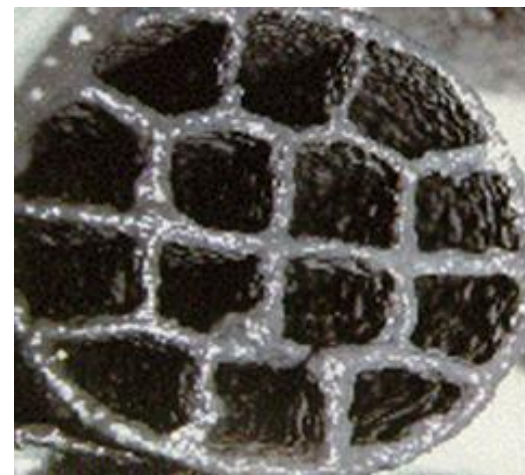
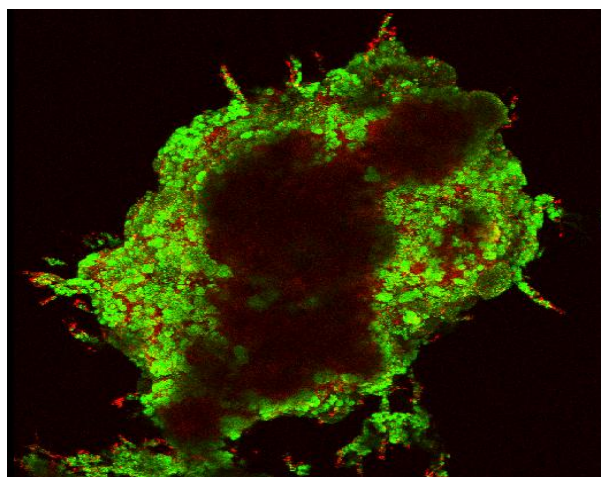


## Les biofilms : organisation, structuration des écosystèmes microbiens

Nicolas BERNET, INRA-LBE



- **Notions générales sur les biofilms**
- **Les biofilms dans les procédés de traitement**
- **Outils mis en œuvre pour étudier les biofilms**
- **Illustrations de résultats de recherches**

- **Notions générales sur les biofilms**
- Les biofilms dans les procédés de traitement
- Outils mis en œuvre pour étudier les biofilms
- Illustrations de résultats de recherches

“A biofilm consists of cells immobilized at a substratum and frequently embedded in an organic polymer matrix of microbial origin”

Characklis et Marshall, 1990

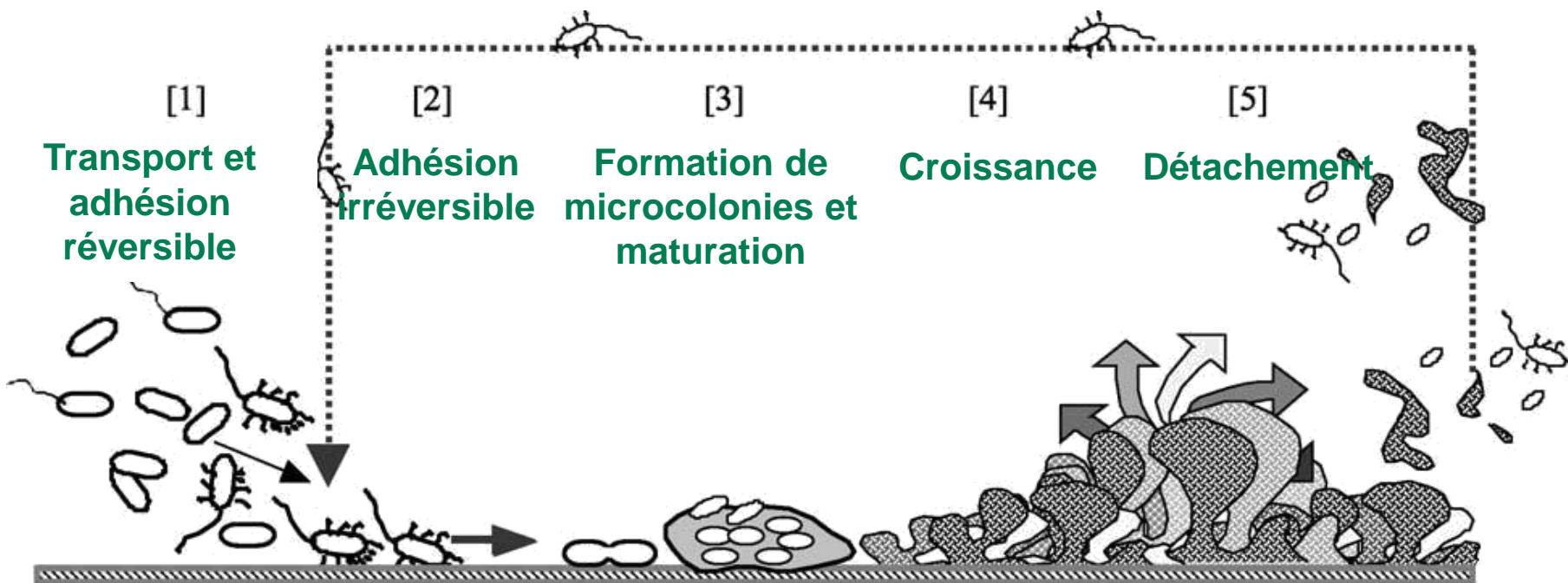
“Biofilms are defined as matrix-enclosed bacterial populations adherent to each other and/or surfaces or interfaces”

Costerton et al., 1995

“Biofilms can be defined simply and broadly as communities of microorganisms that are attached to a surface”

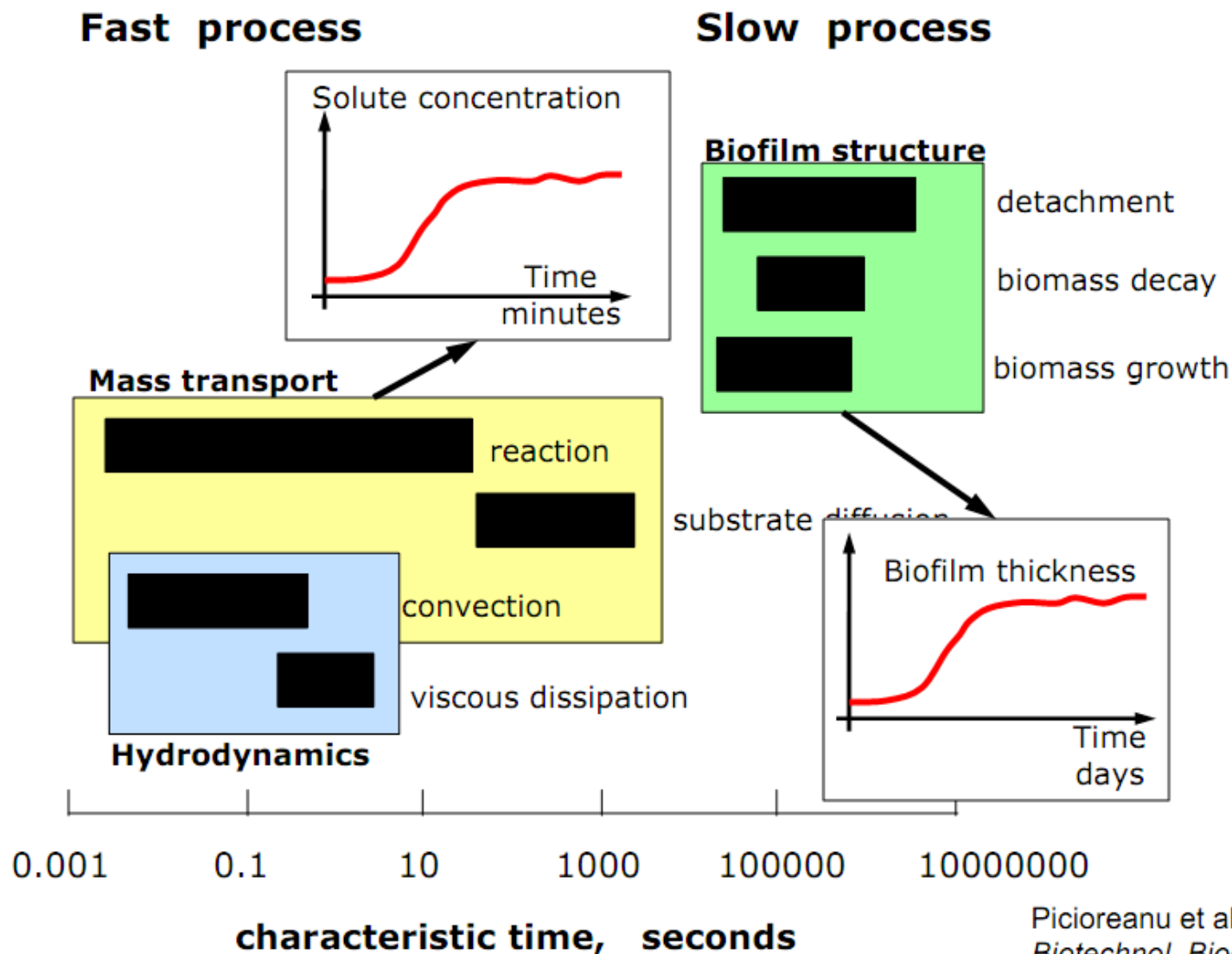
O'Toole et al., 2000

# Phases de développement d'un biofilm

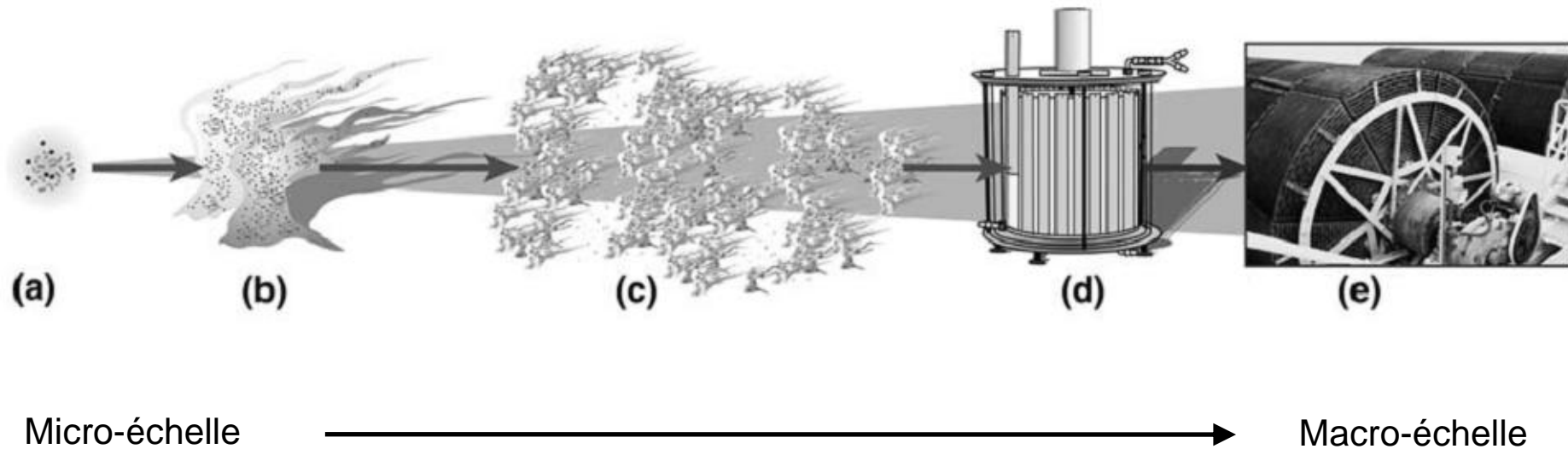


*Modèle de formation du biofilm (Ghigo, 2003)*

# Echelles de temps

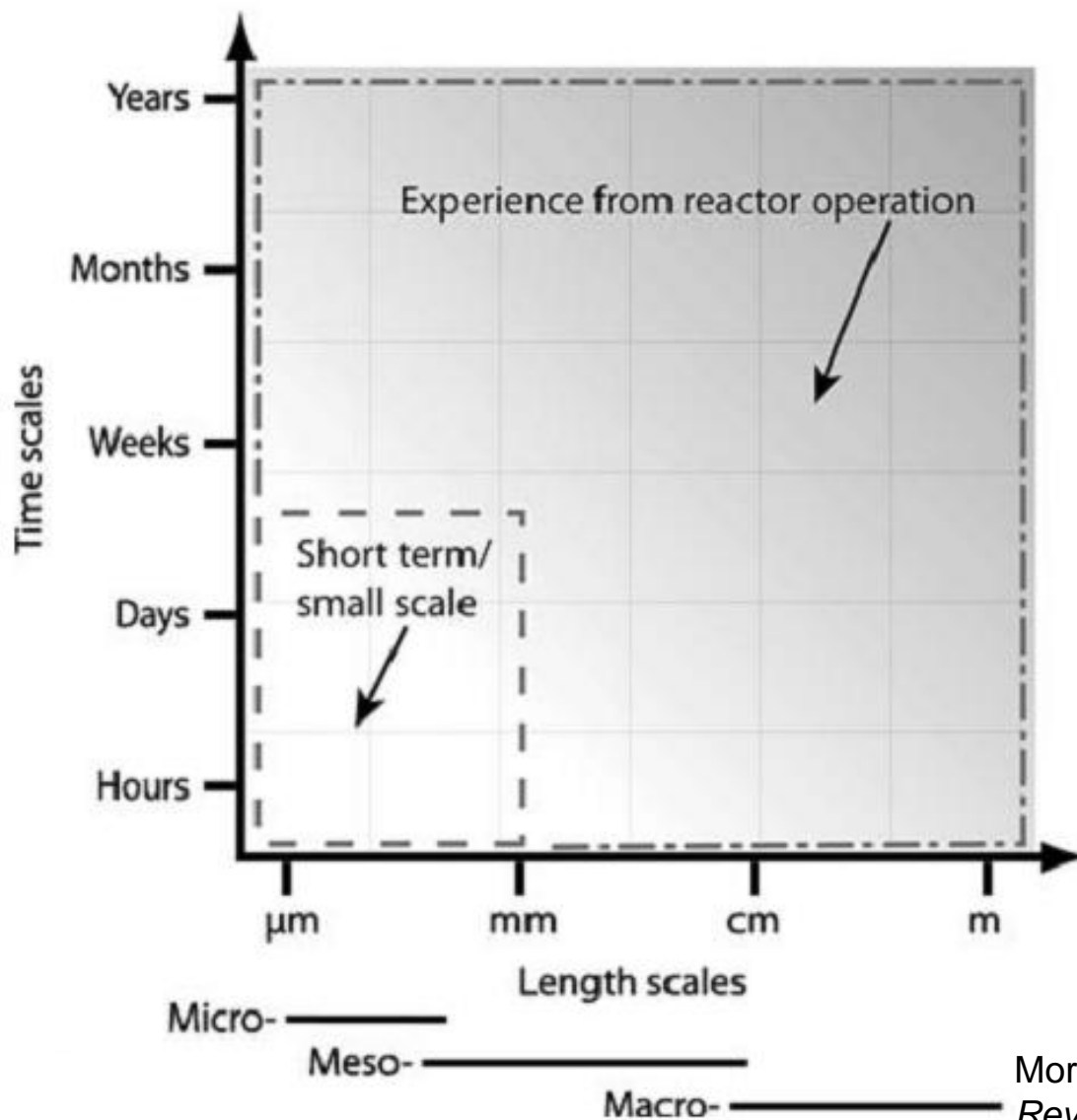


Picioreanu et al. (2000)  
*Biotechnol. Bioeng.*





# Difficulté de relier les échelles d'observation



Morgenroth et Milferstedt, 2009  
*Rev. Environ. Science. Biotechnol.*



- Notions générales sur les biofilms
- **Les biofilms dans les procédés de traitement**
- Outils mis en œuvre pour étudier les biofilms
- Illustrations de résultats de recherches

- Pour augmenter la concentration en microorganismes dans le réacteur

Charge massique : 
$$\frac{F}{M} = \frac{Q \cdot S}{V \cdot X}$$

F: Flux de substrat (Kg/j),

M: Quantité de microorganismes (Kg)

Q: Débit entrant (m<sup>3</sup>/j)

S: Concentration en substrat (Kg/m<sup>3</sup> )

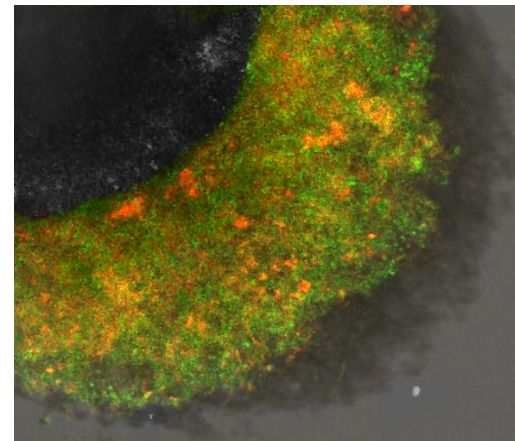
V: Volume de réacteur (m<sup>3</sup>),

X: Concentration en microorganismes (Kg/m<sup>3</sup>)

- Pour une charge massique donnée, augmenter la concentration en microorganismes permet de diminuer le volume de réacteur

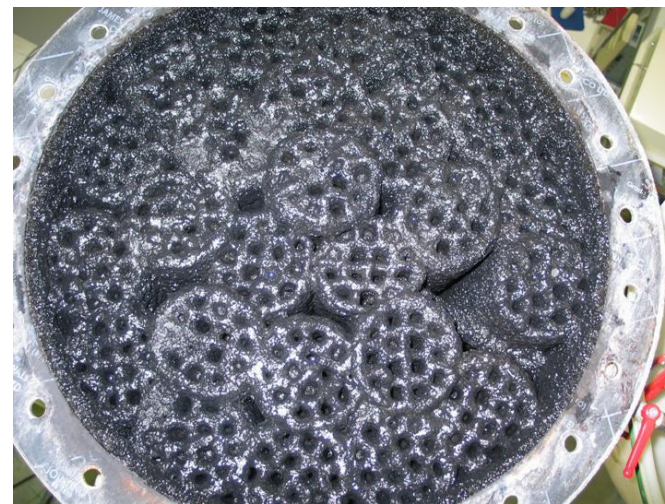
## Avantages

- Charge volumique éliminée élevée
- Compacité (emprise au sol, couverture)
- Modularité
- Robustesse (inhibiteurs, chocs) : diversité?

