



**HAL**  
open science

# Etude et modélisation de la compétition entre bactéries planctoniques et attachées dans un réacteur aérobie à biofilm

Adeline Caylet

► **To cite this version:**

Adeline Caylet. Etude et modélisation de la compétition entre bactéries planctoniques et attachées dans un réacteur aérobie à biofilm. Sciences du Vivant [q-bio]. Université Montpellier 2 (Sciences et Techniques), 2010. Français. NNT: . tel-02817954

**HAL Id: tel-02817954**

**<https://hal.inrae.fr/tel-02817954v1>**

Submitted on 6 Jun 2020

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

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

**UNIVERSITE MONTPELLIER II  
SCIENCES ET TECHNIQUES DU LANGUEDOC**

**T H E S E**

pour obtenir le grade de

**DOCTEUR DE L'UNIVERSITE MONTPELLIER II**

Discipline : Génie des Procédés  
Ecole Doctorale : Science des Procédés-Science des Aliments

présentée et soutenue publiquement

par

**Adeline CAYLET**

le jeudi 9 décembre 2010

**Etude et modélisation de la compétition entre bactéries  
planctoniques et attachées dans un réacteur aérobie à biofilm**

**JURY**

<b>M. Thierry BENEZECH</b> Directeur de Recherche	<i>INRA Lille</i>	Examineur
<b>M. Nicolas BERNET</b> Directeur de Recherche	<i>INRA Narbonne</i>	Directeur de thèse
<b>M. Stéphan BROSILLON</b> Professeur	<i>Université Montpellier II</i>	Président du jury
<b>M. Renaud ESCUDIE</b> Chargé de Recherche	<i>INRA Narbonne</i>	Co-directeur de thèse
<b>M. Gérard MERLIN</b> Professeur	<i>Université de Savoie</i>	Rapporteur
<b>M. Mathieu SPERANDIO</b> Professeur	<i>INSA Toulouse</i>	Rapporteur



# Remerciements

*Comment puis-je commencer les remerciements sans dire tout simplement « merci à tous ». Souvent on dit que cette partie est la partie la plus dure à rédiger car, après 3 ans, la partie la plus simple du manuscrit reste la partie la plus complexe... mais elle permet de tourner la page aux huit années d'étude, et de terminer les quatre années de l'aventure narbonnaise par l'écriture de ce manuscrit...*

*Tout d'abord, merci à Jean-Philippe Delgenès, directeur de l'Unité, et son successeur, Jean-Philippe Steyer, pour m'avoir accueillie au sein du Laboratoire de Biotechnologie de l'Environnement (LBE). Merci pour leur bonne humeur et leur disponibilité.*

*Je voudrais aussi exprimer ma gratitude à l'ensemble du jury, M. le professeur Stéphan Brosillon de l'Université Montpellier II, pour avoir accepté la présidence de ce jury, et plus particulièrement les deux rapporteurs de ces travaux, M. le professeur Gérard Merlin de l'Université de Savoie et M. le professeur Mathieu Spérandio de l'INSA de Toulouse, pour leurs contributions à la version finale de ce mémoire, par leurs remarques et leurs suggestions.*

*Je tiens, ensuite, à remercier mes deux co-directeurs de thèses, M. Nicolas Bernet, directeur de recherche INRA et responsable de l'objet thématique « Biofilms Mixtes en Réacteurs » au LBE, et M. Renaud Escudié, chargé de recherche INRA au LBE, de m'avoir confié ce projet de recherche. Cette codirection, scientifiquement complémentaire, a été d'une grande richesse pour l'évolution de mon travail. Un grand merci en particulier pour votre confiance, votre investissement, votre patience, mais aussi votre sincérité tout au long de ces trois ans. Je vous souhaite à tous les deux de longues et fructueuses collaborations.*

*J'adresse mes remerciements à M. le professeur Etienne Paul de l'INSA de Toulouse, pour m'avoir suivi tout le long de ces dernières années. Tout d'abord en tant que tuteur durant mes stages d'étude, et puis, pour ses conseils et ses remarques pertinentes durant les réunions des comités de thèse (« Les choses les plus dures sont toujours les choses les plus difficiles à entendre... »). Merci aussi à M. Thierry Benezech, directeur de recherche à l'INRA de Lille d'avoir participé à l'évolution et l'évaluation de cette thèse. Vos conseils, vos remarques et vos encouragements ont été bénéfiques.*

*Merci à l'ensemble du personnel du LBE. Tout d'abord, merci aussi aux autres membres de l'équipe « Biofilms », Fred Habouzit (« Vive l'Occitanie indépendante ! »), et Kim Milferstedt (pour qui les transits entre les gares Londoniennes l'ont fait bien rire...). Merci pour les bons moments, la bonne humeur et leurs sympathies... Merci aussi à Gaëlle Gévaudan, à qui je tiens à exprimer ma plus profonde estime. Sans son aide, une grande partie des travaux en microbiologie n'aurait pu être réalisée. Merci pour sa disponibilité et son implication. Merci à Jérôme Hamelin pour toutes les discussions sur la biodiversité et l'aide pour les analyses statistiques (« eh oui, le casque est dur ! »). Merci à Doris Brockmann pour toute son aide et ses conseils pour l'étape de modélisation, pour sa disponibilité et pour son amitié (« Ses pommes au four sont délicieuses ! »). Merci à Sylvie, Annie, Alexandra, Véronique, Isabelle et Nadine (« ma petite collègue de co-voiturage »), pour leur bonne humeur permanente et leur aide dans les chemins sombres de l'administration.*

*Merci à mes collègues de bureau et notamment Philippe Sousbie (futur chef retraité de la gastronomie française : « la préparation de l'Aligot n'est pas un secret pour lui ! »). Merci pour ses discussions sur la métrologie, l'automatisme et pour les fous rires avec nos « réflexions » sur la vie courante. Merci aussi à Ganesh (« Thank you for the indian tea ! »). Merci aux LBE-iens, pour leurs gentillesse et leurs discussions au cours de ces dernières années formidables, Hélène (première personne qui m'a accueilli au labo), Thierry (« C'est la lutte finale... »), Nathalie, Valérie, Audrey,*

*Guillaume,...mais aussi aux autres thésards : Amel, Liliana, Xin-Mei, ... courage c'est plus très long...et Sarah, allez ma « vieille » tient bon ! Juan ne flanche plus...courage...*

*Un grand merci particulièrement à Anaïs Bonnafous, (« Titi, la Coach du volley qui adore la couleur rose»), à Virginie Rossard (« Zen attitude! ») et Olivier LeGoff (« Le Bureau du fond restera toujours le camp Breton résistant aux invasions des Occitans! ») qui m'ont offert leur amitié si enrichissante et des grands moments de rigolade...Un petit clin d'œil à l'équipe de volley INRA, à Stéphanie ainsi que Flavien qui vient toujours encourager « sa Titi » ; et aux filles de Cuxac d'Aude pour les soirées d'entraînement.*

*Merci à M. Aimé Bascoul et aux profs de l'IUT Génie Chimique-Génie des Procédés de Toulouse pour leurs enseignements intéressants et passionnants...Merci aux anciens élèves du Lycée « Saint Gab » de Saint-Affrique, les profs, l'équipe des anciens élèves avec notamment M. Michel Roustan qui m'avait très bien conseillé sur mon orientation professionnelle. Donc merci...*

*Toutes ces années n'auraient pas été si gratifiantes et si riches sans des amitiés qui se sont confortées au fil du temps : Elo (« Elle court, elle court la Sénégalaise ! »), Stéph et Pascal (« les toulousains »), Laure (« l'expatriée bretonne »), Claire (« l'infirmière Soulage »), Rémi et leur petit Théo. Mais aussi Pauline, Marie-Amélie et Fabrice et leur petite Miss Bretzel Lilie, Maé et Damien (« les musicos des Enfoiros ! »), Chloé et Matéo (les vélo-Globetrotteurs : « Après l'Europe, l'Afrique, alors ? »), Iréna et Vince (« ah ! La Tchèque ! »), Milie et ses PO adorées, Agnès (« La flûte enchantée n'est pas un secret pour elle ! »), Lise (« Vive l'internat ! »), Caro, Cécile, Coustoune, Raphaël, Gaëlle, Teuch, Marianne, Maxime, Eveline, ... et aux amis outre France: Sen, Arul, Adi et Trupti (Inde), Jason (Kenya), Charly et Teddy (Chine), Asma (Arabie Saoudite) ; Thanya Nu (Thaïlande), Than Mei (Viêt-Nam), Mathieu et sa petite famille, Anita et Zacharie (Suisse), les italiens et enfin, Angy et Jimmy (Polynésie Française)...merci à tous pour vos encouragements malgré les distances. Merci à Sylvain pour son soutien et son amitié. Mais aussi à Jérôme qui a toujours le petit mot pour me « décourager » dans les moments difficiles...*

*Merci à tous les amis proches de ma famille, les « pêcheurs de la truite échappée » : Alain, Damienne, Audrey ; les « pais bas sol » : Sylvie, Loulou, Francis, Irène, les « aventuriers du Burkina Faso » et les « amis du Vidourle »...Merci à ma famille et notamment à mes oncles « Les jumeaux », David et Jérôme, mais aussi Karine et Marie-Hélène, et les cousins : Corentin (« le dernier rugbyman de la famille... ») Mathide, Valentine et Emma (« les petites basketteuses ...»); Linou et Pierre. Une pensée aussi à ma « petite mamie », qui m'a appris très tôt et par son expérience de toujours affronter la vie avec le sourire, et aussi à mon grand-père qui nous a quitté peu avant la rédaction de ce mémoire...*

*Le meilleur pour la fin ! Merci à mes parents, « Dédou » et Cécile, et à mon frère Alex et Sarah, que dire sinon que je les aime....*

*« Grazie mille!! »*

# Nomenclature

## Caractères romains

$a$	Abondance (-)
$A_{\text{sup port}}$	Surface du support ( $L^2$ )
$A_f$	Surface totale colonisée par la biofilm ( $L^2$ )
$b_H$	Constante de la respiration endogène ( $T^{-1}$ )
$c$	Caractérisation de la Concentration
$C_S$ ou $S$	Concentration en substrat ( $M_{\text{DCO}}.L^{-3}$ )
$C_X$ ou $X$	Concentration en biomasse ( $M_{\text{DCO}_X}.L^{-3}$ ou $M_{\text{DCO}}.L^{-3}$ )
$COT$	Carbone Organique Total ( $M_{\text{COT}}.L^{-3}$ )
$CSA$	Charge Surfaccique Appliquée ( $M.L^{-2}.T^{-1}$ )
$d_H$	Constante de décès de la biomasse ( $T^{-1}$ )
$d$	Constante de disparition de la biomasse
$DCO$	Demande chimique en oxygène ( $M_{\text{DCO}}.L^{-3}$ ), On note DCO, celle qui est utilisée pour exprimer la DCO soluble ou du substrat et $DCO_X$ lorsque l'on parle de la DCO particulaire ou de la biomasse
$DE$	Distance Euclidienne (L)
$D_h$	Diamètre hydraulique (L)
$D, D_i$	Coefficient de diffusion d'un composé dans le liquide ( $L^2.T^{-1}$ )
$D_f$	Coefficient de diffusion d'un composé dans le biofilm ( $L^2.T^{-1}$ )
$e$	Entrefer (L)
$f_D$	Facteur de diffusion (-)
$f_{XI}$	Fraction de la biomasse inerte (-)
$G$	Régime de croissance (-)
$H'$	Indice de Shannon-Weaver
$HL$	Distance de Hellinger (L)
$I$	Courant électrique (I)
$ID$	Indice de Simpson (-)
$k_d$	Constante de détachement du biofilm
$k_L a$	Coefficient de transfert volumique
$K_S$	Constante d'affinité de Monod ( $M.L^{-3}$ )
$K_{O_2}$	Constante d'affinité de Monod ( $M.L^{-3}$ )
$L_L$	Epaisseur de la couche diffusionnelle du biofilm (L)
$L_f$	Epaisseur du biofilm (L)
$MES$	Matière En Suspension ( $M_{\text{MES}}.L^{-3}$ )
$MH$	Matière Humide ( $M_{\text{MH}}.L^{-2}$ )
$MO$	Matière Organique ( $M_{\text{MO}}.L^{-3}$ )
$MVS$	Matière Volatile en Suspension ( $M_{\text{MVS}}.L^{-3}$ )
$MS$	Matière Sèche ( $M_{\text{MS}}.L^{-3}$ )
$MSA$	Matière Sèche Attachée ( $M_{\text{MSA}}.L^{-2}$ )
$N$	Nombre d'individu d'une espèce microbienne (-)
$Q$	Débit volumique ( $L.T^{-1}$ )

$r_x$	Vitesse de production de la biomasse ( $M.T^{-1}$ )
$r_s$	Vitesse d'utilisation du substrat ( $M.T^{-1}$ )
$r_d$	Vitesse de disparition de la biomasse ( $M.T^{-1}$ )
$R$ ou $R_2$ ou $R_1$	Rayon (externe, 2 ou interne, 1) des cylindres (L)
$Re$	Nombre de Reynolds (-)
$Re^*$	Stirring effect (%)
$S$ ou $C_S$	Concentration en substrat ( $M_{DCO}.L^{-3}$ )
$t_{90}$	Temps de réponse (T)
$T$	Température ( $\theta$ )
$Ta$	Nombre de Taylor (-)
$TSH$	Temps de séjour hydraulique (T)
$U$ ou $u$	Caractérisation de la vitesse
$u_f$	Vitesse de croissance du biofilm ( $L.T^{-1}$ )
$u_{de}$	Vitesse de détachement ( $L.T^{-1}$ )
$u_{att}$	Vitesse d'attachement ( $L.T^{-1}$ )
$V$	Volume ( $L^3$ )
$V_U$	Volume utile ( $L^3$ )
$X_I$	Concentration en biomasse inerte ( $M_{DCOx}.L^{-3}$ ou $M_{DCO}.L^{-3}$ )
$X_H$ ou $X$ ou $C_X$	Concentration en biomasse ( $M_{DCOx}.L^{-3}$ ou $M_{DCO}.L^{-3}$ )
$Y_{X/S}, Y_H$	Yield ( $M_{DCOx}. M_{DCO}^{-1}$ )
$z$	Profondeur (L)

#### Caractères grecs :

$\delta$	Taux de dilution ( $T^{-1}$ )
$\varepsilon$	Fraction du biofilm (-)
$\theta$	Porosité (-)
$\kappa$	Facteur de tortuosité (-)
$\mu$	Viscosité dynamique d'un fluide ( $M.L^{-1}.T^{-1}$ )
$\mu_H$	Taux spécifique de croissance ( $T^{-1}$ )
$\mu_{max}$	Taux spécifique de croissance maximal ( $T^{-1}$ )
$\nu$	Viscosité cinématique ( $L^2.T^{-1}$ )
$\rho$	Masse volumique du fluide ( $M.L^{-3}$ )
$\rho_f$	Densité du biofilm ( $M.L^{-3}$ )
$\eta$	Rendement (%)
$\tau$	Coefficient de tortuosité (-)
$\tau_p$	Taux de cisaillement (Pa)
$\Omega$	vitesse de rotation (RPM)

Sigles:

<i>ACP</i>	Analyse en Composantes Principales
<i>ADN</i>	Acide Désoxyribonucléique
<i>ADNr</i>	Acide Désoxyribonucléique ribosomique
<i>ANOSIM</i>	ANalysis Of SIMilarities
<i>ANOVA</i>	ANalysis Of VAriance
<i>ARDRA</i>	Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis
<i>ARISA</i>	Automated Ribosomal Intergenic Spacer Analysis
<i>CE</i>	Capillary electrophoresis
<i>DGGE</i>	Denaturing Gradient Gel Electrophoresis
<i>D/TGGE</i>	Denaturing/Temperature Gradient Gel Electrophoresis
<i>LH – PCR</i>	Length Heterogeneity - Polymerase Chain Reaction
<i>PCR</i>	Polymerase Chain Reaction
<i>RAR</i>	Réacteur Annulaire Rotatif
<i>RDA</i>	Redundancy Analysis
<i>RFLP</i>	Restriction Fragment Length Polymorphism
<i>RISA</i>	Ribosomal Intergenic Spacer Analysis
<i>SIMPER</i>	SIMilarity PERcentages procedure
<i>SSCP</i>	Single Strand Conformation Polymorphism
<i>T – RFLP</i>	Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism
<i>TTGE</i>	Temporal Temperature Gradient Gel Electrophoresis





# Sommaire

Introduction .....	1
Préambule.....	1
Objectifs .....	2
Organisation du document.....	3
Chapitre 1    Synthèse bibliographique .....	5
1.1    Introduction à la problématique.....	5
1.2    Les biofilms.....	7
1.2.1    Définition.....	7
1.2.2    Développement des biofilms .....	9
1.2.3    Formation du biofilm.....	11
1.2.4    Processus de transport dans le biofilm .....	16
1.2.5    Facteurs influençant la croissance du biofilm .....	18
1.3    Compétition microbienne dans un réacteur à biofilm .....	19
1.3.1    Compétition microbienne dans le liquide.....	19
1.3.2    Compétition microbienne au sein du biofilm .....	22
1.3.3    Compétition entre la biomasse en suspension et la biomasse planctonique .....	22
1.3.4    Régimes de croissance.....	23
1.4    Dispositifs expérimentaux pour l'étude des biofilms .....	23
1.4.1    Réacteurs utilisés pour la croissance des biofilms.....	23
1.4.2    Réacteur annulaire rotatif (RAR) .....	25
1.5    Techniques d'investigation des biofilms .....	31
1.5.1    Paramètres globaux .....	31
1.5.2    Force de cohésion.....	35
1.5.3    Exo-polymères (EPS).....	36
1.5.4    Activité et transfert au sein du biofilm .....	36

1.6	Stratégie moléculaire pour caractériser les écosystèmes microbiennes complexes .....	42
1.6.1	Microscopie (sondes moléculaires) .....	43
1.6.2	Amplification et analyse de l'ADN.....	43
1.6.3	Techniques d'empreintes moléculaires .....	45
1.7	Modèles mathématiques de biofilms .....	51
1.7.1	Une peu d'histoire.....	52
1.7.2	Construction d'un modèle de biofilm .....	52
1.7.3	Modèles multi-espèces .....	54
1.7.4	Modèles prenant en compte la diversité microbienne .....	55
1.8	Synthèse.....	55
Chapitre 2	Matériels et Méthodes .....	57
2.1	Dispositif expérimental .....	57
2.1.1	Réacteur annulaire rotatif (RAR) .....	57
2.1.2	Support de colonisation .....	58
2.1.3	Appareillage associé.....	59
2.1.4	Inoculum.....	60
2.1.5	Alimentation des réacteurs .....	61
2.1.6	Paramètres de fonctionnement des réacteurs.....	63
2.2	Mesure des variables biologiques.....	66
2.2.1	Dosage des matières en suspension (MES et MVS).....	66
2.2.2	Quantification de la biomasse fixée (matière humide MH et Matière Sèche Attachée MSA) .....	67
2.2.3	Estimation de la densité et de l'épaisseur du biofilm .....	68
2.3	Mesure des composés solubles .....	68
2.3.1	Dosage du glucose.....	69
2.3.2	Dosage de la Demande Chimique en Oxygène (DCO) .....	69
2.4	Caractérisation du transfert interne .....	69
2.4.1	Dispositif expérimental .....	70

2.4.2	Exploitation des profils de concentration .....	72
2.5	Caractérisation et suivi moléculaire de la flore du réacteur .....	74
2.5.1	Méthodes de prélèvement et de conservation des échantillons .....	74
2.5.2	Extraction et purification de l'ADN total .....	74
2.5.3	Amplification (PCR) .....	75
2.5.4	Analyses CE-SSCP.....	76
2.5.5	Analyse statistique des données .....	77
2.6	Modélisation du biofilm par le logiciel AQUASIM ®.....	79
2.6.1	Objectif du modèle .....	79
2.6.2	Modèle des bilans globaux du biofilm .....	82
2.6.3	Processus de détachement .....	85
2.6.4	Modèle de structure du biofilm .....	88
2.6.5	Synthèse des paramètres utilisés .....	89
2.6.6	Modèles cinétiques .....	90
2.7	Synthèse.....	95
Chapitre 3	Effet du temps de séjour hydraulique sur la répartition de la biomasse et les performances du réacteur à biofilm.....	97
3.1	Rappel des conditions opératoires .....	97
3.2	Impact du temps de séjour hydraulique sur la distribution de la biomasse .....	99
3.2.1	Impact du temps de séjour sur la croissance du biofilm.....	100
3.2.2	Impact du temps de séjour sur la biomasse du biofilm.....	102
3.3	Impact du temps de séjour sur la concentration en biomasse planctonique .....	105
3.4	Effet du temps de séjour hydraulique sur le facteur de diffusion en oxygène dans le biofilm.. .....	107
3.5	Impact du temps de séjour sur les performances du réacteur .....	109
3.6	Synthèse.....	113
Chapitre 4	Etude de la dynamique de la diversité des communautés microbiennes dans un biofilm et dans la biomasse planctonique suivant la modification du temps de séjour hydraulique.....	115
4.1	Comparaison des profils CE-SSCP du biofilm et du liquide.....	115

4.2	Estimation de la diversité .....	119
4.3	Analyse de la structure des communautés microbiennes .....	122
4.4	Synthèse.....	135
Chapitre 5	Modélisation de la compétition entre la biomasse planctonique et le biofilm.....	137
5.1	Rappel des conditions expérimentales et des paramètres du modèle .....	137
5.2	Modèle mono-espèce.....	139
5.2.1	Caractérisation de l'épaisseur moyenne et des concentrations en substrats dans le liquide .....	139
5.2.2	Caractérisation de la distribution de la biomasse dans le réacteur à biofilm.....	142
5.2.3	Caractérisation des flux de détachement, d'oxygène et de substrat à la surface du biofilm .....	145
5.2.4	Estimation des régimes de croissance dans le biofilm .....	147
5.2.5	Bilans globaux.....	149
5.2.6	Discussion .....	151
5.3	Modèle multi-espèces.....	153
5.3.1	Suivi de la diversité du biofilm et de la biomasse planctonique.....	154
5.3.2	Influence du TSH sur la distribution des espèces dans la biomasse planctonique .....	156
5.3.3	Influence du temps de séjour sur la distribution des espèces dans le biofilm .....	160
5.3.4	Discussion .....	164
5.4	Synthèse.....	165
Conclusion Générale	.....	167
Bibliographie	.....	171
ANNEXES	.....	191
Annexe I : Schéma du dispositif expérimental.....		193
Annexe II : Mesure des incertitudes sur les pesées .....		195
Annexe III : Calcul d'incertitude sur les mesures .....		199
Annexe IV : Procédure d'arrêt et de démarrage du réacteur .....		203

# Listes des figures

Figure 1-1 Schéma du métabolisme aérobie des cellules hétérotrophes. ....	9
Figure 1-2 Evolution de la formation d'un biofilm (d'après Characklis et Marshall, 1990). ....	11
Figure 1-3 Description des différents processus de transport existant au niveau d'un biofilm (d'après Picioreanu <i>et al.</i> 2000b ; Derlon, 2008). ....	16
Figure 1-4 Représentation des taux de croissance de deux populations en compétition pour un seul et même substrat limitant suivant le modèle de Monod. Dans le cas A, on a l'évolution du taux de croissance en fonction du substrat lorsque $\mu_{\max,1} > \mu_{\max,2}$ et $K_{S1} > K_{S2}$ . Dans le cas B, on a l'évolution du taux de croissance en fonction du substrat quand $\mu_{\max,1} > \mu_{\max,2}$ et $K_{S1} < K_{S2}$ (d'après Harder et Kuenen, 1977; Dumont, 2008). ....	21
Figure 1-5 Schéma d'un réacteur Couette-Taylor co-axial. ....	25
Figure 1-6 Schéma de la structure des vortex de Taylor (d'après Ohmura <i>et al.</i> 1997). ....	28
Figure 1-7 Transitions dans un réacteur de Couette-Taylor (d'après Andrereck <i>et al.</i> 1986; Coufort, 2004). ....	30
Figure 1-8 Courbe de calibration de l'épaisseur du biofilm obtenue par pesée avec l'épaisseur définie par mesure métrique au sein d'un réacteur tubulaire (d'après Horn et Hempel, 1997b). ....	33
Figure 1-9 Représentation schématique du biofilm résiduel après application de contraintes hydrodynamiques (en Pa) croissantes (d'après Derlon <i>et al.</i> 2008). ....	35
Figure 1-10 Description de l'allure des profils de concentration et de pH en lien avec les différents compartiments du biofilm (d'après Zhang et Bishop, 1994c). ....	37
Figure 1-11 Pointes des microcapteurs à dioxygène dissous et de pH (d'après Unisense, Aarhus, Danemark) ; ....	40
Figure 1-12 Aperçu des stratégies moléculaires utilisées pour analyser les communautés microbiennes avec des sondes moléculaires (A) ou des techniques d'empreintes génétiques (B) (d'après Dabert <i>et al.</i> , 2002; Winderer <i>et al.</i> , 2002; Dorigo <i>et al.</i> , 2005; Cresson, 2006). ....	43
Figure 1-13 Principe de l'amplification en chaîne (ou PCR) d'une séquence cible à partir de d'ADN total (d'après Dumont, 2006). ....	44
Figure 1-14 Principe de la technique SSCP par électrophorèse capillaire (d'après Dumont, 2008). ....	47
Figure 1-15 Description des processus présents lors de la formation d'un biofilm (d'après Picioreanu <i>et al.</i> , 2000b). ....	53
Figure 2-1 Vue éclatée du réacteur annulaire rotatif (©BST modèle 1320LJ). ....	58
Figure 2-2 Vue schématique des coupons utilisés. ....	59
Figure 2-3 Photo de l'un des trois dispositifs expérimentaux. ....	60
Figure 2-4 Schéma descriptif de l'alimentation du réacteur. ....	63
Figure 2-5 Dispositif expérimental de mesure des profils de concentration en Oxygène. ....	71
Figure 2-6 Allure des profils de concentration obtenus dans le biofilm. ....	72
Figure 2-7 Schéma descriptif des cycles de la PCR. ....	76
Figure 2-8 Séquenceur analytique 3130. ....	77
Figure 2-9 Configuration du programme réacteur à biofilm au sein du logiciel AQUASIM®. Les doubles flèches noires indiquent les flux possibles au travers des compartiments et les doubles flèches grises représentent les flux de matière entre chaque compartiment (d'après Wanner et Morgenroth, 2004). ....	80
Figure 2-10 Biofilm 1D avec des profils de concentration de deux substrats : $C_{S1}$ est limité par la croissance et $C_{S2}$ est limité par le transport (d'après Brockmann, 2006 ; Wanner, 2006). ....	81
Figure 2-11 Evolution de l'épaisseur de biofilm dans le cas d'un modèle de détachement fonction de $L_f$ (cas A) et d'un modèle indépendant de $L_f$ (cas B). ....	87
Figure 2-12 Schéma d'un biofilm stratifié en contact avec un compartiment parfaitement mélangé (d'après Lu <i>et al.</i> , 2007). ....	89
Figure 2-13 Schéma récapitulatif des suivis analytiques. ....	96
Figure 3-1 Evolution de l'épaisseur de biofilm au cours de la croissance du biofilm. ....	101

Figure 3-2 Evolution de la masse des 6 coupons (1 bande = 1 coupon sur l'histogramme) supportant du biofilm pendant une période de séchage à 105°C. ....	103
Figure 3-3 Evolution de la matière sèche attachée au cours du temps. ....	104
Figure 3-4 Evolution de la densité du biofilm au cours du temps. ....	105
Figure 3-5 Evolution de la matière en suspension au cours du temps. ....	106
Figure 3-6 Evolution de la concentration en O <sub>2</sub> dissous dans la profondeur du biofilm (résultats brutes). ....	107
Figure 3-7 Evolution du facteur de diffusion f <sub>D</sub> en oxygène au cours du temps de croissance du biofilm. ....	108
Figure 3-8 Evolution de la concentration en substrat résiduel dans la phase liquide. ....	110
Figure 3-9 Evolution du rendement de consommation du substrat. ....	110
Figure 3-10 Evolution du facteur G au cours de temps de croissance du biofilm. ....	112
Figure 4-1 Profils CE-SSCP de la région V3 de l'ADNr 16S bactériens réalisés sur 42 jours à partir de la phase liquide pour les trois TSH étudiés (les flèches roses indiquent les nouveaux pics présents à 42 jours et les flèches noires les pics qui sont présents initialement mais qui disparaissent avec le temps, les lignes verticales, les pics communs pour l'ensemble des profils). ....	116
Figure 4-2 Profils CE-SSCP de la région V3 de l'ADNr 16S bactériens réalisés pendant 42 jours, à partir du biofilm pour les trois TSH étudiés (les flèches roses indiquent les nouveaux pics présents au bout de 42 jours et les flèches noires indiquent les pics qui sont présents initialement mais qui disparaissent durant la période de croissance. Les lignes verticales indiquent les pics communs pour l'ensemble des profils). ....	118
Figure 4-3 Evolution de l'indice de la diversité (calculé d'après le logarithme négatif de Simpson) pour les populations microbiennes du biofilm pour les trois valeurs de TSH. ....	120
Figure 4-4 Evolution de l'indice de la diversité (calculé d'après le logarithme négatif de Simpson) pour les populations microbiennes de la phase liquide pour les trois valeurs de TSH. ....	121
Figure 4-5 ACP sur les profils CE-SSCP d'échantillons de biofilms (B) et de biomasse en suspension dans le liquide (L) ordonnés en fonction des facteurs environnementaux (TSH 0,3h noir, TSH 1h vert, TSH 8 h rouge) (nombres d'échantillon : 6 biofilms et 12 liquides). ....	124
Figure 4-6 ACP sur les profils CE-SSCP d'échantillons de biofilms (B) et de biomasse en suspension dans le liquide (L) ordonnés en fonction des facteurs environnementaux. (TSH 0,3h noir, TSH 1h vert, TSH 8 h rouge) (nombres d'échantillon : 6 biofilms et 6 liquides). ....	125
Figure 4-7 Profils CE-SSCP représentant l'inoculum (bleu) et les profils CE-SSCP du biofilm et du liquide pour les trois temps de séjour (TSH 0,3h (noir), TSH 1h (rouge), TSH 8h (vert)) au jour 28. ....	127
Figure 4-8 Profils moyens CE-SSCP entre les échantillons de biofilm (rouge) et de liquide (bleu) calculés par le t-test. ....	130
Figure 4-9 Comparaison des communautés microbiennes présentes dans le biofilm au 28 <sup>ème</sup> jour pour trois TSH (0,3 h, noir, 1h, rouge, 8h, vert). La flèche indique un pic commun aux différents profils. ....	131
Figure 4-10 Comparaison de la diversité microbienne présente dans le liquide au 28 <sup>ème</sup> jour pour trois TSH (0,3 h, noir, 1h, rouge, 8h, vert). Les flèches indiquent les pics communs entre les différents profils. ....	133
Figure 5-1 Evolution de l'épaisseur du biofilm (L <sub>f</sub> ) et des concentrations en substrat (C <sub>S</sub> ) et en oxygène (C <sub>O<sub>2</sub></sub> ) dans le liquide pour les trois temps de séjour testés. Les simulations sont représentées par les lignes et les résultats expérimentaux par les points. ....	140
Figure 5-2 Evolution des concentrations en biomasse dans le biofilm et le liquide. Les concentrations dans le biofilm sont exprimées en g <sub>D<sub>CO<sub>x</sub></sub></sub> .m <sup>-2</sup> et les concentrations dans le liquide en mg <sub>D<sub>CO<sub>x</sub></sub></sub> .L <sup>-1</sup> . X <sub>net</sub> représente la biomasse active. Les résultats des simulations sont représentés les lignes et les résultats expérimentaux par les points. ....	143
Figure 5-3 Evolution du facteur G calculé pour les trois conditions de croissance (TSH 0,3h (noir), 1h (vert) et 8h (rouge)) d'après les résultats de la simulation et des données expérimentales. ....	147
Figure 5-4 Dynamique de l'indice de diversité (calculé d'après le logarithme négatif de Simpson) pour le biofilm suivant les trois conditions d'études abordées (TSH 0,3h (noir), 1h (vert) et 8h (rouge)). ....	154
Figure 5-5 Dynamique de l'indice de diversité (calculé d'après le logarithme de Simpson) pour la phase liquide suivant les trois conditions d'études abordées (TSH 0,3h (noir), 1h (vert) et 8h (rouge)). ....	156

Figure 5-6 Evolution de la prédiction de la fraction cumulée des 10 biomasses obtenues dans la biomasse planctonique à l'aide d'AQUASIM® au cours du temps (l'axe des abscisses correspond à l'échelle de temps exprimé en jour). ..... 158

Figure 5-7 Dynamique de la distribution de la biomasse au sein du biofilm, pour les 3 TSH. Cette distribution est présentée pour les jours 7, 14, 21, 28, 35, 42, 100 et 200. Ces fractions sont cumulées et sont représentées en fonction de leur épaisseur du biofilm (0 indique le support, 1200 l'épaisseur maximale).  $X_{het,i}$  représente les différentes biomasses et  $X_i$  la biomasse inerte. .... 161



# Liste des tableaux

Tableau 1-1 Composition des EPS et sa gamme de répartition (d'après Flemming et Wingender, 2001a).....	8
Tableau 1-2 Réacteurs à biomasse fixée les plus couramment utilisés à l'échelle du laboratoire. ....	24
Tableau 1-3 Les modèles existant dans la littérature.....	54
Tableau 2-1 Composition du substrat synthétique dans le bac d'alimentation. ....	62
Tableau 2-2 Composition et de l'eau du robinet utilisée pour la dilution du substrat. ....	62
Tableau 2-3 Conditions théoriques calculées pour un volume utile de 1,2L.....	66
Tableau 2-4 Différents modèles de détachement (d'après Morgenroth, 2008 modifié). ....	86
Tableau 2-5 Synthèse des valeurs utilisées au niveau du modèle. ....	90
Tableau 2-6 Taux de réactions dans le modèle 1-D biofilm.....	91
Tableau 2-7 Coefficients stœchiométriques $v_{i,j}$ des processus considérés au sein du modèle biofilm. .	91
Tableau 2-8 Valeurs des différents paramètres cinétique du modèle. ....	92
Tableau 2-9 Paramètres biologiques pour différentes espèces hétérotrophes. ....	94
Tableau 3-1 Conditions opératoires appliquées dans chaque réacteur (moyenne des différents suivis expérimentaux).....	98
Tableau 3-2 Conditions de fonctionnement des batchs lors de l'inoculation. ....	99
Tableau 3-3 Evolution de la masse humide de coupon. ....	100
Tableau 3-4 estimation du flux de substrat au 7 <sup>ème</sup> jour. ....	111
Tableau 4-1 Valeurs des coefficients ANOSIM-R entre les groupes de population du biofilm et du liquide.....	128
Tableau 4-2 Résultats statistiques sur la différence (%) entre les groupes de population du biofilm et du liquide, d'après le t-test (p-value <0,05). ....	128
Tableau 4-3 Valeurs des coefficients ANOSIM-R entre les groupes de population des biofilms. ....	132
Tableau 4-4 Résultats statistiques sur la différence(%) entre les groupes de population des biofilms étudiés d'après le t-test (p-value <0,05). ....	132
Tableau 4-5 Valeurs des coefficients ANOSIM-R entre les groupes de populations présentes dans le liquide, d'après l'ANOSIM. ....	134
Tableau 4-6 Résultats statistiques sur la différence(%) entre les groupes de populations présentes dans la phase liquide obtenus d'après le t-test (p-value <0,05). ....	134
Tableau 5-1 Récapitulatif des conditions de croissance dans les réacteurs biologiques. ....	138
Tableau 5-2 Flux surfacique du biofilm calculé par simulation pour les trois temps de séjour étudiés. Les jours représentent les différentes dates de prélèvement.....	146
Tableau 5-3 Tableau récapitulatifs de bilans matières globaux obtenus par la simulation dans des réacteurs à biofilm, pour les trois valeurs des TSH.....	150

# **Introduction**



## Préambule

L'apparition de la vie sur Terre remonte à environ 3,5 à 3,8 milliards d'années. Les plus anciens microorganismes fossiles qui ont été trouvés dans des sédiments vieux de 3,2 à 3,5 milliards d'années du Pilbara en Australie ou de Barberton en Afrique du Sud ont montré l'existence d'une vie abondante dans les eaux du littoral à faible profondeur et même à la surface de l'eau. Les biofilms sont sûrement les premières colonies d'organismes vivants, présentes il y a plus de 3,5 milliards d'années (Westall, 2010).

De nombreuses recherches ont contribué à accroître les connaissances sur les biofilms, mais, de nos jours, ce système microbien reste encore mal connu. Les biofilms sont largement répandus et se développent dans tous les types d'environnements, naturels ou industriels. Ils peuvent être d'un caractère néfaste, préjudiciable ou, à l'inverse, salubre et profitable. Leur développement peut engendrer des maladies, des infections ou propager des virus (Pais-Correia *et al.*, 2010). Leur présence dans les réseaux d'eau potable ou dans l'industrie, comme l'industrie papetière ou laitière, peut avoir des conséquences néfastes (Kumar *et al.*, 1998 ; Jadesjo et Kortelainen, 2005). A l'inverse, ils peuvent être associés à des réactions utiles à l'environnement grâce au potentiel de biodégradation des microorganismes qui les composent.

Dans les réacteurs hybrides qui mettent en jeu une phase liquide et des agrégats biologiques comme les biofilms, les bactéries du biofilm ont des propriétés sensiblement différentes de celles des bactéries de la même espèce présentes dans le liquide. A l'échelle du réacteur, l'attachement des microorganismes permet un découplage du temps de séjour de la biomasse et du temps de séjour hydraulique (TSH), ce qui permet d'accroître la concentration de la biomasse présente dans les réacteurs biologiques. Ce processus est particulièrement intéressant pour les microorganismes qui possèdent de faibles taux de croissance. Néanmoins, l'augmentation de l'épaisseur du biofilm liée à la concentration des cellules sur le support peut diminuer l'activité du système à cause de la limitation par le transfert du substrat. La porosité du biofilm, la concentration en substrat dans la phase liquide, les échanges de matière à

l'interface du biofilm-liquide et le taux de réaction vont influencer l'évolution du substrat en profondeur du biofilm.

La présence de gradients de concentration entraîne au sein du biofilm un gradient de taux de croissance. Dans le cas des biofilms à populations mixtes, ces gradients de concentration entraînent une stratification de la structure du biofilm. Les microorganismes possédant un taux de croissance faible vont se trouver à l'intérieur du biofilm et ceux qui possèdent un taux de croissance élevé à la surface.

Dans la phase liquide, le temps de séjour de la biomasse est égal au TSH dans le cas des réacteurs ouverts. Le taux de croissance des cellules est donc lié au TSH. La concentration de la biomasse planctonique est fonction de la concentration du substrat en entrée du réacteur.

La compétition entre espèces au sein du biofilm ou du liquide, entre le biofilm et les espèces planctoniques, a été assez peu étudiée. Le TSH est sans doute un facteur majeur dans le contrôle de cette compétition en raison de son influence sur le lessivage des espèces planctoniques. L'effet du TSH sur le biofilm et l'équilibre des populations planctoniques et attachées est l'objet de ce travail de thèse.

## **Objectifs**

Les questions auxquelles nous allons essayer de répondre dans ce mémoire sont les suivantes :

- Quel est l'impact du TSH sur la dynamique de la compétition de la biomasse au sein du réacteur?
- Comment se fait la compétition des espèces dans la phase liquide ? Dans le biofilm ?  
Quelle est la dynamique de cette compétition ?
- Peut-on caractériser la compétition à l'échelle microbienne entre le liquide et le biofilm ?

Ces travaux ont pour objectif de contribuer à la compréhension des mécanismes de la compétition entre les deux biomasses (biofilm et planctonique). Cette étude a donc consisté à

analyser l'impact du TSH sur la croissance des populations du biofilm et du liquide et à modéliser ces données.

Cette étude nécessite une approche pluridisciplinaire, faisant intervenir des connaissances en génie des procédés, en biochimie, en biologie moléculaire, en statistiques (écologie numérique) et en modélisation. Ainsi, une démarche analytique reliant une approche macroscopique de l'influence du TSH à une approche microscopique basée sur des techniques moléculaires doit nous permettre de mieux comprendre la dynamique de la compétition au sein des populations mixtes, présentes lors du développement d'un biofilm. La modélisation doit permettre d'agréger les connaissances apportées par ces deux approches.

## **Organisation du document**

Le *chapitre 1* constitue une synthèse bibliographique. Après avoir introduit la problématique du sujet dans son contexte, nous présenterons le développement du biofilm en décrivant les différents processus et interactions qui existent avec son environnement. Puis, nous décrirons les mécanismes de la compétition à l'échelle macroscopique et microscopique, au niveau d'un système biologique. Enfin, les différentes techniques expérimentales permettant d'étudier et de caractériser cette compétition seront présentées.

Le *chapitre 2* présente les dispositifs expérimentaux et les techniques utilisés durant la thèse, ainsi que les méthodes développées pour le suivi expérimental et pour l'étape de modélisation.

Le *chapitre 3* consiste à faire une présentation détaillée et une analyse des résultats expérimentaux obtenus à l'échelle macroscopique. Il a pour objectif d'identifier l'impact du TSH sur la compétition de la biomasse entre le liquide et le biofilm dans le réacteur. Cet impact sera observé sur les caractéristiques du biofilm (épaisseur, concentration de la biomasse, densité, coefficient de diffusion...) mais aussi sur les performances du réacteur.

Le *chapitre 4* se focalise sur une approche à l'échelle microscopique. Il va être observé l'impact des conditions de croissance sur la compétition microbienne entre les bactéries hétérotrophes du biofilm et celle présentes dans le liquide. La première partie de ce chapitre va consister à observer la diversité des populations microbiennes. La comparaison entre les différentes populations sera présentée par l'analyse de leurs structures en seconde partie.

Le *chapitre 5* présente les résultats de la modélisation et confronte aux données expérimentales. La prédiction du comportement du système biofilm et liquide sera réalisée par un modèle mono et multi-espèces sous certaines conditions d'environnement de croissance.

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

# **Chapitre 1 Synthèse bibliographique**





## 1.1 Introduction à la problématique

Les biofilms (ou films biologiques) représentent l'un des deux modes de vie des microorganismes, le second étant le mode libre dit « planctonique » en suspension dans un milieu liquide. Les biofilms peuvent se développer sur différentes surfaces naturelles, minérales (roche, interface air-liquide...) (Filloux et Vallet, 2003; Koza *et al.*, 2009), ou organiques (peau, dents, racines, feuilles des plantes, tube digestif...) (Danhorn et Fuqua, 2007; Ebert et Brune, 1997; Patel et Sharma, 2010). Ils apparaissent aussi dans le milieu médical (prothèses...) ou le milieu industriel (canalisations, coques de navire, réacteur biologique...) (Denkhaus *et al.*, 2007). Ces biofilms peuvent avoir un effet positif ou négatif pour la surface sur laquelle ils se développent ou l'environnement de croissance. Cet effet est fonction du type de biofilm et de la nature des microorganismes qui le composent.

### *Biofilms « positif » ou « négatif » ?*

On parle de biofilms à effets « positifs » ou « bénéfiques » lorsqu'ils sont utiles à la société humaine en participant à un processus de production ou de dépollution, ou encore lorsqu'ils favorisent le bon fonctionnement des écosystèmes. Dans les milieux naturels, certains biofilms peuvent contribuer à la biorestauration des milieux, par l'élimination des polluants des sols contaminés (pétrole, hydrocarbures, métaux lourds...) ou des eaux souterraines (Parot, 2007).

Les biofilms peuvent être utilisés dans le traitement des eaux (Lazarova et Manem, 1995). Vers 1860, des ingénieurs anglais ont mis en place les premiers filtres à sables, dans lesquels la formation d'un biofilm a permis d'améliorer l'épuration des eaux. Depuis, une multitude de procédés basés sur des systèmes à biomasse fixée ont été développés. Le premier est le lit bactérien, installé en 1893 en Angleterre (Wanner, 2006). Puis, dans les années 1970 et 1980, les contacteurs à biodisques et les biofiltres se sont développés. Ces derniers sont très performants, pour une faible empreinte au sol, comparés aux procédés à boues activées. Ils sont généralement très stables. Néanmoins, ils nécessitent des lavages réguliers afin de prévenir les problèmes liés au colmatage. Des nouvelles alternatives sont alors développées: les réacteurs de type « airlift », les lits fluidisés ou les lits mobiles. Ces procédés font

intervenir des supports mobiles sur lesquels les biofilms s'attachent. Ces supports sont mis en mouvement mécaniquement : insufflation d'air, circulation du liquide, brassage mécanique.

D'autres utilisations des biofilms en milieux industriels sont possibles, comme dans l'exploitation minière des métaux. La lixiviation du cuivre, réalisée classiquement avec de l'acide, peut être remplacée par l'action de biofilms qui libèrent les ions cuivriques ( $\text{Cu}^{2+}$ ) par biolixiviation (Lennox et Blaha, 1991). Une application plus récente des biofilms est liée à la réalisation de piles à combustible microbiennes (ou biopiles) dans lesquelles l'énergie disponible dans un substrat biodégradable est convertie en électricité (Scholz et Schröder, 2003; Monier *et al.*, 2006). Ce dispositif et ses variantes (électrolyse microbienne, synthèse de molécules organiques,...) constitue aujourd'hui un axe de recherche important.

Les biofilms peuvent aussi engendrer des risques pour l'être humain, des problèmes techniques et/ou économiques : on parle alors de biofilms « négatifs » ou « néfastes ». Dans le milieu naturel, ils peuvent engendrer des modifications de l'environnement sur le long terme. Dans l'industrie, les biofilms peuvent être à l'origine de la biocorrosion (Beech, 2004) ou de phénomènes d'encrassement et de colmatage (Flemming *et al.*, 1996; Flemming *et al.*, 1997). Les dommages matériels et la contamination des produits provoquent des problèmes récurrents et coûteux. Dans le secteur médical, ils peuvent être des sources d'infections en se développant sur la surface des implants médicaux, des cathéters, des pansements (Costerton *et al.*, 1999). Ils peuvent également avoir une action directe sur les êtres vivants, comme les biofilms dentaires (ten Cate, 2006) ou intestinaux (Fuller et Gibson, 1997; McBain et Macfarlane, 1998). Ils sont également la source de contamination dans l'industrie agro-alimentaire (Carpentier et Cerf, 1993; Kumar *et al.*, 1998) ou dans d'autres secteurs comme la papeterie (Jadesjo et Kortelainen, 2005).

### *Biofilm ou biomasse planctonique?*

Dans les procédés à biofilm en continu, la biomasse en suspension est éliminée par lessivage. Les microorganismes qui se trouvent sous forme planctonique, possèdent un temps de doublement cellulaire égal au temps de séjour hydraulique. Des études réalisées par Heijnen *et al.* et Tijhuis *et al.* (1992-1994) montrent que le taux de dilution du système ( $\delta$ ) doit être inférieur au taux de croissance maximum des microorganismes ( $\mu_{\text{max},i}$ ) pour ne pas les lessiver du réacteur.

Les réacteurs traitant les effluents biologiques ont une composition microbienne très diversifiée (Saikaly et Oerther, 2004). De nombreuses interactions, comme la compétition entre les espèces, existent. Dans la littérature liée au traitement biologique des eaux usées, la notion de compétition est souvent associée à la compétition pour l'oxygène entre les microorganismes autotrophes et les hétérotrophes (Ohashi *et al.*, 1995; Okabe *et al.*, 1995; Okabe *et al.*, 1996; Morgenroth et Wilderer, 2000; Derlon, 2008). La compétition entre des populations du même type est très peu étudiée (Saikaly et Oerther, 2004). De même, très peu d'études introduisent la notion de diversité microbienne dans ce type de travaux (Ramirez *et al.*, 2009).

Ce chapitre présente l'état de l'art sur les biofilms et notamment sur les mécanismes de formation, les processus de transport et les facteurs qui influencent sa structuration. Ensuite, une présentation des différents phénomènes de compétitions est abordée. Enfin, les dispositifs et les techniques d'étude des biofilms ainsi que les modèles mathématiques de biofilms sont présentés.

