



THÈSE

En vue de l'obtention du

DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par *Institut National des Sciences Appliquées de Toulouse*
Discipline ou spécialité : *Génie des Procédés et de l'Environnement*

Présentée et soutenue par *DERLON Nicolas*
Le 28 Novembre 2008

Titre : *Analyse de la compétition microbienne entre bactéries autotrophes et hétérotrophes au sein d'un biofilm éliminant l'azote*

JURY

Paul LESSARD, Professeur, Université Laval (Rapporteur)
Jean-Philippe STEYER, Directeur de recherche, LBE, INRA, Narbonne (Rapporteur)
Nicolas BERNET, Directeur de recherche, LBE, INRA, Narbonne
Jean-Marc CHOUBERT, Ingénieur de recherche, CEMAGREF
Pascal BOISSON, Ingénieur d'études, VEOLIA Environnement
Alain LINE, Professeur, LISBP, INSA, Toulouse
Etienne PAUL, Professeur, LISBP, INSA, Toulouse
Isabelle QUEINNEC, Chargée de recherche, LAAS-CNRS, Toulouse

Ecole doctorale : *Mécanique, Energétique, Génie civil Et Procédés (MEGEP)*
Unité de recherche : *Laboratoire d'Ingénierie des Systèmes Biologiques et des Procédés, UMR5504, UMR792, CNRS, INRA, INSA, Toulouse, France*
Directeur(s) de Thèse : *Etienne PAUL, Professeur, LISBP, INSA, Toulouse*
Isabelle QUEINNEC, Chargée de recherche, LAAS-CNRS, Toulouse
Rapporteurs : *Paul LESSARD, Professeur, Université Laval*
Jean-Philippe STEYER, Directeur de recherche, LBE, INRA Narbonne

Résumé

Les procédés à biomasse fixée sont utilisés pour la dégradation simultanée des pollutions carbonées et azotées. Cette biodégradation est basée sur le fonctionnement d'un consortium bactérien complexe, composé de bactéries autotrophes et hétérotrophes, associées sous forme de biofilm. La coexistence de ces deux populations résulte d'un phénomène de compétition pour leurs substrats communs (oxygène et azote) et pour l'espace. Elle est à l'origine de nombreux dysfonctionnements des réacteurs, et les mécanismes qui la gouvernent ne sont aujourd'hui pas clairement identifiés. A cet effet, trois aspects ont été abordés dans ce travail : (i) le développement d'un modèle de croissance, (ii) la caractérisation du détachement et son influence sur la compétition, (iii) et l'analyse de l'impact des conditions de croissance sur la compétition. Les principaux résultats sont les suivants :

- Un modèle 1-D qualitatif, dont la structure permet de prédire les dynamiques de populations et les performances épuratoires du système biofilm, a été développé. Ce modèle est multi-espèces et multi-substrats. Un détachement surfacique continu est initialement considéré.
- Une étude expérimentale du détachement a été réalisée. Différents biofilms ont été développés sous des conditions environnementales variées et contrastées, au sein de réacteurs de Couette-Taylor. L'érosion a été redéfinie comme le couplage entre un détachement surfacique continu de petites particules et des événements volumiques dynamiques détachant de larges particules.
- A l'aide du modèle, différents modes de détachement, en termes de fractions d'épaisseurs détachées et de fréquences d'évènements, ont été testés. Le mode de détachement fixe la croissance hétérotrophique à la surface du biofilm, et par conséquent la disponibilité de l'oxygène dans les couches internes du biofilm. Si l'oxygène est limitant, la croissance des bactéries autotrophes est limitée voire impossible. Le mode de détachement, associé au degré de limitation en oxygène, gouverne donc directement les capacités de coexistence entre les différentes populations fonctionnelles.
- Différentes observations expérimentales, réalisées sous des conditions de limitation en oxygène, démontrent cependant que l'avantage accordé par le modèle à la croissance hétérotrophique est surestimé. L'hypothèse d'une dénitrification au sein de clusters anoxiques denses, présents dans la zone aérobie du biofilm, a été émise. Des phénomènes de « détachement spécifique des bactéries hétérotrophes » et de « convection particulière » ont été évalués à l'aide du modèle. Ces deux processus, en limitant l'activité exogène hétérotrophique à la surface du biofilm, ont un impact favorable sur la croissance autotrophique.

Une stratification stricte des fonctionnalités est régulièrement prédite par les modèles 1-D qui considèrent une représentation simplifiée des phénomènes biologiques et physiques. Cette étude soulève finalement l'interrogation suivante : Cette stratification stricte ne fausse-t-elle pas la prédiction du résultat de la compétition entre bactéries autotrophes et hétérotrophes sous certaines conditions ?

Mots clés : biofilm, nitrification, compétition microbienne, stratification des population, modélisation

Abstract

Biofilm reactors are used in wastewater treatment for simultaneous COD and nitrogen removal. This biological process is based on a complex bacterial consortium, composed of both autotrophic and heterotrophic bacteria, associated in “biofilm”. The coexistence of these populations results of a microbial competition for both the substrates and the space. This microbial competition potentially leads to process failures as decreases of the removal rates, and thus its mechanisms must be understood. In this way, the objectives of this work were: (i) to develop a model of biofilm growth, (ii) to characterize the detachment mode and its impact on the competition, (iii) and to analyze the impact of the environmental growth conditions on the competition.

The main results of this work are the following:

- A 1-D biofilm model, since the structure allows predicting population dynamics and the biofilm reactor performances, was developed. This is a multi-species and multi-substrates model, which assumes a continuous surface detachment.
- An experimental study of the detachment mode was performed. Different biofilms were grown under different various and contrasted growth conditions in Couette-Taylor Reactors. Erosion process was defined as a continuous surface detachment of small particles coupled with dynamic volume events detaching large particles.
- Using the model, different detachment modes in terms of fraction of biofilm thickness detached and in terms of frequency were tested. The dynamic volume events determine the heterotrophic growth at the biofilm surface, and thus the availability of oxygen inside the biofilm. If oxygen is limiting in the inner zone of the biofilm, the autotrophic growth is limited or impossible. By impacting the oxygen availability, the dynamic volume events consequently govern the result of the autotrophic-heterotrophic competition.
- Under oxygen-limiting conditions, the comparison between numerical and experimental results shows that a simple 1-D model overpredicts the advantage of the heterotrophic growth. The impact of more complex processes on autotrophic-heterotrophic coexistence was thus evaluated. Specific heterotrophic detachment and particulate convection were shown to favour the autotrophic growth and thus the autotrophic-heterotrophic coexistence.

Finally, 1-D models considering simple biological and physical processes leads to a strict stratification of the functionalities. The following question is highlighted by this work: Is the strict stratification of the microbial functionalities predicted by simple 1-D model can potentially change the result of the autotrophic-heterotrophic competition?

Keywords: biofilm, nitrification, microbial competition, stratification, modelling

LISTE DES SYMBOLES

θ	Porosité du biofilm	-
η_g	Fraction de bactéries hétérotrophes aérobie facultative	-
γ_{N,O_2}	Coefficient de caractérisation du régime de croissance des bactéries autotrophes	-
τ_p	Contrainte de cisaillement	Pa
γ_{S,O_2}	Coefficient d'identification du régime de croissance des bactéries hétérotrophes	-
μ	Taux de croissance spécifique	j^{-1}
$\mu_{max,H}$	Taux de croissance spécifique maximum des bactéries hétérotrophes	j^{-1}
$\mu_{max,NOA}$	Taux de croissance spécifique maximum des bactéries nitratantes	j^{-1}
$\mu_{max,NOI}$	Taux de croissance spécifique maximum des bactéries nitritantes	j^{-1}
ASM	Activated Sludge Model	-
b	Constante de décès dans le cas d'un modèle de mort-régénération	j^{-1}
BAA	Bactéries nitratantes	-
BAI	Bactéries nitritantes	-
b_H	Taux de décès des bactéries hétérotrophes	j^{-1}
BH	Bactéries hétérotrophes	-
b_{NOA}	Taux de décès des bactéries nitratantes	j^{-1}
b_{NOI}	Taux de décès des bactéries nitritantes	j^{-1}
C_{NH}	Concentration en azote ammoniacal en entrée du système biofilm	gN/m^3
C_{NOA}	Concentration en nitrates en entrée du système biofilm	gN/m^3
C_{NOI}	Concentration en nitrites en entrée du système biofilm	gN/m^3
C_O	Concentration en oxygène en entrée du système biofilm	gO_2/m^3
C_{O_2}	Concentration en oxygène dans le liquide	mgO_2/L
$C_{O_2,max}$	Concentration maximum en oxygène dans le liquide	mgO_2/L
C_S	Concentration en matières organiques solubles en entrée du système biofilm.	$gDCO/m^3$
C_s	Charge surfacique	$g/m^2.j$
C_{S_0}	Concentration en substrat dans le liquide	$gDCO/m^3$
CTR	Réacteur de Couette-Taylor	-
C_{Xm}	Densité maximum de biomasse au sein du biofilm	$gDCOx/m^3$
D	Coefficient de diffusion	m^2/j
d_{95}	Diamètre équivalent à 95%	μm
DCO	Demande Chimique en Oxygène	$gDCO/m^3$
DCO/N	Ratio entre la concentration en substrat organique et la concentration en azote ammoniacal	$gDCO/gN$
DCO/O ₂	Ratio entre la concentration en substrat organique et la concentration en oxygène	$gDCO/gO_2$
D_T	Coefficient de diffusion turbulent	m^2/j
EPS	Substances exo-polymériques	-
F	Flux de matières	g/m^2
f_{xi}	Fraction de biomasse inerte produite par la lyse cellulaire	-
G	Coefficient de prédiction du régime : limité par la croissance ou par le substrat	-
i_{BN}	Fraction d'azote dans les boues	-
J	Flux surfacique de matières	$g/m^2.j$

k_d	Constante de décès dans le cas d'un modèle de respiration endogène	j^{-1}
k_{det}	Constante de détachement	Fonction du modèle de détachement
kLa	Coefficient de transfert d'oxygène	h^{-1} ou j^{-1}
K_N	Constante d'affinité pour l'ammonium des BAI	gN/m^3
K_{NAA}	Constante d'affinité pour l'ammonium des BAA	gN/m^3
K_{NH}	Constante d'affinité pour l'ammonium des BH	gN/m^3
K_{NOA}	Constante d'affinité pour les nitrates des BH	gN/m^3
K_{NOI}	Constante d'affinité pour les nitrites des BH et BAA	gN/m^3
K_{OAA}	Constante d'affinité pour l'oxygène des BAA	gO_2/m^3
K_{OAI}	Constante d'affinité pour l'oxygène des BAI	gO_2/m^3
K_{OH}	Constante d'affinité pour l'oxygène des BH	gO_2/m^3
K_{SH}	Constante d'affinité pour le substrat organique des BH	$gDCO/m^3$
L_f	Epaisseur de biofilm	m
MES	Matières En Suspension	gMES/L
Modèle A	Modèle mathématique de type « analytique »	-
Modèle N	Modèle mathématique de type numérique	-
Modèle PA	Modèle mathématique de type « pseudo-analytique »	-
MVS	Matières Volatiles Sèches	gMVS/L
OUR	Oxygen Uptake Rate	mgO ₂ /gMVS.h
P_x	Production de boue	gMVS/j
R	Ratio DCO/N ou DCO/O ₂	gDCO/gN ou gDCO/mgO ₂
Re	Nombre de Reynolds	-
$r_{O_2,max}$	Taux de respiration maximum	mgO ₂ /h.L
r_s	Vitesse de consommation en substrat i	g/j
r_{Xk}	Vitesse de croissance de la biomasse	gDCOx/j
r_{elf}	Vitesse de variation de la fraction liquide dans le compartiment biofilm	-
S_{NH}	Concentration en azote ammoniacal en sortie du système biofilm	gN/m^3
S_{NOA}	Concentration en nitrates en sortie du système biofilm	gN/m^3
S_{NOI}	Concentration en nitrites en sortie du système biofilm	gN/m^3
S_O	Concentration en oxygène en sortie du système biofilm	gO_2/m^3
S_s	Concentration en matières organiques solubles en sortie du système biofilm	$gDCO/m^3$
T_{bw}	Période entre deux événements de « backwashing »	j
$T_{convection}$	Période de convection de la biomasse pour atteindre Zbase_thickness	j
$T_{événement}$	Période entre deux événements de détachement	j
TSS	Temps de séjour des solides	j
u_{det}	Vitesse de détachement du biofilm	$m.j^{-1}$
u_f	Vitesse de déplacement de l'interface biofilm-liquide	$m.j^{-1}$
X_{BAA}	Biomasse nitratante.	gDCOx
X_{BAI}	Biomasse nitritante	gDCOx
X_{BH}	Biomasse hétérotrophes	gDCOx
X_I	les composés particulaires organiques inertes	gDCOx
$X_{M,i}$	Concentration en composés particulaires dans le biofilm	gDCOx/m ³
X_p	Concentration en substrat organique particulaire non-biodégradable	gDCOx/m ³
X_s	Concentration en substrat organique particulaire	gDCOx/m ³

Y	Taux de conversion	$\text{gDCO}_x/\text{gDCO}$
Z	Distance par rapport au support	m
$Z_{\text{base_thickness}}$	Épaisseur de biofilm à partir de laquelle le biofilm est soumis au détachement	m
Z_{max}	Épaisseur maximum de biofilm	m
ϵ_{lf}	fraction liquide dans le compartiment biofilm	-
Q_f	Densité de biofilm	gDCO_x/m^3
$\rho_{M,i}$	Densité spécifique de la biomasse i dans le biofilm	gDCO_x/m^3

PRODUCTION SCIENTIFIQUE

Publications dans des revues internationales avec comité de lecture

Courfort C., Derlon N., Liné A., Ochoa-Chaves J., Paul E. (2007). *Cobesion and detachment in biofilm system for various environmental conditions*. Water Sci. and Technol. 55 (8-9) 421–428.

Derlon N., Escudié R., Massé A., Bernet N., Paul E. (2008). *Stratification in the cohesion of biofilms grown under various environmental conditions*. Water Research, 42 (8-9), 2102-2110.

Publications dans acte de congrès avec comité de lecture sur résumé

Derlon N., Queinnec I., Paul E. *Influence du temps de séjour des solides en suspensions sur la compétition entre biomasse fixée et biomasse en suspension : impact sur le dimensionnement des réacteurs à biomasse fixée*. Proceedings des Journée d'Information sur L'eau.

Communications orales nationales

Derlon N., Queinnec I., Paul E. *Influence du temps de séjour des solides en suspensions sur la compétition entre biomasse fixée et biomasse en suspension : impact sur le dimensionnement des réacteurs à biomasse fixée*. Journée d'Information sur L'eau. Poitiers, 2008.

Coufort C., Derlon N., Liné A., Ochoa-Chaves J., Paul E. *Détachement et Cobésion des Biofilms*. Journée Thématique Réseau National Biofilm : Procédés Industriels et Risques Sanitaires (Orléans, Juin 2006).

Derlon N., Queinnec I., Paul E. *Analyse de mécanismes impliqués dans la stratification des populations microbiennes autotrophes et hétérotrophes au sein de biofilms*. Congrès Jeune Chercheur du PNIR Biofilms (Paris, Novembre 2007).

Derlon N., Escudié R., Godon J-J., Queinnec I., Paul E., Bernet N. *Outils et approches pour l'étude de la stratification des propriétés physiques, des populations microbiennes et des fonctionnalités au sein de biofilms multi-espèces*. Journée Thématique Réseau National Biofilm (Dourdan, Juin 2008).

Communications orales internationales

Courfort C., Derlon N., Liné A., Ochoa-Chaves J., Paul E. *Cobesion and detachment in biofilm system for various environmental conditions*. Biofilm System VI (Amsterdam, septembre 2006).

Derlon N., Gévaudan G., Yin Jun, Bernet N., Queinnec I., Paul E. *Comparison of physical and biological structures of biofilms grown under different COD/TKN ratios*. Biofilm Technologies 2008 (Singapour, Janvier 2008).

Derlon N., Queinnec I., Paul E. *The impact of suspended biomass on the competition between autotrophic and heterotrophic bacteria in biofilms*. Biofilm III (Munich, Octobre 2008).

Ras M., Derlon N. Neuhauser E., Létisse V., Paul E., Lefebvre D. *A hydrophobic exopolymer substances or EPS...* Biofilm III (Munich, Octobre 2008).

Communications sur posters

Derlon N., Yin J., Queinnec I., Liné A., Paul E. *Biofilm detachment under steady state and under dynamic change of shear*. Biofilm Technologies 2008 (Singapour, Janvier 2008). Communication par affiche.

Communications invitées

Coufort C., Derlon N., Liné A., Paul E. *Procédés à biomasse fixée dans le traitement de l'eau*. Journée Thématique Réseau National Biofilm : Procédés Industriels et Risques Sanitaires (Orléans, Juin 2006). Communication invitée

SOMMAIRE

Chapitre I : Synthèse bibliographique	10
<i>I.1 Introduction aux biofilms et à la problématique du sujet</i>	12
I.1.1 Définition	12
I.1.2 Avantages de la biomasse fixée par rapport à la biomasse en suspension.....	12
I.1.3 Les biofilms en traitement de l'eau.....	13
I.1.4 La problématique de la compétition autotrophes-hétérotrophes au sein d'un biofilm nitrifiant.....	15
<i>I.2 Les différentes fonctionnalités d'un biofilm mixte autotrophes-hétérotrophes au sein du biofilm nitrifiant</i>	16
I.2.1 La fonction de nitrification	16
I.2.2 Fonction d'élimination de la DCO	21
I.2.3 Cinétiques de réactions	26
<i>I.3 Le système biofilm</i>	30
I.3.1 Composition générale d'un biofilm	32
<i>I.4 La compétition microbienne</i>	38
I.4.1 Introduction aux différentes interactions microbiennes	38
I.4.2 La compétition microbienne dans le cas d'une biomasse en suspension	40
I.4.3 La compétition microbienne dans le cas d'un système biofilm.....	44
<i>I.5 Les modèles mathématiques</i>	60
I.5.1 Introduction	60

I.5.2 Les différents types de modèles	62
I.5.3 Comparaison des différents types de modèles par rapport à la problématique de compétition autotrophes-hétérotrophes au sein d'un système biofilm.....	65
I.5.4 Structure d'un modèle biofilm développé sous AQUASIM®	68
I.5.5 Conclusions sur la modélisation.....	74
Chapitre II : Matériels et méthodes expérimentaux.....	77
<i>II.1 Réacteurs</i>	<i>79</i>
II.1.1 Support de colonisation.....	79
II.1.2 Réacteur à écoulement de Couette Taylor.....	80
<i>II.2 Protocoles de colonisation des plaques supports</i>	<i>84</i>
II.2.1 Protocole <i>In Situ</i> de colonisation :.....	84
II.2.2 Protocole <i>Ex Situ</i> de colonisation :.....	84
II.2.3 Cellule d'écoulement	85
<i>II.3 Composition des effluents synthétiques</i>	<i>87</i>
II.3.1 Sources de carbone.....	87
II.3.2 Autres éléments nutritifs.....	87
<i>II.4 Caractérisation des biofilms</i>	<i>88</i>
II.4.1 Fonctionnalités.....	88
II.4.2 Propriétés physiques des biofilms	92
II.4.3 Activités autotrophiques et hétérotrophiques	95
II.4.4 Diversité microbienne.....	97
<i>II.5 Caractérisation des phénomènes de détachement.....</i>	<i>98</i>

II.5.1 Granulométrie	98
II.5.2 Particle Image Velocimetry	100
II.6 Caractérisation du transfert interne en oxygène	102

Chapitre III : Ecriture et évaluation du modèle de croissance des biofilms105

III.1 Introduction et objectifs du chapitre	107
III.2 Observations expérimentales de biofilms.....	108
III.3 Objectifs du modèle.....	110
III.3.1 Représentation à l'échelle macro du réacteur.....	110
III.3.2 Représentation à l'échelle du biofilm	111
III.4 Processus biologiques.....	113
III.4.1 Croissance autotrophe.....	113
III.4.2 Croissance hétérotrophe	114
III.4.3 Lyse cellulaire.....	117
III.4.4 Processus d'hydrolyse.....	119
III.4.5 Processus de stockage intracellulaire des composés organiques solubles	119
III.4.6 Bilan des processus biologiques et valeurs des paramètres retenus dans notre modèle..	120
III.5 Les processus physiques.....	126
III.5.1 Sous-couche diffusionnelle.....	126
III.5.2 Transfert interne : diffusion.....	127
III.5.3 Le processus de détachement.....	137
III.5.4 Conclusions sur les processus physiques.....	146
III.6 Evaluation du modèle choisi	146

III.6.1 Evaluation du modèle dans le cas d'un biofilm développé sous les conditions de croissance du cas « standard ».....	146
III.6.2 Evaluation de la coexistence entre bactéries autotrophes et hétérotrophes	149
<i>III.7 Conclusion</i>	<i>152</i>
Chapitre IV : Impact du mode de détachement sur la compétition entre bactéries autotrophes et hétérotrophes	155
<i>IV.1 Introduction et objectifs du chapitre.....</i>	<i>157</i>
<i>IV.2 Caractérisation de la nature du détachement : approche expérimentale</i>	<i>161</i>
IV.2.1 Structure des biofilms caractérisés.....	163
IV.2.2 Caractérisation de la taille des particules détachées	168
IV.2.3 Corrélation entre la taille des particules détachées et la rugosité des biofilm	174
IV.2.4 Conclusions sur la caractérisation de la nature du détachement.....	178
<i>IV.3 Impact de la caractérisation du détachement des biofilms sur l'écriture et la définition des différents modèles de détachement.....</i>	<i>179</i>
<i>IV.4 Impact de la nature du détachement sur la compétition microbienne entre autotrophes et hétérotrophes</i>	<i>182</i>
IV.4.1 Analyse des flux et des taux observés de réactions	183
IV.4.2 Analyse des distributions des populations et des épaisseurs viables de biofilm	185
IV.4.3 Analyse des quantités de biomasses autotrophes et hétérotrophes accumulées.....	190
IV.4.4 Etude de l'impact de la nature du détachement sur la distribution du TSS _{local}	193
IV.4.5 Conclusion sur l'impact de la nature du détachement sur la compétition microbienne entre bactéries autotrophes et hétérotrophes.....	197

<i>IV.5 Etude expérimentale de l'impact de la nature du détachement sur la compétition microbienne entre bactéries autotrophes et hétérotrophes</i>	<i>199</i>
IV.5.1 Analyse des flux et des taux observés de réaction.....	199
IV.5.2 Conclusion.....	203
<i>IV.6 Conclusions</i>	<i>205</i>
<i>IV.7 Discussion</i>	<i>207</i>

Chapitre V : Influence des ratios DCO/N et DCO/O₂ sur la compétition entre bactéries autotrophes et hétérotrophes.....213

Chapitre V :..... 214

<i>V.1 Introduction et objectifs du chapitre</i>	<i>215</i>
<i>V.2 Identification des limitations en azote et en oxygène à imposer.....</i>	<i>216</i>
<i>V.3 Analyse des cas « ratio DCO/N élevé » et « ratio DCO/O₂ élevé ».....</i>	<i>221</i>
V.3.1 Analyse des flux et des taux observés de réaction	221
V.3.2 Impact de la limitation en azote ou en oxygène sur le rendement observé de croissance	226
V.3.3 Impact des conditions de croissance sur la structure des biofilms.....	227
<i>V.4 Discussion.....</i>	<i>229</i>
V.4.1 Implantation des populations nitrifiantes sous limitation par l'azote (cas « DCO/N élevé »).....	230
V.4.2 Compétition vis-à-vis de l'oxygène	237
<i>V.5 Conclusion</i>	<i>245</i>

Chapitre VI : Evaluation de l'impact de processus spécifiques sur la croissance autotrophique	248
<i>VI.1 Problématique et objectifs.....</i>	<i>250</i>
<i>VI.2 Présentation et justification des processus biologiques et physiques évalués dans le cas « Ratio DCO/O₂ élevé ».....</i>	<i>252</i>
VI.2.1 Cas « détachement spécifique des bactéries hétérotrophes».....	256
VI.2.2 Cas « distribution homogène des populations »	258
<i>VI.3 Analyse du cas « détachement sélectif des bactéries hétérotrophes ».....</i>	<i>259</i>
VI.3.1 Analyse des taux observés de réactions	259
VI.3.2 Analyse des distributions en biomasses	261
VI.3.3 Conclusions sur le cas d'un « détachement spécifique des bactéries hétérotrophes »	262
<i>VI.4 Analyse du cas « distribution homogène des populations ».....</i>	<i>262</i>
VI.4.1 Analyse des taux observés de réactions	263
VI.4.2 Analyse des distributions en biomasses	264
VI.4.3 Conclusion sur le cas « distribution homogène des populations »	265
<i>VI.5 Evaluation de l'impact de la croissance des bactéries hétérotrophes filamenteuses dans le cas d'un ratio « DCO/N élevé ».....</i>	<i>266</i>
<i>VI.6 Conclusion.....</i>	<i>267</i>
Chapitre VII : Conclusion générale	270

LISTE DES FIGURES

- Figure I-1 : Récapitulatif des différents domaines de développement des biofilms « positifs » et « néfastes » (Wanner *et al.*, 2006). 13
- Figure I-2 : Réaction de nitrification avec les différents intermédiaires. 19
- Figure I-3 : Métabolisme des bactéries nitrifiantes. 20
- Figure I-4 : Réaction de dénitrification catalysée par des nitrates (NAR), des nitrites (NIR), oxyde nitrique (NOR), oxyde nitreux (N2OR) réductases. 23
- Figure I-5 : Métabolisme aérobie des bactéries hétérotrophes. 23
- Figure I-6 : Métabolisme anoxygène des bactéries hétérotrophes. 24
- Figure I-7 : Schématisation d'un système biofilm. 30
- Figure I-8 : Schématisation des deux principales conceptions pour la représentation des biofilms : (a) conception homogène et (b) conception hétérogène. 31
- Figure I-9 : Relations entre les taux de croissance spécifiques maximums et la concentration en substrat pour deux microorganismes A et B et pour deux cas de figure. 41
- Figure I-10 : Distributions de la biomasse et des concentrations en substrats en fonction de l'épaisseur de biofilm pour différentes valeurs de γ_{S,O_2} (Elenter *et al.* (2007). 52
- Figure I-11 : Schématisation de la discrétisation du compartiment « biofilm » pour représenter la variation temporelle de l'épaisseur de biofilm selon Morgenroth et Wilderer (2000). 55
- Figure I-12 : Variation temporelle de l'épaisseur de biofilm engendrée par un détachement discontinu selon Morgenroth et Wilderer (2000). 56
- Figure I-13 : Evolutions du TSS_{local} (a, b, c) et des distributions de populations (d, e, f) en fonction de l'épaisseur de biofilm pour trois scénarii de détachement différents (Morgenroth et Wilderer 2000).

Figure I-14 : Les quatre compartiments régulièrement utilisés pour la représentation schématique d'un biofilm (Wanner *et al.*, 2006) 68

Figure I-15 : Exemples de compartiments « biofilm » représentés par une géométrie simple caractérisée par structure homogène avec une surface plane (a), représentés par une géométrie simple caractérisée par une structure hétérogène (b), ou représentés par une géométrie complexe où le compartiment « biofilm » est strictement défini comme le volume occupé par celui-ci (c). 69

Figure II-1 : Plaque de colonisation : vue globale (a), bord arrondi (b). 80

Figure II-2 : Schéma du réacteur de Taylor-Couette (Coufort, 2004). 81

Figure II-3 : Schéma du montage expérimental utilisé pour la croissance des biofilms. 82

Figure II-4 : Système de fixation des plaques supports (Ochoa, 2008). 83

Figure II-5 : (a) Evolution de la contrainte de cisaillement en fonction de la vitesse de rotation du cylindre interne (N) d'après les données expérimentales et d'après différentes corrélations (« Wendt », « Donnelly » et « Bilgen ») et (b) évolution de la vitesse de rotation du cylindre interne en fonction de la fréquence. 83

Figure II-6 : Dessin 3-D réalisé sous AUTOCAD® de la cellule d'écoulement en mode « fermé ». 85

Figure II-7 : Photo du divergeant-convergeant en mode « ouvert » permettant l'utilisation de microsondes. 86

Figure II-8 : Présentation de 4 étapes de mesure d'épaisseur par analyse d'images. 94

Figure II-9 : Schéma du respiromètre utilisé au cours de cette étude (Spérandio, 1998). 95

Figure II-10 : Photos de biofilms (a) avant déstructuration et (b) après déstructuration selon le protocole développé. 97

Figure II-11 : Principe de mesure par granulométrie et de traitement de données. 100

Figure II-12 : Système PIV pour la caractérisation des particules détachées. 101

- Figure II-13 Photos du montage expérimental des microsondes. 103
- Figure III-1 : Illustrations de la diversité en termes de morphologie et d'épaisseur des biofilms développés sous différentes conditions environnementales et hydrodynamiques. 109
- Figure III-2 : Schématisation du système biofilm modélisé. 110
- Figure III-3: Profils de concentrations en oxygène dans le cas (a) d'un biofilm développé sous une charge de 25gDCO/m².j avec un ratio de 4gDCO/gN en respiration endogène ($\gamma_{\text{DCO},\text{O}_2} > 0$), (b) d'un biofilm développé sous une charge de 2,5gDCO/m².j avec un ratio de 4gDCO/gN, concentration initiale en ammonium du liquide, 25 mg/l, donc biofilm en respiration exogène ($\gamma_{\text{N},\text{O}_2} = 1$). 115
- Figure III-4: Impact, sur les profils des concentrations des espèces particulières, de la valeur du coefficient η_g dans le cas d'un biofilm développé à une charge de 2,5gDCO/m².j avec un ratio de 4gDCO/gN. 116
- Figure III-5: Evolution des ratios de biomasse active et de biomasse inerte à la base du biofilm en fonction du temps dans le cas d'un biofilm soumis (a) à un détachement surfacique continu, (b) à un détachement volumique en dynamique. 118
- Figure III-6 : Illustration de l'impact de la limitation de la diffusion sur l'activité d'un biofilm : activités endogènes et exogènes hétérotrophiques 127
- Figure III-7 : Corrélation entre la densité de biofilm et la contrainte de cisaillement pour des biofilms développés sous différentes conditions environnementales en termes d'accepteur et de donneur d'électrons. 130
- Figure III-8 : Evolution en fonction de l'épaisseur de la fraction liquide (a) et de la fraction de cellules viables (b) (Wanner et Reichert, 1996). Evolution de la fraction de cellules viables d'après le modèle développé dans ce travail de thèse (c). 132
- Figure III-9 : Evolution des concentrations en biomasse accumulée et du ratio X_A/X_{BH} en fonction du ratio D_{NH}/D_S . Cas d'un biofilm développé dans les conditions du cas « standard ». 135

Figure III-10 : Distribution des populations pour un ratio D_{NH}/D_S de : (a) 0,5 et (b) 1 dans le cas d'un biofilm développé dans le cas « standard ». 136

Figure III-11 : Evolution de l'épaisseur de biofilm L_f pendant la phase de croissance. Cas d'un biofilm anoxique développé avec de l'éthanol avec une charge surfacique de $4,2\text{gDCO}/\text{m}^2\cdot\text{j}$ et une contrainte de cisaillement de $0,3\text{Pa}$ (données Projet RITEAU, (Ochoa, 2008)). 138

Figure III-12 : Evolution de l'épaisseur de biofilm dans le cas (i) d'un modèle de détachement fonction de L_f (ii) d'un modèle de détachement indépendant de L_f . 139

Figure III-13 : Corrélation entre l'épaisseur du biofilm et la charge surfacique pour des biofilms développés sous différentes contraintes de cisaillement ($0,3\text{Pa}$, $0,5\text{Pa}$, 2Pa et 9Pa). 140

Figure III-14: Corrélation entre la charge surfacique et l'épaisseur de biofilm, d'après les prédictions du modèle, pour une contrainte de $0,01\text{Pa}$. 141

Figure III-15 : Corrélation entre le pourcentage de biofilm détaché (%) et la contrainte de cisaillement appliquée (Pa). 142

Figure III-16 : Illustration de l'impact de la contrainte de cisaillement sur l'épaisseur de biofilm d'après le modèle. 144

Figure III-17 : Distributions des populations microbiennes (a) et de l'oxygène (b) en fonction de l'épaisseur de biofilm. Charge surfacique de $2,5\text{gDCO}/\text{m}^2\cdot\text{j}$, $4\text{gDCO}/\text{gN}$, détachement surfacique continu. 148

Figure III-18 : Evolution des efficacités d'élimination de la DCO et de nitrification en fonction du coefficient γ_{S,O_2} . 150

Figure III-19 : Evolution (a) des concentrations en bactéries autotrophes et hétérotrophes et (b) du ratio entre ces deux groupes bactériens, en fonction du coefficient γ_{S,O_2} , pour un apport en oxygène maintenu constant et un ratio de $4\text{gDCO}/\text{gN}$. 151

Figure IV-1 : Photos de biofilms développés sous différentes conditions de croissance. Entre parenthèse, l'indice du cas considéré. 164

Figure IV-2 : Influence des conditions de croissance sur l'épaisseur de biofilm. 166

Figure IV-3 : Distributions des écarts par rapport à l'épaisseur moyenne de biofilm pour chaque condition de croissance testée. 168

Figure IV-4 : Distributions en nombre (a) et en volume (b) des diamètres équivalents de particules détachées (cas 5 du tableau IV-1). 170

Figure IV-5 : Récapitulatif des d_{pp} et des d_{95} des particules majoritaires (distributions en nombre) et des grosses particules (distributions en volume) en fonction des environnements de croissance des biofilms. 172

Figure IV-6 : Comparaison de la taille des particules détachées et de la taille des rugosités pour les différents biofilms. 175

Figure IV-7 : Rapport entre les d_{pp} ou d_{95} des particules larges et les épaisseurs moyennes des biofilms. 177

Figure IV-8 : Schématisation du mode de détachement : (a) surfacique continu et (b) dynamique (à intervalles). 180

Figure IV-9 : Récapitulatif des flux et taux observés de réactions en fonction de la nature du détachement dans le cas « ratio DCO/O₂ élevé » pour différentes valeurs du coefficient γ_{S,O_2} calculées à partir des concentrations dans le liquide dans le cas d'un modèle de détachement surfacique continu qui sert ainsi de référence. 184

Figure IV-10 : Distribution des populations en fonction de l'épaisseur de biofilm pour un détachement surfacique continu (a) et pour un détachement volumique dynamique 25% $1/7j$ (b). Cas « standard ». 186

Figure IV-11 : Impact de la nature du détachement (fréquence, amplitude) sur l'épaisseur viable et inerte pour un biofilm développé sous les conditions de croissance du cas « standard ». 187

Figure IV-12 : Distribution des populations en fonction de l'épaisseur de biofilm pour un détachement surfacique continu (a) et pour un détachement volumique dynamique 80% 1/7j (b). Coefficient γ_{S,O_2} de 0,26. 188

Figure IV-13 : Impact de la nature du détachement (fréquence, amplitude) sur l'épaisseur viable et inerte pour un biofilm développé sous les conditions de croissance du cas « ratio DCO/O₂ élevé ». Coefficient γ_{S,O_2} de 0,26. 189

Figure IV-14 : Impact de la nature du détachement sur la concentration en bactéries autotrophes et hétérotrophes (a) et sur le ratio autotrophes/hétérotrophes (b) dans le cas « standard ». 191

Figure IV-15 : Impact de la nature du détachement sur la concentration surfacique d'autotrophes et hétérotrophes dans le cas « ratio DCO/O₂ élevé ». Coefficient γ_{S,O_2} de 0,26. 192

Figure IV-16 : Distribution des TSS_{locaux} à travers un biofilm dans le cas (a) d'un détachement surfacique continu ou (b) d'un détachement volumique dynamique 25% 1/7j. Cas « standard ». 195

Figure IV-17: Evolution : (a) du flux d'azote en sortie de réacteur et du flux d'azote nitrifié et (b) de l'efficacité de nitrification, pour un biofilm développé sous une faible limitation en oxygène et soumis à des évènements de détachements . Les courbes en pointillés sont des extrapolations. 201

Figure IV-18 : Evolution des variations du flux d'azote nitrifié et de la masse accumulée de biofilm lors d'un évènement de détachement, ainsi que du TSS global. 202

Figure IV-19 : Schéma de l'impact de la fréquence séparant deux évènements de détachement volumiques sur la compétition microbienne entre bactéries autotrophes (représentées en rouge) et hétérotrophes (représentées en vert). 209

Figure IV-20 : Evolution du flux de nitrites produits d'après les données expérimentales et de simulations (trait plein), selon Elenter *et al.* (2007). 211

Figure V-1 : Pourcentage de N_{assimilé} en fonction du ratio DCO/N de l'alimentation (a) pour différentes valeurs de rendements observés de croissance dans le cas d'une concentration en azote

dans les boues de 10% et (b) pour différentes concentrations en azote dans les boues dans le cas d'un taux observé de croissance de 0,1gMVS/gDCO. 217

Figure V-2 : Démarche expérimentale appliquée pour le développement d'un BMAH et d'un BH sous des conditions de limitation en substrat organique. 219

Figure V-3 : Rendements de nitrification, de dénitrification et d'élimination de la DCO en fonction du ratio DCO/N d'après les données expérimentales (a) et numériques (b). Cas d'un détachement surfacique continu. 222

Figure V-4 Profils SSCP de biofilms développés sous des ratios de 4gDCO/gN (a) et 73gDCO/gN (b). 225

Figure V-5 : Rendements observés de croissance (gMVS/gDCO_{éliminée}) en fonction du ratio DCO/N et selon le degré de limitation en oxygène d'après les données expérimentales (a) et numériques (b). 226

Figure V-6 : Photos de biofilms (vus de côté) et de particules détachées pour des biofilms développés sous des ratios de 4gDCO/gN (a), 18gDCO/gN (b) et 73gDCO/gN. 228

Figure V-7 : Evolution des concentrations en biomasse en fonction du ratio DCO/N dans le cas dans biofilm développé à 2,5gDCO/m².j et soumis à : (a) un détachement surfacique continu ou (b) un détachement volumique dynamique 25% 1/7j. La figure a' représente un grossissement de la figure V-7a dans la gamme 0-25gDCO/gN. 234

Figure V-8: Evolution des concentrations en biomasses en fonction de la valeur de K_{NH}. Cas d'un biofilm développé à 2,5gDCO/m².j avec un ratio de 4gDCO/gN (cas « standard ») et soumis à un détachement volumique dynamique. 236

Figure V-9 : Evolution des efficacités de nitrification et d'élimination de la DCO en fonction du coefficient γ_{S,O_2} . 240

Figure V-10: Evolution du flux de DCO éliminée lors d'une augmentation de la charge organique en condition de limitation en oxygène. Elenter *et al.* (2007). 241

Figure V-11 : Evolution du flux de nitrites d'après les données expérimentales (points) et les données de simulations (ligne) (Elenter *et al.*, 2007). 244

Figure VI-1 : Images d'un biofilm autotrophe après 1j de développement (A et B), 6j (C et D) ou 20j (E et F) (barre d'échelle = 20 μ m). Photos d'un cluster de bactéries nitritantes (G) et nitratantes (H) (barre d'échelle = 5 μ m).(Kindaichi *et al.*, 2006). 257

Figure VI-2 : Efficacités d'élimination de la DCO et de nitrification dans le cas d'un « détachement spécifique des bactéries hétérotrophes » pour une concentration en oxygène de (a) 6-7mg_{O2}/L ou (b) 1-2mg_{O2}/L en fonction du TSS_BH. 260

Figure VI-3 : Evolution des concentrations en biomasses en fonction du TSS_BH dans le cas « détachement spécifique des bactéries hétérotrophes » et pour une concentration en oxygène de l'ordre de (a) 6-7mg_{O2}/L ou de (b) 1-2mg_{O2}/L dans le liquide. 261

Figure VI-4 : Efficacités d'élimination de la DCO et de nitrification dans le cas d'une « distribution homogène des populations », pour une concentration en oxygène de (a) 6-7mg_{O2}/L ou (b) 1-2mg_{O2}/L, en fonction du TSS_BH. 263

Figure VI-5 : Evolution des concentrations en biomasses en fonction TSS_BH dans le cas « distribution homogène des populations » et pour une concentration en oxygène comprise entre : (a) 6-7mg_{O2}/L ou (b) 1-2mg_{O2}/L dans le liquide. 264

Figure VI-6 : Distribution des populations d'après le modèle considérant la croissance des bactéries filamenteuses dans le cas d'un ratio « DCO/N élevé » avec un détachement volumique dynamique. La figure (b) représente un zoom de la figure (a). 267

Introduction

Les biofilms représentent certainement le premier système microbien observé au microscope par Antonie van Leeuwenhoek en 1674, savant néerlandais reconnu pour ses travaux en microbiologie (De Kruif, 1927). Cet intérêt se justifie : les biofilms se retrouvent systématiquement dans un système aqueux, où les surfaces sont rapidement colonisées par des microorganismes.

334 ans plus tard, les biofilms constituent encore un système microbien mal connu. Pourtant, ils sont largement répandus dans les environnements naturels et industriels. Leur présence peut revêtir un caractère bénéfique et recherché ou à l'inverse, un caractère néfaste et préjudiciable. Leur développement est en effet à l'origine de problèmes économiques et sanitaires réguliers. Les biofilms engendrent ainsi des complications en hygiène dentaire, lors de maladies infectieuses ou lors d'implants médicaux (Wanner *et al.*, 2006). Leur développement dans les systèmes de distribution d'eau potable (O'Flaherty et Lens, 1998), dans les industries papetières (Elsmore *et al.*, 1999) ou encore dans les échangeurs de chaleur (Melo et Bott, 1998) illustrent également le caractère potentiellement néfaste de ce type de système microbien. A l'inverse, les biofilms représentent des solutions environnementales intéressantes en raison de leur potentiel de biodégradation, lié aux fonctionnalités des microorganismes qui les composent. Les systèmes biofilms sont régulièrement utilisés en traitement des eaux pour l'élimination des pollutions carbonées et azotées (Morgenroth et Wilderer, 2000 ; Elenter *et al.*, 2007), des hydrocarbures, des pesticides, ou des composés médicamenteux.

Les agrégats biologiques de type biofilm et le milieu liquide forment deux phases distinctes et cela engendre trois conséquences majeures :

D'un point de vue « réacteurs », la fixation des cellules (ou la formation des biofilms) conduit à un découplage entre le Temps de Séjour des Solides (TSS) et le Temps de Séjour Hydraulique (TSH), ce qui permet théoriquement d'augmenter la concentration en biomasse. Cette capacité est particulièrement intéressante pour les microorganismes à faible taux de croissance, comme par

exemple les bactéries méthanogènes ou les bactéries autotrophes parmi lesquelles les bactéries nitrifiantes. Il en résulte un accroissement des capacités volumiques des réacteurs. Néanmoins des limites existent : l'augmentation de la concentration en cellules dans les biofilms engendre une augmentation de l'épaisseur du biofilm pour une surface spécifique de support constante. En conséquence, du fait des limitations par le transfert des substrats, l'activité de l'ensemble des cellules ne peut être maintenue optimale.

Les substrats doivent traverser l'interface liquide-solide et être transportés au sein du biofilm pour être consommés par les cellules. Ce transport se fait généralement par diffusion et résulte de gradients de concentrations dans l'agrégat. La profondeur de pénétration des substrats dépend de la porosité du biofilm, de la concentration des substrats dans le liquide, du transfert de matière à l'interface biofilm-liquide et du taux de réaction. Pour des substrats peu solubles comme l'oxygène, la profondeur de pénétration est relativement faible.

Du fait des gradients de concentrations pour les substrats, un gradient de taux de croissance devrait exister également au sein de l'agrégat. Dans le cas d'un système multi-espèces, ces gradients vont conduire à une structure stratifiée, dans laquelle les micro-organismes ayant le taux de croissance le plus élevé sont retrouvés à la surface du biofilm, alors que ceux ayant un taux de croissance plus faible se retrouvent à l'intérieur. A priori donc les micro-organismes à faible taux de croissance pourraient être protégés des contraintes hydrodynamiques et donc pourraient subir un détachement moindre.

L'utilisation de bactéries nitrifiantes au sein d'un réacteur appliqué au traitement des eaux usées est indispensable pour réaliser la première étape d'élimination de la pollution azotée. Cependant, le maintien de la nitrification au sein d'un procédé biologique de traitement constitue un des points sensibles du dimensionnement et de l'opération des stations d'épuration. Vraisemblablement, la compétition microbienne entre les bactéries autotrophes et hétérotrophes est à l'origine de nombreux dysfonctionnements des réacteurs tels que des chutes des taux observés de réactions ou des pertes de nitrification.

La réaction de nitrification permet de transformer les ions ammoniums en nitrates, ce qui nécessite en outre la consommation d'oxygène. Les bactéries hétérotrophes sont responsables de l'élimination de la pollution carbonée qui a lieu sous différents environnements, aérobie ou anoxique ou anaérobie. L'accepteur d'électron privilégié est cependant l'oxygène. Par conséquent, une compétition pour ce substrat commun va exister entre ces deux populations de microorganismes au sein du système. La compétition pour les substrats ne concerne pas seulement l'accepteur final d'électrons, mais également l'azote. En effet, l'azote est utilisé par les bactéries autotrophes pour réaliser la nitrification, mais aussi par l'ensemble des bactéries, puisqu'il est l'un de leurs composants cellulaires.

Il pourrait y avoir aussi compétition pour l'espace, ou encore une compétition dépendant de la résistance des populations à des environnements contraignants (pH, inhibiteurs, toxiques, température...), à des contraintes physiques (cisaillement...). On le voit les processus de compétitions sont nombreux et certainement interdépendants.

A l'heure actuelle, les mécanismes gouvernant la compétition entre populations nitrifiantes et hétérotrophes ne sont pas clairement identifiés. Une caractérisation et analyse plus précises des facteurs impactant la compétition microbienne entre les bactéries autotrophes et hétérotrophes est par conséquent souhaitée, c'est l'enjeu scientifique principal de cette thèse.

Plusieurs questions se posent alors :

- Quelle est la distribution des populations au sein d'un biofilm et de quoi dépend cette distribution ? Quel est alors la concentration locale des populations et ainsi quel est le temps de séjour local de celles-ci ?
- Quel est le rôle du détachement qui est notamment influencé par l'hydrodynamique, la structure du biofilm, la nature des populations, la charge organique... ?
- Comment réagissent les populations dans des conditions de limitations nutritionnelles ? lors d'accoups de charge organique ? lors de changement du ratio DCO/N ?

- La prédiction des capacités de nitrification passe par la réponse à ces questions !

Ainsi, ce travail de thèse vise à caractériser le comportement d'un consortium bactérien associé sous forme de biofilm, et développé dans un environnement maîtrisé en termes de conditions de croissance et hydrodynamiques. Il s'agit donc d'identifier et d'analyser les mécanismes de compétition microbienne entre les bactéries autotrophes et hétérotrophes au sein d'un biofilm éliminant l'azote. L'impact de différents phénomènes sera étudié :

- Le détachement, qui représente l'élimination de particules plus ou moins larges de biofilm, et qui peut se produire selon différents mécanismes (continus ou dynamiques, surfaciques ou volumiques). Dans les réacteurs à biomasse fixée, le détachement est primordial puisqu'il permet de prévenir du colmatage du système. Ce phénomène a par ailleurs un impact direct sur les performances globales du réacteur car il détermine le TSS_{global} et, comme nous le verrons, la distribution des TSS_{locaux} .
- Les conditions environnementales de croissance en termes de ratio DCO/N et DCO/O₂. Des modifications des conditions de croissance peuvent se produire lors de variations des caractéristiques physico-chimiques de l'effluent à traiter. Il s'agit notamment d'identifier comment les bactéries autotrophes coexistent avec les bactéries hétérotrophes sous un régime de limitation en azote ou en oxygène.
- La modélisation permet de tester des hypothèses, de prévoir les conditions expérimentales optimales pour appréhender un processus, et aide à l'interprétation de résultats. Nous nous appuyerons donc sur un modèle développé sous Aquasim®. Les résultats de simulations seront confrontés aux résultats d'expériences.

Ce manuscrit est organisé en six chapitres.

Le *Chapitre I* constitue une synthèse bibliographique. Il comporte cinq parties. La première partie introduit la problématique du sujet et son contexte. La seconde partie présente les différentes fonctionnalités mises en jeu au sein d'un système biofilm éliminant la pollution carbonée et azotée. La nitrification, la dénitrification et l'élimination de la DCO sous des conditions aérobies sont détaillées. La troisième partie définit les propriétés globales de ce type de système (transfert de matière, hétérogénéités,...). La quatrième partie présente les différentes interactions microbiennes, et plus particulièrement le phénomène de compétition microbienne. A la fois la compétition dans le cas d'un modèle planctonique et dans le cas d'un modèle à biomasse fixée, sont analysées. Il s'agit de définir le comportement d'un consortium bactérien selon ses conditions de croissance (compétition pour un seul substrat, compétition multi-substrats), et selon les conditions hydrodynamiques (limitation par la convection, par la diffusion, impact du détachement). Enfin, une cinquième partie conclut ce chapitre par une présentation des différents outils mathématiques utilisés pour modéliser la croissance des biofilms.

Le *chapitre II* présente ensuite les outils utilisés lors de la mise en œuvre expérimentale de ce travail. Les biofilms ont été développés au sein de réacteurs de Couette-Taylor, sous des environnements caractérisés et contrôlés en termes de conditions de croissance et hydrodynamiques. Les méthodes de caractérisation des biofilms, du détachement et des fonctionnalités sont définies.

Le *chapitre III* a pour objectif de présenter la structure du modèle qualitatif développé sous AQUASIM®. Ce modèle est tel que sa structure et ses prédictions sont en accord avec les différentes observations expérimentales de cette étude. Différentes hypothèses simplificatrices ont été réalisées et sont discutées tout au long de ce chapitre. Les processus biologiques et physiques considérés par le modèle sont présentés.

En dernière partie de ce chapitre, le comportement du modèle dans un cas « standard » est évalué à travers l'analyse des flux, des taux observés de réactions, et des concentrations en biomasses.

Cette méthodologie d'analyse est répétée tout au long de la thèse, quelle que soit l'origine des résultats (numériques ou expérimentaux). Le plan d'étude développé pour répondre à la problématique est introduit en fin de chapitre. Il présente les différents cas d'étude testés au cours de ce travail : « détachement surfacique continu », « détachement volumique dynamique », « ratio DCO/N élevé » et « ratio DCO/O₂ élevé ». Tout au long de cette thèse, le fonctionnement du système biofilm sous l'un de ces cas d'étude est analysé par comparaison avec son comportement dans le cas « standard ».

Le *chapitre IV* a pour objectif d'identifier l'impact du mode de détachement sur la compétition entre bactéries autotrophes et hétérotrophes. Le comportement du système biofilm est étudié dans les cas « détachement surfacique continu » et d'un « détachement volumique dynamique ». Dans un premier temps, la problématique et les objectifs du chapitre sont présentés. En raison du peu de données disponibles dans la littérature, le détachement des biofilms est ensuite caractérisé expérimentalement (seconde partie). L'impact des résultats de cette caractérisation sur le processus de détachement considéré dans le modèle est présenté dans la troisième partie. Les quatrième et cinquième parties présentent respectivement les résultats concernant l'impact du mode de détachement sur la compétition microbienne (analyse des flux, taux observés de réactions et masses accumulées) et sur les TSS. En fin de chapitre, une conclusion et une discussion concernant l'impact du mode de détachement sur la compétition entre bactéries autotrophes et hétérotrophes sont présentées (sixième et septième partie).

Le *chapitre V* se focalise sur l'impact des conditions de croissance sur la compétition microbienne entre les bactéries autotrophes et hétérotrophes. Les cas « ratio DCO/N » et « ratio DCO/O₂ » sont considérés dans ce chapitre. La première partie introduit les objectifs du chapitre.

Les prédictions des régimes de croissance testés (limitation en substrats ou en oxygène) sont présentées dans une deuxième partie. Dans une troisième partie, une analyse du comportement du système biofilm dans les cas « ratio DCO/N » et « ratio DCO/O₂ » est réalisée.

Enfin, pour conclure ce chapitre sur l'impact des conditions de croissance sur la compétition entre bactéries autotrophes et hétérotrophes, l'ensemble de ces résultats est discuté.

Une évaluation de différents processus est réalisée dans le *chapitre VI*. En effet, à travers les *chapitres IV* et *V*, il apparaît que le comportement du système biofilm n'est pas correctement prédit par le modèle sous certaines conditions d'environnement de croissance. Ces écarts entre les résultats expérimentaux et numériques nécessitent donc d'être discutés. Notamment, il s'agit d'évaluer l'impact de phénomènes biologiques ou physiques annexes, sur la compétition microbienne entre bactéries autotrophes et hétérotrophes.

Enfin, ce manuscrit se termine par l'analyse des principales conclusions de ce travail, et par une présentation des différentes perspectives qui ont été identifiées à plus ou moins long terme.

Chapitre I : Synthèse bibliographique

I.1 Introduction aux biofilms et à la problématique du sujet

I.1.1 Définition

Une définition simpliste présente les biofilms comme «un ensemble de microorganismes attachés à une surface » (Wanner *et al.*, 2006). Plus précisément, il s'agit « d'une couche de microorganismes organisés au sein d'une matrice biologique d'exo-polymères fixée à une surface » (Wanner *et al.*, 2006). Le biofilm est la forme la plus répandue de la vie microbienne. En milieu aqueux, la quantité de cellules en suspension ne représente en effet que 0,01% de la quantité de cellules totale (Costerton *et al.*, 1995).

I.1.2 Avantages de la biomasse fixée par rapport à la biomasse en suspension

La capacité des cellules à se développer sous forme de biofilm leur confère des avantages décisifs par rapport aux cellules en suspension. Premièrement, la biomasse en suspension peut être éliminée par l'écoulement liquide, alors que les bactéries du biofilm sont davantage protégées de ce phénomène de lessivage (Wanner *et al.*, 2006). Cependant, cet avantage n'est valable que dans le cas où le temps de rétention des solides en suspension est inférieur à leur taux de croissance spécifique (van Benthum *et al.*, 1998). Dans le cas inverse, la biomasse se développera toujours en suspension. La biomasse en suspension n'est en effet pas limitée par l'apport en substrat. Deuxièmement, le biofilm joue un rôle de «barrière», aussi bien pour les composés néfastes à la croissance bactérienne que pour les substrats. La structure biofilm permet aux bactéries qui le composent de se développer dans des « niches », écologiquement plus favorables, en termes de croissance et de survie, que le milieu environnant. L'activité microbienne peut, en effet, engendrer une modification du microenvironnement (en termes de pH, de concentration en biocides, d'oxygène...) pour le rendre plus hospitalier (Rittman et MacCarty, 1982).

Par conséquent, le temps de séjour de la biomasse fixée est globalement élevé par rapport à celui de la biomasse en suspension. Le principal avantage des systèmes de type biofilm est alors de permettre le développement de microorganismes caractérisés par un faible taux de croissance spécifique (*i.e.* traitement simultané DCO-azote, traitement des micropolluants, etc.).

I.1.3 Les biofilms en traitement de l'eau

Certains biofilms peuvent avoir des effets « bénéfiques », fournissant des solutions environnementales à l'homme ou assurant le bon fonctionnement des différents écosystèmes terrestres.

Les biofilms sont ainsi utilisés comme solution environnementale dans le traitement des eaux usées depuis la fin du XIX^{ème} siècle. Une multitude de réacteurs est basée sur des systèmes à biomasse fixée. Le premier répertorié, le lit bactérien (Figure I-1a), a été installé en Angleterre en 1893 (Tchobanoglous *et al.*, 2003).

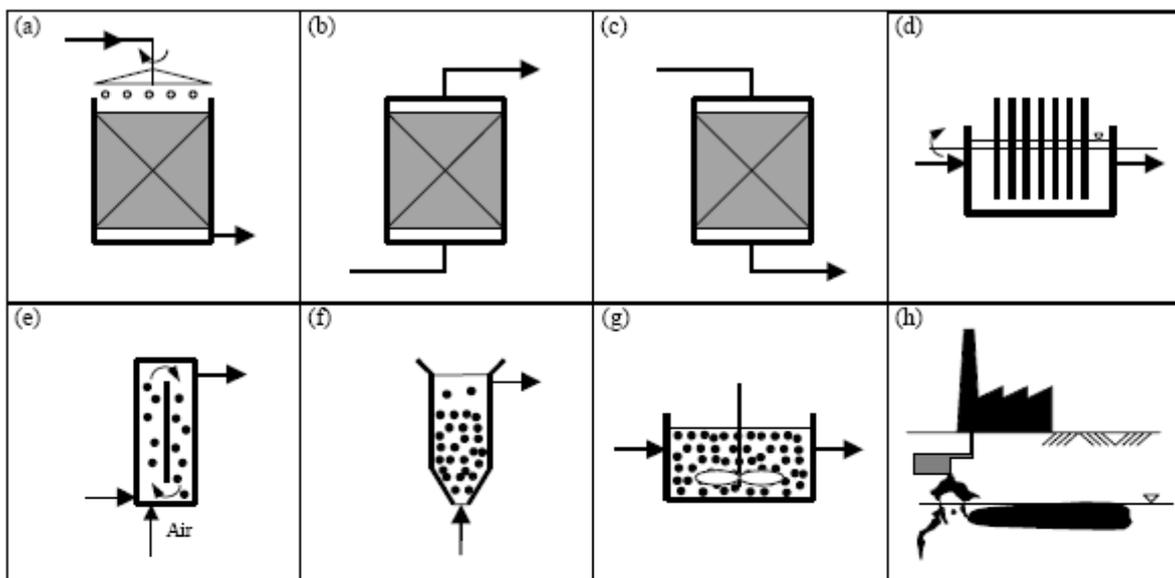


Figure I-1 : Récapitulatif des différents domaines de développement des biofilms « positifs » et « néfastes »

(Wanner *et al.*, 2006).

Dans les années 70, les contacteurs à biodisques ont été développés (Figure I-1d). Le peu de maintenance demandée et leur stabilité sont les deux principaux avantages des lits bactériens et des contacteurs à biodisques. Les années 80 ont vu l'émergence de nouveaux procédés, les biofiltres (Figure I-1b,c). Ceux-ci autorisent des taux de conversion volumiques plus élevés. Cependant les biofiltres sont sujets au colmatage, ce qui nécessite de réaliser des lavages réguliers pour prévenir ce type de phénomènes. Une alternative intéressante est l'utilisation de lits fluidisés (Figure I-1f) ou de réacteurs de type « airlift » (Figure I-1e). Le fonctionnement des lits fluidisés est basé sur l'augmentation de la vitesse d'écoulement du liquide afin de fluidiser les supports. Dans les réacteurs de type « airlift », la mise en mouvement des supports est assurée par insufflation d'air. Au sein des lits mobiles (Figure I-1g), la mise en mouvement des biofilms fixés sur les supports est réalisée à l'aide d'un agitateur mécanique. Les biofilms « bénéfiques » sont également présents dans les environnements naturels. Leur présence dans les sols contaminés permet d'éliminer les polluants contenus dans ces milieux poreux ou dans les eaux souterraines (Figure I-1h).

Dans les rivières, les lacs ou les fleuves, le développement des biofilms sur les rochers et dans les sédiments représente également une alternative environnementale intéressante, notamment pour l'élimination des pesticides.

Par ailleurs, d'autres biofilms peuvent être qualifiés de « néfastes » dans la mesure où ils engendrent des risques pour la santé humaine et des problèmes techniques et économiques. Les biofilms « néfastes » se développent dans de nombreux environnements, engendrant ainsi des risques pour la santé humaine (implants médicaux, biofilms dentaires, etc.) et des problèmes économiques (corrosion des réseaux, corrosion des coques de bateaux, colmatage, etc.). Afin de rester en accord avec le contexte de cette étude qui concerne les biofilms utilisés en traitement des eaux, cette partie n'est pas approfondie.

Pour l'ensemble de ces réacteurs, les conditions opératoires et les contraintes appliquées aux biofilms peuvent être très différentes. Par exemple, des gradients de concentrations au sein du réacteur ou dans le temps peuvent exister. De même, des contraintes d'abrasion ou d'érosion plus ou moins fortes conduisent à des modes de détachement du biofilm bien différents. Les biofilms ont des épaisseurs plus ou moins élevées qui induisent différentes niches écologiques en leur sein. Enfin, une compétition plus ou moins forte avec la biomasse en suspension peut intervenir. Toutes ces conditions conduisent à des situations complexes. Par conséquent, il convient de décrire, comprendre et hiérarchiser leurs influences respectives.

I.1.4 La problématique de la compétition autotrophes-hétérotrophes au sein d'un biofilm nitrifiant

Les systèmes biofilms sont caractérisés par les gradients de concentrations induits par la diffusion, alors que dans un système conventionnel de type « boue activée », ce phénomène est considéré comme mineur (Morgenroth et Wilderer, 2000). Ainsi, dans un système biofilm appliqué au traitement des eaux, les conditions de croissance des microorganismes dépendent de leur localisation dans le biofilm. Le transport d'oxygène ou d'azote peut par exemple limiter la croissance à la base. En revanche, les microorganismes se développant à la base du biofilm sont protégés du détachement, alors que les bactéries à la surface sont rapidement éliminées (Rittman, 1989). Ces deux phénomènes déterminent directement les dynamiques de population et donc les taux observés de réactions, c'est-à-dire les performances globales du réacteur. Dans de nombreuses situations, les biofilms représentent des « niches » écologiques pour un large consortium bactérien.

En raison de cette large diversité de microorganismes qui les composent, ils sont le siège de nombreuses compétitions microbiennes pour l'espace et les substrats.

En traitement des eaux, les systèmes biofilms sont généralement utilisés pour l'élimination simultanée de la DCO et de l'azote. L'avantage des biofilms est de pouvoir maintenir des bactéries caractérisées par un faible taux de croissance, grâce à un temps de séjour élevé. Par conséquent, la coexistence des hétérotrophes et des autotrophes est désirée. Ces deux groupes de microorganismes sont cependant en compétition pour l'espace, pour l'oxygène (leur accepteur final commun), et pour l'azote (Elenter *et al.*, 2007). Cette compétition se traduit par une distribution spatiale hétérogène des microorganismes à travers le biofilm. Ce phénomène de compétition et cette stratification microbienne affectent la stabilité et les performances du système biofilm (Fdz-Polanco *et al.*, 2000). A l'heure actuelle, deux facteurs ont été identifiés comme influençant la compétition microbienne : les conditions de croissance en termes de ratio DCO/N et de charges organiques (induisant une limitation par l'oxygène) (Okabe *et al.*, 1996; Okabe *et al.*, 1995; Ohashi *et al.*, 1995) et le détachement (Morgenroth et Wilderer, 2000; Elenter *et al.*, 2007; Rittman, 1989). Cependant, nous verrons lors de l'étude des résultats bibliographiques concernant ces aspects que les mécanismes de compétition ne sont pas encore clairement compris et analysés. Par exemple, l'influence de la nature du détachement sur les dynamiques de populations et les performances épuratoires n'est pas claire (Elenter *et al.*, 2007). Les caractéristiques structurelles physiques des biofilms sont peu considérées également. L'objectif de cette thèse est donc d'identifier les mécanismes biologiques et physiques affectant la compétition autotrophes-hétérotrophes au sein d'un système complexe type biofilm nitrifiant.

I.2 Les différentes fonctionnalités d'un biofilm mixte autotrophes-hétérotrophes au sein du biofilm nitrifiant

I.2.1 La fonction de nitrification

La nitrification biologique est définie comme l'oxydation des ions ammonium (NH_4^+) en nitrates (NO_3^-) *via* les nitrites (NO_2^-), par deux groupes de bactéries chimolithotrophes, les « ammonium-oxydantes » (représentées par le genre *Nitroso-*) et les « nitrites-oxydantes » (genre *Nitro-*).

Les bactéries de la nitrification sont « autotrophes », utilisant le dioxyde de carbone comme source de carbone minéral. Par ailleurs, l'oxydation des ions ammoniums ou des nitrites représente la seule source d'énergie. Le développement des bactéries nitrifiantes et le processus de nitrification sont optimums pour des conditions de températures mésophiles (entre 15 et 40°C) et pour des valeurs de pH proches de la neutralité.

En raison du faible gain d'énergie obtenu à partir de l'oxydation de l'ion ammonium ou des nitrites, leur taux de croissance et leurs rendements d'assimilation sont faibles, notamment si on les compare à ceux des bactéries hétérotrophes. Leur cinétique de croissance est donc lente par rapport à celle des hétérotrophes.

I.2.1.1 Diversité des bactéries nitrifiantes

Les ammonium-oxydantes et les nitrites-oxydantes forment la famille des Nitrobacteraceae. Toutes les espèces sont Gram-négatif mais présentent néanmoins de nombreuses différences morphologiques.

Les ammonium-oxydantes

Il existe cinq genres de bactéries oxydants les ions ammoniums (Bergey, 1985): *Nitrosomonas*, *Nitrosococcus*, *Nitrosospira*, *Nitrosolobus* et *Nitrosovibrio*. L'espèce la plus étudiée est *Nitrosomonas europaea*. Pendant longtemps, *Nitrosomonas europaea* a été la seule espèce reconnue du genre *Nitrosomonas*, mais des études récentes montrent qu'il en existe en réalité au moins dix. Ces différentes espèces présentent des différences en termes de paramètres cinétiques (μ_{\max} , K_{O_2} , K_{NH_4} , etc.).

Les nitrites-oxydantes

Il en existe quatre genres : *Nitrobacter*, *Nitrococcus*, *Nitrospira*, et *Nitrospina*. Pendant longtemps, le genre *Nitrobacter* a été considéré comme la bactérie nitrite-oxydante clé dans le traitement de l'eau (Grady et Lim, 1980). Il est composé de quatre espèces : *Nitrobacter winogradskyi*, *Nitrobacter hamburgensis*,

Nitrobacter vulgaris et *Nitrobacter alkalicus*. Le nombre important d'études concernant le genre *Nitrobacter* s'explique cependant par la difficulté à isoler les autres genres. Avec l'apparition de nouvelles techniques d'identification telles que l'hybridation *In Situ*, de nombreuses études ont montré qu'en réalité, c'était l'espèce *Nitrosopira* qui était responsable de l'oxydation des nitrites, et que *Nitrobacter* était rarement identifiée dans des systèmes nitrifiants (Juretschko *et al.*, 1998; Schramm *et al.*, 1998; Schramm *et al.*, 1999; Burrell *et al.*, 1998). Cette observation a été confirmée par l'analyse de floes et de biofilms (Juretschko *et al.*, 1998; Koops et Pommering-Röser, 2001). Plus précisément, il semble que les deux espèces cohabitent, mais que *Nitrosopira* soit adaptée à de faibles concentrations en nitrites et oxygène, alors que *Nitrobacter* se développerait à de fortes concentrations (Schramm *et al.*, 1999).

I.2.1.2 Biochimie des bactéries nitrifiantes

Etape de nitritation :

La première étape de la nitrification est l'étape de nitritation. La réaction classique de nitritation est telle que:

Équation I-1



Cette réaction fournit entre 58 et 84kcal.(mol N)⁻¹ soit environ 276 à 351kJ.(mol N)⁻¹ et consomme 3,43g d'oxygène par gramme d'azote transformé en nitrites.

Plus précisément, la réaction de nitritation présente différents intermédiaires. Plusieurs études montrent que le substrat utilisé n'est pas NH₄⁺ mais le NH₃ (Bergey, 1985; Hellinga *et al.*, 1998; Pambrun, 2005; Bock *et al.*, 1991). Par ailleurs, des études montrent que le coefficient de saturation K_s relatif à l'oxydation de l'azote ammoniacal total (NH₄⁺ et NH₃) diminue fortement (donc l'affinité pour le substrat augmente) lorsque le pH passe de 6,5 à 9,1 (Suzuki *et al.*, 1974).

A l'inverse, le coefficient de saturation du NH_3 reste constant quel que soit le pH. Le déplacement de l'équilibre $\text{NH}_4^+/\text{NH}_3$ vers la forme non ionisée rejoint l'hypothèse selon laquelle NH_3 est le substrat des bactéries nitrifiantes.

Si l'on se réfère au substrat NH_4^+ , l'équation de nitrification peut être schématisée comme sur la Figure I-2.

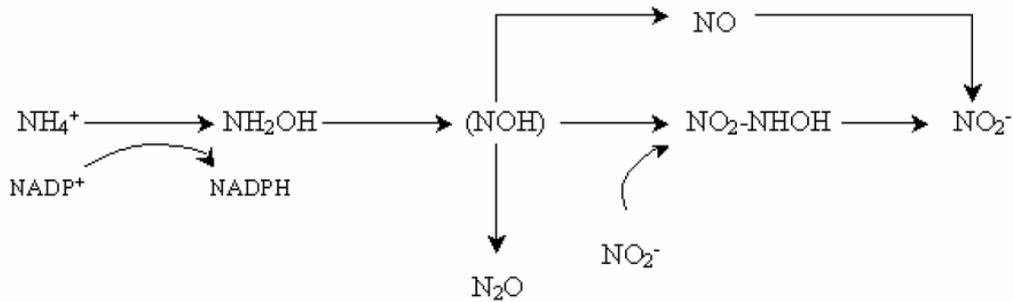
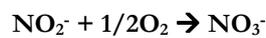


Figure I-2 : Réaction de nitrification avec les différents intermédiaires.

Etape de nitrification

La réaction de nitrification (oxydation des nitrites) s'effectue selon la relation suivante :

Équation I-2



Cette réaction fournit entre 64,4 et 87,5 $\text{kJ} \cdot (\text{molN})^{-1}$ et consomme 1,14g d'oxygène par gramme d'azote nitraté.

I.2.1.3 Stœchiométrie, croissance et coefficients de rendement

Le métabolisme des bactéries nitrifiantes peut être schématisé comme sur la Figure I-3. L'énergie générée par l'oxydation de NH_4^+ est utilisée pour générer du pouvoir réducteur (permettant de fixer le CO_2), ainsi que pour la croissance cellulaire.

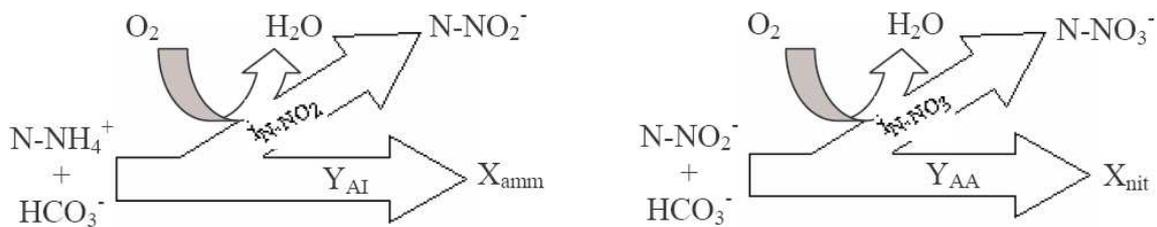


Figure I-3 : Métabolisme des bactéries nitrifiantes.

Les réactions stœchiométriques présentées dans la littérature sont relatives aux deux étapes de la nitrification :

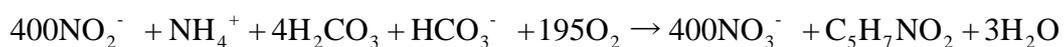
Etape de nitritation :

Équation I-3



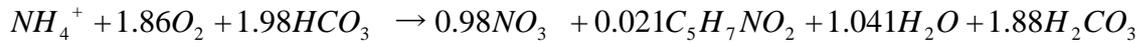
Etape de nitratisation :

Équation I-4



Equation globale de nitrification :

Équation I-5



A partir des équations précédentes, il est possible de déterminer les rendements associés. Ceux-ci sont résumés dans le **Error! Reference source not found.** L'oxydation d'un gramme d'azote ammoniacal nécessite 4,57g d'oxygène soit 3,43gO₂/gN-NH₄⁺ pour la nitritation et 1,14gO₂/gN-NO₂⁻ pour la nitratisation.

Tableau I-1: Rendements de la réaction de nitrification

	Nitritation	Nitratisation
Rendement biomasse / Noxydé en gX/gNoxydé	0,15	0,02
Rendement biomasse / O ₂ consommé en gX/gO ₂	0,047	0,018
Rendement O ₂ consommée / Noxydé en gO ₂ /gNoxydé	3,43	1,16

I.2.2 Fonction d'élimination de la DCO

L'élimination de la pollution organique est réalisée par les bactéries hétérotrophes. Celles-ci utilisent soit l'oxygène (dégradation par voie aérobie), soit les nitrates (dégradation par voie anoxyque) comme accepteur final d'électrons. La dégradation de la pollution organique par voie anoxyque est appelée dénitrification. Cette réaction fait intervenir différents composés intermédiaires tels que les nitrites, l'oxyde nitrique et le protoxyde d'azote.

I.2.2.1 Diversité des bactéries hétérotrophes

Les bactéries hétérotrophes sont principalement des bactéries hétérotrophes aérobies (*Pseudomonas*, *Alcaligènes...*). On distingue les bactéries aérobies strictes et facultatives.

Ces dernières ont la faculté d'utiliser soit l'oxygène soit les formes oxydées de l'azote comme accepteur final d'électrons dans la chaîne respiratoire.

Remarquons cependant que certaines bactéries autotrophes (comme *Paracoccus* ou *Thiobacillus*) sont capables de réaliser la dénitrification en utilisant les bicarbonates ou le dioxyde de carbone comme source de carbone. Les sources d'électrons sont respectivement le di-hydrogène et les composés sulfurés pour les espèces *Paracoccus* et *Thiobacillus*.

I.2.2.2 Biochimie des bactéries hétérotrophes

Dégradation par voie aérobie

La réaction simplifiée d'élimination de la pollution organique est, selon Metcalf et Eddy (1998):

Équation I-6



Avec le terme C.O qui définit les composés organiques dégradés et le terme $C_5H_7NO_2$ qui représente les nouvelles cellules synthétisées.

Dénitrification

Le terme de dénitrification définit le processus de dégradation de la pollution organique par voie anoxique. La première étape de la dénitrification est la conversion des nitrates en nitrites. Cette première étape est ensuite suivie par la production de monoxyde d'azote, puis de protoxyde d'azote et enfin d'azote gazeux. Différentes enzymes appelées « réductases » permettent de catalyser cette réaction, comme l'illustre la figure I-4:

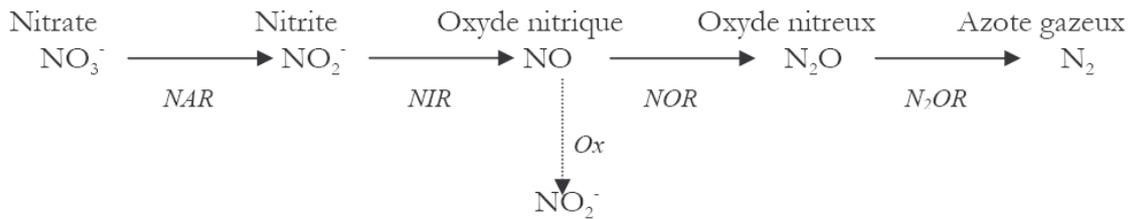


Figure I-4 : Réaction de dénitrification catalysée par des nitrates (NAR), des nitrites (NIR), oxyde nitrique (NOR), oxyde nitreux (N2OR) réductases.

I.2.2.3 Stœchiométrie, croissance et coefficients de rendement

Dégradation par voie aérobie

Le métabolisme de dégradation de la pollution organique par voie aérobie est schématisé Figure I-5:

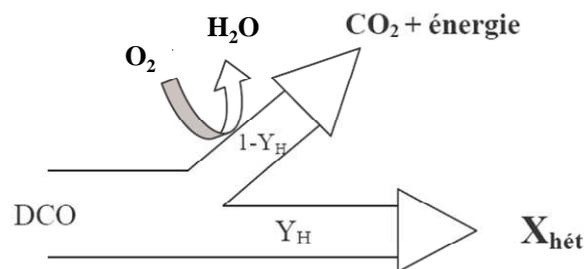


Figure I-5 : Métabolisme aérobie des bactéries hétérotrophes.

Avec :

Y_H : le rendement de conversion de la DCO en biomasse en $\text{gX.gDCO}_{\text{oxydée}}^{-1}$

$1-Y_H$: consommation de la DCO pour la réduction de l'oxygène, en gDCO.gO_2^{-1}

$X_{\text{hét}}$: concentration en bactéries hétérotrophes dénitrifiantes en $\text{gX}_H.\text{L}^{-1}$

On distingue la voie de synthèse de nouvelles cellules (terme Y_H) et la voie de production d'énergie ($1 - Y_H$). La valeur du terme Y_H est variable selon la nature du substrat, l'état physiologique de la biomasse, les caractéristiques de l'alimentation (charge polluante, ratio DCO/N), etc.

