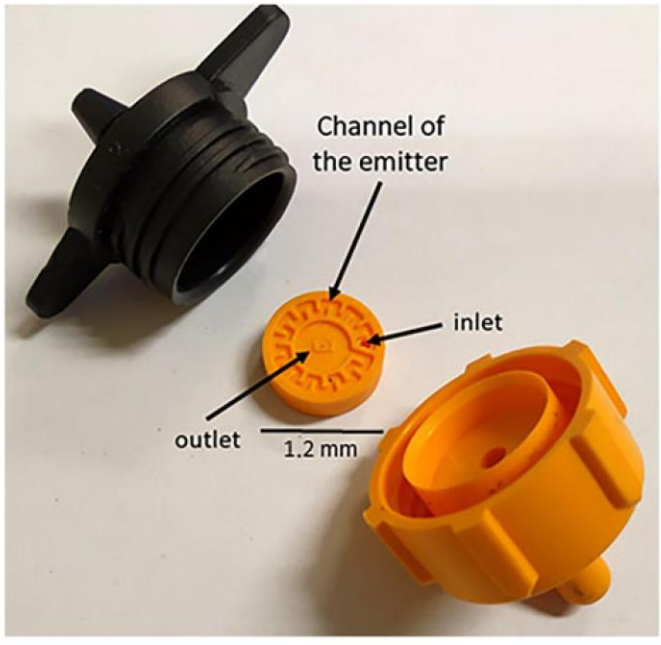


Figure 1. Online drippers used in the current study.

Table 1. Physico-chemical characteristics of the treated wastewater.

Characteristics	Units	Mean	SD
COD	mg l^{-1}	96.5	13.1
Ammonia	mg l^{-1}	22.8	5.2
Nitrate	mg l^{-1}	3.7	1.3
Phosphorus	mg l^{-1}	12.2	1.2
Total suspended solids	mg l^{-1}	43.0	20.7
pH		7.5	0.2
Conductivity	µS cm^{-1}	1,525.8	124.2

The pipe was supplied with treated wastewater from the Murviel-les-Montpellier waste stabilisation pond, and operated for 1 h per week in order to irrigate young vine plants. Irrigation began on 28 July 2017 and ended on 18 October 2017. The TWW was stored in an open storage tank for seven days before each irrigation event and was filtered at 400 µm through a disk filter. The flow rate of each emitter was measured once a week to evaluate the evolution of clogging with time.

Each week (n = 12), TWW quality was evaluated with a series of physico-chemical measurements. The chemical oxygen demand (COD), ammonia, nitrate and phosphorus concentrations (mgl^{-1}) were measured with a spectrophotometer (DR1900, Hach Company, Loveland, CO, USA) using Hach reagents®. Conductivity and pH were measured with probes (TetraCon® 925 and pH-Electrode Sentix® 940, WTW, Wheilhem, Germany). The main water characteristics are presented in Table 1.

Monitoring and sampling

The flow rate was measured to assess the clogging evolution of drippers, by collecting, then weighing the amount of liquid released into a bucket at the outlet of each dripper over a period of 5 min. Flow rates were evaluated in l h^{-1}.

TWW was filtered (15–30 ml) each week through 0.2 µm filters (Supor® 200 PES Membrane Disc Filter, Pall Corporation) in order to assess the bacterial community of the treated wastewater. Filters were placed at −20 °C until DNA extraction.

Six segments (~15 cm) of the irrigation pipe were sampled along the pipe. The biofilms on these fragments were collected at the end of the irrigation period (81 days) using sterile swabs. Samples were placed in tubes containing 2 ml of PBS 1× and stored at −20 °C until DNA extraction.

Drippers were sampled at two time periods. Eight drippers out of the 17 were sampled after 38 days, with the remaining nine drippers being sampled at the end of the irrigation period (81 days). The drippers sampled at day 38 were replaced by new ones to maintain a water supply to the vine plants. As these new drippers had a different starting time point than the others, they were not taken into account in the monitoring of flow and microbial analyses were not performed on them. DNA was extracted on the day of sampling on the part comprising the channel (Figure 1).

DNA extraction

DNA extraction was carried out using a PowerWater® DNA Isolation Kit (Qiagen, Hilden, Germany). The dripper (part comprising the channel, Figure 1) and filter samples were placed in 5 ml tubes containing beads. The manufacturer's guidelines were then followed. The DNA concentration was measured and purity was checked using spectrophotometry (Infinite NanoQuant M200, Grödig, Tecan, Austria). Extracted DNA was stored at −20 °C.

Illumina sequencing

Total bacterial amplification was performed on the biofilm (pipe and dripper) and water samples. The V4–V5 region from 16S rRNA genes was amplified by PCR with 30 cycles (annealing temperature of 65 °C) from the extracted DNA and using primers 515U (5′-GTGYCAGCMGCCGCGGTA-3′) and 928U (5′-CCCCGYCAATTCMTTTRAGT-3′) (Wang & Qian 2009). Adapters were added for multiplexing samples during the second amplification step of the sequencing. The resulting products were purified and loaded onto the Illumina MiSeq cartridge for sequencing of paired 300 bp reads following the manufacturer's instructions (v3 chemistry). Sequencing and library preparation were performed at the Genotoul Lifescience Network Genome and Transcriptome Core Facility in Toulouse, France (get.genotoul.fr). Mothur (version 1.39.5) (Schloss et al. 2009) was used to associate forward and reverse sequences with preclustering at four differences in nucleotides over the length of the amplicon. Uchime (Edgar et al. 2011) was used to identify and remove chimera. Rare unique sequences that appeared less than three times in the entire dataset were removed. 16S rRNA sequences were aligned using SILVA SSURef NR99 version 128 (Mitrović et al. 2011). At the end, sequences were sorted with 97% similarity into operational taxonomic units (OTUs). The chloroplast sequences were removed from the raw data. A list of genera including pathogenic bacteria commonly found in treated wastewater (OMS 2006; EPA 2012) were also tested in order to verify whether the samples might host pathogens (Supplemental material Table S1). Finally, the BLAST program (http://www.ncbi.nlm.

nih.gov/BLAST/) was used to search for publicly available sequences that were closely related to the sample sequences. Sequences were submitted to GenBank under the accession numbers MK273559–MK275196.

Statistical analyses

The number of reads generated for each sample was evenly distributed (12,000–13,000 reads). Calculations of diversity indices (alpha-diversity measurements) were performed for each sample. The Shannon diversity index, the reciprocal Simpson index, and the nonparametric richness estimators ACE (abundance-based coverage estimator) and Chao1 were also calculated for each TWW and biofilm sample. Chao1 richness estimates were based on singletons and doubletons as described by Chao1 (Chao 1984), while ACE was based on the distribution of abundant (>10) and rare (<10) species. Kruskal–Wallis tests were performed to compare indices of diversity and richness according to the origin of the sample. For the comparison of bacterial community structures, a dissimilarity matrix (Bray–Curtis) was performed and visualised using principal coordinate analysis (PCoA). A one-way analysis of similarities (ANOSIM) was used to identify significant differences in community assemblage structure between samples based on the origin of the sample (Clarke 1993). The OTUs that contribute most to the divergence between two habitats were identified using Similarity Percentage (SIMPER) analysis (Clarke 1993). The sequencing data analysis was processed under R v3.4 (www.r-project.org) through R-Studio (http://www.rstudio.com/) with the phyloseq package (McMurdie & Holmes 2012).

Results

Flow rate evolution

The drip irrigation system was fed for 12 weeks with treated wastewater from a waste stabilisation pond. The dripper flows were monitored to assess the evolution of clogging over time. An expected average decrease of 24 ± 4.5% was observed in the flow between the beginning and the end of the irrigation period (Figure 2). Even though complete clogging had not been reached at the end of the irrigation period, the decrease in flow was assumed to be related to the accumulation of material in the irrigation system. The bacterial communities were analysed in TWW, pipe biofilms and at the two dripper sampling times.

Diversity analysis

The richness and bacterial diversity were measured using several indices. As there was no difference between the two sampling times for the drippers ($p > 0.05$), the dripper biofilms were grouped together for analysis (Table 2). The richness and bacterial diversity indices were higher in TWW than in pipe and dripper biofilms. The lowest diversity indices for pipe and dripper biofilms revealed that the bacterial communities were less complex compared to the bacterial community in TWW. The difference between the TWW and biofilm indices also suggested that the bacterial communities of the biofilms were not only associated with bacterial deposition but that there was also a selection of bacterial populations according to their ability to cling onto the pipe and dripper surfaces.

Composition of bacterial communities from TWW and biofilm samples

To determine the identities of the major bacterial groups in the TWW and biofilm samples, analysis of 16S rRNA gene sequencing data was performed. All drippers were grouped together for the next analyses because no differences or significant shifts in the global bacterial community were observed between the two sampling times of drippers.

For the three types of habitats, the highest mean relative abundances, at phylum level, was associated to Proteobacteria (with 50%, 46% and 34% for dripper biofilms, pipe biofilms and TWW samples respectively), followed by Bacteroidetes (with 18%, 17% and 25% respectively) and Actinobacteria (with 6%, 22% and 11% respectively) (Figure 3). The strongest increase between TWW and pipe biofilms from 11% to 22% was observed for Actinobacteria while the abundance of Cyanobacteria increased from 4% to 12% between TWW and dripper biofilms.

Genus-level analysis of TWW bacterial composition revealed that uncultured members of the order Burkholderiales (MWH-UniP1 aquatic group: 5%), the class Actinobacteria (PeM15_ge: 5%) and the order Chlorobiales (SJA-28_ge: 3%) were the genera with the highest relative abundances (Table 3). Bacterial communities of pipe samples were dominated by the genera *Aeromicrobium* (10%), *Brevundimonas* (5%) and *Chryseobacterium* (5%). In dripper biofilms, the dominant genera were *Aquabacterium*, with a mean relative abundance of 14%, and *Terrimonas*, with a mean relative abundance of 9% (Table 3).

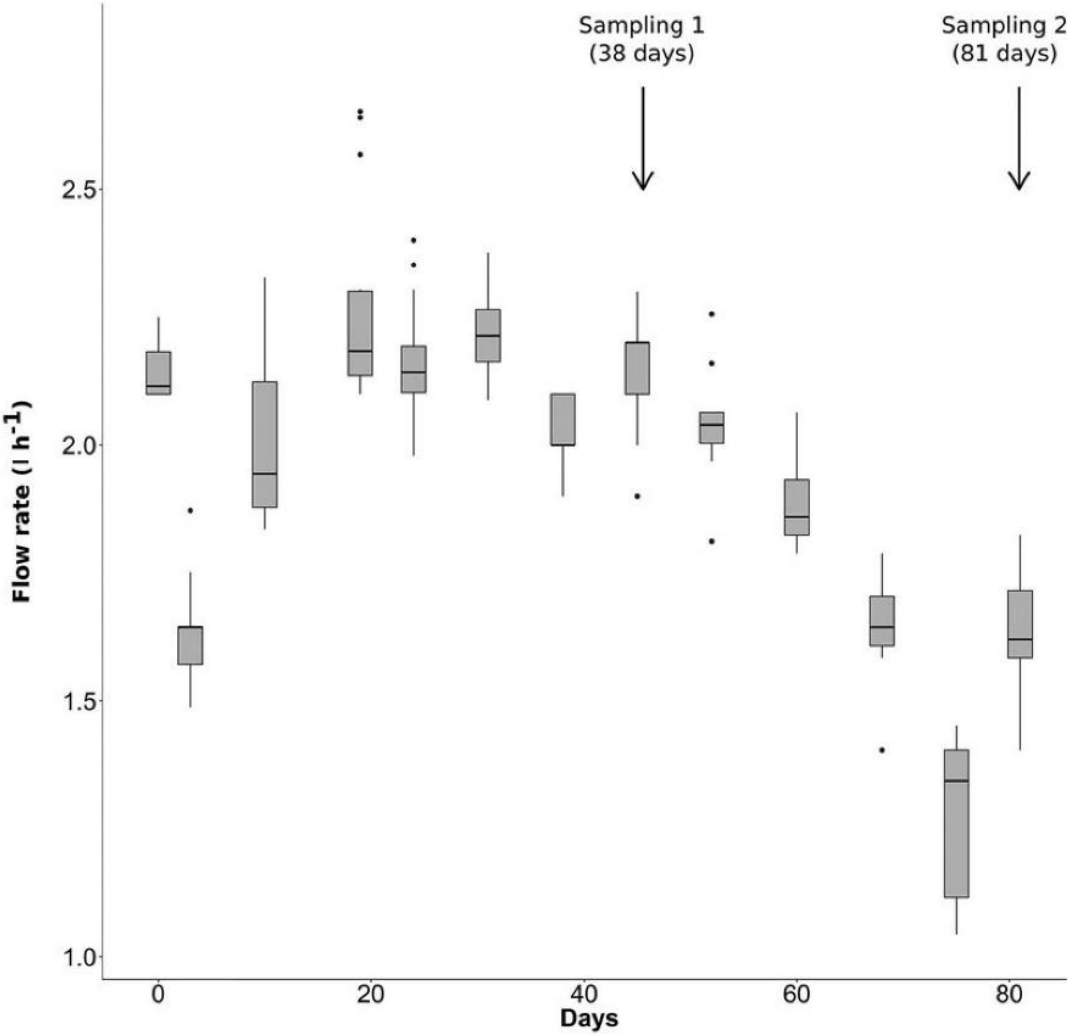


Figure 2. Evolution of the flow rate from drippers (in l h^{-1}; 17 drippers until sampling 1, nine drippers until sampling 2) after 81 days. Boxplots display dispersion of data from the first to third quartile. Median is indicated as horizontal bars inside the boxes.

Table 2. Species richness estimates and diversity indices in dripper, pipe and treated wastewater (TWW) samples.

	Richness indices			Diversity indices	
		OTUs estimated			
Samples	OTUs observed	Chao1	ACE	Shannon	1/Simpson
Drippers (n = 17)	360 ± 44^{ab}	475 ± 57^{ab}	412 ± 61^{ab}	3.8 ± 0.4^{ab}	18.1 ± 8.8^{ab}
Pipe (n = 6)	326 ± 24^{ab}	406 ± 25^{bc}	376 ± 38^{ab}	3.8 ± 0.3^{ab}	20.7 ± 7.9^{ab}
TWW (n = 8)	476 ± 37^{c}	540 ± 41^{a}	505 ± 46^{c}	4.7 ± 0.2^{c}	47.2 ± 21^{c}

Kruskal-test and Dunn-test *ad hoc* test; letters show Dunn's test results.

The cyanobacterial community composition differed according to the origin of the sample. The Shannon diversity index at genus level was significantly higher in the dripper than in the TWW and pipe samples (Kruskal test, $p < 0.05$) with 1.1 ± 0.3, 0.6 ± 0.4 and 0.7 ± 0.4 respectively. The cyanobacterial communities of the pipe and TWW samples were mainly composed of unicellular *Synechococcus* (81% and 77% respectively) whereas filamentous *Leptolyngbya* (35%) and Obscuribacterales (10%) dominated in dripper biofilms. The mean abundances of *Leptolyngbya* and Obscuribacterales relative to the cyanobacterial community in the dripper samples were compared between 38 and 81 days. Each showed an increase from 9% to 58% and from 1% to 18%, respectively.

Spatial changes of bacterial populations along the drip irrigation system

Bacterial population structures were compared between water and biofilm samples by PCoA (Figure 4). Bacterial communities were clustered according to the water/biofilm origin of the sample

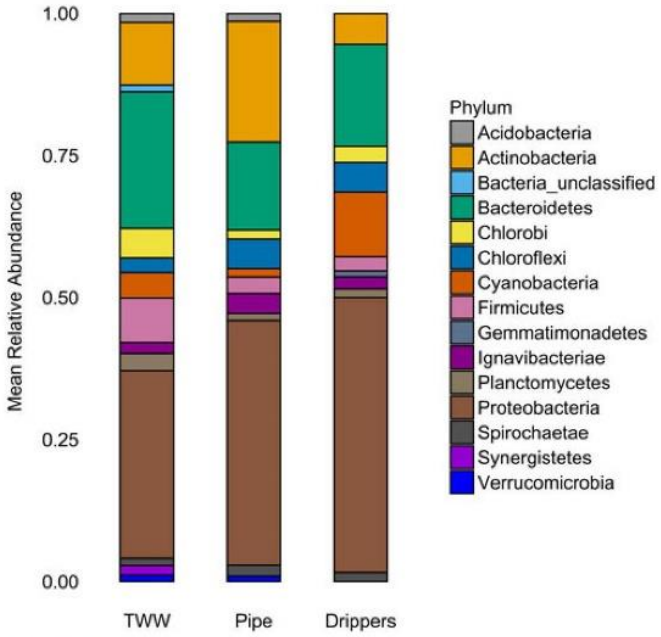


Figure 3. Mean relative abundance according to the habitat (phylum level, $n_{TWW} = 7$, $n_{pipe} = 6$, $n_{dripper} = 17$). TWW = treated wastewater.

(one-way ANOSIM, $R = 0.74$, $p < 0.05$). Some OTU were associated with water samples, such as OTU10 affiliated to the order Burkholderiales (MWH-UniP1 aquatic group), while others were associated with pipe biofilms (ie *Brevundimonas*-OTU20 and *Thiobacillus*-OTU14) or dripper biofilms (ie *Aquabacterium*-OTU1 and *Terrimonas*-OTU2).

SIMPER analysis was performed to identify the first OTUs that significantly contributed to discriminate sample categories (water *vs* biofilms) (Table 4).

Dripper–pipe group separation was significantly dominated by *Aquabacterium* (OTU1). Dripper–TWW group separation was mainly driven by *Terrimonas* (OTU2), the OTU10 affiliated to the order Burkholderiales (MWH-UniP1 aquatic group) and the OTU13 affiliated to the class Actinobacteria (PeM15_ge) with a cumulative contribution of 11%. Cyanobacteria such as *Synechococcus* (OUT24) also contributed to the dripper–TWW divergence (Supplemental material Table S4). Pipe–TWW group separation was mainly driven by a member of the order Burkholderiales (MWH-UniP1 aquatic group, OTU10), the genus *Aeromicrobium* (OTU16) and the genus *Brevundimonas* (OTU20) with a cumulative contribution of 9%. Others such as *Thiobacillus* (OTU14), *Chryseobacterium* (OTU22), PeM15_ge (OTU13), *Gordonia* (OTU19) and *Dietzia* (OTU32) (Table 4, Supplemental material Table S3) also significantly contributed to the Pipe–TWW divergence.

Table 3. Most abundant bacteria for each habitat (>1%).

Habitat	Taxonomic affiliation	Relative abundance
Dripper	*Aquabacterium*	14.06
	Terrimonas	9.23
	Leptolyngbya	7.36
	34P16_ge	5.25
	Rhodopseudomonas	4.11
	Rhodocyclaceae (unclassified)	2.98
	Pseudoxanthomonas	2.65
	SJA-28_ge	2.42
	Tistrella	1.79
	Run-SP154_ge	1.36
	Nocardia	1.24
	Limnothrix	1.18
	Patulibacter	1.11
	Ignavibacterium	1.01
Pipe	*Pseudoxanthomonas*	7.61
	Aeromicrobium	5.82
	Terrimonas	5.20
	Brevundimonas	4.72
	Thiobacillus	4.16
	Chryseobacterium	3.82
	Gordonia	3.64
	Sphingomonas	3.37
	Dietzia	3.19
	Thiomonas	2.84
	Ornithinimicrobium	2.57
	Bacteroidetes_VC2.1_Bac22_ge	2.06
	Aquabacterium	1.88
	Paracoccus	1.85
	Methylomonas	1.65
	Sphingopyxis	1.53
	Rhodocyclaceae (unclassified)	1.32
	Run-SP154_ge	1.21
	Microbacterium	1.19
	Exiguobacterium	1.18
	Rhodococcus	1.11
	PeM15_ge	1.11
	SJA-28_ge	1.09
	Methylocystis	1.03
	Microvirga	1.02
TWW	MWH-UniP1_aquatic_group	5.73
	PeM15_ge	5.05
	SJA-28_ge	3.75
	Run-SP154_ge	3.58
	Alcaligenaceae (unclassified)	3.13
	Lentimicrobiaceae_ge	2.77
	Terrimonas	2.47
	Methylocystis	2.38
	Synechococcus	2.37
	Ruminiclostridium	1.81
	Sediminibacterium	1.79
	Blgi5_ge	1.77
	OPB56_ge	1.56
	VadinBC27_wastewater-Sludge_group	1.46
	CL500-3	1.45
	Anaerovorax	1.41
	Phaeodactylibacter	1.25
	NS11-12_marine_group_ge	1.16
	Methylobacillus	1.15
	Acidibacter	1.09
	Ignavibacterium	1.08
	Candidatus_Aquiluna	1.07

Spatial changes of opportunistic pathogenic genera between pipe and dripper biofilms

In order to assess whether a biofilm can host pathogenic bacteria, a list of pathogenic and opportunistic pathogenic bacterial genera was tested (Supplemental material Table S1). The data did not reveal any tested

Table 4 Bacterial populations that contribute the most to explaining differences among samples (result of Simper analysis).

OTU	Class	Genus	Species identity[1]	% Identity[1]	Relative contribution (%)	*p*-value
Dripper biofilms *vs* Pipe biofilms						
Otu1	Betaproteobacteria	*Aquabacterium*	—	100	7.92	0.08
Otu10	Betaproteobacteria	MWH-UniP1	—	100	3.32	0.01
Otu16	Actinobacteria	*Aeromicrobium*	—	100	3.13	0.01
Otu20	Alphaproteobacteria	*Brevundimonas*	—	100	2.58	0.01
Otu14	Betaproteobacteria	*Thiobacillus*	*T. denitrificans*	100	2.18	0.01
Otu22	Flavobacteria	*Chryseobacterium*	—	100	2.11	0.03
Otu13	Actinobacteria	PeM15_ge	—	100	2.09	0.01
Dripper biofilms *vs* TWW						
Otu2	Sphingobacteriia	*Terrimonas*	—	100	4.99	0.03
Otu10	Betaproteobacteria	MWH-UniP1	—	100	3.46	0.01
Otu13	Actinobacteria	PeM15_ge	—	100	2.38	0.01

[1]According to BLASTn program.

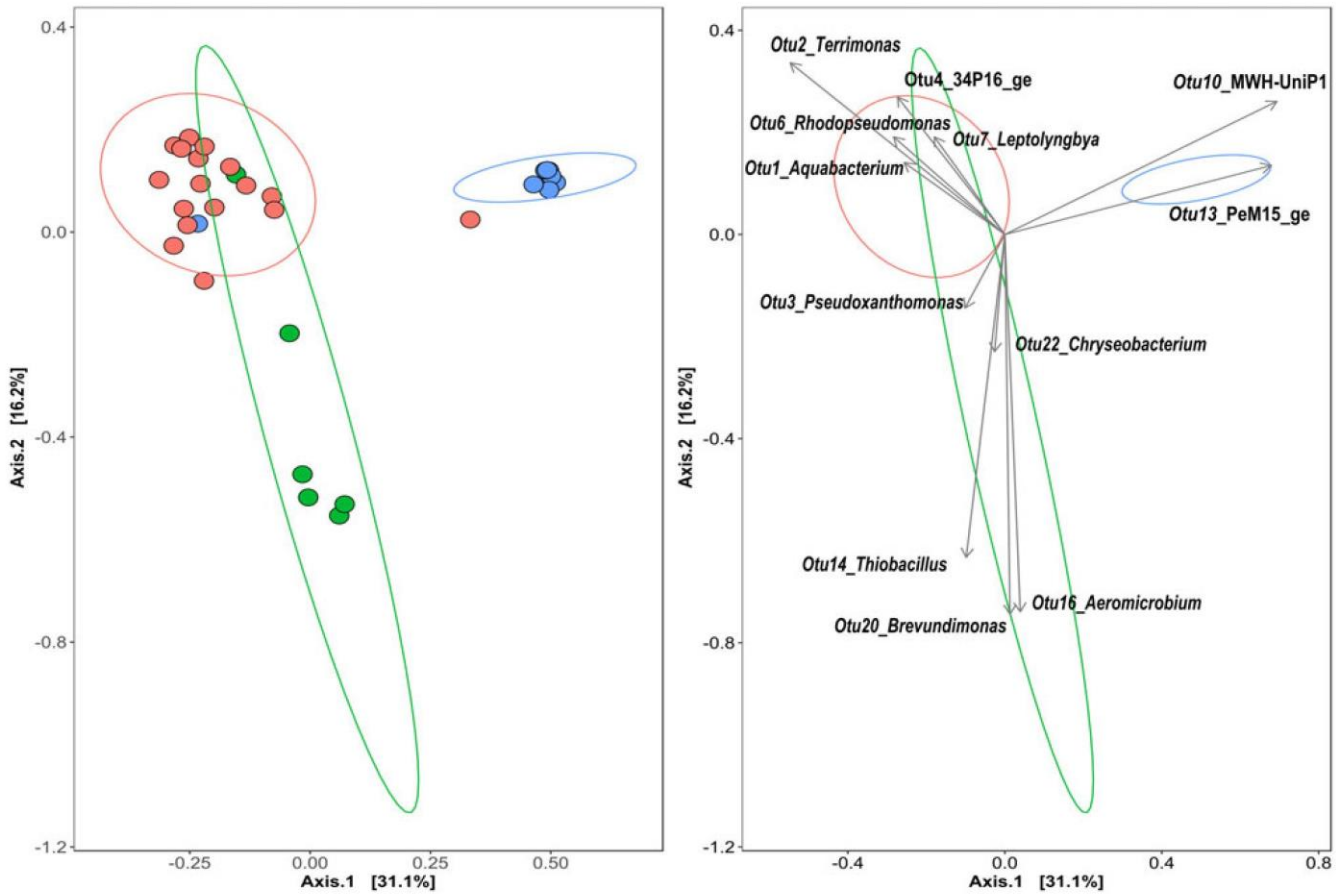


Figure 4. PCoA ordination plot of bacterial diversity of pipe biofilms (green, n = 6), dripper biofilms (red, n = 17) and TWW samples (blue). The analysis was based on Bray – Curtis similarity coefficients. The ellipsoids represent the 95% cut-off similarity level among samples. Arrows display the orientation and contribution (ie greatest contributors) of OTUs.

pathogenic genera, although a few genera that include opportunistic pathogenic species were identified. The relative abundance of all putative opportunistic pathogenic genera detected was below 1%.

The presence and relative abundances of putative opportunistic pathogenic genera varied according to the habitat (Figure 5, Supplemental material Tables S5 and S6). Some genera, such as *Stenotrophomonas* (Supplemental material Tables S5 and S6), and the genera *Nocardia* or *Legionella* were common in the pipe and dripper habitats. The genus *Legionella* was present in all pipe biofilms and in 14 out of 17 dripper biofilms. The genus *Nocardia* was also present in all pipe biofilms and in almost all dripper biofilms (15 out

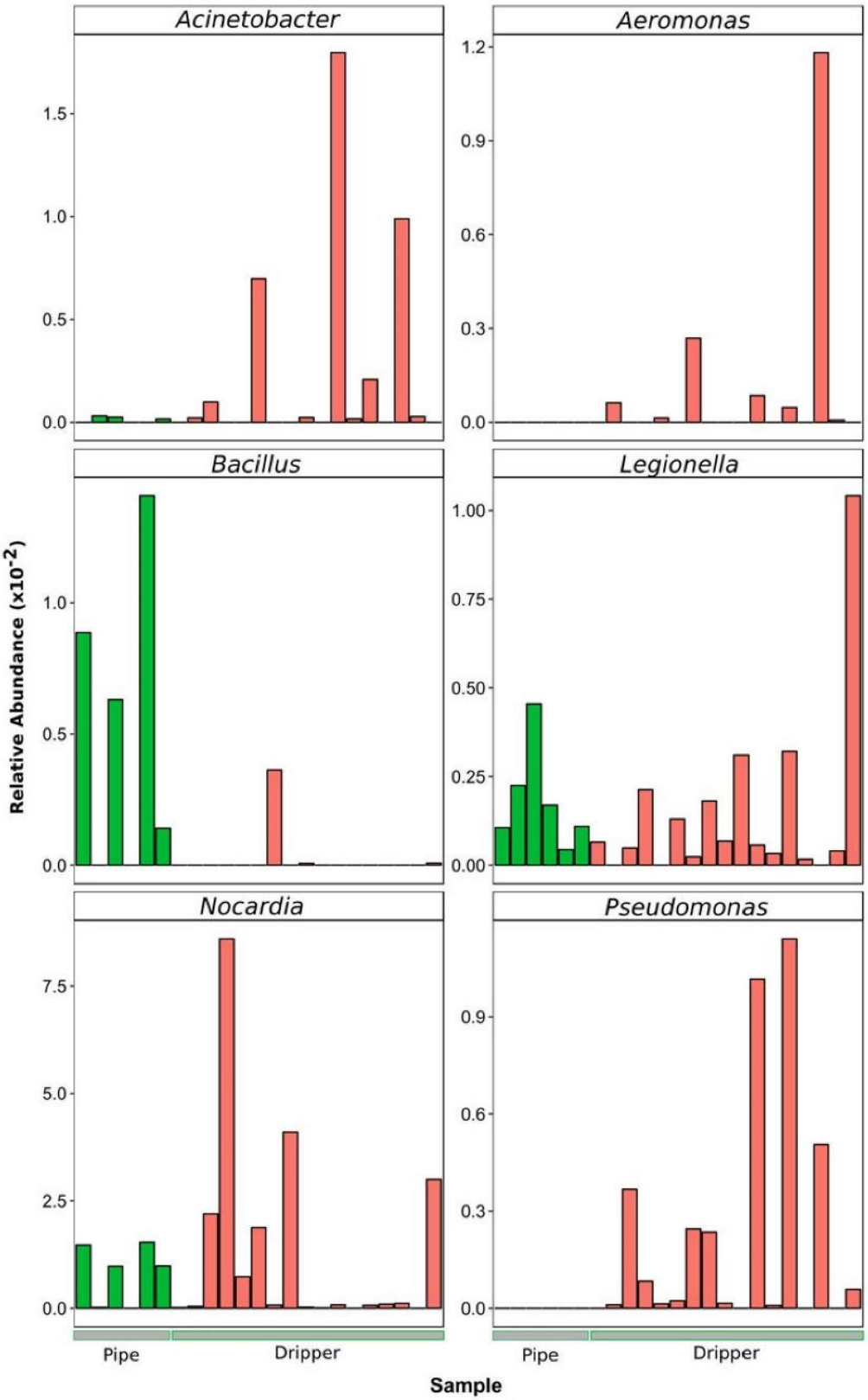


Figure 5. Relative abundance of genera containing pathogenic opportunistic species in the pipe (green, n = 6) and dripper biofilms (red, n = 17).

of 17) although its relative abundance was higher in biofilms from drippers. The occurrence and relative abundances of the genus *Acinetobacter* was higher in dripper biofilms compared to pipe biofilms (Figure 5).

Other genera were only associated with either dripper or pipe biofilms. *Pseudomonas* was only found in dripper biofilms (eight out of 17) and never in pipe samples. Finally, genera such as *Coxiella* were found

in most wastewater samples (six out of eight) but were absent in biofilms from pipes and rarely occurred in biofilms from drippers (four out of 17) (Supplemental material Tables S5 and S6).

Discussion

Biofouling is one of the principal issues in drip irrigation. In this study, bacterial colonisers of irrigation systems fed by treated wastewater (TWW) were identified by high-throughput sequencing of the 16S rRNA gene. The bacterial community structure of wastewater after treatment in lagoon systems, of pipe and dripper biofilms was compared after an irrigation period of two months at a field scale.

The main phyla identified in TWW and biofilm samples (ie Proteobacteria, Bacteroidetes and Actinobacteria) (Figure 3) were among the most abundant bacterial groups in treated wastewater (Becerra-Castro et al. 2015) and in freshwater biofilms (Besemer 2015). However, the results were not consistent with those of Sánchez et al. (2014), who studied biofilms in drippers fed by TWW in greenhouse conditions, and identified Firmicutes as the main phylum. One possible explanation is that greenhouse environmental conditions, with especially high temperatures, favour colonisation by thermophilic bacteria (40–70 °C) belonging to the Firmicutes. This difference confirmed that biofilm composition can be influenced by the experimental set-up and thus highlighted the importance of studying the biofouling of drip irrigation systems in field applications.

Diversity indices analysis revealed that the bacterial communities from pipe and dripper biofilms were less rich and diverse than in TWW (Table 2). This is corroborated by several studies that have previously revealed differences between biofilm and planktonic diversity indices, whether in systems supplied with wastewater, drinking water or freshwater (Sánchez et al. 2014; Peng et al. 2016). Here, pipe and dripper conditions act as an environmental filter on bacteria from TWW.

The MWH_aquatic group (Burkolderiales) and PeM_ge (Actinobacteria) were dominant in TWW (Table 3). These bacterial groups have already been identified in a eutrophic pond and in a wastewater treatment plant (Hahn et al. 2004; Xu et al. 2017). *Aeromicrobium*, *Brevundimonas* and *Chryseobacterium* were the dominant genera in pipe biofilms (Table 3). These genera have already been observed in metal pipe biofilms and in wastewater treatment plants (Peng et al. 2016). The genus *Chryseobacterium* comprises a group of aerobic filamentous organisms that are ubiquitous in the environment and appear to be involved in biofilm formation on corroded surfaces (Tiirola et al. 2009; Oliveira et al. 2011; Liu et al. 2017). The presence of filamentous bacteria in drip irrigation systems should therefore be taken into account, as they can also induce the precipitation of iron and increase the clogging of drippers.

The genus *Aquabacterium* was the main genus in dripper biofilms (Table 3). Previous studies have highlighted *Aquabacterium* as being dominant in biofilms associated with plastics (Kalmbach et al. 1999; Kalmbach et al. 2000; McCormick et al. 2016). In particular, *Aquabacterium* was identified in biofilms on polyethylene and polypropylene surfaces in contact with sewage treatment plant effluents (McCormick et al. 2016). Some species of the genus *Aquabacterium* metabolise the plasticisers used in plastics (Kalmbach et al. 1999) and could thus have a role in the initiation of the biofilm development (Kalmbach et al. 2000). The adhesion abilities of *Aquabacterium* to polyethylene could explain its higher occurrence and abundance in the drippers used in the present study. *Thiobacillus* was also a major contributor of the divergence of bacterial communities between pipe biofilms and TWW bacterial communities (relative contribution: 2.18%). It has also been identified in biofilms on microplastics (McCormick et al. 2016).

The higher relative abundance of genera of Cyanobacteria in dripper biofilms compared to TWW was not expected due to the lack of light in the irrigation system (Figure 2). The cyanobacterial community was mainly composed of the genus *Synechococcus* in TWW and in pipe biofilms, and of the genera *Leptolyngbya* and *Obscuribacterales* in dripper biofilms. *Leptolyngbya* species are photosynthetic filamentous cyanobacteria that have been reported in several environments including wastewater treatment plants (Furtado et al. 2009) and in low-light environments (Bruno et al. 2009). Unlike *Leptolyngbya*, members of the order Obscuribacterales are nonphotosynthetic cyanobacteria that have previously been reported in a wastewater treatment plant (Soo et al. 2014). They could have a key role in phosphorus cycling. Oyserman et al. (2017) demonstrated that by alternating dark/light phases with feast/famine phases in activated sludge, the growth and development of *Leptolyngbya* and members of the *Obscuribacterales* was stimulated. The transfer of water from the waste stabilisation pond to the storage tank and finally to the micro-irrigation system may have induced changes in the activity of these bacteria. For the first

time, to the authors' knowledge, this study has revealed that cyanobacteria play a part in the biological fouling of drippers.

A shift in bacterial communities from pipes to drippers was observed, with different dominant genera (Figure 4). This divergence was significantly driven by *Aquabacterium*. It could be explained by several parameters such as the type of material used (Hyun-Jung et al. 2011; Gamri et al. 2015) or changes in hydrodynamic conditions (ie flow rate, shear forces) that occurred along the drip irrigation system.

Drippers and irrigation pipes are made of polyethylene. Some microorganisms are able to colonise and alter polyethylene surfaces by modifying the functional groups on the surface, the surface topography or the hydrophobicity/hydrophilicity of the surface (Restrepo-Flórez et al. 2014). These changes can facilitate bacterial attachment to the surface and thus biofilm development on polyethylene surfaces. There are several types of polyethylene according to their density or degree of branching. For instance, *Aeromonas* and *Nocardia* were found in pipe and dripper biofilms whereas only the genus *Pseudomonas* was observed in dripper biofilms (Figure 5). These genera have polyethylene biodegradation abilities (Restrepo-Flórez et al. 2014). In the current study, no information was available concerning the material properties of the pipes and drippers. Nevertheless, this parameter might explain the presence of these bacterial genera in the pipe and dripper biofilms. An investigation of the effect of the material properties of polyethylene on the microbial communities would therefore improve present knowledge regarding biofouling processes in drip irrigation systems.

In this study, the *Re* changed from 795 in the pipe to 220 at the inlet of the dripper channel. These *Re* are associated to a laminar regime. However, due to the presence of baffles, the flow in a dripper was heterogeneous. Indeed, studies have demonstrated that the water regime in a dripper is more comparable to a turbulent regime (Li et al. 2006; Zhang et al. 2016). This change in water dynamics can affect and drive the microbial composition of biofilms (Rickard et al. 2004; Besemer et al. 2007). Modifications in the types of bacterial colonisers can induce changes in the overall properties of a biofilm (cohesiveness, resistance to shear forces). Hence, knowledge on the bacteria that are present would point out the structure of a biofilm as well as its ability to either cling onto a surface or detach itself. This information should be taken into account in the management of cleaning strategies.

Pipe and dripper biofilms also hosted bacterial genera known to harbour waterborne opportunistic pathogenic species. The most frequently occurring genera were *Acinetobacter*, *Aeromonas*, *Bacillus*, *Legionella*, *Nocardia* and *Pseudomonas*.

Some genera were found in both pipes and dripper biofilms, for example *Legionella*, *Nocardia* and *Stenotrophomonas* (Figure 5, Supplemental material Tables S5 and S6). Others were mostly associated with drippers, such as *Pseudomonas*, or to pipes, such as *Bacillus* and *Brevundimonas*. The flow parameters could explain the observed differences in colonisation by opportunistic species between pipes and drippers. Some genera such as *Escherichia* or *Mycobacterium* can grow and survive in biofilms under high-shear turbulent flow (Lehtola et al. 2007). Liu et al. (2006) demonstrated that colonisation by biofilm of *Legionella* spp. was higher under a turbulent regime than under laminar conditions ($Re < 2{,}000$) or a stagnant flow regime ($Re < 1$). However, this observation does not corroborate with the results in the present study, as this genus was present in both pipe and dripper biofilms where the flow regimes were laminar and turbulent, respectively. More research is needed to understand the impact of hydraulic conditions on biofouling in drippers containing treated wastewater. Other factors could also play a role in the presence of opportunistic bacteria in the irrigation system including material roughness or the presence of host microorganisms such as amoebae or microalgae, like *Scenedesmus* spp., *Chlorella* spp. and *Gleocystis* spp. (Zbikowska et al. 2014).

Conclusions

For the first time, the bacterial communities associated with biofouling along a drip irrigation system fed by treated wastewater have been characterised. Differences in bacterial communities between pipe and dripper biofilms were highlighted and indicated that the bacteria involved in biofouling were not the same in pipes and in drippers. The main contributor to this divergence was the genus *Aquabacterium*. Material properties and changes in water dynamics could explain this divergence. The observed differences would need to be taken into account in the management of cleaning strategies, since they could modify the properties of the biofilms at a higher scale and thus the efficiency of cleaning treatments.

Based on the results of this study, biofilms from pipes and drippers could represent a favourable habitat for several opportunistic pathogens. The concentrations of these bacteria in the biofilms still remain to be determined. Furthermore, the risk associated with contamination of irrigation water at the point of use in the case of biofilm detachment still needs to be evaluated.

The drip irrigation system was supplied with wastewater treated by three successive stabilisation ponds. The type of the treatment impacts the microbial community of the biofilm. It would thus be noteworthy to assess the impact of wastewater treatment (ie activated sludge, membrane bioreactor) on the microbial composition of a biofilm, especially concerning the dominant genera.

Acknowledgements

The authors gratefully acknowledge the financial support of the Rhone-Mediterranean and Corsica Water Agence (France), project 'Experimental platform for the reuse of treated wastewater in irrigation, Murviel-lès-Montpellier'. They thank Annabelle Mange (IRSTEA, Montpellier, France) and Valérie Bru (LBE-INRA, Narbonne, France) for their assistance in the field and at the laboratory. The authors thank also Kim Milferstedt (LBE-INRA, Narbonne, France) and Jérôme Hamelin (LBE-INRA, Narbonne, France) for their assistance in statistical analysis.

Disclosure statement

No potential conflict of interest was reported by the authors.

ORCID

Kévin Lequette http://orcid.org/0000-0001-8194-705X
Nassim Ait-Mouheb http://orcid.org/0000-0003-0099-0983
Nathalie Wéry http://orcid.org/0000-0002-9584-8092

References

Adin A, Sacks M. 1991. Dripper-clogging factors in wastewater irrigation. J Irrig Drain Eng. 117:813–826. doi:10.1061/(ASCE)0733-9437(1991)117:6(813)

Al-Muhammad J, Tomas S, Anselmet F. 2016. Modeling a weak turbulent flow in a narrow and wavy channel: case of micro-irrigation. Irrig Sci. 34:361–377. doi:10.1007/s00271-016-0508-6

Becerra-Castro C, Lopes AR, Vaz-Moreira I, Silva EF, Manaia CM, Nunes OC. 2015. Wastewater reuse in irrigation: a microbiological perspective on implications in soil fertility and human and environmental health. Environ Int. 75:117–135. doi:10.1016/j.envint.2014.11.001

Besemer K. 2015. Biodiversity, community structure and function of biofilms in stream ecosystems. Res Microbiol. 166:774–781. doi:10.1016/j.resmic.2015.05.006

Besemer K, Singer G, Limberger R, Chlup AK, Hochedlinger G, Hödl I, Baranyi C, Battin TJ. 2007. Biophysical controls on community succession in stream biofilms. Appl Environ Microbiol. 73:4966–4974. doi:10.1128/AEM.00588-07

Biswas K, Turner SJ. 2012. Microbial community composition and dynamics of moving bed biofilm reactor systems treating municipal sewage. Appl Environ Microbiol. 5:855–864.

Bruno L, Billi D, Bellezza S, Albertano P. 2009. Cytomorphological and genetic characterization of troglobitic *Leptolyngbya* strains isolated from roman hypogea. Appl Environ Microbiol. 75:608–617. doi:10.1128/AEM.01183-08

Chao A. 1984. Non-parametric estimation of the classes in a population. Scand J Stat. 11:265–270. Available from: https://www.researchgate.net/publication/268975118_Non-parametric_estimation_of_the_classes_in_a_population

Clarke KR. 1993. Non-parametric multivariate analyses of changes in community structure. Austral Ecol. 18:117–143. doi:10.1111/j.1442-9993.1993.tb00438.x

Dosoretz CG, Tarchitzky J, Katz I, Kenig E, Chen Y. 2010. Fouling in microirrigation systems applying treated wastewater effluents. New Jersey: Treat Wastewater Agricultural Use Impacts Soil Environ Crops:328–350.

Edgar RC, Haas BJ, Clemente JC, Quince C, Knight R. 2011. UCHIME improves sensitivity and speed of chimera detection. Bioinformatics. 27:2194–2200. doi:10.1093/bioinformatics/btr381

Furtado A, Calijuri MDC, Lorenzi AS, Honda RY, Genuário DB, Fiore MF. 2009. Morphological and molecular characterization of cyanobacteria from a Brazilian facultative wastewater stabilization pond and evaluation of microcystin production. Hydrobiologia. 627:195–209. doi:10.1007/s10750-009-9728-6

Gamri S, Soric A, Tomas S, Molle B, Roche N. 2014. Biofilm development in micro-irrigation emitters for wastewater reuse. Irrig Sci. 32:77–85. doi:10.1007/s00271-013-0414-0

Gamri S, Soric A, Tomas S, Molle B, Roche N. 2015. Effects of pipe materials on biofouling under controlled hydrodynamic conditions. J Water Reuse Desalin. 6:167–174. Available from: http://jwrd.iwaponline.com/lookup/doi/10.2166/wrd.2015.037

Hahn MW, Stadler P, Wu QL, Pöckl M. 2004. The filtration-acclimatization method for isolation of an important fraction of the not readily cultivable bacteria. J Microbiol Methods. 57:379–390. doi:10.1016/j.mimet.2004.02.004

Hyun-Jung J, Choi YJ, Ka JO. 2011. Effects of diverse water pipe materials on bacterial communities and water quality in the annular reactor. J Microbiol Biotechnol. 21:115–123.

Kalmbach S, Manz W, Bendinger B, Szewzyk U. 2000. In situ probing reveals Aquabacterium commune as a widespread and highly abundant bacterial species in drinking water biofilms. Water Res. 34:575–581. doi:10.1016/S0043-1354(99)00179-7

Kalmbach S, Manz W, Wecke J, Szewzyk U. 1999. *Aquabacterium* gen. nov., with description of

Aquabacterium citratiphilum sp. nov., *Aquabacterium parvum* sp. nov. and *Aquabacterium commune* sp. nov., three in situ dominant bacterial species from the Berlin drinking water system. Int J Syst Bacteriol. 49:769–777. doi:10.1099/00207713-49-2-769

Katz S, Dosoretz C, Chen Y, Tarchitzky J. 2014. Fouling formation and chemical control in drip irrigation systems using treated wastewater. Irrig Sci. 32:459–469. doi:10.1007/s00271-014-0442-4

Lamm FR, Ayars JE, Nakayama FS. 2007. Maintenance. In: Lamm FR, Ayars JE, Nakayama FS, editors. Microirrigation Crop Prod Des Oper Manag. 13th edn. Vol. 13. Amsterdam: Elsevier BV;1–643. Available from: https://www.elsevier.com/books/microirrigation-for-crop-production/lamm/978-0-444-50607-8

Lazarova V, Bahri A. 2005. Water reuse for irrigation. Lazarova V, Bahri A, editors. Boca Raton: CRC Press.

Lehtola MJ, Torvinen E, Kusnetsov J, Pitkänen T, Maunula L, Von Bonsdorff CH, Martikainen PJ, Wilks SA, Keevil CW, Miettinen IT. 2007. Survival of *Mycobacterium avium*, *Legionella pneumophila*, *Escherichia coli*, and caliciviruses in drinking water-associated biofilms grown under high-shear turbulent flow. Appl Environ Microbiol. 73:2854–2859. doi:10.1128/AEM.02916-06

Li Y, Yang P, Ren S, Xu T. 2006. Hydraulic characterizations of tortuous flow in path drip irrigation emitter. J Hydrodyn. 18:449–457. doi:10.1016/S1001-6058(06)60119-4

Lin Y. W, Li D, Gu AZ, Zeng S. y, He M. 2016. Bacterial regrowth in water reclamation and distribution systems revealed by viable bacterial detection assays. Chemosphere. 144:2165–2174. doi:10.1016/j.chemosphere.2015.10.071

Liu H, Huang G. 2009. Laboratory experiment on drip emitter clogging with fresh water and treated sewage effluent. Agric Water Manag. 96:745–756. doi:10.1016/j.agwat.2008.10.014

Liu J, Luo Z, Liu K, Zhang Y, Peng H, Hu B, Ren H, Zhou X, Qiu S, He X, et al. 2017. Effect of flushing on the detachment of biofilms attached to the walls of metal pipes in water distribution systems. J Zhejiang Univ Sci A. 18:313–328. doi:10.1631/jzus.A1600316

Liu Z, Lin YE, Stout JE, Hwang CC, Vidic RD, Yu VL. 2006. Effect of flow regimes on the presence of *Legionella* within the biofilm of a model plumbing system. J Appl Microbiol. 101:437–442. doi:10.1111/j.1365-2672.2006.02970.x

McCormick AR, Hoellein TJ, London MG, Hittie J, Scott JW, Kelly JJ. 2016. Microplastic in surface waters of urban rivers: concentration, sources, and associated bacterial assemblages. Ecosphere. 7:e01556 doi:10.1002/ecs2.1556

McMurdie P, Holmes S. 2012. PHYLOSEQ: a biocondutor package for handling and analysis of high-throughput phylogenetic sequence data. Pac Symp Biocomput. 2012: 235–246.

Goyal MR, Chavan VK, Tripathi VK. 2015. Principles and management of clogging in micro irrigation. Boca Raton: Apple Academic Press.

Mitrović SM, Dickov A, Vučković N, Mitrović D, Budiša D. 2011. The effect of heroin on verbal memory. Psychiatr Danub. 23:53–59.

Niu W, Liu L, Chen X. 2013. Influence of fine particle size and concentration on the clogging of labyrinth emitters. Irrig Sci. 31:545–555. doi:10.1007/s00271-012-0328-2

Oliveira VM, Lopes-Oliveira PF, Passarini MRZ, Menezes CBA, Oliveira WRC, Rocha AJ, Sette LD. 2011. Molecular analysis of microbial diversity in corrosion samples from energy transmission towers. Biofouling. 27: 435–447. doi:10.1080/08927014.2011.581751

OMS. 2006. Safe Use of Wastewater, Excreta and Greywater Guidelines for the Safe Use of World Health. II:204. Available from: http://whqlibdoc.who.int/publications/2006/9241546832_eng.pdf

Oyserman BO, Martirano JM, Wipperfurth S, Owen BR, Noguera DR, McMahon KD. 2017. Community assembly and ecology of activated sludge under photosynthetic feast-famine conditions. Environ Sci Technol. 51:3165–3175. doi:10.1021/acs.est.6b03976

Pandey PK, Kass PH, Soupir ML, Biswas S, Singh VP. 2014. Contamination of water resources by pathogenic bacteria. AMB Express. 4:1–16.

Peng Y, Li J, Lu J, Xiao L, Yang L. 2016. Characteristics of microbial community involved in early biofilms formation under the influence of wastewater treatment plant effluent. J Environ Sci (China). 66:1–12. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/j.jes.2017.05.015

Reeves PR, Liu B, Zhou Z, Li D, Guo D, Ren Y, Clabots C, Lan R, Johnson JR, Wang L. 2011. Rates of mutation and host transmission for an *Escherichia coli* clone over 3 years. PLoS One. 6:e26907 doi:10.1371/journal.pone.0026907

Restrepo-Flórez JM, Bassi A, Thompson MR. 2014. Microbial degradation and deterioration of polyethylene - a review. Int Biodeterior Biodegrad. 88:83–90. doi:10.1016/j.ibiod.2013.12.014

Rickard AH, Mcbain AJ, Stead AT, Gilbert P. 2004. Shear rate moderates community diversity in freshwater biofilms. Society. 70:7426–7435.

Rizk N, Ait-Mouheb N, Bourrié G, Molle B, Roche N. 2017. Parameters controlling chemical deposits in micro-irrigation with treated wastewater. J Water Supply Res Tec. 66:587–597. doi:10.2166/aqua.2017.065

Sánchez O, Ferrera I, Garrido L, Gómez-Ramos MDM, Fernández-Alba AR, Mas J. 2014. Prevalence of potentially thermophilic microorganisms in biofilms from greenhouse-enclosed drip irrigation systems. Arch Microbiol. 196:219–226. doi:10.1007/s00203-014-0957-3

Schloss PD, Westcott SL, Ryabin T, Hall JR, Hartmann M, Hollister EB, Lesniewski RA, Oakley BB, Parks DH, Robinson CJ, et al. 2009. Introducing mothur: open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities. Appl Environ Microbiol. 75:7537–7541. doi:10.1128/AEM.01541-09

Soo RM, Skennerton CT, Sekiguchi Y, Imelfort M, Paech SJ, Dennis PG, Steen JA, Parks DH, Tyson GW, Hugenholtz P. 2014. An expanded genomic representation of the phylum cyanobacteria. Genome Biol Evol. 6: 1031–1045. doi:10.1093/gbe/evu073

Stoeck T, Pan H, Dully V, Forster D, Jung T. 2018. Towards an eDNA metabarcode-based performance indicator for full- scale municipal wastewater treatment

plants. Water Res. 144:322–331. doi:10.1016/j.watres.2018.07.051

Tiirola M, Lahtinen T, Vuento M, Oker-Blom C. 2009. Early succession of bacterial biofilms in paper machines. J Ind Microbiol Biotechnol. 36:929–937. doi:10.1007/s10295-009-0571-6

US Environmental Protection Agency (USEPA). 2012. Guidelines for water reuse. Washington, DC: USEPA. Available from: http://www3.epa.gov/region1/npdes/merrimackstation/pdfs/ar/AR-1530.pdf

US Environmental Protection Agency (USEPA). 2012. Guidelines for water reuse. Washington, DC: USEPA. Available from: http://www3.epa.gov/region1/npdes/merrimackstation/pdfs/ar/AR-1530.pdf.

Wang Y, Qian PY. 2009. Conservative fragments in bacterial 16S rRNA genes and primer design for 16S ribosomal DNA amplicons in metagenomic studies. PLoS One. 4:e7401 doi:10.1371/journal.pone.0007401

Worako AW. 2015. Evaluation of the water quality status of Lake Hawassa by using water quality index, Southern Ethiopia. Int J Water Resour Environ Eng. 7:58–65. Available from: http://www.academicjournals.org/IJWREE%0Ahttp://academicjournals.org/journal/IJWREE/article-abstract/B79B13252244

Xu D, Liu S, Chen Q, Ni J. 2017. Microbial community compositions in different functional zones of Carrousel oxidation ditch system for domestic wastewater treatment. AMB Express. 7:40 doi:10.1186/s13568-017-0336-y

Yan D, Yang P, Rowan M, Ren S, Pitts D. 2010. Biofilm accumulation and structure in the flow path of drip emitters using reclaimed wastewater. Trans Asabe. 53:751–758. doi:10.13031/2013.30080

Zbikowska E, Kletkiewicz H, Walczak M, Burkowska A. 2014. Coexistence of *Legionella pneumophila* bacteria and free-living amoebae in lakes serving as a cooling system of a power plant. Water Air Soil Pollut. 225:2066 doi:10.1007/s11270-014-2066-y

Zhang L, Wu P, Zhu D, Zheng C. 2016. Flow regime and head loss in a drip emitter equipped with a labyrinth channel. J Hydrodyn. 28:610–616. doi:10.1016/S1001-6058(16)60665-0

Zhou B, Wang T, Li Y, Bralts V. 2017. Effects of microbial community variation on bio-clogging in drip irrigation emitters using reclaimed water. Agric Water Manag. 194:139–149. doi:10.1016/j.agwat.2017.09.006

- Cet article est le premier décrivant la communauté bactérienne, à travers l'utilisation du séquençage haut-débit, évoluant dans un système d'irrigation goutte-à-goutte (effluent, conduite, goutteur) dans le contexte de la reuse.

- Au cours de cette expérimentation, nous avons observé que les indices de diversité et de richesse de l'effluent supérieurs à ceux des biofilms (conduits et goutteurs). Cependant, Durant l'expérimentation "Qualité", nous n'avons pas observé de differences entre les indices de l'effluent et les biofilms des goutteurs. Ceci peut s'expliquer par le fait que la composition microbienne de l'effluent de la lagune va évoluer au cours du temps et sera dépendant des conditions abiotiques (températures, ensoleillement, etc.), influençant la sélection des bactéries de l'effluent traité et la composition des biofilms.

- Cette expérimentation a mis en évidence que les communautés bactériennes des biofilms colonisant les conduites étaient différentes de celles goutteurs. Cette différence est probablement dû à des changements environnementaux comme des modifications au niveau des conditions hydrodynamiques.

- Plusieurs genres incluant des espèces pathogènes (p. ex *Legionella*, *Pseudomonas*) ont été détectés dans les biofilms colonisant la conduite d'irrigation et les goutteurs. Certains étaient plutôt associés aux biofilms des goutteurs tandis que d'autres aux biofilms des conduites d'irrigation. De nouveau, les différences en termes d'hydrodynamique pourraient expliquer ce résultat.

- Cette étude a montré l'importance des conditions d'écoulement sur la composition du biofilm. Ce paramètre sera étudié en conditions contrôlées dans le chapitre suivant.

CHAPITRE 3 : INFLUENCE DE L'ECOULEMENT SUR L'ENCRASSEMENT BIOLOGIQUE ET SUR LES COMMUNAUTES BACTERIENNES DANS LES SYSTEMES D'IRRIGATION AU GOUTTE-A-GOUTTE ALIMENTES PAR DES EAUX USEES TRAITEES.

PRÉAMBULE

Le second chapitre a montré un effet potentiel de l'écoulement expliquant les différences entre les communautés bactériennes des biofilms de la conduite et des goutteurs. Le type de goutteur et la géométrie des labyrinthes définissent les paramètres de l'écoulement dans les labyrinthes des goutteurs. Il est donc possible que suivant le type de goutteur, l'écoulement diffère et influence la mise en place et la composition bactérienne des biofilms. De plus, contrairement à l'écoulement dans une conduite d'irrigation droite, l'écoulement dans un goutteur est complexe caractérisé par un régime turbulent, avec une zone centrale où la vitesse est élevée et des zones de recirculation. L'objectif de cette étude est d'étudier l'effet l'écoulement suivant le type de goutteur sur la mise en place du colmatage des goutteurs et sur la composition microbiologique des biofilms des goutteurs. Pour cela, 3 types de goutteurs avec des débits différents (1, 2 et 4 $l.h^{-1}$) et des géométries de labyrinthe différentes (section, forme et longueur du labyrinthe) ont été choisis. Un dispositif expérimental dédié a été créé, permettant des analyses optiques non destructives, pour suivre la colonisation au cours du temps par tomographie en cohérence optique. Des lignes d'irrigation composées de ces systèmes ont été placées sur un banc d'essai et alimentées en eau usée traitée pendant 4 mois à une fréquence de 2 fois par jour pendant 1 heure. Des goutteurs ont été prélevés à 3 temps pour évaluer l'influence du temps d'irrigation en fonction du type de goutteur sur les communautés bactériennes des biofilms.
Ce chapitre est divisé en deux parties :

La première partie est dédiée à l'étude de l'effet des conditions d'écoulement dans les labyrinthes des goutteurs sur la mise en place du colmatage et sur la composition microbienne globale de celui-ci. Cette partie est abordée sur un format article, en anglais, publié dans le 26/05/2020 dans la revue *Science of the Total Environment*. La seconde partie de cette étude porte sur l'effet du type de goutteur utilisé sur la présence de microorganismes pathogènes dans les biofilms des goutteurs analysés dans la première partie.

Partie 1:

Science of the Total Environment 738 (2020) 139778

Contents lists available at ScienceDirect

Science of the Total Environment

journal homepage: www.elsevier.com/locate/scitotenv

Hydrodynamic effect on biofouling of milli-labyrinth channel and bacterial communities in drip irrigation systems fed with reclaimed wastewater

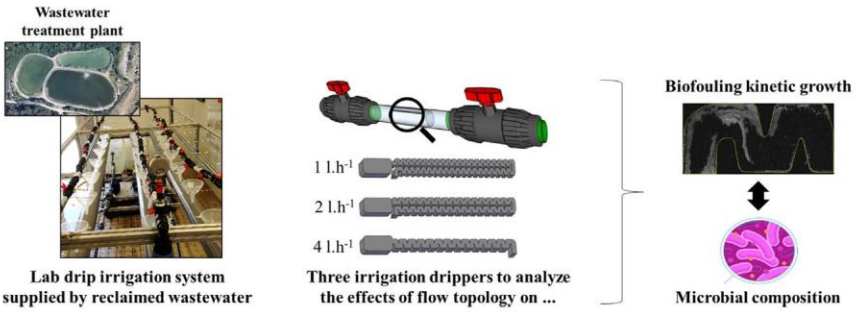
Kévin Lequette [a,b,*], Nassim Ait-Mouheb [b], Nathalie Wéry [a]

[a] INRAE, University of Montpellier, LBE, 102, Avenue des Etangs, 11100 Narbonne, France
[b] INRAE, University of Montpellier, UMR G-Eau Avenue Jean-François Breton, 34000 Montpellier, France

HIGHLIGHTS

- The hydraulic influence of drippers (1, 2 and 4 $l \cdot h^{-1}$) on biofouling was evaluated.
- Optical coherence tomography and 16S rDNA sequencing methodologies were combined.
- Biofouling of drippers were lower in 1 $l.h^{-1}$ than in 4 $l.h^{-1}$ dripper types.
- Flow behaviours of each drippers changed the bacterial community structure.
- Chloroflexi phylum was more abundant under lower average cross-section velocity.

GRAPHICAL ABSTRACT



ARTICLE INFO

Article history:
Received 13 February 2020
Received in revised form 4 May 2020
Accepted 26 May 2020
Available online 03 June 2020

Editor: Paola Verlicchi

Keywords:
Drip irrigation
Biofilm
Flow behaviours
Optical coherence tomography
High-throughput DNA sequencing

ABSTRACT

The clogging of drippers due to the development of biofilms reduces the benefits and is an obstacle to the implementation of drip irrigation technology in a reclaimed water context. The narrow section and labyrinth geometry of the dripper channel results the development of a heterogeneous flow behaviours with the vortex zones which it enhance the fouling mechanisms. The objective of this study was to analyse the influence of the three dripper types, defined by their geometric and hydraulic parameters, fed with reclaimed wastewater, on the biofouling kinetics and the bacterial communities. Using optical coherence tomography, we demonstrated that the inlet of the drippers (mainly the first baffle) and vortex zones are the most sensitive area for biofouling. Drippers with the lowest Reynolds number and average cross-section velocity v (1 $l \cdot h^{-1}$) were the most sensible to biofouling, even if detachment events seemed more frequent in this dripper type. Therefore, dripper flow path with larger v should be consider to improve the anti-clogging performance. In addition, the dripper type and the geometry of the flow path influenced the structure of the bacterial communities from dripper biofilms. Relative abundancy of filamentous bacteria belonging to Chloroflexi phylum was higher in 1 $l \cdot h^{-1}$ drippers, which presented a higher level of biofouling. However, further research on the role of this phylum in dripper biofouling is required.

© 2020 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

The scarcity of water resources is driving the development of water-saving irrigation techniques that enable integrated management of water resources. The reuse of reclaimed wastewater (RWW) is an

* Corresponding author at: INRAE, University of Montpellier, LBE, 102, Avenue des Etangs, 11100 Narbonne, France.
E-mail address: kevin.lequette@gmail.com (K. Lequette).

https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.139778
0048-9697/© 2020 Elsevier B.V. All rights reserved.

appropriate way to alleviate the problem of scarce water resources especially in arid and semi-arid regions (Worako, 2015). Using RWW has several advantages including reducing pressure on freshwater resources and on the need for nutrients (e.g. nitrogen, phosphorus) for plant growth (Lazarova and Bahri, 2005) and can improve crop yields (Wang et al., 2013). Drip irrigation is the most water efficient (up to >90%) and safest technique for irrigation using RWW (Lamm et al., 2007). Drippers are usually composed of a labyrinth-channel and an outlet basin compartment. The geometry of the channel promotes the dissipation of the turbulent kinetic energy due to the zigzag flow path and allows water to be delivered in drip form in an optimum quantity for crop growth. However, the labyrinth channel is narrow (cross-section of around 1 mm) (Zhang et al., 2010) and thus sensitive to clogging (Liu and Huang, 2009; Niu et al., 2013) which reduces drip irrigation advantages by reducing irrigation uniformity (Dosoretz et al., 2010) and by increasing maintenance (e.g. cleaning, replacing irrigation lines).

The process leading to clogging of the drippers is complex and the phenomenon is influenced by several parameters including water quality (concentration of suspended solids and chemical composition) (Lamm et al., 2007; Oliveira et al., 2017), the geometry of the dripper (Li et al., 2019; Wei, 2011) as well as biological processes (Katz et al., 2014), the latter are the most difficult to control when RWW is used (Lamm et al., 2007). Moreover, biofilms in distribution networks can harbour contaminants and may impact the quality of the water released to agroecosystems (Jjemba et al., 2010). Therefore, identifying and understanding the mechanisms leading to biofilm development is necessary to optimize control strategies. Previous studies have shown that flow velocity has an impact on the growth of biofilm in both drip-irrigation pipes (Li et al., 2012; Mahfoud et al., 2009) and in drippers (Gamri et al., 2014).

Previous studies have been carried out on the effect of hydrodynamics on the development of biofilm in straight pipe systems. Thus, an increase in flow rate or shear stress tends to promote the development of a thin and dense biofilm in the pipe wall (Lehtola et al., 2006; Percival et al., 1999). However, the flow behaviour in a dripper is more complex and heterogeneous than in pipes, where the flow is simplified, due to the narrow labyrinth flow path. This milli-labyrinth channel induces non-isotropic conditions by the development of turbulent regime with a main high velocity flow and vortex zones in the channel corners (Al-Muhammad et al., 2016, 2019; Wei et al., 2012; Zhang et al., 2007). Qian et al. (2017) studied the development of fouling in a milli-fluidic system fed with reclaimed wastewater using the Optical coherence tomography (OCT).OCT method allows to monitor biofilm formation non-invasively at a mesoscale (μm to mm range) and without staining (Derlon et al., 2012; Dreszer et al., 2014; Qian et al., 2017; Wagner et al., 2010; West et al., 2016). They reported that fouling occurs mainly in inlet channel regions and in low velocity vortices areas as found by Ait-Mouheb et al. (2018).

Flow behaviour not only influences the development of biofilms but also the microbial composition of the biofilms. Previous research on biofilms has shown that hydrodynamic conditions can drive the microbial community of the biofilms (Besemer, 2015; Hou et al., 2020; Rickard et al., 2004). Rochex et al. (2008) shown that increased shear stress reduced bacterial diversity and slow down biofilm maturation and tend to maintain a young biofilm in a Taylor-Couette reactor. However, in the context of the use of RWW, few authors have examined the influence of dripper parameters (i.e. flow rate, cross section, and geometry of the milli-channel) on microbial composition. Previous studies have described the microbial communities present in biofilms of different drippers by analysing phospholipid-derived fatty acids (PLFAs) (Yan et al., 2009, 2010; Zhou et al., 2017) and indicated that dripper flow rate influenced the PLFAs distribution. These authors showed that three to seven types of PLFAs associated with Gram-negative bacteria were common in biofilms inside drippers, suggesting a significant role for these bacteria in biofilm development. However, in order to develop effective biofilm control strategies, deeper community characterisation is required. Recent study used high-throughput sequencing to describe the bacterial communities present in dripper biofilms to improve knowledge on fouling and to identify the microorganisms responsible for fouling (Xiao et al., 2020; Zhou et al., 2019).

The objectives of the present study were to determine the effect of 3 commercial drippers with different discharges (1) on biofouling in the dripper channel and (2) on the bacterial communities in biofilms formed in drip irrigation systems fed by RWW. A non-destructive microscopic time-monitoring observation system was developed to study biofilms in commercial drippers with different flow rates (1, 2 and 4 $l \cdot h^{-1}$) and known cross-sections. The combined use of the Optical Coherence Tomography method and high-throughput sequencing made it possible to monitor the development of the biofilm under different hydraulic conditions while assessing the impact of these conditions on microbial structure.

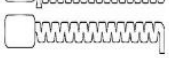
2. Materials and methods

2.1. Experimental setup

2.1.1. Experimental setup and irrigation procedure

The development of biofilm in drippers cannot be observed over time because drippers are walled inside opaque irrigation pipes (black polyethylene tubes). Thus, commercial non-pressure compensating drippers (NPC) (model D2000, Rivulis Irrigation SAS, Lespinasse, France) with different flow path geometry and different flow rates (1, 2 and 4 $l \cdot h^{-1}$) (Table 1) were placed in a transparent tube (internal diameter 15 mm, TubClair, Vitry-le-François, France), allowing to see biofilm development along the channel over time. A solid tube with an internal diameter of 19 mm (ABS+, Stratasys U-print SE plus, Stratasys Ltd., Eden Prairie, Minnesota, US) pressed the dripper against the walls of the transparent tube (Fig. 1.A,C). Finally, an outlet hole (internal diameter 2 mm) was pierced in the transparent tube above the outlet basin. Nine drippers were connected to each other according with the type of dripper using polyethylene tubing (length 10 cm, internal

Table 1
Dripper parameters.

Dripper	Structure of the dripper flow path	Geometric parameters of the path							Hydraulic parameters				
		L (mm)	W (mm)	D	D_h	Volume of the path (mm^3)	$\frac{W}{D}$	$\frac{D_h^{1/2}}{L}$	q ($l \cdot h^{-1}$)	Re	v ($m \cdot s^{-1}$)	.x	CV (%)
D1		103.4	1.01	0.8	1.02	127	1.26	0.009	1	305	0.34	0.4	1.4
D2		94.1	1.03	0.9	1.12	142	1.14	0.011	2	579	0.60	0.4	1.9
D3		47.4	1.35	1.1	1.17	129	1.23	0.023	4	926	0.78	0.4	2.5

L: length of the flow path, W: width of the flow path, D: depth of the flow path, q: flow rate, v: average cross-section velocity D_h: hydraulic diameter, .x: pressure's exponent, CV: Coefficient of variation.

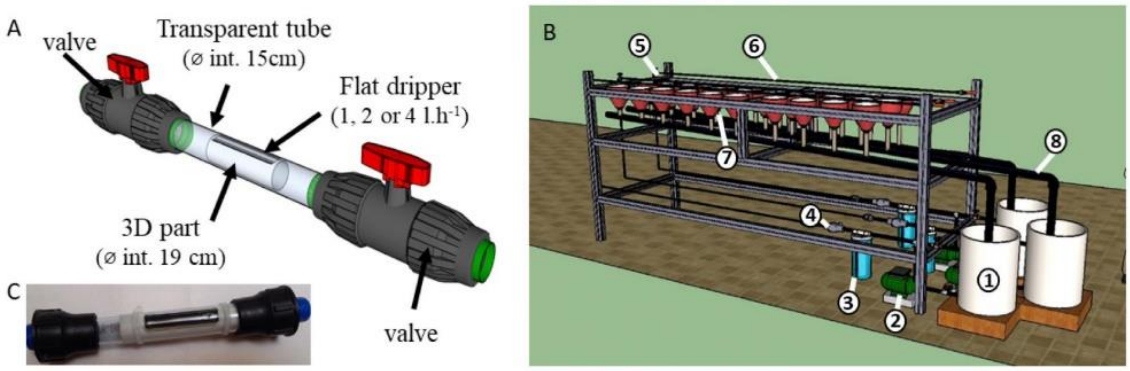


Fig. 1. Dripper system (A, C) and test bench (B). The drippers were placed in a transparent tube to enable optical measurements. The test bench was composed of 1. a tank (60 l); 2. a water pump; 3. a 0.13 mm mesh screen filter; 4. a pressure reducer; 5. a pressure gauge; 6. the drip line with an emitter system located at 10-cm intervals; 7. a collector; 8. a gutter.

diameter 20 mm) and valves (internal diameter 20 mm) (total length 3 m). Then, 3 lines were built (one per dripper type). The valves were used to keep the drippers under water when they were disconnected from the irrigation line for analysis. Each of the three lines was connected to a separate tank (total volume 60 l) and a pump (JetInox 82M, DAB, Saint-Quentin-Fallavier, France) (Fig. 1.B). A screen filter (mesh size 0.13 mm) was installed to reduce the physical clogging of emitters following the technical recommendations of this type of dripper. The inlet pressure was set at 0.08 MPa with a pressure gauge. A gutter was installed below each lateral line to collect the water discharged from the drippers during the experiments. The gutters returned the discharged RWW to the respective tanks, enabling the recycling of water. The lines were supplied twice a day five days out of seven for 1 h, with an interval of 6 h off. The outlet flow rate from the drippers was measured weekly to evaluate emitter performance. Drippers are considered clogged when there is a decrease of at least 25% in the expected flow rate. The system was not flushed during the entire four-month experiment (from April to August 2018).

Table 1 lists the dripper characteristics (D1 to 3) commonly used in drip irrigation system. The geometric parameters, including flow path length (L), width (W), depth (D) and cross-sectional area (D_h) are specific to the dripper type, which influence the type of flow in the dripper path. These parameters were further integrated as two dimensionless parameters, including the width-depth ratio (W/D) and the relative radius ($A^{1/2}$/L), as proposed by Li et al. (2019). Then, the hydraulic parameters, including the outflow (q), the Reynold number (*Re*) and the inlet average cross-sectional velocity (v), are related to these geometric parameters.

In order to know the hydraulic conditions at the inlet channel, the flow regimes were characterized by a Reynolds number (Re).

The Reynolds number (*Re*) was computed using the following formula:

$$Re = \frac{\rho v D_h}{\mu} \quad (1)$$

where ρ is water density ($kg \cdot m^{-3}$), v the water velocity across the pipe ($m \cdot s^{-1}$), D_h the hydraulic diameter (m), and μ the water viscosity (Pa s).

The Reynolds number of the studied drippers is between 305 and 926 at the inlet of labyrinth. It should be noted that these *Re* correspond to laminar flow regime in the case of straight pipes for example. However, due to the labyrinth geometry and small flow cross-sections, it is assumed that flow behaviours in studied drippers correspond to turbulent regime (Li et al., 2006; Zhang et al., 2016).

The hydrodynamic radius (or hydraulic diameter), *Dh*, was calculated for a rectangular cross-section as:

$$Dh = \frac{4A}{P} \quad (2)$$

where A: area (mm) and P for the perimeter (mm).

2.1.2. Physical-chemical and microbiological quality of the RWW

The irrigation lines were supplied with reclaimed wastewater from the Murviel-Les-Montpellier in the South of France, (43.605034° N, 3.757292° E). The wastewater treatment plant is designed around stabilisation ponds with three successive lagoons (13,680 m^3, 4784 m^3 and 2700 m^3) and a nominal capacity of 1500 Inhabitant Equivalent. The RWW was placed in a 60 l tank and changed twice a week to maintain the quality close to that of the wastewater from the treatment plant. Each week ($n = 16$), several physical-chemical and microbiological analyses were performed to evaluate the RWW quality. Chemical oxygen demand (COD), ammonia, nitrate, and phosphorus concentrations (mg l^{-1}) were measured with a spectrophotometer (DR1900, Hach Company, Loveland, CO, USA) using Hach reagents®. Conductivity and pH were measured with probes (TetraCon® 925 and pH-Electrode Sentix® 940, WTW, Wilhelm, Germany). Faecal coliforms, *E. coli*, and *Enterococci* were quantified using the IDEXX method (Colilert18 and Enterolert, IDEXX Laboratories, Westbrook, ME) according to the supplier's recommendations. The main effluent properties are listed in Table 2.