## **1.2 Les biofilms**

### **1.2.1 Définition**

Les premiers biofilms sont apparus il y a plus de 3,5 milliards d'années et sembleraient être les premières colonies d'êtres vivants. Mais le terme « biofilm » n'est utilisé que depuis ces 30 dernières années. C'est John William Costerton, en 1978, qui proposa ce terme de « biofilm » pour parler du mode de vie de certains microorganismes cellulaires (Costerton *et al.*, 1999). Ce mot est composé du grec « bios », la vie, et de l'anglais « film » qui signifie pellicule. Il est donc possible de définir étymologiquement le terme biofilm comme une « pellicule de vie ». Un biofilm est une communauté de microorganismes (bactéries, champignons, algues ou protozoaires), adhérant entre eux et sur une surface au sein d'une matrice adhésive et protectrice constituée d'Exo-Polymères (EPS). Il est hautement hydraté (95% en eau). Les EPS sont composées majoritairement de polysaccharides complexes macromoléculaires (hexoses, sucres aminés, pentoses), de protéines, d'autres glucides (acides

uroniques), de petites quantités de lipides (triglycérides et acides gras libres insaturés) et d'acides nucléiques (ADN et ARN) (Flemming et Wingender, 2001a, 2001b; Sutherland, 2001; Neu et Lawrence, 2009). Le Tableau 1-1 donne une idée de la répartition de la composition des EPS dans les biofilms. Certains EPS jouent un rôle important au niveau de la structure du biofilm comme les acides nucléiques dans la cohésion des organismes (leurs longues chaînes servent de pont entre les cellules). Les lipides interviennent plutôt dans les interactions de type hydrophobe.

**Tableau 1-1 Composition des EPS et sa gamme de répartition (d'après Flemming et Wingender, 2001a).**

Composés	Fractions des EPS
Polysaccharides	40-95%
Protéines	<1-60%
Acides Nucléiques	<1-10%
Lipides	<1-40%

Les biofilms présentent une grande variété de structures et de tailles. Les biofilms de type « monocouche » possèdent une épaisseur comprise entre 5 et 25  $\mu\text{m}$ . Ils sont généralement obtenus à l'échelle du laboratoire à partir de cultures de souches pures (Andersson *et al.*, 2008). A l'opposé, certains biofilms possèdent une épaisseur supérieure à 100  $\mu\text{m}$  et peuvent atteindre plusieurs millimètres (Zhang *et al.*, 1994a). Ces biofilms épais, gélatineux et filamenteux sont principalement observés pour des cultures mixtes que l'on retrouve dans les milieux environnementaux. Les biofilms peuvent être parcourus par un réseau de canaux qui véhiculent les substrats et/ou les microorganismes (Lawrence *et al.*, 1994). Ce réseau n'est pas homogène, surtout lorsque le biofilm est épais (de 1 à 2 mm). Le diamètre des pores passe de 1,7 à 2,7  $\mu\text{m}$  en surface du biofilm, à 0,3-0,4  $\mu\text{m}$  dans les couches inférieures (Characklis et Marshall, 1990; Flemming *et al.*, 2000). Cette différence s'accompagne d'une augmentation de la compacité du biofilm dans sa profondeur. Les conditions environnementales (substrat, régimes et contraintes hydrodynamiques...) ainsi que la composition des communautés microbiennes ont un impact direct sur la structure des biofilms.

## 1.2.2 Développement des biofilms

### 1.2.2.1 Processus biologiques

Les bactéries hétérotrophes se développent en consommant des substrats organiques. Cette dégradation peut se faire par voie aérobie, en présence d'oxygène comme accepteur final d'électrons pour la respiration. Le processus peut être schématisé par la Figure 1-1.

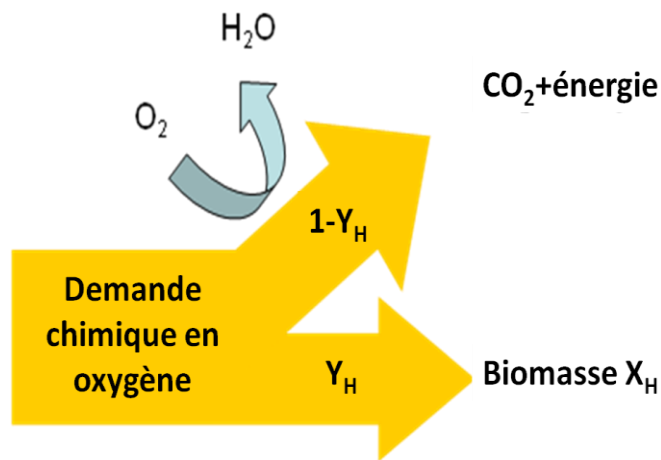


Figure 1-1 Schéma du métabolisme aérobie des cellules hétérotrophes.

$Y_H$  : le rendement de conversion de la DCO en biomasse en  $M_{DCOx} \cdot M_{DCO}^{-1}$ ,

$1-Y_H$  : la consommation de la DCO pour la réduction de l'oxygène, en  $M_{DCO} \cdot M_{O_2}^{-1}$ ,

$X_H$  : la concentration en bactérie en  $M_{DCOx} \cdot L^{-3}$ .

### 1.2.2.2 Cinétique de croissance hétérotrophe

La croissance de la biomasse est décrite par l'équation suivante :

$$r_X = \mu_H X_H \quad 1-1$$

avec  $r_X$  : vitesse de production volumique de biomasse ( $M_{DCOx} \cdot L^{-3} \cdot T^{-1}$ ),

$\mu_H$  : taux de croissance spécifique de la biomasse X, qui est fonction de la température, du pH, de la concentration en substrats et en produits.

Le taux de croissance spécifique peut s'exprimer par :

$$\mu_H = \mu_{\max,H} \cdot f(T) \cdot f(pH) \cdot f(\text{Inibiteur}) \cdot f(\text{Substrats}) \cdot f(\text{produits}) \dots \quad \mathbf{1-2}$$

avec  $\mu_{\max,H}$  : taux de croissance maximal ( $T^{-1}$ ).

La vitesse de consommation du substrat peut être définie à partir du taux de croissance par l'introduction du rendement ( $Y_H$ ) de conversion de substrat S en cellules X ( $M_{\text{DCO}_x} \cdot M_{\text{DCO}}^{-1}$ ) :

$$r_s = \frac{\mu_H}{Y_H} X_H \quad \mathbf{1-3}$$

où  $r_s$  est la vitesse d'utilisation du substrat ( $M_{\text{DCO}} \cdot L^{-3} \cdot T^{-1}$ ).

### 1.2.2.3 Cinétiques de décès

Les cinétiques de décès décrivent les mécanismes qui vont être potentiellement responsables d'une diminution de la quantité de biomasse active. Ils sont généralement représentés par une équation simple d'ordre 1 reliée à la concentration en biomasse active. Ces divers mécanismes peuvent être (van Loosdrecht et Henze, 1999):

- La mortalité, qui est induite par le décès ou la lyse cellulaire. Il y a une diminution du nombre de bactéries actives *via* une libération du substrat biodégradable ( $X_s$ ). Le concept de mort-régénération comprend une libération d'une fraction particulière non biodégradable  $X_p$ .
- La respiration endogène et la consommation des réserves internes. Elles impliquent une diminution de la biomasse active. L'oxydation de la matière associée donne lieu à la libération d'une fraction particulière biodégradable. Il y a une consommation de l'accepteur d'électron. Ce type de mécanisme est souvent utilisé pour expliquer la consommation d'oxygène, dans un milieu où l'apport en substrat est nul.
- La maintenance cellulaire. Une consommation de substrat va être utilisée pour l'énergie de maintenance. Cette énergie ne va donc pas servir à la multiplication cellulaire. Le nombre de cellules microbiennes en présence reste constant.

- Enfin, la prédation : celle-ci peut être mise en évidence lorsqu'on étudie les interactions entre microorganismes de différents types (virus, bactéries, protozoaires, ...). Elle entraîne une diminution du nombre de bactéries actives.

Les cinétiques de décès sont souvent reliées à la concentration de la biomasse active et décrites par l'équation suivante :

$$r_d = -d.X_H$$

1-4

### 1.2.3 Formation du biofilm

La croissance d'un biofilm sur une surface solide prend souvent la forme d'une courbe sigmoïde (cf. *figure 1-2*). Elle se divise en trois phases: une phase initiale où les microorganismes vont adhérer à la surface d'un support, une phase d'accumulation exponentielle où les microorganismes vont croître et enfin une phase stationnaire de maturation.

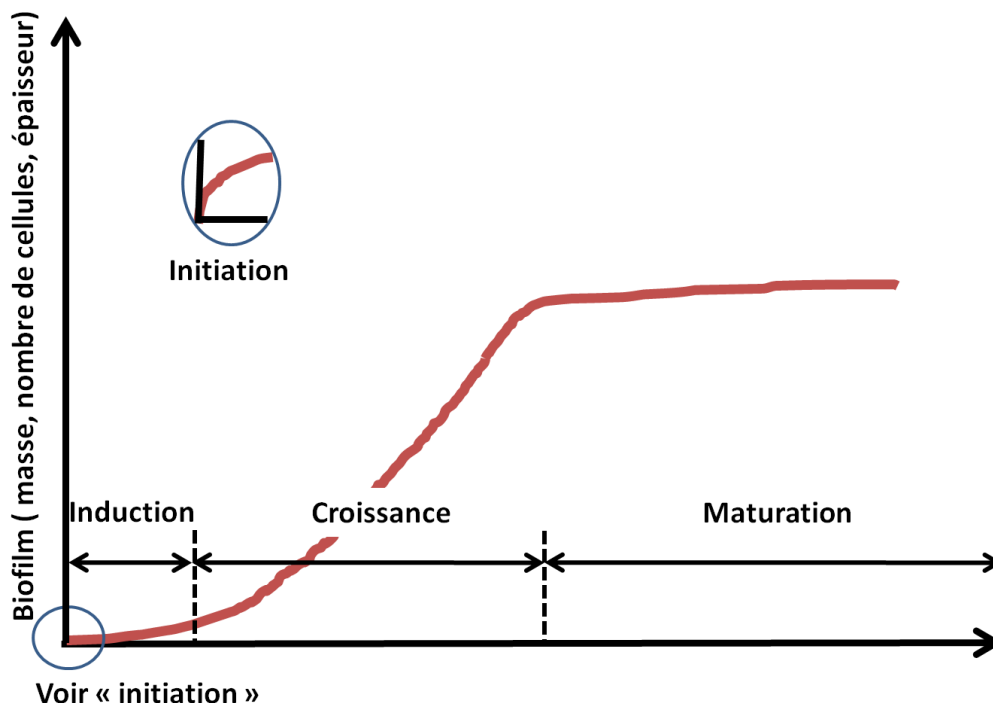


Figure 1-2 Evolution de la formation d'un biofilm (d'après Characklis et Marshall, 1990).



Différentes interactions de type physique, chimique et biologique interviennent au cours de la formation des biofilms sur une paroi exposée à un flux de liquide. Celles-ci vont être décrites dans la suite de ce paragraphe.

### **1.2.3.1 Adsorption des molécules (in)organiques à la surface**

L'adsorption des molécules (in)-organiques de surface est le résultat du conditionnement du support. De nombreuses eaux naturelles ou industrielles sont riches en nutriments et en macromolécules organiques. Ces molécules peuvent être adsorbées à la surface du support et en modifier les propriétés physico-chimiques (Busscher *et al.*, 1995). Comme l'adsorption des molécules est un processus plus rapide que l'adhésion des cellules, l'adhésion initiale des microorganismes est également conditionnée par les propriétés de cette couche.

### **1.2.3.2 Transport des microorganismes vers la surface**

Les microorganismes peuvent être transportés du milieu liquide vers la surface à coloniser par trois modes de transports distincts :

- Le *transport diffusionnel* intervient lorsque les bactéries présentent un mouvement brownien non négligeable. C'est un phénomène physique à l'échelle microscopique. Il peut contribuer significativement au transport bactérien dans le milieu en condition de repos ou vers la sous-couche visqueuse qui entoure la surface.

- Le *transport convectif* est dû aux forces dynamiques du fluide. Les cellules microbiennes vont être transportées vers la surface par l'écoulement du liquide (Trulear et Characklis, 1982).

- Le *transport actif* intervient une fois qu'une bactérie se trouve à proximité d'une surface. Celle-ci génère une réponse chimiotactique (mouvement cellulaire) face à un gradient de concentration (Characklis et Marshall, 1990).

En régime laminaire, le transport est principalement généré par les phénomènes de diffusion. En régime turbulent, le phénomène de convection domine. Dans tous les cas, les cellules vont être transportées vers la surface et vont rentrer en contact entre elles (van Loosdrecht et Heijnen, 1996).

### **1.2.3.3 Adhésion initiale**

L'adhésion initiale des cellules est un processus bio-physico-chimique à la surface du support (van Loosdrecht *et al.*, 1990; Garrett *et al.*, 2008). Elle est divisée en deux sous-étapes nommées : *l'adhésion réversible et l'adhésion irréversible*. L'adhésion est influencée par des paramètres opératoires tels que le pH, la température, les concentrations et la disponibilité des nutriments (Lazarova et Manem, 1995). La durée de contact ainsi que la charge présente à la surface du support peuvent aussi influencer cette étape (Gjaltema et Griebe, 1995).

#### **1.2.3.3.1.1 Adhésion réversible**

Au cours de cette sous-étape, des interactions de types physico-chimiques entre les cellules bactériennes et le support sont mises en place. Des forces de types chimiques (les forces de Van der Waals, les liaisons hydrogènes) ou des forces d'attraction électrostatique interviennent (Palmer *et al.*, 2007).

L'origine ou le type de support influence donc cette première étape d'adhésion (Characklis et Marshall, 1990). Le film formé est cependant facilement éliminé par les forces de cisaillement du fluide, par le rinçage du film (Kumar *et al.*, 1998) ou par une modification des conditions du milieu.

#### **1.2.3.3.1.2 Adhésion irréversible ou l'attachement**

Cette sous-étape fait intervenir des phénomènes biologiques de co-adhésion et de co-agrégation. Ces phénomènes sont plus ou moins rapides suivant le type de microorganisme, l'environnement ou la durée de croissance (Characklis et Marschall, 1990). C'est une étape cruciale pour le développement d'un biofilm sur un support. Si elle est mal réalisée, le biofilm risque de se décrocher plus facilement (Busscher *et al.*, 1995; Willcock *et al.*, 2000).

Les cellules présentes sur le support se fixent par l'intermédiaire de leur activité métabolique. Elles produisent des EPS qui leur permettent de s'accrocher et de recouvrir la surface (Characklis et Marshall, 1990; Flemming et Wingender, 2001a). Une certaine cohésion au sein du biofilm est, petit à petit, créée. Dans le processus de nettoyage des supports, le décrochage des cellules requiert des forces plus importantes comme les forces mécaniques

(Characklis et Marshall, 1990; Kumar *et al.*, 1998), les forces de cisaillement ou un processus de dégradation spécifique (Busscher et van der Mei, 2000).

#### **1.2.3.4 Accumulation du biofilm**

L'enchevêtrement des groupes de cellules et des polymères permet d'avoir un environnement favorable à une bonne croissance des cellules (Stoodley *et al.*, 2002a). Un mouvement actif permet de redistribuer les cellules attachées au sein du film. Les cellules filles obtenues par la division cellulaire s'étalent et forment des grappes ou des groupements cellulaires. Il y a aussi un recrutement des cellules libres du milieu environnement. La composition du biofilm est souvent hétérogène, à cause de la colonisation par différents microorganismes possédant des besoins en nutriments variables. Il n'existe pas nécessairement une couche uniforme sur toute la surface du support.

Différents facteurs influencent le développement du biofilm : les micro-organismes impliqués, les propriétés du support (rugosité, nature du support...), les conditions de culture (température, pH), les paramètres hydrodynamiques (Cao et Alaerts, 1995a; Chen et Huang, 2000), la charge (Stoodley *et al.*, 2002a) ou la disponibilité du substrat (Lazarova et Manem, 1995) (cf. *paragraphe 1.2.5*). Suivant les espèces bactériennes, il existe une forte relation entre la production de polysaccharides et la structure du biofilm (Allison, 2003). Une surproduction d'EPS peut aboutir à un biofilm épais avec une structure complexe composée de groupes cellulaires et de canaux aqueux, mais avec des protubérances (Sutherland, 2001; Allison, 2003).

#### **1.2.3.5 Maturation**

Après la phase d'adhésion et d'accumulation, un état d'équilibre est atteint. La quantité macroscopique de biofilm atteint une valeur seuil limite et va rester constante (Trulear et Characklis, 1982). Les phénomènes de croissance conditionnés par l'accès au substrat sont contrebalancés par les phénomènes de détachement qui sont détaillés dans la partie suivante (cf. *paragraphe 1.2.3.6*).

### **1.2.3.6 Détachement**

Suite à la combinaison de différents phénomènes, des cellules microbiennes et d'autres composants du biofilm peuvent être transférés dans le milieu liquide. Les facteurs ayant une influence sur le détachement du biofilm sont à la fois abiotiques et biotiques. Les forces physiques, comme les forces de cisaillement, impactent la structure du biofilm, la densité et les flux internes de la matrice (Wäsche *et al.*, 2002). Les facteurs chimiques, tels que la concentration et la disponibilité des éléments nutritifs influencent le taux de croissance. L'activité métabolique a aussi une action sur le détachement (Stewart *et al.*, 2000). Les différents mécanismes de détachement sont l'érosion, l'abrasion et le sloughing (Characklis, 1990).

#### **1.2.3.6.1 Erosion**

L'érosion est définie comme une perte continue de petites parties de biofilm. Trulear et Characklis (1982) ont observé que ce type de détachement dépend à la fois des conditions dynamiques du fluide (force de cisaillement à l'interface fluide-biofilm) et des caractéristiques d'attachement de la biomasse. Le taux d'érosion augmente avec l'augmentation du cisaillement du fluide et avec l'épaisseur du biofilm (Gjaltema et Griebe, 1995). La structure et la composition du biofilm peuvent aussi influencer ce phénomène (Alpkvist *et al.*, 2006).

#### **1.2.3.6.2 Abrasion**

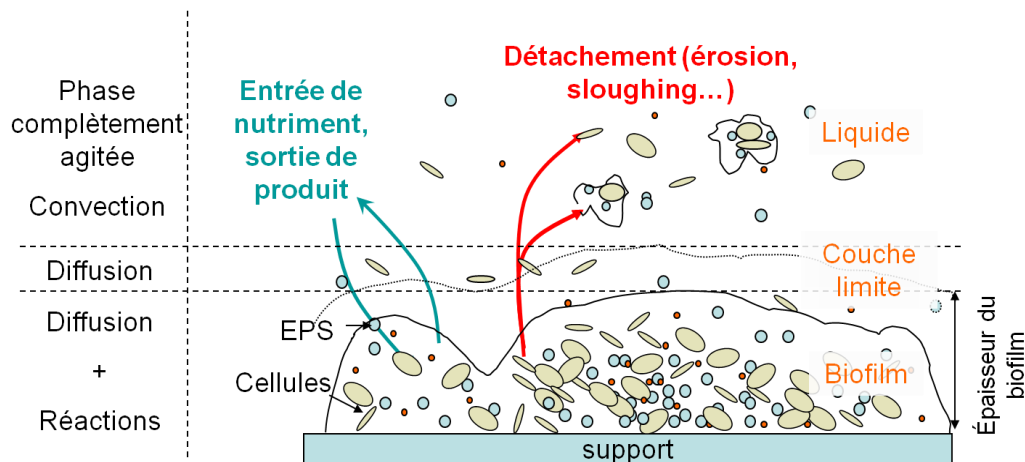
L'abrasion est une perte de biofilm provoquée par la collision entre des particules solides et le biofilm. On trouve généralement ce type de processus dans les réacteurs à lits fluidisés où le support est en suspension (Nicoletta *et al.*, 1998). Gjaltema *et al.* (1997) montrent qu'un décrochement du biofilm lié au phénomène d'abrasion peut prévenir la formation excessive de biofilm.

#### **1.2.3.6.3 Sloughing**

Le sloughing fait référence à une perte massive de biofilm (Howell et Atkinson, 1976). Il apparaît généralement lorsque le biofilm est épais et peu dense, comme dans un milieu riche en nutriment. Il est aussi observé lorsqu'il y a un brutal changement de la charge en substrat

au niveau du biofilm. Ce processus est un processus stochastique (effet aléatoire) contrairement à l'érosion. Il peut donc être causé par la dynamique des fluides et les composés en suspension (présence de certains produits chimiques dans le fluide environnant, modification des propriétés de surface de la bactérie ou du support, phénomène de lessivage) (Rittmann, 1989 ; Characklis et Marshall, 1990).

#### 1.2.4 Processus de transport dans le biofilm



**Figure 1-3 Description des différents processus de transport existant au niveau d'un biofilm (d'après Picioreanu *et al.* 2000b ; Derlon, 2008).**

La Figure 1-3 présente les différents processus de transport que l'on peut rencontrer dans un biofilm. Durant la formation du biofilm, différents phénomènes de transfert convectif et diffusif des solutés ont lieu (cf. *figure 1-3*). Dans le liquide parfaitement mélangé, les phénomènes de convection sont majoritairement présents. Dans la couche limite diffusionnelle et à l'intérieur du biofilm, les phénomènes de diffusion dominent (Zhang et Bishop, 1994a, b).

##### 1.2.4.1 Flux de matière

En général, le métabolisme intrinsèque des microorganismes au sein du biofilm n'est pas si différent de la croissance cellulaire dans le milieu liquide. Il est toutefois dépendant de phénomènes de transfert :

- le transfert de matières solubles et solides (biomasse) du liquide vers le biofilm.

- le *transfert de masse dans le biofilm*. La diffusion des composés solubles peut être décrite par la loi de Fick pour l'expression de la diffusion. Le transport des particules solides et des cellules reste encore très mal connu (Stewart, 2003), mais des études montrent qu'il est possible d'évaluer les flux internes dans un biofilm (Beyenal et Lewandowski., 2002).
- *la compétition dans un biofilm* n'est pas seulement pour le *substrat* mais également pour *l'espace de colonisation*.

#### 1.2.4.2 Convection

Ce processus est observé lorsque le transport du soluté est assuré par le flux présent dans la phase liquide et il est généralement plus rapide que le processus de diffusion.

#### 1.2.4.3 Diffusion moléculaire

Ce processus peut contribuer significativement au transport des solutés, que se soit en profondeur ou au niveau de la couche diffusionnelle.

Dans un biofilm, les solutés sont transportés par une combinaison de l'advection<sup>1</sup> et de la diffusion. La structure hétérogène de certains biofilms permet le transport par convection à cause du flux de liquide qui pénètre et circule dans les réseaux de canaux qui compose la matrice du biofilm (de Beer et Stoodley, 1995; Lewandowski *et al.*, 1995). Cependant, dans les agrégats ou les clusters cellulaires, la diffusion est reconnue comme le principal mode de transport de la matière (de Beer et Stoodley, 1995).

La diffusion peut être influencée par l'épaisseur, la porosité ou la densité du biofilm (ou de la fraction volumique de cellules et des EPS) ainsi que par les caractéristiques physico-chimiques de culture (solutés ioniques, taille des molécules) (Stewart, 1998). Le coefficient de diffusion du biofilm, ou le facteur de diffusion (rapport diffusion effective/diffusion dans l'eau), diminue fortement avec l'augmentation de la fraction volumique de la biomasse (Stewart, 2003).

---

<sup>1</sup> Transport d'une quantité additive (chaleur, énergie interne, élément chimique arbitraire, charges électriques) par le mouvement du milieu, quelle que soit l'origine de ce mouvement (instabilité gravitaire ou entrainement forcé).

## 1.2.5 Facteurs influençant la croissance du biofilm

### 1.2.5.1 Facteurs physiques

Les facteurs physiques qui influencent la croissance du biofilm sont:

-La température : Une température optimale de croissance existe pour chaque microorganisme qui va déterminer son type (psychrophile, mésophile, thermophile, hyperthermophile) (Madigan *et al.*, 1997). Les microorganismes mésophiles sont les plus nombreux et les plus fréquemment rencontrés dans les applications industrielles.

Le développement d'un biofilm est fortement influencé par la température (Annachhatre et Bhamidimarri, 1992). Elle possède également une action sur le degré d'adhésion des microorganismes (Stanley, 1983; Herald et Zottola, 1988a, b).

-Le pH : La plupart des bactéries se développent à un pH neutre, mais certains microorganismes ont besoin d'un milieu acide (bactéries acidophiles) ou d'un milieu basique (bactéries alcalophiles) pour se développer.

Le pH joue un rôle important durant les étapes de la formation du biofilm qui sont l'adsorption microbienne du support, l'attachement de microorganismes et la croissance du biofilm. Un pH neutre est souhaitable pour la croissance de nombreux biofilms aérobies (Annachhatre et Bhamidimarri, 1992).

### 1.2.5.2 Facteurs nutritifs

Les éléments qui sont nécessaires à la croissance des microorganismes sont:

- La source de carbone qui peut varier suivant le type de microorganisme (hétérotrophe ou autotrophe).
- La source d'azote dont l'origine peut être diverse. Certaines bactéries sont capables d'assimiler l'ammoniac, les nitrates, l'azote atmosphérique et d'autres vont assimiler des acides aminés. Une bactérie est constituée en moyenne de 12% d'azote (Madigan *et al.*, 1997).

– Le *phosphore* et le *soufre*, nécessaires aux bactéries pour synthétiser respectivement les acides nucléiques et les acides aminés soufrés, sont principalement d'origine inorganique (Madigan *et al.*, 1997).

Dans les procédés aérobies, les rapports DCO/N/P recommandés sont 100/5/1 (Annachhatre et Bhamidimarri, 1992). Certains éléments métalliques comme le Ni, Co, Fe, Cu, Mo peuvent être additionnés au substrat car ils sont connus pour faciliter la formation de la biomasse et peuvent jouer un rôle d'élément limitant pour la croissance.

### 1.2.5.3 Facteurs hydrodynamiques

Le cisaillement a un impact reconnu sur la structure et les performances d'un biofilm (Liu et Tay, 2001a), ainsi que sur l'agencement des cellules et le détachement (Rittmann, 1982; Chen *et al.*, 1998; Kwok *et al.*, 1998). Un cisaillement élevé favorise la formation de biofilms denses (compact) et minces qui deviennent plus résistant au détachement (Kwok *et al.*, 1998; Liu et Tay, 2001b, 2002; van Loosdrecht *et al.*, 2002). Si le cisaillement augmente, l'épaisseur diminue mais la densité du biofilm croît (Chang *et al.*, 1991; Vieira *et al.*, 1993; Ohashi et Harada, 1994a, b; Chen *et al.*, 1998) et sa porosité diminue (Ramasamy et Zhang, 2005). Le biofilm devient moins résistant au détachement (érosion) dans le cas de milieux riches (Ohashi et Harada, 1996; Chen *et al.*, 1998; Pereira *et al.*, 2002).

Dans la phase liquide, les cellules en suspension répondent au cisaillement hydraulique en changeant leur taux de croissance ou leur morphologie (taille des cellules, densité et le métabolisme) (Nollert *et al.*, 1991; Meijer *et al.*, 1993; Chen et Huang, 2000).

## 1.3 Compétition microbienne dans un réacteur à biofilm

### 1.3.1 Compétition microbienne dans le liquide

Dans un réacteur, la compétition microbienne peut être caractérisée par la dynamique des différentes populations. Les mécanismes qui gouvernent la compétition microbienne de la biomasse en suspension sont les mêmes que dans le biofilm à l'échelle locale (gradients de concentrations).



### 1.3.1.1 Croissance avec un substrat limitant.

Si deux populations  $X_1$  et  $X_2$  en compétition pour un substrat limitant unique (S) sont inoculées en réacteur fermé et en condition d'excès du substrat, chacune se développe suivant son taux de croissance ( $\mu_1$  et  $\mu_2$ ). Dans le cas où  $\mu_1 > \mu_2$ , alors la population 1 croît plus rapidement et domine le système.

Dans le cas d'un réacteur ouvert à l'état stationnaire (chémostat), la croissance est limitée par le substrat apporté. Il peut être démontré qu'il existe deux équilibres possibles: le lessivage des deux populations ou d'une seule des deux.

Un paramètre «  $j$  », caractéristique d'une concentration, est spécifique pour chaque population, notée «  $i$  ». Il est défini par :

$$j_i = K_{S_i} \frac{\delta}{\mu_{\max} - \delta} \quad \mathbf{1-5}$$

où  $i$  correspond à 1 ou 2,  $\delta$  au taux de dilution,  $\mu_{\max}$  est la vitesse spécifique de croissance maximale et  $K_s$  la constante d'affinité de Monod

Dans le liquide, si la concentration en substrat limitant est inférieure aux valeurs de  $j$ , alors les deux populations du système sont lessivées. Sinon, la population qui reste présente dans le système est celle qui aura la valeur de  $j$  la plus faible. Théoriquement, la présence des deux populations à l'équilibre est possible si celles-ci présentent des valeurs de  $j$  égales et supérieures à la valeur de la concentration en substrat limitant :

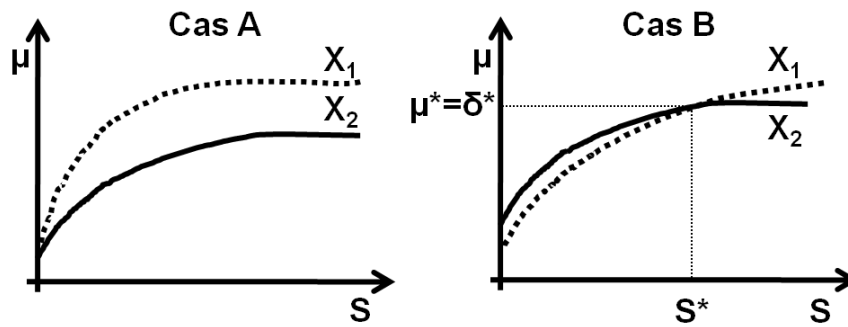
$$K_{S,1} \frac{\delta}{\mu_{\max,1} - \delta} = K_{S,2} \frac{\delta}{\mu_{\max,2} - \delta} \quad \mathbf{1-6}$$

Si  $\mu_{\max,1} = \mu_{\max,2}$  et  $K_{S1} = K_{S2}$ , donc si les deux populations ont les mêmes paramètres, alors l'équation a une infinité de solutions pour  $\delta$ .

Si  $\mu_{\max,1} > \mu_{\max,2}$  et  $K_{S1} > K_{S2}$  ou si  $\mu_{\max,1} < \mu_{\max,2}$  et  $K_{S1} < K_{S2}$ , les populations présentes ne peuvent pas coexister (cf. *cas A, Figure 1-4*), quelle que soit la concentration en substrat.

Si  $\mu_{\max,1} > \mu_{\max,2}$  et  $K_{S1} < K_{S2}$  ou si  $\mu_{\max,1} < \mu_{\max,2}$  et  $K_{S1} > K_{S2}$ , alors les populations peuvent coexister (cf. *cas B, Figure 1-4*). Les deux courbes se coupent en un seul et unique point. Il

existe donc une valeur du taux de dilution où les populations coexistent. Lorsque  $\mu_2 > \mu_1$ , la concentration en substrat  $S$  est très grande devant  $K_{S,1}$ . Quand elle est élevée, alors  $\mu_2 < \mu_1$ . Donc pour  $S$  élevée, la population « 1 » croît rapidement, mais si  $S \ll K_{S,1}$ , alors la population « 2 » croît et devient dominante. Donc, en réacteur ouvert, le couple  $\mu$  et  $K_S$  détermine le résultat de la compétition.



**Figure 1-4** Représentation des taux de croissance de deux populations en compétition pour un seul et même substrat limitant suivant le modèle de Monod. Dans le cas A, on a l'évolution du taux de croissance en fonction du substrat lorsque  $\mu_{\max,1} > \mu_{\max,2}$  et  $K_{S1} > K_{S2}$ . Dans le cas B, on a l'évolution du taux de croissance en fonction du substrat quand  $\mu_{\max,1} > \mu_{\max,2}$  et  $K_{S1} < K_{S2}$  (d'après Harder et Kuenen, 1977; Dumont, 2008).

### 1.3.1.2 Croissance avec plusieurs substrats limitants

La compétition microbienne, lors de la limitation multi-substrats, oblige à faire la distinction entre la croissance non-interactive et la croissance interactive. On considère que la croissance est non-interactive si elle est limitée par un substrat à la fois. Le taux de croissance prend des valeurs prédites pour une des populations. Donc, on a alors :

$$\text{si } \frac{S_1}{K_{S1}} < \frac{S_2}{K_{S2}} \text{ alors } \mu = \mu_{\max} \frac{S_1}{K_1 + S_1} \quad \mathbf{1-7}$$

$$\text{et si } \frac{S_2}{K_{S2}} < \frac{S_1}{K_{S1}} \text{ alors } \mu = \mu_{\max} \frac{S_2}{K_2 + S_2} \quad \mathbf{1-8}$$

Si la croissance est interactive, c'est-à-dire qu'elle utilise les deux substrats simultanément, alors l'ensemble des paramètres  $\mu_{\max}$ ,  $K_S$ , et  $Y_{X/S}$  influencent le résultat de la compétition et le taux de croissance est égal à :

$$\mu_i = \mu_{\max,i} \frac{S_1}{K_{S1} + S_1} * \frac{S_2}{K_{S2} + S_2}$$

1-9

Lorsqu'on travaille avec une limitation de type « multi-substrat », les paramètres  $\mu_{\max}$ ,  $K_S$ ,  $Y_{X/S}$  ne sont pas négligeables (Henze *et al.*, 2002; Dumont, 2008).

### 1.3.2 Compétition microbienne au sein du biofilm

Contrairement à la phase liquide qui possède une concentration en composé dissous homogène, le biofilm est caractérisé par des gradients de concentration principalement situés selon la distance par rapport à sa surface. Ainsi, même dans le cas d'un substrat simple, le biofilm peut abriter des environnements favorables à plusieurs types de microorganismes selon la position dans l'épaisseur du biofilm. Pour une concentration en substrat constante dans le liquide, selon les paramètres de Monod ( $\mu_{\max}$  ;  $K_S$ ), une espèce 1 qui peut posséder des taux de croissance supérieurs à une espèce 2 à la surface du biofilm (concentration en substrat élevé), peut ensuite posséder des conditions de croissance moins favorable dans la profondeur du biofilm, où la concentration en substrat est plus faible. La compétition entre les espèces microbiennes est ainsi plus difficile à appréhender que dans le liquide.

### 1.3.3 Compétition entre la biomasse en suspension et la biomasse planctonique

Dans un réacteur parfaitement agité en continu, lors de l'ensemencement du milieu, tous les microorganismes se trouvent en suspension dans la phase liquide, sous forme planctonique. Le temps de rétention de la biomasse libre correspond au temps de séjour hydraulique du réacteur. Heijnen *et al.* (1992) et Tijhuis *et al.* (1994) ont montré que pour favoriser la fixation des cellules, le taux de dilution ( $\delta=V/Q$ ) du système doit être inférieur au taux de croissance des bactéries concernées. Cela limite la mobilisation du substrat par les bactéries libres et favorise leur lessivage. Un temps de séjour faible est donc plus favorable à la croissance des cellules fixées. La quantification du substrat consommé ainsi que la croissance cellulaire au sein du liquide et dans le biofilm permettent de connaître réellement les flux de substrat (Grady *et al.*, 1999; Rittmann et McCarty, 2001).

Une étude réalisée par Chang *et al.* (2005) montre que la consommation du substrat se fait majoritairement par les micro-organismes du liquide et non ceux du biofilm. Lorsque la concentration en microorganismes planctoniques est importante, les cellules attachées sont soumises à des concentrations en substrat inférieure à celle de la phase liquide, et leurs taux de croissance sont généralement plus faibles.

### 1.3.4 Régimes de croissance

Dans le cas d'un système à biofilm, la prédiction du régime de croissance est un point clé. Picioreanu *et al.* (1998) définissent un paramètre  $G$  pour faire le lien entre le taux de croissance de la biomasse et le transfert de matière dans le biofilm (souvent associé pour des modèles en 2D et 3D). Il est simple d'utilisation mais nécessite la connaissance des paramètres opératoires et cinétiques. Le paramètre  $G$  se définit par (Picioreanu *et al.*, 1998) :

$$G = L_f^2 \frac{\mu_{\max} \cdot X_{\max}}{D_s \cdot S_{\text{liquide}}} \quad \mathbf{1-10}$$

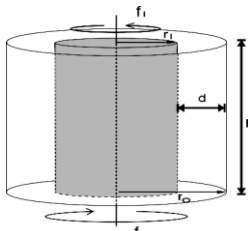
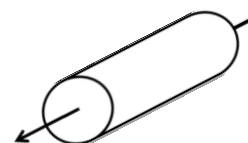
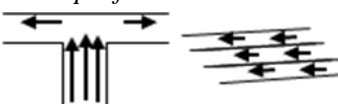
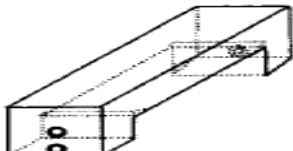
avec  $S_{\text{liquide}}$  : la concentration en substrat dans le liquide ( $M_{\text{DCO}} \cdot L^{-3}$ ),  $X_{\max}$  : la concentration maximum en biomasse dans le biofilm ( $M_{\text{DCOx}} \cdot L^{-3}$ ),  $\mu_{\max}$  : le taux de croissance maximum ( $T^{-1}$ ),  $D_s$  : le coefficient de diffusion du substrat ( $L^2 \cdot T^{-1}$ ),  $L_f$  : l'épaisseur du biofilm (L). Le calcul de ce paramètre permet de définir si le régime est limité par le transfert ( $G > 1$ ) ou par la croissance bactérienne ( $G < 1$ ).

## 1.4 Dispositifs expérimentaux pour l'étude des biofilms

### 1.4.1 Réacteurs utilisés pour la croissance des biofilms

Des réacteurs spécifiques ont été développés à l'échelle du laboratoire pour effectuer la croissance de biofilms. En effet, la compréhension des mécanismes mis en jeu lors de la colonisation d'une surface par des micro-organismes nécessite une maîtrise parfaite des conditions opératoires du procédé et une homogénéité de celles-ci à la surface des matériaux à coloniser. Le tableau 1-2 présente une synthèse des différents réacteurs couramment utilisés pour étudier les biofilms.

Tableau 1-2 Réacteurs à biomasse fixée les plus couramment utilisés à l'échelle du laboratoire.

Réacteur	Description	Avantages	Désavantages	Références
<p>Réacteur annulaire rotatif (Rotor Torque)</p> 	<p>Composé de deux cylindres concentriques, dont un en rotation. L'échantillonnage se fait en plaçant des supports fixés sur les parois du cylindre.</p>	<p>Ratio surface/ volume important, bon mélange, maîtrises des conditions hydrodynamiques, surface d'échantillonnage suffisante</p>	<p>Présence de vortex de Taylor pour certains régimes hydrodynamiques, design pas adapté pour des petites échelles (régime turbulent)</p>	<p>Characklis et Marshall, 1990; Huang et Liu, 1993; Bryers, 2000 Choi et Morgenroth, 2003 Staudt <i>et al.</i>, 2004 Ochoa <i>et al.</i>, 2007</p>
<p>Réacteur tubulaire (Dispositif de Robbins)</p> 	<p>Conduite circulaire et rectangulaire. Positionnement de sections amovibles pour l'échantillonnage.</p>	<p>Fabrication simple, quantité d'échantillons importante, taille du tube variable, possibilité de mesure en ligne avec les microsondes.</p>	<p>Echantillonnage difficile demandant la purge du système</p>	<p>Horn <i>et al.</i>, 1995 Bryers, 2000 Wäsche <i>et al.</i>, 2000; 2002; Ohl <i>et al.</i>, 2004 Lewandowski <i>et al.</i>, 2007 Elenter <i>et al.</i>, 2007</p>
<p>Cellules à plaque parallèle ou radiale (Flow Cells), parfois tubulaire</p> 	<p>Ecoulement entre deux plaques parallèles (entrefer de petite taille).</p>	<p>Contrôle des conditions hydrodynamiques, conditionnement simple, couplage direct avec un microscope.</p>	<p>Dimensions de petite taille (régime laminaire), prélèvement direct du biofilm impossible.</p>	<p>de Beer et Stoodley, 1995; Stoodley <i>et al.</i>, 1999 McLean, 2002 Stoodley <i>et al.</i>, 2002b; Palmer <i>et al.</i>, 2007</p>
<p>Réacteur canal</p> 	<p>Chambre fermée ou ouverte où la plaque de fond amovible permet de placer des coupons</p>	<p>Mesure en continu par des microsondes des composés dissous dans le fluide et le biofilm</p>	<p>Hydrodynamique mal définie, gradients de concentration axiaux et transversaux.</p>	<p>Ohashi et Harada, 1994a Cao et Alaerts, 1995b Beyenal <i>et al.</i>, 1998 Jackson <i>et al.</i>, 2001; Lewandowski <i>et al.</i>, 2007</p>

### 1.4.2 Réacteur annulaire rotatif (RAR)

Les réacteurs annulaires rotatifs sont caractérisés par leur configuration atypique mettant en jeu deux cylindres concentriques. Ils sont aussi appelés réacteurs de Couette-Taylor ou Rotors Torques à cause de leurs caractéristiques d'écoulement entre ces deux cylindres.

Ce type de réacteur est un cas particulier du dispositif d'origine élaboré par Couette en 1923 (Liu *et al.*, 1999; Coufort, 2004) (le premier dispositif pouvait faire tourner ses deux cylindres dans le même sens ou en sens opposé). Il existe plusieurs géométries de ce réacteur : co-axial ou conique (Characklis et Marshall, 1990; Noui-Mehidi *et al.*, 2005).

#### 1.4.2.1 Caractéristiques physiques

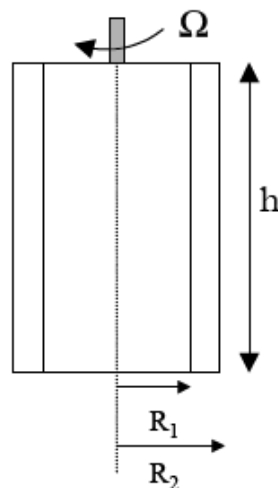


Figure 1-5 Schéma d'un réacteur Couette-Taylor co-axial.

La Figure 1-5 présente le schéma d'un réacteur annulaire co-axial.  $R_1$  et  $R_2$  représentant les rayons des deux cylindres (rayon externe pour le cylindre interne et rayon interne pour le cylindre externe). «  $h$  » représente la hauteur de ces deux cylindres. La vitesse de rotation angulaire est notée «  $\Omega$  ». L'entrefer «  $e$  » correspond à l'espace séparant les deux cylindres ( $e = R_2 - R_1$ ). Le cylindre fixe est appelé « Stator » et le cylindre en rotation « Rotor » (Annachhatre et Bhamidimarri, 1992).

Dans certains cas, une boucle de recirculation est associée pour réaliser le transfert d'oxygène. Le taux de recirculation est indépendant du taux de dilution. De plus, les contraintes

hydrodynamiques de type cisaillement sont fonction de la vitesse de rotation du cylindre et ne sont donc pas liées au temps de séjour.

#### 1.4.2.2 Nombres adimensionnels

L'origine de l'instabilité de Couette-Taylor est une *instabilité centrifuge*.

Deux nombres adimensionnels, permettant de comparer les forces d'inertie (ou centrifuge) sur les forces visqueuses, sont utilisés : le nombre de Reynolds (Re) et le nombre de Taylor (Ta).

##### 1.4.2.2.1 Nombre de Reynolds (Re)

Le nombre de Reynolds, établi en 1895, est le rapport entre les forces d'inertie et les forces visqueuses; ou bien, le rapport (qualitatif) du transfert par convection par le transfert par diffusion de la quantité de mouvement. Il permet de caractériser l'écoulement mais aussi le type de régime. Il s'exprime de manière générique sous la forme suivante :

$$Re = \frac{U \cdot D_h}{\nu} \quad \mathbf{1-11}$$

avec  $\nu$  la viscosité cinématique du fluide ( $L^2.T^{-1}$ ),  $U$  la vitesse ( $L.T^{-1}$ ) et  $D_h$  le diamètre hydraulique qui est caractéristique de la géométrie du système (L).

Dans le cas d'un réacteur co-axial, le nombre de Reynolds s'exprime de la manière suivante :

$$Re = \frac{\Omega R_1 (R_2 - R_1)}{\nu} \quad \mathbf{1-12}$$

avec  $\nu$  est la viscosité cinématique du fluide ( $L^2.T^{-1}$ ),  $\Omega$  est la vitesse angulaire ( $rad.T^{-1}$ ).

#### 1.4.2.2 Nombre de Taylor ( $Ta$ )

Le nombre de Taylor caractérise l'importance de la rotation d'un fluide autour de l'axe vertical. Il est caractérisé par le rapport des forces centrifuges par rapport aux forces visqueuses (Couette, 1935). La force centrifuge  $\frac{\rho \cdot u^2}{r}$  est plus importante près du cylindre interne que du cylindre externe. L'expression du nombre de Taylor peut prendre plusieurs formes, et nous adopterons la relation présentée par Racina et Kind (2006):

$$Ta = \frac{\Omega \cdot R_1^{1/2} \cdot e^{3/2}}{\nu} \quad \mathbf{1-13}$$

Ce nombre permet de caractériser les régimes de turbulence dans l'espace annulaire des deux cylindres dont l'élément interne est en rotation (Kataoka, 1986). Il faut noter que la transition entre les différents flux se fait suivant un nombre de Taylor critique qui est un paramètre de neutralité de la stabilité de l'écoulement.

#### 1.4.2.3 Régimes hydrodynamiques

Les écoulements dans les cellules de Couette ont été largement étudiés par le passé (Kataoka, 1986; Wereley et Lueptow, 1998, 1999). Le réacteur de Couette-Taylor peut présenter différents régimes hydrodynamiques. Ils sont recensés suivant les vitesses de rotation auxquels ils sont observés. Dans notre étude, l'écoulement considéré est un écoulement engendré par la rotation du cylindre interne avec un flux de matière provenant d'une des deux extrémités. Kataoka (1986) présente un article de référence très riche au niveau de ce type d'écoulement. Dans ce type de réacteur, l'instabilité et le régime d'écoulement du transitoire vers la turbulence sont nombreux.

##### 1.4.2.3.1 Ecoulement de Couette

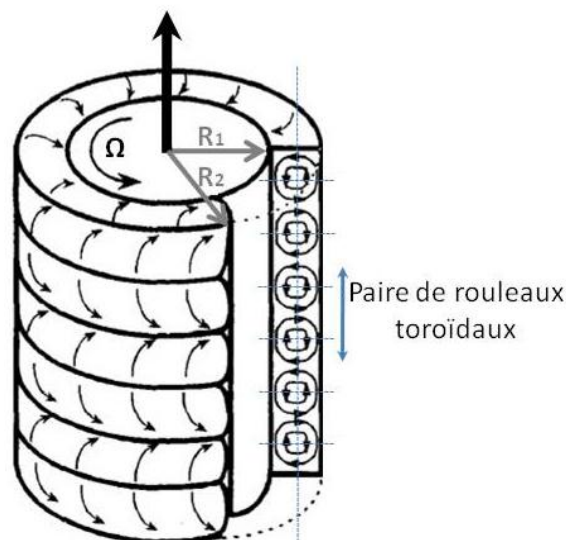
Cette phase existe lorsque la vitesse de rotation du cylindre est faible. Le mouvement du fluide a une direction tangentielle. L'écoulement est stable et axisymétrique.



### 1.4.2.3.2 *Écoulement de Couette-Taylor : « Taylor vortex flow ».*

Si la vitesse de rotation augmente, l'écoulement devient instable. Cette instabilité apparaît souvent lorsque des phénomènes antagonistes comme l'inertie du fluide en mouvement (forces centrifuges engendrées par la rotation) ou la viscosité du fluide, deviennent tellement important que la symétrie de l'écoulement est forcée de se briser.

Des tourbillons se créent à l'extrémité du système avant de remplir l'entrefer. Cet empilement de vortex est appelé vortex de Taylor (Ohmura *et al.*, 1997). Leur section correspond à la taille de l'entrefer et les deux vortex sont des cercles dont leurs centres se situent sur l'axe commun des cylindres (cf. *Figure 1-6*). Cet écoulement est appelé « écoulement tourbillonnaire » (Vortex Flow en anglais).



**Figure 1-6** Schéma de la structure des vortex de Taylor (d'après Ohmura *et al.* 1997).

Si la vitesse de rotation augmente, cet écoulement tourbillonnaire devient lui aussi instable et des nouveaux écoulements font leurs apparitions.

### 1.4.2.3.3 *Écoulement tourbillonnaire ondulant: « Wavy vortex flow ».*

Cette phase apparaît lorsque l'écoulement axisymétrique de Taylor devient lui-même instable. Un écoulement instationnaire apparaît. Un mouvement ondulatoire se superpose aux vortex de

Taylor présent suivant la direction axiale. Les centres des vortex sont animés d'un mouvement axial et radial.

Cette phase d'écoulement peut être classée suivant leur nombre de tourbillons et leur nombre de vagues. Davey (1962), par des études théoriques sur l'instabilité de l'écoulement de Taylor, montre que ce type d'écoulement est périodique et ne comporte qu'une seule fréquence fondamentale. On parle d'un écoulement « Singly Periodic Wavy Vortex Flow ». Si la vitesse de rotation du cylindre interne augmente, l'amplitude des vagues varie périodiquement et l'écoulement se complexifie : c'est le « Double Periodic Wavy Vortex Flow ».