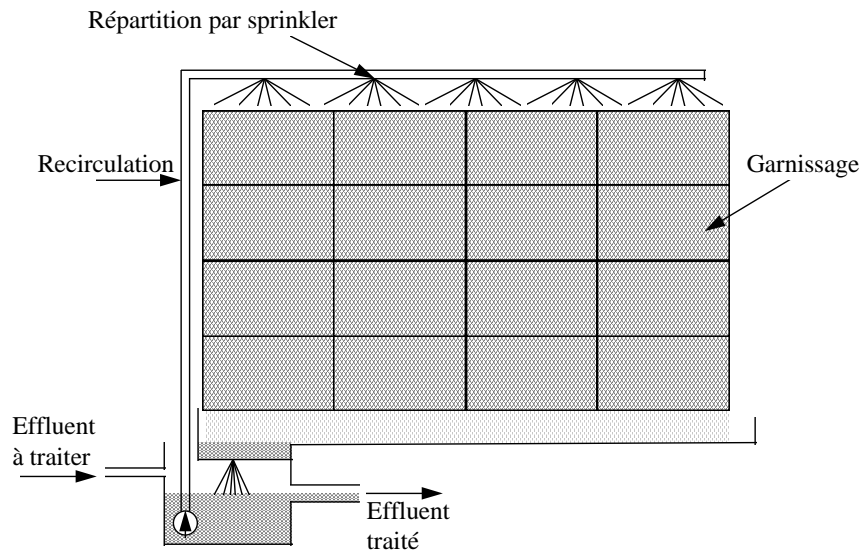


## Mais

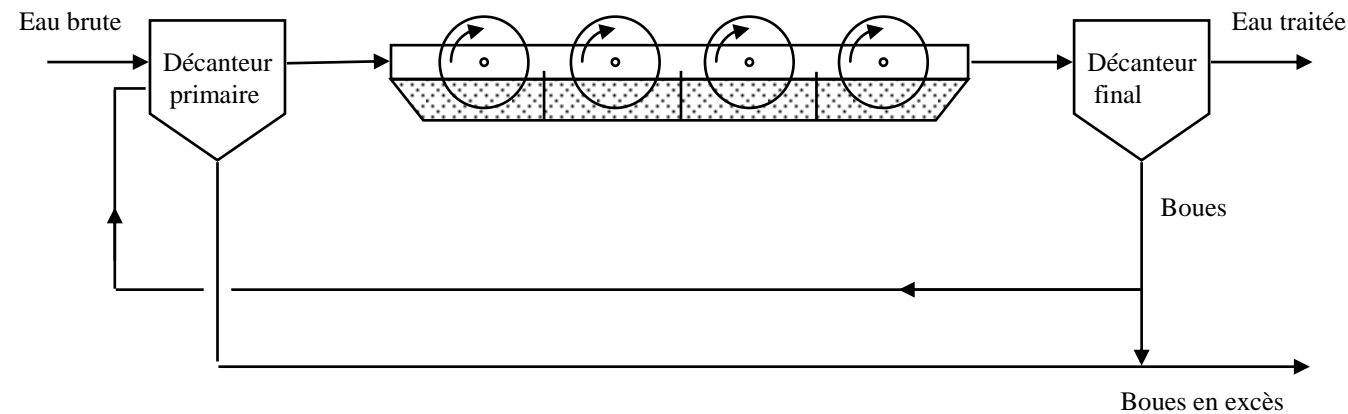
- Frais d'investissement plus élevés
- Automatisation nécessaire
- Durée de colonisation des matériaux support
- Limitations de l'apport en substrats
- Colmatage (lit fixe)



## - Lit bactérien



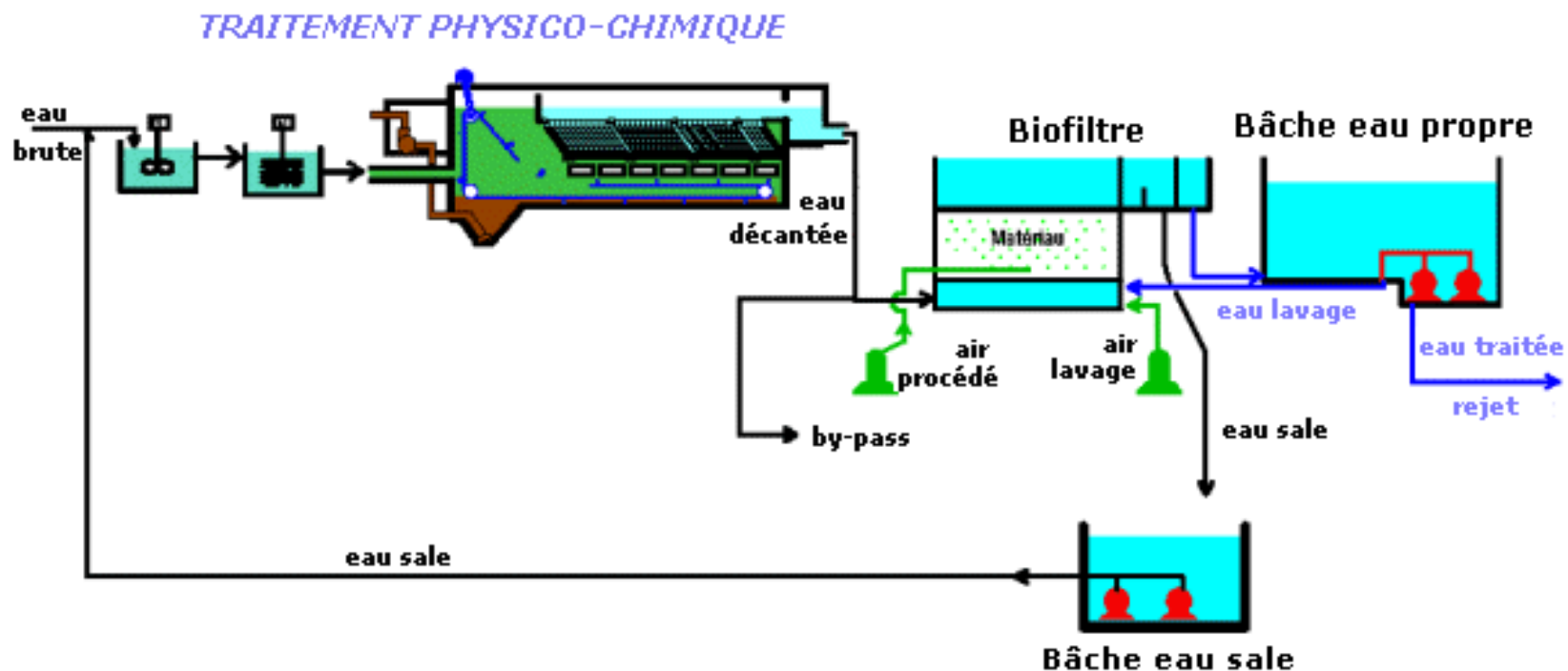
## - Biodisques



# Procédés à biofilm

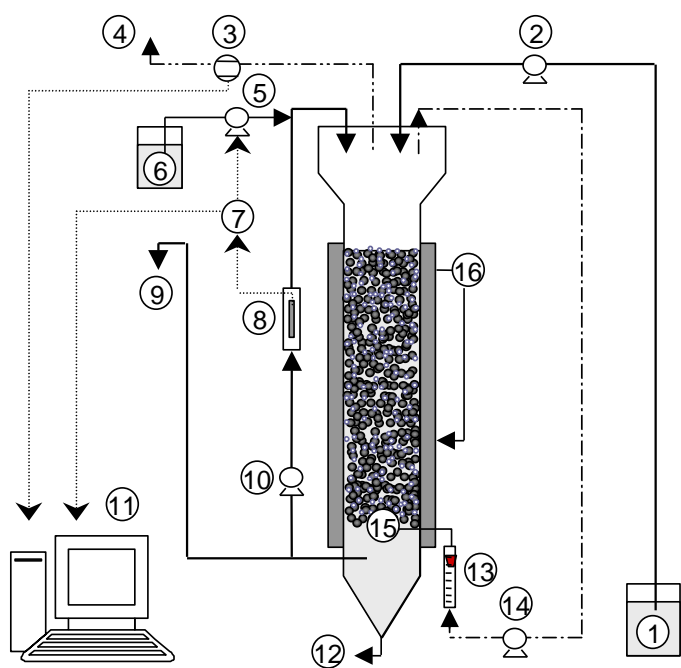
## - Lit fixe (biofiltre)

- Augmentation de la surface disponible (support granulaire)
- Support immergé alimenté en flux ascendant ou descendant
- Pas de clarificateur secondaire
- Colmatage



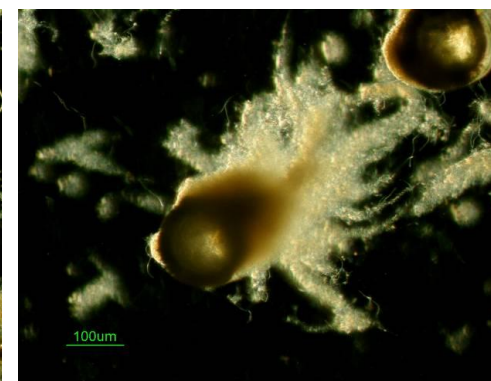
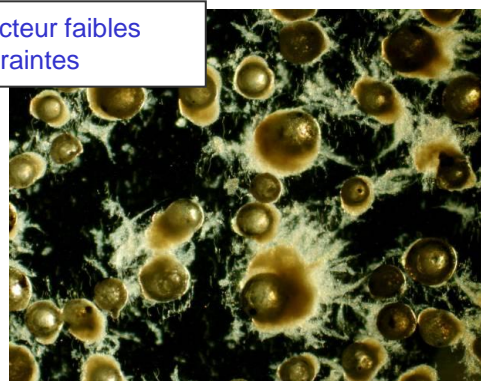
## - Lit mobile (lit fluidisé, air/gas-lift)

- Augmentation de la surface disponible (support granulaire ou granules)
- Support mis en mouvement
- Pas de colmatage
- Contrôle possible des biofilms (hydrodynamique)

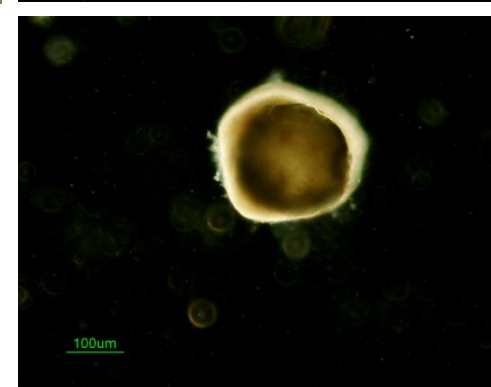
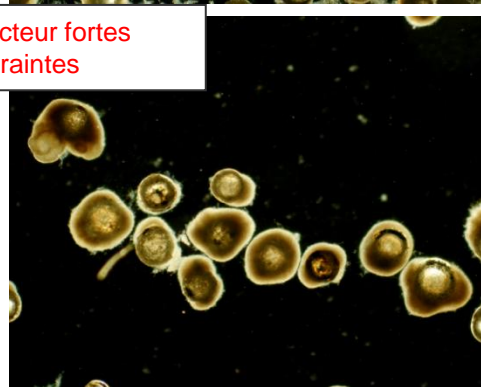


Cresson, 2006

Réacteur faibles contraintes



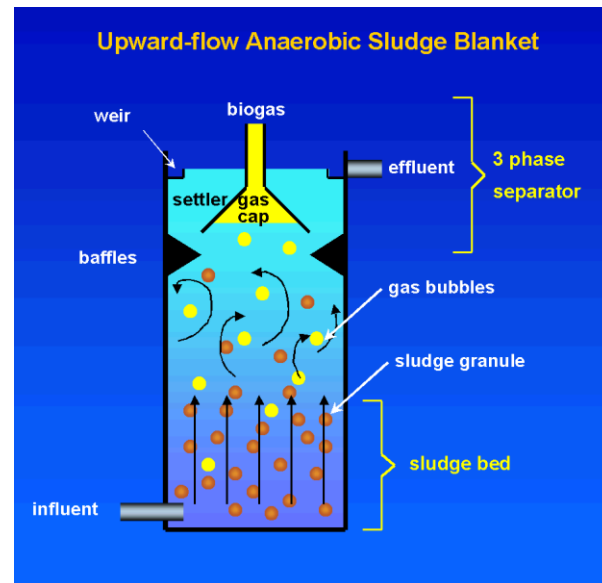
Réacteur fortes contraintes



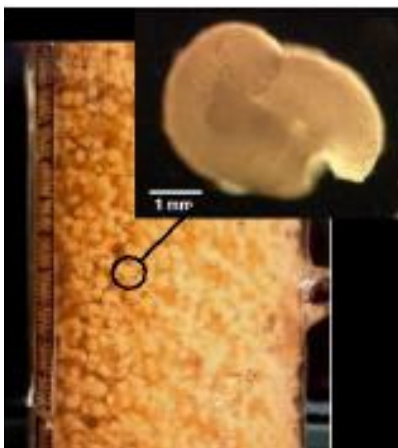


# Procédés à biofilm

- Lit de boues anaérobie (UASB, EGSB, IC)



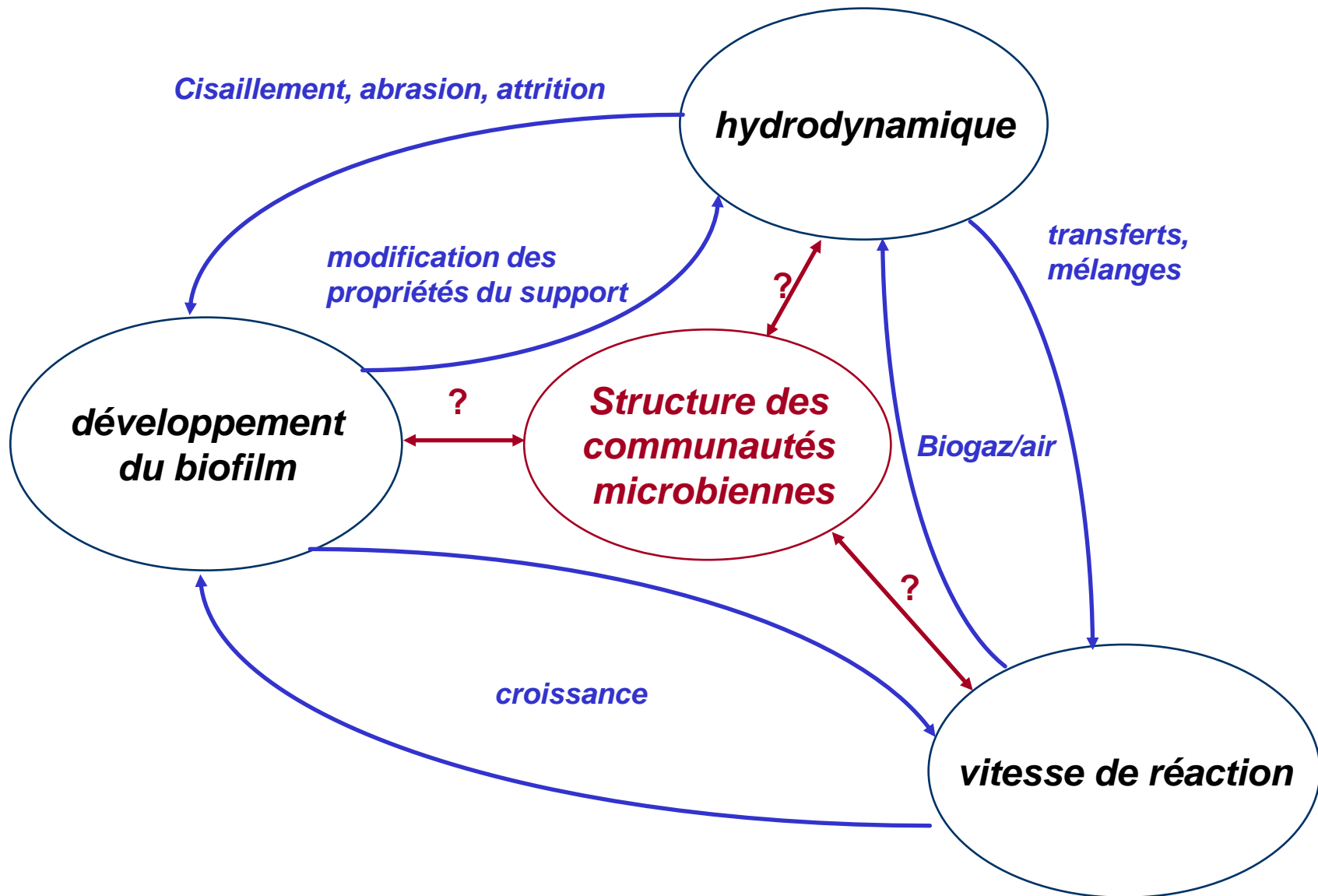
- Boues granulaires aérobiees



[www.UASB.org](http://www.UASB.org)

TU Delft





## ► Génie des procédés :

- Interactions entre les conditions hydrodynamiques (cisaillement, attrition) et les propriétés du biofilm (structure, densité, détachement)
- Utilisation des conditions opératoires pour maîtriser les propriétés du biofilm (épaisseur, densité, activité).

## Changement d'échelle : intégration des modèles macro- et microscopique

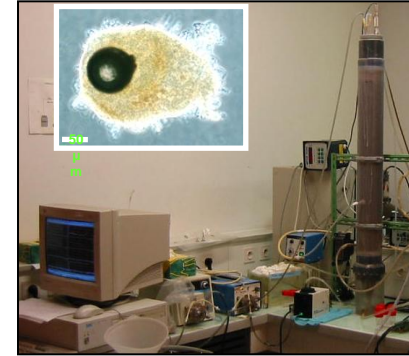
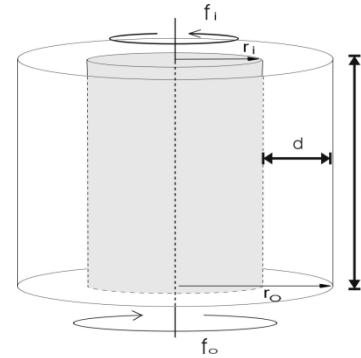
## ► Ecologie microbienne :

- Evolution de la biodiversité d'un biofilm au cours du temps
- Influence de l'hydrodynamique sur la structure des communautés microbiennes d'un biofilm
- Interactions entre le biofilm et les populations planctoniques (compétition,...)
- Structuration spatiale des communautés dans le biofilm

- Notions générales sur les biofilms
- Les biofilms dans les procédés de traitement
- **Outils mis en œuvre pour étudier les biofilms**
- Illustrations de résultats de recherches

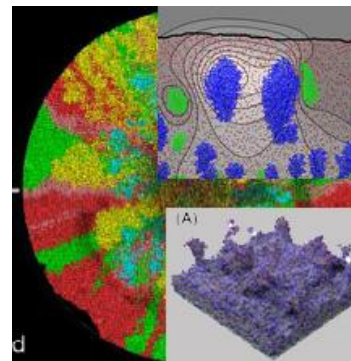
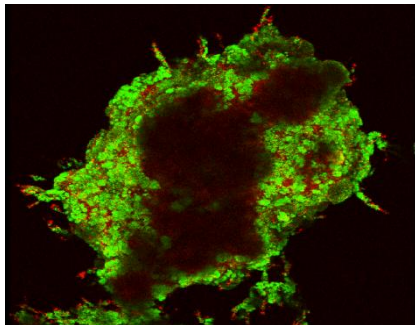
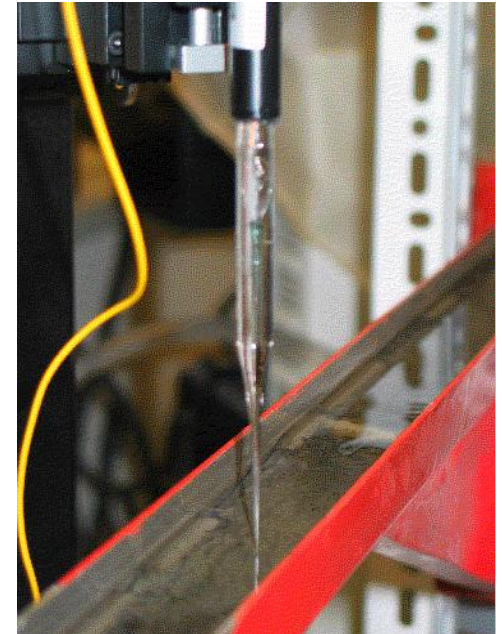
## ► Réacteurs

- Réacteurs de Couette (1L, 20L)
- Réacteur LTI (Lit Triphasique Inverse)
- Colonne à bulles

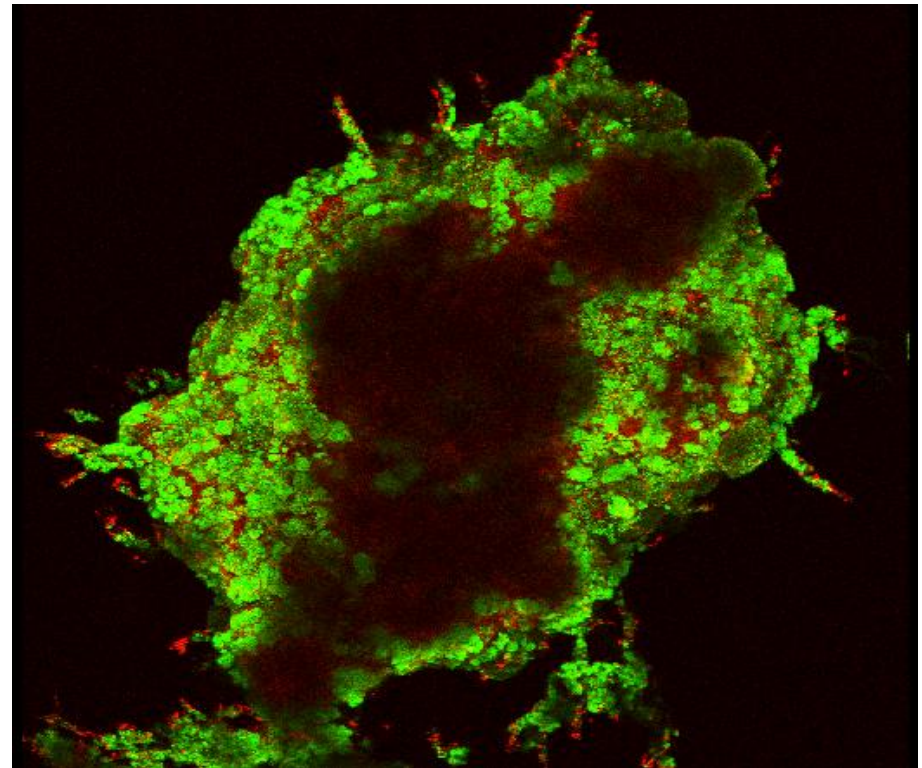
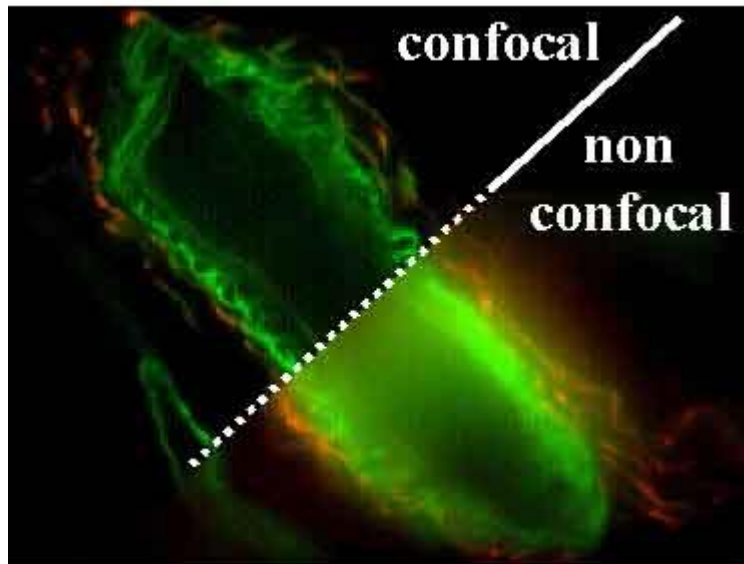