2.2. Image acquisition and processing

2.2.1. Image acquisition

Optical coherence tomography (OCT) was used to study the biofilm kinetics in drippers and along the milli-channel throughout the experimental period. The measurements were performed in situ and non-invasively through the transparent tube. For the measurements, the valves of the dripper systems were closed to keep the drippers in water, and then the dripper in its tubing was disconnected from the irrigation line. Measurements were taken at least once every two weeks and each time all drippers were analysed. After the OCT measurement, each dripper was replaced on the test bench at its initial location. Three-dimensional OCT measurements were acquired using a Thorlabs GANYMEDE II OCT (LSM03 lens, lateral resolution: 8 μm; Thorlabs

Table 2
Physico-chemical characteristics of the RWW.

Characteristics	Units	Mean ($n = 24$)	SD
s-COD	mg l^{-1}	70.3	7.6
Total suspended solids	mg l^{-1}	61	24.2
Ammonia	mg l^{-1}	25.7	7.8
Nitrate	mg l^{-1}	0.7	0.1
Phosphorus	mg l^{-1}	4.9	0.9
Conductivity	μS cm^{-1}	1101.4	51.5
Dissolved oxygen	mg l^{-1}	6.8	1.5
pH		6.9	0.8
Total coliforms	MPN/100 ml	6.1×10^5	6.4×10^5
Escherichia coli	MPN/100 ml	5.9×10^4	5.1×10^4
Enterococci	MPN/100 ml	3.2×10^4	4.6×10^4

GmbH, Lübeck, Germany). The axial voxel size in water ($n = 1.333$) of GANYMEDE II is 2.1 μm. OCTs have a centre wavelength of 930 nm. Due to the length of the drippers, the labyrinth channel was divided into eight parts (inlet, part 2, part 3, return, part 6, part 7, and end; Table S1 in Supplementary material) to study biofouling in different parts of the channels (Fig. 2).

2.2.2. Image processing

First, 3-D OCT datasets were processed in Fiji (running on ImageJ version 1.50b, Schindelin et al. (2009)) and converted into 8-bit grayscales. The datasets were resliced from top to bottom into image stacks and regions of interest (inlet and return areas) were selected. The remaining parts were allocated to the background (black). Secondly, an in-house code was used to detect the pixels associated with the plastic tube and removed using MATLAB R2018r (MathWorks ®, version 2018b). A threshold (adapted to each dataset) was applied to binarize the dataset and the region above the interface was quantified as biofilm. For each position (x, y), the pixels associated with the biofilm (up to the threshold) were summed (on z) to obtain the thickness of the biofilm. The volume of the baffles differed with the dripper (e.g. 4.7, 5.8 and 10.7 mm^3 for B1 and 3, 5 and 8.5 mm^3 for B2 for 1, 2 and 4 $l \cdot h^{-1}$ respectively, Fig. 2). Therefore, to compare the level of fouling between drippers, the biofouling volume was normalized by the volume of the corresponding baffle. The volumetric coverage of the biofilm (%) was calculated for each baffle according to Eq. (3):

$$Volumetric\ Coverage\% = \frac{V_{biofilm}}{V_{baffle}} \times 100 \quad (3)$$

where $V_{biofilm}$ is the biofilm volume and V_{baffle} is the volume of the baffle.

2.3. Analysis of the microbial communities

2.3.1. Sampling the biofilm and reclaimed wastewater

Three drippers in each line were chosen at 32, 72 and 115 days and replaced by new ones to ensure the functioning of the system. However, these new drippers have not been analysed. Each dripper in the transparent tube was extracted with sterile clamps and placed directly in a sterile tube and stored at −20 °C until DNA extraction. RWW was filtered (15 to 30 mL) each week through 0.2 μm (Supor® 200 PES Membrane Disc Filter, Pall Corporation) to analyse the bacterial community in the reclaimed wastewater. Filters were stored at −20 °C until DNA extraction.

2.3.2. DNA extraction

DNA was extracted using the PowerWater® DNA Isolation Kit (Qiagen, Hilden, Germany). Samples (drippers or filters) were placed in 5 mL tubes containing beads. The manufacturer's instructions were then followed. The DNA concentration was measured, and purity checked by spectrophotometry (Infinite NanoQuant M200, Tecan, Austria). Extracted DNA was stored at −20 °C.

2.3.3. Bacterial quantification by qPCR

Total bacterial quantification was performed by qPCR on biofilms from drippers targeting the V9 region from 16S rDNA. The amplification reactions were performed in triplicate, and at two dilutions to check for the absence of inhibition of the PCR reaction. Reaction mixes (12 μl) contained 2.5 μl of water, 6.5 μl of Super Mix qPCR (Invitrogen), 100 nM forward primer BAC338 (5'-ACTCCTACGGGAGGCAG-3′), 250 nM of reverse primer BAC805 (5'-GACTACCAGGGTATCTAAT CC-3′) and 50 nM of probe BAC516 (Yakima Yellow- TGCCA GCAGC CGCGG TAATA C –

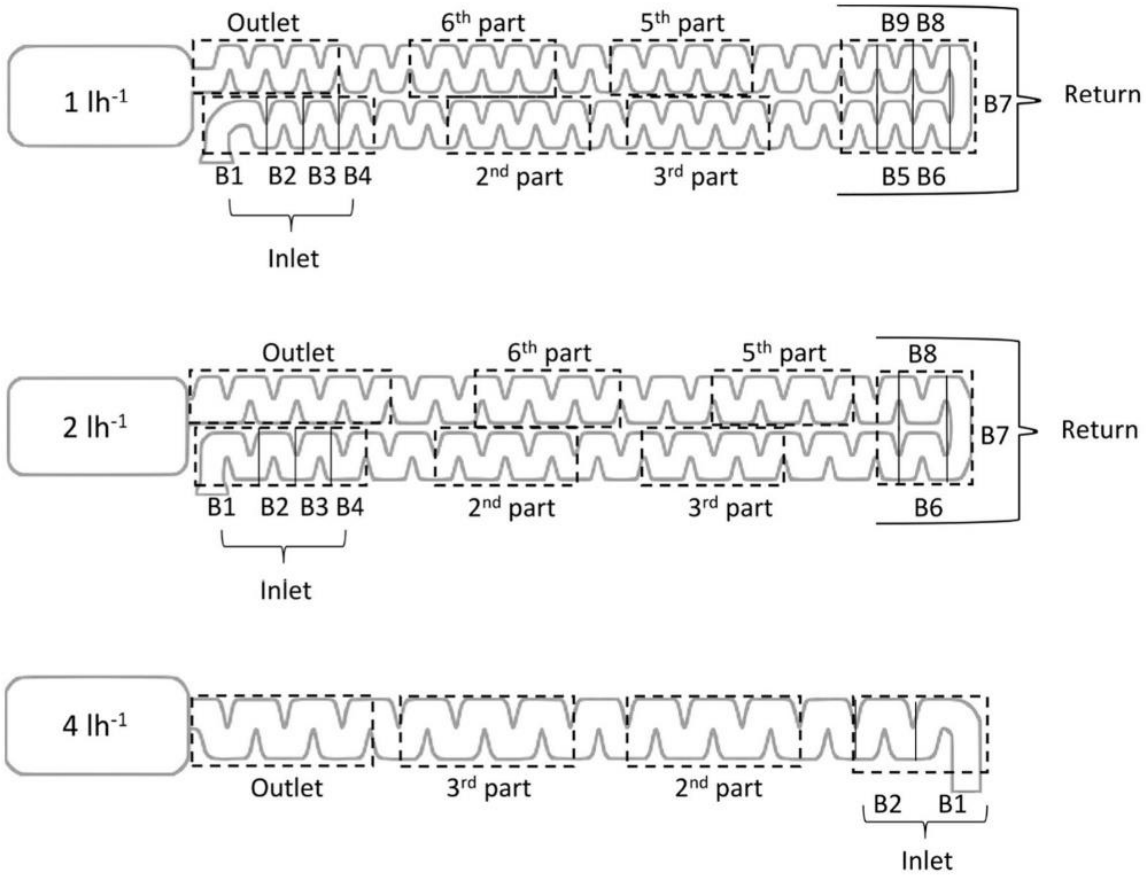


Fig. 2. Schematic diagram of the geometric channel from the drippers. The dotted boxes correspond to the study areas. The length and width (in mm) of each baffle are listed in the Table S1 in Supplementary material.

TAMRA) (Yu et al., 2005). The cycling parameters were 2 min at 95 °C for pre-incubation of the DNA template, followed by 40 cycles at 95 °C for 15 s for denaturation and 60 °C for 60 s for annealing and amplification.

2.3.4. Illumina sequencing

PCR amplified the V4-V5 region of 16S rRNA genes with 30 cycles (annealing temperature 65 °C) using the primers 515U (5′-GTGYCAGCMGCCGCGGTA-3′) and 928U (5′-CCCCGYCAATTCMTTTRAGT-3′) (Wang and Qian, 2009). Adapters were added for multiplexing samples during the second amplification step of the sequencing. The resulting products were purified and loaded onto the Illumina MiSeq cartridge for sequencing of paired 300 bp reads according to the manufacturer's instructions (v3 chemistry). Sequencing and library preparation was performed at the Genotoul Lifescience Network Genome and Transcriptome Core Facility in Toulouse, France (get.genotoul.fr). Mothur (version 1.39.5) (Schloss et al., 2009) was used to associate forward and reverse sequences and clustering at four different nucleotides over the length of the amplicon. Uchime (Edgar et al., 2011) was used to identify and remove chimera. Sequences that appeared less than three times in the entire data set were removed. In all, 16S rRNA sequences were aligned using SILVA SSURef NR99 version 128 (Schloss et al., 2009). Finally, sequences with 97% similarity were sorted into operational taxonomic units (OTUs) (Nguyen et al., 2016). The chloroplast sequences were removed from the raw data. Finally, BLAST (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/) was used to locate publicly available sequences closely related to the sequences obtained from the samples. A total of 11,357,162 reads were grouped in 7730 OTUs at the 97% similarity level. The rarefaction curves indicated that the sequencing depths of all samples were adequate (Fig. S4 in Supplementary material).

2.4. Statistical analyses

The effect of the different commercial types of drippers (with specific geometry and hydraulic parameters) on the kinetics and bacterial composition of the biofouling was evaluated. The kinetics of biofilm development were evaluated by modelling the biofilm formation rate using linear and spline models. The sequencing data were processed under R v3.4 (www.r-project.org) using the R-Studio (http://www.rstudio.com/) phyloseq package (McMurdie and Holmes, 2012). Kruskal-Wallis tests were performed to compare diversity and richness indices over time and between the dripper types. For the comparison of bacterial community structure, a dissimilarity matrix (Bray-Curtis) was performed and visualised using principal coordinate analysis (PCoA). A one-way analysis of similarities (ANOSIM) was used to identify significant differences in community assemblage structure between samples based on the origin of the sample (Clarke, 1993). The OTUs that contributed most to the divergence between two types of dripper were identified using Similarity Percentage (SIMPER) analysis (Clarke, 1993).

3. Results

3.1. Areas favourable for the development of biofilm

The optical methods and discharge measurements are performed in order to analyse the effect of flow topologies along the three dripper channels. During the four month experiment, dripper outflows was higher than 75% of expected flow rate and the drippers never became clogged (Fig. 3).

In the first two weeks, the thickness of the biofilm was too low to be measured and the first measurements were made after one month. Based on OCT analysis (Fig. S1, S2 and S3 in Supplemental material), the biofouling volume after 4 months tended to be higher at the inlet areas (2.45, 3.32 and 2.19 mm^3 for 1, 2 and 4 $l \cdot h^{-1}$ drippers respectively) and decreased after until the return area (with 1.62 and 2 mm^3 of biofilm respectively, there is no return area in 4 $l \cdot h^{-1}$). This means that inlet and return were the most sensible areas for clogging. Fig. 4 shows the increase in biofouling thickness in the inlet and return dripper areas at one and four months. Over time, biological fouling at the

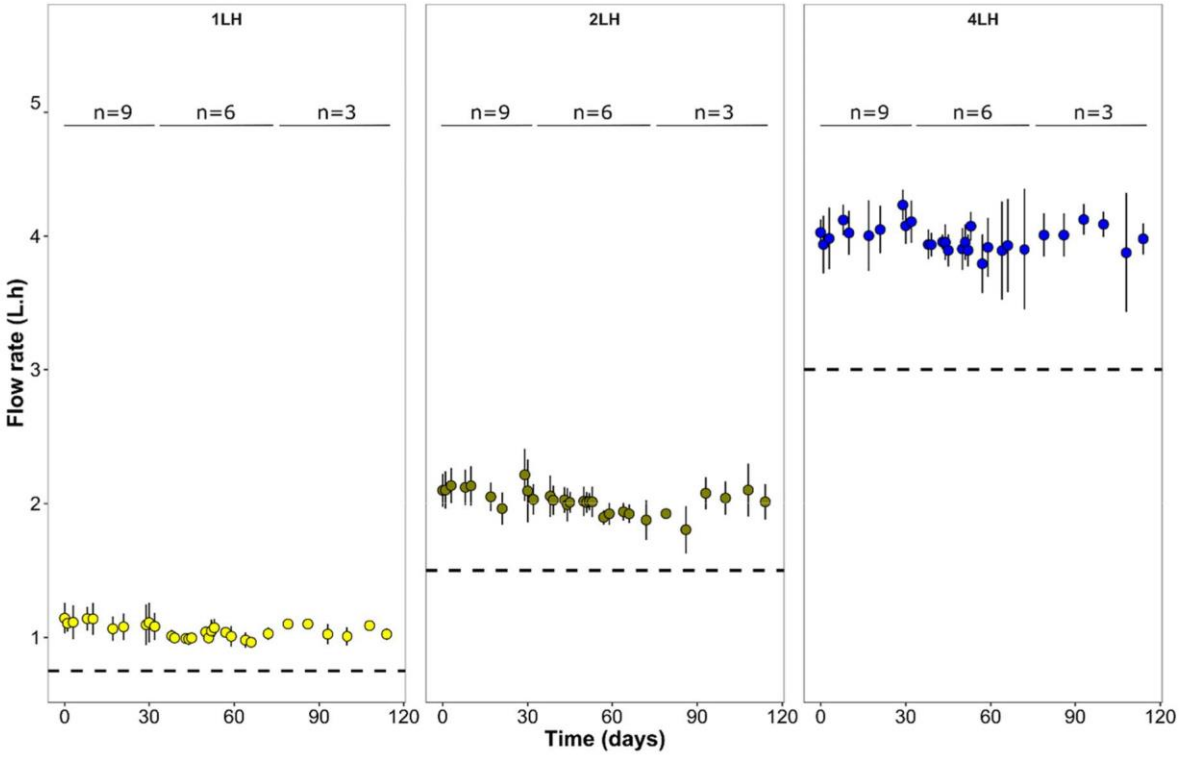


Fig. 3. Mean flow rate (and standard error) according to the dripper type. The dotted line of discharge of <75% corresponds to the limit usually set up to consider that a dripper is clogged. n refers to the number of dripper of the lines.

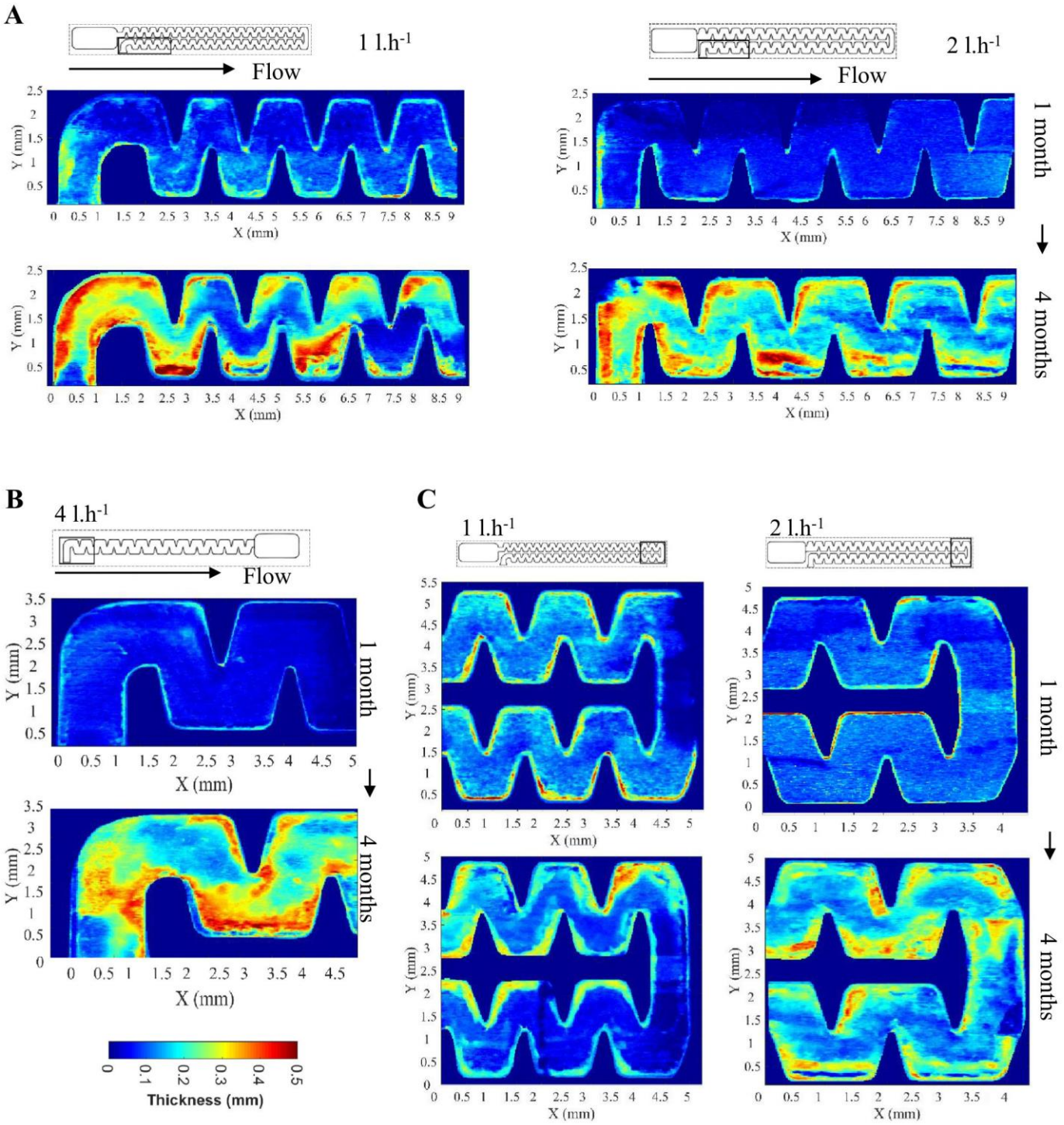


Fig. 4. Biofilm thickness measured using OCT method at the inlet of 1, 2 l·h^{-1} drippers (A) and 4 l·h^{-1} dripper (B) and in the return areas of drippers (C) measured after 1 and 4 months.

inlet area increased, mainly in the first baffle and in corners, and gradually spread to the following corner baffles. After 4 months, the biofilm thickness was higher in the baffle corners for all the drippers, up to 0.5 mm while the thickness at the center of the channel was <0.3 mm. The biofilm thickness in the return area increased mainly after the large bend (B7) in both types of drippers (Fig. 4C).

The volume of the baffles differed with the dripper. Therefore, to compare the level of fouling between drippers, the biofouling volume was normalized by the volume of the corresponding baffle (Eq. (3)). Mean biofouling of the inlet baffles increased over time in all three types of drippers (Fig. S5 in Supplemental material). The level of biofouling were significantly influenced by the type of dripper ($Chi^2 = 115$, p-value < 0.05) and the time ($Chi^2 = 54$, p-value < 0.05) and increased more rapidly in 1 and 2 l·h^{-1} drippers than in 4 l·h^{-1} dripper types (Wald test, p-value < 0.05). After 4 months, the mean biofouling level at the inlet were higher in the 1 l·h^{-1} (18%) and in 2 l·h^{-1} (15.9%) than in the 4 l·h^{-1} (11.8%) drippers (conover test, p-value < 0.05). Therefore, the 1 l·h^{-1} dripper with lowest average cross-section velocity (v), Reynolds number and the ratio W/D and $D_h^{1/2}/L$ were the most sensitive to clogging.

Although the biofouling level of the first baffle tended to be higher, there was no statistical effect of baffles on volumetric coverage over

Table 3
DNA concentration and quantification of bacteria by qPCR in dripper biofilms.

Sampling time (days)	Dripper flow rate ($l \cdot h^{-1}$)	Mean DNA concentration (μg/μl)	Mean of bacteria/dripper (16S copies/dripper)
32	1	137.4 ± 67.9[a]	6.2 ± 0.9 × 10^{9a}
	2	113.9 ± 42.7[a]	5.7 ± 0.6 × 10^{9a}
	4	118.1 ± 26.8[a]	9.9 ± 1.2 × 10^{9a}
72	1	220.4 ± 34.6[a]	9.2 ± 0.5 × 10^{9a}
	2	287.4 ± 113.8[a]	1.2 ± 0.05 × 10^{10a}
	4	194.4 ± 20.2[a]	4.3 ± 2.3 × 10^{9a}
115	1	325.2 ± 70.8[a]	8.7 ± 0.4 × 10^{9a}
	2	387.8 ± 164.1[a]	1.4 ± 0.5 × 10^{10a}
	4	346.1 ± 34.5[a]	5.4 ± 1.4 × 10^{9a}

Kruskal-test and Wilcoxon ad hoc tests were performed on each sampling event to compare the values between the drippers ($n = 3$ for each type of dripper on each sampling event); letters show Wilcoxon test results.

time. However, the volume of biofouling in the first baffle was significantly higher in 1 $l \cdot h^{-1}$ drippers than in 2 $l \cdot h^{-1}$ and 4 $l \cdot h^{-1}$ dripper types after four months with a mean volumetric coverage of 22.6%, 15.8% and 14.1% for 1 $l \cdot h^{-1}$, 2 $l \cdot h^{-1}$ and 4 $l \cdot h^{-1}$ drippers, respectively (Kruskal test, p-value < 0.05).

The mean increase in biofouling in the 1 $l \cdot h^{-1}$ drippers presented a sinusoidal dynamic with up and down phases at the inlet baffle (Fig. S5 in Supplemental material). This could mean several detachment events occurred. The same cycle was observed in the 2 and 4 $l \cdot h^{-1}$ dripper types but only in the first baffle. The detachment event occurred at ~3 months in the 4 $l \cdot h^{-1}$ drippers whereas the first event appeared at 1 month in the 2 $l \cdot h^{-1}$ dripper types. After this baffle, the increase in biofouling was linear. At the return zone in 1 and 2 $l \cdot h^{-1}$ drippers, the volumetric coverage increased over time but was heterogeneous. Thus it was not possible to define kinetic models.

The type of dripper (flow rate and flow cross-section) influenced the level of fouling of the labyrinth with a higher fouling rate in 1 $l \cdot h^{-1}$ drippers (narrower flow cross-section and lower average cross-section velocity).

3.2. Microbial diversity differed between dripper biofilms and reclaimed wastewater

The structure of the bacterial communities in biofilms collected in the three types of drippers were compared using 16S rDNA Illumina sequencing. The bacterial communities in the biofilms were also compared with the communities present in reclaimed wastewater. The chloroplast sequences were removed from the raw data and represented 1.6% and 5.4% of the total sequences in biofilms and in RWW samples, respectively. Microscopic observations of the biofilms in the pipes (data not shown) also revealed the presence of eukaryotic microorganisms (bacterial predators) but the biofilms were still mainly composed of bacteria.

Mean DNA concentration increased significantly between the sampling events for each dripper types drippers (Table 3, $p < 0.05$) but there were no differences between the dripper types ($p > 0.05$). On the other hand, the number of bacteria remained unchanged over time and were similar between the drippers (Table 3, $p > 0.05$), meaning that the increasing of the DNA concentration was probably due to other types of organisms that we observed in pipe biofilms in previous experiments (i.e. eukaryote, algae).

Although fouling levels were higher in the 1 $l \cdot h^{-1}$ dripper type, the richness and diversity indices of the biofilms did not differ significantly and increased similarly between the dripper over time (p-value > 0.05) (Table 4) meaning that the arrival of new species in biofilms could settled regardless of hydrodynamic conditions. The richness and diversity indices of RWW were lower than those in the dripper biofilms. The majority of operational taxonomic units (OTUs) were shared by all the biofilms (Fig. S6 in Supplemental material). Some OTUs and bacterial genera were specific to the dripper flow, but their relative abundance was <0.1% (Table S2 and Fig. S6 in Supplementary material).

Proteobacteria, Bacteroidetes, Firmicutes and Chloroflexi were the main phyla in the dripper biofilms (Fig. 4A). The main phyla found in RWW were Proteobacteria (25–55%) mainly composed of β-Proteobacteria (10–34%) and γ-Proteobacteria (2–34%), followed by Bacteroidetes (22–40%) and Actinobacteria (7–14%) (Fig. 5B). These differences indicate that among bacteria in the reclaimed wastewater, bacteria able to attach to the surface of the dripper under the corresponding flow regime were selected, especially among Firmicutes and Chloroflexi (Fig. 5). From 49 days onwards, cyanobacteria phylum appeared in reclaimed wastewater, explaining the increase in cyanobacteria in the drippers on the second sampling events (72 days). The same observation was made concerning Spirochaetae and Chlorobi phyla. Thus, RWW influenced the bacterial structure and composition of the dripper biofilms. The structure of the biofilms in the drippers evolved over time according to changes in the microbial diversity in the reclaimed wastewater, and with the selection of some adapted taxa able to adhere to the surfaces, such as filamentous Chloroflexi bacteria.

3.3. The dripper flow parameters influenced the composition of the bacterial communities

The impact of the type of dripper, defined both by geometric and hydraulic parameters, on the structure of bacterial communities was first investigated at the phyla and familly taxonomic levels. Proteobacteria phylum was the most abundant phylum in the biofilms (Fig. 5) and was mainly composed of α-Proteobacteria, β-Proteobacteria (mainly

Table 4
Estimated species richness and diversity indices according to the dripper flow rate and the RWW.

Samples	Flow rate ($l \cdot h^{-1}$)	Age (Days)	Richness indices		Diversity indices	
				Estimated OTUs		
			Observed	Chao1	Shannon	1/Simpson
Dripper	1 (n = 3)	32	786 ± 36[a]	786 ± 36[a]	4.7 ± 0.1[a]	40 ± 7[a]
		72	1215 ± 18[b]	1215 ± 18[b]	5.5 ± 0.1[b]	88.4 ± 15.8[b]
		115	1640 ± 135[c]	1640 ± 135[c]	5.9 ± 0.1[c]	149.5 ± 17.4[c]
	2 ($n = 3$)	32	752 ± 61[a]	752 ± 61[a]	4.7 ± 0.1[a]	42.3 ± 2.7[a]
		72	1286 ± 188[b]	1286 ± 188[b]	5.5 ± 0[b]	90.3 ± 6.6[b]
		115	1758 ± 92[c]	1758 ± 92[c]	5.8 ± 0.1[c]	114.2 ± 9.4[c]
	4 (n = 3)	32	783 ± 54[a]	783 ± 54[a]	4.6 ± 0.1[a]	40.4 ± 7.7[a]
		72	1360 ± 23[b]	1360 ± 23[b]	5.6 ± 0[b]	106.7 ± 3.9[b]
		115	1726 ± 30[c]	1726 ± 30[c]	5.8 ± 0[c]	116.6 ± 3.3[c]
RWW ($n = 11$)		–	836 ± 310	836 ± 310	4.2 ± 0.7	32.6 ± 22.9

Kruskal test and the Wilcoxon ad hoc test were performed for each dripper (n = 3 at each sampling); the letters show the results of the Wilcoxon test.

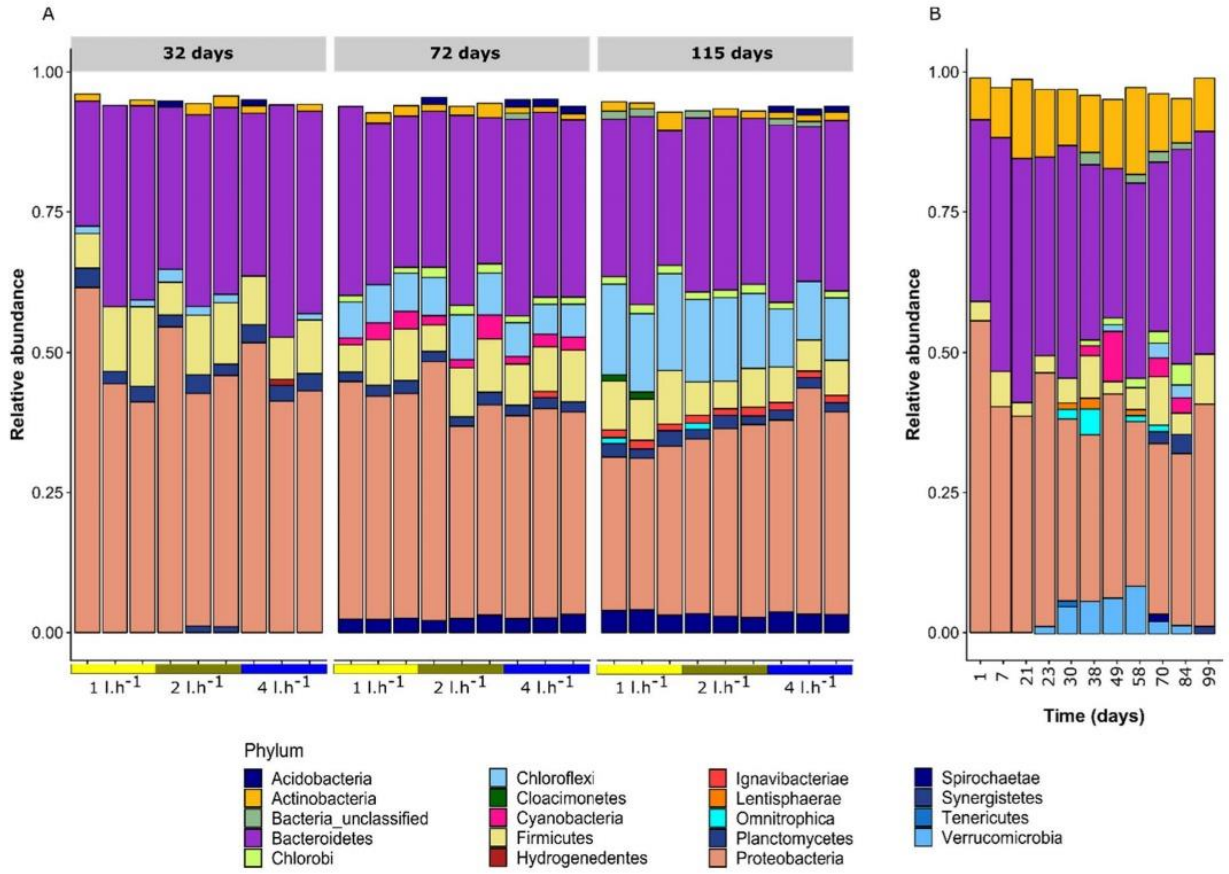


Fig. 5. Relative abundance of bacterial phyla (>1%) in dripper biofilms (A) and in reclaimed wastewater (B). For each sampling event, 3 drippers per dripper type were sampled.

composed of members of the Comamonadaceae family), γ-Proteobacteria and δ-Proteobacteria. At 32 days, the mean abundance of Proteobacteria was similar in all dripper types, with 49, 47 and 45% in the 1, 2 and 4 $l \cdot h^{-1}$ dripper biofilms, respectively (Kruskal-test, *p*-value > 0.05). At 115 days, the mean relative abundance of Proteobacteria (and more specifically β-Proteobacteria) was significantly lower in the 1 $l \cdot h^{-1}$ dripper biofilms than in the 2 and 4 $l \cdot h^{-1}$ dripper biofilms (Kruskal-test, *p*-value < 0.05) and decreased significantly until 28% versus 33 and 37% for the 2 and 4 $l \cdot h^{-1}$ dripper biofilms, respectively.

The phylum of Bacteroidetes was mainly composed of Sphingobacteriia (Chitinophagaceae, Lentimicrobiaceae, Saprospiraceae and Sphingobacteriaceae class members), Bacteroidia (mainly Draconibacteriaceae and Rikenellaceae member families) and Bacteroidetes_vadinHA17. There was no effect of the type of dripper on the mean relative abundance of Bacteroidetes (~30% over time in each dripper type, Kruskal test, *p*-value > 0.05). Over time, the relative abundance of Sphingobacteriia and Bacteroidia decreased while the relative abundance of Bacteroidetes_vadinHA17 increased in the three types of drippers.

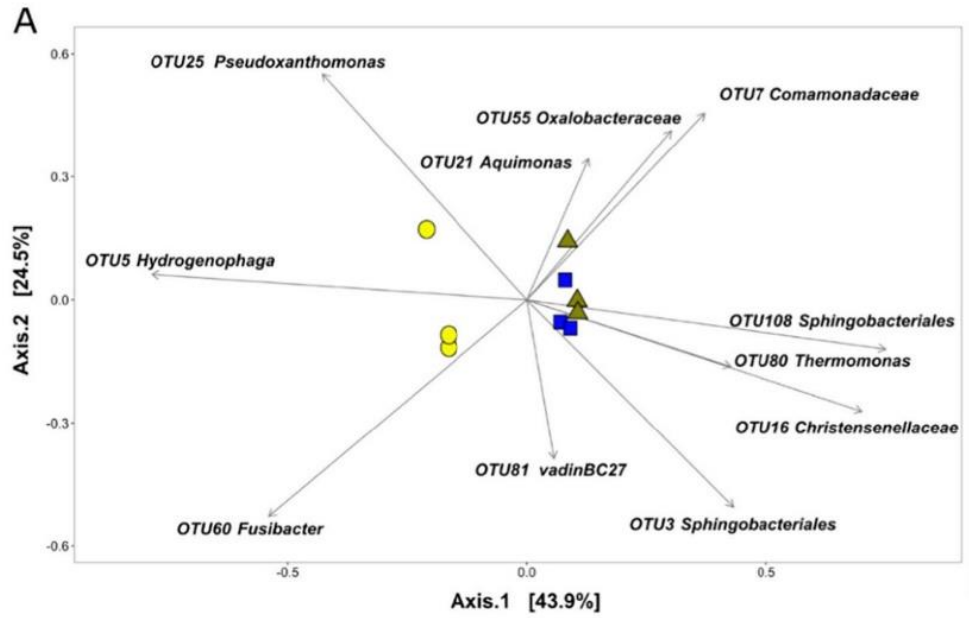
The mean relative abundance of Chloroflexi (mainly composed of Anaerolineaceae and Caldilineaceae member family) increased significantly over time and was significantly higher in 1 $l \cdot h^{-1}$ dripper biofilms after 115 days (16% versus 14% and 10% in 1, 2 and 4 $l \cdot h^{-1}$ dripper biofilms, respectively, Kruskal test, p-value < 0.05). At 115 days, the mean relative abundance of the Anaerolineaceae family was significantly higher in 1 $l \cdot h^{-1}$ dripper biofilms than in the 4 $l \cdot h^{-1}$ dripper biofilms (Kruskal test, p-value < 0.05). There were no significant differences in the Firmicutes phylum (mainly represented by Christensenellaceae, Clostridiaceae and Ruminococcaceae), according to the dripper types or over time (Kruskal test, p-value > 0.05).

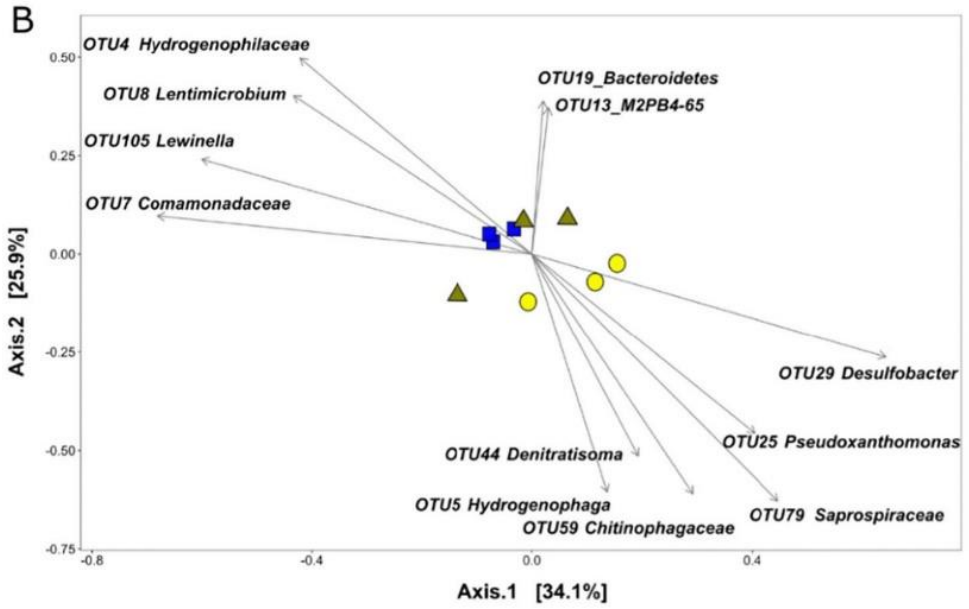
The impact of flow rates on bacterial communities was then investigated at the genus level. Table S3 lists the 10 top genera found in all the dripper biofilms over time. At 32 days, the 1 $l \cdot h^{-1}$ dripper biofilms were dominated by the Comamonadaceae family (6%) including *Hydrogenophaga* genus (9%) and *Pseudoxanthomonas* (3%). The mean relative abundance of the *Hydrogenophaga* genus was significantly influenced by the flow rate (Kruskal test, p-value < 0.05) and was higher in the 1 $l \cdot h^{-1}$ dripper biofilms (3% and 4% for 2 and 4 $l \cdot h^{-1}$ dripper biofilm, respectively). Over time, the mean relative abundance of members of the Comamonadaceae family and of the *Hydrogenophaga* genus decreased significantly in the 1 $l \cdot h^{-1}$ (Kruskal test, p-value < 0.05), close to the relative abundance in 2 and 4 $l \cdot h^{-1}$ dripper biofilms at the end (Kruskal test, p-value > 0.05). Although Proteobacteria phylum dominated at 115 days, some members belonging to Bacteroidetes phylum increased over time as Lentimicrobiaceae family and Bacteroidetes_vadinHA17 and dominated in all three drippers at 115 days (Kruskal test, p-value > 0.05).

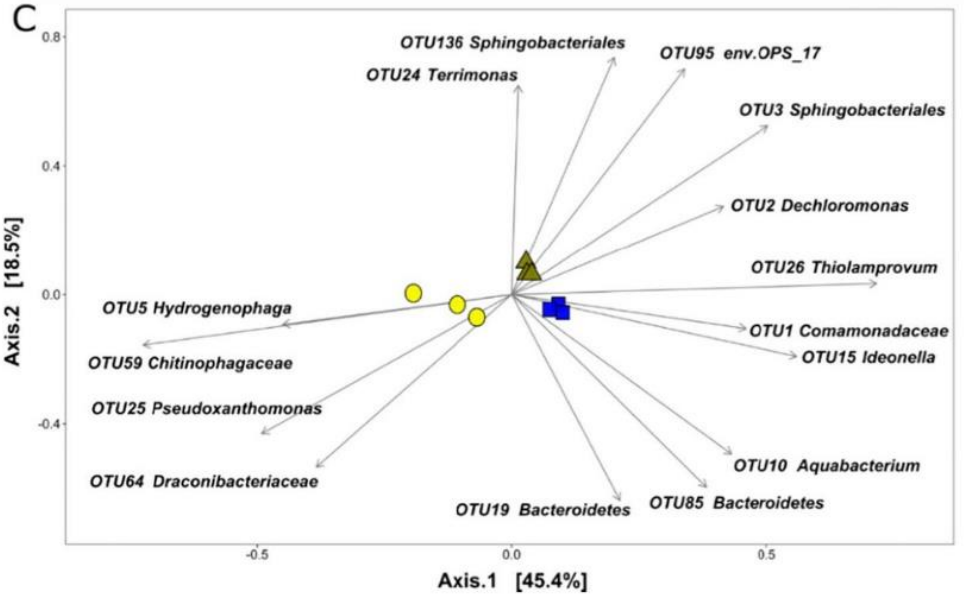
Even if the majority of the genera were the same in the different drippers and on the sampling occasions, some genera with low abundance (<1%) depended specifically on the dripper flow rate and the sampling time (Table S2, Fig. S6 in Supplemental material). For instance, only *Vulcaniibacterium* and *Microvirga* genera were found in the 1 $l \cdot h^{-1}$ dripper at 32 and 72 days. This means that hydrodynamic conditions influenced both the dominant and less abundant bacterial taxa.

3.4. Dripper hydraulic properties impact bacterial community structure

PCoA was performed to compare the structure of bacterial communities between the three types of dripper over time and confirmed that the bacterial community in the dripper biofilms changed depending on hydraulic dripper properties (Fig. 6). At 32 days, the bacterial populations in 2 and 4 $l \cdot h^{-1}$ were clustered (one-way ANOSIM, $R =$


A
OTU25 Pseudoxanthomonas
OTU7 Comamonadaceae
OTU55 Oxalobacteraceae
OTU21 Aquimonas
OTU5 Hydrogenophaga
OTU108 Sphingobacteriales
OTU80 Thermomonas
OTU16 Christensenellaceae
OTU81 vadinBC27
OTU60 Fusibacter
OTU3 Sphingobacteriales
Axis.2 [24.5%]
Axis.1 [43.9%]


B
OTU4 Hydrogenophilaceae
OTU19_Bacteroidetes
OTU8 Lentimicrobium
OTU13_M2PB4-65
OTU105 Lewinella
OTU7 Comamonadaceae
OTU29 Desulfobacter
OTU25 Pseudoxanthomonas
OTU44 Denitratisoma
OTU5 Hydrogenophaga
OTU79 Saprospiraceae
OTU59 Chitinophagaceae
Axis.2 [25.9%]
Axis.1 [34.1%]


C
OTU136 Sphingobacteriales
OTU95 env.OPS_17
OTU24 Terrimonas
OTU3 Sphingobacteriales
OTU2 Dechloromonas
OTU26 Thiolamprovum
OTU5 Hydrogenophaga
OTU1 Comamonadaceae
OTU15 Ideonella
OTU59 Chitinophagaceae
OTU25 Pseudoxanthomonas
OTU10 Aquabacterium
OTU64 Draconibacteriaceae
OTU19 Bacteroidetes
OTU85 Bacteroidetes
Axis.2 [18.5%]
Axis.1 [45.4%]

0.71, $p < 0.05$). The bacterial communities in the 1 $l \cdot h^{-1}$ dripper biofilms formed a second cluster (Fig. 6, A). This means that the hydraulic conditions had little influence on the structure of the microbial community in 2 and 4 $l \cdot h^{-1}$ compared to that in the 1 $l \cdot h^{-1}$ dripper biofilms at the first stage of development. At the end of the experiment (Fig. 6, C) the bacterial community in 2 and 4 $l \cdot h^{-1}$ diverged and formed specific groups (one-way ANOSIM, $R = 0.65$, $p < 0.05$).

The main contributors of the bacterial community were identified using SIMPER analyses and were shown to change over time. Those explaining 50% of the global bacterial divergence are indicated in Fig. 5. At 32 days, 11 OTUs played a significant role in bacterial community divergence. *Pseudoxanthomonas* (OTU 25), *Hydrogenophaga* (OTU 5) and *Fusibacter* genera (OTU 60) were the main contributors and were associated with the 1 $l \cdot h^{-1}$ drippers. These genera were also the main genera found in 1 $l \cdot h^{-1}$ dripper biofilms at 32 days (Table S3 in Supplemental material). At 115 days, 15 OTUs significantly contributed to divergence. *Hydrogenophaga* (OTU 5) and *Pseudoxanthomonas* (OTU 25) were still strong contributors associated with 1 $l \cdot h^{-1}$ dripper biofilms. *Aquabacterium* (OTU 10), *Ideonella* (OTU 15) and Bacteroidetes members (OTU 19, OTU 85) were associated with the 4 $l \cdot h^{-1}$ dripper biofilms, whereas Sphingobacteriales family members (OTU 3, OTU 136) and *Terrimonas* genus (OTU 24) were associated with 2 $l \cdot h^{-1}$ dripper biofilms.

4. Discussion

The main problem with the use of the drip irrigation supplied with reclaimed wastewater is biofouling. Understanding the development of biofouling is the only way to limit the clogging of drip irrigation systems. The labyrinth milli-channel drippers favour the formation of heterogeneous flow with vortex zones. In this study, a laboratory experiment was performed to investigate the kinetics of biofouling and changes in the bacterial communities over time as a function of the hydrodynamic parameters (flow rate, cross-section) of the drippers. Three types of commercial flat drippers used in agriculture with specific channel geometry and different flow rates (1, 2 and 4 $l \cdot h^{-1}$) were installed on a test bench and supplied with treated urban wastewater.

Based on OCT results, the thickness and the volume of the biofouling were higher in the inlet of the channel (mostly in the first baffle) in all the drippers and close to the return areas of the labyrinths in 1 and 2 $l \cdot h^{-1}$ drippers. The biofouling at the inlet of the dripper increased over time in all three dripper types (1, 2 and 4 $l \cdot h^{-1}$) tested here but the 1 $l \cdot h^{-1}$ dripper type was more sensitive. Previous studies had found that clogging capacity is more influenced by the geometrie of the dripper channel than flow rate (G. Y. Li et al., 2006; Li et al., 2019). In this study, as Lavanholi et al. (2018) and Li et al. (2019), the dripper flow path with smaller cross-section and average cross-section velocity (v), W/D or $D_h^{1/2}/L$ parameters were relatively weaker in the anti-clogging risk. Dripper flow path with larger v would locally induce a greater turbulence. Thus, the greater near-wall shear stress would accelerate the detachment of biofouling, which would facilitate the removal of the biofouling (Ait-Mouheb et al., 2018; Al-Muhammad et al., 2019). Previous numerical studies have shown that the greatest head loss occurs in the first inlet baffles (Al-Muhammad et al., 2016, 2019) and that the water velocities and turbulent kinetic energy is characterized by low values in corners of dripper channel (Al-Muhammad et al., 2016). Thus, the reduction of velocity in inlet channel can enhance the adhesion and deposition on the wall surface (Ait-Mouheb et al., 2018), explaining the sensitivity to fouling of these areas. In addition, using OCT we observed the biofouling level from the 1 and 2 $l \cdot h^{-1}$ drippers tended to decreased after the inlet areas as observed by Ait-Mouheb et al. (2018) but re-increased close to the return areas. The return areas was present in the 1 and 2 $l \cdot h^{-1}$ drippers only and seemed to be sensitive to fouling. One explanation to explain the biofouling close to the return area is that the large bend modifies abruptly the flow behaviour which becomes similar to the inlet area. Studies on biofilm from straight pipe shown that these differences can influenced the mass transfert (nutrients) and so the biofilm development (Araújo et al., 2016). Then, CFD studies would be performed to link the biofouling accumulation and local hydrodynamic conditions.

In the present study, biofouling was monitored by OCT in each baffle of the inlet channel. The dripper biofouling alternated between up and down phases locally, mainly for the 1 $l \cdot h^{-1}$ dripper type with smaller cross-section and low flow rate. This suggests that monitoring the development of local biofouling should be considered to optimize control methods. The down phases may be linked with detachment events (Flemming and Wingender, 2010). Detachment events appeared to occur more frequently in the 1 $l \cdot h^{-1}$ drippers. Several studies have shown that there is a link between biofilm development, production of extracellular polymeric substances (EPS) and hydrodynamic conditions. EPS are essential to ensure the maintenance and stability of the biofilm on a surface. Biofilms grown under low velocities are subject to lower shear stress forces which favour faster growth (Melo and Vieira, 1999). However, biofilms subjected to low flow constraints have limited mechanical strength and are more prone to sloughing than those formed at higher flows (Teodósio et al., 2011). In this study, EPS characterisation and quantification were not performed due to low biofilm quantity inside a dripper. However, even if the hydrodynamic forces associated to the dripper types drive the bacterial composition of the biofilm, the response could also be in the modification of the structure and composition of the biofilm matrix. Further research using OCT combined with EPS characterisation methods and with microbial composition analysis will advance our understanding of biofouling in drippers.

The structure of bacterial community of the RWW has a direct influence on the structure and composition of the dripper biofilms. Members of the Comamonadaceae family (β-Proteobacteria including *Hydrogenophaga* genus) dominated in the biofilm samples taken at 32 and 72 days, but were replaced by the Bacteroidetes_VadinHA17 wastewater sludge group belonging to Bacteroidetes at the end (Table S3). This gram-negative, non-mobile anaerobic group is often found in sewage treatment plant sludge and indicates that over time, bacteria commonly found in wastewater have become established and have become the majority in communities. The Comamonadaceae family, which includes many denitrifier members, has been found in wastewater treatment plants and was involved in the first phases of fouling of membrane bioreactors fed with wastewater (Ziegler et al., 2016). Other phyla such as Spirochaetae and Cholorobi appeared in the RWW over time and eventually in the biofilms (Fig. 4). The RWW used in this study was obtained after treatment by lagooning and the treatment process can affect the structure and bacterial composition of biofilms. Further research are needed to study the effect of the wastewater treatment processes on biofilm composition in irrigation lines in order to improve management of biofilm development in the drippers.

DNA concentration increased over time in the dripper biofilms whereas the bacterial concentration remained stable. This could be explained by the presence of other types of organisms as algae and eukaryotes. Moreover, bacterial predators can influence the structure and composition of the biofilm (Böhme et al., 2009; Parry et al., 2007). As perspective, a metagenomic approach of the function of microorganisms involved in the biofilm formation and the effect of other microorganisms (algae, predators) can complete the understanding of dripper clogging.

Bacterial diversity and richness were not influenced by hydraulic parameters of the drippers. This is not consistent with Rochex et al. (2008)

Fig. 6. PCoA ordination plot of bacterial communities found in 1 $l \cdot h^{-1}$ (●), 2 $l \cdot h^{-1}$ (▲) and 4 $l \cdot h^{-1}$ (■) dripper biofilms at 32 days (A), 72 days (B) and 115 days (C). The analysis was based on Bray-Curtis similarity coefficients. Arrows indicate the orientation and contribution of the OTUs (most significant contributors explaining 50% of the global bacterial divergence).

who shown that increased shear stress (from 0.055 to 0.27 Pa), corresponding to an increase of the Reynolds number, reduced the bacterial diversity in a Conical Couette–Taylor Reactor. Then differences between the drippers in terms of flow behaviour may not be sufficient to observe an effect on these indices. Although bacterial diversity was not influenced by the hydraulic parameters, the structure of the bacterial community was. These changes are in agreement with the results of previous studies performed on pipe and reactors (Ai et al., 2016; He et al., 2019; Saur et al., 2017). The level of biofouling decreased with an increase of the cross-section velocity (0.34, 0.61 and 0.78 $m \cdot s^{-1}$ for 1, 2 and 4 $l \cdot h^{-1}$ drippers respectively) in the channel. However the structure of bacterial communities appeared to be less affected by the cross-section velocity above 0.61 $m \cdot s^{-1}$ (2 $l \cdot h^{-1}$ dripper). Even though previous studies have shown that the increase in velocity and shear forces influence the spatial organization and structure of the bacterial community (Saur et al., 2017), the differences between the 2 and 4 $l \cdot h^{-1}$ drippers may not be sufficient to influence this community in the first phases of biofilm development. This could explain similarities in the structure of the bacterial communities sampled in 2 and 4 $l \cdot h^{-1}$ drippers compared to the 1 $l \cdot h^{-1}$ dripper biofilms until 115 days, and this in spite of the flow differences due to the geometry of the labyrinths (e.g. return zone).

Proteobacteria, Bacteroidetes, Firmicutes and Chloroflexi were the most abundant phyla in all three types of dripper (Fig. 4). These phyla have been already been described in drippers supplied by treated wastewater (Lequette et al., 2019; Song et al., 2019; Zhou et al., 2013). Over time, the relative abundance of Proteobacteria and more specifically β-Proteobacteria decreased significantly in 1 $l \cdot h^{-1}$ dripper biofilms compared to 2 and 4 $l \cdot h^{-1}$ dripper biofilms. β-Proteobacteria have been reported to be a dominant group in both drinking water biofilms (Douterelo et al., 2013) and wastewater biofilms (Biswas and Turner, 2012; Ma et al., 2013) and could play an important role in the formation of biofilm in drippers. This group can easily attach to surfaces and can withstand high water velocity and high shear force (Douterelo et al., 2013), which may explain their dominance in drippers 2 and 4 $l \cdot h^{-1}$.

Chloroflexi and Bacteroidetes phyla were also abundant in dripper biofilms. Anaerolineaceae family members (Chloroflexi) were more abundant in 1 $l \cdot h^{-1}$ dripper biofilms at the end than in 2 and 4 $l \cdot h^{-1}$ dripper, meaning that Chloroflexi are sensible to the high Reynolds number. These phyla are commonly found in activated sludge of wastewater treatment plants and include filamentous bacteria as Anaerolineaceae family members (Chloroflexi). Research has shown that filamentous bacteria are essential to the formation of activated sludge but when they are over-concentrated, they are responsible for foaming and bulking events (Kragelund et al., 2007, 2008; Nielsen et al., 2009) and for fouling membrane bioreactors in wastewater treatment plants (Li et al., 2008; Rehman et al., 2020). But the increase of Anaerolineaceae over time can also be explained by the interaction with other bacteria. Chloroflexi and *Hydrogenophaga* spp. (Proteobacteria phylum), mainly found in 1 $l \cdot h^{-1}$ drippers, were also observed by Ziegler et al. (2016) who studied the biofouling of a pilot-scale membrane bioreactor fed with wastewater. From a physiological point of view, *Hydrogenophaga* spp. are able to synthesise polymeric substances (Calderer et al., 2014). Filamentous Chloroflexi produce a complex of enzymes able to degrade EPS, in turn, enabling the cells to use EPS as substrate to maintain their activities (Kragelund et al., 2007). EPS produced by *Hydrogenophaga* spp. could facilitate fouling due to filamentous bacteria and flow parameters. Thus, the increase in Chloroflexi abundance over time could be explained by a sufficient EPS synthesis rate and by the presence of *Hydrogenophaga* spp. at the early stage of biofilm formation. Thus, further research on the role of filamentous bacteria in biofouling development is required, especially by focusing on the effect of the hydraulic and geometric parameters of the flow path on their abundancy.

The divergence between the 1 $l \cdot h^{-1}$ drippers and the 2 and 4 $l \cdot h^{-1}$ drippers prevailed over time and was mainly driven by *Hydrogenophaga* and *Pseudoxanthomonas* genera (Fig. 5). Although no clear information is available on the effect of hydraulic conditions on the installation of these two bacterial genera in drippers, they are often found in biofilms associated with membrane reactor fouling supplied by wastewater (Zheng et al., 2018; Ziegler et al., 2016). Contrary to the 1 $l \cdot h^{-1}$ dripper biofilms, biofilms from the 4 $l \cdot h^{-1}$ dripper were mainly driven by *Aquabacterium* (Proteobacteria) and *Ideonella* (Proteobacteria, Comamonadaceae family) genera after 4 months. These genera were already found associated to wastewater biofilms (Lequette et al., 2019; Luo et al., 2017; McCormick et al., 2016) and included species able to metabolize plasticizers used in plastics (Kalmbach et al., 1999; Tanasupawat et al., 2016). Thus the type of material and the hydraulic parameters of the drippers could influence the presence of bacteria with specific metabolic activities over time.

5. Conclusion

The combined use of OCT and high throughput sequencing highlighted the influence of hydrodynamic parameters (flow rate, cross-section) of the drippers supplied with RWW on biofilm development and bacterial communities:

1) Biofouling was facilitated close to the inlet and in the vortex zones of the dripper channels, more specifically in 1 $l \cdot h^{-1}$ drippers where the Reynolds number, cross-section and average cross-section velocity (v), W/D or $D_h^{1/2}/L$ were smaller.
2) The dripper geometry influence the hydraulic flow behaviour (inlet Reynold number and average cross-section velocity) and the structure of bacterial communities in biofilms. However, the structure of the bacterial community from the 2 and 4 $l \cdot h^{-1}$ drippers were more similar than the 1 $l \cdot h^{-1}$ dripper biofilms.
3) The relative abundance of filamentous bacteria belonging to Chloroflexi phylum was lower in 1 $l \cdot h^{-1}$ compared to 2 and 4 $l \cdot h^{-1}$.

Water velocity evolves along the channel with low velocities at the inlet and in the vortex zones. These changes can influence the transport of nutrients to the biofilm along the channel. Further studies on nutrient transport and on the structure of the bacterial community of the biofilms along the drippers should increase our understanding of fouling phenomena in sensitive areas. Another point is that biofouling can include physical and chemical processes. In this study, the physico-chemical composition of the biofouling was not analysed. Exploring the link between the different types of clogging (physical, chemical and biological) in different dripper types is an important future research path.

CRediT authorship contribution statement

Kévin Lequette: Investigation, Methodology, Formal analysis, Visualization, Writing - review & editing. **Nassim Ait-Mouheb:** Supervision, Methodology, Writing - review & editing. **Nathalie Wéry:** Supervision, Methodology, Writing - review & editing.

Declaration of competing interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Acknowledgements

The authors gratefully acknowledge the financial support of the French Water Agency Rhône Méditerranée Corse, project "Experimental platform for the reuse of reclaimed wastewater in irrigation, Murviellès-Montpellier". We thank Guillaume Guizard (LBE-INRAE, Narbonne,

France) and Jean-François Bonicel (UMR G-Eau-INRAE, Montpellier, France) for their contribution to the development of the dripper system, Geoffrey Froment (UMR G-Eau-INRAE, Montpellier, France), François Liron (UMR G-Eau-INRAE, Montpellier, France) and Marine Muffat-Jeandet (UMR G-Eau-INRAE, Montpellier, France) for their contribution to the development of the test bench, Annabelle Mange (UMR G-Eau-INRAE, Montpellier, France) and Valérie Bru-Adam (LBE-INRAE, Narbonne, France) for their assistance in the field and at laboratory.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.139778.

References

Ai, H., Xu, J., Huang, W., He, Q., Wang, Y., Ni, B., 2016. Mechanism and kinetics of biofilm growth process influenced by shear stress in sewers. Water Sci. Technol. 73, 1572–1582. https://doi.org/10.2166/wst.2015.633.

Ait-Mouheb, N., Schillings, J., Al-Muhammad, J., Bendoula, R., Tomas, S., Amielh, M., Anselmet, F., 2018. Impact of hydrodynamics on clay particle deposition and biofilm development in a labyrinth-channel dripper. Irrig. Sci. 0, 0. doi:https://doi.org/10.1007/s00271-018-0595-7.

Al-Muhammad, J., Tomas, S., Anselmet, F., 2016. Modeling a weak turbulent flow in a narrow and wavy channel: case of micro-irrigation. Irrig. Sci. 34, 361–377. https://doi.org/10.1007/s00271-016-0508-6.

Al-Muhammad, J., Tomas, S., Ait-Mouheb, N., Amielh, M., Anselmet, F., 2019. Experimental and numerical characterization of the vortex zones along a labyrinth milli-channel used in drip irrigation. Int. J. Heat Fluid Flow 80, 108500. https://doi.org/10.1016/j.ijheatfluidflow.2019.108500.

Araújo, P.A., Malheiro, J., Machado, I., Mergulhão, F., Melo, L., Simões, M., 2016. Influence of flow velocity on the characteristics of Pseudomonas fluorescens biofilms. J. Environ. Eng. 142, 04016031. https://doi.org/10.1061/(ASCE)EE.1943-7870.0001068.

Besemer, K., 2015. Biodiversity, community structure and function of biofilms in stream ecosystems. Res. Microbiol. 166, 774–781. https://doi.org/10.1016/j.resmic.2015.05.006.

Biswas, K., Turner, S.J., 2012. Microbial community composition and dynamics of moving bed biofilm reactor systems treating municipal sewage. Appl. Environ. Microbiol. 78, 855–864. https://doi.org/10.1128/AEM.06570-11.

Böhme, A., Risse-Buhl, U., Küsel, K., 2009. Protists with different feeding modes change biofilm morphology. FEMS Microbiol. Ecol. 69, 158–169. https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2009.00710.x.

Calderer, M., Martí, V., de Pablo, J., Guivernau, M., Prenafeta-Boldú, F.X., Viñas, M., 2014. Effects of enhanced denitrification on hydrodynamics and microbial community structure in a soil column system. Chemosphere 111, 112–119. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2014.03.033.

Clarke, K.R., 1993. Non-parametric multivariate analyses of changes in community structure. Aust. J. Ecol. 18, 117–143. https://doi.org/10.1071/WR9840181.

Derlon, N., Peter-Varbanets, M., Scheidegger, A., Pronk, W., Morgenroth, E., 2012. Predation influences the structure of biofilm developed on ultrafiltration membranes. Water Res. 46, 3323–3333. https://doi.org/10.1016/j.watres.2012.03.031.

Dosoretz, C.G., Tarchitzky, J., Katz, I., Kenig, E., Chen, Y., 2010. Fouling in microirrigation systems applying treated wastewater effluents. Treat. Wastewater Agric. Use Impacts Soil Environ. Crop. 328–350. doi:10.1002/9781444328561.ch10.

Douterelo, I., Sharpe, R.L., Boxall, J.B., 2013. Influence of hydraulic regimes on bacterial community structure and composition in an experimental drinking water distribution system. Water Res. 47, 503–516. https://doi.org/10.1016/j.watres.2012.09.053.

Dreszer, C., Wexler, A.D., Drusová, S., Overdijk, T., Zwijnenburg, A., Flemming, H.C., Kruithof, J.C., Vrouwenvelder, J.S., 2014. In-situ biofilm characterization in membrane systems using Optical Coherence Tomography: formation, structure, detachment and impact of flux change. Water Res. 67, 243–254. https://doi.org/10.1016/j.watres.2014.09.006.

Edgar, R.C., Haas, B.J., Clemente, J.C., Quince, C., Knight, R., 2011. UCHIME improves sensitivity and speed of chimera detection. Bioinformatics 27, 2194–2200. https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btr381.

Flemming, H., Wingender, J., 2010. The biofilm matrix. Nat. Rev. Microbiol. 8, 623–633. https://doi.org/10.1038/nrmicro2415.

Gamri, S., Soric, A., Tomas, S., Molle, B., Roche, N., 2014. Biofilm development in microirrigation emitters for wastewater reuse. Irrig. Sci. 32, 77–85. https://doi.org/10.1007/s00271-013-0414-0.

He, Q., Chen, L., Zhang, S., Chen, R., Wang, H., 2019. Hydrodynamic shear force shaped the microbial community and function in the aerobic granular sequencing batch reactors for low carbon to nitrogen (C/N) municipal wastewater treatment. Bioresour. Technol. 271, 48–58. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.09.102.

Hou, P., Wang, T., Zhou, B., Song, P., Zeng, W., Li, Y., 2020. Variations in the microbial community of biofilms under different near-wall hydraulic shear stresses in agricultural irrigation systems. Biofouling 0, 1–12. https://doi.org/10.1080/08927014.2020.1714600.

Jjemba, P.K., Weinrich, L.A., Cheng, W., Giraldo, E., LeChevallier, M.W., 2010. Regrowth of potential opportunistic pathogens and algae in reclaimed-water distribution systems. Appl. Environ. Microbiol. 76, 4169–4178. https://doi.org/10.1128/AEM.03147-09.

Kalmbach, S., Manz, W., Wecke, J., Szewzyk, U., 1999. Aquabacterium gen. nov., with description of Aquabacterium citratiphilum sp. nov., Aquabacterium parvum sp. nov. and Aquabacterium commune sp. nov., three in situ dominant bacterial species from the Berlin drinking water system. Int. J. Syst. Bacteriol. 49, 769–777. https://doi.org/10.1099/00207713-49-2-769.

Katz, S., Dosoretz, C., Chen, Y., Tarchitzky, J., 2014. Fouling formation and chemical control in drip irrigation systems using treated wastewater. Irrig. Sci. 32, 459–469. https://doi.org/10.1007/s00271-014-0442-4.

Kragelund, C., Levantesi, C., Borger, A., Thelen, K., Eikelboom, D., Tandoi, V., Kong, Y., Van Der Waarde, J., Krooneman, J., Rossetti, S., Thomsen, T.R., Nielsen, P.H., 2007. Identity, abundance and ecophysiology of filamentous Chloroflexi species present in activated sludge treatment plants. FEMS Microbiol. Ecol. 59, 671–682. https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2006.00251.x.

Kragelund, C., Levantesi, C., Borger, A., Thelen, K., Eikelboom, D., Tandoi, V., Kong, Y., Krooneman, J., Larsen, P., Thomsen, T.R., Nielsen, P.H., 2008. Identity, abundance and ecophysiology of filamentous bacteria belonging to the Bacteroidetes present in activated sludge plants. Microbiology 154, 886–894. https://doi.org/10.1099/mic.0.2007/011684-0.

Lamm, F.R., Ayars, J.E., Nakayama, F.S., 2007. Maintenance. In: Lamm, F.R., Ayars, J.E., Nakayama, F.S. (Eds.), Microirrigation for Crop Production: Design, Operation, and Management, 13th edn Elsevier B.V, Amsterdam, pp. 1–643.

Lavanholi, R., Oliveira, F.C., Camargo, A.P. de, Frizzone, J.A., Molle, B., Ait-Mouheb, N., Tomas, S., 2018. Methodology to evaluate dripper sensitivity to clogging due to solid particles: an assessment. Sci. World J. 2018, 1–9. https://doi.org/10.1155/2018/7697458.

Lazarova, V., Bahri, A., 2005. Water Reuse for Irrigation. CRC Press, Boca Raton.

Lehtola, M.J., Laxander, M., Miettinen, I.T., Hirvonen, A., Vartiainen, T., Martikainen, P.J., 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. Water Res. 40, 2151–2160. https://doi.org/10.1016/j.watres.2006.04.010.

Lequette, K., Ait-Mouheb, N., Wéry, N., 2019. Drip irrigation biofouling with treated wastewater: bacterial selection revealed by high-throughput sequencing. Biofouling 35, 217–229. https://doi.org/10.1080/08927014.2019.1591377.

Li, G.Y., Wang, J.D., Alam, M., Zhao, Y.F., 2006a. Influence of geometrical parameters of labyrinth path of drip emitters on hydraulic and anti-clogging performance. Trans. ASABE 49, 637–643. https://doi.org/10.13031/2013.20483.

Li, Y., Yang, P., Ren, S., Xu, T., 2006b. Hydraulic characterizations of tortuous flow in path drip irrigation emitter. J. Hydrodyn. 18, 449–457. https://doi.org/10.1016/S1001-6058(06)60119-4.

Li, J., Li, Y., Ohandja, D.G., Yang, F., Wong, F.S., Chua, H.C., 2008. Impact of filamentous bacteria on properties of activated sludge and membrane-fouling rate in a submerged MBR. Sep. Purif. Technol. 59, 238–243. https://doi.org/10.1016/j.seppur.2007.06.011.

Li, G.B., Li, Y.K., Xu, T.W., Liu, Y.Z., Jin, H., Yang, P.L., Yan, D.Z., Ren, S.M., Tian, Z.F., 2012. Effects of average velocity on the growth and surface topography of biofilms attached to the reclaimed wastewater drip irrigation system laterals. Irrig. Sci. 30, 103–113. https://doi.org/10.1007/s00271-011-0266-4.

Li, Y., Feng, J., Xue, S., Muhammad, T., Chen, X., Wu, N., Li, W., Zhou, B., 2019. Formation mechanism for emitter composite-clogging in drip irrigation system. Irrig. Sci. 37, 169–181. https://doi.org/10.1007/s00271-018-0612-x.

Liu, H., Huang, G., 2009. Laboratory experiment on drip emitter clogging with fresh water and treated sewage effluent. Agric. Water Manag. 96, 745–756. https://doi.org/10.1016/j.agwat.2008.10.014.

Luo, J., Lv, P., Zhang, J., Fane, A.G., McDougald, D., Rice, S.A., 2017. Succession of biofilm communities responsible for biofouling of membrane bioreactors (MBRs). PLoS One 12, 1–23. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0179855.

Ma, J., Wang, Z., Zou, X., Feng, J., Wu, Z., 2013. Microbial communities in an anaerobic dynamic membrane bioreactor (AnDMBR) for municipal wastewater treatment: comparison of bulk sludge and cake layer. Process Biochem. 48, 510–516. https://doi.org/10.1016/j.procbio.2013.02.003.

Mahfoud, C., El Samrani, A., Mouawad, R., Hleihel, W., El Khatib, R., Lartiges, B.S., Ouaïni, N., 2009. Disruption of biofilms from sewage pipes under physical and chemical conditioning. J. Environ. Sci. 21, 120–126. https://doi.org/10.1016/S1001-0742(09)60021-8.

McCormick, A.R., Hoellein, T.J., London, M.G., Hittie, J., Scott, J.W., Kelly, J.J., 2016. Microplastic in surface waters of urban rivers: concentration, sources, and associated bacterial assemblages. Ecosphere 7. https://doi.org/10.1002/ecs2.1556.

McMurdie, P., Holmes, S., 2012. PHYLOSEQ: a biocondutor package for handling and analysis of high-throughput phylogenetic sequence data. Pac. Symp. Biocomput. 235–246.

Melo, L.F., Vieira, M.J., 1999. Physical stability and biological activity of biofilms under turbulent flow and low substrate concentration. Bioprocess Eng. 20, 363–368. https://doi.org/10.1007/s004490050604.

Nguyen, N.-P., Warnow, T., Pop, M., White, B., 2016. A perspective on 16S rRNA operational taxonomic unit clustering using sequence similarity. npj Biofilms Microbiomes 2, 16004. https://doi.org/10.1038/npjbiofilms.2016.4.

Nielsen, P.H., Kragelund, C., Seviour, R.J., Nielsen, J.L., 2009. Identity and ecophysiology of filamentous bacteria in activated sludge. FEMS Microbiol. Rev. 33, 969–998. https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2009.00186.x.

Niu, W., Liu, L., Chen, X., 2013. Influence of fine particle size and concentration on the clogging of labyrinth emitters. Irrig. Sci. 31, 545–555. https://doi.org/10.1007/s00271-012-0328-2.

Oliveira, F., Lavanholi, R., Camargo, A., Frizzone, A., Ait-Mouheb, N., Tomas, S., Molle, B., 2017. Influence of concentration and type of clay particles on dripper clogging. Irrig. Drain. Syst. Eng. 06, 1–5. https://doi.org/10.4172/2168-9768.1000184.

Parry, J.D., Holmes, A.K., Unwin, M.E., Laybourn-Parry, J., 2007. The use of ultrasonic imaging to evaluate the effect of protozoan grazing and movement on the topography of bacterial biofilms. Lett. Appl. Microbiol. 45, 364–370. https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2007.02213.x.

Percival, S.L., Knapp, J.S., Wales, D.S., Edyvean, R.G.J., 1999. The effect of turbulent flow and surface roughness on biofilm formation in drinking water. J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 22, 152–159. https://doi.org/10.1038/sj.jim.2900622.

Qian, J., Horn, H., Tarchitzky, J., Chen, Y., Katz, S., Wagner, M., 2017. Water quality and daily temperature cycle affect biofilm formation in drip irrigation devices revealed by optical coherence tomography. Biofouling 7014, 1–11. https://doi.org/10.1080/08927014.2017.1285017.

Rehman, Z.U., Fortunato, L., Cheng, T., Leiknes, T.O., 2020. Metagenomic analysis of sludge and early-stage biofilm communities of a submerged membrane bioreactor. Sci. Total Environ. 701, 134682. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.134682.

Rickard, A.H., Mcbain, A.J., Stead, A.T., Gilbert, P., 2004. Shear rate moderates community diversity in freshwater biofilms shear rate moderates community diversity in freshwater biofilms. Society 70, 7426–7435. https://doi.org/10.1128/AEM.70.12.7426.

Rochex, A., Godon, J.J., Bernet, N., Escudié, R., 2008. Role of shear stress on composition, diversity and dynamics of biofilm bacterial communities. Water Res. 42, 4915–4922. https://doi.org/10.1016/j.watres.2008.09.015.

Saur, T., Morin, E., Habouzit, F., Bernet, N., Escudié, R., 2017. Impact of wall shear stress on initial bacterial adhesion in rotating annular reactor. PLoS One 12, 1–19. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0172113.

Schindelin, J., Arganda-Carrera, I., Frise, E., Verena, K., Mark, L., Tobias, P., Stephan, P., Curtis, R., Stephan, S., Benjamin, S., Jean-Yves, T., Daniel, J.W., Volker, H., Kevin, E., Pavel, T., Albert, C., 2009. Fiji - an open platform for biological image analysis. Nat. Methods 9, 241. https://doi.org/10.1038/nmeth.2019.Fiji.

Schloss, P.D., Westcott, S.L., Ryabin, T., Hall, J.R., Hartmann, M., Hollister, E.B., Lesniewski, R.A., Oakley, B.B., Parks, D.H., Robinson, C.J., Sahl, J.W., Stres, B., Thallinger, G.G., Van Horn, D.J., Weber, C.F., 2009. Introducing mothur: open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities. Appl. Environ. Microbiol. 75, 7537–7541. https://doi.org/10.1128/AEM.01541-09.

Song, P., Zhou, B., Feng, G., Brooks, J.P., Zhou, H., Zhao, Z., Liu, Y., Li, Y., 2019. The influence of chlorination timing and concentration on microbial communities in labyrinth channels: implications for biofilm removal. Biofouling, 1–15 https://doi.org/10.1080/08927014.2019.1600191.

Tanasupawat, S., Takehana, T., Yoshida, S., Hiraga, K., Oda, K., 2016. Ideonella sakaiensis sp. nov., isolated from a microbial consortium that degrades poly(ethylene terephthalate). Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 66, 2813–2818. https://doi.org/10.1099/ijsem.0.001058.

Teodósio, J.S., Simões, M., Melo, L.F., Mergulhão, F.J., 2011. Flow cell hydrodynamics and their effects on E. coli biofilm formation under different nutrient conditions and turbulent flow. Biofouling 27, 1–11. https://doi.org/10.1080/08927014.2010.535206.