Ensuite, cet écoulement tourbillonnaire devient chaotique et faiblement turbulent : on parle alors du « Chaotic Wavy Vortex Flow » (Wereley et Lueptow, 1998, 1999).

#### ***1.4.2.3.4 Ecoulement de Taylor turbulent et l'écoulement Turbulent***

Si la vitesse du cylindre augmente, les vagues présentes aux niveaux des vortex disparaissent, mais leurs structures tourbillonnaires sont conservées. On a un écoulement de « Taylor Turbulent » ou « Turbulent Vortex Flow ». Au-delà de cette phase, les tourbillons sont cassés par la turbulence et l'écoulement est purement tangentiel et pleinement turbulent.

La Figure 1-7 présente le récapitulatif des différents régimes et des transitions présentées. Ce récapitulatif est présenté en fonction d'une valeur critique du nombre de Taylor  $Ta_c$ , qui est déterminé par une vitesse de rotation angulaire critique  $\Omega_c$  du cylindre interne correspondant à l'apparition des instabilités du fluide dans l'entrefer.

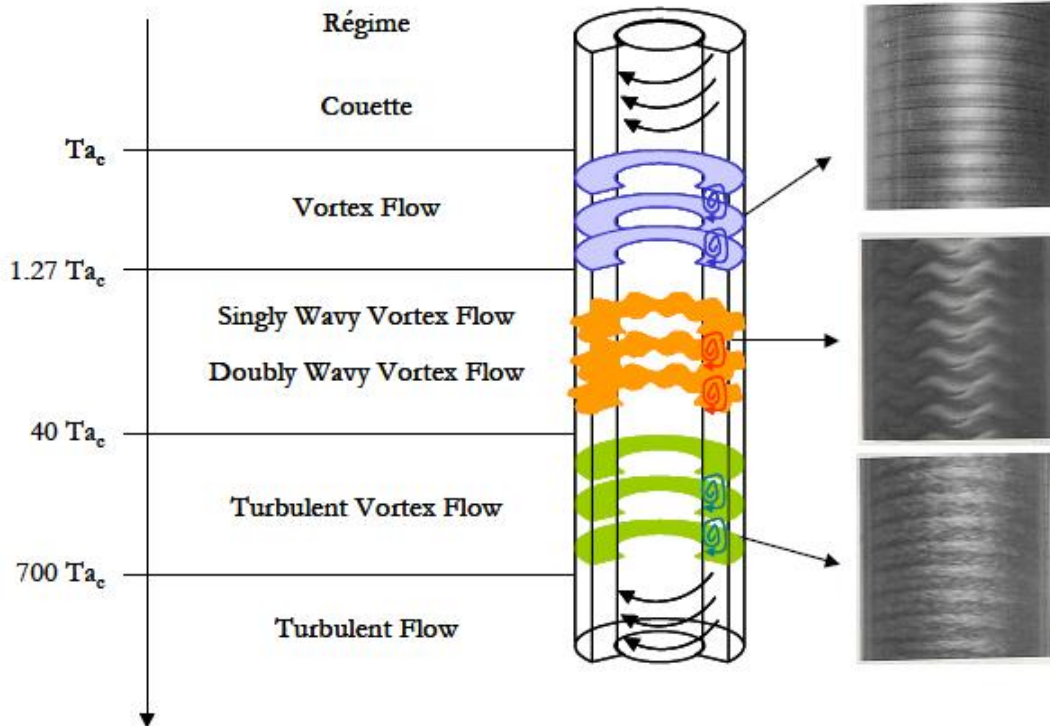


Figure 1-7 Transitions dans un réacteur de Couette-Taylor (d'après Andreueck *et al.* 1986; Coufort, 2004).

#### 1.4.2.4 Contrainte de cisaillement

La contrainte hydrodynamique qui est principalement appliquée à la surface du cylindre interne et externe, est reliée à l'écoulement tangentiel, lui-même lié à la rotation du rotor. Cette contrainte de cisaillement est générée par le gradient de vitesse près de la surface du réacteur. Il est uniforme sur les cylindres internes et externes. Différentes corrélations sont développées pour estimer la contrainte de cisaillement  $\tau_p$  dans cette géométrie. Une des expressions est celle proposée par Racina et Kind (2006) qui est basée sur le concept de Wendt (1933) :

$$\tau_p = 2,13 \frac{(R_1/R_2)^{3/2}}{(1 - R_1/R_2)^{7/4}} \text{Re}^{1,445} \frac{\rho v^2}{2\pi R_1} \quad \text{pour } \text{Re} > 8 \cdot 10^2 \quad \mathbf{1-14}$$

$$\tau_p = 0,113 \frac{(R_1/R_2)^{3/2}}{(1 - R_1/R_2)^{7/4}} \text{Re}^{1,764} \frac{\rho v^2}{2\pi R_1} \quad \text{pour } \text{Re} > 10^4 \quad \mathbf{1-15}$$

Avec  $\tau_p$  est la contrainte de cisaillement exprimée en unité de pression ( $M.T^{-2}.L^{-1}$ ),  $\rho$  la masse volumique du fluide d'étude ( $M.L^{-3}$ ),  $\nu$  la viscosité cinématique du fluide d'étude ( $L^2.T^{-1}$ ).

## 1.5 Techniques d'investigation des biofilms

De nombreuses techniques ont été mises en place par des scientifiques pour caractériser les propriétés physiques, morphologiques, mécaniques, chimiques, et microbiologiques.

### 1.5.1 Paramètres globaux

Le biofilm peut être caractérisé par la quantité de biomasse attachée, mais aussi par l'épaisseur, la densité, la porosité et la rugosité de surface du biofilm. Ces différents paramètres peuvent être liés entre eux.

#### 1.5.1.1 Quantification de la biomasse attachée

Des techniques simples permettent d'avoir accès à une quantification macroscopique de la biomasse colonisant un support. Certaines de ces techniques globales sont basées sur la détermination de la Demande Chimique en Oxygène (DCO) ou du Carbone Organique Total (COT). Plus simplement, le biofilm est également caractérisé par la détermination de la matière humide (MH), de la matière sèche (MSA) et de la matière volatile (MVA) attachées.

Une autre méthode développée par Horn et Hempel (1997b) permet de mesurer la densité moyenne en terme de masse de matière sèche par unité de volume du biofilm. Le volume du biofilm est estimé à partir de sa masse humide en considérant que sa densité est proche du milieu liquide environnant (Horn et Hempel, 1997b; Staudt *et al.*, 2004):

$$\rho_f = \frac{m_{MSA}}{\frac{m_{MH}}{\rho_{humide}}} \quad \mathbf{1-16}$$

Avec

$m_{MH}$ , la masse de biofilm humide (M),

$m_{MSA}$ , la masse de biofilm séchée (M),

$\rho_{humide}$  la masse volumique du milieu liquide (M.L<sup>-3</sup>).

La mesure de la masse volumique est importante car elle permet d'observer et de caractériser l'impact des conditions de croissance et hydrodynamique sur la structuration du biofilm. L'augmentation de la masse volumique du biofilm peut engendrer une diminution du transport au niveau du biofilm (Kwok *et al.*, 1998; Wäsche *et al.*, 2000) et en profondeur de celui-ci (Zhang et Bishop, 1994a).

### 1.5.1.2 Epaisseur

La détermination de l'épaisseur est un paramètre important dans la caractérisation des biofilms. L'épaisseur varie considérablement en fonction de la morphologie du support, de l'âge du biofilm et des conditions hydrodynamiques et opératoires. Il existe différentes méthodes directes et indirectes pour caractériser l'épaisseur.

Les mesures directes sont souvent réalisées par microscopie optique (Lazarova et Manem, 1995; Wolf *et al.*, 2002), mais ces techniques ne tiennent pas compte de l'hétérogénéité de la surface. Des mesures indirectes donnent des informations plus précises, comme la conductance électrique ou la résistance thermique. Okkerse *et al.* (2000) mesurent la variabilité de l'épaisseur en utilisant un capteur optique à triangulation laser (résolution de 19,2  $\mu\text{m}$ ). Manz *et al.* (2003) utilisent un microscope à résonance magnétique pour mesurer l'hétérogénéité de l'épaisseur des biofilms (résolution de 31  $\mu\text{m}$ ). D'autres études existent où le biofilm est cryogénisé et sectionné avant d'être étudié au microscope confocal ou à balayage électronique (Stewart *et al.*, 1995).

Horn et Hempel (1997b) et Staudt *et al.* (2004) ont développé et amélioré une méthode simple permettant de corréler l'épaisseur du biofilm avec la masse volumique du biofilm humide (M.L<sup>-3</sup>) :

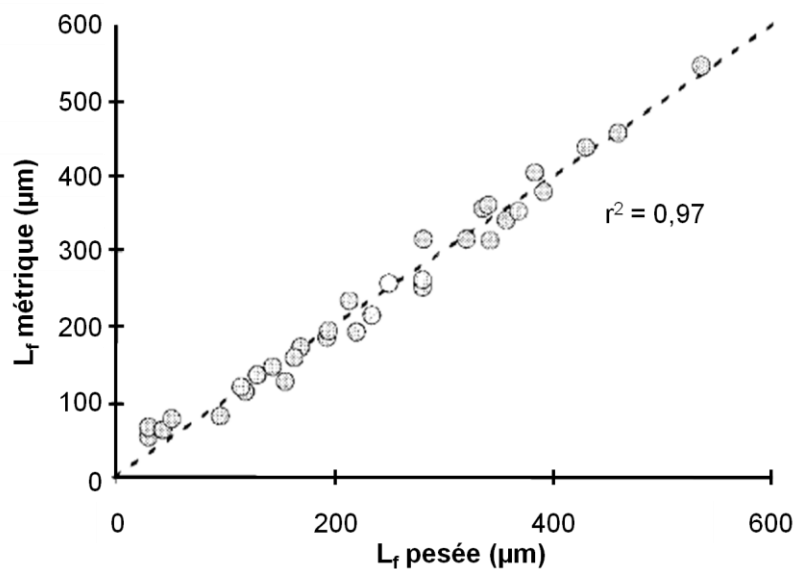
$$L_f = \frac{m_{MH}}{\rho_{humide} \cdot A_f} \quad \mathbf{1-17}$$

Avec:

$A_f$  l'aire de la surface du support colonisée en ( $L^2$ ),

$L_f$ , l'épaisseur de film (L).

Pour cela, l'échantillon prélevé est « égoutté » durant quelques minutes avant d'être pesé (la durée d'égouttage est évaluée suivant le support du biofilm à peser). La Figure 1-8 donne l'évolution linéaire des valeurs de l'épaisseur entre la méthode de pesée et la méthode mesurant l'épaisseur par microscopie. Les résultats obtenus proviennent d'un biofilm produit dans un réacteur tubulaire. L'erreur de mesure est d'environ 3%.



**Figure 1-8** Courbe de calibration de l'épaisseur du biofilm obtenue par pesée avec l'épaisseur définie par mesure métrique au sein d'un réacteur tubulaire (d'après Horn et Hempel, 1997b).

### 1.5.1.3 Porosité et tortuosité

La porosité est la propriété d'un corps qui présente des interstices entre ses molécules et aussi une valeur numérique qui caractérise ces interstices (rapport du volume des vides du matériau divisé par le volume total). Elle permet de caractériser la portion de biofilm qui est occupée par le liquide du milieu à l'extérieur des clusters de microorganismes. La porosité est un paramètre important dans un biofilm car elle influence la diffusion effective. La tortuosité

donne une information identique sur la complexité du biofilm. Son expression est définie par l'inverse de la porosité:

$$\tau = \frac{1}{\theta} \quad \mathbf{1-18}$$

En 1994, Zhang et Bishop (1994a, b) rapportent que la tortuosité et la diffusion effective ou la diffusion au sein du film dépendent de la densité et de la porosité du biofilm. Ils ont démontré que la porosité passe de 80% à 60% dans la profondeur du biofilm. Cela entraîne une diminution du flux de substrat et donc une limitation de la biomasse active. De plus, si la densité augmente, la porosité et le transport du liquide vers les cellules en profondeur diminuent (Zhang et Bishop, 2001). Dans leur étude sur la sécrétion d'EPS en fonction du cisaillement, Ramasamy et Zhang (2005) montrent que lorsque le cisaillement augmente, la sécrétion d'EPS est plus importante et réduit la porosité du biofilm.

La détermination de la porosité est souvent basée sur des relations mettant en avant la fraction de biomasse et d'EPS présentes au sein du biofilm. Cette relation, développée par Zhang et Bishop (1994a), nécessite la connaissance de la fraction du matériel cellulaire qui a été lysée, la fraction d'eau dans les cellules (90%) et la fraction de la biomasse contenant cette eau. Une mesure des phospholipides est réalisée puis convertie en biomasse. La porosité peut être aussi obtenue par la microscopie confocale et une analyse d'image (Lewandowski, 2000).

Une autre méthode pour évaluer la porosité est d'estimer la diffusion au sein du biofilm. Le calcul du coefficient de diffusion est corrélé avec la mesure de la porosité  $\theta$  et du facteur de tortuosité  $\kappa$ . Le facteur de tortuosité est égal à :  $\kappa = \tau^2$

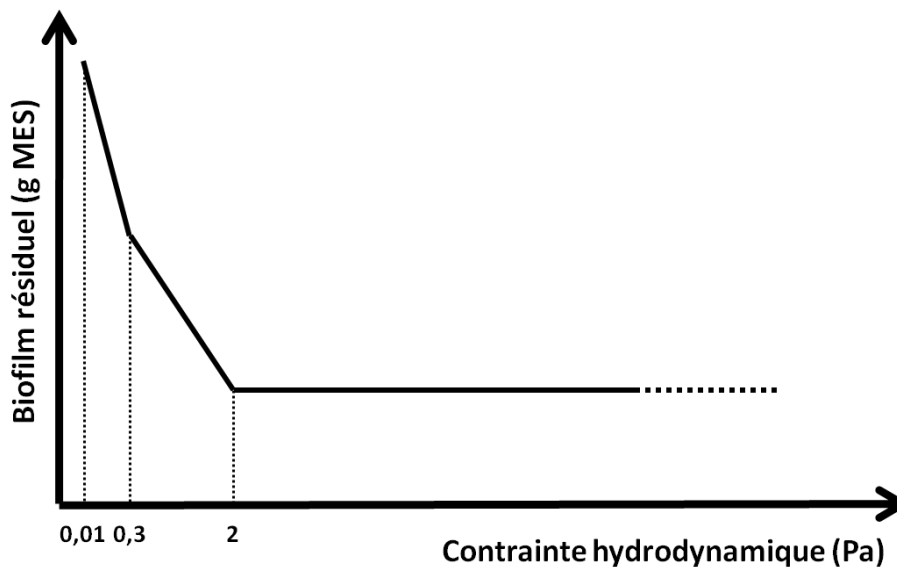
Zhang et Bishop (1994b) démontrent le lien entre les coefficients de diffusion d'un composé qui se diffuse du liquide vers le biofilm. Ils affirment que:

$$D_{effective} = D_f = \frac{\theta}{\kappa} \cdot D \quad \mathbf{1-19}$$

Le rapport de la porosité sur le facteur de tortuosité correspond donc au facteur de diffusion noté  $f_D$ . Pour un biofilm ayant une porosité entre 0,85 et 0,60 en profondeur, le facteur de tortuosité associée est de 1,15 à 1,6.

### 1.5.2 Force de cohésion

Au cours du développement du biofilm, l'épaisseur de celui-ci est régulée d'une part, par la croissance et d'autre part par le détachement. La résistance au détachement est liée aux forces de cohésion. Derlon *et al.* (2008) ont démontré que le biofilm se détache progressivement lorsque l'on augmente les contraintes hydrodynamiques de 0,01 à 2 Pa (*cf. Figure 1-9*). Une masse de biofilm résiduelle reste attachée au support à chaque étape. Au-delà de 2 Pa, il y a l'apparition d'une couche basale qui représente environ 20% de la masse totale du biofilm. Cette couche est très cohésive et reste constamment adhérente au support. Il a été mis en évidence qu'il existe une stratification verticale de la cohésion qui augmente avec la profondeur. La partie peu cohésive est sensible au détachement.



**Figure 1-9** Représentation schématique du biofilm résiduel après application de contraintes hydrodynamiques (en Pa) croissantes (d'après Derlon *et al.* 2008).

Pour obtenir ce type de résultats, une méthode d'étude indirecte, basée sur des tests d'érosion et d'abrasion, a été utilisée. Le test d'érosion soumet le biofilm à différentes contraintes hydrodynamiques à la surface du support d'étude placé dans un réacteur de Couette-Taylor. La distribution des forces de cisaillement à la surface du support a été déterminée par Ochoa *et al.* (2007). Le test d'abrasion est réalisé dans un réacteur à lit fluidisé où un flux d'air met en mouvement des particules qui vont rentrer en collision avec le biofilm.



Il existe aussi des méthodes de mesures directes de la cohésion. Le biofilm peut être, par exemple, découpé en plusieurs tranches à différentes profondeurs et analysé par Microscopie à Force Atomique (AFM). L'énergie de cohésion augmente avec la profondeur du biofilm. Ahimou *et al.* (2007) ont montré que l'on pouvait avoir un facteur de cinq par rapport à l'énergie de cohésion mesurée en surface du biofilm. Rochex *et al.* (2009) rapportent que la composition de la biomasse attachée est plus diversifiée en profondeur et que la structuration de la communauté peut être un facteur influençant la cohésion.

### **1.5.3 Exo-polymères (EPS)**

Dans la littérature de nombreuses études portent sur les EPS présents dans les biofilms. Cependant, les méthodes mises en place ne permettent pas de quantifier la totalité des EPS présents (Ras, 2008). La composition des EPS varie en fonction de la composition de l'effluent de l'alimentation, mais également des conditions de fonctionnement du procédé biologique et des populations microbiennes qui constituent le biofilm. En général, la proportion d'EPS dans les biofilms varie entre 50 et 90% de la matière organique totale (Nielsen *et al.*, 1997).

Ces dernières années, afin de limiter les problèmes liés à quantification des EPS, de nombreuses techniques ont été développées pour étudier les EPS dans les biofilms. Nous rencontrons les microélectrodes et les sondes génétiques (Neu et Lawrence, 1999) qui peuvent être analysés par microscopie confocale laser à balayage par exemple (Stewart *et al.*, 1995).

### **1.5.4 Activité et transfert au sein du biofilm**

#### **1.5.4.1 Généralités**

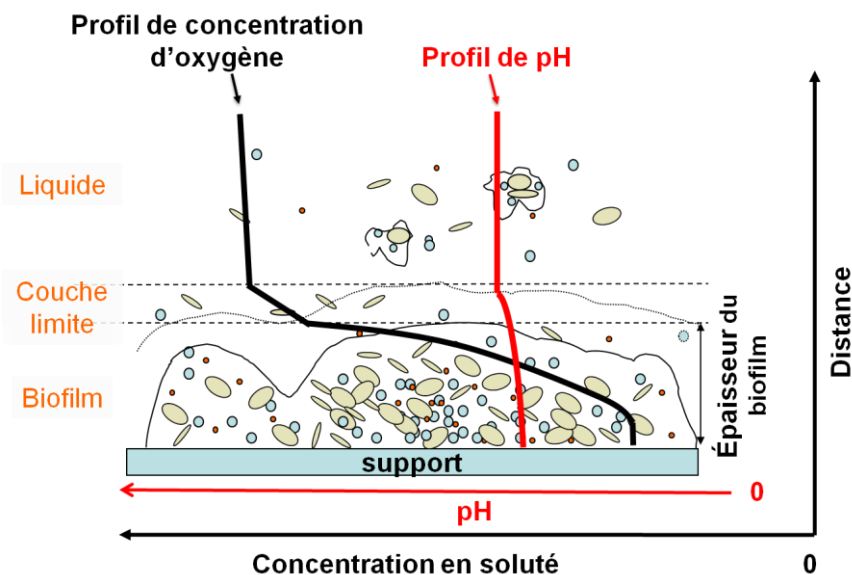
L'accès au substrat par les microorganismes d'un biofilm peut être décrit en trois étapes : le transport du liquide vers la surface externe du biofilm (étape A), la diffusion du substrat au sein du biofilm (étape B) et la consommation de celui-ci par les microorganismes (étape C). La première étape (A) est un phénomène purement physique. A l'équilibre, aux niveaux des

bilans matières sur le biofilm, le flux qui va vers le biofilm est égal au flux qui traverse le biofilm. Il est égal aussi à l'ensemble des réactions (Zhang et Bishop, 1994c).

Afin d'étudier les différents processus de transfert, des outils se sont développés comme les microélectrodes. Elles sont utilisées pour définir les flux au niveau des réacteurs à lit fixe et la mesure du transfert de matière au niveau de la couche diffusionnelle et dans le biofilm (Beuling, 1998).

La Figure 1-10 décrit l'allure d'un profil de concentrations d'oxygène dissous et de pH suivant chaque compartiment du biofilm (Schinkel et Klose, 2002). L'évolution de la concentration en oxygène dissous qui est déterminée permet de caractériser les paramètres de transfert dans le biofilm comme la diffusion et/ou le coefficient de transfert.

La mesure de profils de concentrations est réalisée sur du biofilm en milieu aqueux. Différentes configurations de réacteurs sont utilisées pour faire la mesure avec les microélectrodes. Les plus couramment utilisés sont les réacteurs de type canal ou tubulaire (Zhang et Bishop, 1994c; Lewandowski *et al.*, 1995; Horn et Hempel, 1997a, b; Stoodley *et al.*, 1997; Wäsche *et al.*, 2000).



**Figure 1-10** Description de l'allure des profils de concentration et de pH en lien avec les différents compartiments du biofilm (d'après Zhang et Bishop, 1994c).

Il est possible de réaliser aussi des mesures de profils de température ou de différents métabolites :  $H_2S$  (Jeroschewski *et al.*, 1996),  $S_2$ ,  $H_2$  (Ebert et Brune, 1997),  $NO_3^-$  (de Beer,

1989; Schramm, 2003),  $\text{NO}_2^-$  (de Beer *et al.*, 1997b),  $\text{NH}_4^+$  (de Beer *et al.*, 1997b),  $\text{CO}_2$ ,  $\text{CH}_4$  (Damgaard *et al.*, 2001).

Des microélectrodes qui ont une résolution spatiale importante ( $< 50 \mu\text{m}$ ) due à leur pointe de petit diamètre (1-20  $\mu\text{m}$ ) permettent de mesurer des microgradients de manière reproductible.

### 1.5.4.2 Microcapteurs

Les microcapteurs sont classés en deux sous groupes : les microcapteurs électrochimiques et les microcapteurs à fibre optique.

#### 1.5.4.2.1 Microcapteurs électrochimiques ou les microélectrodes

Parmi les microcapteurs électrochimiques, il existe les microcapteurs potentiométriques dont la mesure est obtenue par un échange d'ions au travers d'une membrane. La différence de charge (caractérisée par une différence de potentiel) sera exprimée par la loi de Nernst. Trois microcapteurs sont couramment utilisés : l'électrode  $\text{Ag}/\text{Ag}^+$  demi-cellulaire, l'électrode échangeuse d'ions (LIX : liquid ion-exchange) (Revsbech *et al.*, 1989; Kuhl et Jørgensen, 1992; de Beer *et al.*, 1997b; Schramm *et al.*, 1997; Santegoeds *et al.*, 1998) et l'électrode de pH. Cette dernière est l'une des plus utilisée. La microélectrode de pH est une version miniature de l'électrode couramment utilisée dans l'industrie avec une membrane sélective en ion  $\text{H}^+$ .

Il existe aussi les sondes ampérométriques. Ces types de microcapteurs sont utilisés pour faire la mesure de  $\text{O}_2$ ,  $\text{H}_2\text{S}$ ,  $\text{H}_2$ ,  $\text{N}_2\text{O}$  et  $\text{HClO}$  (Revsbech *et al.*, 1989; Jeroschewski *et al.*, 1996; Ebert et Brune, 1997). Leur principe est basé sur une réaction électrochimique qui génère un courant mesuré par pico-ampérométrie. Ce courant est proportionnel à la concentration du soluté mesuré. Le microcapteur le plus connu est l'électrode à dioxygène dissous, et notamment le microcapteur de type Clark avec une cathode immergée dans un électrolyte retenu par une membrane en silicone.

Les micro-biocapteurs, enfin, utilisent l'activité cellulaire à la pointe de celui-ci (Santegoeds *et al.*, 1998; Damgaard *et al.*, 2001). Ce type de capteur est assez récent. Dans la littérature, les plus courants sont le biocapteur du glucose (basé sur l'oxydation du glucose), le biocapteur du nitrate et du méthane. Cependant, contrairement aux autres capteurs, ceux-ci ont une durée de vie assez limitée et leurs pointes sont encore larges.

#### **1.5.4.2.2 Microcapteurs à fibres optiques**

Ils sont composés de fibres coniques qui collectent la lumière, directement ou indirectement, à la pointe du capteur. Le système est un équipement optoélectronique (composé de quelques diodes (LED) qui émettent des lumières brillantes par excitation de la fluorescence). Certains types de ces capteurs ont été développés pour mesurer l'oxygène, la température et le pH.

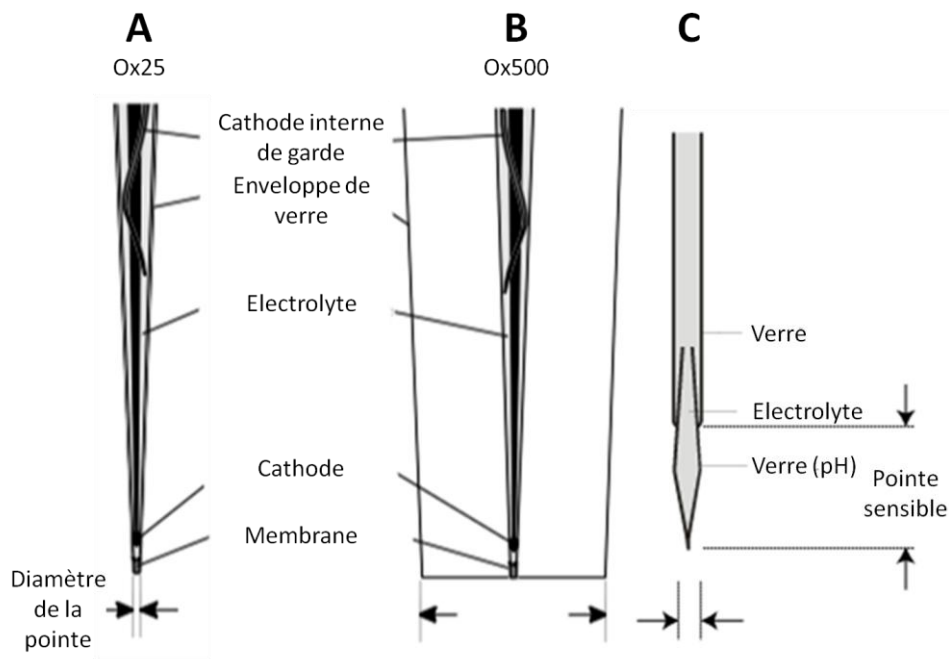
#### **1.5.4.3 Microélectrode à O<sub>2</sub> dissous**

La microélectrode mesurant le dioxygène dissous est un outil qui permet de caractériser les flux et les processus dans un biofilm aérobic. D'après l'allure des profils de concentrations présentée rapidement à la Figure 1-10, des informations caractéristiques des processus de transport au sein du biofilm sont déterminées comme le coefficient de transfert, le facteur de diffusion ou le coefficient diffusion.

La précision des mesures de la concentration est liée à la taille de la pointe de la microélectrode. Leur diamètre peut aller de quelques micromètres à quelques millimètres. La Figure 1-11 décrit le schéma des microélectrodes à dioxygène dissous (A et B) et de pH (C).

La Figure 1-11A illustre un microcapteur typique (une sonde à oxygène Ox25) avec un diamètre de la pointe très faible (diamètre de 25  $\mu\text{m}$ ). La Figure 1-11B montre également un capteur d'oxygène, mais dans ce cas, le diamètre de l'extrémité extérieure est nettement plus important. Sa constitution est donc plus robuste que pour le capteur A. La seule différence entre A et B est le diamètre de la pointe. Les dimensions de la structure interne ainsi que les performances en termes de temps de réponse et de sensibilité, restent inchangées. Cependant l'épaisseur des membranes est un facteur critique dans la performance du capteur. Il est

généralement difficile à contrôler lors du processus de fabrication du capteur, à cause de la miniaturisation du capteur (Suzuki *et al.*, 1990; Ross *et al.*, 1992; Hinkers *et al.*, 1995; Park *et al.*, 2007) La Figure 1-11C décrit une microélectrode de pH. Contrairement aux capteurs d'oxygène, où la zone sensible est une membrane de silicone à la pointe, la zone sensible d'une électrode de pH est en forme d'un petit cylindre longitudinal.



**Figure 1-11** Pointes des microcapteurs à dioxygène dissous et de pH (d'après Unisense, Aarhus, Danemark).

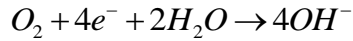
#### 1.5.4.4 Fonctionnement de la microélectrode à dioxygène dissous

La microélectrode à dioxygène dissous est basée sur le design de type Clark. Elle se compose d'une électrode de travail avec une membrane perméable au gaz et d'une électrode de référence interne dans l'électrolyte (Clark *et al.*, 1953).

##### 1.5.4.4.1 Rappel de la théorie

La microélectrode est un système électrochimique qui couple les réactions chimiques avec le signal électrique. Il est constitué principalement d'une cathode (électrode de travail), d'une anode (électrode de référence) et d'un électrolyte. La cathode est composé de métaux nobles

comme le Pt, Ag et Au de manière à éviter que la surface de l'électrode participe aux réactions chimiques. Le principe de l'électrode de Clark est basé sur la réduction de l'oxygène à la cathode (Heineman, 1989), soit :



Une fois qu'un potentiel négatif externe est appliqué à la cathode (la cathode étant plus négative que l'anode), la surface de la cathode fournit des électrons aux molécules d'oxygène. L'anode est utilisée pour établir un potentiel de référence. L'électrolyte sert aussi bien de solvant pour les réactions chimiques.

#### 1.5.4.4.2 *Grandeurs caractéristiques*

Durant la conception ou l'utilisation de la microélectrode, différentes grandeurs caractéristiques sont vérifiées. Ces grandeurs sont le « stirring effect » ( $Re^*$ ) et le temps de réponse ( $t_{90}$ ). Le  $Re^*$  donne la sensibilité, la fiabilité et la stabilité de la sonde (au niveau de la cathode) par rapport à la vitesse du flux au sein du liquide. Le  $t_{90}$  donne une information sur la rapidité de transmission du signal.

##### 1.5.4.4.2.1 « Stirring effect »

Il représente les différences de mesure d'intensité entre les milieux statiques et les milieux agités. Il est calculé par la formule suivante (Baumgärtl et Lübbers, 1983) :

$$Re^* = \left[ \frac{(I - I_1)}{I} \right] * 100\% \quad \mathbf{1-20}$$

Celui-ci est évalué par bullage d'air au niveau de la chambre de calibration où  $I_1$  est le courant mesuré dans l'échantillon non agité (eau stagnante non saturé en air) et  $I$  est le courant mesuré au sein de l'échantillon agité (eau agitée saturée en air). Suivant les microélectrodes créées, cette valeur peut varier beaucoup (Lu et Yu, 2002). Pour les microcapteurs fournis par Unisense (Danemark), leur sensibilité va de 0 à 2% suivant la perturbation générée.

#### 1.5.4.4.2 Temps de réponse

Il est évalué par la relation suggérée par Schneiderman et Goldstick (1978) :

$$t_{90} = \frac{2.996 * l^2 * 10^{-8}}{\pi^2 D} \quad \mathbf{1-21}$$

où  $l$  est la longueur (ou la profondeur) sur laquelle est effectuée la mesure et  $D$  est le coefficient de diffusion en oxygène ( $L^2.T^{-1}$ ).

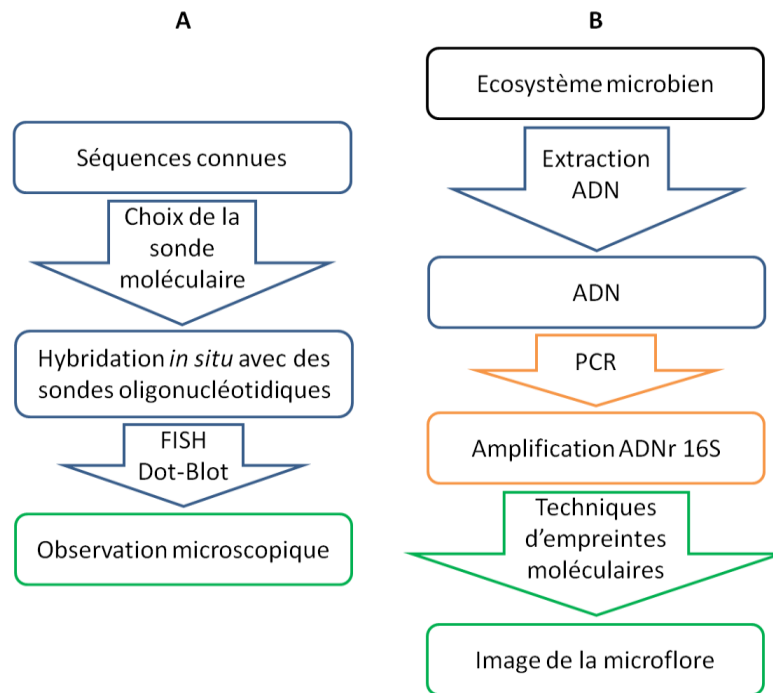
Ce paramètre est souvent lié à l'épaisseur de la membrane en silicone présente à la pointe de la microsonde (cf. *Figure 1-11 A et B*). Plus la membrane est épaisse, plus le  $t_{90}$  sera long. Les variations de la vitesse d'écoulement influencent peu le temps de réponse du signal comme le démontre Horn au niveau de son réacteur tubulaire (Horn, 2000). Une autre étude démontre l'influence de la variation de la taille de la pointe sur le  $t_{90}$  (Lim *et al.*, 2009). Pour les microsondes (Unisense, Aarhus, Danemark), le  $t_{90}$  est inférieur à 4 secondes.

Pour effectuer les mesures de profils de concentration, il est important d'avoir une réduction du signal entre deux calibrations. Si elle dépasse 4%/heure, alors l'électrode sera considérée comme non utilisable. Il est donc nécessaire d'avoir le signal le plus stable et le plus fiable (Beuling, 1998).

### 1.6 Stratégie moléculaire pour caractériser les écosystèmes microbiennes complexes

La Figure 1-12 présente les différentes stratégies d'investigation des communautés microbiennes.

On peut trouver deux stratégies d'investigations des communautés microbiennes lorsque l'on travaille sur des populations mixtes. Une de ces stratégies, qui vise à rechercher une population connue *a priori*, est l'approche par la microscopie. La seconde consiste à établir, sans connaissance préalable des populations présentes, une empreinte moléculaire de l'écosystème microbien.



**Figure 1-12 Aperçu des stratégies moléculaires utilisées pour analyser les communautés microbiennes avec des sondes moléculaires (A) ou des techniques d'empreintes génétiques (B) (d'après Dabert *et al.*, 2002; Winderer *et al.*, 2002; Dorigo *et al.*, 2005; Cresson, 2006).**

### 1.6.1 Microscopie (sondes moléculaires)

Le premier outil d'analyse de la diversité microbienne est le microscope. Il a révélé une grande variété de formes des microorganismes. Cependant, il ne permet pas de différencier les genres de bactéries. Des milieux de culture spécifiques ont été mis en place afin de favoriser et d'étudier les cultures d'espèces microbiennes.

Plus récemment, la fixation cellulaire par hybridation avec des sondes oligo-nucléotidiques (Hybridation fluorescente *in situ*, FISH) a été développée pour suivre *in situ* des populations ciblées. Les échantillons hybridés peuvent être observés au microscope optique ou par microscopie confocale laser (confocal laser scanning microscopy en anglais, CLSM) (Hugenholtz *et al.*, 2002; Wilderer *et al.*, 2002).

### 1.6.2 Amplification et analyse de l'ADN

Ces méthodes nécessitent une étape préalable d'extraction et de purification de l'ADN de l'échantillon. Elles combinent généralement une lyse chimique (par ajout de détergents,



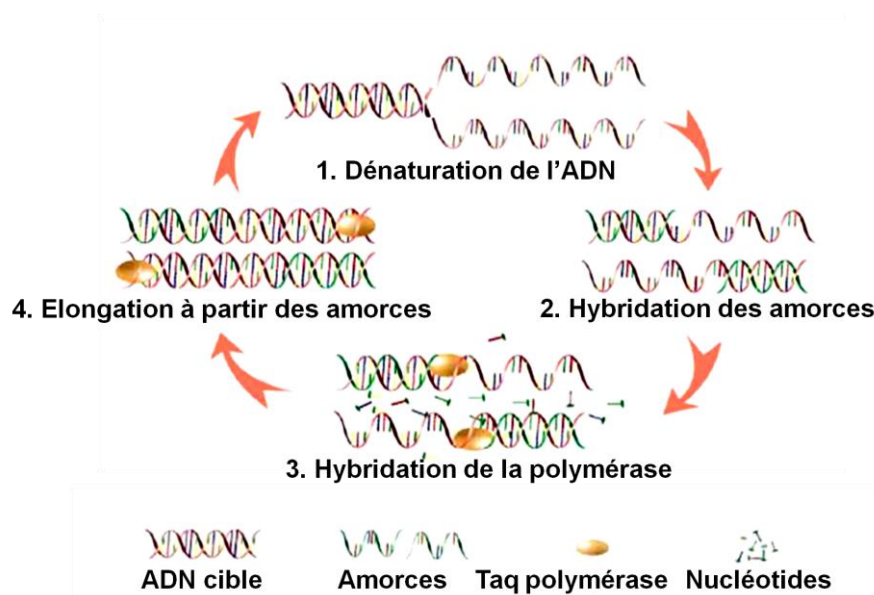
phénol...) et/ou une lyse enzymatique (ajout d'enzyme protéinase K, lysozyme...) et/ou physique (cycle de congélation-décongélation, pilon mortier). Ensuite, une étape de purification de l'ADN est réalisée, afin de retirer les matériaux contaminants potentiels, tels que les métaux et polymères qui sont susceptibles d'inhiber les réactions moléculaires.

Cet ADN purifié va être ensuite amplifié puis séparé par des techniques d'empreintes moléculaires.

### 1.6.2.1 Amplification de l'ADN par la Polymerase Chain Reaction (PCR)

L'étape préalable est l'amplification en chaîne ou PCR (Polymerase Chain Reaction) qui a été mise au point à la fin des années 1980. L'amplification est directement réalisée sur la séquence cible à partir de l'échantillon de l'ADN total. Différents cycles de dénaturation, d'hybridation et d'élongation vont être reproduit de 20 à 30 fois pour amplifier le fragment d'ADN cible (cf. *Figure 1-13*).

Les produits de cette amplification, peuvent généralement être utilisés pour faire l'analyse de la diversité microbienne.



**Figure 1-13** Principe de l'amplification en chaîne (ou PCR) d'une séquence cible à partir de d'ADN total (d'après Dumont, 2006).

### **1.6.2.2 Analyse de l'ADN**

Il existe différents systèmes d'amorces (ou « primer ») pour détecter les microorganismes durant la PCR (du phylum à l'espèce). Le primer est défini comme étant une séquence d'ADN complémentaire spécifique de la zone cible. Il sert de point de départ de la synthèse du brin complémentaire de cette dernière par de l'ADN polymérase. Les ARN ribosomiaux (ARNr), sont rapidement apparus comme des marqueurs de choix car ils possèdent une présence universelle.

### **1.6.3 Techniques d'empreintes moléculaires**

Les techniques d'empreintes moléculaires permettent de produire une image globale de la communauté microbienne. Elles donnent des informations pour aider à la compréhension de la dynamique, de la diversité et de la structuration des communautés. On peut les diviser en deux familles : les techniques qui séparent les produits de la PCR selon leur taille et celles qui les séparent selon leur séquence.

#### **1.6.3.1 Techniques séparatives basées sur la taille du fragment d'ADN**

L'ARDRA (Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis) ou RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) appliqués aux ADNr sont basés sur la variabilité de la taille des fragments d'ADNr digérés par une ou plusieurs enzymes de restriction et analysés par électrophorèse sur gel (Dorigo *et al.* 2005). Cette technique est rapide et peu coûteuse. Elle crée plusieurs fragments d'ADN par espèce et devient rapidement illisible pour des communautés complexes. La T-RFLP (Terminal-Restriction Fragment Length Polymorphism) utilise une amorce marquée par une molécule fluorescente qui permet la détection d'un seul fragment d'ADNr16S.

Une méthode de LH-PCR (Length Heterogeneity) permet de différencier les microorganismes sur la base des inégalités naturelles de la longueur de la séquence de l'ADNr 16S. Les techniques de RISA (rRNA Intergenic Spacer Analysis) et ARISA (Automated RISA) permettent de discriminer par différence de taille, la région intergénique 16S-23S. Une

séparation des produits PCR, sur un séquenceur équipé d'un détecteur de type laser, peut être réalisée avec des amorces fluorescentes.

### 1.6.3.2 Techniques séparatives basées sur la séquence du fragment d'ADN

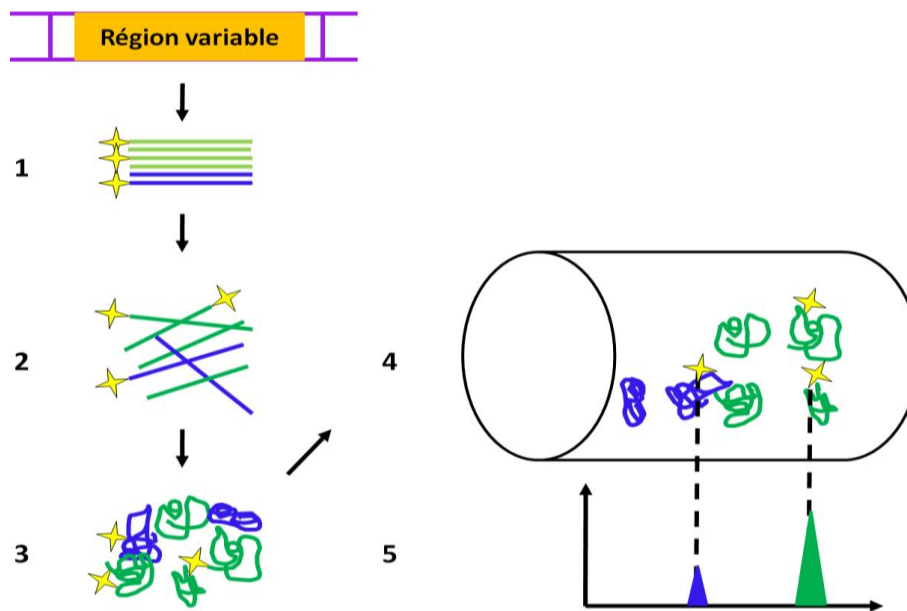
La variation des séquences d'ADN du fragment ciblé permet de différencier les espèces moléculaires ou phylotypes. Les techniques de type D/TGGE, TTGE, SSCP se basent sur des différences de la mobilité électrophorétique provenant des disparités de conformation moléculaire de ces séquences d'ADN.

Les gels d'électrophorèse à gradient de dénaturation (formamide, urée) ou DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis) permettent de « séparer » des fragments d'ADN de taille identique ou très proche. Cet agent dénaturant peut être de la formamide et/ou de l'urée. La variation électrophorétique donne une image de la diversité de l'échantillon.

Cette image de la communauté microbienne est sous forme de bandes aux intensités différentes. Chaque bande correspond à une espèce. La différence de l'intensité lumineuse donne des informations concernant l'abondance de chaque espèce. Il est possible de récupérer, d'après les bandes individuelles, l'ADN. Il peut être ré-amplifié et puis séquencé. La TGGE (Temperature Gradient Gel Electrophoresis) et la TTGE (Temporal Temperature Gradient Gel Electrophoresis) sont deux variantes de la DGGE. La première utilise un gradient de température pour faire la séparation des fragments d'ADN à la place de l'agent dénaturant. La seconde utilise un gel ayant une concentration d'agent dénaturant uniforme où la température augmente graduellement (Muyzer et Ramsing, 1995; Muyzer, 1998).

Enfin, l'analyse du polymorphisme de conformation secondaire est une autre technique d'empreinte moléculaire. La SSCP (Single Strand Conformation Polymorphism) permet d'analyser l'ADN simple brin. Elle diffère de la DGGE par ses conditions de migration électrophorétique non dénaturantes. Elle a été développée pour détecter les mutations des gènes humains et peut-être également utilisée en écologie microbienne (Godon *et al.*, 1997; Zumstein *et al.*, 2000; Godon *et al.*, 2001). Le produit de la PCR est dénaturé en simple brin par choc thermique et puis re-naturé brusquement afin de conserver la structure secondaire de l'ADN. Ensuite, il est placé sur un gel de (poly)acrylamide pour faire une migration par électrophorèse ou par capillarité à l'aide d'un séquenceur automatique. L'emploi de molécules fluorescentes pour une PCR dite marquée, permet d'améliorer la détection initiale

au sein du séquenceur (Zumstein *et al.*, 2000). La mobilité électrophorétique<sup>2</sup> des ADN simple brin se fait donc, en fonction de leur masse moléculaire et de leur structure secondaire. La communauté apparaît alors sous la forme d'un profil de pics lorsque l'électrophorèse est réalisée par capillarité (cf. *Figure 1-14*) ou par profil de bande que l'on peut obtenir avec l'électrophorèse réalisée sur gel.



**Figure 1-14 Principe de la technique SSCP par électrophorèse capillaire (d'après Dumont, 2008)**  
**Exemple avec trois séquences d'ADN dont deux issues de la même espèce microbienne. Une région variable d'un gène d'intérêt est amplifiée avec des amorces marquées d'un fluorochrome<sup>3</sup> (1). Les amplicons<sup>4</sup> sont dénaturés à 95 °C (2). Les amplicons sont rapidement refroidis à 0 °C et leur conformation maintenue grâce à la formamide désionisée (3). Les amplicons adoptent une forme différente car leurs longueurs et leurs compositions en acides nucléiques sont hétérogènes. Les amplicons migrent en électrophorèse capillaire (4). Un laser détecte la fluorescence et l'information est acquise sous forme de chromatogramme (5).**

L'aire de chaque pic (SSCP) donne une information sur l'abondance de chaque « espèce » dans la communauté. Il est possible d'affilier chaque pic d'un échantillon complexe en les comparant avec des clones indépendants.

L'ensemble de ces techniques d'empreintes moléculaires apparaît comme un outil potentiel pour l'étude de la diversité microbienne dans un environnement donné. Cela apporte aussi une

<sup>2</sup> Vitesse de la migration différentielle des analytes dans un champ électrique appliqué, elle est proportionnelle à la charge ionique de l'échantillon.

<sup>3</sup> fluorochrome ou fluorophore : substance chimique capable d'émettre de la lumière de fluorescence après excitation

<sup>4</sup> Fragment d'ADN amplifié

connaissance et une compréhension du lien qui existe entre la diversité et le fonctionnement des milieux.

### **1.6.3.3 Outils statistiques de traitements des données moléculaires**

Afin de comparer entre eux les profils microbiens obtenus avec les différentes techniques moléculaires, des outils statistiques ont été transcrits dans des systèmes informatiques afin de pouvoir les exploiter. On peut rencontrer au niveau de la littérature les programmes SAFUM (Statistical Analysis of Fingerprints Using Molecular biology) (Zemb *et al.*, 2007) et StatFingerprints (Michelland *et al.*, 2009).

#### ***1.6.3.3.1 Ecologie numérique et StatFingerprints***

L'écologie numérique est un domaine de l'écologie quantitative qui traite par l'analyse numérique des données complexes (Legendre et Legendre, 1998). Elle combine des techniques statistiques appropriées à l'écologie avec des techniques numériques non statistiques (groupements, ...). Les méthodes qui sont le plus souvent utilisées sont des méthodes multivariées ou multidimensionnelles. Ce sont des ensembles de méthodes d'analyse numérique traitant en bloc les tableaux de données, où chaque observation, chaque élément d'échantillonnage est défini par plusieurs variables: abondances d'espèces, mesures de l'environnement, etc.

Dans le programme StatFingerprints, développé sous le logiciel R, différents compartiments sont définis. Un premier compartiment permet d'importer des données (profils microbiens et leurs données associées), puis un second permet de gérer ces données : les profils microbiens sont alignés et normalisés. Le dernier compartiment regroupe les outils statistiques. Il permet de faire des études statistiques complexes par l'intermédiaire d'ordination (analyse multidimensionnelle, analyse en composantes principales (ACP)) ou des tests multivariés. Il a aussi des outils statistiques simples comme le calcul de la diversité (Michelland *et al.*, 2009) ou des distances mathématiques.