## ► Outils spécifiques : acquisition de la dimension spatiale

- Microscopie
- Micro-électrodes (mesure de gradients)
- Modélisation 1D, 2D « individu-centrée » (SMA)



Picioeanu, 2006



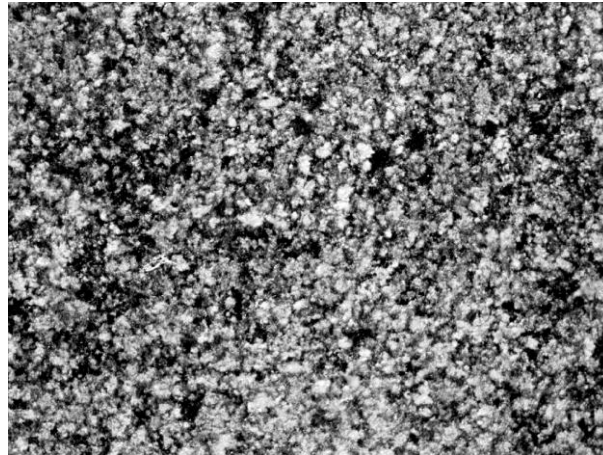
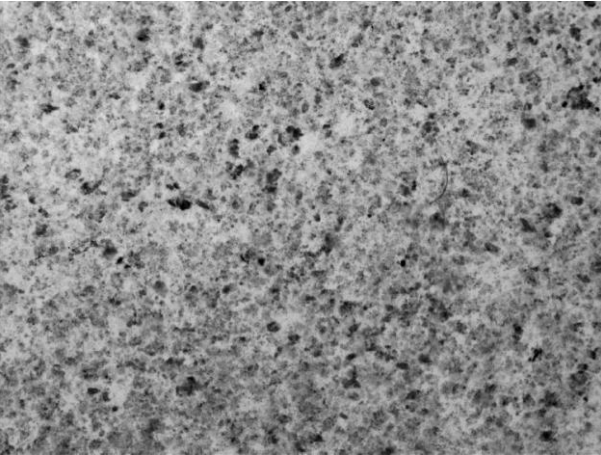
100  $\mu\text{m}$

## ► Accès à des paramètres intrinsèques du biofilm

- Reconstitution 3D à partir des images de plans focaux
- Répartition spatiale des populations (FISH)
- Estimation de la fraction cellulaire (coloration ADN)/ EPS (utilisation de lectines)



2 mm

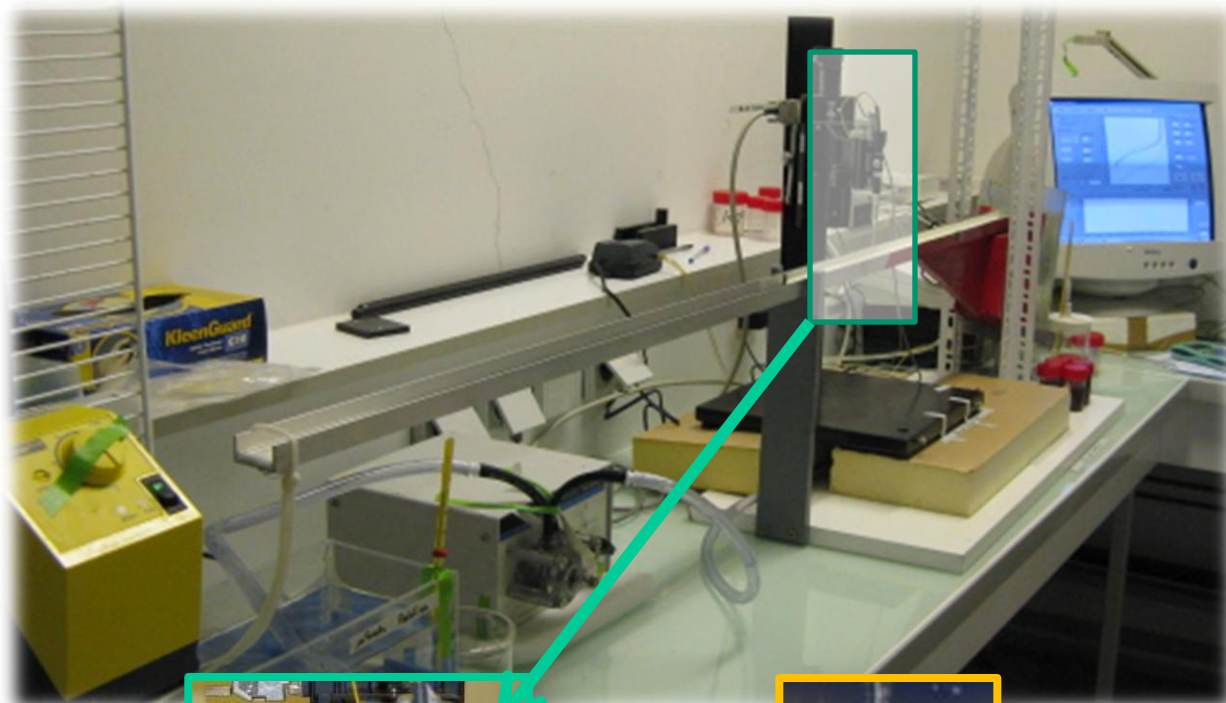


## ► Accès à des paramètres globaux de structure

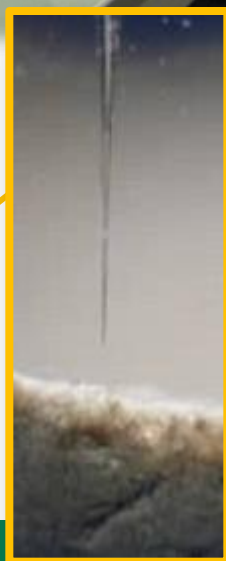
- Analyse d'image nécessaire
- Suivi dynamique
- Comparaisons d'images



# Les microélectrodes pour caractériser le biofilm

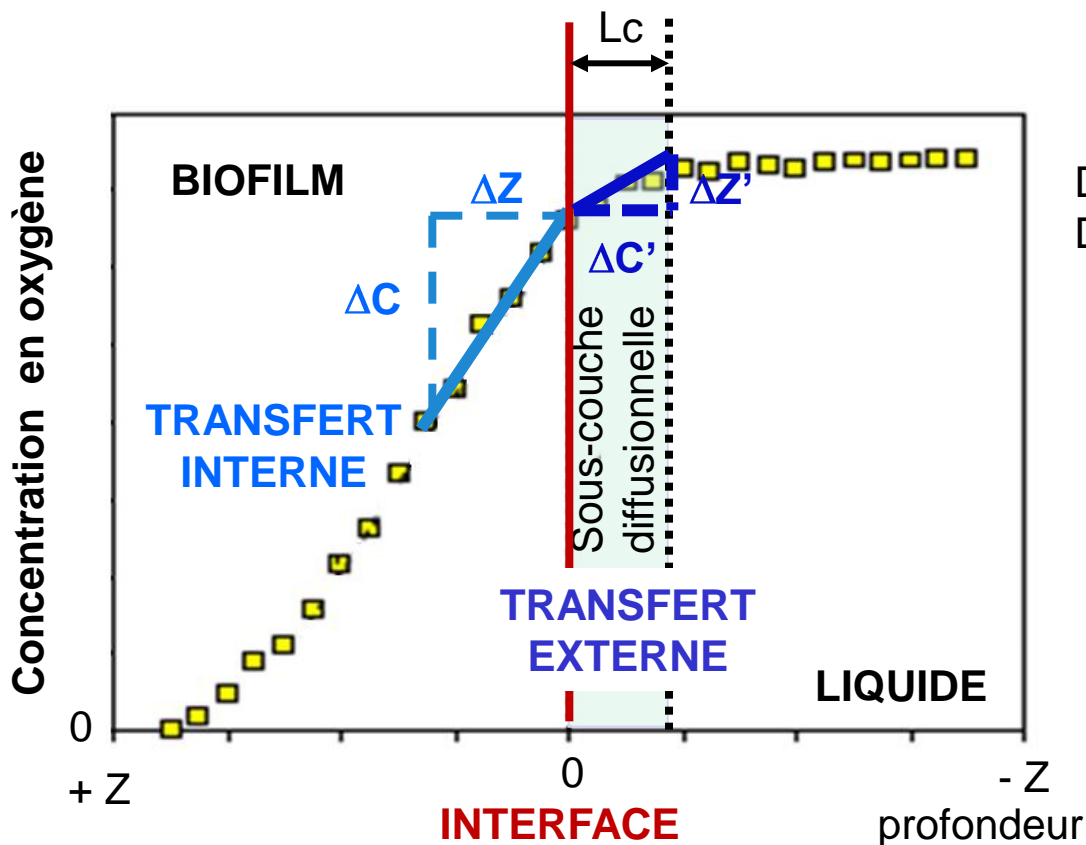


- Conditions hydrodynamiques maîtrisées
- Conditions environnementales maîtrisées (T C, milieu, oxygénation,...)
- Répétitions de profils sur un même échantillon





# Caractérisation de la porosité moyenne d'un biofilm



$D$  : coefficient de diffusion dans le liquide  
 $D_f$  : coefficient de diffusion dans le biofilm

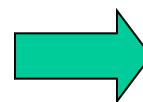
Transfert Externe

$$j_{\text{externe}} = -D \left( \frac{dc}{dz} \right)_{\text{externe}}$$



Transfert Interne

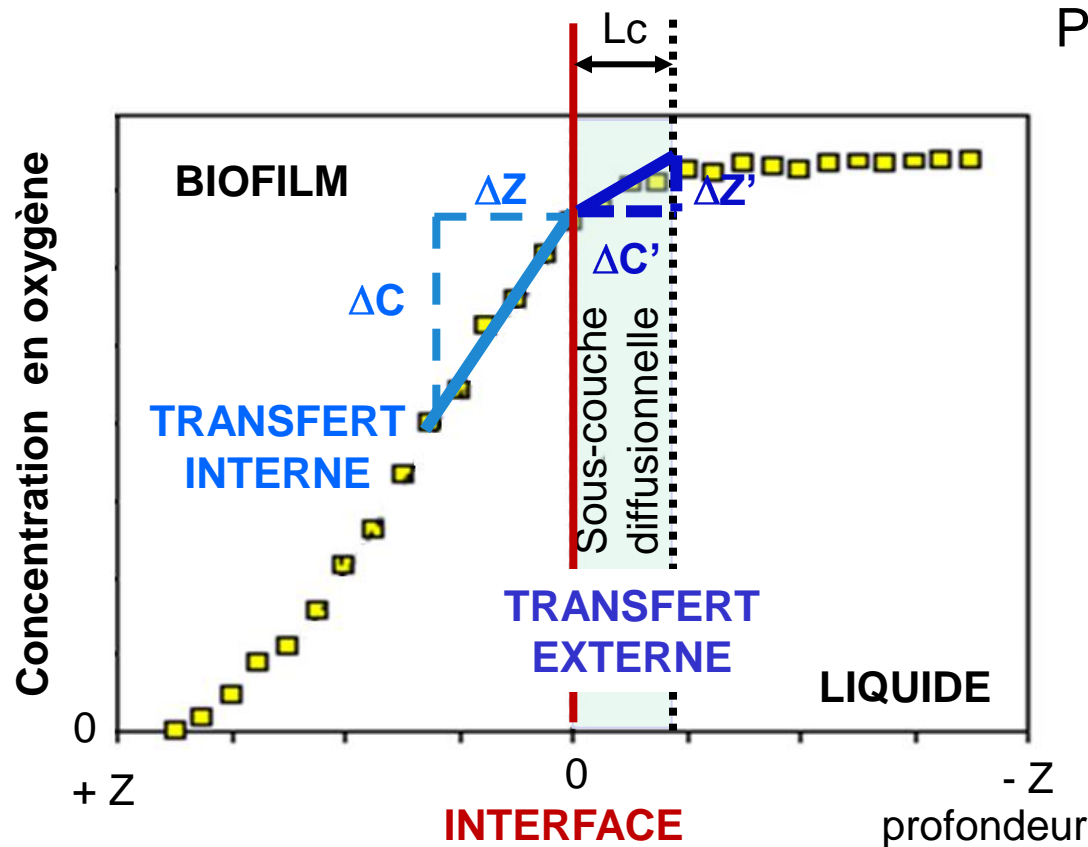
$$j_{\text{interne}} = -D_f \left( \frac{dc}{dz} \right)_{\text{interne}}$$



$$j_{\text{interne}} = j_{\text{externe}}$$

interface **BIOFILM / LIQUIDE**

# Caractérisation de la porosité moyenne d'un biofilm



Pentes caractéristiques de chaque profil (Horn et Morgenroth (2006))

**Interface  
BIOFILM /  
LIQUIDE**

$$\frac{D_f}{D} = \frac{\left(\frac{dc}{dz}\right)_{\text{externe}}}{\left(\frac{dc}{dz}\right)_{\text{interne}}}$$

**Facteur de  
diffusion ( $f_D$ )**

$$\frac{D_f}{D} = f_D$$

**Information sur la structure  
du biofilm**



**Porosité du  
biofilm**

$$\theta = \sqrt[3]{f_D}$$

- Notions générales sur les biofilms
- Les biofilms dans les procédés de traitement
- Outils mis en œuvre pour étudier les biofilms
- **Illustrations de résultats de recherches**

**Influence de l'hydrodynamique sur la structure des communautés microbiennes d'un biofilm**

**Mise en évidence de la stratification des communautés microbiennes**

**Evolution de la diversité au cours de la maturation d'un biofilm**

**Dynamique des populations dans un biofilm nitrifiant**

**Etude de la compétition biofilm/bactéries planctoniques**

## Influence de l'hydrodynamique sur la structure des communautés microbiennes d'un biofilm

Mise en évidence de la stratification des communautés microbiennes

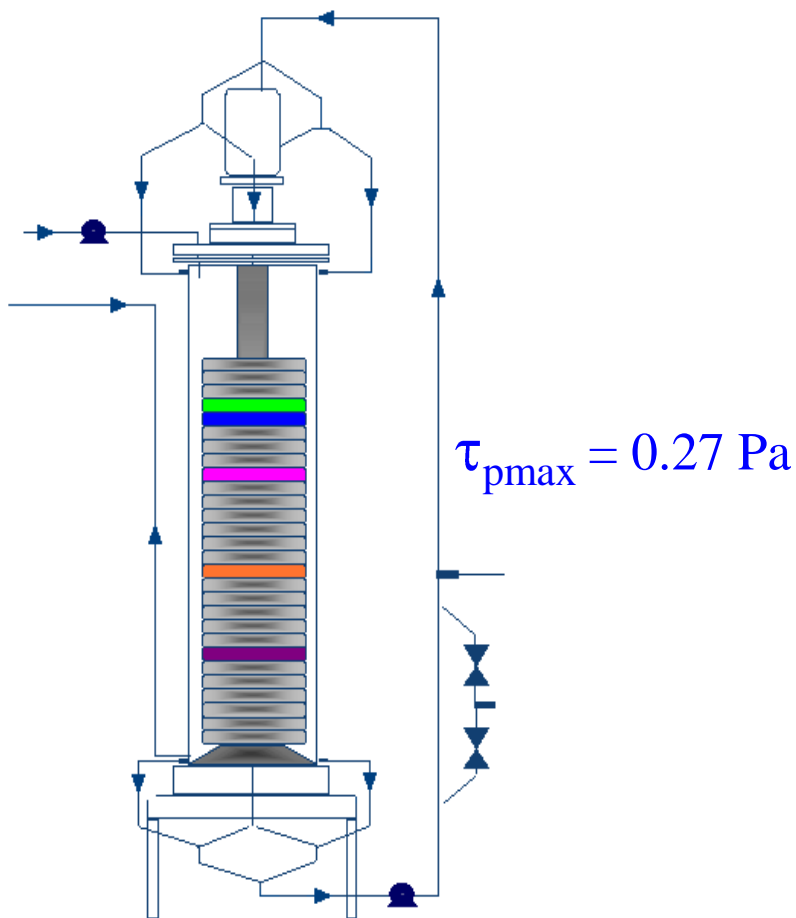
Evolution de la diversité au cours de la maturation d'un biofilm

Dynamique des populations dans un biofilm nitrifiant

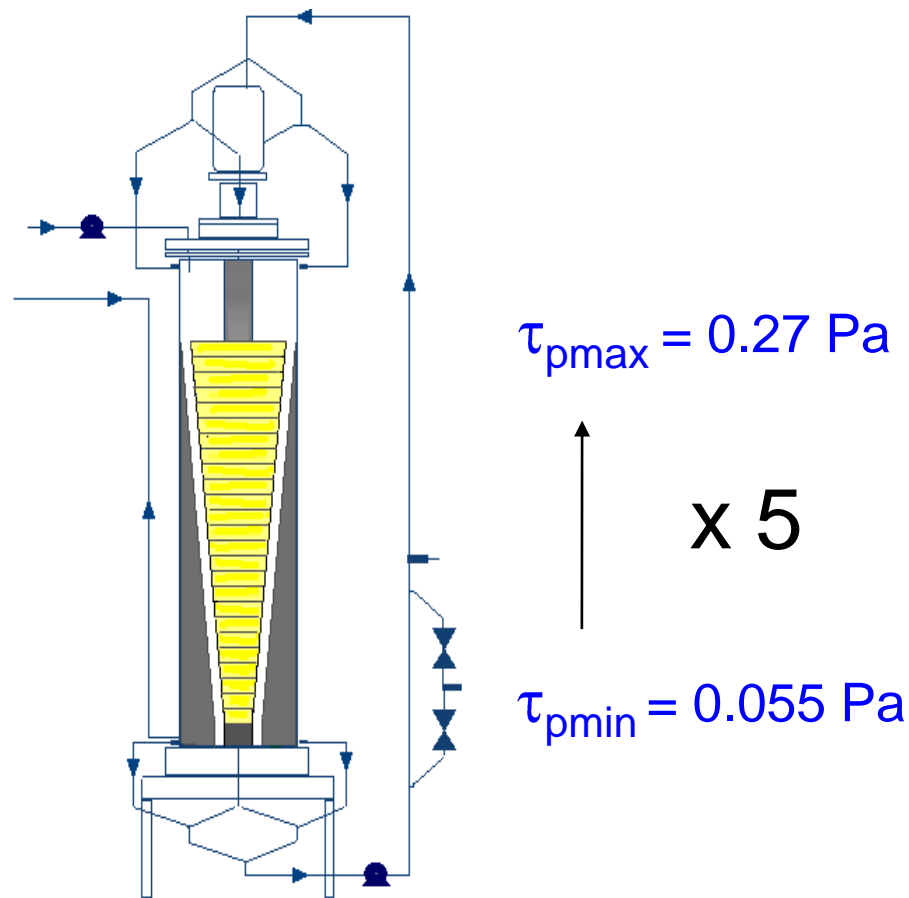
Etude de la compétition biofilm/bactéries planctoniques

## ► Dispositif expérimental:

Témoin : Réacteur de Couette Taylor

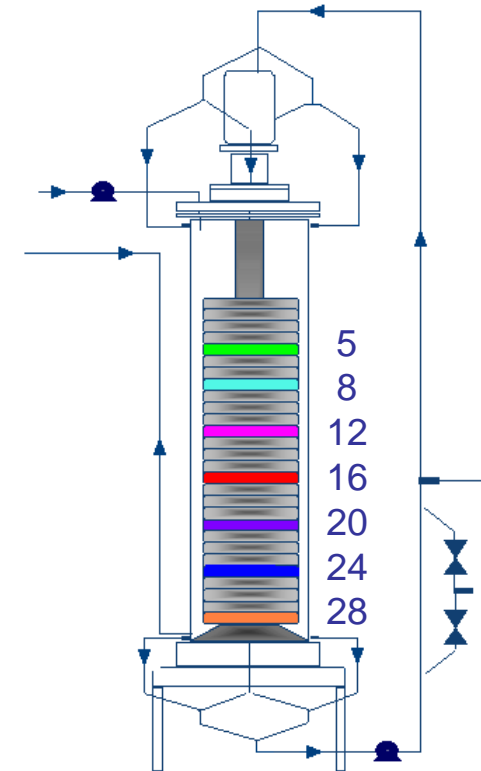
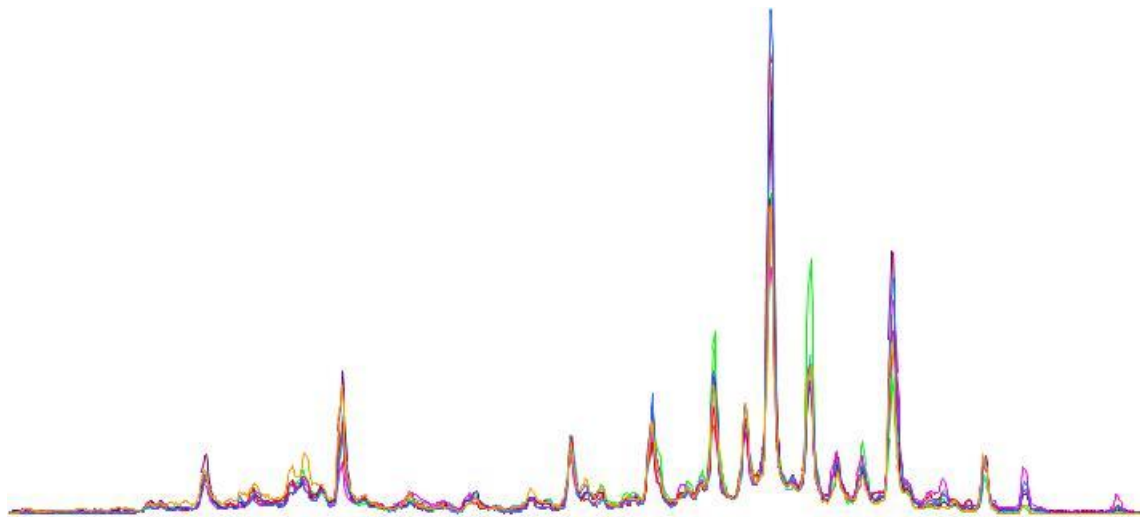