Dégradation par voie anoxique

On schématise le métabolisme global de la réaction de dénitrification comme indiqué Figure I-6:

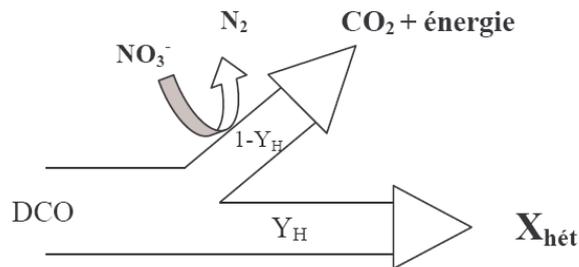


Figure I-6 : Métabolisme anoxique des bactéries hétérotrophes.

Avec :

Y_H : le rendement de conversion de la DCO en biomasse en $\text{gX.gDCOoxydée}^{-1}$

$1 - Y_H$: consommation de la DCO pour la réduction des nitrates, en gDCO.gNO_3^{-1}

$X_{\text{hét}}$: concentration en bactéries hétérotrophes dénitrifiantes en gX.H.L^{-1}

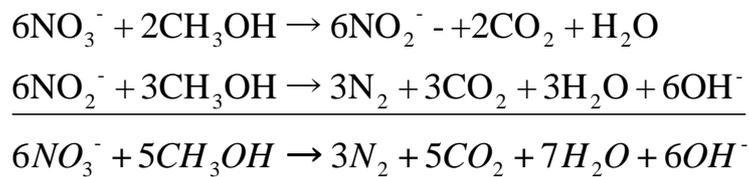
De même que pour la dégradation aérobie de la matière organique, la charge polluante en conditions anoxiques est utilisée à la fois pour fournir de l'énergie (terme $1 - Y_H$) et pour la croissance de nouvelles cellules (terme Y_H).

La réaction de dénitrification est généralement divisée en deux étapes distinctes. La première correspond à la réduction des nitrates en nitrites, et la seconde est relative à la réduction des nitrites en azote moléculaire.

La cinétique de dénitrification (transformation des nitrates en nitrites) est plus lente que la cinétique de dénitrification (réduction des nitrites en azote moléculaire) ce qui explique que l'on n'observe généralement pas d'accumulation de nitrites.

Les réactions simplifiées de dénitrification utilisant le méthanol comme source de carbone sont les suivantes (Verstraete et Philips, 1998) :

Équation I-7



Les ions OH^- produits entraînent une augmentation du pH au cours de la réaction de dénitrification. Le rapport C/N est de 0,71gC/gN- NO_3^- . Pour assurer une dénitrification complète à partir des nitrates, le rapport DCO/N doit être supérieur à 2,86g O_2 /gN- NO_3^- . Si on réalise la dénitrification à partir des nitrites, ce rapport est de 1,71.

Une partie de la matière organique est utilisée pour la croissance cellulaire. Le rapport DCO/N est donc supérieur à 2,86, et est fonction du rendement de conversion Y_{obs} .

Équation I-8

$$\frac{\Delta\text{DCO}}{\Delta\text{N} - \text{NO}_3^-} = \frac{2.86}{1 - Y_{\text{obs}}} \quad \text{Ou} \quad \frac{\Delta\text{DCO}}{\Delta\text{N} - \text{NO}_2^-} = \frac{1.71}{1 - Y_{\text{obs}}}$$

I.2.3 Cinétiques de réactions

I.2.3.1 Cinétique de croissance

Classiquement, on utilise une équation du type suivant pour décrire la dynamique de croissance de la biomasse r_c (gDCO_x.j⁻¹).

Équation I-9

$$r_c = \mu \cdot X$$

Le terme μ , exprimé en j⁻¹, représente le taux de croissance spécifique de la biomasse X. Il s'exprime en fonction de différents paramètres comme représenté ci-dessous:

Équation I-10

$$\mu = \mu_{\max} \cdot f(T) \cdot f(Inhibition) \cdot f(pH) \cdot \frac{C_{S1}}{K_{S1} + C_{S1}} \cdot \frac{C_{S2}}{K_{S2} + C_{S2}} \dots$$

L'Équation I-10 fait également apparaître une constante de Monod (K_s) qui s'apparente à l'inverse d'une constante d'affinité des bactéries vis-à-vis d'un substrat S. Lorsque la concentration en substrat dans le milieu est élevée (on dit que le substrat est « non limitant »), le taux de croissance est alors indépendant de la concentration en substrat C_s et il est directement proportionnel à la quantité de biomasse active présente dans le milieu. Notons que la valeur de K_s est parfois une valeur apparente incluant les limitations par la diffusion du substrat S au sein d'un agrégat (granule, biofilm). Ce fait explique les grandes variabilités que l'on trouve pour les valeurs des constantes de Monod dans la littérature. Le choix des valeurs de ces constantes sera discuté au *chapitre III* qui présente le modèle développé au cours de ce travail de thèse. L'impact du choix de ces valeurs par rapport à la problématique de ce sujet est également discuté au *chapitre V*. Le *chapitre V* concerne l'impact des ratios DCO/N et DCO/O₂ sur la compétition entre bactéries autotrophes et hétérotrophes.

I.2.3.2 Cinétique de consommation du substrat

Il est également possible d'exprimer la cinétique de consommation de substrat en $\text{gDCO}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ telle que :

Équation I-11

$$r_s = \frac{\mu}{Y_{SX}} X$$

Avec :

Y_{SX} : rendement de conversion de substrat S en cellules X ($\text{gDCO}_x\cdot\text{gS}^{-1}$)

X : la concentration en biomasse active en gDCO/L .

μ : le taux spécifique de croissance des microorganismes en h^{-1} .

I.2.3.3 Cinétique de décès

Pour un âge de boue élevé, le processus de lyse cellulaire intervient de manière significative. Par conséquent, sa modélisation est devenue crucial. Ce mécanisme est généralement représenté par une équation unique. Les représentations des mécanismes potentiels responsables d'une diminution de la quantité de biomasse active sont listées et définis dans le tableau ci-dessous. Dans ce tableau, le terme f_{xi} définit la fraction de biomasse inerte produite à partir de la biomasse lysée.

Tableau I-2 : Mécanismes potentiels responsables de la réduction de la masse bactérienne(van Loosdrecht et Henze, 1999).

Concept	Description	Schéma
Mort-Régénération	Décès et lyse cellulaire induisant une réduction de la masse de boue et une diminution du nombre de bactéries actives	
Respiration endogène	Respiration endogène et consommation des réserves internes impliquant une diminution de la masse bactérienne et une réduction des cellules actives	
Maintenance	Consommation du substrat (externe et interne) pour le maintien des cellules conduisant à une réduction de la masse bactérienne sans en réduire le nombre	
Prédation	Prédation augmentée entre les micro-organismes de différentes classes (i.e. bactéries par protozoaires) conduisant à une diminution du nombre de bactéries actives	

La diminution de la production de cellules est associée à une diminution de l'activité des cellules ou une diminution de la masse qui est souvent interprétée comme une diminution du nombre de cellules actives. La lyse cellulaire étant associée au décès des cellules, elle se traduit :

- Soit *via* la respiration endogène, par une oxydation de la matière associée à la libération d'une fraction particulaire biodégradable (Tableau I-2). Ce mécanisme est donc consommateur d'accepteur final d'électron. Ce mécanisme est utilisé généralement pour expliquer la consommation d'oxygène lorsque que l'apport de substrat externe est nul.
- Soit *via* le concept de mort-régénération par une libération de substrat particulaire (X_s). X_s est ensuite hydrolysé avant d'être oxydé. Ce concept comprend également la libération d'une fraction particulaire non biodégradable X_p (Tableau I-2).

Quel que soit le mécanisme considéré, la cinétique de décès est associée à une réaction d'ordre 1 reliée à la concentration en biomasse active :

Équation I-12

$$r_d = -b.X$$

Une fraction de la biomasse lysée (f_{xi}) s'accumule dans le système et est éliminée lors de la purge des boues. En modélisation, le choix du processus représentant la diminution de la quantité de biomasse active est un point important. En effet, les valeurs de la constante b diffèrent suivant le processus choisi. Ce choix sera discuté dans le *chapitre III*.

I.3 Le système biofilm

Comme nous l'avons précisé au début de ce chapitre, le biofilm est défini comme une association de microorganismes regroupés en micro-colonies et organisés au sein d'une matrice polymérique. Ce système peut être schématisé par la figure I-7.

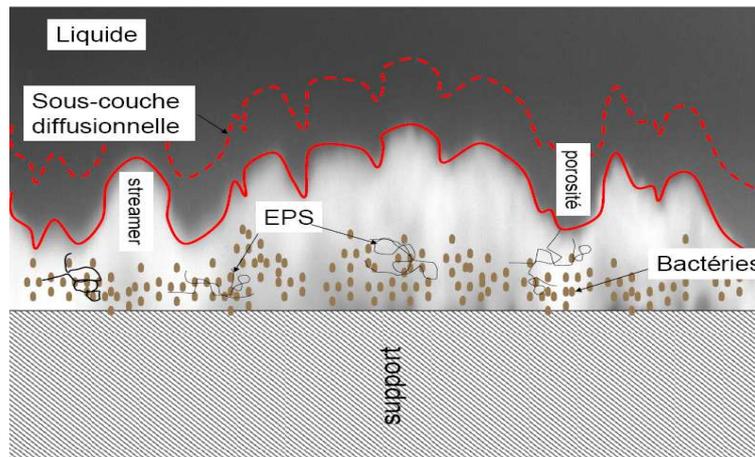
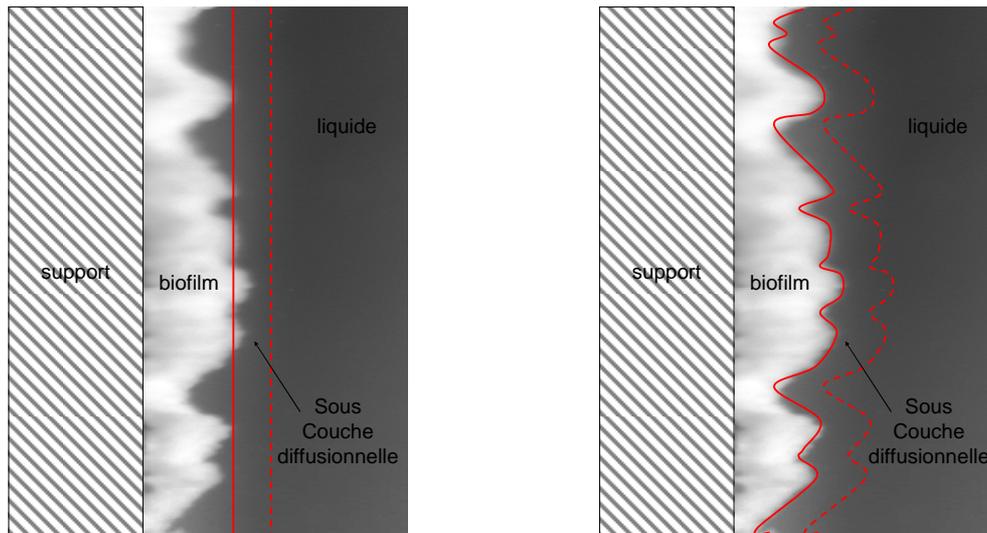


Figure I-7 : Schématisation d'un système biofilm.

Pendant longtemps, les biofilms ont été considérés comme des films biologiques homogènes (Figure I-8a). En modélisation, cette conception s'est traduite par une distribution homogène des composés particuliers et solubles à travers le biofilm.

Le développement de nouvelles technologies telles que la microscopie confocale ou l'analyse d'images a révélé une structure beaucoup plus complexe, composée de pores, de « streamers » (champignons), et autres hétérogénéités (De Beer *et al.*, 1996). Un schéma de la conception d'un biofilm « hétérogène » est donné (Figure I-8b).



a) Conception d'un biofilm « homogène »

b) Conception d'un biofilm « hétérogène »

Figure I-8 : Schématisation des deux principales conceptions pour la représentation des biofilms : (a) conception homogène et (b) conception hétérogène.

La principale caractéristique des biofilms est donc la variation spatiale de leurs propriétés (propriétés microbiennes, physiques, de transfert de matière...), c'est-à-dire leurs hétérogénéités. Ces hétérogénéités peuvent être définies comme « toute variation spatiale d'un paramètre considéré comme important » (Bishop et Rittman, 1995). Ainsi, de nombreux exemples d'hétérogénéités sont cités dans la littérature :

- Hétérogénéités physiques ou morphologiques : épaisseur, rugosité de surface, masse accumulée, densité, porosité, surface de support colonisée, perméabilité, cohésion, élasticité...
- Hétérogénéités chimiques : diversité de composés solubles (substrats, produits) ou de réactions (aérobies, anoxyes...)
- Hétérogénéités biologiques : diversité de populations microbiennes et de leur distribution, diversité d'activités (croissance, production d'EPS, décès...).

Ces hétérogénéités résultent des gradients de concentrations, des conditions de croissance et des conditions hydrodynamiques. Elles se traduisent par une distribution des propriétés du biofilm en fonction de son épaisseur.

Les paragraphes suivants ont pour objectifs de détailler les caractéristiques globales des systèmes biofilms. Il s'agit notamment de décrire les propriétés ou processus spécifiques qui affectent ces systèmes et qui peuvent avoir un impact sur la compétition microbienne.

I.3.1 Composition générale d'un biofilm

La majeure partie du biofilm est composée d'eau. Elle représente plus de 95% en masse d'un biofilm (Sutherland, 2001). A la fois l'eau intracellulaire et l'eau présente dans les pores de la matrice sont considérées. L'eau des pores joue donc un rôle de solvant, dont les propriétés physico-chimiques sont déterminées par la nature et la concentration des solutés qui la composent. Le biofilm est également composé de cellules bactériennes (2-5%), de polysaccharides et protéines (1-2%), de débris cellulaires (ADN, ARN : <1-2%) et d'ions. Les principaux facteurs influençant la composition du biofilm sont son écologie microbienne (bactéries autotrophes, hétérotrophes,...), son environnement de croissance (aérobie, anoxique,...), et les conditions hydrodynamiques (transfert de matières, détachement,...) (Allison *et al.*, 2003).

I.3.1.1 Propriétés physiques d'un biofilm (densité, porosité, tortuosité,...)

La densité est l'un des paramètres régulièrement utilisé dans la littérature pour caractériser la structure d'un biofilm. L'impact des conditions de croissance et hydrodynamiques sur la densité de biofilm a été observé par de nombreux auteurs (Kwok *et al.*, 1998; Wäshe *et al.*, 2000; Characklis et Wilderer 1989; Ohashi et Harada, 1994). Une augmentation de la densité avec la profondeur de biofilm est rapportée (Melo et Vieira, 1999; Zhang et Bishop, 1994). Par rapport à la problématique de ce sujet, cette augmentation de densité peut engendrer une diminution du transfert de matière à la base du biofilm.

Ceci peut indirectement provoquer une stratification plus stricte des populations microbiennes. La prise en compte de ce phénomène dans le développement du modèle sera discutée au *chapitre III*. Une évolution de la porosité et de la tortuosité avec l'épaisseur de biofilms est également rapporté (Zhang et Bishop, 1994). Ce résultat peut également influencer la compétition microbienne. Sa prise en compte dans le développement du modèle sera discutée au *chapitre III*.

I.3.1.2 Propriétés mécaniques d'un biofilm

L'identification du comportement mécanique d'un biofilm est un point clé pour la compréhension de ses mécanismes de détachement. Nous verrons par la suite l'importance du détachement par rapport à la problématique de compétition entre bactéries autotrophes et hétérotrophes. Plusieurs études se sont focalisées sur la caractérisation des propriétés mécaniques des biofilms.

Il ressort de ces études que le biofilm se comporte comme un matériau élastique (Characklis et Wilderer, 1989; Ohashi et Harada, 1994; Stoodley *et al.*, 1999; Ohashi *et al.*, 1999). Le module d'Young et le coefficient de Poisson sont indispensables pour modéliser le détachement d'un biofilm causé par un déséquilibre entre les contraintes appliquées et les forces de cohésion (Picioreanu *et al.*, 2001). Un module d'Young de 60Pa a été mesuré dans le cas d'un biofilm complexe (Characklis et Marshall, 1990). Des modules d'Young variant dans une gamme de 10 à 240Pa ont été mesurés sur les biofilms purs ou mixtes (Stoodley *et al.*, 1999).

Un module d'Young de 64Pa et un coefficient de Poisson de 0,3 sont considérés par Picioreanu *et al.* (2001) pour son étude numérique du détachement des biofilms.

I.3.1.3 Le transfert de matière au sein d'un biofilm hétérogène

L'une des hétérogénéités les plus importantes dans l'étude d'un système biofilm est la rugosité de surface.

Les performances globales d'un système biofilm sont déterminées par les taux de consommation de substrats et le transport de matières. Ce dernier phénomène, qu'il soit interne ou externe, est en retour fonction de la structure du biofilm, et notamment de son état de surface. La surface d'un biofilm est un ensemble de pics, de vallées et de canaux (ou pores), d'hauteurs et de profondeurs variables (De Beer *et al.*, 1994). Le phénomène de transfert dominant peut donc évoluer en fonction de la zone de biofilm considérée. L'utilisation de microélectrodes a démontré que la concentration en oxygène dans les pores du biofilm était très importante comparée à celle mesurée dans la matrice adjacente (De Beer *et al.*, 1994). Ce résultat tend à démontrer que la convection est le phénomène de transport dominant dans les pores du biofilm. A l'inverse, dans la matrice, c'est la diffusion qui est le phénomène dominant.

La présence de ces hétérogénéités peut localement limiter ou favoriser l'apport en substrat, et donc modifier les taux de réactions. A la surface du biofilm, la convection n'est significative dans les vallées que pour vitesses d'écoulement liquide élevées (De Beer et Stoodley, 1995). L'utilisation d'un modèle 3-D simplifié a démontré que les flux de DCO éliminée pouvaient être augmentés par une structure poreuse uniquement si la convection était significative dans les vallées (Rittman *et al.*, 1999). L'impact de la structure sur le transport de matière et les taux de conversion a également fait l'objet d'une étude numérique à l'aide d'un modèle 2-D (Picioreanu *et al.*, 2000a). Il apparaît que la rugosité du biofilm limite le transport et diminue les taux de conversion si la diffusion domine dans les vallées. Ainsi, seule une très faible fraction surfacique du biofilm est active puisque seule la biomasse composant les pics reçoit du substrat (Picioreanu *et al.*, 2000a).

L'ensemble de ces hétérogénéités peut donc modifier significativement la disponibilité des substrats à l'intérieur du biofilm. Indirectement, ce phénomène peut avoir un impact important sur les dynamiques de populations et la distribution des populations à travers le biofilm. Par rapport à la problématique de ce sujet, la modélisation de la structure du biofilm est donc un point important. Ce point sera discuté à la fin de ce chapitre, et au *chapitre III*.

I.3.1.4 Les mécanismes de détachement d'un biofilm

On distingue quatre mécanismes de détachement : (i) l'érosion, (ii) le « sloughing » (desquamation), (iii) l'abrasion et (iv) la prédation. La définition de ces phénomènes est très arbitraire dans la mesure où elle est principalement basée sur la taille des particules détachées (Stewart, 1993). Seuls l'érosion et le sloughing sont traités dans ce travail. L'érosion est un phénomène continu qui agit sur la surface entière du biofilm et qui induit le détachement de petites particules. L'érosion d'une particule est causée par les forces résultantes de l'écoulement du liquide à la surface du biofilm. Le détachement de particules par érosion se produit lorsque les forces externes induites par l'écoulement du liquide sont supérieures aux forces internes de cohésion du biofilm. Par conséquent, l'érosion peut intervenir soit par augmentation des forces externes soit par diminution des forces internes de cohésion du biofilm. Le « sloughing » est défini comme le détachement de larges particules dont la taille est du même ordre de grandeur que l'épaisseur du biofilm. A l'inverse de l'érosion, le « sloughing » se produit de manière locale, plus en profondeur au sein du biofilm. Ces définitions sont bien sur arbitraires et érosion et « sloughing » peuvent relever des mêmes mécanismes. Dans un système biofilm, l'érosion et le « sloughing » déterminent la distribution des TSS locaux et influencent par conséquent la compétition microbienne.

Par conséquent, le processus de détachement est déterminant dans la modélisation des biofilms. Le changement d'épaisseur (L_F) peut intervenir selon un processus surfacique continu formalisé par l'équation I-13:

Équation I-13

$$\frac{dL_F}{dt} = u_F(z = L_F) - u_{\text{det},s}$$

Où $u_{det,s}$ est la vitesse de détachement surfacique (m.j.1) et u_F la vitesse de d'expansion de l'interface matrice-liquide (m.j.1). D'après la littérature, le mécanisme de détachement dominant au sein d'un biofilm est l'érosion.

Toujours d'après la littérature, ce mécanisme intervient de manière surfacique et continue et entraîne le détachement de petites particules. Dans une première partie de cette étude, ce mécanisme a été retenu pour réaliser le changement d'épaisseur.

Le changement d'épaisseur peut également intervenir selon un processus volumique continu. Le détachement affecte alors l'ensemble de l'épaisseur du biofilm. Ce type de détachement est essentiellement formalisé en intégrant un processus de décès supplémentaire (Morgenorth, 2003). Il est par conséquent possible de réaliser un détachement spécifique à une espèce bactérienne donnée, cette espèce étant affectée sur toute l'épaisseur du biofilm. L'impact d'un détachement volumique sur la compétition microbienne au sein d'un biofilm nitrifiant sera traité de manière spécifique dans le chapitre suivant.

Le détachement peut également être un processus dynamique. Il est alors formalisé par une succession d'évènements discrets caractérisés par des amplitudes et des fréquences variables. Ce type de détachement est notamment utilisé pour modéliser les phénomènes de backwashing qui détachent une quantité importante de biomasse lors d'un évènement, alors que le détachement est insignifiant entre deux évènements.

La principale difficulté lors de l'écriture d'un modèle de détachement est d'obtenir de bonnes prédictions malgré le peu de données expérimentales disponibles. Les modèles de détachement présentent par conséquent de nombreuses simplifications qui peuvent être très critiquables.

Une recherche bibliographique témoigne du nombre et de la diversité des modèles proposés pour décrire le détachement (Tableau I-3).

Tableau I-3 : Différents modèles de détachements proposés dans la littérature.

Processus ou phénomène auquel est relié le modèle de détachement	Expression du modèle de détachement	Référence
-	0	Wanner et Gujer, 1984. Kissel et al., 1984.
-	Epaisseur constant	Fruehn et al., 1991.
-	$k_d (\rho_f L_f)^2$	Wanner et Gujer, 1984. Kissel et al., 1984. Fruehn et al., 1991. Trulear et Characklis, 1982. Bryers, 1984.
-	$k_d \rho_f L_f^2$	Wanner et Gujer, 1986. Kreikenbohm et Stephan, 1985.
Epaisseur de biofilm	$k_d \rho_f L_f$	Chang et Rittman, 1987. Rittman, 1989.
-	0 en croissance	Morgenroth et Wilderer, 2000.
-	$k_d (L_f - L_{basethickness})$ pendant l'évènement de détachement	Elenter et al., 2007.
-	$U_f \left(\frac{L_f}{L_{f \max}}\right)^2 \cdot d$	Lackner et al., 2008.
Contrainte de cisaillement	$k_d \rho_f \tau_p$	Bakke et al., 1984.
-	$k_d \rho_f L_f \tau_p^{0.58}$	Rittman et MacCarty, 1982.
-	$L_f (k_d + k'_d \cdot \mu)$	Tijhuis et al., 1994.
Taux de croissance ou de consommation du substrat	$k_d \cdot r_s \cdot L_f$	Speitel et DiGiano, 1987. Peyton et Characklis, 1993.
Distance par rapport à la surface de biofilm	$k_{det} \cdot z^2$	Xavier et al., 2005. Alpkvist et al., 2006. Picioreanu et al., 2000a. Picioreanu et al., 2000b. Picioreanu et al., 1998.

Une large gamme de formalismes est disponible pour modéliser les phénomènes de détachement. Ces expressions peuvent notamment être fonction de l'épaisseur de biofilm, de la contrainte de cisaillement, du taux de croissance, etc. Le choix du formalisme du modèle de détachement sera discuté au *chapitre III*.

I.4 La compétition microbienne

I.4.1 Introduction aux différentes interactions microbiennes

Les communautés microbiennes naturelles et semi-naturelles (i.e. sélectionnées, traitement des eaux, agro-industries,...) sont caractérisées par une diversité et un degré de complexité souvent élevés, avec une grande variété d'interactions physiques, chimiques et biologiques.

La prédiction du comportement de ces systèmes nécessite une description suffisamment juste de ces interactions. L'enjeu de la compréhension des processus régissant les compétitions microbiennes est la capacité de comprendre et prédire quelles niches écologiques permettent de favoriser l'implantation de tel ou tel micro-organisme, et ainsi de telle ou telle fonction.

Un exemple souvent cité pour illustrer les interactions microbiennes, comprend trois micro-organismes A, B et C. La culture mixte de ces trois organismes est capable de se développer sur substrat méthane alors qu'aucune des trois souches n'en est capable en culture pure. Une analyse détaillée des interactions fournit l'explication : La croissance de B nécessite le méthanol fourni par le métabolisme de A qui consomme le méthane. La croissance de C nécessite les composés organiques produits par B et A nécessite une vitamine produite par C. Le succès de ce consortium dans sa globalité dépend ainsi d'un équilibre fin entre les processus de compétition et de mutualismes.

On peut aussi citer des processus de sélection selon la température, le pH, la teneur en eau, ou également d'autres interactions microbiennes telles que celles listées dans le tableau I-4 :

Tableau I-4 : Phénomènes d'interaction microbienne entre deux microorganismes A et B.

Type d'interaction	Caractéristiques	Effet de B sur μA	Effet de A sur μB
Compétition	Effets négatifs dus à l'épuisement du substrat	-	-
Antagonisme	Effets négatifs dus à la production de toxines ou inhibiteurs	-	-
Amensalisme		-	0
Ecrinolyse	Effets négatifs dus à la production d'agents lytiques ; Effet positif dû à la solubilisation de la biomasse = substrat	-	+
Commensalisme	Effet positif dû à la production par B d'un stimulus de croissance de A ou par élimination par B d'un inhibiteur de croissance de A	+	0
Proto-coopération	Idem commensalisme avec aussi présence des deux populations non indispensables pour la croissance de chacun	+	+
Mutualisme	Idem commensalisme avec aussi présence des deux populations indispensables pour la croissance de chacun	+	+
Prédation	B mange A	-	+
Parasitisme	Le parasite B pénètre dans A et dérive le matériel et l'activité de A pour lui	-	+
Symbiose	A et B sont en contact physique ; interaction très spécifique	+	+
Sur population	Compétition pour l'espace	-	-

La compétition vis-à-vis des nutriments et/ou d'autres besoins est sans aucun doute une des interactions les plus importantes qui déterminent la composition et le comportement d'une communauté microbienne.

I.4.2 La compétition microbienne dans le cas d'une biomasse en suspension

Au sein d'un réacteur, la compétition microbienne détermine les dynamiques des concentrations des populations et donc les performances globales d'un système. Remarquons que les mécanismes gouvernant la compétition microbienne dans le cas d'une biomasse en suspension sont les mêmes que ceux gouvernant la compétition dans le cas d'un biofilm, si ces derniers sont analysés à l'échelle local, c'est-à-dire gradients de concentrations. Par conséquent, les mécanismes détaillés et discutés dans cette partie ne seront pas repris dans la partie relative au cas d'un système biofilm.

I.4.2.1 Limitation mono-substrat

Le tracé des courbes μ/C_S est largement utilisé pour analyser la compétition entre deux souches microbiennes pour un substrat. L'affinité de la souche pour son substrat définit, pour une concentration en substrat C_S donnée et un taux de dilution, son taux spécifique de croissance.

Lorsque deux microorganismes A et B sont inoculés au sein d'un réacteur fermé, en condition d'excès de substrats, chacun d'eux se développe à sa vitesse respective de croissance maximale (μ_{\max}^A et μ_{\max}^B). Si μ_{\max}^A est supérieure à μ_{\max}^B , alors A va croître plus vite que B et deviendra l'espèce dominante. C'est donc la valeur relative de μ_{\max} qui détermine le résultat de la compétition.

Dans le cas d'un réacteur ouvert sur le liquide, à l'état stationnaire, la croissance microbienne est limitée par l'apport du substrat. Soient deux microorganismes A et B caractérisés par les courbes $\mu = f(C_S)$ suivantes :

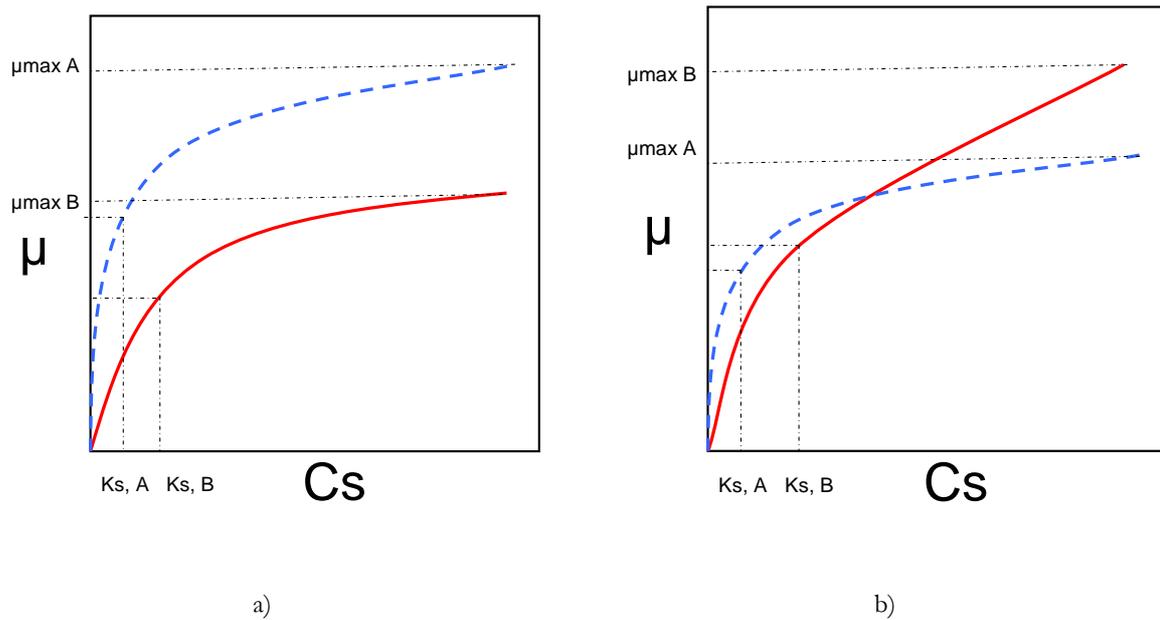


Figure I-9 : Relations entre les taux de croissance spécifiques maximums et la concentration en substrat pour deux microorganismes A et B et pour deux cas de figure.

Dans le cas a), μ_A est toujours supérieur à μ_B quelle que soit C_s . Le microorganisme A va donc croître plus vite que B et deviendra toujours dominant. Dans le cas b), μ_A est supérieur à μ_B pour $C_s \gg K_{s,B}$ lorsque C_s est élevée, mais devient inférieur pour de faibles concentrations de C_s . Sous C_s élevée, c'est B qui va croître le plus vite mais pour $C_s \ll K_{s,B}$, le microorganisme A va croître le plus rapidement et devenir dominant. En réacteur ouvert, c'est donc la valeur relative de K_s qui détermine le résultat de la compétition

En conclusion, pour le cas simple d'une compétition mono-substrat, c'est la valeur relative de μ à la concentration C_s vue par les micro-organismes qui détermine l'abondance relative de souches. L'impact des paramètres cinétiques sur la coexistence de deux microorganismes en culture axénique est illustré par de nombreux exemples dont celui de la coexistence entre *Norcardia* et *Acinetobacter*, deux bactéries filamenteuses, strictement aérobies. La coexistence de *Norcardia* (μ_{max} de $2,3j^{-1}$) et *Acinetobacter* (μ_{max} de $6,2j^{-1}$) en culture pure a été étudiée pour différentes conditions opératoires : réacteur fermé, à alimentation séquencée, cycle aérobie/anaérobie (Kim et Pagilla, 2000).

En réacteur fermé et en raison de son taux de croissance spécifique environ 3 fois plus élevé, *Acinetobacter* est l'espèce dominante en fin de culture. Sous des conditions aérobies et en réacteur à alimentation séquencée, *Norcadia* est éliminée après 56h alors que la concentration d'*Acinetobacter* atteint 125% de sa concentration initiale.

Dans cet exemple, le système est simplifié : les expériences sont menées en conditions stériles, avec deux microorganismes en suspension, etc. Seuls les paramètres cinétiques des deux microorganismes gouvernent la compétition.

La capacité d'adhésion et de formation d'un biofilm peut modifier ces lois de compétition. En effet, la fixation à un support permet de maintenir une population à une concentration significative malgré un taux de croissance inférieur.

I.4.2.2 Limitation multi-substrats

L'étude de la compétition microbienne sous une limitation multi-substrats nécessite de distinguer le cas de croissance non-interactive du cas de croissance interactive.

Pour un microorganisme, le cas de croissance non-interactive suppose que la croissance ne peut être limitée que par un substrat à la fois. Le taux spécifique de croissance prend alors la valeur la plus faible des deux valeurs prédites pour chaque substrat pris séparément :

Équation I-14

$$\mu = \mu_{\max} \frac{C_{S1}}{K_{S1} + C_{S1}} \quad , \quad \frac{C_{S1}}{K_{S1}} < \frac{C_{S2}}{K_{S2}}$$

$$\mu = \mu_{\max} \frac{C_{S2}}{K_{S2} + C_{S2}} \quad , \quad \frac{C_{S2}}{K_{S2}} < \frac{C_{S1}}{K_{S1}}$$

Dans le cas de la croissance interactive, l'ensemble des paramètres, μ_{\max} , K_S et Y_{SX} influencent le résultat de la compétition.

Équation I-15

$$\mu = \mu_{\max} \frac{C_{S1}}{K_{S1} + C_{S1}} * \frac{C_{S2}}{K_{S2} + C_{S2}}$$

Cet impact de la croissance interactive est de nouveau illustré par la compétition entre *Norcadia* et *Acinetobacter*. En réacteur ouvert à alimentation et aération séquencées, ces deux microorganismes sont en compétition à la fois pour le substrat organique et pour l'oxygène. *Norcadia* est éliminée après seulement 17h, alors que la concentration d'*Acinetobacter* atteint 140% de sa concentration initiale. Rappelons qu'en conditions de limitation mono-substrat, *Norcadia* était éliminée après 56h. L'ensemble des paramètres biologiques influencent et accélèrent le phénomène de compétition.

On peut également considérer une interaction entre les types de substrats, comme par exemple une inhibition compétitive sur la consommation des autres substrats :

Équation I-16

$$\mu = \frac{\mu_{\max 1} \cdot C_{S1}}{K_{S1} + C_{S1} + a_2 C_{S2}} + \frac{\mu_{\max 2} \cdot C_{S2}}{K_{S2} + C_{S2} + a_1 C_{S1}}$$

Ce modèle est généralement utilisé lorsqu'un microorganisme croit sur deux sources de carbone/énergie.

Cette inhibition peut également être non-compétitive. C'est le cas de l'inhibition de la croissance des bactéries dénitrifiantes par l'oxygène. Cette compétition entre bactéries aérobies strictes et bactéries aérobies/anaérobies facultatives fixe la proportion de bactérie dénitrifiantes dans les bassins de boues activées. Le terme K_{IO_2} définit la constante d'inhibition de la croissance par le dioxygène (mgO₂/L).

Équation I-17

$$\mu = \mu_{\max} \frac{S}{S + K_S} * \frac{1}{1 + K_{IO_2}^{-1} * O_2}$$

$$\frac{1}{1 + K_{IO_2}^{-1} * O_2}$$

Ainsi pour réaliser le processus de dénitrification, il faudra un volume liquide non aéré et désoxygéné.

En conclusion, pour des compétitions complexes, l'ensemble des facteurs contribuant significativement au comportement de la culture mixte doit être pris en compte. Dans le cas d'une compétition de type « limitation multi-substrats », les paramètres biologiques globaux (μ_{\max} , K_S , Y_{XS}) doivent être considérés. L'analyse de la compétition est plus complexe dans le cas d'une structure hétérogène de type biofilm puisqu'il existe des gradients de concentrations et de conditions environnementales. Une étude bibliographique de la compétition microbienne au sein d'un système biofilm est présentée dans la partie suivante.

I.4.3 La compétition microbienne dans le cas d'un système biofilm

Dans la littérature, de nombreux exemples de compétition microbienne pour les substrats et l'espace sont rapportés au sein de système biofilm.

A titre d'exemple, on peut citer la compétition entre les bactéries méthanogènes et les bactéries sulfato-réductrices pour l'hydrogène et l'acétate (Raskin *et al.*, 1996; Kim et Pagilla, 2000), la compétition entre les bactéries type « Anammox » et les bactéries autotrophes sous des conditions de limitations en oxygène (Hao *et al.*, 2002; Strous, 2000; Sliemers *et al.*, 2002) et bien entendu la compétition entre bactéries autotrophes et hétérotrophes.

I.4.3.1 Evaluation des régimes de croissance dans le cas d'un système biofilm

L'un des points clés pour l'étude de la compétition microbienne au sein d'un biofilm est la prédiction du régime de croissance. Le paramètre G définit le ratio entre le taux de croissance de la biomasse et le transfert de matière au sein d'un système biofilm (Picioreanu *et al.*, 1998) tel que :

Équation I-18

$$G = L_f^2 \cdot \frac{\mu_m \cdot C_{xm}}{D_s \cdot C_{s0}}$$

Avec : C_{s0} , la concentration en substrat dans le liquide (gDCO/m³).

C_{xm} , la concentration maximum en biomasse dans le biofilm (gDCOx/m³).

μ_m , le taux de croissance maximum (j⁻¹).

D_s , le coefficient de diffusion (m²/j).

L_f , l'épaisseur de biofilm (m).

Le calcul de ce coefficient permet de déterminer si le régime est limité par le transfert (valeur de G supérieure à 1) ou par la croissance bactérienne (valeur de G inférieure à 1).

Le régime de croissance des bactéries hétérotrophes peut être évalué par le calcul du paramètre γ_{S,O_2} , tel que :

Équation I-19

$$\gamma_{S,O_2} = \frac{1}{v_{S,O_2}} \cdot \frac{D_s}{D_{O_2}} \cdot \frac{S_{LF,S}}{S_{LF,O_2}}$$

Avec D_S et D_{O_2} les coefficients de diffusion des composés organiques et de l'oxygène ($m^2.j$) et $S_{LF,S}$ et S_{LF,O_2} les concentrations en composés organiques et en oxygène à l'interface matrice-liquide. Le terme v_{S,O_2} est défini tel que :

Équation I-20

$$v_{S,O_2} = \frac{r_S}{r_{O_2}} = (1 - Y_H)$$

Avec r_S et r_{O_2} les vitesses de consommation du substrat et de l'oxygène (gDCO/j), et Y_H le coefficient de conversion pour les bactéries hétérotrophes (gDCOx/gDCO).

Trois régimes de croissance sont distingués, suivant les valeurs de ce coefficient γ_{S,O_2} .

- $\gamma_{S,O_2} < 1$: le substrat organique est potentiellement limitant à l'intérieur du biofilm, l'oxygène diffusant sur toute l'épaisseur de celui-ci.
- $\gamma_{S,O_2} > 1$: l'oxygène est potentiellement limitant à l'intérieur du biofilm, le substrat organique diffusant sur toute l'épaisseur de celui-ci.
- $\gamma_{S,O_2} \approx 1$: l'oxygène et le substrat organique sont simultanément limitants à l'intérieur du biofilm.

Le coefficient stœchiométrique liant le taux de consommation du substrat organique au taux de consommation de l'oxygène est donné ci-dessous :

Équation I-21

$$v_{S,O_2} = \frac{r_S}{r_{O_2}} = \frac{1}{1 - Y_H}$$

I.4.3.2 Impact des limitations en substrat(s) sur la compétition microbienne au sein d'un système biofilm

Quel que soit le type de matrice biologique considérée (floc bactérien, biofilm ou granule), de nombreux auteurs rapportent un effet du ratio DCO/N ou DCO/O₂ sur la compétition entre autotrophes et hétérotrophes (Okabe *et al.*, 1996). Une modification de ces ratios permet en effet de modifier le degré de compétition pour l'azote et l'oxygène (Ohashi et Harada, 1994; Elenter *et al.*, 2007; Zhang *et al.*, 1994; Lee *et al.*, 2002; Jang *et al.*, 2003). Le tableau I-5 regroupe les principales études relatives à l'impact d'une limitation en azote ou en oxygène sur la compétition microbienne entre bactéries autotrophes et hétérotrophes. Les principales conditions opératoires y sont résumées.

Tableau I-5: Récapitulatif des études concernant l'impact d'une limitation en azote et/ou en oxygène sur la compétition microbienne entre bactéries autotrophes et hétérotrophes.

Régime de croissance	Type de réacteur	Charge organique	Source d'azote	Source organique	Ratio DCO/N (gDCO/gN)	Oxygène dissout (mgO ₂ /L)	Temps de séjour des solides en suspension (h)	Référence
Limitation en oxygène ?	Taylor-Couette	-	NH ₄ ⁺	-	-	0,5-2	-	Zhang <i>et al.</i> (1994)
Limitation substrat	Biofiltre	0,48-0,97-1,5-4,8 gDCO/m ³ .j	NH ₄ ⁺	Acétate, galactose, alanine	0,18-0,37-0,52-1,5	-	1,5	Ohashi <i>et al.</i> (1995)
Limitation substrat	Biodisques	0,016-0,1gDCO/m ² .j	NH ₄ ⁺	Acétate	0-0,25-1,5	-	5	Okabe <i>et al.</i> (1996)
Limitations substrat	Réacteur tube	0-0,28-0,91 gDCO/m ² .j	NH ₄ ⁺	Acétate	0-0,425-1,38	5-7	0,5	Elenter <i>et al.</i> (2007)

La compétition microbienne entre bactéries autotrophes et hétérotrophes a été étudiée à l'aide de nombreux types de réacteurs et sous différentes conditions de croissance. Ces études sont caractérisées par les points suivants :

- Seule la compétition pour l'oxygène est abordée dans ces études. La modification du degré de compétition pour l'oxygène est réalisée par modification de la charge organique.
- La concentration en oxygène dans le liquide et le flux d'oxygène apporté au système ne sont pas toujours renseignés. De même, les charges surfaciques en oxygène ne sont pas mentionnées. Par conséquent, le régime de croissance n'est pas clairement défini : Limitation par la croissance ou pas le transfert ? limitation en substrats DCO ou limitations en oxygène ?
- Les ratios DCO/N étant faibles, l'azote est en excès par rapport aux besoins cellulaires. Par conséquent, les bactéries hétérotrophes ne sont pas en compétition avec les bactéries autotrophes pour ce substrat.

Lorsqu'ils sont renseignés, les temps de séjour des solides en suspension sont faibles (<5h). Remarquons que lorsque sa valeur est précisée, la température du système est maintenue à environ 20°C (Okabe *et al.*, 1996). Dans ces conditions, le degré de compétition entre la biomasse en suspension et la biomasse fixée favorise majoritairement la croissance sous forme de biofilm.

Impact du coefficient γ_{S,O_2} sur les fonctionnalités des biofilms

Le tableau I-6 résume les valeurs des coefficients γ_{S,O_2} calculés à partir des différentes données bibliographiques des études citées précédemment et les différents biofilms développés sous ces conditions. Trois types de biofilms ont été développés au cours de ces travaux : Biofilms Hétérotrophes (BH), Biofilms Mixtes Autotrophes Hétérotrophes (BMAH) et Biofilms Autotrophes (BA).

Tableau I-6 : Récapitulatif des valeurs des coefficients γ_{s,O_2} calculés à partir des différentes données bibliographiques et de la nature des biofilms développés sous ces conditions.

Référence	Coefficient γ_{s,O_2}	Nature du biofilm
Zhang <i>et al.</i> , 1994.	5-21	BH*
	2-7	BMAH
	-	NB
Ohashi <i>et al.</i> , 1995.	Incalculable car la concentration en oxygène dans le liquide n'est pas spécifiée	BMAH
Okabe <i>et al.</i> , 1996.	Incalculable car la concentration en oxygène dans le liquide n'est pas spécifiée	BMAH
Elenter <i>et al.</i> , 2007.	0,05	BMAH
	0,3	BMAH
	1,1	BH*

* : signifie que les biofilms développés sont majoritairement composés de bactéries hétérotrophes mais que la caractérisation de leur écologie microbienne démontre le maintien de bactéries autotrophes.

D'après Zhang *et al.* (1994), un BMAH a été développé pour un ratio γ_{s,O_2} compris entre 2 et 7, alors qu'un coefficient compris entre 5 et 21 a permis de développer un BH. Cette observation est tirée de l'analyse des taux observés de réactions mais également des mesures de profils en NH_4-N , NO_3-N et O_2 . La stratification des populations a également été caractérisée par l'intermédiaire de coupes cryogéniques (10-20 μm d'épaisseur) et d'une analyse de l'écologie microbienne de chaque couche. Cette analyse démontre que les bactéries autotrophes sont présentes dans le BH, même si leur concentration est très faible par rapport à celle des bactéries hétérotrophes. L'augmentation du coefficient γ_{s,O_2} d'une valeur comprise entre 2 et 7 à une valeur comprise entre 5 et 21 n'entraînerait donc qu'une chute du flux d'azote nitrifié mais pas une disparition totale des bactéries autotrophes. Une valeur de γ_{s,O_2} comprise entre 1 et 7 permet aux bactéries autotrophes et hétérotrophes de coexister, malgré un régime de croissance limité en oxygène.

A l'aide d'un réacteur tubulaire et pour une augmentation du coefficient γ_{s,O_2} de 0,3 à 1,1, une chute du flux d'azote nitrifié de $1,4 \pm 0,1 \text{ gN/m}^2 \cdot \text{j}$ à $0,2 \pm 0,2 \text{ gN/m}^2 \cdot \text{j}$ a été observée (Elenter *et al.*, 2007). Dans le même temps, l'augmentation du coefficient γ_{s,O_2} engendre une diminution de la part de bactéries nitrifiantes de 5% à 1,2% (mesurée par hybridation moléculaire). L'analyse des données d'Ohashi *et al.* (1995) et d'Okabe *et al.* (1996) est délicate dans la mesure où les concentrations en oxygène dans le liquide ne sont pas spécifiées. Pour ces études, la diminution du flux d'azote nitrifié ne peut pas être corrélée à la modification du coefficient γ_{s,O_2} . Ces études nécessitent par conséquent d'être analysées par rapport à l'évolution du coefficient C/N ou de la charge organique. Une disparition de la nitrification est ainsi rapportée pour une augmentation de la charge organique de 1,5 à $4,8 \text{ gDCO/m}^3 \cdot \text{j}$ (Ohashi *et al.* (1995)).

En conclusion, il apparaît qu'une augmentation du coefficient γ_{s,O_2} engendre une disparition de la nitrification. La valeur du coefficient γ_{s,O_2} pour laquelle la nitrification disparaît n'est cependant pas clairement identifiée. De plus, le degré de limitation en oxygène imposé n'a pas permis de supprimer totalement les bactéries autotrophes. Lorsque le coefficient γ_{s,O_2} est diminué de 1,1 à une valeur de 0 (pas de source exogène organique), une nitrification totale a été atteinte après moins de 10j alors qu'au cours de la phase de démarrage, plus de deux mois avait été nécessaire (Elenter *et al.*, 2007). Ceci confirme donc un maintien des bactéries autotrophes au sein du système biofilm.

Impact des conditions de croissance sur la distribution des populations

Pour expliquer l'élimination de la nitrification par l'augmentation du coefficient γ_{s,O_2} , la distribution des populations en fonction de l'épaisseur de biofilm doit être analysée. Cette problématique a été abordée par Okabe *et al.* (1996). Les différentes couches de biofilm ont été sectionnées par coupe cryogénique.

Les concentrations en bactéries autotrophes ont été déterminées par énumération au microscope après marquage à l'acridine orangé (exprimées en « multiple-dilution Most Probable Number », MPN) pour chaque couche. Concernant les concentrations en bactéries hétérotrophes, celles-ci ont été déterminées après culture sur un gel agar (exprimées en « Colonies-Forming Units » CFU). Pour une gamme de ratio C/N variant entre 0 et 1,5, une augmentation de la charge en substrat organique engendre une stratification plus stricte des populations (Okabe *et al.*, 1996). Quel que soit le ratio C/N, la concentration en bactéries autotrophes dans les couches internes du biofilm est sensiblement constante. A l'inverse, dans les couches surfaciques, les bactéries autotrophes ne se développent que pour des faibles ratios (0 et 0,25) alors qu'à 1,5gC/gN, elles sont absentes de la couche de surface.

En effet, sous un ratio de 1,5gC/gN, la vitesse de croissance des bactéries hétérotrophes est significativement supérieure à celle des bactéries autotrophes ce qui entraîne une disparition de la nitrification (Okabe *et al.*, 1996).

La modélisation 1-D représente un outil intéressant pour l'analyse de la stratification de populations. Dès 1984, un modèle 1-D multi-espèces considérant une épaisseur de biofilm constante et un état d'équilibre atteint a été proposé (Wanner et Gujer, 1984). Ce modèle a ensuite été modifié pour étudier les dynamiques de populations sur une période courte de 10j et en considérant une croissance non-limitée (détachement nul) (Wanner et Gujer, 1986). Après 5j de croissance non limitée, l'activité autotrophe est limitée par la disponibilité de l'oxygène en raison de la forte concentration en bactéries hétérotrophes à la surface du biofilm. Ceci confirme donc que c'est la disponibilité en oxygène après consommation par les bactéries hétérotrophes qui détermine les capacités de croissance des bactéries autotrophes. Récemment, l'évolution dynamique de la distribution des populations lors d'une augmentation du coefficient γ_{s,O_2} a été abordée (Elenter *et al.*, 2007). Les figures ci-dessous illustrent les réponses du modèle obtenues pour des coefficients γ_{s,O_2} de 0 (à l'état d'équilibre), de 0,3 (0,5j après modification du coefficient) et de 0,3 (à l'état d'équilibre).

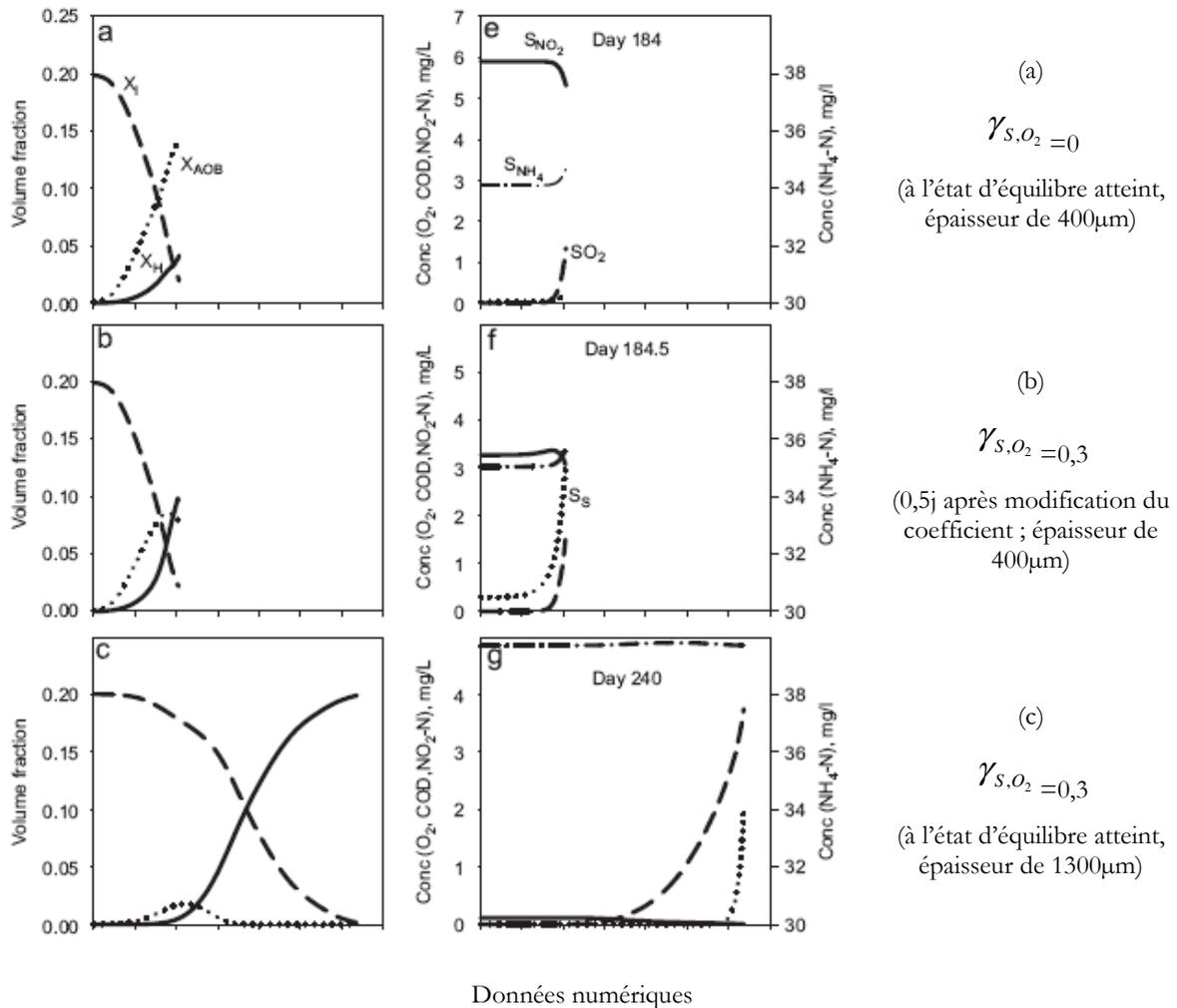


Figure I-10 Distributions de la biomasse et des concentrations en substrats en fonction de l'épaisseur de biofilm pour différentes valeurs de γ_{s,o_2} (Elenter et al. (2007).

Lorsque le coefficient γ_{s,o_2} est modifié par augmentation de la charge organique et pour une concentration en oxygène constante dans le liquide, la vitesse de croissance des hétérotrophes devient significativement supérieure à celle des autotrophes. Les bactéries hétérotrophes se développent alors significativement à la surface du biofilm (Figure I-10b). A l'état d'équilibre atteint, ils dominent significativement la surface du biofilm (Figure I-10c). Une augmentation du coefficient de 0 à 0,3 puis à 1,1 engendre respectivement une augmentation de la concentration en DCO dans le liquide de 1,8 à 10, puis à 35mgDCO/L (Elenter *et al.*, 2007).

Le calcul de la vitesse de croissance des hétérotrophes pour un K_s de 20mgDCO/L indique que celle-ci est multipliée par un facteur 4 puis 2. Dans le même temps, la vitesse de consommation de l'oxygène par les bactéries hétérotrophes augmente, limitant à la fois l'apport d'oxygène dans les couches internes du biofilm et la croissance des bactéries autotrophes.

En conclusion, la capacité de coexistence des bactéries autotrophes et hétérotrophes est gouvernée par la disponibilité de l'oxygène dans les couches internes du biofilm. Plus la concentration en bactéries hétérotrophes est importante à la surface du biofilm, plus la disponibilité en oxygène dans les zones internes est limitée.

Conclusions et manques concernant l'impact de la compétition des conditions de croissance sur la coexistence autotrophes-hétérotrophes

D'après la synthèse bibliographique précédente, seule la compétition pour l'oxygène a été étudiée. Par conséquent, un premier manque concerne la compétition pour l'azote. En effet, celui-ci est utilisé à la fois par les bactéries autotrophes pour la nitrification et par l'ensemble des bactéries pour la synthèse cellulaire. Un premier enjeu consiste donc à identifier la valeur du ratio DCO/N pour laquelle la nitrification est éliminée.

Concernant la compétition pour l'oxygène, il apparaît que c'est la disponibilité en oxygène sous la couche surfacique composée des bactéries hétérotrophes qui gouverne l'implantation des bactéries autotrophes. Le ratio DCO/O₂ dans le liquide permettant d'éliminer la nitrification doit être identifié de manière plus précise. La majorité des résultats a été obtenue sur des biofilms fins (<1000µm) et sur des échelles de temps courtes (< temps nécessaire pour atteindre une épaisseur constante). Ce phénomène doit par conséquent être étudié sur des échelles de temps longues et dans le cas de biofilm épais.

I.4.3.3 Impact du détachement sur la compétition microbienne au sein d'un système biofilm

Définition des notions de temps de séjour des solides local et global (TSS_{local} et TSS_{global})

Le temps de séjour des solides (TSS) au sein d'un système biofilm est fixé à la fois par la croissance et par le détachement. Par rapport à la problématique de ce travail, le TSS est un paramètre crucial puisqu'il influence directement la croissance bactérienne. Pour un système biofilm, le TSS_{global} se distingue du TSS_{local} . Le TSS_{global} est défini par le rapport entre la masse totale de biomasse et la quantité de biomasse détachée par unité de temps. La distribution des biomasses étant hétérogène, les TSS_{local} diffèrent selon la population microbienne considérée et sa localisation. Dans les couches plus profondes, l'apport en substrats est faible mais les microorganismes sont protégés du détachement alors que dans les couches surfaciques, l'apport en substrat et le détachement sont importants. Dans le cas d'un biofilm épais, une fraction significative de la biomasse se développe sur les substrats de lyse. Cette distribution des conditions de croissance et de la sensibilité au détachement implique une distribution du TSS_{local} .

Cette distribution du TSS_{local} a récemment été prise en compte dans l'écriture des modèles de détachement (Morgenroth et Wilderer, 2000). Le compartiment « biofilm » est divisé en deux zones : une zone en surface soumise au détachement et une zone basale protégée de ce phénomène. Ce fractionnement du compartiment « biofilm » est schématisé par la Figure I-11.

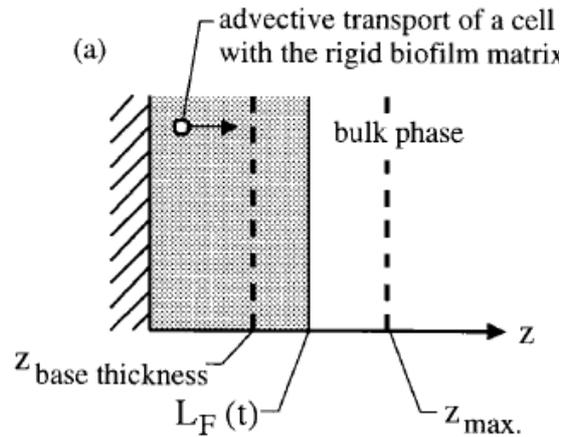


Figure I-11 : Schématisation de la discrétisation du compartiment « biofilm » pour représenter la variation temporelle de l'épaisseur de biofilm selon Morgenroth et Wilderer (2000).

La plupart des modèles de détachement conduisent à une épaisseur moyenne du biofilm constante au cours du temps en régime permanent. Les variations dynamiques dans le temps et l'espace de l'épaisseur ne sont que peu prises en compte. Dans cette optique, le modèle de détachement discontinu répond aux critères suivants (Morgenroth et Wilderer, 2000) :

- Le phénomène de détachement en un point donné du biofilm est une fonction du temps.
- Ce phénomène ne peut intervenir qu'après un certain temps (T_{bw}), correspondant au temps nécessaire au biofilm pour qu'il atteigne une épaisseur maximum (Z_{max}).
- Lors du détachement, l'ensemble de la biomasse située au dessus d'une épaisseur « $Z_{base\ thickness}$ » est détachée.
- Ainsi, l'épaisseur de biofilm varie dans une gamme comprise entre « $Z_{base\ thickness}$ » et « Z_{max} », comme schématisé par la figure I-12.

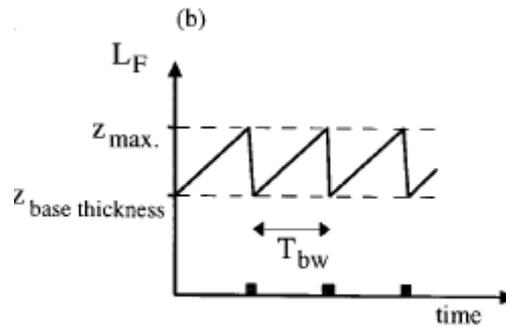


Figure I-12 : Variation temporelle de l'épaisseur de biofilm engendrée par un détachement discontinu selon Morgenroth et Wilderer (2000).

Morgenroth et Wilderer (2000) définissent le TSS_{local} comme la somme de deux termes : le 1^{er} terme est le temps moyen nécessaire à la bactérie pour atteindre l'épaisseur « $Z_{base\ thickness}$ », et le second terme est le temps moyen qui s'écoule avant l'évènement de détachement.

Équation I-22

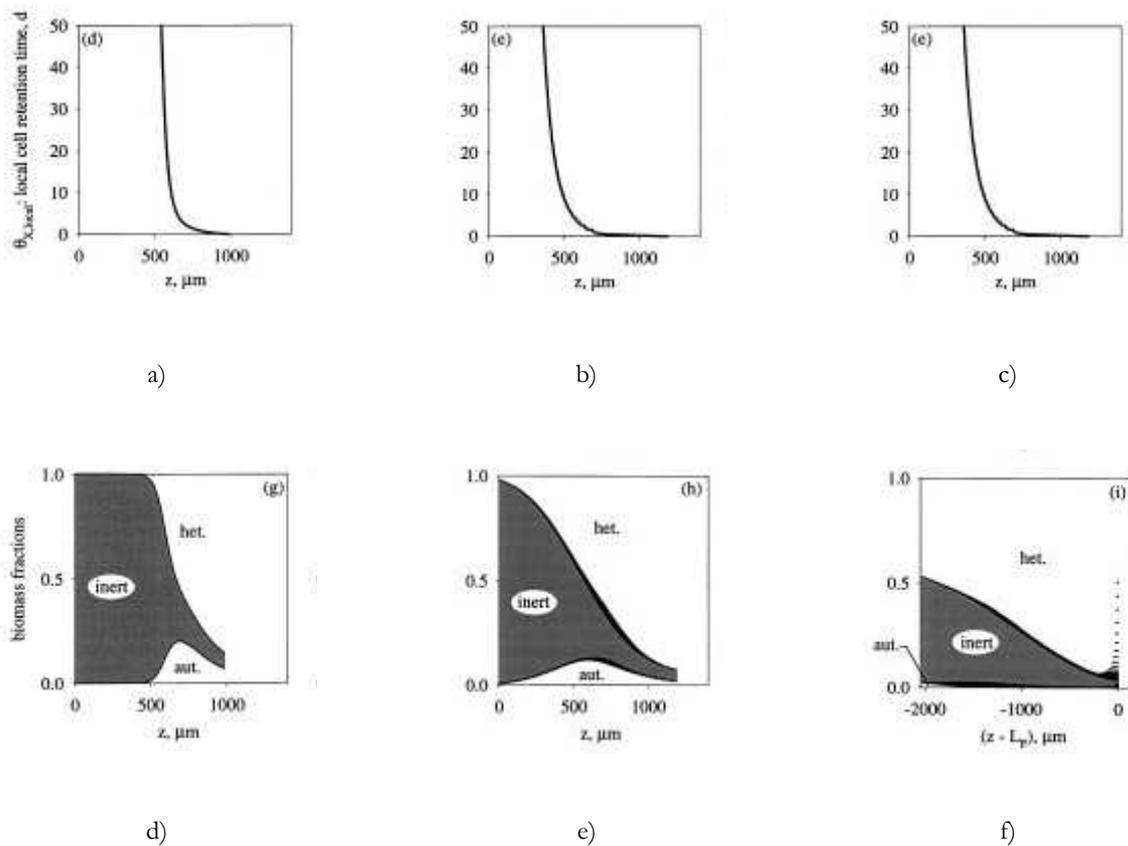
$$TSS_{local} = [\text{Temps moyen pour atteinte } Z_{base\ thickness}] + [\text{Temps moyen avant détachement}]$$

Se pose alors la question de l'impact des mécanismes de détachement sur la distribution des TSS_{locaux} et donc sur la compétition microbienne entre bactéries autotrophes et hétérotrophes. Ce point est discuté dans la partie suivante.

Impact des mécanismes de détachement sur la distribution des temps de séjour et sur la compétition microbienne entre bactéries hétérotrophes et autotrophes

Dans le cas d'un système biofilm, trois scénarii de détachement peuvent être distingués (Morgenroth et Wilderer, 2000) : (1) épaisseur de biofilm constante, l'expansion du biofilm est alors compensée par un détachement surfacique continu, (2) « backwashing » et (3) « sloughing ». Le « backwashing » est un détachement hebdomadaire provoqué par l'opérateur et qui permet de prévenir les phénomènes de colmatage dans le cas d'un réacteur à biofilm.

Le « sloughing » est un détachement naturel fonction de la maturité du biofilm. Ces phénomènes ont été plus longuement décrits dans la section I.3.I.4. L'évolution du $TSS_{local}(j)$ en fonction de l'épaisseur de biofilm (μm) est représentée ci-dessous pour ces trois *scénarii* de détachement.



Epaisseur de biofilm constante

Backwashing

Sloughing

Données numériques

Figure I-13 : Evolutions du TSS_{local} (a, b, c) et des distributions de populations (d, e, f) en fonction de l'épaisseur de biofilm pour trois *scénarii* de détachement différents (Morgenroth et Wilderer 2000).

Le TSS_{global} varie entre 1,9 et 3,4j quel que soit le scénario de détachement. En termes de TSS_{local} , les biofilms sont divisés en deux zones : la zone basale et la zone surfacique. La zone basale, composée essentiellement de biomasse inerte, a une expansion faible. La valeur du TSS_{local} dans cette zone est par conséquent très élevée ($>100j$).

Cette zone est très significative dans le cas d'une épaisseur de biofilm constante (518 μm d'épaisseur, soit 50% de l'épaisseur totale) et dans le cas d'un « backwashing » (314 μm , soit environ 1/3 de l'épaisseur totale). Pour le « backwashing » ou le « sloughing », le développement des bactéries à faible taux de croissance est favorisé dans cette zone grâce à un apport faible et discontinu en substrats. Dans le cas du « sloughing », le $\text{TSS}_{\text{local}}$ de la couche basale (moins de 10 μm d'épaisseur) est inférieur à 3,5j ce qui est trop faible pour que les bactéries autotrophes s'implantent correctement. Dans ces conditions, une quasi-disparition de la nitrification est observée.

En termes de biomasse accumulée, les bactéries autotrophes et hétérotrophes ne sont pas impactées de la même manière par un détachement volumique discontinu.

La croissance des bactéries hétérotrophes est favorisée. En effet, entre deux événements, les bactéries situées à la surface du biofilm se développent avec un fort taux de croissance alors que le décès et l'inactivation dans les couches profondes sont faibles (Morgenroth et Wilderer, 2000). Comparé à un biofilm d'épaisseur constante, la quantité de bactéries hétérotrophes se développant au sein d'un biofilm soumis à un phénomène de « sloughing » est multipliée par 3. A l'inverse, la quantité de bactéries autotrophes reste quasiment constante quel que soit le mécanisme de détachement.

En conclusion, les caractéristiques du mécanisme de détachement, en termes de continuité et de localisation, déterminent les $\text{TSS}_{\text{globaux}}$ et les $\text{TSS}_{\text{locaux}}$. En contrepartie, le $\text{TSS}_{\text{local}}$ détermine l'épaisseur de la couche basale et l'apport en substrat dans cette zone du biofilm. Il apparaît qu'un détachement volumique discontinu permet de réduire l'épaisseur de cette zone basale et d'augmenter la disponibilité des substrats et donc les capacités de croissance des biomasses. Par conséquent, ce type de mécanisme permet d'homogénéiser la distribution des populations.

Impact des temps de séjour sur la compétition microbienne et sur les flux de substrats

Un essai de validation de l'étude théorique de Morgenroth et Wilderer (2000) a été réalisé par Elenter *et al.* (2007).

Les auteurs ont choisi une augmentation ponctuelle de la contrainte de cisaillement pour simuler des variations de la nature et de la fréquence du détachement. La croissance du biofilm est réalisée au sein d'un réacteur tube pour différents ratios DCO/N compris entre 0 et 1,4gDCO/gN et les flux de nitrification et d'élimination de la DCO sont mesurés. Des périodes de croissance caractérisées par une contrainte de cisaillement constante ou variable sont imposées au système biofilm, afin de forcer des phénomènes de « sloughing ». Le premier résultat de ce travail est que le « sloughing » des biofilms n'est pas suffisamment contrôlé par la contrainte de cisaillement. A un ratio DCO/N de 1,4, des phénomènes de « sloughing spontanés » sont observés malgré une contrainte de cisaillement constante.

En termes de flux de DCO éliminée et d'azote nitrifié, le « sloughing » peut avoir différents impacts en fonction des quantités et de la nature des biomasses détachées ou maintenues au sein du système biofilm : (i) le « sloughing » n'a pas d'effet sur les performances du système biofilm si suffisamment de biomasse est maintenue et si le transfert de matière interne n'est pas significativement modifié (ii) le « sloughing » augmente le flux d'azote nitrifié s'il entraîne uniquement le détachement des bactéries hétérotrophes, favorisant la disponibilité en oxygène pour les bactéries autotrophes (iii) le « sloughing » diminue les performances du système si la quantité de biomasse maintenue au sein du système est trop faible.

Les observations expérimentales et les réponses numériques d'Elenter *et al.* (2007) diffèrent significativement lorsque des « sloughing » sont imposés au système biofilm. Expérimentalement, aucune modification du flux d'azote nitrifié n'est observée lors d'un sloughing alors que les réponses du modèle indiquent une forte augmentation de ce flux suite à l'évènement. L'impact (ii) précédemment défini explique cette réponse du modèle. Cette observation démontre par conséquent que la distribution des populations prédite par le modèle diffère de leur distribution réelle.

Conclusions et manques concernant l'impact du temps de séjour local sur la compétition entre autotrophes et hétérotrophes

En conclusion, les mécanismes de détachement ont un impact direct sur les dynamiques de populations et sur les performances globales du système biofilm. Malgré son intérêt, l'étude de Morgenroth et Wilderer (2000) est totalement théorique, ce qui représente sa principale carence. Une confirmation expérimentale de ces observations est nécessaire. En raison du manque de données expérimentales concernant le détachement des biofilms, le formalisme des modèles est souvent choisi tel que l'épaisseur soit maintenue constante. Un premier enjeu consiste à caractériser de manière plus précise les mécanismes de détachement en termes de taille de particules détachées et de fréquence de détachement. Elenter *et al.* (2007) rapporte que la stratification des populations prévue par le modèle est trop stricte. Un second enjeu consiste donc à étudier la stratification des populations dans le cas d'un biofilm épais ayant atteint l'état d'équilibre. Par ailleurs, dans son étude, la fréquence des événements de détachement n'est pas assez élevée, ce qui ne permet pas d'identifier son impact sur la croissance des bactéries autotrophes. Un dernier enjeu consiste alors à identifier la fréquence et l'amplitude de détachement permettant d'imposer une pression telle que la nitrification soit éliminée. Ces différents points seront étudiés au cours de ce travail de thèse, principalement au *chapitre IV*.

I.5 Les modèles mathématiques

I.5.1 Introduction

Un modèle mathématique est une représentation simplifiée de la réalité, basée sur des hypothèses et des équations utilisées pour rationaliser des observations expérimentales. En génie des procédés, les modèles sont des outils puissants pour la compréhension des processus. Bailey (1998) justifie l'utilisation de la modélisation en ingénierie de différentes façons :

- Organiser des informations désordonnées en une structure cohérente : Les récents progrès en techniques d'analyses (analyses confocales, mesures *In Situ*...) ont fortement modifié la vision des biofilms. Il est maintenant clair que la principale caractéristique des biofilms est leur hétérogénéité. Il est très probable que chaque biofilm est unique en son genre. Des lors, la modélisation peut être utilisée pour savoir qu'est ce que ces biofilms ont en commun, et quels processus entraînent leur différenciation.
- Déterminer de manière logique le poids des composants et des interactions du système complexe : On rencontre régulièrement des résultats expérimentaux issus de différents laboratoires, qui quelques fois, mènent à des interprétations différentes. Lorsque les hypothèses peuvent se traduire mathématiquement, il est alors facile de tester leur validité et de les comparer.
- Corriger les erreurs expérimentales ou aider à exploiter certaines mesures pour estimer des paramètres. Les modèles peuvent en effet être un outil mathématique puissant pour l'identification et l'estimation de paramètres à partir de données expérimentales.
- Comprendre le fonctionnement d'un système complexe.
- Définir de nouvelles approches expérimentales ou de nouveaux paramètres opératoires. Le développement et l'étude de biofilms matures demande souvent une approche expérimentale lourde avec une caractérisation complète du système. Une étude numérique peut alors s'avérer judicieuse pour déterminer quels sont les essais expérimentaux à réaliser.

Deux approches peuvent être employées pour le développement d'un modèle mathématique. La première consiste à construire un modèle à partir d'observations expérimentales. Cependant, le modèle obtenu est strictement lié aux conditions dans lesquelles les résultats expérimentaux ont été obtenus, et de ce fait, l'extrapolation est délicate. La deuxième approche consiste à développer le modèle afin de représenter une réalité qui est basée sur des lois fondamentales de la physique, de la chimie et de la biologie.

Les modèles de diffusion-réaction ont ainsi été utilisés pour simuler des réacteurs à biomasse fixée (Wanner et Gujer, 1986; Wanner et Reichert, 1996; Wanner et Gujer, 1984). La rhéologie des biofilms (Dockery et Klapper, 2001; Stoodley *et al.*, 1999), ou encore l'hydrodynamique locale à la surface des biofilms (Picioreanu *et al.*, 2000a; Picioreanu *et al.*, 2000b ; Picioreanu *et al.*, 2001;) ont été étudiées à partir de méthodes de mécanique des fluides. Des lois de résistance des matériaux et de mécanique ont même été employées pour comprendre la croissance et le détachement des biofilms (Picioreanu *et al.*, 2001).

Lorsque les valeurs des variables (concentrations, épaisseur, ...) évoluent au cours du temps, le modèle est qualifié de modèle dynamique. Un modèle dynamique est essentiel si l'objectif est d'étudier le développement d'un biofilm au cours du temps, alors qu'un modèle statique pourra être employé pour déterminer les flux de matières et les gradients de concentrations pour un système donné. Dans ce dernier cas, il faut noter que la masse de biofilm n'est pas une variable, mais une condition initiale du modèle.

En conclusion, la complexité mathématique d'un modèle dépend de la problématique du sujet et des simplifications ou hypothèses qui y sont associées. Différents types de modèles (analytiques, pseudo-analytiques, numériques) sont disponibles. Ceux-ci sont listés et détaillés dans la partie suivante.

I.5.2 Les différents types de modèles

Cette partie a pour but de présenter les différents types de modèles disponibles pour l'étude des biofilms. La pertinence de chaque type de modèle par rapport à la problématique posée sera discutée à la fin de ce chapitre.

I.5.2.1 Les modèles analytiques (A) et pseudo-analytiques (PA)

La caractéristique majeure d'un modèle analytique est que les solutions sont obtenues par dérivation mathématique, et sans appliquer une méthode numérique de résolution. En raison de la simplicité de sa structure, le système biofilm modélisé doit être simple. C'est l'inconvénient principal de ce type de modèle. Les systèmes multi-espèces et multi-substrats, dynamiques et en plusieurs dimensions, sont difficiles voire impossibles à implanter avec ce type de modèle (Wanner *et al.*, 2006). On utilise généralement ce type de modèle lorsqu'un processus est dominant. Pour ces raisons, l'utilisation de ce type de modèle semble donc inadaptée à la problématique de ce travail de thèse. Ce point sera néanmoins discuté par la suite.

Pour une représentation plus réaliste du système biofilm, l'utilisation d'un modèle pseudo-analytique est envisageable lorsqu'une ou plusieurs simplifications du modèle analytique peuvent être supprimées. Les modèles pseudo-analytiques sont généralement composés d'un faible nombre d'équations algébriques qui peuvent être facilement résolues. Cependant, ce type de modèle semble également inadapté à des systèmes biofilms dynamiques (Wanner *et al.*, 2006) et donc à la problématique de ce travail de thèse.

I.5.2.2 Les modèles numériques 1-D

Ces modèles représentent généralement des systèmes biofilms multi-espèces et multi-substrats suivant l'axe perpendiculaire au support et en fonction du temps. Leur complexité est intermédiaire entre celle des modèles A/PA et celle des modèles numériques 2-D et 3-D. La biomasse ne peut se développer que dans une direction. Les équations qui composent ces modèles doivent être résolues numériquement (Wanner *et al.*, 2006). L'intérêt majeur des modèles 1-D est leur flexibilité en termes de nombre de variables, de processus et de transformations considérés. L'utilisation des modèles numériques 1-D est souple. Ils peuvent être utilisés à la fois comme un outil d'aide à la compréhension de mécanismes mais aussi comme un outil de dimensionnement et de prédiction de réacteurs.