### 1.6.3.3.2 Diversité biologique

La diversité biologique, d'après la Convention<sup>5</sup> sur la diversité biologique qui s'est tenue du 3 au 14 juin 1992 à Rio de Janeiro lors de la conférence des Nations Unies sur l'environnement et le développement regroupant 157 pays signataires, est la variabilité des organismes vivants de toute origine y compris, entre autres, les écosystèmes terrestres, marins et autres écosystèmes aquatiques et les complexes écologiques dont ils font partie. Cela comprend aussi la diversité au sein des espèces et entre espèces ainsi que celle des écosystèmes. Pour estimer cette diversité, différents indices mathématiques existent. Leur expression est fonction de deux paramètres : le nombre d'espèces et le nombre d'individus par espèce. Il existe une multitude d'indices mais les plus couramment utilisés sont celui de Simpson (1949) et de Shannon et Weaver (1962). Ils expriment l'importance relative du nombre des espèces abondantes dans un milieu donné.

#### 1.6.3.3.2.1 Indice de diversité de Simpson

Cet indice mesure la probabilité que deux individus sélectionnés au hasard soient issus de la même espèce (Simpson, 1949). Il est exprimé par:

$$ID = \sum_{i=1}^S \frac{N_i(N_i - 1)}{N(N - 1)} \quad 1-22$$

Avec

$N_i$ , le nombre d'individus d'une espèce donnée,  $i$  variant de 1 à  $S$  (nombre d'espèce),

$N$ , le nombre total d'individus.

Cet indice a une valeur nulle lorsque tous les individus appartiennent à des espèces différentes et une valeur de 1 lorsque tous les individus appartiennent à la même espèce. Il existe différentes variables de cette expression utilisée pour exprimer la diversité. On note aussi que cet indice donne plus de poids aux espèces abondantes qu'aux espèces rares. L'expression 1-

<sup>5</sup> Le texte intégral de la convention est disponible sur internet à l'adresse : <http://www.cbd.int/doc/legal/cbd-fr.pdf>

ID est souvent préférée à l'indice de Simpson. Plus la valeur de ce paramètre est élevée, plus la diversité est grande et la population est riche en espèces.

#### 1.6.3.3.2 Indice de diversité de Shannon-Weaver

Cette indice se définit par:

$$H' = \sum_{i=1}^S \left[ \frac{N_i}{N} * \log_2 \left( \frac{N_i}{N} \right) \right] \quad \mathbf{1-23}$$

Avec  $N_i$ , le nombre d'individus d'une espèce allant de  $i$  à  $S$  (total de l'espèce) et  $N$ , le nombre total d'individu (Shannon et Weaver, 1962).

Cet indice, tout comme l'indice de Simpson, exprime l'importance relative du nombre des espèces abondantes dans un milieu donné. Ainsi, plus la proportion des espèces rares est élevée et celle des espèces abondantes réduite, plus l'indice de diversité de Shannon est grand. Cet indice est minimum quand tous les individus appartiennent à la même espèce ; il est maximum quand chaque individu représente une espèce distincte.

#### 1.6.3.3.3 Distances mathématiques

La distance est une mesure d'un écart spatial, de l'espacement entre deux points. La distance mathématique a une définition plus restrictive que l'expression courante utilisée par exemple en géographie. En écologie numérique, plusieurs distances mathématiques peuvent être utilisées (Euclidienne, Manhattan, Hellinger...). Dans la suite de ce paragraphe, sont définies la distance Euclidienne et la distance de Hellinger (Legendre et Legendre, 1998).

Chaque descripteur est considéré comme une dimension dans un espace euclidien, les objets sont positionnés dans cet espace en fonction de la valeur prise par chaque descripteur et la distance se mesure selon le théorème de Pythagore. En écologie microbienne, la distance euclidienne permet d'apprécier la différence de la structure des communautés entre deux profils. Elle se définit par deux vecteurs  $x_{1,n}$  et  $y_{1,n}$  et donne :

$$DE = \sqrt{\sum_{k=1}^n |x_k - y_k|^2} \quad \mathbf{1-24}$$

Cette distance est la distance la plus utilisée après centrage et réduction des variables. Cependant, la distance euclidienne tient compte du double zéro<sup>6</sup>, ce qui la rend inappropriée pour des données d'abondances d'espèces brutes. Pour résoudre cela, plusieurs variantes existent. Mais une autre distance peut être utilisée pour son approche avec les abondances d'espèces: c'est la distance de Hellinger. Cette distance peut être comprise comme une distance euclidienne entre chaque site. Ces derniers sont par contre représentés par la racine carrée des fréquences relatives de chaque espèce.

$$HL = \sqrt{\sum_{k=1}^n \left| \sqrt{\frac{x_k}{x_+}} - \sqrt{\frac{y_k}{y_+}} \right|^2} \quad \mathbf{1-25}$$

## 1.7 Modèles mathématiques de biofilms

Un modèle mathématique permet de traduire la compréhension conceptuelle d'un système réel par des termes mathématiques (National Research Council 2000). Il décrit la compréhension conceptuelle d'un phénomène présent au sein d'un système réel et peut le reproduire, s'il est bien défini, sinon il faut l'ajuster et trouver les paramètres qui se rapprochent le plus du système (Wanner, 2006).

Pour créer et utiliser un modèle, il est important d'identifier les variables et les actions du procédé étudié. Les phénomènes sont décrits par des expressions mathématiques qui associent des équations exprimant un équilibre massique et énergétique en tout point du système. Les paramètres d'entrée du système mathématique sont donc choisis afin de réaliser la modélisation.

<sup>6</sup> Ce thème est lié à la similarité : on prend la valeur « 0 » lorsque des pics sont symétriques.



### 1.7.1 Une peu d'histoire

Dans la littérature, le premier modèle détaillé de biofilm a été proposé par Wanner et Gujer (1986). Il s'agit d'un modèle 1D, c'est-à-dire une dimension. Puis, les modèles 2D et 3D se sont développés au fur et à mesure du développement des outils de calculs.

Le modèle 1D de biofilm considère les gradients perpendiculaires à l'interface biofilm-liquide. Ce modèle a été et est toujours un excellent outil pour la compréhension des processus au sein du biofilm de manière quantitative et globale (Wanner, 1996). Il est très approprié pour décrire les conversions macroscopiques d'un système biofilm et pour donner une description raisonnée des couches qui structurent le biofilm. Cependant, les modèles 1D sont limités lorsque l'on veut considérer un biofilm qui se développe avec des gradients de croissance latéraux ou qui possède un réseau de pores contribuant à la conversion du substrat au sein du biofilm.

Donc de nouvelles recherches ont été menées et des modèles plus détaillés ont été développés (Wimpenny et Colasanti, 1997 ; Kreft *et al.*, 1998, 2001 ; Picioreanu *et al.*, 1998, 2000a, b). Ces nouveaux modèles prennent en considération tous les facteurs pertinents qui ne peuvent pas être décrits dans une dimension 1D. Cependant ils ne s'appliquent pas sur tous les systèmes car tous les processus caractéristiques du modèle ne peuvent pas être définis. Donc pour des simulations simples, les modèles 1D restent toujours les modèles les plus pertinents.

### 1.7.2 Construction d'un modèle de biofilm

Modéliser le développement d'un biofilm est un challenge, parce que les interactions sont complexes entre les différents processus, et, entre le particulaire et les composés solubles. Le schéma suivant (cf. *Figure 1-15*) présente les différents processus qui interviennent durant la formation du biofilm:

Dans le cas d'une modélisation 1D, il est pris en considération:

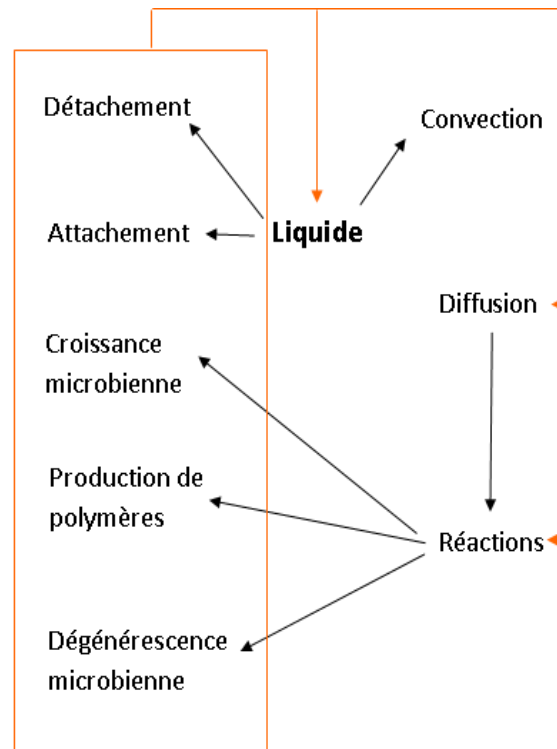
-la convection dans le liquide. En régime turbulent, un flux diffusionnel est généralement pris en compte dans la couche limite, la concentration en composé dissous étant considérée comme homogène dans le reste du liquide.

-la diffusion dans le biofilm: elle est résolue par la loi de Fick. Elle peut aussi influencer le transport des composés.

-la réaction (consommation du substrat et production de biomasse): les processus de conversion chimique et microbienne sont alors calculés avec des équations de réactions de cinétiques standards. Elles permettent aussi de calculer la biomasse qui se forme.

-la croissance du biofilm: la nouvelle biomasse formée durant les premières étapes est redistribuée. Différents modèles existent. On trouve des modèles basés sur une seule biomasse (Kreft *et al.*, 1998; Kreft *et al.*, 2001) ou des modèles faisant intervenir plusieurs espèces (Picioreanu *et al.*, 1998). Il est donc important de décrire quelle est la meilleure formulation mathématique pour représenter la croissance du biofilm.

-le détachement: dans de nombreux modèles, une équation de détachement est utilisée mais elle n'est pas basée sur un processus fondamental. Le détachement est seulement considéré lorsque l'épaisseur du biofilm est stationnaire (Wanner, 1986). Il existe aussi des mécanismes de détachement dont les processus sont liés aux forces hydrodynamiques présentes dans le liquide (Picioreanu *et al.*, 2001). Le Tableau 2-4 (cf. *chapitre 2*) résume les différentes expressions mathématiques de ces processus de détachement.



**Figure 1-15** Description des processus présents lors de la formation d'un biofilm (d'après Picioreanu *et al.*, 2000b).

### 1.7.3 Modèles multi-espèces

L'introduction de la diversité microbienne dans les modèles de biofilm commence par une répartition de la biomasse en quelques espèces. Le Tableau 1-3 présente des modèles multi-espèces trouvés dans la littérature.

**Tableau 1-3 Les modèles existant dans la littérature.**

Type de modèle	Etude	Modèle utilisé	Caractéristiques / réacteur	Références
3D	Cellules individuelles et les matrices d'EPS	Croissance, division, production d'EPS	Détachement	Alpkvist et al., 2006
1D, 2D	Processus basique du système de biofilm : réaction-diffusion	1D Aquasim	Modèle simple ou multiespèces	Perez <i>et al.</i> , 2005
1D	Compétition microorganismes hétérotrophes planctonique et « sessile »	Modèle simulant la compétition entre plusieurs espèces hétérotrophes	Multi espèces microbiennes, temps de séjour	Lu <i>et al.</i> , 2007
3D	Conditions de croissance sur la diffusivité dans le biofilm	Aquasim	Multi espèces, importance de la diffusivité	Beyenal et Lewandowski, 2000
1D	Compétition biomasse fixe et biomasse planctonique aérobie	Modèle cinétique à double croissance	Cinétique de Langmuir-Hinshelwood	Chang <i>et al.</i> , 2005
1D	Compétition biomasses planctoniques aérobies	Modèle simulant la compétition entre plusieurs espèces hétérotrophes	Multi espèces, ressources limitées	Saikaly et Oerther, 2004
1D	Compétition biomasses planctoniques aérobies, interactions	Modèle simulant la compétition entre plusieurs espèces autotrophes	Modèle simulant la compétition entre plusieurs espèces hétérotrophes	Dumont, 2008
1D	Compétition biomasses planctoniques anaérobies	Modèle simulant la compétition entre plusieurs espèces hétérotrophes	Multi espèces microbiennes	Ramirez <i>et al.</i> , 2009

Les modèles développés par Lu *et al.* (2007) et Chang *et al.* (2005) prennent en considération la compétition entre la biomasse planctonique et le biofilm pour une espèce. Cependant, Lu *et al.* (2007) considèrent l'évolution de plusieurs biomasses au sein du biofilm tandis que Chang

*et al.* (2005) étudient la compétition entre la biomasse libre et la biomasse attachée. Les biomasses considérées sont seulement des biomasses hétérotrophes. Les modèles présentés par Beyenal et Lewandowski (2000), Perez *et al.* (2005) et Alpkvist *et al.* (2006) sont des modèles prenant en considération une espèce, mais ils relient les conditions de croissance à différents processus comme la diffusion. D'après le Tableau 1-3, la modélisation de la compétition d'espèces du même genre est très récente.

#### **1.7.4 Modèles prenant en compte la diversité microbienne**

Les modèles de diversité qui existent dans la littérature ont été développés pour caractériser les influences des propriétés des populations microbiennes sur les processus opérationnels et sur le fonctionnement du réacteur (Ramirez, 2008). Ces modèles prennent en considération les indices de diversité microbienne. Des outils statistiques permettent de mettre en avant la relation entre les paramètres opératoires et l'évolution de la biodiversité des populations microbiennes.

Malgré l'abondance des modèles existant pour faire la modélisation des biofilms, très peu de modèles intègrent la diversité et la compétition microbienne. Au regard de cette étude bibliographique et de la problématique de compétition microbienne au sein du système biofilm et au sein du liquide, notre choix s'est porté vers le développement d'un modèle 1D sous AQUASIM®.

### **1.8 Synthèse**

Un biofilm est défini comme une communauté microbienne englobée dans une matrice et adhérente sur une surface inerte. Différents processus interviennent (diffusion, réactions, détachement...). Le développement du biofilm est abordé par de nombreux travaux pluridisciplinaires qui ont mis en évidence que:

- La croissance du biofilm est influencée par la mise en application des paramètres opératoires de type biologique (choix et conditionnement de l'inoculum), de type physique (influence des paramètres hydrodynamiques) et de type chimique (influence de la concentration ou de la dilution en substrat).

- A l'échelle du biofilm, la structure, la densité ou la porosité sont influencées par les conditions opératoires appliquées comme la contrainte de cisaillement ou la charge appliquée. Il en est de même pour son activité.

- A l'échelle des microorganismes, la majorité des travaux est destinée à caractériser l'évolution d'un biofilm en culture pure. Nous rencontrons aussi des travaux sur des cultures mixtes mettant en avant les interactions entre les populations autotrophes (nitrifiantes) et hétérotrophes. La diversité microbienne d'un biofilm cultivé avec des populations mixtes est très peu abordée.

- La notion de « compétition » ou de distribution des microorganismes dans la phase planctonique et dans le biofilm est assez peu étudiée.

- En modélisation, l'approche de la compétition entre les différentes espèces est réalisée pour analyser la compétition entre des autotrophes et des hétérotrophes. Très peu de travaux s'intéressent à la compétition entre différentes espèces du même type (hétérotrophes).

Dans ces travaux de thèse, nous proposons d'étudier la dynamique de la compétition des populations du biofilm et du liquide. Les objectifs sont de réaliser une caractérisation de la communauté microbienne du biofilm durant son développement, mais aussi, en parallèle, de caractériser la communauté microbienne dans le liquide. La distribution des espèces entre le liquide et le biofilm est donc aussi abordée. Pour cela, une approche pluridisciplinaire permettra d'analyser l'impact des conditions opératoires, et plus particulièrement du temps de séjour hydraulique (TSH), sur la compétition entre les espèces planctoniques et attachées. On recherchera à relier les caractéristiques du biofilm avec la diversité et la structure des communautés microbiennes. Ces différents aspects seront synthétisés dans un modèle mathématique afin de pouvoir expliciter les liens existant entre les paramètres environnementaux du réacteur et l'écologie microbienne.

Le chapitre suivant présente le matériel et les méthodes utilisées pour réaliser cette étude.

## **Chapitre 2 Matériels et Méthodes**



L'objectif de ce chapitre est de présenter les différents appareillages, protocoles et méthodes de caractérisation utilisés durant ce travail de thèse. Dans un premier temps, le dispositif expérimental utilisé pour la croissance des biofilms est présenté et les conditions de fonctionnement sont précisées. Les méthodes de mesure mise en place pour le suivi du réacteur et les analyses du biofilm sont ensuite décrites. Pour terminer, le logiciel AQUASIM®, utilisé lors de la simulation de la croissance des biofilms, est présenté.

## **2.1 Dispositif expérimental**

Les biofilms ont été cultivés sur des coupons en polycarbonate placés dans un réacteur annulaire rotatif. Ce type de réacteur permet de réaliser une croissance de biofilm dans des conditions environnementales contrôlées.

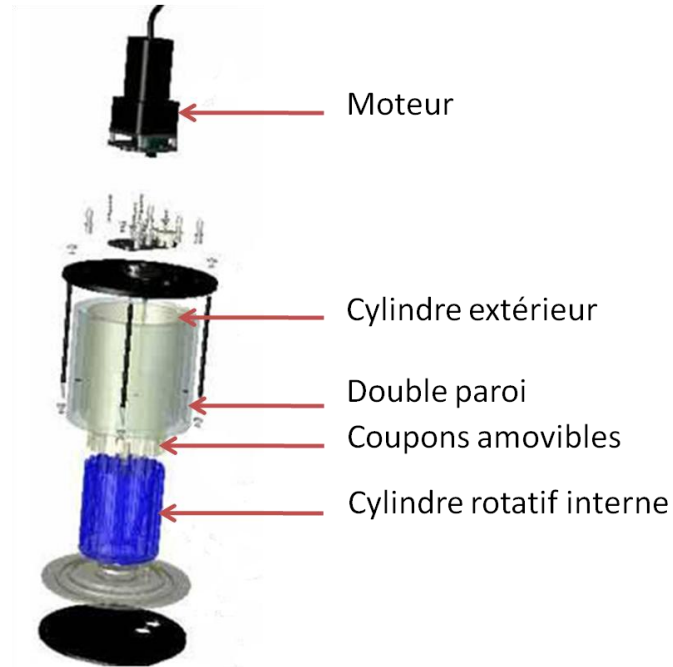
### **2.1.1 Réacteur annulaire rotatif (RAR)**

Le RAR utilisé était le modèle 1320LJ fabriqué et distribué par la société Biosurfaces Technologies Corporation (©BST, Bozeman, Montana, USA). Il est composé de deux cylindres concentriques, dont un en rotation. Le cylindre externe, en verre, est statique et possède un rayon  $R_2$  de 78 mm. Le cylindre interne en rotation est en polycarbonate (BST 1106) et possède 20 emplacements prévus pour positionner des coupons à coloniser par les microorganismes. Son rayon  $R_1$  est de 70 mm. 4 piquages se situent en fond de réacteur et permettent la recirculation du liquide afin d'avoir un bon mélange du milieu (cf. *Figure 2-1*). Le volume du réacteur, caractérisé par l'espacement entre les deux cylindres, est de 1 litre. Le cylindre interne est entraîné par un moteur à vitesse variable qui contrôle le cisaillement à la surface des cylindres interne et externe. Une double paroi en verre permet de réguler la température du réacteur.

Le RAR est plus connu sous l'appellation de réacteur Couette-Taylor (Couette-Taylor Reactor en anglais, CTR). Dans les CTR conventionnels, le nombre de Taylor ( $Ta$ ) permet de caractériser le régime d'écoulement. D'après les corrélations définies par Racina et Kind (2006) dans nos conditions expérimentales et pour une vitesse de rotation de 50 rpm (rotation



par minute), le  $T_a$  était de 1000. D'après Racina et Kind (2006), les contraintes de cisaillement à la paroi du cylindre interne  $\tau_p$  était de 0,324 Pa.

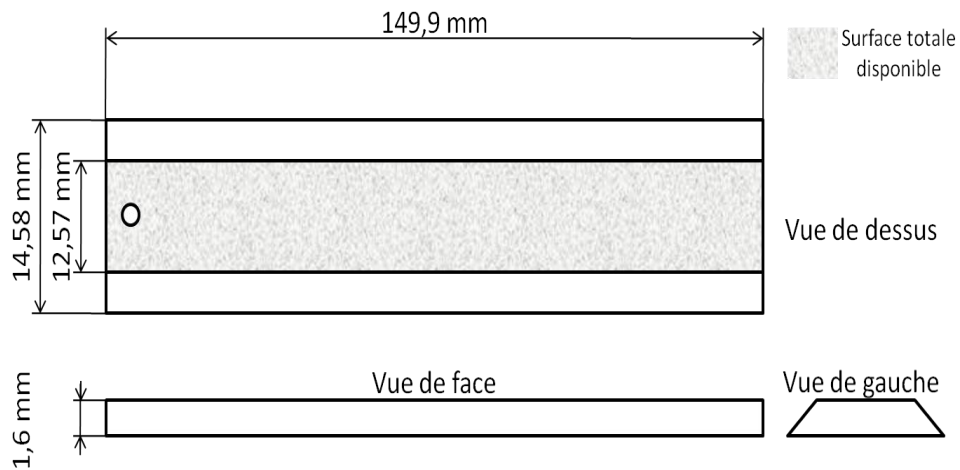


**Figure 2-1** Vue éclatée du réacteur annulaire rotatif (©BST modèle 1320LJ).

### 2.1.2 Support de colonisation

Des coupons en polycarbonate (Réf. BST 503-1), fabriqués spécialement pour le réacteur ©BST-1320JL, ont été utilisés comme support de croissance des biofilms. Cette matière plastique a d'excellentes propriétés mécaniques et physiques. Elle possède une température de transition visqueuse de 150°C et peut être utilisée à une température allant jusqu'à 120°C. La masse volumique du polycarbonate est de 1,2 g.cm<sup>-3</sup>. La géométrie des supports est présentée sur la Figure 2-2.

Ces supports présentent une spécificité géométrique qui facilite le maintien des coupons sur le cylindre interne. Chaque coupon possède un orifice qui permet de le prélever facilement. La surface totale disponible pour le développement du biofilm est de 18,85 cm<sup>2</sup> par coupon (cf. zone grisée sur la Figure 2-2).



**Figure 2-2** Vue schématique des coupons utilisés.

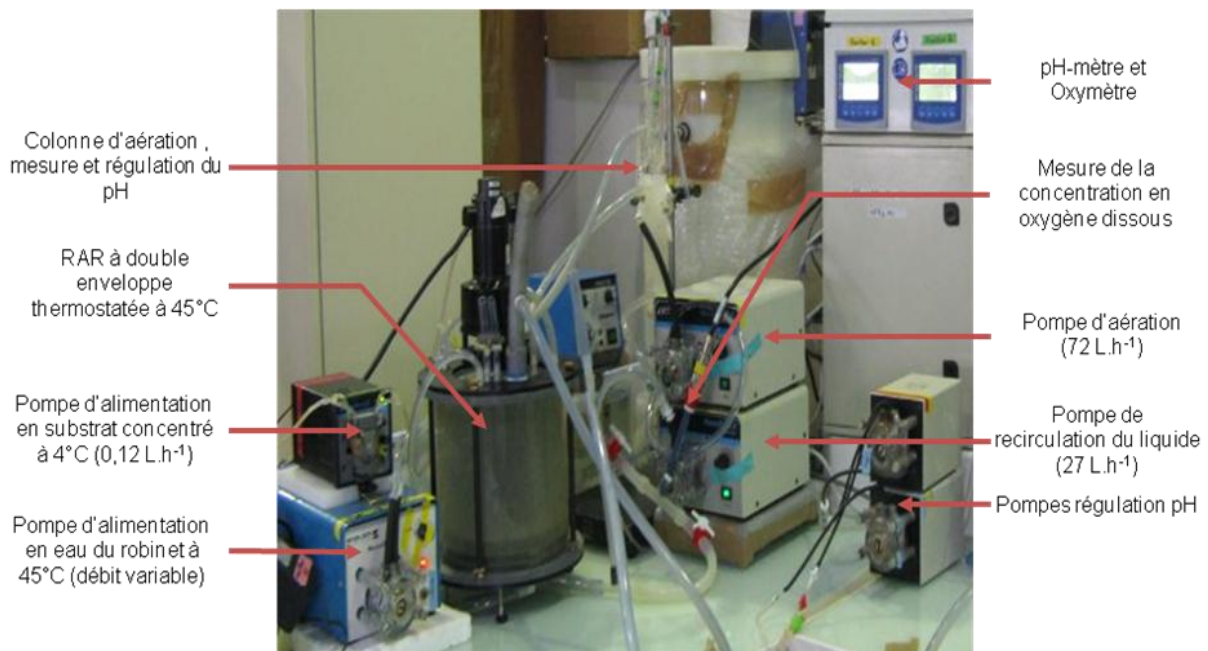
Avant d'être placés dans le réacteur, les coupons ont été nettoyés avec une solution de RBS 35 à 2% (v/v), détergent liquide alcalin distribué par la Société des Traitements Chimiques de Surface, Lambersart, France) suivant le protocole décrit par Meylheuc (2000). Ils ont été introduits dans le réacteur par l'intermédiaire d'une pique et d'une pince à épiler préalablement stérilisées afin de limiter toute contamination de la surface.

### 2.1.3 Appareillage associé

Le dispositif expérimental est associé à une boucle de recirculation dont les objectifs sont de transférer l'oxygène au milieu et d'améliorer le mélange (cf. *Figure 2-3 et Annexe I*). Une pompe péristaltique (Masterflex C/L à deux canaux, vitesse maximale de 60 rpm) délivrait un débit fixe ( $0,12 \text{ L}\cdot\text{h}^{-1}$ ) pour alimenter le réacteur en substrat concentré en glucose ( $2 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ): la charge surfacique était ainsi de  $25 \text{ g}_{\text{glucose}}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{j}^{-1}$ . Une seconde pompe péristaltique à flux variable (Masterflex, vitesse de 7-200 rpm) a été utilisée pour diluer le substrat concentré avec de l'eau du robinet thermostatée à  $45^\circ\text{C}$ . Son débit a été fixé en fonction du temps de séjour hydraulique appliqué en entrée du réacteur. La boucle de recirculation permet au milieu d'être aéré par une injection d'air.

Des sondes de mesure du pH et de la concentration en oxygène dissous ont été utilisées. L'électrode de pH (InPro 3250, Pt100, Mettler-Toledo) était placée dans la chambre d'aération. Le pH était régulé à 7,3 par l'injection d'acide ou de base concentré à  $0,5 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ . La sonde à oxygène dissous (InPro 6050, Pt100, Mettler Toledo) était située sur la boucle de

recirculation. Ces sondes étaient reliées à un régulateur/transmetteur (M300, Mettler-Toledo) à double affichage numérique relié à un ordinateur via un convertisseur analogique/numérique TES (Leroy Automatique Industrielle, Toulouse). Ce TES comporte des entrées et des sorties « Tout Ou Rien » et des entrées analogiques. Il transmet les signaux de la mesure de l'oxygène et du pH au logiciel d'acquisition MSPC (Modular Supervision and Process Control) développé au Laboratoire de Biotechnologie de l'Environnement (LBE) en Visual Basic et fonctionnant sous Windows (Steyer *et al.*, 1997).



**Figure 2-3 Photo de l'un des trois dispositifs expérimentaux.**

Le volume total utile du dispositif (RAR, chambre d'aération et tuyaux) était de 1,2 L pour une surface totale de colonisation, notée  $A_f$ , de 0,2520 m<sup>2</sup> (la surface du réacteur RAR est de 0,2232 m<sup>2</sup>). Un bain-marie a permis de maintenir le réacteur thermostaté dans la double enveloppe à 45°C. Elle correspond à la température moyenne de l'eau de papeterie utilisée comme inoculum. La concentration en oxygène dissous est comprise entre 4 et 6 mg.L<sup>-1</sup>, proche de la concentration de saturation à 45°C.

#### 2.1.4 Inoculum

Les réacteurs ont étéensemencés avec une eau blanche (eau résiduaire produite au cours de la fabrication du papier) provenant de la papeterie de Voiron (Grenoble, France). Cet inoculum a

été choisi car il a déjà été utilisé au laboratoire dans de précédents travaux (Rochex *et al.* 2008, 2009). Cette eau blanche a été préalablement conditionné en aliquots de 100 mL et conservé à -20°C. Sa composition globale, prenant en compte à la fois les phases liquides et solides, était de<sup>7</sup> 2,87 g<sub>MS</sub>.L<sup>-1</sup> de et 0,5 g<sub>MO</sub>.L<sup>-1</sup>. La concentration en matière en suspension MES était de 0,44 g.L<sup>-1</sup> et en matière volatile en suspension (MVS) de 0,148 g.L<sup>-1</sup>. La Demande Chimique en Oxygène (DCO) totale était de 9,2 g.L<sup>-1</sup> et celle de la phase soluble 0,107 g.L<sup>-1</sup>.

L'inoculum a été mis à décongeler à 35°C durant 1 h 30, puis placé pendant 10 min à 45°C avant utilisation. Le volume d'ensemencement est de 100 mL pour un volume utile de réacteur d'environ 1,2 L. Après l'inoculation, le réacteur a fonctionné en mode batch durant 24h avec un milieu à base de glucose à la concentration de 0,240 g<sub>glucose</sub>.L<sup>-1</sup>. Des prélèvements de la phase soluble avant et après inoculation ainsi qu'en fin de batch ont été effectués.

### 2.1.5 Alimentation des réacteurs

Les réacteurs étaient alimentés avec un effluent synthétique à base de glucose. L'utilisation d'un milieu synthétique permet de maîtriser les conditions opératoires, en particulier la charge appliquée en glucose. La solution concentrée en glucose (2 g.L<sup>-1</sup>) était conservée à 4°C et renouvelée tous les 3 jours maximum en prévention de sa dégradation. Ce milieu était complété en azote ((NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), phosphore (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 12H<sub>2</sub>O ; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) et oligo-éléments afin d'obtenir un rapport C/N/P égal à 100/5/1 (Annachatre et Bhamidimarri, 1992). Le Tableau 2-1 donne la composition complète de cette solution.

Cette solution est préparée à partir des solutions concentrées de macroéléments, de tampon et d'oligo-éléments. Durant la préparation, elles sont diluées dans deux litres d'eau déminéralisée, afin de limiter l'apparition de précipités dus à la présence du tampon bicarbonaté. Le pH de la solution d'alimentation est de 7,3. La charge surfacique appliquée correspond 25 g<sub>glucose</sub>.m<sup>-2</sup>.j<sup>-1</sup>.

---

<sup>7</sup> MS : Matière Sèche et MO : Matière Organique

Tableau 2-1 Composition du substrat synthétique dans le bac d'alimentation.

Composés	Concentration dans le bac d'alimentation (g.L <sup>-1</sup> )
C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub>	2
<i>Solution mère de macroéléments</i>	
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1,012
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 12H <sub>2</sub> O	0,148
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,074
MgCl <sub>2</sub> , 6H <sub>2</sub> O	0,0084
CaCl <sub>2</sub> , 2H <sub>2</sub> O	0,006
Extrait de levure	0,05
<i>Solution de fer</i>	
FeCl <sub>2</sub> , 4H <sub>2</sub> O	0,0084
<i>Tampon bicarbonate</i>	
NaHCO <sub>3</sub>	0,3
<i>Solution mère d'oligoéléments</i>	
MnSO <sub>4</sub> , H <sub>2</sub> O	0,008
CuSO <sub>4</sub> , 5H <sub>2</sub> O	0,008
ZnSO <sub>4</sub> , 7H <sub>2</sub> O	0,008
CoSO <sub>4</sub> , 6,5H <sub>2</sub> O	0,004

Tableau 2-2 Composition et de l'eau du robinet utilisée pour la dilution du substrat.

Composés	Concentration de l'eau du robinet (mg.L <sup>-1</sup> )	
<b>Anions</b>	Cl <sup>-</sup>	19,6
	NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	n.a.
	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	5,9
	PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup>	n.a.
	SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	47,8
<b>Cations</b>	Na <sup>+</sup>	12,4
	NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	n.a.
	K <sup>+</sup>	2,3
	Mg <sup>2+</sup>	10,8
	Ca <sup>2+</sup>	70,4

n.a. : not applicable

Le milieu nutritif est dilué en entrée du réacteur par de l'eau du robinet de la ville de Narbonne (Aude). Cette eau a un pH de 7,3 et une dureté totale<sup>8</sup> de 20,015°f (eau dure). La composition d'eau du robinet est donnée dans le Tableau 2-2.

## 2.1.6 Paramètres de fonctionnement des réacteurs

### 2.1.6.1 Taux de séjour hydraulique et le taux de dilution

Les RAR ont été alimentés en mode continu. Le temps de séjour hydraulique est défini par:

$$TSH = \frac{V_U}{Q} \quad 2-1$$

Avec :

TSH : temps de séjour hydraulique (j),

$V_U$ : volume utile du réacteur (L),

$Q$ : Débit volumique d'alimentation du réacteur ( $L \cdot j^{-1}$ ),

Le taux de dilution noté  $\delta$  correspond à l'inverse du TSH. Il est exprimé en  $j^{-1}$ .

Le temps de séjour hydraulique (TSH) correspond en chémostat au temps de rétention cellulaire. D'après Tijhuis *et al.* (1994), le taux de dilution ( $\delta$ ) du système doit être inférieur au taux de croissance des bactéries pour ne pas les lessiver du réacteur.

Dans le dispositif expérimental, deux alimentations (substrat concentrée et eau) se rejoignent en entrée du réacteur. La Figure 2-4 schématise l'alimentation du réacteur.

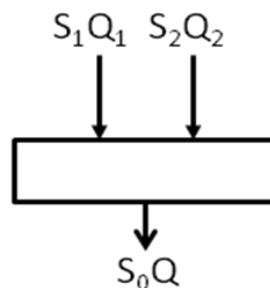


Figure 2-4 Schéma descriptif de l'alimentation du réacteur.

<sup>8</sup> 1°f (degré français) = 1°TH (degré hydrométrique) = 10 mg de CaCO<sub>3</sub>/L.

Avec :

$Q_1$ : Débit volumique d'alimentation en substrat concentré du réacteur ( $L.j^{-1}$ )

$Q_2$ : Débit volumique d'alimentation en eau du robinet du réacteur ( $L.j^{-1}$ )

$S_1$ : Concentration en substrat de l'alimentation ( $g_{DCO}.L^{-1}$ )

$S_2$ : Concentration en substrat de l'eau du robinet ( $g_{DCO}.L^{-1}$ ) (on considère que l'eau du robinet à une DCO négligeable, donc  $S_2 = 0$ ),

$S_0$ : Concentration en substrat en entrée de réacteur ( $g_{DCO}.L^{-1}$ ).

Par bilan matière, la concentration en substrat en entrée est donnée par:

$$S_0 = S_1 \frac{Q_1}{Q} = S_1 \frac{Q_1}{Q_1 + Q_2} \quad 2-2$$

Le débit d'alimentation en substrat concentré  $Q_1$  est vérifié tous les trois jours. Le débit total d'alimentation  $Q$  est contrôlé lors de chaque prélèvement.

### 2.1.6.2 Calcul de la DCO du substrat

La DCO correspond à l'oxydation complète du glucose (substrat) :



Une concentration de  $1 g_{\text{glucose}}.L^{-1}$  correspond à  $1,07 g_{DCO}.L^{-1}$ .

### 2.1.6.3 Charge surfacique appliquée

La charge surfacique appliquée est définie selon l'équation 2-4:

$$CSA = \frac{S_0 \cdot Q}{A_f} \quad 2-4$$

Avec:

$A_f$ : la surface utile du réacteur ( $m^2$ ),

CSA: charge surfacique appliquée ( $\text{g.m}^{-2}.\text{j}^{-1}$ ).

#### 2.1.6.4 Rendement

Il est basé sur la mesure de la DCO dégradée et de la DCO appliquée en entrée de réacteur selon l'équation :

$$\eta = \frac{S_0 - S}{S_0} * 100 \quad 2-5$$

Avec :

S: concentration en substrat en sortie de réacteur ( $\text{g}_{\text{DCO}}.\text{L}^{-1}$ ),

$\eta$ : rendement épuratoire en DCO (%).

#### 2.1.6.5 Régime de croissance : facteur G

Une estimation du facteur G, défini dans le chapitre 1, a été calculée pour nos conditions expérimentales. Il est exprimé par :

$$G(t) = L_f^2(t) \frac{\mu_{\text{max},H} X_H(t)}{D_s S(t)} \quad 2-6$$

Avec :

S: concentration en substrat dans le réacteur ( $\text{g}_{\text{DCO}}.\text{m}^{-3}$ ),

$X_H$ : concentration volumique de la biomasse au sein du biofilm ou masse volumique du biofilm ( $\text{g}_{\text{DCOx}}.\text{m}^{-3}$ ). Pour les calculs de G expérimental, on prendra la valeur moyenne des 3 masses volumiques calculées d'après les analyses expérimentales.

$\mu_{\text{max},H}$ : taux de croissance maximum, dans cette étude on a pris  $22 \text{ j}^{-1}$  (valeur définie par défaut avec AQUASIM®)

$D_s$ : coefficient de diffusion du glucose, il est de  $9,287.10^{-5} \text{ m}^2.\text{j}^{-1}$  à  $45^\circ\text{C}$  (valeur calculée d'après les données du Perry (1984)).

$L_f$ : épaisseur du biofilm (m).



### 2.1.6.6 Conditions opératoires testées

Les trois conditions expérimentales qui ont été testées sont résumées dans le Tableau 2-3. Il présente les paramètres théoriques d'entrée et de sortie qui ont été calculés pour un réacteur avec un volume utile de 1,2 L et une charge surfacique de  $25 \text{ g}_{\text{DCO}} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{L}^{-1}$ . Trois expériences, notées A, B et C possédant des TSH différents ont été effectuées.

**Tableau 2-3 Conditions théoriques calculées pour un volume utile de 1,2L.**

Nom du réacteur	Temps de séjour TSH	Débit					Concentration d'entrée $[S_0]$ théorique
		Substrat $Q_i$	Eau $Q_e$	Sortie $Q$	Air $Q_{air}$	Recirculation $Q_{recirculation}$	
<i>unité</i>	<i>h</i>	<i>L.h<sup>-1</sup></i>					<i>g<sub>DCO</sub>.L<sup>-1</sup></i>
A	0,3	0,12	3,88	4	72	27	0,0642
B	1	0,12	1,08	1,2			0,214
C	8	0,12	0,03	0,15			1,712

## 2.2 Mesure des variables biologiques

### 2.2.1 Dosage des matières en suspension (MES et MVS)

La détermination des matières en suspension (MES) dans l'eau est réalisée, soit par filtration, soit par centrifugation (Rodier, 1975). Dans notre cas, les deux méthodes ont été couplées. Les mesures ont été réalisées après centrifugation d'un volume V d'effluent en sortie à 18000 g durant 20 min à 5°C. Le surnageant a ensuite été filtré sur un filtre<sup>9</sup> Whatman, GF/C, 47 mm, 1,2 µm de masse connue ( $m_0$ ). Celui-ci avait été préalablement calciné à 550°C (3h) puis

<sup>9</sup> La durée de filtration est très longue lorsque l'on utilise des filtres avec un seuil de coupure de 0,45µm. Après chaque filtration réalisée, le filtrat est contrôlé par spectrométrie (600nm). Si une présence de cellules apparaît, il est filtré sur un filtre stérile ayant un seuil de coupure de 0,2µm. La quantité de matière obtenue est additionnée aux autres quantités.

lavé à l'eau déminéralisée et séché pendant 24 h. Le culot est récupéré à l'aide d'une spatule et de d'eau déminéralisée, puis déposé sur le filtre. Il est ensuite placé dans une étuve à 105°C pendant 24 h. Le filtre supportant la quantité de matière sèche est pesé ( $m_1$ ) après refroidissement au sein d'un dessiccateur (30 min). La différence de masse permet de déterminer la quantité de MES en  $\text{g.L}^{-1}$  :

$$MES = \frac{m_1 - m_0}{V} \quad 2-7$$

Le filtre est ensuite placé dans un four à 550°C pendant 2h. La matière organique est consumée, il ne reste que les composés minéraux. Après refroidissement au four à 100°C et au dessiccateur, le filtre est à nouveau pesé ( $m_2$ ). La teneur en matière volatile en suspension (MVS), en  $\text{g.L}^{-1}$ , est donnée par :

$$MVS = \frac{m_2 - m_1}{V} \quad 2-8$$

Chaque mesure a été dupliquée et un "blanc" (filtre référence dont le poids a été suivi durant la durée des analyses) a été réalisé. Les pesées ont été effectuées en triplicats afin de prendre en considération l'incertitude liée à la balance de précision (Sartorius CPA 224S).

### 2.2.2 Quantification de la biomasse fixée (matière humide MH et Matière Sèche Attachée MSA)

La méthode de mesure de la matière humide qui a été développée par Horn et Hempel (1997b) puis reprise par Staudt *et al.* (2004), a été adaptée au besoin de nos analyses. Avant la colonisation des supports dans le RAR, les coupons sont préalablement identifiés, séchés et pesés ( $m_{C0}$ ). Après colonisation par un biofilm, les coupons sont égouttés à l'air libre durant 1 min suivant un angle d'inclinaison de 45°, puis ils sont pesés ( $m_{C1}$ ). La concentration surfacique en matière humide (MH) est calculée par la différence de masse rapportée à la surface du coupon ( $\text{g.m}^{-2}_{\text{support}}$ ) :

$$MH = \frac{m_{C1} - m_{C0}}{A_{\text{sup port}}} \quad \mathbf{2-9}$$

Avec

$A_{\text{support}}$  : l'aire du support colonisée par les microorganismes (m<sup>2</sup>).

Le coupon est ensuite introduit au four à 105°C durant 6 h, avant d'être refroidi au dessiccateur pendant 30 min et pesé ( $m_{C2}$ ). La quantité de matière sèche attachée est obtenue (g.m<sup>-2</sup><sub>support</sub>) par la relation :

$$MSA = \frac{m_{C2} - m_{C0}}{A_{\text{sup port}}} \quad \mathbf{2-10}$$

### 2.2.3 Estimation de la densité et de l'épaisseur du biofilm

La densité du biofilm a été évaluée par l'équation présentée par Horn et Hempel (1997b) et a été exprimée en kg.m<sup>-3</sup> :

$$\rho_f = \frac{MSA}{MH} \cdot \rho_{\text{eau}} \quad \mathbf{2-11}$$

Avec :  $\rho_{\text{eau}}$ , la masse volumique de l'eau (kg.m<sup>-3</sup>).

L'épaisseur du biofilm a été obtenue d'après l'expression de Horn et Hempel (1997b) :

$$L_f = \frac{MH}{\rho_{\text{eau}}} \quad \mathbf{2-12}$$

### 2.3 Mesure des composés solubles

Les composés solubles sont mesurés à partir du filtrat obtenu lors de la détermination des MES. Ils sont dilués pour les besoins de chaque dosage.

### 2.3.1 Dosage du glucose

La concentration en glucose est déterminée par la méthode à l'anthrone (Dreywood, 1946) qui permet de mesurer les sucres totaux réducteurs. Ce dosage à l'anthrone (ou oxo-9,10-dihydro-10-anthracène) mesure les fonctions carbonyles (C=O). Il est basé sur la déshydratation intramoléculaire des oses à chaud en milieu acide. Les dérivés furfuraliques obtenus se condensent avec l'anthrone pour donner un composé coloré.

1 mL d'échantillon est introduit dans un tube à essai et, est mélangé à 2 mL de réactif à l'anthrone (2% d'anthrone dilué dans de l'acide sulfurique à 98%) préparé le jour même (solution non conservable). Une fois le mélange effectué, les tubes à essai sont stockés dans de la glace afin de bloquer la réaction. Les échantillons sont plongés dans un bain marie à 98°C durant 10 min avant d'être replongés dans un bain d'eau glacé pendant 10 min. L'absorbance des échantillons est mesurée à 625 nm grâce à un spectrophotomètre visible (Fischer Thermo Spectronic, Helios Epsilon). La concentration est calculée à partir de courbes de calibration (gamme de glucose de 0 à 10 mg.L<sup>-1</sup> et de 0 à 100 mg.L<sup>-1</sup>). L'erreur de mesure est de l'ordre de ± 2%.

### 2.3.2 Dosage de la Demande Chimique en Oxygène (DCO)

La micro-méthode a été utilisée pour mesurer la DCO (kit ST-DCO commercialisé par la société Equipements Scientifiques SA - Département Bio-Tests & Industries, Gaches, France). 2 mL d'échantillon sont introduits dans un tube préparé d'après la norme 15705-2003-01 (gamme de 0-1500 mg.L<sup>-1</sup> et 0-150 mg.L<sup>-1</sup> à +/-3,5%) avant être mis dans un bloc chauffant à 150°C durant 2h. Les tubes sont refroidis et la DCO de l'échantillon est déterminée par la mesure de l'absorbance à 620 nm dans un spectromètre (Checkit Direct DCO Vario, société Equipements Scientifiques SA - Département Bio-Tests & Industries, Gaches, France).

## 2.4 Caractérisation du transfert interne

La détermination du coefficient de diffusion interne des biofilms a été réalisée dans l'objectif de caractériser sa structure (facteur de diffusion ( $f_D$ ), porosité ( $\theta$ )). Le facteur de diffusion de

l'oxygène est estimé à partir de la mesure des profils de concentration en oxygène dans les biofilms.

## **2.4.1 Dispositif expérimental**

### **2.4.1.1 Les microélectrodes**

Des mesures de profils de concentration en oxygène ont été réalisées par des microélectrodes (modèle Ox-25) fournies par Unisense (Aarhus, Danemark). Il s'agit d'une électrode de type Clark. La mesure est basée sur la diffusion de l'oxygène dissous à travers une membrane en silicone et de sa réduction à la cathode polarisée. L'anode est une anode interne Ag/AgCl. Le diamètre de la pointe de l'électrode est de 20 à 30  $\mu\text{m}$ . Son temps de réponse ( $t_{90}$ ) est de 3 s, sa précision de  $0,3 \mu\text{mol}_{\text{O}_2} \cdot \text{L}^{-1}$  et sa sensibilité de 2%.

### **2.4.1.2 Calibration et entretien de la microélectrode**

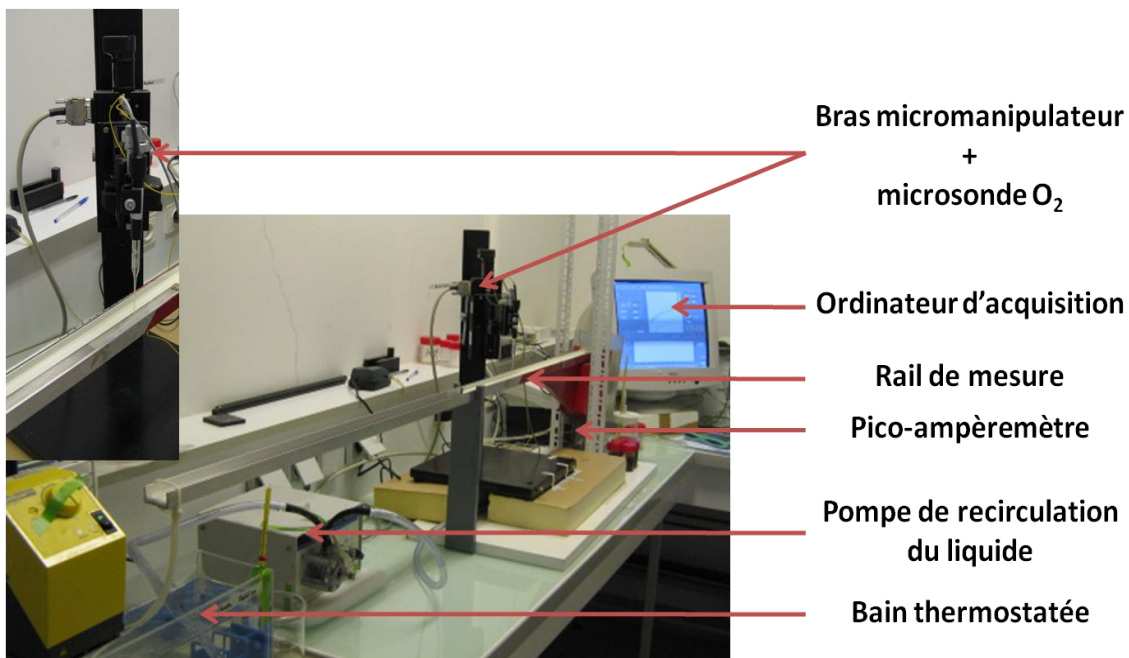
Les microélectrodes doivent être mises à polariser durant 24 h avant leurs utilisations. L'étalonnage est établi par deux points de mesure (solution saturée et non saturée) car l'évolution du potentiel est linéaire avec la concentration en oxygène dissous. Une chambre de bullage thermostatée contenant de l'eau milliQ permet d'obtenir une solution saturée en oxygène dissous, tandis qu'une solution de sortie de réacteur anaérobie a été utilisée pour obtenir un point non saturé.