Réacteur modifié : gradient de cisaillement



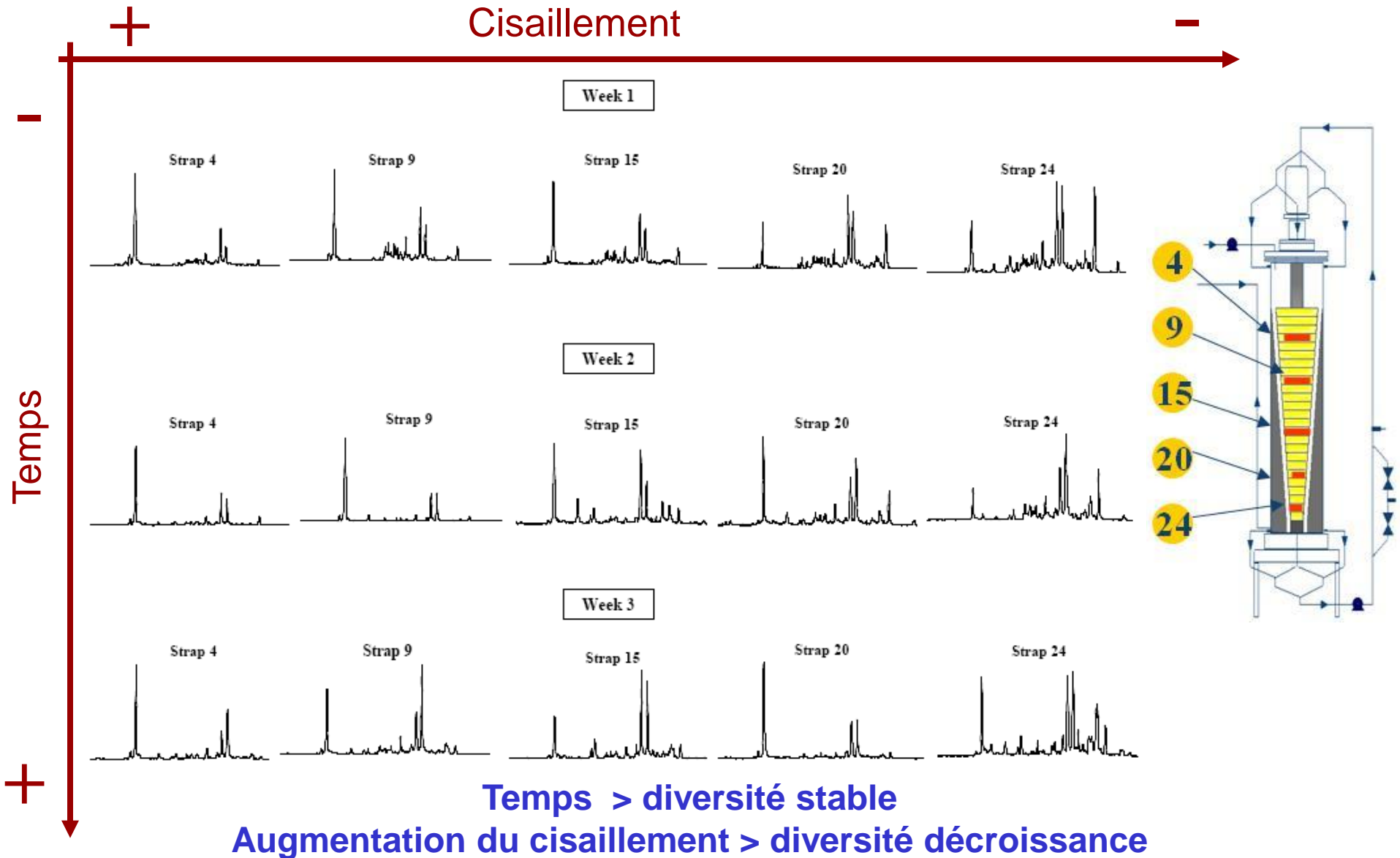
## ► Résultats expérimentaux:

Profils SSCP de biofilms (20 jours)



Les communautés bactériennes du biofilm sont homogènes dans le réacteur





Influence de l'hydrodynamique sur la structure des communautés microbiennes d'un biofilm

**Mise en évidence de la stratification des communautés microbiennes**

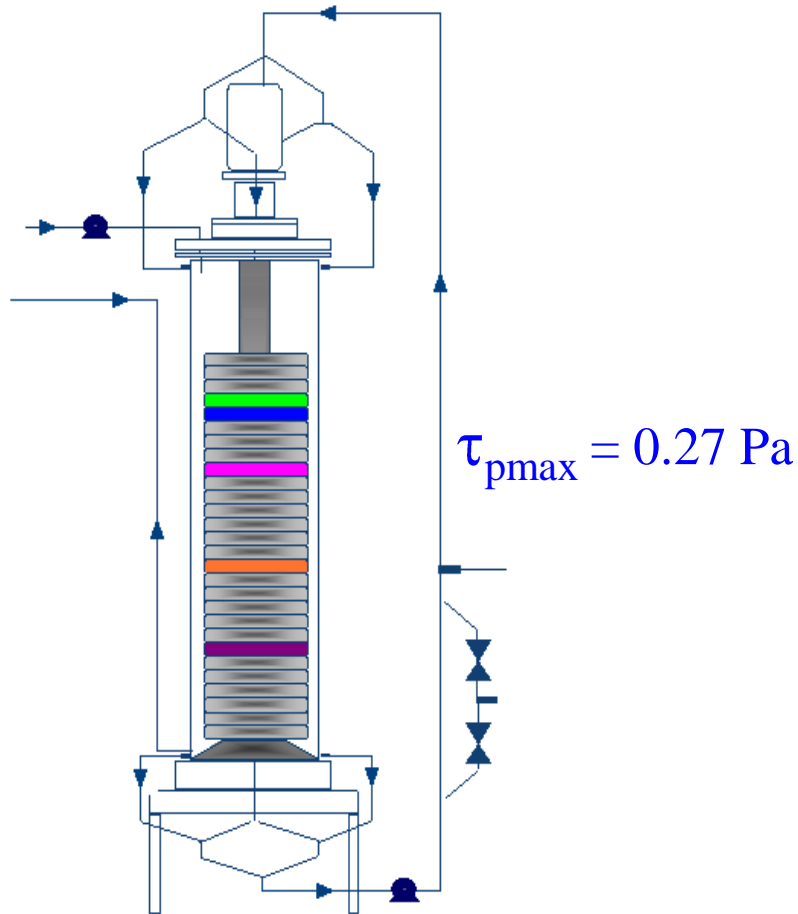
Evolution de la diversité au cours de la maturation d'un biofilm

Dynamique des populations dans un biofilm nitrifiant

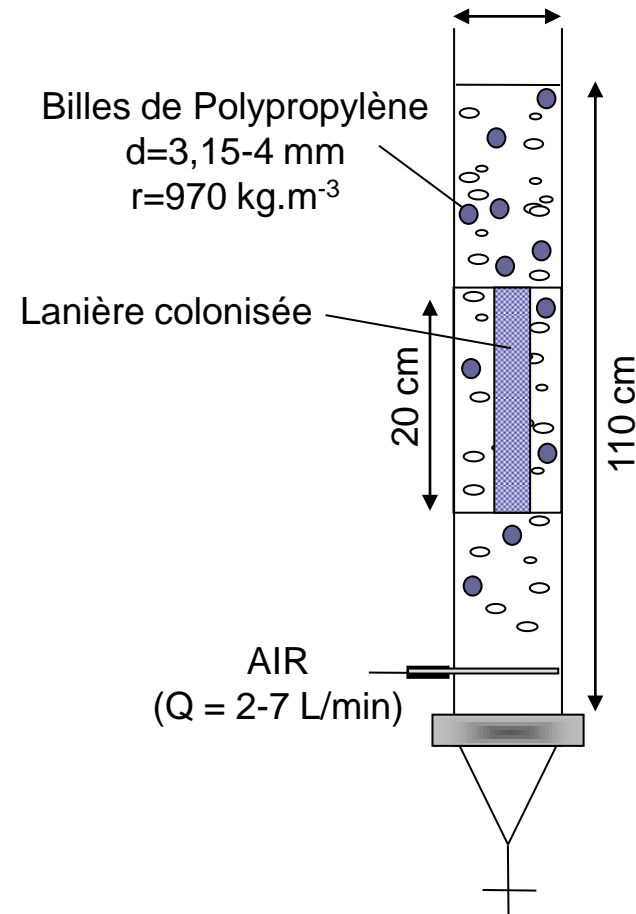
Etude de la compétition biofilm/bactéries planctoniques

## ► Dispositif expérimental:

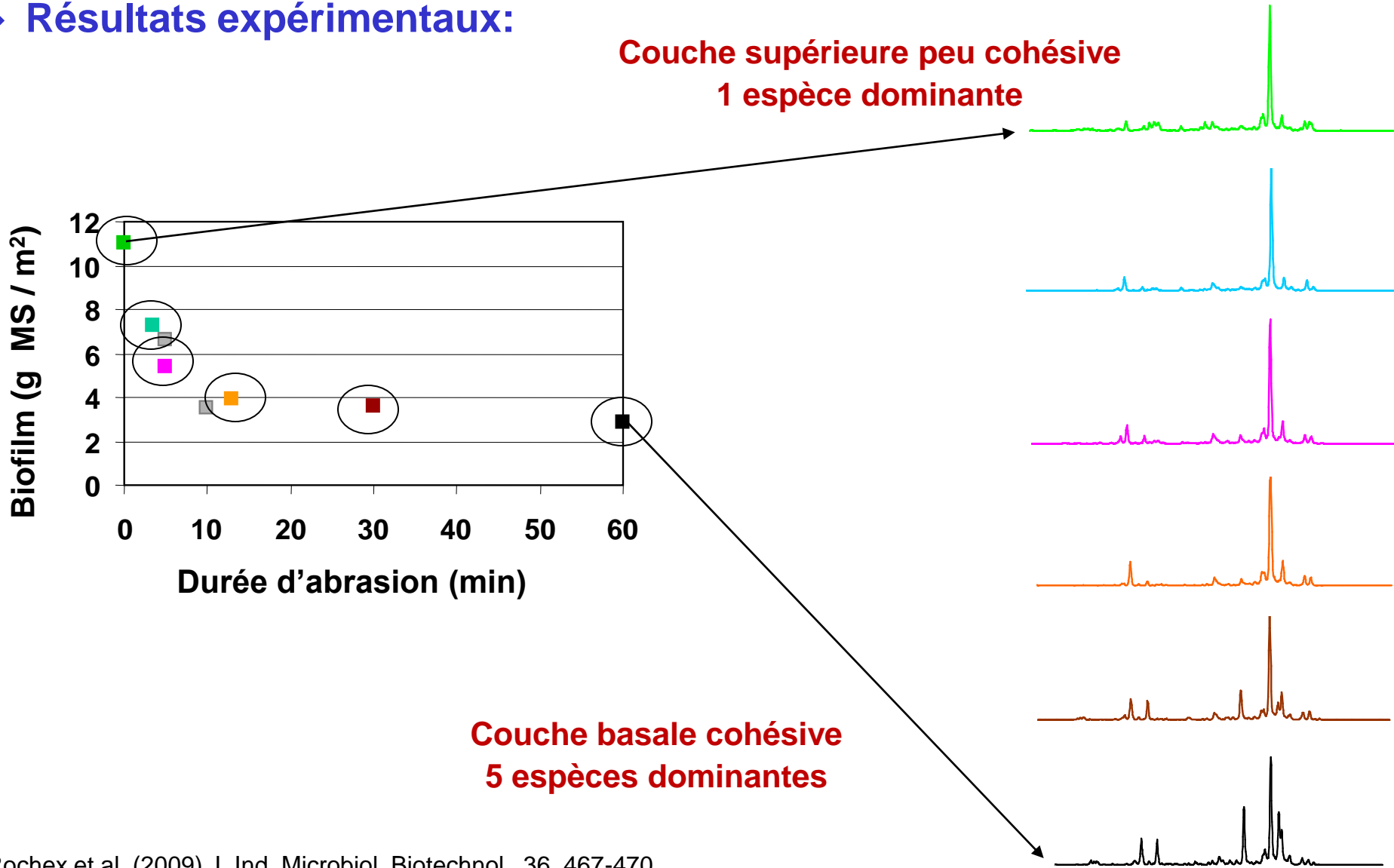
Réacteur de Couette Taylor

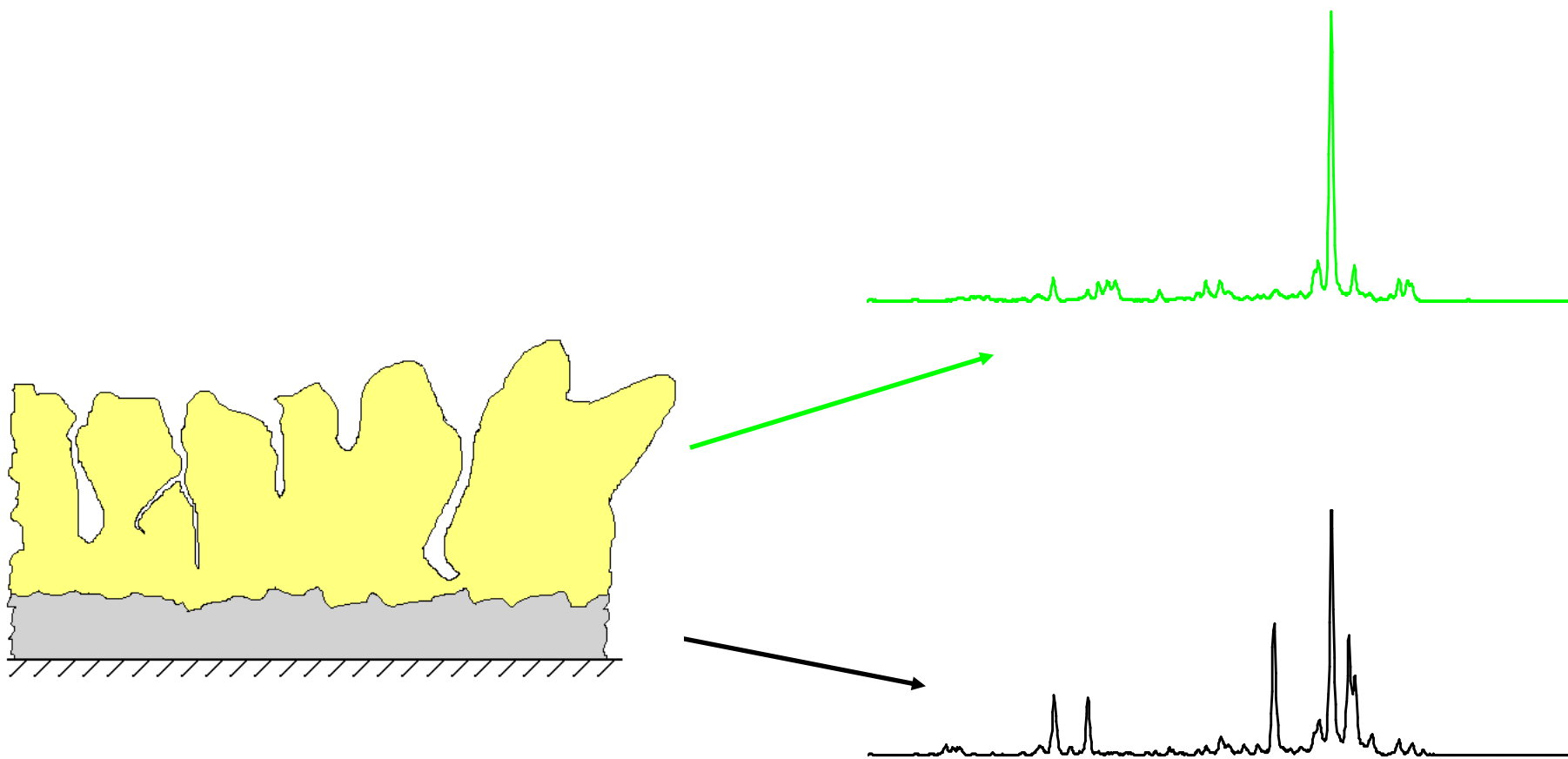


Réacteur d'érosion



## ► Résultats expérimentaux:





Influence de l'hydrodynamique sur la structure des communautés microbiennes d'un biofilm

Mise en évidence de la stratification des communautés microbiennes

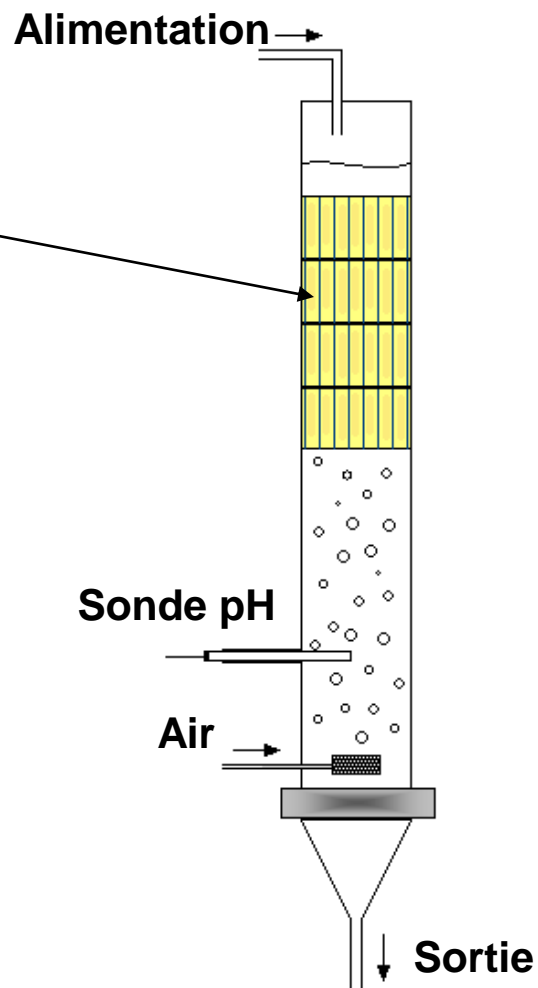
**Evolution de la diversité au cours de la maturation d'un biofilm**