L'inconvénient majeur de ce type de modèle est qu'ils ne peuvent pas être employés afin de modéliser la structure du biofilm. Or, la structure du biofilm est un ensemble dynamique, en perpétuelle évolution, et qui interagit avec de nombreux autres paramètres, notamment le temps de séjour des microorganismes et les phénomènes de transfert interne (van Loosdrecht *et al.*, 1995). Pour répondre à cette problématique, des modèles 2-D et 3-D ont récemment été mis au point.

I.5.2.3 Les modèles numériques 2-D et 3-D

Les modèles numériques 2-D et 3-D sont utilisés pour décrire les hétérogénéités des biofilms. En représentant les hétérogénéités spatiales et temporelles des propriétés physiques, chimiques et biologiques de l'environnement, l'analyse locale du biofilm est rendue possible (Wanner *et al.*, 2006). Bien entendu, l'essor de ces modèles nécessite un développement conséquent des méthodes de résolutions numériques afin de résoudre les équations, ce qui implique l'utilisation de machines plus puissantes, et des temps de calculs allongés. Dans ces modèles, l'espace occupé par la biomasse est divisé en éléments de surface. Cet ensemble forme une grille. La biomasse ne peut se déplacer que dans un nombre fini d'éléments de la grille. Le déplacement de la biomasse peut notamment être automatisé *via* un seuil de densité (Picioreanu *et al.*, 2000a; Picioreanu *et al.*, 2000b; Picioreanu *et al.*, 1998). Ce type de loi présente l'inconvénient d'être spéculatif car très peu de résultats expérimentaux concernant le déplacement de la biomasse à l'intérieur d'un biofilm ne sont à ce jour, disponibles. Lorsque la densité d'un élément de la grille dépasse le seuil fixé, une fraction de la biomasse est déplacée vers un élément adjacent si possible vide. Si la biomasse se déplace vers un élément adjacent plein, celui-ci doit se déplacer à son tour. Par conséquent, ce phénomène de dispersion de la biomasse peut engendrer un mélange dont l'origine n'est pas liée à une interaction biologique (Wanner *et al.*, 2006).

De plus, la taille d'un élément de grille est souvent largement supérieure à celle d'une bactérie (5-20 μm de large pour un élément, 1 μm pour une bactérie), ce qui augmente l'impact de cette dispersion sur le mélange des biomasses dans le cas d'un biofilm multi-espèces (Kreft et Wimpenny, 2001).

I.5.3 Comparaison des différents types de modèles par rapport à la problématique de compétition autotrophes-hétérotrophes au sein d'un système biofilm.

L'un des objectifs récents de l'IWA Task Group « Biofilm Modelling » était de déterminer l'aptitude des différents types de modèles à décrire la compétition microbienne (Wanner *et al.*, 2006). Le Tableau I-7 résume les différents modèles évalués, leurs simplifications ou autres caractéristiques majeures et leur référence.

Tableau I-7 : Résumé des différents modèles évalués pour décrire la compétition microbienne (Wanner *et al.*, 2006).

Modèle	Simplifications	Autres caractéristiques majeures	Référence
N1	Aucune, modèle de base	Détachement surfacique	Wanner et Gujer (1985)
N1a	AQUASIM®	Détachement surfacique	Wanner et Reichert (1996)
N1b	Distribution uniforme de la biomasse	Diffusivité corrigée par rapport à la porosité	
N1s		Détachement volumique	Pas de référence
A	Distribution uniforme de la biomasse selon z et densité constante Moyenne des solutions analytiques d'ordre 0 et d'ordre 1 pour les flux de chaque substrat Le système ne considère que la concentration en oxygène à la surface du biofilm, pas celle dans le bulk	Détachement volumique	Wanner et al. (2006)
Aa	Distribution uniforme de la biomasse selon z et densité constante	Détachement volumique	Wanner et al. (2006)

	Solutions analytiques d'ordre 0 pour les flux de chaque substrat Concentration en oxygène constante dans tout le biofilm		
PAa	Distribution uniforme de la biomasse selon z mais densité variable Bilans sur la DCO et sur N résolus séparément (O ₂ non limitant dans le biofilm) Concentration en oxygène constante dans tout le biofilm	Détachement volumique	Rittman et MacCarty (1982)
PAc	Distribution hétérogène forcée de la biomasse. Les autotrophes et les inertes ne se développent que sous la couche d'hétérotrophes Bilans sur la DCO et sur N résolus séparément (O ₂ non limitant dans le biofilm) Concentration en oxygène constante dans tout le biofilm	Détachement volumique Coefficient de détachement en fonction de l'espèce. Le coefficient des autotrophes et des inertes est 10 fois plus faible que celui des hétérotrophes	
PAd	Distribution uniforme de la biomasse selon z et densité constante Bilans sur la DCO et sur N résolus séparément (O ₂ non limitant dans le biofilm) Concentration en oxygène constante dans tout le biofilm	Détachement volumique	

Notons que les modèles numériques 2-D et 3-D ont volontairement été écartés de ce tableau. Comme nous l'avons déjà énoncé, les phénomènes de dispersion particulaire faussent potentiellement la stratification des bactéries et donc le résultat de la compétition.

L'analyse des simplifications et caractéristiques majeures des modèles énumérés permet d'évaluer leur capacité à répondre à la problématique d'étude et de compréhension de la compétition microbienne.

Ces modèles se distinguent principalement par leur représentation de la distribution spatiale des populations. Les modèles de base du logiciel AQUASIM® permettent à la biomasse de se développer naturellement en fonction des processus de croissance, de décès et de détachement. Ces processus biologiques et physiques gouvernent donc la stratification de la biomasse. Dans les autres cas, la distribution de la biomasse est imposée.

Le modèle PAc impose une séparation de la biomasse en trois compartiments : la couche surfacique composée de bactéries hétérotrophes, la couche interne composée de bactéries autotrophes et la couche basale inerte. Les coefficients de détachement sont alors fonction de chaque biomasse. La limitation en oxygène est le second point distinctif de ces modèles. Les modèles N 1-D calculent la concentration en oxygène en chaque point de z par résolution du bilan de matière sur ce composé. À l'inverse, les modèles A ou PA n'incluent pas de bilan séparé sur l'oxygène. Sa concentration est considérée comme constante dans tout le biofilm.

En conclusion, l'utilisation des modèles PA et A est limitée. La distribution imposée de la biomasse fausse l'estimation du temps de séjour local. La prédiction des taux observés de réaction et le dimensionnement de réacteurs sont par conséquent délicats avec ce type de modèle. La concentration en oxygène, considérée comme constante dans le biofilm, limite également leur utilisation. Dans un système biofilm, la concentration en oxygène dans le liquide est généralement non-limitante. Ce système est néanmoins gouverné par la diffusion, ce qui limite la disponibilité de l'oxygène dans le biofilm. Les modèles A et Pa ne peuvent être utilisés que lorsque le gradient de concentration en oxygène dans le biofilm est faible, ou quand sa concentration est très supérieure à K_{O_2} (Wanner *et al.*, 2006). Pour ces raisons, notre choix s'est porté vers le développement d'un modèle de la base d'AQUASIM®.

I.5.4 Structure d'un modèle biofilm développé sous AQUASIM®

La première étape dans le développement ou le choix d'un modèle est l'identification des composantes du modèle. Prenons pour exemple la Figure I-14 pour présenter les différentes composantes d'un modèle biofilm classique. Les compartiments définissent les différentes zones du système. Il s'agit notamment du compartiment biofilm et du compartiment liquide. Une zone de transfert diffusionnel sépare le biofilm du liquide.

Chaque compartiment inclut des composés, qui peuvent être de différents types (biomasse, substrats, produits...). Les composés peuvent subir des transformations, des phénomènes de transport ou de transfert. Par exemple, l'élimination de la pollution organique par les bactéries hétérotrophes s'accompagne d'une production de biomasse et de CO₂.

Dans chaque compartiment du modèle, chaque composé est soumis aux phénomènes cités ci-dessus. Ces phénomènes sont mathématiquement liés entre eux.

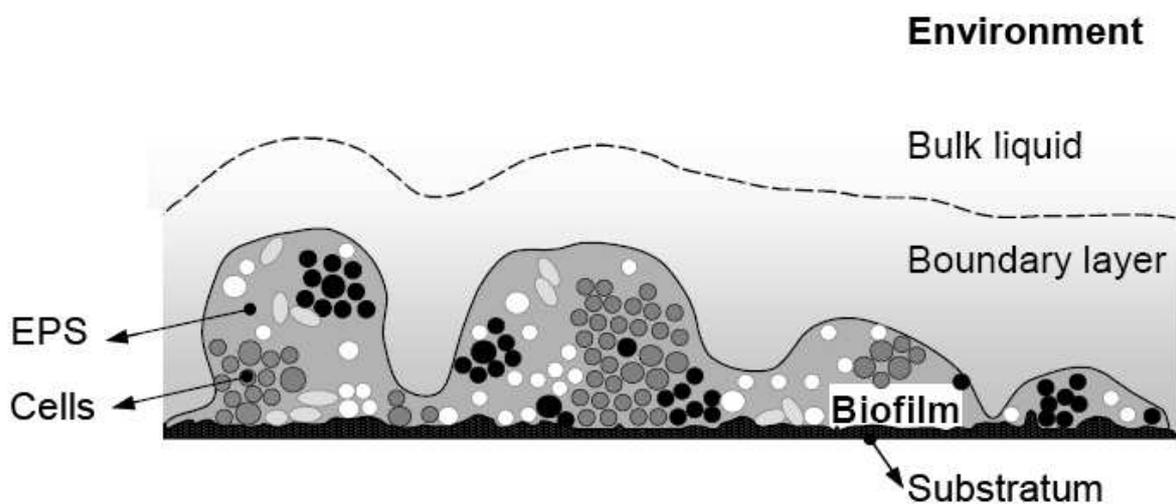


Figure I-14 : Les quatre compartiments régulièrement utilisés pour la représentation schématique d'un biofilm (Wanner *et al.*, 2006)

I.5.4.1 Les compartiments :*Le biofilm*

Le compartiment « biofilm » peut être défini de différentes manières, suivant la prise en compte ou non des hétérogénéités physiques et morphologiques. Ainsi, cette définition du compartiment « biofilm » sera triviale dans le cas d'une surface de biofilm plane (Figure I-15a) mais deviendra complexe dans le cas d'une surface rugueuse (Figure I-15c). La définition du compartiment « biofilm » schématisée Figure I-15b est une définition intermédiaire, mathématiquement moins « lourde » que la (c).

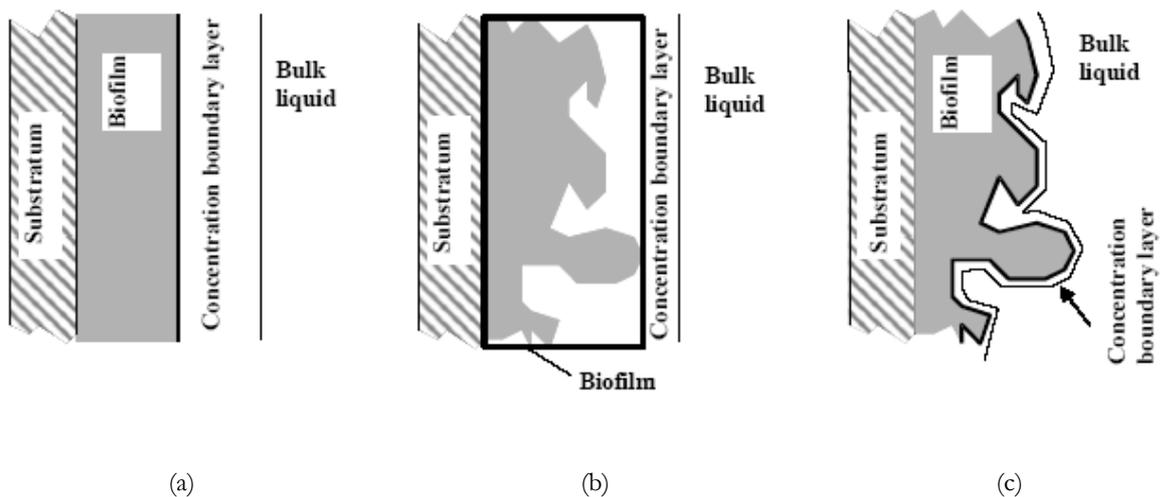


Figure I-15 : Exemples de compartiments « biofilm » représentés par une géométrie simple caractérisée par structure homogène avec une surface plane (a), représentés par une géométrie simple caractérisée par une structure hétérogène (b), ou représentés par une géométrie complexe où le compartiment « biofilm » est strictement défini comme le volume occupé par celui-ci (c).

Le compartiment « biofilm » englobe à la fois des solides et des liquides de différents types.

Sa modélisation se focalise principalement sur le solide, puisque c'est lui qui génère la structure et l'activité du biofilm. Les solides peuvent être représentés par les populations microbiennes actives et inertes, les particules organiques et inorganiques, et les EPS. Les liquides du compartiment biofilm peuvent quant eux être représentés par les liquides interstitiels mais aussi par les liquides intracellulaires. Par rapport à notre problématique, ce degré de complexité n'est pas nécessaire à la compréhension des mécanismes de compétition autotrophes-hétérotrophes. Les différentes simplifications possibles seront discutées dans le *chapitre III*.

Le liquide

Le compartiment « liquide » représente la phase liquide qui recouvre le biofilm. Il est séparé du compartiment « biofilm » par la « couche diffusionnelle ». Il est généralement modélisé par un réacteur parfaitement agité. Les concentrations en composés sont déterminées par l'entrée, la sortie, les conversions et surtout les échanges avec le compartiment « biofilm ».

La couche de transfert diffusionnel

De nombreuses observations expérimentales montrent l'existence de gradients de concentrations significatifs en composés solubles à la surface des biofilms.

Des lors, ces concentrations diffèrent grandement de celles du compartiment « liquide », ce qui implique la définition d'un troisième compartiment : la couche de transfert diffusionnel. La couche de transfert diffusionnel est une couche de liquide fictive dans laquelle tous les phénomènes de résistance au transfert de matières solubles interviennent. En fonction de la rugosité de surface du biofilm, l'épaisseur de cette couche de transfert diffusionnel peut être constante ou non. Dans certains cas, tels que de fortes turbulences ou des vitesses d'écoulement élevées dans le compartiment « liquide », l'influence de la couche de transfert diffusionnel peut être négligée en raison des forts gradients de concentrations à l'intérieur du biofilm.

Le support

Le compartiment « support » représente la surface solide sur laquelle le biofilm se développe. Dans la majorité des cas, le support est un compartiment très simple puisqu'il est inerte et imperméable. Aucun composé n'entre ou ne quitte le support, et aucune transformation n'intervient.

I.5.4.2 Les composés

Les composés dissous

Les composés dissous englobent les substrats, les composés intermédiaires, et les produits issus de l'activité microbienne. Le taux de croissance est fonction du taux de consommation du substrat le plus limitant. Il n'est pas nécessaire de considérer les autres substrats comme des variables tant que ceux-ci ne deviennent pas limitant. Si plusieurs substrats sont susceptibles d'être limitants, leurs concentrations respectives doivent être calculées simultanément, ce qui augmente significativement la complexité du modèle. Il est donc impératif de distinguer les composés limitants pour la croissance d'une population de ceux simplement nécessaires à la croissance.

Les composés particuliers

Les composés particuliers englobent les bactéries actives, inertes ou mortes, les EPS, et tout autre composé particulière, organique ou inorganique, et piégé dans la matrice du biofilm. Suivant l'application du modèle développé, il n'est pas nécessaire de considérer tous ces composés particuliers. Lorsque les composés particuliers sont choisis, il faut déterminer s'ils varient temporellement et/ou spatialement. En termes de distributions, la concentration en composés particuliers peut être définie comme homogène dans tout le biofilm. Cette approche est la plus simple à programmer et à résoudre.

Une approche complexe consiste à développer un modèle qui prédit cette distribution en résolvant simultanément les équations de bilan de matière pour chaque composé particulière.

I.5.4.3 Les transformations et les bilans de matières

Au sein du système, les deux principaux phénomènes sont les transformations et le transfert de matière, ces deux phénomènes étant étroitement liés entre eux. Par exemple, l'utilisation des substrats détermine les gradients de concentrations qui génèrent des phénomènes de diffusion. Ainsi, les concentrations en substrats qui sont « vues » par les microorganismes varient en fonction de la localisation, d'où également une variation des vitesses de croissance. Le transfert fait référence à l'échange de composés dissous à travers la couche de transfert diffusionnel, à l'attachement et au détachement de cellules.

Pour certains composés, des phénomènes de transformation et de transport interviennent simultanément. Quel que soit le modèle mathématique, pour chaque pas de temps et pour chaque élément de volume, il faut résoudre un bilan de matière tel que :

Équation I-23

$$\{\text{Taux net d'accumulation}\} = \{\text{Taux net de transfert de matières}\} + \{\text{Taux net de transformation}\}$$

Les phénomènes de transformations

Les transformations sont des réactions biochimiques qui engendrent la production ou la consommation d'un ou plusieurs composés. En modélisation, les transformations sont mathématiquement représentées par des taux qui peuvent être exprimés en différentes unités (unité de masse par unité de temps (MT^{-1}), unité de masse par unité de volume et par unité de temps ($ML^{-3}T^{-1}$), unité de masse par unité de surface et par unité de temps ($ML^{-2}T^{-1}$)...).

Un biofilm étant par définition une association de microorganismes, le premier type de transformation à considérer est la croissance microbienne. Dans un modèle biofilm, les équations des taux de croissance sont les mêmes que celles utilisées dans les modèles à biomasse en suspension.

La seule différence entre ces deux types de modèle est que les concentrations en substrats « vues » par les microorganismes varient en fonction de la profondeur dans le biofilm et sont différentes de celles dans le liquide.

Les phénomènes de transport interne

Dans un modèle biofilm, les phénomènes de transport généralement considérés sont l'advection, la diffusion, et la dispersion turbulente. L'expression 1-D classique d'un flux massique d'un composé suivant la direction z est donnée par l'équation suivante :

Équation I-24

$$j_z = u_z C - D \frac{\partial C}{\partial z} - D_T \frac{\partial C}{\partial z}$$

Où j_z est le flux massique ($ML^{-2}T^{-1}$), u_z la vitesse d'advection dans la direction z (LT^{-1}), D et D_T les coefficients de diffusion et de dispersion turbulente (L^2T^{-1}). Différentes études rapportent une corrélation entre le coefficient de diffusion local et les propriétés physiques du biofilm (densité, porosité) (Zhang *et al.*, 1994). Ces études seront présentées et discutées dans le *chapitre III*. En effet, ces résultats ainsi que des observations expérimentales seront utilisés pour justifier les différents choix du modèle.

Les phénomènes de transport externe de composés particuliers

La cinétique de transfert des composés particuliers à l'interface liquide-matrice ($ML^{-2}T^{-1}$) dépend d'un bilan de matière entre la cinétique d'attachement et la cinétique de détachement (Wanner *et al.*, 2006). Ces deux cinétiques peuvent être décrites simplement par des expressions du premier ordre fonctions de la concentration en biomasse en suspension (pour le terme d'attachement) ou en biomasse fixée à l'interface (pour le terme de détachement dans le cas d'un modèle surfacique continu).

D'autres modèles font intervenir la contrainte de cisaillement, la densité, de taux de croissance spécifique, l'épaisseur de biofilm. Ces différents formalismes ont été présentés section I.3.I.4 de chapitre. Le choix du formalisme sera discuté *chapitre III*.

Notons par ailleurs que les phénomènes de détachement peuvent être considérablement plus complexes qu'une simple équation du premier ordre. Les nouveaux modèles de détachement tentent de prendre en compte ce degré de complexité. Une approche réaliste consiste ainsi à modéliser à provoquer un détachement du biofilm uniquement lorsque la contrainte de cisaillement appliquée au biofilm excède ses forces de cohésion. Ce type de modèle est donc basé sur les propriétés mécaniques des biofilms (Picioareanu *et al.*, 2001). Ainsi, seule une diminution des forces de cohésion du biofilm ou une augmentation de la contrainte de cisaillement appliquée peut engendrer un détachement.

I.5.5 Conclusions sur la modélisation

Au regard de cette étude bibliographique concernant la modélisation, au regard de la problématique de compétition microbienne au sein d'un système type biofilm, les points suivants doivent être retenus :

- Les différents types de modèles disponibles sont, dans l'ordre croissant de leur complexité, les modèles analytiques (A), les modèles pseudo-analytiques (PA), les modèles numériques 1-D et les modèles numériques 2-D et 3-D.
- Les modèles A et PA, en raison de la simplicité de leur structure, sont inadaptés à la représentation de systèmes biofilms multi-espèces et multi-substrats. Ils considèrent généralement une distribution des populations uniforme en fonction de l'épaisseur. Celle-ci est donc imposée.
- La distribution des populations est naturelle dans les modèles numériques 1-D, 2-D et 3-D. Elle est en effet fonction à la fois des processus de croissance, de décès et de transport externe de composés particuliers.
- L'avantage des modèles numériques 2-D et 3-D par rapport aux 1-D est de pouvoir représenter l'hétérogénéité de la structure. Leur inconvénient majeur est le temps de calcul généré. Par

rapport à la problématique de compétition microbienne, la dispersion des composés particuliers engendrée par les processus de croissance et décès induit un mélange conséquent des populations qui peut potentiellement fausser le résultat de la compétition microbienne et donc l'analyse des mécanismes qui la gouverne.

Par conséquent, notre choix s'est porté vers le développement d'un modèle 1-D sous AQUASIM® qui représente le meilleur compromis entre une trop grande complexité et une mauvaise représentation de la distribution des activités au sein du biofilm.

Chapitre II : Matériels et méthodes expérimentaux

Ce chapitre a pour objectif de présenter les différents pilotes, protocoles et méthodes de caractérisation utilisés au cours de ce travail de thèse.

Dans une première partie, les deux principaux pilotes (Réacteur à écoulement de Couette Taylor et Cellule d'écoulement) ainsi que les supports utilisés pour la croissance des biofilms sont présentés. Les compositions des solutions synthétiques utilisées sont décrites en deuxième partie. Enfin, les troisièmes, quatrièmes et cinquièmes parties exposent l'ensemble de techniques de caractérisation des biofilms, des phénomènes de détachement, et des phénomènes de transfert interne de l'oxygène.

II.1 Réacteurs

Différents types de biofilms ont été développés sur des plaques en plastique placées à l'intérieur de réacteurs à écoulement de Couette-Taylor, permettant une croissance des biofilms sous des conditions hydrodynamiques caractérisées et contrôlées. Dans certaines expériences, les biofilms ont été soumis à des tests d'érosion dans ce même réacteur, après avoir atteint l'état d'équilibre, afin de réaliser une analyse « locale » de leurs propriétés. L'identification des phénomènes de transfert interne de l'oxygène a par ailleurs nécessité le développement d'un réacteur spécifique : la « cellule d'écoulement ». Ces deux réacteurs ainsi que les supports utilisés pour le développement des biofilms sont présentés ci-dessous.

II.1.1 Support de colonisation

Des plaques en polyéthylène (L x l x E: 100 x 50 x 5 mm) ont été utilisées comme support pour la croissance des biofilms (Figure II-1a). Avant d'être placées dans le réacteur de Couette Taylor, ces plaques sont rincées à l'eau déminéralisée, puis recouvertes de boue activée afin de favoriser l'adhésion des bactéries. Pour éviter la formation de biofilm au dos et sur les côtés des plaques, une bande adhésive recouvre ces zones et est retirée avant chaque analyse.

La surface totale disponible pour développement du biofilm est de 45 cm² par plaque soit 0,117m² par réacteur (26 plaques par réacteur, disposées sur deux rangées).

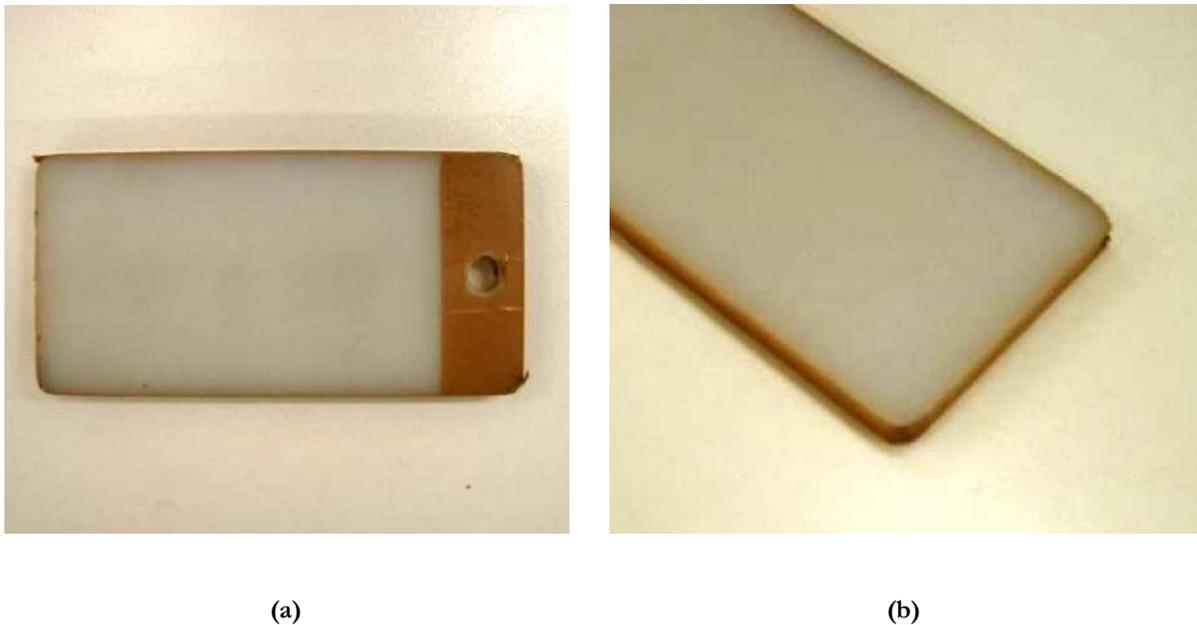


Figure II-1 : Plaque de colonisation : vue globale (a), bord arrondi (b).

Remarquons que ces supports présentent par ailleurs une spécificité géométrique, puisque leurs angles sont volontairement arrondis. Cette géométrie permet en effet de faciliter le guidage de la plaque lorsqu'elle est placée dans la cellule d'écoulement. Ce point sera détaillé par la suite.

II.1.2 Réacteur à écoulement de Couette Taylor

Le réacteur utilisé pour le développement des biofilms est un Réacteur à écoulement de Couette Taylor (Couette-Taylor Reactor en anglais, CTR). Les CTR utilisés pour cette étude ont été développés dans le cadre de la thèse de Carole Coufort (2004), réalisée au Laboratoire d'Ingénierie des Systèmes Biologiques et Procédés. Le CTR, dont un schéma est donné Figure II-2, est constitué de deux cylindres concentriques :

- un cylindre interne en PVC de rayon $R_1=100\text{mm}$, ce cylindre est en rotation.
- un cylindre externe en plexiglas de rayon $R_2=115\text{mm}$. Ce cylindre est fixe.

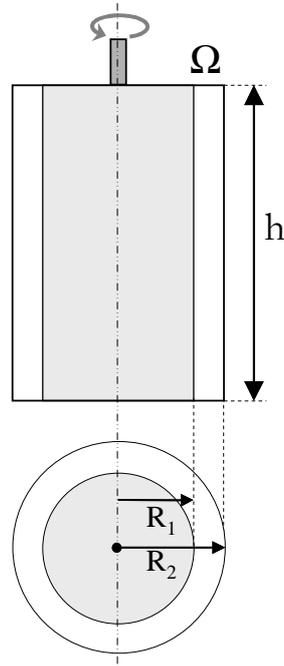


Figure II-2 : Schéma du réacteur de Taylor-Couette (Coufort, 2004).

La taille de l'entrefer noté « e » est de 15mm. La hauteur des deux cylindres $H = 200$ mm confère au dispositif un rapport de forme de $H/e \approx 13.3$. Le cylindre interne est entraîné par un moteur à vitesse Ω variable. Dans un CTR conventionnel, le régime d'écoulement est caractérisé par le nombre de Taylor (Ta) défini ainsi :

Équation II-1

$$Ta = \frac{\Omega R_1^{1/2} (R_2 - R_1)^{3/2}}{\nu}$$

Où ν est la viscosité cinématique du liquide, et Ω la vitesse angulaire du cylindre interne. La vitesse de rotation du cylindre interne ainsi que la taille de l'entrefer définissent donc la contrainte de cisaillement appliquée à la paroi. Ce type de réacteur présente l'avantage d'être le siège d'écoulements axisymétriques et permanents en moyenne, qui peuvent être calculés grâce à la mécanique des fluides numérique. La contrainte de cisaillement est distribuée de manière homogène sur toute la largeur du support (axe des x).

Un schéma du montage expérimental complet du CTR est présenté Figure II-3. Le moteur utilisé pour la rotation du cylindre interne est placé en-dessous du réacteur. Le système est muni de deux pompes péristaltiques, l'une utilisée pour l'alimentation en substrats et l'autre pour l'alimentation d'une chambre d'aération (cas de biofilms aérobies). Cette chambre est munie d'un système d'aération intégrant une membrane souple fines bulles, afin d'assurer l'apport en oxygène dans le cas de conditions aérobies. Des sondes pH et oxygène sont utilisées pour le suivi en ligne de ces deux paramètres. Ces sondes sont plongées dans la chambre d'aération, pour ne pas modifier l'écoulement au sein du CTR. Dans le cas d'un régime de croissance limité en oxygène, l'ouverture de la vanne d'aération est automatisée sur une consigne de concentration en oxygène. Lorsque les biofilms sont développés sous des conditions d'anoxie, un couvercle recouvre la partie supérieure du CTR afin de bloquer le transfert d'oxygène.

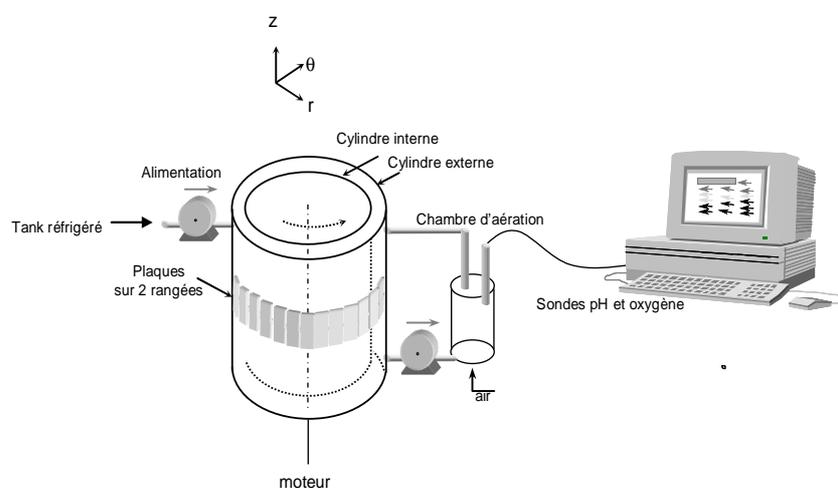


Figure II-3 : Schéma du montage expérimental utilisé pour la croissance des biofilms.

Pour éviter la formation du biofilm ailleurs que sur les plaques polyéthylène, l'ensemble des surfaces du CTR est nettoyé mécaniquement puis rincé à l'eau du réseau tous les deux jours. Les plaques sont disposées sur deux rangées pour une surface globale de $0,117\text{m}^2$. Le liquide est éliminé à l'aide d'une sur-verse.

Le détail de la fixation des plaques est présenté par la Figure II-4.

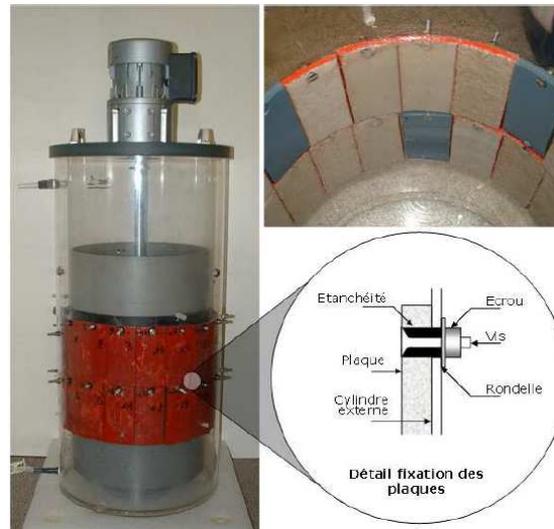


Figure II-4 : Système de fixation des plaques supports (Ochoa, 2008).

La Figure II-5 présente (a) l'évolution de la contrainte de cisaillement en fonction de la vitesse de rotation du cylindre interne (N , en rpm), d'après les données expérimentales et d'après différentes corrélations de la littérature, ainsi que (b) la relation entre la vitesse de rotation du cylindre interne et la fréquence des variateurs.

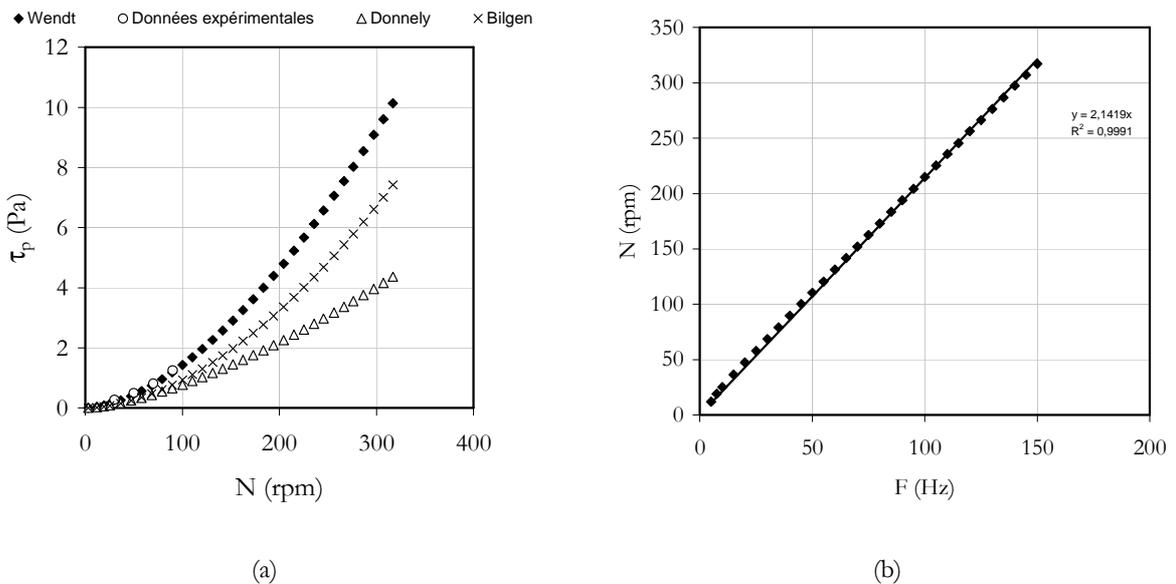


Figure II-5 : (a) Evolution de la contrainte de cisaillement en fonction de la vitesse de rotation du cylindre interne (N) d'après les données expérimentales et d'après différentes corrélations (« Wendt », « Donnelly » et « Bilgen ») et (b) évolution de la vitesse de rotation du cylindre interne en fonction de la fréquence.

II.2 Protocoles de colonisation des plaques supports

Deux protocoles ont été appliqués pour la colonisation des plaques. Le premier est *In Situ* ce qui signifie que les plaques supports sont fixées sur la paroi du CTR avant d'être colonisées. Le second est *Ex Situ* ce qui signifie que les plaques supports sont colonisées à l'extérieur du CTR puis fixées à sa paroi. Ces deux protocoles de colonisation sont détaillés ci-dessous.

II.2.1 Protocole *In Situ* de colonisation :

Suivant le protocole de colonisation *In Situ*, le CTR équipé des plaques supports est rempli avec un mélange « eau du réseau-boue activée ». Environ 100mL de boue activée (concentration proche de 2gMES/L) sont ajoutées à 2,9L d'eau du réseau, ce qui correspond au volume total du système (CTR+tubes+chambre d'aération). Ce mélange « eau du réseau-boue activée » est mis en contact avec les plaques supports pendant 2j. La mise en rotation du cylindre interne et l'alimentation en substrats du CTR interviennent dès le remplissage de celui-ci. Après deux jours, le CTR est vidé, nettoyé, puis de nouveau rempli avec un mélange « eau du réseau-sels minéraux ». Le détail de cette solution de sels minéraux est présenté par la suite.

II.2.2 Protocole *Ex Situ* de colonisation :

Selon ce protocole, les plaques supports sont mises en contact avec des boues activées concentrées (concentration proche de 10gMES/L) pendant environ 24h à l'extérieur du réacteur. Les plaques sont ensuite entièrement rincées à l'éthanol. Les zones des plaques recouvertes d'adhésif sont également rincées à l'eau déminéralisée puis nettoyées mécaniquement. Les plaques ainsi colonisées sont ensuite fixées sur la paroi du CTR, et celui-ci est rempli avec un mélange « eau du réseau-sels minéraux ».

II.2.3 Cellule d'écoulement

La caractérisation des phénomènes de transfert interne de l'oxygène au sein des biofilms a nécessité le développement d'un pilote spécifique : la « cellule d'écoulement ». Le dessin 3-D de cette cellule réalisé sous AUTOCAD® est présenté Figure II-6.

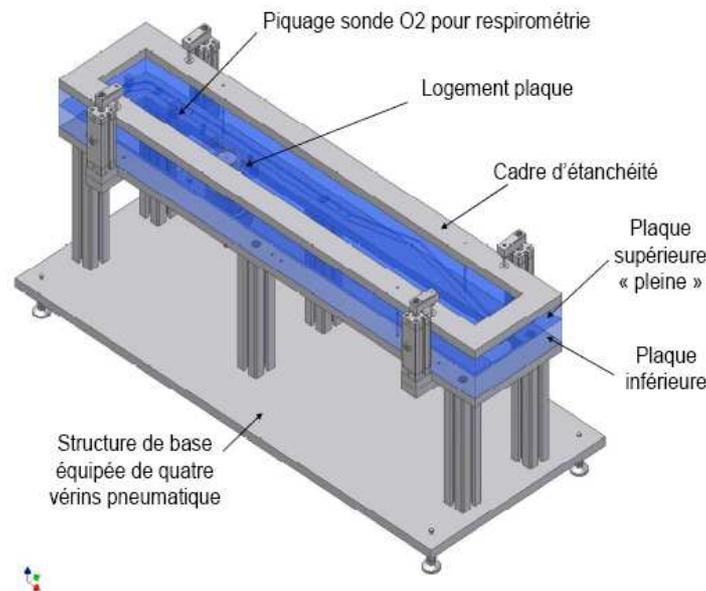


Figure II-6 : Dessin 3-D réalisé sous AUTOCAD® de la cellule d'écoulement en mode « fermé ».

Cette cellule d'écoulement est constituée de 4 éléments principaux : la structure de base équipée de vérins hydrauliques, la plaque inférieure, la plaque supérieure, et le cadre d'étanchéité. Une chambre d'écoulement est creusée dans la plaque inférieure, et consiste en un divergeant-convergeant suivi d'une conduite linéaire. Ce divergeant-convergeant permet de stabiliser l'écoulement dans la seconde partie de la chambre. Un logement permettant d'accueillir une plaque de polyéthylène est également creusé dans cette seconde partie de la chambre. La fixation de la plaque dans ce logement est réalisée en faisant le vide à l'aide d'un système de dépression.

Un système micrométrique permet de déplacer verticalement la plaque dans ce logement, afin que le biofilm soit systématiquement affleurant à la chambre d'écoulement quel que soit son épaisseur. Ce système permet donc de garantir la contrainte de cisaillement appliquée à la surface du biofilm. L'étanchéité du système est effectuée par un système de vérins hydrauliques qui viennent pincer l'ensemble des éléments.

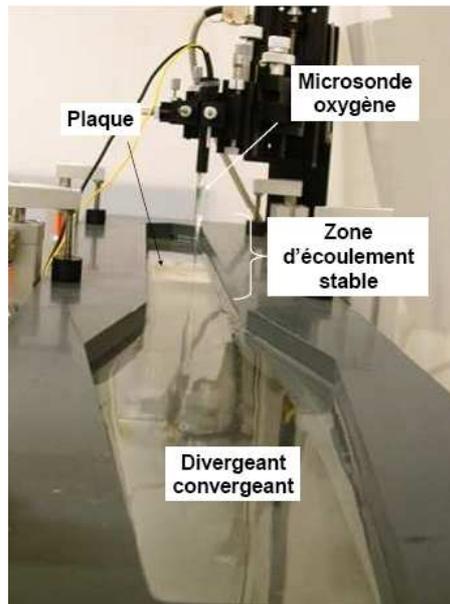


Figure II-7 : Photo du divergeant-convergeant en mode « ouvert » permettant l'utilisation de microsondes.

Cette cellule d'écoulement peut être utilisée soit en mode « fermé » soit en mode « ouvert ». Le mode « fermé » est utilisé pour réaliser soit des tests de détachement, soit des tests de respirométrie. Dans ce cas, le système est fermé à l'air par une plaque supérieure pleine. A l'inverse, le mode « ouvert » est utilisé pour l'acquisition de profils de diffusion à l'intérieur du biofilm. (Figure II-7). Dans ce cas, une chambre d'écoulement est également creusée de part en part de la plaque supérieure. Ceci permet d'utiliser les microsondes pour mesurer la concentration en oxygène dans le biofilm. Cette méthode de caractérisation est détaillée à la fin de ce chapitre.

II.3 Composition des effluents synthétiques

Différentes solutions en termes d'accepteurs final d'électrons, de donneurs d'électrons, de concentrations en substrats ou de ratios DCO/N ont été utilisées. Quelle que soit la solution, les substrats organiques et azotés étaient sous forme solubles. Les caractéristiques de ces solutions sont présentées ci-dessous.

II.3.1 Sources de carbone

Les sources de carbone ont été utilisées seules (Ethanol ou Glucose), ou mélangées entre elles (Ethanol, Glucose, Acide propionique et Acétate de sodium). Différentes charges en substrat organique ont été testées (2,5, 25 ou 40gDCO/m².j).

Les solutions d'alimentation étaient préparées par dilution d'une solution mère concentrée (concentration x50 ou x100) stockée à 4°C. Dans le cas d'un mélange, l'apport en DCO de chaque source de carbone était similaire.

II.3.2 Autres éléments nutritifs

La concentration en azote était calculée en fonction du rapport DCO/N et de la charge surfacique en substrat organique testés. Suivant l'apport en azote, ce composé était soit en excès par rapport aux besoins cellulaires (permettant ainsi d'établir la nitrification) soit en limitation (ne permettant qu'une croissance limitée des hétérotrophes). Comme pour le substrat organique, les solutions d'alimentation étaient préparées à partir d'une solution mère concentrée de sulfate d'ammonium, (NH₄)₂SO₄, stockée à 4°C. Des ratios DCO/N de 4, 9-10, 18 et 73gDCO/gN ont été testés.

Pour assurer la présence de certains éléments minéraux essentiels au métabolisme bactérien, une solution riche en sels minéraux est utilisée systématiquement. L'ajout des sels minéraux est réalisé de façon stœchiométrique, pour éviter la précipitation de minéraux. Le détail de la préparation des solutions mères de sels minéraux est donné Tableau II-1.

Tableau II-1 : Détail de la préparation des solutions mères de sels minéraux.

Solutions	Préparation
A	Solution tampon de phosphate (1,5N) : Dissoudre 207g de $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ dans de l'eau déminéralisée. Neutralisation à $\text{pH}=7,2$ avec KOH [6N] et dilution à 1L.
B	Solution de chlorure de calcium (0,25N) : Dissoudre 27,7g de CaCl_2 dans de l'eau déminéralisée et diluer à 1L.
C	Solution de sulfate de magnésium (0,41N) : dissoudre 101g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ et diluer à 1L.
D	Solution de chlorure ferrique (0,018N) : Dissoudre 4,84g de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ dans de l'eau déminéralisée et diluer à 1L.

La préparation du milieu de croissance consiste alors à ajouter 5mL de la solution A, plus 1mL des solutions B, C et D à 1L d'eau.

II.4 Caractérisation des biofilms

Comme cela a été énoncé précédemment, les biofilms ont été caractérisés en termes de fonctionnalités (abattement aérobie de la pollution carbonée ? nitrification seule ? nitrification et dénitrification ?), propriétés physiques (épaisseur de biofilm ? densité ? masse accumulée ?...), activités (activité maximum hétérotrophe ? autotrophe ?), diversité microbienne. L'ensemble des techniques utilisées pour cette caractérisation des biofilms est détaillé ci-dessous.

II.4.1 Fonctionnalités

L'identification des fonctionnalités du système biofilm se fait par le calcul des bilans de matières organiques et azotés aux bornes des CTRs. Les détails des calculs de ces bilans sont présentés ci-dessous.

II.4.1.1 Bilans sur le substrat organique :

Le détail du bilan de matières sur les composés organiques est donné par l'équation suivante :

Équation II-2

$$J_{S,entrée} = J_{S,sortie} + J_{S,éliminée}$$

Avec :

- $J_{S,entrée}$, la charge surfacique en substrats organiques appliquée en entrée du réacteur (gDCO/m².j).
- $J_{S,sortie}$, la charge surfacique en substrats organiques mesurée en sortie du réacteur (gDCO/m².j).
- $J_{S,éliminée}$, la charge surfacique en substrats organiques dégradé (gDCO/m².j).

II.4.1.2 Bilans sur les composés azotés

Bilan global sur le N-NH₄⁺ :

Le détail du bilan de matières global réalisé sur les composés azotés est donné par l'équation suivante :

Équation II-3

$$j_{N-NH_4,entrée} = J_{N-NH_4,sortie} + J_{N-NH_4,éliminé}$$

Avec :

- $j_{N-NH_4,entrée}$, la charge surfacique en azote ammoniacal appliquée en entrée du réacteur (gN/m².j).
- $J_{N-NH_4,sortie}$, la charge surfacique en azote ammoniacal mesurée en sortie du réacteur (gN/m².j).
- $J_{N-NH_4,éliminé}$, la charge surfacique en azote ammoniacal éliminée (gN/m².j).

Azote nitrifiable :

Le détail du bilan de matières réalisé pour déterminer la quantité d'azote nitrifiable est donné par l'équation suivante :

Équation II-4

$$J_{N\text{-nitrifiable}} = J_{N\text{-NH}_4,\text{entrée}} - J_{N\text{-assimilé}}$$

Avec :

- $J_{N\text{-nitrifiable}}$, la charge surfacique en azote nitrifiable ($\text{gN}/\text{m}^2.\text{j}$).
- $J_{N\text{-NH}_4,\text{entrée}}$, la charge surfacique en azote ammoniacal appliquée en entrée du réacteur ($\text{gN}/\text{m}^2.\text{j}$).
- $J_{N\text{-assimilé}}$, la charge surfacique en azote utilisé par assimilation ($\text{gN}/\text{m}^2.\text{j}$).

Le calcul de la charge surfacique en azote assimilé est réalisé suivant l'équation :

Équation II-5

$$J_{N\text{-assimilé}} = i_{bN} \cdot \frac{Y_{obs} \cdot Q_e \cdot (S_e - S_s)}{S}$$

Avec :

- i_{bN} , la part d'azote contenue dans les boues (entre 8-12%).
- Y_{obs} , le rendement de conversion observé ($\text{gMVS}/\text{gDCO}\text{éliminée}$).
- Q_e , le débit d'entrée ($\text{m}^3.\text{j}^{-1}$).
- S_e et S_s , les concentrations en DCO en entrée et sortie du réacteur ($\text{gDCO}.\text{m}^{-3}$).
- S , la surface colonisable (m^2).

Azote nitrifié :

Le détail du bilan de matières réalisé pour déterminer la quantité d'azote nitrifié est donné par l'équation suivante :

Équation II-6

$$J_{N\text{-nitrifié}} = J_{N\text{-nitrifiable}} - J_{N\text{-NH}_4,\text{sortie}}$$

Avec :

- $j_{N\text{-nitrifié}}$, la charge surfacique en azote nitrifié (gN/m².j).
- $J_{N\text{-nitrifiable}}$, la charge surfacique en azote nitrifiable (gN/m².j).
- $J_{N\text{-NH}_4,\text{sortie}}$, la charge surfacique en azote ammoniacal mesurée en sortie du réacteur (gN/m².j).

Azote dénitrifiable :

Le détail du bilan de matières réalisé pour déterminer la quantité d'azote dénitrifiable est donné par l'équation suivante :

Équation II-7

$$J_{N\text{-dénitrifiable}} = J_{N\text{-nitrifié}}$$

Avec :

- $j_{N\text{-dénitrifiable}}$, la charge surfacique en azote dénitrifiable (gN/m².j)
- $J_{N\text{-nitrifié}}$, la charge surfacique en azote nitrifié (gN/m².j).

Azote dénitrifiée :

Le détail du bilan de matières réalisé pour déterminer la quantité d'azote dénitrifié est donné par l'équation suivante :

Équation II-8

$$J_{N\text{-dénitrifié}} = J_{N\text{-dénitrifiable}} - J_{N\text{-Nox,sortie}}$$

Avec :

- $j_{N\text{-dénitrifié}}$, la charge surfacique en azote dénitrifié (gN/m².j).
- $J_{N\text{-dénitrifiable}}$, la charge surfacique en azote dénitrifiable (gN/m².j).
- $J_{N\text{-Nox,sortie}}$, la charge surfacique en NOx en sortie du réacteur (gN/m².j).

II.4.1.3 Méthodes analytiques :

Pour permettre de réaliser ces différents bilans de matière, plusieurs paramètres ont été mesurés chaque jour en entrée et en sortie des réacteurs : la Demande Chimique en Oxygène (DCO), l'azote ammoniacal, les nitrates, et les nitrites. Tous les échantillons sont analysés après filtration sur filtre nylon (0,45µm). L'ammonium a été mesuré par la méthode de Nessler (AFNOR, NFT 90.015). Les nitrites et nitrates ont été mesurés par spectrométrie (AFNOR, NFT 90.012). Enfin, la DCO a été mesurée par oxydation au dichromate de potassium (AFNOR, NFT 90.101).

II.4.2 Propriétés physiques des biofilms**II.4.2.1 Masse accumulée.**

La masse accumulée a été mesurée en termes de Matières En Suspension (MES) et de Matières Volatiles Sèches (MVS) suivant les normes AFNOR 90-105 et AFNOR 90-029 (AFNOR, 1994). Pour cette mesure, les biofilms sont mécaniquement détachés des plaques par raclage à l'aide d'une règle plastique. Le biofilm ainsi prélevé est ensuite placé dans une coupelle en aluminium pour la mesure des MES puis MVS.

II.4.2.2 Densité

La densité de biofilm a été évaluée suivant la corrélation présentée par Wäsche *et al.* (2002) :

Équation II-9

$$\rho_{\text{biofilm}} = \frac{M_{\text{sèche}}}{M_{\text{mouillée}}} \cdot \rho_{\text{eau}}$$

Avec :

- $M_{\text{sèche}}$, la masse de biofilm après 24h à 105°C (g).
- $M_{\text{mouillée}}$, la masse de biofilm après 30min de séchage à l'air libre (g).
- ρ_{eau} , la masse volumique de l'eau (kg/m³).

Une seconde méthode de mesure de la densité a été utilisée. Celle-ci est basée sur la mesure du volume de biofilm par analyse d'image et sur la mesure de masse accumulée. Les résultats des deux méthodes peuvent donc ainsi être confrontés et discutés.

II.4.2.3 Épaisseur et Rugosité

L'épaisseur moyenne et la rugosité des biofilms ont été caractérisées par analyse d'images. Cette méthode consiste à enregistrer des photos de biofilms vus de côté. Ces images sont ensuite traitées à l'aide d'un logiciel de traitement d'images (VISILOG®). Un programme développé au cours de cette thèse permet, grâce à une binarisation des images, de mesurer différents paramètres tels que l'épaisseur moyenne, l'épaisseur maximum, l'épaisseur minimum, la rugosité et la surface réelle développée.

Les différentes étapes de cette méthode sont présentées Figure II-8.

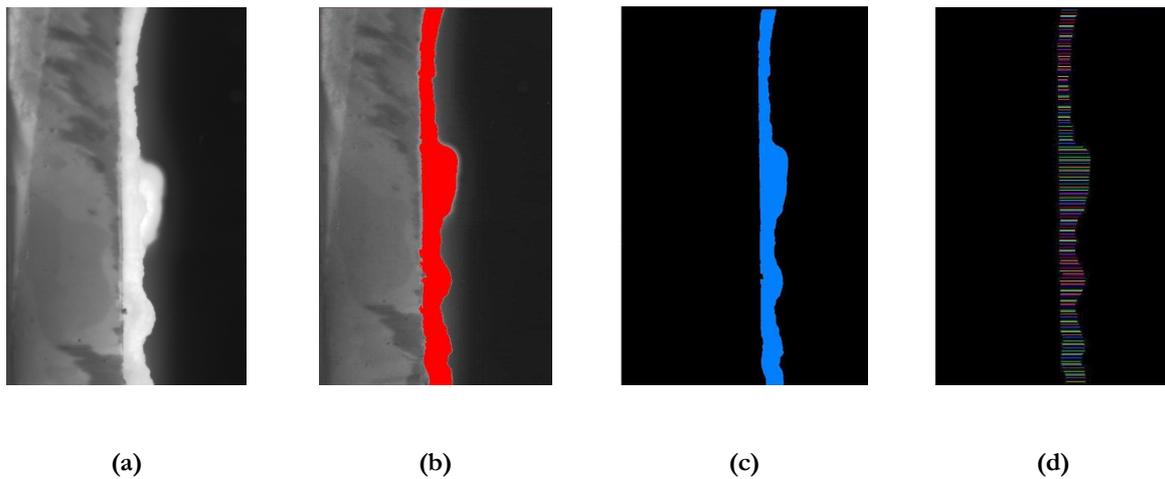


Figure II-8 : Présentation de 4 étapes de mesure d'épaisseur par analyse d'images.

Les 4 étapes de la mesure d'épaisseur par analyse d'image sont : le chargement de l'image brute (a), le réglage du seuil de l'échelle de niveaux de gris (b), la sélection et la binarisation du biofilm (c) et la mesure de l'épaisseur de biofilm tous les 200 μ m (d). La liste des valeurs d'épaisseur est ensuite rendue sous forme de tableur Excel.

L'épaisseur moyenne du biofilm correspond à la moyenne arithmétique de l'ensemble des valeurs mesurées. Les autres grandeurs caractéristiques mesurées *via* ce logiciel sont les paramètres Ra, Rq, Rv et Rsk. Le paramètre Ra correspond à la moyenne arithmétique des écarts par rapport à l'épaisseur moyenne. Les paramètres Rp et Rv définissent respectivement la hauteur du plus grand pic et la profondeur du creux le plus profond. Le paramètre Rsk correspond à la distribution des écarts par rapport à l'épaisseur moyenne de biofilm.

Pour cette caractérisation, une plaque est prélevée dans le CTR puis placée dans un récipient spécifique. Il s'agit d'un récipient rectangulaire en plexi-glace permettant de fixer la plaque verticalement. A l'aide de la même caméra que celle utilisée pour la PIV (Kodak Megaplug ES 1.0,

1600 × 1186 pixels), des images de biofilms vus de côté sont acquises. Ces images sont ensuite traitées une par une à l'aide du programme VISILOG® présenté ci-dessus. Pour chaque condition d'environnement de croissance, environ dix images sont analysées.

II.4.3 Activités autotrophiques et hétérotrophiques

La respirométrie est utilisée pour mesurer l'activité biologique d'une biomasse. Cette technique est basée sur la mesure de la vitesse de consommation de l'oxygène par des microorganismes, également appelé taux de respiration (rO_2).

Lors de la mesure du taux de respiration, le respiromètre est « fermé au gaz et au liquide ». L'avantage de ce système est qu'il permet de s'affranchir des phénomènes de transfert gaz-liquide. Un schéma du respiromètre est présenté Figure II-9.

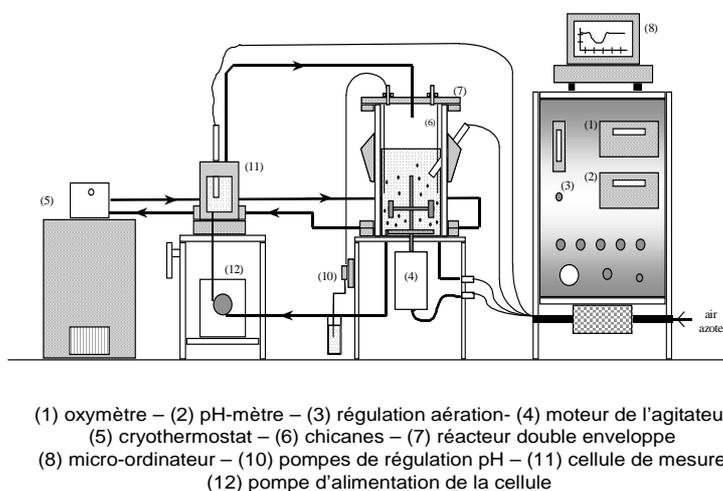


Figure II-9 : Schéma du respiromètre utilisé au cours de cette étude (Spérandio, 1998).

Le respiromètre est composé d'un contacteur et d'une cellule de mesure. Ces deux éléments sont maintenus à température constante à l'aide d'une double enveloppe alimentée en continu par un cryostat. Le contacteur permet l'agitation et l'aération continue des boues. Il est équipé d'une

régulation de pH (sonde Schott Gerate H8281, contrôleur Consort R301). La cellule de mesure a un volume de 0,25L et est agité à l'aide d'un barreau aimanté.

Le fonctionnement du respiromètre est basé sur la succession de cycles recirculation-temporisation-mesure. Une pompe péristaltique recircule séquentiellement les boues vers la cellule de mesure. La mesure du taux de respiration commence après la phase de recirculation et après une temporisation. Les durées de la recirculation et de la temporisation sont choisies par l'opérateur. La mesure de la concentration en oxygène dans la cellule est réalisée à l'aide d'une sonde WTW (modèle Cellox). Après un temps fixé par l'opérateur ou lorsque la concentration en oxygène atteint une valeur limite choisie par l'opérateur, un nouveau cycle peut démarrer.

Lors de la phase de mesure, le taux de respiration est égal à la pente de la courbe d'évolution de la concentration en oxygène. En effet, pendant la mesure, la cellule est fermée au gaz et au liquide, d'où l'expression du taux de respiration :

Équation II-10

$$r_{O_2} = -\frac{dC_{O_2}}{dt}$$

Cette méthode permet de caractériser les activités exogènes et endogènes, hétérotrophiques ou autotrophiques du système biofilm. Différentes solutions de substrats, spécifiques aux populations bactériennes ciblées, ont été utilisées :

- Substrat azoté pour interroger les bactéries autotrophes : solution de NH_4Cl (10gN/L) → 10mgN/L dans le réacteur lors d'un ajout.
- Inhibiteur des bactéries autotrophes : solution d'allythiourée ATU (10g/L) → 20mg/L dans le réacteur.
- Substrat organique facilement biodégradable pour interroger les bactéries hétérotrophes : solution d'acétate de sodium ou d'éthanol à 10gDCO/L → ajout de 40, 100 ou 500mgDCO/L suivant les essais.

Pendant ce travail de thèse, deux types d'échantillons ont été caractérisés en termes d'activité : soit des échantillons conventionnels de types « biomasse en suspension », soit des échantillons de type « biomasse fixée sur support ». Dans le cas d'une biomasse fixée, l'activité mesurée est limitée par la diffusion. Pour s'affranchir de ce phénomène, un protocole de déstructuration a été développé pendant cette thèse.

Cette méthodologie de déstructuration consiste à racler le biofilm à l'aide d'une pièce en plastique droite, puis à le déstructurer pendant 5min à l'aide d'un ultrathurax (vitesse de rotation de 1450tr/min). Ce protocole garantit que les cellules bactériennes ne sont pas lysées par le traitement mécanique. La Figure II-10 présente des photos de biofilms (a) avant déstructuration et (b) après déstructuration selon le protocole développé.

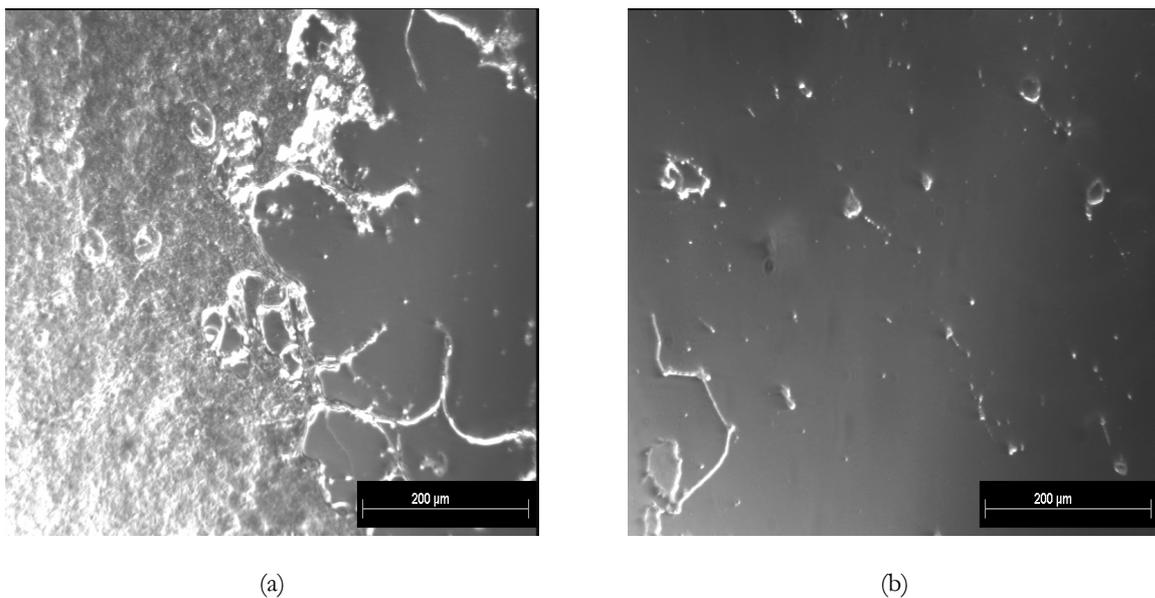


Figure II-10 : Photos de biofilms (a) avant déstructuration et (b) après déstructuration selon le protocole développé.

~~H.4.4~~ Diversité microbienne

La diversité microbienne des biofilms est caractérisée selon le principe de la SSCP (Single strand conformation polymorphism) ou électrophorèse par capillarité. Cette méthode repose sur l'analyse de

la région V3 de l'ADN ribosomal 16S (ADNr 16s). Après amplification de cette région par PCR (Polymerase Chain Reaction en anglais ou Réaction en Chaîne par Polymérase en français, la SSCP permet en effet de séparer les fragments d'ADN de même taille selon leur structure secondaire. La diversité microbienne est alors représentée par un profil de pics où chaque pic représente un ADNr 16S et donc une espèce bactérienne. La flore microbienne est d'autant plus riche que le nombre de pics composant le profil est élevé.

Le protocole d'analyse SSCP consiste à mélanger une fraction de biofilm ou de particules détachées au mélange suivant : 1µl du produit PCR dilué additionné à 18µl de formamide déionisée et à 1µl du standard interne ROX 400 HD (Applied Biosystems, California, USA) dilué 10 fois. L'échantillon est ensuite dénaturé pendant 5 min à 94°C et placé directement dans la glace pendant 10min. L'électrophorèse est effectuée avec l'analyseur ABI 3130 (Applied Biosystems). Les fichiers résultats sont ensuite exportés au format csv grâce au logiciel Chromagna (développé par le Dr. Mark J. Miller at the US National Institute of Health) et les statistiques sont effectuées grâce aux logiciels SAFUM et Matlab 6.5 (MathWorks).

II.5 Caractérisation des phénomènes de détachement

En complément de la caractérisation des propriétés des biofilms, les phénomènes de détachement ont également été étudiés. Les caractéristiques physiques des particules détachées ont notamment été mesurées à la fois par granulométrie et par analyse d'image (PIV). La granulométrie permet une caractérisation précise des petites particules (les particules majoritaires) alors que l'analyse d'image est plus adaptée à l'étude des grosses particules.

II.5.1 Granulométrie

La mesure de la taille des particules détachées est réalisée à l'aide d'un granulomètre Mastersizer 2000 (MALVERN Instrument SA). Cette technique repose sur la capacité des particules à diffracter la

lumière. Toute particule éclairée par un faisceau laser diffracte la lumière dans toutes les directions avec une répartition d'intensité qui dépend de la taille de la particule.

Les lois propres au phénomène de diffraction ne sont facilement applicables que dans certaines conditions :

- les particules sont sphériques, homogènes et isotropes,
- les mouvements des particules sont aléatoires,
- les particules sont suffisamment éloignées les unes des autres,
- le milieu est transparent et n'absorbe pas le faisceau laser.

Dans la pratique, un échantillon de particules détachées diluée avec du perméat est injecté dans une cellule de mesure grâce à une pompe péristaltique située en aval de la cellule. La dilution dans le perméat permet de s'affranchir des phénomènes de ré-agrégation tout en maintenant les caractéristiques physico-chimiques du milieu. L'échantillon est prélevé environ 1h après le nettoyage du CTR. En effet, après nettoyage, le CTR est rempli avec le surnageant et l'alimentation est coupée.

La rotation du cylindre interne est logiquement maintenue pendant cette période. Les particules détachées sont prélevées grâce à un piquage situé à mi-hauteur du CTR.

La Figure II-11 indique le principe de fonctionnement : un faisceau laser parallèle de 18 mm de diamètre est obtenu en collimatant un faisceau issu d'un tube à gaz Hélium Néon.

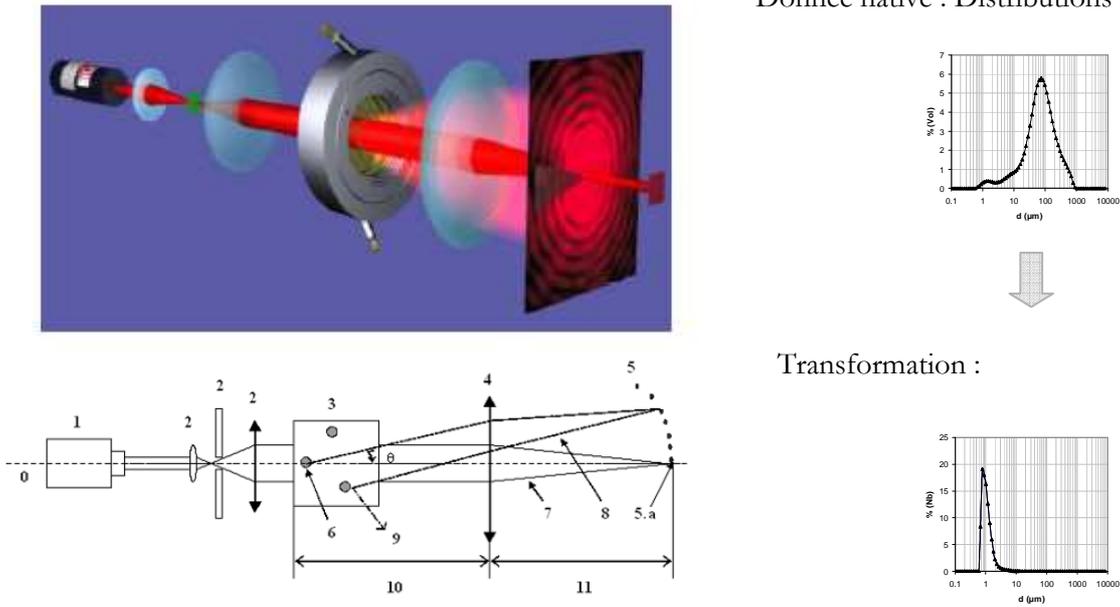


Figure II-11 : Principe de mesure par granulométrie et de traitement de données.

Dans cette étude, l'indice de réfraction du dispersant est considérée égal à 1,33 et correspond à l'indice de réfraction de l'eau. Pour les particules détachées, principalement composées de matière organique, l'indice de réfraction retenu est de 1,596.

Chaque distribution en nombre ou en volume correspond à la moyenne arithmétique de trois mesures, réalisées sur un même échantillon. Remarquons que la distribution en nombre permet de caractériser principalement les petites particules, alors qu'une distribution en volume permet de caractériser les grosses particules.

II.5.2 Particle Image Velocimetry

La PIV (Particle Image Velocimetry) est une méthode expérimentale généralement utilisée pour caractériser l'hydrodynamique d'un réacteur. Dans ce contexte, cette méthode permet d'acquérir les champs de vitesse instantanée dans un plan 2-D. Dans notre étude, la PIV a été utilisée afin de mesurer les tailles de particules détachées. Comparé à d'autres méthodes telles que la granulométrie ou le microscope, cette technique présente l'avantage d'être non-intrusive et non-destructive.

Cette méthode PIV de caractérisation des particules détachées comprend trois étapes :

- L'acquisition des images,
- Le traitement des images,
- Le calcul des distributions de tailles.

II.5.2.1 L'acquisition des images

Le système expérimental mis en place pour acquérir les images des particules détachées est présenté Figure II-12.

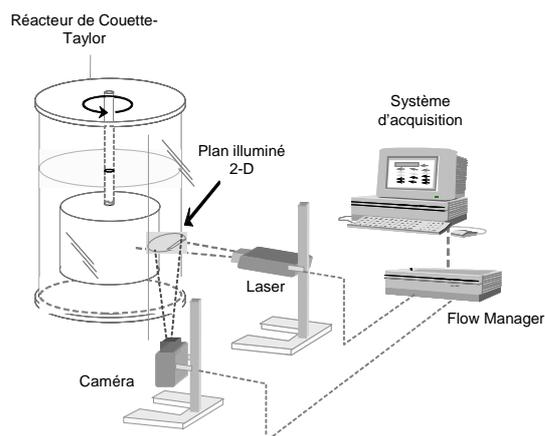


Figure II-12 : Système PIV pour la caractérisation des particules détachées.

Le système d'acquisition est directement couplé au CTR dans lequel sont développés les biofilms. La caractérisation par PIV, tout comme la mesure granulométrique, est réalisée directement après avoir nettoyé le CTR et l'avoir rempli avec le surnageant. Pour la mesure par PIV, l'alimentation du CTR est coupée. Ce système inclut un laser (Mini Yag, 15 Hz, 30 mJ), une caméra (Kodak Megaplug ES

1.0, 1600×1186 pixels), un ordinateur de contrôle équipé du logiciel Flow Manager®. L'acquisition des images consiste à :

- Illuminer à l'aide du laser un champ 2-D de l'écoulement pour visualiser les particules détachées.
- Enregistrer instantanément les images de ce champ.

Les particules détachées, entraînées par l'écoulement du fluide, passe dans le champ 2-D illuminé par le laser. L'épaisseur du faisceau laser étant plus fine que celle des particules, l'image enregistrée est un plan de section des particules. Pour mesurer correctement la taille des particules, seules les particules dont l'intersection avec le plan du laser est maximum doivent être traitées.

II.5.2.2 Traitement d'images

Le traitement d'images est réalisé avec le logiciel VISILOG® également utilisé pour mesurer l'épaisseur et la rugosité des biofilms. Le but de cette étape est d'éliminer les particules dont le contour n'est pas net. Pour cela, un filtre basé sur une échelle de niveau de gris est utilisé. Par conséquent, de nombreuses particules sont éliminées et un grand nombre de photos est nécessaire.

II.5.2.3 Production des distributions

Les différentes caractéristiques des particules détachées sont ensuite calculées. Seules des données 2-D peuvent être déterminées. Il s'agit principalement des distributions en nombre et en volume des tailles de particules.

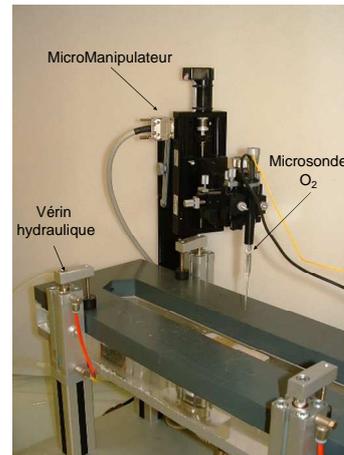
II.6 Caractérisation du transfert interne en oxygène

Le transfert interne de l'oxygène est caractérisé par mesure des profils de concentrations en oxygène dans le biofilm. A cet effet, la cellule d'érosion est couplée à un système de microsondes (Figure II-13). Ce système comprend différents éléments :

- Les microsondes
- Le micromanipulateur
- Le PC de commande et de contrôle



**Couplage micromanipulateur et cellule
d'écoulement**



**Système double tête équipée de deux
sondes**

Figure II-13 Photos du montage expérimental des microsondes.

Les microsondes à oxygène sont des microélectrodes de type Clark. Elles sont basées sur la diffusion de l'oxygène à travers une membrane silicone et sur sa réduction au niveau d'une cathode polarisée avec une anode interne Ag/AgCl. Le flux d'électrons issu de l'anode est fonction de la quantité d'oxygène réduit au niveau de la cathode, qui est fonction de la concentration en oxygène proche de la pointe. Le diamètre de la pointe est d'environ 8-12 μ m. Ces microsondes ont un temps réponse de 3s et une précision d'environ 0,1mgO₂/L.

Les mesures de profils de concentrations en oxygène sont réalisées sous différentes conditions en termes d'activités exogènes autotrophiques et hétérotrophiques. Par conséquent, plusieurs concentrations en azote ou en DCO dans le liquide sont testées (25, 50, 100, 500 et 1000mgDCO/L).

L'apport en oxygène est maintenu constant pendant la mesure des profils et est assuré grâce à la présence d'une chambre d'aération sur la boucle de recirculation. Les conditions hydrodynamiques en termes de nombre de Reynolds ($Re=300$) sont également maintenues constantes.

Chapitre III : Ecriture et évaluation du modèle de croissance des biofilms

III.1 Introduction et objectifs du chapitre

L'objectif principal de ce travail de thèse est de décrire, puis comprendre et modéliser les mécanismes de compétition entre bactéries autotrophes et hétérotrophes au sein d'un biofilm nitrifiant en interaction avec le liquide environnant. Il s'agit alors d'appréhender des processus se déroulant au sein d'un système biologique complexe (multi-substrats et multi-espèces) faisant intervenir de nombreux phénomènes (croissance bactérienne, transfert interne et externe de composés particuliers ou solubles...). L'utilisation d'un modèle structuré paraît alors judicieuse.

L'objectif de ce chapitre n'est pas de développer un modèle calibré dont les paramètres auraient été identifiés à partir de données expérimentales. Il s'agit ici de construire un modèle qualitatif, dont la structure et le comportement sont cohérents par rapport aux observations expérimentales. Pour accroître sa représentativité, le choix du modèle va être réalisé à partir d'observations expérimentales réalisées sur des biofilms développés sous différentes conditions opératoires variées et contrastées. Le modèle développé doit permettre de reproduire ces comportements expérimentaux afin d'aider à la compréhension des mécanismes gouvernant le phénomène de compétition. Un biofilm étant un système très complexe, un certain nombre de simplifications doivent être proposées. La règle d'or en modélisation consiste, en effet, à élaborer un modèle aussi simple que possible et d'un degré de complexité en adéquation avec les besoins. L'objectif de ce premier chapitre de résultats est donc de présenter, en les justifiant autant que possible, les choix concernant les caractéristiques structurelles du modèle développé, en termes de processus biologiques et physiques retenus, et de système considéré. Pour des transformations biologiques données, on choisira également les paramètres cinétiques vrais correspondants, les paramètres de structure du biofilm (densité, porosité, épaisseur), les paramètres relatifs au transport des espèces solubles et particulières en considérant en particulier le processus de détachement. Le choix des processus retenus, ainsi que celui des valeurs des paramètres, seront discutés et justifiés par des observations expérimentales.