La fréquence de calibration de la sonde dépend de son âge : plus l'électrode est neuve, plus la calibration doit être réalisée régulièrement. Les microélectrodes neuves doivent être étalonnées toutes les 30 min, alors que pour une microélectrode « usagée », une calibration toutes les 24 h est suffisante. Cependant, si au cours de l'étape de calibration, il apparaît une réduction du signal qui dépasse les 4%/heure, l'électrode est considérée comme non utilisable. Le nettoyage de la pointe de la microélectrode est réalisé lorsque celle-ci a été utilisée pour faire une dizaine de séries de mesures. Chaque série de mesure prend en considération une trentaine de profils de concentration. Des rinçages sont réalisés successivement avec une solution d'acide chlorhydrique à  $0,01 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ , d'éthanol à 96% et de l'eau déminéralisée afin de retirer des substances qui ont adhérees à la membrane en silicone.

### 2.4.1.3 Banc de mesure des profils de concentration

La Figure 2-5 présente le banc de mesure utilisé pour obtenir les profils de concentration en oxygène. Il est composé d'un réacteur canal, d'un bras micromanipulateur télécommandé qui permet de faire des pas de mesure de  $1\mu\text{m}$ . Un ordinateur, via le logiciel Sensor Profile<sup>10</sup>, permet l'acquisition du signal.

Tous les profils de concentration en oxygène dissous ont été réalisés dans les mêmes conditions opératoires. La solution était maintenue à  $45^\circ\text{C}$  et le débit de recirculation était fixé  $3\text{ L.h}^{-1}$  par une pompe péristaltique. Le nombre de Reynolds au sein du chenal est de 100. La solution, recirculée au niveau du banc d'étude, était préparée à partir d'une solution concentrée en glucose et nutriments. Elle a été congelée et conservée à  $-20^\circ\text{C}$  avant d'être diluée dans 10 litres d'eau déminéralisée pour obtenir une solution de concentration de  $0,268\text{ g.L}^{-1}$  en glucose. Un prélèvement de  $20\text{ mL}$  était effectué avant et après chaque série de mesure, afin de contrôler la concentration en substrat dans le liquide. Environ trente à quarante profils de concentration, espacés d'environ  $1\text{ cm}$ , ont été mesurés pendant une durée inférieure à  $5\text{ h}$ . Les mesures des profils ont été enregistrées en  $\mu\text{molO}_2.\text{L}^{-1}$ .



**Figure 2-5 Dispositif expérimental de mesure des profils de concentration en Oxygène.**

<sup>10</sup> Développé par Unisense (Aarhus, Danemark)

## 2.4.2 Exploitation des profils de concentration

La Figure 2-6 présente l'évolution de la concentration de la demande en oxygène mesurée dans un biofilm.

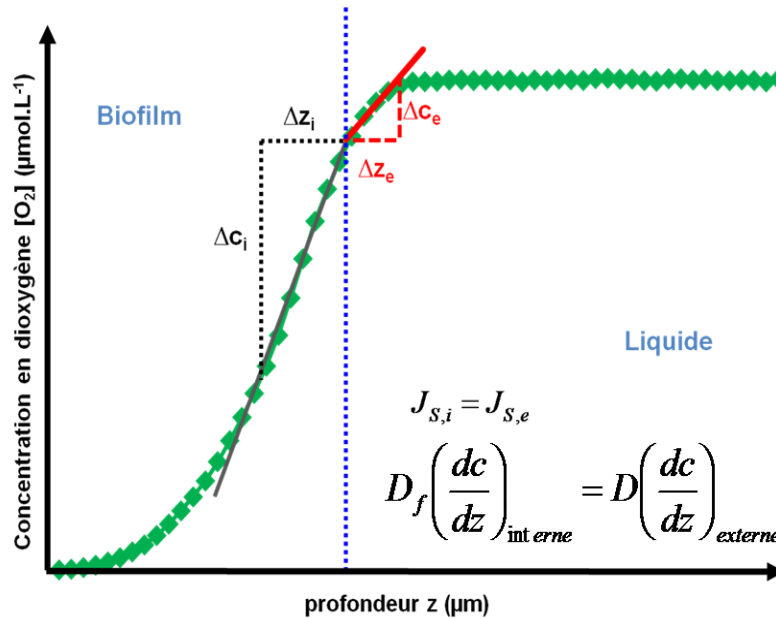


Figure 2-6 Allure des profils de concentration en oxygène obtenus dans un biofilm.

Le coefficient de diffusion du biofilm a été calculé à partir des relations présentées par Horn *et al.* (2003). L'analyse des profils de concentration est basée sur les travaux de Cronenberg et Van den Heuvel (1991) et Lewandowski *et al.* (1991). Dans la couche limite diffusionnelle, le flux de transfert matière est exprimé de la manière suivante :

$$J_{s,e} = -D \left( \frac{dc}{dz} \right)_{externe} \quad 2-13$$

Dans le biofilm, le flux de transfert de matière est réalisé par diffusion :

$$J_{s,i} = -D_f \left( \frac{dc}{dz} \right)_{interne} \quad 2-14$$

A la surface du biofilm, il y a égalité des flux, et l'expression suivante peut être écrite :

$$D_f = D \frac{\left(\frac{dc}{dz}\right)_{externe}}{\left(\frac{dc}{dz}\right)_{interne}} \quad \mathbf{2-15}$$

Avec :

$D_f$ : le coefficient de diffusion du composé dans le biofilm ( $m^2.s^{-1}$ )

$D$ : le coefficient de diffusion du composé dans le liquide ( $m^2.s^{-1}$ )

$\left(\frac{dc}{dz}\right)_{externe}$  : la pente de la droite  $c = f(t)$  dans la couche limite

$\left(\frac{dc}{dz}\right)_{interne}$  : la pente de l'asymptote de la courbe  $c = f(t)$  à la surface du biofilm (cf. *Figure 2-*

6)

Le rapport des deux pentes correspond au rapport entre le coefficient de transfert d'oxygène dans le biofilm sur le coefficient de transfert d'oxygène dans le liquide. Ce ratio est appelé facteur de diffusion au sein du biofilm :

$$f_D = \frac{D_f}{D} = \frac{\left(\frac{dc}{dz}\right)_{externe}}{\left(\frac{dc}{dz}\right)_{interne}} \quad \mathbf{2-16}$$

Sachant que le facteur de tortuosité ( $\kappa$ ) du biofilm est lié au facteur de diffusion, la porosité est estimée par la relation suivante (Zhang et Bishop, 1994b) :

$$\theta = \sqrt[3]{f_D} \quad \mathbf{2-17}$$



## 2.5 Caractérisation et suivi moléculaire de la flore du réacteur

### 2.5.1 Méthodes de prélèvement et de conservation des échantillons

#### *Phase liquide :*

Un prélèvement de 50 mL de liquide a été effectué en sortie de réacteur dans un tube stérile, centrifugé durant 8 min à 7000 rpm (Eppendorf, centrifuge 5430). Après avoir éliminé le surnageant, le culot est récupéré avec 400 µL d'eau stérile, et introduit dans un microtube de 2 mL à vis. Ces échantillons sont ensuite centrifugés dans une microcentrifugeuse (Eppendorf, Minispin) à 7000 rpm durant 8 min. Le surnageant est éliminé et le culot est congelé à -20°C.

#### *Phase attachée :*

Dans une petite boîte de pétri, on récupère le biofilm présent sur le coupon à l'aide d'un scalpel stérile. 200 µL de guanidine thiocyanate (dénaturation des protéines) et 60 µL de N-Lauroyl sarcosine à 10% (détergent ionique) sont ajoutés. Après une bonne homogénéisation de l'échantillon, des aliquots de 500 µL maximum sont introduits dans des microtubes de 2 mL à vis avant d'être congelés à -20°C.

Pour des prélèvements ponctuels sur le coupon, l'échantillon de matière attachée est récupéré à l'aide d'une pipette munie d'un cône à filtre. La quantité prélevée est diluée dans 400 µL d'eau stérile avant d'être centrifugée à 7000 rpm durant 8 minutes. Le surnageant est éliminé et l'échantillon est congelé à -20°C.

### 2.5.2 Extraction et purification de l'ADN total

Le protocole de l'extraction et de purification de l'ADN totaux est détaillé dans Godon *et al.* (1997) si l'extraction n'est pas réalisée par kits.

L'extraction de l'ADN avec les kits QIAAMP DNA STOOL permet de faire la lyse, l'élimination des inhibiteurs et la purification de l'ADN des cellules bactériennes. Les échantillons sont lysés à 95°C durant 5 min après l'ajout d'un tampon ASL sur les échantillons

congelés. Puis les substances endommageant l'ADN et les inhibiteurs de la PCR présents dans l'échantillon sont absorbés par une matrice d'InhibitEx (tablette). Une fois que les inhibiteurs sont éliminés à température ambiante, le surnageant, obtenu par centrifugation et contenant l'ADN, est récupéré sur des microcolonnes Mini Spin du kit QIAamp. L'étape de purification commence.

Une enzyme (protéinase *K*) est ajoutée à l'échantillon afin de digérer et dégrader les protéines durant une incubation à 70°C. Ensuite, l'ADN est adsorbé sur la membrane en silice QIAamp après une courte phase de centrifugation. Cette récupération de l'ADN au niveau de la membrane permet d'éliminer toutes les impuretés ou les restes de la digestion des protéines (inhibition de la PCR ou réactions enzymatiques). L'ADN lié à la membrane est ensuite lavé avec des solutions tampons du kit au cours de deux étapes de centrifugation. Purifié, l'ADN concentré est élué de la colonne QIAamp à la température ambiante. Suivant la quantité de cellules présentes, on peut avoir de 5 à 100 µg d'ADN. L'ADN purifié est stocké à -20°C.

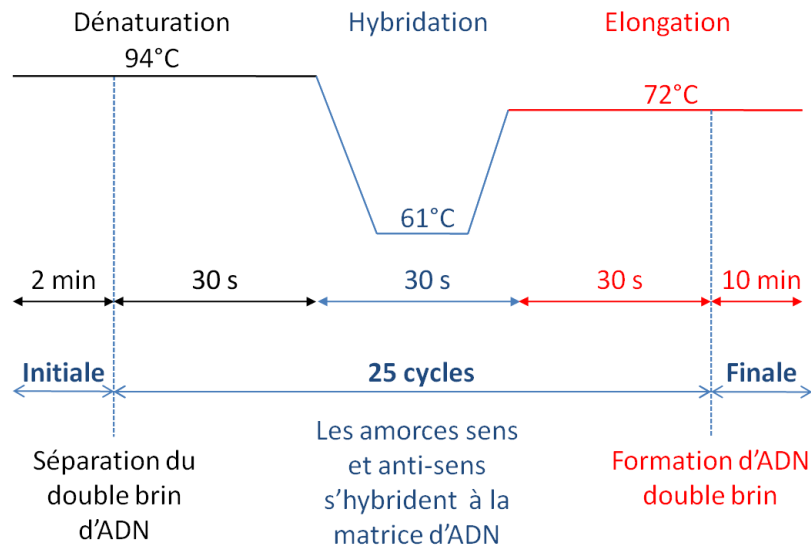
Une estimation de la quantité et de la qualité de l'ADN purifié est effectuée sur un gel d'agarose à 0,7% additionné de Bromure d'éthidium (BET). Par électrophorèse, l'ADN additionné à un tampon de migration, le Tris-Borate EDTA, migre dans le gel. Celui-ci est ensuite visualisé en lumière UV. Une estimation de la taille du fragment d'ADN obtenu est définie par comparaison à un marqueur de taille.

### 2.5.3 Amplification (PCR)

La PCR est utilisée pour amplifier un fragment d'ADN qui correspond à la région V3 (200pb) du gène de l'ARN ribosomique 16S (ADNr 16S). Des amorces bactériennes *w49* (sens) et *w104* (anti sens) ont été utilisées. Elles sont des oligonucléotides spécifiques qui encadrent la région cible V3 de l'ADN. Le mélange contenant l'ADN extrait est ensuite déposé dans un petit tube Eppendorf. Ils sont mis dans un amplificateur dont les conditions opératoires sont préalablement réglées.

Le programme d'amplification est présenté par la Figure 2-7. Le cycle est renouvelé 25 fois. Pour chaque cycle, la quantité d'ADN est doublée. Le produit de l'amplification est déposé sur un gel d'agarose à 2%. Une migration électrophorétique est réalisée. La taille du fragment

attendue est d'environ 100pb. Les produits issus de la PCR sont conservés à  $-20^{\circ}\text{C}$  avant d'être analysés par CE-SSCP.



**Figure 2-7 Schéma descriptif des cycles de la PCR.**

#### 2.5.4 Analyses CE-SSCP

Avant l'analyse par CE-SSCP, 1  $\mu\text{L}$  des produits de PCR est mélangé à 18,9  $\mu\text{L}$  de formamide (Applied) et à 0,075  $\mu\text{L}$  d'étalon interne (GS 400 HD-rox, Applied). Ils sont dénaturés par chauffage (5 min à  $95^{\circ}\text{C}$ ) puis refroidis rapidement (10 min dans l'eau glacée). Après cette renaturation rapide, les fragments d'ADNr 16S simple brin adoptent une conformation secondaire stable, qui permet de les séparer par électrophorèse capillaire. Le temps de migration devant le détecteur de la machine se réalise selon la conformation. La détection se fait grâce au marquage fluorescent de l'amorce *w104* par un laser. L'électrophorèse est réalisée dans un séquenceur automatique (Hitachi Applied Biosystem 3130 Genetic Analyser) présenté par la Figure 2-8. On obtient un profil électrophorétique, où chaque pic correspond à une espèce moléculaire (phylotype).



**Figure 2-8 Séquenceur analytique 3130.**

### 2.5.5 Analyse statistique des données

Les données ont été analysées à l'aide du logiciel libre R (R development Core Team 2010), le programme "StatFingerprints" (Michelland *et al.*, 2009) et le package "Vegan". Ce programme libre permet également d'importer, de traiter et d'afficher les profils des empreintes microbiennes.

Des statistiques uni-variables ont été utilisées pour estimer la diversité des populations microbiennes présentes dans les échantillons. La diversité représente la richesse en espèces d'une communauté et son expression est liée aux nombres d'espèces et à leur distribution. StatFingerprints permet de calculer un grand nombre d'indices, comme les indices de Simpson et de Shannon qui sont les plus connus. Dans cette étude, l'indice utilisé pour mesurer la biodiversité est une variante de l'indice de Simpson (SI) : le logarithme négatif de Simpson (Michelland *et al.*, 2009). Il est calculé de la manière suivante:

$$SI = -\log \sum \left( \frac{a_i}{\sum a_i} \right)^2 \quad \mathbf{2-18}$$

où  $a_i$  représente l'abondance relative de chaque pic (liée à une espèce particulière) et  $\sum a_i$  représente l'abondance de tous les pics (de toutes les espèces). Plus cette valeur est élevée, plus la diversité est grande.

Des analyses multi-variables ont été aussi utilisées pour analyser la structure des communautés. Des distances métriques entre profils microbien comme la distance Hellinger ont été définies (Magurran, 2004). Pour faire cette approche, le package "Vegan" du logiciel R (R core development team, 2010) a été utilisé. Ce package permet de faire les ordinations de base mais contient aussi des fonctions supports pour faire les ajustements entre les variables environnementales et les ordinations graphiques. Le programme "StatFingerprints" réalise aussi des tests statistiques : l'ANOSIM et l'ANOVA. Le premier fait l'analyse de la similitude entre les profils. Le second fait l'analyse de la variance. Seuls les résultats de l'ANOSIM seront présentés dans ces travaux car l'ANOVA est proche des résultats du t-test (t-test uni-varié).

L'ANOSIM est basée sur la comparaison des distances entre les deux groupes que l'on compare. Il donne une valeur du coefficient R-ANOSIM sur une gamme de 0 (pas de différence) à 1 (complètement différent). Ce résultat est associé à une probabilité « p ». La valeur p (p-value) est la probabilité de rejeter à tort l'hypothèse nulle. Cette p-value<sup>11</sup> indique la signification du résultat : plus cette valeur est faible, plus le résultat statistique est significatif. Un test uni-varié (t-test) a été utilisé pour confronter et discuter de nos profils CE-SSCP suivant chaque condition étudiée et suivant l'origine de l'échantillon (biofilm ou liquide). Ce test est comparable à l'ANOSIM mais avec une visualisation moyenne des profils CE-SSCP de chaque groupe testé. Cette moyenne est calculée à partir des valeurs de chaque phénotype.

Les analyses d'ordination ont fait appel à une Analyse en Composantes Principales (ACP). Cette ACP a pour but de condenser et réduire les données qualitatives et de les projeter sur un plan afin d'observer les regroupements des données comparées. Ces regroupements indiquent la similitude entre les profils. Ces données sont aussi ordonnées suivant des facteurs environnementaux qui indiquent, à l'aide de vecteurs, quels sont les points qui sont influencés par ce facteur.

---

<sup>11</sup> Cette valeur indique le plus petit niveau auquel on rejette l'hypothèse nulle au niveau des données statistiques.

## 2.6 Modélisation du biofilm par le logiciel AQUASIM®

L'un des objectifs de ces travaux de thèse est d'expliquer par la modélisation la compétition microbienne entre le biofilm et le liquide mais aussi l'évolution et la répartition des espèces microbienne au sein du biofilm et du liquide. Les mécanismes de croissance et de détachement du biofilm et les interactions avec le milieu environnant sont aussi modélisés. Il s'agit aussi d'appréhender et de mettre en évidence les processus qui influencent la compétition suivant un système biologique simple, en faisant intervenir la croissance cellulaire et les processus de transfert par exemple.

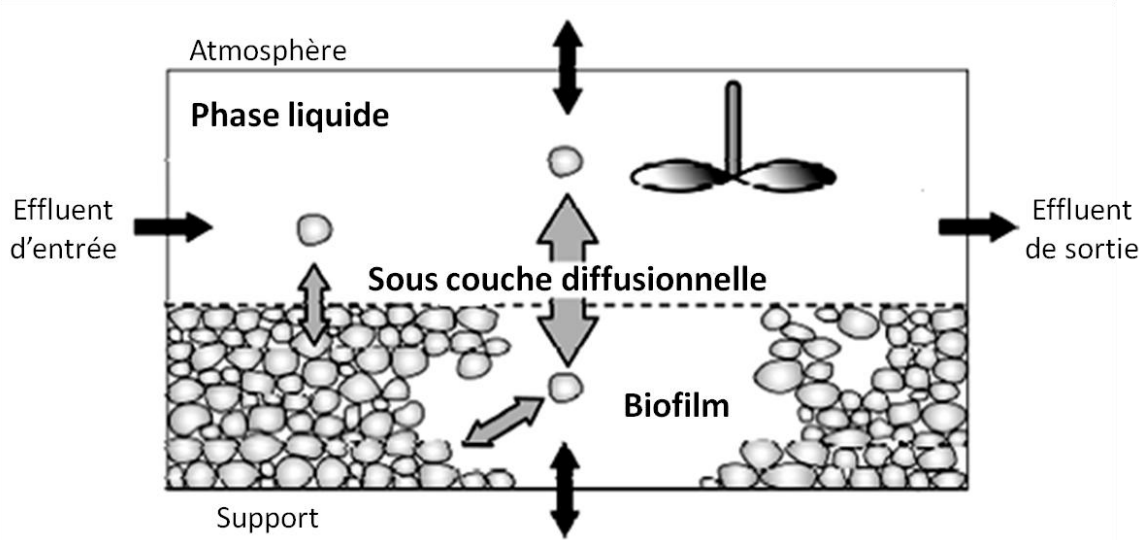
Dans ce paragraphe, l'objectif est de présenter un modèle simple. Le modèle développé doit pouvoir reproduire les comportements expérimentaux qui ont été observés à l'échelle des réacteurs de laboratoire. Deux approches sont faites. Dans un premier temps, un modèle simple (mono-espèce) est utilisé pour présenter la compétition et la distribution de la biomasse entre le liquide et le biofilm. Puis, un modèle plus complexe (multi-espèces) est développé pour appréhender la diversité microbienne. Ce modèle multi-espèces prend en considération plusieurs espèces (biomasses).

Le biofilm est un système complexe. En modélisation, des simplifications doivent être choisies et validées. Des paramètres physiques (épaisseur de la couche limite, porosité,...) et des paramètres relatifs au transport des espèces sont définis pour pouvoir réaliser les transformations biologiques. Certains choix de ces processus et de ces paramètres sont discutés et justifiés.

### 2.6.1 Objectif du modèle

#### 2.6.1.1 Echelle macro du réacteur

Dans le logiciel de simulation AQUASIM® (Reichert, 1998), la fonction réacteur à biofilm considère trois compartiments: la phase liquide, le biofilm et les pores dans le biofilm (volume des pores) (cf. *Figure 2-9*). Les concentrations en composés sont déterminées par l'entrée, la sortie, les réactions de conversion et les échanges entre les différents compartiments.



**Figure 2-9** Configuration du programme réacteur à biofilm au sein du logiciel AQUASIM®. Les doubles flèches noires indiquent les flux possibles au travers des compartiments et les doubles flèches grises représentent les flux de matière entre chaque compartiment (d'après Wanner et Morgenroth, 2004).

Le support est considéré comme « inerte », « simple » et « imperméable ». Il n'y a aucun processus et aucune transformation qui ont lieu. Le compartiment du liquide est défini comme parfaitement mélangé. Le transfert d'oxygène n'impacte pas sur le biofilm car l'oxygénation est externe au biofilm dans le liquide. Les réactions ont lieu à la fois au sein du milieu liquide et du biofilm. La compétition entre la biomasse planctonique et la biomasse attachée peut avoir un impact significatif sur les propriétés du biofilm.

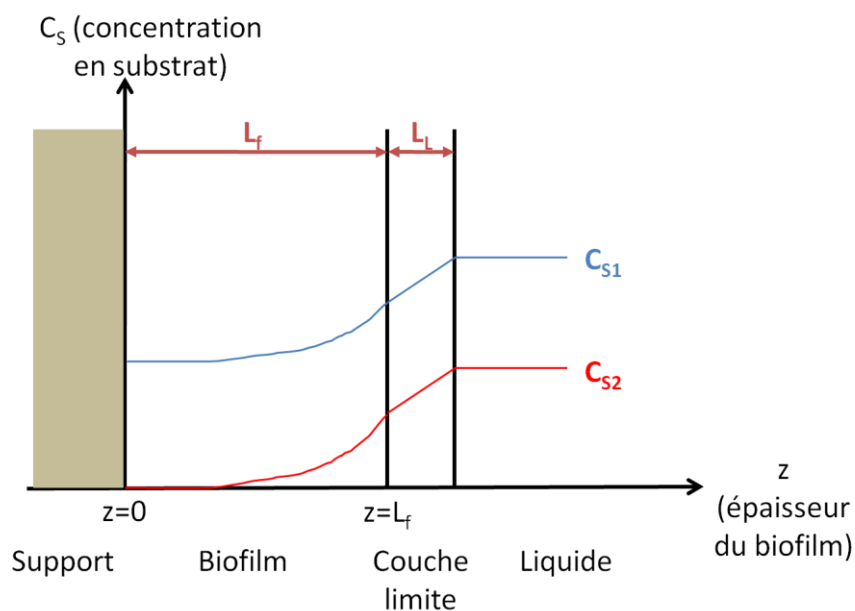
### 2.6.1.2 Echelle du biofilm

Le développement du modèle qui a été mis en place doit rendre compte de la compétition des populations microbiennes dans le biofilm. Il doit mettre aussi en avant la compétition de ces mêmes populations avec celle du liquide. Au niveau du biofilm, les objectifs à atteindre sont les suivants:

- Caractériser et définir la distribution des populations microbiennes à travers l'épaisseur du biofilm,
- Représenter les différents profils de cette distribution des populations au cours de la croissance du biofilm,

- Représenter les différents profils de concentration en substrat dans l'épaisseur pendant la période de formation du biofilm,
- Représenter les processus de transport comme le flux de détachement,
- Représenter la structure du biofilm (concentration de la biomasse attachée, de l'épaisseur...),
- Estimer la diversité au cours de la croissance du biofilm (Indice de Simpson...)

Pour cela, un modèle mathématique 1D a été utilisé. Cette dimension est suffisante pour regarder la compétition à l'échelle du réacteur (exemple : problème Benchmark 3 (Noguera et Picioreanu, 2004; Rittmann *et al.*, 2004)). De plus, le gradient de concentration se situe dans une direction perpendiculaire au support et donc à la surface du biofilm. Donc, la distribution spatiale des différents microorganismes et, du ou des substrat(s) se fait selon un axe perpendiculaire à la surface du support (cf. *Figure. 2-10*).



**Figure 2-10 Biofilm 1D avec des profils de concentration de deux substrats :  $C_{S1}$  est limité par la croissance et  $C_{S2}$  est limité par le transport (d'après Brockmann, 2006 et Wanner, 2006).**

En résumé, le modèle 1D multi-espèces avec un ou plusieurs substrats est basé sur une série d'hypothèses:

- La phase liquide du réacteur est complètement mélangée,



- Le biofilm croît à la surface du support,
- Les gradients de concentrations qui évoluent suivant une direction perpendiculaire au support sont dominants contrairement aux gradients de concentration qui évoluent dans d'autres directions.

La géométrie du compartiment « biofilm » peut se définir de différentes manières. Il peut prendre en compte différentes morphologies et hétérogénéités du biofilm. Il existe une géométrie simple caractérisée soit par une structure homogène en surface ou, soit par une structure hétérogène de la surface. La géométrie complexe définit le compartiment biofilm comme le volume réel occupé par celui-ci (Wanner, 2006). Dans notre cas d'étude, on considère que la densité, la porosité du biofilm et les coefficients de diffusion sont homogènes dans tout le biofilm. La surface du biofilm est « lisse » et ne possède pas de protubérance, donc l'épaisseur du biofilm est identique sur toute la surface de réacteur colonisée.

### 2.6.2 Modèle des bilans globaux du biofilm

Les bilans matières sont basés sur la loi de conservation de la matière et sont résolus pour tous les composés solides et solubles pour chaque phase (biofilm et liquide). Les équations à l'équilibre de chaque composé dans le système peuvent être écrites comme:

$$\left[ \begin{array}{c} \text{Variation de} \\ \text{la masse du} \\ \text{composé} \\ \text{dans le} \\ \text{système} \end{array} \right] = \left[ \begin{array}{c} \text{Transport de la} \\ \text{masse du} \\ \text{composé} \\ \text{entrant dans le} \\ \text{système} \end{array} \right] - \left[ \begin{array}{c} \text{Transport de la} \\ \text{masse du} \\ \text{composé} \\ \text{sortant du} \\ \text{système} \end{array} \right] \pm \left[ \begin{array}{c} \text{Masse du} \\ \text{composé} \\ \text{produit ou} \\ \text{consommé} \\ \text{dans le système} \end{array} \right] \quad \mathbf{2-19}$$

En terme mathématique et différentiel, les équations d'équilibre 1D s'écrivent:

$$\frac{\partial C_i}{\partial t} = \frac{\partial j_i}{\partial z} + r_i \quad \mathbf{2-20}$$

Où  $C_i$  est la concentration du composé  $i$ ,  $j_i$  est le flux massique spécifique et  $r_i$  est la vitesse de production ou de consommation,  $t$  est le temps et  $z$  la coordonnée spatiale dans la direction perpendiculaire au support. Cette équation est appliquée aux composés solides et solubles.

Des processus de conversions prennent dans le milieu liquide et dans le biofilm. Comme le milieu liquide est considéré comme parfaitement mélangé, l'équation à l'équilibre des bilans matières globaux des composés solubles et particulaires, sur le réacteur, peut s'écrire:

$$\frac{d(V_L \cdot C_{L,i})}{dt} = Q \cdot (C_{in,i} - C_{L,i}) + A_f \cdot j_{f,i} + V_L \cdot r_{L,i} \quad 2-21$$

où  $V_L$  est le volume de liquide dans le compartiment liquide.  $Q$  est le débit au sein du milieu liquide,  $C_{in,i}$  et  $C_{L,i}$  sont les concentrations respectives du composé  $i$  en entrée et dans le liquide.  $A_f$  est la surface recouverte par le biofilm,  $j_{f,i}$  est le flux du composé  $i$  au travers du biofilm et  $r_{L,i}$  est la vitesse de production ou de consommation du composé  $i$  dans le liquide.

Dans les paragraphes suivants, nous allons présenter les différents processus qui interviennent dans la modélisation du biofilm.

### 2.6.2.1 Transport interne diffusif

La diffusion moléculaire domine le compartiment biofilm et peut être décrite par la première loi de Fick:

$$j_{z,i} = -D_i \frac{\partial C_i}{\partial z} \quad 2-22$$

où  $D_i$  est le coefficient de diffusion du composé dissous dans le biofilm.  $C_i$  est la concentration de ce composé dissous dans le biofilm. A l'interface biofilm-support ( $z = 0$ ) comme le support est imperméable  $j_{i,0} = 0$ . A l'interface liquide-biofilm ( $z = L_f$ ), la concentration du composé est égale à la concentration du composé à la surface du biofilm.

Au cours de notre étude, les manipulations ont été réalisées à une température de travail de 45°C, il est nécessaire de prendre en considération cette dépendance de la température sur les paramètres physico-chimiques de nos composés solubles. Cette correction par rapport à la température peut être décrite pour le coefficient de diffusion, par :

$$D_i(T) = D(T_{référence}) \cdot \frac{273 + T}{273 + T_{référence}} \cdot \frac{\mu(T_{référence})}{\mu(T)} \quad 2-23$$

où  $D$  est le coefficient de diffusion,  $T$  la température en °C et  $\mu$  la viscosité dynamique de l'eau (Roustan, 2003; Boltz *et al.*, 2010).

La correction de la température sur la viscosité dynamique de l'eau peut être obtenue avec une excellente précision pour les solvants polaires comme l'eau :

$$\mu_i(T) = 10^{\left(A + \frac{B}{(273+T)-C}\right)} \quad \text{2-24}$$

Le domaine d'application de cette équation est de - 10 à 160°C, et les constantes sont :  $A = -1,5668$ ,  $B = 230,298$  et  $C = 146,797$  (Roustan, 2003).

Les valeurs des coefficients de diffusion des composés solubles qui sont choisies pour le modèle, correspondent aux valeurs des coefficients de diffusion mesurée dans l'eau à 20°C ( $T_{\text{référence}}$ ) et corrigées par l'équation 2-23. Ces valeurs sont présentées dans le Tableau 2-5.

### 2.6.2.2 Sous couche diffusionnelle

Une épaisseur de la sous-couche diffusionnelle de 50  $\mu\text{m}$  a été considérée au sein de notre modèle. L'impact de cette épaisseur sur le comportement du modèle a été estimé. Comme nous travaillons avec des conditions hydrodynamiques contrôlées et constantes durant ces travaux de thèse, il n'y a aucune variation significative de cette épaisseur. En effet, la variation de cette épaisseur est considérée en modélisation lorsque les conditions hydrodynamiques changent (Picioreanu *et al.*, 2000a, b; Wäsche *et al.*, 2000, 2002).

Dans notre modèle 1D, on considère un flux massique au travers de cette sous-couche diffusionnelle, qui provoque une résistance du transfert de matière. Ce flux massique des particules et des composés dissous est décrit par:

$$j_{L,i} = -D_i \frac{C_{L,i} - C_{L,i}^*}{L_L} \quad \text{2-25}$$

où  $L_L$  est l'épaisseur de cette sous-couche diffusionnelle,  $D_i$  est le coefficient de diffusion des composés solubles ou particuliers dans l'eau.  $C_{L,i}$  et  $C_{L,i}^*$  sont respectivement les concentrations de ces composés dans le liquide et à la surface du biofilm.

### 2.6.3 Processus de détachement

Le développement de l'épaisseur du biofilm est le résultat de la production nette de biomasse, de l'attachement et du détachement des particules à la surface du biofilm. La vitesse d'attachement fait référence à l'adsorption des cellules microbiennes en suspension dans le milieu vers la surface du biofilm et se modélise par celle-ci. La vitesse de détachement permet de caractériser la perte de particule du biofilm. Souvent ce processus est le plus déterminant dans la modélisation. Dans le modèle 1D, la variation de l'épaisseur s'exprime par:

$$\frac{dL_f}{dt} = u_f(z = L_f) - u_{de} + u_{att} \quad 2-26$$

où  $u_{de}$  et  $u_{att}$  sont les vitesses globales de détachement et d'attachement,  $u_f$  est la vitesse de déplacement de l'interface biofilm-liquide. La vitesse d'attachement décrit les flux de particules qui s'attachent à la surface du biofilm. Cependant, elles n'évoluent pas dans l'épaisseur (Wanner, 2006). Souvent elles sont enlevées par le détachement et l'expression de la variation de l'épaisseur peut alors s'écrire:

$$\frac{dL_f}{dt} = u_f(z = L_f) - u_{de} \quad 2-27$$

Dans AQUASIM®, la vitesse de détachement est définie comme une vitesse globale et elle est identique pour tous les composés. Elle décrit les phénomènes de décroissance de l'épaisseur du biofilm par unité de temps ou bien des processus de détachement comme l'érosion ou le sloughing. Cette vitesse peut se modéliser en fonction de différents paramètres comme l'épaisseur, le taux de cisaillement... :

$$u_{de} = u_{de}(L_f, u_f(L_f), t, \tau, \dots) \quad 2-28$$

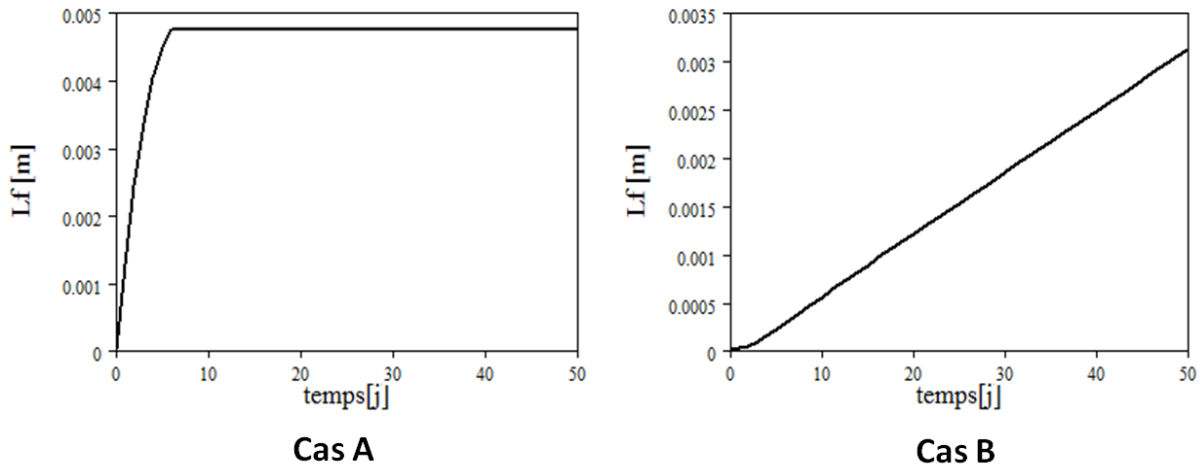
Le Tableau 2-4 résume les différentes expressions que l'on peut rencontrer dans la littérature en termes de vitesse de détachement.

**Tableau 2-4 Différents modèles de détachement (d'après Morgenroth, 2008).**

Processus	expression du taux de détachement ( $M.L^{-2}.T^{-1}$ )	Références
Pas de spécificité	0 $L_f = \text{constante}$	Fruhen <i>et al.</i> , 1991 Wanner et Gujer, 1986
Épaisseur du biofilm	$k_d (\rho_f L_f)^2$ $k_d \rho_f L_f^2$ $k_d \rho_f L_f$	Trulear, 1982; Bryers, 1984 Wanner et Gujer, 1986 Chang et Rittmann, 1987
Backwashing jusqu'à une épaisseur de base prédéfinie	$\left\{ \begin{array}{l} k_d' L_f \\ k_d'' (L_f - L_{f, \text{base\_de\_l'épaisseur}}) \end{array} \right.$	Morgenroth et Wilderer, 1999; Rittmann et Stilwell, 2002
Cisaillement	$k_d \rho_f \tau_p$ $k_d \rho_f \tau_p^{0,58}$	Bakke <i>et al.</i> , 1984 Rittmann, 1982
Taux de croissance ou consommation du substrat	$k_d r_s L_f$ $(k_d' + k_d'' \mu) L_f$	Robinson <i>et al.</i> , 1984; Tjihuis <i>et al.</i> , 1995 Speitel et DiGiano, 1987
Distance par rapport à la surface	$k_d z^2$	Picioreanu <i>et al.</i> , 1998, 2000a, b; Xavier <i>et al.</i> , 2005; Alpkvist <i>et al.</i> , 2006
Distance par rapport à la surface et densité du biofilm	$\frac{k_d z^2}{\rho_f}$	Xavier <i>et al.</i> , 2004
Croissance et épaisseur du biofilm	$u_{\text{det}} = k_{d1} u_f + \frac{1}{2} k_{d2} \rho_f L_f^2$	Stewart, 1993

L'évolution de l'épaisseur a souvent l'allure d'une courbe sigmoïde au cours de sa croissance, avant d'atteindre un état d'équilibre caractérisé par une épaisseur constante. L'expression du détachement doit permettre d'atteindre cet état d'équilibre, où la dérivée de l'épaisseur par rapport au temps est nulle.

La vitesse de déplacement  $u_f$  est liée à la croissance du biofilm. La vitesse de détachement  $u_d$  peut être liée à  $u_f$  mais aussi à l'épaisseur du biofilm. La Figure 2-11 présente l'évolution de l'épaisseur de biofilm en fonction du temps pour les deux phénomènes de détachement: une fonction de  $L_f$  (cas A), l'autre indépendant de  $L_f$  et fonction de  $u_f$  (cas B).



**Figure 2-11** Evolution de l'épaisseur de biofilm dans le cas d'un modèle de détachement fonction de  $L_f$  (cas A) et d'un modèle indépendant de  $L_f$  (cas B).

Dans notre étude, notre modèle doit prendre en compte les deux phénomènes, afin d'atteindre une épaisseur de biofilm constante. Les constantes de détachement  $k_d$  déterminent quant à elles, la période nécessaire pour atteindre cet état d'équilibre. L'expression de détachement, dans le cas d'un lien avec l'épaisseur, peut être fonction d'une puissance sur le terme  $L_f$ . Cela permet de modifier la dynamique afin d'atteindre l'équilibre du système en termes d'épaisseur de biofilm. D'après les différents modèles de la littérature présentés au sein du Tableau 2-4, il a été retenu dans notre cas d'étude, l'expression de détachement surfacique suivante (Stewart, 2003) :

$$u_{\text{det}} = k_{d1}u_f + \frac{1}{2}k_{d2}\rho_f L_f^2 \quad \text{2-29}$$

Deux coefficients de détachement indépendants, notés  $k_{d1}$  et  $k_{d2}$ , vont alors intervenir dans l'expression de détachement. Ces coefficients sont définis à l'aide des données expérimentales.

## 2.6.4 Modèle de structure du biofilm

### 2.6.4.1 Porosité

Dans le logiciel AQUASIM®, la résistance au transfert au travers du compartiment biofilm est ajustée en jouant sur la taille des pores. La matrice solide du biofilm qui est formée par les composés particulaires se définit par :

$$X_{M,i} = \rho_{S,i} \varepsilon_{S,i} \quad \mathbf{2-30}$$

Où  $X_{M,i}$  est la concentration d'un composé particulaire du biofilm (masse de composé particulaire par unité de volume du biofilm),  $\rho_{S,i}$  est la densité de ces matières particulaires (masse de composé particulaire par unité de volume de la phase solide) et  $\varepsilon_{S,i}$  est la fraction de liquide (volume des composés particulaires par unité de volume du biofilm).

La porosité correspond à la fraction du volume des pores du biofilm et est donnée par:

$$\theta = 1 - \sum_{i=1}^{n_x} \frac{X_{M,i}}{\rho_{S,i}} \quad \mathbf{2-31}$$

Où  $\theta$  est la porosité du biofilm,  $n_x$  est le nombre de composés particulaires considérés dans le modèle et  $\sum_{i=1}^{n_x} \frac{X_{M,i}}{\rho_{S,i}}$  est égal à la fraction du volume de biofilm particulaire (Wanner, 2006). La

porosité varie avec les conditions hydrodynamiques (Ramasamy et Zhang, 2005) et suivant la stratification du biofilm (Zhang et Bishop, 1994b) Au niveau du modèle, la valeur de cette porosité est constante et de 0,8. Cette valeur est estimée à partir des profils de concentration en oxygène. Ces résultats sont présentés dans le paragraphe 3.4 du chapitre suivant.

### 2.6.4.2 Stratification du biofilm

Afin de pouvoir visualiser la représentation du gradient de concentration suivant la direction perpendiculaire au support, le biofilm a été divisé en i couches d'épaisseur identique (Lu *et*

al., 2007). La Figure 2-12 représente cette stratification de la couche du biofilm. Pour chaque couche, les équations de conservation de la matière sont explicitées. Comme le biofilm présente des gradients de concentrations suivant les directions perpendiculaires au support, la production de composés particuliers varie. Notre modèle 1D doit prendre en considération cette évolution afin de pouvoir estimer la quantité de particule produite dans le biofilm au cours du temps.

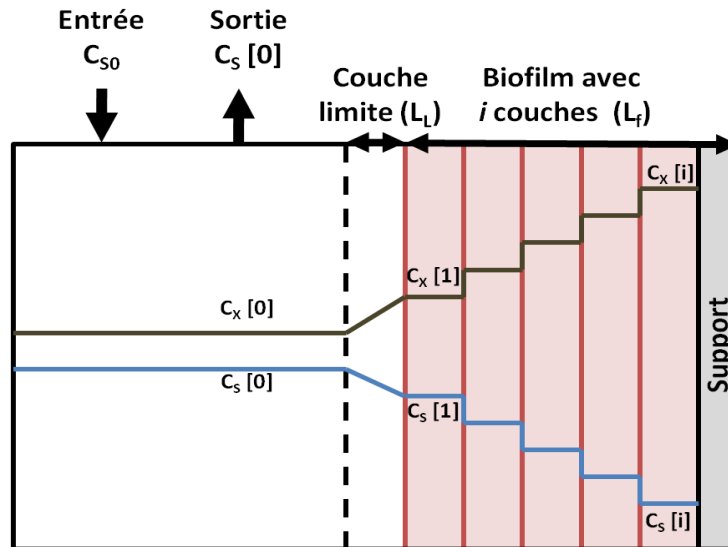


Figure 2-12 Schéma d'un biofilm stratifié en contact avec un compartiment parfaitement mélangé (d'après Lu *et al.*, 2007).

### 2.6.5 Synthèse des paramètres utilisés

Concernant les processus de transport et morphologique qui sont considérés dans notre modèle, les points suivants doivent être retenus:

- L'épaisseur de la sous-couche diffusionnelle est de 50  $\mu\text{m}$ ,
- La phase liquide est parfaitement agitée,
- Les valeurs des coefficients de diffusion présentent la diffusion des composés solubles dans l'eau à 45°C. Au niveau du modèle, l'équation 3-6 est intégrée dans le modèle et les valeurs des coefficients de diffusion utilisées sont mesurées à 20°C et 25°C.
- La porosité choisie est de 0,8.



Le Tableau 2-5 résume les différentes valeurs considérées au niveau du modèle:

**Tableau 2-5 Synthèse des valeurs utilisées au niveau du modèle.**

symbole	Définition	Valeur du modèle
$\theta$	Porosité du biofilm	0,8
$D_{O_2}^{20^\circ C}$	Coefficient de diffusion de l'oxygène ( $m^2 \cdot j^{-1}$ )	0,00021
$D_{glucose}^{25^\circ C}$	Coefficient de diffusion du glucose ( $m^2 \cdot j^{-1}$ )	0,000058
$L_L$	Epaisseur de la sous couche diffusionnelle ( $\mu m$ )	50
$k_{d1}$	Coefficient de détachement lié à la croissance ( $j^{-1}$ )	0,95
$k_{d2}$	Coefficient de détachement lié à l'épaisseur ( $j^{-1}$ )	0,005
$\rho_f$	Densité du biofilm ( $g_{DCO} \cdot m^{-3}$ )	19 000*

\*résultats expérimentaux (cf. *Annexe V : étude de la sensibilité*)

## 2.6.6 Modèles cinétiques

Etant donné l'objectif de cette thèse, d'étudier la compétition microbienne entre le liquide et le biofilm, les modèles cinétiques mono-espèces et multi-espèces sont présentés séparément.

### 2.6.6.1 Mono-espèce

Un modèle simple que l'on retrouve très souvent dans la littérature (Wanner, 2006) a été utilisé pour la croissance. Il inclut les composés solubles comme le substrat et l'oxygène, et aussi les composés particuliers comme la biomasse hétérotrophe et la biomasse inerte.

Au sein du modèle, S a été utilisé pour les composés solubles et X pour les composés particuliers. Pour chaque composé i, la vitesse de production et de consommation est calculée par la relation suivante:

$$r_i = \sum_j r_{ij} = \sum_j v_{ij} \cdot \rho_j \quad \text{2-32}$$

Où  $v_{ij}$  dénote le coefficient stœchiométrique du composé i dans j. et  $\rho_j$  l'expression de la réaction de base.

La croissance de la biomasse est décrite par la cinétique de Monod pour l'utilisation du substrat. La réduction de la biomasse active et la formation de la biomasse inerte ont été

modélisées par la respiration d'endogène et par le décès. Les différents processus sont résumés au sein du Tableau 2-6 et les coefficients stœchiométriques au sein du Tableau 2-7.

**Tableau 2-6 Taux de réactions dans le modèle 1-D biofilm.**

Expression $\rho_j$	Processus	Cinétique	Références
1	Croissance des bactéries hétérotrophes	$\mu_H \cdot \frac{S_S}{S_S + K_S} \cdot \frac{S_{O_2}}{S_{O_2} + K_{O_2}} \cdot X_H$	Rittmann <i>et al.</i> (2004) Wanner (2006)
2	Décès des bactéries hétérotrophes	$d_H \cdot X_H$	Wanner (2006)
3	Respiration endogène des bactéries hétérotrophes	$b_H \cdot \frac{S_{O_2}}{S_{O_2} + K_{O_2}} X_H$	Rittmann <i>et al.</i> , (2004) Wanner (2006)
4	Transfert d'oxygène	$k_L a (S_{O_2, saturation} - S_{O_2})$	Roustan (2003)

Les processus d'hydrolyse ne sont pas considérés au niveau de notre modèle car l'effluent utilisé est un effluent synthétique (substances solubilisées qui sont facilement assimilables). Les processus de stockage intracellulaire ne sont pas non plus considérés au sein du modèle. La respiration endogène est un processus de consommation des réserves internes qui implique une diminution de la masse bactérienne et une réduction des cellules actives.

**Tableau 2-7 Coefficients stœchiométriques  $v_{ij}$  des processus considérés au sein du modèle biofilm.**

Nom du processus	Types de biomasse		Substrats		Expression $\rho_j$
	$X_H$	$X_I$	$S_S$	$S_{O_2}$	
Croissance des bactéries hétérotrophes	1		$-\frac{1}{Y_H}$	$-\frac{(1-Y_H)}{Y_H}$	1
Décès des bactéries hétérotrophes	-1	$f_{XI}$	$1-f_{XI}$		2
Respiration endogène des bactéries hétérotrophes	-1			-1	3
Transfert d'oxygène				1	4

Dans le Tableau 2-6, l'expression  $\rho_j = 4$  représente le transfert en oxygène et non un processus lié à la biomasse. La concentration en oxygène dissous au sein du milieu liquide est introduite par un procédé d'aération. Au niveau de notre modèle, cette aération se caractérise par une expression de transfert de l'oxygène vers la phase liquide:

$$\frac{dS_{O_2}}{dt} = k_L a (S_{O_2, saturation} - S_{O_2}) \quad 2-33$$

Où  $k_{L,a}$  est le coefficient de transfert volumique de l'oxygène ( $j^{-1}$ ),  $S_{O_2}$  est la concentration en oxygène dissous ( $g.m^{-3}$ ) et  $S_{O_2, saturation}$  est la concentration en oxygène dissous à l'équilibre thermodynamique dans le milieu liquide considéré ( $g.m^{-3}$ ).