Dynamique des populations dans un biofilm nitrifiant

Etude de la compétition biofilm/bactéries planctoniques

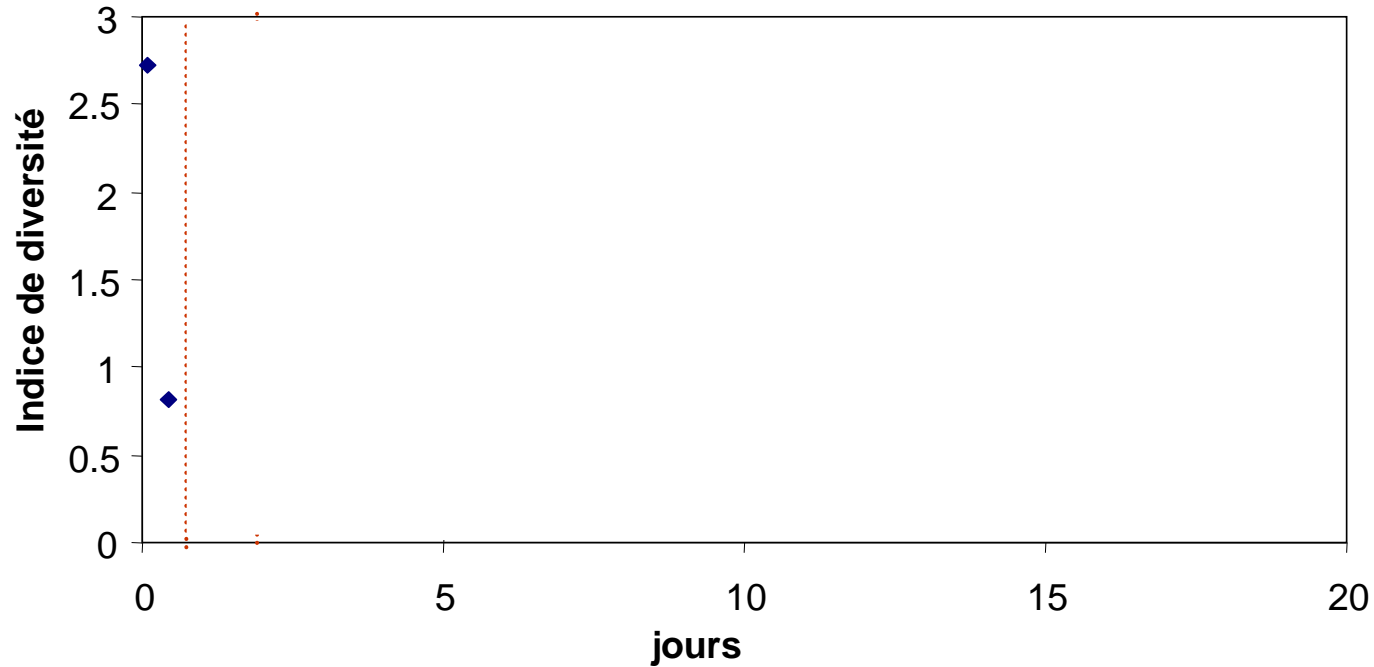
► Dispositif expérimental:

Prélèvement de coupons  
à intervalles réguliers



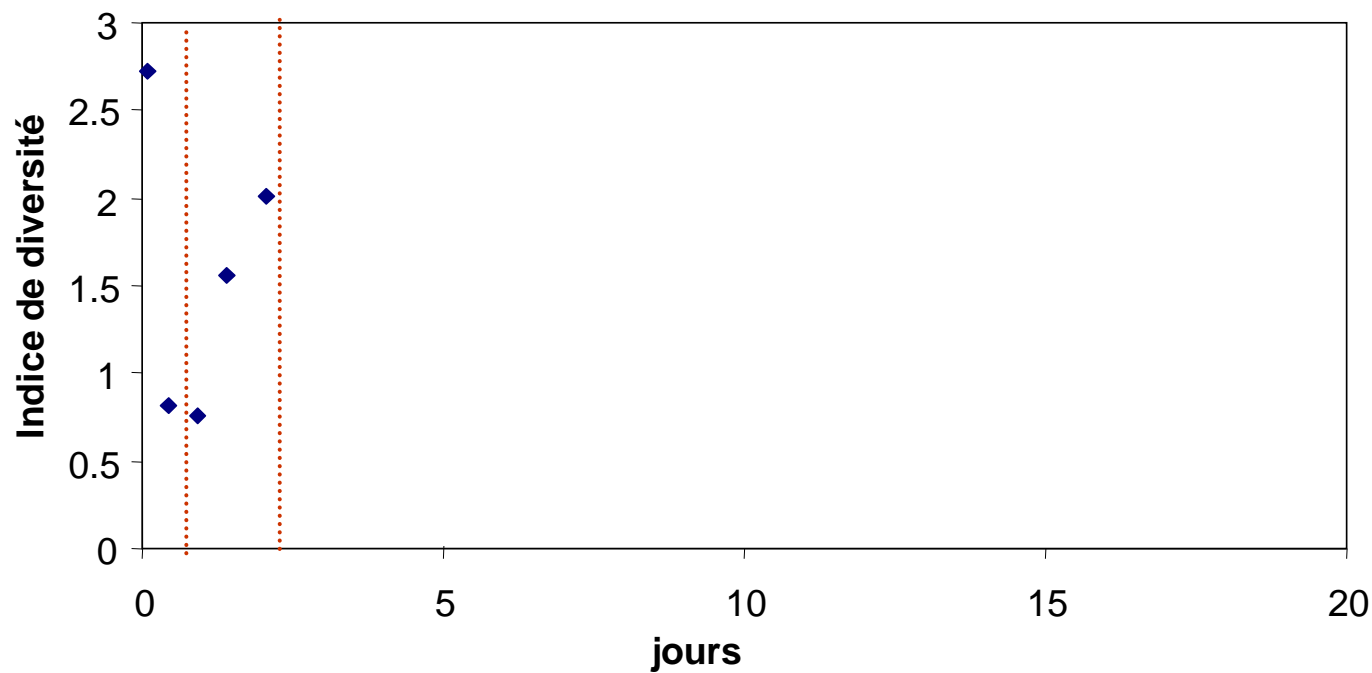


## ► Résultats expérimentaux:



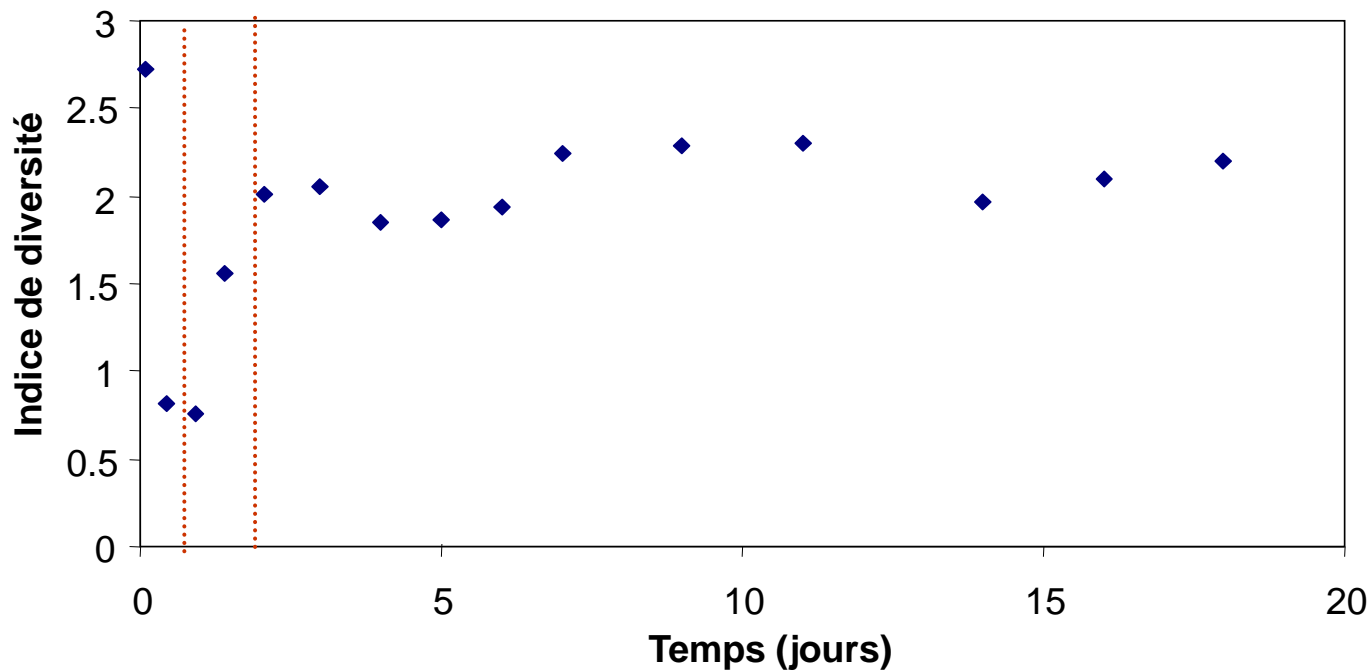
inoculation

## ► Résultats expérimentaux:



inoculation    croissance

## ► Résultats expérimentaux:



inoculation    croissance

maturation

**Diversité qui se stabilise assez rapidement**  
**Structure des communautés qui évolue dans le temps**

Influence de l'hydrodynamique sur la structure des communautés microbiennes d'un biofilm

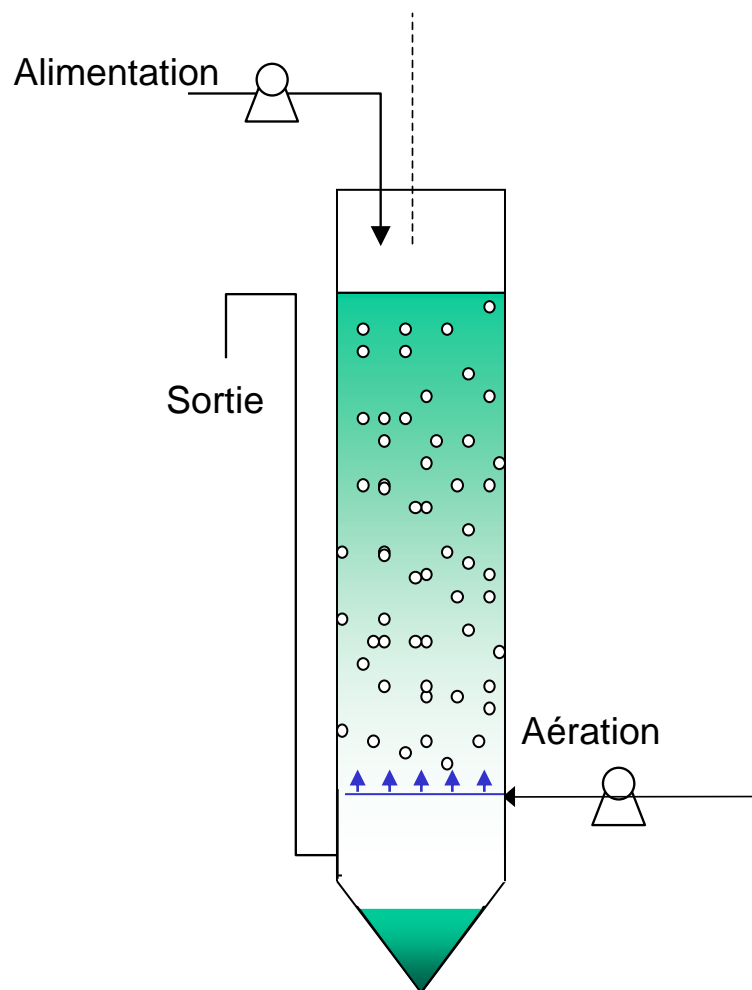
Mise en évidence de la stratification des communautés microbiennes

Evolution de la diversité au cours de la maturation d'un biofilm

**Dynamique des populations dans un biofilm nitrifiant**

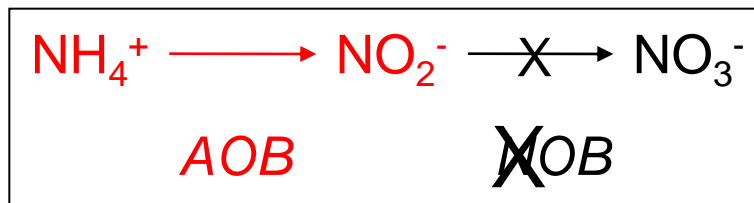
Etude de la compétition biofilm/bactéries planctoniques

## ► Dispositif expérimental: Lit Triphasique Inverse

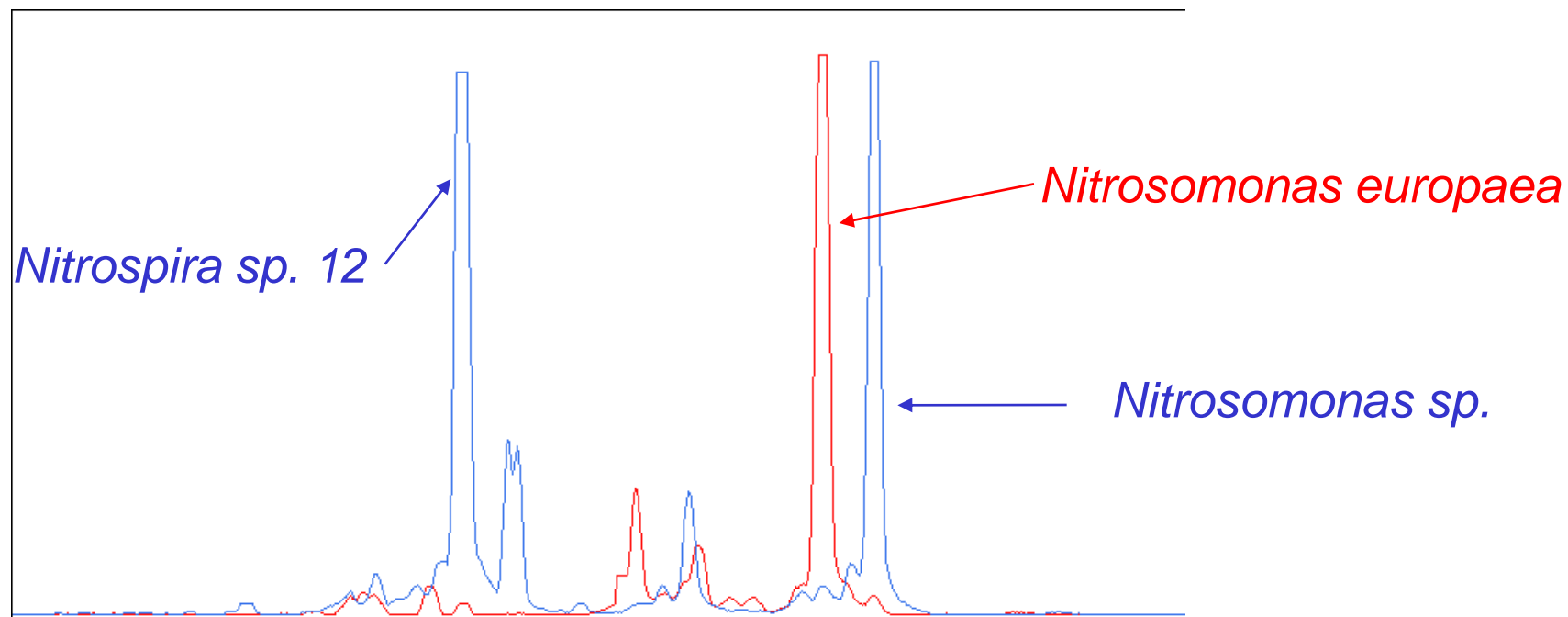
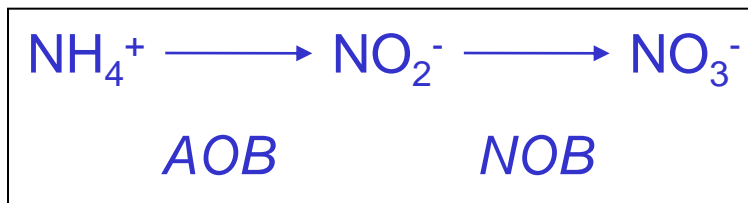


- Volume : 1,35 L
- Support: Extendosphere™  
Particules minérales sphériques  
 $d_p = 150 \mu\text{m}$ ,  $\rho_s = 690 \text{ kg.m}^{-3}$
- Aération / mélange
- Inoculation avec une boue activée nitrifiante
- Alimentation avec un milieu minéral (azote ammoniacal)