Wagner, M., Taherzadeh, D., Haisch, C., Horn, H., 2010. Investigation of the mesoscale structure and volumetric features of biofilms using optical coherence tomography. Biotechnol. Bioeng. 107, 844–853. https://doi.org/10.1002/bit.22864.

Wang, Y., Qian, P.Y., 2009. Conservative fragments in bacterial 16S rRNA genes and primer design for 16S ribosomal DNA amplicons in metagenomic studies. PLoS One 4. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0007401.

Wang, J., Gong, S., Xu, D., Yu, Y., Zhao, Y., 2013. Impact of drip and level-basin irrigation on growth and yield of winter wheat in the North China Plain. Irrig. Sci. 31, 1025–1037. https://doi.org/10.1007/s00271-012-0384-7.

Wei, Z., 2011. Application of RP and manufacturing to water-saving emitters. Advanced Applications of Rapid Prototyping Technology in Modern Engineering. InTech. https://doi.org/10.5772/22401.

Wei, Z., Cao, M., Liu, X., Tang, Y., Lu, B., 2012. Flow behaviour analysis and experimental investigation for emitter micro-channels. Chinese J. Mech. Eng. (English Ed.) 25, 729–737. https://doi.org/10.3901/CJME.2012.04.729.

West, S., Wagner, M., Engelke, C., Horn, H., 2016. Optical coherence tomography for the in situ three-dimensional visualization and quantification of feed spacer channel fouling in reverse osmosis membrane modules. J. Memb. Sci. 498, 345–352. https://doi.org/10.1016/j.memsci.2015.09.047.

Worako, A.W., 2015. Evaluation of the water quality status of Lake Hawassa by using water quality index, Southern Ethiopia. Int. J. Water Resour. Environ. Eng. 7, 58–65. https://doi.org/10.5897/IJWREE2014.

Xiao, Y., Seo, Y., Lin, Y., Li, L., Muhammad, T., Ma, C., Li, Y., 2020. Electromagnetic fields for biofouling mitigation in reclaimed water distribution systems. Water Res. 173, 115562. https://doi.org/10.1016/j.watres.2020.115562.

Yan, D., Bai, Z., Rowan, M., Gu, L., Shumei, R., Yang, P., 2009. Biofilm structure and its influence on clogging in drip irrigation emitters distributing reclaimed wastewater. J. Environ. Sci. 21, 834–841. https://doi.org/10.1016/S1001-0742(08)62349-9.

Yan, D., Yang, P., Rowan, M., Ren, S., Pitts, D., 2010. Biofilm accumulation and structure in the flow path of drip emitters using reclaimed wastewater. Trans. ASABE 53, 751–758. https://doi.org/10.13031/2013.30080.

Yu, Y., Lee, C., Kim, J., Hwang, S., 2005. Group-specific primer and probe sets to detect methanogenic communities using quantitative real-time polymerase chain reaction. Biotechnol. Bioeng. 89, 670–679. https://doi.org/10.1002/bit.20347.

Zhang, J., Zhao, W., Wei, Z., Tang, Y., Lu, B., 2007. Numerical and experimental study on hydraulic performance of emitters with arc labyrinth channels. Comput. Electron. Agric. 56, 120–129. https://doi.org/10.1016/j.compag.2007.01.007.

Zhang, J., Zhao, W., Tang, Y., Lu, B., 2010. Anti-clogging performance evaluation and parameterized design of emitters with labyrinth channels. Comput. Electron. Agric. 74, 59–65. https://doi.org/10.1016/j.compag.2010.06.005.

Zhang, L., Wu, P., Zhu, D., Zheng, C., 2016. Flow regime and head loss in a drip emitter equipped with a labyrinth channel. J. Hydrodyn. 28, 610–616. https://doi.org/10.1016/S1001-6058(16)60665-0.

Zheng, L., Yu, D., Wang, G., Yue, Z., Zhang, C., Wang, Y., Zhang, J., Wang, J., Liang, G., Wei, Y., 2018. Characteristics and formation mechanism of membrane fouling in a full-scale RO wastewater reclamation process: membrane autopsy and fouling characterization. J. Memb. Sci. 563, 843–856. https://doi.org/10.1016/j.memsci.2018.06.043.

Zhou, B., Li, Y., Pei, Y., Liu, Y., Zhang, Z., Jiang, Y., 2013. Quantitative relationship between biofilms components and emitter clogging under reclaimed water drip irrigation. Irrig. Sci. 31, 1251–1263. https://doi.org/10.1007/s00271-013-0402-4.

Zhou, B., Wang, T., Li, Y., Bralts, V., 2017. Effects of microbial community variation on bioclogging in drip irrigation emitters using reclaimed water. Agric. Water Manag. 194, 139–149. https://doi.org/10.1016/j.agwat.2017.09.006.

Zhou, B., Li, Y., Liu, Y., Zhou, Y., Song, P., 2019. Critical controlling threshold of internal water shear force of anti-clogging drip irrigation emitters using reclaimed water. Irrig. Sci. 0 (0). https://doi.org/10.1007/s00271-019-00624-8.

Ziegler, A.S., McIlroy, S.J., Larsen, P., Albertsen, M., Hansen, A.A., Heinen, N., Nielsen, P.H., 2016. Dynamics of the fouling layer microbial community in a membrane bioreactor. PLoS One 11, 1–14. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0158811.

Partie 2 : Effet de l'écoulement sur la présence de microorganismes pathogènes

I. MATÉRIELS ET MÉTHODES

Étant donné que le séquençage n'a pas permis d'identifier les espèces pathogènes présentes dans les biofilms et dans les effluents, nous avons recherché les OTUs associés à des genres incluant des espèces pathogènes. L'ensemble de ces OTUs a ensuite été considéré comme une sous communauté. L'étude des indices de diversité, de richesse ainsi que l'étude de la structure et la composition de cette sous-communauté ont été réalisée afin d'étudier l'effet de l'écoulement, et donc du type de goutteur sur cette communauté bactérienne spécifique. Un séquençage du gène *mip* a été réalisé afin d'avoir un aperçu de la diversité des espèces de Légionnelles présentes dans les biofilms des goutteurs en fonction du type de goutteur. Des qPCR ont également été réalisées afin de quantifier les indicateurs de contaminations fécales *E. coli* et *Enterococcus* ainsi que des espèces pathogènes *Legionella pneumophila*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Aeromonas hydrophila*.

II. RÉSULTATS

A. Influence du débit sur les indices de diversité et de richesse des OTUs associés aux genres incluant des espèces pathogènes

La richesse était similaire au cours du temps pour chaque type de goutteur et entre chaque type de goutteur (p-value > 0,05) (Tableau 17). Le nombre d'OTUs observés et l'indice Chao1 ont les mêmes valeurs, signifiant que l'ensemble des OTUs associés aux genres recherchés ont été détectés. La diversité (indice de Shannon) a augmenté au cours du temps pour les goutteurs 1 et 2 $l.h^{-1}$, mais était stable pour les goutteurs 4 $l.h^{-1}$. Comparativement à la diversité de la communauté globale qui augmentait au cours du temps dans les 3 types de goutteurs, ceci indique que la diversité des OTUs associés à des genres incluant des espèces pathogènes augmente en même temps dans le cas des goutteurs 1 et 2 $l.h^{-1}$, mais pas pour le 4 $l.h^{-1}$.

À 32 jours, les indices 1/Simpson étaient plus faibles dans les goutteurs 1 et 2 $l.h^{-1}$ comparativement aux goutteurs 4 $l.h^{-1}$ (p-value < 0,05), mais ont augmenté au cours du temps jusqu'à être similaire aux goutteurs 4 $l.h^{-1}$ (p-value > 0,05) (Tableau 17). Étant donné que la richesse n'augmentait pas, cela signifie que des OTUs ont été remplacés par d'autres au cours du temps dans les biofilms des goutteurs, et que l'arrivé de nouveaux OTUs dans les biofilms des goutteurs 1 et 2 $l.h^{-1}$ a mis plus de temps. L'indice de diversité 1/Simpson dans biofilms des goutteurs 4 $l.h^{-1}$ à 115 jours n'était pas différent statistiquement même si on note une augmentation. Ceci est probablement dû à l'écart-type élevé, indiquant une augmentation l'abondance relative d'un ou plusieurs OTUs. La richesse et la diversité dans les biofilms des goutteurs EUB étaient similaires à celle des biofilms des goutteurs à 115 jours.

Tableau 17 Indices de richesse et de diversité des genres incluant des espèces pathogènes. EUT : eau usée traitée. Les différentes lettres indiquent des différences significatives par comparaison par paire en utilisant le test de Kruskal-wallis (et le test ad-hoc conover à p<0,05).

			Richesse		**Diversité**	
				OTUs estimés		
Échantillon	**Débit ($l.h^{-1}$)**	**Temps (Jours)**	**Observé**	**Chao1**	**Shannon**	**1/Simpson**
Goutteur	1 (n=3)	32	$17 \pm 3,5^{a}$	$17 \pm 3,5^{a}$	$1.7 \pm 0,4^{a}$	$3.3 \pm 1,2^{a}$
		72	$12.3 \pm 1,5^{ab}$	$12.3 \pm 1,5^{ab}$	$1.7 \pm 0,4^{a}$	$3.8 \pm 2,7^{a}$
		115	$17 \pm 6,1^{ab}$	$17 \pm 6,1^{ab}$	$2.5 \pm 0,2^{b}$	$9.7 \pm 0,9^{b}$
	2 (n=3)	32	$18.7 \pm 3,1^{a}$	$18.7 \pm 3,1^{a}$	$1.6 \pm 0,1^{a}$	$2.7 \pm 0,2^{a}$
		72	$18 \pm 9,8^{a}$	$18 \pm 9,8^{a}$	$2 \pm 0,5^{bc}$	$4.4 \pm 2,3^{b}$
		115	$17.3 \pm 2,1^{a}$	$17.3 \pm 2,1^{a}$	$2.5 \pm 0,1^{bc}$	$9.6 \pm 0,4^{c}$
	4 (n=3)	32	15 ± 1^{a}	15 ± 1^{a}	$2.1 \pm 0,1^{a}$	$5.8 \pm 0,9^{a}$
		72	$14.3 \pm 3,5^{a}$	$14.3 \pm 3,5^{a}$	$2 \pm 0,3^{a}$	$5.1 \pm 2,5^{a}$
		115	$17.7 \pm 5,1^{a}$	$17.7 \pm 5,1^{a}$	$2.5 \pm 0,4^{a}$	$10.7 \pm 4,5^{a}$
EUT (n= 11)		-	21.9 ± 8	21.9 ± 8	$2.3 \pm 0,6$	7.6 ± 5

B. Effet du type de goutteur sur la structure de la sous-communauté bactérienne regroupant des genres incluant des espèces pathogènes

Dans les échantillons séquencés, nous avons recherché les OTUs associés à 61 genres incluant des espèces bactériennes pathogènes (Annexe « Parcelle », Table S1), communément trouvées dans les eaux usées. 19 genres (représentés par 116 OTUs) ont été détectés dans les biofilms

des goutteurs et dans l'eau usée traitée de la lagune (Figure 40). La majeure partie des OTUs était affiliée au genre *Legionella* avec 34 OTUs, suivi de *Bacteroides* (15 OTUs), *Coxiella* (10 OTUs) et *Pseudomonas* (9 OTUs). La Figure 40 présente l'abondance relative des genres détectés dans la sous-communauté. Cependant, ces genres étaient minoritaires au niveau de la communauté globale (inférieure à 1 % voire 0,1 %).

Parmi les genres détectés, les abondances relatives des genres *Pseudomonas* et *Stenotrophomonas* étaient plus élevées dans les biofilms des goutteurs que dans l'effluent. L'abondance relative du genre *Pseudomonas* était aussi plus élevée dans les goutteurs 1 $l.h^{-1}$ que dans les 4 $l.h^{-1}$ à 32 et 72 jours (p-value <0,05), et où les volumes de biofilms étaient les plus élevés. Les abondances relatives des genres *Mycobacterium*, *Treponema* et *Gordonia* augmentaient au cours du temps dans les biofilms alors que celle du genre *Acinetobacter* diminuait. Étant donné que les concentrations en ADNr 16S n'augmentaient pas au cours du temps, quel que soit le type de goutteur (cf. Partie 1, « Table 3'), cela indique que les genres détectés dont les abondances relatives augmentent colonisent préférentiellement les goutteurs. À l'inverse, bien que majoritaire dans l'effluent, les genres *Aeromonas* et *Bacteroides* étaient peu représentés dans les biofilms des goutteurs. Cela indique aussi un remplacement des OTUs et genres incluant des espèces pathogènes dans les biofilms des goutteurs au cours du temps, illustré par l'augmentation de la diversité notamment dans les goutteurs 1 et 2 $l.h^{-1}$ (Tableau 18). Il semblerait que le type de goutteur influence l'abondance de *Legionella* : en effet, les abondances étaient très faibles dans les goutteurs 4 $l.h^{-1}$, où les volumes de biofilm en entrée étaient aussi plus faibles (cf. Partie 1, 1 $l.h^{-1}$: 18 %, 2 $l.h^{-1}$: 15,9 % ; 4 $l.h^{-1}$ 11,8 %), comparativement aux 2 autres types de goutteurs bien que les concentrations en ADNr 16S soient similaires.

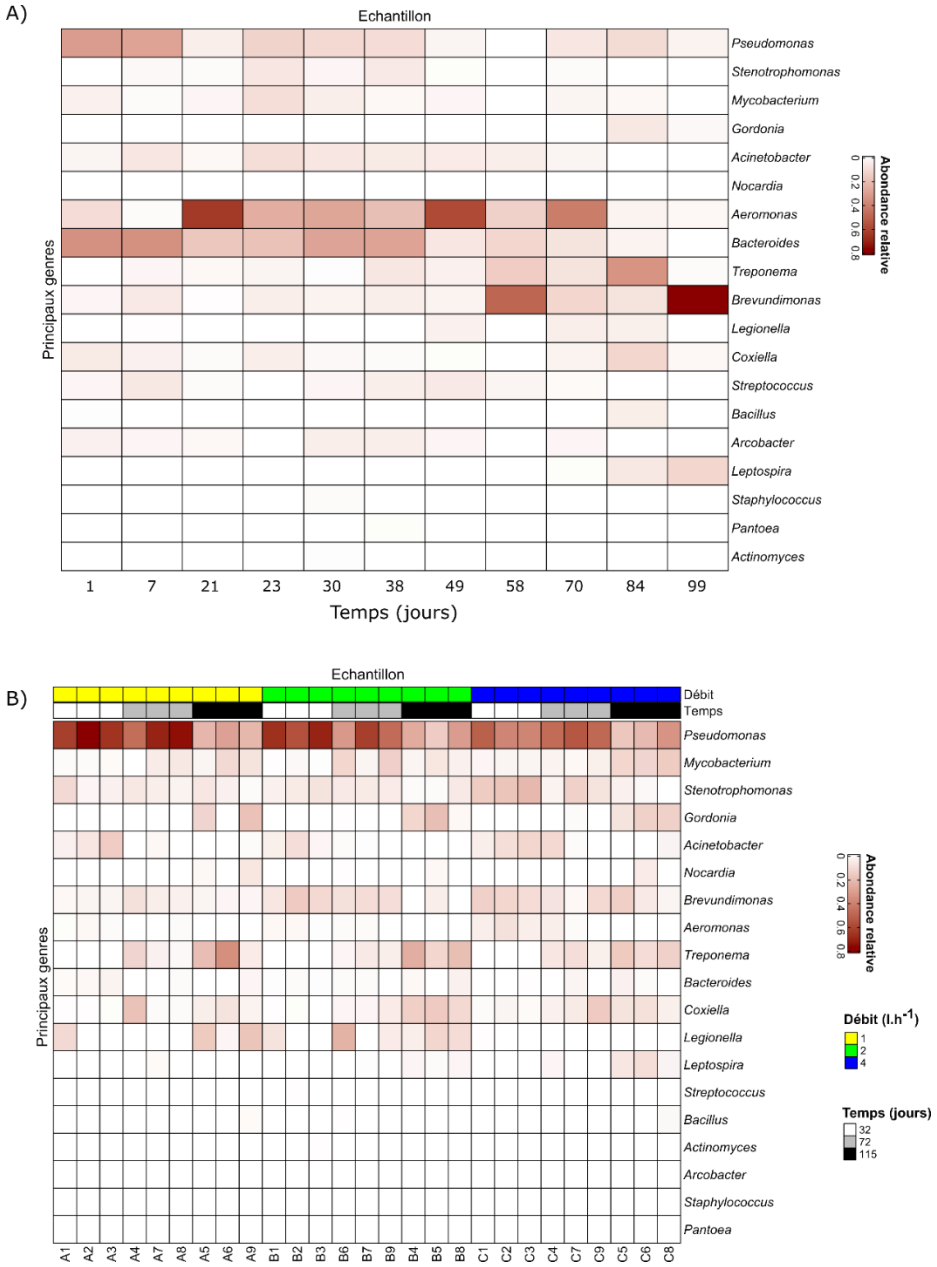


Figure 40 Abondances relatives des principaux genres incluant des espèces bactériennes pathogènes dans l'effluent de la lagune alimentant le banc d'essai (A) et dans les biofilms des goutteurs (B).

L'analyse de la structure de la communauté des OTUs associés aux genres bactériens incluant des espèces pathogènes (Figure 41) a confirmé l'effet du type de goutteur à 32 jours (Adonis test, r^2=0,75, p-value < 0,05) et à 115 jours (Adonis test, r^2=0,41, p-value < 0,05) ainsi que l'évolution dans le temps pour chaque type de goutteur (Adonis test, $r^2_{1\ l/h}$=0,61, $r^2_{2\ l/h}$=0,73, $r^2_{4\ l/h}$=0,69, p-value < 0,05).

14 OTUs associés à 10 genres incluant des espèces pathogènes influençaient la structure des communautés (Figure 41). À 32 jours, 3 OTUs associés au genre *Pseudomonas* (50, 207, 2228) étaient principalement retrouvés dans les goutteurs 1 $l.h^{-1}$. L'OTU 207 est affilié à l'espèce *P. alcaligenes* et l'OTU 2228 (*Pseudomonas*) était uniquement détectable dans les goutteurs des biofilms 1 $l.h^{-1}$ au cours du temps. L'abondance relative de l'OTU 50 (*Pseudomonas*) était plus élevée dans les goutteurs 1 $l.h^{-1}$ à 32 jours que dans les autres goutteurs, mais a diminué au cours du temps. À l'inverse, l'OTU 92 (*Pseudomonas*) était plus représenté dans les goutteurs 2 $l.h^{-1}$. Ceci indique que le type de goutteur influençait l'abondance relative d'OTUs affiliés au genre *Pseudomonas*. À 115 jours, les OTUs 308 (*Mycobacterium*) et 50 (*Pseudomonas*) étaient principalement associés au goutteur 4 $l.h^{-1}$ alors que les OTUs 1124 (*Legionella*) et 92 (*Pseudomonas*) étaient principalement représentés dans les goutteurs 2 $l.h^{-1}$. Au cours du temps, les spécificités pour un type de goutteur évoluaient.

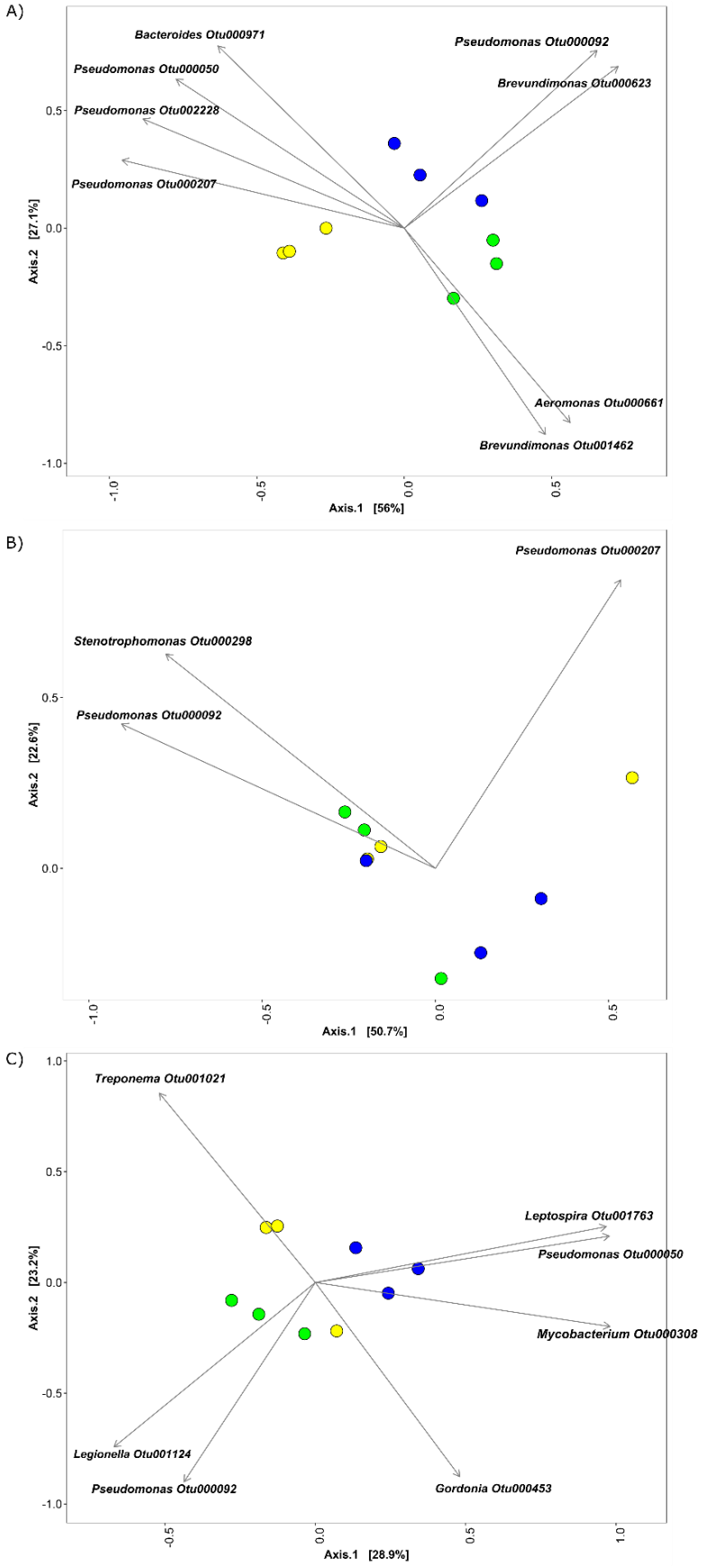

A)
Bacteroides Otu000971
Pseudomonas Otu000092
Pseudomonas Otu000050
Brevundimonas Otu000623
Pseudomonas Otu002228
Pseudomonas Otu000207
Aeromonas Otu000661
Brevundimonas Otu001462
Axis.2 [27.1%]
Axis.1 [56%]
B)
Pseudomonas Otu000207
Stenotrophomonas Otu000298
Pseudomonas Otu000092
Axis.2 [22.6%]
Axis.1 [50.7%]
C)
Treponema Otu001021
Leptospira Otu001763
Pseudomonas Otu000050
Mycobacterium Otu000308
Legionella Otu001124
Pseudomonas Otu000092
Gordonia Otu000453
Axis.2 [23.2%]
Axis.1 [28.9%]

Figure 41 PCoA des sous-communautés bactériennes des biofilms regroupant les genres avec des espèces pathogènes à 32 jours (A), 72 jours (B) et 115 jours (C). L'analyse PCoA est basée sur une matrice de similarité Bray-Curtis. 1 $l.h^{-1}$: jaune, 2 $l.h^{-1}$: vert, 4 $l.h^{-1}$: bleu. Les flèches indiquent les OTUs qui participent significativement (p-value < 0,05) à la séparation des communautés bactériennes.

Les biofilms des goutteurs 1 et 2 $l.h^{-1}$ ont également été utilisés pour explorer la diversité des espèces appartenant au genre Légionnelle par séquençage (Tableau 18). Après 115 jours, 3 espèces de Légionnelles ont été détectées (*L. feeleii*, *L. impletisoli*, *L. pneumophila*). Les abondances relatives de L. feeleii sont plus élevées globalement dans les goutteurs 1 $l.h^{-1}$ alors que celles de *L. pneumophila* étaient plus élevées dans les goutteurs 2 $l.h^{-1}$. Cependant, au vu de la variabilité importante entre les goutteurs d'une même condition, des expérimentations complémentaires sont nécessaires pour statuer quant à l'influence des conditions hydrodynamiques sur la colonisation des goutteurs par les légionelles pathogènes. Certains OTUs ont été affiliés à des espèces n'appartenant pas au genre *Legionella* tels que *Litorilinae aerophila* (Chloroflexi) et le genre *Tatlockia* appartenant à la famille des Legionellaceae.

Tableau 18 Diversité des espèces de légionelles présentes dans les biofilms des goutteurs après 115 jours dans les 1 et 2 $l.h^{-1}$. Les séquences présentant une similarité de 99 % ont été triées en unités taxonomiques opérationnelles (OTU).

Espèce	1 $l.h^{-1}$				2 $l.h^{-1}$			
	Nb de copies ADNr 16S moyen/goutteur	Échantillons			Nb de copies ADNr 16S moyen/goutteur	Échantillons		
		A5	A6	A9		B4	B5	B9
L. feeleii		87,7 %	51,5 %	80,6 %		38,2 %	57,2 %	2,5 %
L. impletisoli		0,1 %	0 %	0,2 %		0,5 %	0,4 %	0,0 %
L. pneumophila	$8,7\pm 0,4\times10^{9}$	6,2 %	8,2 %	4,5 %	$1,4\pm0,5\ x10^{10}$	20,6 %	19,5 %	1,4 %
Litorilinea aerophila		0,1 %	0,3 %	0,2 %		0,6 %	0,4 %	<0,1 %
Tatlockia unclassified		0,4%	4,6%	1,2%		0,5%	1,9%	0,1%

C. Indicateurs et espèces pathogènes dans les biofilms des goutteurs et dans l'eau de la lagune

La concentration en bactéries totales, estimée par le nombre de copies du gène codant pour l'ADNr 16S, compris entre 10^9 et 10^{10} copies/biofilms, était similaire au cours du temps et entre les différents types de goutteurs (cf. Partie 1, Table 3), bien que le niveau de colmatage des goutteurs augmentait. La concentration en *Enterococcus* spp. était similaire au cours du temps et entre les goutteurs, excepté à 115 jours où la concentration moyenne était plus élevée dans les goutteurs 4 $l.h^{-1}$ comparativement au 1 $l.h^{-1}$ (Figure 42). Les concentrations en *E. coli* tendaient à diminuer avec le temps dans l'effluent de la lagune ce qui pourrait être lié à une augmentation du rayonnement. Globalement, les concentrations en *E. coli* étaient sous la limite de quantification dans les biofilms des goutteurs (Figure 42).

Durant la période expérimentale, les concentrations en *L. pneumophila* étaient de sous la limite de détection (LOD : 10 copies du gène mip/puits de PCR). Le comportement des espèces pathogènes *P. aeruginosa* et *A. hydrophila* étaient différents de celui des entérocoques (Figure 42). Ces opportunistes étaient retrouvés préférentiellement dans les biofilms des goutteurs à faible débit. Bien que *P. aeruginosa* soit difficilement quantifiable dans l'effluent de la lagune, les concentrations augmentaient au cours du temps dans les biofilms des goutteurs, principalement dans les goutteurs 1 $l.h^{-1}$. La concentration en bactéries n'augmentant pas au cours du temps, cela suggère que l'espèce *P. aeruginosa* s'installait dans les goutteurs et préférentiellement les goutteurs 1 $l.h^{-1}$ (Figure 42). *A. hydrophila* n'était pas détectable dans les échantillons de l'effluent alimentant le banc d'essai et dans les goutteurs 4 $l.h^{-1}$ au cours du temps. *A. hydrophila* était quantifiable dans peu d'échantillons des goutteurs 1 et 2 $l.h^{-1}$ au cours du temps et dans aucun des biofilms des goutteurs 4 $l.h^{-1}$. Cela suggère un effet des conditions hydrodynamiques sur l'installation de ces deux pathogènes opportunistes, avec une colonisation plus importante des goutteurs à 1 $l.h^{-1}$ et 2$l.h^{-1}$ comparativement au 4 $l.h^{-1}$.

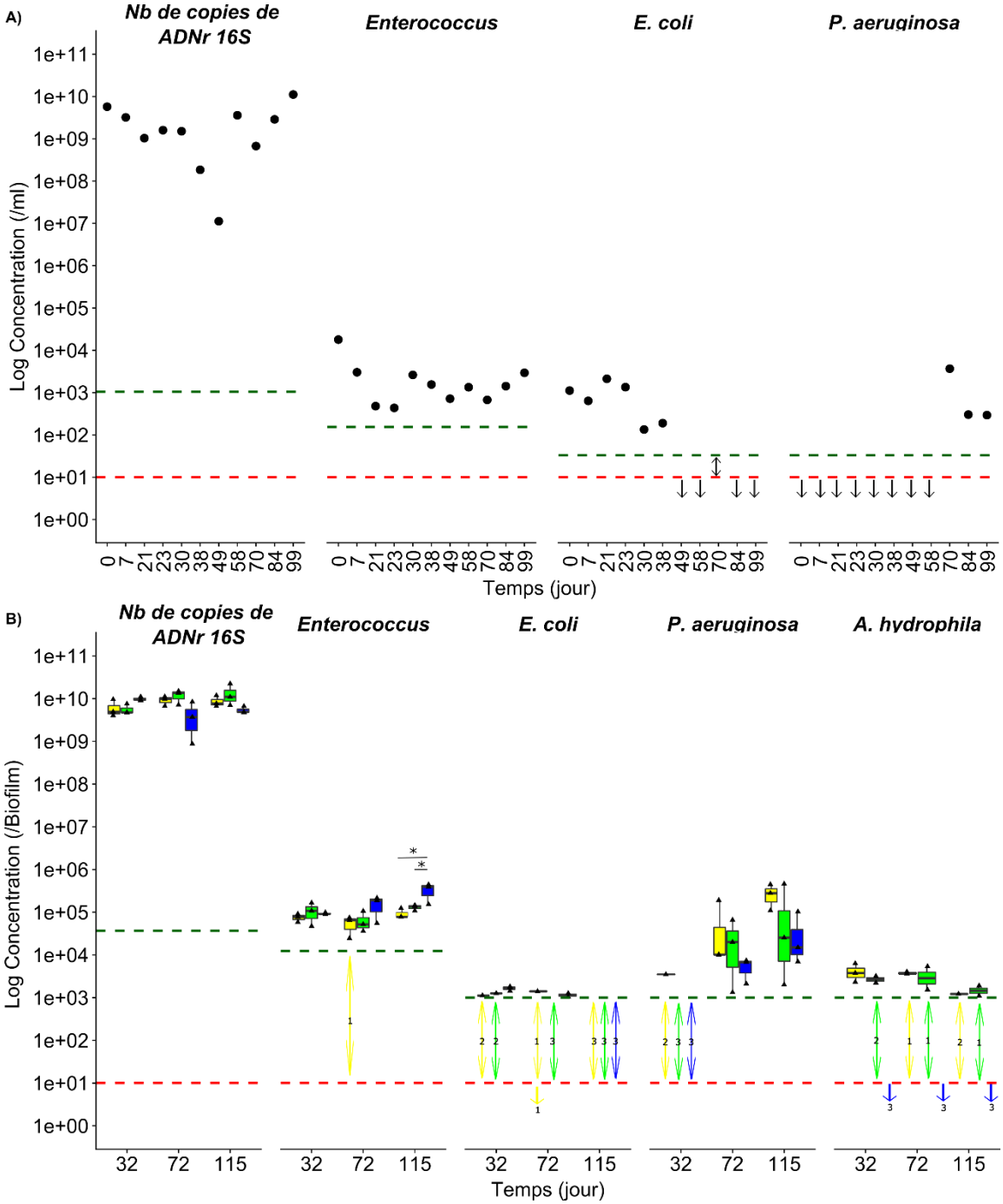


Figure 42 Concentration des bactéries (ADNr 16S), d'*Enterococcus* spp. (23S ADNr), *E. coli* (*iudA*), *P. aeruginosa* (*regA*) et *A. hydrophila* (*aha1*) dans la lagune (A) et dans les biofilms des goutteurs (B). Les résultats de la quantification de *A. hydrophila* dans la lagune ne sont pas présentés, car ils étaient toujours sous la limite de détection. 3 goutteurs étaient prélevés par date d'échantillonnage et par type de goutteur; en jaune : 1l.h^{-1}, en vert : 2 l.h^{-1}, en bleu : 4 l.h^{-1}. La ligne pointillée rouge indique la limite de détection, la verte : la limite de quantification. Lorsque la détection a eu lieu, mais à des concentrations inférieures au seuil de quantification (LOQ), les résultats sont représentés par des doubles flèches. Lorsque la concentration était inférieure au seuil de détection (LOD), les résultats sont représentés par des flèches simples. Les chiffres à côté des flèches indiquent le nombre d'échantillons inférieurs à la LOD ou LOQ. Les * indiquent une différence significative (conover test, p-value < 0,05).

III. DISCUSSION

Un des problèmes majeurs associés à l'utilisation de l'eau usée traitée pour l'irrigation est la présence de microorganismes pathogènes. À cela s'ajoute le développement de biofilms qui sont des réservoirs potentiels à espèces pathogènes. Dans cette étude, l'effet du type de goutteur (et de l'écoulement associé) sur la présence de bactéries pathogènes a été exploré par la recherche de genres incluant des espèces pathogènes dans les données de séquençage et la quantification d'indicateurs bactériens de contamination fécale et de bactéries pathogènes par PCR quantitative.

19 genres incluant des espèces pathogènes (soit 116 OTUs) ont été détectés dans les données de séquençage. L'analyse de ces OTUs a mis en évidence que la structure de cette sous-communauté bactérienne des biofilms des goutteurs et de la lagune était différente, indiquant une sélection dans un premier temps liée au passage de l'effluent vers le système d'irrigation. Par exemple, les abondances relatives des genres *Aeromonas* et *Bacteroides* étaient plus élevées dans l'effluent de la lagune que dans les goutteurs. À l'inverse, le genre *Pseudomonas* était plus représenté dans les biofilms des goutteurs, montrant sa capacité à coloniser les surfaces et passer en mode « sessile ». Un effet du type de goutteur a été également mis en évidence. Pseudomonas est principalement présent dans les goutteurs 1 et 2 $l.h^{-1}$. L'OTU 207 est affilié à l'espèce *P. alcaligenes* et est principalement associé au goutteur 1 $l.h^{-1}$. *P. alcaligenes* est un pathogène humain opportuniste capable d'induire une infection du sang (Suzuki *et al.*, 2013b).

Dans cette étude, 34 OTUs étaient associés au genre *Legionella*. Un séquençage spécifique avec le gène mip codant pour une protéine appelée Macrophage Infectivity Potentiator impliquée dans le pouvoir pathogène de *Legionella* (Ludwig *et al.*, 1994), a permis d'analyser la diversité des légionelles et de montrer la présence de 2 espèces pathogènes : *Legionella feeleii* et *Legionella pneumophila*, toutes deux agents de la fièvre de Pontiac (C. Wang *et al.*, 2019). Les premiers résultats obtenus ici semblent indiquer que les abondances relatives des espèces de légionelles sont influencées par le type de goutteur. Par exemple, l'abondance relative de *L. pneumophila* tendait à être plus élevée dans les biofilms des goutteurs 2 $l.h^{-1}$ alors que *L. feeleii* était majoritairement présent dans les goutteurs 1 $l.h^{-1}$. Cependant l'étude a aussi montré une variabilité importante d'un goutteur à l'autre, et il serait nécessaire d'analyser un plus grand nombre d'échantillons pour conclure. L'augmentation des forces de cisaillement augmente les

risques de détachement, ce qui influence la rugosité de surface des biofilms ainsi que l'adhésion de *L. pneumophila* (Oder *et al.*, 2017; Shen *et al.*, 2015).

Afin de la valider la présence de bactéries pathogènes opportunistes, des qPCR ciblées ont été réalisées en parallèle de la quantification des indicateurs de contamination fécale *E. coli* et *Enterococcus* spp. ciblant les bactéries pathogènes *L. pneumophila*, *P. aeruginosa* et *A. hydrophila. Les concentrations de L. pneumophila* étaient en dessous de la limite de détection pour tous les échantillons testés. Les bactéries entériques montrent des comportements différents de ceux des espèces pathogènes *P. aeruginosa* et *A. hydrophila*, notamment concernant l'influence du type de goutteur ou la capacité à coloniser le biofilm. Ainsi, *P. aeruginosa* et *A. hydrophila* étaient difficilement quantifiables, voir indétectables dans l'effluent, mais quantifiable dans les biofilms des goutteurs, à l'inverse d'*E. coli*. Une étude récente a montré la présence de *P. aeruginosa* dans l'eau usée traitée ainsi qu'à la surface des cultures irriguées avec des abondances supérieures à l'effluent (Obayomi *et al.*, 2019b), suggérant un effet de la colonisation du réseau sur la contamination de la culture. Les indicateurs de contamination fécale sont utilisés pour rendre compte de la présence de pathogènes d'origine entérique et ne permettent pas d'estimer le devenir des autres pathogènes, notamment dans les biofilms, ce qui est en accord avec plusieurs études (Dietrich *et al.*, 2007; Virto *et al.*, 2005; Winward *et al.*, 2008). L'analyse des cinétiques de développement des biofilms a mis en évidence des évènements de détachement, principalement dans les goutteurs 1 $l.h^{-1}$, où les concentrations en *P. aeruginosa* ont tendance à augmenter au cours du temps et à être les plus élevées. Il serait important de comparer les concentrations en *P. aeruginsa* en sortie de goutteur, comparativement à d'autres ressources en eau utilisées en agriculture et d'estimer les risques sanitaires associés.

P. aeruginosa est un agent pathogène opportuniste qui peut provoquer des infections humaines. Dans des régimes d'écoulement irréguliers et dans des environnements hydrodynamiquement complexes, comme dans le cas des labyrinthes des goutteurs, *P. aeruginosa* produit des filaments de biofilm au niveau de la couche supérieure du biofilm en contact direct avec la phase liquide (Rusconi *et al.*, 2010). Ces filaments favorisent l'accrétion de cellule, la capture de nutriments et de débris en transit (Drescher *et al.*, 2013). Bien que minoritaire au sein de la communauté bactérienne globale dans les biofilms des goutteurs, la formation de ces filaments pourrait favoriser l'encrassement biologique des labyrinthes. Tout comme pour *P. aeruginosa*,

A. hydrophila est également une espèce opportuniste pathogène. *A. hydrophila* était sous la limite de détection dans les effluents alimentant les bancs mais était quantifiée dans les goutteurs 1 et 2 $l.h^{-1}$, mais pas dans les 4 $l.h^{-1}$ indiquant un effet de l'écoulement sur sa présence. Sachant qu'au cours de la formation des biofilms, il y a des phases de détachement, et que le détachement des biofilms dans ses systèmes peuvent induire une dégradation de la qualité microbioloque l'eau (Pachepsky *et al.*, 2012), il serait intéressant d'analyser la composition microbiologique de l'eau sortant du système afin d'évaluer l'effet de la colonisation du réseau sur l'eau au point d'usage.

IV. CONCLUSION

En plus d'impacter le niveau de colmatage des goutteurs, les paramètres hydrauliques des goutteurs influençaient la présence des genres incluant des espèces pathogènes ainsi que les concentrations en espèces pathogènes :

1) Certains genres incluant des espèces pathogènes opportunistes voient leur abondance diminuer au cours du temps (p. ex. *Acinetobacter*, *Pseudomonas*, *Stenotrophomonas*) d'autres leur abondance augmenter (p. ex. *Mycobacterium*, *Gordonia*, *Treponema*), alors que la concentration en bactéries totales est relativement stable.
2) Les indicateurs de contamination fécale et les espèces opportunistes ont des comportements différents, ces dernières étant plus aptes à s'installer dans les biofilms. Par exemple, *P. aeruginosa*, bien que rarement quantifiable dans l'effluent, était présent dans les biofilms des goutteurs, alors que l'inverse est observé pour *E. coli*.
3) *A. hydrophila*, *P. aeruginosa L. feeleii* et *L. pneumophila* semblent sensibles aux paramètres hydrodynamiques des goutteurs.

Au cours du développement des biofilms des goutteurs 1 $l.h^{-1}$, nous avons observé des phases de croissances et de décroissance du volume de biofilm, suggérant des épisodes de détachement. La présence de ces pathogènes opportunistes dans les biofilms des goutteurs, principalement dans les goutteurs 1 l.h-1 qui sont également les plus sensibles au colmatage, peut altérer la qualité microbiologique de l'eau et induire un risque sanitaire. Généralement, afin de limiter le

développement des biofilms dans ces systèmes, plusieurs solutions sont utilisées comme la chloration ou la purge des systèmes (Goyal, 2018). Pour autant, l'efficacité de ces méthodes sur la présence de bactéries pathogènes dans les systèmes d'irrigation goutte à goutte n'a pas été explorée. Le chapitre suivant sera dédié à l'étude de l'effet de ces méthodes.

- Dans cette étude, 3 types de goutteurs ont été utilisés pour évaluer l'effet des paramètres d'écoulement sur la mise en place et la composition microbienne des biofilms des goutteurs.

- L'entrée, la zone de retour du labyrinthe et les zones de recirculation dans le coin des chicanes étaient les zones les plus sensibles au colmatage. L'énergie de turbulence et le cisaillement sont plus faibles dans ces zones, ce qui expliquerait le développement favorisé des biofilms.

- Le goutteur 1 $l.h^{-1}$ était le plus sensible au colmatage, notamment au niveau de l'entrée du labyrinthe. La section et la vitesse de l'écoulement au niveau de la section étaient plus faibles pour ce type de goutteur, ce qui peut faciliter l'attachement et le développement des biofilms.

- Le type de goutteur utilisé influençait également la structure et la composition bactérienne des biofilms des goutteurs. L'abondance des Chloroflexi était plus élevée dans les goutteurs 1 $l.h^{-1}$. Ceci pourrait être lié au fait qu'il y a plus d'EPS synthétisés et utilisables par les Chloroflexi.

- Bien que non quantifiable dans les eaux usées traitées, *P. aeruginosa* et *A. hydrophila* étaient présents dans les biofilms des goutteurs. Le type de goutteur influençait également les concentrations de ces bactéries pathogènes dans les biofilms des goutteurs. Par exemple, les concentrations en *P. aeruginosa* étaient plus élevées dans les biofilms des goutteurs 1 $l.h^{-1}$. Les concentrations de *A. hydrophila* tendaient à diminuer avec l'augmentation du débit des goutteurs.

CHAPITRE 4 : EFFET DE LA CHLORATION ET DE LA PURGE SUR LE COLMATAGE DES GOUTTEURS ALIMENTES PAR LES EAUX USÉES TRAITÉES

PRÉAMBULE

Plusieurs méthodes existent pour prévenir et limiter le colmatage des goutteurs. L'objectif de cette étude a été d'étudier l'efficacité de deux méthodes de prévention du colmatage, à savoir la chloration et la purge hydrique, sur la mise en place de celui-ci et sur sa composition microbienne. Ces méthodes sont celles les plus couramment utilisés pour leur coût et leur facilité de mise en place. Pour cela, des goutteurs 1 $l.h^{-1}$, identifiés lors de l'expérimentation « Écoulement » comme les plus sensibles au colmatage, ont été utilisés. Des lignes d'irrigations, composées des systèmes goutteurs avec accès optique, ont été placées sur un banc d'essai alimenté avec de l'eau usée traitée pendant 3 mois et ont été traitées soit par chloration, soit par purge hydrique ou par la combinaison de ces deux méthodes.

Ces traitements induisent des détachements de biofilms qui peuvent augmenter les concentrations en contaminants microbiologiques si ceux-ci ont colonisé le réseau. L'effet de ces méthodes sur la présence de bactéries pathogènes dans les biofilms et dans l'effluent sortant du réseau a donc également été étudié pour savoir si la colonisation du système pouvait influencer la qualité microbiologique de l'eau au point d'usage. L'approche a combiné l'exploration des données de séquençage (amplicons d'ADNr 16S) et la quantification par qPCR des gènes spécifiques aux espèces pathogènes.

Ce chapitre est divisé en deux parties :

- La première partie est dédiée à l'étude de l'effet des méthodes de nettoyages sur la mise en place du colmatage et sur la composition microbienne globale de celui-ci. Cette partie est abordée sous un format article, en anglais, et publiée dans la revue *Science of the Total Environment.*
- La seconde partie de cette étude porte sur l'effet de ces méthodes de nettoyage sur la présence de microorganismes pathogènes dans les biofilms des goutteurs.

Partie 1 : Effects of chlorination and pressure flushing of drippers fed by reclaimed wastewater on biofouling

Abstract

Milli-channel baffle labyrinths are widely used in drip irrigation systems. They induce a pressure drop enabling drip irrigation. However, with a section thickness that is measured in mm², they are sensitive to clogging, which reduces the performance and service life of a drip irrigation system. The impact of chlorination (1.5 ppm of free chlorine during 1 h application) and pressure flushing (0.18 MPa) on the biofouling of non-pressure-compensating drippers, fed by real reclaimed wastewater, was studied at lab scale using Optical Coherence Tomography. The effect of these treatments on microbial composition (bacteria and eukaryotes) was also investigated by High-throughput DNA sequencing. Biofouling was mainly observed in the inlet, outlet and return areas of the milli-labyrinth channel from drippers. Chlorination reduced biofilm development, particularly in the mainstream of the milli-labyrinth channel, and it was more efficient when combined with pressure flushing. Moreover, chlorination was more efficient in maintaining water distribution uniformity (CU <95% compared to less than 85% for unchlorinated lines). It reduced more efficiently the bacterial concentration (≈ 1 log) and the diversity of the bacterial community in the dripper biofilms compared to the pressure flushing method. This latter significantly modified the microbial communities, promoting chlorine-resistant bacteria such as *Comamonadaceae* or *Azospira*. Inversely, several bacterial groups were identified as sensitive to chlorination such as Chloroflexi and Planctomycetes. Nevertheless, one month after stopping the treatments bacterial diversity recovered and the chlorine-sensitive bacteria such as Chloroflexi phylum and the Saprospiraceae, Spirochaetaceae, Christensenellaceae and Hydrogenophilaceae families re-emerged in conjunction with the growth of biofouling, highlighting the resilience of the bacteria originating from drippers. Based on PCoA analyses, the structure of the bacterial communities still clustered separately from non-chlorinated drippers, showing that the effect of chlorination was still detectable one month after stopping the treatment.

Keywords: Drip irrigation; biofilm; cleaning methods, milli-fluidic systems, Optical Coherence Tomography; High-throughput DNA sequencing, water reuse

I. INTRODUCTION

Due to the scarcity of water resources, the use of reclaimed wastewater for crop irrigation is significantly increasing worldwide, particularly in arid and semi-arid countries (Ait-mouheb et al., 2020). Drip irrigation, combined with the use of reclaimed wastewater, has several advantages, as it provides water to the plant (e.g. roots) in optimal quantities and frequencies for plant growth (Goyal, 2018; Wang et al., 2013). The drippers are generally characterized by a narrow labyrinth channel (internal flow section around 1 mm^2, which enables the development of a turbulent regime composed of a main high velocity flow and vortex zones in channel corners (Al-Muhammad et al., 2019, 2016; Wei et al., 2012). This milli-labyrinth flow path can become clogged by suspended particles, chemical precipitation and biofilms (Green et al., 2018; Y. Li et al., 2019; Oliveira et al., 2017, 2020; Rizk et al., 2019; Zhou et al., 2018). Dripper clogging not only greatly reduces irrigation uniformity, but also affects crops, by severely limiting the large-scale development of drip irrigation. Biofouling caused by biofilm growth, increases physical and chemical clogging (Li et al., 2013; Tarchitzky et al., 2013), and is considered a key factor in the clogging of drip irrigation systems using reclaimed wastewater (Song et al., 2017; Wang et al., 2017). Therefore, the evaluation of methods to control and limit the development of biofilms in these systems is necessary (Lamm et al., 2007).

Existing methods used to reduce clogging include precipitation, filtration, chlorination, acidification and pressure flushing (Duran-Ros et al., 2009; Katz et al., 2014; Puig-Bargués et al., 2010; Song et al., 2017). Although chlorination has been recognised as the least expensive method to treat biological-growth related clogging, the chlorination schemes recommended in the scientific literature differ according to the type of reagent used (liquid sodium hypochlorite (NaOCl), calcium hypochlorite ($Ca(OCl)_2$), gaseous chlorine (Cl_2)), the concentration and injection interval application (Goyal, 2018; Rav-Acha et al., 1995). Indeed, chlorination can be applied in concentrations ranging from 0.4 ppm (Batista et al., 2009) to more than 100 ppm (Chauhdary et al., 2015). Both chlorine concentrations and injection frequency have an impact on clogging reduction efficiency. However, the application of high chlorine concentrations can intensify clogging by releasing clogging constituents that were previously stuck to the pipe wall (Rav-Acha et al., 1995), and can negatively impact crop growth, since a high chlorine concentrations in the soil may lead to toxicity (Li and Li, 2009). Therefore, the use of low free-chlorine concentrations (1–2 ppm) at repeated frequencies (weekly, twice a week) has proven its effectiveness in limiting dripper fouling (J. Li et al., 2010; Li et al., 2012; Song et al., 2017). Other studies have shown that the over frequent use of chlorine (once or twice a week) can also

promote the development of a biofilm resistant to chlorination (J. Li et al., 2010). However, little is known about the mechanisms and microorganisms involved in this process. An in-depth analysis of the chlorination effects on the microbiome of drippers would be required to better understand the mechanisms of biofilm development and optimise the control of biofilm development (Zhou et al., 2017). Pressure flushing consists in washing water pipelines by increasing the hydraulic shear force within the pipe system. To be effective, flushing must be carried out often enough, and at an appropriate velocity rate, to dislodge and transport accumulated sediment. The minimum flow velocity for flushing the drip irrigation system is 0.3-0.6 m s^{-1}, in order to remove clogging and particulate matter (Han et al., 2018; Lamm et al., 2007; Li et al., 2018). As for chlorination, the frequency of flushing (weekly to monthly) directly influences the efficiency of the method and the service life of the drip irrigation system (Lamm, 2013; Li et al., 2015, 2018; Puig-Bargués et al., 2010). Flushing the system as often as possible is recommended (Lamm et al., 2007), but this may favour the development of a flushing-resistant biofilm caused by specific bacteria (Li et al., 2015). Thus, despite studies aimed at optimizing application parameters, the problem of clogging has yet to be fully resolved, and the mechanisms involved are poorly understood.

The effectiveness of chlorination and pressure flushing methods on the biofouling of drip irrigation systems is often studied, but generally separately. However, several studies on drinking water systems have shown that when two methods are combined, they were more effective in reducing the level of colonisation than when they were used separately (Mathieu et al., 2014; Tsvetanova, 2020). Thus, studying the effects of these methods, when used separately and in combination, will lead to a better understanding of the mechanisms involved.

The objectives of the present study were to determine the effects of chlorination and pressure flushing, when combined or used alone, on (1) biofilm kinetic development and (2) on the microbial communities in biofilms formed in irrigation systems fed by reclaimed wastewater (RWW). To evaluate if the effects of the treatments were transient or permanent, biofilms were also analysed 1 month after stopping the cleaning operations. A non-destructive optical time-monitoring observation system was developed to study biofilm growth in commercial drippers (1 $l.h^{-1}$) by optical coherence tomography (OCT) (Lequette et al., 2020). For the first time, the combined use of the OCT method and high-throughput sequencing made it possible to monitor biofilm development according to the cleaning methods used, while also evaluating the impact of these methods on the bacterial compositions. Although eukaryotes can influence the formation and development of biofilms (Parry, 2004; Parry et al., 2007), data on

eukaryotes in drippers supplied by reclaimed wastewater remain scarce (Dehghanisanij et al., 2005). Therefore, the impact of these cleaning methods on eukaryotes was also investigated.

II. MATERIALS AND METHODS

A. Experimental setup

1. Experimental setup and irrigation procedure

Non-pressure-compensating (NPC) drippers (model D2000, Rivulis Irrigation SAS, Lespinasse, France) with a flow rate of 1 $l.h^{-1}$ (Table 1) were used. The NPC drippers were placed in a transparent tube (internal diameter 15 mm, TubClair, Vitry-le-François, France), so that the analysis of the biofilm development along the channel could be performed over time without disturbance. More details on these experiments are presented in Lequette et al. (2020). Four irrigation lines with nine dripper systems per line were placed on the test bench: control (C-without cleaning events), a pressure flushing (PF), chlorination line (Cl) and pressure flushing/chlorination (PFCl) (see Cleaning procedures for details). Each of the four lines was connected to a separate tank (total volume 60l) and a pump (JetInox 82M, DAB, Saint-Quentin-Fallavier, France) (Figure 1.B). A disk filter (mesh size 0.13mm) was installed to reduce the physical clogging of emitters according to the technical recommendations for this type of dripper. The inlet pressure was set at 0.08 MPa (nominal working dripper pressure) using a pressure gauge. A gutter system, connected to each respective tank, was installed below each lateral line to collect the water discharged from the drippers during the experiments. The lines were supplied twice a day, five days per week for 1 h, with an interval of 6h off. Discharge measurements were performed each week to evaluate emitter performance and clogging. The relative average discharge of drippers (Li et al., 2015) was used to assess the drip irrigation performance and was calculated in Equation 1:

$$Dra = \frac{\sum_i^n \frac{q_i^t}{q_i^0}}{n} \times 100 \quad (1)$$

where q_i^0 indicated the nominal flow of drippers ($l.h^{-1}$), q_i^t the measured flow rate ($l.h^{-1}$) and n the total number of experimental emitters. The drippers were considered clogged when the outflow presented a discharge rate below 75% (Yu et al., 2018b).

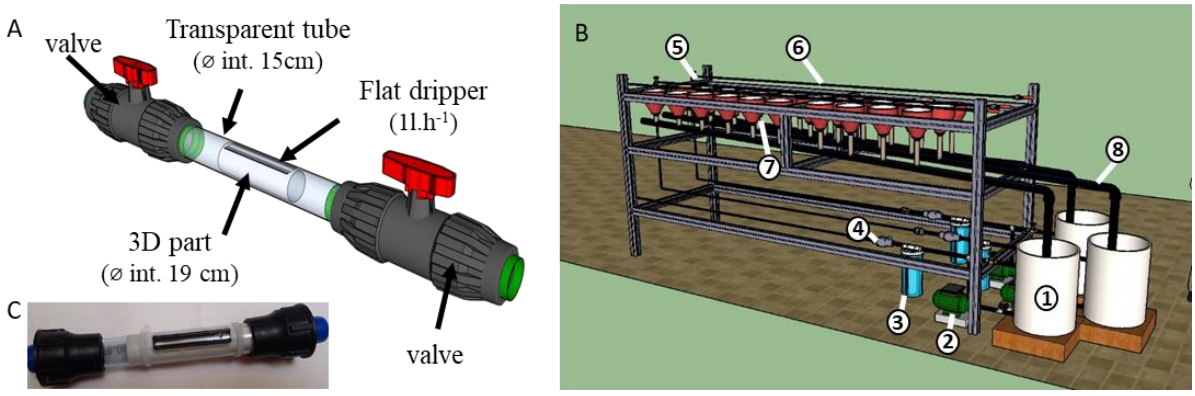


Figure 1. Dripper system (A, C) and test bench (B). The drippers were placed in a transparent tube to enable optical measurements. The test bench was composed of 1. a tank (60l); 2. a water pump; 3. a 0.13mm mesh screen filter; 4. a pressure reducer; 5. a pressure gauge; 6. the drip line with an emitter system located at 10 cm intervals; 7. a collector; 8. a gutter.

Table 1 lists the dripper characteristics. The flow regimes were characterized by a Reynolds number (Re). The Reynolds number (Re) was computed using the following Equation 2:

$$Re = \frac{\rho v D_h}{\mu} \quad (2)$$

where ρ is water density (kg.m^{-3}), v the water velocity across the pipe (m.s^{-1}), D_h the hydraulic diameter (m), and μ the water dynamic viscosity (Pa s).

The hydraulic diameter), *Dh*, was calculated for a rectangular cross-section as (Equation 3):

$$Dh = \frac{4A}{P} \quad (3)$$

where A: area (mm) and P for the perimeter (mm).

Table 1 Dripper parameters

q (l.h^{-1})	*L* (mm)	*W* (mm)	*h* (mm)	D_h	Total labyrinth volume (mm^3)	Re (inlet)	.x	CV (%)	Channel geometry
1	103.4	1.01	0.8	1.02	127	305	0.4	1.4	

L: length of the flow path, *W*: width of the flow path, *h*: depth of the flow path, q: flow rate, D_h: hydraulic diameter, .x: pressure's exponent, CV: Coefficient of variation

2. Physicochemical and microbiological quality of TWW

The irrigation lines were supplied with reclaimed wastewater from the Murviel-Les-Montpellier treatment plant located in the South of France (43.605034° N, 3.757292° E). The wastewater treatment plant design is based on stabilisation ponds with three successive lagoons (13 680 m^3, 4784 m^3 and 2700 m^3) and a nominal capacity of 1,500 Inhabitant Equivalent. RWW was placed in a 60l tank and changed twice a week to maintain the quality close to that of the wastewater from the treatment plant. Each week (n=16), several physical-chemical and microbiological analyses were performed to evaluate RWW quality. Chemical oxygen demand (COD), ammonia, nitrate, and phosphorus concentrations (mg l^{-1}) were measured using a spectrophotometer (DR1900, Hach Company, Loveland, CO, USA) using LCK Hach reagents®. Conductivity and pH were measured with probes (TetraCon® 925 and pH-Electrode Sentix® 940, WTW, Wilhelm, Germany). Faecal coliforms, *E. coli*, and *Enterococci* were quantified using the IDEXX method (Colilert18 and Enterolert, IDEXX Laboratories, Westbrook, ME) according to the supplier's recommendations. The main effluent properties are listed in Table 2.

Table 2 Physico-chemical and microbiological characteristics of the RWW

Characteritics	**Units**	**Mean (n=9)**	**SD**
COD (LCK 614)	mg l^{-1}	159.7	25.1
Total suspended solids	mg l^{-1}	65.9	13.8
Ammonia (LCK 303)	mg l^{-1}	28.1	11.8
Nitrate (LCK 339)	mg l^{-1}	3.1	1.1
Phosphorus (LCK 350)	mg l^{-1}	7.0	0.8
Conductivity	µS cm^{-1}	1319.3	82.1
Dissolved oxygen	mg l^{-1}	8.8	0.4
pH		7.9	0.1
Total coliforms	MPN/100mL	3.10E+05	1.60E+05
Escherichia coli	MPN/100mL	1.08E+05	0.8E+05
Enterococci	MPN/100mL	2.73E+04	1.72E+04

B. Cleaning procedures

Cleaning event tests were divided into two periods: a cleaning period (71 days) followed by a period without cleaning events (33 days) in order to study the interruption of these

treatments on biofilm regrowth. During the cleaning period, chlorination and pressure flushing were applied once a week for 1h.

Concerning the disinfection method, liquid sodium hypochlorite (NaOCl) with a residual chlorine concentration>9% was used for chlorination. NaOCl was added directly to the tank in order to reach 1.5 ppm of free chlorine at the outlet of the drip irrigation line. After running the system for 1h, the residual free chlorine concentration was tested every 10 min at the end of the drip irrigation lines using LCK 310 Hach reagents®. Depending on the measurements, NaOCl was added in the tanks to maintain the 1.5 ppm of free chlorine in the system.

The maximum working pressure used for the drippers (1 $l.h^{-1}$) was 0.25MPa according to the manufacturer's recommendations. However, the use of the transparent tubes around the dripper systems meant that this pressure rate could not be reached without damaging the system. Therefore, for lateral flushing procedures, the valves at the end of the drip-line were closed and the pressure was increased to 0.18MPa. The pressure was controlled using a manometer placed at the inlet of the dripline. After each cleaning event, RWW from the test bench was removed and replaced by new RWW.

C. Image acquisition and processing

1. Image acquisition

Optical coherence tomography (OCT) was used to study f biofilm kinetics inside the drippers, and along the milli-channel throughout the experimental period (Table 3) after 3 weeks of running. Measurements were made in situ and non-invasively through the transparent tube. For the measurements, dripper system valves were closed to keep the drippers in the water. The dripper system was then disconnected from the irrigation line. Measurements were taken at least once every two weeks. Due to the number of drippers, the monitoring of the 36 drippers (9 per lines) by OCT was carried out over one week. After the OCT measurement, each dripper was returned to its original location on the test bench. The three-dimensional OCT measurements were acquired using a Thorlabs GANYMEDE II OCT (LSM03 lens, axial resolution= 2.1 µm, lateral resolution= 8µm; Thorlabs GmbH, Lübeck, Germany). The size of the axial voxel in water (n = 1.333) of the GANYMEDE II is 2.1 µm. OCTs have a center wavelength of 930 nm.

Table 3 Analysis and sampling schedule. *: After one month, one dripper from the control line was totally clogged. After 29 days this dripper was sampled along with 3 randomly chosen ones. This explains why the number of drippers monitored and sampled at 104 days is lower than in the other conditions.

Date	Week				Sampling dates		
	Cleaning			No-cleaning	Cleaning		No-cleaning
	3	6	10	15	29	71	104
Number of drippers per condition (n=)	9	5*-6	5*-6	2*-3	4*-3	3	2*-3
Analyses	OCT (inlet, outlet & return areas)				OCT (inlet, outlet & return areas) & 16S rRNA sequencing		

2. Image analysis

OCT acquisition was performed in order to monitor biofouling development over time (volume and thickness) depending on the treatment used. First, 3-D OCT datasets were processed in Fiji (running on ImageJ version 1.50b, Schindelin et al. (2009)) and converted into 8-bit grayscale. The datasets were resliced from top to bottom into image stacks, and regions of interest (inlet, outlet and return areas) were selected (Figure S1 in Supplemental material). The remaining parts were allocated to the background (black). Secondly, an in-house code was used to detect the pixels associated with the plastic tube and removed using MATLAB R2018r (MathWorks ®, version 2018b). A threshold (adapted to each dataset) was applied to binarize the dataset and the region above the interface was quantified as biofilm. For each position (x, y), the pixels associated with the biofilm (up to the threshold) were summed (on z) to obtain biofilm thickness. The biofilm volume (mm^3) was calculated for each area according to Equation 4:

$$Volume\ of\ biofilm = \frac{V_{biofilm}}{V_{areas}} \quad (4)$$

where $V_{biofilm}$ is the biofilm volume and V_{areas} is the volume of the area of interest (inlet, outlet, return).

After the first visualisation of the data, an additional data-driven approach was used to enable biofilm quantification along the labyrinth, which was divided into two zones (around the edges/around the middle). Zones were created using a 'median split' procedure. Labyrinth width was determined for each x-step and divided by four in order to split the labyrinth into

two equivalent areas: i) the middle zone corresponds to the two central quarters, ii) the edge zone corresponds to the two side quarters summed (Figure S2 in Supplemental material).

D. Analysis of microbial communities

1. DNA extraction

DNA was extracted using the PowerWater® DNA Isolation Kit (Qiagen, Hilden, Germany). The samples (drippers or filters) were placed in 5 ml tubes containing beads. The manufacturer's instructions were then followed. The DNA concentration was measured and the purity checked by spectrophotometry (Infinite NanoQuant M200, Tecan, Austria). The extracted DNA was stored at -20°C.

2. Bacterial quantification by qPCR

Total bacterial quantification was performed by qPCR on biofilms taken from drippers targeting the V9 region from 16S rDNA. The amplification reactions were performed in triplicate, and for two dilutions to check for the absence of PCR reaction inhibition. Reaction mixes (12µl) contained 2.5µl of water, 6.5µl of Super Mix qPCR (Invitrogen), 100nM forward primer BAC338 (5'-ACTCCTACGGGAGGCAG-3'), 250nM of reverse primer BAC805 (5'-GACTACCAGGGTATCTAAT CC-3') and 50nM of probe BAC516 (Yakima Yellow – TGCCA GCAGC CGCGG TAATA C – TAMRA) (Yu et al., 2005). The cycling parameters were 2 min at 95 °C for pre-incubation of the DNA template, followed by 40 cycles at 95 °C for 15 sec for denaturation and 60 °C for 60 sec for annealing and amplification.

3. Illumina sequencing

The PCR amplified the V4-V5 region of 16S rRNA genes with 30 cycles (annealing temperature 65 °C) using the primers 515U (5′-GTGYCAGCMGCCGCGGTA-3′) and 928U (5′-CCCCGYCAATTCMTTTRAGT-3′) (Wang and Qian, 2009). A PCR amplified the 18S rRNA genes (30 cycles, annealing temperature 56 °C) was also performed using the primers 5'-GCGGTAATTCCAGCTCCAA-3' and 5'-TTGGCAAATGCTTTCGC-3' (Hadziavdic et al., 2014) on dripper biofilms at the end of the cleaning period. Adapters were added for multiplexing samples during the second sequencing amplification step. The resulting products were purified and loaded onto the Illumina MiSeq cartridge for sequencing of paired 300 bp reads according to the manufacturer's instructions (v3 chemistry). Sequencing and library preparation tasks were performed at the Genotoul Lifescience Network Genome and

Transcriptome Core Facility in Toulouse, France (get.genotoul.fr). Mothur (version 1.39.5) (Schloss et al., 2009) was used to associate forward and reverse sequences and clustering at four different nucleotides over the length of the amplicon. Uchime (Edgar et al., 2011) was used to identify and remove chimera. Sequences that appeared fewer than three times in the entire data set were removed. In all, 16S rRNA sequences were aligned using SILVA SSURef NR99 version 128 (Schloss et al., 2009). Finally, sequences with 97% similarity were sorted into operational taxonomic units (OTUs) (Nguyen et al., 2016). The chloroplast sequences from 16S rRNA sequences were removed from the raw data and represented respectively 2.8% and 16.6% of the sequences in biofilms and RWW samples. Finally, BLAST (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/) was used to locate publicly available sequences closely related to the sequences obtained from the samples. A total of 2,281,644 reads were grouped in 3210 OTUs at the 97% similarity level. The rarefaction curves indicated that the sequencing depths of all samples were satisfactory (Figure S3 in Supplementary material).

E. Statistical analyses

Non-parametric statistical tests (Kruskal and Wilcoxon tests) were performed to compare the biofilm volume and the biofilm distribution along the labyrinth depending on the treatment used. The Shannon diversity index, the reciprocal Simpson index, and the nonparametric richness estimator Chao1 were also calculated for each RWW and biofilm sample. Chao1 richness estimates were based on singletons and doubletons as described by Chao1 (Chao, 1984). Kruskal-Wallis tests were performed to compare indices of diversity and richness according to sample origin, and the biofouling rate between the drippers. To compare bacterial community structures, a dissimilarity matrix (Bray-Curtis) was performed and visualised using principal coordinate analysis (PCoA). A one-way analysis of similarities (ANOSIM) was used to identify significant differences in community assemblage structure between samples based on the origin of the sample (Clarke, 1993). The genera that contribute most to the divergence between two habitats were identified using Similarity Percentage (SIMPER) analysis (Clarke, 1993). The sequencing data analysis was processed under R v3.4 (www.r-project.org) through R-Studio (http://www.rstudio.com/) using the phyloseq package (McMurdie and Holmes, 2012).

III. RESULTS

Biofilm development kinetics under chlorination and pressure flushing treatments, either combined or used separately, were monitored for 71 days using OCT measurements and compared to each other as well as to non-treated controls. The drippers were collected after 29 and 71 days in order to characterise the effect of these treatments on the bacterial composition of the biofilms. After 71 days, the treatments were stopped, and drippers were subsequently analysed at day 104 to evaluate if the effects of the treatments were permanent or transitory.

A. Biofouling kinetic analysis

1. Dynamic changes for outflow ratio variation of drippers

Changes in discharge ratios (Dra) along the lateral are shown in Figure 2. Dra decreased mainly for control (C) and pressure flushing (PF) lines over time, reaching about 80% after 2 months. The Dra of the chlorinated lines (Cl and PFCl) was close to 100% after 2 months of treatment, meaning that chlorination offered better control of flow rates than purging alone. For the same treatment, the Dra sometimes increased between two measurements, which indicates that the dripper clogging can be temporary and that detachment can occur. In the control line, most drippers (7/9 after 71 days) had discharge velocity rates below 75% and one dripper was totally clogged after one month (no outflow). In the pressure line, 4/9 drippers were considered clogged after 71 days while none were clogged for chlorinated lines (chlorination alone or combined with pressure flushing). After 1 month, without any cleaning steps, the Dra from the C and PF lines increased but were still lower than the Dra from the chlorinated lines.

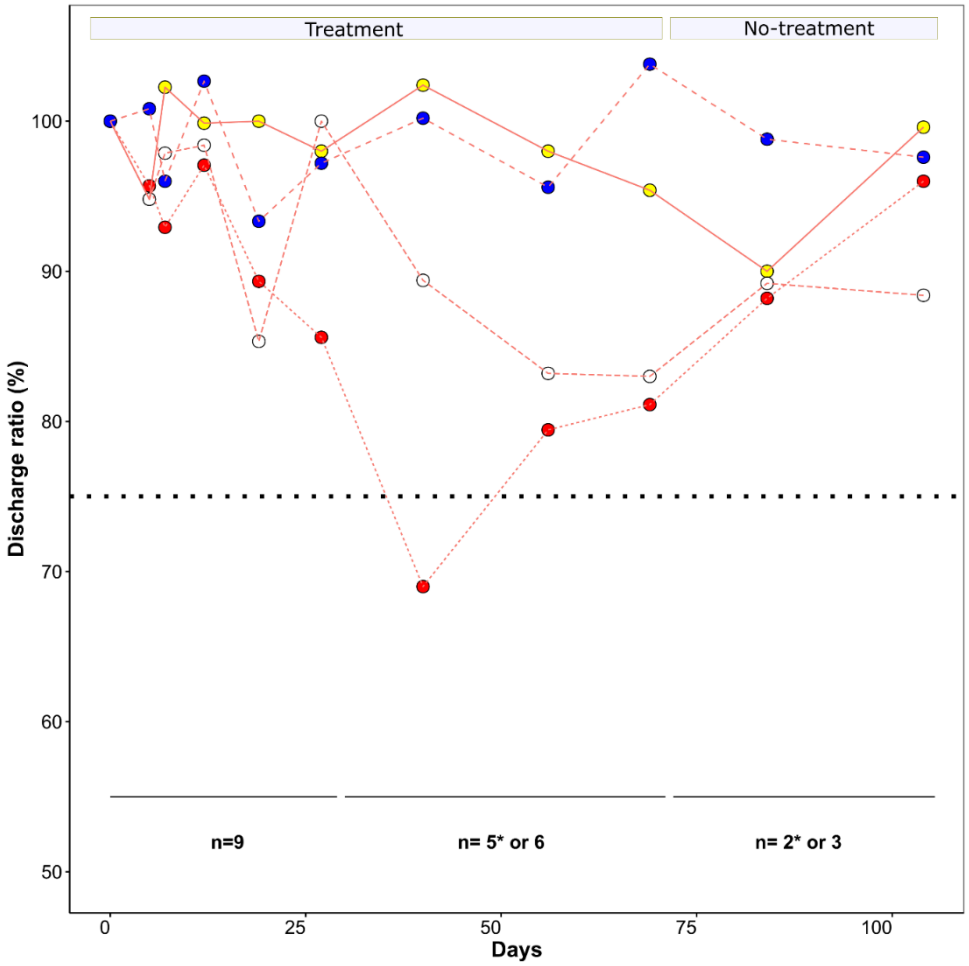


Figure 2 Discharge ratio variation according to the cleaning procedure used. Control (●), Pressure Flushing (○), Chlorination (●) and Pressure Flushing combined with Chlorination (●). The drippers were considered as clogged when the discharge was less than 75% (dotted line). n corresponds to the number of drippers for each line (* : data control line).

2. Chlorination combined with pressure flushing decreased biofouling

The volume and thickness of the biofilm were determined using OCT in channel areas most sensitive to fouling: the inlet, outlet and return zones.

Biofilm volumes increased during the cleaning phase (p-value <0.05, Figure 3). Although the average volume was lower in the PFCl condition after 10 weeks, there were no statistically significant differences between conditions, and this indicates that the treatments had no significant effect on the overall biofouling level. This may be due to significant variability between the triplicates. After one month, and without cleaning steps (at week 15), the mean biofouling volume increased in PF, Cl and PFCl conditions and volume was higher in the PF condition than in PFCl (p-value = 0.06) (Figure 3).

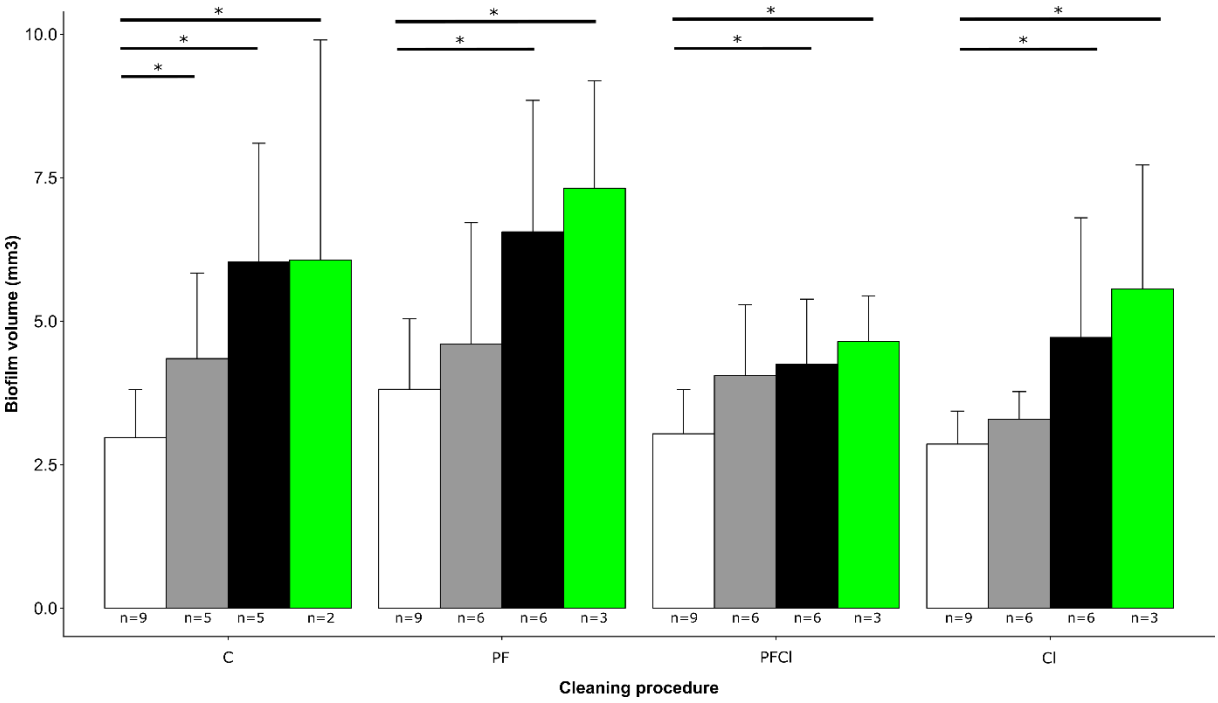


Figure 3 Changes in biofilm volume according to the cleaning method used (at weeks 3, 6, 10 (cleaning phase) and 15 (no-cleaning phase); white, grey, dark grey and green respectively). C= control, PF= Pressure flushing, PFCl= Pressure flushing combined with chlorination, Cl= Chlorination. n refers to the number of drippers. The biofouling volume was quantified as the sum of the fouling volumes developed for the inlet, return and outlet areas. * shows significant differences (p-value < 0.05) on the conover test.