**Tableau 2-8 Valeurs des différents paramètres cinétiques du modèle.**

Symbole	Définition	Valeur du modèle	Valeur de Henze <i>et al.</i> (2002) (20°C)	Valeur de Horn <i>et al.</i> (2003) (20°C)	Valeur de Rittmann <i>et al.</i> , (2004)	Valeur Elenter <i>et al.</i> , (2007)
$\mu_{max,H}$	Taux de croissance spécifique maximum ( $j^{-1}$ )	22	4-8	5	6	7,2
$d_H$	Taux de décès ( $j^{-1}$ )	0,01	0,1-0,2	-	0,08	0,19
$b_H$	Taux de respiration endogène ( $j^{-1}$ )	0,2	-	-	0,32	-
$K_S$	Constante d'affinité pour le substrat ( $g_{DCO}.m^{-3}$ )	20	5-30	10	4	2
$K_{O_2}$	Constante d'affinité pour l'oxygène ( $g_{DCO}.m^{-3}$ )	0,5	0,5-1	0,5	0,2	0,1
$Y_H$	Taux de conversion ( $g_{DCOX} \cdot G_{DCO}^{-1}$ )	0,42*	0,5-0,7	0,5	0,63	0,43/0,53
$f_{XI}$	Fraction de la biomasse inerte produite par la lyse cellulaire	0,1	-	-	-	0,1

\*Déterminé expérimentalement (étude en batch)

Dans les milieux biologiques, il est souvent très difficile de calculer ou de mesurer les vrais paramètres cinétiques. Le Tableau 2-8 présente les différentes valeurs utilisées au niveau du modèle et leurs comparaisons avec des valeurs rencontrées dans la littérature, le plus souvent à une température de 20°C. Globalement les paramètres cinétiques choisis pour le développement de notre modèle sont du même ordre de grandeur que les valeurs de la littérature. La constante de Monod ( $K_S$ ) ou constante d'affinité pour le substrat présente des valeurs très variables dans la littérature (cf. *Tableau 2-8*). Les valeurs de  $K_S$  sont parfois des valeurs apparentes qui prennent en considération les limitations liées à la diffusion du substrat.

Les valeurs du taux de croissance données dans la littérature sont inférieures à la valeur estimée dans notre étude. Cet écart peut provenir de l'influence de la température car la température de travail de notre système est de 45°C et non de 20°C comme dans la plupart des études. Les taux de décès et le taux de la respiration endogène ont des valeurs très petites par rapport à la littérature. Le biofilm, étudié sur une période de 42 jours, est « un biofilm jeune » dans lequel le substrat pénètre dans toute l'épaisseur. Ceci peut justifier une faible mortalité des microorganismes dans ce biofilm.

La valeur du rendement de croissance ou taux de conversion est légèrement plus faible que les valeurs de la littérature. Cette valeur a été estimée expérimentalement.

#### **2.6.6.2 Multi-espèces**

Notre modèle multi-espèces correspond à l'écriture de plusieurs modèles mono-espèces. Chaque espèce a les mêmes taux de réactions et les mêmes coefficients stœchiométriques. Cependant, leurs paramètres cinétiques sont différents (couples  $\mu_H$  et  $K_S$  changent).  $\mu_H$  est le taux de croissance maximal. La compétition a donc lieu entre plusieurs espèces qui possèdent les mêmes fonctions. Elles partagent les mêmes ressources et ont les mêmes exigences environnementales (espèces hétérotrophes). Souvent les modèles de biofilms ne considèrent pas la compétition entre plusieurs espèces ayant la même fonction (Noguera et Picioreanu, 2004; Rittmann *et al.*, 2004). Récemment, des modèles qui simulent la compétition d'espèces hétérotrophes planctoniques (Saikaly et Oerther, 2004 ; Ramirez *et al.*, 2009) ou dans un biofilm ont été développés (Lu *et al.*, 2007).

Dans notre modèle, dix espèces hétérotrophes sont mises en compétition. Nous allons rechercher à modéliser la « diversité » microbienne qui évolue dans le biofilm et dans le milieu liquide comme une conséquence de la compétition. Pour cela, 10 espèces possédant des couples  $\mu_H$  et  $K_S$  différents sont définies. Le Tableau 2-9 présente les différentes valeurs des couples  $\mu$  et  $K_S$  testées. Ces couples sont estimés à partir des données expérimentales et sont basés sur le couple référence défini pour le modèle mono-espèce ( $\mu_H$  de  $20 \text{ j}^{-1}$  et un  $K_S$  de  $20 \text{ g}_{\text{DCO}} \cdot \text{m}^{-3}$ ).

Afin de pouvoir justifier et expliquer les phénomènes observés à l'échelle expérimentale, différentes simulations préalables ont été réalisées. Elles ont été réalisées avec différentes valeurs de  $K_S$  choisies à 2%, 5% et 10% de différence autour de la valeur calée dans le modèle mono-espèce et avec un  $\mu_H$  fixe (valeur du modèle mono-espèce). Puis, d'autres simulations ont été réalisées avec des valeurs de  $\mu_H$  oscillant à 2%, 5% et 10% de différence et une valeur de  $K_S$  fixe (valeur du modèle mono-espèce). Afin d'éviter la domination d'une seule espèce et d'équilibrer notre système, il est donc apparu intéressant de choisir nos valeurs des couples dans un intervalle de 2% autour des valeurs de référence de  $\mu_H$  et de  $K_S$ . Le dernier couple (pour l'espèce  $X_{\text{het}10}$ ) a été choisi, après différentes simulations, avec un  $\mu_H$  supérieur aux autres valeurs définies.

**Tableau 2-9 Paramètres biologiques pour différentes espèces hétérotrophes.**

Numéro de l'espèce	Taux de croissance spécifique maximum $\mu_{\text{max},H}$ ( $\text{j}^{-1}$ )	Constante d'affinité pour le substrat $K_S$ ( $\text{g}_{\text{DCO}} \cdot \text{m}^{-3}$ )
1	21,56	19,6
2	21,56	20
3	21,56	20,4
4	22	19,6
5	22	20
6	22	20,4
7	22,44	19,6
8	22,44	20
9	22,44	20,4
10	23	20

Un indice de diversité est aussi calculé sur la base du logarithme négatif de Simpson. Sa formule est basée sur la concentration d'une espèce et l'ensemble des espèces présentes au sein d'une des deux phases. La concentration a été assimilée à l'abondance d'une espèce afin d'être le plus proche des résultats obtenus en microbiologie. Il est calculé à titre indicatif.

## 2.7 Synthèse

Afin de répondre à nos objectifs et de pouvoir estimer la compétition entre les populations du liquide et du biofilm, des études expérimentales ont été effectuées dans des réacteurs annulaires rotatifs qui permettent d'avoir une bonne maîtrise des paramètres opératoires. Afin de caractériser cette compétition, différents temps de séjour hydraulique seront appliqués, pour une charge constante au niveau de chaque réacteur. Une caractérisation rigoureuse de la répartition de la biomasse attachée et planctonique sera effectuée durant une période d'expérimentation de 42 jours. Les mesures expérimentales sont synthétisées dans la Figure 2-13.

Les données expérimentales obtenues permettront de vérifier les bilans matières sur chaque réacteur. L'utilisation de microélectrodes à oxygène permettra d'évaluer les caractéristiques liées à la structure du biofilm (porosité, facteur de diffusion). De plus, les empreintes moléculaires de chaque échantillon seront utilisées pour estimer la répartition des espèces entre les communautés planctoniques et attachées.

Ces résultats expérimentaux obtenus seront ensuite confrontés à un modèle implémenté dans le logiciel AQUASIM® afin de confirmer et comprendre les observations, et aussi de dresser d'autres pistes de travail.

Les entrées du modèle vont être identiques aux entrées testées expérimentalement. Pour les paramètres d'entrées choisis à partir de la littérature, les valeurs vont être validées en réalisant des simulations et en comparant les résultats simulés obtenus avec les résultats expérimentaux (épaisseur, MES et MSA).

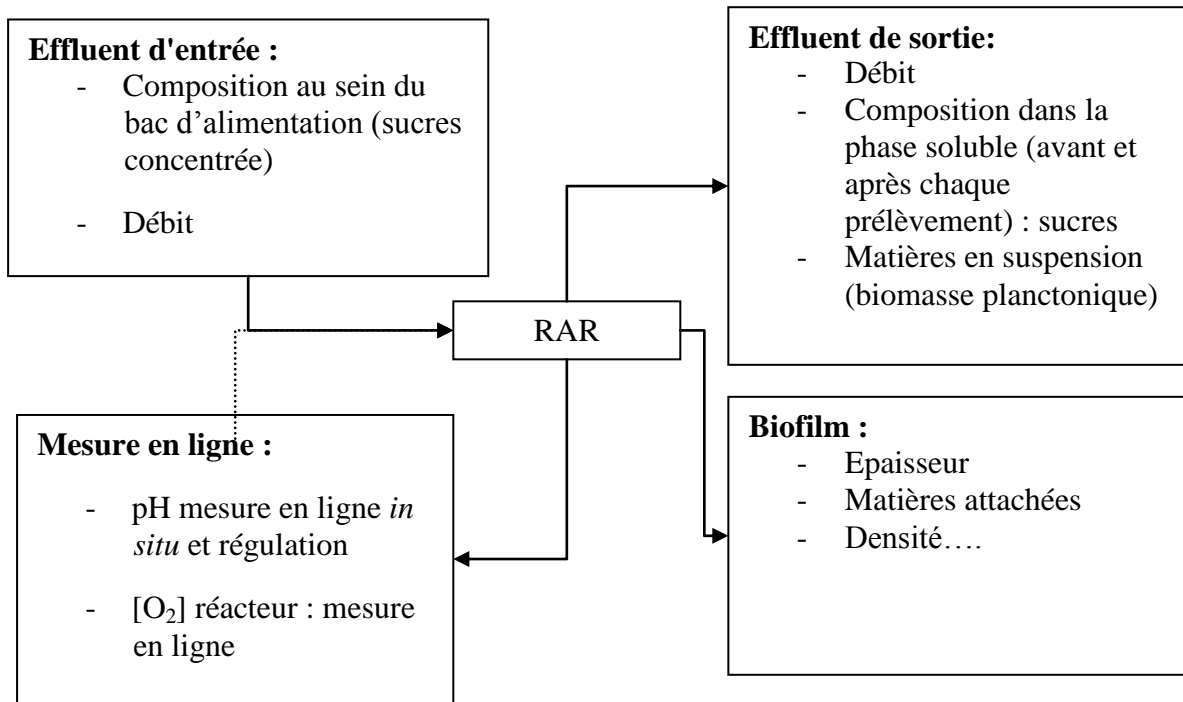


Figure 2-13 Schéma récapitulatif des suivis analytiques.

# **Chapitre 3 Effet du temps de séjour hydraulique sur la répartition de la biomasse et les performances du réacteur à biofilm**





L'objectif de ce chapitre est de caractériser la compétition entre la biomasse attachée en biofilm et la biomasse planctonique. Différentes expériences ont été réalisées dans des réacteurs annulaires rotatifs (RAR). Au cours de chaque expérience, une valeur de temps de séjour hydraulique (TSH) a été fixée. Cette valeur détermine le taux de dilution et donc le taux de croissance spécifique des microorganismes présents dans la biomasse planctonique. La charge surfacique appliquée et le cisaillement restent constants dans les différentes expériences.

Les conditions opératoires testées sont rappelées dans le premier paragraphe de ce chapitre, avant de présenter les résultats expérimentaux. Dans un premier temps, nous avons caractérisé l'impact du TSH sur les caractéristiques globales du biofilm et du liquide. Nous avons ensuite recherché un effet potentiel des conditions testées sur la porosité du biofilm à travers la caractérisation du facteur de diffusion de l'oxygène : des mesures de profils de concentration en oxygène dissous ont été réalisées sur les échantillons de biofilms prélevés durant la phase de croissance aux différents TSH testés. Enfin, nous présentons les bilans matières afin d'observer l'influence sur les performances du réacteur.

### **3.1 Rappel des conditions opératoires**

Le Tableau 3-1 résume les paramètres opératoires des différentes expériences. La durée de chaque expérience a été de 42 jours. La charge surfacique appliquée et la valeur du TSH réel ont été recalculées à partir des débits mesurés à l'entrée du réacteur. La concentration en glucose dans le bac d'alimentation est de  $2 \text{ g}_{\text{glucose}} \cdot \text{L}^{-1}$  soit  $2,14 \text{ g}_{\text{DCO}} \cdot \text{L}^{-1}$ . Le Tableau 3-1 présente les valeurs moyennes des conditions opératoires des trois réacteurs étudiés.

La surface utile à coloniser pour chaque réacteur est de  $0,252 \text{ m}^2$ . Le pH est régulé à 7,3. La concentration en oxygène dissous a été contrôlée par l'intermédiaire d'une électrode à oxygène : elle est de 4 à  $6 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ . La charge surfacique appliquée est de  $24 \text{ g}_{\text{DCO}} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{j}^{-1}$ , mais la concentration d'entrée en substrat, après dilution avec l'eau du robinet, est cependant différente dans chaque réacteur.

**Tableau 3-1 Conditions opératoires appliquées dans chaque réacteur (moyenne des différents suivis expérimentaux).**

Libellés	Unité	Réacteurs		
		A	B	C
Nom du réacteur				
Temps de séjour hydraulique théorique	H	0,3	1	8
Volume utile du réacteur	L	1,24 +/- 0,01	1,19 +/- 0,01	1,16 +/- 0,01
Vitesse de rotation du cylindre	tr.min <sup>-1</sup>	50 +/- 1	50 +/- 1	50 +/- 1
Débit du substrat concentré*	L.h <sup>-1</sup>	0,120 +/- 0,001	0,120 +/- 0,001	0,100 +/- 0,001
Débit de l'eau du robinet*	L.h <sup>-1</sup>	3,68 +/- 0,07	0,87 +/- 0,01	0,050 +/- 0,002
Débit total en sortie du réacteur*	L.h <sup>-1</sup>	3,80 +/- 0,07	0,99 +/- 0,01	0,150 +/- 0,001
Débit d'air*	L.h <sup>-1</sup>	73,65 +/- 0,86	73,80 +/- 1,80	79,98 +/- 1,43
Débit de la boucle de recirculation*	L.h <sup>-1</sup>	25,80 +/- 0,42	24,95 +/- 0,33	29,34 +/- 0,34
Concentration en entrée après dilution	g <sub>DCO</sub> .L <sup>-1</sup>	0,068 +/- 0,002	0,26 +/- 0,01	1,43 +/- 0,05
Temps de séjour expérimental (calculé d'après les valeurs des débits)	H	0,33 +/- 0,01	1,20 +/- 0,02	7,70 +/- 0,02
Charge surfacique appliquée	g <sub>DCO</sub> .m <sup>-2</sup> .j <sup>-1</sup>	24,61 +/- 0,72	24,51 +/- 0,94	20,43 +/- 0,05

\*Voir schéma de l'installation en annexe I.

Lors de leur inoculation avec un effluent papetier, les réacteurs ont fonctionné en mode batch durant 24 h. La concentration en glucose a été mesurée avant et après cette période de batch (cf. *Tableau 3-2 suivant*). La concentration en biomasse initiale a également été quantifiée. Comme la démarche d'inoculation des réacteurs a été identique pour les trois démarrages, le *Tableau 3-2* montre que la consommation et la quantité de biomasse obtenue est similaire dans les trois réacteurs, de même que la quantité de biomasse planctonique initiale.

**Tableau 3-2 Conditions de fonctionnement des batchs lors de l'inoculation.**

Réacteur		A	B	C	
Concentration en glucose (mg <sub>DCO</sub> .L <sup>-1</sup> )	Démarrage du réacteur en batch	Avant inoculation	275 +/- 16	328 +/- 13	277 +/- 0,2
		Après inoculation	266 +/- 04	307 +/- 9	272 +/- 0,5
	Fin de réacteur en batch	13 +/- 0,1	11 +/- 0,0	7 +/- 0,0	
Biomasse initiale introduite (mg <sub>DCO</sub> .L <sup>-1</sup> )		17 +/- 1	18 +/- 0, 89	18 +/- 1,1	
Biomasse finale après 24 h (mg <sub>DCO</sub> .L <sup>-1</sup> )		125 +/- 15	146 +/- 12	130 +/- 16	

Après la réactivation de l'inoculum, les réacteurs ont fonctionné en continu suivant les conditions opératoires décrites par le Tableau 3-1.

### 3.2 Impact du temps de séjour hydraulique sur la distribution de la biomasse

Les coupons ont été prélevés tous les 7 jours à partir de la fin du batch jusqu'au 42<sup>ème</sup> jour de culture. Chaque coupon prélevé a été remplacé par un coupon propre afin de ne pas perturber l'hydrodynamique. L'effluent liquide à la sortie des réacteurs a été prélevé avant et après l'échantillonnage du biofilm afin de contrôler les éventuels détachements du biofilm. Les valeurs obtenues permettent d'expliciter et de valider nos mesures d'échantillon de biofilm. Elle confirme aussi que la procédure d'arrêt et de redémarrage du réacteur n'a pas causé de détérioration au niveau du biofilm produit. En effet, une procédure d'arrêt du réacteur pour prélever les supports a été mise en place afin de limiter le décrochement de biofilm lors du changement des contraintes. Une diminution de la vitesse de rotation de 5 rpm est appliquée toutes les minutes pour arrêter la rotation du cylindre interne (cf. *annexe III*). Les mêmes paliers sont également appliqués lors du redémarrage.

### 3.2.1 Impact du temps de séjour sur la croissance du biofilm

La méthode utilisée pour estimer l'épaisseur du biofilm est celle basée sur la masse humide du biofilm (Horn et Hempel, 1997b; Staudt *et al.*, 2004). Afin d'optimiser la technique, une première étude a consisté à rechercher la durée optimale d'égouttage du coupon pour obtenir une mesure stable de la masse humide. Pour le même type de coupon, des études ont montré qu'une durée d'égouttage de 5 min en position verticale (Staudt *et al.*, 2004; Horn et Morgenroth, 2006; Garny *et al.*, 2008) semble appropriée. Horn et Hempel (1997b) ont utilisé une inclinaison de 45° et une durée d'égouttage de 30 min. Dans nos conditions expérimentales, un décrochement du biofilm peut avoir lieu sur les coupons et la position verticale n'est donc pas souhaitée. L'étude préliminaire a consisté à évaluer la durée d'égouttage entre 1 minute et 5 minutes. Pour cela, des coupons de biofilm ont été prélevés après 7 jours de croissance dans le réacteur à biofilm puis ils ont été mis à égoutter suivant une inclinaison de 45° sur du papier absorbant pendant une minute, avant d'être pesé une 1<sup>ère</sup> fois. Ensuite, ils ont à nouveau été déposés sur du papier absorbant suivant la même inclinaison pendant 4 minutes et repesés. Le Tableau 3-3 résume les résultats obtenus lors de cette étude préliminaire. Les pesées ont été réalisées en triplicatas.

**Tableau 3-3 Evolution de la masse humide de coupon.**

libellées	Unité	Valeur de la pesée		écart (%)
		1	5	
<b>Durée d'égouttage</b>	<b>Min</b>			
<b>Coupon 1</b>	<b>g<sub>MH</sub></b>	4,8206 +/- 0,0001	4,8205 +/- 0,0002	0,002
<b>Coupon 2</b>		4,6435 +/- 0,0002	4,6433 +/- 0,0002	0,002

D'après le Tableau 3-3, il apparaît clairement qu'une durée de la phase d'égouttage de 1 min est suffisante pour déterminer la masse humide du biofilm. Cette durée a été utilisée afin de limiter au maximum les pertes par évaporation sur le biofilm dépendant de la température du laboratoire.

La masse humide du biofilm peut être calculée d'après l'équation (2-9). En considérant que la densité du liquide est égale à  $1 \text{ g.cm}^{-3}$  (densité de l'eau), l'épaisseur du biofilm sur chaque coupon peut être estimée (cf. équation 2-12). La Figure 3-1 présente l'évolution de l'épaisseur du biofilm au cours du temps d'expérimentation pour les trois conditions étudiées.

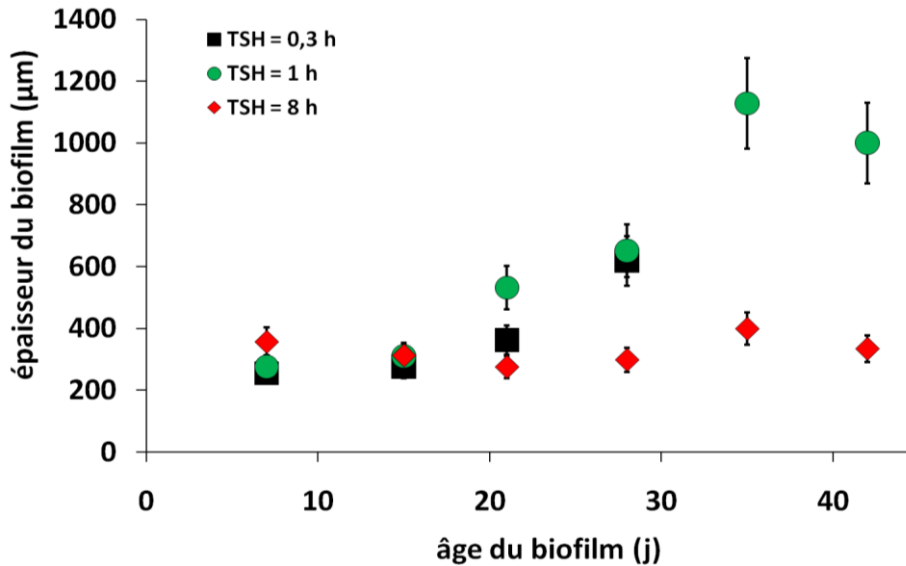


Figure 3-1 Evolution de l'épaisseur de biofilm au cours de la croissance du biofilm.

Après 7 jours de croissance, l'épaisseur du biofilm atteint environ  $300 \mu\text{m}$  pour les trois conditions testées. A  $\text{TSH} = 1 \text{ h}$ , l'épaisseur du biofilm croît durant les 35 premiers jours avant d'atteindre un plateau. Cette même observation est faite pour l'étude du biofilm obtenu avec un temps de séjour de  $0,3 \text{ h}$ . Cependant, le plateau (état d'équilibre) n'a pas été atteint dans ce cas. En effet, lors de cette expérimentation, des problèmes techniques au niveau de l'aération ont eu lieu entre les jours 28 et 35. Une limitation en oxygène dissous a engendré un détachement du biofilm. Les deux derniers échantillonnages de biofilm n'ont pas été représentés. L'allure de l'évolution de l'épaisseur pour les biofilms cultivés à  $\text{TSH} = 0,3 \text{ h}$  et  $\text{TSH} = 1 \text{ h}$  suit la forme d'une courbe sigmoïde (Characklis et Marshall, 1990). Trois phases peuvent être mises en évidence. L'induction a lieu durant les 15 premiers jours (épaisseur stable), puis une phase exponentielle apparaît. La croissance du biofilm a lieu entre les jours 15 et 35. Ensuite, il semble que la courbe forme un plateau au environ de  $1 \text{ mm}$  d'épaisseur. Ce plateau indique un équilibre entre la croissance et le détachement.

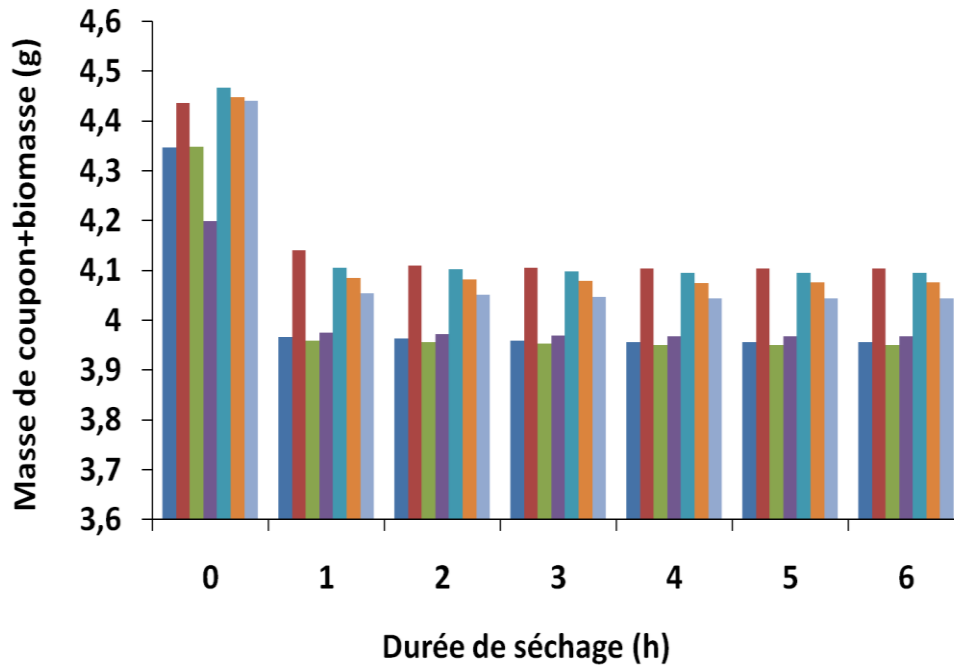
Pour un  $\text{TSH} = 8 \text{ h}$ , l'évolution de l'épaisseur du biofilm est différente. Après 7 jours d'expérience, le biofilm atteint une épaisseur d'environ  $350 \mu\text{m}$  et celle-ci ne va plus évoluer

au cours du temps. L'accumulation du biofilm est directement liée à sa vitesse de détachement et à la vitesse de croissance des microorganismes. Ainsi, un équilibre entre détachement et croissance est atteint rapidement pour un TSH = 8 h. Il semble qu'il existe une limitation du flux de substrat allouée au biofilm et qui diminue son développement. Cette diminution est provoquée par la présence de biomasse planctonique.

D'après ces premières observations, le TSH semble avoir un impact réel sur la taille du biofilm. Elle confirme que pour une charge massique équivalente et dans les mêmes conditions, la quantité de biofilm à l'équilibre est plus importante pour un temps de séjour faible que pour un temps de séjour élevé (Tijhuis *et al.*, 1994; Cresson *et al.*, 2007). L'ordre de grandeur pour l'épaisseur du biofilm est proche des valeurs reportées dans la littérature (Wäsche *et al.*, 2002; Garny *et al.*, 2008). Cependant, la méthode Horn et Hempel (1997b) utilisée pour déterminer l'épaisseur ne permet pas d'estimer l'hétérogénéité du biofilm. La valeur de l'épaisseur présentée est une estimation globale de celle-ci (hypothèse d'un biofilm homogène). Pour les données expérimentales obtenues lorsque le TSH est de 8 h, il y a une évolution constante des valeurs. Cependant, les données restent discutables pour la mesure de l'épaisseur pendant les 15 premiers jours de croissance du biofilm car celle-ci reste constante alors qu'elle devrait augmenter au cours du temps. On peut en conclure que l'épaisseur mesurée pendant cette période ne peut pas correspondre à l'épaisseur réelle du biofilm mais plutôt à l'épaisseur d'un film d'eau présent en surface du coupon.

### **3.2.2 Impact du temps de séjour sur la biomasse du biofilm**

Comme pour la mesure de la masse humide, il a fallu adapter la méthode de mesure de la matière sèche attachée. Staudt *et al.* (2004) définissent pour les coupons du même type, une durée de séchage de 24 h à une température de 60°C. La première démarche a été de valider une durée de séchage correcte pour une température de 105°C. Pour cela, différents coupons ont été prélevés, égouttés et séchés au four à 105°C. La Figure 3-2, représente l'évolution de cette pesée durant la phase de séchage de 6h à 105°C pour un biofilm cultivé avec un temps de séjour hydraulique de 0,3 h.



**Figure 3-2 Evolution de la masse des 6 coupons (1 bande = 1 coupon sur l’histogramme) supportant du biofilm pendant une période de séchage à 105°C.**

Ces résultats démontrent que toute la quantité d’eau présente sur l’échantillon de biofilm est éliminée après une durée de 1h à 105°C. Pour plus de sécurité au niveau des mesures, par exemple pour des biofilms plus épais, il est préférable d’appliquer une durée de séchage plus longue (de 4 à 6 h). Au-delà de cette période, il existe un risque de détérioration du matériau (déformation du coupon) et donc un risque d’erreur au niveau de la détermination des MSA.

Dans la suite de l’étude, les coupons prélevés pour la détermination de la masse humide ont été séchés pendant 6 h à 105°C. La Figure 3-3 résume les valeurs de MSA pour les trois conditions expérimentales et pour différents âges des biofilms.

Pour des temps de séjour de 0,3 h et 1 h, la quantité de biomasse attachée a doublé pendant l’expérience : elle passe d’environ  $4 \text{ g}_{\text{MSA}} \cdot \text{m}^{-2}$  pour le jour 7 à  $8 \text{ g}_{\text{MSA}} \cdot \text{m}^{-2}$  en fin d’expérience. Cette évolution n’est pas observée au niveau du biofilm cultivé avec un temps de séjour de 8 h. La concentration en matière sèche attachée est fixe dès le jour 7, aux alentours de  $6 \text{ g}_{\text{MSA}} \cdot \text{m}^{-2}$ . Cette observation peut nous laisser penser que le prélèvement effectué au jour 42 semble être biaisé. Cette erreur de mesure peut provenir d’une perte de biofilm sur le support durant la phase de prélèvement du coupon sur le cylindre car celle-ci se fait par l’intermédiaire d’un orifice situé en tête du réacteur.



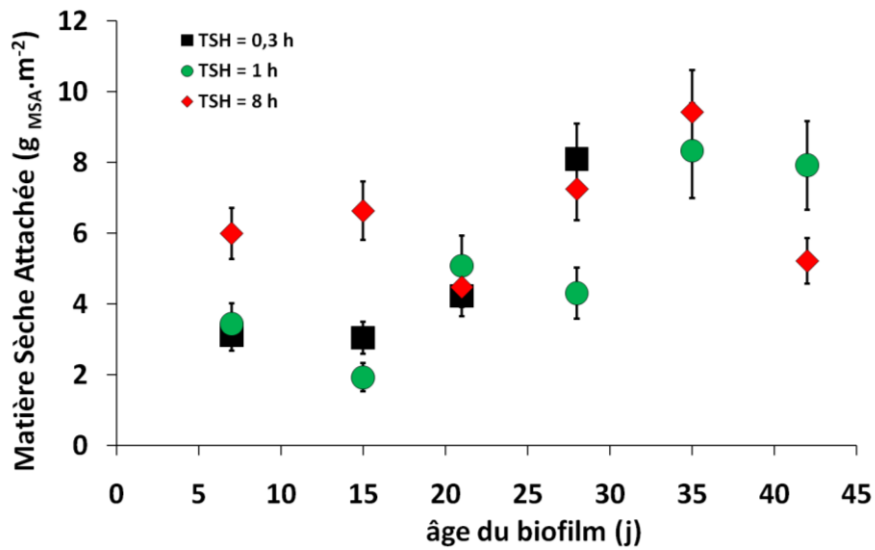


Figure 3-3 Evolution de la matière sèche attachée au cours du temps.

Si l'on considère seulement l'évolution des MSA entre les jours 7 et 35 (cas TSH 8h), il apparaît que la quantité de biomasse sur le support augmente. Elle passe de 6 à 10  $\text{g}_{\text{MSA}}\cdot\text{m}^{-2}$ . Le temps de séjour ne possède pas d'impact significatif sur la production de biomasse au niveau du support hormis durant les 20 premiers jours d'étude. Le TSH possède donc une influence sur la cinétique de formation du biofilm et peu d'influence sur les MSA. Cette évolution de la biomasse attachée peut être rapprochée des données de Wijeyekoon *et al.* (2004) et Garny *et al.* (2008). L'étude de Garny *et al.* (2008) a montré que la concentration en biomasse attachée était liée à la charge surfacique appliquée en entrée du réacteur. Cette étude a été réalisée au sein d'un RAR pour deux conditions hydrodynamiques différentes mais pour un TSH constant. Wijeyekoon *et al.* (2004) ont démontré que la variation de la charge surfacique avait une influence sur le taux de croissance d'un biofilm cultivé dans un réacteur tubulaire pour un TSH fixe.

La Figure 3-4 présente l'évolution de la densité du biofilm (masse volumique du biofilm) en fonction du temps pour les trois conditions expérimentales. Pour un TSH donné, la densité du biofilm est constante au cours du temps. Ceci peut s'expliquer par le fait que les biofilms étudiés dans cette thèse sont des biofilms « jeunes », caractérisés par des mortalités faibles et donc des teneurs en matières minérales peu élevées. Cependant, les valeurs de la densité varient selon le TSH fixé. En effet, la densité obtenue pour un TSH = 8 h est de  $20 \text{ kg}\cdot\text{m}^{-3}$  alors que celle n'est que de  $10 \text{ kg}\cdot\text{m}^{-3}$  pour des TSH de 0,3 h et 1 h. Cet écart peut provenir de la

variation de la charge surfacique par rapport aux autres réacteurs (variation de 20% de la charge surfacique entre les réacteurs A et C). L'ordre de grandeur des densités mesurées est en accord avec la littérature et la gamme de valeurs présentée par Garny *et al.* (2008). Ils obtiennent une densité de  $6 \text{ kg.m}^{-3}$  pour une charge appliquée de  $1,6 \text{ g}_{\text{DCO}} \text{ m}^{-2} \text{ j}^{-1}$  et un TSH de 0,5 h.

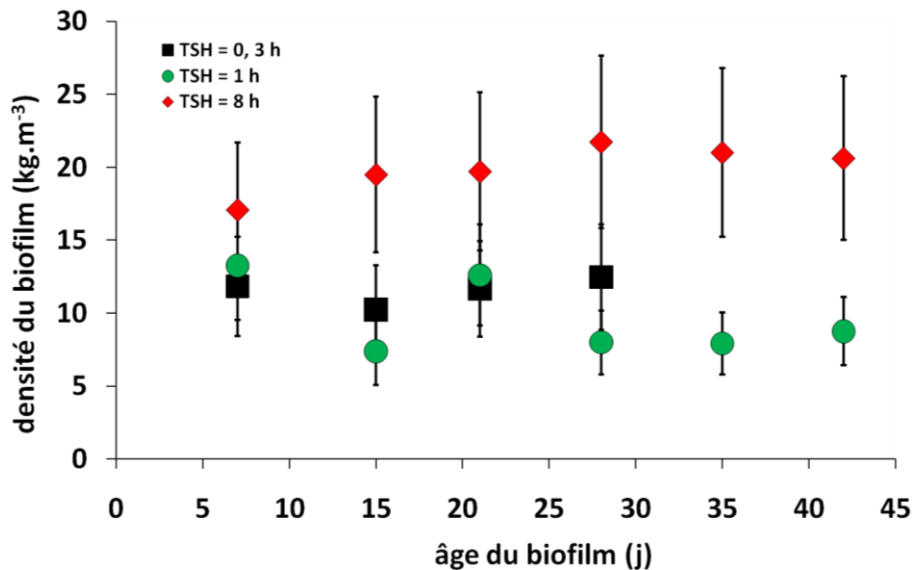


Figure 3-4 Evolution de la densité du biofilm au cours du temps.

Par conséquent, le TSH possède une influence sur la croissance et le développement du biofilm. Ces observations peuvent être rapprochées des études déjà réalisées (van Loosdrecht *et al.*, 1995; Wijeyekoon *et al.*, 2004). Il est difficile à ce stade d'attribuer cet effet au fait que la concentration en substrat en entrée de réacteur soit différente pour chaque TSH appliqué (avec une charge constante) ou à un effet induit par la compétition avec la biomasse planctonique dont la concentration peut varier avec le TSH comme nous allons le montrer dans le paragraphe suivant.

### 3.3 Impact du temps de séjour sur la concentration en biomasse planctonique

Au cours des expériences, le suivi de la phase liquide a été réalisé pour quantifier la biomasse libre. Il est cependant important de rappeler que la biomasse en suspension prend en considération la biomasse qui a été produite dans la phase liquide mais aussi la biomasse qui

s'est détachée du biofilm. Les RAR sont considérés comme parfaitement mélangés et fonctionnent en continu. Ceci permet d'affirmer que la composition de l'effluent de sortie est la même que celle du milieu liquide dans le réacteur. Les prélèvements de liquide ont donc été faits en sortie de chaque réacteur. Chaque échantillon liquide a été centrifugé et filtré avant d'être séché au four à 105°C durant 24h. Les analyses ont été dupliquées. La Figure 3-5 présente l'évolution de la biomasse en suspension dans le milieu liquide aux trois TSH étudiés.

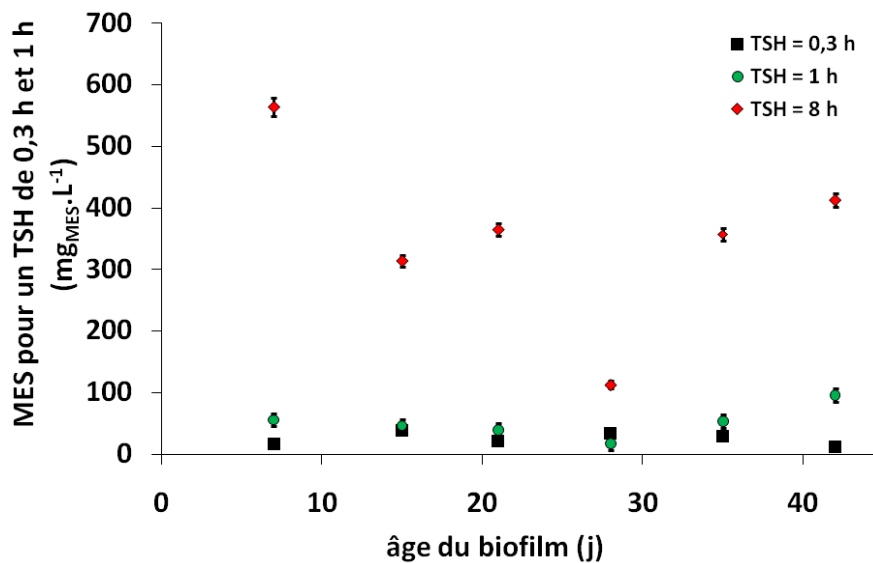


Figure 3-5 Evolution de la matière en suspension au cours du temps.

Durant la période d'expérimentation, pour un TSH donné, la quantité de matière en suspension reste constante au cours du temps. Cependant, il apparaît clairement que le temps de séjour hydraulique a un impact sur la croissance de la biomasse planctonique. Plus la concentration en substrat augmente, plus celle de la biomasse planctonique est élevée. Elle passe de 30 mg<sub>MES</sub>.L<sup>-1</sup> à 700 mg<sub>MES</sub>.L<sup>-1</sup> si le TSH varie entre 0,3 h et 8 h alors que la concentration en glucose en entrée de réacteur varie de 0,068 à 1,43 g<sub>DCO</sub>.L<sup>-1</sup>.

Lorsque le taux de dilution est inférieur au taux de croissance spécifique de la biomasse, celle-ci est lessivée du réacteur. Pour le temps de séjour de 0,3h, nous pouvons émettre l'hypothèse qu'une quantité de biomasse libre aussi faible provient plutôt de la biomasse qui s'est détachée du biofilm que de la biomasse planctonique produite par croissance. Lorsque le

temps de séjour augmente, la quantité de biomasse augmente car elle est liée à la croissance cellulaire dans le liquide.

En considérant à la fois les observations sur la biomasse libre et la biomasse fixe, ce travail expérimental permet de montrer que la quantité de biofilm produite est plus importante lorsque la biomasse en suspension est faible, c'est à dire lorsque le temps de séjour est court. Plus la biomasse est lessivée, plus le biofilm peut se développer. Ces résultats confirment que le biofilm est favorisé lorsque le taux de croissance maximal ( $\mu_{\max}$ ) est plus faible que le taux de dilution ( $\delta$ ) (Tijhuis *et al.*, 1994; van Loosdrecht *et al.*, 1995).

### 3.4 Effet du temps de séjour hydraulique sur le facteur de diffusion en oxygène dans le biofilm

Cette étude vise à rechercher et observer l'influence du temps de séjour hydraulique sur la structure du biofilm au cours de sa croissance. Différents profils de concentrations en oxygène ont été mesurés sur chaque coupon prélevé afin de prendre en considération les variations de mesure liées à hétérogénéité du biofilm. Chaque série de mesure comprend 30 à 40 profils de concentration en oxygène.

La Figure 3-6 présente l'une des séries de mesure des profils de concentration réalignés pour un biofilm cultivé avec un temps de séjour de 0,3 h et prélevé après 14 jours de culture. La position "0" indique la surface du biofilm. Cette position est définie de manière qualitative d'après l'allure des profils et l'épaisseur calculée.

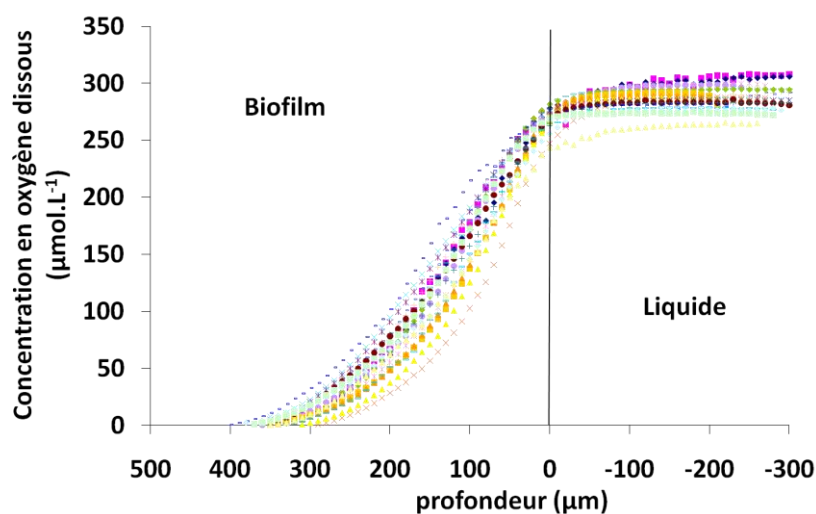
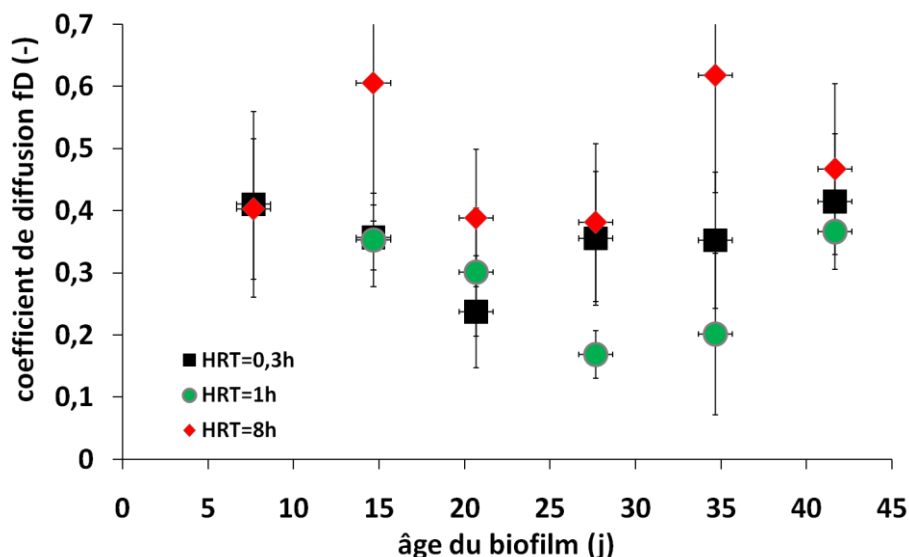


Figure 3-6 Evolution de la concentration en  $O_2$  dissous dans la profondeur du biofilm (résultats brutes).

Il apparaît clairement que, suivant la position de la mesure au niveau du biofilm, l'allure des profils de concentration est similaire. Nous avons pu vérifier que la concentration en oxygène dans le milieu liquide varie peu. La faible variation du signal au niveau du liquide (concentration variant entre 250 et 300  $\mu\text{mol.L}^{-1}$  pour tous les profils) confirme que la microélectrode fonctionne bien car ces valeurs sont proches de la saturation en oxygène dissous pour une température de 20°C. Ces valeurs seront ensuite corrigées par rapport à la température de travail à 45°C (en effet, la concentration de l'oxygène à la saturation dans l'eau est de 283  $\mu\text{mol.L}^{-1}$  à 20°C alors qu'elle n'est que de 185  $\mu\text{mol.L}^{-1}$  à 45°C). Donc les valeurs de cette concentration mesurée vont être ensuite corrigées par rapport à la température en corrigeant le signal (Unisense, Aarhus, Danemark).

Après l'alignement des profils de la série, il a été déterminé graphiquement sur chaque profil la pente représentative du transport interne et externe (Horn et Morgenroth, 2006), afin de calculer le facteur de diffusion associé (cf. *équation 2-16*) et d'en déduire la valeur de porosité (cf. *équation 2-17*). La Figure 3-7 présente le facteur de diffusion représentatif de chaque échantillon de biofilm au cours de la durée d'expérience.



**Figure 3-7 Evolution du facteur de diffusion  $f_D$  en oxygène au cours du temps de croissance du biofilm.**

Quelle que soit la valeur du temps de séjour appliqué, la Figure 3-7 montre que le facteur de diffusion n'évolue pas significativement au cours de la croissance du biofilm. De même, le temps de séjour appliqué n'a pas d'influence sur la diffusion de l'oxygène dans le biofilm. Les valeurs de facteurs de diffusion en oxygène qui ont été obtenues sont proches de celles rapportées dans la littérature. Pour une densité de biofilm de  $25 \text{ kg.m}^{-3}$ , le facteur de diffusion de l'oxygène est de l'ordre de 0,4 (Stewart, 1993; Beyenal et Tanyolac, 1994; Zhang *et al.*, 1994). A l'échelle expérimentale, nous obtenons un facteur de diffusion de 0,4 pour une densité moyenne du biofilm de  $19 \text{ kg.m}^{-3}$ . Le facteur de diffusion étant corrélé avec la porosité, on peut en déduire une valeur de la porosité de 0,8.

Cependant, d'après la littérature, la valeur du facteur de diffusion diminue lorsque la densité du biofilm augmente (Stewart, 1993; Hinson et Kocher, 1996; Horn et Morgenroth, 2006). Dans notre étude, pour le biofilm cultivé avec un temps de séjour de 8 h, la densité du biofilm est élevée mais la valeur du facteur de diffusion reste inchangée par rapport aux deux autres conditions opératoires testées. Une hétérogénéité de la structure du biofilm (valeur de l'épaisseur différente à la surface...) peut être à l'origine de cette différence (Stewart, 1993).

### 3.5 Impact du temps de séjour sur les performances du réacteur

Dans ce paragraphe, nous nous intéressons aux performances globales des réacteurs. Pour cela, nous avons comparé les résultats obtenus pour les trois RAR en explicitant les bilans matières et le facteur G caractéristique du régime de croissance.

La Figure 3-8 montre l'évolution de la concentration en substrat résiduel dans chaque réacteur et la Figure 3-9 présente le rendement  $\eta$ .

Durant nos expériences, la majorité du substrat est consommée durant la croissance du biofilm, quel que soit le temps de séjour appliqué. Dans les trois réacteurs, la concentration en substrat résiduel reste constante dans le temps avec des valeurs de l'ordre de  $10 \text{ mg}_{\text{DCO}}.\text{L}^{-1}$ . Les réacteurs se comportent donc, pour la phase liquide, comme des chémostats. La biomasse planctonique est soutirée du réacteur en fonction du taux de dilution  $\delta$  imposé. La charge en glucose est la même et reste fixe pour les trois conditions. Le calcul des rendements de consommation du substrat (cf. *Figure 3-9*) montre qu'ils sont toujours supérieurs à 80%. Plus

le temps de séjour est grand, meilleur est le rendement. Par conséquent, même si la quantité de biomasse attachée est identique entre tous les réacteurs, l'augmentation de la concentration en biomasse planctonique favorise la dégradation du substrat.

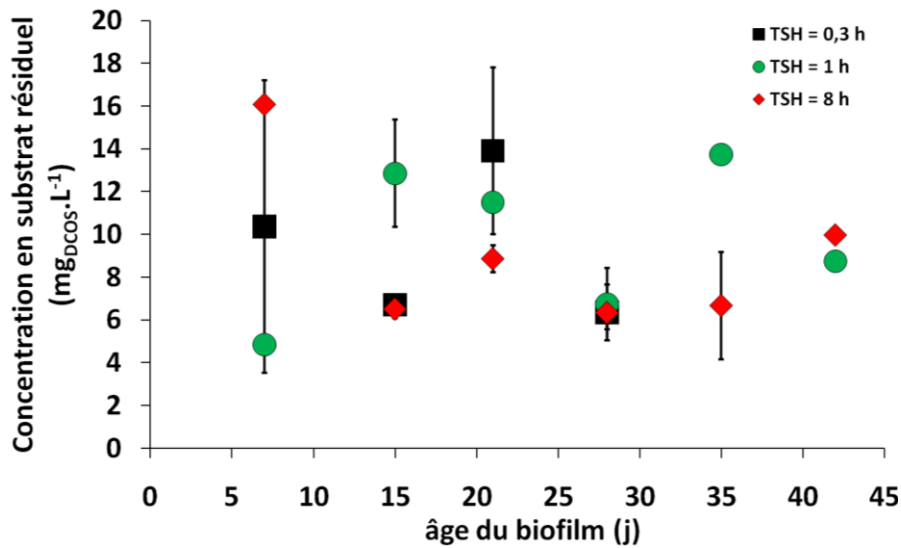


Figure 3-8 Evolution de la concentration en substrat résiduel dans la phase liquide.