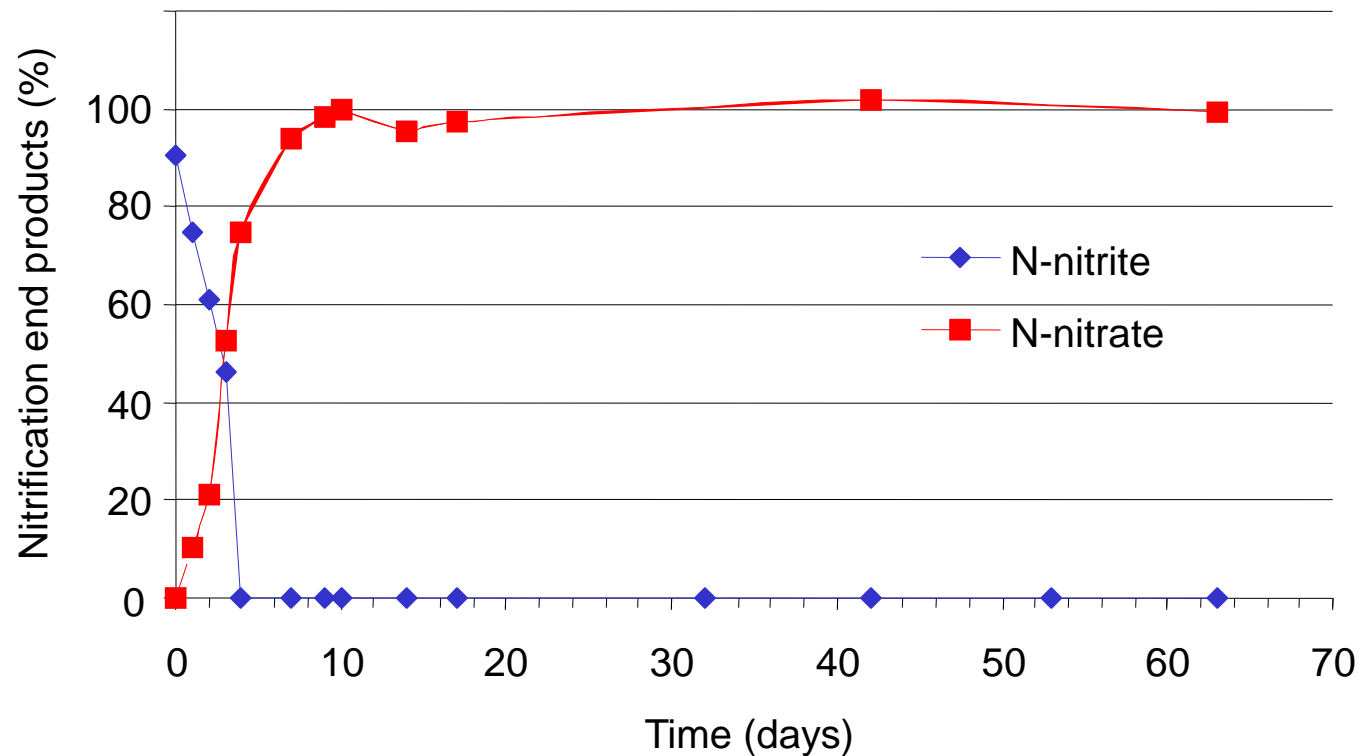
Reactor R<sub>30</sub>



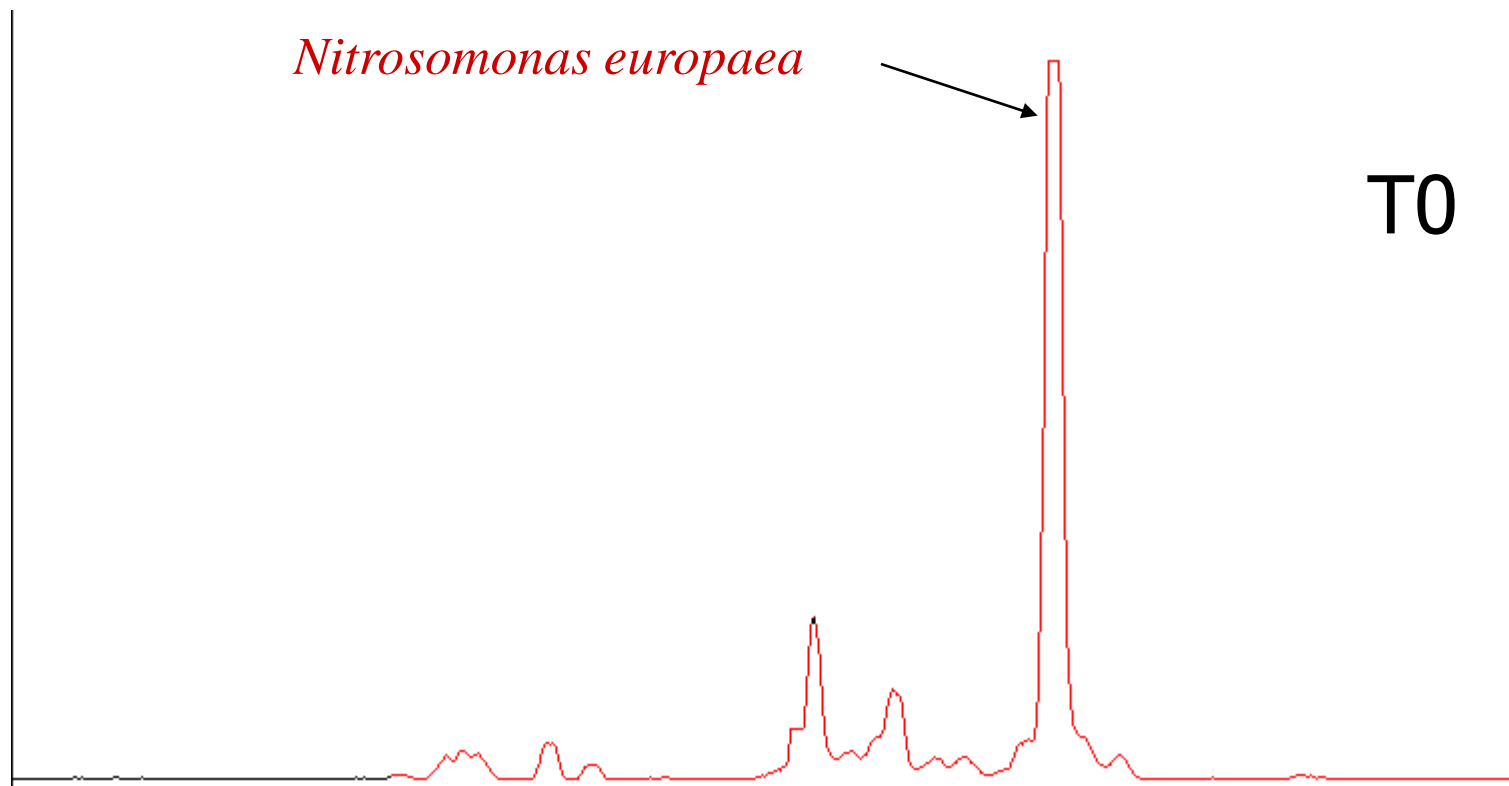
Reactor R<sub>10</sub>

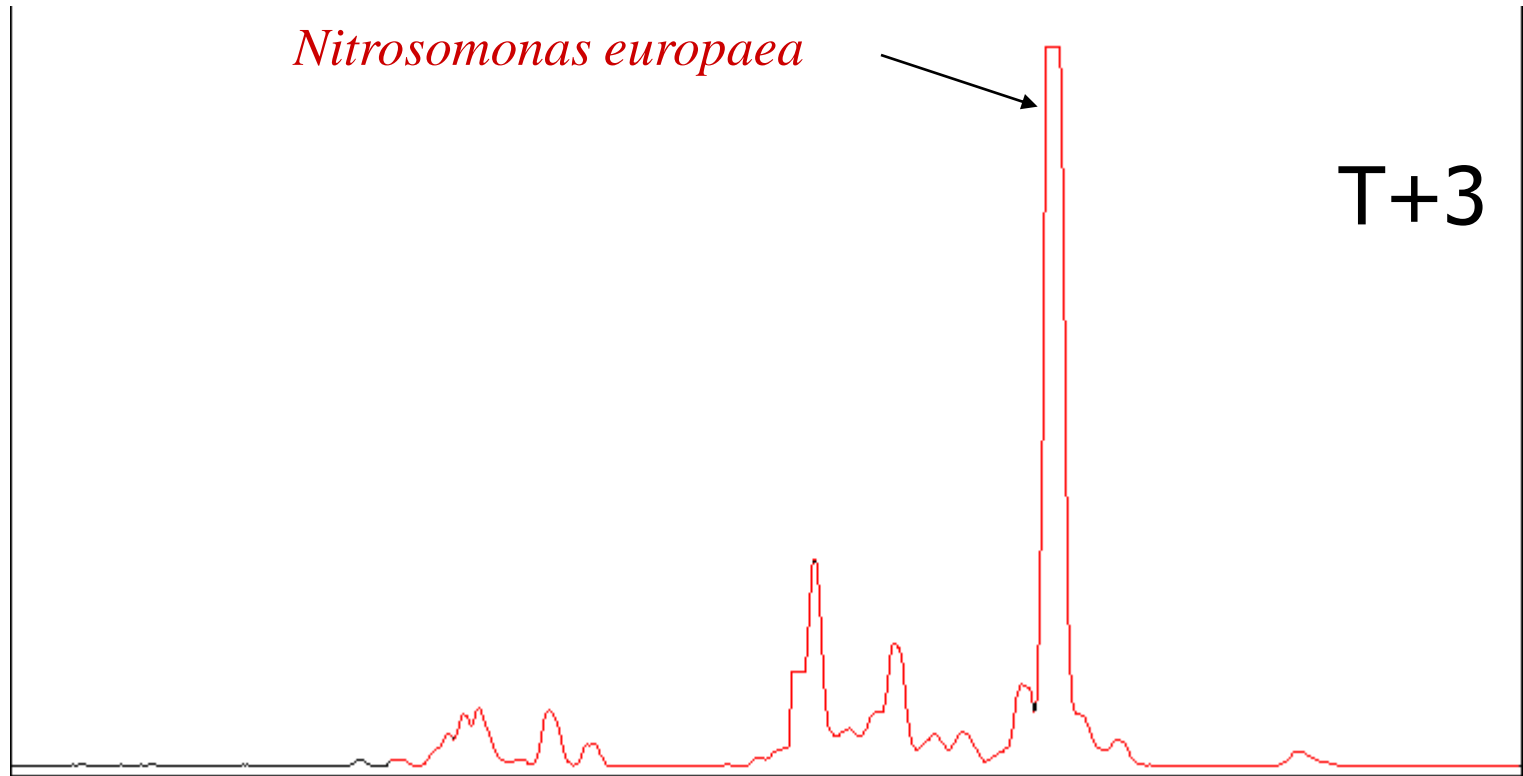


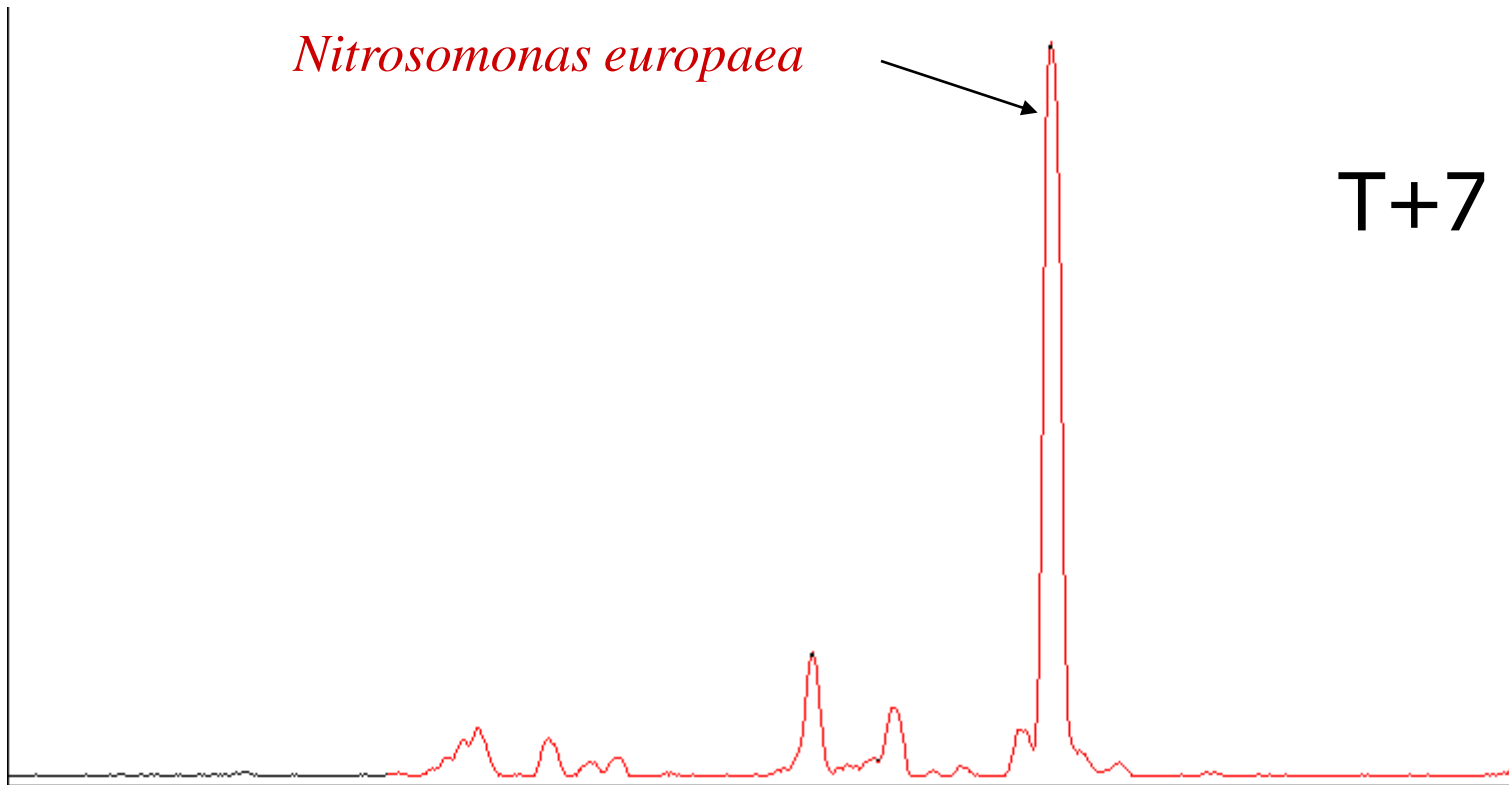
- Baisse de la charge en ammonium (0,4 g/L.d) dans R10
- Maintien d'un flux d'aération constant (30 L/h)