The study of clogging volumes in the areas of interest shown that biofouling tended to be higher in the inlet areas, whatever the treatment concerned (Figure S4). Moreover, dripper outflow was negatively correlated to the increase in inlet biofouling volumes after 10 weeks (Pearson's test, r=-0.44, p<0.05), which may explain the decrease in Dra observed for lines C and PF (Figure 2).

Although overall biofilm volumes measured in drippers and sensitive areas were statistically similar over time between the cleaning methods, the biofilm thickness was significantly influenced by the type of treatment used. Figure 3 shows an increase in biofouling thickness in the inlet areas during the cleaning period at weeks 3, 10 and 15. The channel inlet was the most sensitive area, in particular in the first baffle (p-value <0.05) where the average thickness increased by more than 0.5 mm (depth of the channel: 0.8 mm). Biofouling of the C drippers increased along the labyrinth, but did not exceed 0.3-0.4 mm (Figure 4). OCT images showed that biofouling thickness decreased mainly: in the middle of the channel when chlorination was

applied (Cl and PFCl lines), at the inlet (Figure 4), outlet (Figure S5) and close to the return area (Figure S6) when compared to C and PF lines.

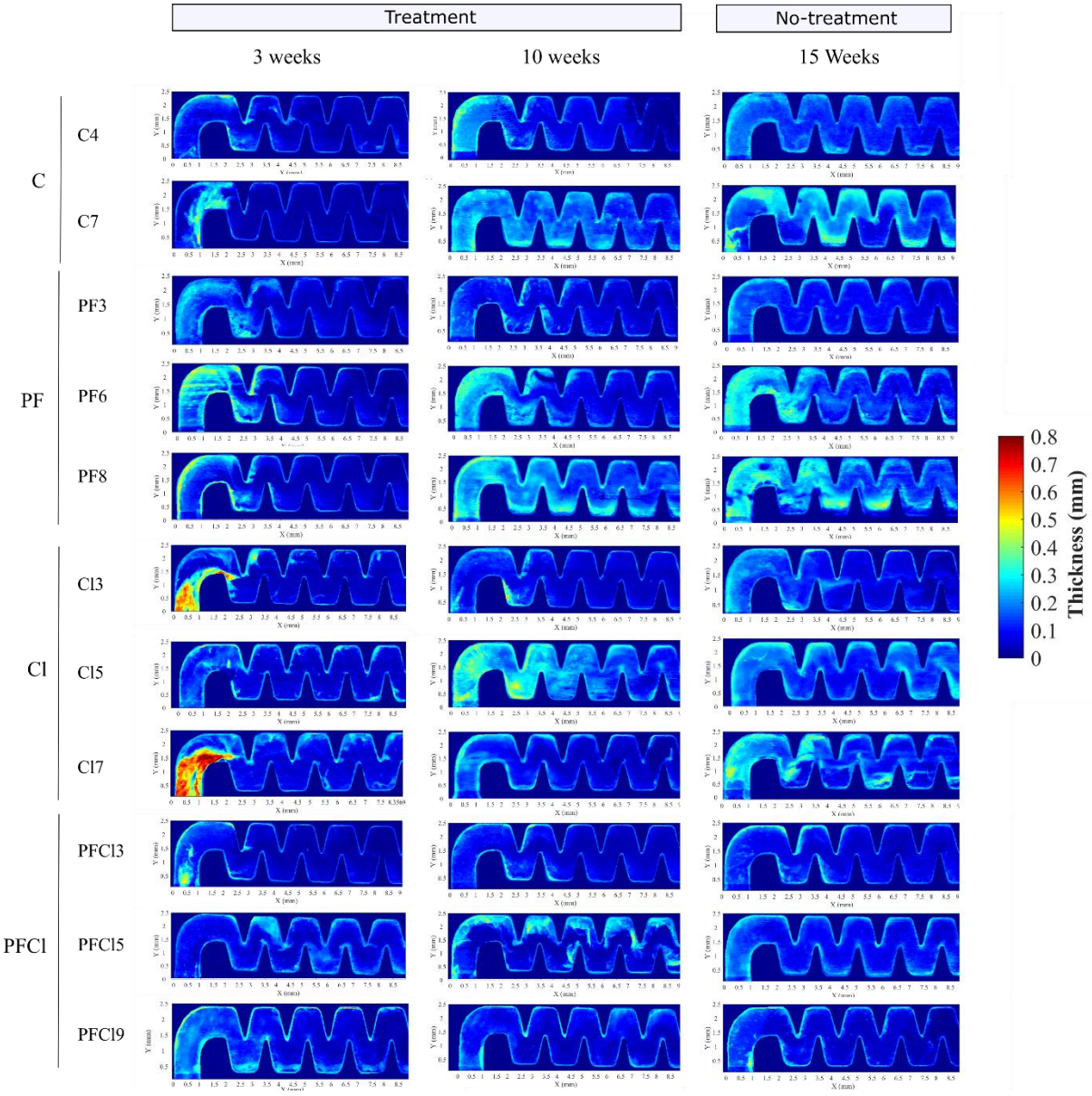


Figure 4 Biofilm thickness at the inlet of drippers under C (Control), PF (Pressure flushing), Cl (Chlorination) and PFCl (Pressure flushing/Chlorination) conditions measured after 3, 10 and 15 weeks. The drippers presented are those also analysed by high-throughput sequencing at 104 days.

To further explore differences in biofilm locations according to conditions, the inlet area was divided along the labyrinth into 2 parts: the middle and the edges. The number of pixels associated with biofouling was then determined for each of these areas. Figure 5 shows the mean pixel quantity for biofouling along the inlet channel in the middle, and along the edges at

the end of the cleaning step (10 weeks). When chlorination was combined with pressure flushing (PFCl), the number of pixels associated with biofouling along the inlet channel was statistically lower in the middle and close to the edges compared to the C, PF and Cl lines. Biofouling rates tended to be lower in the middle part than in the edge part. After 1 month without cleaning events, the number of pixels associated with biofouling along the inlet channel was similar in the middle and on the edges for all tested conditions (Figure S7). This means that the use of chlorination combined with increasing pressure, affected the location of the biofilm (edges or middle zone) rather than the overall amount of biofouling in the inlet zone. Moreover, this means that the combination of chlorination and pressure flushing was more efficient than chlorination alone at limiting biofilm growth.

For some chlorinated drippers (Cl3, Cl7), biofilm thickness between the 19th and 71st days decreased around the first inlet baffle, suggesting that some detachment of biofilm occurred (Figure 4).

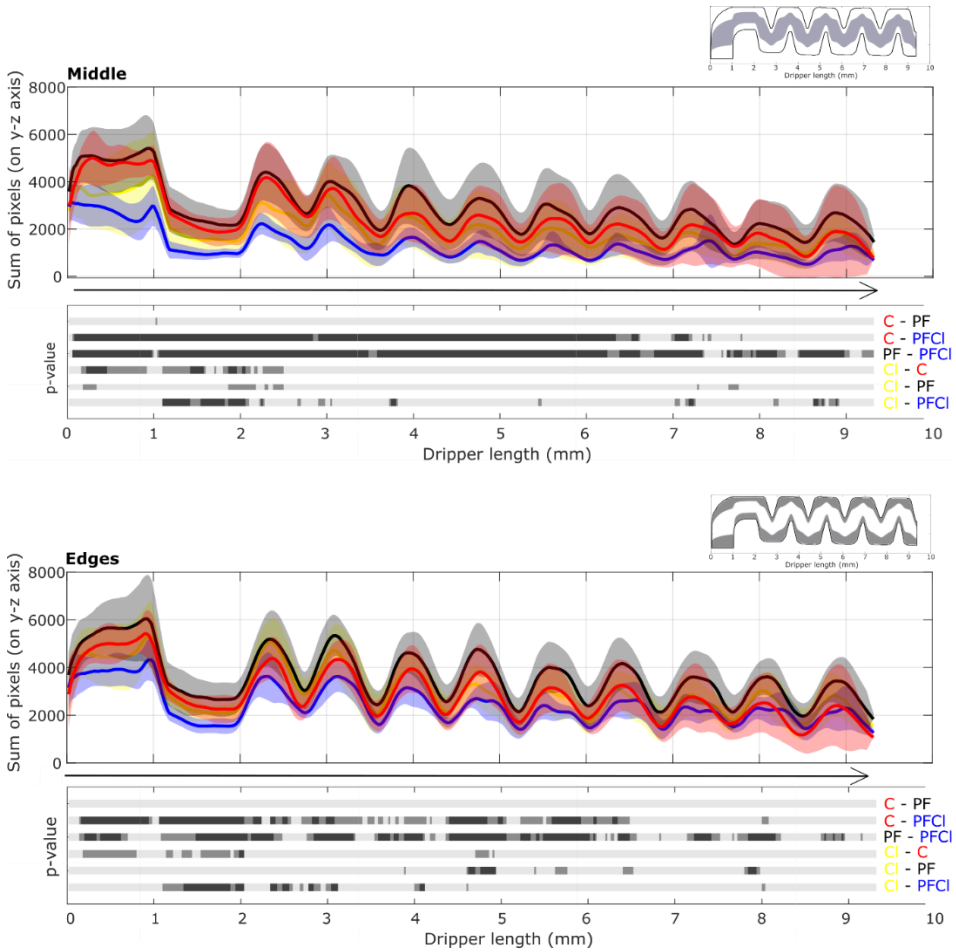


Figure 5 Means and standard deviation of pixels associated with biofouling in the middle and on the edges of the inlet dripper channel after 10 weeks of treatment. For each position of x, pixels in y-z are summed. Grey areas on inlet schemes at right-top indicate the zone of interest. Control (C-●),

Pressure flushing (PF-●), Chlorination (Cl-●) and Pressure flushing combined with Chlorination (PFCl-●); the arrow indicates the direction of the flow along the channel; n=6 per condition.. P-value graphs show the results of the Wilcoxon tests with ■: non-significant, ■: $p<0.1$, ■: $p<0.05$.

3. Biofouling level and bacterial quantification

The quantity of bacterial cells in the drippers during the cleaning period was between 10^9 and 10^{10} copies of 16S rDNA at 29 days and between 10^{10} and 10^{11} copies at 71 days (Figure 6A) (background level of 10^3 copies of 16S rDNA at t0). The number of copies of 16S rDNA increased significantly between days 29 and 71 for the C, PF and PFCl conditions (p-value<0.05), but not for the Cl condition (p-value>0.05). At 29 days, the number of copies of 16S rDNA in the control (C) and Cl conditions were higher than in the PFCl condition (p-value <0.05). At 71 days, the number of copies of 16S rDNA remained higher in the C condition than in the PFCl condition, which means that the combination of chlorination and pressure flushing reduced the number of bacteria more efficiently than pressure flushing (PF) or chlorination alone (Cl). Regardless of the protocol studied, the fouling level given by the volume of biofilm was positively correlated to the number of bacteria recorded during the cleaning period (Pearson's test, r=0.66) at 71 days, meaning that the number of bacteria in the dripper increased along with biofouling (Figure 6B).

After one month without cleaning events, the number of copies of 16S rDNA was similar to that recorded at the end of the cleaning period for each condition and concentrations remained higher in the C and PF conditions when compared with the PFCl condition.

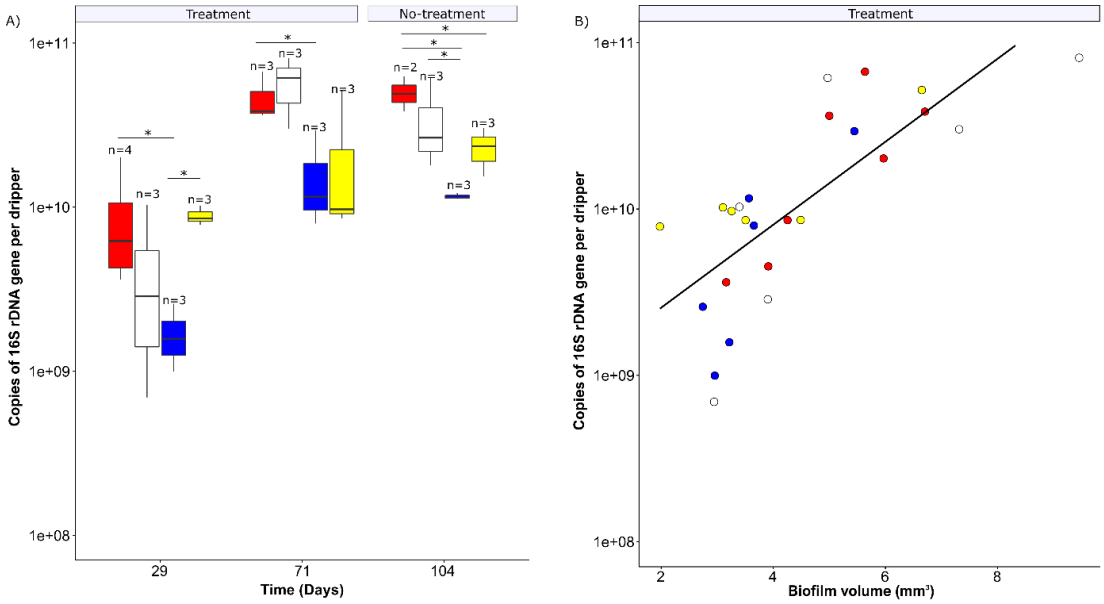


Figure 6 Evolution of the bacterial quantity by dripper according to the cleaning method used (left) and the biofilm volume (right). Control (●), Pressure flushing (○), Chlorination (●) and Pressure flushing combined with Chlorination (●). The biofouling volume was quantified as the sum of the fouling at the inlet, return and outlet areas. * indicates significant differences (conover-test, p-value < 0.05).

B. Bacterial Community Structure Analysis

The bacterial communities in dripper biofilms collected after 29 and 71 days were compared using 16S rDNA Illumina sequencing to evaluate the treatment effects. They were also compared with the communities present in reclaimed wastewater used to supply the dripper systems and renewed every week. After 71 days, treatments were stopped and biofilms were sampled again at 104 days to investigate the resilience of the communities, i.e. to test if the biofilms would then become closer to those estimated for the control condition.

1. Structure of bacterial communities

During the cleaning period, community richness increased significantly between 29 days and 71 days in conjunction with the biofouling level for all conditions (Table 4, conover test, p-value<0.05). The diversity indices remained similar (conover test, p-value>0.05) except for the Cl condition where the diversity indices increased after 71 days.

The richness and diversity indices for the C and PF conditions were higher than in both chlorinated conditions (Cl and PFCl) at 29 days and 71 days (Table 4) indicating that the structure of the bacterial community was impacted by the treatment used. After the cleaning period (104 days), the richness and diversity indices were similar between the drippers of the

different lines. However, community richness had increased in the Cl and PFCl lines while it remained stable in the C and PF lines. The Shannon index increased in the PF, Cl and PFCl conditions and was statistically higher than in the control (C) condition. In addition, the 1/Simpson's index for the C line decreased from 71 days to 104 days.

Table 4 Richness and diversity indices according to the cleaning method

			Richness indices		Diversity indices	
Period	**Day**	**Methods**	**Observed**	**Chao1**	**Shannon**	**1/Simpson**
Treatment period	29	C (n=4)	478 ± 59^{a}	642 ± 53^{a}	4.6 ± 0.1^{a}	47.8 ± 1.9^{a}
		PF (n=3)	469 ± 17^{a}	677 ± 85^{a}	4.6 ± 0.1^{a}	50.9 ± 4^{a}
		PFCl (n=3)	443 ± 34^{a}	549 ± 30^{bc}	4.1 ± 0.2^{bc}	18 ± 6.1^{b}
		Cl (n=3)	309 ± 49^{a}	441 ± 53^{b}	3.4 ± 0.1^{c}	11.4 ± 1.2^{b}
	71	C (n=3)	597 ± 46^{a}	851 ± 40^{a}	4.9 ± 0.1^{a}	59.9 ± 7.2^{a}
		PF (n=3)	572 ± 41^{a}	786 ± 8^{a}	4.7 ± 0.1^{a}	45.8 ± 8.3^{a}
		PFCl (n=3)	520 ± 37^{ab}	698 ± 49^{bc}	4.2 ± 0.1^{b}	18.9 ± 4.6^{b}
		Cl (n=3)	408 ± 85^{b}	578 ± 147^{b}	4.2 ± 0.1^{b}	26.0 ± 2.5^{b}
No treatment period	104	C (n=2)	512 ± 83^{a}	751 ± 133^{a}	4.4 ± 0.1^{a}	26.9 ± 4.5^{a}
		PF (n=3)	665 ± 103^{a}	924 ± 159^{a}	5.1 ± 0.1^{b}	63.3 ± 4.3^{b}
		PFCl (n=3)	741 ± 52^{a}	946 ± 73^{a}	5.0 ± 0.1^{bc}	48.7 ± 10^{ab}
		Cl (n=3)	678 ± 49^{a}	938 ± 91^{a}	4.8 ± 0.1^{c}	32.9 ± 6.3^{a}
RWW (n=9)			501 ± 67	671 ± 81	4.5 ± 0.3	36.3 ± 15.2

Kruskal tests and the conover ad hoc test were performed for each sampling time; the letters show the results of the conover test.

PCoA confirmed that the bacterial community changed depending on the cleaning method used, and over time (Figure 7). Both the cleaning method and time were significant factors that help explain the differences in community structure ($p<0.05$, Adonis). Pressure flushing, when compared to the control condition, had no effect on the bacterial community structure. This was also true for pressure flushing combined with chlorination (when compared to chlorination alone). Thus, during the cleaning period, bacterial population clustering was correlated to the use of chlorine (Adonis, $p<0.05$, $R^2_{29\ days}=0.58$ and $R^2_{71\ days}= 0.68$). At 29 days, the bacterial populations from the C dripper biofilms were significantly different from the Cl and PFCl dripper biofilms (Adonis, $p<0.05$, $R^2_{C\text{-}Cl}=0.73$ and $R^2_{C\text{-}PFCl}=0.72$ respectively). After

1 month without cleaning events, clustering, linked to the use of chlorine, was maintained (Adonis, $p<0.05$, $R^2_{104\ days}=0.46$) but there was no statistical difference between the chlorinated and non-chlorinated conditions (Adonis, $p>0.05$).

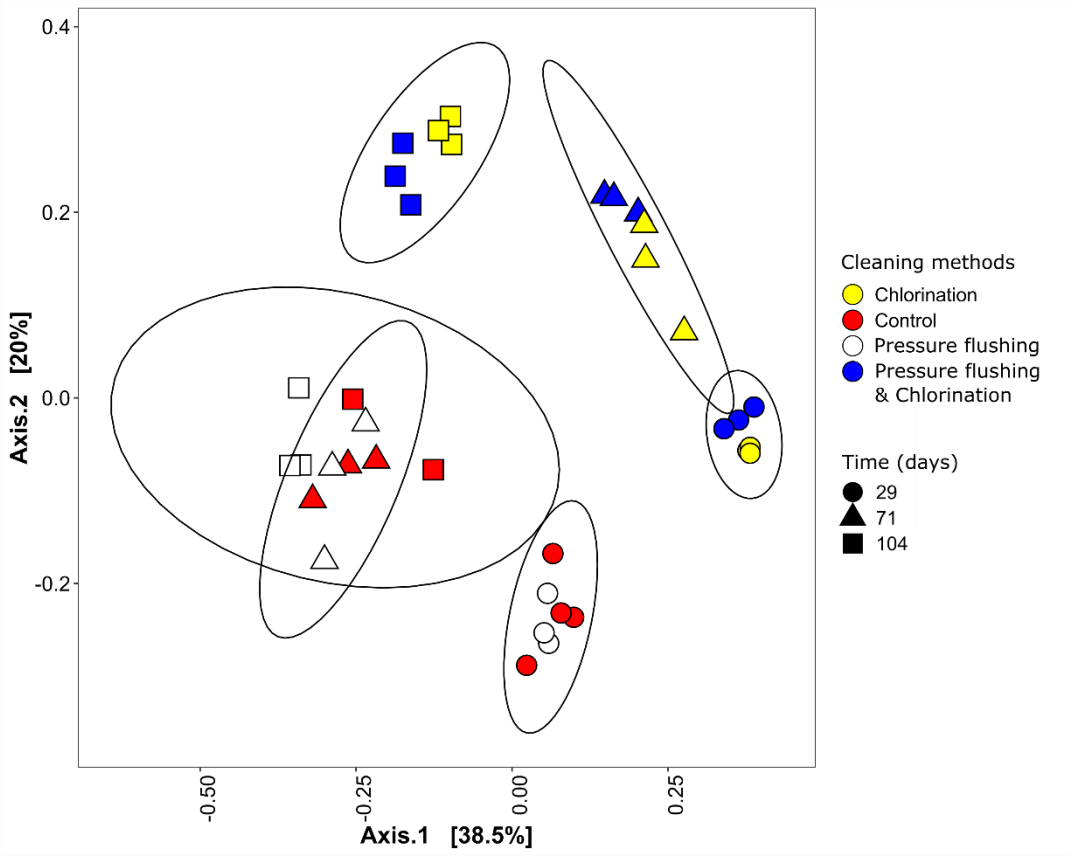


Figure 7 Principal coordinate analysis (PCoA) of microbial communities from dripper biofilms at genus level. The ellipsoids represent the 95% cut off similarity levels among samples.

2. Composition of bacterial communities in RWW and dripper biofilms

Biofilms and RWW microbiomes were both dominated by Proteobacteria (mainly β- and γ-Proteobacteria), Bacteroidetes, Actinobacteria and Firmicutes (Figure 8A and 8B). However, some phyla were more abundant in RWW, and other, more specific to biofilms. Acidobacteria were mainly detected in samples of dripper biofilms whereas Actinobacteria and Verrucomicrobia phyla were more abundant in RWW samples. In addition, the relative abundance of the Spirochaetes phylum increased over time in the dripper biofilms, but represented less 1% of the overall RWW bacterial community. This means that the dripper environment induced bacterial selection. From 70 days onwards the Synergistetes phylum appeared in RWW, explaining its increase in two drippers sampled at 104 days. This means

that RWW bacterial composition dynamics have an effect on the bacterial community found in dripper biofilms.

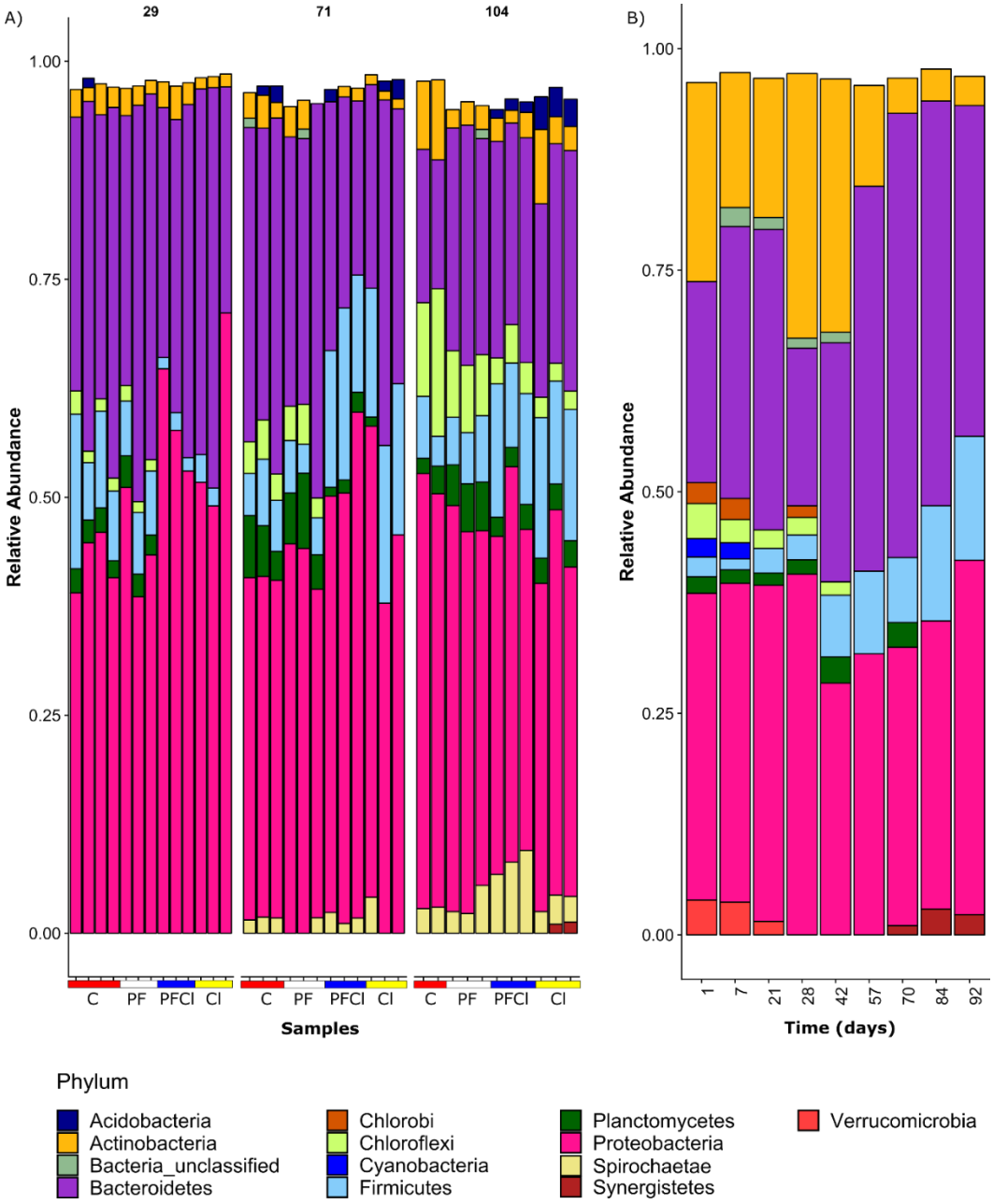


Figure 8 Relative abundance of bacterial phyla (>1%) in dripper biofilms over time (A) and in reclaimed wastewater (B).

Both the chlorination and pressure flushing methods modified bacterial community structure and composition. The relative abundance of Proteobacteria phylum was higher in chlorinated biofilms over time (Kruskal-test, $p<0.05$), while the relative abundance of Chloroflexi and

Planctomycetes was lower (Kruskal-test, $p < 0.05$). Indeed, Chloroflexi and Planctomycetes phyla were under-represented (<1% of the global community) in the biofilms sampled on the chlorinated lines when compared to those recorded in non-chlorinated biofilms during the cleaning period (Figure 8A). These phyla were once more detectable in the 104 days samples once the treatment was stopped, but were still less dominant than in the non-chlorinated lines (mean relative abundances: 14% and 7% in C and PF respectively against 2% and 4% in Cl and PFCl respectively). This means that chlorination induced a bacterial selection and, although sensitive bacteria were able to grow again in the biofilm, chlorination effects on the communities persisted 1 month after the treatments were stopped. Thus, the composition of the bacterial community found in the biofilms was principally governed by two factors: the dynamics of the RWW bacterial composition and the selection of some adapted taxa able to cope with chlorination.

As suggested with Figure 7, the bacterial composition profiles of C and PF dripper biofilms were similar and dominated by the same genera as members of Comamonadaceae family, *Dechloromonas*, env.OPS_17 group at 29 days and *Terrimonas*, *Dechloromonas* and *Denitratisoma* at 71 days (Table S1). In addition, the SIMPER analysis showed that there were very few genera that revealed any significant differences between the structure of C and PF communities (Figure S8), which confirmed that the bacterial structure and composition were similar between C and PF dripper biofilms. There were also few differences between the Cl and PFCl conditions (Table S1), indicating that chlorination was mainly responsible for the bacterial composition, as suggested in Figure 7.

The phyla whose abundance was most affected by the treatments were studied at family and genus levels in the dripper biofilms. Proteobacteria were mainly composed of β-Proteobacteria, followed by γ-Proteobacteria, δ-Proteobacteria and α-Proteobacteria. Relative abundances of β-Proteobacteria and α-Proteobacteria were statistically higher in chlorinated biofilms (Cl and PFCl, Kruskal test, $p < 0.05$) while γ-Proteobacteria were not impacted by the cleaning method used (Kruskal test, $p > 0.05$). Inversely, δ-Proteobacteria were statistically higher in non-chlorinated drippers (C and PF) with 2% against <1% recorded for chlorinated drippers (Cl and PFCl). Among the β-Proteobacteria and α-Proteobacteria, the Comamonadaceae family members, *Azospira*, Sphingomonadaceae, *Caulobacter* and *Hyphomicrobium* (α-Proteobacteria) were more abundant in chlorinated biofilms (Kruskal test, $p<0.05$) whereas others were more abundant in the C and PF such as *Denitratisoma* and *Aquabacterium* (Kruskal test, $p<0.05$) (Figure 9, Table S1). SIMPER analysis indicated that

Azospira, and an unclassified genus from *Comamonadaceae*, were the main genera responsible for bacterial community clustering depending on the use of chlorination (Figure S8) during the cleaning period. The genus *Pseudoxanthomonas* (γ-Proteobacteria) was more abundant in Cl and PFCl (3–6%) conditions compared to C and PF conditions (<1%) whereas the Run-SP154_ge was more abundant in non-chlorinated drippers (C and PF).

The relative abundance of Firmicutes (dominated by Clostridia class) were significantly higher in chlorinated biofilm compared to non–chlorinated biofilm (Kruskal-test, $p<0.05$) at 71 days (4–6% in C-PF against 16–17% in Cl and PFCl respectively, Figure 8A). Moreover, *Fusibacter* genus (Clostridia class) drove the separation of the bacterial community structure according to the use of chlorine (Figure S8).

Chloroflexi (mainly composed of one Anaerolineaceae member's family, *Leptolinea*, Choroflexi SBR2076 and SJA-15 group) and Planctomycetes phylum (mainly comprised of the OM190 group, *Planctomyces* and *Schlesneria* genera) were significantly less abundant in the chlorinated biofilms (Cl and PFCl) during the treatment period (Figure 8A).

3. Composition of eucaryotic communities in dripper biofilms

At the end of the cleaning period, the 18S rRNA sequence analysis also showed a treatment-related effect on the structure and composition of the eukaryotic communities (Figure S9). The Ciliophora and Fungi classes were the most heavily represented. Among the Ciliophora class, the family Tokophryidae was mainly present in the biofilms of non-chlorinated drippers, while the families Vorticellidae and Peritrichia were mainly present in chlorinated dripper biofilms. The fungi, which was dominated by the Dothideomycetes or Pezizomycotina families, were less present in chlorinated drippers whereas the Sordariomycetes family was mainly present in chlorinated biofilms.

4. Impact of the interruption of the cleaning method on the bacterial community composition

SIMPER analysis at 104 days showed that there was no difference between C and the other conditions (Table S8), which confirmed that bacterial communities converged (Figure 7) when the treatments were stopped.

Chloroflexi and Planctomycetes phyla increased in chlorinated dripper biofilms from Cl and PFCl lines once chlorination was stopped (Figure 8A). The genera and taxonomic groups belonging to Chloroflexi such as the Anaerolineaceae family members: *Leptolinea*, SBR2076

and SJA-15 groups settled in chlorinated dripper biofilms. Other minor bacterial families in chlorinated drippers sampled during the cleaning period re-emerged such as Saprospiraceae (Bacteroidetes), Spirochaetaceae (Spirochaetae), Christensenellaceae (Firmicutes) and Hydrogenophilaceae (β-Proteobacteria) at similar levels found in biofilms from non-chlorinated drippers (Figure 9). Inversely, the relative abundance of the main genera from chlorinated biofilm during the cleaning period decreased such as Azospira, *Flavobacterium* and *Cloacibacterium* (Figure 9).

A shift was observed in the bacterial compositions from the C drippers at 104 days compared to 71 days, mainly due to an increase in the relative abundances of Chloroflexi (from 3% to 14%) and Actinobacteria (from 3 to 8.5%), which were higher than those recorded in the other conditions (p-value <0.05). On the contrary, the relative abundance of Bacteroidetes phylum (represented by *Terrimonas* genus) decreased from 37% to 16%. The dominant genera previously found during the cleaning period increased such as *Dechloromonas* and *Aquabacterium* (β-Proteobacteria) (p-value> 0.05), which could explain the decrease in 1/Simpson's index observed (Table 4). The relative abundances of Chloroflexi, mainly composed of Anaerolineaceae family members, and Actinobacteria, were higher in the C condition than in the others.

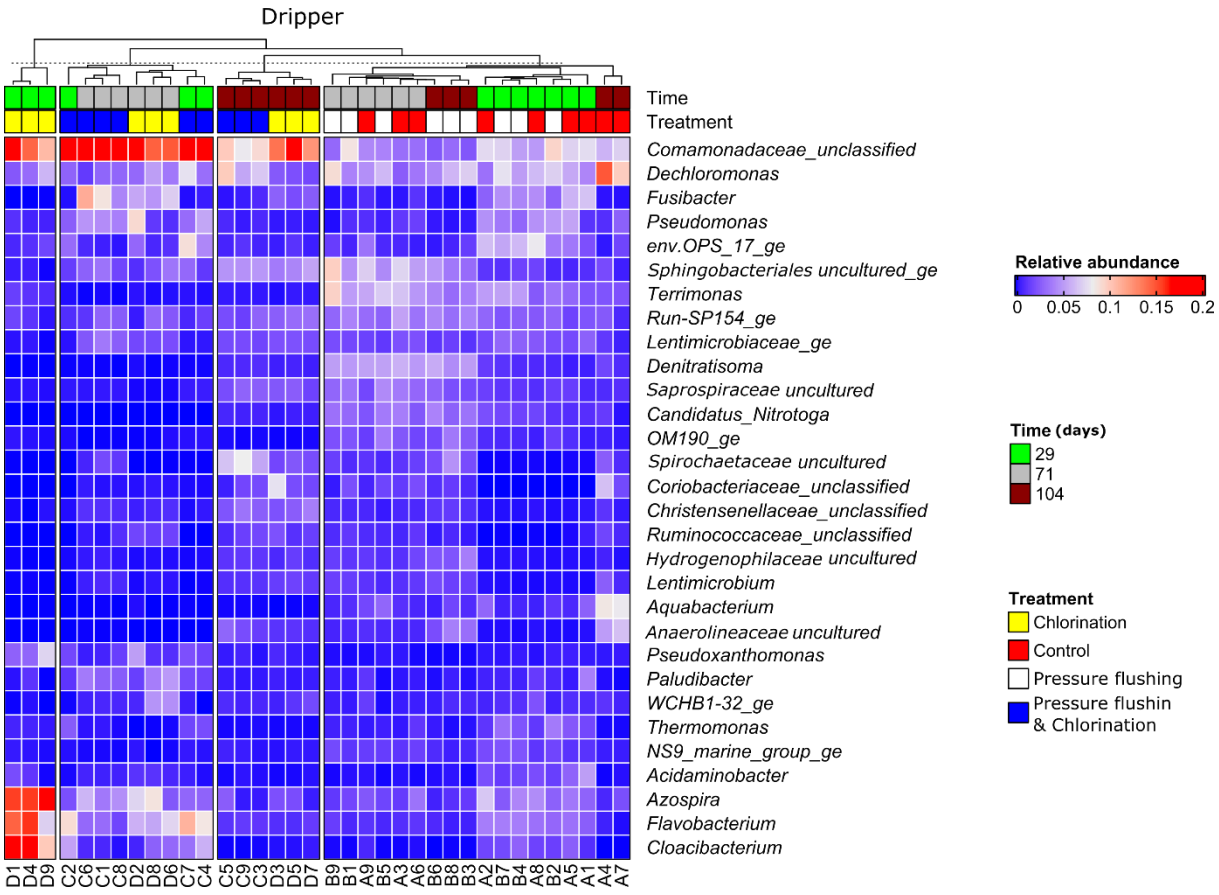


Figure 9 Heat map of bacterial genera from dripper biofilms. Genera with the top 30 relative abundance are shown.

IV. DISCUSSION

In this study, the effects on biological clogging and microbial communities, resulting from different cleaning methods (chlorination (Cl), pressure flushing (PF), and a combination of both methods (PFCl)), were investigated. Commercial flat drippers (1 $l.h^{-1}$) used in agriculture were installed on a test bench and fed with reclaimed wastewater. After a 2-month period of treatments, cleaning events were interrupted in order to study the impact on biofouling regrowth and bacterial communities.

Chlorination but not purge-only treatment helped to maintain flow rates

The effectiveness of cleaning methods is often looked at from the perspective of flow maintenance (Feng et al., 2018; Han et al., 2018; Song et al., 2017). Chlorination (1.5 ppm), alone or in combination with pressure flushing (Cl and PFCl), maintained flow rates and reduced distribution heterogeneity throughout the cleaning period. Conversely, the uniformity of water distribution decreased over time under non-chlorinated conditions (C and PF), which

means that chlorination use is preferable in order to maintain expected flow rates. Chlorination results were consistent with those of J. Li et al. (2010) who showed that chlorinating (2.5 ppm of free chlorine) once a week, maintained the expected dripper flow rates supplied by reclaimed wastewater for a longer period of time. However, the impact of pressure flushing is not consistent with Yu et al. (2018) who showed that increasing the pressure from 0.1MPa to 0.3MPa for 2 minutes helped maintain the expected flow rates for longer periods by removing large particles (<6.6 µm in diameter). The pressure increases used in our experimental work may not have been sufficient to promote a detachment of biofilm and maintain flow rates. However, biofilm is considered to be an elastically deformable, but quasi-static structure that enables it to deal with an increase in pressure and flow velocity (Picioreanu et al., 2018). For instance, Li et al. (2015) showed that EPS concentrations found in dripper biofilms were higher when purging was performed once rather than twice a week. This suggests that purging too often does not optimally reduce biofilm development. Moreover, Zhang et al. (2020) showed that lateral flushing changes deposit biomass and the microbial environment rather than the attached biomass, which may explain the nonsignificant effect of purging on biofilms.

Biofilms can also increase pressure loss due to friction along the labyrinth (Li et al., 2016): the biofilm formed in the labyrinth increases roughness, which in turn increases friction, resulting in increased flow resistance, and thus increased the pressure loss with a consequent decrease in distribution uniformity.

Impact of the cleaning procedures on biofouling

Purging had no impact on bacterial concentrations and biofouling (volume, thickness). A recent study showed that flushing (1h per day) with reclaimed wastewater is not effective at limiting dripper clogging when compared to freshwater flushing due to the presence of suspended solids and other organic compounds (N. Li et al., 2019). Thus, the use of freshwater could offer a solution to improve the efficiency of the pressure flushing method. However, in the case of field irrigation with treated wastewater, it is not always possible to have access to a second water resource.

Conversely, the level of biofouling and bacterial concentrations in the chlorinated lines (Cl and PFCl), mainly in the PFCl line, tended to decrease when compared to those observed for non-chlorinated lines. The combination of pressure flushing and chlorination seemed to offer a better control of biofouling than chlorination alone. This decrease was mainly due to a significant decrease in biofouling in the middle of the channel, where flow velocity was higher (Ait-

Mouheb et al., 2018; Al-Muhammad et al., 2016; Yu et al., 2018a). Increasing the flow velocity by increasing the pressure favours mass transfer (Beyenal and Lewandowski, 2002; Moreira et al., 2013) and influences mixing (Khaydarov et al., 2018; Naher et al., 2011). Mathieu et al. (2014) showed using a rotating disc reactor that the shear stress and cohesive force necessary to detach biofilm decreased after chlorine application (10 ppm during 1h). This is probably due to the breaking of the hydrogen bond, as well as polymer and hydrophobic interactions, caused by chlorine (Xue and Seo, 2013), thus weakening the biofilm and makes it easier to detach. Therefore, chlorine mass transfer caused by hydrodynamic conditions in the main flow zones (middle of the milli-channel) may explain why the biofouling level was lower under PFCl conditions than in C and PF conditions in the middle and corners of the channel, and why bacterial concentrations were lower under this condition.

However, the combination of the two methods did not completely stifle the development of biofouling. One explanation is that the increase in the PFCl condition favours the biofilm compaction, and the resistance of the basal layer in the central and corner areas (Blauert et al., 2015; Rochex et al., 2008; Valladares Linares et al., 2016; Wagner and Horn, 2017), which reduced the chlorine effect (Lee et al., 2018). Lee et al. (2018) showed that the free chlorine penetration at 10 ppm of Cl_2 was low in a biofilm of 2000 µm (7 days to reach the substratum) and tended to promote the sloughing off of the superficial layers of the biofilm. Thus, the concentration of free chlorine used (1.5 ppm) may be insufficient to reduce the level of clogging, especially in corner areas where biofilm thickness was higher. However, studies have shown that the long-term use of a high-concentration of chlorine can have more significant adverse effects on soil health than for the lower ones (Song et al., 2019). Further studies on chlorine transfer, whether combined or not with a purge, while taking into account agricultural practices and soil health, are needed to find cleaning strategies, which are efficient and with limited environmental impacts.

Chlorination strongly modified microbial communities in biofilms

In this study, total bacteria, diversity and richness indices in conjunction with the level of clogging.

Bacterial diversity was lower in chlorinated conditions compared to those of the control and pressure flushing lines. The bacterial diversity of biofilms found in drinking water distribution pipes was also previously shown to decrease with the increasing concentration of chlorine (0.05 to 1.76 ppm) (Fish and Boxall, 2018; Mi et al., 2015).

Pressure flushing had no impact on the bacterial community when f compared with the non-treated control line, which is consistent with Li et al. (2015) who studied the microbial composition of biofilms using PLFA analysis. On the other hand, the use of chlorine, whether combined or not with pressure flushing, has significantly altered the structure of the bacterial community during the cleaning step. Proteobacteria and Firmicutes phyla appeared to contain bacterial members resistant to chlorine treatment whereas Chloroflexi phylum appeared to be sensitive to chlorine, which is consistent with Song et al. (2019). Chloroflexi phylum includes many filamentous bacteria such as Anaerolineaceae member's family and *Leptolinea* genus detected in sequencing data and responsible for clogging membrane bioreactors in wastewater treatment plants (Li et al., 2008) and drippers supplied by RWW (Lequette et al., 2019). Chloroflexi may have a key role in the dripper clogging.

Chlorinated dripper biofilms were largely dominated by OTUs belonging to the Comamonadaceae family (β-Proteobacteria), followed by *Flavobacterium* (Bacteroidetes), *Pseudomonas* and *Pseudoxanthomonas* genera (γ-Proteobacteria). β-Proteobacteria are frequently found in chlorinated drinking distribution systems and wastewater biofilms (Douterelo et al., 2016; Navarro et al., 2016; Shaw et al., 2014), and their abundance can increase in conjunction with the chlorine concentration (Wang et al., 2019b). The Comamonadaceae family was commonly found in water and chlorinated biofilms (Wang et al., 2019a; Zhang et al., 2019). *Pseudomonas* and *Hydrogenophaga* (Comamonadaceae) are known to exhibit resistance to disinfection (Jia et al., 2015; Wang et al., 2019a). Increases in relative abundance of *Pseudomonas* have been observed in water samples after chlorination (Jia et al., 2015) and *Hydrogenophaga* are known to colonise chlorinated distribution pipes fed with reclaimed wastewater (Wang et al., 2019b).

Firmicutes predominated in the chlorinated drippers after 2 months of treatment. At the class level, the bacterial community was mainly composed of Clostridia (abundance between 10 and 14%), which includes many members capable of producing endospores. These endospores are highly resistant to a variety of environmental challenges, such as heat, solvents, oxidising agents, UV irradiation and desiccation (Abecasis et al., 2013). The resilience of endospores allows them to remain viable in a hostile environment for long periods of time, and contributes to their survival and proliferation in chlorinated environments (Douterelo et al., 2016).

The eukaryotic communities, which are mainly composed of Ciliophora and Fungi, were also influenced by chlorine use. Sordariomycetes, Tremellomycetes and Chytridiomycetes were still

present in chlorinated biofilms, while Dothideomycetes or Pezizomycotina were only recovered in control and purge drippers. Sordariomycetes, Tremellomycetes and Chytridiomycetes are commonly found in the effluent of wastewater treatment plants and are associated with water treatment (Assress et al., 2019). Sordariomycetes has also been detected, and deemed to be dominant, in biofilms found in drinking water distribution systems (0.05 ppm to 0.8 ppm of free chlorine) (Fish and Boxall, 2018). These results suggest that among fungi, some are more tolerant to chemical disinfection. The resistance to chemical disinfection of some fungi can be explained by their thick melanized cell walls, which increases resistance to mechanical damage and restricts intrusion of biocides into the cell (Hageskal et al., 2012), or may be due to their ability to form spores (Sonigo et al., 2011). Ciliophora were affected by chlorine use, with chlorine-sensitive families (e.g. Tokophryidae), whereas others were still present in chlorinated drippers (e.g. Vorticellidae). Ciliophora contains bacteria predators that can significantly reduce bacteria concentrations (Parry et al., 2007) and influences biofilm morphology (Böhme et al., 2009; Derlon et al., 2012). Although eukaryotic communities found in dripper biofilms are poorly studied, their role in biofilm development and resistance to cleaning processes may be important, and must be integrated in biofilm control studies. In addition, the microbiome of reclaimed water evolves over time, and depends on the treatment used. For this reason, additional studies to investigate the effect of the wastewater treatment (i.e. activated sludge, membrane bioreactor) as well as the role of bacterial predators on the microbial composition of a biofilm should be performed.

Resilience of microbial communities once treatments are stopped

1 month after the stoppage of cleaning events, several bacterial families, deemed to be chlorine-sensitive, re-emerged such as Saprospiraceae, Spirochaetaceae, Christensenellaceae and Hydrogenophilaceae at levels similar to those measured in biofilms from non-chlorinated drippers. The relative abundance of Chloroflexi phylum also increased significantly after this period. Bacteria concentration, diversity and richness indexes also increased. This suggests that treatment stoppage reduces selection pressure and makes it easier to recruit new species. Fish and Boxall (2018) obtained a similar result for biofilm development in drinking water distribution systems, and this would explain the increase in dripper clogging after the interruption of chlorination observed by Katz et al. (2014) (10 ppm of free chlorine). This also illustrates the resilience of the bacterial community in its ability to deal with chlorine used (Allison and Martiny, 2009) in a drip irrigation system. However, PCoA analyses showed that

the drippers in the chlorinated lines still form a different bacterial cluster than non-chlorinated lines 1 month after treatment stoppage, which shows that the treatment, although finished, has residual effects on the structure of the communities, and that resilience was only partial.

V. CONCLUSION

The combined use of OCT and high throughput sequencing shed light on the impact of the two cleaning procedures (pressure flushing, chlorination) on the biofouling of RWW-fed drip-irrigation systems:

- The pressure flushing method alone did not reduce the biofouling of the drippers and did not influence the biofilm microbiome.
- Conversely, chlorination application alone or combined with pressure flushing steps reduced dripper biofouling, mainly in the centre of the labyrinth.
- Some bacteria commonly known to clog systems, such as Chloroflexi and Planctomycetes, appear sensitive to chlorine and susceptible to regrowth after chlorination is discontinued.
- Others, such as the members of the Comamonadaceae and Clostridia (Firmicutes), are less sensitive. Further research on the mechanisms governing sensitivity is needed to improve biofilm control.
- Treatment suspension leads to an increase in the bacterial diversity of the initially chlorinated biofilms, and to a convergence of the communities towards non-chlorinated biofilms, although differences in the structure remain. This indicates that the bacterial community is resilient to chlorine, but that the community at a global scale keeps the ‘memory’ of the chlorination.

Partie 2 : Effet des méthodes de nettoyage sur la présence de microorganismes pathogènes dans les systèmes d'irrigation alimentés avec des eaux usées traitées

I. MATÉRIELS ET MÉTHODES

Les OTUs associés à des genres incluant des espèces pathogènes ont été recherchés dans les données de séquençage. L'ensemble de ces OTUs a ensuite été considéré comme une sous-communauté. L'étude des indices de diversité, de richesse ainsi que l'étude de la structure et la composition de cette sous-communauté ont été effectuées afin d'étudier l'effet des méthodes de nettoyage. Un séquençage du gène *mip* a été réalisé afin d'avoir un aperçu de la diversité des espèces appartenant au genre *Legionella* présentes dans les biofilms des goutteurs et l'influence du type de traitement. Les indicateurs de contaminations fécales *E. coli* et *Enterococcus* ainsi que les espèces pathogènes *Legionella pneumophila*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Aeromonas hydrophila* ont été quantifiées par qPCR.

II. RÉSULTATS

Les OTUs associés à 61 genres incluant des espèces bactériennes pathogènes (liste en annexe), communément trouvées dans les eaux usées ont été recherchés. 24 ont été détectés dans les biofilms des goutteurs ou dans l'eau usée traitée de la lagune.

A. Impact des traitements sur les genres incluants des espèces pathogènes

À 29 jours, les indices de richesse et de diversité des OTUs appartenant à des genres contenant des espèces pathogènes sont plus élevés dans les conditions Cl et PFCl (chlorés) que dans C et PF (non chlorés) (p-value < 0,05), alors que les indices de richesse sont similaires, indiquant que c'est la répartition des OTUs qui est modifiée. À 71 jours, cette différence n'apparaît plus que pour la richesse observée (Tableau 19).

Pendant la période de traitement (29 et 71 jours), la richesse et la diversité étaient plus élevées dans l'eau de la lagune que dans les biofilms non chlorés (p-value < 0,05) (Tableau 19), indiquant que seuls certains genres colonisent les biofilms. Par contre, les valeurs d'indices étaient similaires entre les biofilms des goutteurs chlorés et l'eau de la lagune (p-value > 0,05).

Tableau 19 Indices de richesse et de diversité des genres incluant des espèces pathogènes. Les différentes lettres signifient des différences significatives par comparaison par paire en utilisant le test de conover à p<0,05.

			Indices de Richesse		Indices de Diversité	
Conditions	**Chlore**	**Temps (en jours)**	**Observé**	**Chao1**	**Shannon**	**Simpson**
C (n= 4)	Sans	29	9 ± 1,4^{a}	13 ± 5,5^{a}	1,2 ± 0,1^{a}	0,6 ± 0,1^{a}
PF (n= 3)			9 ± 3^{a}	17 ± 12,1^{a}	1,2 ± 0,1^{a}	0,6 ± 0^{a}
Cl (n= 3)	Avec		10,7 ± 3,1^{ab}	14 ± 8,7^{a}	1,7 ± 0,1^{b}	0,8 ± 0^{b}
PFCl (n= 3)			19,3 ± 3,1^{b}	23,9 ± 4,7^{a}	2 ± 0,2^{b}	0,8 ± 0^{b}
C (n= 3)	Sans	71	12 ± 1,7^{a}	19,5 ± 6,9^{a}	1,4 ± 0,2^{a}	0,6 ± 0,1^{a}
PF (n= 3)			12,7 ± 1,2^{a}	21,8 ± 11,7^{a}	1,7 ± 0,4^{a}	0,7 ± 0,1^{a}
Cl (n= 3)	Avec		17 ± 1^{b}	19 ± 2,6^{a}	2 ± 0,2^{a}	0,8 ± 0^{a}
PFCl (n= 3)			17,3 ± 3,2^{b}	29,8 ± 23,5^{a}	1,8 ± 0,3^{a}	0,7 ± 0,1^{a}
C (n= 2)	Sans	104	9,5 ± 6,4^{a}	13,3 ± 7,4^{a}	1,1 ± 0,4^{a}	0,6 ± 0,1^{a}
PF (n= 3)			11 ± 4,4^{a}	19,2 ± 6,8^{a}	1,7 ± 0,4^{ab}	0,7 ± 0,1^{ab}
Cl (n= 3)	Avec		16 ± 2^{a}	23,3 ± 6,1^{a}	2,3 ± 0,2^{b}	0,9 ± 0^{b}
PFCl (n= 3)			18 ± 4^{a}	31,7 ± 19,4^{a}	2,2 ± 0^{ab}	0,8 ± 0^{b}
RWW (n= 8)	-	-	19,2 ± 7	26,6 ± 12,7	2,4 ± 0,4	0,9 ± 0

Bien qu'il n'y ait pas de différence au niveau des indices de richesse (p-value > 0,05), les indices de Shannon pour la communauté des genres incluant des espèces pathogènes étaient plus élevés dans les conditions chlorées où la diversité globale était plus faible, et inversement dans les conditions non chlorées (Figure 43).

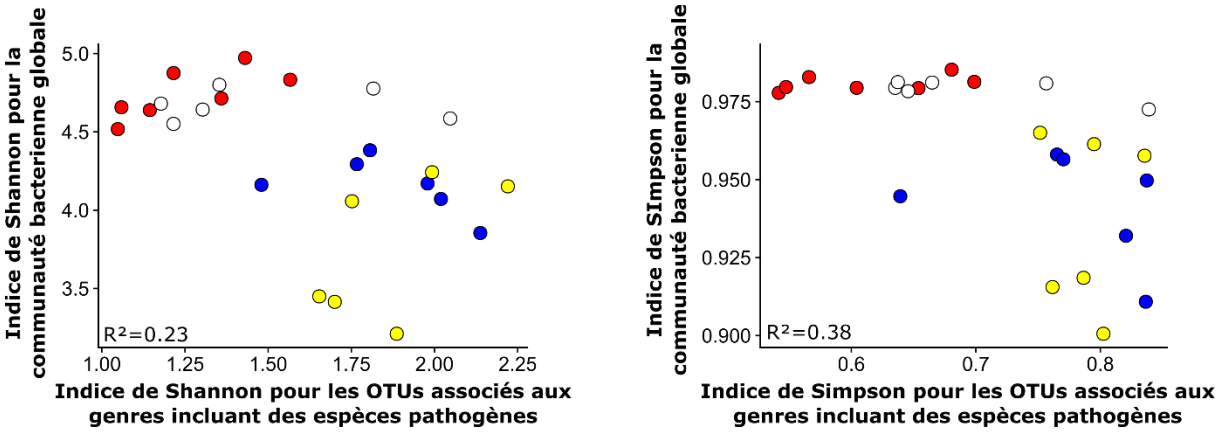


Figure 43 Relation entre la diversité de la communauté bactérienne globale et la diversité de la sous-communauté des genres incluant des espèces pathogènes pendant la période de traitement. (C : rouge, PF : blanc, Cl : jaune, PFCl : bleu).

B. Effet de la chloration sur la structure des communautés microbiennes incluant des espèces pathogènes

L'analyse de la structure de la communauté des OTUs associés aux genres bactériens incluant des espèces pathogènes (Figure 44) a confirmé l'effet du chlore à 29 jours (Adonis test, r=0.43, p-value < 0,05) et à 71 jours (Adonis test, r=0.53, p-value < 0,05) sur la structure des communautés des biofilms. Cette structure varie moins entre les deux temps d'échantillonnage pour les biofilms chlorés (Adonis test, r=0.51, p-value < 0,05) que pour les biofilms non chlorés (Adonis test, r=0.22, p-value < 0,05).

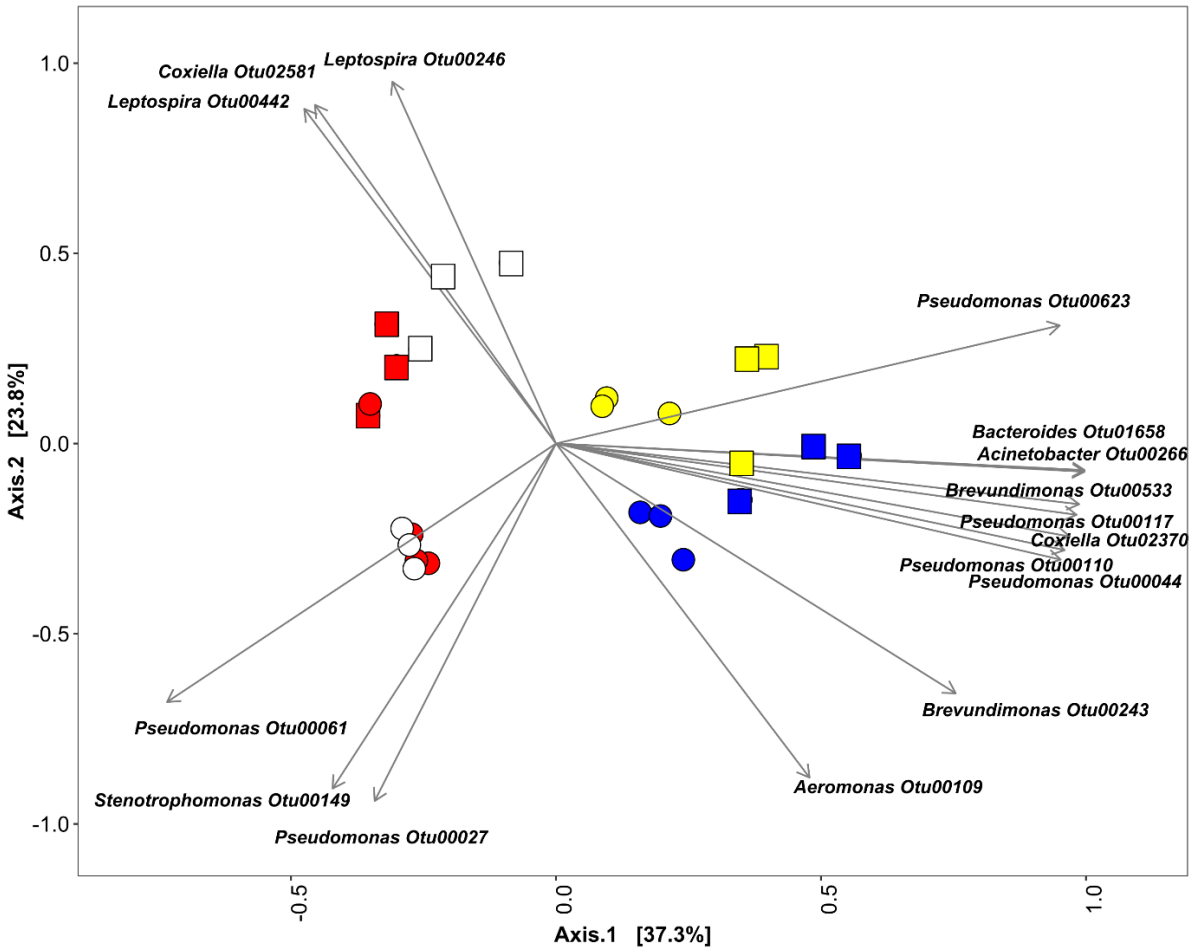


Figure 44 PCoA des communautés bactériennes des genres contenant des espèces pathogènes des biofilms à 29 (●) et 71 (■) jours. L'analyse PCoA est basée sur une matrice de similarité Bray-Curtis. C : rouge, PF : blanc, Cl : jaune, PFCl : bleu. Les flèches indiquent les OTUs qui participent significativement (p-value < 0,05) à la séparation des communautés.

Parmi les OTUs associés au genre *Pseudomonas*, les OTUs 44, 110, 117 et 623 étaient associés aux biofilms chlorés alors que les OTU 27 et 61 étaient associés aux biofilms des goutteurs non chlorés. Les genres *Brevundimonas* (OTU 243, 533), *Aeromonas* (OTU 109) et *Acinetobacter* (OTU 266) étaient associés aux biofilms des goutteurs chlorés (p-value < 0,05). À l'inverse, *Stenotrophomonas* (OTU 149) et *Leptospira* (OTU 246, 442) sont associés aux biofilms des goutteurs non chlorés. Ceci signifie que la chloration induit une sélection parmi les genres incluant des espèces pathogènes.

Le Tableau 20 présente les OTUs majoritaires (>0,1 %) associés aux genres incluant des espèces pathogènes dans les biofilms des goutteurs et dans l'effluent traité. L'étude des OTUs les plus abondants au sein d'un genre bactérien ciblé montre que ceux retrouvés dans l'eau de

la lagune étaient différents de ceux retrouvés dans les biofilms des goutteurs (Tableau 20). Par exemple, la diversité des OTUs associés au genre *Pseudomonas* était plus élevée dans les biofilms chlorés que dans l'eau (6 OTUs vs 2 OTUs) indiquant un effet de la chloration. En revanche, la diversité du genre *Bacteroidetes* était plus élevée dans l'eau que dans les biofilms chlorés et non chlorés (5 OTUs vs 1 OTUs) indiquant une sélection liée au passage de l'effluent vers le système d'irrigation. Ceci est également valable pour les OTUs associés au genre *Legionella*. D'autres OTUs étaient retrouvés quel que soit l'origine de l'échantillon tels que les OTU 149 affiliés à *Stenotrophomonas maltophila* ou l'OTU 117 affilié à *Pseudomonas anguilliseptica*.

Après 2 mois, 12 OTUs majoritaires associés à des genres incluant des espèces pathogènes étaient détectés dans les biofilms chlorés représentant 5,8 % de la communauté de la communauté bactérienne globale contre 4 OTUs, soit 1,2 % de la communauté globale, pour les biofilms non chlorés. Certains OTUs majoritaires étaient communs à l'ensemble des goutteurs tels que l'OTU 149 (*Stenotrophomonas*), l'OTU 27 et 61 (*Pseudomonas*) alors que d'autres étaient majoritairement présents dans les conditions chlorées tels que l'OTU 226 (*Acinetobacter*) ou 243 (*Brevundimonas*). La diversité des OTUs associés au genre *Pseudomonas* était également plus élevée dans les biofilms chlorés (7 OTUs majoritaires sur les 10 détectés) que dans les biofilms non chlorés (2 OTUs). Les concentrations moyennes en bactéries, exprimées en nombre de copies du gène ADNr 16S, des biofilms chlorés tendaient à être inférieures à celles des biofilms non chlorés (cf. Partie 1, « Table S3'). Cependant, rapportées à la concentration moyenne en bactéries, les concentrations des OTUs affiliés au genre *Pseudomonas* étaient entre 10^7-10^8 bactéries/biofilm chlorés et entre 10^4-10^6 bactéries/biofilm non chlorés pendant la période de traitement. Ainsi, les OTUs 44 (*P. alcaligenes*) et 117 (*P. anguilliseptica)* colonisent préférentiellement les biofilms des goutteurs chlorés. Après 1 mois d'arrêt des méthodes de nettoyage, seulement 4 OTUs étaient détectés dans les biofilms initialement chlorés (0,8 % de la communauté globale) et 3 OTUs (1,4 % de la communauté globale) pour les biofilms non chlorés.

Tableau 20 Abondances relatives des OTUs dominants (>0,1 % de la communauté globale) dans les biofilms des goutteurs et dans la lagune. Seules les OTUs contribuant au moins dans un échantillon à plus de 0,1 % sont indiquées. Les flèches indiquent les tendances liées au chlore (augmentation : ↑ ou diminution : ↓). Les flèches rouges indiquent une différence significative. L'affiliation taxonomique est indiquée pour les OTUs avec plus de 98 % de similarité. « nd » : non détecté ; « — » : < 0,1 %

			Abondance relative (%) (Dans les biofilms)							**Affiliation taxonomique**	**% de similarité**
			Avec chlore		**Sans chlore**		**↓ ou ↑**	**Avec chlore (n=6)**	**Sans chlore (n=5)**		
Genre	**OTU**	**Lagune (n=9)**	**29d (n=6)**	**71d (n=6)**	**29d (n=7)**	**71d (n=6)**		**104d**			
Pseudomonas	27	-	1 ± 0,8	0,3 ± 0,4	2,3 ± 1,4	0,4 ± 0,3	↓	0,2 ± 0,1	0,4 ± 0,3		
	44	0,3 ± 0	0,9 ± 0,8	2,2 ± 1,9	nd	nd	↑	0,2 ± 0,1	-	*P. alcaligenes* (MN999989.1)	100
	61	nd	0,3 ± 0	0,2 ± 0	1,7 ± 0,8	0,5 ± 0,2	↓	0,2 ± 0,1	0,6 ± 0,8		
	110	-	0,1 ± 0	0,3 ± 0,4	-	nd	↑	-	-		
	117	0,1 ± 0,2	0,4 ± 0	1,1 ± 0,8	nd	-	↑	-	-	*P. anguilliseptica* (MH185879.1)	100
	571	-	-	0,1 ± 0	nd	nd		-	nd		
	623	0,2 ± 0	nd	0,1 ± 0	nd	-		-	-		
Stenotrophomonas	149	-	0,4 ± 0,2	0,1 ± 0	0,6 ± 0,3	0,1 ± 0		-	-	*S. maltophila* (MN493874.1)	100
Acinetobacter	266	0,1 ± 0	0,1 ± 0	0,1 ± 0	nd	-	↑	-	-		
Bacteroidetes	446	0,1 ± 0,1	-	-	-	-		-	-		
	713	0,1 ± 0,1	nd	nd	-	nd		-	nd		

	1347	0,1 ± 0	-	-	nd	nd		nd	nd	*B. stercoris* (LC515591.1)	100
Aeromonas	109	-	1,1 ± 1,1	0,3 ± 0,1	0,2 ± 0	-	↑	-	nd		
Treponema	583	-	-	nd	-	nd		0,2 ± 0	-		
Brevundimonas	243	nd	0,6 ± 0	0,3 ± 0,1	-	nd	↑	-	-		
Legionella	484	-	0,3 ± 0	-	-	0,2 ± 0		-	-		
	555	-	-	-	0,1 ± 0	nd		-	nd		
	718	-	-	-	nd	nd		-	nd		
Leptospira	169	-	-	0,7 ± 1,1	-	-		-	0,4 ± 0,8	*L. interrogans* (DQ522190.1)	98,9
Enterococcus	625	0,2 ± 0	nd	-	nd	-		-	nd		
Streptococcus	562	0,1 ± 0	nd	-	-	-		-	-		
Mycobacterium	265	-	0,1 ± 0,1	-	-	-		-	-		
	Somme	1,3 ± 0,4	5,3 ± 3	5,8 ± 4,8	4,9 ± 2,5	1,2 ± 0,5		0,8 ± 0,3	1,4 ± 1,9		

Les biofilms des goutteurs de la ligne contrôle (C) et de la ligne chlore (Cl) ont également été utilisé pour explorer la diversité des espèces appartenant au genre *Legionella* par séquençage (Tableau 21). À 71 jours, 4 espèces de légionelles ont été détectées (*L. donaldonii, L. feeleii, L. impletisoli, L. pneumophila*). 12 OTUs ont été détectés comme appartenant à l'espèce *L. pneumophila*, représentant entre 90 et 99 % de la communauté des légionelles. L'utilisation du chlore (Cl) par rapport à la ligne contrôle (C) n'a pas d'effet sur les abondances relatives de *L. pneumophila*. Certains OTUs ont été affiliés à des espèces n'appartenant pas au genre *Legionella* tels que *Halomonas phosphatis* (—-Proteobacteria) et le genre *Tatlockia* appartenant à la famille des Legionellaceae.

Tableau 21 Diversité des espèces de légionelles présentes dans les biofilms des goutteurs après 71 jours de traitement. Les séquences présentant une similarité de 99 % ont été triées en unités taxonomiques opérationnelles (OTU).

	Contrôle (C)		**Chlore seul (Cl)**	
Espèce	A3	A6	D2	D8
Legionella donaldsonii	0,5 %	0,2 %	0 %	0 %
Legionella feeleii	0 %	0 %	0,1 %	0 %
Legionella impletisoli	0,4 %	0 %	0 %	0 %
Legionella pneumophila	90,0 %	89,6 %	99,3 %	90,3 %
Legionella unclassified	4,2 %	4,2 %	0,3 %	0,1 %
Tatlockia unclassified	0,1 %	0,1 %	0 %	1,4 %
Halomonas phosphatis	0,2 %	0,1 %	0,3 %	7 %

C. Diversité et composition de l'effluent sortant des goutteurs pendant le traitement

Des prélèvements en sorties de goutteurs pendant la période de traitement ont été réalisés afin d'étudier l'effet de la colonisation du système sur la structure de la communauté bactérienne de l'eau en sortie. Ces prélèvements avaient lieu pendant le traitement. Les indices de richesse et de diversité étaient similaires entre l'eau usée traitée de la lagune et les effluents sortant des goutteurs purgés et chlorés (Kruskal test, p-value > 0,05). Il n'y avait pas non plus de différences entre les effluents sortant des goutteurs suivant le type de traitement utilisé (Kruskal test, p-value > 0,05).

Les OTUs majoritaires (>0,1 %) associés aux genres incluant des espèces pathogènes retrouvés dans la lagune ont été comparés à ceux retrouvés dans l'eau sortant des goutteurs pendant le

traitement. Il n'y avait pas de différences significatives entre l'eau de la lagune et l'eau sortant des goutteurs, indiquant que la colonisation du réseau n'a pas d'effet sur la structure des communautés sortant du réseau d'irrigation.

D. Quantification d'espèces pathogènes bactériennes

Afin de valider la présence d'espèces pathogènes parmi les genres détectés dans les données de séquençages, et d'évaluer l'effet des traitements sur leur concentration, 3 espèces couramment retrouvées dans les biofilms des eaux usées ont été choisies et quantifiées par qPCR : *Legionella pneumophila, Pseudomonas aeruginosa* et *Aeromonas hydrophila*.

1. Dans l'effluent et dans les biofilms

Pendant les traitements, les concentrations en *L. pneumophila* étaient sous la limite de détection (LOD : 10 copies du gène mip/puits). Les concentrations en bactéries totales augmentaient au cours du temps et étaient supérieures après 2 mois dans les biofilms des goutteurs non chlorés (Kruskal-test, p-value > 0,05) (Figure 45). Pendant la période de traitement, la concentration en *Enterococcus* spp. a augmenté au cours du temps, mais étaient similaires entre les conditions chlorées et non chlorées indiquant que la chloration n'avait pas d'effet sur l'abondance des entérocoques. *E. coli* a été détecté et quantifié uniquement à 71 jours dans les biofilms, mais était quantifiable dans l'effluent (10^3 copies/ml environ). À l'inverse, les espèces pathogènes *P. aeruginosa* et *A. hydrophila* étaient détectables et quantifiables dans les biofilms des goutteurs à 29 et 71 jours, mais rarement dans l'effluent, indiquant que ces espèces colonisent préférentiellement les systèmes et que leurs comportements sont différents des indicateurs de contamination fécale (Figure 45). Les concentrations en *P. aeruginosa* et *A. hydrophila* n'augmentaient pas au cours du temps dans les biofilms. Les concentrations de *P. aeruginosa* étaient plus faibles à 29 jours dans les biofilms non chlorés (p-value < 0,05). *A. hydrophila* était aussi plus concentré à 71 jours dans les biofilms chlorés (p-value < 0,05) et cette différence reste significative à 104 jours, après l'arrêt des traitements (Figure 45).

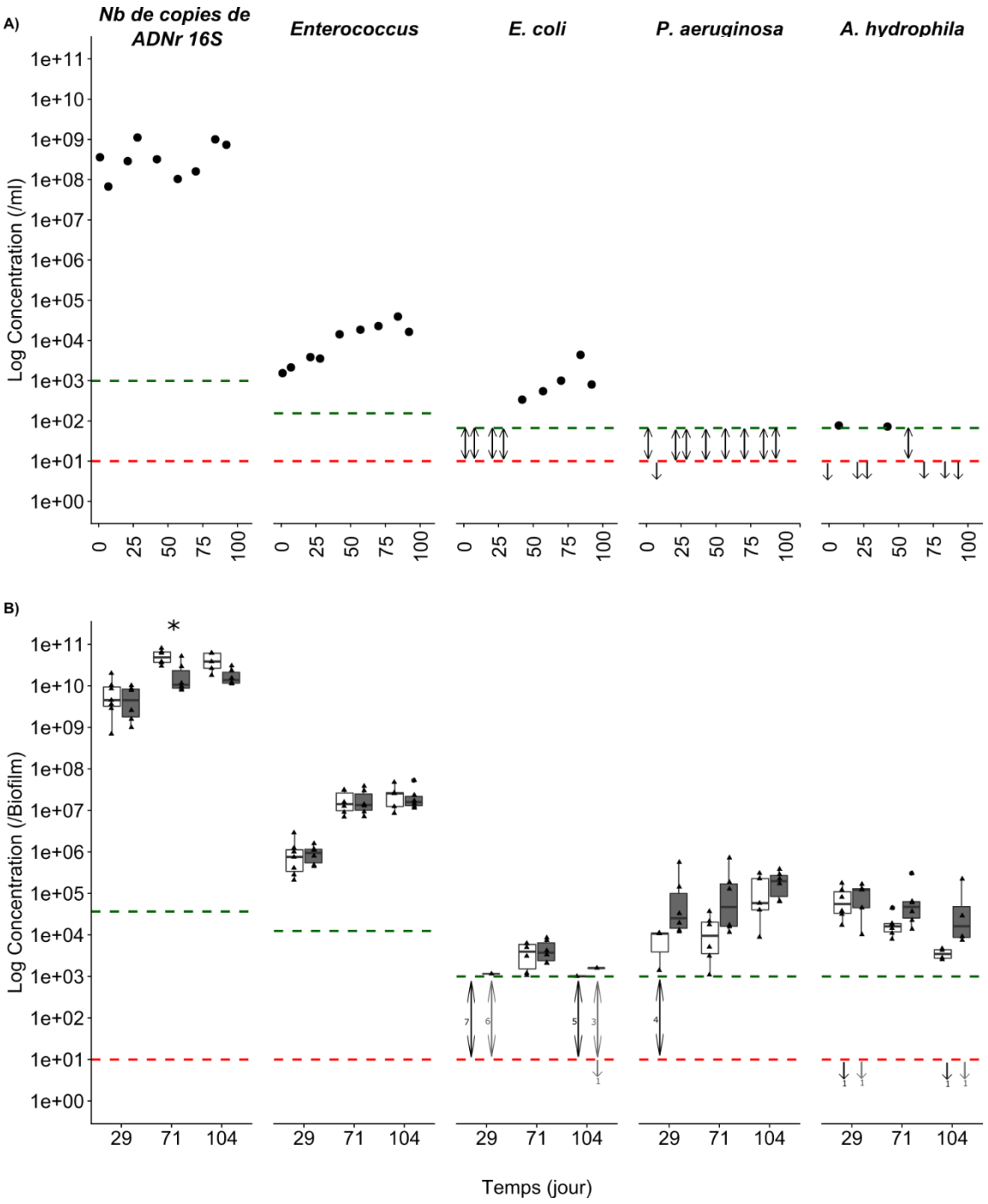


Figure 45 Concentration des bactéries (ADNr 16S), d'*Enterococcus* spp. (ADNr 23S), *E. coli* (*iudA*), *P. aeruginosa* (*regA*) et *A. hydrophila* (*aha1*) dans l'effluent de la lagune (A) et dans les biofilms des gouteurs (B). non chlorés (blanc) et chlorés (gris) à 29 et 71 jours (traitement) et 104 jours (sans traitement). À 29 jours, n_{chlore}=6, $n_{non\text{-}chloré}$=7; A 71 jours, n=6 pour les deux conditions et à 104 jours, n_{chlore}=6, $n_{non\text{-}chloré}$=5. La ligne pointillée rouge indique la limite de détection, la verte : la limite de quantification. Lorsque la détection a eu lieu, mais à des concentrations inférieures au seuil de quantification (LOQ), les résultats sont représentés par des doubles flèches. Lorsque la concentration était inférieure au seuil de détection (LOD), les résultats sont représentés par des flèches simples. Les chiffres à côté des flèches indiquent le nombre d'échantillons inférieurs à la LOD ou LOQ. Les * indiquent une différence significative (conover test, p-value < 0,05).