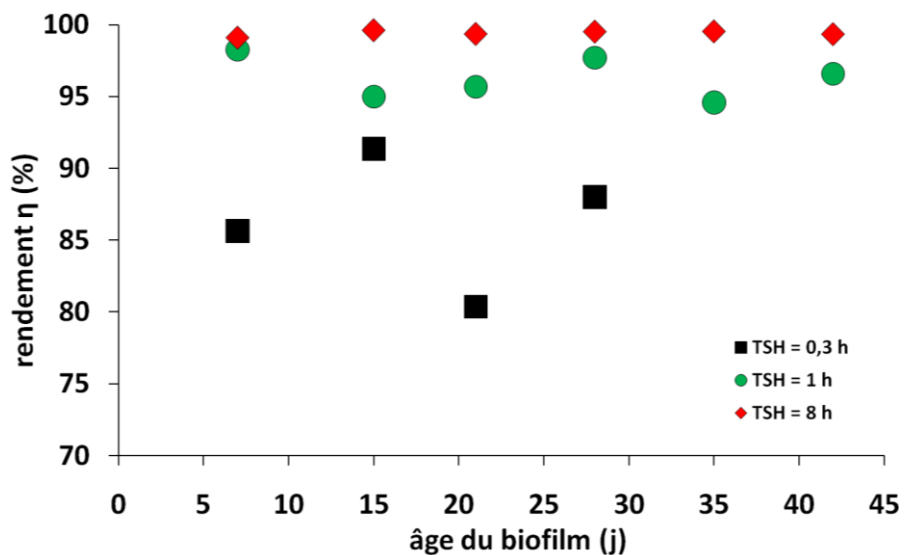


Figure 3-9 Evolution du rendement de consommation du substrat.

Le Tableau 3-4 présente une estimation de la répartition du flux de substrat dans les réacteurs au 7<sup>ème</sup> jour de croissance du biofilm. Ces calculs sont réalisés à partir des bilans globaux sur les réacteurs à un jour précis. Ils visent à déterminer le flux de substrat qui est alloué au biofilm. Ce flux est estimé par différence entre le flux qui alimente le réacteur, celui qui va vers la biomasse planctonique et le flux de substrat qui sort du réacteur. On considère dans ce calcul que la toute biomasse planctonique croît et a un rendement de croissance de 0,42.

**Tableau 3-4 estimation du flux de substrat au 7<sup>ème</sup> jour.**

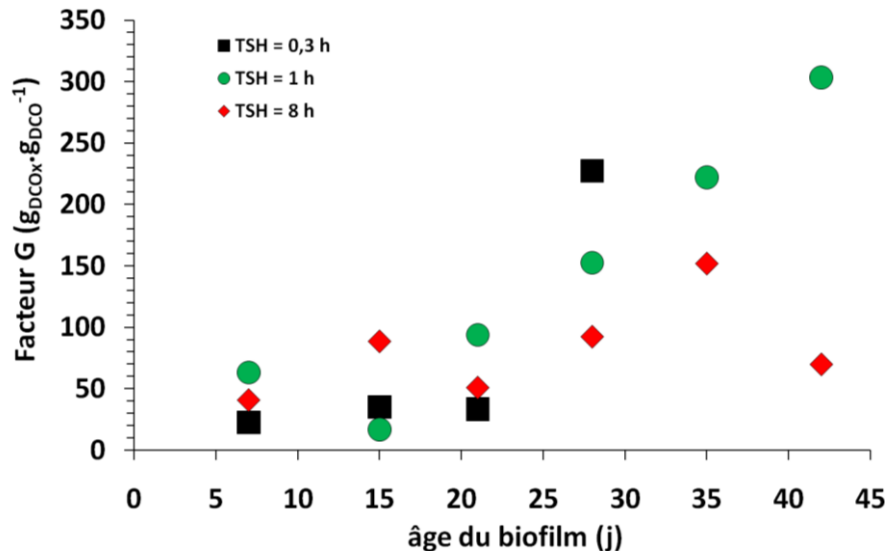
Libellés	Unité	Réacteurs		
		A	B	C
<b>Flux surfacique</b>				
<b>-entrée</b>	<b>gDCO.m<sup>-2</sup>.j<sup>-1</sup></b>	27,8 +/- 1,6	26,7 +/- 1,4	28,0 +/- 1,6
<b>-sortie</b>		4,0 +/- 2,7	0,5 +/- 0,1	0,3 +/- 0,1
<b>-dans la phase liquide</b>		19,5 +/- 1,1	16,3 +/- 0,4	26,8 +/- 0,8
<b>-vers le biofilm</b>		4,2 +/- 5,4	9,9 +/- 1,8	0,9 +/- 2,4

D'après ces valeurs, on peut observer que le flux de substrat appliqué se répartit de façon hétérogène dans le réacteur à biofilm suivant le temps de séjour hydraulique étudié. Si on ne considère pas l'étude réalisée à TSH = 0,3 h, car la quantité de biomasse planctonique peut-être biaisée par la biomasse qui s'est détachée, on peut voir que lorsque le temps de séjour augmente (passage de 1h à 8 h), le flux de substrat vers le biofilm diminue, contrairement au flux de substrat de la phase liquide. La présence de biomasse planctonique semble limiter le flux de substrat vers le biofilm. On peut aussi voir que, quelque soit le temps de séjour, le substrat est consommé majoritairement dans le liquide par la biomasse planctonique et non par le biofilm. Ce résultat va dans le sens des observations de Chang *et al.*, (2005).

Un autre indicateur de l'évolution du régime de croissance est le facteur G. Il a été estimé durant la période de croissance du biofilm afin d'observer l'influence du temps de séjour sur le transfert et la structure du biofilm (Picioreanu *et al.*, 1998; Derlon, 2008). Le taux de croissance maximal utilisé pour déterminer cette valeur est de 22 j<sup>-1</sup> (valeur obtenue dans le travail de modélisation).



La Figure 3-10 présente l'évolution de ce coefficient G.



**Figure 3-10 Evolution du facteur G au cours de temps de croissance du biofilm.**

Si on observe le facteur G au cours du temps, il apparaît que celui-ci semble augmenter avec l'épaisseur du biofilm pour les temps de séjour de 0,3 h et 1 h. On remarque aussi cette augmentation pour le temps de séjour de 8 h. Ce facteur G est calculé d'après l'équation 2-6 décrite par Picioreanu *et al.* (1998) et prend en considération l'effet de la croissance du biofilm par rapport au transport du substrat dans le biofilm. On considère que le taux de croissance maximal ( $22 \text{ j}^{-1}$ ) et le coefficient de diffusion du glucose à  $45^\circ\text{C}$  ( $9,287 \cdot 10^{-5} \text{ m}^2 \cdot \text{j}^{-1}$ ) sont les mêmes pour les trois expériences. De plus, la concentration en substrat dans les réacteurs paraît similaire (cf. *Figure 3-8*). La concentration maximale en biomasse dans le biofilm est associée à la densité du biofilm, donc la valeur prise a été la valeur moyenne de la densité soit  $19\,000 \text{ kg} \cdot \text{m}^{-3}$ . Comme ces paramètres restent similaires pour les trois conditions étudiées, alors l'évolution de la valeur du facteur G est influencée par l'évolution de l'épaisseur du biofilm au carré. Cette observation est confirmée par l'allure des courbes des Figures 3-1 et 3-10.

D'après la Figure 3-10, le facteur G a des valeurs inférieures à 100 pendant les 15 premiers jours. Mais après 21 jours de croissance, le G commence à augmenter. Nous pouvons en déduire que le transport du substrat dans le biofilm est limitant, au fur et à mesure de l'augmentation de l'épaisseur. En effet, le substrat va pénétrer dans le biofilm en surface, mais

sa concentration va diminuer lorsque l'on avance dans la profondeur du biofilm (Picioreanu *et al.*, 1998). Le transport du substrat dans le biofilm est dominé par la diffusion (Stoodley *et al.*, 1994; de Beer *et al.*, 1997a). Cette diffusion est un déplacement de molécule et donc le flux diffusionnel va être proportionnel au gradient de concentration (Loi de Fick). Lorsque l'on augmente le TSH, la vitesse de transport des molécules de substrat diminue car le flux de substrat entre la phase liquide et le biofilm diminue aussi. Cette remarque peut expliquer les valeurs plus faibles du facteur G obtenues pour un TSH de 8 h car l'épaisseur du biofilm dépend de la vitesse de croissance du biofilm. Si on diminue le flux de substrat, on limite la croissance du biofilm (d'où des valeurs d'épaisseur faibles). Pour les TSH courts, la limitation du transfert est liée à l'épaisseur du biofilm.

Dans la phase liquide, comme celle-ci est parfaitement mélangée, le transport se fait par convection, processus de transport bien plus rapide que la diffusion.

### 3.6 Synthèse

Ce chapitre avait pour objectif de caractériser la compétition entre la biomasse attachée en biofilm et la biomasse planctonique. Des conditions opératoires ont été imposées, en modifiant la valeur du TSH pour une charge appliquée en substrat constante.

- Concernant la distribution de la biomasse entre le compartiment liquide et le biofilm, il est apparu que la croissance du biofilm est favorisée par rapport à la biomasse planctonique lorsque le temps de séjour est court et donc que le taux de dilution est grand. Ces résultats sont comparables aux observations faites par Cresson *et al.* (2007).
- Le facteur de diffusion est constant pour les 3 conditions opératoires testées ( $f_D = 0,4$ ). cela signifie que la modification du temps de séjour ne semble pas avoir d'impact sur la structure (porosité) de la matrice du biofilm.
- Concernant le régime de croissance explicité par le facteur G, il a été démontré que la limitation du transport est due à l'épaisseur croissante du biofilm. Il apparaît que la

croissance du biofilm est limitée par le transport du substrat lorsque l'épaisseur du biofilm devient importante. Cela démontre que le développement du biofilm est dans un premier temps limité par le flux de substrat (vitesse du liquide) mais aussi par l'épaisseur du biofilm (gradient de concentration).

Dans le chapitre 4, nous allons explorer plus en profondeur l'impact du temps de séjour sur les communautés microbiennes, afin de mieux représenter la compétition entre les espèces présentes dans le système. Nous verrons également l'impact de la compétition sur les espèces présentes dans la biomasse planctonique et dans le biofilm.

**Chapitre 4 Etude de la dynamique de la diversité des communautés microbiennes dans un biofilm et dans la biomasse planctonique suivant la modification du temps de séjour hydraulique**



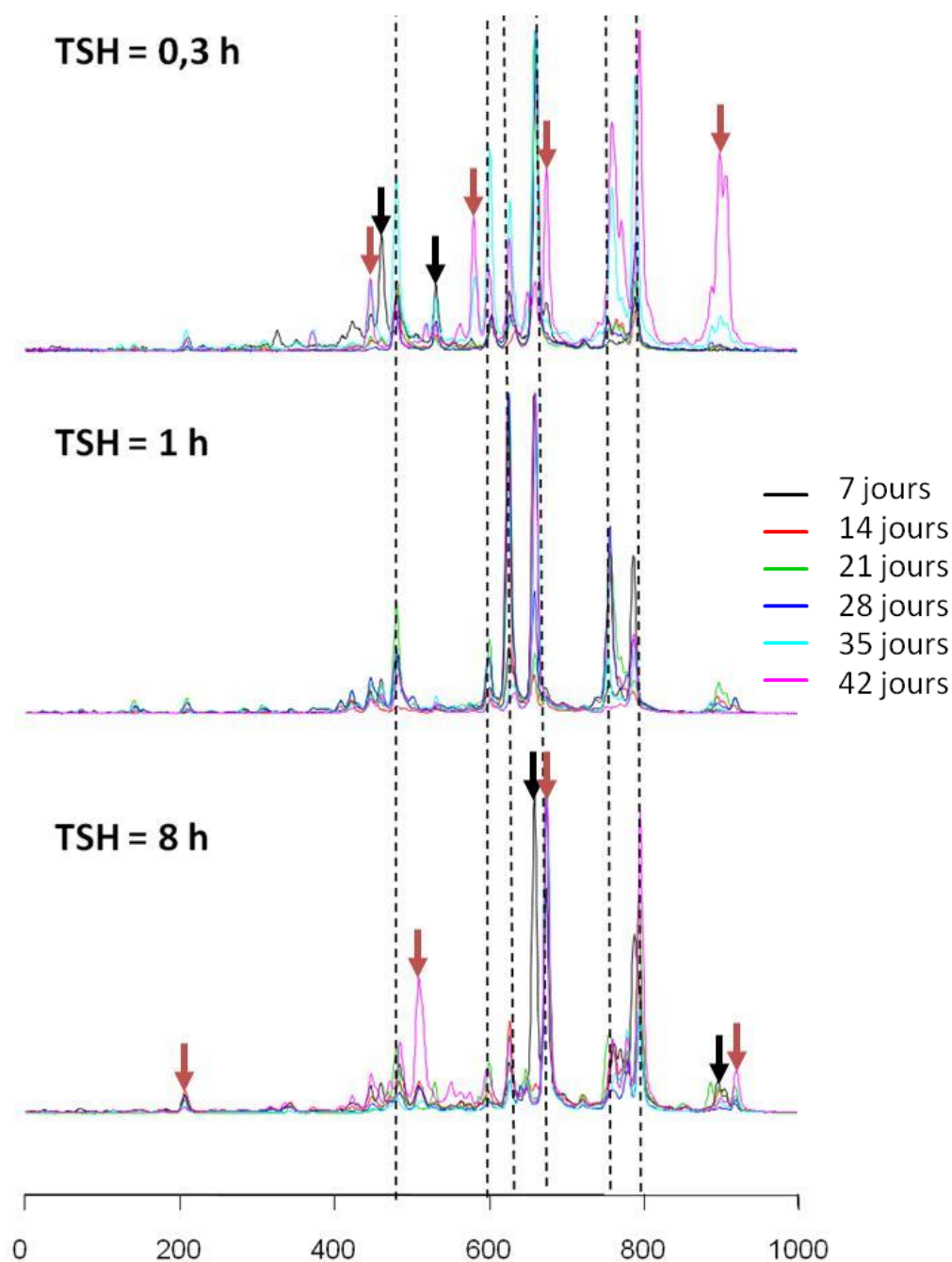
Ce chapitre a pour objectif d'observer et de caractériser la diversité microbienne et la structure des communautés microbiennes du biofilm et de la biomasse planctonique. Cela va permettre aussi d'établir l'influence du TSH sur la distribution des espèces présentes. La dynamique de cette diversité est aussi abordée. Pour chaque réacteur fonctionnant en continu suivant les conditions décrites dans le chapitre 3, des échantillons de biofilm et de liquide ont été prélevés hebdomadairement en conditions stériles lors de phases d'arrêt du réacteur. La microbiologie de ces échantillons est appréhendée par une technique d'empreinte moléculaire (PCR-SSCP) (cf. *chapitre 2*). Les électrophorégrammes obtenus sont constitués d'une succession de pics ayant des tailles proportionnelles à l'abondance des populations bactériennes de l'échantillon. Ces profils sont normalisés et alignés entre eux par le logiciel StatFingerprints (Michelland *et al.*, 2009) afin de pouvoir les comparer.

Dans un premier temps, nous cherchons à évaluer les différences qui peuvent exister entre les différents profils CE-SSCP obtenus pour les échantillons de biofilm et de liquide. Puis la diversité microbienne est estimée par le calcul d'un indice de diversité. Cet indice a été calculé pour les différents échantillons au cours du temps. Enfin, une comparaison des structures des communautés est réalisée. Pour cela, les distances génétiques vont être définies et traitées par des analyses statistiques pour faire des comparaisons entre les profils CE-SSCP.

#### **4.1 Comparaison des profils CE-SSCP du biofilm et du liquide**

Il s'agit ici de comparer nos différents profils CE-SSCP caractéristiques du biofilm et du liquide. Pour cela, nous avons recherché les pics qui sont communs aux trois valeurs de TSH étudiés dans la phase liquide et dans le biofilm.

La Figure 4-1 présente la superposition des profils bactériens alignés que nous avons obtenus pour les échantillons de la phase liquide. Ils sont séparés suivant les trois TSH. Chaque profil de couleur correspond à un échantillon réalisé à un temps de prélèvement donné (7 (noir), 14 (rouge), 21 (vert), 28 (bleu), 35 (bleu clair) ou 42 (rose) jours). Les échantillons du liquide correspondent à ceux qui ont été réalisés avant la procédure d'arrêt du réacteur.



**Figure 4-1** Profils CE-SSCP de la région V3 de l'ADNr 16S bactériens réalisés sur 42 jours à partir de la phase liquide pour les trois TSH étudiés (les flèches roses indiquent les nouveaux pics présents à 42 jours et les flèches noires les pics qui sont présents initialement mais qui disparaissent avec le temps, les lignes verticales, les pics communs pour l'ensemble des profils).

L'observation comparative de ces profils met en évidence six zones communes où des pics se superposent pour l'ensemble des échantillons liquides. Si on fait une analyse suivant la valeur du TSH, il apparaît des différences pour le TSH de 0,3 h. En effet, le profil obtenu au jour 42

présente de nouveaux pics (flèches roses) qui n'apparaissent pas sur les profils obtenus à 14, 21, 28 jours qui sont assez stables dans l'ensemble. Cependant, l'abondance des espèces (hauteur des pics), montre que le profil obtenu à 42 jours pour le TSH = 0,3 h est différent et révèle des espèces qui étaient sous-dominantes. Cette différence peut provenir d'une perturbation par rapport à l'aération du réacteur entre les jours 28 et 35 qui avait provoqué un détachement massif du biofilm. Nous pouvons donc penser que la biomasse du biofilm continue de se détacher et passe dans la phase liquide.

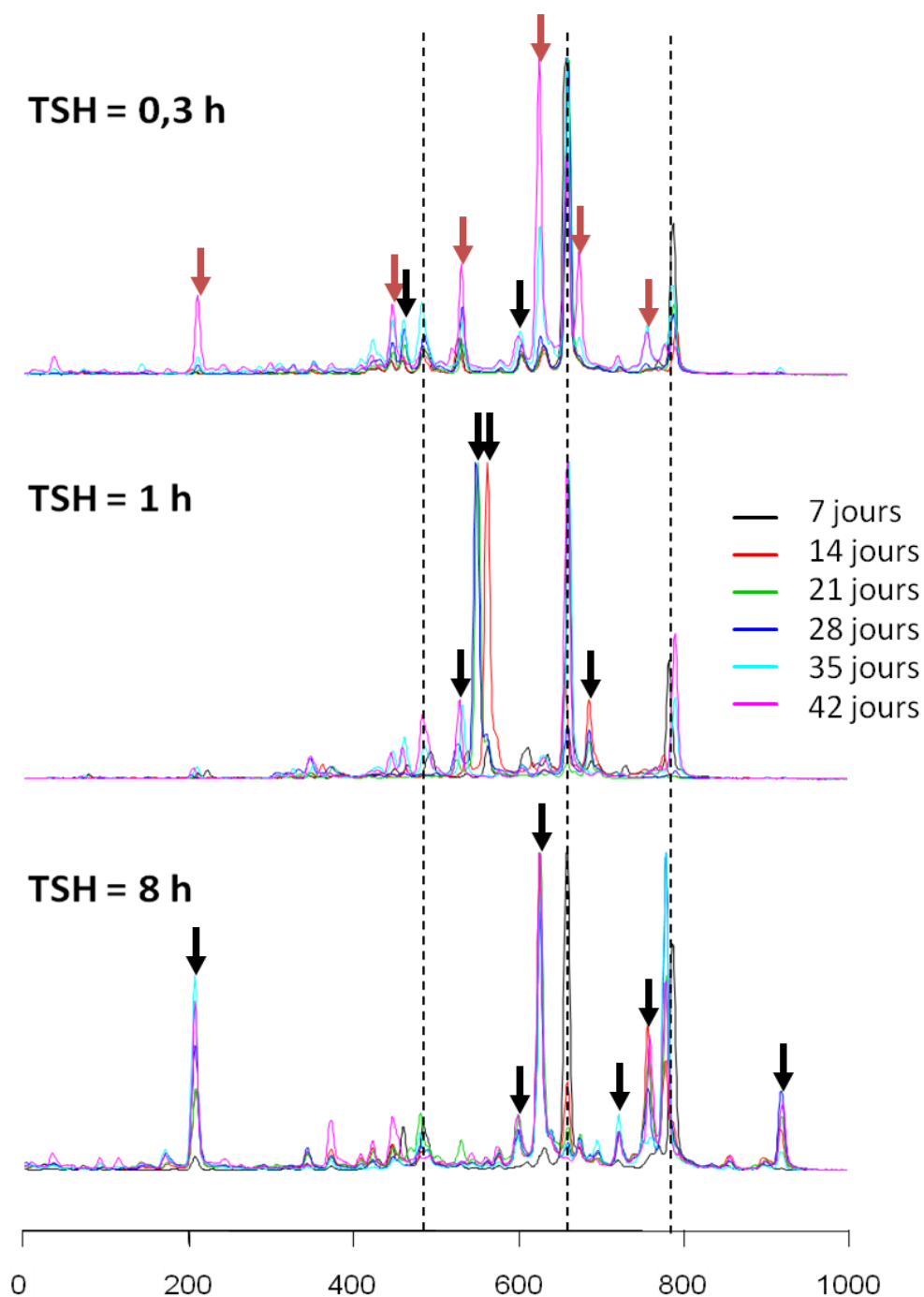
Pour le TSH de 1 h, nous n'observons pas de différence entre les profils qui se superposent au cours du temps.

Au TSH de 8 h, on observe également l'émergence de nouveaux pics, surtout au 42<sup>ème</sup> jour. Cependant, durant la dynamique de croissance, si de nouveaux pics sont apparus, d'autres ont disparu (ces variations de pics sont indiquées par les flèches noires sur la Figure 4-1) et leur abondance varie aussi au cours du temps. Il existe donc une évolution des communautés au cours du temps. Globalement, il semble que la modification du TSH ait peu d'influence sur les communautés de la phase liquide car les profils sont stables au cours du temps.

La Figure 4-2 montre les profils bactériens CE-SSCP obtenus pour les échantillons de biofilms. Ils sont présentés en fonction des trois valeurs du TSH.

D'après analyse des profils CE-SSCP, nous observons trois pics communs entre toutes les communautés du biofilm. Si on fait une analyse plus fine de chaque groupement de profil au niveau des TSH, on observe que pour un TSH de 0,3 h, il apparaît deux pics qui disparaissent avec le temps (cf. *Figure 4-2, flèches noires*). Pour les profils observés à 35 et 42 jours, de nouveaux pics apparaissent (cf. *Figure 4-2, flèches roses*), comme dans la phase liquide au même TSH. Cette présence peut, comme nous l'avons indiqué précédemment, provenir d'une perturbation ayant provoqué un détachement accidentel au sein du système expérimental. Il est donc logique de retrouver les mêmes populations dans le biofilm et dans la phase liquide.





**Figure 4-2** Profils CE-SSCP de la région V3 de l'ADNr 16S bactériens réalisés pendant 42 jours, à partir du biofilm pour les trois TSH étudiés (les flèches roses indiquent les nouveaux pics présents au bout de 42 jours et les flèches noires indiquent les pics qui sont présents initialement mais qui disparaissent durant la période de croissance. Les lignes verticales indiquent les pics communs pour l'ensemble des profils.).

Si l'on augmente la valeur du TSH à 1 h, 4 nouveaux pics apparaissent dans le biofilm pendant la dynamique de croissance. Cependant à 42 jours, sur 4 pics, 3 ont disparu. Pour le

TSH de 8 h, il y a 3 pics qui dominent mais durant la croissance, de nouveaux pics apparaissent (6 pics).

Ainsi, l'augmentation du TSH induit une augmentation du nombre de pics CE-SSCP. Le programme StatFingerprints recense 13 pics pour le TSH le plus court, et 17 pics pour le TSH le plus élevé (p-value = 0,001) pour les profils microbiens du biofilm.

Si nous comparons les profils microbiens du biofilm avec les profils microbiens du liquide, il semble que des différences existent. Le nombre de pics communs passe de 3 pour le biofilm à 6 pour le liquide. Mais cela reste une observation visuelle des profils. Cela ne permet pas d'affirmer si les espèces qui apparaissent dans le liquide ne sont pas présentes aussi dans le biofilm. En effet, durant la croissance du biofilm, des pics apparaissent et disparaissent.

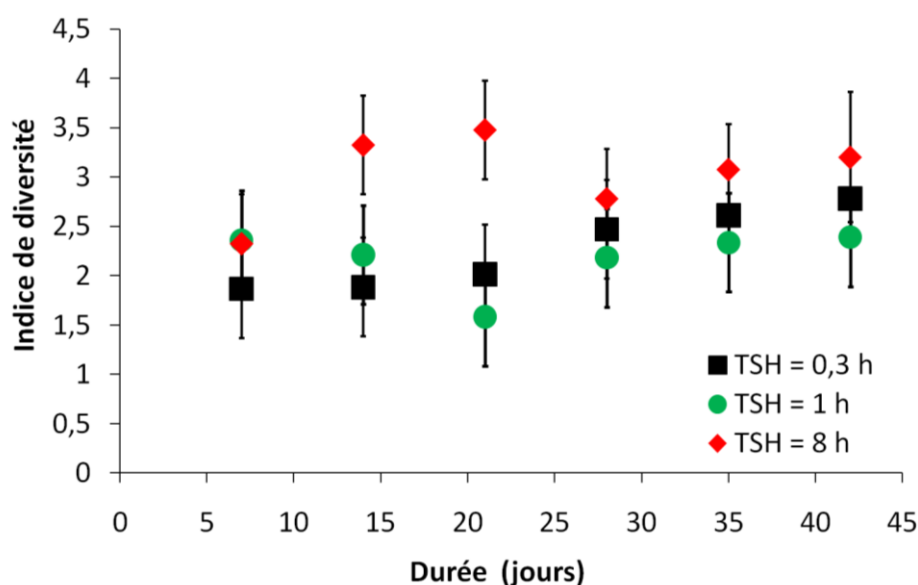
Pour compléter et expliquer ces observations, deux analyses complémentaires des signaux issus des empreintes moléculaires ont été réalisées: l'estimation d'un indice de diversité sur chaque profil CE-SSCP et une comparaison de la structure des communautés ont été réalisées. Dans la partie suivante, nous présentons les résultats obtenus à partir d'une étude statistique basée sur l'indice de diversité.

## 4.2 Estimation de la diversité

Nous avons calculé un indice de diversité (le logarithme négatif de Simpson) en utilisant le logiciel StatFingerprints à partir des différents profils présentés dans le paragraphe précédent. Cet indice de diversité, noté ID, est un indicateur qui englobe deux notions : la richesse et l'abondance relative de chaque espèce. Son calcul prend notamment en considération le bruit de fond pour chaque profil (Haegeman *et al.*, soumis). Dans un profil CE-SSCP brut, les pics représentent les espèces dominantes de l'échantillon tandis que le bruit de fond (aire sous la courbe sans l'aire sous les pics) représente les espèces minoritaires (Fromin *et al.*, 2002; Nakatsu *et al.*, 2000). Ce bruit de fond est associé à la co-migration des espèces minoritaires sur les pics des espèces dominantes. L'importance de ces phénomènes de co-migration peut être donc analysée sur un profil CE-SSCP par l'analyse du bruit de fond de chaque profil (Loisel *et al.*, 2006). Si un profil CE-SSCP ne possède qu'un seul pic, le logarithme négatif de Simpson est nul car toute l'information génétique est concentrée dans un pic (une seule espèce moléculaire). A l'inverse, plus il y a de pics (qui se chevauchent nécessairement), plus le logarithme négatif de Simpson est grand. En suivant l'évolution de l'ID au cours du temps,

il est possible de décrire la dynamique de la diversité microbienne. Dans la suite du chapitre nous conserverons le terme d'Indice de diversité.

Les Figures 4-3 et 4-4 représentent la dynamique de l'indice de diversité (le logarithme négatif de Simpson) dans le biofilm et dans la phase liquide pour les trois TSH.



**Figure 4-3 Evolution de l'indice de la diversité (calculé d'après le logarithme négatif de Simpson) pour les populations microbiennes du biofilm pour les trois valeurs de TSH.**

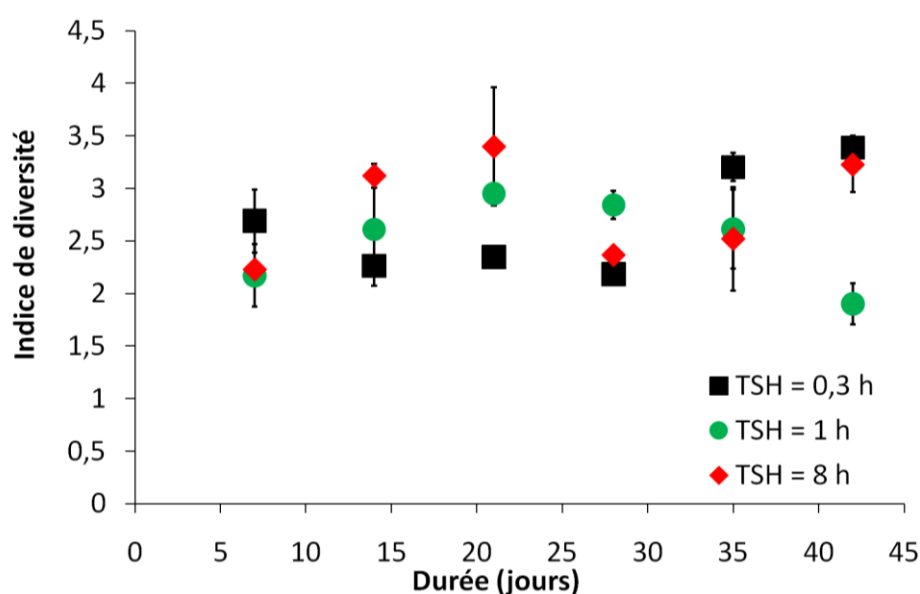
Le logarithme négatif de Simpson des bactéries du biofilm présente une valeur moyenne de 2,99 +/- 0,44 pour un TSH de 8 h et de 2,27 +/- 0,39 et 2,07 +/- 0,29 pour des TSH de 0,3 h et 1 h respectivement. Il n'y a pas d'évolution significative de cet indice durant la croissance du biofilm, au moins à partir du jour 7. Un test statistique de proximité réalisé entre les ID de chaque profil au cours du temps nous indique que :

- pour l'étude à TSH de 0,3h, les valeurs de l'ID sont identiques entre elles à 92% (p-value = 0,57),
- pour l'étude à TSH de 1 h, les valeurs de l'ID sont identiques entre elles à 79% (p-value = 0,05)
- pour l'étude à TSH de 8 h, les valeurs de l'ID sont identiques entre elles à 94% (p-value = 0,16).

La p-value nous informe sur le degré de significativité de nos résultats obtenus par les tests statistiques. Plus sa valeur est faible, plus le résultat du test est significatif.

Si on réalise un test statistique sur les résultats en fonction de la valeur du TSH pour les ID du biofilm, on montre que le TSH n'a pas d'effet car le test statistique affirme que les valeurs de l'ID pour l'ensemble des biofilm sont proches à 97% (p-value = 0,379).

Cette première analyse des données moléculaires nous montre que la diversité des communautés microbiennes des biofilms est stable au cours du temps. La dynamique de la croissance n'influence donc pas la diversité. De plus, la diversité est la même dans le biofilm pour les différentes valeurs de TSH.



**Figure 4-4 Evolution de l'indice de la diversité (calculé d'après le logarithme négatif de Simpson) pour les populations microbiennes de la phase liquide pour les trois valeurs de TSH.**

La Figure 4-4 montre que l'évolution de l'ID dans le liquide n'est pas différente au cours du temps. Sa valeur moyenne est de 2,89 +/- 0,54 pour un TSH de 8h, de 2,44 +/- 0,43 pour un TSH de 1 h, et de 2,56 +/- 0,49 pour le TSH de 0,3 h. Les valeurs pour les TSH courts ne sont pas significativement différentes. Le test statistique réalisé sur la dynamique de l'ID pour le liquide aux différents TSH nous donne:

- pour le TSH de 0,3h, les valeurs de l'ID sont proches à 86% (p-value = 0,05),
- pour l'étude à TSH de 1 h, les valeurs de l'ID sont proches à 86% (p-value = 0,05),
- pour l'étude à TSH de 8 h, elles sont proches à 86% (p-value = 0,05).

On note cependant qu'il n'y a pas de variation de l'ID dans le liquide. Le facteur temps et le TSH n'ont pas d'influence sur la diversité microbienne.

Nous avons ensuite comparé les ID du liquide et du biofilm en les regroupant suivant leurs valeurs de TSH. Il apparaît au niveau des résultats statistiques que :

- pour le TSH de 0,3h, l'ID est similaire 86% (p-value = 0,03),
- pour l'étude à TSH de 1 h, l'ID est similaire à 96% (p-value = 0,60),
- pour l'étude à TSH de 8 h, il est de 92% (p-value=0,02).

Ainsi on peut conclure que la dynamique temporelle et la variation du TSH n'a pas d'influence sur la diversité microbienne du liquide et du biofilm. Néanmoins, cette approche ne nous permet pas de savoir comment évolue la structure des communautés microbiennes. En effet, des communautés avec des indices de diversités proche peuvent présenter des structures différentes (structures de la communauté différentes = profils CE-SSCP différents).

### 4.3 Analyse de la structure des communautés microbiennes

La composition d'une communauté se définit comme la connaissance du nombre d'espèces, du nombre d'individus par espèces et de l'identification de ces espèces. Mais un profil CE-SSCP permet seulement d'acquérir une connaissance de la structure globale de la communauté. Les changements liés à la hauteur relative des pics ou à l'apparition et la disparition de pics dans une zone du profil CE-SSCP étudié peuvent être identifiés par comparaison des profils microbiens. Pour estimer les différences entre les profils, un indice de proximité est calculé afin de pouvoir obtenir une matrice de proximité. Cet indice de proximité correspond à la distance Euclidienne (Ghiglione *et al.*, 2005; Sen *et al.*, 2008). Cette distance consiste à prendre la racine carrée de la somme des différences d'aire (des pics) au carré entre les deux profils CE-SSCP (Legendre et Legendre, 1998).

$$DE = \sqrt{\sum_{i=1}^n |x_k - y_k|^2} \quad 4-1$$

Avec x et y correspondant à l'aire des pics d'un profil.

La matrice de proximité<sup>12</sup> va être représentée dans un graphique à l'aide d'une Analyse en Composantes Principales (ACP) afin d'observer les similitudes qui existent entre nos différents profils. Plus les points sont proches, plus les populations des deux profils sont génétiquement proches. Ces indices sont ensuite ordonnés en fonction de l'effet de plusieurs facteurs environnementaux qui viendraient influencer la proximité entre deux ou plusieurs profils. Dans notre étude, les facteurs que nous avons choisis pour classer nos indices sont les valeurs du TSH (0,3h, 1h, et 8h) et l'origine de l'échantillon (biofilm ou liquide). Ces facteurs sont pris directement en compte dans l'ACP.

Ensuite, afin de conforter les résultats obtenus par l'ACP, des tests statistiques ont été effectués entre plusieurs groupements de données. Les hypothèses utilisées pour ses tests sont basées sur l'impact des facteurs environnementaux. Les tests utilisés sont l'ANOSIM et le t-tests. L'ANOSIM permet de faire une analyse des similitudes entre les profils des deux groupements étudiés et donne un coefficient ANOSIM-R qui indique le degré de différence qui existe. Si ANOSIM-R est petit, les profils sont similaires et inversement. Le t-test peut être assimilé à une ANOVA. Il nous donne un pourcentage de différence qui existe entre les deux groupements. Ce test permet d'exprimer la proximité entre les profils.

Donc pour évaluer l'influence du TSH sur la répartition des espèces au sein de la communauté, une matrice de proximité a été calculée sur l'ensemble des données CE-SSCP. Puis, on a observé l'impact de différents facteurs précédemment cités (TSH).

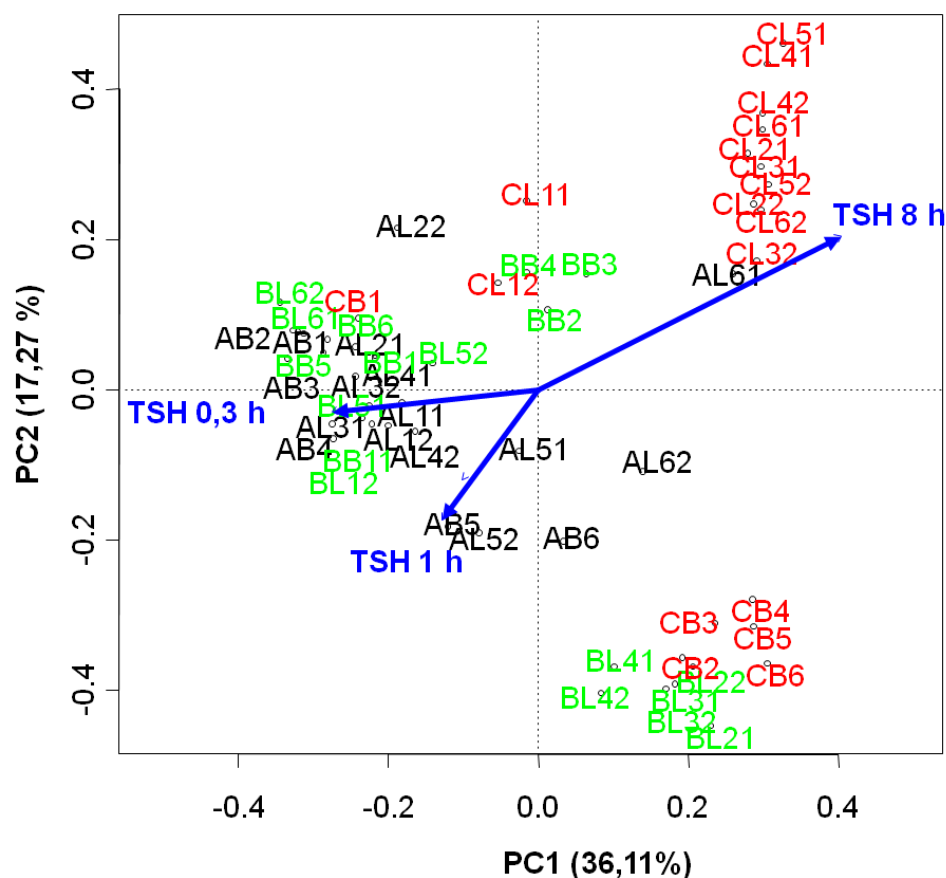
A l'aide d'une ACP présentée par la Figure 4-5, on a pu mettre en évidence des correspondances entre les profils et les facteurs. Les flèches représentent les corrélations entre un facteur et des profils CE-SSCP. La longueur de ces vecteurs représente la force du gradient<sup>13</sup> qui est proportionnelle au lien existant entre les données de l'ACP et la variable environnementale. Les points représentatifs des échantillons de la phase liquide sont définis par la lettre « L » et ceux du biofilm, par la lettre « B ». Les nombres indiquent la période de prélèvement. On note de 1 à 6 pour indiquer le jour de prélèvement (1 : jour 7, 2 : jour 14...6 : jour 42).

---

<sup>12</sup> Ensemble des points, un point = un profil CE-SSCP

<sup>13</sup> Gradient : grandeur vectorielle qui indique de quelle façon une grandeur physique varie dans l'espace

Pour cette ACP, 53,39% des différences génétiques entre les échantillons sont exprimées dans les deux axes principaux. Les corrélations entre les facteurs environnementaux (TSH) sont très hautement significatifs ( $p < 0,001$ ).

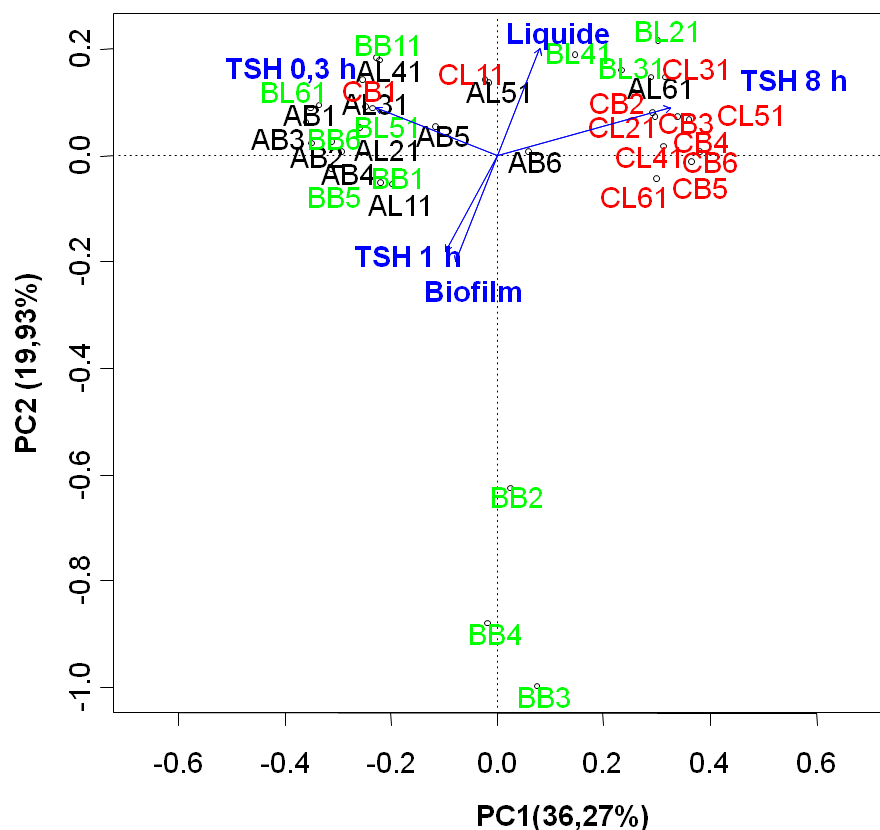


**Figure 4-5** ACP sur les profils CE-SSCP d'échantillons de biofilms (B) et de biomasse en suspension dans le liquide (L) ordonnés en fonction des facteurs environnementaux (TSH 0,3h noir, TSH 1h vert, TSH 8 h rouge) (nombres d'échantillon : 6 biofilms et 12 liquides).

Pour chaque communauté bactérienne, les résultats de cette analyse mettent en lumière l'importance de la valeur du TSH sur la répartition des populations du biofilm et du liquide. Pour les populations obtenues avec un temps de séjour faible (0,3h et 1 h), la différence entre la structure des communautés du biofilm et du liquide est très faible. On observe au niveau du graphique que les points sont très proches (vert et noir). Au contraire, pour le TSH de 8 h (groupement des points rouges), la répartition des espèces dans les communautés du liquide et du biofilm est différente. De plus, les points obtenus pour le TSH de 8 h sont disposés dans la partie droite de notre plan. Ces observations nous montrent que les vecteurs « TSH » (0,3 h, 1h et 8 h) sont corrélés entre eux. La correspondance liquide-biofilm a été aussi estimée. Mais

le nombre d'échantillons considéré pour chaque point est de 2 pour le liquide et 1 pour le biofilm, ce qui rend cette approche peu « équilibrée » (cf. *Figure 4-5*).

Une autre ACP est réalisée en considérant seulement un échantillon du liquide et un échantillon du biofilm pour tous les points de prélèvement. Les résultats sont présentés par la *Figure 4-6*.



**Figure 4-6** ACP sur les profils CE-SSCP d'échantillons de biofilms (B) et de biomasse en suspension dans le liquide (L) ordonnés en fonction des facteurs environnementaux. (TSH 0,3h noir, TSH 1h vert, TSH 8 h rouge) (nombres d'échantillon : 6 biofilms et 6 liquides).

Pour cette ACP, 54,75% des différences génétiques entre les échantillons sont représentées. Les vecteurs « origines », c'est-à-dire « biofilm » et « liquide » apparaissent comme étant peu significatif (p-value de 0,05). Il en est de même pour les échantillons de biofilm pour un TSH courts (p-value de 0,05), alors que pour le TSH long, le vecteur est très significatif. Donc, il apparaît que les populations évoluent avec la valeur du TSH. En effet, le vecteur du TSH de 1 h est presque perpendiculaire aux vecteurs TSH 0,3 h et de 8 h. L'orientation des vecteurs « origine » indique la zone du graphique où les échantillons de liquide et de biofilm sont présents. On peut donc supposer que les espèces présentes dans le liquide proviennent du détachement du biofilm. Cependant, il devrait y avoir une croissance dans le liquide pour une



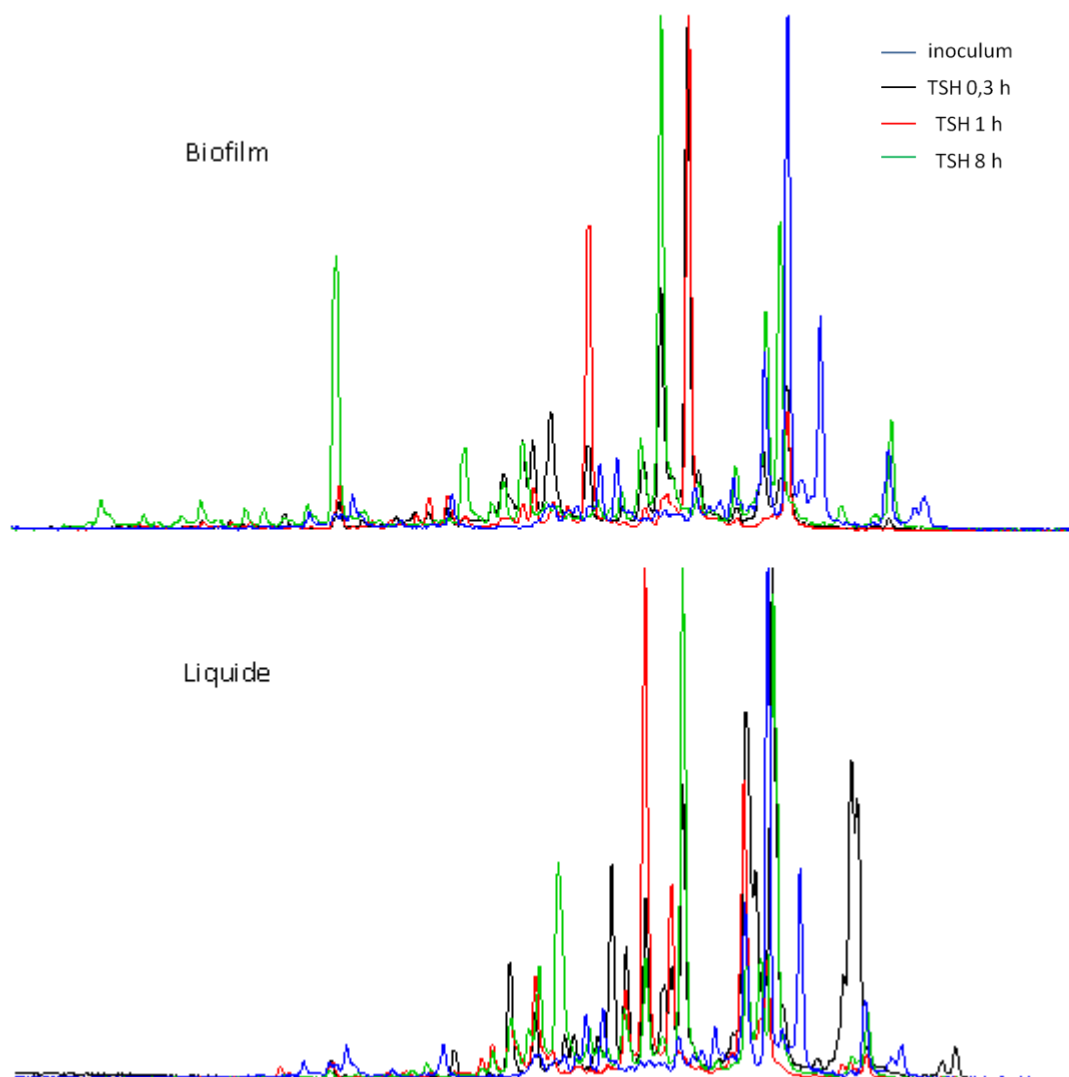
TSH élevé. Afin de vérifier la présence de cette croissance dans la phase liquide, notre analyse va être complétée par des tests statistiques de proximité et de similitude. Pour faire ces tests (ANOSIM et t-test), nous avons utilisés les échantillons présentés par la Figure 4-5.

#### **4.3.1.1 Analyse de la similitude et de la proximité des profils CE-SSCP du liquide et du biofilm aux différents temps de séjour**

Dans cette partie, nous avons recherché les similitudes et la proximité qui existent entre les profils CE-SSCP en utilisant des tests statistiques.