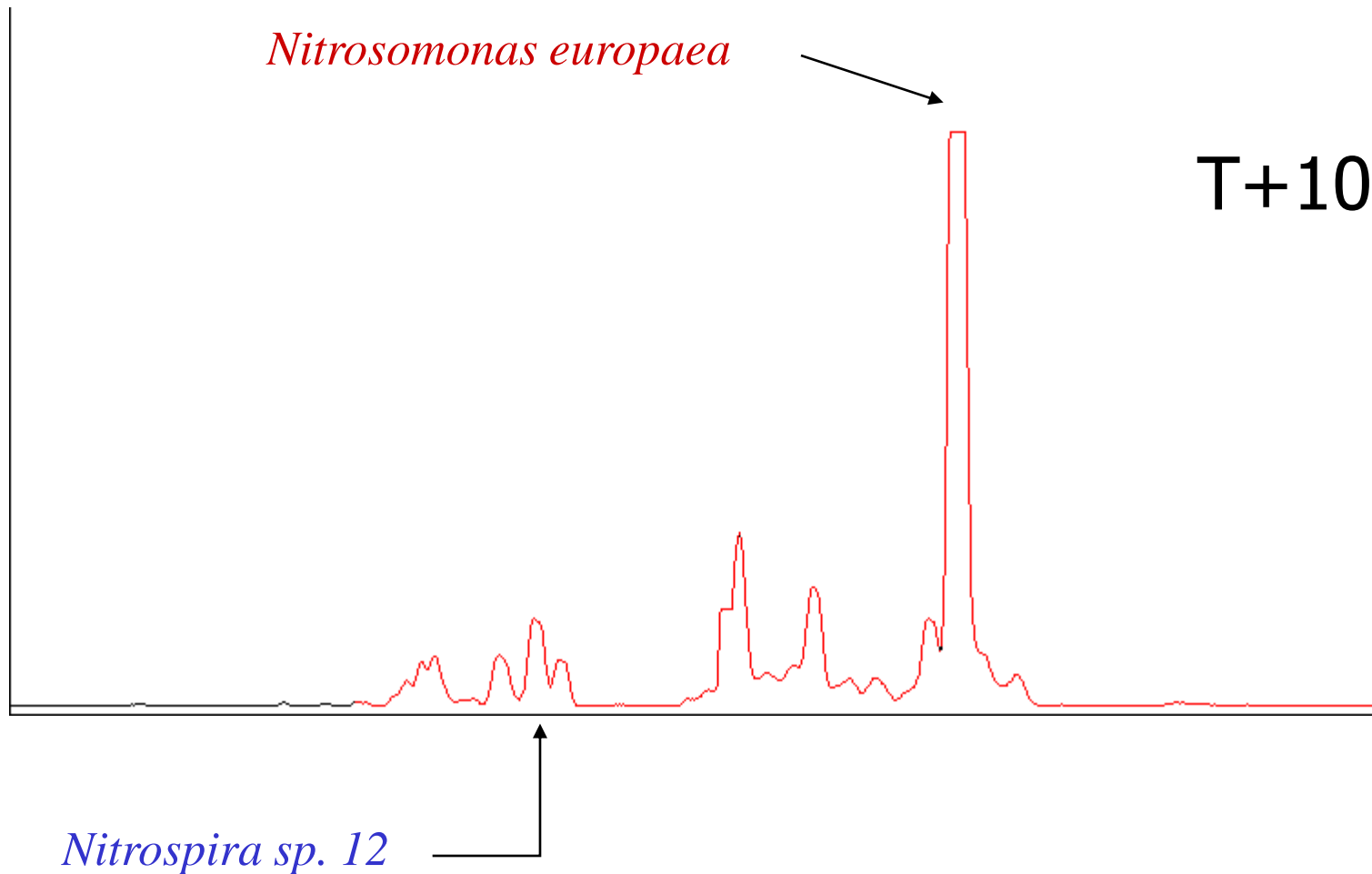


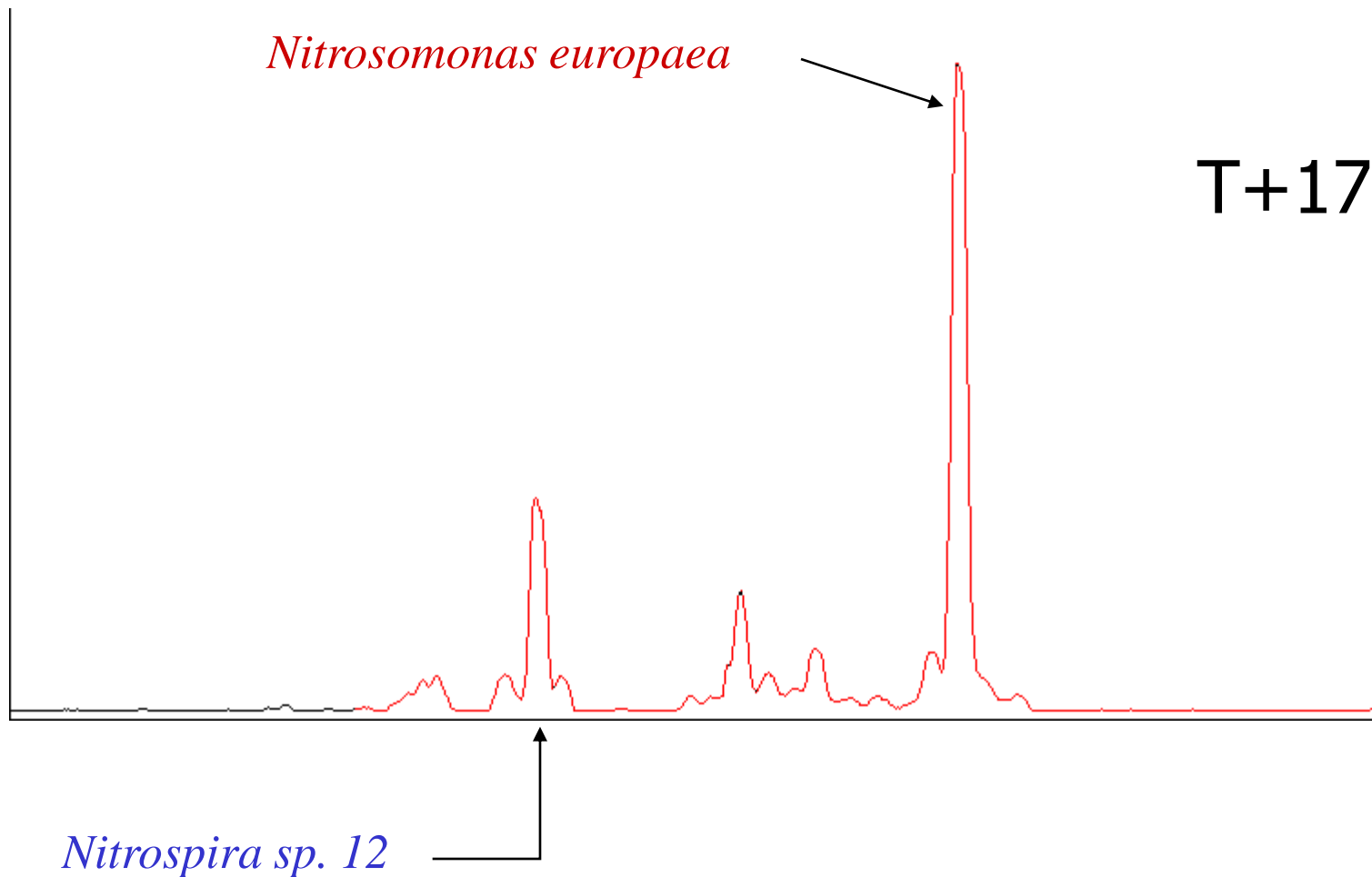


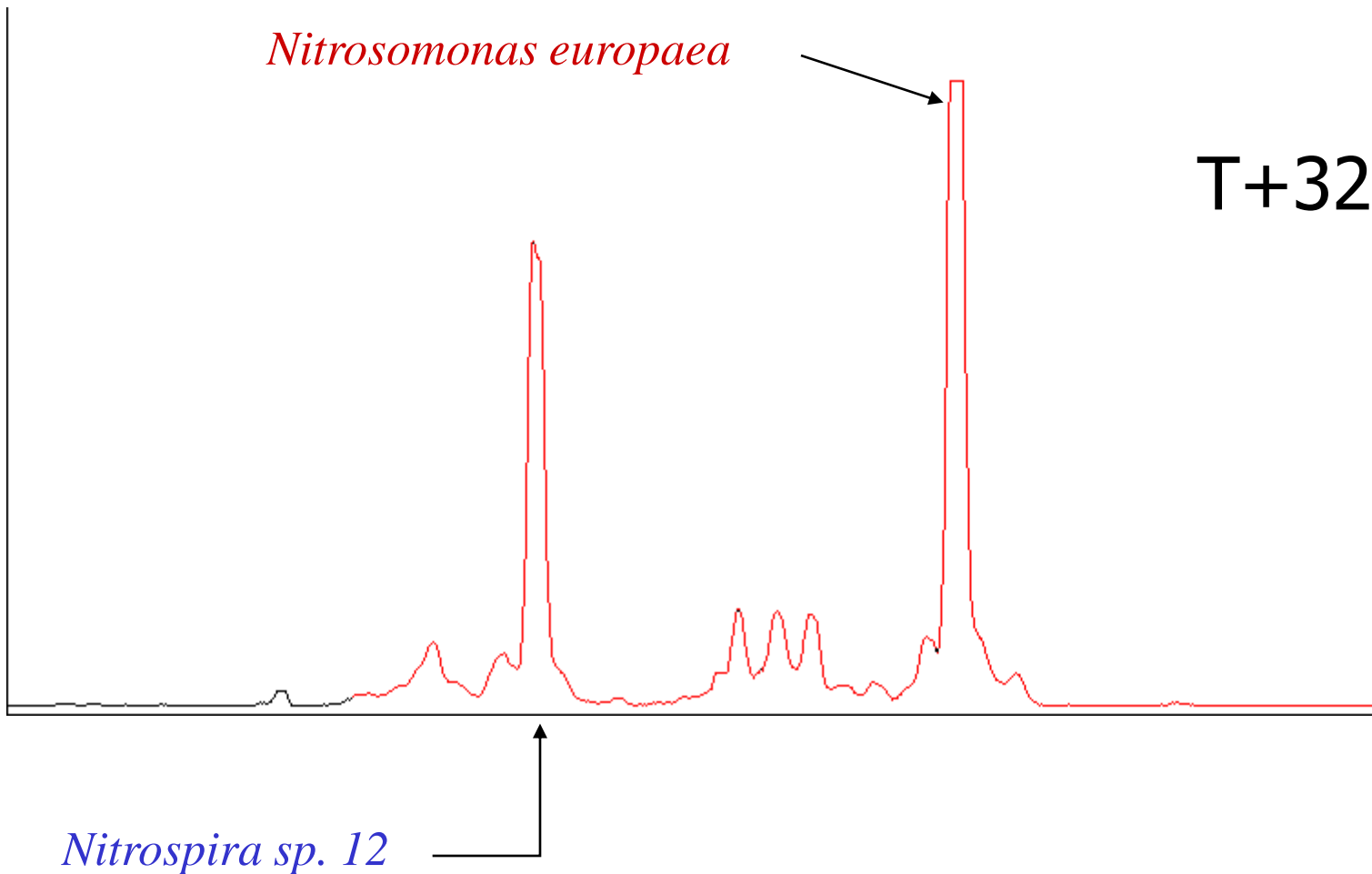


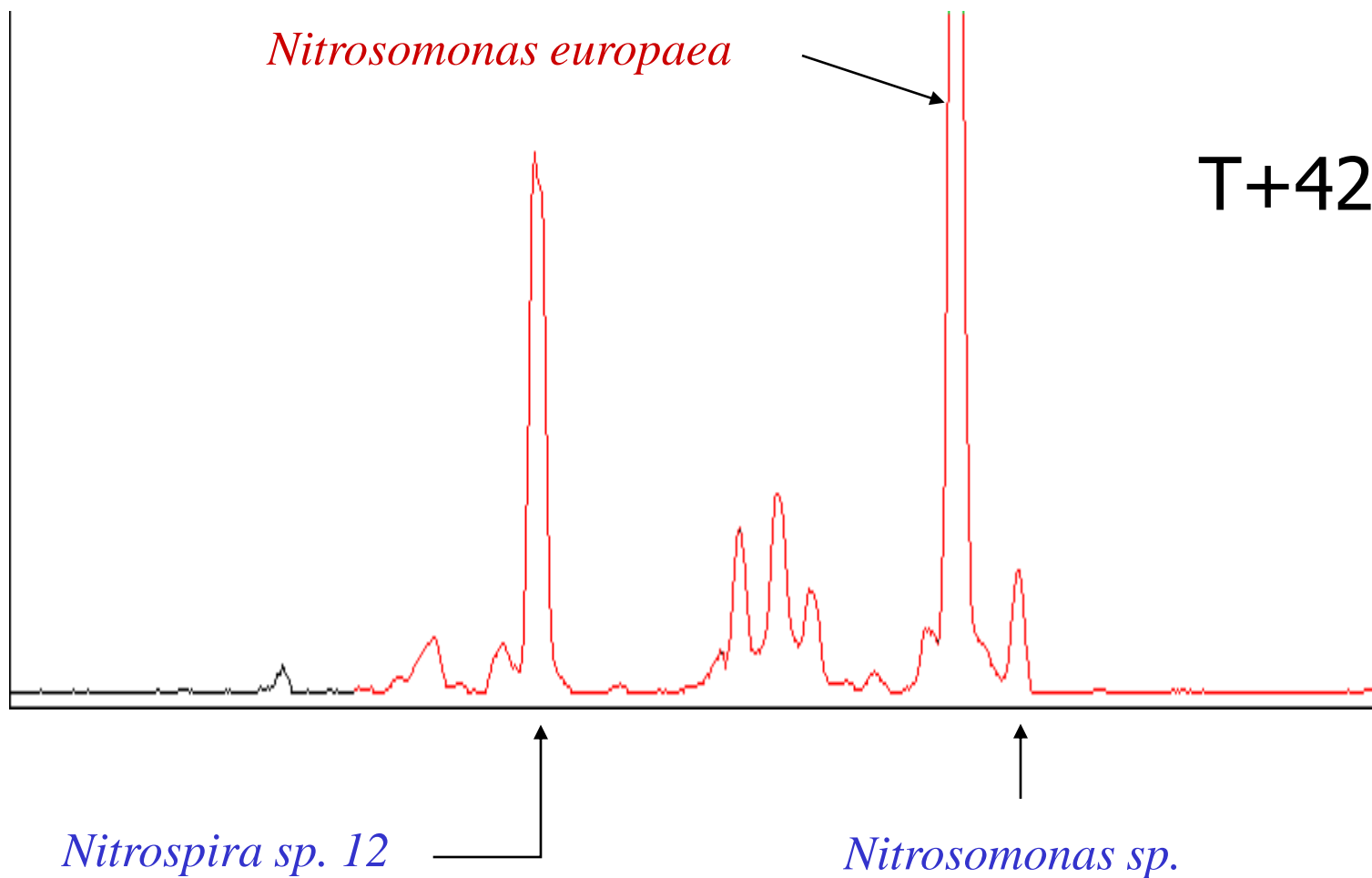




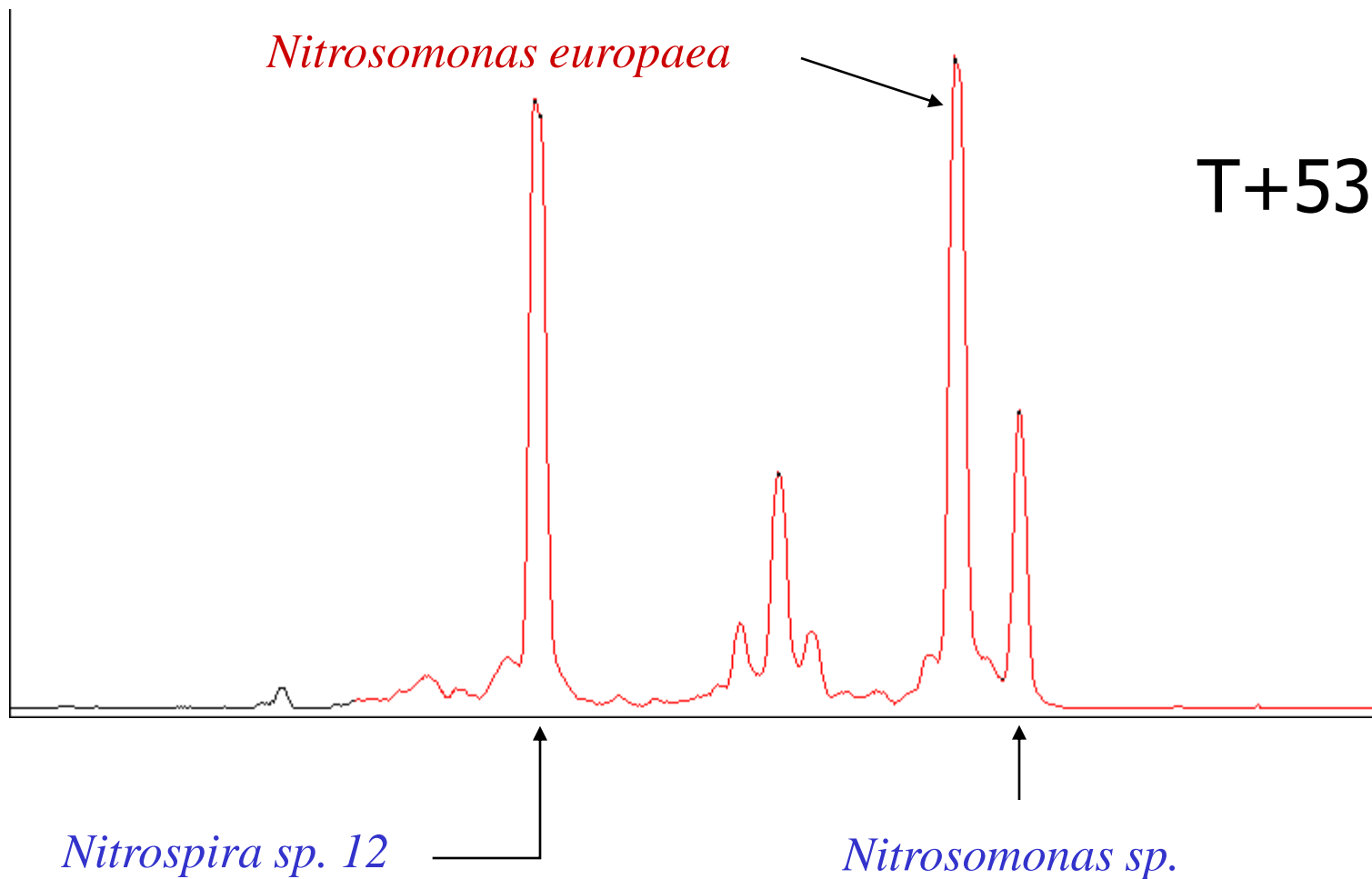


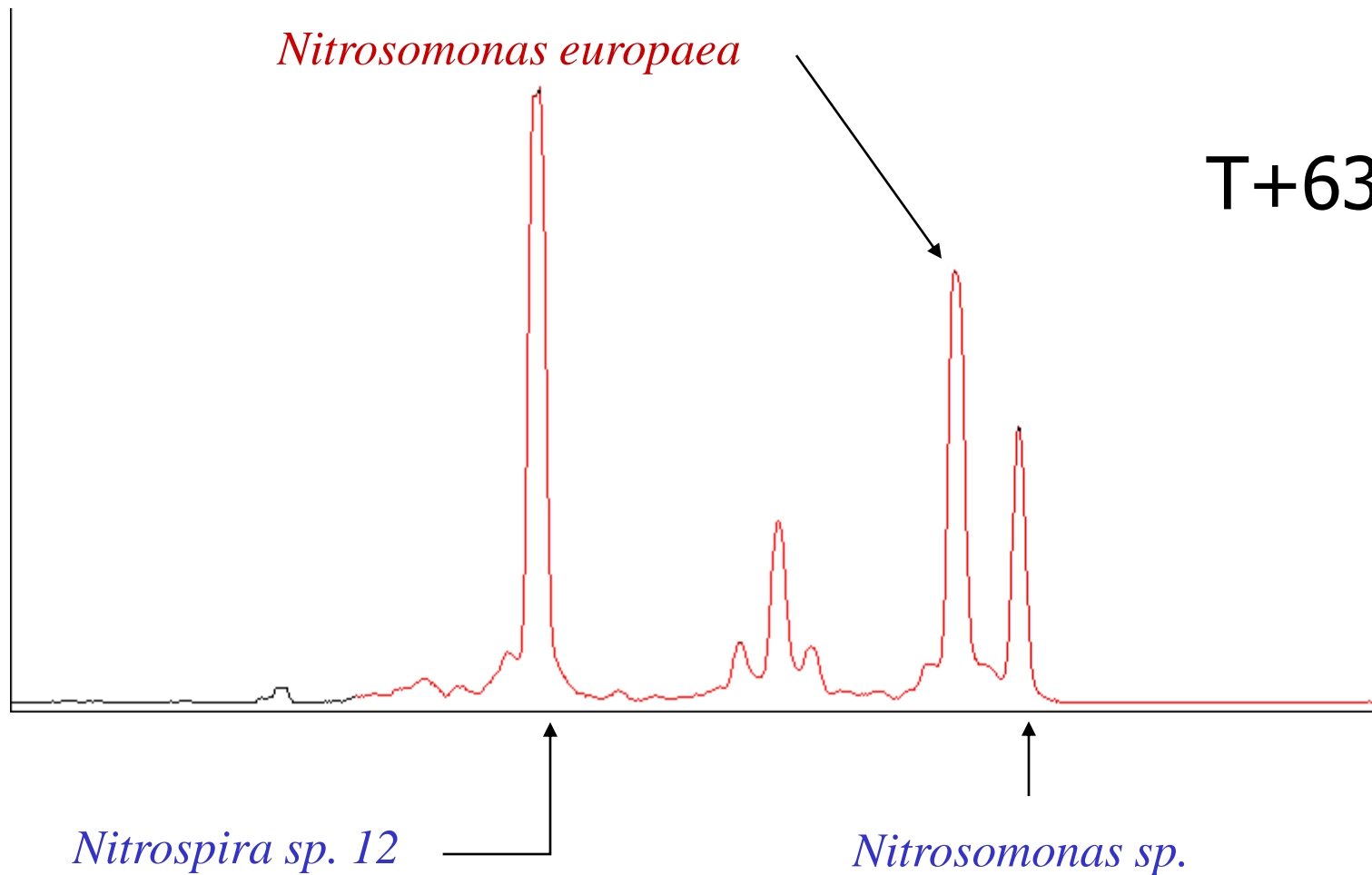


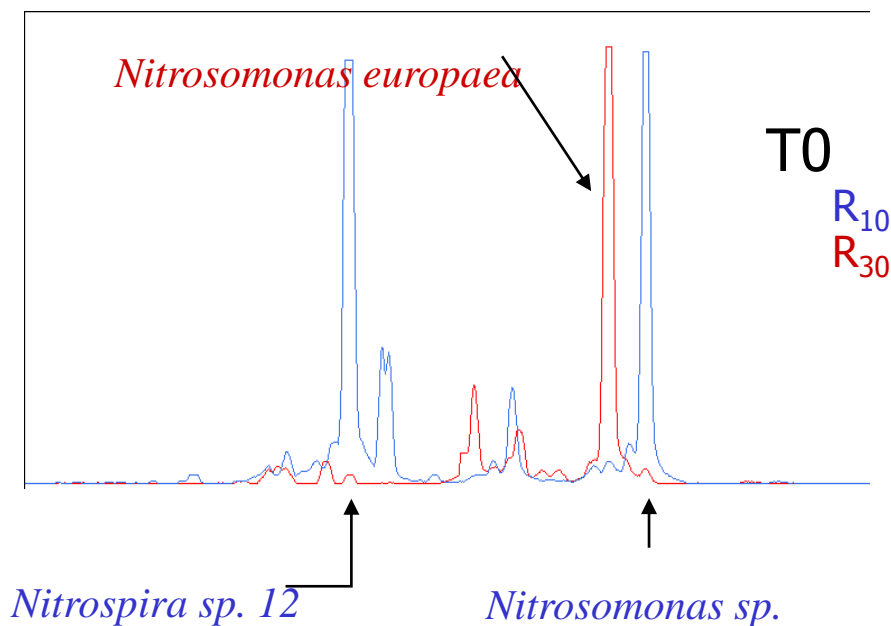
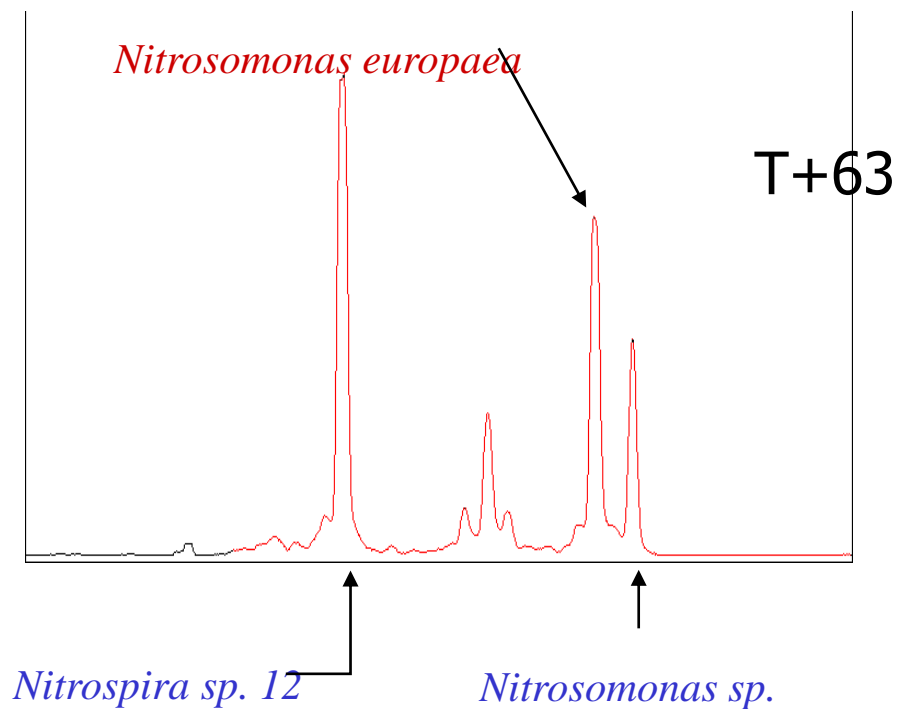












Influence de l'hydrodynamique sur la structure des communautés microbiennes d'un biofilm

Mise en évidence de la stratification des communautés microbiennes

Evolution de la diversité au cours de la maturation d'un biofilm

Dynamique des populations dans un biofilm nitrifiant

**Etude de la compétition biofilm/bactéries planctoniques**

Thèse de A Caylet

Liquide



Temps de séjour de  
la **biomasse**  
planctonique

=

Temps de Séjour  
Hydraulique  
(TSH)

<

Biofilm



Temps de séjour de  
la **biomasse**  
attachée

Fonctionnement en  
CHEMOSTAT ( $\delta = \mu$ )

## Objectifs:

- Caractériser l'impact du TSH sur le biofilm (structure)
- Caractériser la compétition entre les populations microbiennes

## ✓ Démarche

Culture du biofilm en réacteur permettant de contrôler les conditions environnementales



Suivi macroscopique

Suivi microbiologique

Bilan matière

Structure des communautés

←→  
**Modélisation**



✓ Inoculum papetier

✓ T = 45 C

✓ Aération

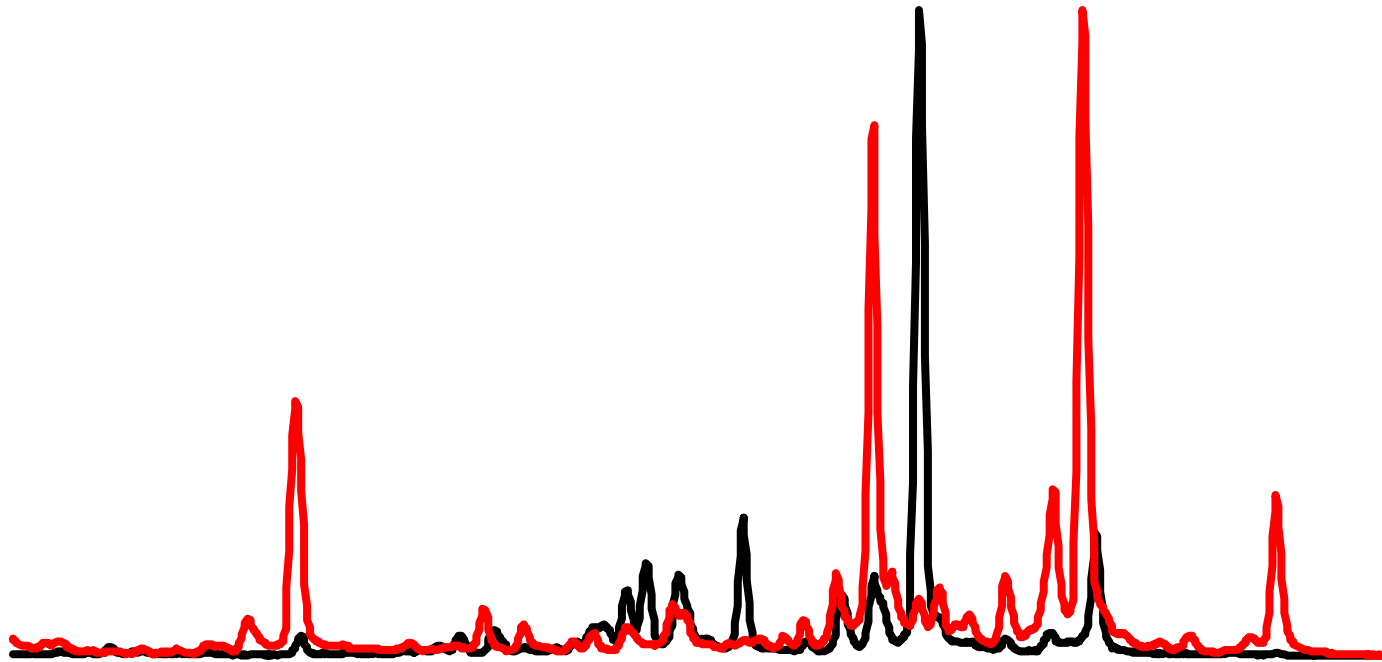
saturation en oxygène

✓ Charge fixe en glucose

$25 \text{ g}_{\text{DCO}} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{j}^{-1}$

✓ Durée : 42 jours

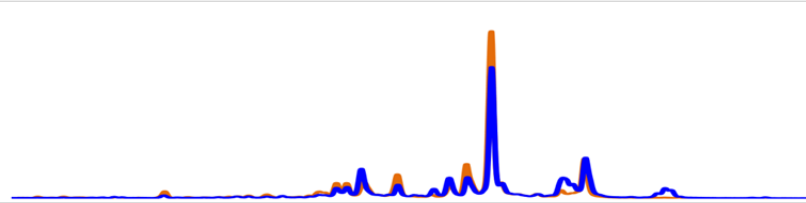
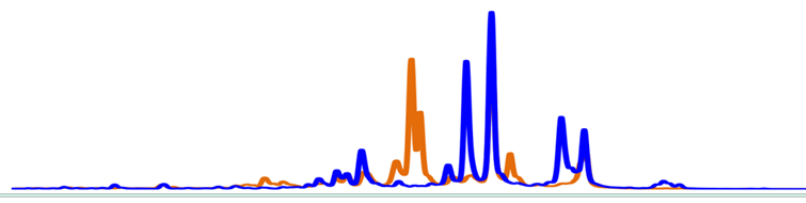
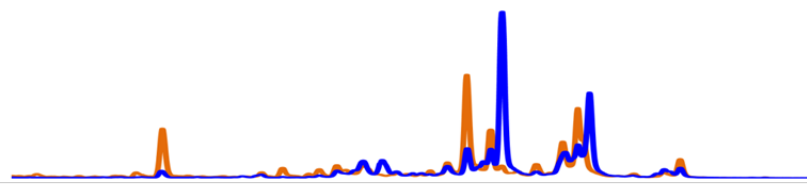
TSH (h)	Débit de substrat (L.h <sup>-1</sup> )	Débit d'eau de dilution (L.h <sup>-1</sup> )	Débit total (L.h <sup>-1</sup> )	[S <sub>0</sub> ] théorique (g <sub>DCO</sub> ·L <sup>-1</sup> )
<b>0,3</b>		3,88	4	<b>0,064</b>
<b>1</b>	0,12	1,08	1,2	<b>0,21</b>
<b>8</b>		<b>0,03</b>	<b>0,15</b>	<b>1,71</b>