2. En sortie de goutteur

Pendant la période de traitement, des prélèvements en sorties de goutteurs à 42 et 71 jours ont été réalisés afin de quantifier la présence des indicateurs et des espèces pathogènes avec fonction du traitement par rapport aux concentrations retrouvées dans la lagune lors du changement d'eau de la cuve (Figure 46).

Les concentrations en *L. pneumophila* étaient sous la limite de détection. La concentration moyenne de bactérie dans l'effluent (nombre de copies du gène de l'ADNr 16S/ml, sur toute la période expérimentale) en de $4{,}6x10^8$/ml (n=9). À 71 jours, la concentration en bactéries était plus élevée de près de 1 log/ml dans les effluents sortants des goutteurs chlorés par rapport à la concentration de la lagune, indiquant un effet des traitements sur la concentration en bactérie de l'effluent sortant. Les concentrations en entérocoques diminuaient dans l'effluent sortant des goutteurs non chlorés. À 42 jours, la concentration moyenne en *E. coli* était plus élevée dans l'effluent sortant des goutteurs chlorés que dans celle de la lagune et des goutteurs non chlorés, mais pas à 71 jours.

Concernant *P. aeruginosa*, les concentrations en sorties de goutteurs chlorés étaient plus élevées que dans la lagune. Étant donné que les concentrations de *P. aeruginosa* étaient également plus élevées dans les biofilms des goutteurs chlorés, cela suggère que ce pathogène colonise préférentiellement les systèmes, et les biofilms qui se développent dans le réseau peuvent induire une augmentation de la concentration dans l'eau d'irrigation de *P. aeruginosa*. *A. hydrophila* était rarement quantifiable. Cependant, lorsque cela était possible, les concentrations dans les effluents sortant des goutteurs étaient plus élevées en conditions chlorées. Tout comme *P. aeruginosa*, les concentrations en *A. hydrophila* étaient plus élevées dans les biofilms des goutteurs chlorés à 71 jours, suggérant ainsi que *A. hydrophila* se maintient principalement dans les biofilms colonisant le système et que ces biofilms peuvent expliquer la présence de ce pathogène dans l'effluent de sortie. Ainsi, les espèces pathogènes susceptibles de s'installer dans les biofilms des réseaux d'irrigation pourraient affecter la qualité de l'eau d'irrigation en sortie.

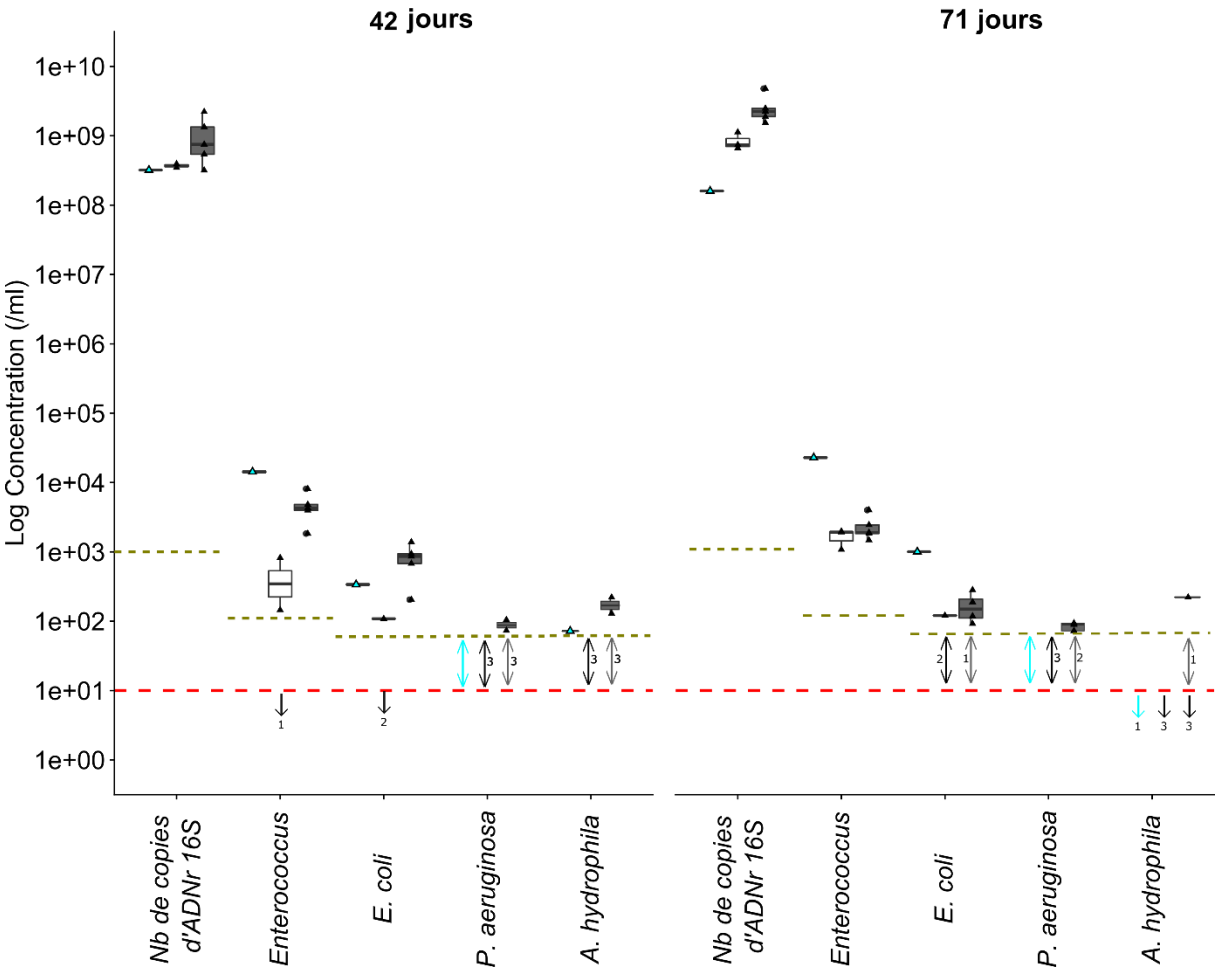


Figure 46 Concentration des bactéries (ADNr 16S), d'*Enterococcus* spp. (ADNr 23S), *E. coli* (*iudA*), *P. aeruginosa* (*regA*) et *A. hydrophila* (*aha1*) dans l'effluent de la lagune (triangle bleu), en sortie de goutteur non chloré (blanc) et chlorée (gris) pendant la période de traitement. À 42 jours, n_{chlore}=5, $n_{non\text{-}chloré}$=3; A 71 jours, n_{chlore}=5, $n_{non\text{-}chloré}$=3. La ligne pointillée rouge indique la limite de détection, la verte : la limite de quantification. Lorsque la détection a eu lieu, mais à des concentrations inférieures au seuil de quantification (LOQ), les résultats sont représentés par des doubles flèches. Lorsque la concentration était inférieure au seuil de détection (LOD), les résultats sont représentés par des flèches simples. Les chiffres à côté des flèches indiquent le nombre d'échantillons inférieurs à la LOD ou LOQ.

III. DISCUSSION

Un des problèmes majeurs associés à l'utilisation de l'eau usée traitée pour l'irrigation est la présence de microorganismes pathogènes. Dans cette étude, l'effet de méthode de nettoyage (chloration, purge hydrique, combinée) sur des indicateurs bactériens de contamination fécale et des bactéries pathogènes présentes dans les biofilms des goutteurs d'un système de micro-irrigation alimenté par de l'eau usée traitée a été évalué à l'échelle laboratoire. Une analyse plus globale réalisée à partir des données de séquençage a permis de mettre en évidence l'influence

des traitements sur les genres incluant des espèces pathogènes. Durant la période de traitement, la communauté bactérienne pathogène de l'effluent de la lagune était différente de la communauté des biofilms des goutteurs (chlorés et non chlorés), indiquant une sélection dans un premier temps liée au passage de l'effluent vers le système d'irrigation. Par exemple, le nombre d'OTU associé au genre *Bacteroidetes* était plus élevé dans l'effluent de la lagune que dans les goutteurs. À l'inverse, le nombre d'OTU associé en genre *Pseudomonas* était plus élevé dans les biofilms des goutteurs que dans l'effluent de la lagune pendant la période de traitement, notamment dans les biofilms des goutteurs chlorés.

L'utilisation du chlore, combiné ou non à la purge, diminuait la richesse et la diversité de la communauté bactérienne globale des biofilms durant la période de traitement. Néanmoins, à cette diminution correspondant une augmentation de la diversité de la communauté des genres incluant des espèces pathogènes. Après un mois sans traitement, la diversité et la richesse globale des biofilms chlorés ont augmenté jusqu'à atteindre des niveaux similaires à ceux des biofilms non chlorés initialement. Cependant, la diversité et la richesse de la communauté bactérienne pathogène restaient plus élevées dans les biofilms initialement chlorés. Les biofilms présentent un niveau d'organisation complexe, dans lequel les microorganismes sont impliqués dans des interactions intra — et interspécifiques. Ces interactions peuvent être soit compétitives soit coopératives (Elias and Banin, 2012; Rendueles and Ghigo, 2012). Plusieurs études ont mis en évidence que le développement des biofilms multiespèces favorisait la résistance face au chlore (Schwering *et al.*, 2013), mais aussi que le niveau de biodiversité des communautés microbiennes permettait de conditionner l'invasion de celui-ci par des microorganismes pathogènes (Mallon *et al.*, 2015; van Elsas *et al.*, 2012). Dans cette étude, le nombre d'OTUs associé au genre *Pseudomonas* était plus élevé dans les biofilms chlorés que dans les biofilms non chlorés pendant la période de traitement puis a diminué après 1 mois sans chloration dans les biofilms chlorés initialement. De plus, les concentrations des pathogènes *P. aeruginosa* et *Aeromonas hydrophila* étaient aussi plus élevés dans les biofilms chlorés que dans les biofilms non chlorés. Ainsi, diminuer la diversité et la richesse des biofilms pourrait libérer des niches écologiques et faciliter le maintien des bactéries pathogènes en diminuant la pression biotique (prédation, compétition)(Tilman, 2004).

Certain OTUs affiliés au genre *Pseudomonas* étaient présents dans les biofilms chlorés avant et après la période de traitement tel que l'OTU 44 affilié à *Pseudomonas alcaligenes*. *P. alcaligenes* était aussi majoritairement présent dans l'eau sortant des goutteurs chlorés, mais pas dans l'eau sortant des goutteurs non chlorés, indiquant une sélection parmi le genre

Pseudomonas due au chlore. *P. alcaligenes* est un pathogène humain opportuniste capable d'induire une infection du sang (Suzuki *et al.*, 2013b). Une étude récente a montré que *P. alcaligenes* était présente dans l'eau potable post-traitée par le chlore et que son génome comprenait plusieurs ARGs (Jia *et al.*, 2019). De la même façon, les concentrations en *P. aeruginosa* sont plus élevées dans les biofilms chlorés et dans l'eau sortant de ces goutteurs pendant le traitement. Des études antérieures ont signalé que *P. aeruginosa* pouvait développer une résistance aux faibles niveaux de chlore utilisés dans le traitement de l'eau potable (Shrivastava *et al.*, 2004). De plus, Behnke and Camper, (2012) ont montré que 10 ppm de chlore libre étaient nécessaires pour éliminer toutes les cellules de *P. aeruginosa* présentes dans un biofilm. En plus de l'effet protecteur lié au biofilm, des études ont mis en évidence que les souches résistantes au chlore produisaient une capsule riche en alginate (Grobe *et al.*, 2001), augmentant leur tolérance au chlore (Shrivastava *et al.*, 2004). Ces propriétés peuvent expliquer les concentrations plus élevées de *P. aeruginosa* dans les échantillons eau et biofilms chlorés.

Le genre *Aeromonas*, comprenant l'espèce pathogène *A. hydrophila*, était principalement présent dans les biofilms et effluents des goutteurs chlorés. Ce genre est aussi connu pour synthétiser une capsule permettant d'augmenter la virulence du pathogène et conférant une barrière protectrice supplémentaire vis-à-vis des désinfectants et toxines (Fernández-Bravo and Figueras, 2020). Des études ont trouvé le genre *Aeromonas* spp. dans l'eau usée traitée utilisée pour l'irrigation agricole, représentant un risque pour les consommateurs si l'on considère que cette eau peut être la source d'entrée de la bactérie dans la chaîne alimentaire (Al-Jassim *et al.*, 2015; Fernandez-Cassi *et al.*, 2016; Latif-Eugenín *et al.*, 2017). *A. hydrophila* est souvent retrouvé dans l'eau et les biofilms des systèmes de distribution d'eau potable (Bertelli *et al.*, 2018; Wang *et al.*, 2014) et présente des capacités de résistances face au chlore en phase planctonique (1,2 ppm) (Scoaris *et al.*, 2008; Skwor *et al.*, 2020). De plus, des études ont montré que l'utilisation d'hypochlorite de sodium < 400 ppm était inefficace sur les biofilms d'*A. hydrophila* (Jahid and Ha, 2014).

D'autres OTUs tel que l'OTU 149 affilié à l'espèce pathogène *Stenotrophomonas maltophilia* était retrouvé à la fois dans les goutteurs chlorés et non chlorés, ainsi que dans l'eau sortant des goutteurs. *S. maltophilia* a déjà été identifié comme résistant à la chloration dans l'eau usée traitée (Shekhawat *et al.*, 2020). Shekhawat *et al.*, (2020) ont étudié l'effet de la concentration en chlore utilisée sur la survie de *S. maltophilia* à un stade planctonique dans l'eau usée traitée et ont montré que 1,5 ppm de chlore permettait d'inactiver toutes les cellules. Néanmoins, Gomes *et al.*, (2020) ont montré que 10 ppm de chlore n'était pas efficace pour inactiver les

cellules de *S. maltophilia* dans un biofilm. Ainsi, la concentration en chlore utilisée dans la présente étude n'était pas suffisante pour réduire la présence d'*A. hydrophila* et *S. maltophilia.* Classiquement, les indicateurs de contamination fécale sont utilisés pour rendre compte de la présence de pathogène entérique. Ces indicateurs ne renseignent pas quant au danger lié aux pathogènes non-entériques dans les biofilms et dans l'eau sortant du système, ce qui est en accord avec plusieurs études (Dietrich *et al.*, 2007; Virto *et al.*, 2005; Winward *et al.*, 2008). C'est pourquoi certaines réglementations associées à la reuse recommandent le suivi direct d'espèces pathogènes telles que *Legionella pneumophila*. Cette étude a bien montré les différences de comportement dans les biofilms et face aux traitements entre les pathogènes opportunistes et les indicateurs bactériens de contamination fécale telles qu'*E. coli* et les entérocoques. Nous avons observé que les espèces *P. aeruginosa* et *A. hydrophila* étaient difficilement quantifiables dans les eaux de la lagune contrairement au biofilm des goutteurs. De plus, les concentrations de ces pathogènes étaient plus élevées dans les biofilms des goutteurs chlorés et dans les effluents sortant de ces goutteurs. Ceci suggérerait un effet de la colonisation du réseau sur la qualité de l'effluent sortant du système pendant la chloration. L'augmentation des concentrations de ces pathogènes dans les effluents sortants peut être due au détachement du biofilm du système pendant la chloration. Effectivement, des études ont montré que l'utilisation du chlore, associé au non à la purge, fragilisait la structure du biofilm et diminuait son adhérence (Mathieu *et al.*, 2014; Tsvetanova, 2020; Xue and Seo, 2013). Ainsi, ces évènements de détachement ont pu participer à l'augmentation de la concentration des espèces pathogènes et diminuer la qualité de l'eau d'irrigation (Verbyla *et al.*, 2016). Des expérimentations supplémentaires sont nécessaires afin d'identifier les mécanismes responsables de l'augmentation de la concentration de ces pathogènes dans l'effluent des goutteurs. Il faut également noter que cette quantification a été réalisée par PCR quantitative. Bien que cette méthode soit très répandue pour le suivi de la qualité de l'eau, elle ne donne pas d'information concernant la viabilité et l'infectiosité des cellules. Ainsi, suivant l'état physiologique de ces cellules, le détachement et les capacités de survies de ces pathogènes une fois sortis du réseau, principalement dans le cas de la chloration, pourraient représenter un problème au niveau de la qualité microbiologique des produits consommés.

L'ensemble du microbiote influence la survie et le maintien de bactéries pathogènes dans les biofilms et le rôle des prédateurs ne doit pas être négligé. Des observations microscopiques de biofilms raclés à partir de la conduite contrôle ont montré la présence de plusieurs types de protozoaires. Bien que la structure de la communauté eucaryote soit influencée par l'utilisation

du chlore, il n'y avait pas de différence au niveau de l'abondance relative des genres les plus abondants. La communauté eucaryote était principalement composée de protozoaires appartenant à la classe des Ciliophora et des Fungi. Les ciliés sont fréquemment décrits comme étant des prédateurs des bactéries et peuvent réduire significativement le volume (Parry *et al.*, 2007) et influencer la morphologie des biofilms (Böhme *et al.*, 2009). Toutefois, certaines études démontrent également que de nombreuses bactéries, y compris des espèces pathogènes, bénéficient des interactions avec les protozoaires. Ces derniers peuvent en effet internaliser et protéger des bactéries pathogènes d'un environnement défavorable à leurs survies comme cela a été montré pour *Campylobacter jejuni* (Reyes-Batlle *et al.*, 2017; Trigui *et al.*, 2016), *Listeria monocytogenes* (Fieseler *et al.*, 2014), *Legionella pneumophila* (Cervero-Aragó *et al.*, 2014), et *Stenotrophomonas maltophilia* (Cateau *et al.*, 2014). Ces protozoaires sont alors considérés comme des « Chevaux de Troie » (Barker and Brown, 1994) et augmentent la résistance des bactéries pathogènes face au chlore (King *et al.*, 1988). De plus, certains de ces protozoaires peuvent être sous forme de « kystes » dans lesquels sont encapsulées des espèces pathogènes. Cette forme permet alors de fournir une niche protectrice vis-à-vis des conditions environnementales. Par exemple, Lambrecht *et al.*, (2013) ont montré que *E. coli*, *L. monocytogenes*, *Salmonella enteritica* and *Yersinia enterocolitica* étaient plus tolérantes aux antibiotiques et à une diminution de pH lorsqu'elles étaient présentes dans les kystes d'*Acanthamoeba castellanii*. Ils ont également montré que le passage d'*E. coli*, *L. monocytogenes* et *S. enteritica* dans les kystes de *A. castellanii* permettait d'augmenter la résistance de ces bactéries après un traitement à l'hypochlorite de sodium (Lambrecht *et al.*, 2017). *L. pneumophila* résistait aussi mieux à la chloration lorsqu'elle était présente dans les kystes d'*A. polyphaga* (Dupuy *et al.*, 2011). Par conséquent, les protozoaires et leurs formes « enkystées » peuvent être des vecteurs de bactéries pathogènes et faciliter leurs disséminations (Balczun and Scheid, 2017). Dans cette étude, 2 genres majoritaires appartenant au phylum des amibes ont été détectés après 2 mois de traitement : Vermamoebidae et Breviata. *Vermamoeba (Hartmannella) vermiformis*, au même titre qu'*Acanthamoeba* spp., est reconnu pour être une des amibes hôtes de plusieurs espèces bactériennes pathogènes telles que *L. pneumophila* (Fouque *et al.*, 2014), *P. aeruginosa* (Delafont *et al.*, 2018) ou *S. maltophilia* (Cateau *et al.*, 2014). Wang *et al.*, (2012) ont étudié l'effet du chlore (4 $mg.l^{-1}$) et de la chloramine (4,8 $mg.l^{-1}$) sur la concentration de *Vermamoeba (Hartmannella) vermiformis, Acanthamoeba spp., Legionella spp et P. aeruginosa* dans les biofilms se développant sur des coupons en PVC avec de l'eau potable. Ils ont observé que *Legionella spp*. était sous les limites de quantification

durant toute la période expérimentale alors que *P. aeruginosa, Acanthamoeba spp., V. vermiformis* pouvait atteindre jusqu'à 4, 4 et 3,5 $log.cm^{-2}$ dans les biofilms après 5 jours. Fouque *et al.,* (2015) ont montré que 15 $mg.l^{-1}$ de chlore libre était nécessaire pour inactiver les kystes de *V. vermiformis*. Dans notre étude, la concentration en chlore libre utilisée était de 1,5 $mg.l^{-1}$. Il est possible que cette concentration stimule l'internalisation des espèces pathogènes vers les hôtes afin d'augmenter les chances de survie, mais qu'elle ne soit pas suffisamment élevée pour supprimer les microorganismes hôtes, et donc, les espèces bactériennes pathogènes. Ceci expliquerait les concentrations en *P. aeruginosa* plus élevée dans les biofilms chlorés. Ainsi, l'écologie microbienne des biofilms des goutteurs a besoin d'être étudiée plus en détail, et notamment la prédation en tant que facteur de régulation potentiel pour stimuler ou diminuer la persistance des pathogènes opportunistes.

IV. CONCLUSION

Dans cette étude, l'utilisation de la chloration a permis de diminuer le niveau de colmatage et la diversité globale de la communauté bactérienne des biofilms. Néanmoins, la diminution s'accompagnait d'une augmentation de la diversité des genres incluant des espèces pathogènes. Les concentrations des espèces pathogènes *P. aeruginosa* et *A. hydrophila* étaient plus élevées dans les biofilms des goutteurs chlorés. Ces augmentations peuvent être liées aux capacités de ces bactéries à résister au chlore (p. ex., capsule) ou à coloniser d'autres microorganismes (p. ex. amibes). Ainsi, des recherches supplémentaires sont nécessaires afin de comprendre les mécanismes et interactions mis en œuvre.

Les concentrations en *P. aeruginosa* et *A. hydrophila* tendaient aussi à être plus élevées dans les effluents des goutteurs chlorés comparativement à l'effluent des goutteurs non chlorés et aux concentrations de la lagune. Ceci suggère un effet de la colonisation des systèmes de micro-irrigation sous condition chlorée sur la qualité de l'eau en sortie du système. Ces augmentations peuvent être dues au détachement du biofilm pendant le traitement. Néanmoins, des recherches complémentaires visant à étudier l'infectiosité des cellules sont nécessaires afin de statuer sur le risque sanitaire lié à la présence de ces microorganismes.

- L'utilisation de la chloration associée à la purge hydrique permet de réduire significativement le développement des biofilms dans les goutteurs, principalement en limitant le développement des biofilms dans le centre du labyrinthe, où la vitesse de l'écoulement est la plus élevée. L'écoulement jouerait donc un rôle dans le transfert du chlore vers et dans le biofilm. A l'inverse, la purge seule ne permet pas de limiter le développement des biofilms.

- La chloration réduit la diversité, la concentration en bactéries dans les biofilms et modifie la structure et la composition microbienne des biofilms. A l'inverse, la purge seule ne modifie la composition microbienne des biofilms par rapport à la ligne contrôle. Les biofilms chlorés sont principalement composés de la famille des Comamonadaceae et des genres *Flavobacterium* et *Pseudomonas* connus pour résister au chlore. A l'inverse, le phylum des Chloroflexi prédomine dans les biofilms des goutteurs non chlorés (purge).

- L'arrêt des traitements entraîne une augmentation de la diversité bactérienne des biofilms initialement chlorés et une convergence des communautés vers les biofilms non chlorés, bien que des différences de structure subsistent. Cela indique qu'à l'arrêt des traitements, la colonisation reprend et le biofilm s'enrichit de nouvelles espèces, mais la communauté à l'échelle globale conserve la « mémoire » de la chloration.

- Bien que la chloration limite le colmatage des goutteurs, la diversité des genres incluant des espèces pathogènes, ainsi que les concentrations en *P. aeruginosa* et *A. hydrophila* étaient plus élevées dans les biofilms des goutteurs chlorés.

- Les concentrations en *P. aeruginosa* pouvaient être supérieures dans les effluents chlorés sortant du système d'irrigation plutôt que dans l'effluent entrant. Ceci suggère un effet de la colonisation du système sur la qualité microbiologique de l'effluent au point d'usage. Cependant ces augmentations sont obtenues juste après le traitement. Il serait donc intéressant d'étudier l'effet de la colonisation en conditions normales. Des expérimentations complémentaires détectant le détachement des biofilms dans ces réseaux sont nécessaires pour évaluer le risque de ces biofilms sur la qualité de l'eau.

DISCUSSION GENERALE & CONCLUSION

I. RAPPEL DES OBJECTIFS DE LA THESE

Le colmatage des goutteurs est un réel frein pour la mise en place durable et efficace des systèmes d'irrigation dans un contexte de réutilisation des eaux usées (REUT). De nombreuses recherches ont été menées de façon à identifier les causes de ce colmatage et les moyens de le limiter. Le colmatage des goutteurs a plusieurs origines : physique (p. ex. agrégation de particules), chimique (p. ex. précipitation de sels) et biologique (p. ex. formation de biofilm). Le colmatage biologique par la formation des biofilms est celui qui reste le moins bien maîtrisé. La qualité de l'eau, le type de goutteur, les pratiques agricoles, le type de filtration sont autant de paramètres influençant le colmatage de ces systèmes et conduisant à une perte d'efficience (p. ex. augmentation des coûts de remplacement et des opérations de maintenance, hétérogénéité de distribution de l'eau). Néanmoins, les mécanismes sous-jacents au colmatage biologique et l'effet de ces paramètres sur la mise en place et la composition des biofilms restent peu étudiés, bien que cela soit essentiel pour améliorer les stratégies de contrôle.

Le premier objectif de ces travaux de thèse était de comprendre l'influence de deux facteurs sur la mise en place et la composition du colmatage biologique des goutteurs dans un contexte de reuse : l'effet du traitement de l'eau (eau usée non traitée *versus* eau usée traitée) et l'effet de l'écoulement (comparaison entre goutteur et conduite et comparaison de différents types de goutteurs). Dans un second temps, l'efficacité des méthodes de nettoyage (chloration et purge hydrique) a également été évalué. Pour atteindre ces objectifs, des expérimentations à l'échelle terrain (« Qualité de l'eau », « Parcelle ») ont été combinées à des expérimentations à l'échelle laboratoire (« Écoulement », « Nettoyage »). Un dispositif millifluidique dans lequel étaient placés des goutteurs réels et permettant un accès optique a été développé de façon à suivre les cinétiques de formation des biofilms par tomographie en cohérence optique (OCT). Combiné à cette méthode, la caractérisation des communautés microbiennes des biofilms a été étudiée par des méthodes de biologie moléculaire (PCR quantitative, séquençage haut débit), permettant ainsi de relier un niveau de développement de biofilm à la composition microbienne. Enfin, la recherche et la quantification d'espèces pathogènes dans les effluents entrant et sortant ainsi que dans les biofilms des goutteurs ont été effectuées afin de savoir si la colonisation du système pouvait impacter la qualité microbiologique de l'eau jusqu'à son point d'usage.

II. AVANTAGES ET LIMITES DE L'APPROCHE EXPERIMENTALE

A. Méthodes moléculaires

Les approches moléculaires permettent d'analyser un microbiote dans sa globalité. L'approche la plus répandue en écologie microbienne est le séquençage des amplicons obtenus après PCR ciblant une région de l'ADNr 16S pour les bactéries et de l'ADNr 18S pour les eucaryotes. Au début de ces travaux de thèse, très peu de recherches sur la caractérisation des communautés associées au colmatage des systèmes d'irrigation utilisaient cette méthode. Les premiers articles sur les communautés microbiennes proviennent d'une équipe de l'Université agricole de Chine (Beijing) qui utilisait la caractérisation et la quantification des acides gras phospholipidiques (PLFA) (Y. Li *et al.*, 2019a; Song *et al.*, 2017; Zhou *et al.*, 2015). Cependant, cette méthode ne permet pas d'atteindre un niveau de discrimination suffisant pour rendre compte de la diversité microbienne ni d'identifier les espèces. Le premier article de la thèse a décrit pour la première fois les microbiotes des goutteurs alimentés avec des eaux usées traitées dans un contexte de reuse à l'échelle de la parcelle. Depuis de nouveaux articles ont été publiés par la même équipe avec les techniques moléculaires dont les objectifs étaient d'étudier l'effet de la chloration ou d'un traitement électromagnétique sur la mise en place du colmatage et sur sa composition microbienne (Hou et al., 2020; Song et al., 2019b; Xiao et al., 2020a, 2020b).

Concernant la recherche des contaminants microbiologiques, nous avons recherché dans un premier temps des genres incluant des espèces pathogènes. Cependant chaque genre ne contient pas que des espèces pathogènes. Le programme BLAST n'a permis d'identifier que quelques séquences au niveau taxonomique de l'espèce, et pour la majorité, il ne s'agissait pas d'espèces pathogènes. Bien que la méthode de métagénomique ciblée sur les gènes codant pour l'ADNr 16S et l'ADNr 18S soit très utile pour mettre en évidence les genres dominants dans un échantillon, elle ne permet pas l'identification des espèces pathogènes (Greay *et al.*, 2019). Des solutions existent telles que l'utilisation combinée des gènes codant pour l'ADNr 16S et de l'ADN 23S (Sabat *et al.*, 2017), la technologie PacBio (utilisation de plusieurs zones hypervariables du gène codant pour l'ADNr 16S) (Schloss *et al.*, 2016), le séquençage de plus longs fragments (Franzén *et al.*, 2015) ou encore l'utilisation d'une approche métagénomique globale (ou « Shotgun ») (Mohiuddin *et al.*, 2017). Pour compléter les données de séquençage, nous avons donc utilisé la quantification spécifique de quelques espèces pathogènes par qPCR et le séquençage intra- genre pour étudier la diversité des légionelles. Néanmoins, la recherche

de genres contenant des espèces pathogènes nous a permis de mettre en lumière des différences marquées entre ces différents genres concernant la colonisation des biofilms et l'influence des paramètres étudiés.

La méthode IDEXX utilisée ici pour quantifier les indicateurs est une méthode normée très utilisée et facile à mettre en place en routine. Pour autant, des études montrent que l'utilisation de cette méthode de culture pour rendre compte de la qualité de l'effluent après traitement peut donner des faux positifs et des faux négatifs (Vergine *et al.*, 2017). La détection de faux négatifs peut être due à des limitations techniques, le signal étant proche de la limite de quantification, ou à la perte de cultivabilité. Le concept d'état « viable mais non cultivable » (VBNC) a été introduit pour décrire les cellules qui restent métaboliquement actives, mais qui sont incapables de se diviser dans ou sur des milieux nutritionnels qui soutiennent normalement leurs croissances (Sagarduy *et al.*, 2019). Ces cellules ne sont donc pas détectées avec les méthodes de culture classiques, ce qui peut induire une sous-estimation du risque microbiologique. C'est pourquoi l'utilisation de technique en biologie moléculaire, indépendante de la notion de cultivabilité, permet de réduire cette incertitude. Par exemple, Lin *et al.*, (2016) ont mis en évidence une différence de plus de 2 log (*Salmonella*, *E. coli*) entre la quantification par culture et la méthode PCR quantitative. Dans nos travaux, nous avons noté que, globalement, les concentrations retrouvées dans les effluents en *E. coli* par la méthode IDEXX et par la qPCR étaient similaires, ce qui indique l'absence de VBNC pour cet indicateur dans les échantillons testés et que l'utilisation de la qPCR est aussi une technique valable pour le suivi de la qualité de l'effluent. Rapide et spécifique, la méthode qPCR pour la détection des agents pathogènes dans l'eau a été incluse dans certaines directives gouvernementales aux États-Unis (Varma *et al.*, 2009). Nous avons notamment utilisé cette technique pour étudier les pathogènes *Aeromonas hydrophila* et *Pseudomonas aeruginosa*.

La qPCR ne rend pas compte de la viabilité des cellules et peut conduire à des sur-estimations si l'ADN des cellules non viables n'est pas rapidement recyclé au sein du microbiote. Ainsi, il est difficile de déterminer le risque que peut représenter les concentrations en pathogènes mesurées par qPCR sans connaitre le « turn-over » des cellules non viables dans les biofilms. Afin de répondre à cette limite, des méthodes, couplées à la PCR quantitative ont été développées. Par exemple, une combinaison de la qPCR avec le traitement au monoazide de propidium (PMA) a permis dans plusieurs études la surveillance spécifique des bactéries cibles viables (Frankenhuyzen *et al.*, 2013; Yokomachi and Yaguchi, 2012) y compris dans un

contexte de réutilisation des eaux usées traitées pour l'irrigation. Le principe de ce couplage repose sur le fait de considérer qu'une cellule est viable dès lors que son intégrité membranaire est conservée. Le PMA va se fixer sur les ADNs « libres » issus de cellules dont l'intégrité membranaire est altérée, ce qui empêchera la quantification de ces ADNs par qPCR.

B. Dispositif optique

Avant ces travaux de thèse, les caractérisations physico-chimiques et biologiques des biofilms des goutteurs étaient réalisées en extrayant les goutteurs d'une conduite d'irrigation. L'extraction des goutteurs de la conduite d'irrigation est laborieuse et peut endommager le biofilm et affecter sa structure et composition. De plus, ceci ne permet pas de suivre les cinétiques de formation du biofilm étant donné que les goutteurs sont placés dans une conduite d'irrigation opaque noire. Pourtant avoir des dynamiques temporelles est nécessaire pour mieux comprendre les mécanismes sous-jacents au colmatage des goutteurs. Afin d'avoir une idée des cinétiques de formation des biofilms, il est possible d'utiliser des systèmes en flow-cell transparents dans lesquelles sont gravés des labyrinthes mimant la géométrie des labyrinthes des goutteurs (Ait-Mouheb *et al.*, 2018; Azeredo *et al.*, 2017; Qian *et al.*, 2017). Cependant, la conception de ces systèmes est coûteuse et le nombre de répliqua est limité. De plus, les caractéristiques physico-chimiques des matériaux utilisés pour la construction des flow-cells sont différentes des celles des goutteurs. Sachant que le type de matériaux et ses paramètres physico-chimiques influencent le développement des biofilms (Gamri *et al.*, 2015), l'utilisation de systèmes utilisant des goutteurs réels nous semblait le plus pertinent pour appréhender les mécanismes conduisant au colmatage. Ainsi, la conception du système optique a permis pour la première fois de suivre le développement du colmatage dans des goutteurs réels avec la méthode OCT. Cette méthode optique permet de suivre le développement des biofilms de manière non invasive et non destructive à l'échelle du millimètre, permettant d'avoir des informations spatiales globales sur la distribution du colmatage dans les labyrinthes des goutteurs.

Cependant, le dispositif possède des limitations. Le tube dans lequel était placé le goutteur était en PVC et donc d'un matériau et avec des propriétés de surface différentes (polyéthylène pour les goutteurs). Durant les expérimentations, nous avons noté qu'une partie du biofilm était attaché à la surface du tube plastique, ce qui a pu avoir un effet sur les cinétiques de formation des biofilms. De plus, nous avons observé que la composition microbienne des biofilms attachés au tube plastique était légèrement différente de celles des goutteurs. C'est pourquoi l'analyse

des résultats des communautés bactériennes s'est portée exclusivement sur celles associées directement au goutteur. L'idéal serait donc d'avoir un tube constitué du même matériau que celui des goutteurs et avec les mêmes propriétés de surface. Un autre point négatif de ce tube transparent est sa sensibilité à la chaleur. Pendant l'expérimentation sous la serre expérimentale (Expérimentation « Qualité »), nous avons observé que ce tube pouvait se dilater sous l'effet de la chaleur et ne plus permettre de plaquer le goutteur correctement contre le tube plastique transparent, ce qui est essentiel pour avoir un écoulement le plus proche de la réalité. Ces goutteurs n'ont pas été analysés, mais cette information a permis de mettre en avant que ce système était valide dans le cas d'expérimentation en laboratoire à température contrôlée plutôt que sur le terrain.

Combinée à la méthode de séquençage haut débit, la méthode OCT nous a permis pour la première fois de relier une cinétique de formation du colmatage à une communauté microbienne spécifique. Cependant, les cinétiques de formation des biofilms données par l'OCT ne corrèlent pas forcément avec les quantifications des bactéries (Expérimentation « Écoulement » où la quantité de biofilm augmente alors que la concentration en bactéries totales données par la concentration en ADNr 16S est constante). Ceci pourrait être dû au fait que le signal ADN prend en compte les cellules non viables. Cependant, les changements temporels des communautés valideraient l'approche moléculaire. La différence entre l'observation OCT et la concentration ADNr 16S est donc probablement liée au fait que l'OCT mesure à la fois les cellules et la matrice exopolymérique. Un des manques de la thèse est de ne pas avoir pu quantifier les EPS, qui aurait permis de relier les observations en OCT avec ces concentrations en ADN. Nous n'avons pas pu réaliser cette quantification due au volume trop faible de biofilm. Il faudrait pour cela augmenter le nombre de goutteurs analysés (entre 25-50) et regrouper ces goutteurs pour en analyser le contenu (Y. Li *et al.*, 2019a; Zhou *et al.*, 2013). Cependant, avec cette méthode, il ne serait pas possible de prendre en compte la variabilité observée en termes de volume de colmatage d'un goutteur à un autre. Une autre solution serait alors de coupler la méthode OCT à une méthode de marquage (Leitgeb and Baumann, 2018) permettant de déterminer la quantité en EPS *in situ* par spectrométrie par exemple.
Par ailleurs les premiers prélèvements des goutteurs étaient réalisés après environ 1 mois de fonctionnement. Étant donné que les concentrations en ADNr 16S n'augmentaient pas au cours du temps (Expérimentation « Écoulement »), il est probable que les biofilms avaient déjà atteint un stade de maturité avancé, bien que cela ne corresponde pas forcément à une chute des débits.

C’est pourquoi des prélèvements plus réguliers pendant la phase d’initiation sont à envisager afin de mieux comprendre la dynamique de colonisation des goutteurs.
Sachant que le colmatage d’origine chimique (p. ex. précipitation de sels) peut aussi influencer la formation des biofilms et inversement (Rizk, 2017), des études complémentaires sont aussi nécessaires pour qualifier et quantifier le colmatage physique, chimique et biologique pour dégager la part de chacune de ces origines dans le colmatage des goutteurs. Par exemple, Rizk *et al.*, (2017) ont utilisé la méthode de diffraction de rayons X (DRX) pour qualifier l’effet de l’hydrodynamique sur la composition et la mise en place du colmatage biologique et chimique.

C. Échelle expérimentale : approche terrain versus approche laboratoire

Les expérimentations visant à étudier le colmatage des systèmes d’irrigation goutte-à-goutte sont soit réalisées à l’échelle terrain, soit à l’échelle laboratoire. Les expérimentations à l’échelle laboratoire en condition contrôlée permettent d’étudier l’effet de paramètres spécifiques en minimisant l’influence d’autres paramètres. Pour autant, les résultats de ces expérimentations peuvent être à nuancer quand on sait que le développement des biofilms est multifactoriel. C’est pourquoi combiner les approches terrain et laboratoires est nécessaire pour mieux appréhender les mécanismes induisant le colmatage. Par exemple, au cours de ces experimentations, nous avons observé que les indices de diversité et de richesse de l’effluent supérieurs étaient tantôt supérieurs, tantôt inférieurs à ceux des biofilms des goutteurs. Ceci peut s’expliquer par le fait que la composition microbienne de l’effluent de la lagune va évoluer au cours du temps et sera dépendant des conditions abiotiques (températures, ensoleillement, etc.), influençant la sélection des bactéries de l’effluent traité et la composition des biofilms. Ainsi, l’analyse de la composition de l’effluent est à prendre en considération afin de mieux comprendre la mise en place des biofilms des les systems d’irrigation goutte-à-goutte.

Néanmoins, on observe que les phyla et genres majoritaires retrouvés dans les biofilms des goutteurs étaient communs aux quatre expérimentations, quelle que soit l’échelle d’étude. Ainsi, on retrouvait principalement les phyla Proteobacteria (dominé par les genres *Aquabacterium*, *Pseudomonas*, *Pseudoxanthomonas*) et Bacteroidetes (dominé par le genre *Terrimonas* principalement). Les résultats observés à l’échelle laboratoire sont donc cohérents avec les résultats de l’échelle terrain. Pour autant, il y avait quand même certaines différences liées à l’échelle d’étude (terrain ou laboratoire). Par exemple, les Firmicutes et les Thermotogae

étaient majoritairement présents dans les biofilms se développant dans les goutteurs placés sous la serre ou sur la parcelle expérimentale, bien que le type de goutteur utilisé soit différent (goutteur plat 1 $l.h^{-1}$ *versus* goutteur bouton 2 $l.h^{-1}$). Ces phyla incluent de nombreuses espèces bactériennes thermophiles capables de se développer dans les conditions de températures élevées. La température dans les tuyaux d'irrigation sur le terrain peut atteindre plus de 50 °C en été (Gamri *et al.*, 2015). À l'inverse, dans les expérimentations en laboratoire (20-25°C), ces deux phyla étaient moins représentées. Ainsi, le paramètre température semble jouer un rôle important dans la composition microbienne, mais également dans la formation des biofilms. Qian *et al.*, (2017) ont montré en simulant un cycle de température de 20-50°C en laboratoire que maintenir le système à 50 °C permettait de diminuer la quantité de biofilm de près de 50 % comparativement à des conditions de température à 20 °C. Bien que la différence n'est pas été quantifiée, nous avons également observé que les biofilms « terrain » soumis aux fortes températures sous la serre lors de l'expérimentation « Qualité » étaient moins épais que ceux des expérimentations en laboratoire (« Écoulement », « Nettoyage »). Ceci peut s'expliquer par le fait que la température pendant les expérimentations à l'échelle laboratoire était située entre 20-25°C tandis que la température sous la serre était plus élevée (jusqu'à 47 °C en journée). Il semble que la formation du biofilm mais également le microbiote dans les goutteurs soit fortement dépendante du facteur température et qu'il est nécessaire de prendre ce dernier en considération. L'irrigation goutte à goutte peut être utilisée toute l'année, mais le colmatage biologique sera certainement différent en fonction des conditions météorologiques.

Un autre point à prendre en considération est la longueur des systèmes et des conduites d'irrigation utilisés dans nos expérimentations. Effectivement, que ce soit sur le terrain ou à l'échelle laboratoire, le nombre de goutteurs (9 à 18 goutteurs par ligne d'irrigation) et la longueur des conduites (3 m pour l'expérimentation « Qualité », « Écoulement », « Nettoyage » ; 11 m pour l'expérimentation « Parcelle ») n'étaient pas représentatifs d'un système d'irrigation à l'échelle réelle. Plusieurs études ont rapporté que les goutteurs en fin de ligne d'irrigation se colmataient plus rapidement. Ainsi, des effets de position peuvent avoir lieu, mais n'ont pas été mis en évidence dans le cas de nos expérimentations, probablement dues à une longueur insuffisante de nos lignes d'irrigation. Pour autant, combiner les deux approches a permis de mettre en évidence des points communs et des différences entre les différentes échelles d'études.

III. ÉCOULEMENT, MICROBIOTE ET TRANSFERT DE MATIÈRE

A. Écoulement et microbiote

L'écoulement au sein d'un système d'irrigation goutte à goutte est différent suivant la zone dans laquelle on se situe (conduite ou goutteur par exemple). Nous avons pu montrer que le microbiote associé aux biofilms des conduites d'irrigation était différent de celui associé aux biofilms des goutteurs. Ceci peut s'expliquer par le fait que le régime de l'écoulement était laminaire dans la conduite alors qu'il était turbulent dans les goutteurs (Expérimentation Parcelle). L'effet de l'écoulement sur le microbiote des biofilms ainsi que sur les cinétiques et les volumes de biofilm a également été montré. Dans l'expérimentation « Écoulement », 3 types de goutteurs (1, 2 et 4 $l.h^{-1}$) avec des géométries de labyrinthes différentes ont été comparés. Au sein d'un labyrinthe, l'écoulement est hétérogène à cause de la géométrie du labyrinthe, avec une zone centrale où la vitesse et le taux de cisaillement sont élevés, et des zones où la vitesse et le taux de cisaillement sont plus faibles, correspondant aux zones de recirculation dans les chicanes (Ait-Mouheb *et al.*, 2018; Al-Muhammad *et al.*, 2019). Les résultats des analyses de la structure et de la composition des communautés microbiennes des biofilms ont montré que les microbiotes étaient influencés par les paramètres d'écoulement, et que les goutteurs avec une faible section et une vitesse d'entrée faible favorisaient la présence du phylum des Chloroflexi.

Le type d'écoulement influençait également la présence des bactéries pathogènes ciblées par qPCR, à savoir *Pseudomonas aeruginosa* et *Aeromonas hydrophila*. Ces pathogènes colonisaient préférentiellement les biofilms des goutteurs 1 $l.h^{-1}$ comparativement aux 4 $l.h^{-1}$. L'effet de l'écoulement, associé au type de goutteur, est donc à prendre en considération si l'on veut limiter le volume de biofilm ainsi que la présence de bactéries indésirables dans les biofilms du système.

Le microbiote des biofilms était fortement influencé par l'écoulement au sein des goutteurs. De plus, au sein même des goutteurs, il y a un écoulement hétérogène et des zones plus sensibles au colmatage que d'autres (entrée, retour, zones de recirculation). Il serait donc intéressant d'étudier le microbiote à une échelle plus localisée de manière à évaluer l'effet de cet écoulement hétérogène sur la répartition des communautés microbiennes le long d'un goutteur. Cela permettrait peut-être d'identifier que l'entrée, en plus d'être une zone sensible au colmatage, favorise également l'installation des certains phyla ou genres bactériens.

B. Écoulement et transfert de matière

Les zones les plus sensibles au colmatage pour les 3 types de goutteurs étaient la zone d'entrée, la zone de retour (quand elle existait, 1 et 2 $l.h^{-1}$), la fin du labyrinthe dans un moindre niveau. Au sein de ces trois zones, les coins des chicanes (zones de recirculation) constituent des points d'accumulation. Ces trois zones favorables au colmatage étaient également observées lors de l'étude portant sur l'effet de méthodes de nettoyage (chloration et/ou purge hydrique) pour limiter le colmatage (goutteur utilisé : 1 $l.h^{-1}$). En particulier, le colmatage commençait principalement au niveau de la première chicane d'entrée puis diminuait jusqu'à la zone de retour. Les études de simulation numérique de l'écoulement dans les labyrinthes des goutteurs montrent que l'écoulement en entrée n'est pas encore établi (Ait-Mouheb *et al.,* 2018; Al-Muhammad *et al.,* 2019). Concernant la zone de retour, les premières simulations de l'écoulement au niveau de la zone suggèrent que la vitesse et le cisaillement diminuent pour devenir similaires à ceux en entrée de labyrinthe. La diminution de ces paramètres peut alors faciliter l'adhésion des bactéries ainsi que le transfert des nutriments vers les biofilms (Araújo *et al.,* 2016). Pour autant, ce transfert sera favorisé jusqu'à une certaine limite. Par exemple, Li *et al.,* (2012) ont montré qu'en dessous de 0,45 $m.s^{-1}$ dans des conduites, la formation des biofilms était principalement contrôlée par le transport des nutriments et des particules en suspension. Au-dessus, c'est principalement le taux de cisaillement qui contrôle le développement des biofilms. De nombreuses études rapportent que les biofilms se développant sous vitesse et cisaillement faibles sont moins denses et plus poreux. Cette porosité va ainsi faciliter le transfert des nutriments dans le biofilm. À l'inverse, les biofilms se développant sous condition de vitesse et de cisaillement élevés sont plus denses et moins poreux (Wagner *et al.,* 2010). Aussi, une concentration élevée de nutriments favorise la croissance du biofilm, mais s'accompagne d'une force adhésive relativement faible (Liu *et al.,* 2019). On peut alors voir se dégager des liens entre hydrodynamique, croissance de biofilm et transfert de nutriment en fonction de la zone où l'on se trouve dans le labyrinthe. Au cours de ces travaux, bien que nous n'ayant pas qualifié et quantifié la densité et la porosité des biofilms des goutteurs, nous avons pu noter que les biofilms se développant dans les goutteurs 1 $l.h^{-1}$ semblaient visuellement moins denses et plus poreux que les biofilms des goutteurs 4 $l.h^{-1}$. L'analyse de la densité et de la porosité, en mesurant le nombre de pixels/voxels « vides » dans le biofilm, permettrait d'approfondir la compréhension de l'effet de l'écoulement sur la structure des biofilms et le

transfert des nutriments, comme proposé par Gierl *et al.*, (2020) et Rosenthal *et al.*, (2015). De plus, les biofilms ont des propriétés viscoélastiques qui leur permettent de se déformer afin de résister par exemple à des changements brusques dans les conditions hydrodynamiques (Picioreanu *et al.*, 2018). Ceci peut expliquer pourquoi, dans le cadre de l'expérimentation « Nettoyage », l'utilisation de la purge seule n'a pas eu d'effet sur le volume et la distribution du biofilm le long du labyrinthe ainsi que sur le microbiote des biofilms des goutteurs 1 $l.h^{-1}$ par rapport à la chloration.

Une étude approfondie de l'effet des conditions hydrodynamiques sur la distribution des nutriments en lien avec la formation des biofilms permettrait donc de mieux comprendre pourquoi ces biofilms se développent préférentiellement dans la zone d'entrée, de retour et dans les zones de recirculation. Cela souligne également que la présence d'une zone de retour n'est pas conseillée afin de limiter les risques de colmatage.

L'effet de l'écoulement sur le transfert de matière peut également expliquer l'effet de la chloration et de la purge sur la mise en place des biofilms dans les labyrinthes des goutteurs. Dans le cas de l'expérimentation » Nettoyage », la chloration était plus efficace que la purge pour limiter le colmatage des goutteurs notamment en réduisant le colmatage de la zone centrale, où la vitesse d'écoulement est plus importante. Ceci n'avait, à notre connaissance, pas été observé dans ces systèmes à écoulement complexe. Par contre, l'épaisseur du biofilm au niveau des zones de recirculation restait plus élevée, même avec la chloration, que dans la zone centrale. De nouveau, il est possible que l'hydrodynamique de la zone centrale favorise le transfert de matière du chlore vers le biofilm, expliquant ainsi sa réduction. À l'inverse, ce transfert était probablement réduit au niveau des zones de recirculation à cause des vitesses plus faibles et de l'épaisseur au niveau des zones de recirculations. L'étude du transfert du chlore à travers le biofilm dans les systèmes d'irrigation goutte à goutte permettrait de mieux comprendre l'effet du chlore ainsi que les mécanismes de résistance. Ceci pourrait être réalisé en utilisant des microélectrodes comme proposées par Lee, (2014) qui permettent de mesurer la diffusion du chlore dans le biofilm. Quoi qu'il en soit, l'utilisation conjointe de la chloration avec la purge hydrique était la solution la plus efficace pour limiter le développement du colmatage. Le dispositif développé pourrait également permettre d'évaluer le bénéfice de technologies de traitement de l'eau telles que l'ozonation et les traitements UV dont l'objectif est de réduire la charge en microorganismes, mais qui pourraient être avantageuses aussi pour la prévention du colmatage des goutteurs.

Un point à considérer également est l'effet du biofilm sur l'écoulement dans le labyrinthe. Effectivement, bien que l'écoulement initial module le développement des biofilms dans les goutteurs, les biofilms peuvent aussi modifier l'écoulement. Les biofilms peuvent augmenter la perte de charge due à la friction en raison de la réduction de la section d'écoulement et de la rugosité des biofilms (Dosoretz *et al.,* 2010; Shen *et al.,* 2015). Ainsi, il serait intéressant de relier la formation des biofilms observés avec la méthode OCT à la modélisation de l'écoulement dans le labyrinthe avec la formation des biofilms. Ceci permettrait d'améliorer les connaissances de l'effet du biofilm sur la perte des débits par exemple.

IV. LES PRINCIPAUX ACTEURS DU COLMATAGE BIOLOGIQUE DES GOUTTEURS

Bien que des différences soient observées entre les différentes échelles d'étude sur la composition des biofilms des goutteurs, certains phyla ou genres étaient systématiquement présents et dominants alors qu'ils étaient minoritaires dans les effluents. Par exemple, le genre *Aquabacterium* a été détecté dans la quasi-totalité des biofilms des goutteurs alimentés avec des eaux usées traitées. Certaines espèces appartenant au genre *Aquabacterium* sont retrouvées dans les biofilms se développant sur des surfaces plastiques (McCormick *et al.,* 2016) et possèdent des capacités à dégrader les plastiques (Kalmbach *et al.,* 2000). Le phylum des Chloroflexi était également minoritaire dans les effluents, mais majoritaire dans les biofilms des différentes expérimentations (excepté dans l'expérimentation « Nettoyage » dans les conditions chlorées). L'abondance relative de ce phylum augmentait au cours du temps avec l'augmentation du colmatage des goutteurs, mais était influencée par l'écoulement (Expérimentation « Écoulement »). Les Chloroflexi ont été identifiés comme majoritaires dans les récentes études utilisant la métagénomique pour l'étude du colmatage des systèmes membranaires pour le traitement des eaux usées (Rehman *et al.*, 2020), mais aussi dans les biofilms des goutteurs (Xiao *et al.*, 2020a). Le phylum des Chloroflexi est composé de nombreuses espèces filamenteuses dont la croissance serait liée à la présence de microorganismes méthanogènes hydrogénotrophes (Yamada and Sekiguchi, 2018a, 2018b). Kragelund *et al.,* (2007) ont aussi montré que les Chloroflexi produisaient un complexe enzymatique permettant d'utiliser les carbohydrates, lesquelles sont une part importante des EPS (Fish *et al.,* 2016). Comme nous avons pu le voir, le microbiote des biofilms des goutteurs est dynamique. La présence de microorganismes dans les premières phases de colonisation va

faciliter l'installation de nouveaux microorganismes par la synthèse de la matrice d'EPS, qui elle-même faciliterait l'installation du phylum des Chloroflexi. Dans l'expérimentation « Nettoyage », nous avons observé que les Chloroflexi étaient minoritaires, suggérant que ce phylum est sensible à la chloration. Néanmoins, la diminution du volume de biofilm, potentiellement du à la diminution des EPS pourrait également expliquer l'absence de ce phylum dans les biofilms des goutteurs chlorés. La chloration induisait une diminution de la diversité globale qui réaugmentait dès lors que la chloration était arrêtée, s'accompagnant de l'augmentation de l'abondance relative des Chloroflexi et du colmatage. Le phylum des Chloroflexi semble donc avoir un rôle clé dans le colmatage.

Les interactions avec d'autres types de microorganismes peuvent aussi expliquer les cinétiques du colmatage. Ainsi, d'autres microorganismes peuvent avoir l'effet inverse et permettre un contrôle de ce colmatage. Dans le chapitre « Nettoyage », un séquençage eucaryote a été réalisé afin d'avoir une description plus complète des microorganismes présents dans les biofilms des goutteurs. Plusieurs genres associés aux Ciliophora ont été identifiés. Les ciliés regroupent de nombreuses espèces de prédateurs bactériens. Les prédateurs, et notamment les protozoaires, sont des constituants courants des biofilms développés sur les systèmes alimentés avec des eaux usées. Derlon *et al.*, (2012) ont montré que la présence du prédateur *Tetrahymena pyriformis* augmentait la porosité et l'hétérogénéité du biofilm se développant sur une membrane (taille moyenne des pores 10 nm) alors que celui-ci était dense et épais en absence de prédation. Ils ont également noté que le flux passant à travers la membrane était 2 fois plus élevé en présence de prédateurs. Ainsi, ces prédateurs pourraient avoir rôle non négligeable dans le contrôle du colmatage des systèmes d'irrigation goutte-à-goutte.

Certaines questions concernant le rôle des Chloroflexi ou des prédateurs dans le développement des biofilms restent donc en suspens. L'utilisation d'autres méthodes omiques est alors à considérer afin de répondre à ces questions et d'améliorer les connaissances concernant le colmatage des goutteurs alimentés avec des eaux usées. Par exemple, l'analyse du protéome et/ou du transcriptome des biofilms peut permettre l'identification de marqueurs de gènes ou de protéomes appropriés ayant des fonctions pertinentes dans le développement et le fonctionnement du biofilm et pouvant potentiellement être utilisés en tant que marqueur du colmatage.

Un dernier point à considérer est le type de traitement de l'eau usée sur la composition microbienne de l'effluent et donc des goutteurs. L'eau usée utilisée au cours de ces travaux était traitée par lagunage. Étant donné que les caractéristiques physico-chimiques et biologiques sont fonction du traitement appliqué, il est probable que suivant le traitement utilisé pour traiter les eaux usées, la communauté bactérienne de l'effluent traitée, soit différente, impactant à la fois la mise en place du colmatage et le microbiote des biofilms s'installant dans le réseau. Il apparaît ainsi nécessaire de mener des recherches complémentaires quant à l'effet de la méthode de traitement des eaux usées sur la mise en place et la composition des biofilms des systèmes d'irrigation goutte à goutte afin de savoir s'il est possible de mettre en évidence des modèles génériques de colmatage des systèmes d'irrigation goutte-à-goutte alimenté avec des eaux usées.

V. COLMATAGE ET RISQUES SANITAIRES

A. Qualité de l'effluent et présence de pathogènes

La réutilisation des eaux usées traitées pour l'agriculture doit répondre à des normes sanitaires. Les pathogènes d'origine entérique (p. ex. *Salmonella*, *Campylobacter*, *Giardia*, *Ascaris*, Enterovirus) sont les contaminants microbiologiques principaux dans le contexte de la reuse. Sur les filières de traitement, deux types d'indicateurs sont utilisés pour deux objectifs : vérifier l'efficacité du traitement (indicateurs de traitement) et vérifier la maîtrise du risque microbiologique de l'eau distribuée par rapport aux usages définis (indicateurs de contamination fécale). L'indicateur biologique le plus utilisé est *E. coli*, mais il n'est pas considéré comme représentatif du devenir de l'ensemble des microorganismes pathogènes. La réglementation française en vigueur au cours de la thèse impose le suivi de trois autres indicateurs : les entérocoques, les spores de bactéries anaérobies sulfito-réductrices (BASR) et les virus bactériophages ARN-F spécifiques pour estimer la qualité des eaux dédiée à la REUT. Durant ce travail de thèse, nous avons choisi de travailler avec les indicateurs suivants : les coliformes, *E. coli* et les entérocoques. Les effluents hébergent également des pathogènes opportunistes pour lesquels la présence des biofilms dans le réseau d'irrigation peut constituer une niche favorable à leur développement. La thèse s'est donc efforcée de décrire les deux types de dangers : celui associé aux contaminations fécales, et celui associé au développement des opportunistes dans les biofilms.

B. Les biofilms : réservoirs à pathogènes ?

Le devenir des pathogènes opportunistes sur la filière d'irrigation avec des eaux usées traitées est peu regardé. Une récente étude a montré la présence de pathogènes opportunistes dans l'eau usée traitée ainsi qu'à la surface des cultures irriguées avec ces eaux avec des abondances supérieures à celle de l'effluent (Obayomi *et al.*, 2019b), suggérant un effet de la colonisation du réseau sur la contamination de la culture. Nous avons cherché à savoir si les biofilms étudiés dans la thèse contenaient des espèces pathogènes et à évaluer l'effet des paramètres étudiés sur leur devenir.

Nous avons mis en évidence dans les données de séquençage la présence de plusieurs genres bactériens incluant des espèces pathogènes tels que *Legionella, Pseudomonas, Aeromonas* ou encore *Stenotrophomonas* pour toutes les expérimentations. Bien que présents dans les effluents, certains colonisaient préférentiellement les goutteurs comme le genre *Pseudomonas* (Expérimentation « Écoulement »). Nous avons mis en évidence la présence de 2 espèces de légionelles pathogènes dans les biofilms des goutteurs (expérimentation « Écoulement » et « Nettoyage ») : *L. pneumophila* et *L. feeleii*, vecteurs de la fièvre de Pontiac. Bien qu'identifiée au travers d'un séquençage spécifique, les concentrations de *L. pneumophila* étaient sous les limites de détection de la qPCR dans les effluents et dans les biofilms des goutteurs, et ceci pour toutes les expérimentations. L'expérimentation « Nettoyage » a également mis en évidence que la diversité des OTUs affiliés à des genres incluant des espèces pathogènes était plus élevée dans les biofilms chlorés que dans les biofilms non chlorés, alors que l'inverse était obtenu pour la communauté bactérienne dans son ensemble. Plusieurs études ont mis en évidence que le développement des biofilms multi-espèces permettait de diminuer l'invasion de celui-ci par des microorganismes pathogènes (Mallon *et al.*, 2015; van Elsas *et al.*, 2012). Ainsi, les communautés diversifiées des biofilms des réseaux d'irrigation, bien que représentant un problème technique car favorisant le colmatage, pourraient limiter l'implantation d'espèces pathogènes. L'expérimentation « Nettoyage » renforce donc cette hypothèse. Pour autant, il est difficile de savoir si ce niveau de diversité est lié directement à l'effet de la chloration (résistance de ces genres plus élevée face à la chloration) mais l'hypothèse d'un effet bloquant des biofilms sur la réduction des bactéries pathogènes ne peut pas être écartée.

L'utilisation de la qPCR a permis de quantifier deux espèces de bactéries pathogènes opportunistes dans les biofilms des goutteurs, à savoir *Pseudomonas aeruginosa* (10^3-10^6 copies de gène/goutteur) et *Aeromonas hydrophila* (10^4-10^6 copies de gène/goutteur). Globalement, ces pathogènes n'étaient pas quantifiables dans l'effluent traité, mais l'étaient dans les biofilms des goutteurs tandis qu'*E. coli* ne l'était quasiment pas. Ceci indique aussi que *P. aeruginosa et A. hydrophila* colonisent préférentiellement le système et que le comportement des indicateurs de contamination fécale est différent de celui de ces pathogènes. Benami *et al.,* (2013) ont montré que les concentrations traitées pour l'irrigation étaient en moyenne de 10^3 copies de gene/100 ml. Obayomi *et al.,* (2019a) ont montré que les concentrations dans l'eau potable pour l'irrigation étaient de comprises entre 1 et 10^2 NPP/100 ml contre 10^1-10^4 NPP/100 ml dans les eaux usées traitées (traitement par boues activées) pour l'irrigation. Fernandez-Cassi *et al.,* (2016) ont quantifié *Aeromonas* spp. à 2.10^5 NPP/100 ml en moyenne dans les eaux usées traitées par lagunage pour l'irrigation. Ainsi, les concentrations de *P. aeruginosa* et *A. hydrophila* dans les eaux usées traitées quantifiées par qPCR dans cette étude étaient semblables à celles retrouvées dans des études sur des eaux urbaines traitées par d'autres types de traitement.

Nous avons observé que le volume de colmatage dans les goutteurs $1lh^{-1}$ qui sont les plus sensibles au colmatage alternait avec des phases de croissances et de décroissance, suggérant un détachement du biofilm. Le détachement des biofilms colonisant un système peut dégrader la qualité de l'eau au point d'usage (Pachepsky *et al.,* 2012). La présence de pathogènes dans les biofilms étant démontrée, l'impact sur la qualité microbiologique en sortie reste à approfondir. Durant les expérimentations « qualité » et « nettoyage », des prélèvements en sortie de goutteurs ont été réalisés pour explorer l'effet de la colonisation du système sur la qualité de l'eau sortant. Globalement, les concentrations en indicateurs et espèces pathogènes en entrée étaient similaires à celles en sortie de système. Pour autant, nous avons observé que les concentrations de *P. aeruginosa* en sortie de goutteurs pouvaient être supérieures à l'effluent en entrée (Expérimentation « Qualité »). Ceci peut être lié à un relargage des bactéries présentes dans les biofilms ou au détachement du biofilm colonisant le système. Cependant ce relargage pourrait être un effet du traitement et il reste à démontrer l'importance des épisodes de détachements « hors traitement » sur l'effluent en sortie de goutteur. C'est pourquoi un suivi en ligne du détachement serait à prendre en considération afin de savoir si effectivement, les biofilms se développant dans ces systèmes peuvent représenter un risque.

Bien que non étudié durant ces travaux de thèse, le virome peut également avoir un effet sur la composition des biofilms. On sait que les virus sont très abondants dans les stations d'épuration des eaux usées, avec environ 10^8 à 10^{10} particules virales par ml dans les eaux usées (Tamaki *et al.*, 2012). Certains virus retrouvés dans les eaux usées correspondent à des taxons hôtes spécifiques (Rusiñol *et al.*, 2020). La composition de la communauté bactérienne peut donc influencer la structure de la communauté virale, et simultanément, les virus peuvent influencer les communautés bactériennes en provoquant une mortalité bactérienne (Fuhrman and Schwalbach, 2003). Les récents évènements liés à la pandémie du virus SARS-CoV-2 posent de nouvelles questions d'ordre sanitaire compte tenu de la réutilisation des eaux usées traitées pour l'agriculture (Oliver *et al.*, 2020). C'est pourquoi le virome doit également être considéré, notamment dans le cas de la colonisation des systèmes d'irrigation par les biofilms, qui peuvent être un réservoir potentiel.

VI. CONCLUSION

Les expérimentations menées au cours de ces travaux de doctorat ont permis de répondre à plusieurs questions et d'améliorer la compréhension de la formation et de la composition du colmatage biologique des goutteurs dans un contexte de réutilisation des eaux usées traitées pour l'irrigation. Ainsi, il a été montré l'importance de l'écoulement dans la mise en place des biofilms et sur le microbioteassocié. Il a également été montré que l'association combinée de la chloration avec la purge permettait de limiter le colmatage, mais qu'elle favorisait le maintien de groupes bactériens résistants. La présence d'espèces pathogènes dans les biofilms du réseau a aussi été confirmée.

Pour autant, comme dans tout travail de recherche, répondre à des questions est source de nouvelles interrogations. Ainsi, des expérimentations à des échelles plus localisées sont nécessaires pour mieux comprendre l'effet de l'écoulement sur la formation ces biofilms. L'influence du microbiote des biofilms dans son ensemble (bactéries, eucaryote, virus) et de la présence des pathogènes sur la qualité microbiologique de l'eau au point d'usage reste également à confirmer.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES[7]

Abecasis, A.B., Serrano, M., Alves, R., Quintais, L., Pereira-Leal, J.B., Henriques, A.O., 2013. A genomic signature and the identification of new sporulation genes. J. Bacteriol. 195, 2101–2115. https://doi.org/10.1128/JB.02110-12

Abusam, A., Al-anzi, B., 2011. Comparison between the irrigation qualities of conventional tertiary and UF + RO advanced treated wastewaters 2, 526–532. https://doi.org/10.4236/as.2011.24068

Achinas, S., Charalampogiannis, N., Euverink, G.J.W., 2019. A brief recap of microbial adhesion and biofilms. Appl. Sci. 9, 1–15. https://doi.org/10.3390/app9142801

Adegoke, A.A., Amoah, I.D., Stenström, T.A., Verbyla, M.E., Mihelcic, J.R., 2018. Epidemiological evidence and health risks associated with agricultural reuse of partially treated and untreated wastewater: A review. Front. Public Heal. 6, 1–20. https://doi.org/10.3389/fpubh.2018.00337

Adin, A., Sacks, M., 1991. Dripper-clogging factors in wasterwater irrigation. J. Irrig. Drain. Eng. 117, 813–826.

Ait-mouheb, N., Mayaux, P., Mateo-sagasta, J., Hartani, T., 2020. Water Reuse : a resource for Mediterranean Agriculture. Water Resour. Mediterr. Reg. 1–25.

Ait-Mouheb, N., Schillings, J., Al-Muhammad, J., Bendoula, R., Tomas, S., Amielh, M., Anselmet, F., 2018. Impact of hydrodynamics on clay particle deposition and biofilm development in a labyrinth-channel dripper. Irrig. Sci. 0, 0. https://doi.org/10.1007/s00271-018-0595-7

Ajithkumar, B., Ajithkumar, V.P., Iriye, R., Doi, Y., Sakai, T., 2003. Spore-forming Serratia marcescens subsp. sakuensis subsp. nov., isolated from a domestic wastewater treatment tank. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 53, 253–258. https://doi.org/10.1099/ijs.0.02158-0

Al-Jassim, N., Ansari, M.I., Harb, M., Hong, P.-Y.Y., 2015. Removal of bacterial contaminants and antibiotic resistance genes by conventional wastewater treatment processes in Saudi Arabia: Is the treated wastewater safe to reuse for agricultural irrigation? Water Res. 73, 277–290. https://doi.org/10.1016/j.watres.2015.01.036

Al-Muhammad, J., 2016. Flow in millimetric-channel: numerical and experimental study. Ecole centrale de Marseille.

[7] Pour les références citées dans les articles **publiées**, veuillez-vous référer directement à l'article.

Al-Muhammad, J., Tomas, S., Ait-Mouheb, N., Amielh, M., Anselmet, F., 2019. Experimental and numerical characterization of the vortex zones along a labyrinth milli-channel used in drip irrigation. Int. J. Heat Fluid Flow 80, 108500. https://doi.org/10.1016/j.ijheatfluidflow.2019.108500

Al-Muhammad, J., Tomas, S., Anselmet, F., 2016. Modeling a weak turbulent flow in a narrow and wavy channel: case of micro-irrigation. Irrig. Sci. 34, 361–377. https://doi.org/10.1007/s00271-016-0508-6

Al-Nakshabandi, G.A., Saqqar, M.M., Shatanawi, M.R., Fayyad, M., Al-Horani, H., 1997. Some environmental problems associated with the use of treated wastewater for irrigation in Jordan. Agric. Water Manag. 34, 81–94. https://doi.org/10.1016/S0378-3774(96)01287-5

Alkhamisi, S.A., Abdelrahman, H.A., Ahmed, M., Goosen, M.F.A., 2011. Assessment of reclaimed water irrigation on growth, yield, and water-use efficiency of forage crops. Appl. Water Sci. 1, 57–65. https://doi.org/10.1007/s13201-011-0009-y

Allison, S.D., Martiny, J.B.H., 2009. Resistance, resilience, and redundancy in microbial communities. Light Evol. 2, 149–166. https://doi.org/10.17226/12501

Almuktar, S.A.A.A.N., Scholz, M., Sani, A., 2015. Recycling of domestic wastewater treated by vertical-flow wetlands for irrigating Chillies and Sweet Peppers. Agric. Water Manag. 149, 1–22. https://doi.org/10.1016/j.agwat.2014.10.025

Amoah, I.D., Adegoke, A.A., Stenström, T.A., 2018. Soil-transmitted helminth infections associated with wastewater and sludge reuse: a review of current evidence. Trop. Med. Int. Heal. 23, 692–703. https://doi.org/10.1111/tmi.13076

ANSES, 2012. Réutilisation des eaux usées traitées pour l'irrigation des cultures, l'arrosage des espaces verts per aspersion et lavage des voiries. Avis l'Anses 33.

Aquarec, 2007. Work Package 2: Guideline for Quality Standards for Water Reuse in Europe.

Araújo, P.A., Malheiro, J., Machado, I., Mergulhão, F., Melo, L., Simões, M., 2016. Influence of Flow Velocity on the Characteristics of Pseudomonas fluorescens Biofilms. J. Environ. Eng. 142, 4016031. https://doi.org/10.1061/(ASCE)EE.1943-7870.0001068

Assress, H.A., Selvarajan, R., Nyoni, H., Ntushelo, K., Mamba, B.B., Msagati, T.A.M., 2019. Diversity, Co-occurrence and Implications of Fungal Communities in Wastewater Treatment Plants. Sci. Rep. 9, 1–15. https://doi.org/10.1038/s41598-019-50624-z

Augspurger, C., Ku, K., 2010. Flow velocity and primary production influences carbon utilization in nascent epilithic stream biofilms 237–243. https://doi.org/10.1007/s00027-

009-0126-y

Aujla, M.S., Thind, H.S., Buttar, G.S., 2007. Fruit yield and water use efficiency of eggplant (Solanum melongema L.) as influenced by different quantities of nitrogen and water applied through drip and furrow irrigation. Sci. Hortic. (Amsterdam). 112, 142–148. https://doi.org/10.1016/j.scienta.2006.12.020

Ayers, R., Wescot, D.W., 1976. Water quality for agriculture, in: Science, E. (Ed.), Environmental Science. Environmental Science.