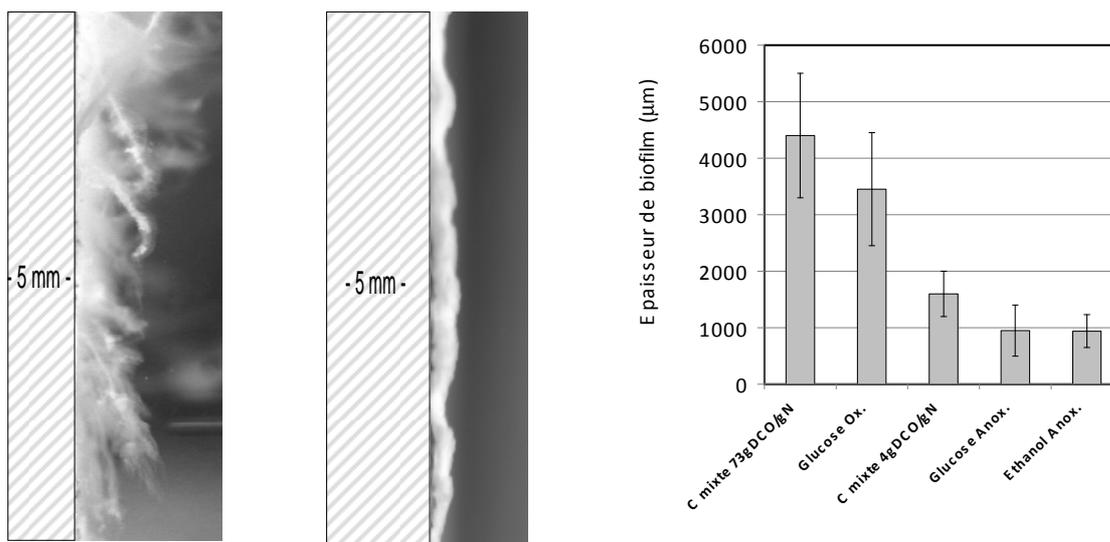
Remarquons que l'analyse des observations expérimentales a un double objectif: (i) aider à déterminer la structure du modèle et les valeurs des paramètres biologiques et physiques (ii) évaluer les capacités de prédiction du modèle.

Les simulations utilisées dans ce chapitre sont faites à partir du modèle développé, soit après un certain nombre d'itérations entre observations expérimentales et comportement du modèle.

III.2 Observations expérimentales de biofilms

La Figure III-1 permet de visualiser des biofilms développés sous différents environnements en termes de conditions de croissance ou de conditions hydrodynamiques, après 1 ½ de croissance. L'objectif est d'illustrer la diversité des biofilms développés et caractérisés au cours de ce travail de thèse.

Dans l'exemple ci-dessous, c'est la diversité en termes de morphologie et d'épaisseur qui est observée. D'autres aspects (fonctionnalités, taux observés de réactions, diversité microbienne) illustrent également la diversité des biofilms caractérisés mais ne sont pas présentés sur la Figure III-1.



a) Photo de biofilm développé avec une source de carbone mixte en conditions aérobies (2,5gDCO/m².j, 73gCOD/gN)

b) Photo de biofilm développé avec éthanol en conditions anoxiques (38gDCO/m².j, 20gDCO/gN)

c) Evolution de l'épaisseur de biofilms développés sous différents environnements de croissance

Données expérimentales

Figure III-1 : Illustrations de la diversité en termes de morphologie et d'épaisseur des biofilms développés sous différentes conditions environnementales et hydrodynamiques.

Les deux photos présentées ci-dessus témoignent de la diversité de morphologies développées en fonction des conditions de croissance (nature de l'accepteur et donneur d'électrons, charge surfacique en substrat organique, ratio DCO/N, etc.). Les propriétés physiques du biofilm, comme par exemple son épaisseur, sont significativement impactées par ces conditions de croissance (Figure III-1c). L'épaisseur des biofilms caractérisés pendant cette étude varie dans une gamme assez large, allant de 1000μm à plus de 4000μm. Les conditions hydrodynamiques (contrainte de cisaillement, nature du détachement, épaisseur de la sous-couche diffusionnelle) influencent également les propriétés des biofilms.

Au regard de cette diversité de biofilms, une attention particulière doit être portée à la relation entre les conditions de croissance et les caractéristiques développées. Il sera, en particulier, nécessaire de représenter la dépendance entre la valeur de l'épaisseur à l'équilibre et les conditions opératoires et d'environnement.

III.3 Objectifs du modèle

III.3.1 Représentation à l'échelle macro du réacteur

Les compartiments considérés dans le modèle sont : la phase liquide, la couche limite ou sous couche diffusionnelle, et le biofilm (Figure III-2).

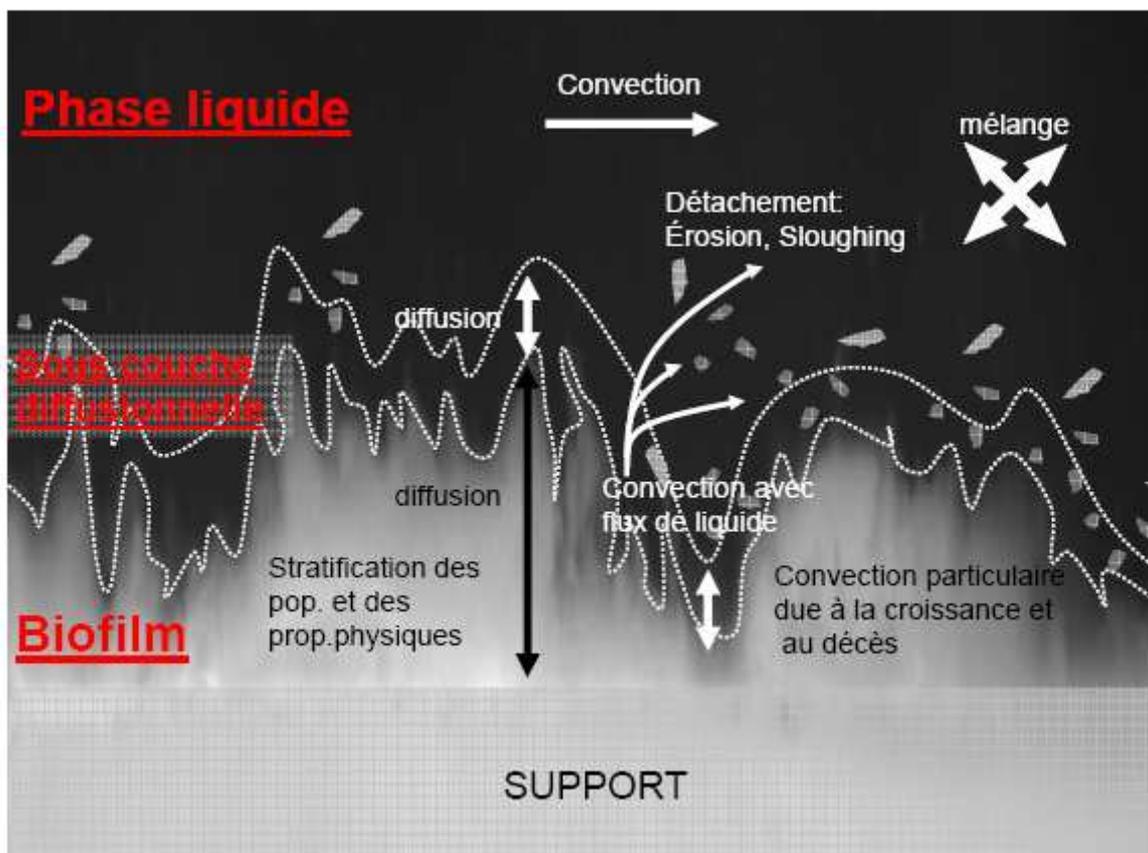


Figure III-2 : Schématisation du système biofilm modélisé.

Le compartiment « support » est considéré inerte. Le compartiment de la phase liquide est considéré comme parfaitement mélangé. Dans nos conditions opératoires, le transfert d'oxygène n'impacte pas le détachement puisque l'oxygénation est externe (voir *chapitre II*). Les processus réactionnels peuvent avoir lieu dans le biofilm mais aussi dans le liquide du fait du détachement de particules. La compétition entre la biomasse en suspension et la biomasse fixée peut avoir un impact significatif sur les propriétés du biofilm. Expérimentalement, des nettoyages journaliers sont effectués pour éliminer les cellules détachées. AQUASIM® ne permettant pas de simuler ces nettoyages journaliers et pour être cohérent par rapport aux études expérimentales, les constantes de mortalité diffèrent en fonction du compartiment considéré. Dans le compartiment « liquide », des valeurs très élevées de 100j^{-1} ont été volontairement choisies pour simuler les nettoyages journaliers.

III.3.2 Représentation à l'échelle du biofilm

Parce que cela a été observé expérimentalement le modèle à développer doit pouvoir rendre compte d'une compétition pour les substrats et l'espace, au sein du biofilm, entre les populations microbiennes fonctionnelles impliquées dans l'élimination de la DCO et de l'azote. A l'échelle du biofilm, les objectifs du modèle à développer sont les suivants :

- Représenter les diverses fonctions impliquées dans l'élimination de l'azote (nitrification, dénitrification) et l'élimination aérobie de la DCO ainsi que leurs distributions. Les concentrations des populations microbiennes associées à ces fonctions seront déduites sur la base des bilans de matières. Il s'agit des populations responsables des fonctions d'élimination de la DCO en aérobie et en anoxie : (X_BH (bactéries hétérotrophes)), et des fonctions de nitrification : (X_BAI (bactéries nitritantes), X_BAA (bactéries nitratantes)).
- Représenter les différents profils de concentration en substrats qui déterminent les capacités de transformations biologiques locales. Seront donc pris en compte: DCO, ammonium, nitrites, nitrates, oxygène. On représentera également certains produits des réactions, en particulier le

matériel inerte provenant de la lyse des cellules (X_I). Les processus de transformation associés à chacune de ces espèces : la croissance, le décès, ..., doivent ainsi être explicités.

- Représenter la structure du biofilm : épaisseur, masse du biofilm, propriétés homogènes ou non (état de surface, porosité, densité, cohésion, diffusion...).
- Représenter les processus de transport :
- Transfert de composés solubles (convection dans le compartiment « liquide », diffusion dans le compartiment « biofilm »). Les coefficients de diffusion et la densité du biofilm sont constants.
- Transfert de composés particuliers : la dépendance entre le taux de détachement et, par exemple, la contrainte de cisaillement et l'épaisseur de biofilm devra être explicitée.

Un modèle mathématique 1-D a été développé. La dimension 1-D a été choisie, plutôt qu'une approche 2-D ou 3-D pour différentes raisons. La première tient compte de la disponibilité du logiciel AQUASIM qui a démontré une capacité et une pertinence pour l'étude des processus de compétition (Wanner *et al.*, 2006). La deuxième repose sur le fait que les gradients de concentration se situent essentiellement selon une direction perpendiculaire à la surface du biofilm. En effet, le milieu liquide au dessus du biofilm est considéré comme parfaitement mélangé. Ainsi, les hétérogénéités majeures, microbiennes, chimiques et physiques, se distribuent selon un axe perpendiculaire à la surface du biofilm. Le modèle 1-D permet alors, par exemple, d'obtenir :

- Les concentrations et les bilans de matière des composés particuliers et solubles, permettant de calculer les taux observés de réaction.
- L'évolution temporelle de l'épaisseur de biofilm en fonction des différents phénomènes tels que la croissance et le décès bactérien, le détachement ou encore l'attachement.
- La distribution spatiale des composés particuliers en fonction de l'épaisseur de biofilm.
- La distribution spatiale des composés solubles en fonction de l'épaisseur de biofilm.

L'analyse conjointe de ces différentes prédictions devrait, selon notre point de vue, répondre à la problématique posée, qui consiste à analyser et comprendre les mécanismes de compétition autotrophe-hétérotrophe au sein d'un biofilm nitrifiant en interaction avec le liquide environnant et selon la structure du biofilm. A l'inverse des modèles 2-D et 3-D, le modèle 1-D ne permet cependant pas de représenter les hétérogénéités physiques du biofilm dans les autres directions. Par exemple, les hétérogénéités de surface (rugosité) ne seront pas considérées. Pourtant, elles peuvent avoir un impact sur la nature du détachement (augmentation de la contrainte locale) et sur les phénomènes de transport (convection dans les pores, diffusion). Indirectement, la structure tridimensionnelle peut donc influencer les profils de concentrations en substrats dans le biofilm et sans doute la compétition microbienne. Néanmoins, nous verrons qu'une adaptation du modèle 1-D peut rendre compte indirectement des conséquences d'une hétérogénéité tridimensionnelle.

III.4 Processus biologiques

III.4.1 Croissance autotrophe

Etant donné l'objectif du travail d'étudier la compétition des fonctions microbiennes dans un système à biofilm, les deux fonctions de la nitrification ont été considérées : la nitritation et la nitratisation.

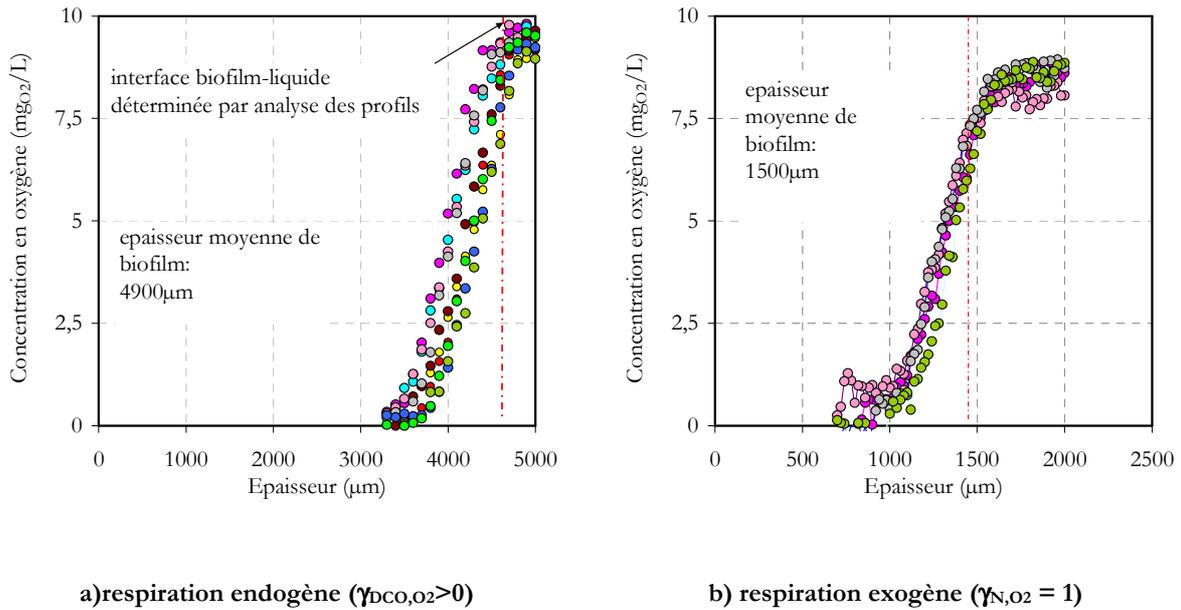
Nous pourrions ainsi considérer l'influence des conditions locales d'environnement sur la distribution spatiale de ces deux fonctions opérant de manière successive. Pour ces deux populations, on ne considérera que les processus de limitation par les substrats donneurs et accepteurs d'électrons. Notons que même si le substrat des bactéries nitritantes semble être le NH_3 en équilibre avec le NH_4^+ (Pambrun, 2005), c'est le NH_4^+ qui est considéré dans cette étude. Cette hypothèse ne permet pas de prendre en compte une limitation de la croissance par le NH_4^+ à des pH faibles. Cependant, dans nos biofilms, la présence systématique de la dénitrification augmente le pH local, ce qui peut modifier la forme du substrat azoté. La distinction NH_3 -substrat pourra cependant constituer une perspective de ce travail.

La limitation de la croissance des bactéries nitrifiantes par la source de carbone HCO_3^- n'est pas considérée étant donné qu'une production *in situ* est réalisée par les bactéries hétérotrophes. Les processus de croissance et de décès des bactéries nitritantes et nitratantes sont formalisés aux lignes 4, 5, 7 et 8 du tableau III-1. L'azote produit lors de la lyse de tous les types de cellules est recyclé sous forme de NH_4^+ .

III.4.2 Croissance hétérotrophe

La DCO peut être consommée soit par voie aérobie, soit par voie anoxique. Elle peut également être libérée *in situ* par les processus de mortalité. Les processus de croissance des bactéries hétérotrophes, sous conditions aérobies ou anoxiques, sont formalisés aux lignes 1, 2, et 6 du tableau III-1.

L'impact de la dénitrification sur la distribution des populations hétérotrophes et autotrophes est certainement à considérer. Il existe en effet des microenvironnements anoxiques au sein des biofilms, qui résultent à la fois de la limitation de la diffusion de l'oxygène dans la matrice et de la production de nitrates par la réaction de nitrification. Ces gradients engendrent une répartition spatiale hétérogène des environnements aérobies et anoxiques, plus ou moins forte selon par exemple la nature du détachement ou selon les charges surfaciques appliquées en DCO, oxygène et azote. Cet aspect est illustré par la Figure III-3 qui représente les profils de concentrations en oxygène dissous mesurés à l'aide d'une micro-sonde pour des biofilms développés sous des charges organiques surfaciques de $25\text{gDCO}/\text{m}^2\cdot\text{j}$ et $2,5\text{gDCO}/\text{m}^2\cdot\text{j}$ avec un ratio $4\text{gDCO}/\text{gN}$. Dans le cas a), l'épaisseur de biofilm mesurée par analyse d'image est de l'ordre de $5000\mu\text{m}$. Lors de l'acquisition du profil, le biofilm est en respiration endogène (pas d'apport de substrat exogène, le $\gamma_{\text{S},\text{O}_2}$ est cependant supérieur à 0 car des substrats stockés et le NH_4^+ libéré par l'hydrolyse engendrent une respiration endogène significative) et le Reynolds qui caractérise l'écoulement à sa surface est de 300. Dans le cas b), l'épaisseur moyenne du biofilm est d'environ $1500\mu\text{m}$. Le biofilm b) est en respiration exogène avec une concentration en ammonium de $25\text{mgN}/\text{L}$ dans le liquide ($\gamma_{\text{N},\text{O}_2} = 1$). Un Reynolds est maintenu constant de 300.



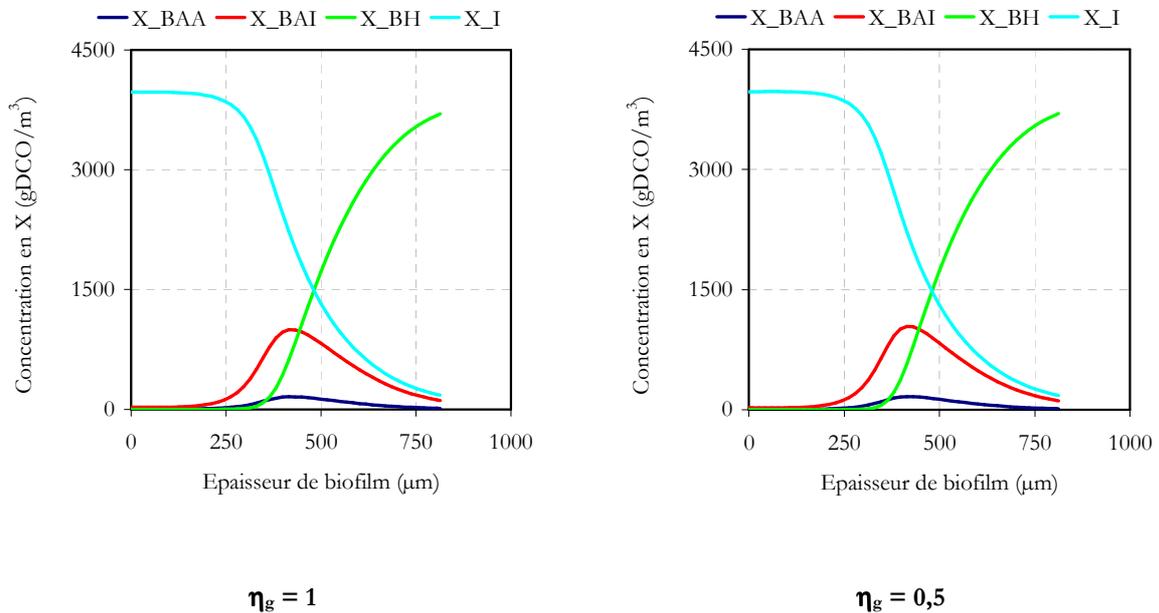
Données expérimentales

Figure III-3: Profils de concentrations en oxygène dans le cas (a) d'un biofilm développé sous une charge de 25gDCO/m².j avec un ratio de 4gDCO/gN en respiration endogène ($\gamma_{\text{DCO},\text{O}_2} > 0$), (b) d'un biofilm développé sous une charge de 2,5gDCO/m².j avec un ratio de 4gDCO/gN, concentration initiale en ammonium du liquide, 25 mg/l, donc biofilm en respiration exogène ($\gamma_{\text{N},\text{O}_2} = 1$).

Dans le cas a), l'oxygène est complètement consommé sur 1000μm et donc 80% de l'épaisseur est caractérisé par une concentration en oxygène proche de 0 (Figure III-3a). La consommation totale de l'oxygène sur 20% du biofilm indique que la DCO est en excès par rapport à l'oxygène à l'intérieur de celui-ci, malgré un coefficient $\gamma_{\text{DCO},\text{O}_2}$ proche de 0 qui serait calculé à partir des concentrations dans le liquide. Cette étude a été reproduite sur un biofilm plus fin (Figure III-3b). Pour un coefficient $\gamma_{\text{N},\text{O}_2}=1$ (soit 25mgN/L dans le liquide), l'oxygène est consommé sur environ 500μm. Par conséquent, les deux tiers du biofilm sont privés d'oxygène et représentent potentiellement une zone de réaction anoxique. Ces résultats sont en accord avec ceux de Zhang *et al.*,(1994).

Pour ces raisons, l'hypothèse de l'existence d'une zone de réaction en anoxie est donc pleinement justifiée et le processus de dégradation de la DCO par les bactéries hétérotrophes sous des conditions anoxiques a été pris en compte. Cet aspect est d'autant plus important que les nitrates permettent aux bactéries hétérotrophes de poursuivre leur croissance en absence d'oxygène ce qui leur confère un nouvel avantage par rapport aux bactéries autotrophes.

Se pose alors la question de la fraction de biomasse hétérotrophe capable de réaliser la dénitrification, fraction matérialisée par le facteur η_g placé sur l'équation du taux de dénitrification (Gujer *et al.*, 1999). L'impact de la valeur de η_g sur la répartition des populations à l'équilibre a été étudié dans le cas d'un biofilm développé avec limitation d'oxygène, sous une charge surfacique de 2,5gDCO/m².j avec un ratio DCO/N de 4gDCO/gN. Pour ce ratio, l'excès d'azote favorise la nitrification et donc la disponibilité des nitrates au sein du système. Par rapport à la disponibilité de cet accepteur final d'électrons, la croissance des bactéries hétérotrophes capables de réaliser la dénitrification est non limitée.



Données numériques

Figure III-4: Impact, sur les profils des concentrations des espèces particulières, de la valeur du coefficient η_g dans le cas d'un biofilm développé à une charge de 2,5gDCO/m².j avec un ratio de 4gDCO/gN.

D'après la Figure III-4, en régime stabilisé, les répartitions de la biomasse selon l'épaisseur de biofilm sont similaires pour des coefficients η_g de 1 et 0,5. Aucun impact de ce coefficient n'est observé sur le rendement de dénitrification. Aucun impact sur le flux d'azote nitrifié et donc sur la quantité de biomasse autotrophe n'est observé. Ce résultat, obtenu dans des conditions où la dénitrification est favorisée par rapport à la disponibilité des nitrates, confirme que le coefficient η_g n'impacte pas significativement la répartition spatiale des populations pour notre modèle lorsque le régime stabilisé est atteint. Par conséquent, nous avons considéré que, sous nos conditions d'étude, ce coefficient n'influencerait pas la coexistence bactéries autotrophes-hétérotrophes. Ce facteur a été maintenu dans notre modèle pour tenir compte d'un effet de compétition en condition dynamique.

Une valeur classique de 0,8 a été retenue, en accord avec les différentes valeurs retenues dans la littérature, dont les modèles ASM (Gujer *et al.*, 1999).

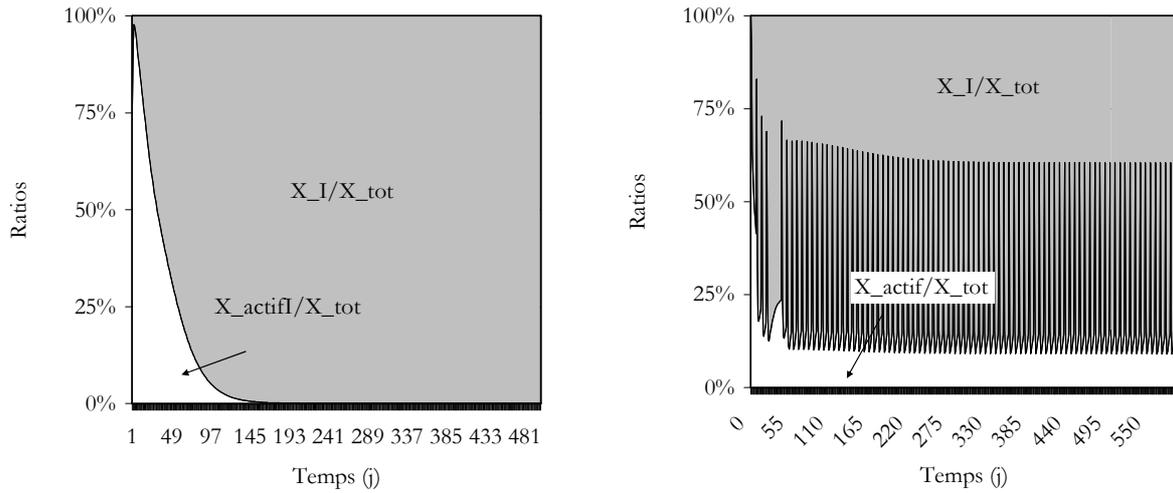
III.4.3 Lyse cellulaire

Les différents processus de lyse cellulaire ont été présentés dans le *chapitre I* (van Loosdrecht et Henze, 1999). Dans le cadre de notre étude, les processus de décès peuvent impacter la compétition selon deux voies.

La première voie concerne l'influence sur le profil d'oxygène. Dans notre modèle, nous avons opté pour un modèle de mort-génération qui n'engendre pas de consommation d'oxygène directement sur les produits de lyse. La consommation d'oxygène correspondante intervient lors de la consommation des substrats issus de la lyse. A l'état d'équilibre, la quantité d'oxygène consommée sur les produits de lyse est similaire à celle consommée par un modèle de respiration endogène. Il n'y a donc *a priori* pas d'influence sur le profil spatial d'oxygène.

La deuxième voie concerne les produits de lyse nommés X_I dont une fraction f_{si} est particulaire et inerte vis-à-vis de la biodégradation. La biomasse inerte X_I va donc s'accumuler au sein du biofilm et prendre éventuellement la place des bactéries vivantes.

Cette fraction n'étant éliminée que par le détachement, la forme de ce dernier va conditionner le temps de séjour local du X_I et donc sa distribution au sein du biofilm. Cet aspect est illustré par la Figure III-5 qui représente l'évolution des fractions actives et inerte dans le cas d'un détachement surfacique continu (a) et dans le cas d'un détachement volumique discontinu (b) à la base du biofilm. Ces différents mécanismes de détachement seront explicités plus loin dans cette thèse, au *chapitre IV*.



a) Cas d'un détachement surfacique continu

b) Cas d'un détachement volumique dynamique
détachant 25% de l'épaisseur initiale de biofilm 1
fois par semaine

Données numériques

Figure III-5: Evolution des ratios de biomasse active et de biomasse inerte à la base du biofilm en fonction du temps dans le cas d'un biofilm soumis (a) à un détachement surfacique continu, (b) à un détachement volumique en dynamique.

Lorsque le régime est stabilisé, la valeur de f_{xi} n'a pas d'impact sur les ratios de biomasse active et inerte. L'impact du mode de détachement est par contre très significatif. Cet aspect fera l'objet d'une étude spécifique au chapitre suivant. Notons également que dans le cas d'un biofilm soumis à un détachement surfacique continu, sa base est entièrement composée de biomasse inerte.

Si un processus d'érosion profonde intervient, le modèle suppose donc que l'activité ne repartira pas. Nous verrons au *chapitre IV* que la nature du détachement influencera cette conclusion.

III.4.4 Processus d'hydrolyse

La DCO peut être soluble, et donc directement assimilable ou, particulaire, voire colloïdale, (X_S), et alors nécessiter une hydrolyse avant d'être consommée. Dans notre modèle, notre effluent synthétique est composé de substrats solubles facilement assimilables, les substrats hydrolysables ne proviennent donc que de la lyse cellulaire. La considération de X_S est attachée à une cinétique de production de substrat soluble S_S . La prise en compte de l'hydrolyse ralentit la production de S_S lors du processus de décès.

Indirectement, si le processus de décès est la respiration endogène, l'hydrolyse a un impact sur la cinétique de consommation de l'oxygène qui est ralentie. Un impact sur les profils transitoires de concentrations en oxygène est envisageable. Cet aspect ne nous a pas paru majeur dans le cas de notre travail et nous n'avons donc pas considéré ce processus dans notre modèle. Les produits de lyse forment directement du S_S .

III.4.5 Processus de stockage intracellulaire des composés organiques solubles

Ce processus consiste à stocker les composés organiques solubles. Il nécessite de l'énergie sous forme d'ATP qui peut être directement fournie par la respiration aérobie ou par la dénitrification. Ce processus n'est pas pris en compte dans notre modèle. En effet, comme pour le processus d'hydrolyse, rappelons que nous étudions principalement des états pour lesquels le régime épuratoire est stabilisé. Le stockage n'influe que sur la cinétique de consommation des produits intracellulaires, et donc transitoirement sur le taux de consommation de l'oxygène. Une étude respirométrique menée sur différents biofilms et en utilisant les quatre sources de carbone de l'alimentation a été réalisée. Un phénomène de stockage a été identifié lors d'un apport exogène d'acétate de sodium. Ce phénomène n'a pas été observé avec le glucose, l'éthanol ou l'acide propionique.

Ce processus pourrait avoir une influence sur le taux de consommation d'oxygène par les hétérotrophes mais cet aspect n'a pas été analysé et n'est pas considéré dans notre modèle. Ce sera sans doute une perspective du travail.

III.4.6 Bilan des processus biologiques et valeurs des paramètres retenus dans notre modèle

Les composantes particulières sont définies par le terme « X_i » et les composantes solubles par les termes « C_i » ou « S_i » respectivement pour leur concentration en entrée et sortie du réacteur. Pour chaque composé i , sa vitesse de production/consommation est calculée par la relation suivante :

Équation III-1

$$r_i = \sum_j r_{ij} = \sum_j v_{ij} \cdot \rho_j$$

Les taux de réaction biologique des trois populations microbiennes fonctionnelles retenues dans notre modèle sont présentés dans le Tableau III-1.

Tableau III-1: Taux de réactions retenues dans le modèle 1-D biofilm

j	Processus	Cinétique
1	Croissance des bactéries hétérotrophes aérobies	$\mu_H \frac{S_S}{S_S + K_S} \frac{S_O}{S_O + K_{OH}} \frac{S_{NH}}{S_{NH} + K_{NH}} X_{BH}$
2	Croissance des bactéries hétérotrophes anoxygènes utilisant les nitrites (NOI)	$\eta_8 \mu_H \frac{S_S}{S_S + K_S} \frac{K_{OH}}{S_O + K_{OH}} \frac{S_{NH}}{S_{NH} + K_{NH}} \frac{S_{NOI}}{S_{NOI} + K_{NOI}} \frac{S_{NOI}}{S_{NOI} + S_{NOA}} X_{BH}$
3	Croissance des bactéries hétérotrophes anoxygènes utilisant les nitrates (NOA)	$\eta_8 \mu_H \frac{S_S}{S_S + K_S} \frac{K_{OH}}{S_O + K_{OH}} \frac{S_{NH}}{S_{NH} + K_{NH}} \frac{S_{NOA}}{S_{NOA} + K_{NOA}} \frac{S_{NOA}}{S_{NOI} + S_{NOA}} X_{BH}$
4	Croissance aérobique des bactéries nitritantes	$\mu_{AI} \frac{S_{NH}}{S_{NH} + K_N} \frac{S_O}{S_O + K_{OAI}} X_{BAI}$
5	Croissance aérobique des bactéries nitratantes	$\mu_{AA} \frac{S_{NOI}}{S_{NOI} + K_{NOI}} \frac{S_{NH}}{S_{NH} + K_{NAA}} \frac{S_O}{S_O + K_{OAA}} X_{BAA}$
6	Décès des bactéries hétérotrophes	$b_H X_{BH}$
7	Décès des bactéries nitritantes	$b_{AI} X_{BAI}$

8	Décès des bactéries nitrifiantes	$b_{AA} X_{BAA}$
9	Transfert d'oxygène	$K_L a (S_{O_2, \max} - S_{O_2})$

Une matrice décrivant les différentes stœchiométries des processus biologiques est présentée dans le Tableau III-2.

Tableau III-2 : Coefficients stœchiométriques v_{ij} des processus considérés pour la modélisation du système biofilm.

Processus sur l'espèce i	SO ₂	SNH	SNOI	SNOA	SS	XNOI	XNOA	X _{BH}	X _I
Unité →	mgO ₂ /m ³	mgN/m ³	mgN/m ³	mgN/m ³	mgDCO/m ³	gDCO _x /m ³			
i mécanisme									
1 Croissance aérobie des hétérotrophes	$-\frac{1-Y_H}{Y_H}$	$-i_{bm}$			$-\frac{1}{Y_H}$			1	
2 Croissance anoxyie des hétérotrophes sur SNOI		$-i_{bm}$	$-\frac{1-Y_H}{1,71 \cdot Y_H}$		$-\frac{1}{Y_H}$			1	
3 Croissance anoxyie des hétérotrophes sur SNOA		$-i_{bm}$		$-\frac{1-Y_H}{2,86 \cdot Y_H}$	$-\frac{1}{Y_H}$			1	
4 Mort-régénération de X _{BH}		$i_{bm} \cdot (1 - f_{xi})$			$(1 - f_{xi})$			-1	f_{xi}
5 Croissance aérobie de XNOI	$-\frac{3,43 - Y_{NOI}}{Y_{NOI}}$	$-\frac{1}{Y_{NOI}} - i_{bm}$	$\frac{1}{Y_{NOI}}$			1			
6 Mort-régénération de XNOI		$i_{bm} \cdot (1 - f_{xi})$			$(1 - f_{xi})$			-1	f_{xi}
7 Croissance aérobie de XNOA	$-\frac{1,14 - Y_{NOA}}{Y_{NOA}}$	$-i_{bm}$	$-\frac{1}{Y_{NOA}}$	$\frac{1}{Y_{NOA}}$			1		
8 Mort régénération de XNOA		$i_{bm} \cdot (1 - f_{xi})$			$(1 - f_{xi})$			-1	f_{xi}

Souvent, dans les milieux hétérogènes, il est difficile de mesurer la vraie valeur d'un paramètre biologique, celui-ci étant alors une valeur hybride prenant en compte également les limitations de transfert. Dans le modèle utilisé, ce sont les paramètres biologiques vrais que nous devons implémenter puisque les processus de transfert sont pris explicitement en compte. Les différents paramètres cinétiques pris dans le cas du modèle utilisé sont listés dans le tableau III-3 et comparés avec ceux d'Elenter *et al.* (2007), du modèle ASM2d (qui considère l'élimination biologique du phosphate et l'activité dénitrifiante) (Gujer *et al.*, 1995), du modèle ASM3 (qui considère la nitrification sans faire la distinction entre les réactions de nitritation et de nitratisation, et qui prend en compte le stockage intracellulaire de composés organiques).

Tableau III-3 : Liste des différents paramètres cinétiques du modèle

Symbole	Définition (unité)	Valeur modèle	Valeur Elenter <i>et</i> <i>al.</i> (2007)	Valeur ASM2d	Valeur ASM3
Biomasse nitritante (NOI)					
$\mu_{\max, NOI}$	Taux de croissance spécifique maximum (j^{-1})	0,95	0,76	1 (20°)	0,35(20°)
b_{NOI}	Taux de décès (j^{-1})	0,05	0,13	0,15 (20°)	0,05(20°)
K_{-N}	Constante d'affinité pour l'ammonium (gN/m^3)	0,4	2,4	1	1
K_{-OAI}	Constante d'affinité pour l'oxygène (gO_2/m^3)	0,1	0,6	0,5	0,5
Y_{NOI}	Taux de conversion ($gDCO_x/gN$)	0,21	0,15	0,24	0,24
Biomasse nitratante (NOA)					
$\mu_{\max, NOA}$	Taux de croissance spécifique maximum (j^{-1})	0,95	0,81	1 (20°)	-
b_{NOA}	Taux de décès (j^{-1})	0,05	0,06	0,15 (20°)	-
K_{NOI}	Constante d'affinité pour les nitrites (gN/m^3)	0,1	5,5	1	-
K_{OAA}	Constante d'affinité pour l'oxygène ($g O_2/m^3$)	0,1	2,2	0,5	-
K_{NAA}	Constante d'affinité pour	0,1	-	-	-

l'ammonium (gN/m ³)					
Y_{NOA}	Taux de conversion (gDCOx/gN)	0,03	0,04	0,15(20°)	-
Biomasse hétérotrophe (H)					
$\mu_{max,H}$	Taux de croissance spécifique maximum (j ⁻¹)	4,8	7,2	6 (20°)	1 (20°)
b_H	Taux de décès (j ⁻¹)	0,2	0,19	0,4 (20°)	0,1 (20°)
K_{NH}	Constante d'affinité pour l'ammonium (gN/m ³)	0,4	-	0,05 (20°)	0,01
K_{OH}	Constante d'affinité pour l'oxygène (gO ₂ /m ³)	0,32	0,1	0,2	0,2
K_{SH}	Constante d'affinité pour le substrat organique (gDCO/m ³)	20	2	4 (sur l'acétate)	2
K_{NOA}	Constante d'affinité pour les nitrates (gN/m ³)	0,1	0,1	0,5	0,5
K_{NOI}	Constante d'affinité pour les nitrites (gN/m ³)	0,1	0,1	0,5	-
Y_H	Taux de conversion (gDCOx/gDCO)	0,54	0,43/0,53	0,625	0,63
Autres paramètres					
f_{XI}	Fraction de biomasse inerte produite par la lyse cellulaire	0,1	0,1	0,1	-
i_{BN}	Fraction d'azote dans les boues	0,08	0,07	0,07	0,07

Globalement, l'ensemble de ces paramètres biologiques a le même ordre de grandeur pour les différents auteurs cités. On notera cependant l'écart important entre les valeurs de la constante de Monod des bactéries hétérotrophes pour le substrat organique K_{SH} (20mgDCO/L dans notre modèle, 2 et 4mgDCO/L, dans les modèles (Elenter *et al.*, 2007) et ASM2d). Un écart important concerne également les valeurs des constantes de Monod des bactéries nitrifiantes pour l'ammonium (0,4, 2,4 et 1mgN/L respectivement pour notre modèle, le modèle (Elenter *et al.*, 2007) et le modèle ASM2d). Les valeurs des paramètres cinétiques que nous avons retenues sont justifiées par les résultats d'une étude respirométrique. Le but de cette étude était d'identifier les paramètres cinétiques caractéristiques de la biomasse, principalement ceux des bactéries nitrifiantes et des bactéries nitrifiantes. Ces essais ont été menés sur différents types d'échantillons (boue activée classique, boue

autotrophe spécifiée) et sous différentes conditions opératoires en termes de température et de pH. L'ensemble des valeurs mesurées est résumé dans le Tableau III-4. Il s'agit uniquement de paramètres vrais.

Tableau III-4: Paramètres cinétiques déterminés par respirométrie et pris en compte pour le choix des paramètres cinétiques du modèle.

Population	Valeur mesurée	Conditions opératoires		
X_BAI		pH	Température	Echantillon
μ_{BAI}	0,7	7,3	20°	Boue activée mixte
	1,1	8,1	20°	
	2,2	7,3	30°	
K_N	0,45±0,1	7,3	20°	
	0,7	8,1	20°	
	0,7	7,5	30°	
X_BAA		pH	Température	Echantillon
μ_{BAA}	0,6	7	20°	Boue activée mixte
	2	7	30°	Boue spécifiée autotrophe
K_NOI	1	7,3	20°	Boue activée mixte
	1,8±0,1	7	30°	Boue spécifiée autotrophe

A partir de cet ensemble de données, les valeurs des paramètres cinétiques biologiques de X_BAI et X_BAA ont été choisies. Ces valeurs sont conformes aux résultats obtenus à 20°C, à un pH proche de la neutralité (7 à 7,3) et dans le cas d'une boue activée classique.

La valeur de la constante d'affinité des bactéries hétérotrophes pour le substrat organique a également été fixée en fonction des résultats issus d'une étude respirométrique. L'échantillon était un biofilm déstructuré. Un protocole de déstructuration a été développé et validé pour détruire la structure des biofilms sans lyser la biomasse et ainsi mesurer des paramètres cinétiques vrais.

III.5 Les processus physiques

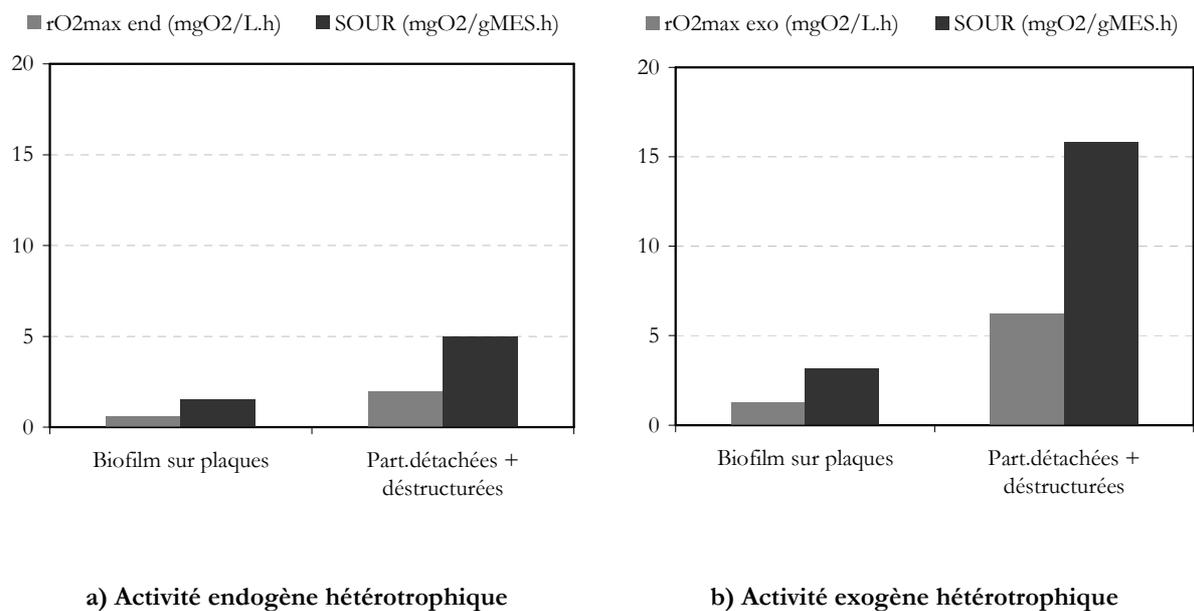
III.5.1 Sous-couche diffusionnelle

Le compartiment « liquide », est considéré comme parfaitement mélangé ce qui représente la réalité de nos réacteurs de Couette-Taylor. Ce compartiment est séparé du compartiment « biofilm » par le compartiment de la « sous-couche diffusionnelle ». L'impact de la rugosité de surface du biofilm sur l'épaisseur de la sous-couche diffusionnelle n'est pas considéré dans notre modèle puisqu'un modèle 1-D ne permet pas de modéliser la structure du biofilm développé. Remarquons cependant que l'impact du transfert externe sur l'épaisseur de cette sous couche diffusionnelle et donc sur les taux observés de réactions a fait l'objet de plusieurs études (Wäsche *et al.*, 2000; Picioreanu *et al.*, 2000a; Picioreanu *et al.*, 2000b). Une sous-couche diffusionnelle d'une épaisseur constante de 200 μm est considérée dans notre modèle. L'impact de l'épaisseur de la sous-couche diffusionnelle sur le comportement du modèle a été évalué. Etant donné le travail à condition hydrodynamique contrôlée et constante dans cette thèse, aucune influence significative sur les résultats qualitatifs, *i.e* la distribution des populations et les taux de réactions, n'a été observée pour un biofilm développé selon les conditions du cas « standard » (celles-ci sont présentées à la fin de ce chapitre).

III.5.2 Transfert interne : diffusion

III.5.2.1 Impact de la limitation par la diffusion sur l'activité d'un système biofilm

Le transfert de matière dans le compartiment biofilm est dominé par la diffusion. L'impact de la diffusion sur l'activité d'un système biofilm est illustré par la Tableau III-6. Les activités endogènes et exogènes hétérotrophiques ont donc été mesurées sur deux types d'échantillons : un biofilm structuré (« biofilm sur plaque ») et le même biofilm déstructuré suivant le protocole présenté au *chapitre II* (« particules détachées et déstructurées ») dans le cas d'un biofilm développé sous une charge de 25gDCO/m².j avec un ratio de 4gDCO/gN. L'activité des biofilms a été caractérisée en termes de taux de respiration maximum (r_{O_2max} exprimé en mgO₂/L.h) et de taux de respiration spécifique (SOUR exprimé en mgO₂/gMES.h) par respirométrie.



Données expérimentales

Figure III-6 : Illustration de l'impact de la limitation de la diffusion sur l'activité d'un biofilm : activités endogènes et exogènes hétérotrophiques

En termes d'activités endogènes hétérotrophiques, le taux de respiration maximum et le taux de respiration spécifique des biofilms structurés sont environ 5 fois plus faibles que ceux des biofilms déstructurés. La même observation est réalisée en termes d'activités exogènes hétérotrophiques. La comparaison des activités vraies (activité d'un biofilm structuré) et des activités potentielles (activité d'un biofilm déstructuré) témoigne de l'impact de la limitation par le phénomène de diffusion. Cette différence peut s'expliquer par la limitation de la disponibilité en oxygène dans le biofilm induite par la diffusion. La modélisation du transfert interne est par conséquent primordiale. Une sur ou sous-estimation de ce phénomène modifiera en effet les dynamiques de populations et leur répartition spatiale sur l'épaisseur du biofilm.

Dans la suite de cette partie, trois points seront discutés. Le premier point consiste à présenter le formalisme de prise en compte de la stratification des propriétés physique sous AQUASIM®. Un second point consiste à identifier quel est l'impact de la stratification des propriétés physiques du biofilm sur le transfert de matière et sur la distribution des populations (Reichert et Wanner, 1997; Zhang et Bishop, 1994). Il s'agit de déterminer si la stratification de la densité doit être prise en compte par le modèle pour répondre de manière rigoureuse à la problématique. Le troisième point est de discuter des valeurs des coefficients de diffusion retenues.

III.5.2.2 Formalisme de la stratification des propriétés physiques du biofilm sous AQUASIM®

Avec AQUASIM®, l'augmentation de la résistance au transfert dans les couches profondes est réalisée au travers de variation du terme de porosité, et non à travers le coefficient de diffusion. Le terme de porosité est en effet pris en compte dans les équations 1-D de flux de matières et est défini tel que :

Équation III-2

$$\theta = 1 - \sum_{i=1}^{n_X} \frac{X_{M,i}}{\rho_{X_i}}$$

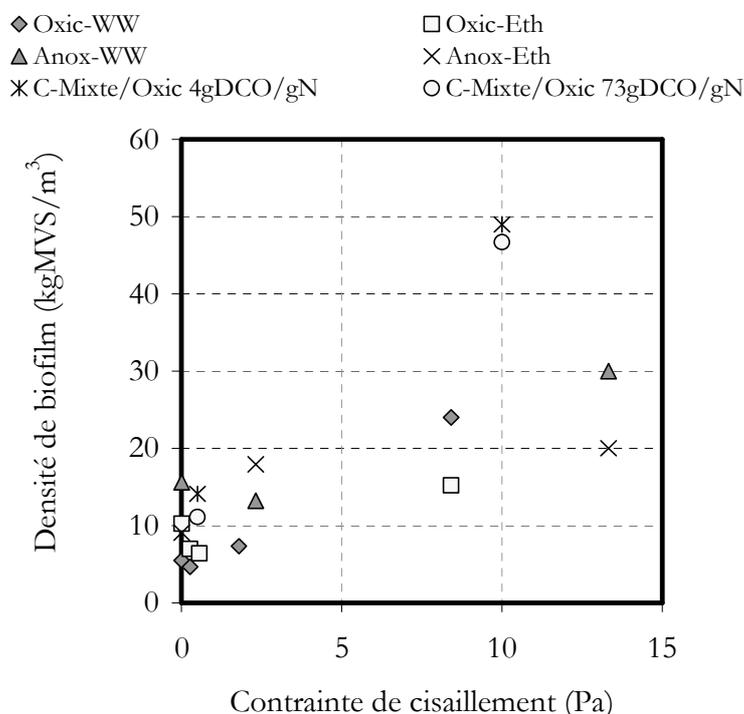
Avec $X_{M,i}$ la concentration en matières particulaires et ρ_{X_i} la densité des matières particulaires. Dans le compartiment biofilm, la variation de porosité intervient par variation de la fraction liquide. La vitesse de développement de la fraction liquide $r_{\varepsilon_{lF}}$, est définie par l'équation suivante :

Équation III-3

$$r_{\varepsilon_{lF}} = \frac{\varepsilon_{lF}}{1 - \varepsilon_{lF}} \sum_{k=1}^{n_x} \frac{r_{X_k}}{\rho_{s_k}} + r'_{\varepsilon_{lF}}$$

Le premier terme de la partie de droite entraîne une expansion du compartiment biofilm uniquement si la porosité est constante. Le second terme est utilisé pour faire varier la fraction liquide (et donc la porosité) dans le temps et dans l'espace. Ce terme est considéré comme nul dans notre modèle, ce qui signifie que la vitesse de développement de la fraction liquide est similaire à la vitesse de développement de la fraction solide. Par conséquent, la densité apparente est constante quelle que soit l'espèce et quelle que soit la localisation dans le biofilm. Une corrélation entre la densité de biofilm et la profondeur a cependant été observée expérimentalement pour des biofilms développés sous différentes conditions de croissance en termes d'accepteurs et de donneurs d'électrons (Figure III-7). Dans cette étude, deux accepteurs d'électrons ont été testés : l'oxygène et les nitrates. Trois sources de carbone ont été utilisées : une eau résiduaire urbaine filtrée, de l'éthanol, ou une source mixte (éthanol, acide propionique, acétate, glucose). Après avoir atteint l'état d'équilibre, les biofilms ont été soumis à des tests d'érosion suivant le protocole décrit dans le *chapitre II*. A chaque niveau de contrainte de cisaillement, le biofilm résiduel a été caractérisé en termes d'épaisseur et de masse accumulée. La densité a ensuite été calculée en fonction de ces deux paramètres.

Les résultats obtenus sont illustrés Figure III-7 et représentent l'évolution de la densité de biofilm en fonction de la contrainte de cisaillement appliquée lors du test d'érosion.



Données expérimentales

Figure III-7 : Corrélation entre la densité de biofilm et la contrainte de cisaillement pour des biofilms développés sous différentes conditions environnementales en termes d'accepteur et de donneur d'électrons.

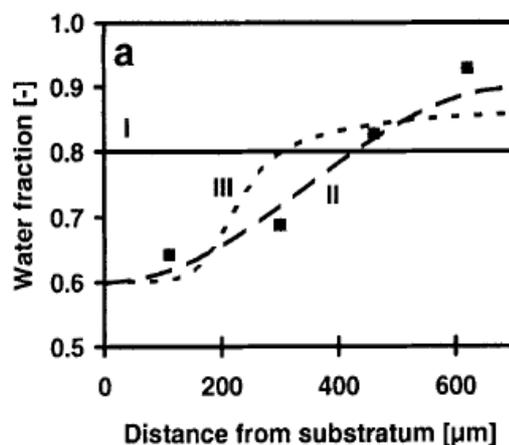
Une augmentation de la densité avec la contrainte de cisaillement est observée quelle que soit les conditions environnementales de croissance des biofilms. La densité de la couche basale (biofilm résiduel après érosion à 10Pa) est supérieure à celle du biofilm initial. Remarquons que l'augmentation de la densité avec l'épaisseur de biofilm est plus importante pour les biofilms développés avec une source mixte de carbone. Ces biofilms ont en effet été développés sous une contrainte de cisaillement de 0,5Pa. La densité de leur couche basale est 3 fois supérieure à leur densité initiale. Les autres biofilms ont été développés sous une contrainte de cisaillement très faible (0,01). La densité de leur couche basale est 2 fois plus élevée que leur densité initiale. Cette augmentation de la densité avec l'épaisseur de biofilm est également rapportée dans la littérature (Zhang et Bishop, 1994).

Se pose alors la question de l'impact de cette stratification de la densité sur la distribution des populations et sur le phénomène de compétition. Est-il justifié de considérer une densité constante dans notre modèle étant donnée la problématique consistant à étudier la compétition microbienne entre bactéries autotrophes et hétérotrophes au sein d'un biofilm nitrifiant ?

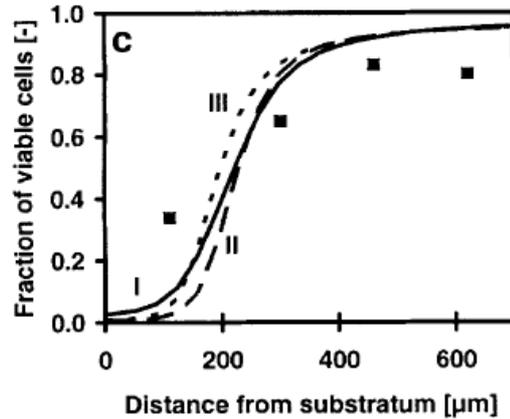
III.5.2.3 Impact de la stratification de la densité sur la stratification de la fraction de cellules viables

L'impact de la densité sur la répartition des populations a déjà fait l'objet d'une étude (Wanner et Reichert, 1996). Avec AQUASIM® et comme cela a déjà été présenté, une variation de densité dans l'espace intervient *via* une variation de la fraction de liquide dans le compartiment biofilm. Suivant la littérature (Wanner et Reichert, 1996), trois cas sont considérés : variation de la fraction liquide nulle (cas « I »), variation de la fraction liquide gouvernée par un processus de relaxation (cas « II »), ou corrélée au taux de croissance hétérotrophe (cas « III »). Les résultats ont ensuite été comparés aux résultats expérimentaux de Zhang et Bishop (1994). L'évolution de la fraction liquide (Figure III-8a) et de la fraction de cellules viables (Figure III-8b) est illustrée ci-dessous (Wanner et Reichert, 1996). Les données expérimentales apparaissent en « points noirs ». Les données numériques sont marquées « I », « II », et « III ». La Figure III-8 (c) représente l'évolution de la fraction de cellules viables obtenue avec notre modèle, qui considère une densité constante.

a) Evolution de la fraction liquide dans le compartiment biofilm



b) Evolution de la fraction de cellules viables dans le compartiment biofilm (Wanner et Reichert, 1996)



c) Evolution de la fraction de cellules viables dans le cas d'un biofilm développé à 2,5gDCO/m².j.

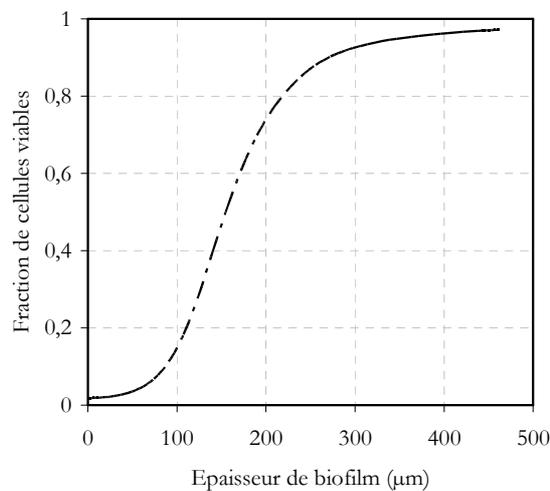


Figure III-8 : Evolution en fonction de l'épaisseur de la fraction liquide (a) et de la fraction de cellules viables (b) (Wanner et Reichert, 1996). Evolution de la fraction de cellules viables d'après le modèle développé dans ce travail de thèse (c).

D'après les courbes d'évolution de la fraction liquide dans le compartiment biofilm (Figure III-8a), les prédictions du modèle dans les cas II et III ont une allure similaire aux observations expérimentales. Dans les cas II et III, la fraction de liquide diminue lorsqu'on se rapproche du support. Dans le cas I, elle est constante. La seconde courbe représente l'évolution de la fraction viable de cellules en fonction de l'épaisseur de biofilm (Figure III-8b). Quel que soit le cas d'étude, cette fraction atteint un maximum à la surface du biofilm et chute lorsqu'on se rapproche du support. Les courbes tracées à partir des données numériques suivent la même évolution que les données expérimentales, même dans le cas d'une porosité constante.

L'analyse de ces courbes ne révèle donc pas de corrélation entre la variation de fraction liquide et la distribution de la biomasse. Nous remarquons également que la courbe d'évolution de la fraction de cellules viables obtenue avec notre modèle (porosité constante de 0,8) suit également la même tendance (Figure III-8c). Le transfert de chaque substrat étant influencé de manière similaire, aucun impact sur la stratification n'est observé dans le cas d'un détachement surfacique. Nous verrons par la suite (*chapitre IV*) que celle-ci est également gouvernée par la nature du modèle de détachement. Par conséquent, la stratification des propriétés physiques du biofilm, en particulier de la densité, n'est pas prise en compte dans le modèle. La vitesse de variation de la fraction liquide est donc égale à zéro.

III.5.2.4 Choix des valeurs des coefficients de diffusion

Les valeurs suivantes ont par ailleurs été choisies pour les coefficients de diffusion des composés solubles.

Tableau III-5 : Valeurs des paramètres du biofilm, de transfert de matière et autres.

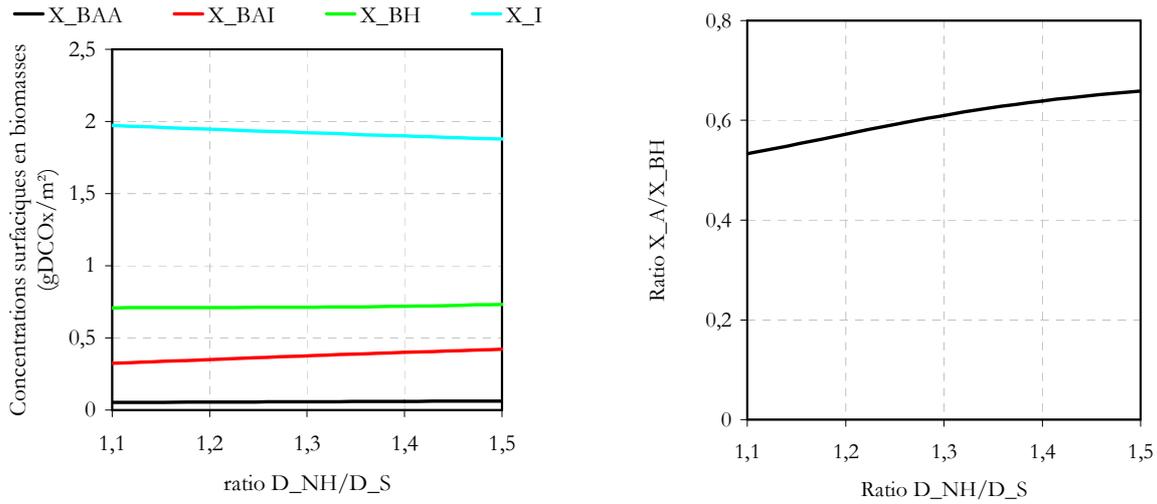
Symbole	Définition	Valeur modèle	Valeur modèle (Elenter <i>et al.</i> , 2007)
ϵ	Porosité du biofilm	0,8	0,8
D_{NH_4}	Coefficient de diffusion de l'ammonium (m^2/j)	0,000141	0,00015
D_{NO_2}	Coefficient de diffusion des nitrites (m^2/j)	0,000137	0,00014
D_{NO_3}	Coefficient de diffusion des nitrates (m^2/j)	0,000137	0,00014
D_{O_2}	Coefficient de diffusion de l'oxygène (m^2/j)	0,00022	0,00022
D_S	Coefficient de diffusion de la DCO (m^2/j)	0,000104	0,000104
L_L	Epaisseur de la sous couche diffusionnelle (μm)	200	200

Avec le logiciel AQUASIM®, la réduction de diffusion des espèces au sein du biofilm par rapport à celle dans l'eau n'est prise en compte qu'au travers de la fraction liquide du compartiment solide. Les valeurs des coefficients de diffusion présentées dans le tableau précédent ont été mesurées en milieu aqueux sous des conditions opératoires maîtrisées (physico-chimique du milieu, température, ...).

On peut cependant remarquer qu'un biofilm est un milieu hétérogène en termes de présence ou non de solutés, de pH,...Il est par conséquent légitime de penser que les valeurs des coefficients de diffusion dans l'eau des pores du biofilms différent de celles mesurées sous des conditions maîtrisées.

A titre d'exemple, l'influence du ratio D_{NH}/D_S sur les quantités de biomasse accumulée et sur le ratio entre bactéries autotrophes et hétérotrophes est illustrée ci-dessous. Ces résultats ont été obtenus en faisant varier le coefficient de diffusion de l'ammonium dans le cas d'un biofilm développé à 2,5gDCO/m².j avec un ratio de 4gDCO/gN sans limitation par l'oxygène. Ces conditions de croissance sont relatives au cas « standard », qui est présenté ligne 1 du tableau III-7. Sous ces conditions, le ratio D_{NH}/D_S est de 1,35. En régime de croissance non limité en azote et en oxygène, seul l'apport en substrat fixe les capacités de croissance, ce qui permet d'identifier son impact sur les dynamiques de populations.

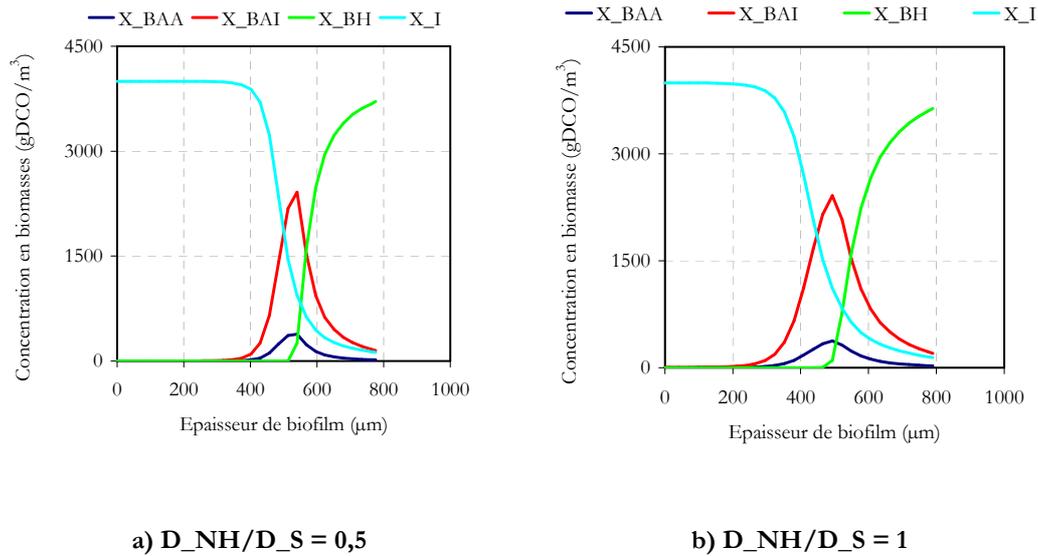
La Figure III-9 représente l'évolution des concentrations en biomasses en fonction du ratio D_{NH}/D_S (Figure III-9a) et l'évolution du ratio entre la concentration en bactéries autotrophes (X_A) et la concentration en bactéries hétérotrophes (X_{BH}) en fonction du ratio D_{NH}/D_S (Figure III-9b).



Données numériques

Figure III-9 : Evolution des concentrations en biomasse accumulée et du ratio X_A/X_BH en fonction du ratio D_NH/D_S. Cas d'un biofilm développé dans les conditions du cas « standard ».

A la fois les concentrations en biomasse et le ratio X_A/X_BH sont influencés par le rapport D_NH/D_S. Une valeur croissante du ratio D_NH/D_S engendre à peu près une augmentation linéaire des concentrations X_BH, X_BAI et X_BAA. La variation du ratio X_A/X_BH est de l'ordre de 8% pour une variation du ratio D_NH/D_S inférieure à 10%. L'augmentation des concentrations en biomasses observée pour un ratio D_NH/D_S croissant s'explique par l'homogénéisation de la distribution de la biomasse à travers le biofilm. Cette distribution des populations est représentée Figure III-10 dans le cas d'un ratio D_NH/D_S de 0,5 (a) et de 1 (b).



Données numériques

Figure III-10 : Distribution des populations pour un ratio D_{NH}/D_S de : (a) 0,5 et (b) 1 dans le cas d'un biofilm développé dans le cas « standard ».

L'augmentation du ratio D_{NH}/D_S accroît la disponibilité en azote à l'intérieur du biofilm. Sans limitation en oxygène, les microorganismes sont alors capables de se développer plus en profondeur, dans des zones où ils ne sont pas éliminés par le détachement surfacique continu. Cette extension de la distribution des populations explique l'augmentation des concentrations en biomasse accumulée. Les bactéries autotrophes se développant préférentiellement dans les couches internes et utilisant l'ammonium pour la nitrification, elles sont significativement avantagées par l'augmentation du ratio D_{NH}/D_S , ce qui explique l'augmentation du ratio X_A/X_{BH} observée.

Cependant, pour une variation inférieure à 10% du ratio D_{NH}/D_S , aucune modification significative des fonctions et de la composition du biofilm n'est observée. Ceci justifie les valeurs de coefficients de diffusion retenues qui sont celles mesurées dans l'eau pure à 20°C.

III.5.3 Le processus de détachement.

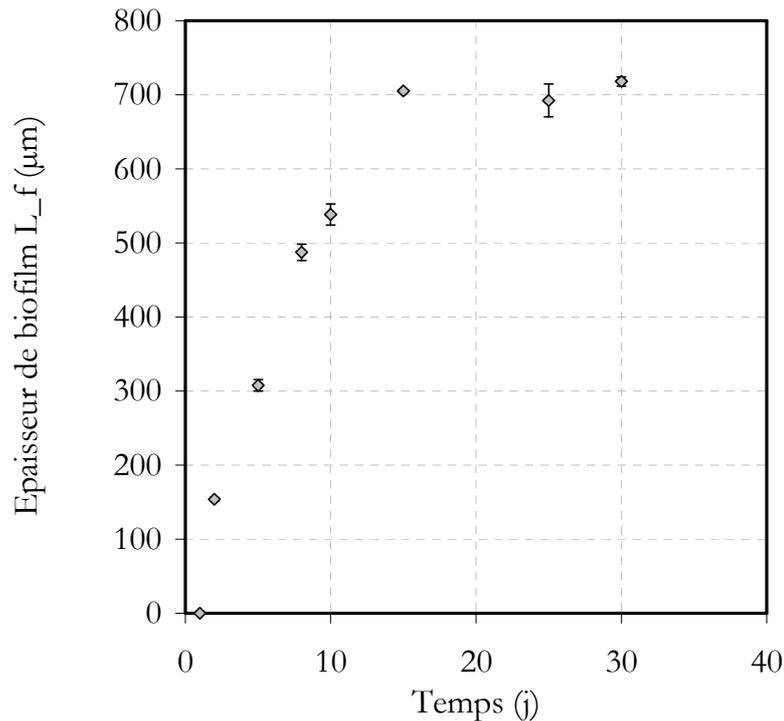
Durant ce travail, les observations expérimentales concernant le détachement ont démontré que :

- A l'état d'équilibre, pour une charge surfacique et une contrainte de cisaillement données, l'épaisseur de biofilm reste en moyenne temporelle constante. (Figure III-11)
- Une augmentation de la charge surfacique, pour une contrainte de cisaillement stable, entraîne une augmentation de l'épaisseur de biofilm (Figure III-13)
- Une augmentation de la contrainte de cisaillement, pour une charge surfacique donnée, engendre une diminution de l'épaisseur de biofilm et donc de la masse résiduelle (Figure III-15)

Ces trois observations expérimentales et leurs conséquences sur l'écriture du modèle de détachement sont présentées et discutées ci-dessous.

III.5.3.1 Épaisseur constante à charge surfacique et contrainte de cisaillement constantes

A l'équilibre, un biofilm est caractérisé par une épaisseur moyenne sensiblement constante. Ceci est illustré par la courbe de la Figure III-11, obtenue dans le cas d'un biofilm développé sous des conditions anoxiques avec de l'éthanol comme source de carbone (contrainte de cisaillement de 0,3Pa, charge surfacique de 4,2gDCO/m².j)



Données expérimentales

Figure III-11 : Evolution de l'épaisseur de biofilm L_f pendant la phase de croissance. Cas d'un biofilm anoxique développé avec de l'éthanol avec une charge surfacique de $4,2\text{gDCO}/\text{m}^2\cdot\text{j}$ et une contrainte de cisaillement de $0,3\text{Pa}$ (données Projet RITEAU, (Ochoa, 2008)).

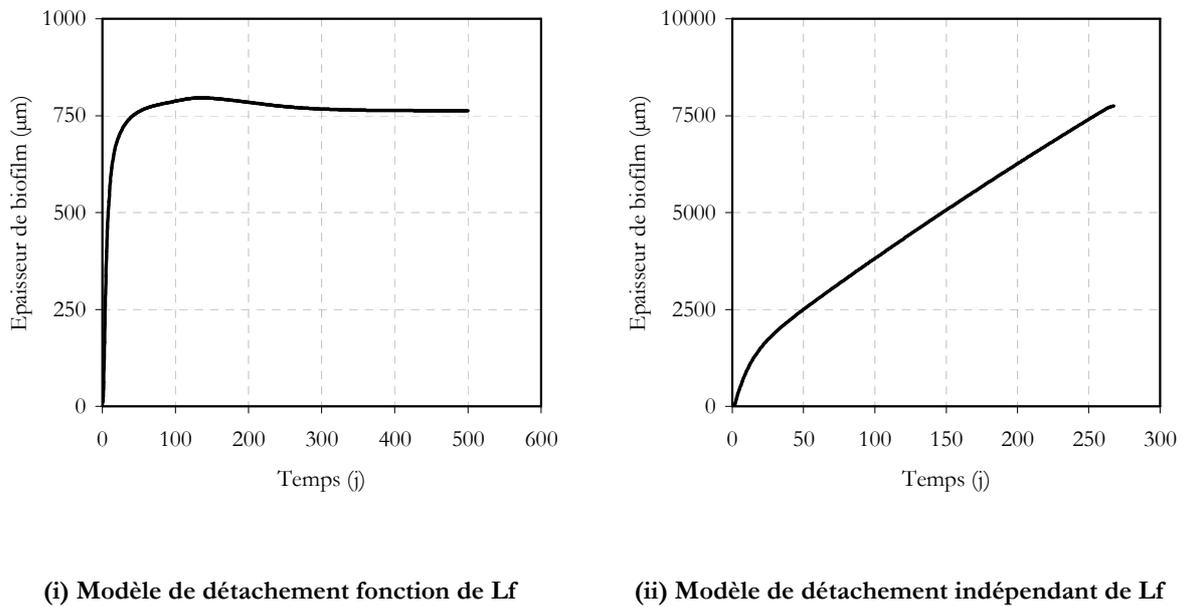
D'après cette courbe, après 15j de croissance, le biofilm atteint un état d'équilibre qui se caractérise par une épaisseur constante d'environ $700\mu\text{m}$. L'expression du modèle de détachement doit permettre d'atteindre cet état stationnaire. Lorsque L_f est constante, la dérivée dL_f/dt est nulle.

Par conséquent, la vitesse de déplacement due à la croissance de l'interface biofilm-bulk (u_f) est égale à la vitesse de déplacement due au détachement (u_{de}). La vitesse de déplacement de l'interface u_f étant une fonction de L_f , deux scénarios sont par conséquent envisageables pour atteindre une épaisseur constante :

- Soit le terme u_{de} est également fonction de L_f . Dans ce cas u_{de} est directement fixée telle que L_f soit constante.

- Soit le terme u_{de} n'est pas fonction de L_f . Dans ce cas la probabilité que u_{de} soit égale à u_f est très faible, dans la mesure où il n'existe qu'un seul point d'équilibre remplissant cette condition.

Pour mettre en évidence ce phénomène, plusieurs modèles de détachement ont été testés. L'évolution de l'épaisseur de biofilm en fonction du temps pour deux modèles de détachement (l'un fonction de L_f , l'autre indépendant de L_f) est présentée ci-dessous (Figure III-12).



Données numériques

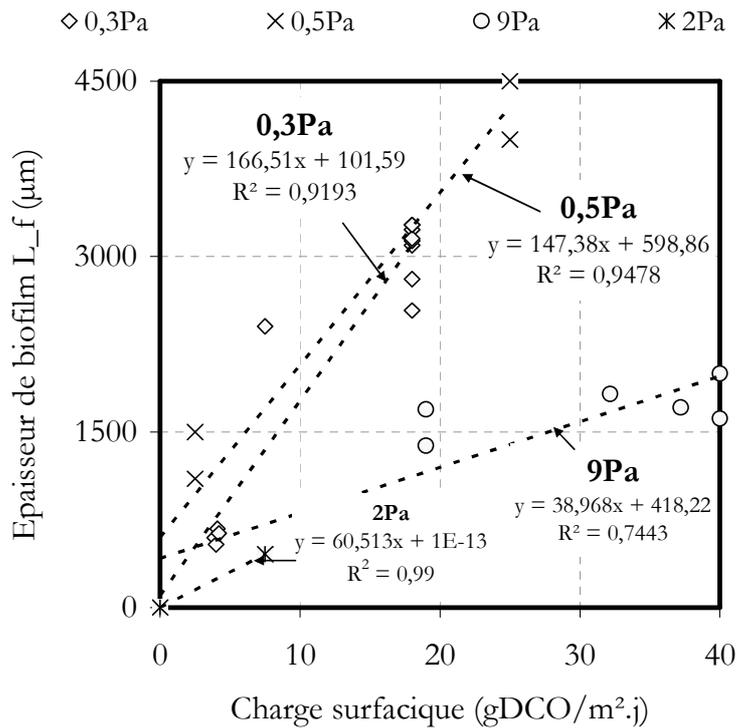
Figure III-12 : Evolution de l'épaisseur de biofilm dans le cas (i) d'un modèle de détachement fonction de L_f (ii) d'un modèle de détachement indépendant de L_f .

Afin d'atteindre une épaisseur de biofilm constante, le modèle de détachement doit donc être fonction de L_f . La constante de détachement détermine quant à elle la période nécessaire pour atteindre l'état d'équilibre. Notons également qu'une puissance placée sur le terme L_f permet de modifier la dynamique de mise à l'équilibre du système en termes d'épaisseur de biofilm.

Rappelons que les différents modèles proposés dans la littérature ont été présentés au *chapitre I* (Tableau I-3). Dans notre cas, une puissance de 1 sur le terme L_f a été retenue.

III.5.3.2 Influence de la charge surfacique sur la valeur de L_f à l'équilibre

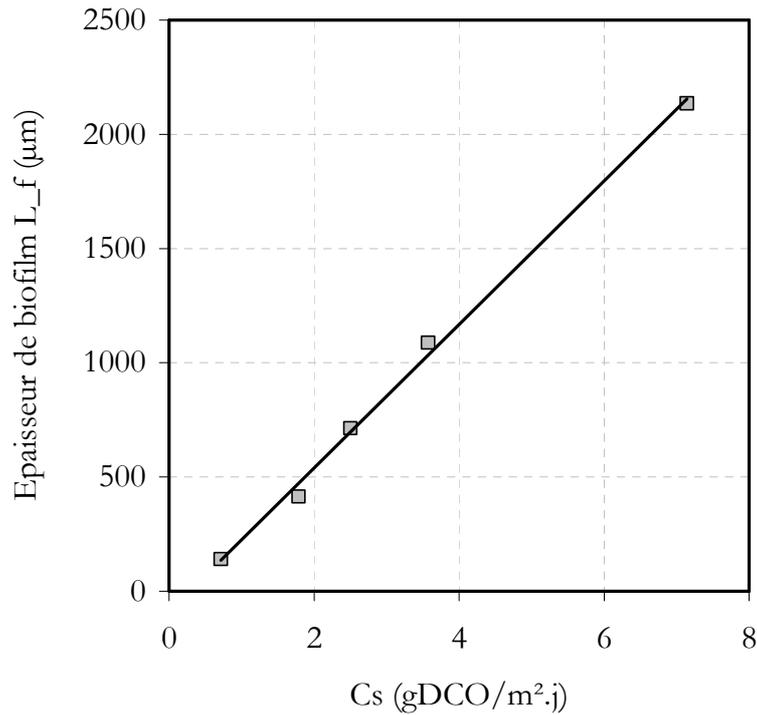
La corrélation entre l'épaisseur de biofilm et la charge surfacique est illustrée sur la Figure III-13 qui présente la relation entre L_f et la charge surfacique. Les biofilms ont été développés sous différentes contraintes de cisaillement. Sous des conditions données, lorsque l'état d'équilibre est atteint, l'épaisseur de biofilm est mesurée par analyse d'images suivant la méthode présentée au *chapitre II*.