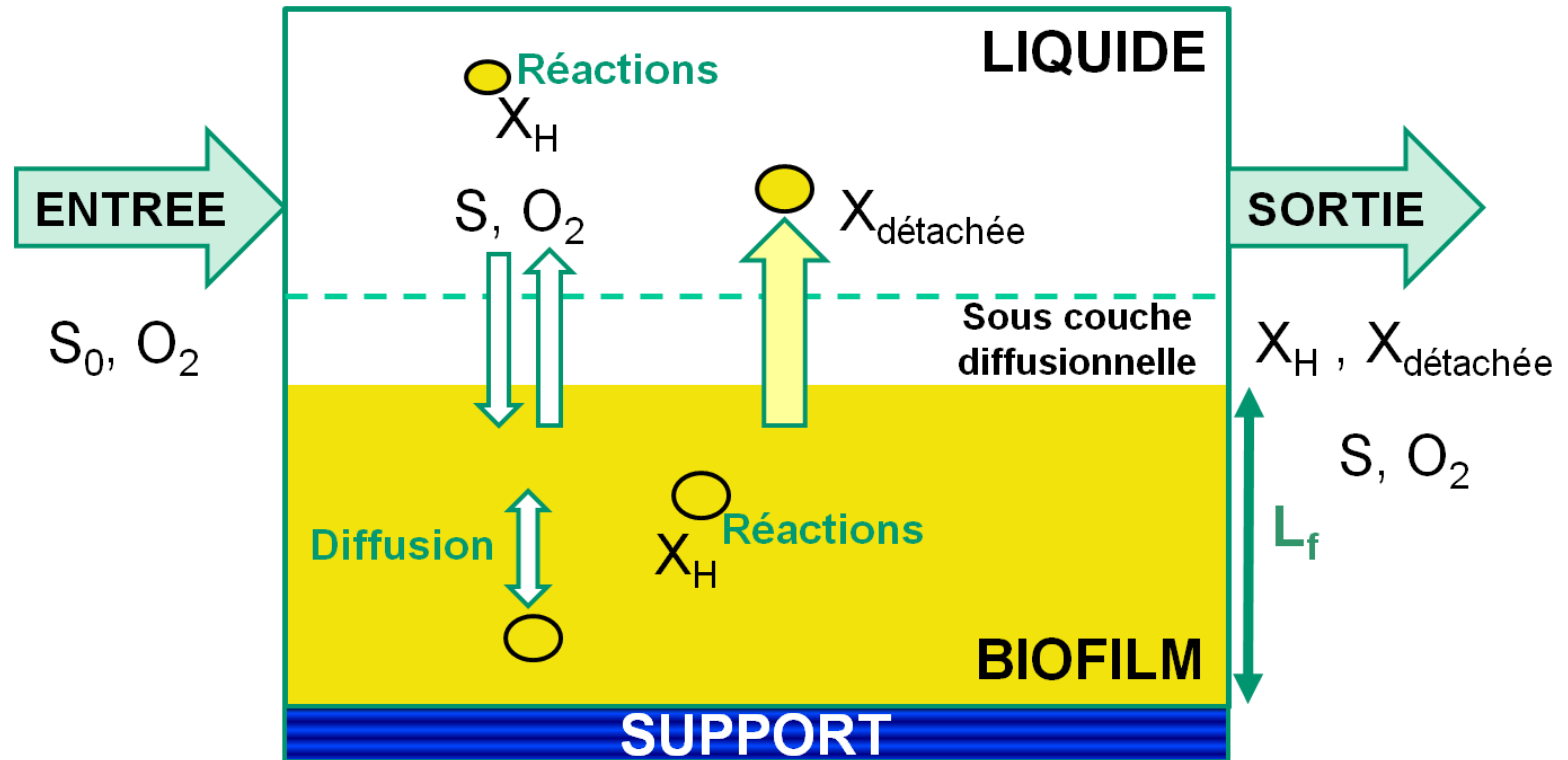
- Distances génétiques entre échantillons (ACP)
- Test des différences génétiques entre groupes d'échantillons (ANOSIM)



✓ Comparaison entre du liquide et du biofilm

TSH (h)	Profils moyens (6 semaines) Liquide / biofilm	ANOSIM (R)
0,3		0,04
1		0,16*
8		0,69*

## Réacteur continu



- ➡ Croissance dans le liquide et dans le biofilm
- ➡ Modélisation dans un système 1D

✓ Croissance

$$\mu_H \cdot \frac{S_S}{S_S + K_S} \cdot \frac{S_{O_2}}{S_{O_2} + K_{O_2}} \cdot X_H$$

✓ Gamme des paramètres de Monod

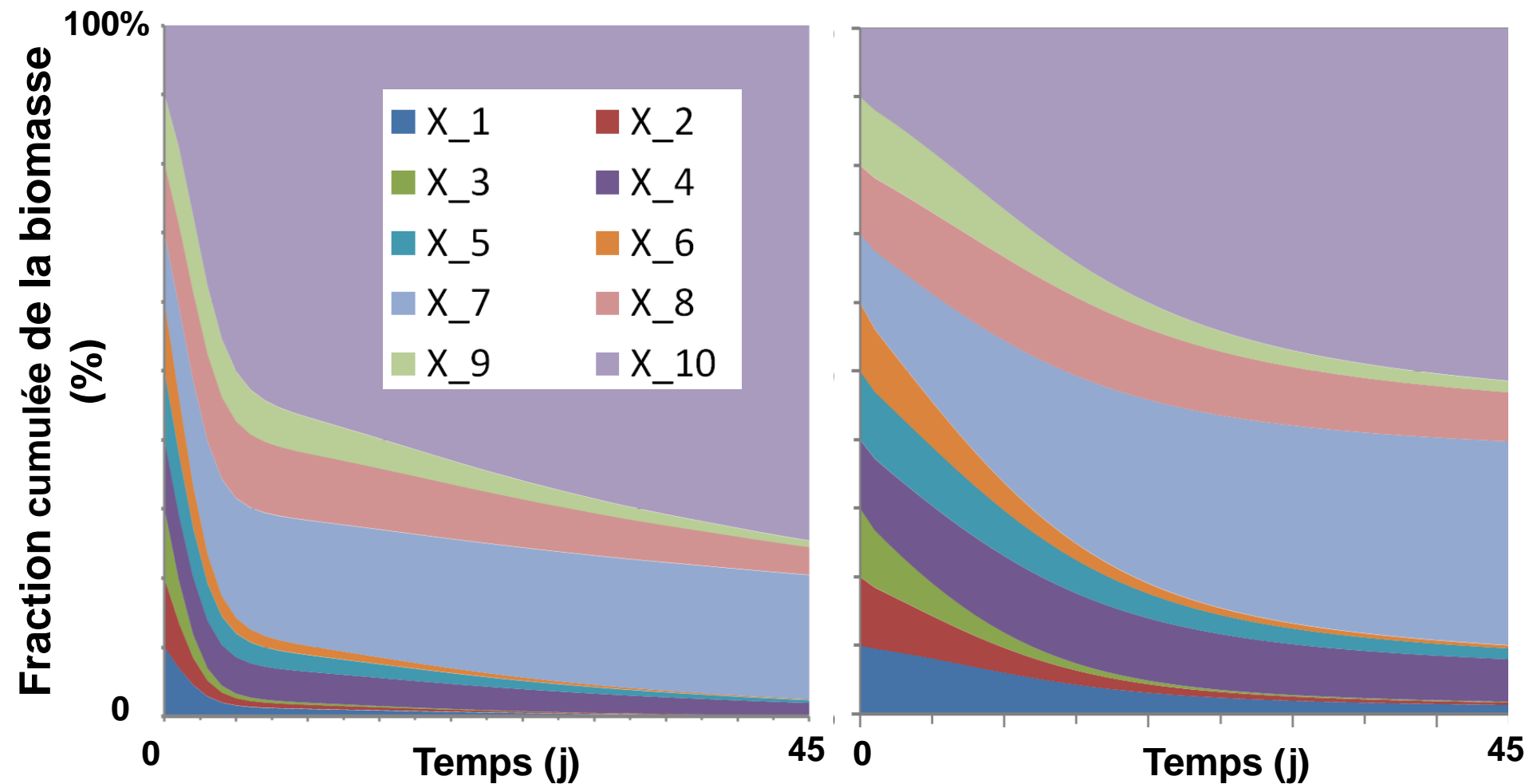
✓  $21,56 < \mu_H < 23 \text{ j}^{-1}$

✓  $19,6 < K_S < 20,4 \text{ mg}_{\text{DCO}} \cdot \text{L}^{-1}$

✓ Dynamique dans le liquide

TSH = 0,3 h

TSH = 8 h



✓ à 7 jours (biofilm)

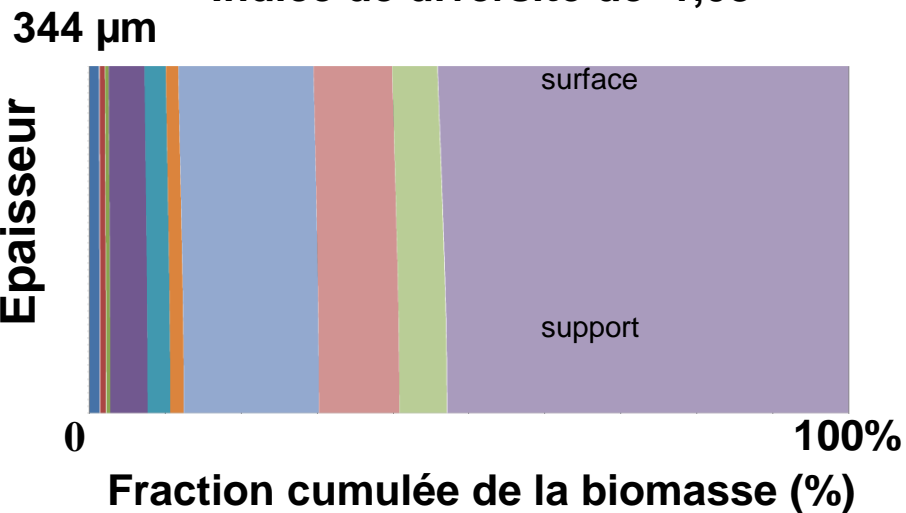


**TSH = 0,3h**

**TSH = 8 h**

Indice de diversité de 1,08

Indice de diversité de 2

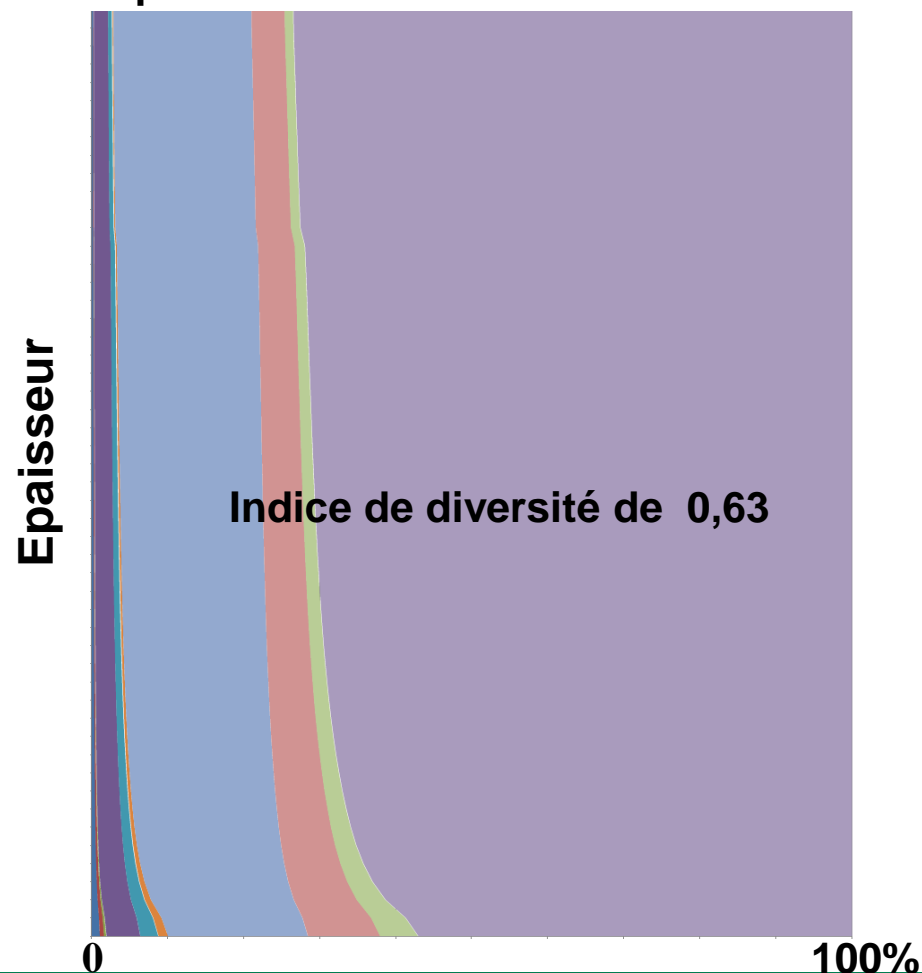


✓ à 42 jours (biofilm)

- |       |        |
|-------|--------|
| ■ X_1 | ■ X_2  |
| ■ X_3 | ■ X_4  |
| ■ X_5 | ■ X_6  |
| ■ X_7 | ■ X_8  |
| ■ X_9 | ■ X_10 |

TSH = 0,3 h

1130  $\mu\text{m}$



TSH = 8 h

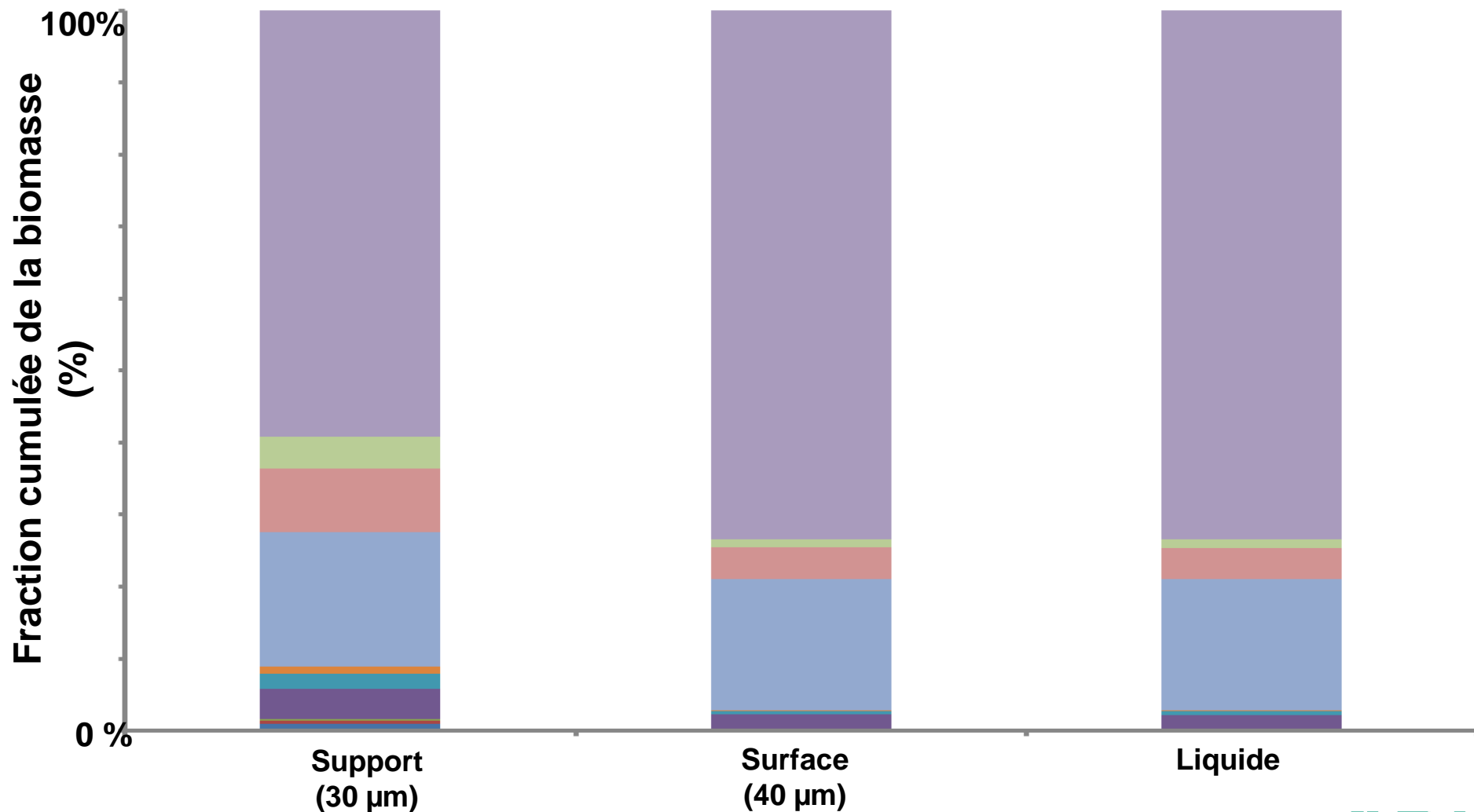
150  $\mu\text{m}$



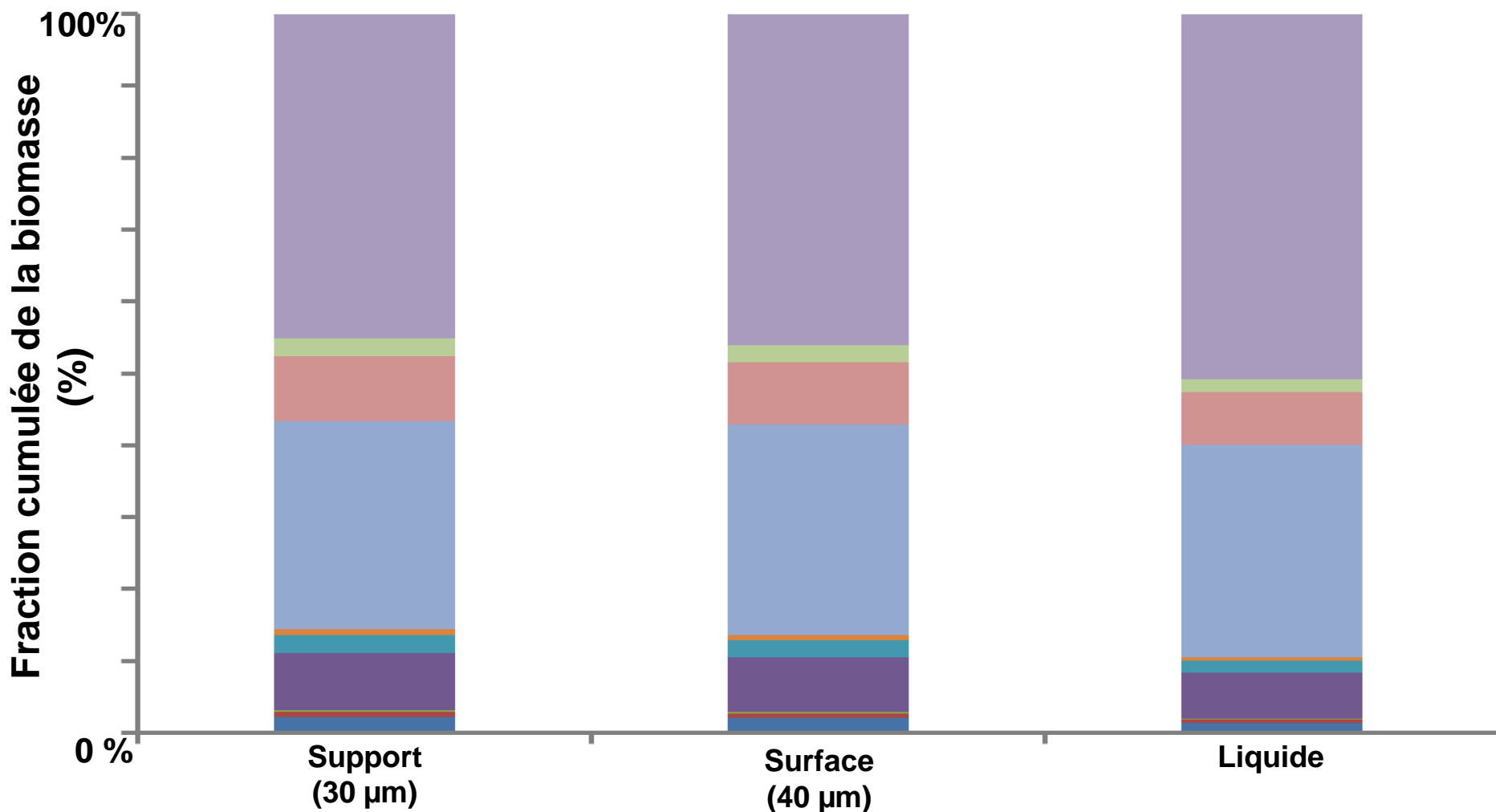
Fraction cumulée de la biomasse (%)

Fraction cumulée de la biomasse (%)

- ✓ Comparaison biofilm / liquide à 42 jours, TSH court (0,3 h)



- ✓ Comparaison biofilm / liquide à 42 jours, TSH long (8 h)





- Les biofilms sont présents partout... y compris dans les procédés de traitement des eaux
- Les biofilms sont des communautés microbiennes qui se structurent dans le temps et l'espace
- Les mécanismes impliqués dans leur formation et leur fonctionnement ont des échelles de temps et d'espace très variés
- Leur étude nécessite une approche pluridisciplinaire associant l'écologie microbienne et le génie des procédés