Azeredo, J., Azevedo, N.F., Briandet, R., Cerca, N., Coenye, T., Costa, A.R., Desvaux, M., Di Bonaventura, G., Hébraud, M., Jaglic, Z., Kačániová, M., Knøchel, S., Lourenço, A., Mergulhão, F., Meyer, R.L., Nychas, G., Simões, M., Tresse, O., Sternberg, C., 2017. Critical review on biofilm methods. Crit. Rev. Microbiol. 43, 313–351. https://doi.org/10.1080/1040841X.2016.1208146

Baeza, R., Contreras, J.I., 2020. Evaluation of Thirty-Eight Models of Drippers Using Reclaimed Water: Effect on Distribution Uniformity and Emitter Clogging. Water 12, 1463. https://doi.org/10.3390/w12051463

Bai, X., Xi, C., Wu, J., 2016. Survival of Helicobacter pylori in the wastewater treatment process and the receiving river in Michigan, USA. J. Water Health 14, 692–698. https://doi.org/10.2166/wh.2016.259

Balczun, C., Scheid, P.L., 2017. Free-living amoebae as hosts for and vectors of intracellular microorganisms with public health significance. Viruses 9. https://doi.org/10.3390/v9040065

Banting, G.S., Braithwaite, S., Scott, C., Kim, J., Jeon, B., Ashbolt, N., Ruecker, N., Tymensen, L., Charest, J., Pintar, K., Checkley, S., Neumanna, N.F., 2016. Evaluation of various Campylobacter-specific quantitative PCR (qPCR) assays for detection and enumeration of Campylobacteraceae in irrigation water and wastewater via a miniaturized most-probable-number-qPCR assay. Appl. Environ. Microbiol. 82, 4743–4756. https://doi.org/10.1128/AEM.00077-16

Barceló, Damià, Petrovic, M., 2011. Waste Water Treatment and Reuse in the Mediterranean Region.

Barker, J., Brown, M.R.W., 1994. Trojan Horses of the microbial world: protozoa and the survival of bacterial pathogens in the environment. Microbiology 140, 1253–1259. https://doi.org/https://doi.org/10.1099/00221287-140-6-1253

Barreto, A.N., do Nascimento, J.J.V.R., de Medeiros, E.P., da Nóbrega, J.A., Bezerra, J.R.C.,

2013. Changes in chemical attributes of a Fluvent cultivated with castor bean and irrigated with wastewater. Rev. Bras. Eng. Agric. e Ambient. 17, 480–486. https://doi.org/10.1590/S1415-43662013000500003

Batista, R., Soares, A., Marin, O., Souza, J., Sartori, M., Batista, R., 2009. Efficiency of chemical treatments in preventing the clogging of drippers by applying treated sanitary sewerage. DYNA 76, 149–157.

Becerra-Castro, C., Lopes, A.R., Vaz-Moreira, I., Silva, E.F., Manaia, C.M., Nunes, O.C., 2015. Wastewater reuse in irrigation: A microbiological perspective on implications in soil fertility and human and environmental health. Environ. Int. 75, 117–135. https://doi.org/10.1016/j.envint.2014.11.001

Beer, D.D.E., Stoodley, P., 2006. Microbial Biofilms. https://doi.org/10.1007/0-387-30741-9

Behnke, S., Camper, A.K., 2012. Chlorine dioxide disinfection of single and dual species biofilms, detached biofilm and planktonic cells. Biofouling 28, 635–647. https://doi.org/10.1080/08927014.2012.700705

Benami, M., Gross, A., Herzberg, M., Orlofsky, E., Vonshak, A., Gillor, O., 2013. Assessment of pathogenic bacteria in treated graywater and irrigated soils. Sci. Total Environ. 458–460, 298–302. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2013.04.023

Benouniche, M., Kuper, M., Hammani, A., Boesveld, H., 2014. Making the user visible: analysing irrigation practices and farmers' logic to explain actual drip irrigation performance. Irrig. Sci. 32, 405–420. https://doi.org/10.1007/s00271-014-0438-0

Bentley, D.R., Balasubramanian, S., Swerdlow, H.P., Smith, G.P., Milton, J., Brown, C.G., Hall, K.P., Evers, D.J., Barnes, C.L., Bignell, H.R., Boutell, J.M., Bryant, J., Carter, R.J., Keira Cheetham, R., Cox, A.J., Ellis, D.J., Flatbush, M.R., Gormley, N.A., Humphray, S.J., Irving, L.J., Karbelashvili, M.S., Kirk, S.M., Li, H., Liu, X., Maisinger, K.S., Murray, L.J., Obradovic, B., Ost, T., Parkinson, M.L., Pratt, M.R., Rasolonjatovo, I.M.J., Reed, M.T., Rigatti, R., Rodighiero, C., Ross, M.T., Sabot, A., Sankar, S. V, Scally, A., Schroth, G.P., Smith, M.E., Smith, V.P., Spiridou, A., Torrance, P.E., Tzonev, S.S., Vermaas, E.H., Walter, K., Wu, X., Zhang, L., Alam, M.D., Anastasi, C., Aniebo, I.C., Bailey, D.M.D., Bancarz, I.R., Banerjee, S., Barbour, S.G., Baybayan, P.A., Benoit, V.A., Benson, K.F., Bevis, C., Black, P.J., Boodhun, A., Brennan, J.S., Bridgham, J.A., Brown, R.C., Brown, A.A., Buermann, D.H., Bundu, A.A., Burrows, J.C., Carter, N.P., Castillo, N., Chiara E. Catenazzi, M., Chang, S., Neil Cooley, R., Crake, N.R., Dada, O.O., Diakoumakos, K.D., Dominguez-Fernandez, B., Earnshaw, D.J., Egbujor, U.C.,

Elmore, D.W., Etchin, S.S., Ewan, M.R., Fedurco, M., Fraser, L.J., Fuentes Fajardo, K. V, Scott Furey, W., George, D., Gietzen, K.J., Goddard, C.P., Golda, G.S., Granieri, P.A., Green, D.E., Gustafson, D.L., Hansen, N.F., Harnish, K., Haudenschild, C.D., Heyer, N.I., Hims, M.M., Ho, J.T., Horgan, A.M., Hoschler, K., Hurwitz, S., Ivanov, D. V, Johnson, M.Q., James, T., Huw Jones, T.A., Kang, G.-D., Kerelska, T.H., Kersey, A.D., Khrebtukova, I., Kindwall, A.P., Kingsbury, Z., Kokko-Gonzales, P.I., Kumar, A., Laurent, M.A., Lawley, C.T., Lee, S.E., Lee, X., Liao, A.K., Loch, J.A., Lok, M., Luo, S., Mammen, R.M., Martin, J.W., McCauley, P.G., McNitt, P., Mehta, P., Moon, K.W., Mullens, J.W., Newington, T., Ning, Z., Ling Ng, B., Novo, S.M., O'Neill, M.J., Osborne, M.A., Osnowski, A., Ostadan, O., Paraschos, L.L., Pickering, L., Pike, A.C., Pike, A.C., Chris Pinkard, D., Pliskin, D.P., Podhasky, J., Quijano, V.J., Raczy, C., Rae, V.H., Rawlings, S.R., Chiva Rodriguez, A., Roe, P.M., Rogers, J., Rogert Bacigalupo, M.C., Romanov, N., Romieu, A., Roth, R.K., Rourke, N.J., Ruediger, S.T., Rusman, E., Sanches-Kuiper, R.M., Schenker, M.R., Seoane, J.M., Shaw, R.J., Shiver, M.K., Short, S.W., Sizto, N.L., Sluis, J.P., Smith, M.A., Ernest Sohna Sohna, J., Spence, E.J., Stevens, K., Sutton, N., Szajkowski, L., Tregidgo, C.L., Turcatti, G., vandeVondele, S., Verhovsky, Y., Virk, S.M., Wakelin, S., Walcott, G.C., Wang, J., Worsley, G.J., Yan, J., Yau, L., Zuerlein, M., Rogers, J., Mullikin, J.C., Hurles, M.E., McCooke, N.J., West, J.S., Oaks, F.L., Lundberg, P.L., Klenerman, D., Durbin, R., Smith, A.J., 2008. Accurate whole human genome sequencing using reversible terminator chemistry. Nature 456, 53–59. https://doi.org/10.1038/nature07517

Bertelli, C., Courtois, S., Rosikiewicz, M., Piriou, P., Aeby, S., Robert, S., Loret, J.F., Greub, G., 2018. Reduced chlorine in drinking water distribution systems impacts bacterial biodiversity in biofilms. Front. Microbiol. 9, 1–11. https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02520

Beyenal, H., Lewandowski, Z., 2002. Internal and external mass transfer in biofilms grown at various flow velocities. Biotechnol. Prog. 18, 55–61. https://doi.org/10.1021/bp010129s

Biswas, K., Turner, S.J., 2012. Microbial community composition and dynamics of moving bed biofilm reactor systems treating municipal sewage. Appl. Environ. Microbiol. 78, 855–864. https://doi.org/10.1128/AEM.06570-11

Bixio, D., Wintgens, T., 2006. Water Reuse System Management Manual Aquarec. European Commission: Brussels, Belgium.

Bjorneberg, D.L., 2013. IRRIGATION | Methods, Reference Module in Earth Systems and

Environmental Sciences. Elsevier Inc. https://doi.org/10.1016/b978-0-12-409548-9.05195-2

Blauert, F., Horn, H., Wagner, M., 2015. Time-resolved biofilm deformation measurements using optical coherence tomography. Biotechnol. Bioeng. 112, 1893–1905. https://doi.org/10.1002/bit.25590

Blumenthal, U.J., Mara, D.D., Peasey, A., Ruiz-Palacios, G., Stott, R., 2000. Guidelines for the microbiological quality of treated wastewater used in agriculture: Recommendations for revising WHO guidelines. Bull. World Health Organ. 78, 1104–1116. https://doi.org/10.1590/S0042-96862000000900006

Böhme, A., Risse-Buhl, U., Küsel, K., 2009. Protists with different feeding modes change biofilm morphology. FEMS Microbiol. Ecol. 69, 158–169. https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2009.00710.x

Bouma, B.., Tearney, G.., 2002. Hankbook of Optical Coherence Tomography, 2001st ed.

Bounoua, S., Tomas, S., Labille, J., Molle, B., Granier, J., Haldenwang, P., Izzati, S.N., 2016. Understanding physical clogging in drip irrigation: in situ, in-lab and numerical approaches. Irrig. Sci. 34, 327–342. https://doi.org/10.1007/s00271-016-0506-8

Boutin, C., Héduit, A., Helmer, J., 2009. Technologies d'épuration en vue d'une réutilisation des eaux usées traitées (REUT) Rapport final, Convention de partenariat ONEMA-Cemagref 2008; action 28 : "Réutilisation des eaux traitées."

Brissaud, F., Blin, E., Hemous, S., Garrelly, L., 2008. Water reuse for urban landscape irrigation: Aspersion and health related regulations. Water Sci. Technol. 57, 781–787. https://doi.org/10.2166/wst.2008.162

Brooke, J.S., 2012. Stenotrophomonas maltophilia: An emerging global opportunistic pathogen. Clin. Microbiol. Rev. 25, 2–41. https://doi.org/10.1128/CMR.00019-11

Brunke, M., Gonser, T., 1997. The ecological significance of exchange processes between rivers and groundwater. Freshw. Biol. 37, 1–33. https://doi.org/10.1046/j.1365-2427.1997.00143.x

Bucks, D.A., Nakayama, F.S., Gilbert, R.G., 1979. Trickle irrigation water quality and preventive maintenance. Agric. Water Manag. 2, 149–162. https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/0378-3774(79)90028-3

Busscher, H.J., Van Der Mei, H.C., 2006. Microbial adhesion in flow displacement systems. Clin. Microbiol. Rev. 19, 127–141. https://doi.org/10.1128/CMR.19.1.127-141.2006

Cai, L., Wu, D., Xia, J., Shi, H., Kim, H., 2019. Influence of physicochemical surface

properties on the adhesion of bacteria onto four types of plastics. Sci. Total Environ. 671, 1101–1107. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.03.434

Campaoré, M.L., 2006. Panorama des techniques d'irrigation etéléments de choix, in: Tiercelin, J.-R., Vidal, A. (Eds.), Traitée d'Irrigation. Lavoisier, Paris, pp. 489–512.

Candela, L., Fabregat, S., Josa, A., Suriol, J., Vigués, N., Mas, J., 2007. Assessment of soil and groundwater impacts by treated urban wastewater reuse. A case study: Application in a golf course (Girona, Spain). Sci. Total Environ. 374, 26–35. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2006.12.028

Capra, A., Scicolone, B., 2007. Recycling of poor quality urban wastewater by drip irrigation systems. J. Clean. Prod. 15, 1529–1534. https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2006.07.032

Capra, A., Scicolone, B., 2005. Assessing dripper clogging and filtering performance using municipal wastewater. Irrig. Drain. 54, S71–S79. https://doi.org/10.1002/ird.187

Capra, A., Scicolone, B., 2004. Emitter and filter tests for wastewater reuse by drip irrigation. Agric. Water Manag. 68, 135–149. https://doi.org/10.1016/j.agwat.2004.03.005

Capra, A., Scicolone, B., 1998. Water Quality and Distribution Uniformity in Drip/Trickle Irrigation Systems. J. Agric. Eng. Res. 70, 355–365. https://doi.org/10.1006/jaer.1998.0287

Cararo, D.C., Botrel, T.A., Hills, D.J., Leverenz, H.L., 2006. Analysis of clogging in drip emitters during wastewater irrigation. Appl. Eng. Agric. 22, 251–257. https://doi.org/10.13031/2013.20286

Carre, E., 2017. Qualité biologique des eaux usées traitées en vue de la réutilisation. Université de Lyon.

Carter, L.J., Chefetz, B., Abdeen, Z., Boxall, A.B.A., 2019. Emerging investigator series: Towards a framework for establishing the impacts of pharmaceuticals in wastewater irrigation systems on agro-ecosystems and human health. Environ. Sci. Process. Impacts 21, 605–622. https://doi.org/10.1039/c9em00020h

Cateau, E., Maisonneuve, E., Peguilhan, S., Quellard, N., Hechard, Y., Rodier, M.-H., 2014. Stenotrophomonas maltophilia and Vermamoeba vermiformis relationships: Bacterial multiplication and protection in amoebal-derived structures. Res. Microbiol. 165, 847–851. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.resmic.2014.10.004

Cervero-Aragó, S., Sommer, R., Araujo, R.M., 2014. Effect of UV irradiation (253.7 nm) on free Legionella and Legionella associated with its amoebae hosts. Water Res. 67, 299–309. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.watres.2014.09.023

Chahal, C., van den Akker, B., Young, F., Franco, C., Blackbeard, J., Monis, P., 2016. Pathogen and Particle Associations in Wastewater: Significance and Implications for Treatment and Disinfection Processes, Advances in Applied Microbiology. Elsevier Ltd. https://doi.org/10.1016/bs.aambs.2016.08.001

Chao, A., 1984. Non-parametric estimation of the classes in a population. Scand. J. Stat. 11, 265–270. https://doi.org/10.2307/4615964

Chauhdary, J.N., Bakhsh, A., Ahmad, N., Mehmood, K., 2015. Optimizing chlorine use for improving performance of drip irrigation system under biologically contaminated water source. Pakistan J. Agric. Sci. 52, 829–835.

Chee-Sanford, J.C., Mackie, R.I., Koike, S., Krapac, I.G., Lin, Y.-F., Yannarell, A.C., Maxwell, S., Aminov, R.I., 2009. Fate and Transport of Antibiotic Residues and Antibiotic Resistance Genes following Land Application of Manure Waste. J. Environ. Qual. 38, 1086–1108. https://doi.org/10.2134/jeq2008.0128

Chen, C.-L., Liu, W.-T., Chong, M.-L., Wong, M.-T., Ong, S.L., Seah, H., Ng, W.J., 2004. Community structure of microbial biofilms associated with membrane-based water purification processes as revealed using a polyphasic approach. Appl. Microbiol. Biotechnol. 63, 466–473. https://doi.org/10.1007/s00253-003-1286-7

Chen, M.J., Zhang, Z., Bott, T.R., 2005. Effects of operating conditions on the adhesive strength of Pseudomonas fluorescens biofilms in tubes. Colloids Surfaces B Biointerfaces 43, 61–71. https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2005.04.004

Choi, S., Lee, S., Kim, T.H., Chung, J., Choo, E.J., Kwak, Y.G., Kim, M., Kim, Y.S., Woo, J.H., Ryu, J., Kim, N.J., 2004. Clinical Features and Outcomes of Bacteremia Caused by Enterococcus casseliflavus and Enterococcus gallinarum: Analysis of 56 Cases . Clin. Infect. Dis. 38, 53–61. https://doi.org/10.1086/380452

Choi, Y.C., Morgenroth, E., 2003. Monitoring biofilm detachment under dynamic changes in shear stress using laser-based particle size analysis and mass fractionation. Water Sci. Technol. 47, 69–76.

Chu, D., 2018. Effects of heavy metals on soil microbial community. IOP Conf. Ser. Earth Environ. Sci. 113. https://doi.org/10.1088/1755-1315/113/1/012009

Cirelli, G.L., Consoli, S., Licciardello, F., Aiello, R., Giuffrida, F., Leonardi, C., 2012. Treated municipal wastewater reuse in vegetable production. Agric. Water Manag. 104, 163–170. https://doi.org/10.1016/j.agwat.2011.12.011

Claesson, M.J., Wang, Q., O'Sullivan, O., Greene-Diniz, R., Cole, J.R., Ross, R.P., O'Toole,

P.W., 2010. Comparison of two next-generation sequencing technologies for resolving highly complex microbiota composition using tandem variable 16S rRNA gene regions. Nucleic Acids Res. 38, e200–e200. https://doi.org/10.1093/nar/gkq873

Clarke, K.R., 1993. Non-parametric multivariate analyses of changes in community structure. Aust. J. Ecol. 18, 117–143. https://doi.org/10.1071/WR9840181

Clivot, H., Cornut, J., Chauvet, E., Elger, A., Poupin, P., Guérold, F., Pagnout, C., 2014. Leaf-associated fungal diversity in acidified streams: Insights from combining traditional and molecular approaches. Environ. Microbiol. 16, 2145–2156. https://doi.org/10.1111/1462-2920.12245

Clivot, H., Danger, M., Pagnout, C., Wagner, P., Rousselle, P., Poupin, P., Guérold, F., 2013. Impaired Leaf Litter Processing in Acidified Streams: Learning from Microbial Enzyme Activities. Microb. Ecol. 65, 1–11. https://doi.org/10.1007/s00248-012-0107-x

Cofie, O., Nikiema, J., Impraim, R., Adamtey, N., Paul, J., Kone, D., 2016. Co-composting of Solid Waste and Fecal Sludge for Nutrient and Organic Matter Recovery, Internation Water Management Institute. https://doi.org/10.5337/2016.204

Corcoran, E., Nellemann, C., Baker, E., Bos, R., Osborn, D., Savelli, H., 2010. Sick Water? The Central Role of Wastewater Management in Sustainable Development: A Rapid Response Assessment, Mine Water and the Environment. Earthprint: Arendal, Norway.

Correa, P.A., Lin, L.S., Just, C.L., Hu, D., Hornbuckle, K.C., Schnoor, J.L., Van Aken, B., 2010. The effects of individual PCB congeners on the soil bacterial community structure and the abundance of biphenyl dioxygenase genes. Environ. Int. 36, 901–906. https://doi.org/10.1016/j.envint.2009.07.015

Costerton, J., 1995. Overview of microbial biofilms. J. Ind. Microbiol. 15, 137–140. https://doi.org/10.1007/BF01569816

Couture, I., 2006. Principaux critères pour évaluer la qualité de l ’ eau en micro-irrigation.

Cui, B., Liang, S., 2019. Monitoring Opportunistic Pathogens in Domestic Wastewater from a Pilot-Scale Anaerobic Biofilm Reactor to Reuse in Agricultural Irrigation. Water 11, 1283. https://doi.org/10.3390/w11061283

Darouich, H.M., Pedras, C.M.G., Gonçalves, J.M., Pereira, L.S., 2014. Drip vs. surface irrigation: A comparison focussing on water saving and economic returns using multicriteria analysis applied to cotton. Biosyst. Eng. 122, 74–90. https://doi.org/10.1016/j.biosystemseng.2014.03.010

Davies-Colley, R.J., Craggs, R.J., Park, J., Sukias, J.P.S., Nagels, J.W., Stott, R., 2005. Virus

removal in a pilot-scale “advanced” pond system as indicated by somatic and F-RNA bacteriophages. Water Sci. Technol. a J. Int. Assoc. Water Pollut. Res. 51, 107–110.

De-la-Pinta, I., Cobos, M., Ibarretxe, J., Montoya, E., Eraso, E., Guraya, T., Quindós, G., 2019. Effect of biomaterials hydrophobicity and roughness on biofilm development. J. Mater. Sci. Mater. Med. 30. https://doi.org/10.1007/s10856-019-6281-3

De Giglio, O., Caggiano, G., Bagordo, F., Barbuti, G., Brigida, S., Lugoli, F., Grassi, T., La Rosa, G., Lucentini, L., Uricchio, V.F., De Donno, A., Montagna, M.T., 2017. Enteric viruses and fecal bacteria indicators to assess groundwater quality and suitability for irrigation. Int. J. Environ. Res. Public Health 14. https://doi.org/10.3390/ijerph14060558

De Giglio, O., Napoli, C., Apollonio, F., Brigida, S., Marzella, A., Diella, G., Calia, C., Scrascia, M., Pacifico, C., Pazzani, C., Uricchio, V.F., Montagna, M.T., 2019. Occurrence of Legionella in groundwater used for sprinkler irrigation in Southern Italy. Environ. Res. 170, 215–221. https://doi.org/10.1016/j.envres.2018.12.041

DeForest, J.L., Zak, D.R., Pregitzer, K.S., Burton, A.J., 2004. Atmospheric Nitrate Deposition, Microbial Community Composition, and Enzyme Activity in Northern Hardwood Forests. Soil Sci. Soc. Am. J. 68, 132–138. https://doi.org/10.2136/sssaj2004.1320

Dehghanisanij, H., Yamamoto, T., Ahmad, B.O., Fujiyama, H., Miyamoto, K., 2005. The effect of chlorine on emitter clogging induced by algae and protozoa and the performance of drip irrigation. Trans. ASAE 48, 519–527. https://doi.org/10.13031/2013.18326

Delafont, V., Rodier, M.H., Maisonneuve, E., Cateau, E., 2018. Vermamoeba vermiformis: a Free-Living Amoeba of Interest. Microb. Ecol. 76, 991–1001. https://doi.org/10.1007/s00248-018-1199-8

Demirel, K., Sener, S., 2009. Performance of sprinkler irrigation systems at different pressures and under varying wind speed conditions in landscape areas. Philipp. Agric. Sci. 92, 308–314. https://doi.org/10.3860/pas.v92i3.1374

Derlon, N., Massé, A., Escudié, R., Bernet, N., Paul, E., 2008. Stratification in the cohesion of biofilms grown under various environmental conditions. Water Res. 42, 2102–2110. https://doi.org/10.1016/j.watres.2007.11.016

Derlon, N., Peter-Varbanets, M., Scheidegger, A., Pronk, W., Morgenroth, E., 2012. Predation influences the structure of biofilm developed on ultrafiltration membranes. Water Res. 46, 3323–3333. https://doi.org/10.1016/j.watres.2012.03.031

Desvaux, M., Dumas, E., Chafsey, I., Hébraud, M., 2006. Protein cell surface display in Gram-positive bacteria: from single protein to macromolecular protein structure. FEMS Microbiol. Lett. 256, 1–15. https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2006.00122.x

Dietrich, J.P., Loge, F.J., Ginn, T.R., Başagˇaogˇlu, H., 2007. Inactivation of particle-associated microorganisms in wastewater disinfection: Modeling of ozone and chlorine reactive diffusive transport in polydispersed suspensions. Water Res. 41, 2189–2201. https://doi.org/10.1016/j.watres.2007.01.038

Ding, C., He, J., 2010. Effect of antibiotics in the environment on microbial populations. Appl. Microbiol. Biotechnol. 87, 925–941. https://doi.org/10.1007/s00253-010-2649-5

Do, T., Jolley, K.A., Maiden, C.J., Gilbert, S.C., Clark, D., Wade, W.G., Beighton, D., 2009. Population structure of Streptococcus oralis. Microbiology 155, 2593–2602. https://doi.org/10.1099/mic.0.027284-0

Dohm, J.C., Lottaz, C., Borodina, T., Himmelbauer, H., 2008. Substantial biases in ultra-short read data sets from high-throughput DNA sequencing. Nucleic Acids Res. 36, e105–e105. https://doi.org/10.1093/nar/gkn425

Domenech, E., Amorós, I., Moreno, Y., Alonso, J.L., 2018. Cryptosporidium and Giardia safety margin increase in leafy green vegetables irrigated with treated wastewater. Int. J. Hyg. Environ. Health 221, 112–119. https://doi.org/10.1016/j.ijheh.2017.10.009

Donlan, R.M., 2002. Biofilms: Microbial life on surfaces. Emerg. Infect. Dis. 8, 881–890. https://doi.org/10.3201/eid0809.020063

Dosoretz, C.G., Tarchitzky, J., Katz, I., Kenig, E., Chen, Y., 2010. Fouling in Microirrigation Systems Applying Treated Wastewater Effluents. Treat. Wastewater Agric. Use Impacts Soil Environ. Crop. 328–350. https://doi.org/10.1002/9781444328561.ch10

Douterelo, I., Boxall, J.B., Deines, P., Sekar, R., Fish, K.E., Biggs, C.A., 2014. Methodological approaches for studying the microbial ecology of drinking water distribution systems. Water Res. 65, 134–156. https://doi.org/10.1016/j.watres.2014.07.008

Douterelo, I., Jackson, M., Solomon, C., Boxall, J., 2016. Microbial analysis of in situ biofilm formation in drinking water distribution systems: implications for monitoring and control of drinking water quality. Appl. Microbiol. Biotechnol. 100, 3301–3311. https://doi.org/10.1007/s00253-015-7155-3

Drechsel, P., Scott, C.A., Raschid-Sally, L., 2011. L'irrigation avec des eaux usées et la santé: Évaluer et atténuer les risques dans les pays à faible revenu. Presses de l'Université du

Québec.

Drescher, K., Shen, Y., Bassler, B.L., Stone, H.A., 2013. Biofilm streamers cause catastrophic disruption of flow with consequences for environmental and medical systems. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 110, 4345–4350. https://doi.org/10.1073/pnas.1300321110

Dreszer, C., Wexler, A.D., Drusová, S., Overdijk, T., Zwijnenburg, A., Flemming, H.C., Kruithof, J.C., Vrouwenvelder, J.S., 2014. In-situ biofilm characterization in membrane systems using Optical Coherence Tomography: Formation, structure, detachment and impact of flux change. Water Res. 67, 243–254. https://doi.org/10.1016/j.watres.2014.09.006

Dryden, S.K., Ramaswami, B., Yuan, Z., Giammar, D.E., Angenent, L.T., 2006. A rapid reverse transcription-PCR assay for F+ RNA coliphages to trace fecal pollution in Table Rock Lake on the Arkansas-Missouri border. Water Res. 40, 3719–3724. https://doi.org/10.1016/j.watres.2006.09.003

Dupuy, M., Mazoua, S., Berne, F., Bodet, C., Garrec, N., Herbelin, P., Ménard-Szczebara, F., Oberti, S., Rodier, M.H., Soreau, S., Wallet, F., Héchard, Y., 2011. Efficiency of water disinfectants against Legionella pneumophila and Acanthamoeba. Water Res. 45, 1087–1094. https://doi.org/10.1016/j.watres.2010.10.025

Duran-Ros, M., Puig-Bargués, J., Arbat, G., Barragán, J., Cartagena, F.R. de, 2009. Effect of filter, emitter and location on clogging when using effluents. Agric. Water Manag. 96, 67–79. https://doi.org/10.1016/j.agwat.2008.06.005

Eaufrance, 2011. Synthèses la conformité des des eaux usées. France.

Edgar, R.C., Haas, B.J., Clemente, J.C., Quince, C., Knight, R., 2011. UCHIME improves sensitivity and speed of chimera detection. Bioinformatics 27, 2194–2200. https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btr381

Elias, S., Banin, E., 2012. Multi-species biofilms: Living with friendly neighbors. FEMS Microbiol. Rev. 36, 990–1004. https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2012.00325.x

EPA, 2012. Guidelines for Water Reuse.

Eroglu, S., Sahin, U., Tunc, T., Sahin, F., 2012. Bacterial application increased the flow rate of CaCO 3-clogged emitters of drip irrigation system. J. Environ. Manage. 98, 37–42. https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2011.12.014

Fahrenfeld, N., Ma, Y., O'Brien, M., Pruden, A., 2013. Reclaimed water as a reservoir of antibiotic resistance genes: Distribution system and irrigation implications. Front. Microbiol. 4, 1–10. https://doi.org/10.3389/fmicb.2013.00130

FAO, 2013. Fao Statistical Yearbook 2013, Crop production statistics. Food and Agriculture Organization: Rome. https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004

FAO, 2003. USERS MANUAL FOR IRRIGATION WITH TREATED WASTEWATER. Cairo.

FAO, 2002. Eau Et Agriculture: Produire Plus Avec Moins D'Eau 22.

Feng, J., Li, Y., Wang, W., Xue, S., 2018. Effect of optimization forms of flow path on emitter hydraulic and anti-clogging performance in drip irrigation system. Irrig. Sci. 36, 37–47. https://doi.org/10.1007/s00271-017-0561-9

Feng, J., Wang, W., Liu, H., 2020. Study on Fluid Movement Characteristics inside the Emitter Flow Path of Drip Irrigation System Using the Yellow River Water.

Feng, L.-J., Jia, R., Sun, J.-Y., Wang, J., Lv, Z.-H., Mu, J., Yang, G.-F., 2017. Response of performance and bacterial community to oligotrophic stress in biofilm systems for raw water pretreatment. Biodegradation 28, 231–244. https://doi.org/10.1007/s10532-017-9792-y

Fernández-Bravo, A., Figueras, M.J., 2020. An update on the genus Aeromonas: Taxonomy, epidemiology, and pathogenicity. Microorganisms. https://doi.org/10.3390/microorganisms8010129

Fernandez-Cassi, X., Silvera, C., Cervero-Aragó, S., Rusiñol, M., Latif-Eugeni, F., Bruguera-Casamada, C., Civit, S., Araujo, R.M., Figueras, M.J., Girones, R., Bofill-Mas, S., 2016. Evaluation of the microbiological quality of reclaimed water produced from a lagooning system. Environ. Sci. Pollut. Res. 23, 16816–16833. https://doi.org/10.1007/s11356-016-6812-0

Ferreira, V., Chauvet, E., 2011. Synergistic effects of water temperature and dissolved nutrients on litter decomposition and associated fungi. Glob. Chang. Biol. 17, 551–564. https://doi.org/10.1111/j.1365-2486.2010.02185.x

Fierer, N., Jackson, R.B., 2006. The diversity and biogeography of soil bacterial communities. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 103, 626 LP-631. https://doi.org/10.1073/pnas.0507535103

Fieseler, L., Doyscher, D., Loessner, M.J., Schuppler, M., 2014. Acanthamoeba release compounds which promote growth of Listeria monocytogenes and other bacteria. Appl. Microbiol. Biotechnol. 98, 3091–3097. https://doi.org/10.1007/s00253-014-5534-9

Fish, K., Osborn, A.M., Boxall, J.B., 2017. Biofilm structures (EPS and bacterial communities) in drinking water distribution systems are conditioned by hydraulics and

influence discolouration. Sci. Total Environ. 593–594, 571–580. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.03.176

Fish, K.E., Boxall, J.B., 2018. Biofilm microbiome (re)growth dynamics in drinking water distribution systems are impacted by chlorine concentration. Front. Microbiol. 9, 1–21. https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02519

Fish, K.E., Osborn, A.M., Boxall, J., 2016. Characterising and understanding the impact of microbial biofilms and the extracellular polymeric substance (EPS) matrix in drinking water distribution systems. Environ. Sci. Water Res. Technol. 2, 614–630. https://doi.org/10.1039/C6EW00039H

Flemming, H., Wingender, J., 2010. The biofilm matrix. Nat. Rev. Microbiol. 8, 623–33. https://doi.org/10.1038/nrmicro2415

Flemming, H.C., Wingender, J., Szewzyk, U., Steinberg, P., Rice, S.A., Kjelleberg, S., 2016. Biofilms: An emergent form of bacterial life. Nat. Rev. Microbiol. 14, 563–575. https://doi.org/10.1038/nrmicro.2016.94

Fouque, E., Héchard, Y., Hartemann, P., Humeau, P., Trouilhé, M.C., 2015. Sensitivity of Vermamoeba (Hartmannella) vermiformis cysts to conventional disinfectants and protease. J. Water Health 13, 302–310. https://doi.org/10.2166/wh.2014.154

Fouque, E., Trouilhé, M.-C., Thomas, V., Humeau, P., Héchard, Y., 2014. Encystment of Vermamoeba (Hartmannella) vermiformis: Effects of environmental conditions and cell concentration. Exp. Parasitol. 145, S62–S68. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.exppara.2014.03.029

Frahm, E., Obst, U., 2003. Application of the fluorogenic probe technique (TaqMan PCR) to the detection of Enterococcus spp. and Escherichia coli in water samples. J. Microbiol. Methods 52, 123–131. https://doi.org/10.1016/S0167-7012(02)00150-1

Frankenhuyzen, J.K. van, Trevors, J.T., Flemming, C. a, Lee, H., Habash, M.B., 2013. Optimization, validation, and application of a real-time PCR protocol for quantification of viable bacterial cells in municipal sewage sludge and biosolids using reporter genes and Escherichia coli. J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 40, 1251–61. https://doi.org/10.1007/s10295-013-1319-x

Franzén, O., Hu, J., Bao, X., Itzkowitz, S.H., Peter, I., Bashir, A., 2015. Improved OTU-picking using long-read 16S rRNA gene amplicon sequencing and generic hierarchical clustering. Microbiome 3, 43. https://doi.org/10.1186/s40168-015-0105-6

Friberg, N., Bergfur, J., Rasmussen, J., Sandin, L., 2013. Changing Northern catchments: Is

altered hydrology, temperature or both going to shape future stream communities and ecosystem processes? Hydrol. Process. 27, 734–740. https://doi.org/10.1002/hyp.9598

Fuhrman, J.A., Schwalbach, M., 2003. Viral influence on aquatic bacterial communities. Biol. Bull. 204, 192–195. https://doi.org/10.2307/1543557

Galván, A.L., Magnet, A., Izquierdo, F., Fenoy, S., Rueda, C., Fernández Vadillo, C., Henriques-Gil, N., del Aguila, C., 2013. Molecular Characterization of Human-Pathogenic Microsporidia and Cyclospora cayetanensis Isolated from Various Water Sources in Spain: a Year-Long Longitudinal Study. Appl. Environ. Microbiol. 79, 449–459. https://doi.org/10.1128/AEM.02737-12

Gamri, S., Soric, A., Tomas, S., Molle, B., Roche, N., 2015. Effects of pipe materials on biofouling under controlled hydrodynamic conditions. J. Water Reuse Desalin. jwrd2015037. https://doi.org/10.2166/wrd.2015.037

Gamri, S., Soric, A., Tomas, S., Molle, B., Roche, N., 2014. Biofilm development in micro-irrigation emitters for wastewater reuse. Irrig. Sci. 32, 77–85. https://doi.org/10.1007/s00271-013-0414-0

Gerbersdorf, S.U., Jancke, T., Westrich, B., Paterson, D.M., 2008. Microbial stabilization of riverine sediments by extracellular polymeric substances. Geobiology 6, 57–69. https://doi.org/10.1111/j.1472-4669.2007.00120.x

Gierl, L., Stoy, K., Faíña, A., Horn, H., Wagner, M., 2020. An open-source robotic platform that enables automated monitoring of replicate biofilm cultivations using optical coherence tomography. npj Biofilms Microbiomes 6, 1–9. https://doi.org/10.1038/s41522-020-0129-y

Gilbert, R.G., Nakayama, F.S., Bucks, D.A., French, O.F., Adamson, K.C., 1981. Trickle irrigation: Emitter clogging and other flow problems. Agric. Water Manag. 3, 159–178. https://doi.org/10.1016/0378-3774(81)90001-9

Gilbert, R.G., Nakayama, F.S., Bucks, D.A., French, O.F., Adamson, K.C., Johnson, R.M., 1982. Irrigation : clence Trickle Irrigation : Predominant Bacteria in Treated Colorado River Water and Biologically Clogged Emitters * 123–132.

Giulietti, A., Overbergh, L., Valckx, D., Decallonne, B., Bouillon, R., Mathieu, C., 2001. An Overview of Real-Time Quantitative PCR: Applications to Quantify Cytokine Gene Expression. Methods 25, 386–401. https://doi.org/https://doi.org/10.1006/meth.2001.1261

Goller, C.C., Romeo, T., 2008. Environmental influences on biofilm development. Curr. Top.

Microbiol. Immunol. 322, 37–66. https://doi.org/10.1007/978-3-540-75418-3_3

Gomes, I.B., Simões, L.C., Simões, M., 2020. Influence of surface copper content on Stenotrophomonas maltophilia biofilm control using chlorine and mechanical stress. Biofouling 36, 1–13. https://doi.org/10.1080/08927014.2019.1708334

Gong, W., Marchetti, A., 2019. Estimation of 18S Gene Copy Number in Marine Eukaryotic Plankton Using a Next-Generation Sequencing Approach . Front. Mar. Sci. .

González-Escalona, N., Hammack, T.S., Russell, M., Jacobson, A.P., De Jesús, A.J., Brown, E.W., Lampel, K.A., 2009. Detection of live Salmonella sp. cells in produce by a taqman-based quantitative reverse transcriptase real-time PCR Targeting invA mRNA. Appl. Environ. Microbiol. 75, 3714–3720. https://doi.org/10.1128/AEM.02686-08

Gourmelon, M., Caprais, M.P., Mieszkin, S., Marti, R., Wéry, N., Jardé, E., Derrien, M., Jadas-Hécart, A., Communal, P.Y., Jaffrezic, A., Pourcher, A.M., 2010. Development of microbial and chemical MST tools to identify the origin of the faecal pollution in bathing and shellfish harvesting waters in France. Water Res. 44, 4812–4824. https://doi.org/10.1016/j.watres.2010.07.061

Goyal, M.R., 2018. Wastewater Management for Irrigation, Wastewater Management for Irrigation. https://doi.org/10.1201/b18967

Goyal, M.R., 2017. Micro irrigation Management, Apple Acad. ed. Taylor & Francis Group, USA.

Grafton, R.Q., Williams, J., Perry, C.J., Molle, F., Ringler, C., Steduto, P., Udall, B., Wheeler, S.A., Wang, Y., Garrick, D., Allen, R.G., 2018. The paradox of irrigation efficiency. Science (80-.). 361, 748–750. https://doi.org/10.1126/science.aat9314

Greay, T.L., Gofton, A.W., Zahedi, A., Paparini, A., Linge, K.L., Joll, C.A., Ryan, U.M., 2019. Evaluation of 16S next-generation sequencing of hypervariable region 4 in wastewater samples: An unsuitable approach for bacterial enteric pathogen identification. Sci. Total Environ. 670, 1111–1124. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.03.278

Green, O., Katz, S., Tarchitzky, J., Chen, Y., 2018. Formation and prevention of biofilm and mineral precipitate clogging in drip irrigation systems applying treated wastewater. Irrig. Sci. 0, 1–14. https://doi.org/10.1007/s00271-018-0581-0

Grobe, S., Wingender, J., Flemming, H.-C., 2001. Capability of mucoid Pseudomonas aeruginosa to survive in chlorinated water. Int. J. Hyg. Environ. Health 204, 139–142. https://doi.org/https://doi.org/10.1078/1438-4639-00085

Habteselassie, M.Y., Xu, L., Norton, J.M., 2013. Ammonia-oxidizer communities in an agricultural soil treated with contrasting nitrogen sources. Front. Microbiol. 4, 1–10. https://doi.org/10.3389/fmicb.2013.00326

Hadziavdic, K., Lekang, K., Lanzen, A., Jonassen, I., Thompson, E.M., Troedsson, C., 2014. Characterization of the 18s rRNA gene for designing universal eukaryote specific primers. PLoS One 9. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0087624

Hageskal, G., Tryland, I., Liltved, H., Skaar, I., 2012. No simple solution to waterborne fungi: various responses to water disinfection methods. Water Supply 12, 220–226. https://doi.org/10.2166/ws.2012.131

Haisch, C., Niessner, R., 2007. Visualisation of transient processes in biofilms by optical coherence tomography. Water Res. 41, 2467–2472. https://doi.org/10.1016/j.watres.2007.03.017

Hajjami, K., Ennaji, M., Fouad, S., Oubrim, N., Cohen, N., 2012. Wastewater Reuse for Irrigation in Morocco: Helminth Eggs Contamination´s Level of Irrigated Crops and Sanitary Risk (A Case Study of Settat and Soualem Regions). J. Bacteriol. Parasitol. 4, 1–5. https://doi.org/10.4172/2155-9597.1000163

Hamilton, K.A., Hamilton, M.T., Johnson, W., Jjemba, P., Bukhari, Z., LeChevallier, M., Haas, C.N., 2018. Health risks from exposure to Legionella in reclaimed water aerosols: Toilet flushing, spray irrigation, and cooling towers. Water Res. 134, 261–279. https://doi.org/10.1016/j.watres.2017.12.022

Han, S., Li, Y., Xu, F., Sun, D., Feng, J., Liu, Z., Wu, R., Wang, Z., 2018. Effect of Lateral Flushing on Emitter Clogging under Drip Irrigation with Yellow River Water and a Suitable Method. Irrig. Drain. 67, 199–209. https://doi.org/10.1002/ird.2193

Haosu, S., Yunkai, L., Ji, F., Liu, H., Liu, Y., 2016. Effects of flow path boundary optimizations on particle transport in drip irrigation emitters. Irrig. Drain. 65, 417–425. https://doi.org/10.1002/ird.2017

Haramoto, E., Katayama, H., Oguma, K., Ohgaki, S., 2007. Quantitative analysis of human enteric adenoviruses in aquatic environments. J. Appl. Microbiol. 103, 2153–2159. https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2007.03453.x

Harwood, V.J., Brownell, M., Perusek, W., Whitlock, J.E., 2001. Vancomycin-Resistant Enterococcus spp. Isolated from Wastewater and Chicken Feces in the United States. Appl. Environ. Microbiol. 67, 4930–4933. https://doi.org/10.1128/AEM.67.10.4930-4933.2001

Harwood, V.J., Levine, A.D., Scott, T.M., Chivukula, V., Lukasik, J., Farrah, S.R., Rose, J.B., 2005. Validity of the indicator organism paradigm for pathogen reduction in reclaimed water and public health protection. Appl. Environ. Microbiol. 71, 3163–3170. https://doi.org/10.1128/AEM.71.6.3163-3170.2005

Hata, A., Hanamoto, S., Shirasaka, Y., Yamashita, N., Tanaka, H., 2016. Quantitative distribution of infectious F-specific RNA phage genotypes in surface waters. Appl. Environ. Microbiol. 82, 4244–4252. https://doi.org/10.1128/AEM.00621-16

Haynes, R.J., Naidu, R., 1998. Influence of lime, fertilizer and manure applications on soil organic matter content and soil physical conditions: a review. Nutr. Cycl. Agroecosystems 51, 123–137. https://doi.org/10.1023/A:1009738307837

Henze, M., Comeau, Y., 2008. Wastewater characterization, in: Henze, M., van Loosdrecht, M.C.M., Ekama, G.A., Brdjanovic, D. (Ed.), Biological Wastewater Treatment: Principles Modelling and Design. IWA, pp. 33–52. https://doi.org/10.2166/9781780408644_001

Herald, J., Zottola, E.A., 1988. Attachment of Listeria monocytogenes to stainless steel surface at various temperatures and pH values. J. Food Sci. 53, 1549–1552. https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1988.tb09321.x

Hidalgo, D., Irusta, R., 2005. The cost of wastewater reclamation and reuse in agricultural production in the The cost of wastewater reclamation and reuse in agricultural production in the Mediterranean countries.

Hills, D.J., Nawar, F.M., Waller, P.M., 1989. Effects of Chemical Clogging on Drip-Tape Irrigation Uniformity. https://doi.org/10.13031/2013.31135

Ho, L.T., Pham, D.T., Van Echelpoel, W., Alvarado, A., Espinoza-Palacios, J.E., Arevalo-Durazno, M.B., Goethals, P.L.M., 2018. Exploring the influence of meteorological conditions on the performance of a waste stabilization pond at high altitude with structural equation modeling. Water Sci. Technol. 78, 37–48. https://doi.org/10.2166/wst.2018.254

Ho, L.T., Van Echelpoel, W., Goethals, P.L.M., 2017. Design of waste stabilization pond systems: A review. Water Res. 123, 236–248. https://doi.org/10.1016/j.watres.2017.06.071

Hong, P.Y., Julian, T.R., Pype, M.L., Jiang, S.C., Nelson, K.L., Graham, D., Pruden, A., Manaia, C.M., 2018. Reusing treated wastewater: Consideration of the safety aspects associated with antibiotic-resistant bacteria and antibiotic resistance genes. Water

(Switzerland) 10. https://doi.org/10.3390/w10030244

Horn, H., Reiff, H., Morgenroth, E., 2003. Simulation of growth and detachment in biofilm systems under defined hydrodynamic conditions. Biotechnol. Bioeng. 81, 607–617. https://doi.org/10.1002/bit.10503

Hörsch, P., Gorenflo, A., Fuder, C., Deleage, A., Frimmel, F.H., 2005. Biofouling of ultra- and nanofiltration membranes fordrinking water treatment characterized by fluorescence in situ hybridization (FISH). Desalination 172, 41–52. https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/j.desal.2004.05.009

Hou, P., Wang, T., Zhou, B., Song, P., Zeng, W., Muhammad, T., Li, Y., 2020. Variations in the microbial community of biofilms under different near-wall hydraulic shear stresses in agricultural irrigation systems. Biofouling 36, 44–55. https://doi.org/10.1080/08927014.2020.1714600

Howell, T., 2003. Irrigation Efficiency. Conserv. Agric. 181–190. https://doi.org/10.1081/E-EWS 120010252

Hunt, S.M., Werner, E.M., Huang, B., Hamilton, M.A., Stewart, P.S., 2004. Hypothesis for the role of nutrient starvation in biofilm detachment. Appl. Environ. Microbiol. 70, 7418–7425. https://doi.org/10.1128/AEM.70.12.7418-7425.2004

Hyun-Jung, J., Choi, Y.J., Ka, J.O., 2011. Effects of diverse water pipe materials on bacterial communities and water quality in the annular reactor. J. Microbiol. Biotechnol. 21, 115–123. https://doi.org/10.4014/jmb.1010.10012

Ibekwe, A.M., Murinda, S.E., 2019. Linking microbial community composition in treated wastewater with water quality in distribution systems and subsequent health effects. Microorganisms 7. https://doi.org/10.3390/microorganisms7120660

Ibragimov, N., Evett, S.R., Esanbekov, Y., Kamilov, B.S., Mirzaev, L., Lamers, J.P.A., 2007. Water use efficiency of irrigated cotton in Uzbekistan under drip and furrow irrigation. Agric. Water Manag. 90, 112–120. https://doi.org/10.1016/j.agwat.2007.01.016

ISO, 2003. TC 23/SC 18 Matériels et réseaux d'irrigation et de drainage.

Ito, E., Pu, J., Miura, T., Kazama, S., Nishiyama, M., Ito, H., Konta, Y., Nguyen, G.T., Omura, T., Watanabe, T., 2019. Weekly variation of rotavirus a concentrations in sewage and oysters in Japan, 2014–2016. Pathogens 8, 2014–2016. https://doi.org/10.3390/pathogens8030089

J. Li, L. Chen, Y. Li, 2009. Comparison of Clogging in Drip Emitters During Application of Sewage Effluent and Groundwater. Trans. ASABE 52, 1203–1211.

https://doi.org/10.13031/2013.27797

J. Li, L. Chen, Y. Li, J. Yin, H. Zhang, 2010. Effects of Chlorination Schemes on Clogging in Drip Emitters during Application of Sewage Effluent. Appl. Eng. Agric. 26, 565–578. https://doi.org/10.13031/2013.32067

Jahid, I.K., Ha, S. Do, 2014. Inactivation kinetics of various chemical disinfectants on aeromonas hydrophila planktonic cells and biofilms. Foodborne Pathog. Dis. 11, 346–353. https://doi.org/10.1089/fpd.2013.1682

Jaramillo, M.F., Restrepo, I., 2017. Wastewater reuse in agriculture: A review about its limitations and benefits. Sustain. 9. https://doi.org/10.3390/su9101734

Jia, S., Shi, P., Hu, Q., Li, B., Zhang, T., Zhang, X.-X., 2015. Bacterial Community Shift Drives Antibiotic Resistance Promotion during Drinking Water Chlorination. Environ. Sci. Technol. 49, 12271–12279. https://doi.org/10.1021/acs.est.5b03521

Jia, S., Wu, J., Ye, L., Zhao, F., Li, T., Zhang, X.X., 2019. Metagenomic assembly provides a deep insight into the antibiotic resistome alteration induced by drinking water chlorination and its correlations with bacterial host changes. J. Hazard. Mater. 379, 120841. https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2019.120841

Jimenez, B., Asano, T., 2015. Water Reuse: An International Survey of current practice, issues and needs. Water Intell. Online 7, 9781780401881–9781780401881. https://doi.org/10.2166/9781780401881

Jjemba, P.K., Weinrich, L.A., Cheng, W., Giraldo, E., LeChevallier, M.W., 2010. Regrowth of potential opportunistic pathogens and algae in reclaimed-water distribution systems. Appl. Environ. Microbiol. 76, 4169–4178. https://doi.org/10.1128/AEM.03147-09

Jongman, M., Korsten, L., 2018. Irrigation water quality and microbial safety of leafy greens in different vegetable production systems: A review. Food Rev. Int. 34, 308–328. https://doi.org/10.1080/87559129.2017.1289385

JRC, 2017. Minimum quality requirements for water reuse in agricultural irrigation and aquifer recharge. https://doi.org/10.2760/887727

Kalavrouziotis, I.K., Kokkinos, P., Oron, G., Fatone, F., Bolzonella, D., Vatyliotou, M., Fatta-Kassinos, D., Koukoulakis, P.H., Varnavas, S.P., 2015. Current status in wastewater treatment, reuse and research in some mediterranean countries. Desalin. Water Treat. 53, 2015–2030. https://doi.org/10.1080/19443994.2013.860632

Kalavrouziotis, I.K., Koukoulakis, P.H., 2011. Plant nutrition aspects under treated wastewater reuse management. Water. Air. Soil Pollut. 218, 445–456.

https://doi.org/10.1007/s11270-010-0658-8

Karmeli, D., 1977. Classification and flow regime analysis of drippers. J. Agric. Eng. Res. 22, 165–173. https://doi.org/10.1016/0021-8634(77)90060-9

Katz, S., Dosoretz, C., Chen, Y., Tarchitzky, J., 2014. Fouling formation and chemical control in drip irrigation systems using treated wastewater. Irrig. Sci. 32, 459–469. https://doi.org/10.1007/s00271-014-0442-4

Keller, R., Pedroso, M.Z., Ritchmann, R., Silva, R.M., 1998. Occurrence of virulence-associated properties in Enterobacter cloacae. Infect. Immun. 66, 645–649. https://doi.org/10.1128/iai.66.2.645-649.1998

Kellis, M., Kalavrouziotis, I.K., Gikas, P., 2013. Review of wastewater reuse in the mediterranean countries, focusing on regulations and policies for municipal and industrial applications. Glob. Nest J. 15, 333–350.

Keraita, B., Jimenez, B., Drechsel, P., 2008. Extent and implications of agricultural reuse of untreated, partly treated and diluted wastewater in developing countries.

Kerim, K., Banu, Ö., 2015. Regrowth Potential of Bacteria after Ultraviolet Disinfection in the Absence of Light and Dark Repair. J. Environ. Eng. 141, 4014069. https://doi.org/10.1061/(ASCE)EE.1943-7870.0000905

Khaydarov, V., Borovinskaya, E.S., Reschetilowski, W., 2018. Numerical and experimental investigations of a micromixer with chicane mixing geometry. Appl. Sci. 8, 3–6. https://doi.org/10.3390/app8122458

Khurana, M.P.S., Singh, P., 2012. Waste Water Use in Crop Production : A Review 2, 116–131. https://doi.org/10.5923/j.re.20120204.01

Kim, J., Lim, J., Lee, C., 2013. Quantitative real-time PCR approaches for microbial community studies in wastewater treatment systems: Applications and considerations. Biotechnol. Adv. 31, 1358–1373. https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2013.05.010

King, C.H., Shotts, E.B., Wooley, R.E., Porter, K.G., 1988. Survival of coliforms and bacterial pathogens within protozoa during chlorination. Appl. Environ. Microbiol. 54, 3023–3033. https://doi.org/10.1128/aem.54.12.3023-3033.1988

Kiziloglu, F.M., Turan, M., Sahin, U., Angin, I., Anapali, O., Okuroglu, M., 2007. Effects of wastewater irrigation on soil and cabbage-plant (brassica olerecea var . capitate cv . yalova-1) chemical properties 166–172. https://doi.org/10.1002/jpln.200621971

Kohn, T., Mattle, M.J., Minella, M., Vione, D., 2016. A modeling approach to estimate the solar disinfection of viral indicator organisms in waste stabilization ponds and surface

waters. Water Res. 88, 912–922. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.watres.2015.11.022

Kolter, R., Greenberg, E.P., 2006. Microbial sciences: The superficial life of microbes. Nature 441, 300–302. https://doi.org/10.1038/441300a

Kosikowska, U., Rybojad, P., Stepień-Pyśniak, D., Zbikowska, A., Malm, A., 2016. Changes in the prevalence and biofilm formation of Haemophilus influenzae and Haemophilus parainfluenzae from the respiratory microbiota of patients with sarcoidosis. BMC Infect. Dis. 16, 1–13. https://doi.org/10.1186/s12879-016-1793-7

Kothary, M.H., Babu, U.S., 2001. INFECTIVE DOSE OF FOODBORNE PATHOGENS IN VOLUNTEERS: A REVIEW. J. Food Saf. 21, 49–68. https://doi.org/10.1111/j.1745-4565.2001.tb00307.x

Krasowska, A., Sigler, K., 2014. How microorganisms use hydrophobicity and what does this mean for human needs? Front. Cell. Infect. Microbiol. 4, 1–7. https://doi.org/10.3389/fcimb.2014.00112

Kreij, C. De, Burg, A.M.M. Van Der, Runia, W.T., 2003. Drip irrigation emitter clogging in Dutch greenhouses as affected by methane and organic acids 60, 73–85.

Kujundzic, E., Fonseca, A.C., Evans, E.A., Peterson, M., Greenberg, A.R., Hernandez, M., 2007. Ultrasonic monitoring of early - stage biofilm growth on polymeric surfaces 68, 458–467. https://doi.org/10.1016/j.mimet.2006.10.005

Kulkarni, P., Olson, N.D., Paulson, J.N., Pop, M., Maddox, C., Claye, E., Rosenberg Goldstein, R.E., Sharma, M., Gibbs, S.G., Mongodin, E.F., Sapkota, A.R., 2018. Conventional wastewater treatment and reuse site practices modify bacterial community structure but do not eliminate some opportunistic pathogens in reclaimed water. Sci. Total Environ. 639, 1126–1137. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.05.178

La Rosa, G., Pourshaban, M., Iaconelli, M., Muscillo, M., 2010. Quantitative real-time PCR of enteric viruses in influent and effluent samples from wastewater treatment plants in Italy. Ann. Ist. Super. Sanita 46, 266–273. https://doi.org/10.4415/ANN_10_03_07

Lal, K., Yadav, R.K., Kaur, R., Bundela, D.S., Khan, M.I., Chaudhary, M., Meena, R.L., Dar, S.R., Singh, G., 2013. Productivity, essential oil yield, and heavy metal accumulation in lemon grass (Cymbopogon flexuosus) under varied wastewater-groundwater irrigation regimes. Ind. Crops Prod. 45, 270–278. https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2013.01.004

Lalucat, J., Bennasar, A., Bosch, R., Garcia-Valdes, E., Palleroni, N.J., 2006. Biology of Pseudomonas stutzeri. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 70, 510–547.

https://doi.org/10.1128/mmbr.00047-05

Lambrecht, E., Baré, J., Sabbe, K., Houf, K., 2017. Impact of Acanthamoeba cysts on stress resistance of Salmonella enterica serovar Typhimurium, Yersinia enterocolitica 4/O:3, Listeria monocytogenes 1/2a, and Escherichia coli O:26. Appl. Environ. Microbiol. 83. https://doi.org/10.1128/AEM.00754-17

Lambrecht, E., Baré, J., Van Damme, I., Bert, W., Sabbe, K., Houf, K., 2013. Behavior of Yersinia enterocolitica in the presence of the bacterivorous Acanthamoeba castellanii. Appl. Environ. Microbiol. 79, 6407–6413. https://doi.org/10.1128/AEM.01915-13

Lamm, F.R., 2013. Effect of Flushing Velocity and Flushing Duration on Sediment Transport in Microirrigation Driplines. Trans. ASABE 56, 1821–1828. https://doi.org/10.13031/trans.56.10293

Lamm, F.R., Ayars, J.E., Nakayama, F.S., 2007. Maintenance, in: Lamm, F.R., Ayars, J.E., Nakayama, F.S. (Eds.), Microirrigation for Crop Production: Design, Operation, and Management, 13th Edn. Elsevier B.V., Amsterdam, pp. 1–643.

Landre, J.P.B., Gavriel, A.A., Lamb, A.J., 1998. False-positive coliform reaction mediated by Aeromonas in the colilert defined substrate technology system. Lett. Appl. Microbiol. 26, 352–354. https://doi.org/10.1046/j.1472-765X.1998.00347.x

Lane, D.J., Pace, B., Olsen, G.J., Stahl, D.A., Sogin, M.L., Pace, N.R., 1985. Rapid determination of 16S ribosomal RNA sequences for phylogenetic analyses. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 82, 6955–6959. https://doi.org/10.1073/pnas.82.20.6955

Larned, S.T., 2010. A prospectus for periphyton : recent and future ecological research 29, 182–206. https://doi.org/10.1899/08-063.1

Latif-Eugenín, F., Beaz-Hidalgo, R., Silvera-Simón, C., Fernandez-Cassi, X., Figueras, M.J., 2017. Chlorinated and ultraviolet radiation -treated reclaimed irrigation water is the source of Aeromonas found in vegetables used for human consumption. Environ. Res. 154, 190–195. https://doi.org/10.1016/j.envres.2016.12.026

Lauber, C.L., Hamady, M., Knight, R., Fierer, N., 2009. Pyrosequencing-Based Assessment of Soil pH as a Predictor of Soil Bacterial Community Structure at the Continental Scale. Appl. Environ. Microbiol. 75, 5111 LP-5120. https://doi.org/10.1128/AEM.00335-09

Lavanholi, R., Oliveira, F.C., Camargo, A.P. de, Frizzone, J.A., Molle, B., Ait-Mouheb, N., Tomas, S., 2018. Methodology to Evaluate Dripper Sensitivity to Clogging due to Solid Particles: An Assessment. Sci. World J. 2018, 1–9. https://doi.org/10.1155/2018/7697458

Law, J.W.-F., Ab Mutalib, N.-S., Chan, K.-G., Lee, L.-H., 2015. Rapid methods for the detection of foodborne bacterial pathogens: principles, applications, advantages and limitations. Front. Microbiol. 5, 770. https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00770

Lazarova, V., Bahri, A., 2005. Water Reuse for Irrigation. CRC Press;, Boca Raton.

Le Dantec, C., Duguet, J.P., Montiel, A., Dumoutier, N., Dubrou, S., Vincent, V., 2002. Chlorine disinfection of atypical mycobacteria isolated from a water distribution system. Appl. Environ. Microbiol. 68, 1025–1032. https://doi.org/10.1128/AEM.68.3.1025-1032.2002

Lebeaux, D., Ghigo, J., 2012. Infections associées aux biofilms. médecine/sciences 28, 727–739. https://doi.org/10.1051/medsci/2012288015

Lee, D.-Y., Shannon, K., Beaudette, L.A., 2006. Detection of bacterial pathogens in municipal wastewater using an oligonucleotide microarray and real-time quantitative PCR. J. Microbiol. Methods 65, 453–467. https://doi.org/10.1016/j.mimet.2005.09.008

Lee, W.H., 2014. Needle-type environmental microelectrode sensors for biofilm study in aqueous systems, in: Proceedings of the 11th IEEE International Conference on Networking, Sensing and Control. IEEE, pp. 185–190. https://doi.org/10.1109/ICNSC.2014.6819623

Lee, W.H., Pressman, J.G., Wahman, D.G., 2018. Three-Dimensional Free Chlorine and Monochloramine Biofilm Penetration: Correlating Penetration with Biofilm Activity and Viability. Environ. Sci. Technol. 52, 1889–1898. https://doi.org/10.1021/acs.est.7b05215

Lehtola, M.J., Laxander, M., Miettinen, I.T., Hirvonen, A., Vartiainen, T., Martikainen, P.J., 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. Water Res. 40, 2151–2160. https://doi.org/10.1016/j.watres.2006.04.010

Lehtola, M.J., Miettinen, I.T., Keina, M.M., Kekki, T.K., Laine, O., Hirvonen, A., Vartiainen, T., Martikainen, P.J., 2004. Microbiology , chemistry and biofilm development in a pilot drinking water distribution system with copper and plastic pipes 38, 3769–3779. https://doi.org/10.1016/j.watres.2004.06.024

Leitgeb, R.A., Baumann, B., 2018. Multimodal optical medical imaging concepts based on optical coherence tomography. Front. Phys. 6. https://doi.org/10.3389/fphy.2018.00114

Lequette, K., Ait-Mouheb, N., Wéry, N., 2020. Hydrodynamic effect on biofouling of milli-labyrinth channel and bacterial communities in drip irrigation systems fed with reclaimed wastewater. Sci. Total Environ. 738, 139778.

https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.139778

Lequette, K., Ait-Mouheb, N., Wéry, N., 2019. Drip irrigation biofouling with treated wastewater: bacterial selection revealed by high-throughput sequencing. Biofouling 35, 217–229. https://doi.org/10.1080/08927014.2019.1591377

Li, C., Felz, S., Wagner, M., Lackner, S., Horn, H., 2016a. Investigating biofilm structure developing on carriers from lab-scale moving bed biofilm reactors based on light microscopy and optical coherence tomography. Bioresour. Technol. 200, 128–136. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.10.013

Li, C., Wagner, M., Lackner, S., Horn, H., 2016b. Assessing the influence of biofilm surface roughness on mass transfer by combining optical coherence tomography and two-dimensional modeling. Biotechnol. Bioeng. 113, 989–1000. https://doi.org/10.1002/bit.25868

Li, G.B., Li, Y.K., Xu, T.W., Liu, Y.Z., Jin, H., Yang, P.L., Yan, D.Z., Ren, S.M., Tian, Z.F., 2012. Effects of average velocity on the growth and surface topography of biofilms attached to the reclaimed wastewater drip irrigation system laterals. Irrig. Sci. 30, 103–113. https://doi.org/10.1007/s00271-011-0266-4

Li, J., Chen, L., Li, Y., Yin, J., Zhang, H., 2009. Effects of chloration schemes on clogging in drip emitters during application of sewage effluent. Appl. Eng. Agric.

Li, J., Li, Y., Ohandja, D.G., Yang, F., Wong, F.S., Chua, H.C., 2008. Impact of filamentous bacteria on properties of activated sludge and membrane-fouling rate in a submerged MBR. Sep. Purif. Technol. 59, 238–243. https://doi.org/10.1016/j.seppur.2007.06.011

Li, J., Zhang, J., Ren, L., 2003. Water and nitrogen distribution as affected by fertigation of ammonium nitrate from a point source. Irrig. Sci. 22, 19–30. https://doi.org/10.1007/s00271-003-0064-8

Li, J.S., Li, Y.F., Zhang, H., 2012. Tomato Yield and Quality and Emitter Clogging as Affected by Chlorination Schemes of Drip Irrigation Systems Applying Sewage Effluent. J. Integr. Agric. 11, 1744–1754. https://doi.org/10.1016/S2095-3119(12)60179-8

Li, N., Kang, Y., Li, X., Wan, S., Zhang, C., Wang, X., 2019. Lateral flushing with fresh water reduced emitter clogging in drip irrigation with treated effluent. Irrig. Sci. 37, 627–635. https://doi.org/10.1007/s00271-019-00637-3

Li, Y., Feng, J., Xue, S., Muhammad, T., Chen, X., Wu, N., Li, W., Zhou, B., 2019a. Formation mechanism for emitter composite-clogging in drip irrigation system. Irrig.

Sci. 37, 169–181. https://doi.org/10.1007/s00271-018-0612-x

Li, Y., Li, J., 2009. Effects of chlorination on emitter clogging and tomato yield and nitrogen uptake in a drip irrigation system with sewage effluent. Am. Soc. Agric. Biol. Eng. Annu. Int. Meet. 2009, ASABE 2009 4, 2531–2543. https://doi.org/10.13031/2013.27047

Li, Y., Liu, H., Yang, P., Wu, D., 2013a. Analysis of tracing ability of different sized particles in drip irrigation emitters with computational fluid dynamics. Irrig. Drain. 62, 340–351. https://doi.org/10.1002/ird.1737

Li, Y., Pan, J., Chen, X., Xue, S., Feng, J., Muhammad, T., Zhou, B., 2019b. Dynamic effects of chemical precipitates on drip irrigation system clogging using water with high sediment and salt loads. Agric. Water Manag. 213, 833–842. https://doi.org/10.1016/j.agwat.2018.11.021

Li, Y., Song, P., Pei, Y., Feng, J., 2015. Effects of lateral flushing on emitter clogging and biofilm components in drip irrigation systems with reclaimed water. Irrig. Sci. 33, 235–245. https://doi.org/10.1007/s00271-015-0462-8

Li, Y., Yang, P., Ren, S., Xu, T., 2006. Hydraulic Characterizations of Tortuous Flow in Path Drip Irrigation Emitter. J. Hydrodyn. 18, 449–457. https://doi.org/10.1016/S1001-6058(06)60119-4

Li, Y., Yang, P., Xu, T., Ren, S., Lin, X., Wei, R., Xu, H., 2008a. CFD and digital particle tracking to assess flow characteristics in the labyrinth flow path of a drip irrigation emitter. Irrig. Sci. 26, 427–438. https://doi.org/10.1007/s00271-008-0108-1

Li, Y., Yang, P., Xu, T., Ren, S., Lin, X., Wei, R., Xu, H., 2008b. CFD and digital particle tracking to assess flow characteristics in the labyrinth flow path of a drip irrigation emitter. Irrig. Sci. 26, 427–438. https://doi.org/10.1007/s00271-008-0108-1

Li, Y., Zhou, B., Liu, Y., Jiang, Y., Pei, Y., Shi, Z., 2013b. Preliminary surface topographical characteristics of biofilms attached on drip irrigation emitters using reclaimed water. Irrig. Sci. 31, 557–574. https://doi.org/10.1007/s00271-012-0329-1

Li, Y.K., Liu, Y.Z., Li, G.B., Xu, T.W., Liu, H.S., Ren, S.M., Da Yan, Z., Yang, P.L., 2012. Surface topographic characteristics of suspended particulates in reclaimed wastewater and effects on clogging in labyrinth drip irrigation emitters. Irrig. Sci. 30, 43–56. https://doi.org/10.1007/s00271-010-0257-x

Li, Z., Yu, L., Li, N., Chang, L., Cui, N., 2018. Influence of flushing velocity and flushing frequency on the service life of labyrinth-channel emitters. Water (Switzerland) 10.

https://doi.org/10.3390/w10111630

Lili, Z., Yang, P., Ren, S., Li, Y., Liu, Y., Xia, Y., 2016. Chemical Clogging of Emitters and Evaluation of Their Suitability for Saline Water Drip Irrigation. Irrig. Drain. 65, 439–450. https://doi.org/10.1002/ird.1972

Lim, J., Shin, S.G., Lee, S., Hwang, S., 2011. Design and use of group-specific primers and probes for real-time quantitative PCR. Front. Environ. Sci. Eng. China 5, 28–39. https://doi.org/10.1007/s11783-011-0302-x

Lin, Y. wen, Li, D., Gu, A.Z., Zeng, S. yu, He, M., 2016. Bacterial regrowth in water reclamation and distribution systems revealed by viable bacterial detection assays. Chemosphere 144, 2165–2174. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2015.10.071

Liu, H., Huang, G., 2009. Laboratory experiment on drip emitter clogging with fresh water and treated sewage effluent. Agric. Water Manag. 96, 745–756. https://doi.org/10.1016/j.agwat.2008.10.014

Liu, L., Hall, G., Champagne, P., 2020. The role of algae in the removal and inactivation of pathogenic indicator organisms in wastewater stabilization pond systems. Algal Res. 46, 101777. https://doi.org/10.1016/j.algal.2019.101777

Liu, L., Niu, W., Wu, Z., Guan, Y., Li, Y., 2017. Risk and inducing mechanism of acceleration emitter clogging with fertigation through drip irrigation systems. Nongye Jixie Xuebao/Transactions Chinese Soc. Agric. Mach. 48, 228–236. https://doi.org/10.6041/j.issn.1000-1298.2017.01.030

Liu, N., Skauge, T., Landa-Marbán, D., Hovland, B., Thorbjørnsen, B., Radu, F.A., Vik, B.F., Baumann, T., Bødtker, G., 2019. Microfluidic study of effects of flow velocity and nutrient concentration on biofilm accumulation and adhesive strength in the flowing and no-flowing microchannels. J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 46, 855–868. https://doi.org/10.1007/s10295-019-02161-x

Liu, W., Li, L., Khan, M.A., Zhu, F., 2012. Popular molecular markers in bacteria. Mol. Genet. Microbiol. Virol. 27, 103–107. https://doi.org/10.3103/S0891416812030056

Logan, N.A., 2012. Bacillus and relatives in foodborne illness. J. Appl. Microbiol. 112, 417–429. https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2011.05204.x

Lonigro, A., Montemurro, N., Laera, G., 2017. Effects of residual disinfectant on soil and lettuce crop irrigated with chlorinated water. Sci. Total Environ. 584–585, 595–602. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.01.083

López-Gálvez, F., Randazzo, W., Vásquez, A., Sánchez, G., Decol, L.T., Aznar, R., Gil, M.I.,

Allende, A., 2018. Irrigating Lettuce with Wastewater Effluent: Does Disinfection with Chlorine Dioxide Inactivate Viruses? J. Environ. Qual. 47, 1139–1145. https://doi.org/10.2134/jeq2017.12.0485

Loubier, S., Declercq, R., 2014. Analyses coûts-bénéfices sur la mise en oeuvre de projets de réutilisation des eaux usées traitées (REUSE).

Ludwig, B., Rahfeld, J., Schmidt, B., Mann, K., Wintermeyer, E., Fischer, G., Hacker, J., 1994. Characterization of Mip proteins of Legionella pneumophila. FEMS Microbiol. Lett. 118, 23–30. https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1994.tb06798.x

Mahfoud, C., El Samrani, A., Mouawad, R., Hleihel, W., El Khatib, R., Lartiges, B.S., Ouaïni, N., 2009. Disruption of biofilms from sewage pipes under physical and chemical conditioning. J. Environ. Sci. 21, 120–126. https://doi.org/10.1016/S1001-0742(09)60021-8

Maisiri, N., Senzanje, A., Rockstrom, J., Twomlow, S.J., 2005. On farm evaluation of the effect of low cost drip irrigation on water and crop productivity compared to conventional surface irrigation system. Phys. Chem. Earth 30, 783–791. https://doi.org/10.1016/j.pce.2005.08.021

Mallon, C.A., Poly, F., Le Roux, X., Marring, I., van Elsas, J.D., Salles, J.F., 2015. Resource pulses can alleviate the biodiversity–invasion relationship in soil microbial communities. Ecology 96, 915–926. https://doi.org/10.1890/14-1001.1

Mansour, R., Elshafei, A., 2017. Protection of Metal Surfaces from Microbial Colonization. Annu. Res. Rev. Biol. 14, 1–8. https://doi.org/10.9734/ARRB/2017/34452

Mara, D.D., Sleigh, P.A., Blumenthal, U.J., Carr, R.M., 2007. Health risks in wastewater irrigation: Comparing estimates from quantitative microbial risk analyses and epidemiological studies. J. Water Health 5, 39–50. https://doi.org/10.2166/wh.2006.055

Marinho, L.E. de O., Coraucci Filho, B., Roston, D.M., Stefanutti, R., Tonetti, A.L., 2014. Evaluation of the Productivity of Irrigated Eucalyptus grandis with Reclaimed Wastewater and Effects on Soil. Water, Air, Soil Pollut. 225, 1830. https://doi.org/10.1007/s11270-013-1830-8

Marinho, L.E. de O., Tonetti, A.L., Stefanutti, R., Coraucci Filho, B., 2013. Application of Reclaimed Wastewater in the Irrigation of Rosebushes. Water, Air, Soil Pollut. 224, 1669. https://doi.org/10.1007/s11270-013-1669-z

Masclaux, F.G., Hotz, P., Friedli, D., Savova-Bianchi, D., Oppliger, A., 2013. High occurrence of hepatitis E virus in samples from wastewater treatment plants in

Switzerland and comparison with other enteric viruses. Water Res. 47, 5101–5109. https://doi.org/10.1016/j.watres.2013.05.050

Matheyarasu, R., Bolan, N.S., Naidu, R., 2016. Abattoir Wastewater Irrigation Increases the Availability of Nutrients and Influences on Plant Growth and Development. Water. Air. Soil Pollut. 227. https://doi.org/10.1007/s11270-016-2947-3

Mathieu, L., Bertrand, I., Abe, Y., Angel, E., Block, J.C., Skali-Lami, S., Francius, G., 2014. Drinking water biofilm cohesiveness changes under chlorination or hydrodynamic stress. Water Res. 55, 175–184. https://doi.org/10.1016/j.watres.2014.01.054

McLean, R.K., 2000. Spray evaporation losses from sprinkler irrigation systems. Can. Biosyst. Eng. / Le Genie des Biosyst. au Canada 42, 1–8.

McMurdie, P., Holmes, S., 2012. PHYLOSEQ: a biocondutor package for handling and analysis of high-throughput phylogenetic sequence data. Pac Symp Biocomput 235–246.