Données expérimentales

Figure III-13 : Corrélation entre l'épaisseur du biofilm et la charge surfacique pour des biofilms développés sous différentes contraintes de cisaillement (0,3Pa, 0,5Pa, 2Pa et 9Pa).

Quatre contraintes de cisaillement ont été testées (0,3Pa, 0,5Pa, 2Pa, et 9Pa) dans cette étude expérimentale. D'après la courbe de la Figure III-13, pour une contrainte de cisaillement donnée, l'épaisseur de biofilm augmente linéairement avec une charge surfacique en substrat organique croissante. Le même comportement est obtenu avec le modèle (Figure III-14). Un biofilm a été simulé sous une charge surfacique croissante comprise entre 1 et $7\text{gDCO}/\text{m}^2.\text{j}$.



Données numériques

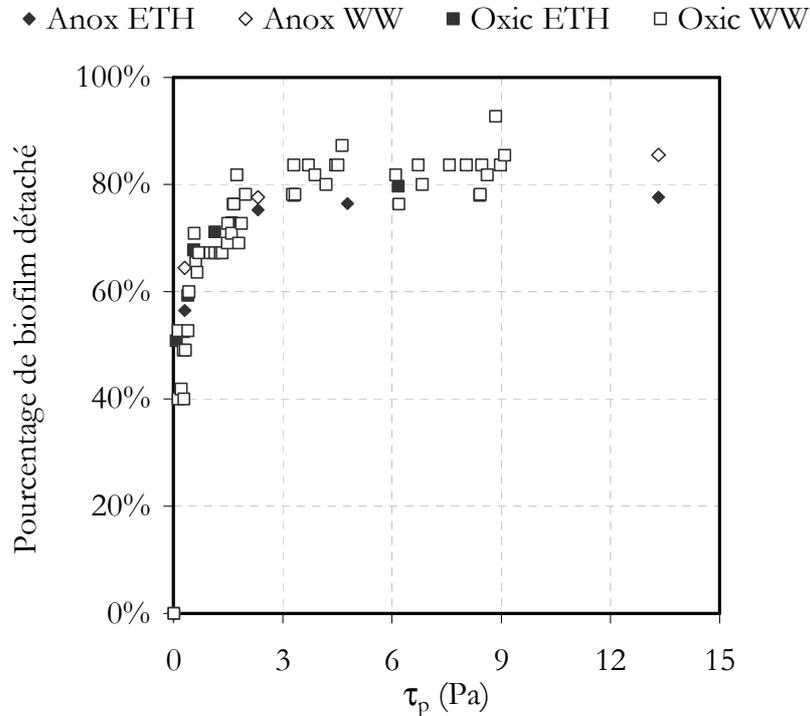
Figure III-14: Corrélation entre la charge surfacique et l'épaisseur de biofilm, d'après les prédictions du modèle, pour une contrainte de 0,01Pa.

L'augmentation de la charge surfacique implique une augmentation d'épaisseur du biofilm de 300µm à 2200µm. Le modèle, qui considère $U_{det}=f(L_f)$ représente donc correctement cette observation expérimentale, dans le domaine 0-8gDCO/m².j.

III.5.3.3 Influence de la contrainte de cisaillement.

La Figure III-15 suivante met également en évidence que plus la contrainte de cisaillement est élevée, plus la pente de la courbe $L_f= f(C_s)$ est faible. Une variation forte de l'épaisseur pour des contraintes appliquées entre 0,3 et 2 Pa est observée et va être expliquée. Il semble, en effet, exister une zone de contrainte seuil.

En régime dynamique, l'efficacité de détachement peut également être corrélée à la contrainte de cisaillement. L'évolution du pourcentage en masse de biofilm détaché en fonction de la contrainte de cisaillement appliquée a été étudiée lors d'évènements dynamiques (Figure III-15).



Données expérimentales

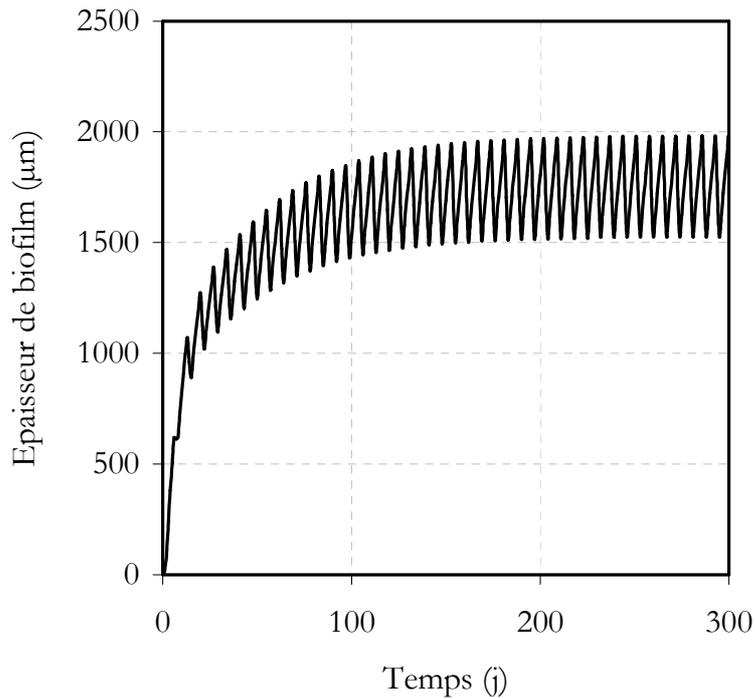
Figure III-15 : Corrélation entre le pourcentage de biofilm détaché (%) et la contrainte de cisaillement appliquée (Pa).

Entre 0,01Pa et 0,3Pa, la fraction de biofilm détaché est très élevée pour atteindre 60% de la masse initiale de biofilm. Lorsqu'ensuite la contrainte de cisaillement est augmentée de 0,3 à 2Pa, le biofilm continue à se détacher mais la fraction détachée par rapport à la masse initiale est plus faible : A 2Pa, 80% du biofilm initial a été détaché. Enfin, lorsque la contrainte de cisaillement est augmentée au-delà de 2Pa, et jusqu'à 15Pa, le pourcentage de biofilm détaché se maintient autour de 80%. La couche basale résiduelle, d'une épaisseur comprise entre 100 et 500 μ m selon les conditions opératoires, n'est pas éliminée malgré l'application de valeurs élevées de taux de cisaillement.

Notons que des tests de croissance *in situ* sous une contrainte de 13 Pa ont conduit également au maintien d'une couche de biofilm d'épaisseur correspondant à celle de la couche basale définie précédemment (Coufort et al., 2007 ; Derlon et al., 2008).

Ce résultat expérimental illustre la corrélation entre le taux de détachement et la contrainte de cisaillement lors d'un évènement dynamique. Nos expériences sont conduites majoritairement à une valeur constante de la contrainte de cisaillement. Cependant, premièrement, nous avons, grâce à cette étude, acquis de la connaissance concernant l'amplitude du détachement selon la contrainte hydrodynamique appliquée.

Deuxièmement, nous allons utiliser une augmentation de la contrainte pour agir sur l'épaisseur du biofilm et ainsi contraindre les micro-organismes présents. Le terme τ_p , illustrant la contrainte de cisaillement a par conséquent été intégré à notre modèle de détachement. La capacité du modèle à reproduire ces observations expérimentales est illustrée ci-dessous. La croissance d'un biofilm soumis à une augmentation hebdomadaire de la contrainte de cisaillement de 0,01Pa à 0,2Pa a été simulée avec une charge de 2,5gDCO/m².j. L'épaisseur de biofilm est représentée en fonction du temps. D'après les observations expérimentales, cette variation de la contrainte de cisaillement doit engendrer une diminution de la masse accumulée de biofilm d'environ 25%.



Données numériques

Figure III-16 : Illustration de l'impact de la contrainte de cisaillement sur l'épaisseur de biofilm d'après le modèle.

D'après la réponse du modèle, à l'état d'équilibre, l'épaisseur de biofilm diminue de 2000µm à 1500µm lorsque la contrainte de cisaillement est augmentée de 0,01 à 0,2Pa. La densité de biofilm est considérée comme constante dans notre modèle. La diminution de l'épaisseur est par conséquent corrélée à une diminution de 25% de la masse de biofilm. Ceci est en accord avec les observations expérimentales précédentes. L'impact d'une variation dynamique de l'épaisseur de biofilm sur la compétition microbienne fera l'objet d'une étude approfondie dans le *chapitre IV*. Nous verrons notamment comment ce paramètre impacte la distribution des populations au sein du biofilm.

III.5.3.4 Conclusion sur le modèle de détachement

En conclusion, un modèle de détachement surfacique continu a été retenu pour simuler des états d'équilibre. La vitesse de détachement s'écrit :

Équation III-4

$$V_{\text{det}} = k_{\text{det}} \cdot \tau_p \cdot L_f$$

Avec : V_{det} , la vitesse de déplacement de l'interface matrice/liquide, en m.j-1.

k_{det} , la constante de détachement, en Pa-1.j-1.

τ_p , la contrainte de cisaillement, en Pa.

L_f , l'épaisseur de biofilm, en m.

La vitesse de détachement varie linéairement avec τ_p . Pourtant, nous avons montré que la masse de biofilm accumulée, pour une condition de croissance donnée, évolue de manière logarithmique en fonction de la contrainte de cisaillement. Ce choix de simplification repose sur les arguments suivants :

L'ensemble de nos essais expérimentaux ont été réalisés pour des valeurs de contraintes de cisaillement très faibles (<0,5Pa). Or dans cette gamme de contraintes, l'évolution de la masse accumulée de biofilm en fonction de τ_p évolue linéairement.

La prise en compte de τ_p vise uniquement à simuler l'effet d'une variation brève de l'intensité de la contrainte sur la vitesse de détachement. Nous n'avons pas cherché à représenter la modification d'épaisseur suite à un changement durable de la contrainte τ_p .

III.5.4 Conclusions sur les processus physiques

Concernant les processus physiques considérés dans notre modèle, les points suivants doivent être retenus :

Le compartiment liquide est considéré comme parfaitement agité.

- La sous-couche diffusionnelle est caractérisée par une épaisseur constante de 200 μm .
- La stratification des propriétés physiques du biofilm n'est pas considérée.
- Les valeurs des coefficients de diffusion ont été choisies en accord avec celles mesurées dans l'eau pure à 20°C ce qui est en accord avec le principe de modélisation développée sous AQUASIM®.
- Le modèle de détachement est fonction à la fois de l'épaisseur de biofilm L_f et de la contrainte de cisaillement, cette dernière visant uniquement à simuler l'effet d'une variation brève de l'intensité de la contrainte sur la vitesse de détachement. Il s'agit d'un modèle surfacique et continu.

III.6 Evaluation du modèle choisi

L'objectif de ce *chapitre III* était de développer, à partir d'observations expérimentales, un modèle capable de représenter les évolutions des capacités fonctionnelles d'un système biofilm à la fois à l'échelle globale (échelle du réacteur) et à l'échelle locale (échelle du biofilm). Il s'agissait notamment de développer un outil numérique **qualitatif**, permettant de représenter un système multi-espèces. Un autre objectif était d'avoir accès à la distribution des populations ou des composés solubles à travers le biofilm.

III.6.1 Evaluation du modèle dans le cas d'un biofilm développé sous les conditions de croissance du cas « standard »

Nous allons évaluer les capacités du modèle choisi à décrire qualitativement les évolutions des espèces au sein d'un biofilm développé sous les conditions de croissance relatives au cas « standard ».

Nous considérons successivement l'analyse des flux et taux observés de réactions et l'analyse des distributions des populations et de l'oxygène.

Le cas « standard » représente les conditions opératoires pour lesquelles les concentrations en bactéries autotrophes et hétérotrophes sont toutes les deux significatives et distribuées en surface. Par conséquent, les principales conditions de croissance relatives à ce cas standard sont :

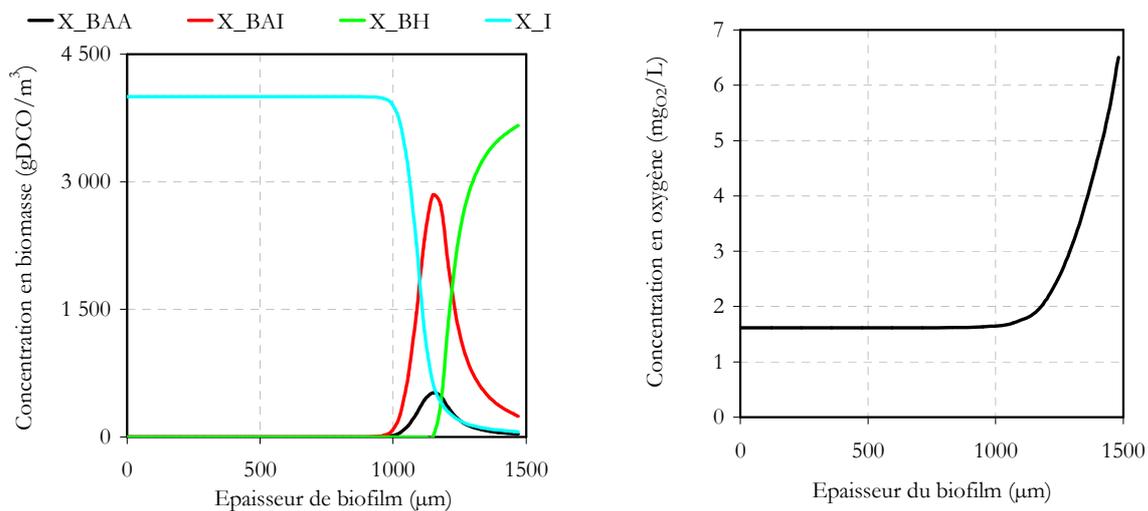
- Une charge organique de 2,5gDCO/m².j, en accord avec les valeurs régulièrement citées dans la littérature et permettant d'obtenir un biofilm d'une épaisseur d'environ 1500µm (en accord avec les observations expérimentales)
- Un ratio DCO/N de 4gDCO/gN, qui implique un excès d'ammonium par rapport aux besoins de la croissance cellulaire, et qui favorise donc un développement significatif de la biomasse autotrophe.
- Un détachement surfacique continu, qui permet d'obtenir une épaisseur de biofilm constante lorsque l'état d'équilibre est atteint et implique une stratification donnée des micro-organismes en fonction de leur taux de croissance.
- Un apport en oxygène garantissant un régime de croissance limité en substrats donneurs d'électron et non en accepteur d'électron (oxygène).
- Le tableau ci-dessous présente les flux et taux observés de réactions calculés d'après les réponses du modèle dans le cas « standard ».

Tableau III-6 : Récapitulatif des flux et taux observés de réaction d'après le modèle et dans le cas « standard »

Coefficient	Flux de DCO éliminé	Efficacité d'élimination de la DCO	Flux d'azote assimilé	Rendement de conversion de la biomasse
γ_{s,O_2}				
Sans unité	gDCO/m ² .j	%	gN/m ² .j	gMVS/gDCO
0,26	>2,4	>98%	0,05	0,22

Flux d'azote nitrifié	Efficacité de nitrification	Flux d'azote dénitrifié	Efficacité de dénitrification
gN/m ² .j	%	gN/m ² .j	%
0,62	>0,98	0	0

La Figure III-17 illustre le type de réponses fournies par le modèle présenté dans ce chapitre, dans les conditions du cas « standard ». La distribution des populations (a) et de l'oxygène (b) sont représentées en fonction de l'épaisseur de biofilm, pour un biofilm en régime stabilisé.



a) Distribution des populations

b) Diffusion de l'oxygène

Données numériques

Figure III-17 : Distributions des populations microbiennes (a) et de l'oxygène (b) en fonction de l'épaisseur de biofilm. Charge surfacique de 2,5gDCO/m².j, 4gDCO/gN, détachement surfacique continu.

A travers l'analyse du Tableau III-6 et de la Figure III-17, dans le cas « standard », les points suivants sont observés :

- L'épaisseur du biofilm est cohérente par rapport à celle observée expérimentalement pour les mêmes conditions opératoires.
- Les trois populations fonctionnelles sont présentes au sein du biofilm, ainsi que la biomasse inerte (X_I).
- Le biofilm est pénétré totalement par l'oxygène. Ainsi, la limitation est réalisée par les substrats donneurs d'électron. Un coefficient γ_{S,O_2} de 0,26 est calculé d'après les concentrations en DCO et en oxygène dans le liquide à l'état d'équilibre.
- Par conséquent, l'élimination de la DCO et la nitrification sont totales.
- Des gradients de concentrations en composés solubles se matérialisent au sein du compartiment « biofilm ». Ces gradients de substrats doivent impliquer des gradients de taux de croissance et ainsi une dominance en surface des espèces microbiennes à taux spécifique de croissance élevé.
- Les 4 populations sont distribuées de manière hétérogène au sein du biofilm, les bactéries hétérotrophes dominant en surface. Cette distribution confirme donc la remarque précédente.

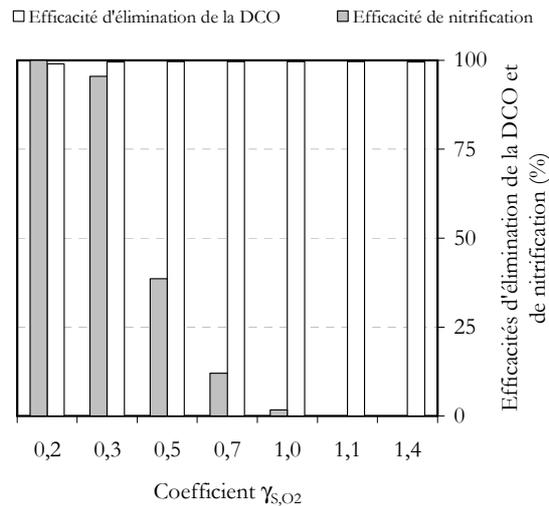
Par conséquent, le modèle développé répond correctement aux objectifs fixés dans ce chapitre.

III.6.2 Evaluation de la coexistence entre bactéries autotrophes et hétérotrophes

Par la suite, le modèle va être utilisé comme un outil numérique qualitatif afin d'analyser les mécanismes de compétition entre les bactéries autotrophes et hétérotrophes pour des cas d'études spécifiques. Préalablement à leur mise en place expérimentale, ces cas d'études ont été définis à l'aide du modèle. Ils représentent des conditions opératoires spécifiques, pour lesquelles la croissance de l'une des populations est soit avantagée, soit limitée. Ce dernier point est primordial dans la mesure où l'apport en oxygène est reconnu comme un facteur gouvernant la coexistence entre les bactéries autotrophes et hétérotrophes. Comme cela a été présenté au chapitre I, le calcul du coefficient γ_{S,O_2} permet de quantifier la limitation en oxygène et donc le régime de croissance des bactéries hétérotrophes. L'impact de l'apport en oxygène sur la compétition entre bactéries autotrophes et

hétérotrophes est illustré par la Figure III-18. Celle-ci représente l'évolution des efficacités d'élimination de la DCO et de nitrification en fonction des valeurs des coefficients γ_{S,O_2} .

La variation de ce coefficient est obtenue en faisant varier la charge organique tout en maintenant constant le ratio DCO/N (4gDCO/gN) et l'apport en oxygène.



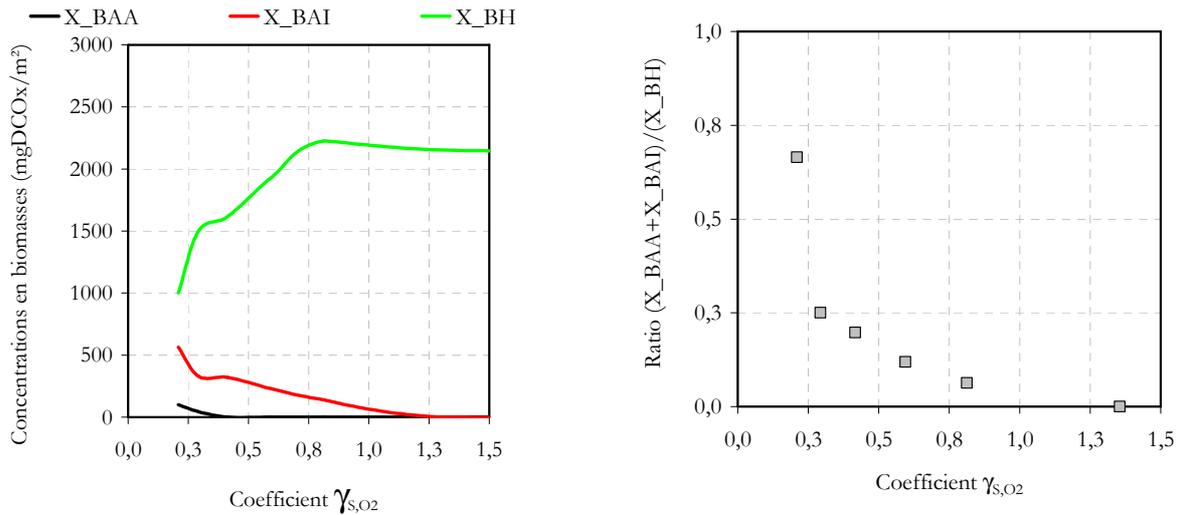
Données numériques

Figure III-18 : Evolution des efficacités d'élimination de la DCO et de nitrification en fonction du coefficient γ_{S,O_2} .

Quelle que soit la valeur du coefficient γ_{S,O_2} , une élimination totale de la DCO est prédite par le modèle.

L'augmentation du coefficient γ_{S,O_2} engendre une diminution de l'efficacité de nitrification qui devient insignifiante à partir d'une valeur proche de 1, dans le cas d'un détachement surfacique continu.

La Figure III-19 représente (a) l'évolution des concentrations en biomasses et (b) l'évolution du ratio entre ces deux groupes bactériens, en fonction du coefficient γ_{S,O_2} .



- a) Evolution des concentrations en bactéries autotrophes et hétérotrophes en fonction du coefficient γ_{s,O_2}
- b) Evolution du ratio $(X_{BAA} + X_{BAI}) / X_{BH}$ en fonction du coefficient γ_{s,O_2}

Données numériques

Figure III-19 : Evolution (a) des concentrations en bactéries autotrophes et hétérotrophes et (b) du ratio entre ces deux groupes bactériens, en fonction du coefficient γ_{s,O_2} , pour un apport en oxygène maintenu constant et un ratio de 4gDCO/gN.

D'après la Figure III-19 et donc les simulations de base de notre modèle, les concentrations en bactéries autotrophes diminuent avec une augmentation du coefficient γ_{s,O_2} . La disparition des bactéries nitrifiantes est observée à partir d'un coefficient γ_{s,O_2} de 0,4. Celle des bactéries nitrifiantes est observée à partir d'un coefficient γ_{s,O_2} de 1,3. Cependant, dès que le coefficient γ_{s,O_2} est supérieur à 1, leur concentration devient très faible comparée à celle des bactéries hétérotrophes. Nous pouvons également remarquer que l'augmentation de la quantité de bactéries hétérotrophes est significative entre 0,3 et 0,8, alors que leur concentration diminue légèrement pour un coefficient γ_{s,O_2} supérieur à 0,8. En effet, au-delà d'une valeur de 0,8 la croissance des bactéries hétérotrophe est également limitée par la disponibilité en oxygène.

III.7 Conclusion

L'exemple présenté dans la section précédente illustre parfaitement l'influence de l'apport en oxygène sur les dynamiques de population autotrophes et hétérotrophes. Par conséquent, une attention particulière sera donnée à l'impact de cette variable tout au long de ce travail. Ce cas d'étude est défini ligne 4 du tableau III-7. Ce tableau présente l'ensemble des cas d'études mis en place dans ce travail pour identifier les mécanismes de compétition entre les bactéries autotrophes et hétérotrophes.

Tableau III-7 : Présentations des différents cas d'études qui seront analysés au cours de ce travail.

Cas	Régime de croissance	de	Caractéristiques majeures
Standard	Limité en substrats		Permet d'obtenir des concentrations significatives en X_{BH} , X_{BAI} et X_{BAA} Modèle de détachement surfacique continu Pas de limitation en azote (4gDCO/gN) Pas de limitation en oxygène (2,5gDCO/m ² .j)
Détachement volumique dynamique	Limité en substrats ou en oxygène		Modèle de détachement volumique continu (=détachement surfacique continu + des évènements détachant un volume significatif de biofilm). Pas de limitation en azote
Ratio DCO/N élevé	Limité en substrats		Modèle de détachement surfacique continu Forte limitation en azote Pas de limitation en oxygène

Ratio élevé	DCO/O ₂	Limité en oxygène	Modèle de détachement surfacique continu Pas de limitations en DCO ou en azote (ratio DCO/N faible et charge organique élevée) Limitation en oxygène (concentration en oxygène contrôlée dans le liquide)
----------------	--------------------	-------------------	---

Ces différents cas sont étudiés et analysés dans les chapitres suivants, à partir des résultats expérimentaux et numériques.

Chapitre IV : Impact du mode de détachement sur la compétition entre bactéries autotrophes et hétérotrophes

IV.1 Introduction et objectifs du chapitre

Au sein d'un système biologique, l'implantation d'une population dépend de son taux de croissance spécifique et de son temps de rétention (TSS). Dans un système à boue activée classique sans perte de biomasse par le décanteur, le TSS est fixé par le rapport entre la quantité de biomasse présente dans le bioréacteur et la quantité de biomasse purgée. La concentration en biomasse active est considérée homogène dans le réacteur. Le cas des systèmes biofilms est plus complexe car du fait des gradients de concentrations en substrats, les biomasses actives sont distribuées de manière hétérogène au sein du biofilm. Le TSS dépendra donc de la concentration locale de chaque biomasse fonctionnelle et de son taux de détachement. Ainsi, le TSS local (TSS_{local}) est gouverné non seulement par le transfert des substrats permettant la croissance mais aussi par le détachement. On comprend instinctivement que le mode de détachement, *i.e.* l'épaisseur (amplitude) de détachement, la fréquence de détachement, ..., peut influencer ce TSS_{local} et donc la compétition entre populations fonctionnelles.

Deux études pionnières, que nous avons déjà analysées, ont soulevé plusieurs questionnements sur ces aspects (Morgenroth et Wilderer, 2000; Elenter *et al.*, 2007). La première étude est uniquement basée sur une approche numérique (Morgenroth et Wilderer, 2000). Les prédictions du modèle en termes de distributions des TSS_{locaux} et des populations fonctionnelles nécessitent par conséquent d'être confirmées par des observations expérimentales. L'étude d'Elenter *et al.* (2007) s'est focalisée sur le comportement d'un système biofilm soumis à des événements de type sloughing. L'occurrence de ces événements n'était toutefois pas totalement maîtrisée pour des charges organiques élevées ($36g_{DCO}/m^2.j$). A faibles charges (sans apport exogène de DCO ou $11g_{DCO}/m^2.j$), l'épaisseur détachée (<50%) et la fréquence des événements durant chaque période de caractérisation étaient trop faibles pour mettre les bactéries autotrophes en situation de compétition.

Par conséquent, ces résultats ne permettent pas d'identifier clairement l'impact du mode de détachement sur la compétition entre populations fonctionnelles au sein du biofilm. Cet aspect nécessite par conséquent d'être étudié à travers l'analyse des prédictions du modèle et des résultats expérimentaux.

L'objectif de ce chapitre consiste donc à observer puis caractériser le détachement de biofilms développés sous différentes conditions d'environnements de croissance mais sous une contrainte de cisaillement constante (0,1Pa ou 0,5Pa). La caractérisation des mécanismes de détachement d'un biofilm peut être abordée suivant différentes approches :

- L'approche mécanistique, qui consiste à qualifier et quantifier les contraintes hydrodynamiques appliquées ainsi que leur impact sur la déformation du biofilm. Il s'agit donc de comprendre la cause de la rupture.
- Une approche plus « expérimentale », qui consiste à caractériser les conséquences d'une contrainte globale appliquée au biofilm. Il s'agit dans ce cas de caractériser le biofilm résiduel après détachement.

Malgré son intérêt, le développement de l'approche mécanistique reste limité par les connaissances concernant les caractéristiques mécaniques des biofilms (cohésion, rhéologie, élasticité,...). Ces connaissances sont d'autant plus difficiles à acquérir que les biofilms sont des structures dont les propriétés varient fortement en fonction de leur localisation spatiale.

De nombreux travaux sur le détachement se sont donc intéressés aux biofilms résiduels (Ochoa *et al.*, 2007 ; Coufort *et al.*, 2007 ; Derlon *et al.*, 2008). Le principal résultat de ces travaux concerne la cohésion des biofilms. A cet effet, des changements dynamiques de la contrainte de cisaillement ont été imposés au système biofilm. Une stratification de la cohésion a été observée et présentée au *chapitre III*. Ces résultats ont notamment permis de développer le test d'érosion détaillé au *chapitre II*.

Cependant, ces travaux n'ont pas permis de caractériser le mécanisme de détachement en régime stationnaire (épaisseur constante sous une contrainte de cisaillement constante).

De manière complémentaire, l'étude des propriétés physiques des particules détachées à travers l'analyse de leurs distributions en nombre et en volume doit permettre cette caractérisation (Choi et Morgenroth, 2003). Il s'agit de déterminer si l'érosion se rapproche plus d'un phénomène surfacique continu, ou d'un phénomène volumique dynamique. Cette alternative est d'autant plus judicieuse que la définition des différents mécanismes de détachement est principalement basée sur la taille des particules détachées (Stewart, 1993). S'il s'avère que l'érosion est un phénomène volumique dynamique, l'évaluation de sa fréquence et de son amplitude est nécessaire.

La première partie de ce *chapitre IV* est donc consacrée à la caractérisation de la nature du détachement de différents biofilms en conditions de croissance. Le mécanisme de détachement en régime stationnaire est caractérisé par l'analyse conjointe des propriétés du biofilm résiduel et de celles des particules détachées. Pour un état d'équilibre établi, les biofilms résiduels ont été caractérisés en termes d'épaisseur moyenne, d'état de surface (rugosité), de masse accumulée et de densité et les particules détachées en termes de taille (diamètres obtenus par granulométrie et Particle Image Velocimetry).

Ces études expérimentales doivent permettre de déterminer si l'érosion se rapproche plus d'un phénomène surfacique continu, ou d'un phénomène volumique dynamique ou encore de l'association des deux.

Les biofilms ont été développés sous les conditions relatives au cas « standard » présenté dans le tableau III-6 du *chapitre III*, sous des contraintes de cisaillement de 0,1 ou 0,5Pa. L'oxygène et les nitrates ont été testés comme accepteur final d'électrons. Une source mixte de substances carbonées (glucose, éthanol, acide propionique, acétate de sodium) ou simple (glucose ou éthanol) a été utilisée. Des charges organiques de 2,5 ou 38gDCO/m².j et des ratios de 4, 20 ou 73gDCO/gN ont été

appliqués. Cette diversité de conditions d'environnement de croissance doit, en théorie, garantir le développement de biofilms différents en termes de morphologies. Par conséquent, les cas traités de biofilms sont considérés variés et contrastés.

Sur la base des conclusions de ces études morphologiques, la seconde partie de ce chapitre est consacrée à l'évaluation d'une modification du modèle de détachement. Cette modification considère le détachement comme le fruit à la fois de l'érosion de surface et d'une succession d'évènements se produisant à intervalles réguliers et affectant le volume du biofilm. Ce modèle associe donc un détachement surfacique continu à des évènements volumiques dynamiques. Il sera dénommé « détachement volumique dynamique » en opposition avec le mode de « détachement surfacique continu ». Une étude numérique de l'impact de la fréquence et de l'amplitude des évènements de détachement sur la compétition microbienne est ensuite réalisée. L'influence de la nature du détachement est évaluée à travers l'analyse des flux et taux observés de réactions, des épaisseurs actives, et des quantités de biomasse accumulées. Deux cas d'étude, dont les spécificités sont présentées dans le Tableau III-7, sont considérés : le cas « standard » et le cas « ratio DCO/O₂ élevé ».

Dans la troisième partie, l'impact du TSS_{local} sur la compétition microbienne est analysé. Une étude expérimentale de l'impact du TSS_{local} est notamment mise en place. L'objectif est de vérifier la validité et la représentativité des observations réalisées à partir du modèle et concernant la nature du détachement (amplitude, fréquence) sur les processus de compétition entre micro-organismes autotrophes et hétérotrophes. Dans ce cadre, une expérimentation de développement de biofilms soumis à des évènements volumiques est réalisée. Ces évènements volumiques maîtrisés sont successivement imposés selon une séquence propre à un système biofilm. En parallèle, les flux et les taux de réactions sont suivis pour évaluer l'impact de cette répétition d'évènements.

IV.2 Caractérisation de la nature du détachement : approche expérimentale

Pour le développement des biofilms, les différentes conditions de croissance testées diffèrent par : la nature du substrat organique, la nature de l'accepteur d'électron, le ratio DCO/N ou encore la charge surfacique imposée. Remarquons que le ratio DCO/N est relatif au rapport entre la concentration en DCO et la concentration en ammonium. L'ensemble de ces conditions opératoires est résumé dans le Tableau IV-1.

Tableau IV-1 : Récapitulatifs des conditions de croissance des biofilms dont le détachement a été caractérisé.

Cas	Régime de croissance des bactéries hétérotrophes	de	Valeur du coefficient γ_{S,O_2} ou γ_{S,NO_3}	Source de carbone	Accepteur final d'électrons	Charge surfacique (gDCO/m ² .j)	Ratio DCO/N (gDCO/gN)	Contrainte de cisaillement (Pa)
1	Limité	en	0,9	Mixte	Oxygène (saturation)	2,5	73	0,5
2	Limité	en	-	Glucose	Oxygène (saturation)	38	20	0,1
3	Limité	en	0,44	Mixte	Oxygène (saturation)	2,5	4	0,5
4	Limité	en	-	Glucose	Nitrates (saturation)	38	20	0,1
5	Limité	en	-	Ethanol	Nitrates (saturation)	38	20	0,1

- : signifie que ces données n'ont pas été mesurées

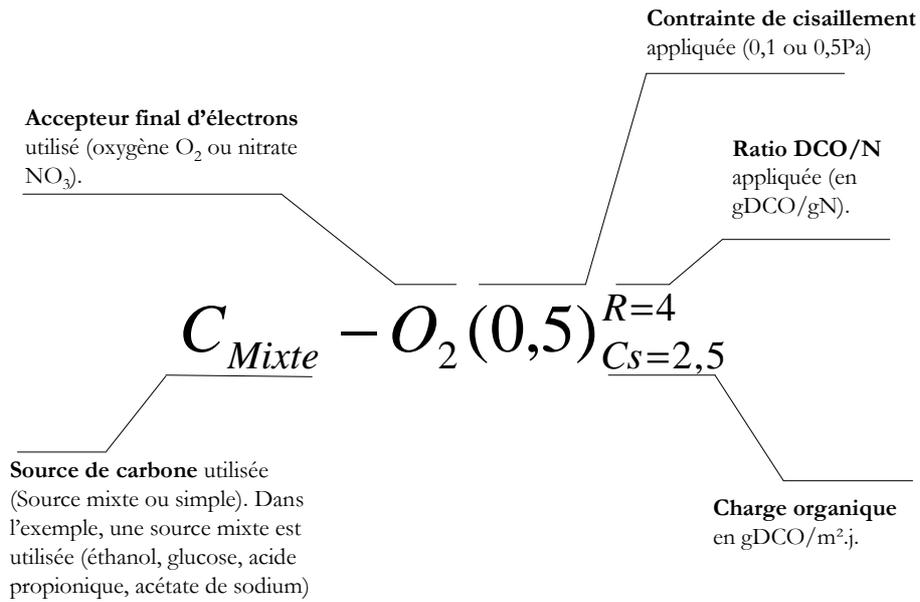
Dans tous les cas, les biofilms ont été développés sous des conditions de limitation en substrats donneurs d'électrons (De⁻).

Dans les cas 1, 2 et 3, l'oxygène a été utilisé comme accepteur final d'électrons alors que dans les cas 4 et 5 ce sont les nitrates qui sont utilisés. Cependant, dans les cas 1 et 2, le ratio DCO/N est élevé. Par conséquent, le flux de nitrates produits, même dans l'hypothèse d'une nitrification totale, est très faible. A l'inverse, dans les cas 3, 4 et 5, la disponibilité des nitrates est accrue en raison d'un ratio DCO/N faible sous des conditions aérobies (flux de nitrates produits par la nitrification élevé) ou d'une source exogène de nitrates. Dans les cas 3, 4 et 5, nous pouvons instinctivement penser qu'une fraction significative du biofilm se développe sous des conditions anoxiques (biofilm dénitrifiant).

A l'inverse, dans les cas 1 et 2, la fraction de biofilm anoxique est supposée insignifiante (biofilm non-dénitrifiant). Cette différence de fonctionnalités a été confirmée par l'analyse des bilans de matières (présentés au *chapitre V*).

Par ailleurs, une contrainte de cisaillement de 0,5Pa a été appliquée dans les cas 1 et 3 alors qu'une contrainte plus faible (0,1Pa) a été testée dans les cas 2, 4 et 5. Plusieurs sources de carbone ont également été testées. La source de carbone implique potentiellement une sélection des microorganismes, ce qui en retour peut avoir un impact sur la morphologie du biofilm développé. Ces différents aspects sont analysés par la suite.

La terminologie suivante sera utilisée dans ce chapitre pour identifier les différents biofilms caractérisés en fonction de leurs conditions d'environnement de croissance.



IV.2.1 Structure des biofilms caractérisés

Le premier résultat de cette étude concerne l'impact des conditions de croissance sur la morphologie des biofilms, pour lesquels des photos sont présentées sur la Figure IV-1.

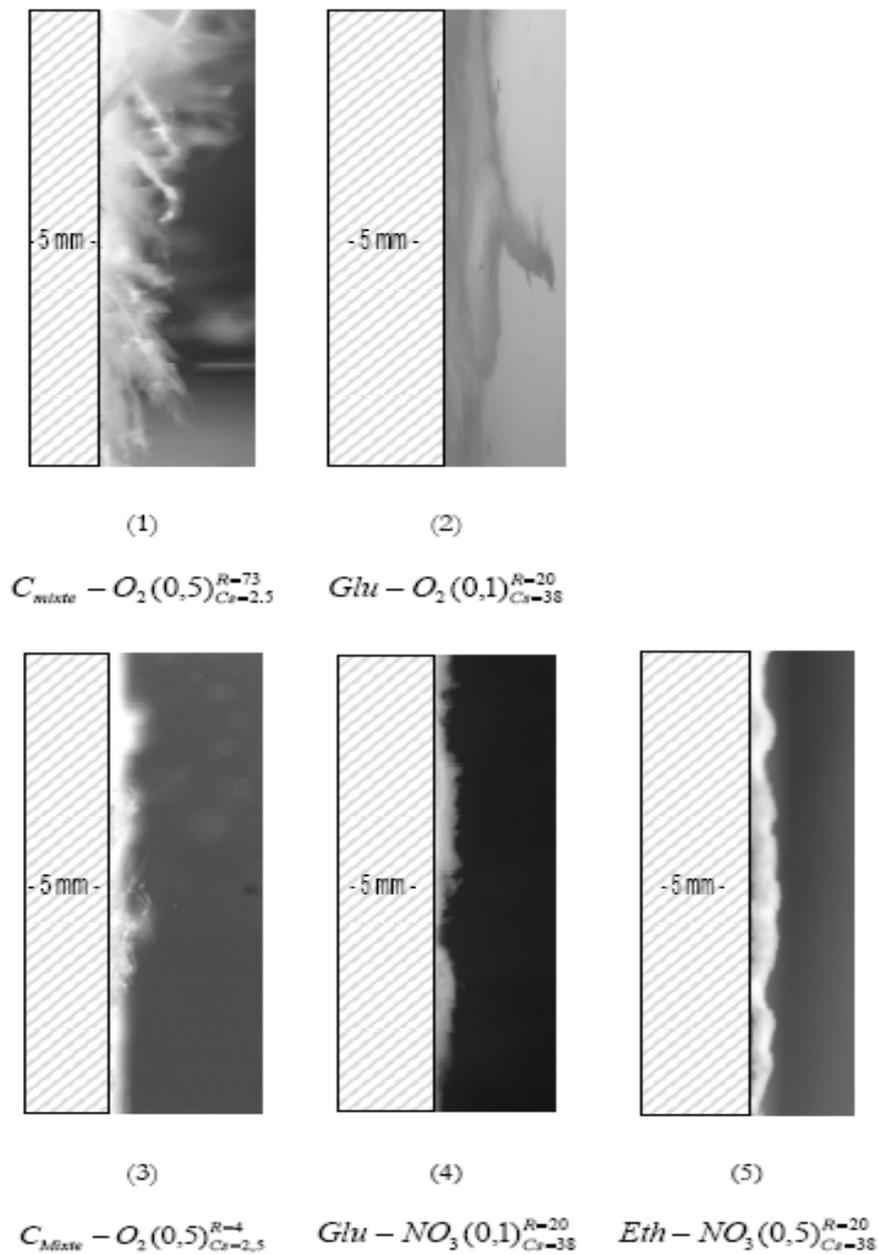


Figure IV-1 : Photos de biofilms développés sous différentes conditions de croissance. Entre parenthèse, l'indice du cas considéré.

De nombreux « streamers » caractérisent les biofilms développés dans les cas 1 et 2 (biofilms non-dénitrifiants). Ces biofilms sont par ailleurs cotonneux et filandreux. Les biofilms développés dans les cas 3, 4 et 5 (biofilms dénitrifiants), présentent une structure compacte, faiblement rugueuse et sans « champignons » ni « streamers ». Les observations microscopiques des biofilms 1 et 2 indiquent une

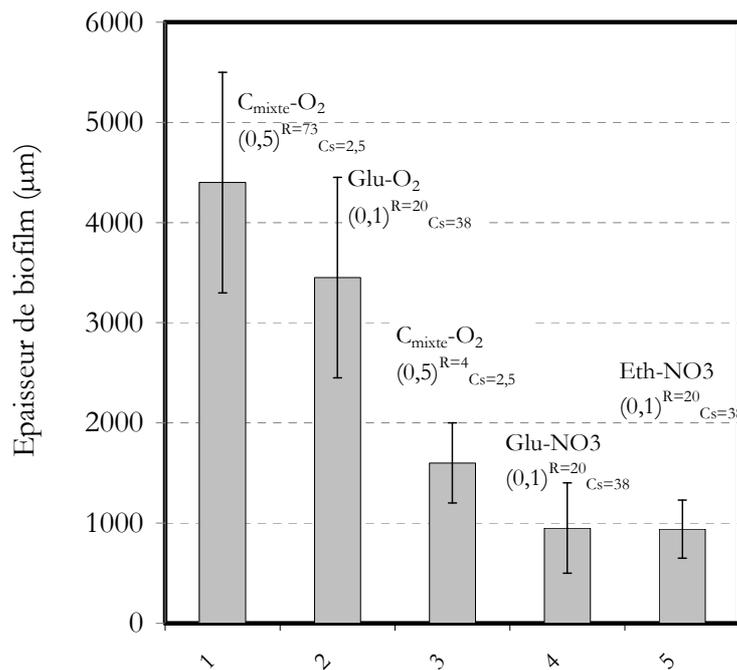
forte proportion de bactéries filamenteuses, alors que les biofilms 4 et 5 sont composés uniquement de bactéries classiques (« floc-forming bacteria » en anglais). Dans le cas 3, la fraction de bactéries filamenteuses observée est faible.

En condition aérobie, la proportion de bactéries filamenteuses augmente avec le degré de la limitation en azote (augmentation du ratio DCO/N de 4 à 20gDCO/gN, puis à 73gDCO/gN).

D'après la littérature, les biofilms sont d'autant plus rugueux que la contrainte de cisaillement appliquée est faible et que les charges organiques sont élevées (van Loosdrecht *et al.*, 1995). Dans notre cas, c'est l'effet de la fonction de dénitrification sur la structure et l'écologie microbienne qui est remarqué, ainsi que l'effet d'une limitation en azote (73gDCO/gN). Dans le cas 2, un impact de la source de carbone (glucose seule) est également envisageable.

IV.2.1.1 Caractérisation de l'épaisseur moyenne de biofilm

La différence de morphologie en fonction des conditions de croissance des biofilms se quantifie facilement par mesure de l'épaisseur moyenne de biofilm (Figure IV-2). L'épaisseur des biofilms a donc été mesurée par analyse d'image après environ 1 ½ mois de croissance, selon la méthode présentée au *chapitre II*.



Données expérimentales

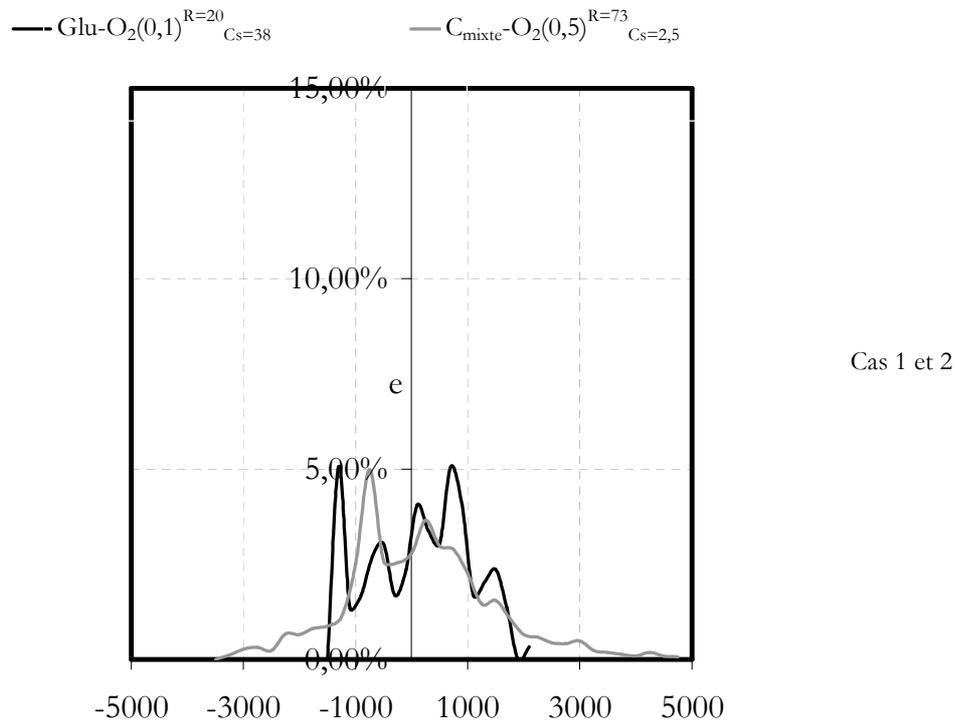
Figure IV-2 : Influence des conditions de croissance sur l'épaisseur de biofilm.

Notons en premier lieu que la charge organique surfacique n'explique pas les différences d'épaisseur observées comme dans le cas d'une condition opératoire donnée.

Dans cette expérience, même si plusieurs conditions opératoires sont changées à chacune de ces expériences, l'impact de la fonction de dénitrification (présente dans les cas 3, 4 et 5) sur l'épaisseur moyenne de biofilms semble très significatif. Les biofilms non-dénitrifiants (cas 1 et 2) sont caractérisés par des épaisseurs moyennes respectivement de $3500 \pm 400 \mu\text{m}$ à $4400 \pm 1100 \mu\text{m}$. Notons que dans le cas 1, la forte limitation en azote (ratio de 73gDCO/gN) augmente l'impact de l'absence de dénitrification sur l'épaisseur moyenne de biofilm, vraisemblablement en raison de la forte proportion de bactéries filamenteuses. A l'inverse, les biofilms dénitrifiants (cas 3, 4 et 5), sont caractérisés par des épaisseurs moyennes inférieures à $1500 \mu\text{m}$.

IV.2.1.2 Caractérisation de la rugosité des biofilms

L'impact des conditions de croissance sur les propriétés physiques globales des biofilms est aussi observé en termes de rugosité de surface, comme en témoigne la Figure IV-3. Celle-ci représente la distribution des écarts par rapport à l'épaisseur moyenne de biofilm pour chaque condition de croissance. La Figure IV-3a est relative aux biofilms non-dénitrifiants (cas 1 et 2) alors que la Figure IV-3b est relative aux biofilms dénitrifiants (cas 3, 4 et 5).



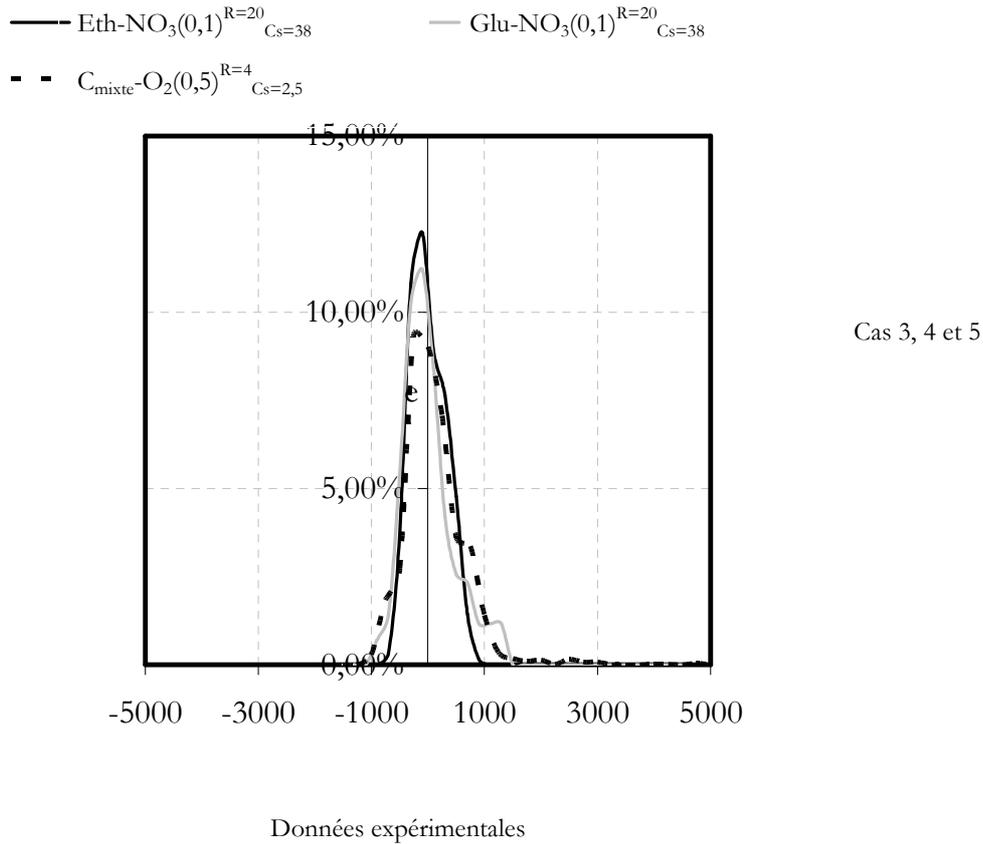


Figure IV-3 : Distributions des écarts par rapport à l'épaisseur moyenne de biofilm pour chaque condition de croissance testée.

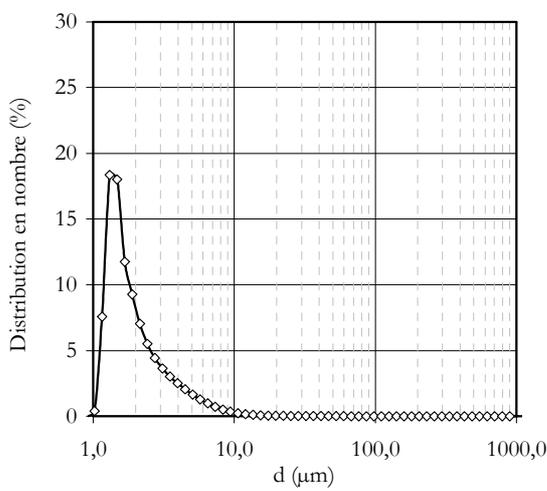
Les biofilms dénitrifiants sont moins rugueux que les biofilms non-dénitrifiants. Les écarts par rapport à l'épaisseur moyenne de biofilm varient dans une gamme comprise entre -1000µm et +1000µm pour un système dénitrifiant. Dans le cas d'un système non-dénitrifiant, cette gamme est élargie. Dans le cas d'un biofilm aérobique développé sous un ratio DCO/N de 73gDCO/gN (cas 1), cette gamme atteint -3000µm à 3000µm. Par conséquent, de même que pour l'épaisseur, nous remarquons que la rugosité des biofilms est significativement affectée par la fonction de dénitrification et par la limitation en azote.

IV.2.2 Caractérisation de la taille des particules détachées

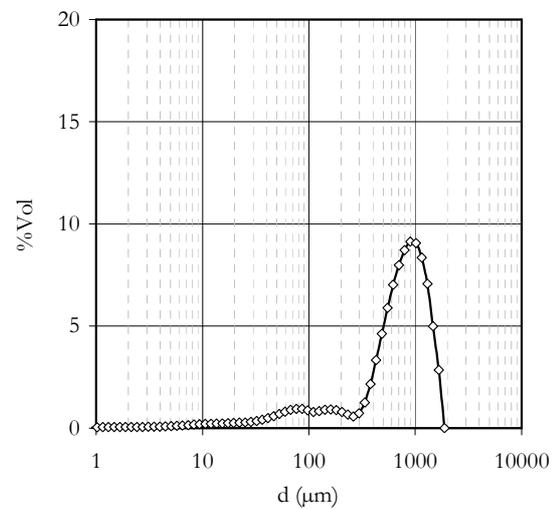
Les distributions en nombre et en volume des tailles de particules ont été mesurées sur des périodes longues d'environ 1 mois ½ après avoir atteint l'état d'équilibre. Pendant ces périodes de

caractérisation, l'épaisseur moyenne de biofilm est constante. Un exemple de distribution en nombre (a) et en volume (b) est donné sur le Figure IV-4, dans le cas d'un biofilm non-dénitrifiant (cas 1) et dans le cas d'un biofilm dénitrifiant (cas 4).

Notons que le détachement a été suivi sur une période longue et que les particules caractérisées sont des particules détachées sur une période d'environ 24 h (période entre deux nettoyages des réacteurs). Selon le protocole de l'analyse granulométrique (présenté au *chapitre II*), une forte dilution des particules permet de prévenir des phénomènes de ré-agglomération (Bessière, 2008).

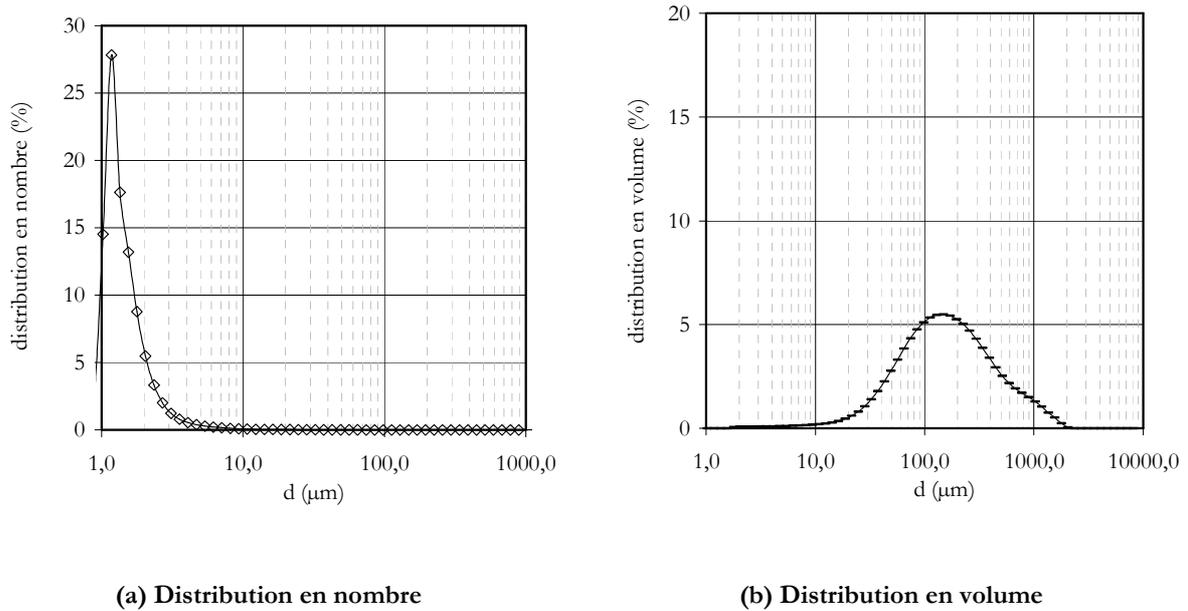


(a) Distribution en nombre



(b) Distribution en volume

Données expérimentales « Cas (1) $C_{mixte} - O_2 (0,5)_{Cs=2,5}^{R=73}$ »



Données expérimentales « Cas (4) $Glu - NO_3(O,1)_{C_S=38}^{R=20}$ »

Figure IV-4 : Distributions en nombre (a) et en volume (b) des diamètres équivalents de particules détachées (cas 5 du tableau IV-1).

Une distribution en nombre caractérise davantage les particules majoritaires alors qu'une distribution en volume caractérise mieux les grosses particules.

Dans l'exemple ci-dessus, le diamètre le plus probable (dpp) des particules majoritaires (distribution en nombre) est de l'ordre du micron, quel que soit l'environnement de croissance. Le dpp des grosses particules (distribution en volume), dans le cas 1, est d'environ 1000µm. Sa distribution s'étend de 30 à 2000µm, alors que l'épaisseur de ce biofilm atteint $4400 \pm 1100 \mu\text{m}$. Le dpp des grosses particules est d'environ 100-200µm dans le cas 4 pour une distribution qui s'étend de 20 µm à 600 µm, alors que le biofilm a une épaisseur de $950 \pm 450 \mu\text{m}$.

Un impact de la fonction de dénitrification sur l'allure des distributions en volume est identifié. La distribution en volume d'un biofilm dénitrifiant est très étendue, ce qui traduit une large gamme de diamètres équivalents des grosses particules.

Dans le cas d'un biofilm non-dénitrifiant, la gamme de diamètres équivalents de grosses particules est moins large, ce qui se traduit par une distribution peu étendue. Par conséquent, dans la suite de cette étude et afin de considérer au mieux l'impact de la fonction de dénitrification sur le mode de détachement des biofilms, les particules détachées seront caractérisées à travers les valeurs de leur d_{pp} et de leur diamètre équivalent à 95% (d_{95}).

Ainsi, le détachement s'effectue par érosion de surface pour une majorité de particules mais d'un point de vue quantitatif (quantité de biomasse détachée), l'érosion de profondeur est la plus significative (répartie sur environ 60% de l'épaisseur de biofilm dans les exemples présentés). Ce résultat illustre l'importance de considérer un détachement en profondeur (l'épaisseur moyenne de biofilm affectée par ce détachement en profondeur sera présentée par la suite).

Cette caractérisation des particules détachées a été réalisée pour l'ensemble des biofilms développés sous les conditions de croissance présentées au début de ce chapitre. Un récapitulatif des diamètres d_{pp} et d_{95} des particules majoritaires et des grosses particules en fonction de l'environnement de croissance est donné Figure IV-5.

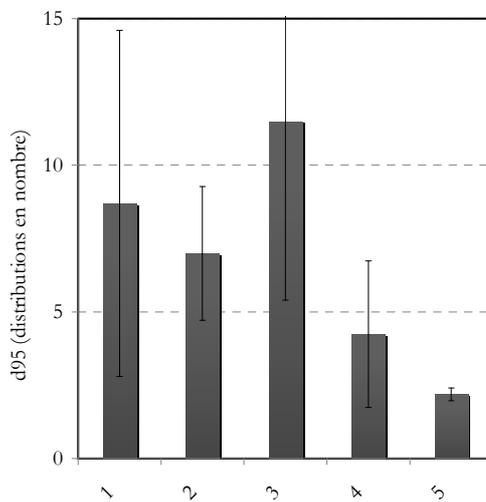
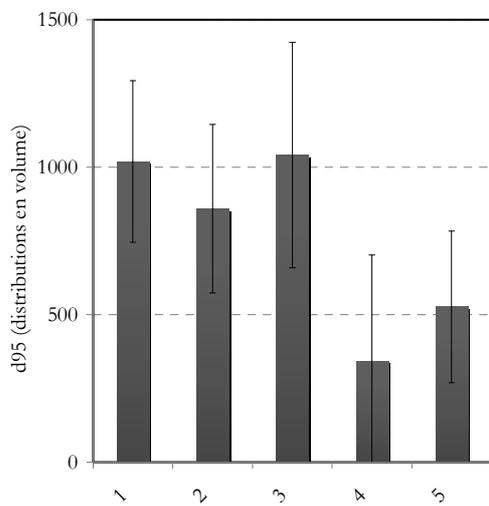
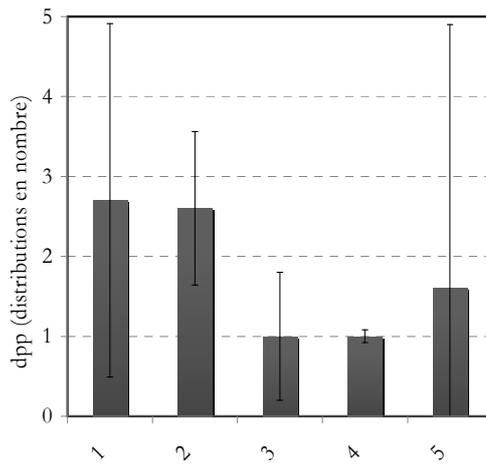
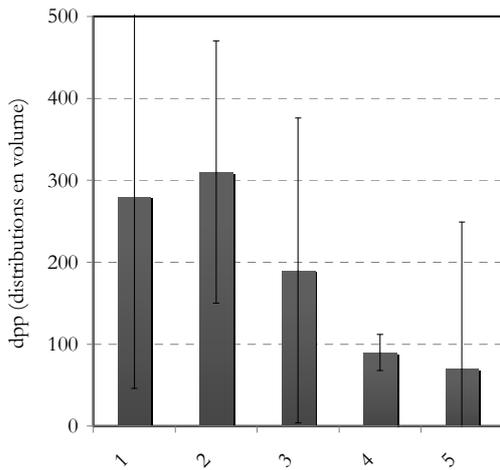
(1) $C_{mixte} - O_2(O,5)_{Cs=2,5}^{R=73}$

(2) $Glu - O_2(O,1)_{Cs=38}^{R=20}$

(3) $C_{mixte} - O_2(O,5)_{Cs=2,5}^{R=4}$

(4) $Glu - NO_3(O,1)_{Cs=38}^{R=20}$

(5) $Eth - NO_3(O,1)_{Cs=38}^{R=20}$



(a)

(b)

Données expérimentales

Figure IV-5 : Récapitulatif des dpp et des d₉₅ des particules majoritaires (distributions en nombre) et des grosses particules (distributions en volume) en fonction des environnements de croissance des biofilms.

Les barres présentes sur les histogrammes des Figure IV-5 (a) et (b) représentent des variations autour de la valeur moyenne de d_{95} et non des barres d'erreurs sur les données. Ces variations sont définies comme la moyenne des écarts de d_{pp} et d_{95} par rapport à leur valeur moyenne respective.

D'après la Figure IV-5, les points suivants ont été identifiés :

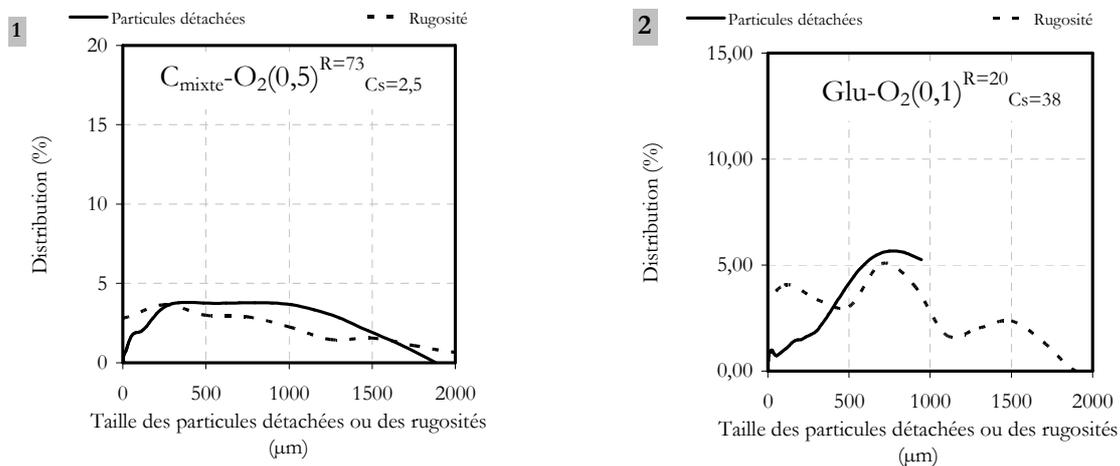
- Quel que soit l'environnement de croissance du biofilm, l'érosion détache un très grand nombre de petites particules avec une fréquence élevée mais aussi quelques grosses avec une fréquence faible (d_{pp} supérieur à $100\mu\text{m}$ et d_{95} supérieur à $300\mu\text{m}$), ces dernières représentant la majorité du volume éliminé.
- Néanmoins, une variation importante des diamètres équivalents selon les conditions d'environnement est observée :
- Le d_{pp} des petites particules des biofilms non-dénitrifiants (cas 1 et 2) est environ 3 fois supérieur à celui des biofilms dénitrifiants (cas 3, 4, 5) : respectivement $3\mu\text{m}$ contre $1\mu\text{m}$ en moyenne.
- Le d_{pp} des grosses particules des biofilms non-dénitrifiants est supérieur de 30 à 60% à celui des biofilms dénitrifiants : respectivement $300\mu\text{m}$ en moyenne contre $100\text{-}200\mu\text{m}$.
- Le d_{95} des particules majoritaires des biofilms non-dénitrifiants est supérieur à celui des biofilms dénitrifiants: respectivement 7 à $11\mu\text{m}$ contre 2 à $4\mu\text{m}$.
- de même, le d_{95} des grosses particules des biofilms non-dénitrifiants est supérieur à celui des biofilms dénitrifiants : respectivement 800 à $1000\mu\text{m}$ contre 300 à $500\mu\text{m}$.
- Les d_{95} des particules majoritaires et des grosses particules sont très variables, comme en témoignent les variations autour de leur valeur moyenne. Les variations de d_{95} peuvent atteindre 30% à 100% de la valeur moyenne de d_{95} .
- La nature de la source de carbone semble également influencer les valeurs des d_{95} .

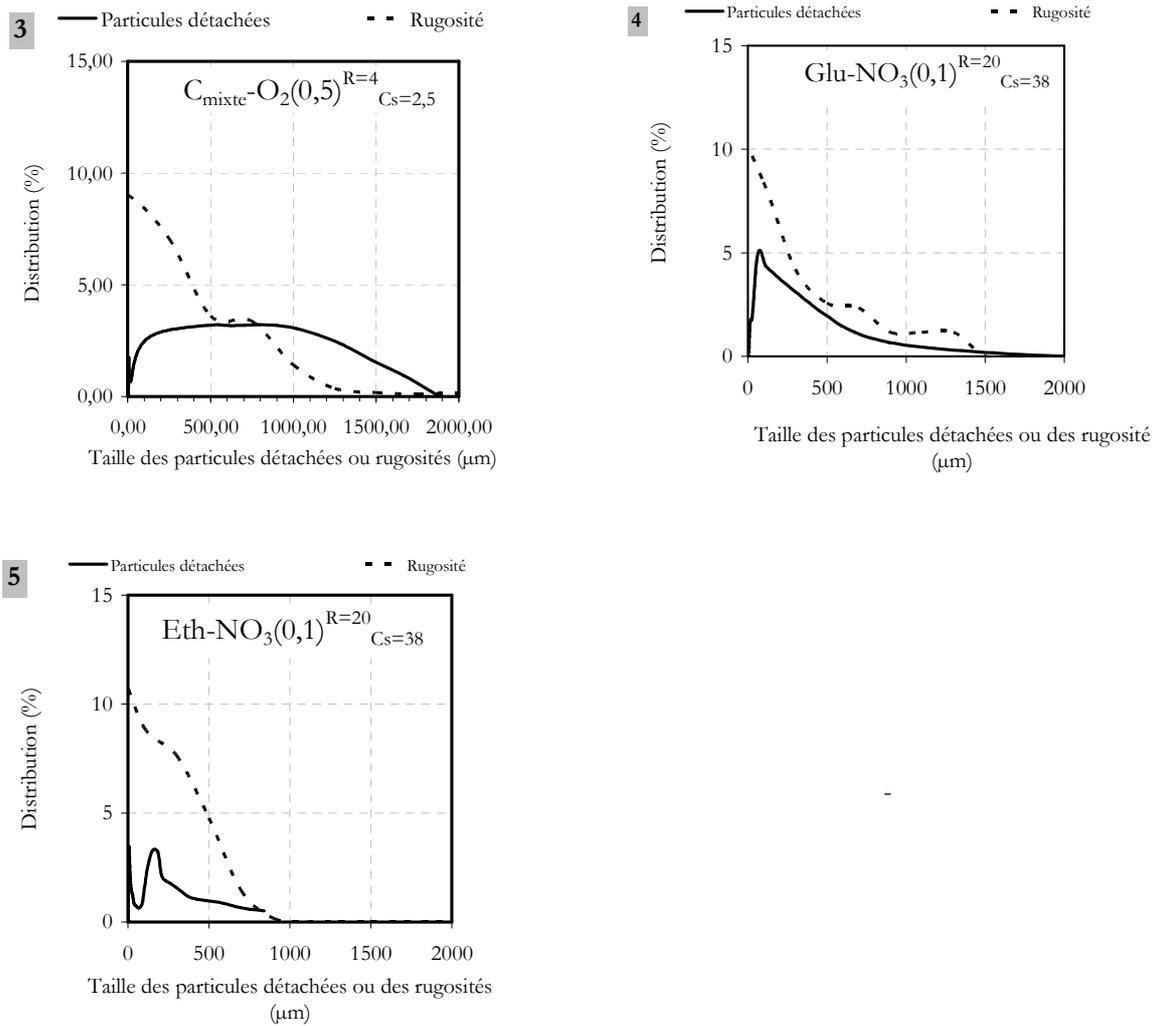
En conclusion, l'érosion ne peut pas être considérée uniquement comme un phénomène surfacique continu.

L'érosion est la résultante d'un phénomène surfacique continu, qui détache de petites particules, et d'évènements ponctuels qui détachent de larges particules en profondeur. L'érosion est donc un **phénomène surfacique et volumique dynamique**. De plus il semble que la fréquence de détachement d'une particule soit d'autant plus faible que la profondeur de biofilm impactée par le détachement de cette particule est élevée.

IV.2.3 Corrélation entre la taille des particules détachées et la rugosité des biofilm

Dans la partie précédente, nous nous sommes attachés à identifier le mode de détachement des biofilms à travers l'analyse couplée des particules détachées et des structures développées. Dès lors, il apparaît judicieux de confronter ces deux types de résultats (Figure IV-6) pour confirmer l'adéquation entre ces deux méthodes de caractérisation. Seules les distributions moyennes des larges particules sont confrontées à la rugosité des biofilms, leur détachement étant très significatif comparé à celui des particules majoritaires en termes de quantité de biomasse détachée. La rugosité est représentée par la distribution des valeurs absolues des écarts par rapport à l'épaisseur moyenne de biofilm.





Données expérimentales

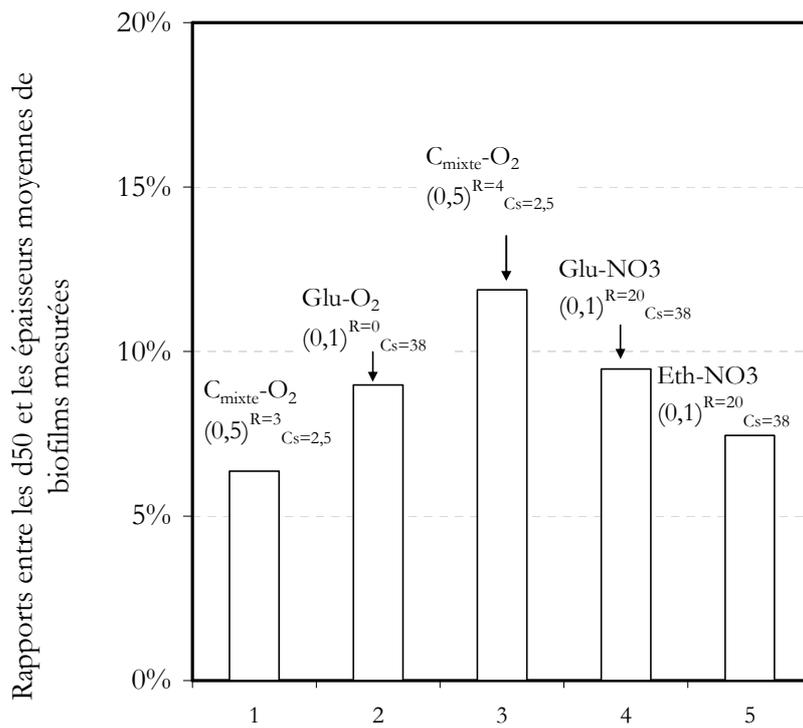
Figure IV-6 : Comparaison de la taille des particules détachées et de la taille des rugosités pour les différents biofilms.

Dans le cas 2, la distribution moyenne des grosses particules s'étend jusqu'à 1000µm en raison de la configuration du logiciel d'acquisition de données du granulomètre. Instinctivement, on peut néanmoins penser que la distribution réelle s'étend au-delà de 1000µm.

Quel que soit l'environnement de croissance des biofilms, il existe une tendance entre la distribution des diamètres équivalents des larges particules et les rugosités.

Cependant, le détachement ne semble pas être l'unique cause des rugosités observées. On peut par exemple imaginer qu'une rugosité puisse apparaître *via* le détachement successif et localisé de plusieurs particules, et non d'une seule. Par conséquent, la corrélation entre les distributions des tailles des particules et la rugosité est délicate, ne fournissant qu'une information qualitative.

Néanmoins, l'existence d'un détachement volumique paraît confirmée. Dès lors, un point déterminant est d'identifier quelle épaisseur de biofilm est affectée par ce mode de détachement, et quelle relation épaisseur-fréquence. Les rapports entre les d_{pp} et $d_{95 \text{ volume}}$ des grosses particules et les épaisseurs moyennes de biofilm ont été calculés pour chaque condition d'environnement de croissance. Ce rapport traduit l'épaisseur affectée par le détachement (Figure IV-7).



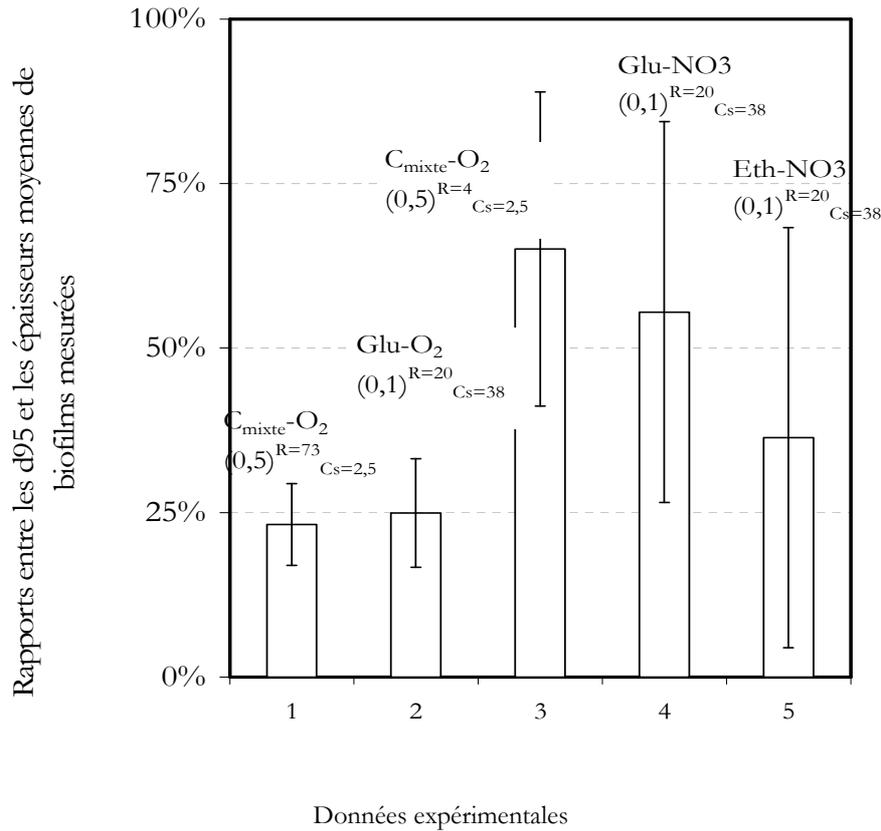


Figure IV-7 : Rapport entre les dpp ou d₉₅ des particules larges et les épaisseurs moyennes des biofilms.