Megh R. Goyal, Chavan, V.K., Tripathi, V.K., 2015. Principles and Management of Clogging in Micro Irrigation. Apple Academic Press ; Boca Raton.

Meier, T., Bendinger, B., 2016. Survival of pathogens in drinking water plumbing systems: Impact factors and sanitation options. Water Sci. Technol. Water Supply 16, 931–941. https://doi.org/10.2166/ws.2016.040

Mekonnen, M.M., Hoekstra, A.Y., 2016. Sustainability: Four billion people facing severe water scarcity. Sci. Adv. 2, 1–7. https://doi.org/10.1126/sciadv.1500323

Mendoza-Olazarán, S., Morfin-Otero, R., Rodríguez-Noriega, E., Llaca-Díaz, J., Flores-Treviño, S., González-González, G.M., Villarreal-Treviño, L., Garza-González, E., 2013. Microbiological and Molecular Characterization of Staphylococcus hominis Isolates from Blood. PLoS One 8. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0061161

Merkley, G.P., Allen, R.G., 2003. Sprinkle and trickle irrigation lecture notes (BIE 5110/6110). Utah State Univ.

Mi, Z., Dai, Y., Xie, S., Chen, C., Zhang, X., 2015. Impact of disinfection on drinking water biofilm bacterial community. J. Environ. Sci. (China) 37, 200–205. https://doi.org/10.1016/j.jes.2015.04.008

Miyamoto, H., Yamamoto, H., Arima, K., Fujii, J., Maruta, K., Izu, K., Shiomori, T., Yoshida, S.I., 1997. Development of a new seminested PCR method for detection of Legionella species and its application to surveillance of Legionellae in hospital cooling tower water. Appl. Environ. Microbiol. 63, 2489–2494. https://doi.org/10.1128/aem.63.7.2489-2494.1997

Mohiuddin, M.M., Salama, Y., Schellhorn, H.E., Golding, G.B., 2017. Shotgun metagenomic sequencing reveals freshwater beach sands as reservoir of bacterial pathogens. Water Res. 115, 360–369. https://doi.org/10.1016/j.watres.2017.02.057

Montero, J., Tarjuelo, J.M., Carrión, P., 2003. Sprinkler droplet size distribution measured with an optical spectropluviometer. Irrig. Sci. 22, 47–56. https://doi.org/10.1007/s00271-003-0069-3

Moreira, J.M.R., Teodósio, J.S., Simões, M., Melo, L.F., Mergulhão, F.J., 2013. Biofilm formation under turbulent conditions: external mass transfer versus shear stress. Int. Conf. Heat Exch. Fouling Clean. 2013, 200–204.

Morgenroth, E., Milferstedt, K., 2009. Biofilm engineering: Linking biofilm development at different length and time scales. Rev. Environ. Sci. Biotechnol. 8, 203–208. https://doi.org/10.1007/s11157-009-9163-1

Naher, S., Orpen, D., Brabazon, D., Poulsen, C.R., Morshed, M.M., 2011. Effect of micro-channel geometry on fluid flow and mixing. Simul. Model. Pract. Theory 19, 1088–1095. https://doi.org/10.1016/j.simpat.2010.12.008

Nakayama, F.S., Bucks, D.A., 1991. Water quality in drip/trickle irrigation: A review. Irrig. Sci. 12, 187–192. https://doi.org/10.1007/BF00190522

Navarro, R.R., Hori, T., Inaba, T., Matsuo, K., Habe, H., Ogata, A., 2016. High-resolution phylogenetic analysis of residual bacterial species of fouled membranes after NaOCl cleaning. Water Res. 94, 166–175. https://doi.org/10.1016/j.watres.2016.02.044

Nguyen, N.-P., Warnow, T., Pop, M., White, B., 2016. A perspective on 16S rRNA operational taxonomic unit clustering using sequence similarity. npj Biofilms Microbiomes 2, 16004. https://doi.org/10.1038/npjbiofilms.2016.4

Niu, W., Liu, L., Chen, X., 2013. Influence of fine particle size and concentration on the clogging of labyrinth emitters. Irrig. Sci. 31, 545–555. https://doi.org/10.1007/s00271-012-0328-2

Niu, W., Yu, L., Wu, P., 2010. Anti-clogging experimental investigation and optimized design of micro-channels of emitter based on isoline of sand content. Trans. Chinese Soc. Agric. Mach. 26, 14–20.

Obayomi, O., Bernstein, N., Edelstein, M., Vonshak, A., Ghazayarn, L., Ben-Hur, M., Tebbe, C.C., Gillor, O., 2019a. Importance of soil texture to the fate of pathogens introduced by irrigation with treated wastewater. Sci. Total Environ. 653, 886–896. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.10.378

Obayomi, O., Ghazaryan, L., Ben-Hur, M., Edelstein, M., Vonshak, A., Safi, J., Bernstein, N., Gillor, O., 2019b. The fate of pathogens in treated wastewater-soil-crops continuum and the effect of physical barriers. Sci. Total Environ. 681, 339–349. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.04.378

Oder, M., Fink, R., Bohinc, K., Torkar, K.G., 2017. The influence of shear stress on the adhesion capacity of Legionella pneumophila. Arch. Ind. Hyg. Toxicol. 68, 109–115. https://doi.org/10.1515/aiht-2017-68-2904

Of, C., Plugging, E., 2011. Causes and Prevention of Emitter Plugging In 1–11.

Oliveira, F., Lavanholi, R., Camargo, A., Frizzone, A., Ait-Mouheb, N., Tomas, S., Molle, B., 2017. Influence of Concentration and Type of Clay Particles on Dripper Clogging. Irrig. Drain. Syst. Eng. 6, 1–5. https://doi.org/10.4172/2168-9768.1000184

Oliveira, F.C., Lavanholi, R., de Camargo, A.P., Ait-Mouheb, N., Frizzone, J.A., Tomas, S., Molle, B., 2020. Clogging of drippers caused by suspensions of kaolinite and montmorillonite clays. Irrig. Sci. 38, 65–75. https://doi.org/10.1007/s00271-019-00652-4

Oliver, M.M.H., Hewa, G.A., Pezzaniti, D., Haque, M.A., Haque, S., Haque, M.M., Moniruzzaman, M., Rahman, M.M., Saha, K.K., Kadir, M.N., 2020. COVID-19 and Recycled Wastewater Irrigation: A Review of Implications. Preprints 1–23. https://doi.org/10.20944/PREPRINTS202006.0105.V1

OMS, 2006. Safe Use of Wastewater , Excreta and Greywater Guidelines for the Safe Use of. World Health II, 204. https://doi.org/10.1007/s13398-014-0173-7.2

Orlofsky, E., Benami, M., Gross, A., Dutt, M., Gillor, O., 2015. Rapid MPN-Qpcr Screening for Pathogens in Air, Soil, Water, and Agricultural Produce. Water. Air. Soil Pollut. 226. https://doi.org/10.1007/s11270-015-2560-x

Pachepsky, Y., Morrow, J., Guber, A., Shelton, D., Rowland, R., Davies, G., 2012. Effect of biofilm in irrigation pipes on microbial quality of irrigation water. Lett. Appl. Microbiol. 54, 217–224. https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2011.03192.x

Palau Salvador, G., Arviza Valverde, J., Bralts, V. F., 2004. Hydraulic Flow Behaviour through an In-line Emitter Labyrinth using CFD Techniques, in: 2004, Ottawa, Canada August 1 - 4, 2004. American Society of Agricultural and Biological Engineers, St. Joseph, MI, pp. 3127–3135. https://doi.org/10.13031/2013.16437

Park, S., Szonyi, B., Gautam, R., Nightingale, K., Anciso, J., Ivanek, R., 2012. Risk factors for microbial contamination in fruits and vegetables at the preharvest level: A systematic review. J. Food Prot. 75, 2055–2081. https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-12-160

Parry, J., 2004. Protozoan Grazing of Freshwater Biofilms. Adv. Appl. Microbiol. 54. https://doi.org/0065-2164/04

Parry, J.D., Holmes, A.K., Unwin, M.E., Laybourn-Parry, J., 2007. The use of ultrasonic imaging to evaluate the effect of protozoan grazing and movement on the topography of bacterial biofilms. Lett. Appl. Microbiol. 45, 364–370. https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2007.02213.x

Pedrero, F., Kalavrouziotis, I., Alarcón, J.J., Koukoulakis, P., Asano, T., 2010. Use of treated municipal wastewater in irrigated agriculture-Review of some practices in Spain and Greece. Agric. Water Manag. 97, 1233–1241. https://doi.org/10.1016/j.agwat.2010.03.003

Percival, S., Yates, M., Williams, D., Chalmers, R., Gray, N., 2014. Microbiology of Waterborne Diseases, Microbiology of Waterborne Diseases. Elsevier.

Picioreanu, C., Blauert, F., Horn, H., Wagner, M., 2018. Determination of mechanical properties of biofilms by modelling the deformation measured using optical coherence tomography. Water Res. 145, 588–598. https://doi.org/10.1016/j.watres.2018.08.070

Piña, B., Bayona, J.M., Christou, A., Fatta-Kassinos, D., Guillon, E., Lambropoulou, D., Michael, C., Polesel, F., Sayen, S., 2020. On the contribution of reclaimed wastewater irrigation to the potential exposure of humans to antibiotics, antibiotic resistant bacteria and antibiotic resistance genes – NEREUS COST Action ES1403 position paper. J. Environ. Chem. Eng. 8, 102131. https://doi.org/10.1016/j.jece.2018.01.011

Pitts, D.J., Haman, D.Z., Smajstria, a G., 1990. Causes and prevention of emitter plugging in micro irrigation systems. Bull. Coop. Ext. Serv. 1–11.

Plauborg, F., Andersen, M.N., Liu, F., Ensink, J., Ragab, R., 2010. Safe and high quality food production using low quality waters and improved irrigation systems and management : SAFIR. Agric. Water Manag. 98, 377–384. https://doi.org/10.1016/j.agwat.2010.05.020

Podschun, R., Ullmann, U., 1998. Klebsiella spp. as nosocomial pathogens: Epidemiology, taxonomy, typing methods, and pathogenicity factors. Clin. Microbiol. Rev. 11, 589–603. https://doi.org/10.1128/cmr.11.4.589

Puig-Bargués, J., Arbat, G., Barragán, J., Ramírez De Cartagena, F., 2005. Hydraulic performance of drip irrigation subunits using WWTP effluents, in: Agricultural Water Management. pp. 249–262. https://doi.org/10.1016/j.agwat.2004.09.032

Puig-Bargués, J., Arbat, G., Elbana, M., Duran-Ros, M., Barragán, J., de Cartagena, F.R., Lamm, F.R., 2010a. Effect of flushing frequency on emitter clogging in microirrigation

with effluents. Agric. Water Manag. 97, 883–891. https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/j.agwat.2010.01.019

Puig-Bargués, J., Arbat, G., Elbana, M., Duran-Ros, M., Barragán, J., de Cartagena, F.R., Lamm, F.R., 2010. Effect of flushing frequency on emitter clogging in microirrigation with effluents. Agric. Water Manag. 97, 883–891. https://doi.org/10.1016/j.agwat.2010.01.019

Puig-Bargués, J., Lamm, F., Trooien, T., Clark, G., 2010b. Effect of dripline flushing on subsurface drip irrigation systems. Trans. ASABE 53, 147–155. https://doi.org/10.13031/2013.29513

Pun, A., 2000. TECHNICAL NOTE INFLUENCE OF C : N RATIO ON THE START-UP OF UP- FLOW ANAEROBIC FILTER REACTORS 34, 2614–2619. https://doi.org/10.1016/S0043-1354(00)00161-5

Qadir, M., Wichelns, D., Raschid-Sally, L., Minhas, P.S., Drechsel, P., Bahri, K., McCornick, P., Abaidoo, R.C., Attia, F., El-Guindy, E., Ensink, J.H.J., Jimenez, B., Kijne, J.W., Koo-Oshima, S., Oster, J.D., Yebande, L., Sagardoy, J.A., van der Hoek, W., Wichnels, D., Raschid-Sally, L., Singh Minhas, P., Drechsel, P., Bahri, A., McCornick, P., 2007. Agricultural use of marginal-quality water—opportunities and challenges. Water Food; Water Life. A Compr. Assess. Water Manag. Agric. 425–457. https://doi.org/10.4324/9781849773799

Qdais, H.A., Abdulla, F., Kurbatova, A., 2019. Wastewater reuse in Jordan and its potential as an adaptation measure to climate change. J. Environ. Eng. Sci. 14, 203–211. https://doi.org/10.1680/jenes.19.00029

Qian, J., Horn, H., Tarchitzky, J., Chen, Y., Katz, S., Wagner, M., 2017. Water quality and daily temperature cycle affect biofilm formation in drip irrigation devices revealed by optical coherence tomography. Biofouling 7014, 1–11. https://doi.org/10.1080/08927014.2017.1285017

Qingsong, W., Gang, L., Jie, L., Yusheng, S., Wenchu, D., Shuhuai, H., 2008. Evaluations of emitter clogging in drip irrigation by two-phase flow simulations and laboratory experiments. Comput. Electron. Agric. 63, 294–303. https://doi.org/10.1016/j.compag.2008.03.008

Qingsong, W., Yusheng, S., Gang, L., Wenchu, D., Shuhuai, H., 2006. Study of hydraulic performance of the eddy channel for drip emitters. Irrig. Drain. 55, 61–72. https://doi.org/10.1002/ird.216

Ragusa, S.R., de Zoysa, D.S., Rengasamy, P., 1994. The effect of microorganisms, salinity and turbidity on hydraulic conductivity of irrigation channel soil. Irrig. Sci. 15, 159–166. https://doi.org/10.1007/BF00193683

Rahman, M.Z., Riesbeck, F., Dupree, S., 2018. The Opportunity Versus Risks in Wastewater Irrigation, in: Hettiarachchi, H., Ardakanian, R. (Eds.), Safe Use of Wastewater in Agriculture. Springer International Publishing, Cham, pp. 13–25. https://doi.org/10.1007/978-3-319-74268-7_2

Ramirez, K.S., Craine, J.M., Fierer, N., 2012. Consistent effects of nitrogen amendments on soil microbial communities and processes across biomes. Glob. Chang. Biol. 18, 1918–1927. https://doi.org/10.1111/j.1365-2486.2012.02639.x

Raskin, L., Rittmann, B.E., Stahl, D.A., 1996. Competition and coexistence of sulfate-reducing and methanogenic populations in anaerobic biofilms. Appl. Environ. Microbiol. 62, 3847–3857.

Rav-Acha, C., Kummel, M., Salamon, I., Adin, A., 1995. The effect of chemical oxidants on effluent constituents for drip irrigation. Water Res. 29, 119–129. https://doi.org/10.1016/0043-1354(94)E0113-K

Ravina, I., Paz, E., Sofer, Z., Marcu, A., Schischa, A., Sagi, G., Yechialy, Z., Lev, Y., 1997. Control of clogging in drip irrigation with stored treated municipal sewage effluent. Agric. Water Manag. 33, 127–137. https://doi.org/10.1016/S0378-3774(96)01286-3

Ravina, I., Paz, E., Sofer, Z., Marcu, A., Shisha, A., Sagi, G., 1992. Control of emitter clogging in drip irrigation with reclaimed wastewater. Irrig. Sci. 13, 129–139. https://doi.org/10.1007/BF00191055

Rehman, Z.U., Fortunato, L., Cheng, T., Leiknes, T.O., 2020. Metagenomic analysis of sludge and early-stage biofilm communities of a submerged membrane bioreactor. Sci. Total Environ. 701, 134682. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.134682

Reinoso, R., Torres, L.A., Bécares, E., 2008. Efficiency of natural systems for removal of bacteria and pathogenic parasites from wastewater. Sci. Total Environ. 395, 80–86. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2008.02.039

Rendueles, O., Ghigo, J.M., 2012. Multi-species biofilms: How to avoid unfriendly neighbors. FEMS Microbiol. Rev. 36, 972–989. https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2012.00328.x

Réseau MedECC, 2019. Les risques liés aux changements climatiques et environnementaux dans la région Méditerranée.

Reuter, J.A., Spacek, D. V., Snyder, M.P., 2015. High-Throughput Sequencing Technologies.

Mol. Cell 58, 586–597. https://doi.org/10.1016/j.molcel.2015.05.004

Reyes-Batlle, M., Girbau, C., López-Arencibia, A., Sifaoui, I., Liendo, A.R., Bethencourt Estrella, C.J., García Méndez, A.B., Chiboub, O., Hajaji, S., Fernández-Astorga, A., Valladares, B., Martínez-Carretero, E., Piñero, J.E., Lorenzo-Morales, J., 2017. Variation in Campylobacter jejuni culturability in presence of Acanthamoeba castellanii Neff. Exp. Parasitol. 183, 178–181. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.exppara.2017.09.005

Rezzonico, F., Smits, T.H., Montesinos, E., Frey, J.E., Duffy, B., 2009. Genotypic comparison of Pantoea agglomerans plant and clinical strains. BMC Microbiol. 9. https://doi.org/10.1186/1471-2180-9-204

Richards, J.J., Melander, C., 2009. Controlling bacterial biofilms. ChemBioChem 10, 2287–2294. https://doi.org/10.1002/cbic.200900317

Rietz, D.N., Haynes, R.J., 2003. Effects of irrigation-induced salinity and sodicity on soil microbial activity. Soil Biol. Biochem. 35, 845–854. https://doi.org/10.1016/S0038-0717(03)00125-1

Rieul, L., Ruelle, P., 2003. Guide pratique, 3rd ed. Paris.

Rizk, N., 2017. Characterization of chemical and biological clogging and their interactions within a micro irrigation system in the context of the reuse of treated effluents in irrigation. Université Aix-Marseille.

Rizk, N., Ait-Mouheb, N., Bourrié, G., Molle, B., Roche, N., 2017. Parameters controlling chemical deposits in micro-irrigation with treated wastewater. J. Water Supply Res. Technol. - AQUA 66, 587–597. https://doi.org/10.2166/aqua.2017.065

Rizk, N., Ait-Mouheb, N., Molle, B., Roche, N., 2019. Treated wastewater reuse in micro-irrigation: effect of shear stress on biofilm development kinetics and chemical precipitation. Environ. Technol. 0, 1–11. https://doi.org/10.1080/09593330.2019.1625956

Rochex, A., Godon, J.J., Bernet, N., Escudié, R., 2008. Role of shear stress on composition, diversity and dynamics of biofilm bacterial communities. Water Res. 42, 4915–4922. https://doi.org/10.1016/j.watres.2008.09.015

Romaní, A.M., Borrego, C.M., Díaz-Villanueva, V., Freixa, A., Gich, F., Ylla, I., 2014. Shifts in microbial community structure and function in light- and dark-grown biofilms driven by warming. Environ. Microbiol. 16, 2550–2567. https://doi.org/10.1111/1462-2920.12428

Romaní, A.M., Guasch, H., Balaguer, M.D., 2016. Aquatic Biofilms: Ecology, Water Quality

and Wastewater Treatment. Caister Academic Press.

Rosenberg, E., De Long, E.F., Lory, S., Stackebrandt, E., Thompson, F., 2014. The Phylum Thermotogae, The Prokaryotes: Other Major Lineages of Bacteria and The Archaea. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-642-38954-2

Rosenthal, A., Yi, J., Zhang, H.F., Balogun, O., Wells, G., 2015. Quantitative image analysis of mesoscale biofilm structure with optical coherence tomography. 88th Annu. Water Environ. Fed. Tech. Exhib. Conf. WEFTEC 2015 5, 4736–4745. https://doi.org/10.2175/193864715819540793

Rousk, J., Bååth, E., Brookes, P.C., Lauber, C.L., Lozupone, C., Caporaso, J.G., Knight, R., Fierer, N., 2010. Soil bacterial and fungal communities across a pH gradient in an arable soil. ISME J. 4, 1340–1351. https://doi.org/10.1038/ismej.2010.58

Rusconi, R., Lecuyer, S., Guglielmini, L., Stone, H.A., 2010. Laminar flow around corners triggers the formation of biofilm streamers. J. R. Soc. Interface 7, 1293–1299. https://doi.org/10.1098/rsif.2010.0096

Rusin, P.A., Rose, J.B., Haas, C.N., Gerba, C.P., 1997. Risk assessment of opportunistic bacterial pathogens in drinking water. Rev. Environ. Contam. Toxicol. 152, 57–83. https://doi.org/10.1007/978-1-4612-1964-4_2

Rusiñol, M., Martínez-Puchol, S., Timoneda, N., Fernández-Cassi, X., Pérez-Cataluña, A., Fernández-Bravo, A., Moreno-Mesonero, L., Moreno, Y., Alonso, J.L., Figueras, M.J., Abril, J.F., Bofill-Mas, S., Girones, R., 2020. Metagenomic analysis of viruses, bacteria and protozoa in irrigation water. Int. J. Hyg. Environ. Health 224, 113440. https://doi.org/10.1016/j.ijheh.2019.113440

Ryan, M.P., Adley, C.C., 2013. The antibiotic susceptibility of water-based bacteria Ralstonia pickettii and Ralstonia insidiosa. J. Med. Microbiol. 62, 1025–1031. https://doi.org/10.1099/jmm.0.054759-0

Sabat, A.J., Van Zanten, E., Akkerboom, V., Wisselink, G., Van Slochteren, K., De Boer, R.F., Hendrix, R., Friedrich, A.W., Rossen, J.W.A., Kooistra-Smid, A.M.D.M., 2017. Targeted next-generation sequencing of the 16S-23S rRNA region for culture-independent bacterial identification-increased discrimination of closely related species. Sci. Rep. 7, 1–12. https://doi.org/10.1038/s41598-017-03458-6

Sagarduy, M., Courtois, S., Del Campo, A., Garmendia, J.M., Petrau, A., 2019. Differential decay and prediction of persistence of Enterococcus spp. and Escherichia coli culturable

cells and molecular markers in freshwater and seawater environments. Int. J. Hyg. Environ. Health 222, 695–704. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ijheh.2019.04.011

Sánchez-Peinado, M. del M., González-López, J., Martínez-Toledo, M.V., Pozo, C., Rodelas, B., 2010. Influence of linear alkylbenzene sulfonate (LAS) on the structure of Alphaproteobacteria, Actinobacteria, and Acidobacteria communities in a soil microcosm. Environ. Sci. Pollut. Res. 17, 779–790. https://doi.org/10.1007/s11356-009-0180-y

Sánchez, O., Ferrera, I., Garrido, L., Gómez-Ramos, M.D.M., Fernández-Alba, A.R., Mas, J., 2014. Prevalence of potentially thermophilic microorganisms in biofilms from greenhouse-enclosed drip irrigation systems. Arch. Microbiol. 196, 219–226. https://doi.org/10.1007/s00203-014-0957-3

Sato, T., Qadir, M., Yamamoto, S., Endo, T., Zahoor, A., 2013. Global, regional, and country level need for data on wastewater generation, treatment, and use. Agric. Water Manag. 130, 1–13. https://doi.org/10.1016/j.agwat.2013.08.007

Saur, T., Morin, E., Habouzit, F., Bernet, N., Escudié, R., 2017. Impact of wall shear stress on initial bacterial adhesion in rotating annular reactor. PLoS One 12, 1–19. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0172113

Schindelin, J., Arganda-Carrera, I., Frise, E., Verena, K., Mark, L., Tobias, P., Stephan, P., Curtis, R., Stephan, S., Benjamin, S., Jean-Yves, T., Daniel, J.W., Volker, H., Kevin, E., Pavel, T., Albert, C., 2009. Fiji - an Open platform for biological image analysis. Nat. Methods 9, 241. https://doi.org/10.1038/nmeth.2019.Fiji

Schloss, P.D., Jenior, M.L., Koumpouras, C.C., Westcott, S.L., Highlander, S.K., 2016. Sequencing 16S rRNA gene fragments using the PacBio SMRT DNA sequencing system. PeerJ 2016, 1–16. https://doi.org/10.7717/peerj.1869

Schloss, P.D., Westcott, S.L., Ryabin, T., Hall, J.R., Hartmann, M., Hollister, E.B., Lesniewski, R.A., Oakley, B.B., Parks, D.H., Robinson, C.J., Sahl, J.W., Stres, B., Thallinger, G.G., Van Horn, D.J., Weber, C.F., 2009. Introducing mothur: open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities. Appl. Environ. Microbiol. 75, 7537–41. https://doi.org/10.1128/AEM.01541-09

Schmid-Hempel, P., Frank, S.A., 2007. Pathogenesis, virulence, and infective dose. PLoS Pathog. 3, 1372–1373. https://doi.org/10.1371/journal.ppat.0030147

Schwering, M., Song, J., Louie, M., Turner, R.J., Ceri, H., 2013. Multi-species biofilms

defined from drinking water microorganisms provide increased protection against chlorine disinfection. Biofouling 29, 917–928. https://doi.org/10.1080/08927014.2013.816298

Scoaris, D. de O., Colacite, J., Nakamura, C. V., Ueda-Nakamura, T., de Abreu Filho, B.A., Dias Filho, B.P., 2008. Virulence and antibiotic susceptibility of Aeromonas spp. isolated from drinking water. Antonie van Leeuwenhoek, Int. J. Gen. Mol. Microbiol. 93, 111–122. https://doi.org/10.1007/s10482-007-9185-z

Seto, E.Y., Konnan, J., Olivieri, A.W., Danielson, R.E., Gray, D.M.D., 2016. A quantitative microbial risk assessment of wastewater treatment plant blending: Case study in San Francisco Bay. Environ. Sci. Water Res. Technol. 2, 134–145. https://doi.org/10.1039/c5ew00147a

Shaw, J.L.A., Monis, P., Fabris, R., Ho, L., Braun, K., Drikas, M., Cooper, A., 2014. Assessing the impact of water treatment on bacterial biofilms in drinking water distribution systems using high-throughput DNA sequencing. Chemosphere 117, 185–192. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2014.06.077

Shekhawat, S.S., Kulshreshtha, N.M., Gupta, A.B., 2020. Investigation of chlorine tolerance profile of dominant gram negative bacteria recovered from secondary treated wastewater in Jaipur, India. J. Environ. Manage. 255, 109827. https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2019.109827

Shelton, D.R., Kiefer, L.A., Pachepsky, Y.A., Blaustein, R.A., Martinez, G., 2013. Coliform retention and release in biofilms formed on new and weathered irrigation pipes. Irrig. Sci. 31, 971–981. https://doi.org/10.1007/s00271-012-0373-x

Shen, Y., Monroy, G.L., Derlon, N., Janjaroen, D., Huang, C., Morgenroth, E., Boppart, S.A., Ashbolt, N.J., Liu, W.T., Nguyen, T.H., 2015. Role of biofilm roughness and hydrodynamic conditions in legionella pneumophila adhesion to and detachment from simulated drinking water biofilms. Environ. Sci. Technol. 49, 4274–4282. https://doi.org/10.1021/es505842v

Sheng, X.X., Ting, Y.P., Pehkonen, S.O., 2008. The influence of ionic strength, nutrients and pH on bacterial adhesion to metals. J. Colloid Interface Sci. 321, 256–264. https://doi.org/10.1016/j.jcis.2008.02.038

Shrivastava, R., Upreti, R.K., Jain, S.R., Prasad, K.N., Seth, P.K., Chaturvedi, U.C., 2004. Suboptimal chlorine treatment of drinking water leads to selection of multidrug-resistant Pseudomonas aeruginosa. Ecotoxicol. Environ. Saf. 58, 277–283.

https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0147-6513(03)00107-6

Simões, M., Simões, L.C., Vieira, M.J., 2010. A review of current and emergent biofilm control strategies. LWT - Food Sci. Technol. 43, 573–583. https://doi.org/10.1016/j.lwt.2009.12.008

Simon, K.S., Simon, M.A., Benfield, E.F., 2009. Variation in ecosystem function in Appalachian streams along an acidity gradient. Ecol. Appl. 19, 1147–1160. https://doi.org/10.1890/08-0571.1

Singandhupe, R.B., Rao, G.G.S.N., Patil, N.G., Brahmanand, P.S., 2003. Fertigation studies and irrigation scheduling in drip irrigation system in tomato crop (Lycopersicon esculentum L.). Eur. J. Agron. 19, 327–340. https://doi.org/10.1016/S1161-0301(02)00077-1

Singh, J., Sharma, D., Kumar, G., Sharma, N.R., 2018. Microbial Bioprospecting for Sustainable Development, in: Bioremediation: An Eco-Sustainable Approach for Restoration of Contaminated Sites. pp. 1–397. https://doi.org/10.1007/978-981-13-0053-0

Skwor, T., Stringer, S., Haggerty, J., Johnson, J., Duhr, S., Johnson, M., Seckinger, M., Stemme, M., 2020. Prevalence of potentially pathogenic antibiotic-resistant aeromonas spp. in treated urban wastewater effluents versus recipient riverine populations: A 3-year comparative study. Appl. Environ. Microbiol. 86. https://doi.org/10.1128/AEM.02053-19

Sloots, T.P., Nissen, M.D., Ginn, A.N., Iredell, J.R., 2015. Rapid identification of pathogens using molecular techniques. Pathology 47, 191–198. https://doi.org/10.1097/PAT.0000000000000241

Smit, E., Leeflang, P., Gommans, S., van den Broek, J., van Mil, S., Wernars, K., 2001. Diversity and Seasonal Fluctuations of the Dominant Members of the Bacterial Soil Community in a Wheat Field as Determined by Cultivation and Molecular Methods. Appl. Environ. Microbiol. 67, 2284 LP-2291. https://doi.org/10.1128/AEM.67.5.2284-2291.2001

Sohou, L.R., Kénou, C., Sogbedji, J.M., Sintondji, L.O., Agbossou, E.K., Mensah, G.A., 2017. Synthese Bibliographique Sur Les Technologies De Maitrise De L'eau Pour Les Cultures Dans Les Zones Humides Tropicales. Eur. Sci. Journal, ESJ 13, 152. https://doi.org/10.19044/esj.2017.v13n3p152

Song, P., Feng, G., Brooks, J., Zhou, B., Zhou, H., Zhao, Z., Li, Y., 2019a. Environmental

risk of chlorine-controlled clogging in drip irrigation system using reclaimed water: the perspective of soil health. J. Clean. Prod. 232, 1452–1464. https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2019.06.050

Song, P., Li, Y., Zhou, B., Zhou, C., Zhang, Z., Li, J., 2017. Controlling mechanism of chlorination on emitter bio-clogging for drip irrigation using reclaimed water. Agric. Water Manag. 184, 36–45. https://doi.org/10.1016/j.agwat.2016.12.017

Song, P., Zhou, B., Feng, G., Brooks, J.P., Zhou, H., Zhao, Z., Liu, Y., Li, Y., 2019b. The influence of chlorination timing and concentration on microbial communities in labyrinth channels: implications for biofilm removal. Biofouling 35, 401–415. https://doi.org/10.1080/08927014.2019.1600191

Sonigo, P., Toni, A. De, Reilly, K., 2011. A Review ofFungi in Drinking Water and the Implications for Human Health. Paris.

Sridhara Chary, N., Kamala, C.T., Samuel Suman Raj, D., 2008. Assessing risk of heavy metals from consuming food grown on sewage irrigated soils and food chain transfer. Ecotoxicol. Environ. Saf. 69, 513–524. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2007.04.013

Stefania, A., Giacomo, G., Bernardo, C. de G. 2, Vito, I., A. Ferruccio, P., 2017. Cost–Benefit Analysis of Wastewater Reuse in Puglia, Southern Italy 1–17. https://doi.org/10.3390/w9030175

Stevenin, C., Tomas, S., Vallet, A., Amielh, M., Anselmet, F., 2016. Flow characteristics of a large-size pressure-atomized spray using DTV. Int. J. Multiph. Flow 84, 264–278. https://doi.org/10.1016/j.ijmultiphaseflow.2016.05.004

Stoeck, T., Pan, H., Dully, V., Forster, D., Jung, T., 2018. Towards an eDNA metabarcode-based performance indicator for full- scale municipal wastewater treatment plants. Water Res. 144, 322–331. https://doi.org/10.1016/j.watres.2018.07.051

Stoodley, P., DeBeer, D., Lappin-Scott, H.M., 1997. Influence of electric fields and pH on biofilm structure as related to the bioelectric effect. Antimicrob. Agents Chemother. 41, 1876–1879. https://doi.org/10.1128/aac.41.9.1876

Stoodley, P., Dodds, I., Boyle, J.D., Lappin-Scott, H.M., 1999. Influence of hydrodynamics and nutrients on biofilm structure. J. Appl. Microbiol. Symp. Suppl. 85, 19–28. https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1998.tb05279.x

Sun, H., Terhonen, E., Koskinen, K., Paulin, L., Kasanen, R., Asiegbu, F.O., 2014. Bacterial diversity and community structure along different peat soils in boreal forest. Appl. Soil

Ecol. 74, 37–45. https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2013.09.010

Suzuki, M., Suzuki, S., Matsui, M., Hiraki, Y., Kawano, F., Shibayama, K., 2013a. Genome sequence of a strain of the human pathogenic bacterium Pseudomonas alcaligenes that caused bloodstream infection. Genome Announc. 1, e00919-13.

Suzuki, M., Suzuki, S., Matsui, M., Hiraki, Y., Kawano, F., Shibayama, K., 2013b. Genome sequence of a strain of the human pathogenic bacterium Pseudomonas alcaligenes that caused bloodstream infection. Genome Announc. 1, 1–2. https://doi.org/10.1128/genomeA.e00919-13

Swartjes, F.A., 2011. Dealing with Contaminated Sites, Springer. ed. Springer Netherlands, Dordrecht. https://doi.org/10.1007/978-90-481-9757-6

Swathi A., T., Rakesh, M., Premsai S., B., Louis S., T., William K., T., Subhash C., M., 2013. Chronic N-amended soils exhibit an altered bacterial community structure in Harvard Forest, MA, USA. FEMS Microbiol. Ecol. 83, 478–493. https://doi.org/10.1111/1574-6941.12009

Tamaki, H., Zhang, R., Angly, F.E., Nakamura, S., Hong, P.-Y., Yasunaga, T., Kamagata, Y., Liu, W.-T., 2012. Metagenomic analysis of DNA viruses in a wastewater treatment plant in tropical climate. Environ. Microbiol. 14, 441–452. https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2011.02630.x

Tanaka, T., Takahashi, H., Kobayashi, J.M., Ohyama, T., Okabe, N., 2004. A nosocomial outbreak of febrile bloodstream infection caused by heparinized-saline contaminated with Serratia marcescens, Tokyo, 2002. Jpn. J. Infect. Dis. 57, 189–192.

Tarchitzky, J., Rimon, A., Kenig, E., Dosoretz, C.G., Chen, Y., 2013. Biological and chemical fouling in drip irrigation systems utilizing treated wastewater. Irrig. Sci. 31, 1277–1288. https://doi.org/10.1007/s00271-013-0406-0

Taylor, H.D., Bastos, R.K.X., Pearson, H.W., Mara, D.D., 1995. Drip irrigation with waste stabilisation pond effluents: Solving the problem of emitter fouling. Water Sci. Technol. 31, 417–424. https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/0273-1223(95)00528-U

Teodósio, J.S., Simões, M., Melo, L.F., Mergulhão, F.J., 2011. Flow cell hydrodynamics and their effects on E. coli biofilm formation under different nutrient conditions and turbulent flow. Biofouling 27, 1–11. https://doi.org/10.1080/08927014.2010.535206

Tevell, S., Hellmark, B., Nilsdotter-Augustinsson, Söderquist, B., 2017. Staphylococcus capitis isolated from prosthetic joint infections. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 36, 115–122. https://doi.org/10.1007/s10096-016-2777-7

Thebo, A.L., Drechsel, P., Lambin, E.F., 2014. Global assessment of urban and peri-urban agriculture: Irrigated and rainfed croplands. Environ. Res. Lett. 9. https://doi.org/10.1088/1748-9326/9/11/114002

Thebo, A.L., Drechsel, P., Lambin, E.F., Nelson, K.L., Tidwell, V.C., Moreland, B.D., Zemlick, K.M., 2017. A global , spatially-explicit assessment of irrigated croplands influenced by urban wastewater flows. Environ. Res. Lett. 12. https://doi.org/10.1088/1748-9326/aa75d1

Thompson, L.J., Gray, V., Lindsay, D., Holy, A. Von, 2006. Carbon : nitrogen : phosphorus ratios influence biofilm formation by Enterobacter cloacae and Citrobacter freundii 101, 1105–1113. https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2006.03003.x

Tilman, D., 2004. Niche tradeoffs , neutrality , and community structure : A stochastic theory of resource competition , invasion , and community assembly 101.

Tilman, D., Cassman, K.G., Matson, P.A., Naylor, R., Polas, S., 2002. Agricultural sustainability and intensive production practices. Nature 418, 671–677. https://doi.org/10.1080/11263508809430602

Torsvik, V., Øvreås, L., 2002. Microbial diversity and function in soil: from genes to ecosystems. Curr. Opin. Microbiol. 5, 240–245. https://doi.org/10.1016/S1369-5274(02)00324-7

Toze, S., 2006. Reuse of effluent water - Benefits and risks. Agric. Water Manag. 80, 147–159. https://doi.org/10.1016/j.agwat.2005.07.010

Tran, Q.K., Schwabe, K.A., Jassby, D., 2016. Wastewater Reuse for Agriculture : A Development of a Regional Water Reuse Decision-Support Model (RWRM) for Cost-Effective Irrigation Sources Wastewater Reuse for Agriculture : A Development of a Regional Water Reuse Decision-Support Model (RWRM) for. https://doi.org/10.1021/acs.est.6b02073

Tremblay, Y.D.N., Hathroubi, S., Jacques, M., 2014. Les biofilms bactériens : leur importance en santé animale et en santé publique 110–116.

Trigui, H., Paquet, V.E., Charette, S.J., Faucher, S.P., 2016. Packaging of Campylobacter jejuni into Multilamellar Bodies by the Ciliate <span class="named-content genus-species" id="named-content-. Appl. Environ. Microbiol. 82, 2783 LP-2790. https://doi.org/10.1128/AEM.03921-15

Tsvetanova, Z., 2020. Quantification of the bacterial community of drinking water -

associated biofilms under different flow velocities and changing chlorination regimes. Appl. Water Sci. https://doi.org/10.1007/s13201-019-1086-6

UNDP, 2006. Beyond Scarcity: Power, Poverty and the Global Water Crisis. United Nations Development Programme (UNDP). New York. https://doi.org/10.1177/004908570603600312

UNESCO World Water Assessment Programme, 2020. The United Nations world water development report 2020: water and climate change.

Urbano, V.R., Mendonça, T.G., Bastos, R.G., Souza, C.F., 2017. Effects of treated wastewater irrigation on soil properties and lettuce yield. Agric. Water Manag. 181, 108–115. https://doi.org/10.1016/j.agwat.2016.12.001

Uyttendaele, M., Jaykus, L.-A., Amoah, P., Chiodini, A., Cunliffe, D., Jacxsens, L., Holvoet, K., Korsten, L., Lau, M., McClure, P., Medema, G., Sampers, I., Rao Jasti, P., 2015. Microbial Hazards in Irrigation Water: Standards, Norms, and Testing to Manage Use of Water in Fresh Produce Primary Production. Compr. Rev. Food Sci. Food Saf. 14, 336–356. https://doi.org/10.1111/1541-4337.12133

Valladares Linares, R., Wexler, A.D., Bucs, S.S., Dreszer, C., Zwijnenburg, A., Flemming, H.C., Kruithof, J.C., Vrouwenvelder, J.S., 2016. Compaction and relaxation of biofilms. Desalin. Water Treat. 57, 12902–12914. https://doi.org/10.1080/19443994.2015.1057036

Van Der Kooij, D., Veenendaal, H.R., Scheffer, W.J.H., 2005. Biofilm formation and multiplication of Legionella in a model warm water system with pipes of copper, stainless steel and cross-linked polyethylene. Water Res. 39, 2789–2798. https://doi.org/10.1016/j.watres.2005.04.075

van Elsas, J.D., Chiurazzi, M., Mallon, C.A., Elhottova, D., Kristufek, V., Salles, J.F., 2012. Microbial diversity determines the invasion of soil by a bacterial pathogen. Proc. Natl. Acad. Sci. 109, 1159–1164. https://doi.org/10.1073/pnas.1109326109

Varela, A.R., Manaia, C.M., 2013. Human health implications of clinically relevant bacteria in wastewater habitats. Environ. Sci. Pollut. Res. 20, 3550–3569. https://doi.org/10.1007/s11356-013-1594-0

Varma, M., Field, R., Stinson, M., Rukovets, B., Wymer, L., Haugland, R., 2009. Quantitative real-time PCR analysis of total and propidium monoazide-resistant fecal indicator bacteria in wastewater. Water Res. 43, 4790–4801. https://doi.org/10.1016/j.watres.2009.05.031

Verbyla, M.E., Iriarte, M.M., Mercado Guzmán, A., Coronado, O., Almanza, M., Mihelcic, J.R., 2016. Pathogens and fecal indicators in waste stabilization pond systems with direct reuse for irrigation: Fate and transport in water, soil and crops. Sci. Total Environ. 551–552, 429–437. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.01.159

Vergine, P., Salerno, C., Barca, E., Berardi, G., Pollice, A., 2017. Identification of the faecal indicator Escherichia coli in wastewater through the β-D-glucuronidase activity: Comparison between two enumeration methods, membrane filtration with TBX agar, and Colilert®-18. J. Water Health 15, 209–217. https://doi.org/10.2166/wh.2016.119

Verrier, D., Mortier, B., Albagnac, G., 1987. Initial adhesion of methanogenic bacteria to polymers. Biotechnol. Lett. 9, 735–740. https://doi.org/10.1007/BF01024610

Vinten, A.J.A., Mingelgrin, U., Yaron, B., 1983. The Effect of Suspended Solids in Wastewater on Soil Hydraulic Conductivity: II. Vertical Distribution of Suspended Solids. Soil Sci. Soc. Am. J. 47, 408–412. https://doi.org/10.2136/sssaj1983.03615995004700030003x

Virto, R., Mañas, P., Álvarez, I., Condon, S., Raso, J., 2005. Membrane damage and microbial inactivation by chlorine in the absence and presence of a chlorine-demanding substrate. Appl. Environ. Microbiol. 71, 5022–5028. https://doi.org/10.1128/AEM.71.9.5022-5028.2005

Vivaldi, G.A., Camposeo, S., Rubino, P., Lonigro, A., 2013. Microbial impact of different types of municipal wastewaters used to irrigate nectarines in southern italy. Agric. Ecosyst. Environ. 181, 50–57. https://doi.org/10.1016/j.agee.2013.09.006

Voelkerding, K. V., Dames, S.A., Durtschi, J.D., 2009. Next-generation sequencing:from basic research to diagnostics. Clin. Chem. 55, 641–658. https://doi.org/10.1373/clinchem.2008.112789

Von Sperling, M., 2015. Waste Stabilisation Ponds. Water Intell. Online 6, 9781780402109–9781780402109. https://doi.org/10.2166/9781780402109

Wagner, M., Horn, H., 2017. Optical coherence tomography in biofilm research: A comprehensive review. Biotechnol. Bioeng. https://doi.org/10.1002/bit.26283

Wagner, M., Taherzadeh, D., Haisch, C., Horn, H., 2010. Investigation of the mesoscale structure and volumetric features of biofilms using optical coherence tomography. Biotechnol. Bioeng. 107, 844–853. https://doi.org/10.1002/bit.22864

Wang, C., Chuai, X., Liang, M., 2019. Legionella feeleii: pneumonia or Pontiac fever? Bacterial virulence traits and host immune response. Med. Microbiol. Immunol. 208, 25–

32. https://doi.org/10.1007/s00430-018-0571-0

Wang, H., Hu, C., Li, X., 2015. Characterization of biofilm bacterial communities and cast iron corrosion in bench-scale reactors with chloraminated drinking water. Eng. Fail. Anal. 57, 423–433. https://doi.org/10.1016/j.engfailanal.2015.08.016

Wang, H., Masters, S., Edwards, M.A., Falkinham, J.O., Pruden, A., 2014. Effect of disinfectant, water age, and pipe materials on bacterial and eukaryotic community structure in drinking water biofilm. Environ. Sci. Technol. 48, 1426–1435. https://doi.org/10.1021/es402636u

Wang, H., Masters, S., Hong, Y., Stallings, J., Falkinham, J.O., Edwards, M.A., Pruden, A., 2012. Effect of disinfectant, water age, and pipe material on occurrence and persistence of legionella, mycobacteria, pseudomonas aeruginosa, and two amoebas. Environ. Sci. Technol. 46, 11566–11574. https://doi.org/10.1021/es303212a

Wang, J., Gong, S., Xu, D., Yu, Y., Zhao, Y., 2013. Impact of drip and level-basin irrigation on growth and yield of winter wheat in the North China Plain. Irrig. Sci. 31, 1025–1037. https://doi.org/10.1007/s00271-012-0384-7

Wang, X., Hu, X., Wang, H., Hu, C., 2012. Synergistic effect of the sequential use of UV irradiation and chlorine to disinfect reclaimed water. Water Res. 46, 1225–1232. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.watres.2011.12.027

Wang, Y., Qian, P.Y., 2009. Conservative fragments in bacterial 16S rRNA genes and primer design for 16S ribosomal DNA amplicons in metagenomic studies. PLoS One 4. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0007401

Wang, Y.H., Wu, Y.H., Tong, X., Yu, T., Peng, L., Bai, Y., Zhao, X.H., Huo, Z.Y., Ikuno, N., Hu, H.Y., 2019a. Chlorine disinfection significantly aggravated the biofouling of reverse osmosis membrane used for municipal wastewater reclamation. Water Res. 154, 246–257. https://doi.org/10.1016/j.watres.2019.02.008

Wang, Y.H., Wu, Y.H., Yu, T., Zhao, X.H., Tong, X., Bai, Y., Huo, Z.Y., Hu, H.Y., 2019b. Effects of chlorine disinfection on the membrane fouling potential of bacterial strains isolated from fouled reverse osmosis membranes. Sci. Total Environ. 693, 133579. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.133579

Wang, Z., Li, J., Li, Y., 2017. Using Reclaimed Water for Agricultural and Landscape Irrigation in China: a Review. Irrig. Drain. https://doi.org/10.1002/ird.2129

Wäsche, S., Horn, H., Hempel, D.C., 2002. Influence of growth conditions on biofilm development and mass transfer at the bulk/biofilm interface. Water Res. 36, 4775–4784.

https://doi.org/10.1016/S0043-1354(02)00215-4

Webb, A.L., Taboada, E.N., Selinger, L.B., Boras, V.F., Inglis, G.D., 2016. Efficacy of wastewater treatment on Arcobacter butzleri density and strain diversity. Water Res. 105, 291–296. https://doi.org/10.1016/j.watres.2016.09.003

Wei, Q., Shi, Y., Dong, W., Lu, G., Huang, S., 2006. Study on hydraulic performance of drip emitters by computational fluid dynamics. Agric. Water Manag. 84, 130–136. https://doi.org/10.1016/j.agwat.2006.01.016

Wei, Z., 2011. Application of RP and Manufacturing to Water-Saving Emitters, in: Advanced Applications of Rapid Prototyping Technology in Modern Engineering. InTech. https://doi.org/10.5772/22401

Wei, Z., Cao, M., Liu, X., Tang, Y., Lu, B., 2012. Flow behaviour analysis and experimental investigation for emitter micro-channels. Chinese J. Mech. Eng. (English Ed. 25, 729–737. https://doi.org/10.3901/CJME.2012.04.729

Wei, Z., Zhao, W., Tang, Y., Lu, B., Zhang, M., 2005. Anti-clogging design method for the labyrinth channels of drip irrigation emitters. Trans. Chinese Soc. Agric. Mach. 21, 1–7.

Wéry, N., Lhoutellier, C., Ducray, F., Delgenès, J.P., Godon, J.J., 2008. Behaviour of pathogenic and indicator bacteria during urban wastewater treatment and sludge composting, as revealed by quantitative PCR. Water Res. 42, 53–62. https://doi.org/10.1016/j.watres.2007.06.048

West, S., Wagner, M., Engelke, C., Horn, H., 2016. Optical coherence tomography for the in situ three-dimensional visualization and quantification of feed spacer channel fouling in reverse osmosis membrane modules. J. Memb. Sci. 498, 345–352. https://doi.org/10.1016/j.memsci.2015.09.047

White, P.J., Greenwood, D.J., 2013. Properties and management of cationic elements for crop growth, in: Soil Conditions and Plant Growth. Blackwell Publishing Ltd, Oxford, pp. 160–194. https://doi.org/10.1002/9781118337295.ch6

Wijeyekoon, S., Mino, T., Satoh, H., Matsuo, T., 2004. Effects of substrate loading rate on biofilm structure. Water Res. 38, 2479–2488. https://doi.org/10.1016/j.watres.2004.03.005

Winward, G.P., Avery, L.M., Stephenson, T., Jefferson, B., 2008. Chlorine disinfection of grey water for reuse: Effect of organics and particles. Water Res. 42, 483–491. https://doi.org/10.1016/j.watres.2007.07.042

Wittwer, C.T., Herrmann, M.G., Moss, A.A., Rasmussen, R.P., 1997. Continuous

Fluorescence Monitoring of Rapid Cycle DNA Amplification. Biotechniques 22, 130–138. https://doi.org/10.2144/97221bi01

Wong, D., Nielsen, T.B., Bonomo, R.A., Pantapalangkoor, P., Luna, B., Spellberg, B., 2017. Clinical and pathophysiological overview of Acinetobacter infections: A century of challenges. Clin. Microbiol. Rev. 30, 409–447. https://doi.org/10.1128/CMR.00058-16

Wong, V.N.L., Dalal, R.C., Greene, R.S.B., 2008. Salinity and sodicity effects on respiration and microbial biomass of soil. Biol. Fertil. Soils 44, 943–953. https://doi.org/10.1007/s00374-008-0279-1

World Water Assessment Programme, 2018. The United Nations World Water Development Report 2018.

Wu, R.S.., 1999. Eutrophication, Water Borne Pathogens and Xenobiotic Compounds: Environmental Risks and Challenges. Mar. Pollut. Bull. 39, 11–22. https://doi.org/10.1016/S0025-326X(99)00014-4

WWAP, 2017. Les eaux usées, Une ressource inexploitée. Rapport mondial des Nations Unies sur la mise en valeur des ressources en eau 2017. Paris.

Xiao, Y., Liu, Y., Ma, C., Muhammad, T., Zhou, B., Zhou, Y., Song, P., Li, Y., 2020a. Using electromagnetic fields to inhibit biofouling and scaling in biogas slurry drip irrigation emitters. J. Hazard. Mater. 401, 123265. https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2020.123265

Xiao, Y., Seo, Y., Lin, Y., Li, L., Muhammad, T., Ma, C., Li, Y., 2020b. Electromagnetic fields for biofouling mitigation in reclaimed water distribution systems. Water Res. 173, 115562. https://doi.org/10.1016/j.watres.2020.115562

Xue, Z., Seo, Y., 2013. Impact of chlorine disinfection on redistribution of cell clusters from biofilms. Environ. Sci. Technol. 47, 1365–1372. https://doi.org/10.1021/es304113e

Yamada, T., Sekiguchi, Y., 2018a. Longilinea. Bergey's Man. Syst. Archaea Bact., Major Reference Works. https://doi.org/doi:10.1002/9781118960608.gbm01482

Yamada, T., Sekiguchi, Y., 2018b. Bellilinea, Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria, Major Reference Works. https://doi.org/doi:10.1002/9781118960608.gbm01479

Yan, D., Bai, Z., Rowan, M., Gu, L., Shumei, R., Yang, P., 2009. Biofilm structure and its influence on clogging in drip irrigation emitters distributing reclaimed wastewater. J. Environ. Sci. 21, 834–841. https://doi.org/10.1016/S1001-0742(08)62349-9

Yan, D., Yang, P., Rowan, M., Ren, S., Pitts, D., 2010. Biofilm Accumulation and Structure in the Flow Path of Drip Emitters Using Reclaimed Wastewater. Trans. Asabe 53, 751–

758. https://doi.org/10.13031/2013.30080

Yang, B., Wang, J., Zhang, Y., Wang, H., Ma, X., Mo, Y., 2020. Anti-clogging performance optimization for dentiform labyrinth emitters. Irrig. Sci. https://doi.org/10.1007/s00271-020-00671-6

Yang, Y., Yu, K., Xia, Y., Lau, F.T.K., Tang, D.T.W., Fung, W.C., Fang, H.H.P., Zhang, T., 2014. Metagenomic analysis of sludge from full-scale anaerobic digesters operated in municipal wastewater treatment plants. Appl. Microbiol. Biotechnol. 98, 5709–5718. https://doi.org/10.1007/s00253-014-5648-0

Yao, Y., Habimana, O., 2019. Biofilm research within irrigation water distribution systems: Trends, knowledge gaps, and future perspectives. Sci. Total Environ. 673, 254–265. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.03.464

Ylla, I., Canhoto, C., Romaní, A.M., 2014. Effects of Warming on Stream Biofilm Organic Matter Use Capabilities 132–145. https://doi.org/10.1007/s00248-014-0406-5

Yokomachi, N., Yaguchi, J., 2012. Enumeration of viable Escherichia coli by real-time PCR with propidium monoazide. Water Sci. Technol. 66, 2065–2073. https://doi.org/10.2166/wst.2012.370

Yu, J., Kim, D., Lee, T., 2010. Microbial diversity in biofilms on water distribution pipes of different materials. Water Sci. Technol. 61, 163–171. https://doi.org/10.2166/wst.2010.813

Yu, L., Li, N., Long, J., Liu, X., Yang, Q., 2018a. The mechanism of emitter clogging analyzed by CFD–DEM simulation and PTV experiment. Adv. Mech. Eng. 10, 1–10. https://doi.org/10.1177/1687814017743025

Yu, L., Li, N., Yang, Q., Liu, X., 2018b. Influence of Flushing Pressure before Irrigation on the Anti-Clogging Performance of Labyrinth Channel Emitters. Irrig. Drain. 67, 191–198. https://doi.org/10.1002/ird.2173

Yu, L., Mei, Q., 2014. Anti-clogging design and experimental investigation of PIV for labyrinth-channel emitters of drip irrigation emitters. Trans. Chinese Soc. Agric. Mach. 45, 155–160. https://doi.org/10.6041/j.issn.1000-1298.2014.09.026

Yu, Y., Lee, C., Kim, J., Hwang, S., 2005. Group-specific primer and probe sets to detect methanogenic communities using quantitative real-time polymerase chain reaction. Biotechnol. Bioeng. 89, 670–679. https://doi.org/10.1002/bit.20347

Zazueta, F.S., 2011. Evaporation Loss During Sprinkler Irrigation. Univ. Florida Bull. 1–7.

Zhang, H., Tian, Y., Kang, M., Chen, C., Song, Y., Li, H., 2019. Effects of

chlorination/chlorine dioxide disinfection on biofilm bacterial community and corrosion process in a reclaimed water distribution system. Chemosphere 215, 62–73. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.09.181

Zhang, J., Zhao, W., Wei, Z., Tang, Y., Lu, B., 2007. Numerical and experimental study on hydraulic performance of emitters with arc labyrinth channels. Comput. Electron. Agric. 56, 120–129. https://doi.org/10.1016/j.compag.2007.01.007

Zhang, L., Wu, P., Zhu, D., Zheng, C., 2017. Effect of pulsating pressure on labyrinth emitter clogging. Irrig. Sci. 35, 267–274. https://doi.org/10.1007/s00271-017-0532-1

Zhang, L., Wu, P., Zhu, D., Zheng, C., 2016. Flow regime and head loss in a drip emitter equipped with a labyrinth channel. J. Hydrodyn. 28, 610–616. https://doi.org/10.1016/S1001-6058(16)60665-0

Zhao, L., Liu, Y.-W., Li, N., Fan, X.-Y., Li, X., 2020. Response of bacterial regrowth, abundant and rare bacteria and potential pathogens to secondary chlorination in secondary water supply system. Sci. Total Environ. 719, 137499. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.137499

Zhou, B., Li, Y., Liu, Y., Pei, Y., Jiang, Y., Liu, H., 2014. Effects of flow path depth on emitter clogging and surface topographical characteristics of biofilms. Irrig. Drain. 63, 46–58. https://doi.org/10.1002/ird.1792

Zhou, B., Li, Y., Liu, Y., Xu, F., Pei, Y., Wang, Z., 2015. Effect of drip irrigation frequency on emitter clogging using reclaimed water. Irrig. Sci. 33, 221–234. https://doi.org/10.1007/s00271-015-0461-9

Zhou, B., Li, Y., Pei, Y., Liu, Y., Zhang, Z., Jiang, Y., 2013. Quantitative relationship between biofilms components and emitter clogging under reclaimed water drip irrigation. Irrig. Sci. 31, 1251–1263. https://doi.org/10.1007/s00271-013-0402-4

Zhou, B., Li, Y., Song, P., Zhou, Y., Yu, Y., Bralts, V., 2017a. Anti-clogging evaluation for drip irrigation emitters using reclaimed water. Irrig. Sci. 35, 181–192. https://doi.org/10.1007/s00271-016-0530-8

Zhou, B., Wang, D., Wang, T., Li, Y., 2018. Chemical Clogging Behavior in Drip Irrigation Systems Using Reclaimed Water. Trans. ASABE 61, 1667–1675. https://doi.org/10.13031/trans.12902

Zhou, B., Wang, T., Li, Y., Bralts, V., 2017b. Effects of microbial community variation on bio-clogging in drip irrigation emitters using reclaimed water. Agric. Water Manag. 194, 139–149. https://doi.org/10.1016/j.agwat.2017.09.006

Zhu, Y., Zhang, Y., Ren, H., Geng, J., Xu, K., Huang, H., Ding, L., 2015. Physicochemical characteristics and microbial community evolution of biofilms during the start-up period in a moving bed biofilm reactor. Bioresour. Technol. 180, 345–351. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.01.006

Ziegler, A.S., McIlroy, S.J., Larsen, P., Albertsen, M., Hansen, A.A., Heinen, N., Nielsen, P.H., 2016. Dynamics of the fouling layer microbial community in a membrane bioreactor. PLoS One 11, 1–14. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0158811

Zörb, C., Senbayram, M., Peiter, E., 2014. Potassium in agriculture - Status and perspectives. J. Plant Physiol. 171, 656–669. https://doi.org/10.1016/j.jplph.2013.08.008

ANNEXES

ANNEXES « INTRODUCTION »

Tableau S1 Analyses de la qualité des eaux usées brutes (EB) et traitées (EUT) pour la station de traitement de Murviel-lès-Montpellier en 2014 (Source: Lyonnaise des Eaux)

Paramètre	Charge (Kg/j)		Abattement (%)	Concentration moyenne (mg/l)		EB (Kg/j)		Coefficient de variation (%)	EUT (mg/l)	
	EB	EUT		EB	EUT	Mini	Maxi		Mini	Maxi
DBO_5	74	6.96	91	277	36.6	34.3	114	33	20	55
DCO	200	34.2	83	747	186	79.4	323	38	109	325
MES	68.1	12.6	81	254	64.1	37.7	116	35	16	140
MVS	62.5			232		34.6	104	36		
NH_4	17.4	4.6	74	60.9	22.4	9.14	47.5	58	3.9	43.5
NO_2		0.16			1.19				0.02	8.7
NO_3		0.22			1.41				0.2	5.7
N_G	21.8	6.74	69	76.4	34.1	11.6	58.9	57	13.5	56.1
NTK	21.7	6.36	71	76	31.5	11.5	58.7	57	13.2	54.9
P_t	2.42	1.32	45	8.85	7.2	1.39	4.68	37	3.5	9.3
PO_4	1.44	0.86	40	5.13	4.8	0.82	3.42	47	1.5	7.7

ANNEXES « MATERIELS ET METHODES »

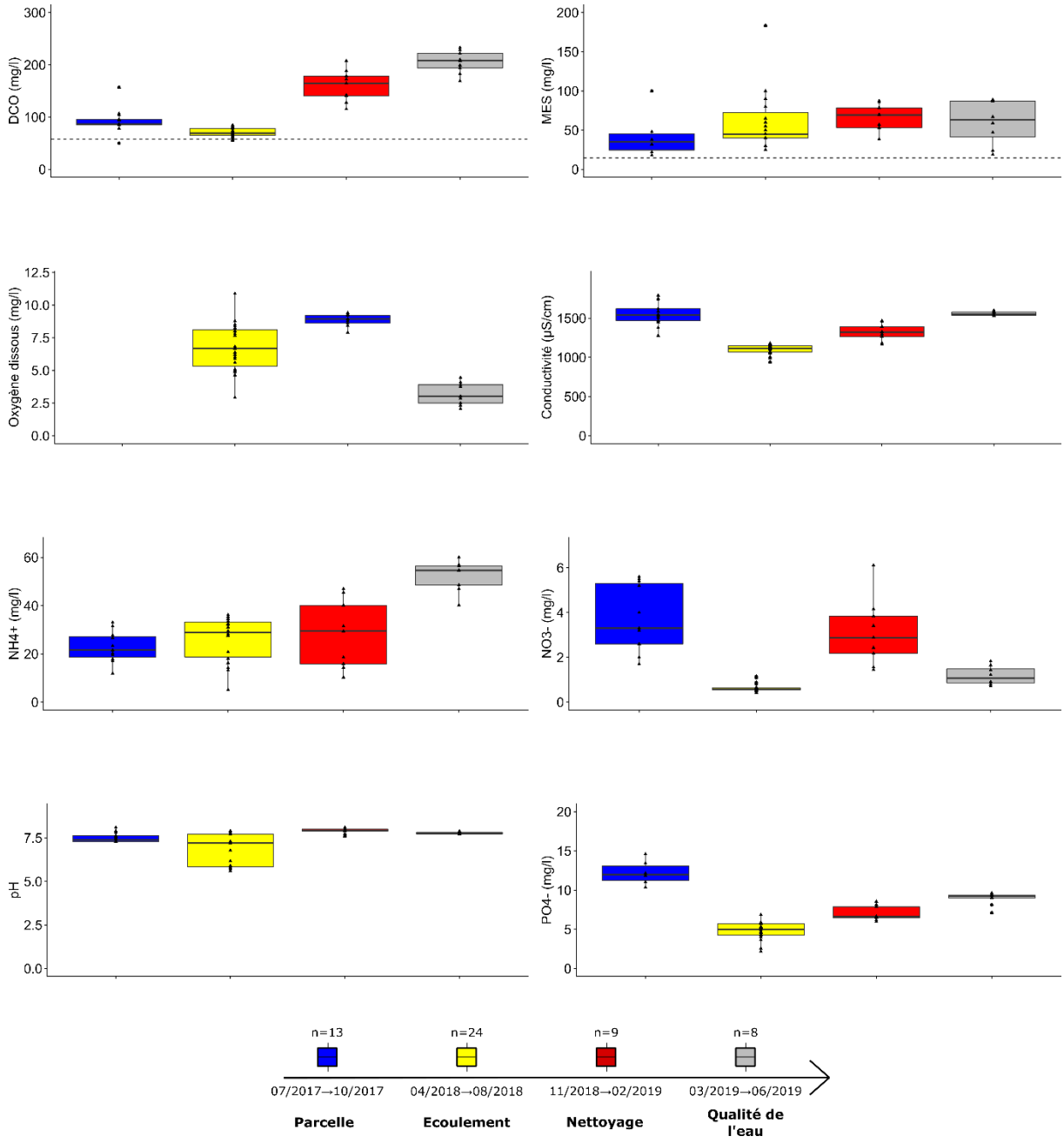


Figure S1 Paramètres physico-chimiques de l'effluent traité en fonction de la période expérimentale. La ligne en pointillé pour les paramètres DCO (60 mg.l^{-1}) et MES (15 mg.l^{-1}) indique la limite permettant d'atteindre la qualité A suivant la réglementation en vigueur.

Tableau S1 Résultats Prestataire (* SBASR : spore des bactéries sulfito-réductrices)

Date	Indicateur	*E. coli*	Entérocoques	SBASR*	Bactériophage ARN F	Qualité réglementaire
	unité	**NPP/100 ml**	**NPP/100 ml**	**UFC/100 ml**	**UFP/ml**	
2-Jun-17	entrée	$2{,}3.\ 10^{7}$	$2{,}0.\ 10^{6}$	>15000	$4{,}5.\ 10^{7}$	
	sortie	$7{,}2.\ 10^{3}$	$4{,}1.\ 10^{3}$	$2{,}0.\ 10^{3}$	$1{,}2.\ 10^{4}$	
	Abattement (Log)	**3,5**	**2,7**	**>0,87**	**3,6**	**C**
17-Oct-17	entrée	$2{,}2.\ 10^{7}$	$8{,}1.\ 10^{6}$	$5{,}4.\ 10^{4}$	$5{,}5.\ 10^{6}$	
	sortie	$3{,}2.\ 10^{3}$	$2{,}5.\ 10^{2}$	$2{,}0.\ 10^{4}$	$9{,}7.\ 10^{3}$	
	Abattement (Log)	**3,8**	**4,5**	**0,4**	**2,8**	**Hors cadre**
16-Jul-18	entrée	$1{,}3.\ 10^{7}$	$1{,}1.\ 10^{7}$	$5{,}4.\ 10^{5}$	$1{,}5.\ 10^{3}$	
	sortie	$5{,}6.\ 10^{2}$	$1{,}8.\ 10^{3}$	$5{,}4.\ 10^{3}$	<1	
	Abattement (Log)	**4,4**	**3,8**	**2,0**	**>3,2**	**C**
30-Aug-18	entrée	$3{,}8.\ 10^{7}$	$8{,}6.\ 10^{6}$	$1{,}6.\ 10^{7}$	$1{,}1.\ 10^{3}$	
	sortie	$6{,}0.\ 10^{3}$	$1{,}6.\ 10^{3}$	$3{,}3.\ 10^{4}$	<1	
	Abattement (Log)	**3,8**	**3,7**	**2,7**	**>3**	**C**

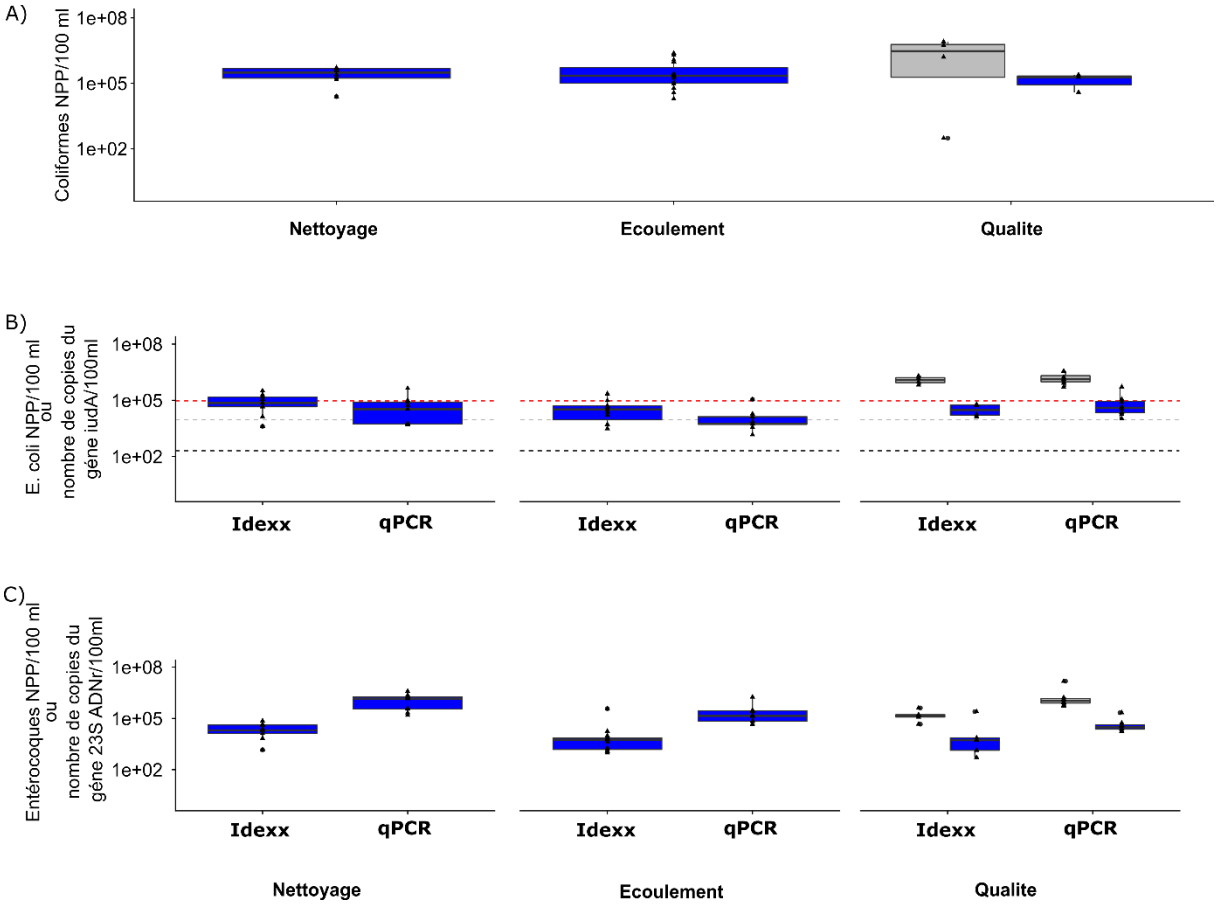


Figure S2 Concentrations en indicateurs de contamination fécale dans l'effluent traité EUT au cours des expérimentations « Nettoyage » et « Écoulement », et de l'effluent non traité (EUB) au cours de l'expérimentation « Qualité ». La méthode qPCR n'a pas été utilisée dans le cas de la quantification des coliformes (A). Les lignes en pointillé indiquent les limites permettant d'atteindre la qualité A (noir), B (grise) et C (rouge) suivant la réglementation en vigueur. En bleu : eau usée traitée, en gris : eau usée brute. Les résultats qPCR, initialement exprimé en nombre de copies du gène cible/ml ont été multipliés par 100 pour faciliter la comparaison aux résultats de la méthode Idexx exprimée en NPP/100 ml. Les concentrations en entérocoques sont supérieures dans le cas la méthode Idexx comparativement à la méthode qPCR. Ceci s'explique par le fait que la méthode Idexx se base principalement sur la détection et la quantification de 2 espèces d'entérocoques, à savoir *Enterococcus faecium* et *Enterococcus faecalis* tandis que la méthode qPCR permet la quantification de l'ensemble des espèces appartenant aux entérocoques.

ANNEXES CHAPITRE « QUALITE »

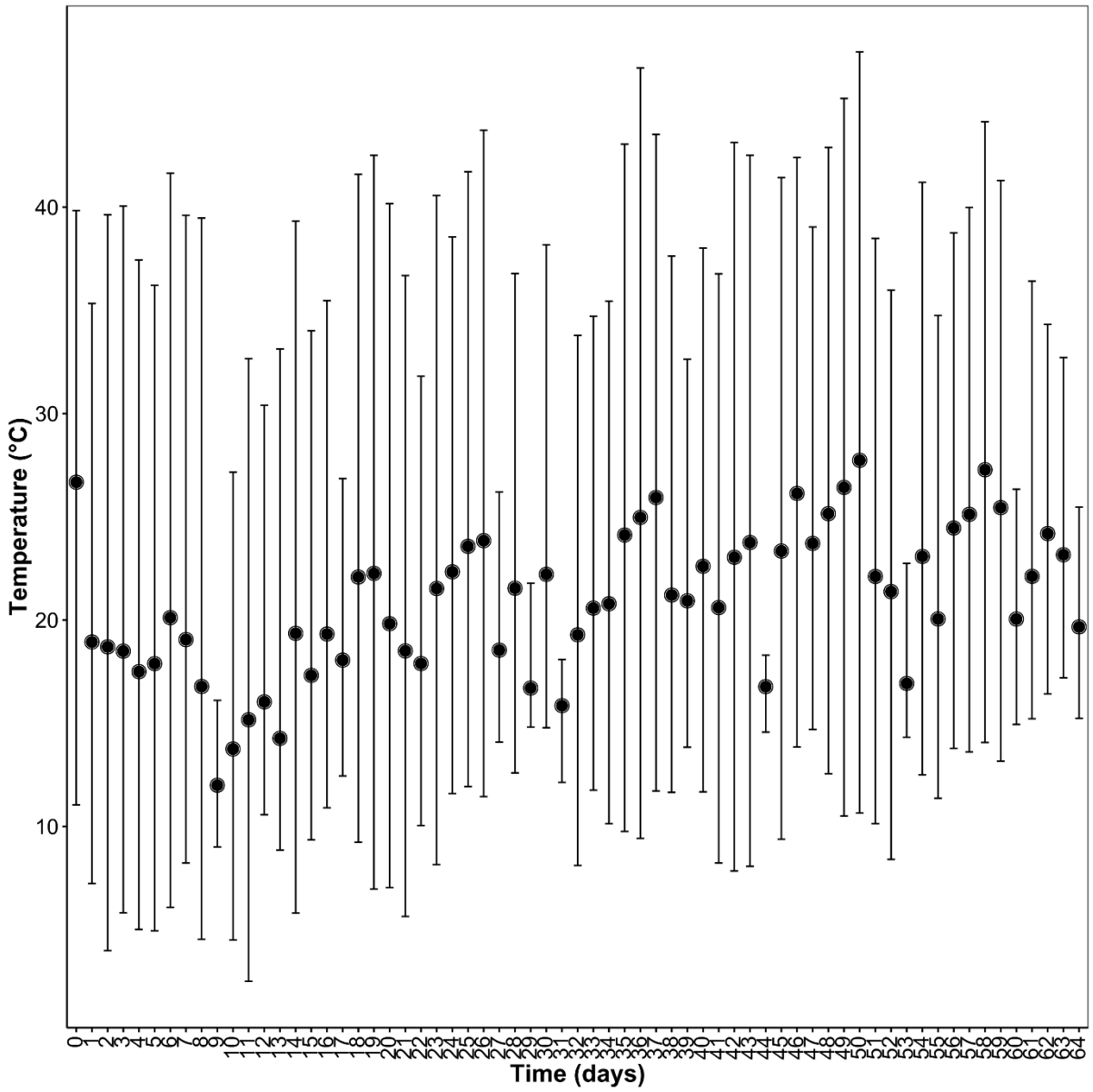


Figure S1 Température moyenne de l'air ambiante sous la serre. Les écart-types correspondent aux valeurs de température minimales et maximales pendant la journée.