La fraction de l'épaisseur moyenne concernée par le détachement varie entre quelques pourcents (cas 1 et 2) et plus de 80% (cas 3 et 4). Quel que soit le rapport considéré, le biofilm du cas 1 est le biofilm dont l'épaisseur est la moins affectée par le détachement des larges particules. A l'inverse, le biofilm du cas 3 est le plus impacté par le détachement de grosses particules (80% au maximum de son épaisseur est affectée par le détachement), sûrement en raison de sa faible épaisseur (environ 1000 μ m). Des fractions d'épaisseurs détachées de biofilm de 25%, 50% et 80% seront considérées dans la suite de cette étude pour étudier l'impact du mode de détachement sur la compétition entre bactéries autotrophes et hétérotrophes.

Les rapports entre les dpp ou d₉₅ des particules majoritaires, et les épaisseurs moyennes de biofilm, ne sont pas analysés.

En effet, quel que soit l'environnement de croissance, ces rapports sont inférieurs à 1% de l'épaisseur moyenne de biofilm. Leur détachement est donc assimilé au détachement surfacique continu.

IV.2.4 Conclusions sur la caractérisation de la nature du détachement

L'objectif de cette première partie était de confirmer ou infirmer l'hypothèse d'un détachement volumique dynamique détachant le biofilm en profondeur. A cet effet, une caractérisation du détachement a été effectuée par analyse conjointe de la taille des particules détachées et de la morphologie des biofilms. Différentes conditions d'environnement de croissance ont été testées afin de développer différents biofilms. Les conclusions majeures sont les suivantes :

- L'érosion entraîne majoritairement le détachement de petites particules à la surface du biofilm, et lors d'évènements ponctuels, le détachement de larges particules en profondeur. Plus la taille des particules détachées est élevée, plus la fréquence à laquelle elles se détachent est faible. A partir de ces résultats, l'érosion a été redéfinie comme un phénomène à la fois surfacique et volumique dynamique.
- Les conditions de croissance influencent significativement la taille des particules détachées. Quel que soit le type de distribution considérée, la taille des particules détachées est moins élevée pour les biofilms dénitrifiants que pour les biofilms non dénitrifiants.
- Les caractéristiques des particules détachées sont directement liées aux propriétés physiques des biofilms qui sont déterminées par les conditions d'environnement de croissance. Ainsi, la taille des particules larges est du même ordre de grandeur que la taille des rugosités.
- Les conditions de croissance influencent significativement la morphologie des biofilms et notamment leurs propriétés morphologiques en termes d'épaisseur et de rugosité de surface.
- *En termes d'épaisseur moyenne de biofilm* : les biofilms dénitrifiants sont plus fins que les biofilms ne présentent pas cette fonctionnalité. Un impact de la forte limitation en azote sous des conditions aérobies est également observé puisque ce biofilm est particulièrement épais (>4000 μ m). On peut envisager qu'une limitation engendre une production plus élevée de substances exo-polymériques,

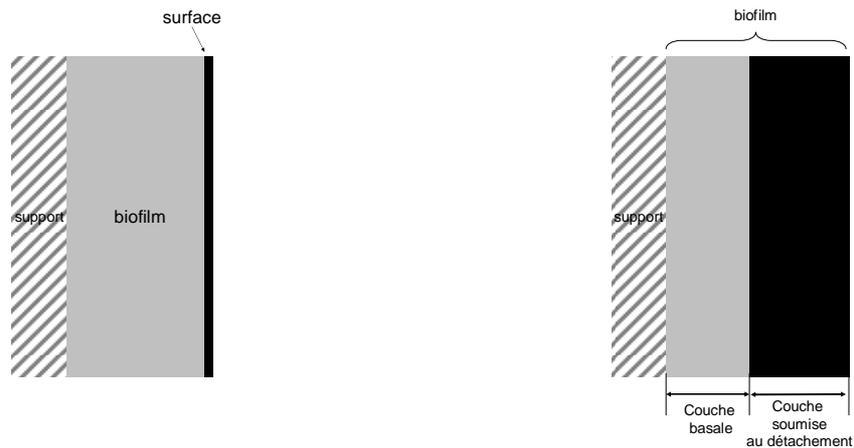
améliorant ainsi la cohésion du biofilm. Ceci expliquerait l'épaisseur importante du biofilm malgré une charge organique faible de 2,5gDCO/gN.

- *En termes de rugosité*: les biofilms dénitrifiants sont moins rugueux que les biofilms non-dénitrifiants. Un impact de la limitation en azote est également observé, le biofilm développé sous ces conditions étant le plus rugueux.
- *En termes de fractions de biofilm détaché*: La fraction de biofilm concernée par le détachement volumique, donnée par les rapports « dpp/épaisseur moyenne » et « d₉₅/épaisseur moyenne », est plus élevée dans le cas d'un biofilm dénitrifiant que dans le cas d'un biofilm non-dénitrifiant. Pour les biofilms dénitrifiants, la fraction moyenne détachée est de 50% avec de fortes variations (entre 25% et 80%). Pour les biofilms non-dénitrifiants, la fraction moyenne détachée est de 25% avec un faible coefficient de détachement.
- Le détachement d'une large particule affecte le biofilm sur au maximum 80% de son épaisseur. Les 20% relatifs à l'épaisseur non détachée sont vraisemblablement liés à la fraction représentée par la couche basale dont la cohésion est très forte (voir *chapitre III* ainsi que Coufort *et al.*, 2007 ; Derlon *et al.*, 2008).

Nous allons maintenant nous intéresser aux conséquences de ces observations sur le mode de détachement considéré par le modèle. C'est l'objet de la partie suivante.

IV.3 Impact de la caractérisation du détachement des biofilms sur l'écriture et la définition des différents modèles de détachement

Dans la première partie de ce chapitre, le caractère dynamique et volumique de l'érosion a été démontré. Notamment, le détachement de larges particules à fréquence variable a été remarqué. Ce résultat témoigne des limites d'un modèle de détachement surfacique continu (Figure IV-8a) dont la quantité de biomasse détachée dépend de sa concentration à l'interface biofilm-liquide.



Détachement surfacique continu (a)

Détachement dynamique (à intervalles) (b)

Figure IV-8: Schématisation du mode de détachement : (a) surfacique continu et (b) dynamique (à intervalles).

Le modèle de détachement surfacique continu est écrit selon l'équation IV-1. Rappelons que ce modèle est tel que :

Équation IV-1

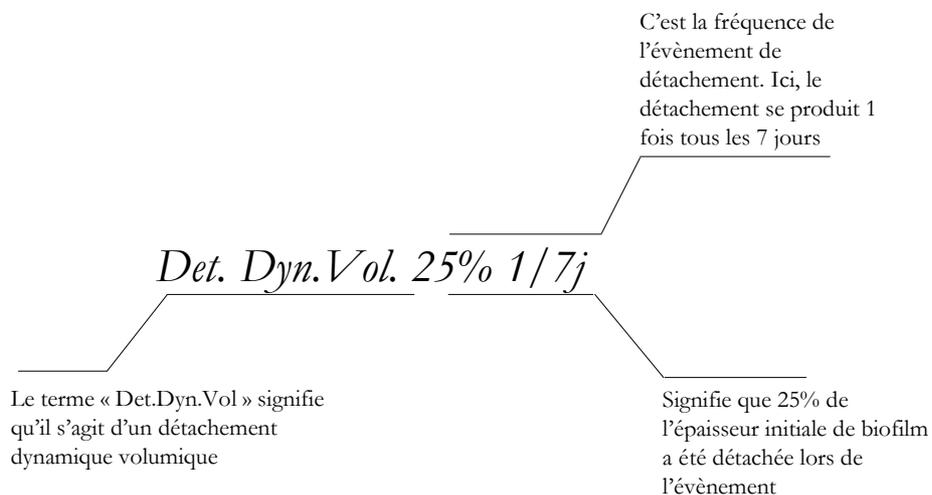
$$V_{\text{det}} = k_{\text{det}} \cdot \tau_p \cdot L_f$$

Sur la base de ce modèle, un détachement volumique et dynamique a été simulé en accord avec les précédentes observations expérimentales (Figure IV-8b). Le modèle développé sous AQUASIM® étant un modèle 1-D, le détachement volumique dynamique est caractérisé par :

- Une profondeur de détachement variable.
- Une fréquence de détachement (potentiellement variable).

Plusieurs valeurs de « τ_p » ont été testées pour modéliser les événements volumiques dynamiques.

Les valeurs de « τ_p » ont été choisies telles que 25 à 50% de l'épaisseur de biofilm soit détachée lors d'un évènement. Entre deux évènements volumiques dynamiques, des périodes de 1j, 7j ou 14j sous un détachement surfacique continu ont été choisies. La durée de ces périodes a été définie afin de faire varier les capacités de « re-croissance du biofilm » après un évènement volumique dynamique. Ceci nous renseigne sur les dynamiques de retour à l'état stationnaire du système biofilm. La terminologie suivante sera utilisée par la suite pour représenter ce modèle de détachement volumique dynamique.



Dans l'exemple ci-dessus, le détachement est du type « volumique dynamique ». Les évènements sont hebdomadaires et éliminent 25% de l'épaisseur initiale de biofilm. Les différents modes de détachement qui seront analysés par la suite sont les suivants :

- Détachement surfacique continu.
- Dét.vol.dyn. 25% 1/1j.
- Dét.vol.dyn. 25% 1/7j.
- Dét.vol.dyn. 25% 1/14j.

- Dét.vol.dyn. 50% 1/7j.
- Dét.vol.dyn. 50% 1/14j.
- Dét.vol.dyn.80% 1/7j.

IV.4 Impact de la nature du détachement sur la compétition microbienne entre autotrophes et hétérotrophes

Dans cette partie, une étude numérique de l'impact du détachement sur la distribution des populations est réalisée. Les biofilms sont développés sous des conditions de croissance relatives au cas « standard » et au cas « ratio DCO/O₂ élevé » présentés dans le tableau III-7 du *chapitre III*. Les conditions de croissance relatives à ces deux cas sont rappelées ci-dessous :

- Sous les conditions de croissance du cas « standard », le biofilm est développé avec une charge de 2,5gDCO/m².j et un ratio de 4gDCO/gN, sans limitation par l'oxygène.
- Sous les conditions de croissance du cas « ratio DCO/O₂ élevé », différentes charges organiques ont été appliquées, avec un ratio de 4gDCO/gN. L'apport en oxygène est limité par rapport aux besoins théoriques pour une élimination de la DCO et une nitrification totale.

Pour ces deux cas, différents scénarios de détachement sont testés. L'impact de la nature du détachement sur la compétition microbienne entre les bactéries autotrophes et hétérotrophes est étudié à travers l'analyse : (i) des flux et taux observés de réactions, (ii) des distributions des différentes populations et (iii) des quantités de biomasses accumulées.

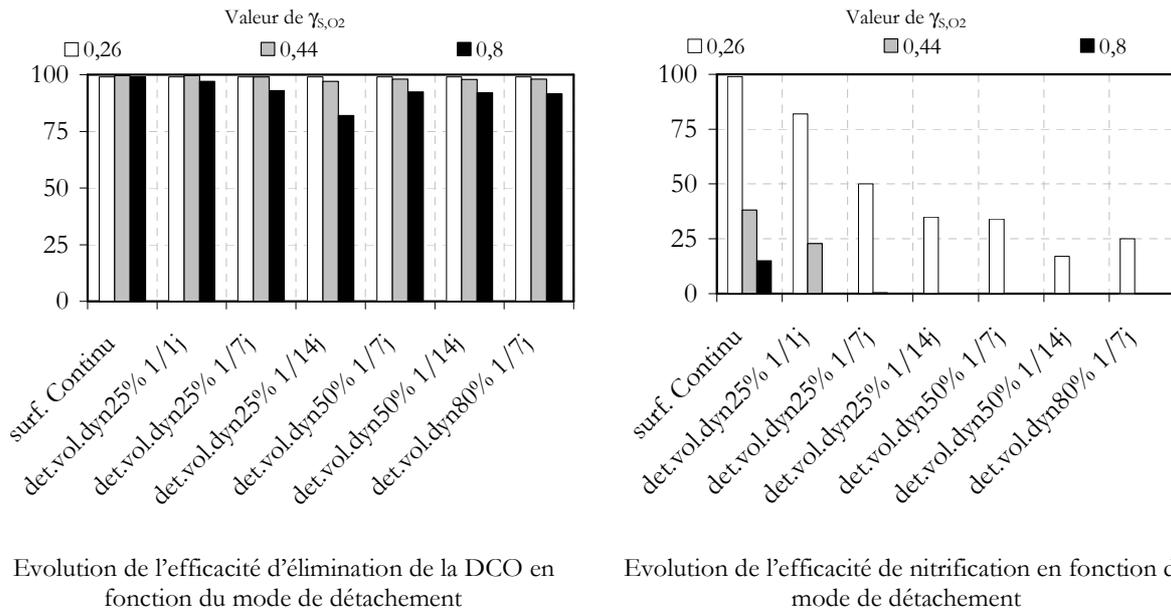
IV.4.1 Analyse des flux et des taux observés de réactions

IV.4.1.1 Cas « standard »

L'impact du mode de détachement sur les flux de DCO éliminée et d'azote nitrifié a été évalué d'après les réponses du modèle. Un rendement d'élimination de la DCO supérieur à 98% a été observé quel que soit le scénario de détachement, ce qui correspond à un flux de DCO éliminée légèrement inférieur à $2,5\text{gDCO}/\text{m}^2.\text{j}$. Un taux de nitrification supérieur à 98% a également été observé, ce qui représente un flux d'azote nitrifié d'environ $0,55\text{gN}/\text{m}^2.\text{j}$. Sous les conditions de croissance relatives au cas « standard », aucun impact du mécanisme de détachement sur les performances globales du réacteur n'est observé. Ce résultat indique que les capacités de croissance des bactéries autotrophes et hétérotrophes sont inchangées par la nature du détachement, ce qui s'explique sans doute parce que les points critiques ne sont pas atteints.

IV.4.1.2 Cas « ratio DCO/O₂ élevé »

Le Figure IV-9 présente l'évolution des taux observés de réactions en fonction de la nature du détachement et pour différentes valeurs du coefficient $\gamma_{\text{S},\text{O}_2}$. Les valeurs des coefficients $\gamma_{\text{S},\text{O}_2}$ sont calculées à partir des concentrations dans le liquide dans le cas d'un modèle de détachement surfacique continu, qui sert ainsi de référence.



Données numériques

Figure IV-9 : Récapitulatif des flux et taux observés de réactions en fonction de la nature du détachement dans le cas « ratio DCO/O₂ élevé » pour différentes valeurs du coefficient γ_{s,O_2} calculées à partir des concentrations dans le liquide dans le cas d'un modèle de détachement surfacique continu qui sert ainsi de référence.

A travers l'analyse des taux observés de réactions présentés ci-dessus, les points suivants sont rapportés :

- Quel que soit le coefficient γ_{s,O_2} , lorsqu'un détachement volumique dynamique est imposé au système biofilm, une chute de l'efficacité de nitrification est observée. Pour un coefficient γ_{s,O_2} de 0,26, l'efficacité de nitrification chute de 98% à 25% lorsque des événements de détachement sont imposés, ce qui signifie que les bactéries autotrophes restent implantées au sein du système biofilm. Pour des coefficients γ_{s,O_2} de 0,44 et de 0,8, une disparition de la nitrification est observée lorsqu'un détachement volumique dynamique est appliqué.
- Quel que soit la valeur du coefficient γ_{s,O_2} , et quel que soit le mode de détachement, les rendements d'élimination de la DCO sont très élevés. Les rendements d'élimination de la DCO sont d'autant plus faibles que la valeur du coefficient γ_{s,O_2} est proche de 1. Le rendement

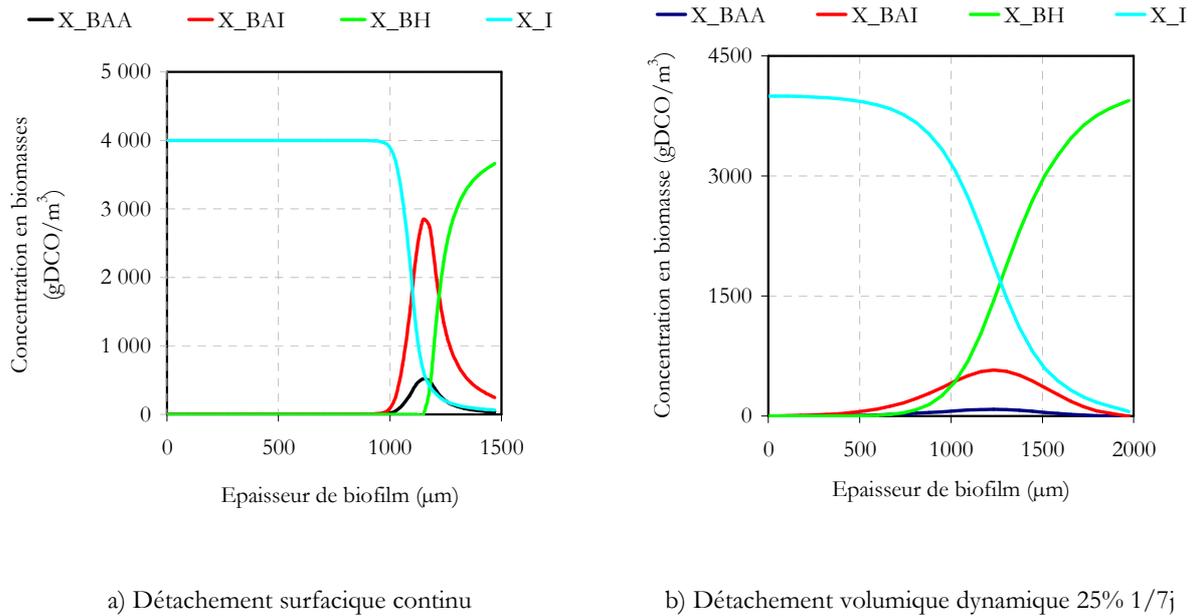
d'élimination de la DCO le plus faible est observé pour un coefficient de 0,8 et pour un détachement volumique de 25% toutes les deux semaines. En effet, ce détachement permet à la fois de conserver une quantité significative de bactéries hétérotrophes et de garantir un temps de re-croissance significative. Par conséquent, une activité exogène hétérotrophique élevée est maintenue, ce qui engendre une forte limitation en oxygène. Dans ce cas, même les bactéries hétérotrophes sont impactées, ce qui explique le faible taux d'élimination de la DCO.

IV.4.2 Analyse des distributions des populations et des épaisseurs viables de biofilm

Pour correctement identifier l'impact de la nature du détachement sur les dynamiques de populations au sein du biofilm, une analyse de la distribution des populations est nécessaire. Quelles que soient l'amplitude et la fréquence du détachement volumique dynamique, la constante de détachement k_{det} entre deux événements est la même pour l'ensemble des simulations. Par conséquent, c'est la fréquence des détachements volumiques dynamiques qui fixe l'expansion du biofilm pendant les périodes de détachement surfacique continu. Ceci implique que l'épaisseur moyenne de biofilm est variable selon le mode de détachement appliqué.

IV.4.2.1 Cas « standard »

La Figure IV-10 représente les distributions des populations en fonction de l'épaisseur de biofilm dans le cas d'un biofilm soumis à un détachement surfacique continu (Figure IV-10a) ou soumis à un détachement volumique dynamique 25% 1/7j (Figure IV-10b) dans le cas « standard ».



Données numériques

Figure IV-10 : Distribution des populations en fonction de l'épaisseur de biofilm pour un détachement surfacique continu (a) et pour un détachement volumique dynamique 25% 1/7j (b). Cas « standard ».

Pour un détachement surfacique et continu, la totalité de la biomasse viable est présente à la surface du biofilm (entre 1000µm et 1500µm d'épaisseur). Seul un tiers du biofilm est composé de biomasse viable. Sous cette couche, entre 0 et 1000µm, seule la biomasse inerte compose le biofilm. Les bactéries hétérotrophes sont présentes uniquement à la périphérie de la zone viable (entre 1100µm et 1500µm). Leur concentration est maximale à la surface du biofilm et elle diminue lorsqu'on s'éloigne de la surface. Dans cette zone, elles coexistent avec les bactéries autotrophes. Dans le cas b), la distribution des populations est plus étendue. La biomasse viable est présente entre 500µm et 2000µm d'épaisseur soit deux tiers du biofilm. La fréquence et l'amplitude du détachement favorisent par conséquent une distribution des populations à travers l'ensemble du biofilm.

L'impact du mode de détachement sur l'épaisseur viable de biofilm en fonction des différents modèles de détachement est représenté par la Figure IV-11. Remarquons que l'épaisseur viable est différente de l'épaisseur active. En effet, l'épaisseur viable est relative à la distribution des populations microbiennes uniquement. Quant à l'épaisseur active, elle est déterminée par l'épaisseur viable de biofilm où les substrats diffusent. Le mode de détachement implique donc une dynamique de l'épaisseur active, puisque ce phénomène modifie l'apport en substrats.

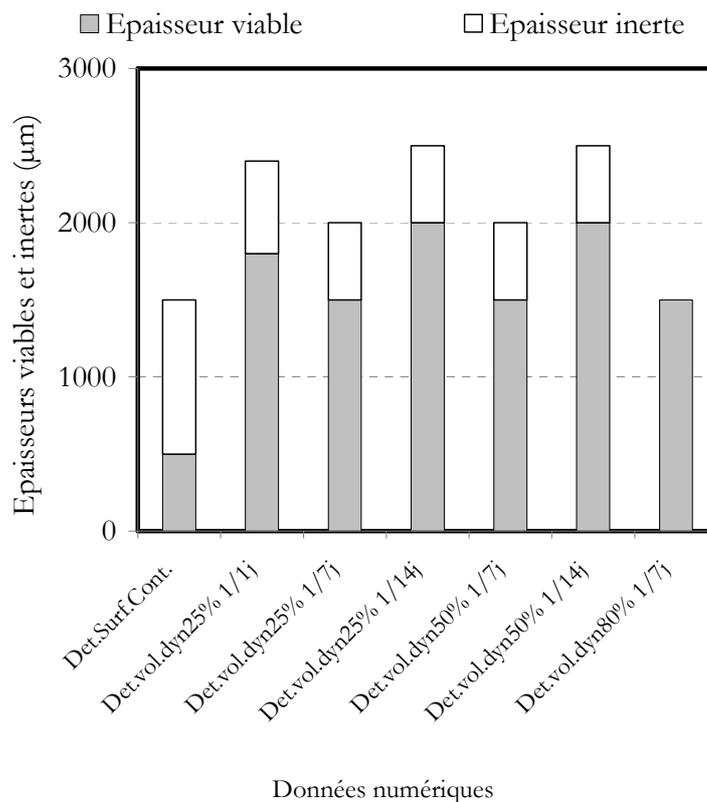


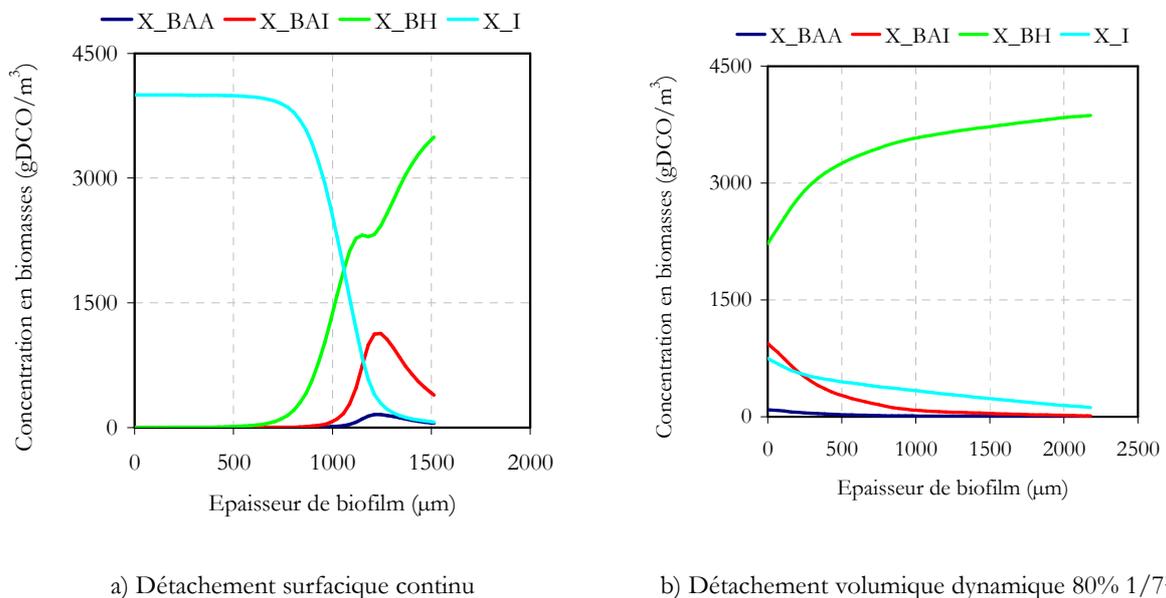
Figure IV-11 : Impact de la nature du détachement (fréquence, amplitude) sur l'épaisseur viable et inerte pour un biofilm développé sous les conditions de croissance du cas « standard ».

L'épaisseur viable est minimale (500µm) lorsque le biofilm est soumis à un détachement surfacique continu. L'épaisseur viable de biofilm est influencée principalement par la fréquence du détachement volumique dynamique. En effet, à amplitude détachée constante, une diminution de la fréquence de 1/7j à 1/14j engendre une augmentation à la fois de l'épaisseur viable et inerte. A fréquence constante, la modification de l'amplitude du détachement volumique dynamique n'a pas d'impact sur les valeurs d'épaisseurs viables et inertes.

On peut remarquer que dans le cas d'un détachement hebdomadaire de 80% de l'épaisseur de biofilm, la totalité du biofilm est composée de biomasse active.

IV.4.2.2 Cas « ratio DCO/O₂ élevé »

La Figure IV-12 représente les distributions des populations en fonction de l'épaisseur de biofilm dans le cas d'un biofilm soumis à un détachement surfacique continu (Figure IV-12a) ou soumis à un détachement dynamique volumique 80% 1/7j, dans le cas d'un coefficient γ_{s,O_2} de 0,26 (Figure IV-12b).



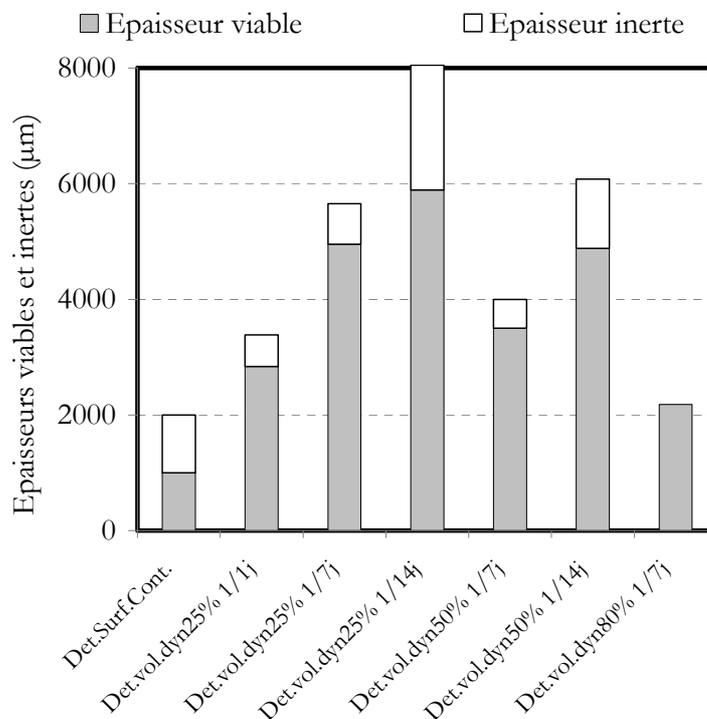
Données numériques

Figure IV-12 : Distribution des populations en fonction de l'épaisseur de biofilm pour un détachement surfacique continu (a) et pour un détachement volumique dynamique 80% 1/7j (b). Coefficient γ_{s,O_2} de 0,26.

Comme cela a été démontré par l'analyse des taux observés de réactions, dans le cas d'un détachement surfacique continu et d'un γ_{s,O_2} de 0,26, les bactéries autotrophes sont significativement implantées au sein du système biofilm, comme en témoigne la Figure IV-12a.

Dans le cas d'un détachement volumique (Figure IV-12b), en raison de la disponibilité en substrats augmentée à la base du biofilm, les bactéries autotrophes trouvent leur niche proche du support, où elles sont protégées du détachement. De même que pour le cas « standard », la nature du détachement impacte donc directement la distribution des populations. Comparé à un détachement surfacique continu, un détachement volumique dynamique favorise le maintien d'une viabilité significative dans les couches internes et basales du biofilm, malgré une épaisseur élevée de biofilm.

La Figure IV-13 illustre l'impact de la nature du détachement sur l'épaisseur viable de biofilm.



Données numériques

Figure IV-13 : Impact de la nature du détachement (fréquence, amplitude) sur l'épaisseur viable et inerte pour un biofilm développé sous les conditions de croissance du cas « ratio DCO/O₂ élevé ». Coefficient γ_{s,O_2} de 0,26.

L'impact de la nature du détachement sur l'épaisseur viable de biofilm est similaire à celui observé dans le cas « standard ».

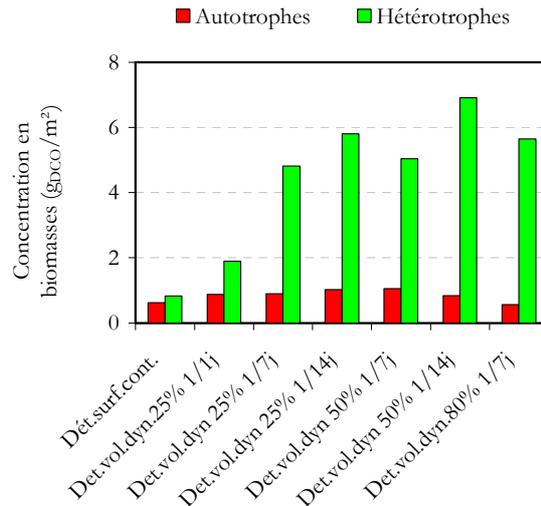
Une diminution de la fréquence entraîne une augmentation de l'épaisseur viable de biofilm. Par ailleurs, la limitation en oxygène étant plus élevée que dans le cas « standard », l'amplitude de détachement a également un impact. Ainsi, une augmentation de l'amplitude de détachement engendre une diminution de l'épaisseur du biofilm. Pour un détachement hebdomadaire de 80% de l'épaisseur de biofilm, la totalité de l'épaisseur du biofilm est viable.

IV.4.3 Analyse des quantités de biomasses autotrophes et hétérotrophes accumulées

Cette partie a pour objectif de quantifier l'impact de la nature du détachement sur les quantités de biomasses autotrophes et hétérotrophes accumulées. A ce sujet, il est important de bien définir le terme « quantité de biomasse accumulée », celui-ci se distinguant du terme « quantité de biomasse produite par la croissance ». Pour un flux de pollution éliminée identique et quel que soit la nature du détachement, la « quantité de biomasse produite par la croissance » est constante puisque proportionnelle à $[Y_{\text{obs}} \cdot (\text{flux DCO}_{\text{éliminée}})] \cdot C$. Cependant, les « quantités de biomasse accumulée » peuvent être différentes. En effet, la « quantité de biomasse accumulée » est fonction de l'équilibre entre l'augmentation de la quantité de biomasse (croissance) et de la diminution (décès et détachement).

IV.4.3.1 Cas « standard »

Si la fréquence et l'amplitude du détachement ont un impact sur la répartition des populations, ces caractéristiques ont aussi un impact significatif sur les quantités de biomasse accumulée. La Figure IV-14 présente l'impact de la nature du détachement sur les concentrations (gDCO_x/m^2) en bactéries autotrophes et hétérotrophes.



(a)

Données numériques

Figure IV-14 : Impact de la nature du détachement sur la concentration en bactéries autotrophes et hétérotrophes (a) et sur le ratio autotrophes/hétérotrophes (b) dans le cas « standard ».

D'après la Figure IV-14, la concentration en bactéries hétérotrophes augmente très significativement avec la fréquence et l'amplitude du détachement.

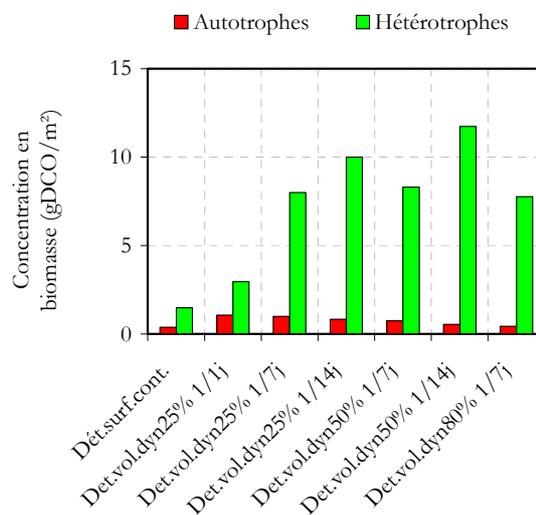
Rappelons que k_{det} est maintenue constante entre deux évènements quelles que soient leur amplitude et leur fréquence, ce qui implique que l'épaisseur de biofilm est différente pour chaque simulation. Dans le cas d'un détachement surfacique continu, la concentration en bactéries hétérotrophes est inférieure à 1gDCOx/m^2 . Dans le cas d'un détachement dynamique volumique, elle est multipliée par des facteurs compris entre 2 et 8 en fonction de l'amplitude et de la fréquence de l'évènement périodique. Les bactéries autotrophes ne sont pas affectées de la même manière par la nature du détachement puisque leur concentration reste quasiment constante. A partir d'un détachement hebdomadaire de 80% de l'épaisseur et malgré la non-limitation en oxygène, une diminution significative de la quantité de bactéries autotrophes est observée.

Dans le cas d'un détachement surfacique continu, le ratio de concentrations entre les bactéries autotrophes (X_A) et les bactéries hétérotrophes (X_{BH}) est proche de 0,75. Ce ratio diminue lorsqu'un détachement dynamique volumique est imposé.

Pour un détachement dynamique volumique à 25% $1/1j$, un ratio d'environ 50% est observé. Ce ratio continue à diminuer légèrement lorsque des détachements volumiques plus amples et plus fréquents sont imposés.

IV.4.3.2 Cas « ratio DCO/O₂ élevé »

La Figure IV-15 représente l'impact de la nature du détachement sur les quantités de biomasses accumulées dans le d'un coefficient γ_{s,O_2} de 0,26.



Données numériques

Figure IV-15 : Impact de la nature du détachement sur la concentration surfacique d'autotrophes et hétérotrophes dans le cas « ratio DCO/O₂ élevé ». Coefficient γ_{s,O_2} de 0,26.

Dans le cas d'un détachement surfacique continu et pour un coefficient γ_{s,O_2} de 0,26, une faible concentration en bactéries autotrophes est présente au sein du système biofilm. Un ratio de 0,25 est observé entre la concentration en bactéries autotrophes et la concentration en bactéries hétérotrophes. Dans le cas d'un détachement volumique dynamique journalier de 25% de l'épaisseur, ce ratio atteint 35%. La quantité de biomasse hétérotrophe accumulée est alors deux fois supérieure à celle accumulée dans le cas d'un détachement surfacique continu.

A amplitude de détachement constante, la diminution de la fréquence de détachement engendre une légère augmentation de la quantité de biomasse hétérotrophe accumulée (+10%). La même observation est réalisée lorsque l'amplitude des évènements est augmentée à fréquence constante. Dans le même temps, la quantité de biomasse autotrophe accumulée diminue régulièrement.

Pour des coefficients γ_{S,O_2} de 0,44 et 0,8, un détachement volumique dynamique entraîne une disparition des bactéries autotrophes. Par conséquent la totalité du biofilm est composée de biomasse hétérotrophe.

A travers l'analyse des masses accumulées en bactéries autotrophes et hétérotrophes, un impact significatif du mode de détachement est observé. Le mode de détachement détermine en outre, dans le cas d'un système biofilm, la distribution des temps des séjours des solides (TSS). Par conséquent, pour bien identifier comment le mode de détachement influence les dynamiques de populations et les performances épuratrices du système, une analyse des distributions des TSS_{local} est indispensable. C'est l'objet de la partie suivante.

IV.4.4 Etude de l'impact de la nature du détachement sur la distribution du TSS_{local}

L'objectif de cette partie est d'analyser l'impact de la nature du détachement sur la distribution des TSS_{local} à travers le biofilm. Une étude numérique est réalisée pour évaluer la distribution des TSS_{local} . Le but de cette étude n'est pas de quantifier précisément les valeurs des TSS_{local} . Il s'agit d'identifier des tendances selon la nature du modèle de détachement considéré.

La croissance du biofilm entraîne son expansion dans la direction opposée au support. Cette expansion du biofilm est associée à un déplacement de matières particulaires et donc à une vitesse de convection de ces composés.

La valeur du TSS dans la couche basale (couche protégée des évènements de détachement) est donc directement corrélée à la valeur de cette vitesse de convection des matières particulaires au sein du biofilm (Morgenroth et Wilderer, 2000).

A cet effet, l'étude de Morgenroth et Wilderer (2000) est particulièrement intéressante dans la mesure où elle fournit une estimation de cette vitesse de convection particulaire, pour des biofilms simulés dans des gammes de charges organiques similaires à celles appliquées dans notre étude:

Équation IV-2

$$v(z) = \frac{dz}{dt} = 0,054z$$

Avec « z » définissant la position de la biomasse dans la direction perpendiculaire au support. Le coefficient de $0,054j^{-1}$ a été estimé numériquement sous AQUASIM® (Morgenroth et Wilderer, 2000) sous des conditions de croissance, en termes de charge organique, proches de celles appliquées dans notre étude. Les capacités de croissance du biofilm étant similaire, ce coefficient a été retenu (en première approximation) pour l'estimation de l'impact de la nature du détachement sur la distribution des TSS. Dans cette première approche, nous n'avons pas pris en compte le fait d'une fréquence variable de détachement selon l'épaisseur. L'intégration entre $z(t_0)$ et $z(t_{convection})$ de l'expression précédente nous permet donc d'écrire :

Équation IV-3

$$T_{convection} = 18.Ln\left(\frac{Z_{basale}}{Z(t_0)}\right)$$

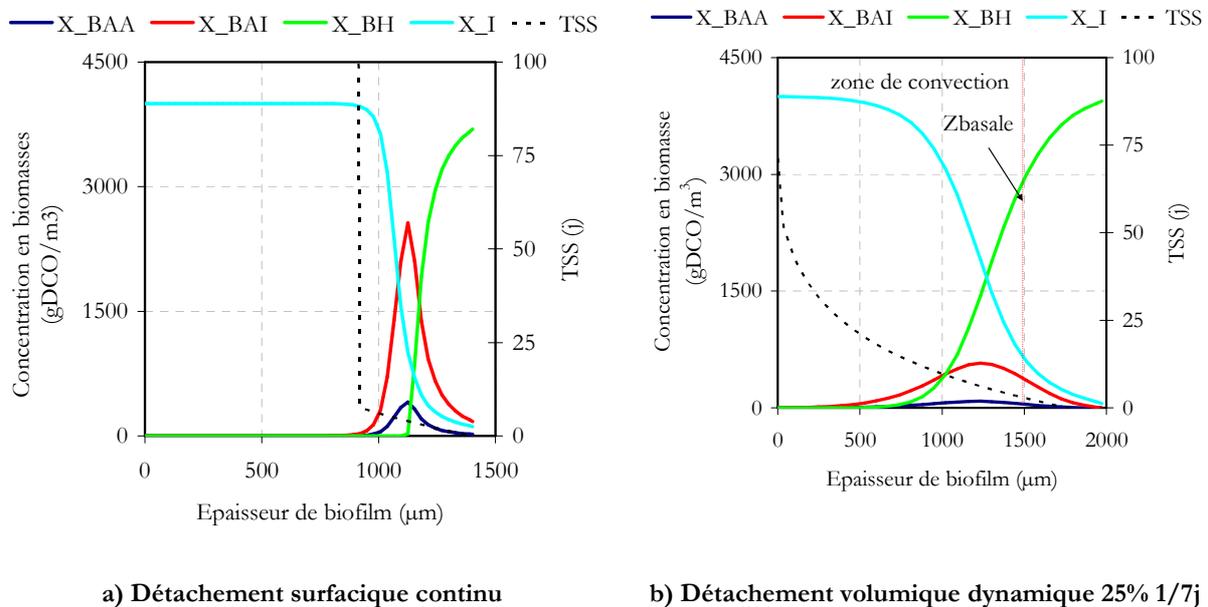
Avec Z_{basale} , l'épaisseur de la couche de biofilm non soumise au détachement volumique dynamique et $Z(t_0)$, la position initiale de la particule considérée. L'expression de TSS_{local} est donc :

Équation IV-4

$$TSS_{local}(z) = T_{convection} + 0,5T_{évènement}$$

Avec $T_{\text{évènement}}$ la période entre deux évènements.

La distribution des TSS_{locaux} en fonction de l'épaisseur de biofilm est représentée Figure IV-16 dans le cas d'un biofilm développé sous les conditions du cas « standard » et soumis à (a) un détachement surfacique continu ou (b) un détachement volumique dynamique 25% 1/7j. Elle est corrélée à la distribution des populations. Rappelons encore une fois que l'objet de cette étude est d'estimer l'impact de la nature du détachement sur la distribution des TSS_{locaux} , mais pas d'évaluer leur valeur de manière précise et rigoureuse.



Données numériques

Figure IV-16 : Distribution des TSS_{locaux} à travers un biofilm dans le cas (a) d'un détachement surfacique continu ou (b) d'un détachement volumique dynamique 25% 1/7j. Cas « standard ».

Dans le cas d'un détachement surfacique continu (Figure IV-16a), la valeur du TSS_{local} est supérieure à 10j entre 0 et 920µm. Cette zone étant composée exclusivement de biomasse inerte, la valeur très élevée du TSS_{local} dans cette zone est expliquée par une expansion nulle (vitesse de convection nulle). Entre 1000 et 1500µm, le TSS_{local} est inférieur à 10j et augmente avec la profondeur. La totalité de la biomasse active est présente dans cette zone.

Dans le cas d'un détachement volumique dynamique 25% 1/7j, la zone située sous Z_{basale} est protégée des évènements de détachement, mais du fait de la vitesse de convection, cette zone est cependant composée de biomasse active. Dans cette zone, la valeur du TSS_{local} est gouvernée par la vitesse de convection. Par conséquent, augmente au fur et à mesure que l'on se rapproche de la base du biofilm. Entre 0 et 1000 μm , le TSS_{local} est supérieur à 10j et atteint 75j à la base du biofilm. Dans la zone située entre Z_{basale} et Z_{max} , le TSS est inférieur à 3,5j ($0,5 * T_{\text{évènement}}$).

En conclusion, la nature du détachement impacte directement l'allure de la distribution des TSS locaux. Un biofilm développé dans le cas d'un détachement volumique dynamique permet d'obtenir un TSS_{local} élevé à la base du biofilm tout en maintenant une viabilité significative dans cette zone. Par ailleurs, les TSS_{globaux} sont respectivement de 1,5 et 0,5j dans le cas d'un détachement surfacique continu (Figure IV-16a) et dans le cas d'un détachement volumique dynamique (Figure IV-16b).

D'après le modèle, plus l'amplitude et la fréquence des évènements sont élevées, plus les bactéries autotrophes trouvent leur « niche » proche du support. En effet, dans cette zone, les bactéries autotrophes trouvent un équilibre entre leur élimination par le détachement et des capacités de croissance gouvernées par un apport limité en substrats. Dans le cas « standard » et toujours d'après le modèle, il est impossible d'éliminer les bactéries autotrophes tant que l'amplitude de détachement n'atteint pas 100% de l'épaisseur de biofilm. En effet, l'oxygène pénètre jusqu'à la base du biofilm quelle que soit l'activité exogène hétérotrophique en surface. Il y aura donc toujours une activité nitrifiante étant donné le TSS_{local} élevé de la base du biofilm (épargnée par le détachement). En revanche, dans le cas « ratio DCO/O₂ élevé », l'avantage accordé à la croissance des bactéries hétérotrophes engendre une disparition des bactéries autotrophes, car la totalité de l'oxygène est consommée en surface.

Un point clé concerne donc l'identification du seuil en termes de coefficient γ_{S,O_2} (calculé dans le cas de référence d'un détachement surfacique continu) à partir duquel les bactéries autotrophes sont éliminées du système biofilm. Pour un coefficient γ_{S,O_2} de 0,26, un maintien des bactéries autotrophes est prédit par le modèle. Pour un coefficient γ_{S,O_2} de 0,44, la disparition de la nitrification est prédite par le modèle. Par conséquent, selon le modèle, un coefficient γ_{S,O_2} d'environ 0,35 peut être considéré comme le seuil limite à partir duquel, la répétition de détachements volumiques entraîne une élimination de la nitrification. Cependant, une confirmation de ces prédictions numériques par une étude expérimentales est nécessaire. C'est l'objet de la partie IV.5 à suivre.

IV.4.5 Conclusion sur l'impact de la nature du détachement sur la compétition microbienne entre bactéries autotrophes et hétérotrophes

A travers l'étude numérique réalisée précédemment, les points suivants doivent être retenus concernant l'impact de la nature du détachement sur la compétition microbienne entre bactéries autotrophes et hétérotrophes :

- Il existe une valeur critique de γ_{S,O_2} , au-delà de laquelle un détachement volumique dynamique entraîne une perte de la nitrification et donc une élimination des bactéries autotrophes. Cette valeur du coefficient γ_{S,O_2} est de l'ordre de 0,35. Pour un coefficient supérieur à 0,35, le détachement volumique dynamique entraîne une perte de la nitrification et une baisse de l'efficacité d'élimination de la DCO. Pour un coefficient inférieur à 0,35, la nitrification est maintenue au sein du système.
- Quelles que soient les conditions de croissance, un détachement volumique dynamique étend la distribution des populations par rapport à un détachement surfacique continu. Cependant, l'impact de la fréquence des événements est différent de l'impact de l'amplitude des événements.
- A fréquence d'évènements constante et dans le cas « standard », l'augmentation de l'amplitude de détachement n'impacte ni la distribution des populations, ni l'épaisseur viable de biofilm, ni la quantité de biomasse accumulée. A fréquence d'évènements constante et dans le cas « ratio

DCO/O₂ élevé », l'amplitude de détachement engendre une légère diminution de l'épaisseur viable de biofilm, sans que la quantité de biomasse accumulée ne soit impactée.

- A amplitude d'évènements constante et quelles que soient les conditions de croissance, la diminution de la fréquence des évènements a un impact significatif sur la distribution des populations, l'épaisseur de biofilm et la quantité de biomasse accumulée. Ainsi, une augmentation de la période séparant deux évènements entraîne une augmentation importante la quantité de biomasse accumulée et donc de l'épaisseur de biofilm.
- Quelles que soient les conditions de croissance, un détachement volumique dynamique favorise l'accumulation des bactéries hétérotrophes. Dans le cas « standard », l'accumulation significative des bactéries hétérotrophes au sein du système biofilm n'entraîne pas une limitation en oxygène dans le biofilm. Par conséquent, les bactéries autotrophes s'implantent normalement, ce qui est notamment confirmé par la valeur du flux d'azote nitrifié. Dans le cas « ratio DCO/O₂ élevé » l'accumulation des bactéries hétérotrophes est telle que la disponibilité en oxygène au sein du biofilm diminue fortement. Par conséquent, la croissance des bactéries autotrophes est très limitée voire impossible.

Remarquons que dans le cas « standard » avec un détachement volumique dynamique, la concentration élevée en bactéries hétérotrophes peut potentiellement absorber un pic de charge organique. Suivant l'amplitude de ce pic, ceci peut se traduire par une modification du régime de croissance (passage d'un cas « standard » à un cas « ratio DCO/O₂ élevé ») et donc une limitation de la croissance des populations autotrophes.

IV.5 Etude expérimentale de l'impact de la nature du détachement sur la compétition microbienne entre bactéries autotrophes et hétérotrophes

IV.5.1 Analyse des flux et des taux observés de réaction

Une étude expérimentale a été mise en place pour confirmer l'influence du mode de détachement sur l'élimination de la population de nitrifiants du biofilm. Tout d'abord, un biofilm a été développé sous des conditions de rapport DCO/O₂ devant impliquer une légère réduction du rendement de la nitrification. Ces conditions correspondent à un flux de DCO de 25gDCO/m².j, un flux d'azote ammoniacal de 6,25gN/m².j, qui permet d'obtenir un biofilm épais. Le flux d'oxygène imposé doit être inférieur aux besoins théoriques relatifs à une élimination totale de la DCO et à une nitrification totale. Il est important de souligner qu'il est très difficile de situer, *a priori*, le seuil de limitation par l'oxygène d'un point de vue expérimental, sans doute du fait de la mauvaise connaissance des paramètres cinétiques des populations. Ce point sera discuté au *chapitre V*. Néanmoins, le système biofilm a été stabilisé à un taux de nitrification de 85%, indiquant une nitrification partielle, alors que l'élimination de la DCO était complète. Des mesures des profils de concentrations en oxygène ont également confirmé une diffusion partielle de cet accepteur final d'électron.

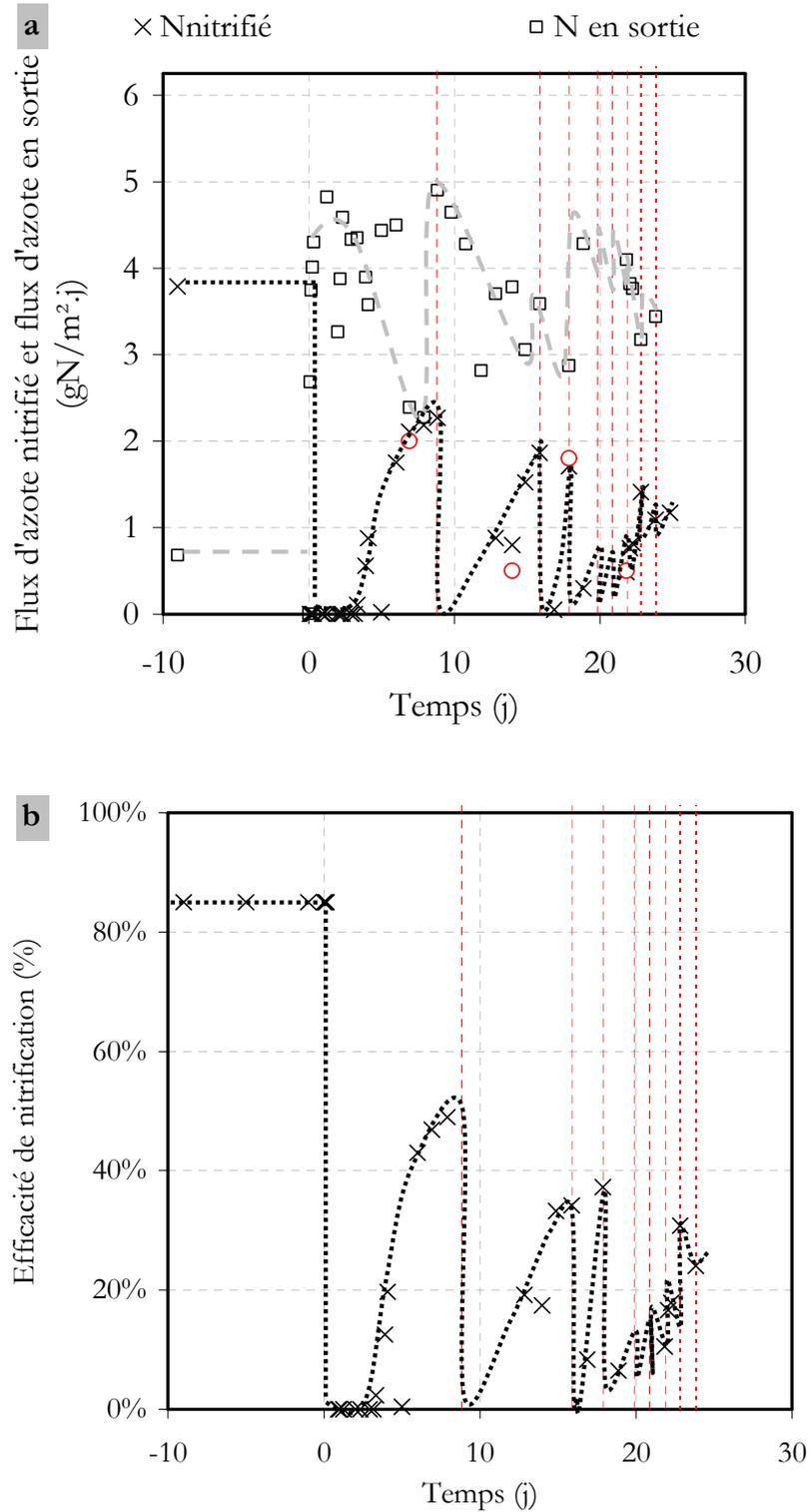
Nous avons ensuite imposé un détachement volumique en faisant varier séquentiellement le taux de cisaillement de 0,5 à 10 Pa pendant une durée de 10 minutes (rotation plus rapide du cylindre interne du CTR). La fréquence de ce détachement volumique a été augmentée progressivement pour atteindre un TSS_{global} de 1 jour. Il est important de comprendre que l'application d'un détachement séquentiel permet la re-croissance des espèces bactériennes entre deux événements. Cette capacité influe, comme nous l'avons vu dans la section IV-4, sur la compétition entre bactéries autotrophes et hétérotrophes.

Dans les conditions expérimentales testées, deux scénarii sont envisageables : (i) soit la nitrification est éliminée (ou réduite) si l'oxygène est limitant, (ii) soit le taux de nitrification est maintenu si cette limitation n'a pas lieu, le détachement volumique n'ayant dans ce dernier cas qu'une action de déplacement des biomasses nitrifiantes vers l'intérieur du biofilm.

Notons enfin que des cinétiques en réacteur fermé ont été réalisées afin de confirmer les mesures journalières du taux de nitrification obtenues à partir de bilans de matières.

Pour réaliser ces cinétiques, les entrées et sorties du réacteur sont coupées. La décroissance de la concentration en ammonium est suivie lorsque la concentration en DCO est nulle (activité exogène hétérotrophique nulle). Dans ces conditions, l'ammonium est majoritairement utilisé par la réaction de nitrification.

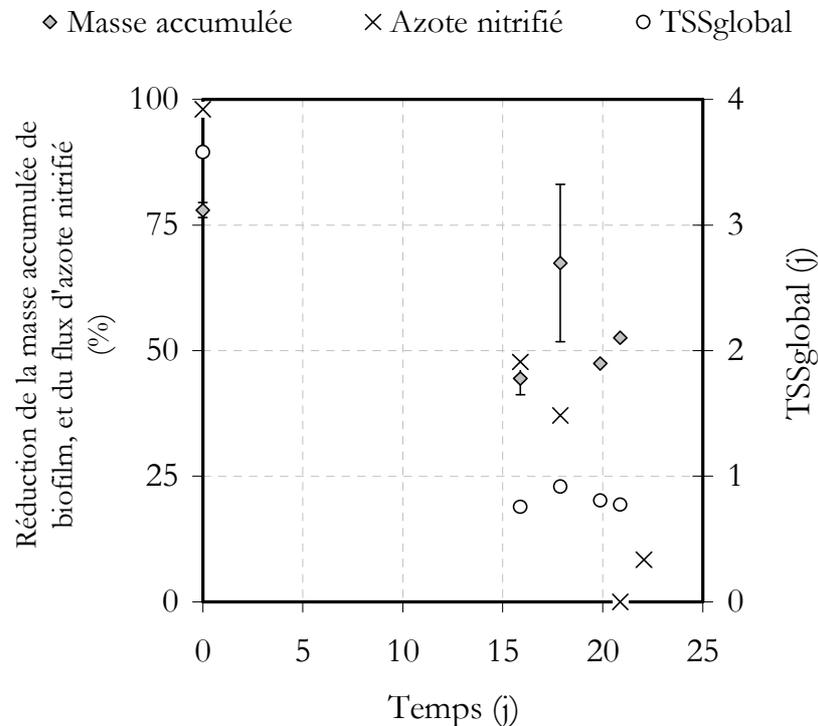
La Figure IV-17 présente : (a) les évolutions du flux de NH_4^+ en sortie du système et du flux d'azote nitrifié, et (b) l'évolution de l'efficacité de nitrification. Entre -10j et 0j, aucun événement de détachement forcé n'a été effectué ($\tau_p=0,5\text{Pa}$). A partir de 0j, les événements de détachement sont identifiés par un trait rouge pointillé sur la courbe. Les analyses réalisées en réacteur fermé à $t = 8\text{j}$, 14j, 17j et 22j sont matérialisées également (symboles ronds, vides). Nous observons que ces taux de nitrification mesurés en réacteur fermé confirment les mesures réalisées en réacteur ouvert par les bilans de matières. Les écarts mesurés sont inférieurs à 10%. Les mesures sont donc fiables. Les courbes en pointillés sont des extrapolations, ajoutées pour faciliter la lecture.



Résultats expérimentaux

Figure IV-17: Evolution : (a) du flux d'azote en sortie de réacteur et du flux d'azote nitrifié et (b) de l'efficacité de nitrification, pour un biofilm développé sous une faible limitation en oxygène et soumis à des évènements de détachements . Les courbes en pointillés sont des extrapolations.

L'évolution des fractions de biomasse détachée et de diminution du flux d'azote nitrifié lors de chaque évènement, ainsi que l'évolution du TSS_{global} , sont représentées Figure IV-18.



Données expérimentales

Figure IV-18 : Evolution des variations du flux d'azote nitrifié et de la masse accumulée de biofilm lors d'un évènement de détachement, ainsi que du TSS global.

A travers l'analyse de cette Figure IV-17 et IV-18, les points suivant sont retenus :

- A $t=0j$, un premier évènement de détachement est imposé et entraîne le détachement de 80% du biofilm, confirmant ainsi la présence d'une couche basale très cohésive correspondant à 20% en masse du biofilm (Coufort *et al.*, 2007 ; Derlon *et al.*, 2008). Seule une couche de biofilm, d'épaisseur inférieure à $500\mu m$, est maintenue sur les plaques. La masse résiduelle de biofilm après détachement est d'environ $2,4gMES/m^2$. Le TSS_{global} chute de 4j à 0,88j (Figure IV-18).
- Le détachement volumique de biomasse entraîne une chute élevée du flux d'azote nitrifié et une augmentation correspondante du flux d'azote en sortie. Le rendement de nitrification est proche de 0. Après 4j, le flux d'azote nitrifié augmente traduisant une reprise de la nitrification. La

récupération de la nitrification est rapide et traduit une croissance de bactéries nitrifiantes. Ainsi la couche basale contient des micro-organismes nitrifiants mais en très faible concentration.

- A $t=9j$, un évènement de détachement est de nouveau imposé. Il entraîne une diminution de la masse accumulée de biofilm de $3,3\text{gMES}/\text{m}^2$ à $1,5\text{gMES}/\text{m}^2$ (perte de 55% de la masse initiale, Figure IV-18). Le $\text{TSS}_{\text{global}}$ est de $0,75j$. Dans un premier temps, le flux d'azote chute mais une activité résiduelle significative demeure cette fois-ci. Le rendement de nitrification augmente par la suite et atteint 38% à 16 j.
- A partir de 16j, des évènements sont imposés tous les 2j et entraînent un détachement jusqu'à la couche basale (perte de 50% de la masse de biofilm, Figure IV-18). Le $\text{TSS}_{\text{global}}$ est d'environ $0,9j$. Le rendement de nitrification chute après les premiers évènements d'érosion volumique mais petit à petit, il augmente. Il est clair que la nitrification peut se maintenir sous ces conditions.

Ainsi, la fraction de nitrification perdue lors d'un détachement (Figure IV-18) diminue linéairement au fur et à mesure que les évènements sont imposés. Après 20j, la perte de nitrification est nulle ce qui indique que les évènements réalisés n'entraînent pas d'élimination significative des bactéries autotrophes. A cette période, l'analyse des flux indique en effet une augmentation du flux d'azote.

La perte de biomasse est très importante lors du premier évènement de détachement (80% de la masse initiale). A partir de 15j, la fraction de biomasse éliminée lors d'un évènement se stabilise à environ 50%. Ce résultat semble indiquer une augmentation de la cohésion du biofilm lorsqu'il est soumis à des stress hydrauliques répétés.

IV.5.2 Conclusion

L'expérience réalisée avait pour objectif d'éprouver certains résultats de simulation, à savoir l'impact d'un détachement volumique sur les capacités de nitrification, si possible, pour une condition de légère limitation en oxygène (biofilm épais partiellement pénétré par l'oxygène). Une réduction du temps de séjour pour les solides et, en particulier, pour les bactéries nitrifiantes était recherchée.

Le détachement volumique a été maîtrisé en imposant séquentiellement, sur des temps très courts, une contrainte de cisaillement élevée entraînant une érosion profonde jusqu'à la couche basale.

Lors de cette expérience, nous avons constaté que, malgré un ratio DCO/O₂ élevé (au regard des prédictions du modèle), il n'apparaît pas de limitation évidente et forte par l'oxygène (observation non conforme aux résultats de simulation). Néanmoins, nous avons pu confirmer que pour un biofilm non pénétré totalement par l'oxygène, un détachement profond engendre une perte momentanée des capacités de nitrification. La capacité de nitrification est pourtant récupérée du fait de la croissance cellulaire en quelques jours. Au démarrage du système, six semaines avaient été nécessaires pour stabiliser le système à un taux de nitrification d'environ 85%. L'impact des séquences de détachement sur cette capacité est de moins en moins fort. La diminution du TSS_{global} à des valeurs critiques pour la nitrification (TSS_{global}<1j) n'engendre pas l'élimination des bactéries autotrophes. Ce résultat peut être expliqué par une croissance des bactéries autotrophes dans la couche basale, très cohésive, dont le temps de séjour est beaucoup plus élevé.

Nous n'avons pas pu pour des raisons de fermeture du bâtiment, poursuivre l'expérience aussi longtemps que désiré. L'extrapolation de l'évolution du taux de nitrification sur la suite de l'expérience est délicate. Néanmoins, deux évolutions sont possibles.

- La première, le taux de nitrification tendrait vers sa valeur maximale (rendement de nitrification de 100%). Dans ce cas, nous pouvons conclure que nous sommes bien dans un régime de croissance non limitée en oxygène. En conséquence, l'élimination complète de la DCO et la nitrification totale sont logiques. Ce cas est en accord avec les simulations du « cas standard ». La nitrification s'implante dans les couches basales et le détachement volumique, même s'il engendre une diminution du TSS_{local} pour les bactéries nitrifiantes, n'induit pas une diminution suffisante pour entraîner l'élimination de ces bactéries autotrophes. La cohésion forte de la couche basale du biofilm garantit la possibilité du maintien des bactéries autotrophes même lors de l'application de contraintes de cisaillement aussi élevée que 10Pa.

- La deuxième évolution possible correspond à une stabilisation du taux de nitrification à une valeur d'environ 50%. Dans ce cas, le détachement volumique induirait la diminution significative du TSS_{local} engendrant une diminution de la concentration en bactéries nitrifiantes dans le biofilm. De nouveau ce résultat serait en accord avec les simulations mais cette fois ci du cas « ratio DCO/O₂ élevé ». On constate ici l'importance de bien estimer les capacités de pénétration de l'oxygène dans le biofilm ainsi que les constantes de Monod pour l'oxygène (K_{O_2}) des différentes populations.
- Expérimentalement, la répétition d'évènements de détachement n'entraîne pas d'augmentation significative de l'épaisseur du biofilm, comme cela est prédit par le modèle. C'est un point important dans la mesure où d'après le modèle, cette augmentation de l'épaisseur due à la croissance entraîne une forte limitation en oxygène dans le biofilm et donc la disparition des bactéries autotrophes.

IV.6 Conclusions

Ce chapitre avait pour objectifs (i) d'identifier la nature du détachement des biofilms ainsi que ses caractéristiques (continu/dynamique, fréquence, amplitude, etc.) (ii) d'intégrer l'ensemble de ces résultats expérimentaux afin d'appliquer un détachement surfacique continu couplé à des évènements volumiques dynamiques (iii) de déterminer, à l'aide de ce nouveau modèle, l'impact de la nature du détachement sur la compétition microbienne entre bactéries autotrophes et hétérotrophes (iv) de confirmer ces résultats numériques par des observations expérimentales, notamment en diminuant le TSS_{global} d'un système biofilm grâce à la répétition d'évènements de détachement maîtrisés et programmés.

D'après les résultats numériques et expérimentaux présentés dans ce chapitre, les conclusions générales de cette étude sont les suivantes :

- Par l'analyse de la morphologie des particules détachées et la distribution des rugosités de surface des biofilms, il est apparu que l'érosion de surface engendrait le détachement de nombreuses petites particules (taille de la cellule ou de petits agrégats cellulaires) mais que de plus ou moins grosses particules étaient également éliminées. En supposant que ces particules soient sphériques, le détachement concerne donc aussi les couches profondes du biofilm. Il apparaît également que la fréquence de détachement diminue avec la profondeur ce qui confirme des résultats précédents montrant une stratification de la cohésion avec la profondeur.
- Le mode de détachement par érosion a donc pu être précisé. Il s'agit d'un phénomène surfacique continu engendrant le détachement de petites particules, couplé avec des événements dynamiques engendrant le détachement volumique de larges particules. Par conséquent, la croissance de biofilm a été simulée dans le cas d'un détachement surfacique continu couplé à des événements volumiques dynamiques.
- D'après l'étude numérique, le mode de détachement influence significativement les masses et les distributions des bactéries autotrophes et des bactéries hétérotrophes accumulées. Dans le cas d'un détachement volumique dynamique, l'accumulation des autotrophes est limitée alors que celle des hétérotrophes est favorisée. Dans le cas « standard », le ratio X_A/X_H diminue donc par rapport à celui observé dans le cas d'un détachement surfacique continu mais l'accessibilité des bactéries nitrifiantes aux substrats est favorisée d'où une élimination totale des substrats. Dans le cas « DCO/O₂ élevé », l'avantage des bactéries hétérotrophes entraîne l'élimination des bactéries autotrophes, lorsque le détachement est volumique dynamique.
- D'après les réponses du modèle et quel que soit le cas considéré, l'épaisseur viable des biofilms augmente avec la fréquence et l'amplitude du processus de détachement, d'où une répartition plus homogène des biomasses. Dans le cas d'un détachement surfacique continu, la totalité de la biomasse est concentrée à la surface du biofilm.
- D'après les résultats expérimentaux réalisés dans le cas d'une faible limitation en oxygène (biofilm épais partiellement pénétré en oxygène, nitrification partielle), une diminution du TSS_{global} par l'intermédiaire d'événements de détachement ne permet pas d'éliminer la nitrification. Un

maintien des bactéries autotrophes au sein d'une couche basale est observé, malgré un TSS_{global} inférieur à $1j$.

IV.7 Discussion

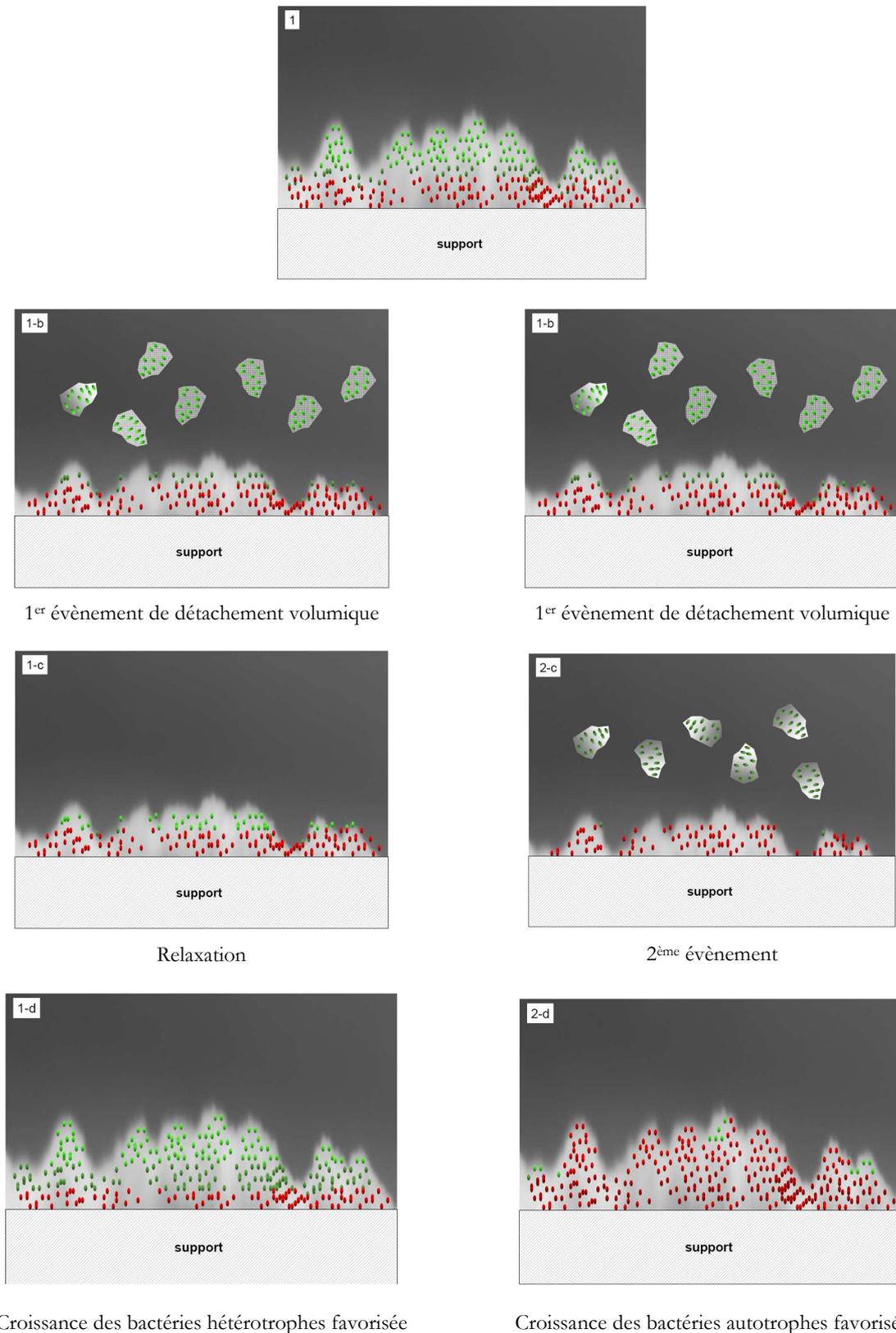
Le détachement est un phénomène déterminant pour l'étude des biofilms puisqu'il influence directement les dynamiques de populations et les performances globales des réacteurs (Morgenroth et Wilderer, 2000). Différents modes de détachement ont été identifiés d'après la littérature. Il s'agit principalement de l'érosion et du sloughing. Leurs définitions respectives demeurent cependant arbitraires puisqu'elles sont principalement liées aux dimensions des particules détachées (Stewart, 2003). Ce manque de connaissances concernant les mécanismes de détachement se reflète directement dans l'écriture des modèles. Ceux-ci considèrent généralement un taux de détachement constant (Wanner and Gujer, 1984 ; Trulear et Characklis, 1982; Bryers, 1984) ou dans certains cas une absence de détachement (Fruehn *et al.*, 1991)

Lorsqu'un évènement de détachement se produit, trois cas peuvent être envisagés : (i) soit la quantité de biomasse résiduelle est faible après détachement, et une chute des flux est alors observée, (ii) soit la quantité de biomasse résiduelle après détachement est significative, et aucun impact sur les flux n'est observé, (iii) soit l'évènement détache spécifiquement l'une des populations, et seuls les flux de matières relatifs à l'activité de cette population sont impactés. Prédire l'impact d'un évènement sur les dynamiques de population et sur les performances du système nécessite par conséquent d'évaluer la quantité de biomasse résiduelle. Une prédiction rigoureuse de la stratification est donc demandée.

Par ailleurs, lorsque la limitation en oxygène est augmentée, la capacité de croissance des bactéries autotrophes est fixée par la disponibilité de l'oxygène dans les couches internes du biofilm. Cette disponibilité est elle-même gouvernée par l'activité des bactéries hétérotrophes, qui se développent à la surface du biofilm.

Une surestimation de l'accumulation des bactéries hétérotrophes à la surface du biofilm engendre une sous-estimation de la disponibilité en oxygène dans la zone interne. Indirectement, les capacités de coexistence entre les bactéries autotrophes et hétérotrophes sont diminuées, ce qui fausse la prédiction des performances du système. Ce second exemple témoigne de nouveau de l'importance d'une prédiction rigoureuse de la stratification des populations.

La figure IV-19 schématise l'impact de la fréquence de détachement sur la compétition entre bactéries autotrophes et hétérotrophes. Initialement, la surface du biofilm, où l'apport en substrat est élevé, est dominée par les bactéries hétérotrophes, alors que les bactéries autotrophes se développent plus en profondeur, où elles sont protégées du détachement (Figure IV-19-1).



Croissance des bactéries hétérotrophes favorisée

Croissance des bactéries autotrophes favorisée

Figure IV-19 : Schéma de l'impact de la fréquence séparant deux événements de détachement volumiques sur la compétition microbienne entre bactéries autotrophes (représentées en rouge) et hétérotrophes (représentées en vert).

Lorsqu'un évènement volumique se produit, les bactéries situées à la surface du biofilm sont détachées. L'apport en substrat pour la biomasse autotrophe est favorisé en raison du détachement significatif des bactéries hétérotrophes présentes dans cette zone (Figure IV-19-1b). Entre deux évènements, l'expansion du biofilm, si elle n'est pas contrôlée, a un effet négatif sur la disponibilité en oxygène dans les zones internes du biofilm (Figure IV-19-1c). Les bactéries hétérotrophes, en raison de leurs cinétiques de croissance élevées, se redéveloppent significativement et dominent de nouveau la surface du biofilm (Figure IV-19-1d).

Cet impact de la fréquence de détachement volumique contrebalance l'effet positif d'un évènement volumique. En effet, si la fréquence des évènements est élevée, les bactéries hétérotrophes présentes à la surface sont de nouveau détachées avant qu'elles ne puissent dominer cette zone du biofilm (Figure IV-19-2c). Dans ces conditions, c'est la croissance autotrophique qui est favorisée et les bactéries autotrophes dominent le biofilm (Figure IV-19-2d). L'expansion du biofilm a un effet d'autant plus négatif que le degré de limitation en oxygène est élevé.

Par ailleurs, malgré une disponibilité en substrats augmentée par un détachement volumique dynamique, le maintien des bactéries autotrophes n'est possible que si un TSS minimum est atteint. Les valeurs de TSS_{global} , inférieures à $4j$ en régime stationnaire, et inférieures à $1j$ lorsque des évènements sont imposés, ne permettent pas d'expliquer le maintien des bactéries autotrophes lors d'évènements volumiques répétés. Le TSS_{global} n'est donc pas un paramètre judicieux pour la compréhension des mécanismes gouvernant la compétition microbienne dans le cas d'un système biofilm. Pour expliquer les dynamiques de populations, les distributions des TSS_{locaux} doivent être évaluées. Le mode de détachement impacte cette distribution. Dans le cas d'un détachement volumique dynamique, la couche basale est caractérisée à la fois par une viabilité significative et par un TSS_{local} élevé. Ce résultat permet d'expliquer le maintien de la nitrification observé expérimentalement lors d'évènements volumiques répétés.

Dans son étude et d'après les données expérimentales, Elenter *et al.* (2007) a également observé un maintien du flux d'azote nitrifié lorsqu'un évènement volumique est imposé après 210j au système biofilm limité en oxygène (Figure IV-20).

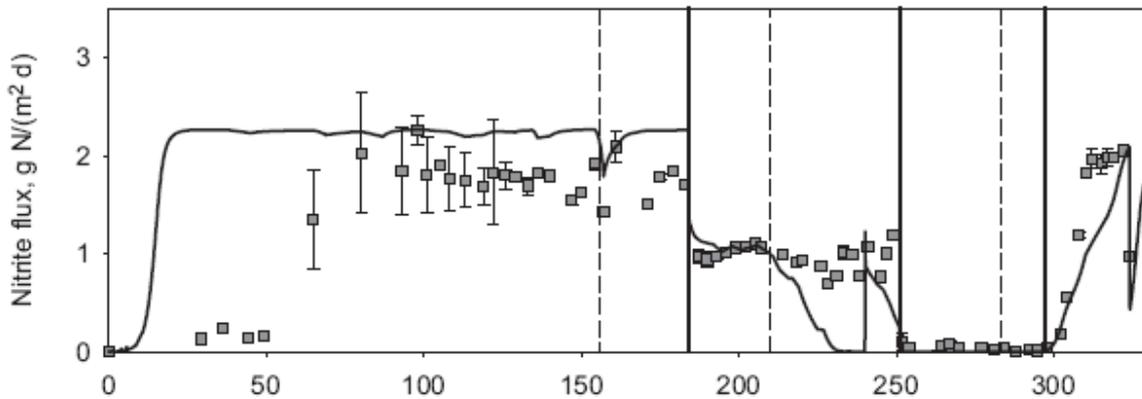


Figure IV-20 : Evolution du flux de nitrites produits d'après les données expérimentales et de simulations (trait plein), selon Elenter *et al.* (2007).

L'impact de ce phénomène est surestimé par le modèle, qui représente une chute du flux d'azote nitrifié (trait plein).

Dans notre cas, il est également intéressant de noter que les répétitions des évènements de détachement ont entraîné une augmentation de la densité de cette couche basale. Après le premier évènement, la concentration surfacique en biofilm était de l'ordre de 2,5gMVS/m². A la fin de la période de caractérisation, cette concentration atteignait 3,3gMVS/m². Cette augmentation peut être due à la fois à une consolidation du biofilm ou à une densification en biomasse de la couche basale. Pour un TSS_{global} inférieur à 1j, une augmentation du flux d'azote nitrifié a été observée ce qui confirme l'augmentation de l'accumulation en bactéries autotrophes au sein le biofilm.

En conclusion, c'est l'existence d'une couche basale de très forte cohésion qui permet aux biomasses autotrophes et hétérotrophes de se maintenir dans le système biofilm quel que soit le TSS_{global}. En effet, le caractère cohésif de la couche basale implique un TSS_{local} très élevé.

Remarquons que d'après le modèle, pour une charge organique de 25gDCO/m².j et une concentration en oxygène élevé dans le liquide (> à 8mgO₂/L), les bactéries autotrophes sont absentes du système biofilm. Pourtant, dans les mêmes conditions, une nitrification partielle mais significative a été observée. Par conséquent, une étude poussée de l'impact du ratio DCO/O₂ sur la compétition entre bactéries autotrophes et hétérotrophes est nécessaire. L'étude du cas « ratio DCO/O₂ » est présentée au chapitre suivant. Par ailleurs, ces deux groupes bactériens étant également en compétition pour l'azote, la compétition pour ce substrat sera également analysée (cas « ratio DCO/N élevé »).

Chapitre V : Influence des ratios
DCO/N et DCO/O₂ sur la compétition
entre bactéries autotrophes et
hétérotrophes

V.1 Introduction et objectifs du chapitre

Comme cela a été présenté dans le *chapitre I* puis confirmé dans le *chapitre IV*, la compétition microbienne entre bactéries hétérotrophes et autotrophes dépend entre autres des conditions de croissance du biofilm (charge surfacique, ratio DCO/N, ratio DCO/O₂...). Au *chapitre IV* et dans le cas d'une compétition pour l'oxygène, nous avons remarqué que les prédictions du modèle semblaient différer des observations expérimentales. D'après la littérature, peu d'études fournissent une analyse quantifiée, basée sur des données expérimentales, des facteurs déterminant le résultat de cette compétition pour l'oxygène. De plus, le lien qui existe entre les conditions de croissance des populations et la structure physique des biofilms ainsi que la structure des populations fonctionnelles ne sont pas établis (Okabe *et al.*, 1995; Elenter *et al.*, 2007; Ohashi *et al.*, 1995). Par conséquent, une analyse poussée de la compétition microbienne entre les bactéries autotrophes et hétérotrophes dans le cas d'un « ratio DCO/O₂ élevé » est nécessaire. Par ailleurs, ces deux populations étant en compétition également pour l'azote, le cas d'un « ratio DCO/N élevé » sera également abordé.

Le premier objectif de ce travail est donc d'identifier dans quelle gamme de ratios DCO/N ou DCO/O₂ les populations autotrophes et hétérotrophes coexistent, et au delà de quelle valeur une seule population est présente. Il s'agit donc d'identifier des seuils critiques permettant la coexistence de ces deux groupes de bactéries.

Nous chercherons par conséquent à développer deux types de biofilms caractérisés par des fonctionnalités différentes : un Biofilm Mixte Autotrophe-Hétérotrophe (BMAH) qui réalise simultanément l'élimination de la pollution carbonée et azotée (biofilm bi fonctionnel), et un Biofilm Hétérotrophe (BH) qui réalise uniquement l'élimination de la pollution carbonée (biofilm mono fonctionnel). Les différents ratios DCO/N pour développer ces biofilms seront recherchés

expérimentalement. Ensuite, les biofilms seront développés sous différents ratios DCO/O₂ afin d'appréhender l'effet d'une limitation par l'oxygène.

La caractérisation des fonctionnalités est basée sur l'analyse des taux observés de réaction (rendement de nitrification, de dénitrification, d'élimination de la pollution carbonée et rendement de conversion). Les résultats expérimentaux seront comme précédemment, confrontés et discutés par rapport aux prédictions du modèle. A la fois les réponses du modèle dans le cas d'un détachement surfacique continu et dans le cas d'un détachement volumique dynamique seront considérées.

Cependant, les résultats relatifs au cas d'un détachement volumique dynamique, plus en accord avec la caractérisation expérimental du détachement, n'est abordé que dans la discussion. Pour commencer, l'identification de la gamme de ratios DCO/N ou DCO/O₂ à tester est nécessaire. C'est l'objet de la partie qui suit.

V.2 Identification des limitations en azote et en oxygène à imposer

La double limitation de la croissance, par l'azote et l'oxygène, pour les deux populations microbiennes hétérotrophes et autotrophes constitue un sujet d'étude toujours d'actualité. En effet, une lecture attentive de la littérature traitant de ce sujet indique que les connaissances demeurent vagues, et la validation expérimentale en conditions contrôlées et caractérisées peu fréquente (Okabe *et al.*, 1995; Elenter *et al.*, 2007; Ohashi *et al.*, 1995).

En premier lieu, le choix de la plage de variation des ratios DCO/N et DCO/O₂ apparaît crucial. On pourrait penser que ce choix puisse néanmoins se baser sur des calculs théoriques. En effet, en première approximation, dans le cas d'un BMAH, l'azote apporté au système doit être, *a priori*, en excès par rapport aux besoins de la croissance cellulaire nette, notamment des bactéries hétérotrophes.

A l'inverse, dans le cas du BH, l'azote doit être juste équivalent à ces besoins pour limiter la croissance des bactéries autotrophes nitrifiantes. Pour un système à boue activée, les besoins en azote pour la croissance dépendent de la valeur du rendement observé de croissance (Y_{SXobs}) qui dépend lui du ratio entre le taux spécifique de croissance et le taux de décès et donc le TSS_{global} .

Équation V-1

$$Y_{SXobs} = \frac{Y_{SX}}{1 + \frac{k_d}{\mu_{obs}}}$$

Dans le cas d'un système biofilm, le calcul de la valeur de Y_{SXobs} est délicat. Ainsi, par analogie avec un système à boues activées, la valeur de Y_{SXobs} a été encadrée. La Figure V-1 présente l'évolution de la part d'azote assimilée en fonction du ratio DCO/N pour différentes valeurs de taux observés de croissance (a), ou pour différents besoins en azote pour la synthèse cellulaire (b).

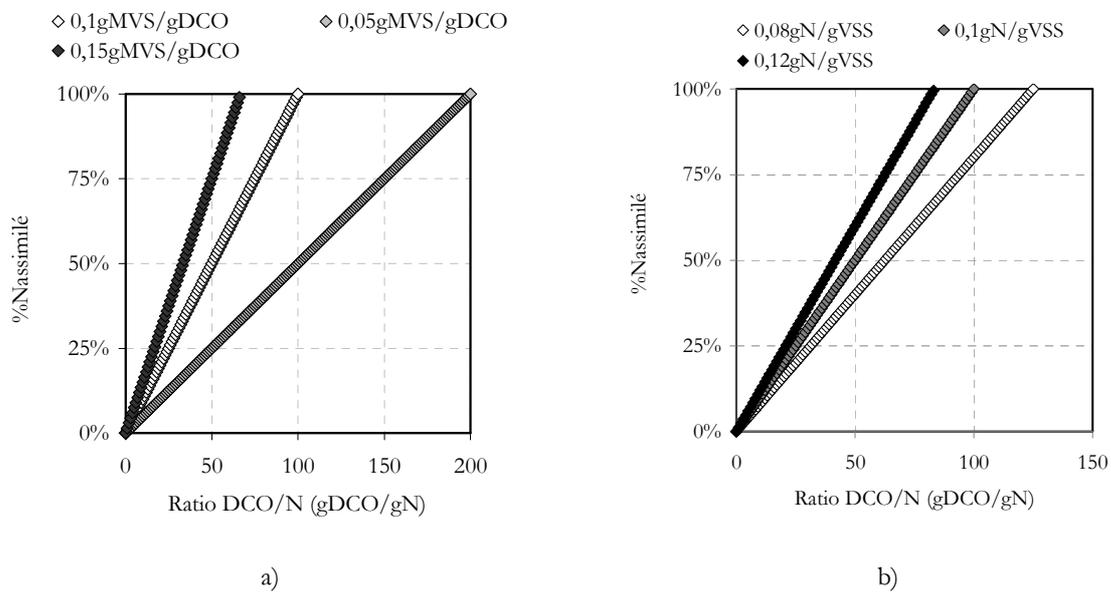


Figure V-1 : Pourcentage de $N_{assimilé}$ en fonction du ratio DCO/N de l'alimentation (a) pour différentes valeurs de rendements observés de croissance dans le cas d'une concentration en azote dans les boues de 10% et (b) pour différentes concentrations en azote dans les boues dans le cas d'un taux observé de croissance de 0,1gMVS/gDCO.

Pour que l'ensemble de l'azote apporté au système soit utilisé uniquement pour la croissance cellulaire, il est nécessaire d'imposer des ratios DCO/N de 66, 100 et 200gDCO/gN pour Y_{SXobs} respectivement de 0,15, 0,1 et 0,05gMVS/gDCO. Ce résultat confirme potentiellement le développement de BMAH pour des ratios DCO/N inférieurs à 5gDCO/gN (Okabe *et al.*, 1995; Elenter *et al.*, 2007; Ohashi *et al.*, 1995). Les informations sur les valeurs de Y_{SXobs} dans le cas d'un système biofilm sont inexistantes. Rappelons que pour des $TSS_{globaux}$ de l'ordre de 10-20 jours, en systèmes à boues activées, des valeurs de l'ordre de 0,1-0,15 gMVS/gDCO sont citées pour une alimentation en effluent synthétique tel que celui utilisé dans cette étude. Un point essentiel est donc souligné par ces calculs. Pour bien estimer le seuil de ratio DCO/N à partir duquel il sera théoriquement possible de développer un BH, il est primordial d'estimer de façon précise la production de boue. Tout au long de cette étude, une attention particulière a donc été portée au calcul de ce paramètre. La démarche expérimentale suivante a été mise en place (Figure V-2) pour l'étude de la compétition microbienne sous des conditions de limitation en substrat organique (excès d'oxygène).

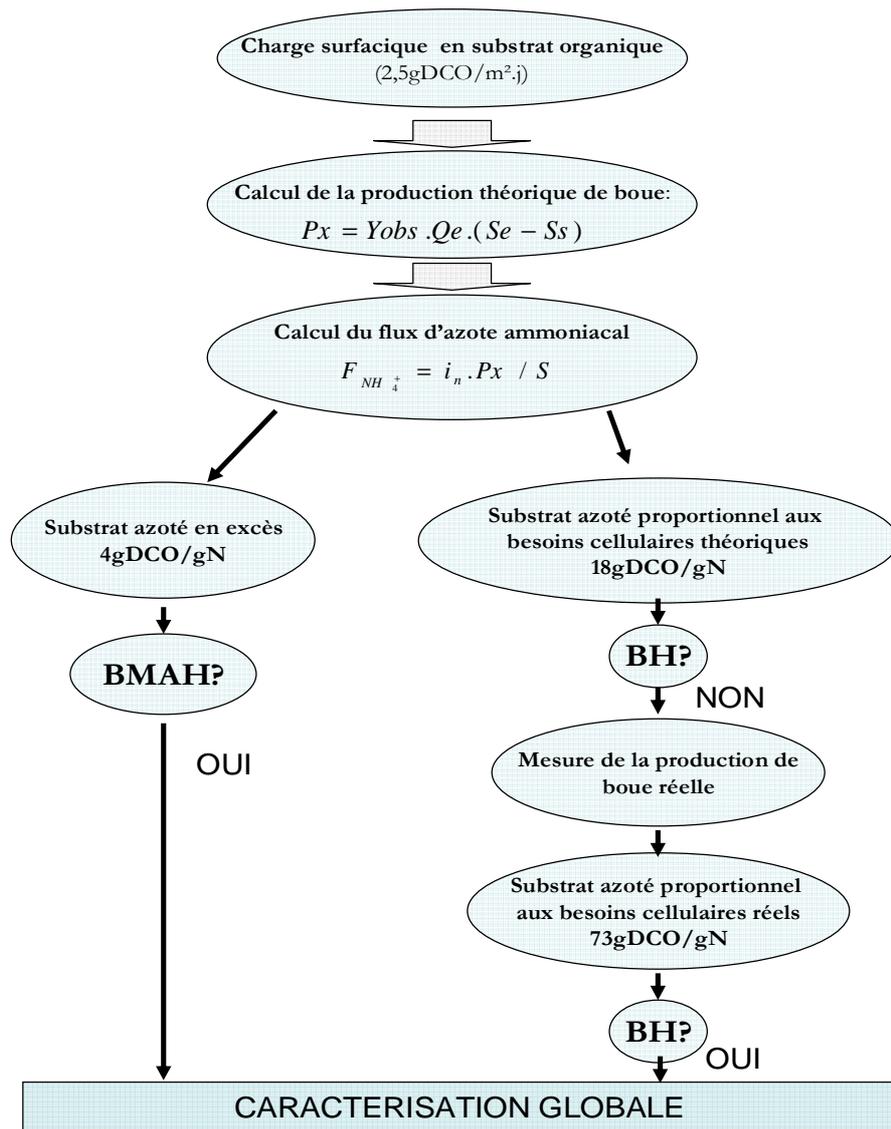


Figure V-2 : Démarche expérimentale appliquée pour le développement d'un BMAH et d'un BH sous des conditions de limitation en substrat organique.

Le régime de croissance (nature de la limitation) des bactéries hétérotrophes peut être prédit par le calcul du coefficient γ_{S,O_2} qui fournit la détermination du régime de limitation dominant (voir *chapitre I*). Ces coefficients γ_{S,O_2} sont respectivement de 0,44, 0,1 et 0,9 pour des ratios DCO/N de 4, 18 et 73gDCO/gN utilisés dans cette étude (cas « DCO/N élevé »). Cette dernière valeur, proche de 1, indique théoriquement que les bactéries hétérotrophes se développeraieent sous un régime de limitation en substrat organique et en oxygène. Ces trois conditions d'environnements de croissance sont résumées dans le tableau V-1, cas 1, 2 et 3.

Dans une deuxième partie de cette étude, l'implantation de la nitrification sous des conditions de limitation en oxygène a été étudiée. Il s'agit donc du cas « ratio DCO/O₂ élevé ». La charge organique appliquée était de 25gDCO/m².j et le ratio DCO/N de 4gDCO/gN.

Des concentrations en oxygène différentes dans le liquide ont été appliquées : 6-7mgO₂/L (cas 4 du tableau V-1) et 1-2mgO₂/L (cas 5 du tableau V-1). Les coefficients γ_{S,O_2} calculés par rapport aux concentrations mesurées expérimentalement dans le liquide sont respectivement de 3 et 50. Ces valeurs nous indiquent que les bactéries hétérotrophes se développent *a priori* sous un régime de limitation en oxygène. Ce régime devrait être défavorable à la croissance des bactéries autotrophes.

Le Tableau V-1 récapitule les cinq environnements testés pour la croissance des biofilms, et l'analyse de l'influence des ratios DCO/N et DCO/O₂ sur les fonctionnalités du biofilm.

Tableau V-1 : Récapitulatif des différentes conditions opératoires testées pour la croissance des biofilms dans les cas « ratio DCO/N élevé » et « ratio DCO/O₂ élevé ».

Cas	N° du cas	Régime de croissance des bactéries hétérotrophes ¹	Valeur du coefficient γ_{S,O_2}	Charge surfacique ² (gDCO/m ² .j)	Ratio DCO/N (gDCO/gN)	Concentration en oxygène dans le liquide (mgO ₂ /L)	Contrainte de cisaillement (Pa)
Cas « standard »	1	Limité en substrats DCO	0,44	2,5	4	A saturation	0,5
	2	Limité en substrats DCO	0,1	2,5	18	A saturation	0,5
Cas « ratio DCO/N élevé »	3	Limité en substrats DCO	0,9	2,5	73	A saturation	0,5

Cas « ratio DCO/O ₂ élevé »	4	Limité en oxygène	3	25	4	6-7	0,5
	5	Limité en oxygène	50	25	4	1-2	0,5

¹ Ce coefficient est calculé sans tenir compte de la consommation d'oxygène par la nitrification

² La charge surfacique en DCO est fixée grâce aux simulations

Pour les cas 1, 2 et 3, un régime de limitation en substrat organique est imposé. Par conséquent, la charge organique appliquée (2,5gDCO/m².j) doit être plus faible que la charge surfacique en oxygène qui est imposée au système biofilm. Expérimentalement, une aération et une recirculation continues du liquide ont été réalisées. La charge surfacique en oxygène était de 11,5gO₂/m².j. Dans les cas 4 et 5, ces charges étaient d'environ 21,5gO₂/m².j. Pour maintenir cet apport en oxygène malgré des concentrations différentes dans le liquide, des débits de recirculations distincts ont été appliqués.

L'analyse des cas « ratio DCO/N élevé » et « ratio DCO/O₂ élevé » est basée sur l'analyse des taux observés de réactions (taux de nitrification, de dénitrification et d'élimination de la pollution carbonée) en s'appuyant sur les bilans matière. Le détail de ces bilans de matières est présenté au *chapitre II*.

V.3 Analyse des cas « ratio DCO/N élevé » et « ratio DCO/O₂ élevé »

V.3.1 Analyse des flux et des taux observés de réaction

La Figure V-3 présente les efficacités de nitrification, de dénitrification et d'élimination de la DCO associées aux flux mesurés, en fonction des conditions de croissance des biofilms, d'après les données

expérimentales (a) et numériques (b). Les résultats numériques ont été obtenus dans le cas d'un modèle de détachement surfacique continu.

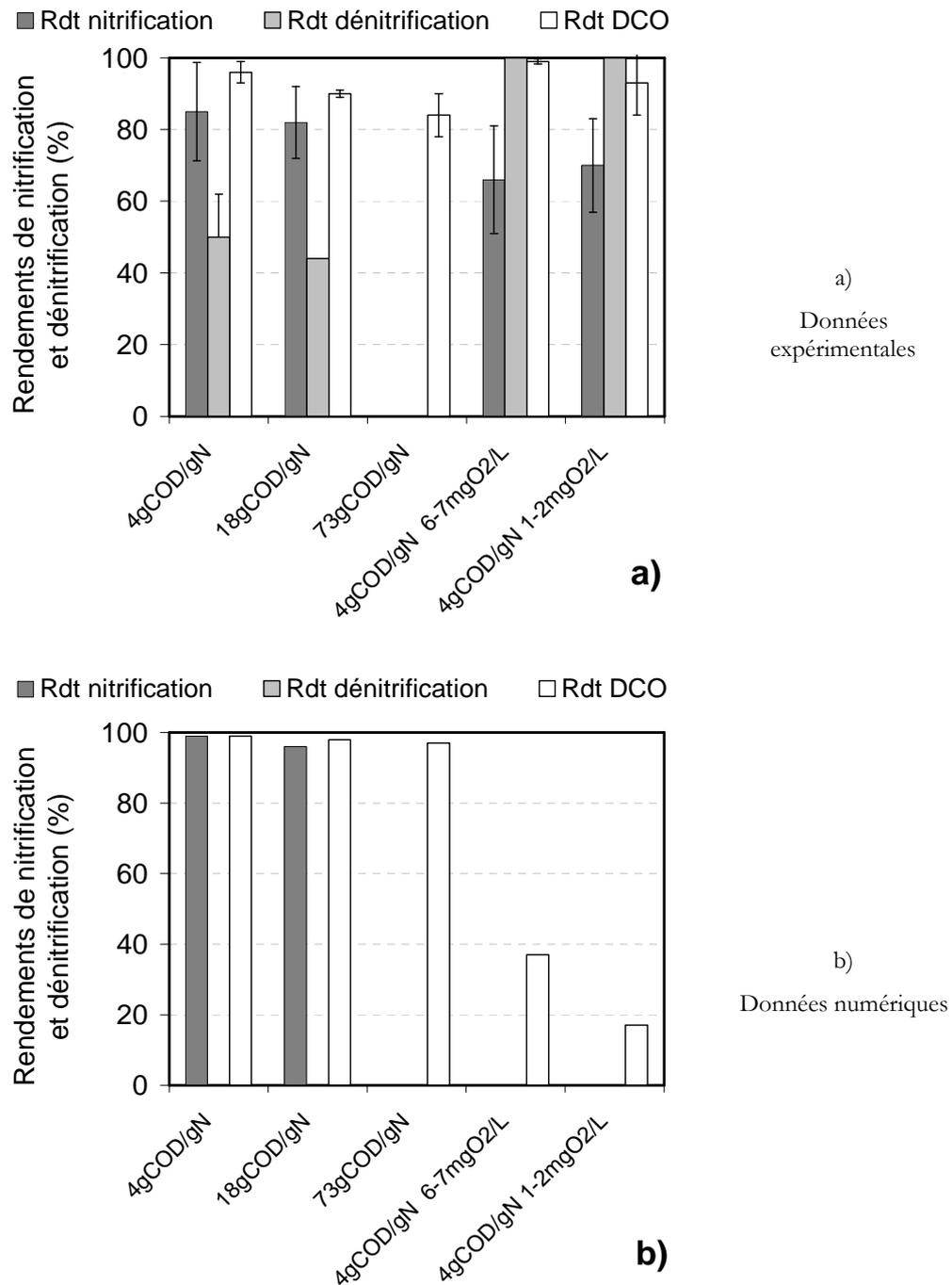


Figure V-3 : Rendements de nitrification, de dénitrification et d'élimination de la DCO en fonction du ratio DCO/N d'après les données expérimentales (a) et numériques (b). Cas d'un détachement surfacique continu.

D'après la Figure V-3a (données expérimentales), nous pouvons noter les points suivants :

- Les activités nitrifiantes et dénitrifiantes sont implantées pour des biofilms développés sous des ratios de 4 et 18gDCO/gN (cas « standard »), et de manière plus inattendue pour la nitrification, même dans le cas « ratio DCO/O₂ élevé ».
- Les activités nitrifiantes et dénitrifiantes ne s'implantent pas dans le cas « ratio DCO/N élevé » (73gDCO/gN).
- Les rendements d'élimination de la DCO sont élevés quel que soit le régime de croissance. Sous un régime de limitation en substrat organique, ce rendement diminue lorsqu'on passe du cas « standard » au cas « ratio DCO/N élevé » (respectivement 96%, 90% et 84% pour des ratios de 4, 18 et 73gDCO/gN). Dans le cas « ratio DCO/O₂ élevé », le rendement d'élimination de la DCO diminue très légèrement avec la diminution de la concentration en oxygène dans le liquide (respectivement 99% et 93% à 6-7 et 1-2mgO₂/L respectivement).
- Sous un régime de limitation en substrat organique, la nitrification est partielle mais les efficacités élevées (85% et 82% pour des ratios de 4 et 18gDCO/gN). L'efficacité de nitrification est supérieure à l'efficacité de dénitrification (partielle à 50% et 44% pour des ratios de 4 et 18gDCO/gN). A l'inverse, dans le cas « ratio DCO/O₂ élevé », la dénitrification est complète alors que la nitrification est partielle (66% et 70% pour des concentrations en oxygène comprises entre 6-7 et 1-2mgO₂/L respectivement). De manière inattendue, dans ce cas, nous avons observé aucune diminution d'efficacité de la nitrification lors de la diminution de la concentration en oxygène de 6-7 et 1-2mgO₂/L. Ce point sera discuté à la fin de ce chapitre.

D'après les réponses du modèle obtenues dans le cas d'un modèle de détachement surfacique continu (Figure V-3b), nous remarquons que :

- L'activité nitrifiante est implantée pour des biofilms simulés dans les cas « standard » avec un ratio de 4 et 18gDCO/gN. L'activité nitrifiante ne s'implante pas lorsqu'une limitation en oxygène ou

une limitation très forte en N-NH₄⁺ est présente. Le modèle montre également qu'une charge élevée en DCO élimine la nitrification.

- L'activité dénitrifiante ne s'implante pas quel que soit le régime de croissance. En effet, la dénitrification ne peut pas s'implanter en absence de nitrification (cas « ratio DCO/N élevé » et « ratio DCO/O₂ élevé »). Dans les cas « standard » avec un ratio de 4 ou 18gDCO/gN, la nitrification a lieu mais la DCO est limitante et la concentration en oxygène élevée empêchent la dénitrification. Ceci n'est pas observé en condition expérimentale.
- Le rendement d'élimination de la DCO est très élevé dans les cas « standard » et « ratio DCO/N élevé ». Dans le cas « ratio DCO/O₂ élevé », ce rendement est faible et diminue lorsque le degré de limitation par l'oxygène est augmenté.

Notons également que d'après le modèle, dans le cas d'un détachement surfacique, la nitrification disparaît pour un ratio DCO/N d'environ 75gDCO/gN. Le cas d'un détachement volumique dynamique sera abordé dans la discussion.

La différence de fonctionnalités observée dans le cas d'un régime de limitation en substrat organique est confirmée par les résultats SSCP présentés ci-dessous et obtenus dans le cas de biofilms développés sous des ratios de 4 (cas « standard », Figure V-4a) et de 73gDCO/gN (cas « ratio DCO/N élevé, Figure V-4b).

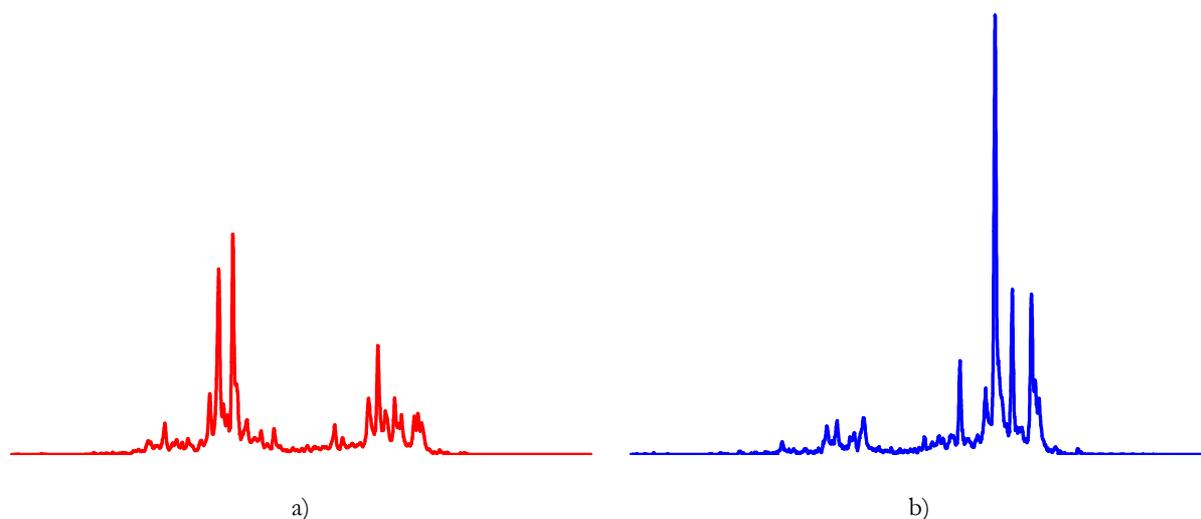


Figure V-4 Profils SSCP de biofilms développés sous des ratios de 4gDCO/gN (a) et 73gDCO/gN (b).

Le profil SSCP obtenu pour le biofilm développé dans le cas « standard » sous un ratio de 4gDCO/gN est constitué de deux groupes de pics bien distincts d'un point de vue de leur temps de rétention. À l'inverse, dans le cas « ratio DCO/N élevé », un seul groupe de pics est observé. Ces groupes de pics n'ont pas été caractérisés d'un point de vue phylogénétique mais il semble que la diversité augmente dans le cas d'un biofilm mixte hétérotrophe/autotrophe. Si comme les nombreux essais réalisés par le Laboratoire de Biotechnologie de l'Environnement (LBE, Unité INRA de Narbonne) le laissent penser, certains des pics apparaissant sur le profil de la Figure V-4a peuvent être attribués aux bactéries nitrifiantes, alors ces données viennent confirmer qu'une limitation en azote sous des conditions de limitation en substrat organique permet de bloquer l'implantation des bactéries autotrophes.

L'implantation de micro-organismes au sein d'une population est liée directement à leur capacité de croissance dans les conditions du microenvironnement. Cette capacité de croissance est fonction, entre autre, du rendement de croissance observé.

Or, en condition de limitation nutritionnelle, et selon le TSS_{local} , ce rendement observé peut varier. Nous avons quantifié ce rendement de croissance observé.

V.3.2 Impact de la limitation en azote ou en oxygène sur le rendement observé de croissance

La Figure V-5 représente l'évolution des rendements observés de croissance ($\text{gMVS/gDCO}_{\text{éliminée}}$) en fonction des ratios d'après les données expérimentales (a) et numériques (b).

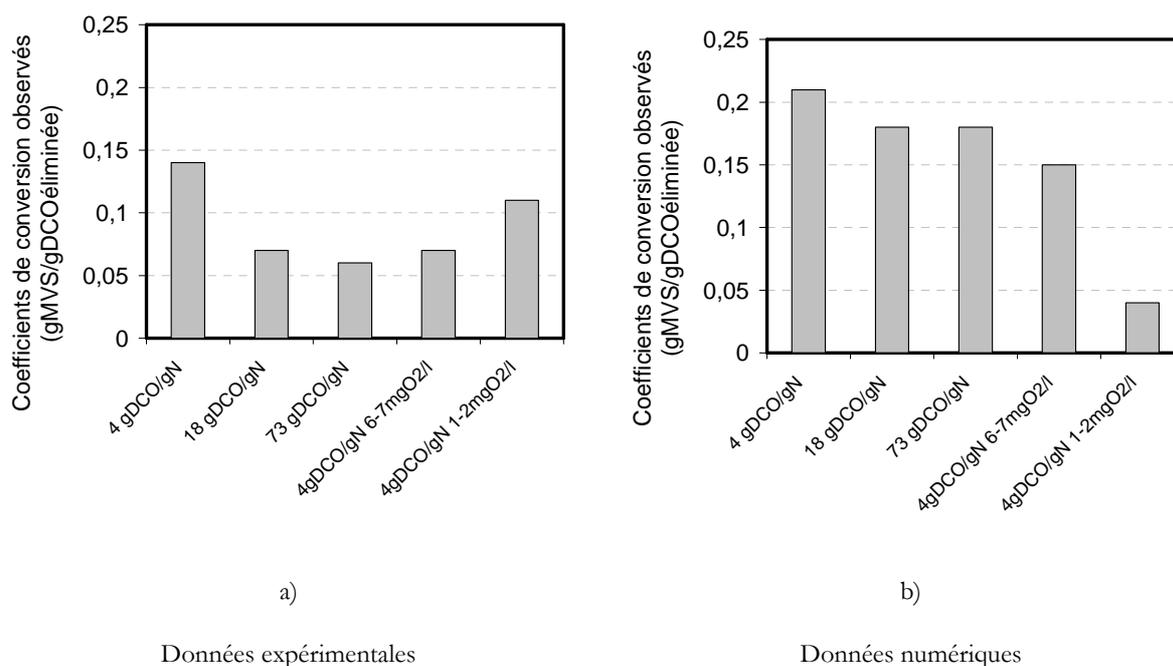


Figure V-5 : Rendements observés de croissance ($\text{gMVS/gDCO}_{\text{éliminée}}$) en fonction du ratio DCO/N et selon le degré de limitation en oxygène d'après les données expérimentales (a) et numériques (b).

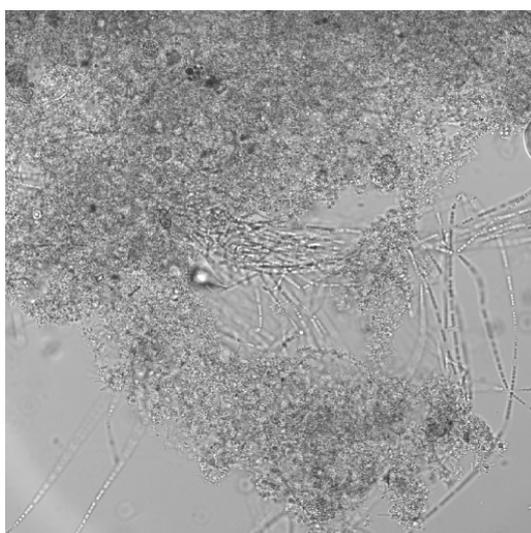
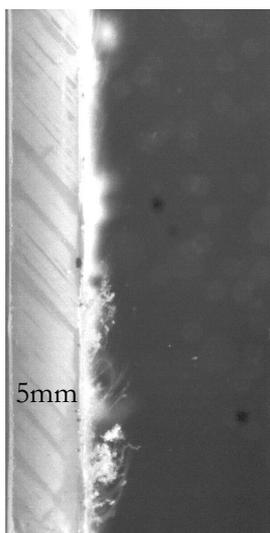
D'après les résultats expérimentaux, quel que soit le régime de croissance, les rendements observés de croissance sont très faibles (inférieurs à $0,15\text{gMVS/gDCO}_{\text{éliminée}}$). Sous un régime de limitation en substrat organique, le rendement observé de croissance diminue lorsqu'on augmente la limitation en azote (respectivement $0,14$, $0,07$ et $0,06\text{gMVS/gDCO}_{\text{éliminée}}$). A l'inverse, dans le cas « ratio DCO/O₂ élevé », il augmente avec l'augmentation de la limitation en accepteur final d'électron.

D'après les résultats numériques, les rendements observés de croissance sont inférieurs à $0,2\text{gMVS/gDCO}_{\text{éliminée}}$ mais supérieurs à ceux mesurés expérimentalement. Leurs valeurs diminuent lorsqu'on augmente la limitation en azote ou en oxygène (cas « ratio DCO/N ou DCO/O₂ élevés »).

Seule une forte limitation en oxygène se répercute sur la valeur du rendement observé de croissance.

V.3.3 Impact des conditions de croissance sur la structure des biofilms

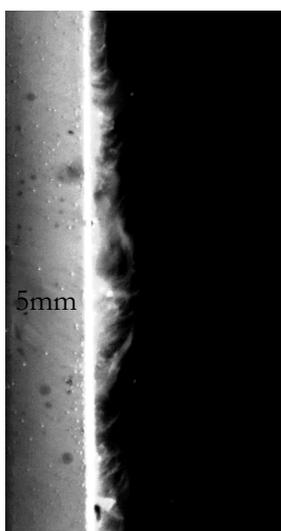
L'impact de la limitation en azote, sous une limitation en substrats, est illustré par la figure suivante qui présente des photos des biofilms et des particules détachées pour les cas 1, 2 et 3.



(a)

Cas « standard »

4gDCO/gN



(b)

Pas de photos disponibles

Cas « standard »

18gDCO/gN

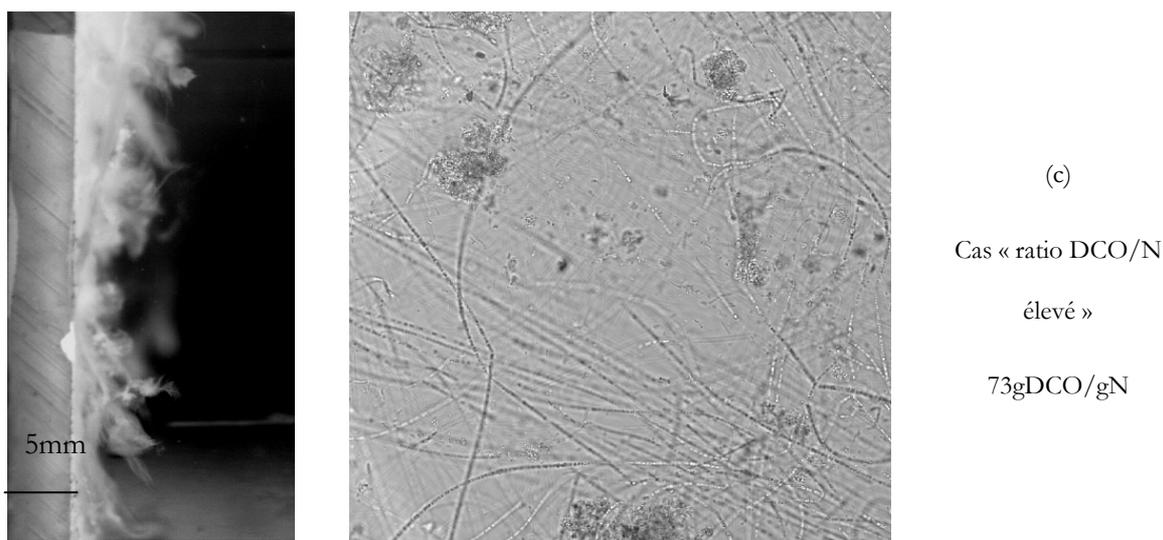


Figure V-6 : Photos de biofilms (vus de côté) et de particules détachées pour des biofilms développés sous des ratios de 4gDCO/gN (a), 18gDCO/gN (b) et 73gDCO/gN.

D'après la figure ci-dessus, nous observons que :

- Quel que soit le ratio DCO/N, les biofilms présentent des structures filamenteuses, filandreuses et cotonneuses, caractérisées par la présence de nombreux streamers.
- Ce caractère filandreux est beaucoup plus prononcé dans le cas « ratio DCO/N élevé », c'est-à-dire dans le cas d'une très forte limitation en substrat azoté (73gDCO/gN). Ceci est confirmé par les observations microscopiques : les bactéries filamenteuses dominent le biofilm développé dans le cas « ratio DCO/N élevé » alors que les biofilms développés dans le cas « standard » sous des ratios de 4 et 18gDCO/N sont principalement constitués de « flocc-forming bacteria ».
- Ce développement plus important et brutal de filamenteuses a donc été observé lorsque la limitation en azote est devenue très élevée, ce qui correspond au passage d'un ratio de 18 à 73gDCO/gN.

Remarquons que dans les cas « ratio DCO/O₂ élevé », la structure des biofilms n'a pas été caractérisée. En effet, sous ces conditions, la colonisation des plaques était partielle et très hétérogène. L'analyse de la rugosité et de l'épaisseur moyenne était par conséquent délicate et n'a pas été réalisée.

A l'inverse, dans les cas « standard » et « ratio DCO/N élevé », l'ensemble de la surface disponible était colonisé de manière homogène, ce qui a permis une caractérisation de la structure des biofilms développés.

V.4 Discussion

L'objectif de ce chapitre était d'identifier l'impact du ratio DCO/N et DCO/O₂ sur la compétition microbienne entre populations autotrophes et hétérotrophes. Dans cette optique, différents biofilms ont été développés sous deux régimes de croissance distincts : un régime de limitation en substrats, DCO ou ammonium pour l'étude de l'impact du ratio DCO/N (cas « standard » et « ratio DCO/N élevé ») et un régime de limitation en oxygène pour l'étude de l'impact du ratio DCO/O₂ (cas « ratio DCO/O₂ élevé »). Sous un régime de limitation en substrat organique, des ratios DCO/N de 4, 18 et 73gDCO/gN ont été appliqués. Dans le cas « ratio DCO/O₂ élevé », les biofilms ont été développés sous un ratio de 4gDCO/gN mais avec des concentrations en oxygène dans le liquide de 6-7mgO₂/L ou de 1-2mgO₂/L. Les différents biofilms ont ensuite été caractérisés en termes de fonctionnalité, de diversité microbienne et de structure physique.

Deux points sont discutés dans cette section. Il s'agit de :

- l'implantation des populations nitrifiantes sous une limitation de la croissance par l'azote (cas « DCO/N élevé »).
- l'implantation des populations nitrifiantes sous une limitation de la croissance par l'oxygène (cas « DCO/O₂ élevé »).

V.4.1 Implantation des populations nitrifiantes sous limitation par l'azote (cas « DCO/N élevé »).

Sous un régime de limitation en substrat organique par rapport à l'oxygène, il a été nécessaire d'imposer une très forte limitation en azote (ratio de 73gDCO/gN) pour supprimer la nitrification. Ce résultat va être discuté pour répondre essentiellement à deux interrogations :

- la valeur de 73gDCO/gN est-elle cohérente ? Cela revient à faire l'analyse de la pertinence du domaine-seuil de DCO/N conduisant à l'élimination des bactéries autotrophes.
- quelle influence du mode de détachement sur le seuil de DCO/N conduisant à l'élimination des bactéries autotrophes ?

V.4.1.1 Analyse de la pertinence du domaine-seuil de DCO/N conduisant à l'élimination des autotrophes

Contrairement au cas des travaux cités dans la *chapitre I* (Okabe *et al.*, 1996; Okabe *et al.*, 1995; Elenter *et al.*, 2007; Hao *et al.*, 2002; Ohashi *et al.*, 1995; Zhang *et al.*, 1994), dans cette étude, le ratio DCO/N est modifié en faisant varier la concentration en ammonium dans la solution d'alimentation. Cette approche conduit à limiter la croissance bactérienne par l'azote. A l'inverse, dans les études citées précédemment, l'augmentation du ratio DCO/N *via* une augmentation de la charge organique engendrait d'abord une limitation en oxygène.

Expérimentalement, le rapport DCO/N a été fixé tout d'abord à une valeur de 18gDCO/gN afin de supprimer la nitrification. Néanmoins, la chute du rendement de conversion Y_{Sxobs} alors constatée, conduit, d'après les courbes de la Figure V-1, à diminuer les besoins en azote de la croissance cellulaire. Une augmentation du rapport DCO/N a dû être réalisée pour limiter l'apport d'azote à la quantité strictement nécessaire pour la croissance à partir de la consommation de la DCO.

La valeur de 73 gDCO/gN a ainsi été imposée conduisant de nouveau à une chute du Y_{SXobs} , bien que celle-ci soit plus faible. Par conséquent, les résultats obtenus montrent qu'une limitation de la croissance par l'azote ammoniacal au sein d'un biofilm mixte BMAH, engendre une forte réduction de la valeur du Y_{SXobs} de 0,15 gMVS/gDCO_{éliminée} jusqu'à une valeur de 0,06 gMVS/gDCO_{éliminée}. Cette valeur très faible mérite d'être commentée et analysée.

Ce résultat pourrait être expliqué soit par un changement du temps de séjour moyen des solides dans le biofilm qui rendrait la mortalité plus significative, soit par l'effet d'une limitation en azote sur le rendement de croissance. Cette deuxième hypothèse apparaît très plausible. Il existe, en effet, deux voies métaboliques d'assimilation de l'ammonium (NH₃ et NH₄⁺) chez les bactéries. La première est connue sous le nom de « high ammonia pathway » et intervient lorsque l'ammonium est présent en excès. Les enzymes « glutamate déshydrogénase » et « alanine déshydrogénase » catalysent l'incorporation de l'ammonium dans les acides aminés. Cependant, la constante de Michaelis-Menten (K_m) de ces enzymes pour l'ammonium présente une valeur élevée (2-5 mM) et on peut donc conclure que l'affinité pour l'ammonium est relativement faible. Lorsque l'ammonium est limitant, ou lorsque les nitrates (qui doivent être réduits en ammonium avant d'être utilisés) constituent la source d'azote, la deuxième voie est utilisée, « low ammonia pathway ». L'ammonium est alors incorporé via la « glutamine synthétase » ou la « glutamate déshydrogénase » qui présentent un K_m dont la valeur est faible (0,5 mM) mais qui nécessitent de l'ATP. Il en résulte une voie métabolique plus défavorable d'un point de vue énergétique que la précédente excepté si l'azote est davantage limitant que l'énergie. Une diminution du rendement de croissance peut donc être expliquée par un changement de voie d'assimilation de l'azote.

Par conséquent, lors de nos essais, la limitation forte en azote ammoniacal conduirait à l'utilisation d'une voie d'incorporation de l'azote plus défavorable énergétiquement qui conduirait à une diminution significative du rendement de croissance. Nous n'avons pas pu déterminer si cette voie métabolique était largement répandue chez les bactéries mais il est possible que cela engendre une sélection des populations. L'apparition de populations de bactéries filamenteuses en est peut être l'illustration.

Une diminution des rendements d'élimination de la DCO, de 96% à 90%, puis de 90% à 84% pour des variations de ratios DCO/N respectivement de 4 à 18 gDCO.gN puis à 73gDCO/gN est aussi observée. D'après les simulations, la diminution attendue du rendement d'élimination la DCO est moins significative (rendement >95%). Ce résultat confirme qu'en plus de la disparition de la nitrification, il y a limitation des capacités de dégradation de la DCO par la population hétérotrophe. L'observation microscopique montre d'ailleurs que lors d'une augmentation du ratio de 18 à 73gDCO/gN, un biofilm épais, rugueux, composé essentiellement de bactéries filamenteuses apparaît. Par conséquent, la limitation par l'azote affecte la croissance des populations autotrophes mais aussi des populations hétérotrophes.

Les bactéries filamenteuses sont généralement caractérisées par des taux de croissance spécifiques et des constantes de Monod inférieures à ceux des bactéries qui forment classiquement les flocs bactériens. Le tableau V-2 présente les taux de croissance et les constantes de Monod pour les substrats organiques en fonction de la nature du donneur d'électron, pour deux types de bactéries régulièrement observées en boue activée (Tsang *et al.*, 2007) : *N.amarae*, une bactérie filamenteuse, et *P.Aeruginosa*, une bactérie classique.

Tableau V-2 : Paramètres cinétique des bactéries *N.Amarae* et *P.Aeruginosa* (Tsang et al., 2007).

Source de carbone	<i>N.amarae</i>		<i>P.Aeruginosa</i>	
	μ_{\max} (h ⁻¹)	K _s (mgDCO/L)	μ_{\max} (h ⁻¹)	K _s (mgDCO/L)
A.acétique	0,1	0,3	3,5	2
A. laurique	0,07	1,1	1	7,4
Acide myristique	0,07	1,1	1	8,7
Acide palmitique	0,07	1,3	0,7	10,5
Acide stearique	0,07	1,4	0,3	11
Acide lignocerique	0,05	1,5	0,1	12,6

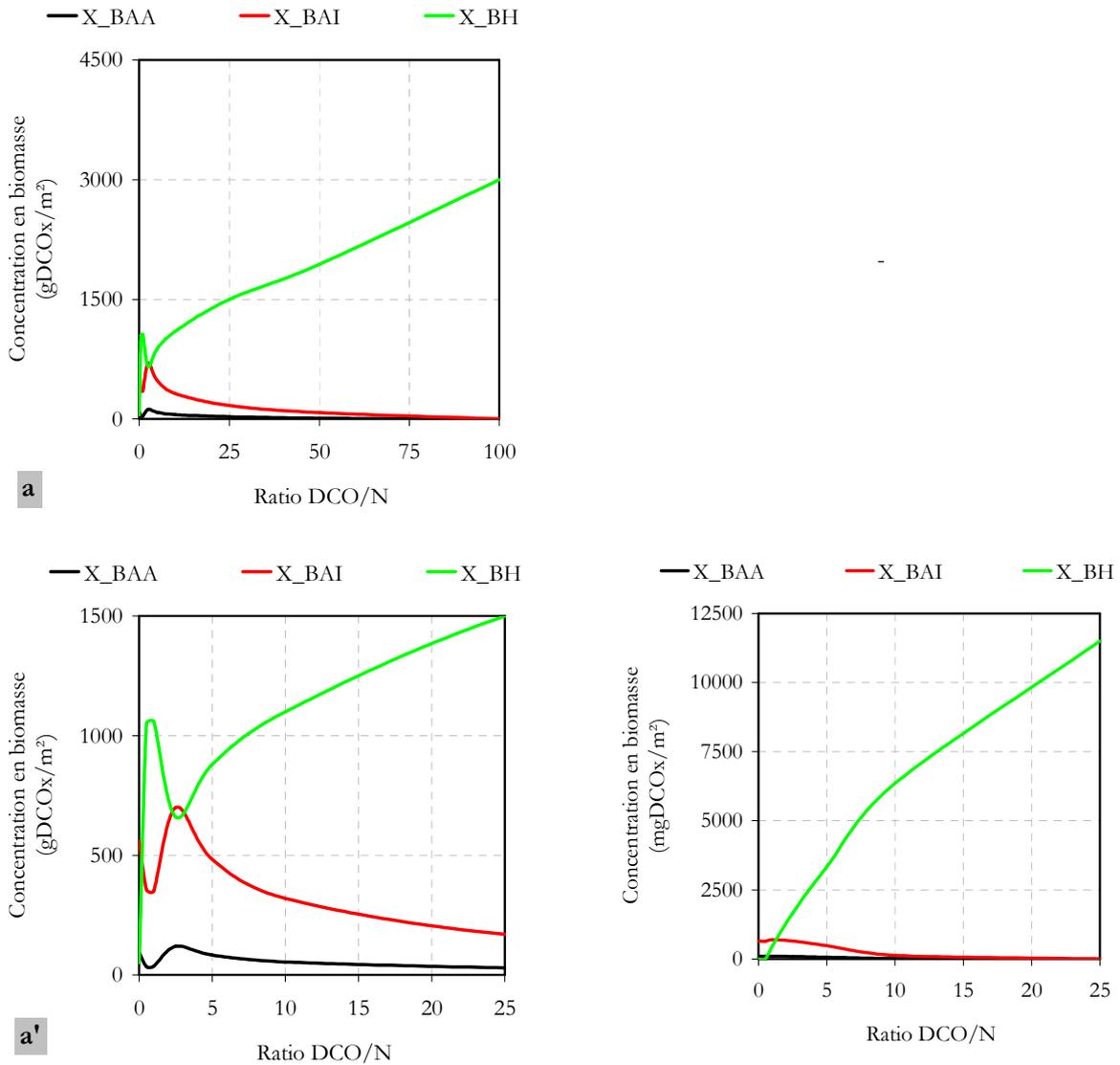
Du fait de constantes de Monod plus faibles, la croissance de *P.Amarae* est favorisée lorsque les concentrations en substrats sont faibles. De la même manière que la compétition entre bactéries autotrophes et hétérotrophes pour l'oxygène ou l'azote, le développement des bactéries filamenteuses résulte de phénomènes de compétition avec les bactéries non-filamenteuses.

Le maintien de la biomasse hétérotrophe à un ratio de 73gDCO/gN, et donc de l'élimination élevée de la DCO, n'est possible qu'en raison de cette modification d'écologie microbienne. Il est probable que ce soit grâce à l'affinité très forte des bactéries hétérotrophes filamenteuses pour l'ammonium que les bactéries nitrifiantes sont éliminées du biofilm. L'analyse de l'influence du ratio DCO/N sur la compétition entre populations autotrophes et hétérotrophes nécessiterait donc de considérer trois populations microbiennes : les bactéries hétérotrophes non-filamenteuses (K_{NH} plus élevé, μ_{max} plus élevé), les bactéries nitrifiantes (K_N intermédiaire, μ_{max} faible), et enfin, les bactéries filamenteuses (K_{NH} plus faible mais μ_{max} également plus faible). De plus, la diminution du rendement de croissance avec le degré de limitation en azote serait à prendre en compte. Ce point est discuté au *chapitre VI*.

Dans le *chapitre IV*, nous avons vu l'importance du TSS_{local} sur les processus de compétition en condition de limitation. Les valeurs de ces TSS_{locaux} dépendraient du mode de détachement. Cet aspect est discuté dans le paragraphe suivant en utilisant les simulations.

V.4.1.2 Analyse de l'influence du mode de détachement sur le domaine-seuil de DCO/N conduisant à l'élimination des autotrophes

Par simulation, l'influence du mode de détachement sur la compétition entre bactéries nitrifiantes et hétérotrophes va être analysée qualitativement. La Figure V-7 présente l'évolution des concentrations en biomasse en fonction du ratio DCO/N dans le cas d'un biofilm développé à 2,5gDCO/m².j et soumis aux deux modes de détachement étudiés au chapitre précédent : (a) un détachement surfacique continu et (b) un détachement dynamique volumique. Le cas (a') est un grossissement du cas (a) dans la gamme de ratio DCO/N : 0-25gDCO/gN.



a) et a') Détachement surfacique continu

b) Détachement volumique discontinu 25% 1/7j

Données numériques

Figure V-7 : Evolution des concentrations en biomasse en fonction du ratio DCO/N dans le cas dans biofilm développé à 2,5gDCO/m².j et soumis à : (a) un détachement surfacique continu ou (b) un détachement volumique dynamique 25% 1/7j. La figure a' représente un grossissement de la figure V-7a dans la gamme 0-25gDCO/gN.

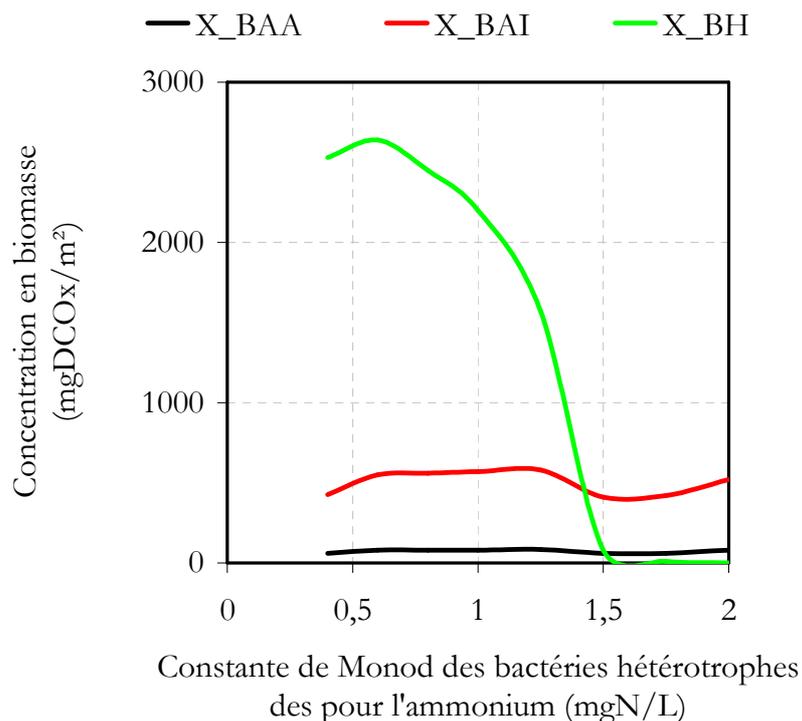
Dans le cas a), le biofilm est soumis à un détachement surfacique continu. Dans le cas b), le détachement est en plus volumique et dynamique, 25% de l'épaisseur étant détaché chaque semaine. Quel que soit le processus de détachement, une augmentation du ratio DCO/N entraîne une augmentation de la concentration en bactéries hétérotrophes et une diminution de la concentration en

bactéries autotrophes. Ainsi, comme il a été déjà constaté, le processus de détachement a un impact significatif sur l'évolution de ces concentrations au sein du biofilm.

Dans le cas du détachement volumique dynamique, les populations autotrophes disparaissent du biofilm pour un ratio 17gDCO/gN. Dans le cas du détachement surfacique continu, elles ne sont éliminées du système que pour un ratio d'environ 75gDCO/gN. Ce dernier résultat semble concorder avec nos observations expérimentales mais sans doute de façon fortuite. En effet, rappelons ici que le modèle ne prend en compte ni la population de bactéries filamenteuses, ni la diminution du rendement de croissance. Or nous avons vu dans le paragraphe précédent que ces deux points jouaient sans doute un rôle capital dans le résultat de la compétition microbienne étudiée.

Ainsi, comme le détachement pour nos biofilms est de type volumique, le seuil de DCO/N conduisant à l'élimination des bactéries nitrifiantes devrait être faible, par exemple de 17 (facteur 5 par rapport à celui identifié expérimentalement). La différence observée entre les résultats expérimentaux et ceux de simulation pour le détachement dynamique volumique laisse penser de nouveau que les rapports entre paramètres cinétiques des deux populations, autotrophes et hétérotrophes, ne sont pas fixés correctement dans notre modèle. Il existe donc sans doute des processus ou avantages cinétiques que nous n'avons pas encore identifiés qui favoriseraient la croissance des bactéries autotrophes au détriment de celle des bactéries hétérotrophes.

Une première piste pourrait concerner une surestimation des cinétiques des bactéries hétérotrophes non filamenteuses en conditions de limitation d'azote. En effet, ces bactéries doivent disparaître progressivement lors de l'augmentation du ratio DCO/N au profit des bactéries hétérotrophes filamenteuses. Ainsi, la prédominance des bactéries hétérotrophes non filamenteuses dans le cas d'un modèle de détachement volumique discontinu peut être due à une valeur de K_{NH} trop faible. L'impact de la valeur de K_{NH} sur les concentrations en biomasse dans le cas d'un biofilm développé à 2,5gDCO/m².j avec un ratio de 4gDCO/gN et soumis à un détachement volumique discontinu est illustré par la Figure V-8.



Données numériques

Figure V-8: Evolution des concentrations en biomasses en fonction de la valeur de K_{NH} . Cas d'un biofilm développé à $2,5\text{gDCO}/\text{m}^2\cdot\text{j}$ avec un ratio de $4\text{gDCO}/\text{gN}$ (cas « standard ») et soumis à un détachement volumique dynamique.

Logiquement, l'augmentation de K_{NH} de 0,4 à 1,5 mgN/L entraîne une élimination des bactéries hétérotrophes alors que la concentration en bactéries autotrophes demeure sensiblement constante. Une identification précise des valeurs de K_{NH} des populations hétérotrophes qui composent les biofilms nitrifiants est par conséquent nécessaire.

Une deuxième piste que nous proposons pour expliquer le maintien des nitrifiants malgré le mode de détachement volumique dynamique, repose sur l'hypothèse d'un détachement différentiel entre les bactéries autotrophes et hétérotrophes. Cette hypothèse repose sur la capacité des bactéries autotrophes à se développer sous forme de clusters cellulaires (Kindaichi *et al.*, 2006). Par ce mécanisme, on peut instinctivement penser que la cohésion de ce microenvironnement autotrophe est supérieure à la cohésion d'une zone composée uniquement de bactéries hétérotrophes.

Par conséquent, les bactéries hétérotrophes seraient éliminées du système biofilm plus facilement que les bactéries autotrophes.

Ces deux pistes seront évaluées dans le *chapitre VI*, qui consiste à discuter les résultats clés de cette étude de manière globale.

V.4.2 Compétition vis-à-vis de l'oxygène

Dans le cadre de cette discussion concernant la compétition entre populations autotrophes et hétérotrophes, nous considérerons successivement deux points :

- la compétition pour l'oxygène entre populations autotrophes et hétérotrophes.
- la compétition pour l'oxygène entre populations nitritantes et nitratantes.

Pour enrichir la discussion sur l'effet de limitation de la croissance par l'oxygène, les résultats d'Elenter *et al.* (2007) seront analysés conjointement aux nôtres. En effet, ces auteurs ont été les seuls à réaliser des expériences poussées, sur de longues périodes, pour analyser la compétition entre bactéries nitrifiantes et hétérotrophes en faisant varier la charge organique surfacique. Nous allons rappeler les conditions opératoires utilisées par ces auteurs. Le tableau V-3 présente un récapitulatif des flux et des concentrations dans le liquide, mesurés pour les différentes conditions d'environnement de croissance d'après Elenter *et al.* (2007).

Tableau V-3 : Récapitulatif des flux et des concentrations dans le liquide d'après les résultats d'Elenter *et al.* (2007). (indice « a » : contrainte de cisaillement constante 0,01Pa, indice « b » : contrainte de cisaillement variable).

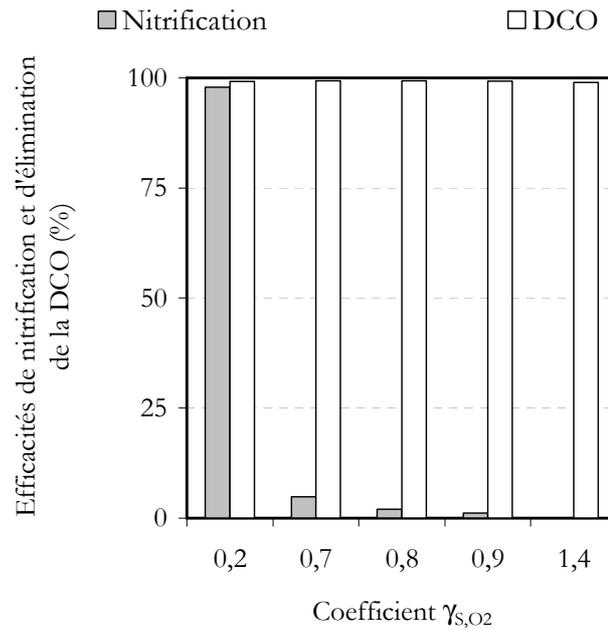
Cas	Elenter et al. (2007)						
	Ia	Ib	IIa	IIb	IIIa	III b	IV
γ_{s,o_2}	0,05	0,05	0,3	0,3	1,1	1,1	0,05
Flux de DCO en entrée (gDCO/m ² .j)	0		11,2	11,2	36,4	36,4	0
Flux de DCO éliminée (gDCO/m ² .j)	-		5,7±1,8	5,7±1,9	15	15	-
Flux d'azote en entrée (gN/m ² .j)	26,5						
Flux d'azote assimilé (gN/m ² .j)	-						
Flux d'azote nitrifié (gN/m ² .j)	-						
Flux d'azote dénitrifié (gN/m ² .j)	-						
Flux d'azote global éliminé (gN/m ² .j)	2,1±0,3	1,5-2,5	1,8±0,3	1,4±0,1	0,2±0,2		2,2
S_O2 (mgO2/L)	6						
S_S (mgDCO/L)	1,3		10,1±2,4		34,9±6,6		0
S_NH (mgN/L)	37,8±0,3		43,9±5,8		41,8±1,9		41,9±0,3
S_NOI (mgN/L)	2,7±0,7		0,9±0,3		0,1		2,4±0,1
S_NOA (mgN/L)	0	0					

V.4.2.1 Compétition pour l'oxygène entre populations autotrophes et hétérotrophes

L'analyse des résultats expérimentaux dans le cas « DCO/O₂ élevé » rapporte que la nitrification s'implante au sein de nos systèmes biofilm pour des coefficients γ_{s,o_2} de 3 et 50.

Cependant ces valeurs élevées s'expliquent par le fait qu'expérimentalement, à la fois les bactéries hétérotrophes et autotrophes sont impactées par l'oxygène. Par conséquent, à la fois l'élimination de la DCO et la nitrification sont partielles. En revanche, dans les mêmes conditions de croissance et quel que soit le mode de détachement, le modèle prédit l'absence de nitrification, mais une élimination de la DCO totale. Par conséquent le modèle ne prédit pas que les deux populations fonctionnelles sont impactées de la même manière. Peu d'informations sont disponibles dans la littérature concernant l'impact du coefficient γ_{s,o_2} sur la compétition entre populations microbienne. L'étude expérimentale récente et bien documentée d'Elenter *et al.*, (2007) rapporte une disparition de la nitrification lorsque le coefficient γ_{s,o_2} est augmenté de 0,3 à 1,1. Nous allons tenter d'analyser ces différences de comportement et par la même analyser la sensibilité des populations à une concurrence pour l'oxygène.

Le modèle construit permet de proposer des valeurs seuils de limitation des populations autotrophes par l'oxygène et leur élimination du biofilm au profit des populations hétérotrophes, dans le cas d'un détachement volumique dynamique (25%, 1/7j), comme indiqué par la Figure V-9.



Données numériques

Figure V-9 : Evolution des efficacités de nitrification et d'élimination de la DCO en fonction du coefficient **γ_{s,O_2} .**

Le modèle prévoit donc une élimination des populations nitrifiantes pour des valeurs de γ_{s,O_2} proche de 1, ce qui est en accord avec les données expérimentales et de simulations d'Elenter *et al.* (2007). De même que dans le cas d'un détachement surfacique continu, pour un détachement volumique dynamique, le modèle ne prévoit pas que les populations fonctionnelles soient impactées de manière similaire par la limitation en oxygène. L'avantage accordé à la croissance hétérotrophique est donc surestimé.

Dans l'étude d'Elenter *et al.* (2007), une surestimation de l'activité hétérotrophique est également réalisée dans le cas d'un système limité en oxygène, comme indiqué sur la Figure V-10. Cette surestimation est identifiée lorsque la charge organique est augmentée, au jour 250. Les données de simulation sont indiquées en trait plein.

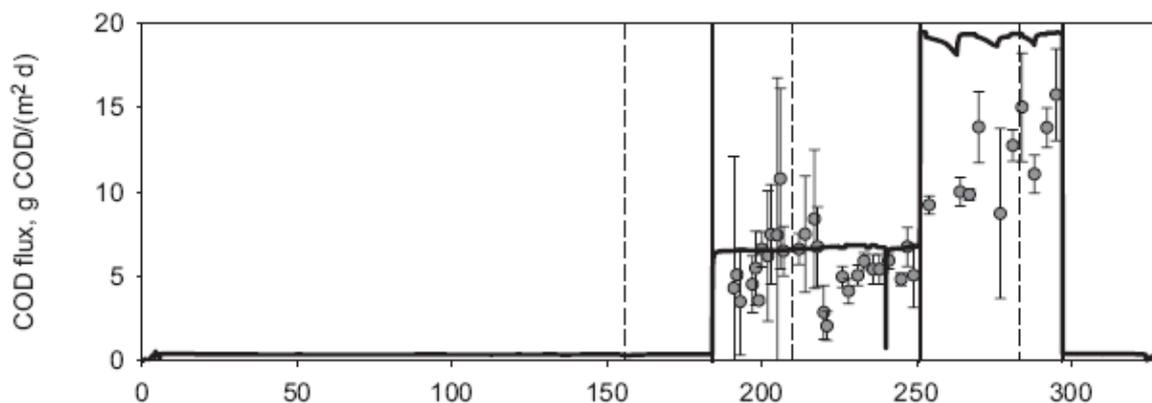


Figure V-10: Evolution du flux de DCO éliminée lors d'une augmentation de la charge organique en condition de limitation en oxygène. Elenter *et al.* (2007).

D'un point de vue expérimental, deux expériences peuvent être comparées pour analyser l'influence de la limitation par l'oxygène. Pour un biofilm développé dans le cas « standard », la charge en azote appliquée au système est d'environ 0,625gN/m².j, l'efficacité de nitrification est élevée, et le flux d'azote dénitrifié est plutôt moyen (0,3gN/m².j).

Dans le cas « ratio DCO/O₂ élevé », une charge de 6,25gN/m².j a été appliquée. Sous ces conditions et malgré la nitrification partielle observée, le flux d'azote dénitrifiable atteint environ 4gN/m².j. Dans le cas d'une dénitrification *via* les nitrates, en considérant un Y_{obs} de 0,1gDCO_x/gDCO, les quantités de DCO consommées sont respectivement de 1gDCO/m².j et 13gDCO/m².j pour les cas « standard » et « ratio DCO/O₂ élevé ». Par conséquent, dans le cas d'un « ratio DCO/O₂ élevé », la réduction, grâce à l'implantation de la dénitrification, des besoins en oxygène pour l'élimination de la DCO est particulièrement significative et ainsi, la limitation en oxygène sur la croissance autotrophique est minimisée. Les nitrates produits par la dénitrification permettent de récupérer une partie de l'oxygène prélevé par la nitrification.

Malgré des degrés de limitation en oxygène différents (concentrations de 6-7 ou 1-2mgO₂/L), des efficacités de nitrification similaires ont été observées dans les cas « ratio DCO/O₂ élevé ». Remarquons cependant que l'efficacité de dénitrification, pour une concentration en oxygène de 1-2mgO₂/L, est supérieure à celle observée dans le cas d'une concentration de 6-7mgO₂/L. Par conséquent, la réduction de la consommation en oxygène est plus significative, ce qui peut expliquer les comportements similaires observés.

Nous pouvons donc considérer que le système composé des populations autotrophes et des populations hétérotrophes aérobies et dénitrifiantes constitue un système où il existe à la fois des processus de compétition mais également des processus qui s'apparentent au commensalisme de type proto-coopération (Tableau V-4). La compétition pour l'oxygène est clairement établie. En revanche, nous montrons que la dénitrification qui élimine une partie de la DCO sans prélever d'oxygène moléculaire favorise l'implantation des populations nitrifiantes. On peut considérer que les bactéries dénitrifiantes éliminent des composés (DCO), non pas directement toxiques mais engendrant potentiellement une limitation par l'oxygène.

Tableau V-4 : Rappel de différentes interactions microbiennes.

Type d'interaction	Caractéristiques	Effet de B sur μA	Effet de A sur μB
Compétition	Effets négatifs dus à l'épuisement du substrat	-	-
Commensalisme	Effet + dû à la production par B d'un stimulus de croissance de A ou par élimination par B d'un inhibiteur de croissance de A	+	0
Proto-coopération	Idem commensalisme avec aussi présence des deux populations non indispensables pour la croissance de chacun	+	+

Une nouvelle question se pose alors. En effet, en principe la dénitrification intervient dans les couches plus profondes, non oxygénées du biofilm. Donc si une stratification rigoureuse du biofilm était réelle, la dénitrification ne devrait pas avoir d'impact sur la compétition vis-à-vis de l'oxygène et jouer ainsi un rôle en faveur des bactéries nitrifiantes. Par conséquent, nos résultats laissent penser que l'organisation des populations microbiennes est beaucoup plus hétérogène que supposée, notamment dans le sens de la profondeur du biofilm. Il pourrait exister une organisation en micro-colonies spécialisées réparties dans le biofilm. Les limitations diffusionnelles interviendraient donc davantage au sein de ces micro-colonies pouvant alors permettre une dénitrification simultanée à l'élimination aérobie de la DCO. Bien sur ces suppositions mériteraient des recherches complémentaires pour validation.

V.4.2.2 Compétition entre populations nitritante et nitratante

Notons qu'une accumulation de nitrites est rapportée dans l'étude d'Elenter *et al.* (2007) pour une alimentation composée uniquement de substrat azoté, c'est-à-dire pour un ratio C/N nul (flux d'environ 11gN/m².j). Le flux d'azote nitrifié est alors élevé, de même que la disponibilité en nitrites. Sous nos conditions, le flux d'azote nitrifié est plus faible.

Les besoins en oxygène des bactéries nitrifiantes sont plus faibles également, en raison de la faible disponibilité en nitrites. Cette accumulation de nitrites est attribuée à un phénomène de compétition entre les bactéries nitritantes et nitrifiantes pour l'oxygène (Elenter *et al.*, 2007). Le modèle développé dans cette étude représente correctement ce phénomène d'accumulation (Figure V-11). Des constantes d'affinité K_{OAI} et K_{OAA} de 0,6 et 2,2mgO₂/L sont ainsi considérées. Notons cependant qu'une inhibition par le NH₃ ou par un autre composé azoté (acide nitreux, hydroxylamine) aurait pu être envisagée.

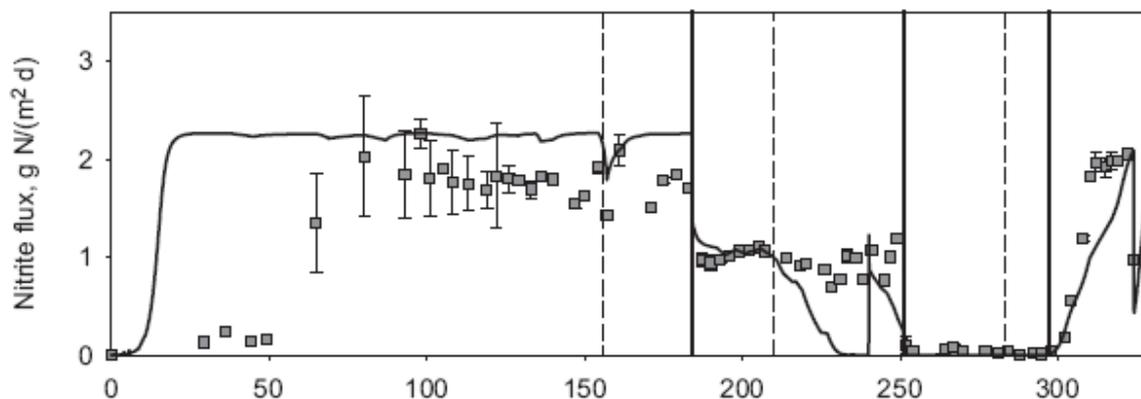


Figure V-11 : Evolution du flux de nitrites d'après les données expérimentales (points) et les données de simulations (ligne) (Elenter *et al.*, 2007).

Dans notre étude, l'analyse des concentrations dans le liquide n'indique pas d'accumulation de nitrites quelles que soient les conditions variées de régime de croissance qui ont été testées. Ce phénomène n'est pas prédit par les réponses du modèle. Dans les cas 1, 2 et 3 (cas « standard » et cas « ratio DCO/N élevé »), l'oxygène est en excès et la charge organique est faible. En l'absence de compétition entre bactéries nitritantes et nitrifiantes pour l'oxygène, l'absence d'accumulation de nitrite est donc logique. En revanche, dans les cas 4 et 5 (cas « ratio DCO/O₂ élevé »), la charge surfacique est élevée. Pourtant, l'accumulation de nitrite n'est pas non plus observée. Nous confirmons ainsi que les seuils de limitation pour l'oxygène ne sont pas bien représentés par notre modèle.

Lorsqu'elle est observée, la limitation de l'activité nitrifiante est attribuée soit à une localisation plus profonde des bactéries nitrifiantes dans le biofilm, soit à une constante d'affinité pour l'oxygène plus élevée comparé à celle des bactéries nitritantes (Garrido *et al.*, 1997). Dans notre étude, l'absence d'accumulation de nitrites peut cependant s'expliquer par la faible charge en azote appliquée. Dans les cas 4 et 5, cette charge était de 6,25gN/m².j contre 26gN/m².j dans l'étude d'Elenter *et al.* (2007).

Elenter et al. (2007) rapporte des concentrations en azote ammoniacal de l'ordre de 40mgN/L. Dans la gamme de pH et de température appliquées dans l'étude d'Elenter *et al.* (2007), une inhibition par le NH₃ ou le NO₂ n'est pas envisageable.

V.5 Conclusion

Ce chapitre avait pour objectif d'évaluer l'influence de limitations de la croissance de populations autotrophes et hétérotrophes en azote ou en oxygène sur les processus de compétition. Des limitations plus ou moins fortes ont donc été imposées, en modifiant le rapport DCO/N pour une limitation par l'azote, ou, en modifiant la charge surfacique en DCO ou la concentration en oxygène dissous du liquide, pour une limitation par O₂.

- Concernant la limitation par l'azote, nous avons pu constater qu'elle entraîne une chute du rendement de croissance, ainsi que la disparition simultanée des bactéries hétérotrophes non filamenteuses et des populations autotrophes au profit de l'implantation de bactéries filamenteuses. Il est proposé de tenir compte de cette population filamenteuse pour mieux rendre compte de l'influence du ratio DCO/N sur la dynamique des populations. Ce point sera discuté dans le chapitre suivant.
- La chute du rendement de croissance pourrait être liée à un changement de voie métabolique pour l'incorporation de l'azote dans les molécules des cellules. Ce changement ou simplement la limitation forte en azote ammoniacale pourrait être à l'origine de l'élimination des populations hétérotrophes non filamenteuses. La population de bactéries nitrifiantes ne prend cependant pas le dessus du fait du développement de bactéries filamenteuses dont l'affinité pour la source d'azote est très élevée.
- Concernant la limitation de la croissance par l'oxygène, il apparaît que les bactéries nitrifiantes résistent mieux à la compétition pour l'oxygène que ce qui est prévu par le modèle. De façon plus prononcée que dans le cas d'une compétition pour l'azote, la chute du rendement d'élimination de la DCO intervient en même temps que la chute du rendement de nitrification, ce qui indique

que ces deux populations fonctionnelles sont impactées de la même manière. Ceci est en opposition avec les réponses du modèle, qui prévoient d'abord une chute du rendement de nitrification, et ensuite, pour une limitation plus forte en oxygène, une chute du rendement d'élimination de la DCO. Le seuil de ratio DCO/O₂ qui détermine l'élimination des populations autotrophes est assez délicat à cerner par la modélisation. En effet, l'élimination se fait rapidement dès que le seuil est dépassé. De plus, la modélisation ne semble pas bien représentative des comportements des populations vis-à-vis de la limitation par l'oxygène. Il est possible que la dénitrification et une répartition plus homogène (moins stratifiée) des colonies de populations fonctionnelles permettent d'expliquer ces observations. Ainsi, l'organisation des populations microbiennes serait beaucoup plus hétérogène que supposée.