ANNEXES CHAPITRE « PARCELLE »

Table S1 Genera including pathogenic bacteria tested. Genus in bold were detected in TWW, pipe and/or dripper biofilm samples.

Acinetobacter, *Alcaligenes,* ***Aeromonas***, *Burkholderia,* ***Bacillus***, ***Bacteroides***, *Bordetella, Borrelia,* ***Brevibacterium***, *Brucella, Campylobacter, Chlamydia, Chlamydophila, Citrobacter, Clostridium, Corynebacterium,* ***Coxiella***, *Enterobacter, Enterococcus, Escherichia, Francisella, Fusobacterium,* ***Gordonia***, *Haemophilus, Helicobacter, Klebsiella,* ***Legionella***, ***Leptospira***, *Listeria, Moraxella, Mycobacterium, Mycoplasma, Neisseria,* ***Nocardia***, ***Pseudomonas***, *Plesiomonas, Salmonella, Serratia, Shigella, Staphylococcus,* ***Stenotrophomonas***, ***Streptococcus***, *Streptomyces, Vibrio, Yersinia*

Table S2 OTUs explaining 50% of the Dripper-Pipe dissimilarity, by SIMPER analysis

OTU	Phylum	Genus	Species identity	Identity %	Relative Contribution (%)	P-value
Otu1	Betaproteobacteria	*Aquabacterium*	-	100	7.92	0.08
Otu2	Sphingobacteriia	*Terrimonas*	-	100	5.84	0.14
Otu3	Gammaproteobacteria	*Pseudoxanthomonas*	-	100	4.29	0.18
Otu16	Actinobacteria	*Aeromicrobium*	-	100	3.66	0.22
Otu4	Gammaproteobacteria	34P16_ge	-	100	3.12	0.25
Otu20	Alphaproteobacteria	*Brevundimonas*	-	100	2.92	0.28
Otu6	Alphaproteobacteria	*Rhodopseudomonas*	*R. palustris*	100	2.44	0.30
Otu7	Cyanobacteria	*Leptolyngbya*	-	95	2.43	0.33
Otu14	Betaproteobacteria	*Thiobacillus*	*T. denitrificans*	100	2.42	0.35
Otu22	Flavobacteria	*Chryseobacterium*	*C. daecheongense*	100	2.40	0.37
Otu8	Cyanobacteria	*Leptolyngbya*	-	100	2.24	0.40
Otu19	Actinobacteria	*Gordonia*	*G. araii, terrae, amarae, effusa*	100	2.19	0.42
Otu32	Actinobacteria	*Dietzia*	*D. maris*	100	2.01	0.44
Otu11	Betaproteobacteria	Rhodocyclaceae_un	-	100	1.83	0.46
Otu37	Betaproteobacteria	*Thiomonas*	-	100	1.75	0.47
Otu40	Actinobacteria	*Ornithinimicrobium*	-	100	1.62	0.49
Otu41	Alphaproteobacteria	*Sphingomonas*	-	100	1.48	0.51
					50.57%	

Table S3 OTUs explaining 50% of the Pipe - TWW dissimilarity, by SIMPER analysis

OTU	Phylum	Genus	Species identity	Identity %	Relative Contribution (%)	P-value
Otu3	Gammaproteobacteria	*Pseudoxanthomonas*	-	100	4.94	0.20
Otu10	Betaproteobacteria	MWH-UniP1	-	100	3.32	0.01
Otu16	Actinobacteria	*Aeromicrobium*	-	100	3.13	0.01
Otu2	Sphingobacteriia	*Terrimonas*	-	100	3.00	0.90
Otu20	Alphaproteobacteria	*Brevundimonas*	-	100	2.58	0.01
Otu14	Betaproteobacteria	*Thiobacillus*	*T. denitrificans*	100	2.18	0.01
Otu22	Flavobacteriia	*Chryseobacterium*	*C. daecheongense, C. shandongense*	100	2.11	0.03
Otu13	Actinobacteria	PeM15_ge	-	100	2.09	0.01
Otu19	Actinobacteria	*Gordonia*	*G. araii, terrae, amarae, effusa*	100	1.97	0.01
Otu5	Chlorobia	SJA-28_ge	-	98	1.87	0.07
Otu21	Betaproteobacteria	Alcaligenaceae	-	99	1.80	0.01
Otu9	Gammaproteobacteria	Run-SP154_ge	*Uncultured Chromatiaceae*	100	1.76	0.19
Otu32	Actinobacteria	*Dietzia*	*D. maris*	100	1.74	0.01
Otu37	Betaproteobacteria	*Thiomonas*	-	100	1.52	0.02
Otu40	Actinobacteria	*Ornithinimicrobium*	-	100	1.41	0.01
Otu41	Alphaproteobacteria	*Sphingomonas*	-	100	1.31	0.01
Otu24	Cyanobacteria	*Synechococcus*	-	99	1.30	0.08
Otu17	Caldilineae	uncultured	-	99	1.28	0.03
Otu1	Betaproteobacteria	*Aquabacterium*	-	100	1.18	1.00

Otu26	Sphingobacteria	*Lentimicrobiaceae_ge*	-	98	1.12	0.01
Otu49	Alphaproteobacteria	*Paracoccus*	*P. denitrificans*	100	1.01	0.01
Otu15	Alphaproteobacteria	*Methylocystis*	-	99	1.00	0.06
Otu43	Bacteroidetes	Bacteroidetes_VC2.1	-	95	0.85	0.34
Otu39	Gammaproteobacteria	*Methylomonas*	-	100	0.84	0.04
Otu28	Sphingobacteria	*Sediminibacterium*	-	99	0.82	0.04
Otu45	Clostridia	*Anaerovorax*	-	97	0.82	0.01
Otu44	Alphaproteobacteria	*Sphingopyxis*	*S. terrae, S. adhaesiva*	100	0.82	0.01
Otu47	Phycisphaerae	CL500-4	-	100	0.73	0.01
Otu51	Chlorobia	OPB56_ge	-	99	0.73	0.01
Otu42	Sphingobacteria	*Phaeodactylibacter*	-	100	0.71	0.03
Otu60	Clostridia	*Ruminiclostridium*	-	92	0.67	0.02
					50.63%	

Table S4 OTUs explaining 50% of the Dripper-TWW dissimilarity, by SIMPER analysis

OTU	*Phylum*	*Genus*	*Species identity*	Identity %	Relative Contribution (%)	P-value
Otu1	Betaproteobacteria	*Aquabacterium*	-	100	7.94	0.31
Otu2	Sphingobacteriia	*Terrimonas*	-	100	4.99	0.03
Otu10	Betaproteobacteria	MWH-UniP1	-	100	3.46	0.01
Otu4	Gammaproteobacteria	34P16_ge	-	100	2.73	0.27
Otu13	Actinobacteria	PeM15_ge	-	100	2.38	0.01
Otu6	Alphaproteobacteria	*Rhodopseudomonas*	*R. palustris*	100	2.24	0.30
Otu7	Cyanobacteria	*Leptolyngbya*	-	95	2.22	0.57
Otu8	Cyanobacteria	*Leptolyngbya*	-	100	2.06	0.68
Otu5	Chlorobia	SJA-28_ge	-	98	1.96	0.01
Otu9	Gammaproteobacteria	Run-SP154_ge	*Uncultured Chromatiaceae*	100	1.95	0.02
Otu21	Betaproteobacteria	*Alcaligenaceae*	-	99	1.89	0.01
Otu3	Gammaproteobacteria	*Pseudoxanthomonas*	-	100	1.60	0.81
Otu11	Betaproteobacteria	*Rhodocyclaceae*	-	100	1.58	0.56
Otu24	Cyanobacteria	*Synechococcus*	-	99	1.38	0.01
Otu15	Alphaproteobacteria	*Methylocystis*	-	99	1.21	0.01
Otu18	Alphaproteobacteria	*Tistrella*	*T. mobilis*	98	1.07	0.37
Otu26	Bacteroidetes	*Lentimicrobiaceae_ge*	*L. saccharophilum*	98	1.06	0.01
Otu27	Actinobacteria	*Patulibacter*	-	100	1.05	0.22
Otu28	Bacteroidetes	*Sediminibacterium*	-	99	0.94	0.01

Otu45	Clostridia	*Anaerovorax*	-	97	0.88	0.01
Otu23	Actinobacteria	*Nocardia*	-	100	0.81	0.76
Otu47	Phycisphaerae	CL500-3	-	92	0.78	0.01
Otu25	Anaerolineae	uncultured	-	99	0.77	0.13
Otu42	Bacteroidetes	*Phaeodactylibacter*	-	100	0.75	0.01
Otu51	Chlorobia	OPB56_ge	-	100	0.75	0.01
Otu29	Ignavibacteria	*Ignavibacterium*	-	99	0.73	0.11
Otu60	Clostridia	*Ruminiclostridium*	-	92	0.72	0.01
Otu33	Cyanobacteria	*Limnothrix*	*L. planktonica, L. redekei*	100	0.68	0.71
					50.56%	

Table S5 Relative abundance of genera including pathogenic opportunistic bacteria in TWW and pipe biofilms (x10^{-3}).

	TWW								Pipe					
Genus	**WW1**	**WW2**	**WW3**	**WW4**	**WW5**	**WW6**	**WW7**	**WW8**	**P1**	**P2**	**P3**	**P4**	**P5**	**P6**
Acinetobacter	-	-	3.1	-	-	-	-	0.6	-	0.3	0.2	-	-	0.2
Aeromonas	-	0.5	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-
Bacillus	0.2	-	-	-	-	-	0.1	-	8.9	-	6.3	-	14.1	1.4
Brevundimonas	1.8	-	0.2	0.1	-	-	0.1	0.7	64	8	60	0.6	43	108
Coxiella	-	1.2	0.3	0.7	0.4	1.2	-	0.1	-	-	-	-	-	-
Gordonia	8.5	0.1	-	0.7	-	-	0.6	-	51.8	0.9	55	-	21.8	89
Legionella	1.6	-	-	0.3	-	-	-	-	1.1	2.3	4.5	1.7	0.4	1.1
Leptospira	-	0.4	0.4	0.5	0.8	-	0.2	-	-	-	-	0.1	-	0.2
Nocardia	29.8	0.06	-	-	-	-	-	0.1	14.7	0.2	9.7	-	15.3	10
Pseudomonas	2.3	-	-	-	0.1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Stenotrophomonas	0.6	-	-	0.3	-	-	-	-	0.2	-	0.6	-	0.3	-
Streptococcus	-	-	0.4	0.1	-	-	-	0.3	-	-	-	-	-	-

Table S6 Relative abundance of genera including pathogenic opportunistic bacteria in dripper biofilms (x10^{-3}).

	Drippers																
Genus	**D1**	**D2**	**D3**	**D4**	**D5**	**D6**	**D7**	**D8**	**D9**	**D10**	**D11**	**D12**	**D13**	**D14**	**D15**	**D16**	**D17**
Acinetobacter	-	0.2	10	-	-	7	-	-	0.2	-	18	0.2	2.1	-	10	0.3	-
Aeromonas	-	0.6	-	-	0.1	-	2.7	-	-	-	0.9	-	0.5	-	11.8	0.1	-
Bacillus	-	-	-	-	-	-	3.6	-	0.1	-	-	-	-	-	-	-	0.1
Bacteroides	-	-	0.2	-	-	-	-	-	-	-	0.1	0.1	-	-	-	-	-
Brevundimonas	0.1	1.8	-	3.5	0.07	1.1	0.06	0.9	0.5	14.3	0.5	-	2.7	0.3	2.6	0.07	0
Coxiella	-	-	-	0.1	-	-	-	-	0.2	-	0.1	-	-	-	0.2	-	-
Gordonia	0.7	-	25.5	2.2	-	11.4	1.5	10.8	3.7	-	-	0.3	1.2	0.4	13.2	-	20
Legionella	0.6	-	0.5	2.1	-	1.3	0.2	1.8	0.7	3.1	0.6	0.3	3.2	0.2	-	0.4	10.4
Leptospira	-	-	0.6	0.5	-	-	0.1	-	-	-	-	-	0.8	0.1	0.9	0.2	-
Nocardia	0.1	0.4	22	86	7.3	18.7	0.7	41	0.2	0.1	0.8	-	0.7	0.9	1.1	-	30
Pseudomonas	-	0.1	3.7	0.8	0.1	0.2	2.4	2.4	0.2	-	10.1	0.1	11.4	-	5.1	-	-
Stenotrophomonas	0.2	0.3	-	0.2	-	1.4	-	-	0.5	2.4	0.4	-	-	-	0.6	-	-

ANNEXES CHAPITRE « ECOULEMENT »

Table S1 Measurements of the different areas of the labyrinth. L: length and W: width.

Dripper flow rate (l.h-1)	**Inlet L x W (mm)**	**2nd Part L x W (mm)**	**3rd Part L x W (mm)**	**Return L x W (mm)**	**5th Part L x W (mm)**	**6th Part L x W (mm)**	**Oulet L x W (mm)**
1	9.5 * 2.5	9.5 * 2.5	9.5 * 2.7	5.2 * 5	8 * 2.5	9.8 * 2.5	9.4 * 2.5
2	9.4 * 2.5	8 * 2.5	8 * 2.5	4.5 * 5	8 * 2.5	8 * 2.5	9 * 2.5
4	5.5 * 3.7	9.9 * 3	9.8 * 3	-	-	-	9 * 3

Table S2 Five top abundant genera (<1%, x10^{-1}) of genera found specifically in one dripper type for each sampling time. Bold genera were only found in one dripper type considering the three sampling times. –un: unclassified, _ge: genus

Sampling time	1l.h		2l.h		4l.h	
(days)	Taxonomic affiliation	%	Taxonomic affiliation	%	Taxonomic affiliation	%
32	***Vulcaniibacterium***	1.6	*Mobilitalea*	0.08	*Phyllobacteriaceae_un*	0.06
	Oligoflexus	0.5	*Hyphomicrobiaceae_un*	0.04	***Bergeyella***	0.05
	Schlegelella	0.3	RB446_ge	0.04	***Larkinella***	0.05
	Microvirga	0.1	***Pelobacter***	0.03	*Defluviitaleaceae_UCG-011*	0.02
	Nannocystis	0.1	Candidatus_Shapirobacteria_ge	0.02	*Cohnella*	0.02
72	***Vulcaniibacterium***	0.22	*Legionella*	0.6	PRD18C08_ge	0.1
	Schlegelella	0.22	*Aquicella*	0.1	OPB35_soil_group_ge	0.1
	Microvirga	0.10	*Cytophaga*	0.1	WA-aaa01f12_ge	0.1
	Selenomonadales_*un*	0.07	*Leptolyngbya*	0.1	***Brevinema***	0.01
	KD4-96_ge	0.03	*Chryseolinea*	0.01	*Meniscus*	0.01
115	*Isosphaera*	0.07	KD3-93_ge	0.06	*Rhodomicrobium*	0.09
	Pseudolabrys	0.07	*Bacteroidetes_ge*	0.03	*Corynebacterium_1*	0.08
	Parasegetibacter	0.05	U29-B03	0.03	*Acetobacteroides*	0.07
	Microvirga	0.05	possible_genus_06	0.03	*Herpetosiphon*	0.06
	Derxia	0.04	***Planctopirus***	0.02	*Sorangium*	0.05

Table S3. Ten most abundant genera found in dripper biofilms according to the sampling time. '_un': For unclassified genus ('_un'), the taxonomic affiliation is given at family level _ge: uncultured bacteria identified at the genus level by molecular studies.

Sampling time	1l.h^{-1}		2l.h^{-1}		4l.h^{-1}	
(days)	**Taxonomic affiliation**	**%**	**Taxonomic affiliation**	**%**	**Taxonomic affiliation**	**%**
32	*Hydrogenophaga*	9.48	*Comamonadaceae_un*	8.49	*Comamonadaceae_un*	9.61
	Comamonadaceae_un	6.56	Bacteroidetes _M2PB4-65_ge	4.97	*Hydrogenophaga*	4.22
	Pseudoxanthomonas	3.87	*Oxalobacteraceae_un*	4.45	*Thiocapsa*	3.43
	Thiocapsa	3.47	*Dechloromonas*	4.39	Bacteroidetes _M2PB4-65_ge	3.43
	Bacteroidetes _M2PB4-65_ge	3.44	*Hydrogenophaga*	3.30	*Sphingobacteriales_un*	3.00
	Bacteroidetes _vadinBC27	3.16	*Thiocapsa*	3.21	*Christensenellaceae_un*	2.98
	Fusibacter	3.05	*Sphingobacteriales_un*	3.03	*Thermomonas*	2.63
	Sphingobacteriales_un	2.33	*Aquabacterium*	2.70	*Lentimicrobiaceae_ge*	1.97
	Aquabacterium	2.32	*Christensenellaceae_un*	2.50	*Dechloromonas*	1.85
	Dechloromonas	2.21	*Aquimonas*	2.45	*Rhodobacteraceae_un*	1.79
72	*Hydrogenophaga*	4.65	*Comamonadaceae_un*	5.74	*Comamonadaceae_un*	5.55
	Comamonadaceae_un	3.99	*Rhodocyclaceae_un*	4.42	*Dechloromonas*	3.37
	Desulfobacter	3.83	*Dechloromonas*	3.66	Bacteroidetes_vadinHA17	3.31
	Dechloromonas	2.98	*Lentimicrobiaceae_ge*	2.56	*Lentimicrobiaceae_ge*	3.03
	Cyanobacteria_FamilyI_un	2.41	Cyanobacteria_FamilyI_un	2.36	*Lentimicrobium*	2.74
	Bacteroidetes_vadinHA17	2.39	*Desulfobacter*	2.32	*Zoogloea*	2.09
	Lentimicrobiaceae_ge	1.99	*Lentimicrobium*	2.29	*Sphingobacteriales_un*	1.92
	Lentimicrobium	1.97	Bacteroidetes_vadinHA17	2.24	*Hydrogenophaga*	1.88
	Terrimonas	1.87	*Zoogloea*	1.93	*Christensenellaceae_un*	1.84
	Thauera	1.85	*Haliangium*	1.89	Proteobacteria_Run-SP154_ge	1.80
115	Bacteroidetes_vadinHA17	5.79	Bacteroidetes_vadinHA17	4.94	Bacteroidetes_vadinHA17	6.31
	Lentimicrobiaceae_ge	2.82	*Lentimicrobium*	2.55	Candidatus_Competibacter	4.47
	Anaerolineaceae_un	2.75	*Terrimonas*	2.37	*Lentimicrobiaceae_ge*	2.74
	Chloroflexi_SJA-15_ge	2.40	*Lentimicrobiaceae_ge*	2.37	*Lentimicrobium*	2.61
	Lentimicrobium	2.38	Candidatus_Competibacter	2.04	*Comamonadaceae_un*	2.40
	Desulfobacter	2.04	*Anaerolineaceae_un*	1.95	*Rhodocyclaceae_un*	2.18
	Terrimonas	1.91	*Dechloromonas*	1.91	*Terrimonas*	1.89
	Rhodocyclaceae_un	1.83	*Comamonadaceae_un*	1.70	*Aquabacterium*	1.84

Gelria	1.60	Chloroflexi_SJA-15_ge	1.65	*Dechloromonas*	1.80
Syntrophomonadaceae_ge	1.51	*Rhodocyclaceae_un*	1.57	*Anaerolineaceae_un*	1.67

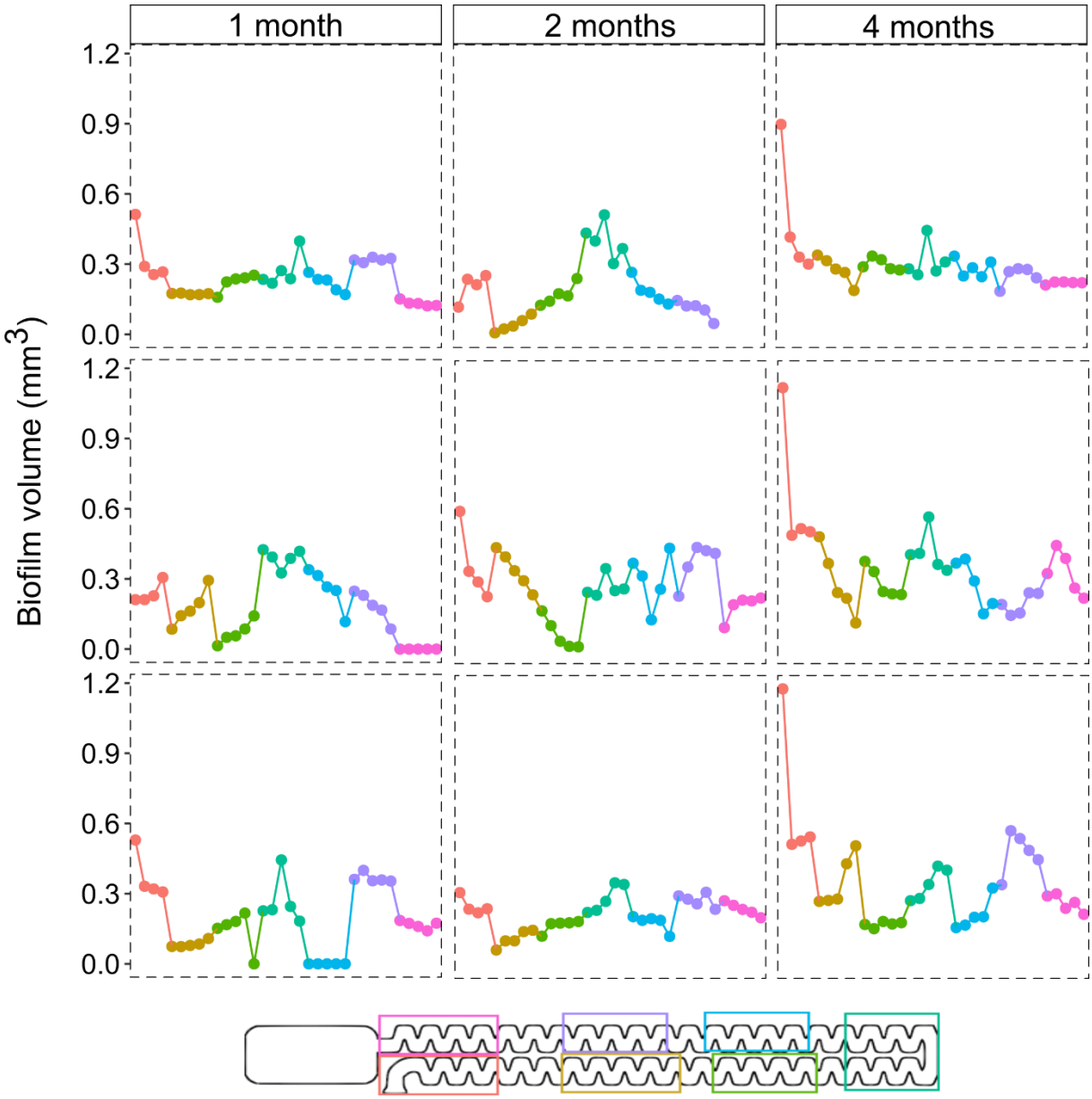


Figure S1 Biofouling in three 1 l.h-1 drippers in time. (●: inlet; ●: 2nd part, ●; 3rd part, ●: return, ●: 5th part, ●: 6th part, ●: end). The three drippers correspond to those taken at 115 days.

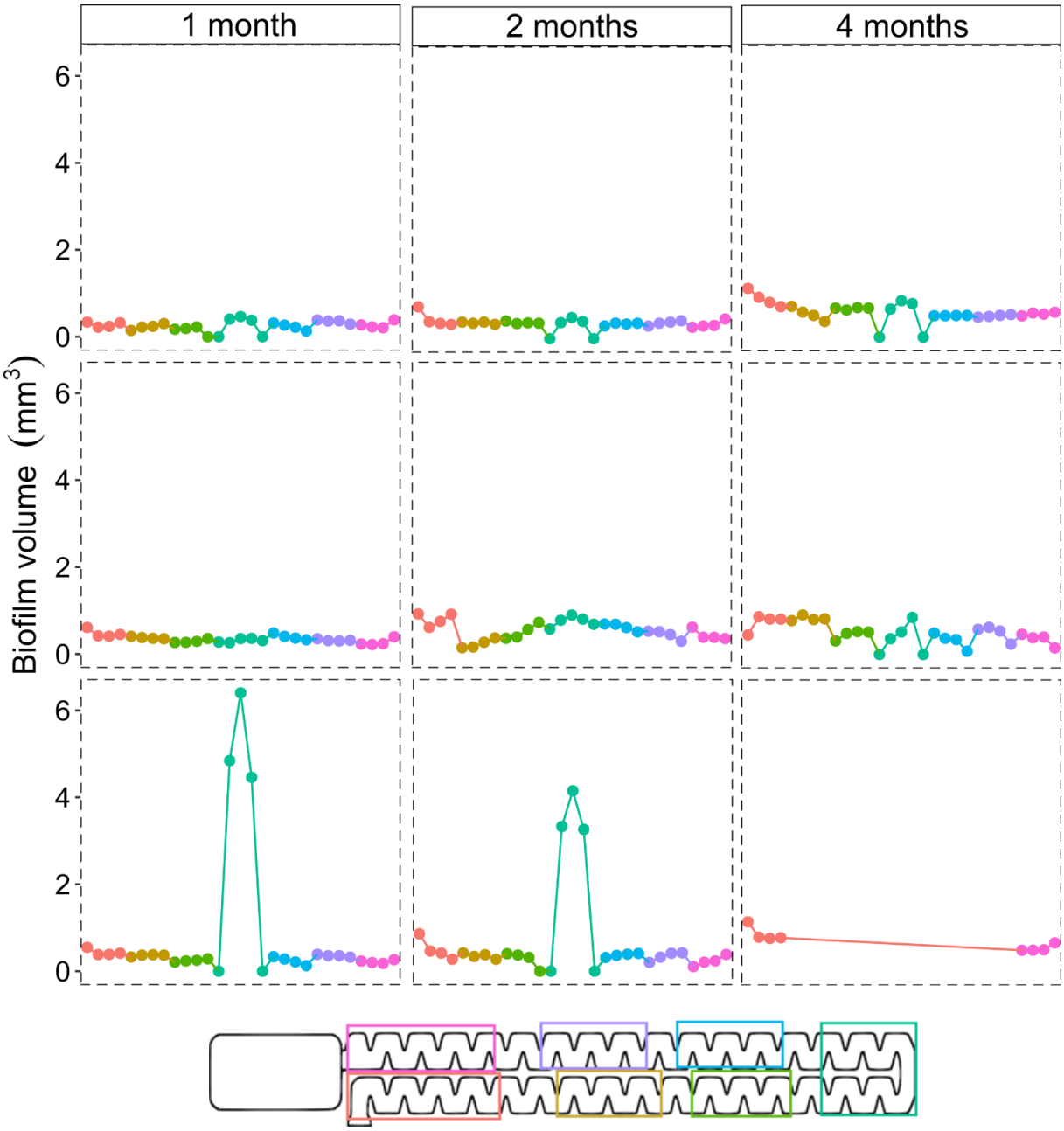


Figure S2 Biofouling in three 2 l.h-1 drippers in time. (●: inlet; ●: 2nd part, ●; 3rd part, ●: return, ●: 5th part, ●: 6th part, ●: end). The three drippers correspond to those taken at 115 days.

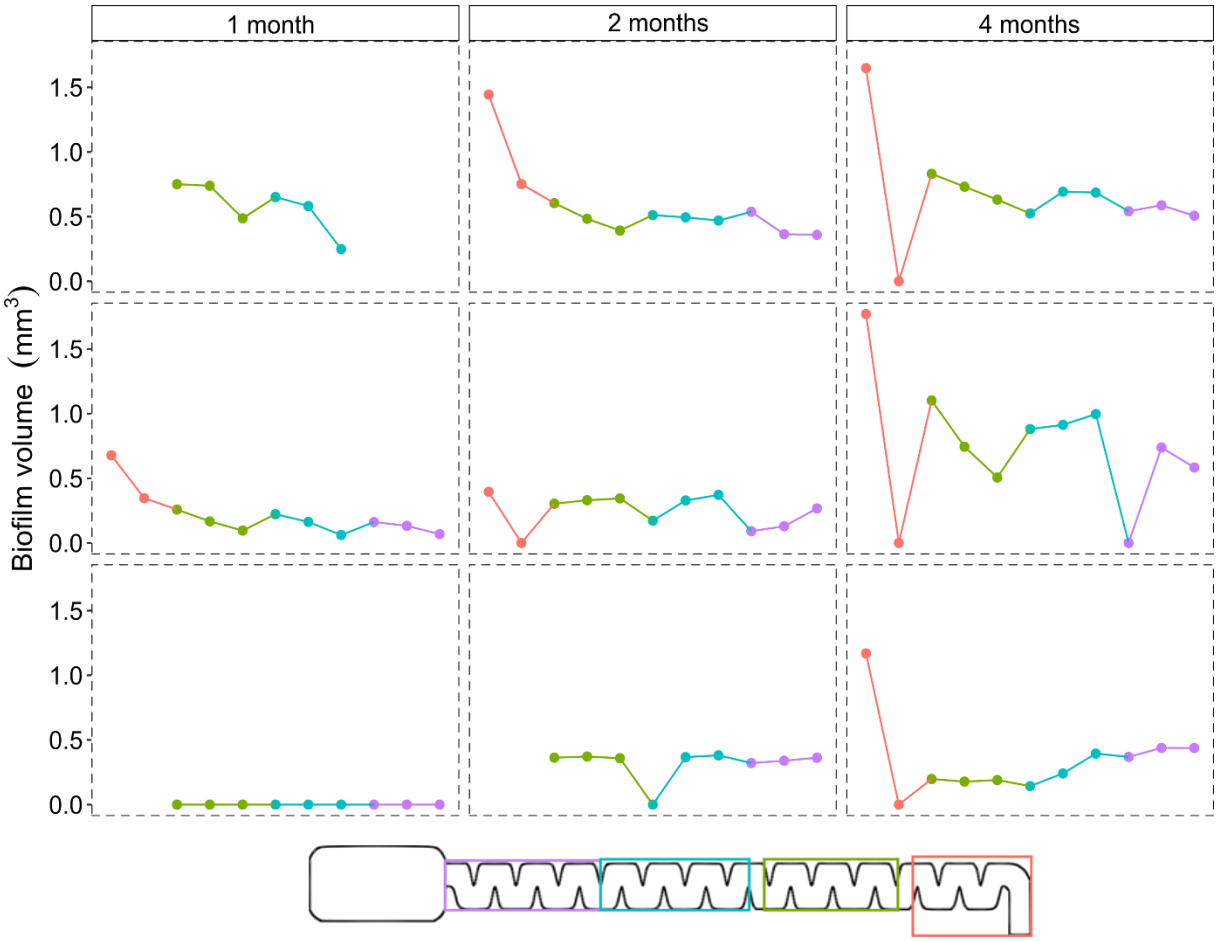


Figure S3 Biofouling in three 4 l.h-1 drippers in time. (●: inlet; ●: 2nd part, ●; 3rd part, ●: end). The three drippers correspond to those taken at 115 days.

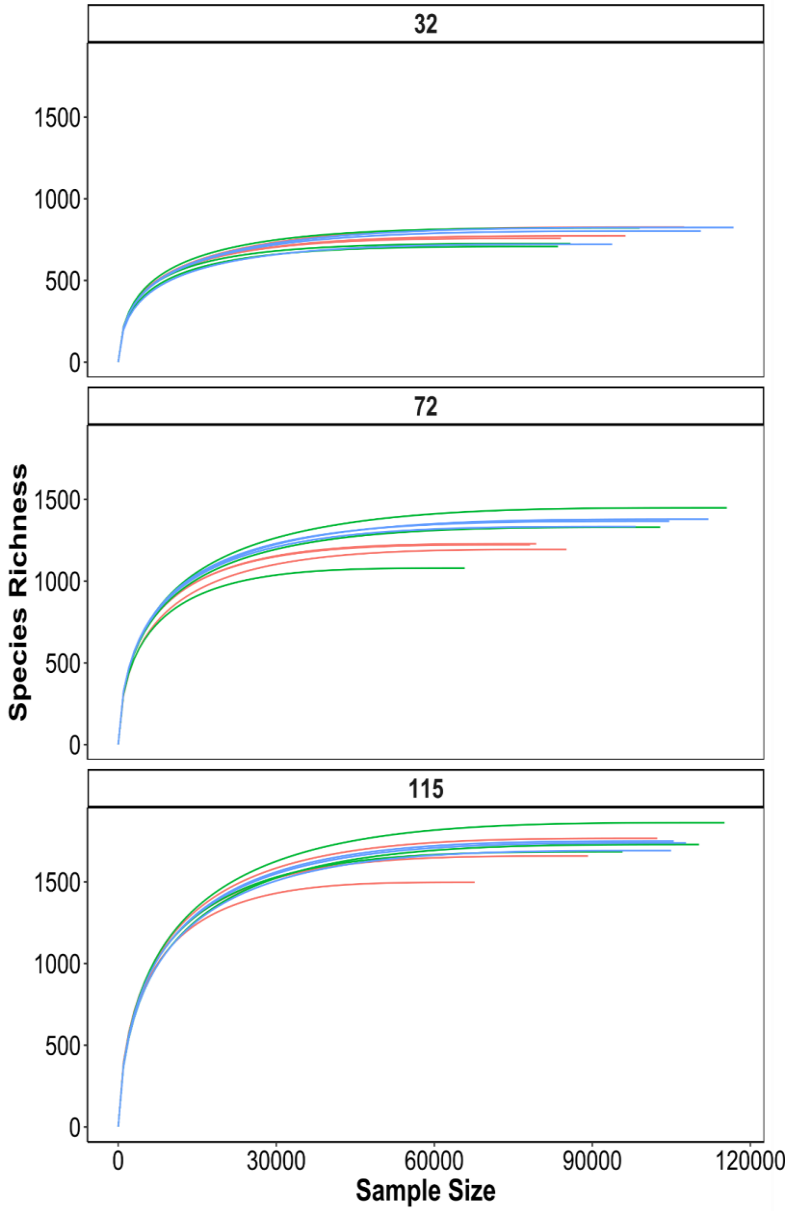


Figure S4 Rarefaction curves from dripper biofilms in time. Red for 1 l.h^{-1} dripper, green for 2 l.h^{-1} and blue for 4 l.h^{-1} drippers.

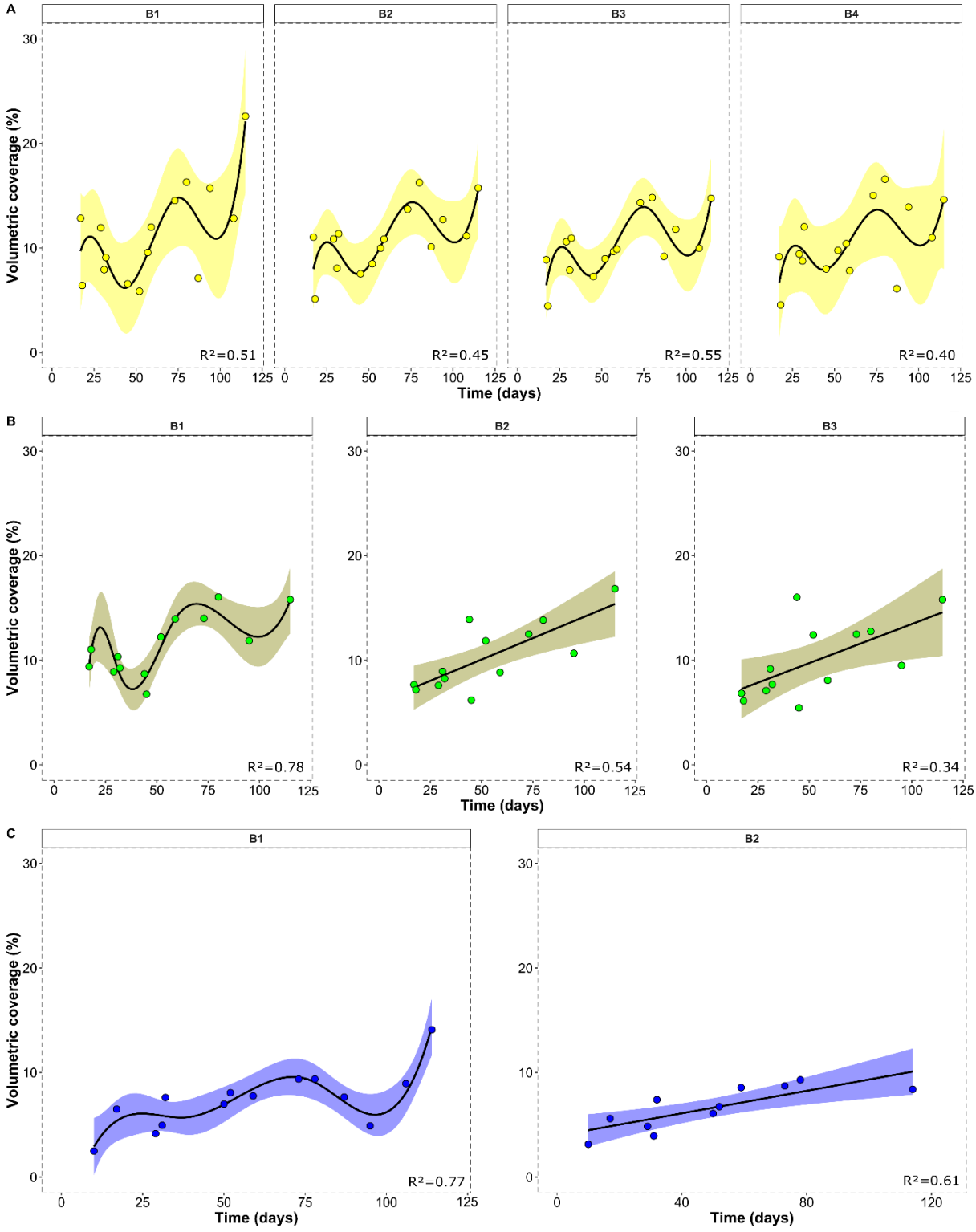


Figure S5. Mean volumetric biofilm coverage at the inlet of the drippers 1 l.h^{-1} (A) and 2 l.h^{-1} (B) and 4 l.h^{-1} (C) over time. The lines and confidence interval (95% of associated variance) correspond to the spline and linear model used for each dripper type (Baffle B4 from 2 l.h^{-1} was not included due to the too low regression value (R^2<0.25).

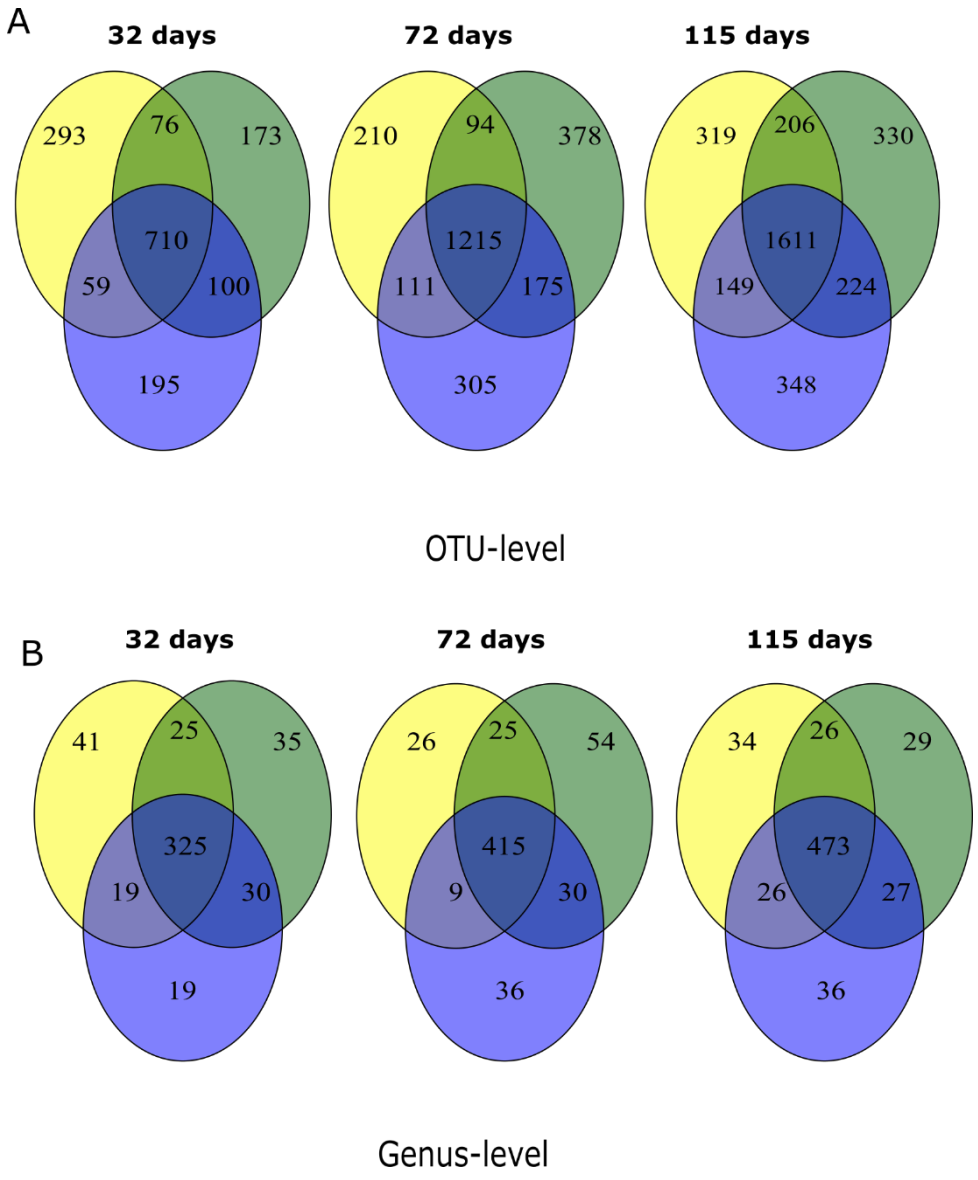


Figure S6 Venn Diagram of bacterial OTUs (A) and bacterial genera (B) detected in 1l.h^{-1} (yellow), 2 l.h^{-1} (green) and 4 l.h^{-1} (blue) dripper biofilms.

ANNEXES CHAPITRE « NETTOYAGE »

Flow rate ($l.h^{-1}$)	Inlet L x W		Return L x W		Outlet L x W	
1	9.5	2.5	5.2	5	9.4	2.5

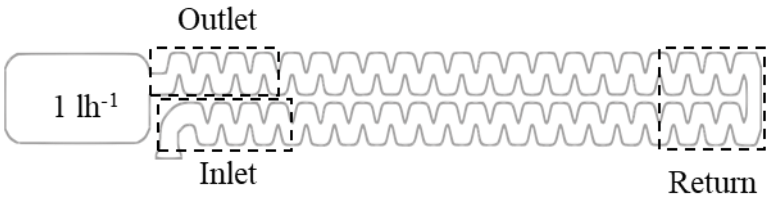


Figure S1 Measurements of the different areas of the labyrinth. L: length and W: width

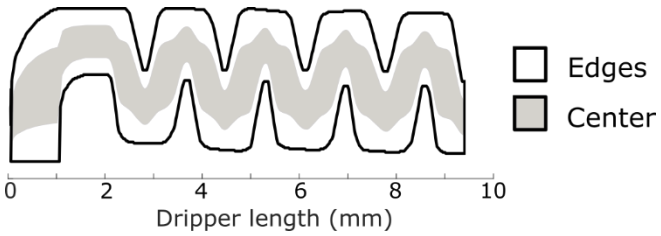


Figure S2 Diagram of the dripper labyrinth at the inlet area. The zone in gray corresponds to the central zone of the labyrinth. The zone in white corresponds to the zone at the edge of the labyrinth.

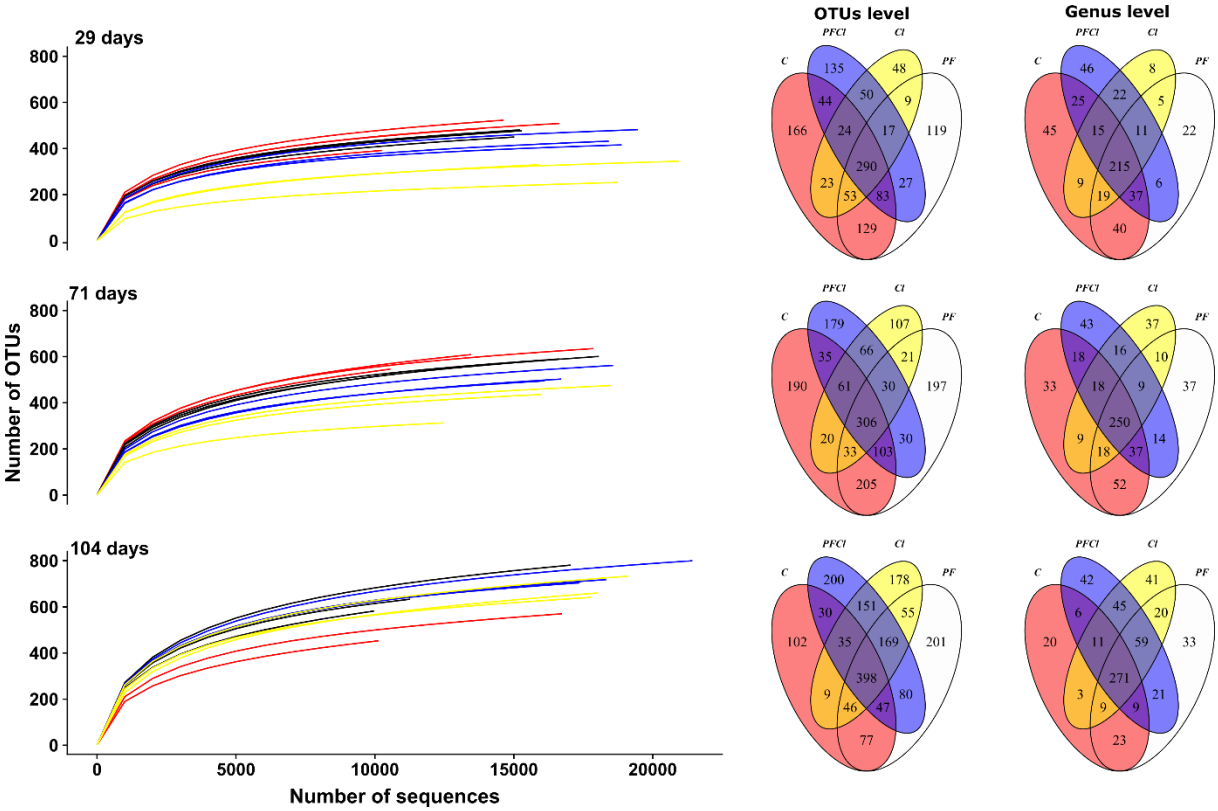


Figure S2 Rarefaction curves from dripper biofilms and Venn Diagram of bacterial OTUs and bacterial genera in time. (Control: red, Pressure flushing: white, Pressure flushing & Chlorination: blue, Chlorination: yellow).

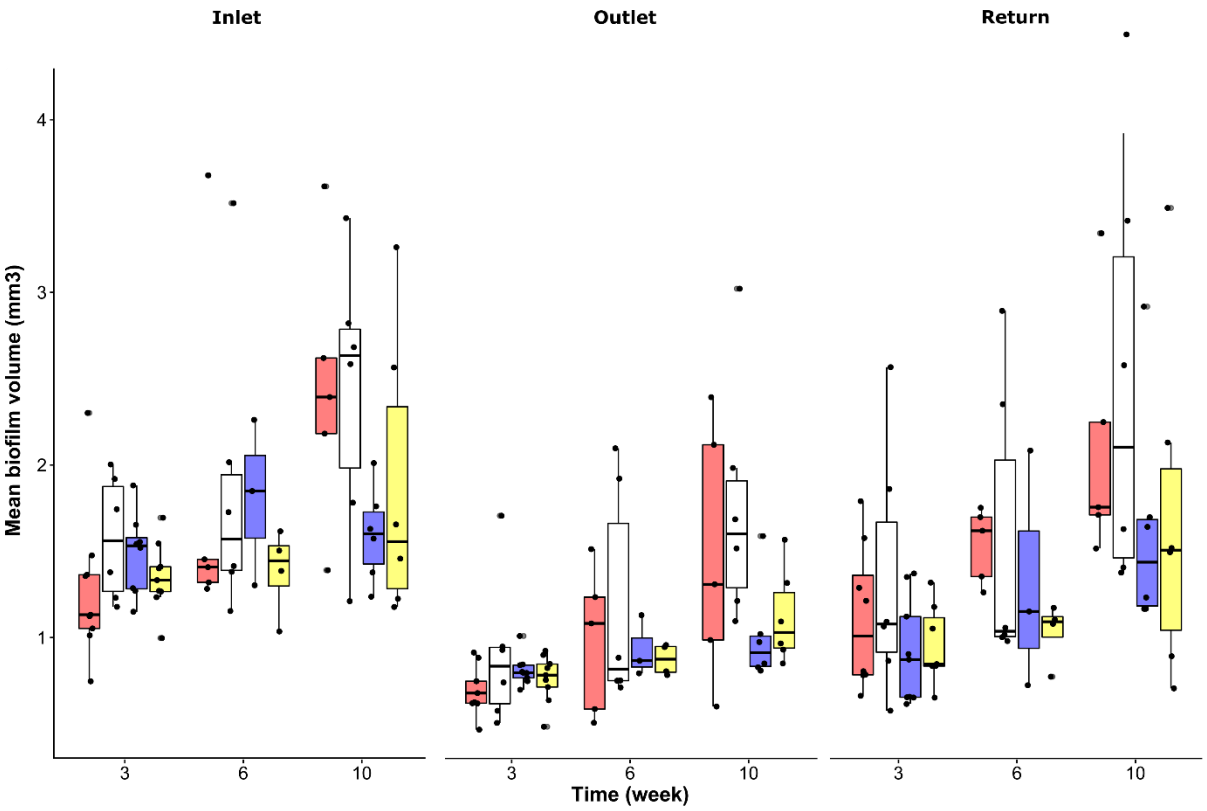


Figure S3 Biofilm volume during the cleaning period. Control (●), Pressure flushing (○), Chlorination (●) and Pressure flushing/Chlorination (●).

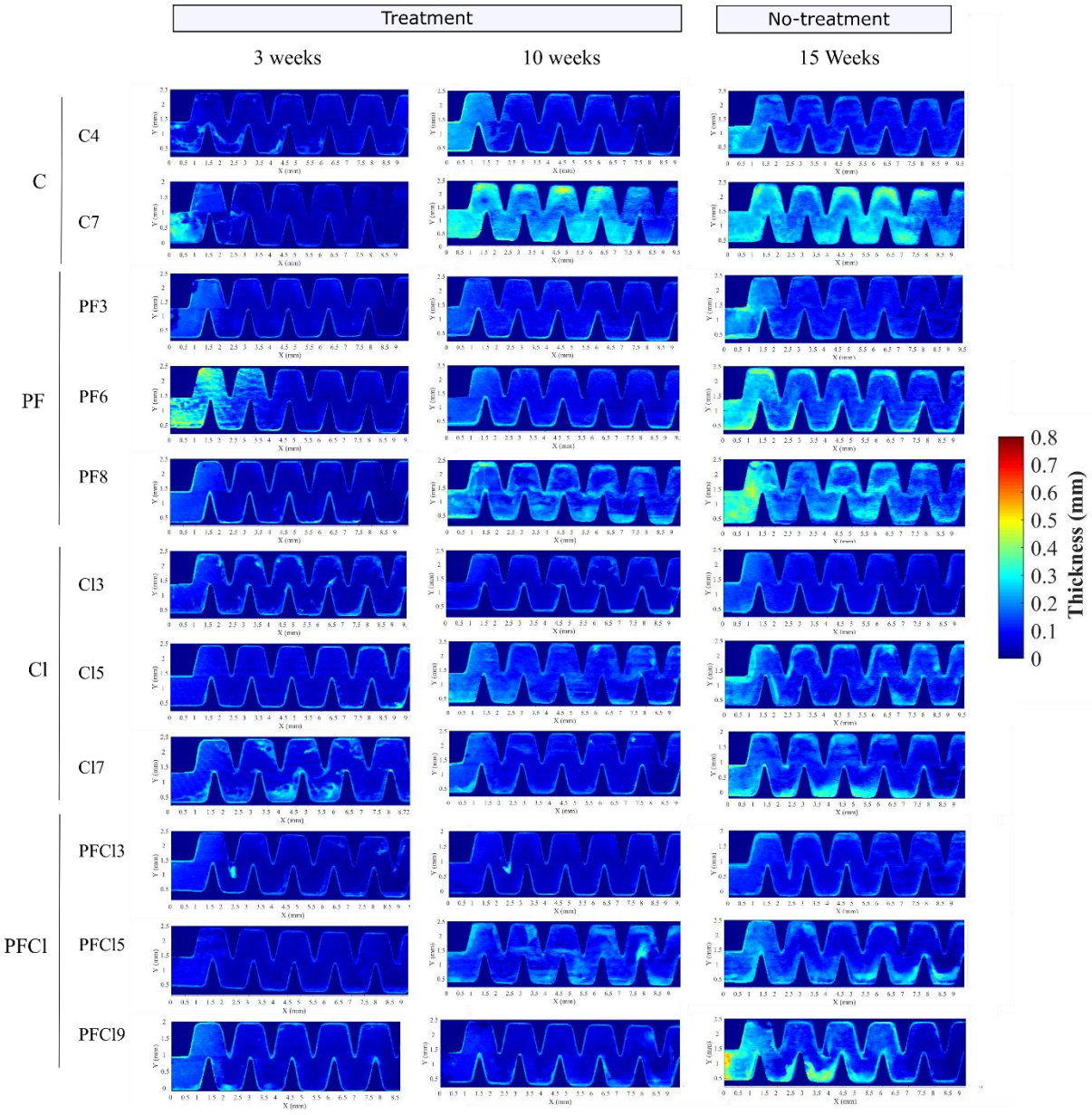


Figure S4 Biofilm thickness at the outlet of drippers under the C (Control), PF (Pressure flushing), Cl (Chlorination) and PFCl (Pressure flushing/Chlorination) conditions measured at 3, 10 and 15 weeks. The drippers presented are those also analysed by 16S rRNA sequencing at 104 days

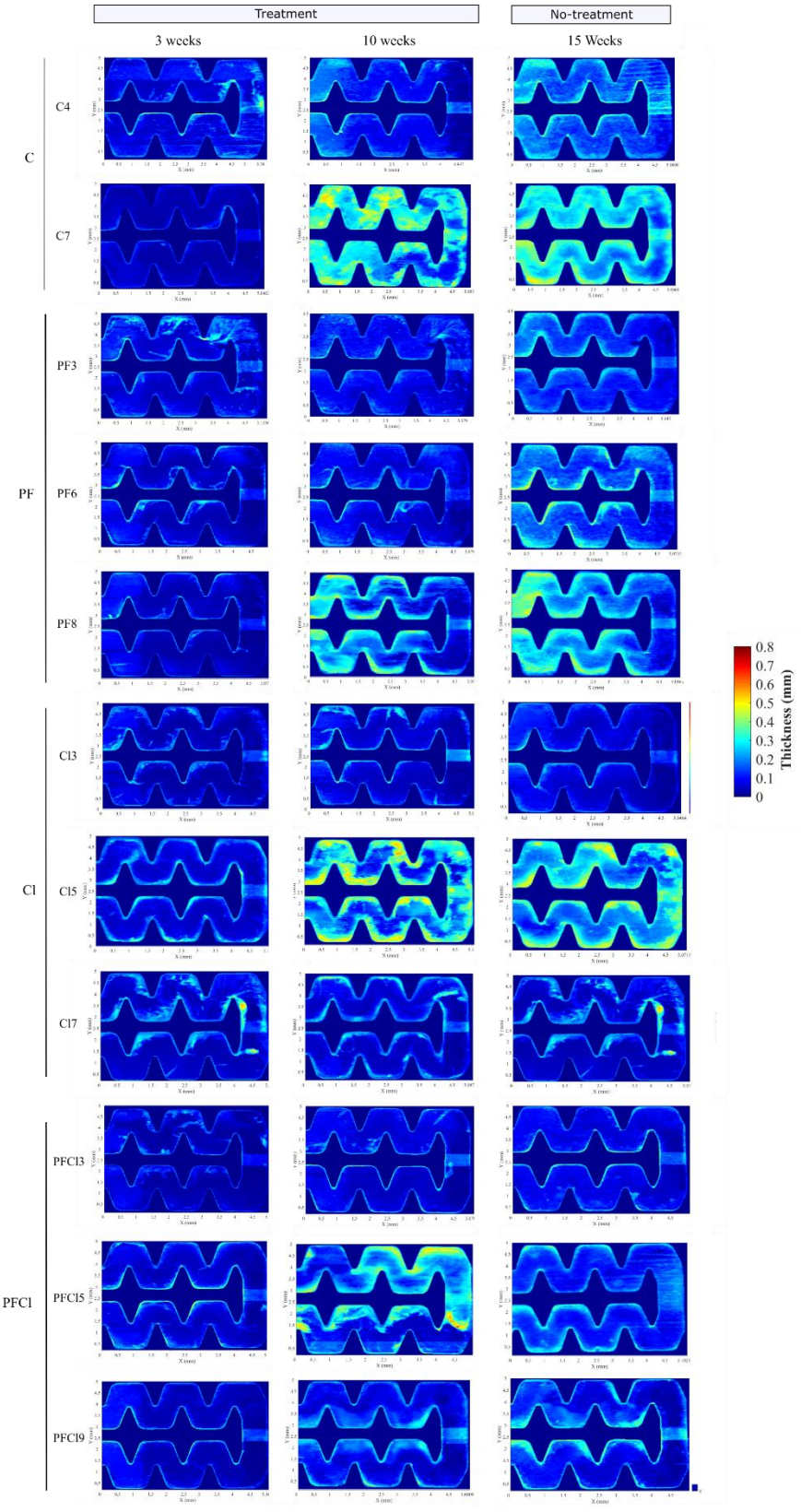


Figure S5 Biofilm thickness at the return of drippers under the C (Control), PF (Pressure flushing), Cl (Chlorination) and PFCl (Pressure flushing/Chlorination) conditions measured at 3, 10 and 15 weeks. The drippers presented are those also analysed by 16S rRNA sequencing at 104 days

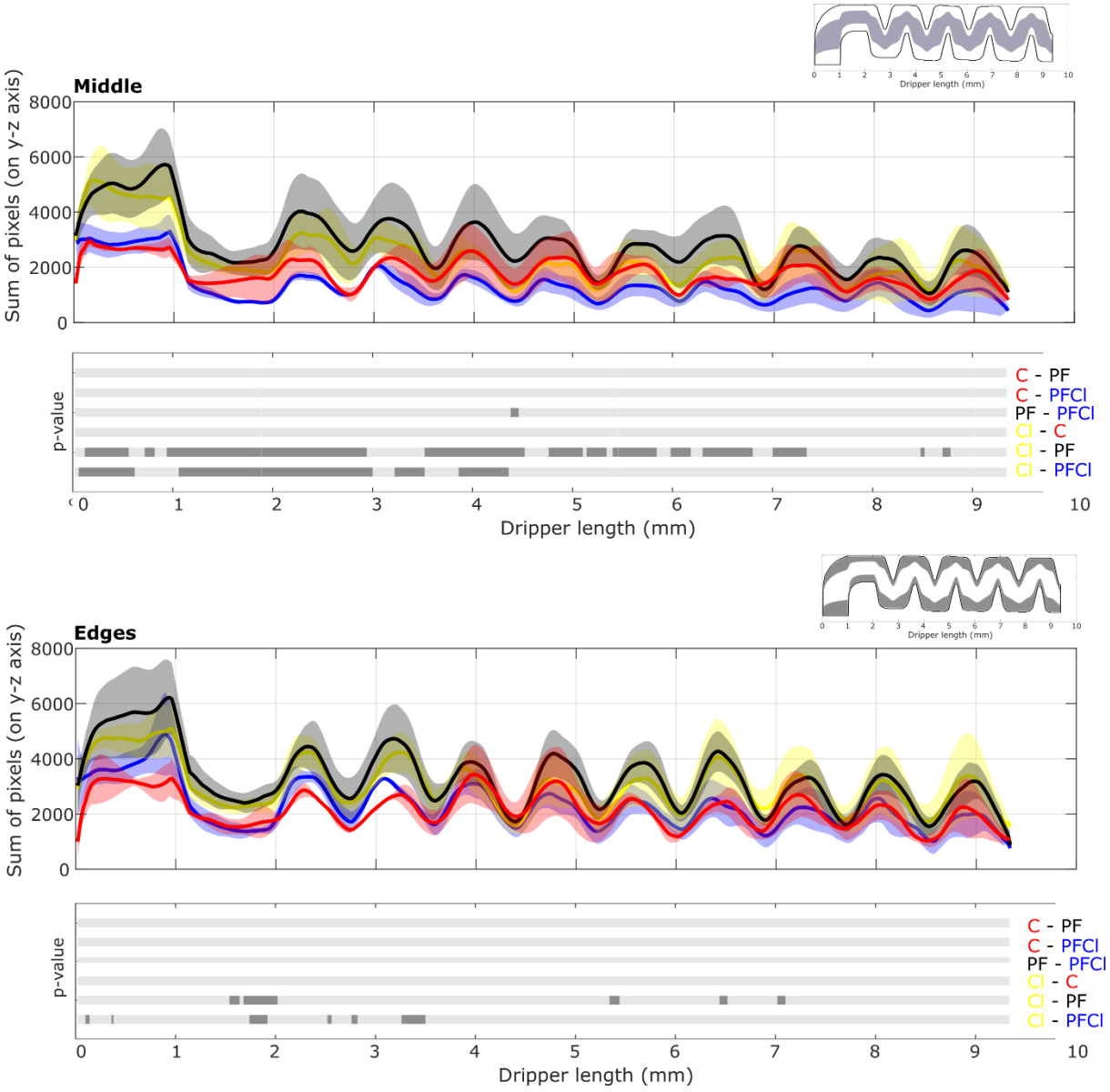


Figure S6 Mean number of pixels associated with the biofilm mass (and standard deviation) in the middle and edges of the inlet dripper channel after one month without cleaning. Control (C-●), Pressure flushing (PF-●), Chlorination (Cl-●) and Pressure flushing combined with Chlorination (PFCl-●); n=6 per condition. P-value graphs show the results of the Wilcoxon tests with ■: non-significant, ■: $p<0.1$, ■: $p<0.05$.

Table S1 Top abundant genera (<3%, x10^{-1}) of thosefound specifically in one dripper type for each sampling time.–un: unclassified, _ge: genus

Time (days)	Control (C)		Pressure flushing (PF)		Chlorination & Pressure flushing (PFCl)		Chlorination (Cl)	
	Genus	Relative abundance	Genus	Relative abundance	Genus	Relative abundance	Genus	Relative abundance
29d	Comamonadaceae_un	6.8 ± 1.2	Comamonadaceae_un	7.3 ± 2.1	Comamonadaceae_un	21.7 ± 7.4	*Azospira*	19.2 ± 6.2
	env.OPS_17_ge	6.1 ± 2.2	*Dechloromonas*	6.7 ± 1.3	*Flavobacterium*	9.6 ± 1.3	*Cloacibacterium*	14.7 ± 4.1
	Fusibacter	5.7 ± 1	env.OPS_17_ge	5.1 ± 1.3	*Dechloromonas*	5.6 ± 3.1	Comamonadaceae_un	13.9 ± 3
	Azospira	5 ± 1.6	*Terrimonas*	4.6 ± 1	env.OPS_17_ge	5.5 ± 3	*Flavobacterium*	12.4 ± 4.7
	Pseudomonas	4.9 ± 0.4	*Fusibacter*	4.4 ± 0.2	*Cloacibacterium*	4.9 ± 1.3	*Pseudoxanthomonas*	5.1 ± 3
	Dechloromonas	4.9 ± 1.3	*Pseudomonas*	4.4 ± 0.9	*Pseudomonas*	4.4 ± 1.6	*Dechloromonas*	4.7 ± 2
	Terrimonas	4.1 ± 1.5	*Flavobacterium*	3.7 ± 0.5			Comamonadaceae_un	15.2 ± 1.1
71d	uncultured_ge	6.5 ± 1.1	*Terrimonas*	7.2 ± 2.2	Comamonadaceae_un	22.5 ± 3.8	*Azospira*	8 ± 1.1
	Terrimonas	5.7 ± 0.9	*Dechloromonas*	6.5 ± 2.5	*Fusibacter*	8.1 ± 3.6	*Flavobacterium*	6.3 ± 0.9
	Denitratisoma	5.4 ± 0.4	uncultured_ge	6.3 ± 3	*Azospira*	4.8 ± 1.2	*Fusibacter*	5.8 ± 1.1
	Dechloromonas	4.1 ± 0.7	Comamonadaceae_un	5.3 ± 3	*Pseudomonas*	4.5 ± 0.4	WCHB1-32_ge	4.7 ± 0.1
	Run-SP154_ge	4.1 ± 1.2	*Denitratisoma*	5.2 ± 0.1			*Paludibacter*	4.5 ± 0.8
	Comamonadaceae_un	3.6 ± 0.6	uncultured	3.9 ± 0.7				
			Run-SP154_ge	3.6 ± 0.8				
104d	*Dechloromonas*	12.3 ± 3.5	*Dechloromonas*	5.8 ± 1.4	Comamonadaceae_un	9.1 ± 1	Comamonadaceae_un	14.3 ± 2.2
	Aquabacterium	8.4 ± 0.3	*Denitratisoma*	5.1 ± 0.6	*Dechloromonas*	7.4 ± 2.2	Coriobacteriaceae_un	7.8 ± 0
	Herpetosiphon	7 ± 0	*Competibacter*	4.5 ± 1.2	uncultured	6.8 ± 1.4	uncultured_ge	4.5 ± 0.8
	Comamonadaceae_un	6.6 ± 0.7	uncultured	4 ± 0.6	uncultured_ge	4.8 ± 0.1	Christensenellaceae_un	3.9 ± 0
	Coriobacteriaceae_un	6.5 ± 0	uncultured_ge	4 ± 0.8	Christensenellaceae_un	3.5 ± 0	*Thiocapsa*	3.6 ± 0
	uncultured	5.8 ± 1	Run-SP154_ge	3.9 ± 0.5			Run-SP154_ge	3.3 ± 0.1
			Candidatus_Nitrotoga	3.8 ± 0.4			uncultured	3.2 ± 0.2
			Terrimonas	3.8 ± 0.5				

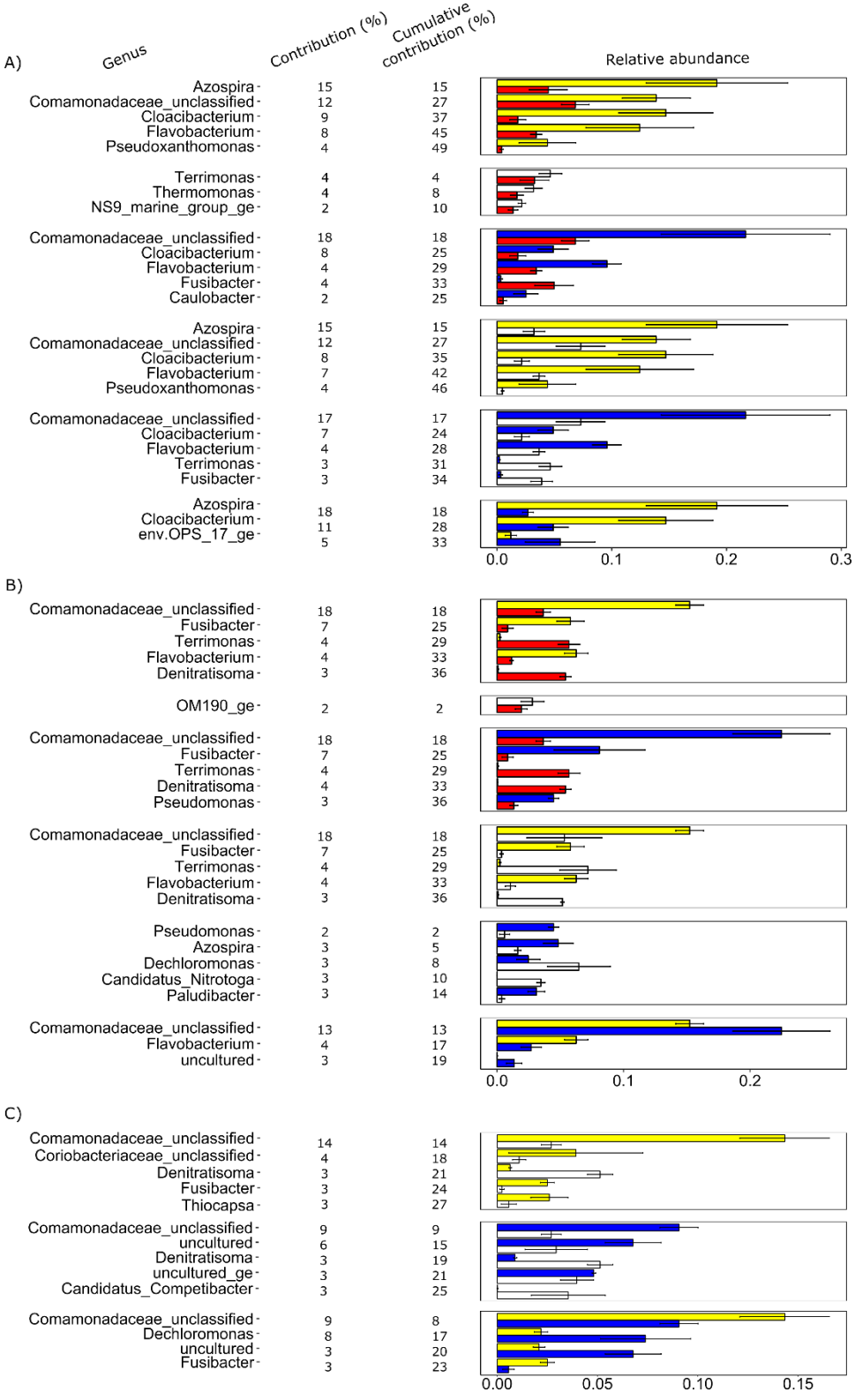


Figure S8 Most influential bacterial genera in discriminating between 2 conditions (SIMPER analysis). Control (●), Pressure flushing (○), Chlorination (●) and Pressure flushing/Chlorination (●).

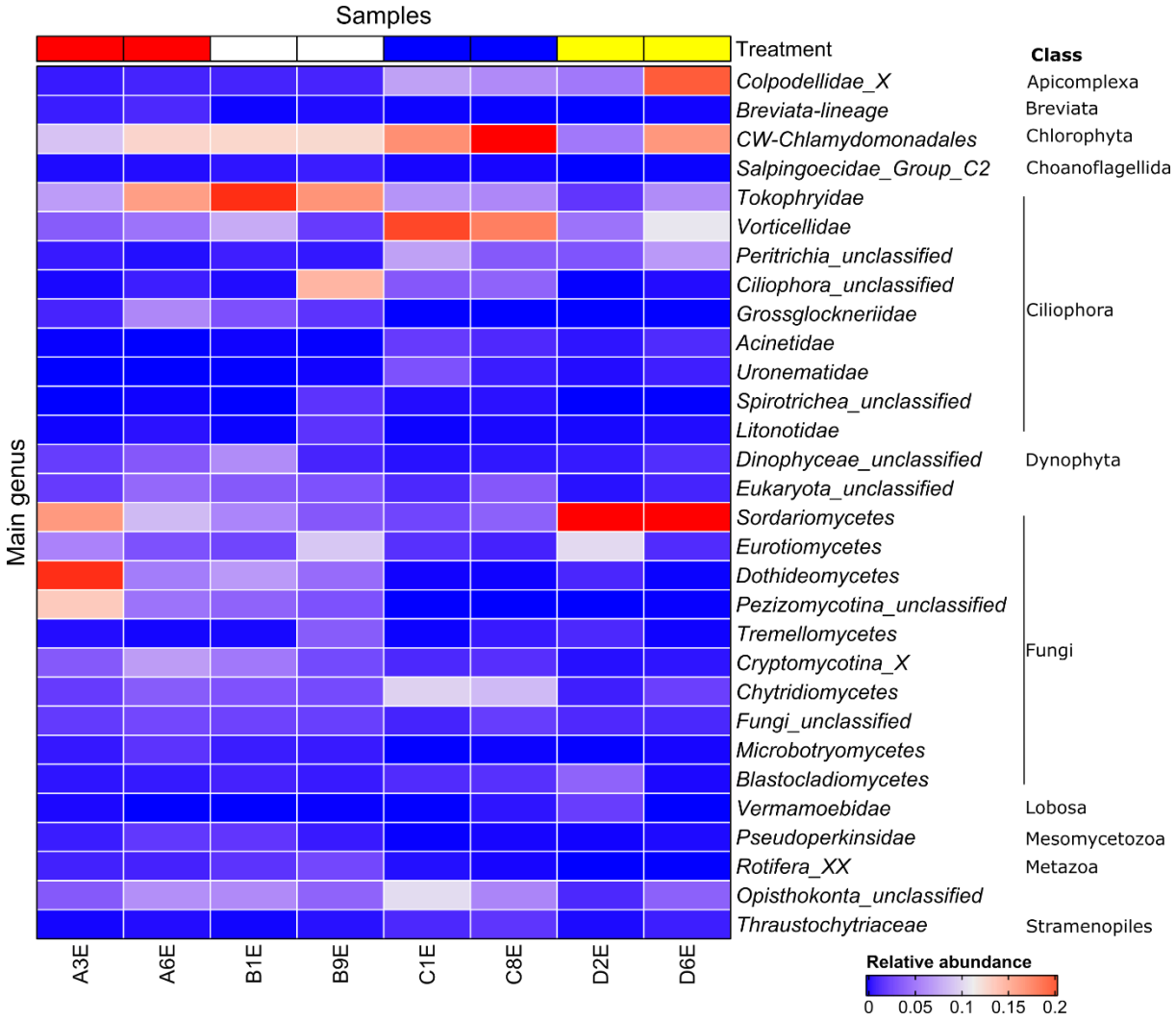


Figure S9 Heat map of eukaryotes genera from dripper biofilms Genera in top thirty relative abundance are shown. Control (●), Pressure flushing (○), Chlorination (●) and Pressure flushing/Chlorination (●).