- La limitation en oxygène affecte d'abord la population nitrifiante par rapport à la population dénitrifiante comme le montre à la fois les simulations (non fournies) et les résultats expérimentaux d'Elenter *et al.* (2007). Nous n'avons cependant pas observé dans notre cas cette accumulation malgré une charge organique surfacique élevée.

Dans le *chapitre VI* suivant, nous allons explorer plus en profondeur les possibilités pour mieux représenter la compétition entre les deux populations autotrophes et hétérotrophes.

Chapitre VI : Evaluation de l'impact de processus spécifiques sur la croissance autotrophique

VI.1 Problématique et objectifs

Les résultats des *chapitres IV et V* ont montré d'une part que le mode de détachement correspondait à de l'érosion volumique en engendrant théoriquement une diminution de la compétitivité des organismes autotrophes par rapport aux organismes hétérotrophes aérobies. D'autre part, ils ont montré que des limitations de la croissance par l'azote ou par l'oxygène pouvaient entraîner l'élimination des populations autotrophes mais qu'il fallait considérer des modifications de populations hétérotrophes profondes et des changements métaboliques pour rendre compte de la réalité. Nous allons évaluer certaines modifications du modèle pour rendre compte d'un avantage compétitif des bactéries autotrophes.

A travers l'analyse du *chapitre IV* et du *chapitre V*, le tableau suivant récapitule les différents résultats de la compétition entre bactéries autotrophes et hétérotrophes dans le cas d'une compétition pour l'azote et pour l'oxygène, suivant les différents modes de détachement considérés

Tableau VI-1 : Récapitulatif des différents résultats de la compétition entre bactéries autotrophes et hétérotrophes d'après le modèle et d'après nos observations expérimentales.

Type de compétition	Résultat de la compétition selon le modèle	Résultat de la compétition selon les observations expérimentales
Cas « standard »	Cas d'un détachement surfacique continu : BMAH avec une stratification stricte des populations fonctionnelles.	-
	cas d'un détachement dynamique volumique : BMAH avec une stratification étendue des populations fonctionnelles.	BMAH

Cas « ratio DCO/N élevé »	Cas d'un détachement surfacique :	
	continu :	
	BH si le ratio DCO/N est supérieur à 75gDCO/gN.	
	Cas d'un détachement surfacique continu :	BH si le ratio DCO/N est supérieur à 75gDCO/gN.
	BH si le ratio DCO/N est supérieur à 15gDCO/gN.	
Cas « ratio DCO/O ₂ élevé »	<u>Cas d'un détachement surfacique</u>	
	<u>continu</u> : BH si le coefficient γ_{s,O_2} est supérieur à 1, BMAH sinon	
	<u>Cas d'un détachement volumique dynamiques</u> : BH si le coefficient γ_{s,O_2} est supérieur à 1, BMAH sinon	BMAH pour des coefficients γ_{s,O_2} de 3 et 50, les différentes populations fonctionnelles sont impactées de la même manière
	Cas d'un détachement surfacique continu puis d'un détachement volumique dynamique :	BHMA dans le cas d'un biofilm épais, partiellement pénétré par l'oxygène, et soumis à des événements de détachement.
	BH si le coefficient γ_{s,O_2} initial est supérieur à 0,3, BMAH sinon	

A travers l'analyse du tableau VI-1, il existe des décalages :

- Dans le cas d'une limitation par l'oxygène, quel que soit le mode de détachement considéré par le modèle.
- Dans le cas d'une limitation par l'azote, uniquement si le mode de détachement considéré par le modèle est volumique dynamique.

Afin de prédire correctement l'implantation de la nitrification au sein d'un système biofilm limité en oxygène, il est impératif d'augmenter la disponibilité en oxygène pour la croissance autotrophique. La modification de la disponibilité intra-biofilm en oxygène nécessite une diminution de l'activité exogène hétérotrophique. A cet effet, deux processus peuvent être envisagés :

- un « détachement spécifique des bactéries hétérotrophes »,
- une « distribution homogène des populations ».

Pour prédire l'implantation de la nitrification dans le cas d'un « ratio DCO/N élevé » avec un modèle de détachement volumique dynamique, l'implantation des bactéries hétérotrophes filamenteuses, caractérisées par des paramètres cinétiques biologiques plus faibles que les bactéries hétérotrophes classiques, doit être évaluée.

Ces trois processus vont être analysés dans les paragraphes suivants et leur impact sur le processus de compétition va être illustré par différentes simulations. Pour commencer, le cas d'une limitation en oxygène va être traité dans la section qui suit.

VI.2 Présentation et justification des processus biologiques et physiques évalués dans le cas « Ratio DCO/O₂ élevé »

Les différents cas qui vont être testés et comparés pour tenter d'améliorer la représentation de la compétition entre populations autotrophes et hétérotrophes dans le cas d'une limitation en oxygène sont présentés dans le tableau VI-2.

Pour cette section, le mode de détachement considéré a volontairement été choisi du type surfacique continu.

Ce choix peut paraître surprenant si l'on considère le résultat de la caractérisation du détachement présenté au *chapitre IV*. Cependant, les deux principales hypothèses qui vont être testées dans le cas d'un « ratio DCO/O₂ élevé » influencent directement les TSS des différentes populations fonctionnelles. Par conséquent, pour évaluer leur impact sur la croissance autotrophique, le comportement du système doit être analysé par analogie avec celui d'un système dont les TSS n'évoluent pas de manière dynamique. Cette analyse n'est pas possible si des événements volumiques dynamiques sont considérés, entraînant de fortes variations des TSS globaux et locaux au cours du temps. Nous avons donc choisi de découpler l'impact du détachement volumique dynamique de l'impact des processus testés dans cette section.

Tableau VI-2: Récapitulatif des différents processus évalués.

Cas d'étude	Processus spécifique évaluée	Spécificités du modèle	Intérêt
Cas référence	-	Détachement surfacique continu Charge organique de 25gDCO/m ² .j Ratio DCO/N de 4gDCO/gN [O ₂]= 6-7mg _{O₂} /L ou 1- 2mg _{O₂} /L	C'est le cas de référence qui considère une stratification stricte des populations et une absence de nitrification lors d'une limitation en oxygène
« Détachement spécifique des bactéries hétérotrophes »	Détachement spécifique des différentes biomasses	Détachement surfacique continu Charge organique de 25gDCO/m ² .j Ratio DCO/N de 4gDCO/gN [O ₂]= 6-7mg _{O₂} /L ou 1-2mg _{O₂} /L Modification des constantes de décès de X _{BH} dans le biofilm	Diminuer le temps de séjour global de la biomasse hétérotrophe afin de favoriser la croissance des bactéries autotrophes
« Distribution homogène des populations »	Convection particulaire	Détachement surfacique continu Charge organique de	Obtenir un biofilm plus homogène en termes de stratification des populations et fonctionnalités

		25gDCO/m ² .j	
		Ratio DCO/N de 4gDCO/gN	
		[O ₂]= 6-7mg _{O₂} /L ou 1-	
		2mg _{O₂} /L	
		Coefficients de convection des	
		composés particuliers (1m.j ⁻¹)	
« Compétition biomasse fixée- biomasse en suspension »	Phénomène de compétition entre la biomasse en suspension et la biomasse fixée	Détachement surfacique continu Charge organique de 25gDCO/m ² .j Ratio DCO/N de 4gDCO/gN [O ₂]= 6-7mg _{O₂} /L ou 1- 2mg _{O₂} /L Différent TSS de la biomasse en suspension sont testés.	Etudier l'influence d'une biodégradation partielle dans la phase liquide sur les fonctionnalités du biofilm.

L'impact de ces phénomènes biologiques ou physiques sur la disponibilité de l'oxygène dans le biofilm est analysé par la suite selon l'approche classique utilisée durant cette thèse: (i) analyse des flux et taux observés de réaction (ii) analyse des masses accumulées et ratios de biomasses. Le choix de ces phénomènes est justifié et discuté ci-dessous.

VI.2.1 Cas « détachement spécifique des bactéries hétérotrophes »

Le cas « détachement spécifique des bactéries hétérotrophes » consiste à différencier le détachement de la biomasse hétérotrophe de celui de la biomasse autotrophe. Ce détachement spécifique est réalisé par un artifice qui consiste à faire varier la constante de décès des bactéries hétérotrophes. Par conséquent, cet artifice agit sur l'ensemble de l'épaisseur du biofilm, alors que le détachement n'agit qu'en surface du biofilm. Pour évaluer l'impact du cas « détachement spécifique des bactéries hétérotrophes » sur l'implantation des bactéries autotrophes, nous allons donc faire varier la constante de décès des bactéries hétérotrophes.

La quantité de biomasse hétérotrophe éliminée du système biofilm est alors égale à la somme de la quantité de biomasse hétérotrophe éliminée par le détachement plus la quantité de biomasse éliminée par lyse forcée, comme indiqué par l'équation VI-1 :

Équation VI-1

$$X_{BH_{\text{éliminée}}} = X_{BH_{\text{détachée}}} + X_{BH_{\text{mortalité}}}$$

Par conséquent, cette artifice impact directement le TSS global des bactéries hétérotrophes que nous noterons TSS_{BH}. Celui est fonction de la quantité de biomasse hétérotrophe accumulée au sein du système biofilm et de $X_{BH_{\text{éliminée}}}$.

L'hypothèse d'un détachement sélectif est justifiée par l'aptitude des bactéries autotrophes à se développer sous forme de clusters cellulaires (Kindaichi *et al.*, 2006).

Cet aspect est illustré par la figure suivante qui représente des photos de biofilms autotrophes après différentes périodes de croissance. Les photos A, C, E, G et H ont été acquises par microscopie confocale et hybridation moléculaire. Les photos B, D et F ont été acquises par microscopie classique.

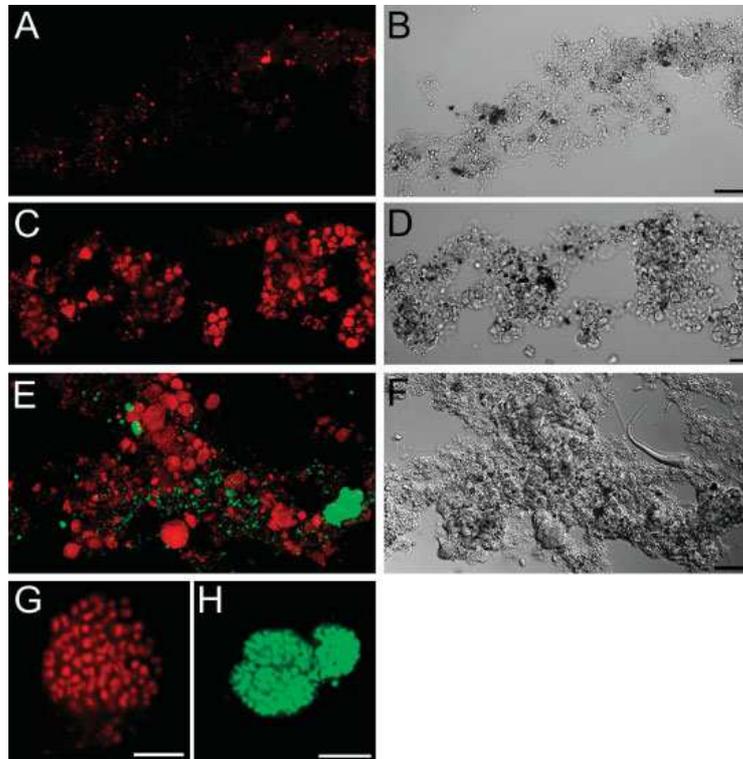


Figure VI-1 : Images d'un biofilm autotrophe après 1j de développement (A et B), 6j (C et D) ou 20j (E et F) (barre d'échelle = 20µm). Photos d'un cluster de bactéries nitritantes (G) et nitratantes (H) (barre d'échelle = 5µm). (Kindaichi *et al.*, 2006).

A travers l'analyse de ces photos, il apparaît que les bactéries autotrophes se développent sous forme de clusters cellulaires ou colonies. En raison de cette structure particulière, l'hypothèse d'une cohésion supérieure peut être émise. Dans notre étude, l'analyse des propriétés physiques des biofilms a révélé un impact du ratio DCO/N sur la structure du biofilm, et donc potentiellement sur sa cohésion. Ce résultat appuie l'hypothèse d'une cohésion spécifique à chaque population.

VI.2.2 Cas « distribution homogène des populations »

Le cas « distribution homogène des populations » a pour objectif d'évaluer l'effet de la convection particulaire sur l'implantation de la nitrification. Ce processus permet aux composés particuliers de se déplacer au sein du compartiment biofilm. Plusieurs études ont en effet démontré l'existence de canaux dans lesquels la convection était le phénomène de transport dominant (De Beer *et al.*, 1994; Stoodley *et al.*, 1994; Stoodley *et al.*, 1994). A l'aide de particules fluorescente en latex de $0,28\mu\text{m}$, la vitesse de convection a été mesurée au sein de biofilms de $700\mu\text{m}$ d'épaisseur (Stoodley *et al.*, 1994). Le déplacement des particules a été observé non seulement dans les canaux, mais également à l'intérieur des clusters cellulaires, et parfois même dans le sens opposé à celui de l'écoulement liquide. Des vitesses comprises entre 10 et $20\mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$ ont ainsi été mesurées. Nous avons nous-même proposé dans la discussion du *chapitre V* une distribution moins stratifiée des populations fonctionnelles le long de l'épaisseur pour mieux rendre compte des observations. En particulier, nous avons souligné le rôle joué par les bactéries dénitrifiantes qui pourraient dénitrifier sur les couches supérieures du fait de limitations au transfert dans les colonies du biofilm. Un processus correspondant pourrait impliquer que les bactéries nitrifiantes demeurent en surface malgré la croissance rapide des populations hétérotrophes.

Pour ce cas d'étude, la matrice du biofilm est considérée comme diffuse par le modèle (prise en compte d'une vitesse de convection des matières particulières), et non pas rigide comme dans les cas précédents. La vitesse de convection particulaire est fixée à $1\text{ m}\cdot\text{j}^{-1}$ quelle que soit la biomasse considérée. En effet, cette vitesse de convection particulaire permet d'obtenir une distribution homogène de l'ensemble des populations à travers le biofilm.

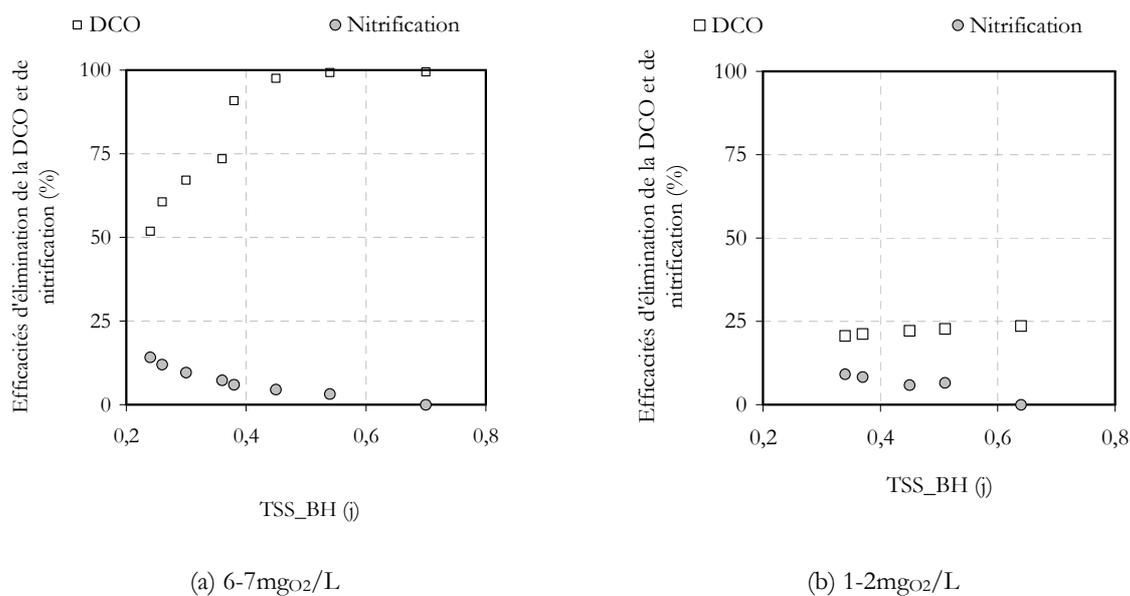
VI.3 Analyse du cas « détachement sélectif des bactéries hétérotrophes »

Ce cas d'étude est défini ligne 2 du tableau VI-2 et a été analysé pour une concentration en oxygène de l'ordre de 6-7mg_{O2}/L ou de l'ordre de 1-2mg_{O2}/L dans le liquide. Le détachement spécifique des bactéries hétérotrophes est réalisé *via* un artifice qui consiste à augmenter leur constante de décès dans le compartiment biofilm. Par conséquent, l'ensemble des bactéries hétérotrophes, quelle que soit leur localisation, est impacté. Ce cas d'étude sera analysé par comparaison avec le cas de référence « ratio DCO/O₂ » pour lequel la constante de décès des bactéries hétérotrophes est fixée à 0,2j⁻¹.

VI.3.1 Analyse des taux observés de réactions

Le Figure VI-2 représente l'évolution des efficacités d'élimination de la DCO et de nitrification dans le cas d'un « détachement spécifique des bactéries hétérotrophes » pour une concentration en oxygène de (a) 6-7mg_{O2}/L ou de (b) 1-2mg_{O2}/L, en fonction du TSS global des bactéries hétérotrophes (TSS_{BH}). Rappelons que le TSS_{BH} est calculé en fonction de la quantité de biomasse hétérotrophe lysée additionnée à la quantité de biomasse hétérotrophe détachée.

Pour le cas de référence « ratio DCO/O₂ élevé », quelle que soit la plage de concentrations en oxygène dans le liquide, le TSS_{BH} est légèrement supérieur à 0,8j et la nitrification n'est pas implantée.



Données numériques

Figure VI-2 : Efficacités d'élimination de la DCO et de nitrification dans le cas d'un « détachement spécifique des bactéries hétérotrophes » pour une concentration en oxygène de (a) 6-7mgO₂/L ou (b) 1-2mgO₂/L en fonction du TSS_BH.

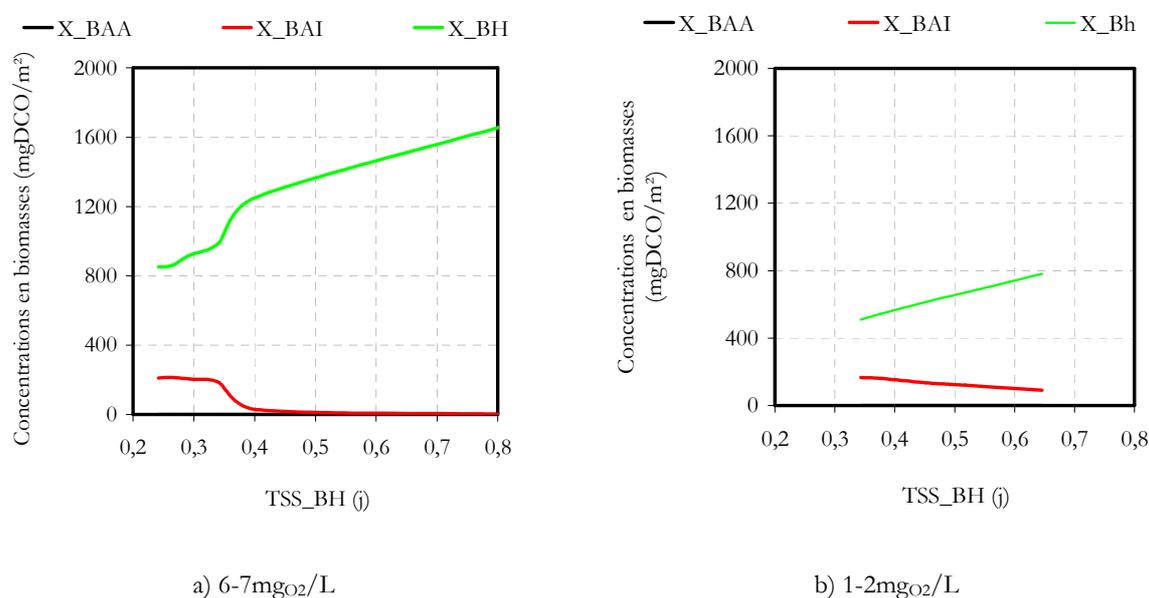
D'après les courbes d'évolutions des efficacités d'élimination de la DCO et de nitrification, les points suivants sont retenus :

- Quelle que soit la concentration en oxygène dans le liquide, une diminution du TSS_BH entraîne une augmentation de l'efficacité de nitrification et une diminution de l'efficacité d'élimination de la DCO.
- Une diminution de la concentration en oxygène de 6-7mgO₂/L à 1-2mgO₂/L entraîne une diminution significative de l'efficacité d'élimination de la DCO (facteur d'environ 4) alors que l'efficacité de nitrification reste globalement constante. La dénitrification est totale quel que soit le flux d'azote nitrifié (valeurs non présentées).
- L'efficacité maximum de nitrification est observée lorsque l'élimination de la DCO est la plus faible, c'est-à-dire pour un TSS_BH de 0,2j.
- Pour une concentration en oxygène comprise entre 6-7mgO₂/L dans le liquide, l'implantation des bactéries nitrifiantes est observée pour un TSS_BH inférieur à 0,5j. De même, entre 1-2mgO₂/L

dans le liquide, l'implantation des bactéries nitritantes est observée pour un TSS_BH inférieur à 0,8j.

VI.3.2 Analyse des distributions en biomasses

La Figure VI-3 représente l'évolution des concentrations en biomasses en fonction du TSS_BH dans le cas « détachement spécifique des bactéries hétérotrophes » pour des concentrations en oxygène dans le liquide de l'ordre de (a) 6-7mgO₂/L et de (b) 1-2mgO₂/L.



Données numériques

Figure VI-3 : Evolution des concentrations en biomasses en fonction du TSS_BH dans le cas « détachement spécifique des bactéries hétérotrophes » et pour une concentration en oxygène de l'ordre de (a) 6-7mgO₂/L ou de (b) 1-2mgO₂/L dans le liquide.

Quelle que soit la limitation en oxygène, seules les bactéries nitritantes et hétérotrophes se développent au sein du biofilm. Une diminution du TSS_BH entraîne une diminution de leur concentration alors que dans le même temps une augmentation de la concentration en bactéries nitritantes est observée. L'apparition de la biomasse nitritante est observée pour des valeurs du TSS_BH respectivement de 0,5 et 0,8 pour des concentrations en oxygène de 6-7mgO₂/L et 1-2mgO₂/L.

VI.3.3 Conclusions sur le cas d'un « détachement spécifique des bactéries hétérotrophes »

Dans le cas d'un régime de croissance limité en oxygène, un détachement spécifique des bactéries hétérotrophes permet d'augmenter la disponibilité en oxygène pour la croissance des bactéries nitrifiantes. Les bactéries nitrifiantes et hétérotrophes sont capables de coexister dans une gamme de TSS_BH d'autant plus large que la concentration en oxygène est faible. Ceci s'explique notamment par une constante de Monod pour l'oxygène des bactéries nitrifiantes plus faible que celle des bactéries hétérotrophes. La prise en compte d'un détachement spécifique et plus élevé des bactéries hétérotrophes par rapport aux bactéries autotrophes peut rendre compte du maintien de la nitrification sous des conditions de concentration en oxygène ou des conditions de charge organique *a priori* défavorable. Cette étude met aussi en évidence la compétition entre bactéries nitrifiantes et nitrifiantes déjà discutée en fin de *chapitre V*. Dans notre modèle, les paramètres cinétiques des bactéries nitrifiantes sont plus désavantageux que ceux des bactéries nitrifiantes dans le cas d'une limitation en oxygène. Par conséquent, l'oxygène est consommé de manière privilégiée par les bactéries nitrifiantes, ce qui explique l'absence de bactéries nitrifiantes. Ce résultat de simulations devra être confirmé par des essais respirométriques, pour évaluer ces paramètres biologiques cinétiques.

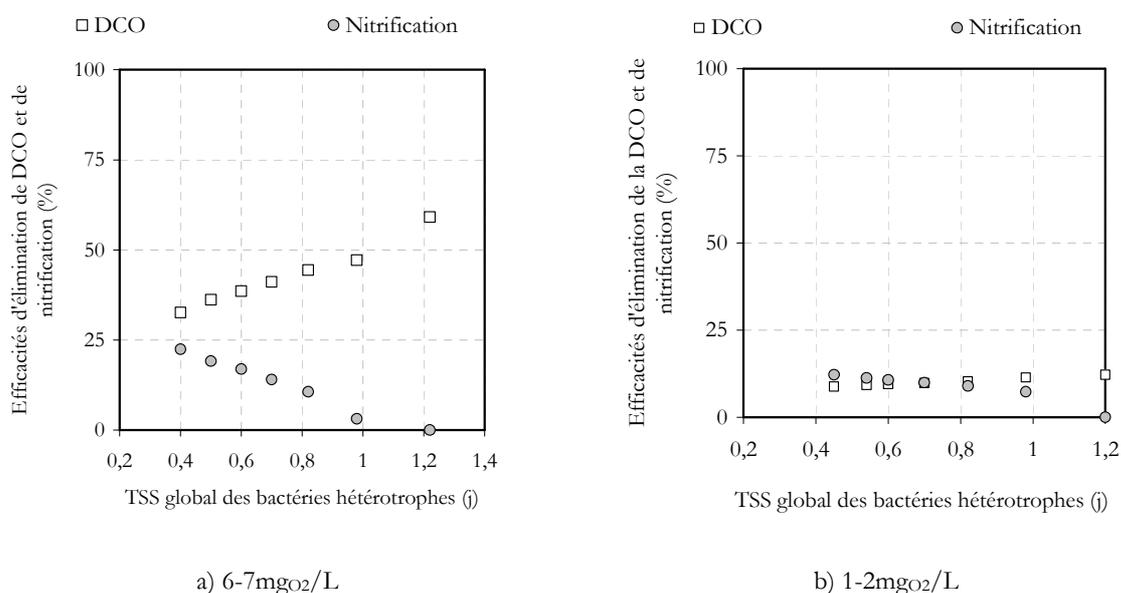
Comme nous l'avons vu, une autre hypothèse peut être avancée pour rendre compte du maintien de la nitrification. Il s'agit de l'hypothèse d'une distribution homogène des populations au sein de la zone active du biofilm. Nous allons analyser ce cas dans la section suivante.

VI.4 Analyse du cas « distribution homogène des populations »

Dans ce cas d'étude, le phénomène de convection particulière des microorganismes est considéré, ce qui se traduit par une distribution homogène des populations à travers le biofilm.

VI.4.1 Analyse des taux observés de réactions

Le Figure VI-4 représente l'évolution des efficacités d'élimination de la DCO et de nitrification dans le cas d'une « distribution homogène des populations » et pour une concentration en oxygène de (a) 6-7mg_{O2}/L ou (b) 1-2mg_{O2}/L en fonction du TSS_BH. Ces résultats doivent être analysés par comparaison avec les résultats de la section précédente, où ce phénomène de convection n'est pas considéré dans le modèle (voir figure VI-2).



Données numériques

Figure VI-4 : Efficacités d'élimination de la DCO et de nitrification dans le cas d'une « distribution homogène des populations », pour une concentration en oxygène de (a) 6-7mg_{O2}/L ou (b) 1-2mg_{O2}/L, en fonction du TSS_BH.

Dans le cas d'une « distribution homogène des populations », en comparaison avec le cas précédent et d'après l'analyse des efficacités d'élimination de la DCO et de nitrification, les points suivants sont observés :

- L'élimination de la DCO et la nitrification sont partielles. Logiquement, dans le cas d'une concentration en oxygène de 6-7mg_{O2}/L, les efficacités d'élimination de la DCO et de nitrification sont supérieures à celles observées dans le cas d'une concentration en oxygène de 1-2mg_{O2}/L.

- Une diminution du TSS_BH entraîne une diminution de l'efficacité d'élimination de la DCO et une augmentation de l'efficacité de nitrification. Par ailleurs, la dénitrification est totale quel que soit la valeur du TSS_BH.
- L'efficacité maximum de nitrification est observée pour un TSS_BH de 0,2j.
- Lorsque la concentration en oxygène est maintenue entre 6 et 7mgO₂/L dans le liquide, l'implantation des bactéries autotrophes est observée pour des valeurs de TSS_BH inférieures à 1j. Pour une concentration en oxygène comprise entre 1 et 2 mgO₂/L, l'implantation des bactéries autotrophes est observée lorsque le TSS_BH est inférieur à 1,2j.

VI.4.2 Analyse des distributions en biomasses

La Figure VI-5 représente l'évolution des concentrations en biomasses en fonction du TSS_BH dans le cas «distribution homogène des populations» pour une concentration en oxygène dans le liquide de : (a) 6-7mgO₂/L ou (b) 1-2mgO₂/L. Cette figure doit être analysée par comparaison avec l'évolution des concentrations en biomasses en fonction du TSS_BH pour le cas précédent (figure VI-3).

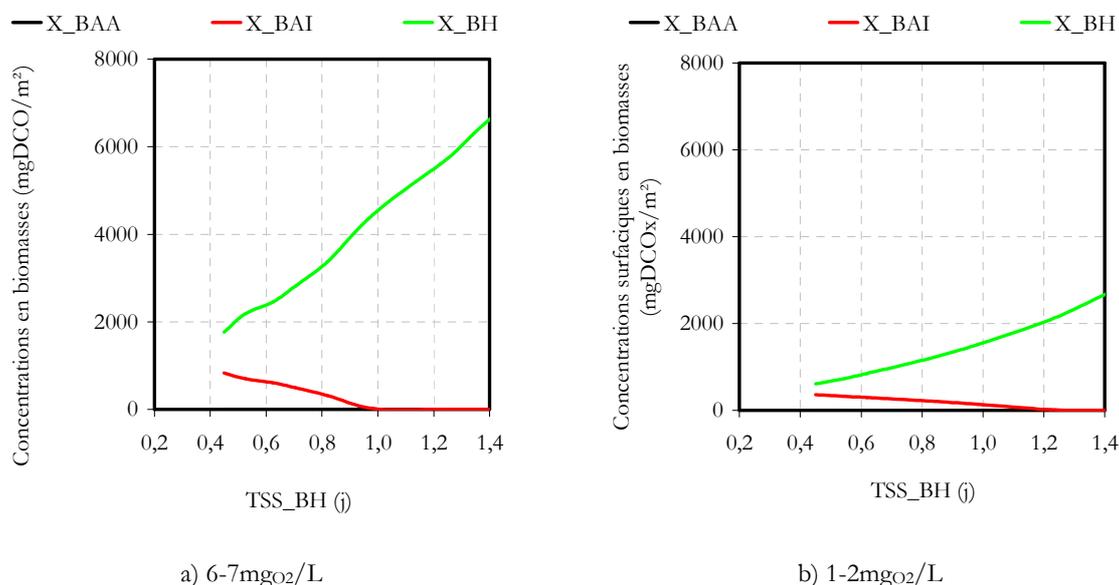


Figure VI-5 : Evolution des concentrations en biomasses en fonction TSS_BH dans le cas « distribution homogène des populations » et pour une concentration en oxygène comprise entre : (a) 6-7mgO₂/L ou (b) 1-2mgO₂/L dans le liquide.

Quelle que soit la concentration en oxygène dans le liquide, seules les bactéries nitritantes et les bactéries hétérotrophes se développent au sein du biofilm. La croissance des bactéries nitratantes n'est pas observée. Une diminution du TSS_BH entraîne une diminution de la concentration en bactéries hétérotrophes et une augmentation de la concentration en bactéries nitritantes. Pour une concentration en oxygène de l'ordre de 6-7mgO₂/L, ces deux populations coexistent lorsque le TSS_BH est inférieur à 1j. Lorsque la concentration en oxygène dans le liquide est de l'ordre de 1-2mgO₂/L, les bactéries nitritantes et hétérotrophes coexistent lorsque le TSS_BH inférieur à 1,2j.

VI.4.3 Conclusion sur le cas « distribution homogène des populations »

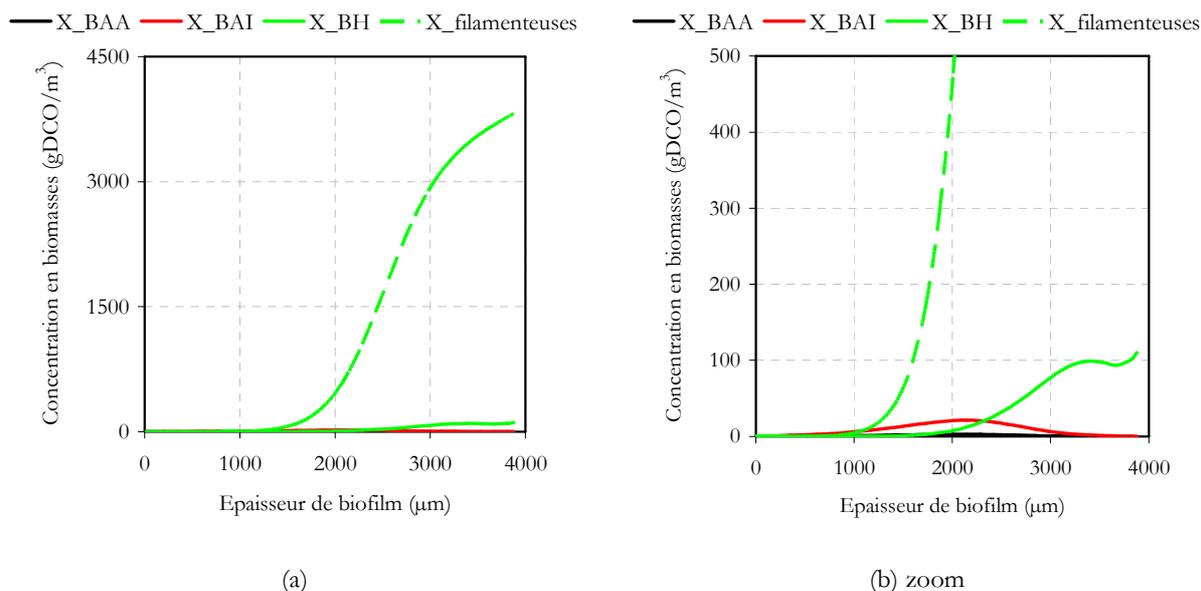
En conclusion de l'étude du cas « distribution homogène des populations », il apparaît que la convection particulière favorise la coexistence entre les bactéries autotrophes nitritantes et hétérotrophes. En effet, ces deux groupes de bactéries coexistent dans une gamme de TSS_BH plus large lorsque la convection particulière est considérée.

Comme dans le cas d'un « détachement spécifique des bactéries hétérotrophes », leur coexistence est d'autant plus favorisée que la concentration en oxygène dans le liquide est faible. Cependant, pour un TSS_BH constant et en comparaison du cas d'un « détachement spécifique des bactéries hétérotrophes », la considération du phénomène de convection particulière engendre une diminution des efficacités d'élimination de la DCO et de nitrification. De même, les bactéries nitratantes ne s'implantent pas, en raison de paramètres biologiques cinétiques défavorables comparés à ceux des bactéries nitritantes.

VI.5 Evaluation de l'impact de la croissance des bactéries hétérotrophes filamenteuses dans le cas d'un ratio « DCO/N élevé ».

Pour prédire l'implantation de la nitrification dans le cas d'un « ratio DCO/N élevé » avec un modèle de détachement volumique dynamique, l'impact d'une troisième population, les bactéries hétérotrophes filamenteuses, caractérisé par des paramètres cinétiques biologiques plus faibles que les bactéries hétérotrophes classiques, doit être évalué.

La croissance du biofilm a été simulée dans le cas d'un « ratio DCO/N élevé » et d'un détachement volumique dynamique 25% 1/7j. La constante de Monod pour l'ammonium et le taux de croissance spécifique des bactéries filamenteuses sont inférieurs de moitié à ceux des bactéries hétérotrophes non filamenteuses ($K_{NH_f}=0,2\text{mgN/L}$ et $\mu_{\max_BH_f}=2,4\text{j}^{-1}$). Les autres paramètres cinétiques sont similaires à ceux des bactéries hétérotrophes non-filamenteuses. La distribution des populations en fonction de l'épaisseur de biofilm est présentée Figure VI-6.



Données numériques

Figure VI-6 : Distribution des populations d'après le modèle considérant la croissance des bactéries filamenteuses dans le cas d'un ratio « DCO/N élevé » avec un détachement volumique dynamique. La figure (b) représente un zoom de la figure (a).

Les bactéries hétérotrophes filamenteuses dominent le biofilm. Par ailleurs, d'après la figure VI-6(b), nous remarquons que bactéries autotrophes sont toujours implantées au sein du biofilm. Le développement des bactéries filamenteuses est donc potentiellement responsable du maintien de la nitrification malgré le ratio DCO/N élevé.

VI.6 Conclusion

L'objectif de ce dernier chapitre était d'évaluer, à travers des simulations, l'impact de différentes hypothèses sur l'implantation de la nitrification.

Pour discuter le cas d'un « ratio DCO/O₂ élevé », les hypothèses d'un « détachement spécifique des bactéries hétérotrophes » et d'une « convection particulière » ont été testées. Les simulations ont été réalisées volontairement avec un modèle de détachement surfacique continu, afin de découpler l'impact de chaque phénomène sur la croissance autotrophique.

Quelle que soit la gamme de concentration en oxygène imposée au système, ces deux phénomènes favorisent la disponibilité en oxygène et par conséquent l'implantation de la nitrification. En effet, le détachement spécifique des bactéries hétérotrophes permet de diminuer leurs TSSs et leur masse accumulée. Par conséquent, la consommation d'oxygène liée à cette population fonctionnelle est diminuée, ce qui permet aux bactéries nitritantes de s'implanter. Une distribution homogène favorise encore plus l'implantation des bactéries nitritantes. Dans ces deux cas, les bactéries nitratantes ne s'implantent pas ou peu, vraisemblablement en raison d'une compétition pour l'oxygène avec les bactéries nitritantes. Une évaluation expérimentale des deux hypothèses constitue une perspective de recherche intéressante.

L'étude du cas « ratio DCO/N élevé » a consisté à intégrer le processus de croissance/décès des bactéries hétérotrophes filamenteuses. Dans le cas d'un détachement volumique dynamique, les simulations confirment que la nitrification est maintenue pour un ratio d'environ 75gDCO/gN uniquement grâce à une modification de la population hétérotrophe.

Chapitre VII : Conclusion générale

Au sein d'un système biologique appliqué à l'élimination simultanée de la DCO et de la pollution azotée, le consortium bactérien est composé à la fois de bactéries autotrophes et hétérotrophes. Par conséquent, ces deux populations interagissent ensemble. Plusieurs types d'interactions microbiennes ont été identifiés d'après la littérature (compétition, commensalisme, proto-coopération,...). Ces interactions peuvent avoir des effets positifs ou négatifs sur les différents microorganismes qui composent le système. Dans le cas d'un système biologique complexe appliqué à l'élimination de la DCO et de l'azote, les bactéries autotrophes et hétérotrophes sont en compétition pour leurs substrats communs (oxygène et ammonium) et pour l'espace. Ce phénomène de compétition microbienne impacte directement les dynamiques de populations et donc les performances globales du réacteur (Morgenroth et Wilderer, 2000). Les mécanismes gouvernant cette compétition microbienne entre les bactéries autotrophes et hétérotrophes n'étaient pas clairement caractérisés et analysés. Par conséquent, le dimensionnement des réacteurs à biomasse fixée se base sur des lois empiriques. Pour ces raisons, une étude des interactions microbiennes entre les populations autotrophes et hétérotrophes pour un système de type biofilm était souhaitable, ce qui a motivé les travaux de cette thèse.

Dans le cas d'un système conventionnel de type « boue activée » et d'une compétition multi-substrats, le résultat de la compétition microbienne entre bactéries autotrophes et hétérotrophes est gouverné par l'ensemble des paramètres cinétiques biologiques (μ_{\max} , constantes de Monod, Y_{Xsobs}). Comparé à une biomasse en suspension, le transfert de matière dans le cas d'un biofilm est limité par la diffusion. Ces gradients de concentrations entraînent le développement de structures hétérogènes en termes de fonctionnalités, d'écologie microbienne et de propriétés physiques. Par conséquent, l'analyse de la compétition entre bactéries autotrophes et hétérotrophes est plus complexe au sein d'un système biofilm par rapport aux systèmes à biomasse en suspension. Les processus physiques tels que le détachement viennent compliquer également l'analyse des processus.

Dans le cas d'un système biofilm, le régime de croissance peut être évalué à travers le calcul de différents paramètres tels que le coefficient G (Picioreanu *et al.*, 1998) ou le coefficient γ_{s,O_2} . Le coefficient G permet de déterminer si le régime est limité par la croissance bactérienne ou par le transfert de matière. En complément, le coefficient γ_{s,O_2} permet de déterminer si la croissance des bactéries hétérotrophes est limitée par la disponibilité en substrat organique ou par la disponibilité en oxygène. D'après la littérature, deux phénomènes importants ont été identifiés comme ayant un impact significatif sur la compétition microbienne au sein d'un biofilm : les limitations en substrat(s), et le détachement.

L'étude de l'impact des limitations en substrat(s) s'est majoritairement focalisée sur l'analyse de la compétition pour l'oxygène. D'après la littérature, une augmentation du coefficient γ_{s,O_2} entraîne une disparition de la nitrification. Le seuil critique en termes de coefficient γ_{s,O_2} à partir duquel les bactéries autotrophes sont éliminées du système n'est cependant pas formellement identifié. Le mode de compétition est à vérifier. Par ailleurs, la majorité des études est réalisée sur des biofilms fins (<1000 μm) et jeunes (< temps nécessaire pour atteindre une épaisseur constante). Une étude poussée, de biofilms matures et épais, développés sous des conditions d'environnements de croissance et hydrodynamiques contrôlées et variées, paraissait nécessaire. En parallèle de la limitation par l'oxygène il convenait également d'analyser les mécanismes de compétition pour l'azote.

Le détachement est également reconnu comme ayant une influence significative sur la compétition microbienne entre bactéries autotrophes et hétérotrophes. Au démarrage de cette thèse, les mécanismes de détachement des biofilms n'étaient que peu étudiés et pas clairement identifiés. La définition des processus de détachement restait en outre très arbitraire puisque basée sur la taille des particules détachées. D'après l'étude numérique de Morgenroth et Wilderer (2000), le mode de détachement a un impact direct sur les taux observés de réaction et sur les dynamiques de populations. Malgré son intérêt, une confirmation expérimentale de ces résultats de simulations était nécessaire.

A cet effet, Elenter *et al.* (2007) s'est focalisée sur le comportement de systèmes biofilms mixtes autotrophes-hétérotrophes soumis à des évènements de détachement volumiques, pendant des périodes longues (>6mois). Malgré le très grand intérêt de ce travail, le détachement volumique des biofilms n'était pas suffisamment contrôlé lorsque de fortes charges organiques étaient appliquées. Par ailleurs, la fréquence de ces évènements était trop faible pour mettre en situation de compétition les bactéries autotrophes et hétérotrophes. Par conséquent, l'étude d'Elenter *et al.* (2007) ne permettait pas de tirer des conclusions précises concernant l'impact du mode de détachement sur la compétition entre les différentes populations fonctionnelles.

En conclusion de la synthèse bibliographique présentée au début de ce manuscrit, les différents objectifs de ce travail de thèse ont été définis. Ainsi, cette étude avait comme objectifs d'analyser les mécanismes de compétition à travers l'analyse couplée de résultats de simulations et de résultats expérimentaux. Par conséquent le développement d'un modèle de croissance 1-D a constitué notre première tâche. Il s'agissait de développer un outil qualitatif permettant d'éprouver le comportement d'un système biofilm éliminant l'azote sous différentes conditions de croissance. L'objectif n'était donc pas de développer un outil quantitatif, calibré à partir d'un jeu de données expérimentales et permettant d'effectuer une identification de paramètre.

D'un point de vue expérimental, l'enjeu était de développer les biofilms sous des conditions d'environnement de croissance et hydrodynamiques contrôlées, et permettant d'induire des situations de compétition variées entre les différentes populations fonctionnelles afin d'identifier les mécanismes la gouvernant.

Concernant l'étude de l'impact du détachement, les objectifs étaient :

- De caractériser les mécanismes de détachement, notamment en termes d'amplitude et de fréquence, par la caractérisation conjointe du biofilm résiduel et des particules détachées, dans le but d'élucider le mode de détachement des biofilms. Cette analyse devait notamment permettre

de fournir des éléments d'informations concernant la corrélation entre la structure du biofilm et les propriétés de détachement.

- D'identifier, pour différentes conditions d'environnements de croissance, l'impact du mode de détachement sur la compétition microbienne à travers l'analyse des prédictions du modèle, et de confirmer ces prédictions par des observations expérimentales.

Concernant l'étude de l'impact des conditions de croissance, les objectifs étaient :

- D'identifier l'effet de limitations en substrat(s) sur le comportement du système biofilm. Il s'agissait donc de mettre en place des situations de compétition entre les différentes populations fonctionnelles pour l'azote et pour l'oxygène. Notamment, il s'agissait d'identifier :
 - le seuil critique de ratio DCO/N à partir duquel les bactéries autotrophes sont éliminées du système biofilm.
 - le seuil critique de ratio DCO/O₂ à partir duquel les bactéries autotrophes sont éliminées du système biofilm.
- De proposer des modifications du modèle, en accord avec l'ensemble des résultats expérimentaux obtenus issus de l'analyse des différentes situations de compétition. Il s'agissait notamment d'évaluer différents processus spécifiques (détachement spécifique, convection particulière, etc) en termes d'impact sur la coexistence entre bactéries autotrophes et hétérotrophes.

Pour répondre à ces différentes interrogations, les biofilms ont été développés sous des conditions d'environnements de croissance variées et contrastées (différents accepteurs ou donneurs d'électrons, différents ratios DCO/N ou DCO/O₂, ...). Le large panel de conditions de croissance testées permet en effet d'identifier les mécanismes gouvernant les interactions entre bactéries autotrophes et hétérotrophes, et d'obtenir des résultats plutôt exhaustifs concernant le comportement du système biofilm.

Les principaux résultats obtenus au cours de ce travail sont les suivants :

- Un modèle 1-D qualitatif, dont la structure et le comportement permet de représenter correctement un grand nombre d'observations expérimentales, a été développé. Il ne s'agit pas d'un outil quantitatif dont les paramètres ont été calibrés à partir de données expérimentales, mais d'un outil qualitatif qui permet de prédire le comportement du système biofilm en termes de dynamiques de populations et de performances épuratoires. Ce modèle est multi-espèces (bactéries nitrifiantes, nitrifiantes, hétérotrophes aérobies facultatives, filamenteuses et biomasse inerte) et multi-substrats. La stratification de la densité n'est pas considérée. Un modèle de détachement fonction de l'épaisseur de biofilm et de la contrainte de détachement a été retenu, en accord avec les résultats expérimentaux montrant une stratification de la cohésion. Les capacités de prédiction du modèle ont été évaluées dans un cas d'étude « standard » pour lequel les donneurs d'électrons sont limitants. Dans ces conditions, les résultats du modèle sont en accord avec les observations expérimentales. Ce modèle est bien sûr perfectible. Nous aurions pu par exemple prendre en compte des processus de stockage intracellulaire, la présence de substrats particuliers ou encore des processus d'inhibition de la nitrification. Ce modèle sera complété tout au long des travaux de thèse pour rendre compte de nos observations (mode de détachement par exemple) ou pour tester des hypothèses (détachement spécifique de populations microbiennes par exemple).
- Un travail plus approfondi a été réalisé sur le détachement pour déterminer son mode d'action sur le biofilm. La caractérisation de l'érosion a été réalisée pour des biofilms développés sous des conditions d'environnements contrastées, notamment en termes de fonctionnalités. L'érosion a été redéfinie comme le couplage entre un phénomène de détachement surfacique continu de petites particules et des événements volumiques dynamiques détachant de larges particules. La fréquence de détachement est d'autant plus faible que la taille des particules détachées est élevée, ce qui concorde avec nos résultats concernant une stratification de la cohésion.
- Les fonctionnalités des biofilms, notamment la dénitrification, influencent significativement la morphologie développée. Les biofilms dénitrifiants sont plus fins et moins rugueux que les

biofilms non-dénitrifiants. Ils se détachent sous forme de particules dont la taille est plus faible que celles issues des biofilms non-dénitrifiants. La fraction d'épaisseur de biofilm affectée par un évènement de détachement volumique varie selon l'environnement de croissance, entre 25 et 80%. Une limitation forte en azote, en raison de la sélection des bactéries hétérotrophes de type filamenteuses, a une influence spécifique sur la morphologie du biofilm, particulièrement épais et rugueux.

- Une étude numérique de l'impact du mode de détachement a été ensuite réalisée sur la base de ces résultats expérimentaux. Différents modes de détachement, en termes de fractions d'épaisseur détachée et de fréquences, ont été testés. Ces évènements modifient l'apport en substrats dans les couches internes du biofilm, réduisant à la fois les cinétiques de lyse et d'inactivation à la base du biofilm et la distribution des TSS_{locaux} . A la surface du biofilm, les bactéries se développent avec une vitesse de croissance plus élevée comparé au cas d'un détachement surfacique continu. Une fréquence d'évènements faible autorise une recroissance significative des bactéries hétérotrophes à la surface du biofilm. Si l'oxygène est limitant, la croissance nette autotrophique est limitée. Si l'oxygène est en excès, la croissance autotrophique n'est jamais limitée par le mode de détachement. Pour une fréquence d'évènement élevée, la biomasse hétérotrophe est régulièrement éliminée du système, et c'est par conséquent la croissance autotrophique qui est favorisée. L'impact du mode de détachement dépend par conséquent de la nature de la population fonctionnelle détachée. Selon le modèle, pour le maintien de la nitrification, un coefficient γ_{s,O_2} limite, compris entre 0,26 et 0,44 est trouvé. Ce coefficient est calculé à partir des concentrations dans le liquide dans le cas référence d'un détachement surfacique continu.
- L'impact du mode de détachement a fait l'objet d'une validation expérimentale, afin d'éprouver les réponses du modèle dans le cas d'un biofilm partiellement pénétré par l'oxygène. Des évènements volumiques ont été répétés, entraînant une diminution du TSS_{global} à une valeur inférieure à $1j$, et une chute partielle de l'efficacité de nitrification. Les bactéries autotrophes ne sont pas éliminées par les jeux de compétition avec les bactéries hétérotrophes sous ces conditions, ce qui est en opposition avec les réponses du modèle dans le cas d'une charge

organique élevée ($25\text{gDCO}/\text{m}^2\cdot\text{j}$). Le maintien de la nitrification s'explique entre autre par la croissance autotrophique dans la couche basale du biofilm, très cohésive et donc jamais détachée lors d'un évènement ($\text{TSS}_{\text{local}}$ très élevé). Dans le cas d'un système biofilm partiellement pénétré en oxygène et soumis à des évènements volumiques, le modèle semble accorder un avantage surestimé à la croissance des bactéries hétérotrophes.

- Dans le cas d'un « ratio DCO/N élevé », les bactéries autotrophes se développent tant que l'azote est en excès par rapport aux besoins pour la croissance hétérotrophe. Le seuil de ratio DCO/N au-delà duquel les bactéries autotrophes ne peuvent pas se développer est donc directement fixé par le rendement de conversion Y_{Xsobs} . Expérimentalement, un seuil de $73\text{gDCO}/\text{gN}$ a été identifié, alors que dans le cas d'un détachement volumique dynamique, le modèle prévoit un seuil d'environ $15\text{gDCO}/\text{gN}$. L'élimination partielle mais élevée de la DCO n'a été maintenue qu'en raison d'un développement de bactéries hétérotrophes filamenteuses. La prise en compte de ce développement de filamenteuses (μ_{max} et K faibles) dans le modèle permet de déplacer ce seuil à une valeur similaire à celle expérimentalement identifiée.
- L'étude expérimentale du cas « ratio DCO/ O_2 élevé » confirme le décalage entre les observations expérimentales et les prédictions du modèle dans le cas d'un biofilm développé sous une charge organique élevée et partiellement pénétré par l'oxygène. L'avantage accordé par le modèle (dans sa configuration initiale) à la croissance hétérotrophique est surestimé, réduisant ainsi la disponibilité en oxygène pour la croissance autotrophique. Les constantes d'affinité pour l'oxygène des différentes populations fonctionnelles ne suffisent pas à expliquer ce résultat. Ce décalage est potentiellement expliqué par la fonction de dénitrification, qui réduit la consommation en oxygène pour l'élimination de la DCO. Cette hypothèse n'est cependant valable que si la dénitrification se produit au sein de microenvironnements anoxiques, développés dans des zones aérobies. Son impact potentiel sera d'autant plus significatif que la constante d'inhibition par l'oxygène des bactéries hétérotrophes dénitrifiantes est élevée, et que la constante de Monod pour l'oxygène des bactéries autotrophes est faible. Une identification précise des paramètres cinétiques biologiques est par conséquent demandée.

- Du fait des décalages entre les observations expérimentales et les simulations du modèle, d'autres processus spécifiques ont été évalués par rapport à leur impact sur l'implantation de la nitrification dans des conditions théoriques de forte compétition. La prise en compte d'un détachement spécifique et plus élevé des bactéries hétérotrophes par rapport aux bactéries autotrophes peut rendre compte du maintien de la nitrification sous des conditions de concentration en oxygène ou des conditions de charge organique surfacique *a priori* défavorable. Cette hypothèse se justifie par la capacité des bactéries autotrophes à se développer sous forme de clusters cellulaires denses, potentiellement très cohésifs. Ce détachement spécifique des bactéries hétérotrophes entraîne une diminution de leur TSS_{global} . Ainsi, les deux populations fonctionnelles coexistent dans une gamme de TSS_{BH} d'autant plus large que la concentration en oxygène est faible, en raison de la constante de Monod plus faible des bactéries nitrifiantes qui favorise leur croissance dans ces conditions. Un impact favorable de la convection particulière a également été identifié. Les bactéries autotrophes et hétérotrophes, dans le cas d'une distribution homogène des populations, coexistent dans une gamme de TSS_{BH} encore plus étendue que dans le cas d'une stratification stricte des populations fonctionnelles. Ces différentes hypothèses ayant un impact favorable sur l'implantation des bactéries autotrophes sous une limitation en oxygène, elles devront faire l'objet d'une évaluation expérimentale.

Ces trois hypothèses (cluster anoxiques, clusters autotrophiques, et convection particulière) soulèvent l'interrogation suivante, concernant la structure des modèles utilisés pour l'étude des interactions microbiennes : La stratification stricte des fonctionnalités, régulièrement prédite par les modèles 1-D (Wanner et Gujer, 1984, 1986 ; Wanner *et al.*, 2006 ; Morgenroth et Wilderer, 2000 ; Elenter *et al.*, 2007) ne fausse-t-elle pas la prédiction du résultat de la compétition entre bactéries autotrophes et hétérotrophes sous certaines conditions ?

En effet, la stratification prédite par les modèles 1-D engendre une surestimation de l'avantage accordé aux bactéries hétérotrophes.

Une stratification homogène réduit l'avantage des bactéries caractérisées par un taux de croissance élevé, comparées aux bactéries caractérisées par un taux de croissance faible. Ceci semble démontrer les limites d'une prédiction simplifiée des phénomènes de croissance et de détachement. L'utilisation de modèle 2-D ou 3-D, permettant de modéliser les hétérogénéités du système, apparaît comme un outil intéressant. L'impact du développement de clusters cellulaires, composés de bactéries autotrophes ou de bactéries dénitrifiantes, pourrait notamment être évalué à travers l'utilisation de ce type de modèles.

Remarquons enfin que ce travail n'a pas permis de répondre à l'ensemble des questions posées, et différents points devront de nouveau être abordés, ce qui représente les perspectives à ce travail :

- A court terme, une identification précise, expérimentale, du coefficient γ_{s,O_2} à partir duquel la répétition d'évènements volumique engendre une perte de nitrification est nécessaire. Se pose alors la question de la calibration du modèle. Initialement, le développement d'un modèle calibré n'était pas notre objectif. Au regard de la sensibilité du résultat de la compétition, une calibration du modèle est demandée. L'une des priorités est notamment de calibrer le modèle vis-à-vis de la diffusion de l'oxygène.
- A moyen terme, l'intégration de différents processus biologiques, tels que la production de substances exo-polymériques ou le stockage de composés intracellulaires, devra être réalisée. Ces mécanismes étant coûteux en énergie ou modifiant ponctuellement la consommation en oxygène, ils peuvent avoir un impact sur le résultat de la compétition entre bactéries autotrophes et hétérotrophes vis-à-vis de l'oxygène. Leur intégration au sein du modèle et leur évaluation constitue une piste d'étude intéressante. Le développement d'un modèle 3-D de type automate cellulaire, permettant de décrire les hétérogénéités du biofilm, représente également une piste de

recherche intéressante, notamment pour identifier les mécanismes de compétition dans le cas d'une limitation en oxygène.

- A long terme, le développement d'un outil d'estimation des TSS globaux et locaux spécifiques aux populations fonctionnelles devrait être développé, dans une optique de dimensionnement précis des réacteurs à biomasse fixée utilisé pour le traitement des eaux résiduaires urbaines.
- En dernier lieu, une étude sur l'impact d'une biomasse en suspension sur la distribution des populations dans un biofilm a été réalisée mais n'a pas été intégrée dans ce manuscrit. Elle permet d'envisager une caractérisation du fonctionnement des réacteurs hybrides à lit mobile. Une communication au congrès Biofilm III de Munich (2008) a été présentée. Ce travail apporte ainsi une contribution pour améliorer le dimensionnement des réacteurs à biomasse fixée.

Liste de références

Afnor. 1994. Qualité de l'eau. Recueil de normes françaises.

Allison D.G., McBain, A.J., and Gilbert, P. 2003. Biofilms: problems of control. In "Community structure and cooperation in Biofilms" (ed. Allison D.G., Gilbert, P., Lappin-Scott, H-P. and Wilson, M.). 59, pp. 39-327.

Alpkvist E., Picioreanu, C., van Loosdrecht, M.C.M., and Heyden, A. 2006. Three-dimensional biofilm model with individual cells and continuum EPS matrix. *Biotech. Bioeng.*, 94, pp. 961-979.

Bailey J.E. 1998. Mathematical modeling and analysis in biochemical engineering: past accomplishments and future opportunities. *Biotech. Prog.*, 14, pp. 8-20.

Bakke R., Trulear, M.G., Robinson, J.A., and Characklis, W.G. 1984. Activity of *Pseudomonas Aeruginosa* in biofilms: steady state. *Biotech. Bioeng.*, 26, pp. 1418-1424.

Bergey 1985. Aerobic Chemolithrophic bacteria and associated organisms. *Manual of systematic microbiology*, 3, pp. 1807-1834.

Bessière Y. 2008. Rapport interne sur la cohésion des floes.

Bishop P.L. and Rittman, B.E. 1995. Modeling heterogeneity in biofilms: report of the discussion session. *Water Sci. and Technol.*, 32, pp. 263-265.

Bock E., Koops, H.P., Harms, H., and Ahlers, B. 1991. The biochemistry of nitrifying organisms. Eds. *JM Shively & L.L. Barton, Variations in Autotrophic Life - Academic Press, New York.*

Bryers J.D. 1984. Biofilm formation and chemostat dynamics: pure and mixed culture considerations. *Biotech. Bioeng.*, 26, pp. 948.

Burrell P.C., Keller, J., and Blackall, L.L. 1998. Microbiology of a nitrite-oxidizing bioreactor. *Appl. Environ. Microbiol.*, 64, pp. 1878-1883.

Chang H.T. and Rittman, B.E. 1987. Mathematical modeling of biofilm on activated carbon. *Environ. Sci. Technol.*, 21, pp. 273-280.

Characklis W.G. and Marshall, K. 1987. in "Biofilms", ed. by Characklis W.G. and Marshall, K. Wiley Series in Ecological and Applied Microbiology Series Editors: Ralph Mitchell.

Characklis W.G. and Wilderer, P.A. 1989. Structure and function of biofilms. Wiley, New York, 6-9.

Choi C. and Morgenroth, E. 2003. Monitoring biofilm detachment under dynamic changes in shear stress using laser-based particle size analysis and mass fractionation. *Water Sci. and Technol.*, 47, pp. 69-76.

Costerton J.W., Lewandowski, Z., Caldwell, D.E., Korber, D.R., and Lappin-Scott, H.M. 1995. Microbial Biofilm, *Annu. Rev. Microbiol.*

Coufort C., Derlon, N., Ochoa-Chaves, J., Line, A., and Paul, E. 2007. Cohesion and detachment in biofilm systems for different electron acceptors and donors. *Water Sci. and Technol.*, 55, pp. 421-428.

Coufort C. 2004. Manuscrit de thèse LISBP, INSA Toulouse.

De Beer D. and Stoodley P. 1995. Relation between the structure of an anaerobic biofilm and transport phenomena. *Water Sci. and Technol.*, 32, pp. 11-18.

De Beer D., Stoodley P., and Lewandowski Z. 1996. Liquid flow and mass transport in heterogeneous biofilms. *Water Res.*, 30, pp. 2761-2765.

De Beer D., Stoodley P., Roe F., and Lewandowski Z. 1994. Effects of biofilm structures on oxygen distribution and mass transport. *Biotech. Bioeng.*, 43, pp. 1131-1138.

De Kruif P. 1927. *Mikroben Jäger*. Art. Institut Orell Füssli, Zurich.

Derlon N., Masse, A., Escudie, R., Bernet, N., and Paul, E. 2008. Stratification in the cohesion of biofilms grown under various environmental conditions. *Water Res.*, 42, pp. 2102-2110.

Dockery J. and Klapper, I. 2001. Finger formation in biofilm layers. *SIAM J. Appl. Math.*, 62, pp. 853-869.

Elenter D., Milferstedt, K., Zhang, W., Hausner, M., and Morgenroth, E. 2007. Influence of detachment on substrate removal and microbial ecology in a heterotrophic/autotrophic biofilm. *Water Res.*, 41, pp. 4657-4671.

Elsmore R., Gilbert, P., Ludensky, M., and Coulbrum, J. 1999. Biofilm in paper manufacturing. In: Wimpenny, Gilbert, Walker, Brading, (Eds), *Biofilms: The Good, the bad and the Ugly*. Bais Bioline, Cardif. 81-89.

Fdz-Polanco F., Mendez, E., Uruena, M.A., Villaverde, S., and Garcia, P.A. 2000. Spatial distribution of heterotrophs and nitrifiers in a submerged biofilter for nitrification. *Water Res.*, 34, pp. 4081-4089.

Fruehn M., Christian, E., Gujer, W., and Wanner, O. 1991. Significance of spatial distribution of microbial species in mixed culture biofilms. *Water Sci. and Technol.*, 23, pp. 1365-1374.

Garrido J.M., Van Benthum, W.A.J., Van Loosdrecht, M.C.M., and Heijnen, J.J. 1997. Influence of dissolved oxygen concentration on nitrite accumulation in a biofilm airlift suspension reactor. *Biotech. Bioeng.*, 53, pp. 168-178.

Grady C.P.L. and Lim, H.C. 1980. *Biological Wastewater Treatment: Theory and Applications*. Marcel Dekker. New York.

Gujer W., Henze, M., Mino, T., and van Loosdrecht M.C.M. 1999. Activated Sludge Model No.3. *Water Sci. and Technol.*, 39, pp. 183-193.

Gujer W., Henze, M., Mino, T., Matsuo T., Wentzel, M.C., and Marais, G.V.R. 1995. The activated Sludge Model No. 2: Biological phosphorus removal. *Water Sci. and Technol.*, 31, pp. 1-11.

Hao X., Heijnen, J.J., and van Loosdrecht, M.C.M. 2002. Sensitivity analysis of a biofilm model describing a one-stage completely autotrophic nitrogen removal (CANON) process. *Biotechn. Bioeng.*, 77, pp. 266-277.

Hellinga C., Schellen, A., Mulder, J.W., van Loosdrecht, M.C.M., and Heijnen, J.J. 1998. The SHARON process: an innovative method for nitrogen removal from ammonium-rich waste water. *Water Sci. and Technol.*, 37, pp. 135-142.

- Jang A., Yoon, Y.-H., Kim, I.S., Kim, K.-S., and Bishop, P.L. 2003. Characterization and evaluation of aerobic granules in sequencing batch reactor. *Journal of Biotechnology*, 105, pp. 71-82.
- Juretschko S., Timmermann, G., Schmid, M., Schleifer, K.H., Pommerening-Roser, A., Koops, H.-P., and Wagner, M. 1998. Combined molecular and conventional analysis of nitrifying bacterium diversity in activated sludge: *Nitrosococcus mobilis* and *Nitrospira*-Like bacteria as dominant populations. *Applied and environmental microbiology*, 64.
- Kim H. and Pagilla, K.R. 2000. Competitive growth of *Norcadia* and *Acinetobacter* under anaerobic/aerobic batch operation. *Water Res.*, 34, pp. 2667-2674.
- Kindaichi T., Kawano, Y., Ito, T., Satoh, H., and Okabe, S. 2006. Population dynamics and in situ kinetics of nitrifying bacteria in autotrophic nitrifying biofilms as determined by real-time quantitative PCR. *Biotech. Bioeng.*, 94, pp. 1111-1121.
- Kissel J.C., Mc Carty, P.L., and Street L.R. 1984. Numerical simulation of mixed-culture biofilm. *J. Environ. Eng.*, 110, pp. 393-411.
- Koops H.P. and Pommering-Röser, A. 2001. Distribution and ecophysiology of nitrifying bacteria emphasizing cultured species. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 37, pp. 1-9.
- Kreft J.-U. and Wimpenny, J.W.T. 2001. Effect of EPS on biofilm structure and function as revealed by an individual-based model of biofilm growth. *Water Sci. Technol.*, 6, pp. 135-141.
- Kreikenbohm R. and Stephan, W. 1985. Application of a two-compartment model to the wall growth of *Pelobacter acidigallici* under continuous culture conditions. *Biotech. Bioeng.*, 27, pp. 296-301.
- Kwok W.K., Picioreanu, C., Ong, S.L., van Loosdrecht, M.C.M., Ng, W.J., and Heijnen, J.J. 1998. Influence of biomass production and detachment forces on biofilm structures in a biofilm airlift suspension reactor. *Biotech. Bioeng.*, 58, pp. 400-407.
- Lackner S., Terada, A., and Smets, B. 2008. Heterotrophic activity compromises autotrophic nitrogen removal in membrane-aerated biofilms. Results of a modeling study. *Water Res.*, 42, pp. 1102-1112.
- Lee H.S., Park, S.J., and Yoon, T.I. 2002. Wastewater treatment in a hybrid biological reactor using powdered minerals: effects of organic loading rates on COD removal and nitrification. *Process Biochemistry*, 38, pp. 81-88.
- Melo L.F. and Bott. 1998. T.R. Biofouling in water systems. *Experiments in Thermal Fluid Sciences*, 14, pp. 375-381.
- Melo L.F. and Vieira, M.J. 1999. Physical stability and biological activity of biofilms under turbulent flow and low substrate concentration. *Bioprocess Eng.*, 20, pp. 363-368.
- Metcalf and Eddy. 1998. *Wastewater Engineering, treatment disposal reuse*. Thir Edition. McGraw-Hill International Edition.
- Morgenroth E. 2003. Biofilm detachment in "Biofilm in wastewater treatment". Wiley ed.
- Morgenroth E. and Wilderer, P.A. 2000. Influence of detachment mechanisms on competition in biofilms. *Water Res.*, 34, pp. 417-426.

Nogueira R., Elenter, D., Brito, A., Melo, L.F., Wagner, M., and Morgenroth, E. 2005. Evaluating heterotrophic growth in nitrifying biofilm reactor using fluorescence in situ hybridization and mathematical modeling. *Water Sci. and Technol.*, pp 135-141.

Ochoa J.-C. 2008. Manuscrit de thèse, LISBP, INSA Toulouse.

Ochoa J.-C., Coufort, C., Escudie, R., Line, A., and Paul, E. 2007. Influence of non-uniform distribution of shear stress on aerobic biofilms. *Chemical Engineering Science*, 62, pp. 3672-3684.

O'Flaherty V. and Lens, P. In: Lens P., Moran P.A., Mahony T., Stoodley P., O'Flaherty V. (Eds). *Biofilm in Medicine, Industry and Environmental Biotechnology*. IWA Publishing. UK, 132-159.

Ohashi A. and Harada, H. 1994. Adhesion strength of biofilm developed in a attached-growth reactor. *Water Sci. and Technol.*, 32, pp. 67-74.

Ohashi A., Koyama, T., Syutsubo, K., and Harada, H. 1999. A novel method for evaluation of biofilm tensile strength resisting to erosion. *Water Sci. and Technol.*, 39, pp. 261-268.

Ohashi A., Mobarry, B., Manem, J.A., Stahl, D.A., and Rittmann, B.E. 1995. Influence of substrate c/n ratio on the structure of multi-species biofilms consisting of nitrifiers and heterotrophs. *Water Science and Technology*, 32, pp. 75-84.

Okabe S., Hirata, K., and Watanabe, Y. 1995. Dynamic changes in spatial microbial distribution in mixed population biofilms: experimental results and model simulation. *Wat. Sci. and Technol.*, 38, pp. 67-74.

Okabe S., Hiratia, K., Ozawa, Y., and Watanabe, Y. 1996. Spatial microbial distributions of nitrifiers and heterotrophs in mixed-population biofilms. *Biotech. Bioeng.*, 50, pp. 24-35.

Pambrun V. 2005. Analyse et modélisation de la nitrification partielle et de la précipitation concomitante du phosphore dans un réacteur alimentation séquencée, Thèse LISBP, INSA Toulouse.

Peyton B.M. and Characklis, W.G. 1993. A statistical analysis of the effect of substrate utilization and shear stress on the kinetics of biofilm detachment. *Biotech. Bioeng.*, 41, pp. 728-735.

Picioreanu C., van Loosdrecht, M.C.M., and Heijnen, J.J. 1998. Mathematical modeling of biofilm structure with a hybrid differential discrete cellular automaton approach. *Biotech. Bioeng.*, 58, pp. 101-116.

Picioreanu C., van Loosdrecht, M.C.M., and Heijnen, J.J. 2000a. A theoretical study on the effect of surface roughness on mass transport and transformation in biofilms. *Biotech. Bioeng.*, 68, pp. 354-369.

Picioreanu C., van Loosdrecht, M.C.M., and Heijnen, J.J. 2000b. Effect of diffusive and convective substrate transport on biofilm structure formation: a two dimensional modeling study. *Biotech. Bioeng.*, 69, pp. 504-515.

Picioreanu C., van Loosdrecht, M.C.M., and Heijnen, J.J. 2001. Two-dimensional model of biofilm detachment caused by internal stress from liquid flow. *Biotech. Bioeng.*, 72, pp. 205-218.

Raskin L., Rittmann, B.E., and Stahl, D.A. 1996. Competition and Coexistence of Sulfate-Reducing and Methanogenic Populations in Anaerobic Biofilms. *Appl. Environ. Microbiol.*, 62, pp. 3847-3857.

Reichert P. and Wanner, O. 1997. Movement of solids in biofilms: significance of liquid phase transport. *Water Sci. Technol.*, 36, pp. 321-328.

Rittman B. and MacCarty, P. 1982. Model of steady-state biofilm kinetics. *Biotech. Bioeng.*, 22, pp. 2343-2357.

Rittman B.E. , Pettis, M., Reeves, H.W., and Stahl, D.A. 1999. How biofilm clusters affect substrate flux and ecological selection. *Water Sci. and Technol.*, 39, pp. 99-105.

Rittman B.E. 1989. Detachment from biofilms. In "Structure and function of biofilms", eds W.G. Characklis and P.A. Wilderer, Wiley, New York. 49-58.

Schramm A., de Beer, D., Van Den Heuvel, J.C., Ottengraf, S., and Amann, R. 1999. Microscale distribution of populations and activities of *nitrosospira* and *nitrospira* spp along a macroscale gradient in nitrifying bioreactor: quantification by In Situ hybridization and the use of microsensors. *Applied and environmental microbiology*, 65, pp. 3690-3696.

Schramm A., de Beer, D., Wagner, M., and Amann, R. 1998. Identification and activities In Situ of *Nitrosospira* and *Nitrospira* spp as dominant populations in a nitrifying fluidized bed reactor. *Applied and environmental microbiology*, 64, pp. 3480-3485.

Slikers A.O., Derwort, N., Gomez, J.L.C., Strous, M., Kuenen, J.G., and Jetten, M.S.M. 2002. Completely autotrophic nitrogen removal over nitrite in one single reactor. *Water Res.*, 36, pp. 2475-2482.

Speitel G.E. and DiGiano, F.A. 1987. Biofilm shearing under dynamic conditions. *J. Environ. Eng. ASCE*, 113, pp. 464.

Sperandio M. 1998. Manuscrit de these. LISBP, INSA Toulouse.

Stewart P.S. 1993. A model of biofilm detachment. *Biotech. Bioeng.*, 41, pp. 111-117.

Stoodley P., De Beer, D., and Lewandowski, Z. 1994. Liquid flow in biofilm systems . *Applied and Environmental Microbiology*, 60, pp. 2711-2716.

Stoodley P., Lewandowski, Z., Boyle, J.D., and Lappin-Scott, H.M. 1999. Structural deformation of bacterial biofilm caused by short-term fluctuations in fluid shear: an in situ investigation of biofilm rheology. *Biotech. Bioeng.*, 65, pp. 83-92.

Strous M. 2000. Microbiology of anaerobic ammonium oxydation. PhD Thesis.

Sutherland I.W. 2001. Biofilm exopolysaccharides: a strong and sticky framework. *Microbiology*, 147, pp. 3-9.

Suzuki I., Dular, U., and Kwok, S.C. 1974. Ammonia or ammonium ion as substrate for oxidation by *Nitrosomonas Europaea* cells and extracts. *J. Bacteriology*, 120, pp. 556.

Tchobanoglous G., Burton, F.L., and Stensel, H.D. 2003. Wastewater engineering, treatment and reuse, 4th ed, McGraw Hill, New York.

Tijhuis L., van Loosdrecht M.C.M., and Heijnen J.J. 1994. Dynamics of biofilm detachment in biofilm airlift suspension reactor. *Biotechnol. Bioeng.*, 46, pp. 258-269.

Trulear M.G. and Characklis, W.G. 1982. Dynamics of biofilm processes. *J. Water Pollut. Control Fed.*, 54, pp. 1288-1301.

Tsang Y.F., Sin, S.N., and Chua, H. 2007. Nocardia foaming control in activated sludge process treating domestic wastewater. *Bioresource Technology*.

Van Benthum W.A.J., Derissen, B.P., van Loosdrecht, M.C.M., and Heijnen, J.J. 1998. Nitrogen removal using nitrifying biofilm growth and denitrifying suspended growth in a biofilm airlift suspension reactor coupled with a chemostat. *Water Res.*, 32, pp. 2009-2018.

van Loosdrecht M.C.M. and Henze, M. 1999. Maintenance, endogeneous respiration, lysis, decay and predation. *Water Sci. and Tech.*, 39, pp. 107-117.

van Loosdrecht M., Eikelboom, D., Gjaltema, A., Mulder, A., Tjihuis, L., and Heijnen JJ. 1995. Biofilm structures. *Water Sci. and Technol.*, 32, pp. 35-43.

Verstraete W. and Philips, S. 1998. Nitrification-denitrification processes and technologies in new contexts. *Environmental Pollution*, 102, pp.

Wanner O. and Gujer, W. 1984. Competition in biofilms. *Water Sci. and Technol.*, 17, pp. 27-44.

Wanner O. and Reichert P. 1996. Mathematical modeling of mixed-culture biofilms. *Biotech. Bioeng.*, 49, pp. 172-184.

Wanner O., Eberl, H., Morgenroth, E., Noguera, D., Picioreanu, C., Rittmann, B., and Van Loosdrecht, M. 2006. Mathematical modelling of biofilms. IWA Scientific and Technical Report No.18, IWA Publishing, ISBN 1843390876.,

Wäsche S., Horn, H., and Hempel, HC. 2000. Mass transfer phenomena in biofilm systems. *Water Sci. and Technol.*, 41, pp. 357-360.

Wäsche S., Horn, H., and Hempel, HC. 2002. Influence of growth conditions on biofilm development and mass transfer at the bulk/biofilm interface. *Water Res.*, 36, pp 1775-1784.

Xavier J.B., Picioreanu, C., and van Loosdrecht, M.C.M. 2005. A general description of detachment for multidimensional modelling of biofilm. *Biotech. Bioeng.*, 91, pp. 651-669.

Zhang T.C., Fu, Y.C., and Bishop, P.L. 1994. Competition in biofilms. *Water Sci. and Technol.*, 29, pp. 263-270.

Zhang TC. and Bishop, PL. 1994. Density, porosity and pore structure of biofilms. *Water Res.*, 28, pp. 2267-2277.