La Figure 4-7 présente l'effet du TSH sur les communautés du biofilm et du liquide par rapport à l'inoculum. Il s'agit de résultats bruts difficiles à exploiter directement. C'est pourquoi une analyse mathématique et statistique est réalisée. Le calcul d'un « degré de différence » va permettre d'estimer s'il existe une différence entre les espèces présentes dans nos communautés suivant la valeur du TSH.

Le Tableau 4-1 présente les résultats obtenus après la comparaison des différents groupes d'échantillons avec ANOSIM. La valeur ANOSIM-R donne le degré de différence. Ce degré se calcule, par analogie avec l'ANOVA, par un test fondé sur la comparaison des distances entre les rB groupes avec des distances dans les groupes rW pour produire la statistique R de l'ANOSIM. Les rB groupes et rW groupes correspondent a des groupes de données qui doivent être comparés.



**Figure 4-7 Profils CE-SSCP représentant l'inoculum (bleu) et les profils CE-SSCP du biofilm et du liquide pour les trois temps de séjour (TSH 0,3h (noir), TSH 1h (rouge), TSH 8h (vert)) au jour 28.**

D'après ces résultats, il apparaît clairement qu'il existe une différence entre les profils du biofilm et du liquide. Ces résultats sont significatifs pour le TSH de 1h et hautement significatif pour le TSH de 8h. Lorsque le temps de séjour passe de 0,3 à 1h, une différence entre les populations du biofilm et du liquide apparaît, la valeur de l'ANOSIM-R passe de 0,045 à 0,3392 pour une variation du TSH entre 0,3 h et 1 h. Si on continue d'augmenter la valeur du TSH (8h), le nombre de pic « visuel » sur le profil s'accroît pour le biofilm, mais pas pour le liquide et l'ANOSIM est de 0,63. Il semble que les populations du biofilm évoluent avec le TSH.

**Tableau 4-1 Valeurs des coefficients ANOSIM-R entre les groupes de population du biofilm et du liquide.**

Groupes comparés	Liquide TSH = 0,3 h	Liquide TSH = 1 h	Liquide TSH = 8 h
<b>Biofilm TSH= 0,3 h</b>	0,045 p-value = 0,306		
<b>Biofilm TSH= 1 h</b>		0,3392 p-value = 0,005	
<b>Biofilm TSH= 8 h</b>			0,7415 p-value < 0,001

Le Tableau 4-2 et la Figure 4-8 présentent les pourcentages de différence statistique obtenue pour le t-test.

**Tableau 4-2 Résultats statistiques sur la différence (%) entre les groupes de population du biofilm et du liquide, d'après le t-test (p-value <0,05).**

Groupes comparés	Liquide TSH = 0,3 h	Liquide TSH = 1 h	Liquide TSH = 8 h
<b>Biofilm TSH= 0,3 h</b>	20%		
<b>Biofilm TSH= 1 h</b>		33%	
<b>Biofilm TSH= 8 h</b>			71%

Après l'analyse de ces résultats (cf. *Tableau 4-2*), nous pouvons voir que le pourcentage de différence entre les groupements biofilm/liquide augmente avec le TSH. En effet, pour un TSH de 0,3 h, nous avons un degré de proximité de 20%, mais si nous passons à une valeur du TSH de 1h, cet indice passe à 33% et il atteint 71% au TSH de 8h. Ces résultats montrent bien que pour des TSH courts, les populations du biofilm et de la phase liquide sont très proches. Cela est cohérent avec l'hypothèse qu'aux TSH courts, la biomasse planctonique est essentiellement de la biomasse détachée du biofilm. Il est donc logique que les communautés

soient très proches. En revanche, quand le TSH est long, la biomasse planctonique contient également des populations dont le taux de croissance leur permet de se multiplier dans la phase liquide. On peut donc comprendre l'éloignement observé entre les deux communautés (biofilm *vs.* liquide)

Cette évolution de la proximité et de la similitude de nos profils peut être appréciée visuellement par la superposition des profils CE-SSCP moyens des groupements du biofilm et du liquide. Ces profils sont présentés dans la Figure 4-8. Le profil du groupement biofilm est en rouge et celui du liquide en bleu. Ces profils moyens sont obtenus par le t-test. Ce profil moyen est une courbe représentant l'empreinte moyenne de chaque profil pour chaque groupe. Une moyenne arithmétique de tous les profils est calculée suivant la position sur le scan du profil (ligne horizontale de l'axe des abscisses). Le pourcentage ainsi que la signification de ces résultats sont également fournis.

Cette Figure 4-8, montre que pour le TSH de 0,3 h, les profils se superposent et sont très proches. Si l'on passe à un TSH de 1 h, alors il apparaît que les pics des profils du liquide sont différents de ceux du biofilm. On peut voir six pics pour la phase liquide et seulement cinq pics pour le biofilm, dont seulement trois sont communs aux deux phases. Pour le TSH de 8 h, le nombre de pics augmente. Nous avons dix pics pour le biofilm et onze pics pour le liquide avec seulement six pics communs. Ces observations sont similaires à celles effectuées dans le paragraphe 4-1.

Nous pouvons en conclure que le TSH influence la similitude et la proximité des communautés microbiennes entre le biofilm et le liquide. Les communautés observées pour des TSH courts dans le liquide semblent provenir du détachement du biofilm et non de la croissance. Nous allons à présent analyser la similitude des communautés propres aux biofilms et aux populations planctoniques suivant les différents TSH étudiés.

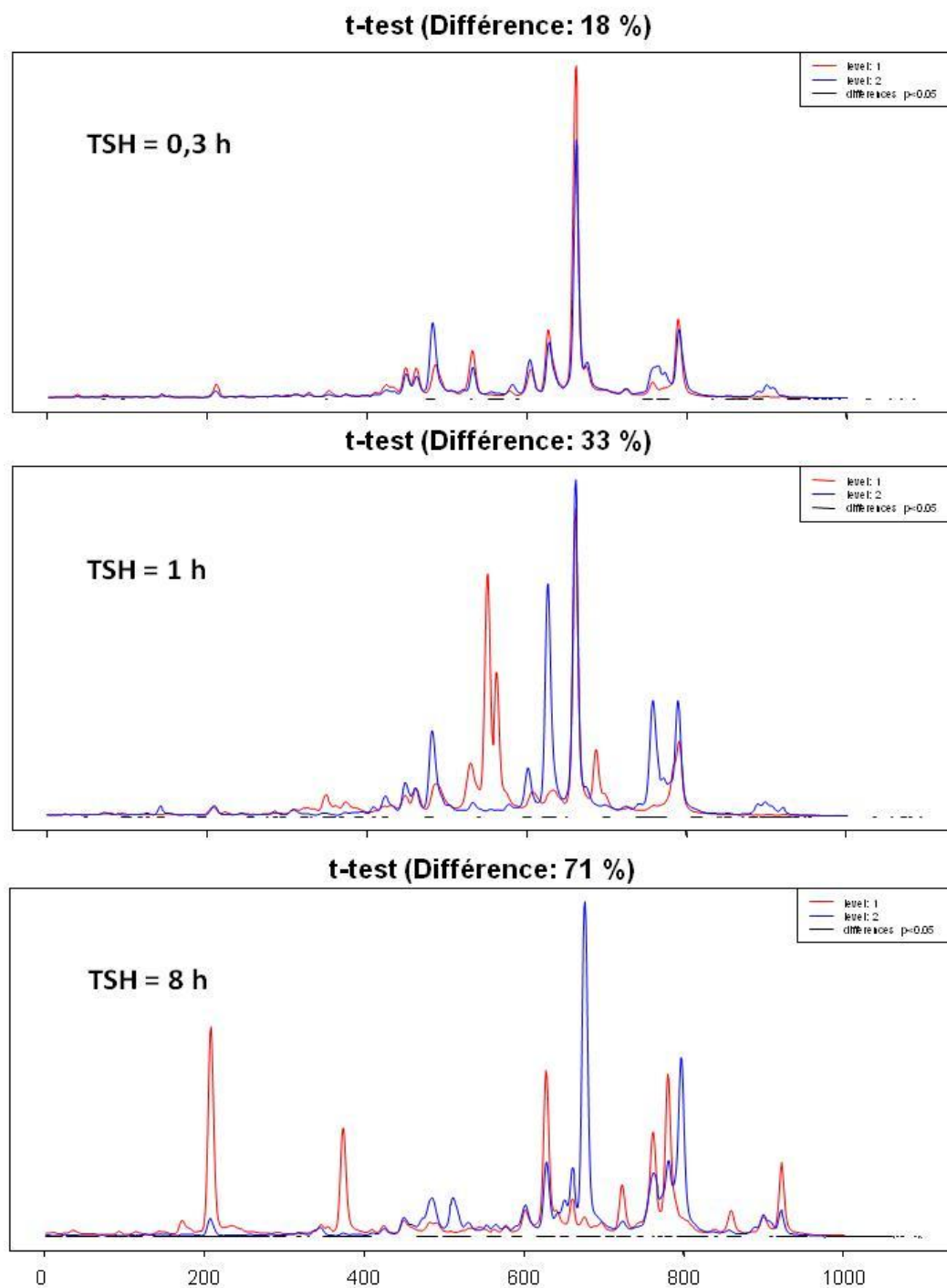
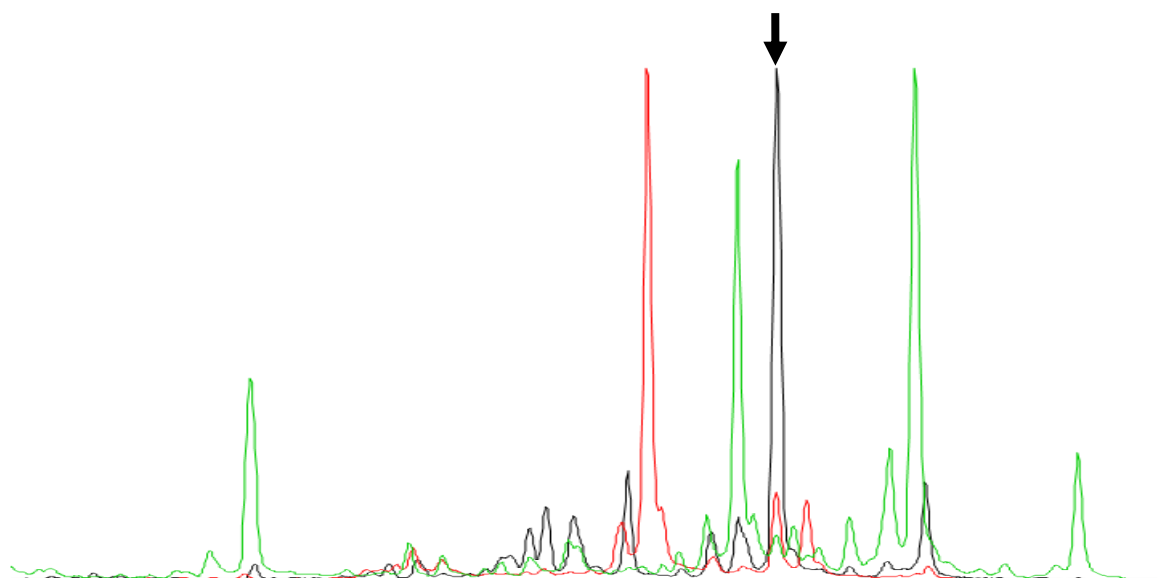


Figure 4-8 Profils moyens CE-SSCP entre les échantillons de biofilm (rouge) et de liquide (bleu) calculés par le t-test.

#### 4.3.1.2 Analyse de la similitude et de la proximité des profils CE-SSCP du biofilm aux différents temps de séjour

Les différences de communautés des biofilms obtenus pour différents TSH sont présentées dans la Figure 4-9. Les profils ont été choisis au jour 28, qui correspond à la moitié de la durée expérimentale.



**Figure 4-9** Comparaison des communautés microbiennes présentes dans le biofilm au 28<sup>ème</sup> jour pour trois TSH (0,3 h, noir, 1h, rouge, 8h, vert). La flèche indique un pic commun aux différents profils.

Les trois profils sont simples (moins de 10 pics observés). On remarque que les profils sont différents suivant le TSH. Ils sont proches entre eux pour des faibles valeurs de TSH (cf. *profils noir et rouge de la Figure 4-9*) mais différents pour un TSH de 8 h (cf. *profil vert de la Figure 4-9*). Il apparaît un seul pic majoritaire pour les TSH de 0,3 h et de 1 h et trois pics majoritaires pour le temps de séjour de 8h. Le pic majoritaire, indiqué par une flèche noire sur la Figure 4-9, est le seul pic commun aux trois profils étudiés pour trois TSH différents. L'inoculum n'a aucun effet (cf *Figure 4-7*).

Le Tableau 4-3 présente les valeurs du coefficient ANOSIM-R obtenues à partir des comparaisons entre les différents biofilms. Le Tableau 4-4 donne les résultats des t-tests sur les mêmes comparaisons entre les groupements.

**Tableau 4-3 Valeurs des coefficients ANOSIM-R entre les groupes de population des biofilms.**

Groupes comparés	Biofilm TSH= 1 h	Biofilm TSH= 8 h
Biofilm TSH= 0,3 h	R= 0,09 p-value = 0,156	R= 0,5648 p-value = 0,03
Biofilm TSH= 1 h		R= 0,2244 p-value = 0,021

**Tableau 4-4 Résultats statistiques sur la différence(%) entre les groupes de population des biofilms étudiés d'après le t-test (p-value <0,05).**

Groupes comparés	Biofilm TSH= 1 h	Biofilm TSH= 8 h
Biofilm TSH= 0,3 h	9%	38%
Biofilm TSH= 1 h		37%

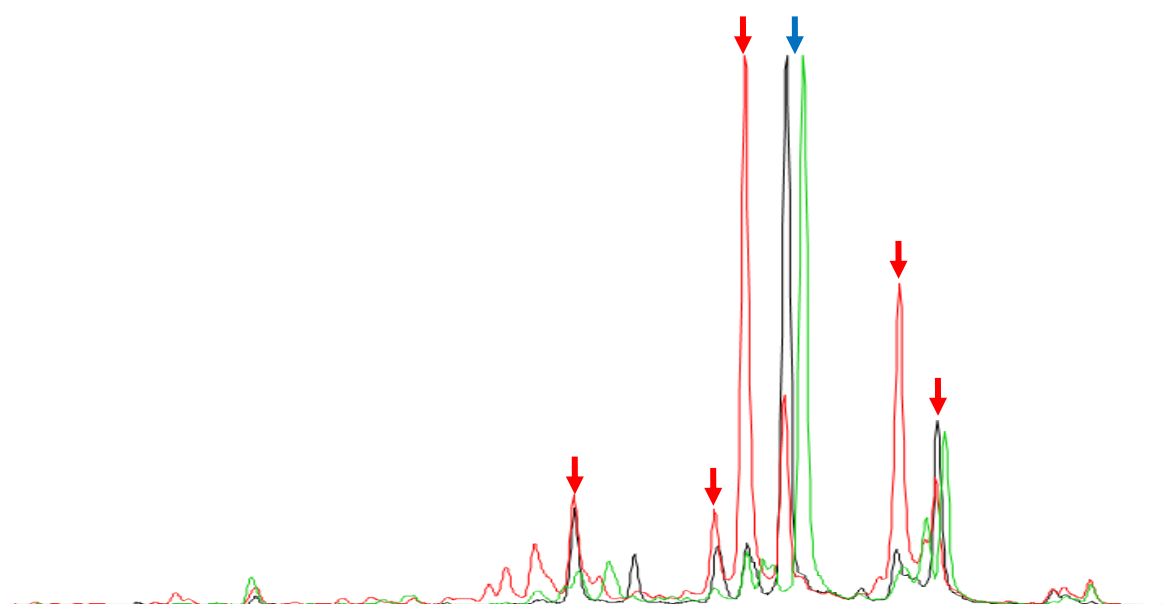
D'après l'analyse de ces résultats présentés dans les Tableaux 4-3 et 4-4, il apparaît que les communautés du biofilm qui sont cultivées avec un TSH court sont similaires et proches entre elles, tandis qu'elles sont différentes de celles du biofilm cultivé avec un TSH long. En effet, le coefficient ANOSIM-R est égal à 0,09 et on a 9% de différence entre les profils CE-SSCP des biofilms cultivés avec un TSH de 0,3 h et de 1 h. Alors que l'on a ANOSIM-R = 0,5648 et 38% de différence entre les profils CE-SSCP pour des valeurs de TSH de 1 h et 8 h et un ANOSIM-R = 0,2244 et 37% de différence entre les profils à TSH de 1 h et de 8 h.

Ces différences pourraient être liées à la différence des cinétiques de croissance et des épaisseurs entre les biofilms cultivés à TSH court et long. Il a été montré que des biofilms produits dans des conditions similaires présentaient une stratification avec une couche basale très cohésive et très riche en espèces alors que la couche supérieure peu cohésive est moins

riche (Derlon *et al.* 2008 ; Jackson *et al.* ,2001, Martiny *et al.* 2003, Rochex *et al.*, 2008). En fonction de la vitesse à laquelle le système du biofilm atteint son état d'équilibre en terme d'épaisseur notamment, la stratification du biofilm ne suit pas la même cinétique. Ainsi, les biofilms à TSH 0,3 et 1h ont des développements très comparables alors que celui développé à un TSH de 8h se développe moins vite, avec notamment une épaisseur moindre. Pour un même jour d'observation, le stade de maturation des biofilms à court et long TSH n'est donc pas le même.

#### 4.3.1.3 Analyse de la similitude et de la proximité des profils CE-SSCP du liquide aux différents temps de séjour

Après avoir observé l'effet du TSH sur les communautés du biofilm, nous passons maintenant à l'observation de l'effet du TSH sur celles de la biomasse planctonique. La Figure 4-10 montre les communautés bactériennes de la phase liquide pour les différents temps de séjour hydraulique.



**Figure 4-10** Comparaison de la diversité microbienne présente dans le liquide au 28<sup>ème</sup> jour pour trois TSH (0,3 h, noir, 1h, rouge, 8h, vert). Les flèches indiquent les pics communs entre les différents profils.

Comme pour les biofilms, les profils présentés ont été comparés pour le jour 28. Les profils sont toujours assez simples, il y a entre 3 à 8 pics visibles suivant les profils CE-SSCP. Les profils aux TSH courts semblent similaires. Il y a 6 pics communs entre eux. Pour le TSH de



8 h, nous voyons aussi que le profil possède des pics communs aux autres profils à TSH court (cf. *flèches rouges sur la Figure 4-10*). Néanmoins, il existe une zone du profil dans laquelle les pics sont très proches mais où ils ne se superposent pas (cf. *flèches bleus sur la Figure 4-10*).

La croissance dans le liquide est liée au TSH, mais il semble que les profils changent suivant la valeur du TSH. Cette approche peut corroborer la présence de la croissance d'espèces planctoniques dans la phase liquide en plus des espèces provenant du détachement lorsque l'on travaille avec un TSH élevé.

Des tests de similitude et de proximité ont donc été aussi réalisés entre les groupements des profils obtenus pour le liquide et ordonnés selon les trois différents TSH. Les résultats sont résumés pour le test de similitude dans le Tableau 4-5 et pour le test de proximité dans le Tableau 4-6.

**Tableau 4-5 Valeurs des coefficients ANOSIM-R entre les groupes de populations présentes dans le liquide, d'après l'ANOSIM.**

Groupes comparés	Liquide TSH= 1 h	Liquide TSH= 8 h
Liquide TSH= 0,3 h	R= 0,123 p-value = 0,05	R= 0,587 p-value < 0,001
Liquide SH= 1 h		R= 0,3045 p-value < 0,001

**Tableau 4-6 Résultats statistiques sur la différence(%) entre les groupes de populations présentes dans la phase liquide obtenus d'après le t-test (p-value <0,05).**

Groupes comparés	Liquide TSH= 1 h	Liquide TSH= 8 h
Liquide TSH= 0,3 h	15%	31%
Liquide TSH= 1 h		48%

D'après l'analyse des Tableaux 4-5 et 4-6, il apparaît que le TSH a aussi un effet sur les communautés présentes dans le liquide. On passe d'une valeur de ANOSIM-R de 0,123 pour la comparaison entre TSH de 0,3 h et de 1 h à 0,3045 pour les liquides 1 h / 8 h et à 0,587 pour les liquides 0,3 h / 8 h. Cette première observation nous indique que les communautés microbiennes sont proches pour de faibles valeurs de TSH et plus éloignées si le TSH augmente. Cela confirme l'hypothèse que les populations aux TSH courts proviennent du détachement du biofilm et non de la croissance bactérienne.

Nous pouvons en conclure que l'effet du TSH influence la distribution des espèces dans la population du biofilm. Plus on augmente le temps de séjour, plus le biofilm est enrichi par de nouvelles espèces.

Dans la phase liquide, la valeur du TSH va contrôler la répartition entre la biomasse en croissance significative aux TSH longs, et la biomasse détachée du biofilm, rapidement majoritaire après le lessivage de l'inoculum aux TSH courts.

#### **4.4 Synthèse**

La croissance des biofilms à différents TSH a montré que ce paramètre n'a pas d'effet sur la diversité des populations de la biomasse planctonique ni sur celle du biofilm. Il a cependant un effet sur le nombre d'espèces majoritaires présentes dans la communauté. A TSH court, la communauté microbienne de la biomasse planctonique est très proche de celle du biofilm. Cela confirme que cette biomasse planctonique vient pour l'essentiel du détachement du biofilm. Quand le TSH est plus long, les communautés du liquide et du biofilm se différencient en raison de la croissance autonome de la biomasse planctonique. A TSH élevé, on a donc des communautés différentes. Ce travail peut constituer une piste pour caractériser la proportion de biomasse libre issue du détachement dans un système à biofilm.



## **Chapitre 5 Modélisation de la compétition entre la biomasse planctonique et le biofilm**



Le travail expérimental réalisé dans un réacteur RAR à différents TSH a permis d'étudier la compétition entre la biomasse fixe (biofilm) et la biomasse libre d'un point de vue macroscopique (quantité, structure) et microbiologique (population). L'objectif de ce chapitre consiste à utiliser des outils de modélisation (AQUASIM®) afin d'agrèger les résultats obtenus et de mieux appréhender les mécanismes mis en jeu. La modélisation a été abordée en deux étapes.

Dans un premier temps, un modèle mono-espèce classique, prenant en compte la biomasse présente dans la phase liquide et en biofilm, a été développé afin de caler les paramètres du modèle sur les trois conditions expérimentales. La validation est réalisée à partir des variables globales (épaisseur du biofilm, concentration en biomasse planctonique...). Les conditions opératoires étant identiques dans les trois expériences, à l'exception du TSH, il a été décidé d'utiliser les mêmes paramètres dans le modèle pour les trois conditions, pour la croissance comme pour le détachement.

Dans un second temps, un modèle multi-espèces a été développé et utilisé afin d'introduire une diversité (10 espèces) et d'analyser l'impact du TSH sur cette diversité et la structure des populations dans les trois conditions testées afin de confronter les simulations aux résultats expérimentaux.

## **5.1 Rappel des conditions expérimentales et des paramètres du modèle**

Pour étudier le développement des biofilms, différentes conditions de croissance ont été appliquées en faisant varier la valeur du TSH. Les principales conditions opératoires sont résumées dans le Tableau 5-1.

Les biofilms ont été développés sous des conditions de limitation en substrat. Le glucose est utilisé comme source de carbone et donneur d'électron. Nous avons décidé de fixer une charge surfacique théorique de l'ordre de  $25 \text{ g}_{\text{DCO}} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{j}^{-1}$  pour les trois réacteurs. Mais les suivis expérimentaux ont été réalisés avec une charge surfacique réelle moyenne de  $24,5 \text{ g}_{\text{DCO}} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{j}^{-1}$  (moyenne de la charge calculée à partir des suivis sur les réacteurs). Cependant, dans le cas du réacteur C, la charge surfacique expérimentale était légèrement plus faible. Dans le cadre des simulations, une charge constante de  $24,5 \text{ g}_{\text{DCO}} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{j}^{-1}$  a été fixée afin de se

rapprocher le plus possible de la réalité expérimentale. Une simulation a été réalisée pour vérifier la faible influence de la différence de charge constatée sur la croissance de la biomasse.

**Tableau 5-1 Récapitulatif des conditions de croissance dans les réacteurs biologiques.**

Réacteur	TSH (h)	Accepteur final d'électrons	Charge surfacique moyenne sur 42 jours ( $\text{g}_{\text{DCO}} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{j}^{-1}$ )	Concentration moyenne du substrat en entrée sur 42 jours ( $\text{g}_{\text{DCO}} \cdot \text{L}^{-1}$ )
A	0,3	Oxygène (saturation)	24,61	0,068
B	1		24,51	0,260
C	8		20,43	1,430

Les paramètres et les conditions tests choisis pour les simulations avec modèle mono-espèce, ont été présentés dans le chapitre 2. La valeur de la concentration en oxygène prise par défaut dans le liquide est de  $6 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  : elle correspond à la valeur de la saturation en oxygène dissous dans l'eau à  $45^\circ\text{C}$ . Au niveau du système expérimental, le réacteur est considéré comme parfaitement agité et l'apport l'oxygène dans le réacteur reste constant.

Le taux de croissance spécifique maximale, la constante d'affinité de Monod, et les coefficients de détachement ( $k_{d1}$  et  $k_{d2}$ ) sont identiques pour les 3 réacteurs. Le taux de croissance maximal et la constante d'affinité de Monod ont été ajustés par rapport aux données expérimentales sur l'épaisseur du biofilm, la concentration en biomasse planctonique et en substrat dans le liquide. Les valeurs de  $k_{d1}$  et  $k_{d2}$  ont été fixées respectivement à 0,95 et  $0,005 \text{ j}^{-1}$ , le taux de croissance spécifique maximal à  $22 \text{ j}^{-1}$  et la constante d'affinité de Monod à  $20 \text{ mg}_{\text{DCO}} \cdot \text{L}^{-1}$ . Le  $Y_H$  utilisé était de 0,42 (mesuré expérimentalement).

Les simulations nécessitent de fixer certaines conditions initiales. Une épaisseur initiale du biofilm de  $1 \mu\text{m}$  a été fixée : il s'agit de la valeur souvent prise par défaut dans les simulations. La concentration de la biomasse planctonique initiale a été fixée à  $0,134 \text{ g}_{\text{DCO}} \cdot \text{L}^{-1}$  : cette valeur correspond à la concentration expérimentale en biomasse dans la phase liquide après le batch de 24 h.

Les simulations ont été réalisées sur une période de 50 jours à 200 jours. Dans la suite du chapitre, on notera  $\text{DCO}_x$  la demande chimique en oxygène qui correspond à la biomasse.

## 5.2 Modèle mono-espèce

### 5.2.1 Caractérisation de l'épaisseur moyenne et des concentrations en substrats dans le liquide

L'influence du temps de séjour sur la répartition de la biomasse peut être identifiée au niveau du biofilm par son épaisseur moyenne. En effet, la mesure de ce paramètre permet d'apprécier la différence de morphologie du biofilm en fonction des conditions de croissance. Les résultats de la simulation sont comparés aux données expérimentales dans la Figure 5-1.

D'après les résultats de la simulation, l'épaisseur du biofilm est dépendante du temps de séjour. Elle est très faible pour le TSH de 8 h (350  $\mu\text{m}$ ) et de 1200  $\mu\text{m}$  pour les TSH 0,3 h et de 1 h. L'épaisseur pour les temps de séjour de 0,3 et 1 h est très proche.

Si nous comparons nos résultats expérimentaux avec les résultats de la simulation, l'épaisseur simulée encadre les points expérimentaux. L'épaisseur estimée est de 1200  $\mu\text{m}$  au bout de 42 jours pour le TSH de 1 h, alors que la valeur expérimentale est de 1000  $\mu\text{m}$ . La différence est d'environ 200  $\mu\text{m}$ . On observe le même phénomène pour la simulation réalisée pour le TSH de 0,3 h avec un écart de l'ordre de 400  $\mu\text{m}$ . Pour un TSH de 8 h, des différences entre les données sont aussi observées.

Néanmoins, la simulation donne des épaisseurs inférieures aux résultats expérimentaux. L'épaisseur estimée évolue de manière croissante, alors que l'épaisseur mesurée reste constante. Une explication possible peut être liée à la surestimation de l'épaisseur expérimentale durant les 20 premiers jours de croissance du biofilm. En effet, celui-ci est présent en faible quantité sur le support et l'erreur de la mesure peut provenir de la présence d'un film de liquide qui peut biaiser la valeur expérimentale. En effet, si l'on observe les résultats expérimentaux au jour 7, la valeur de l'épaisseur est presque la même pour les trois études (environ 300  $\mu\text{m}$ ).



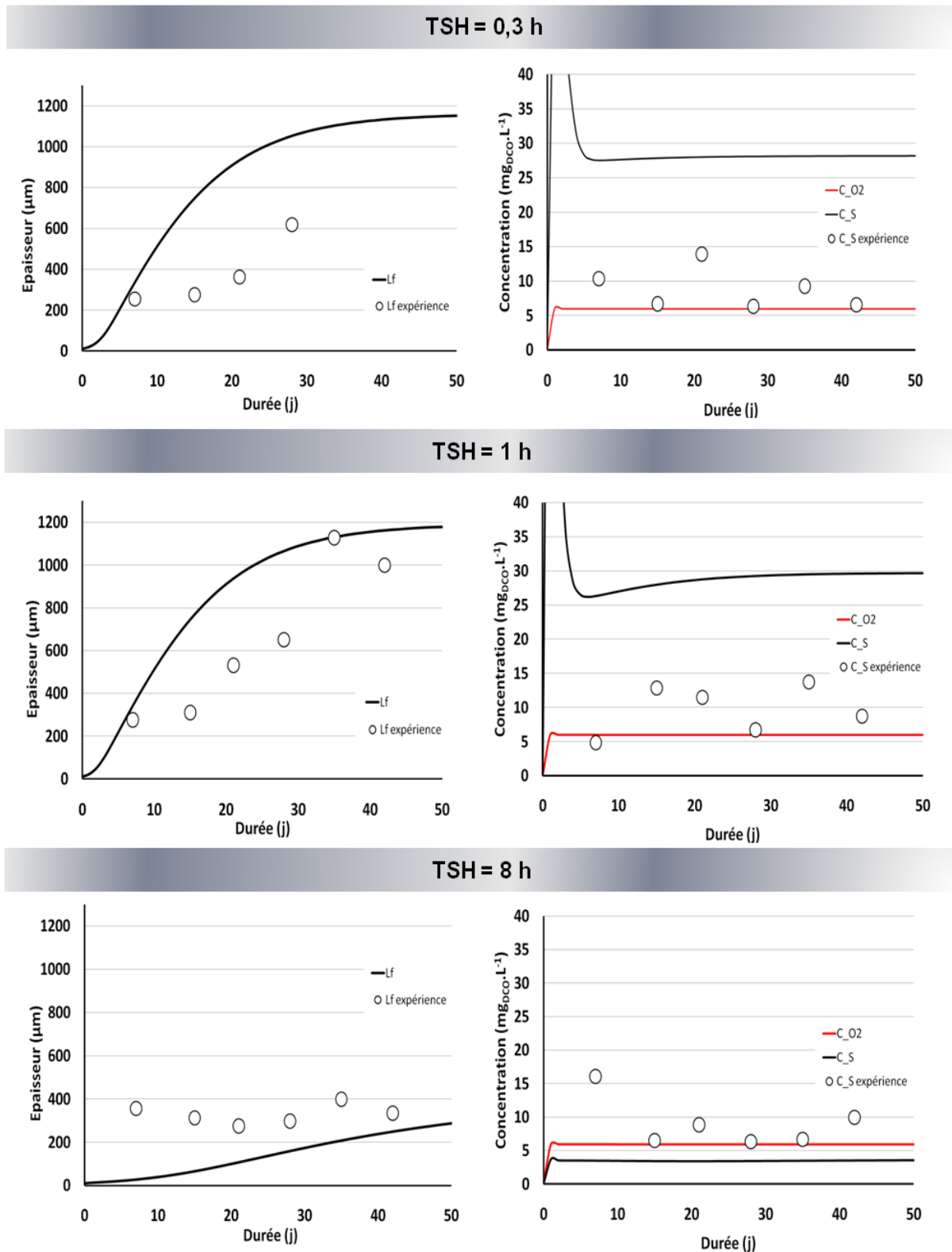


Figure 5-1 Evolution de l'épaisseur du biofilm ( $L_f$ ) et des concentrations en substrat ( $C_S$ ) et en oxygène ( $C_{O_2}$ ) dans le liquide pour les trois temps de séjour testés. Les simulations sont représentées par les lignes et les résultats expérimentaux par les points.

Pour diminuer les écarts entre le résultat des simulations et les données expérimentales, il aurait fallu adapter les valeurs des coefficients de détachement à chaque expérience. Ils sont liés à la vitesse de croissance du biofilm et à l'épaisseur du biofilm (Speitel et Di Giano, 1987; Wanner, 2006). La valeur du  $k_{d2}$  permet de réajuster la valeur de l'épaisseur maximale du biofilm tandis que le coefficient  $k_{d1}$  possède une forte influence sur la dynamique de l'accroissement du biofilm. Cependant, cette démarche ne peut se justifier scientifiquement. En effet, comme nous travaillons avec une contrainte de cisaillement identique pour chaque étude, les constantes de détachement doivent être identiques dans les trois réacteurs. L'objectif de ce chapitre étant de reproduire la dynamique de croissance du biofilm, les simulations obtenues sont globalement satisfaisantes.

La Figure 5-1 (cf. *partie de droite*) permet de comparer les concentrations en substrat mesurées et simulées dans le liquide. Les résultats des simulations pour les faibles temps de séjour hydrauliques sont presque identiques. En effet, pour un TSH de 0,3 h ou de 1 h, la concentration en substrat est de l'ordre de  $29 \text{ mg}_{\text{DCO}} \cdot \text{L}^{-1}$ . Les valeurs expérimentales, quant à elles, sont deux à trois fois plus petites. Pour le TSH de 8 h, la concentration est de  $3,5 \text{ mg}_{\text{DCO}} \cdot \text{L}^{-1}$  alors que les données expérimentales sont deux fois plus élevées.

Cet écart obtenu entre les données expérimentales et les données simulées pour le TSH de 8 h peut s'expliquer par la forte croissance de la biomasse dans le réacteur. En effet, la concentration de la biomasse planctonique est très élevée au sein du réacteur, elle est de  $700 \text{ mg}_{\text{DCOX}} \cdot \text{L}^{-1}$ , pour le modèle alors que pour la phase expérimentale, nous avons une concentration moyenne de  $500 \text{ mg}_{\text{DCOX}} \cdot \text{L}^{-1}$  (cf. *Figure 5-2*). Donc cela peut se justifier par la valeur de la concentration en substrat résiduel que l'on a obtenu.

Si nous réalisons la simulation à TSH 8h avec une charge surfacique appliquée en entrée de réacteur de  $20 \text{ g}_{\text{DCO}} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{j}^{-1}$ , la concentration en glucose résiduelle et l'épaisseur du biofilms sont proches, avec des écarts respectifs de 5% et de 2% par rapport à la simulation à  $24 \text{ g}_{\text{DCO}} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{j}^{-1}$ .

Pour les résultats de la concentration en oxygène dissous, la valeur de la concentration est fixée en entrée du réacteur, puis celle-ci est recalculée par AQUASIM® suivant l'équation du transfert d'oxygène. La valeur simulée obtenue est proche de la valeur de la saturation dans le réacteur.

### 5.2.2 Caractérisation de la distribution de la biomasse dans le réacteur à biofilm

L'impact du TSH sur la distribution de la biomasse dans le réacteur à biofilm peut-être aussi observée avec le modèle. La Figure 5-2 représente l'évolution de la concentration en biomasse dans le biofilm et le liquide durant la période d'étude de 42 jours.

Si l'on analyse dans un premier temps l'évolution de la concentration dans le biofilm (cf. Figure 5-2, partie de gauche), il apparaît que d'après les simulations, nous pouvons confirmer que le TSH possède une influence sur l'évolution de la quantité de biomasse ( $X_{\text{het}}$ ) présente dans le biofilm, comme nous avons pu le voir avec les résultats sur l'épaisseur. En effet, lorsque le TSH est de 8 h, la biomasse dans le biofilm est de  $0,2 \text{ g}_{\text{DCOX}} \cdot \text{m}^{-2}$  au jour 10, alors qu'elle est dix fois plus élevée pour les biofilms qui se sont développés avec un faible temps de séjour hydraulique ( $2 \text{ g}_{\text{DCOX}} \cdot \text{m}^{-2}$  pour TSH de 0,3 h et de 8 h) pour la même durée d'expérience. Puis au jour 30, la concentration en biomasse est de  $0,6 \text{ g}_{\text{DCOX}} \cdot \text{m}^{-2}$  à TSH de 8 h. Pour les faibles valeurs de TSH au même jour, la concentration est de  $4 \text{ g}_{\text{DCOX}} \cdot \text{m}^{-2}$ . Cette dernière valeur ( $4 \text{ g}_{\text{DCOX}} \cdot \text{m}^{-2}$ ) reste constante jusqu'à la fin de la durée de manipulation. Donc un état d'équilibre au niveau des biofilms est atteint, ce qui laisse penser que les flux au niveau du biofilm sont à l'équilibre (entrée = sortie à l'interface biofilm-liquide). Cette évolution est représentée par l'apparition d'un plateau (à partir du 30<sup>ème</sup> jour) au niveau des courbes de résultats obtenues pour les biofilms (TSH de 0,3 et 1 h). Cependant, pour le TSH de 8 h, ce palier n'est pas visible, la concentration de biomasse ( $X_{\text{het}}$ ) continue de croître. Le biofilm qui est cultivé est un « biofilm jeune ». Si l'on travaille sur une plus longue période, le biofilm peut suivre la même évolution que celle observée aux TSH courts et accumuler de la biomasse inerte.

Si l'on s'intéresse aux résultats obtenus pour la biomasse planctonique (cf. Figure 5-2, partie de droite), il apparaît que la concentration de  $X_{\text{het}}$  varie en fonction du TSH appliqué mais est constante au cours du temps pour un TSH donné. La biomasse inerte est présente en faible quantité car les temps de rétention cellulaire sont courts.

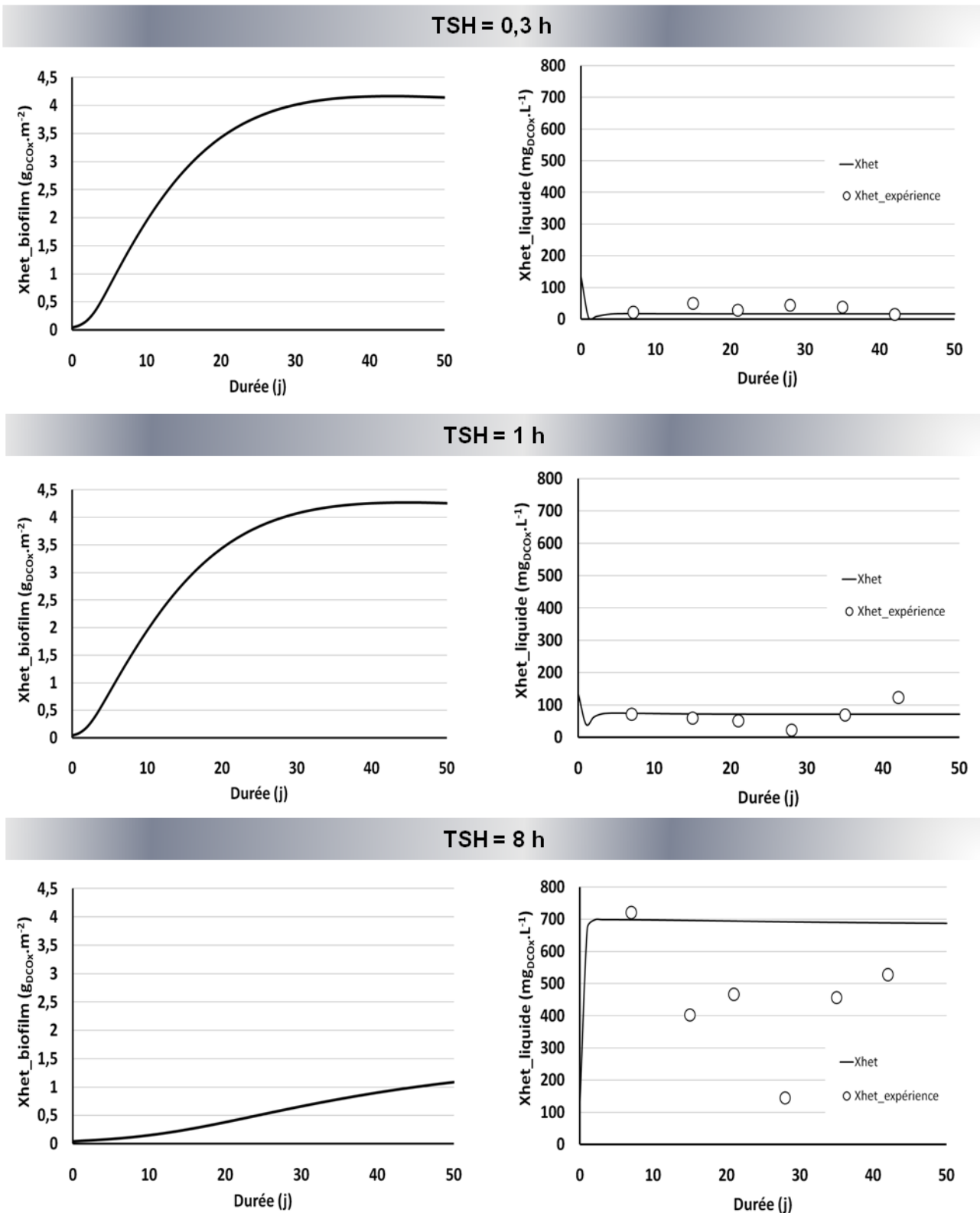


Figure 5-2 Evolution des concentrations en biomasse dans le biofilm et le liquide. Les concentrations dans le biofilm sont exprimées en  $g_{DCOx} \cdot m^{-2}$  et les concentrations dans le liquide en  $mg_{DCOx} \cdot L^{-1}$ .  $X_{het}$  représente la biomasse active. Les résultats des simulations sont représentés les lignes et les résultats expérimentaux par les points.

Lors des premières heures de simulation, une forte diminution de la concentration en biomasse libre apparaît pour les TSH faibles (0,3 h et 1 h). Cette observation s'explique facilement par le lessivage de la biomasse initiale présente dans le réacteur. Après cette phase transitoire, la concentration est constante au cours du temps pour les 3 simulations, car les réacteurs fonctionnent en mode continu. Suivant la valeur du temps de séjour, la concentration de la  $X_{\text{het}}$  planctonique varie. Elle est de  $20 \text{ mg}_{\text{DCO}_x} \cdot \text{L}^{-1}$  pour un TSH de 0,3 h,  $70 \text{ mg}_{\text{DCO}_x} \cdot \text{L}^{-1}$  pour un TSH de 1 h et de  $690 \text{ mg}_{\text{DCO}_x} \cdot \text{L}^{-1}$  pour le TSH de 8 h. Ce résultat est lié au fait que le temps de séjour hydraulique est identique au temps de rétention de la biomasse (ou temps de rétention cellulaire) comme l'on peut le trouver dans la littérature abordant les systèmes biologiques (Edeline, 1997, Henze *et al.* 2002).

Si nous comparons les données simulées avec les données expérimentales, nous observons que la concentration en biomasse planctonique est proche des valeurs simulées pour le TSH de 1 h. Pour le TSH de 0,3 h, la quantité de biomasse expérimentale est légèrement supérieure aux valeurs obtenues avec la simulation. Cet écart peut être diminué par un meilleur ajustement des paramètres de détachement en considérant des conditions de détachement plus précises comme la prise en considération du sloughing. Même si le détachement est considéré dans notre modèle, nous n'avons pas pu quantifier la biomasse détachée dans le milieu liquide à l'échelle expérimentale. La quantification de cette biomasse détachée nous aurait permis d'ajuster le processus de détachement dans le modèle (Stewart, 1993).

Pour le temps de séjour de 8 h, les valeurs de la simulation sont légèrement supérieures aux valeurs obtenues expérimentalement. Cet écart peut s'expliquer par la différence de la charge surfacique. En effet, la charge de  $24,5 \text{ g}_{\text{DCO}} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{j}^{-1}$  a été fixée dans les simulations, alors que la charge surfacique expérimentale était 20% plus faible. Cette hypothèse peut être vérifiée par les résultats de la simulation obtenus pour un TSH de 8h avec une charge surfacique appliquée de  $20 \text{ g}_{\text{DCO}} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{j}^{-1}$ . La concentration de biomasse de la phase liquide est alors de  $580 \text{ mg}_{\text{DCO}_x} \cdot \text{L}^{-1}$ . Cette valeur se rapproche ainsi des valeurs expérimentales moyennes qui sont de  $514 \pm 123 \text{ mg}_{\text{DCO}_x} \cdot \text{L}^{-1}$  si l'on ne considère pas la valeur de la biomasse planctonique mesurée pour le jour 35.

Donc les bactéries du liquide sont plus abondantes lorsque le TSH est élevé, contrairement aux bactéries du biofilm. Cette influence du temps de séjour confirme bien les observations effectuées par Heijnen *et al.* (1993). Ils affirment que le taux de dilution du système ( $\delta$ ), qui

correspond à l'inverse du TSH, doit être supérieur au taux maximum de croissance des bactéries concernées afin de favoriser le biofilm et de limiter la mobilisation du substrat par les bactéries libres. En effet, lorsque le temps de séjour hydraulique est court, les bactéries présentes dans le liquide sont lessivées et n'ont plus accès au substrat. Le temps de séjour des boues<sup>14</sup> est plus élevé pour le biofilm que pour la biomasse planctonique. Cela permet aux bactériens du biofilm de croître plus facilement lorsque le substrat n'est pas mobilisé majoritairement par les cellules du liquide. Ce phénomène avait été démontré par le modèle décrit par Chang *et al.* (2005). Ce fait corrobore nos résultats expérimentaux et simulés en terme de la biomasse libre et attachée (croissance lente du biofilm pour un TSH de 8 h provient de la présence de biomasse planctonique).

### 5.2.3 Caractérisation des flux de détachement, d'oxygène et de substrat à la surface du biofilm

La simulation numérique présente l'avantage de pouvoir calculer des flux de matière à la surface du biofilm sur la période de croissance de 42 jours. Plusieurs flux peuvent être estimés : le flux de biomasse détaché du biofilm, le flux de substrat et le flux d'oxygène dans le biofilm. En effet, AQUASIM® permet de calculer les flux surfaciques qui entrent et qui sortent du compartiment biofilm. Le Tableau 5-2 regroupe les valeurs des flux correspondant aux 7 points de prélèvement de biofilm (7, 14, 21, 28, 35 et 42 jours).

D'après les données obtenues par simulation, nous pouvons observer une variation des flux avec le temps de séjour. D'une manière générale, comme pour d'autres variables observées, les flux calculés pour les temps de séjour de 0,3 et 1 h sont proches.

Si l'on observe le flux de détachement du biofilm, nous remarquons que celui-ci reste constant au cours du temps pour un TSH de 0,3h avec une valeur moyenne de  $4,860 \text{ g}_{\text{DCOx}} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{j}^{-1}$ . Si l'on augmente le temps de séjour, le flux de détachement évolue au cours du temps. Pour un TSH de 1h, sa valeur passe de  $4,760 \text{ g}_{\text{DCOx}} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{j}^{-1}$  au jour 7 à  $5,094 \text{ g}_{\text{DCOx}} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{j}^{-1}$  au jour 42. Par contre pour le temps de séjour de 8 h, le flux de détachement est beaucoup plus faible qu'aux temps de séjour de 0,3 et 1h. Il augmente fortement du jour 7 au jour 28 ( $0,243 \text{ g}_{\text{DCOx}} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{j}^{-1}$  à  $0,621 \text{ g}_{\text{DCOx}} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{j}^{-1}$ ) puis il se stabilise autour de cette valeur.

---

<sup>14</sup> Ou âge des boues ou temps de rétention cellulaire

Ainsi, le flux de détachement diminue avec le temps de séjour si nous comparons les données entre les faibles TSH et le TSH de 8h pour tous les jours étudiés. D'après le modèle de détachement utilisé, le taux de détachement durant la phase de croissance du biofilm est liée à la vitesse de croissance ( $u_f$ ) et à de l'épaisseur du biofilm ( $L_f$ ).

**Tableau 5-2 Flux surfacique du biofilm calculé par simulation pour les trois temps de séjour étudiés. Les jours représentent les différentes dates de prélèvement.**

Flux surfacique	TSH (h)	Jour de croissance (j)					
		7	14	21	28	35	42
<b>Détachement</b> ( $g_{DCO_x} \cdot m^{-2} \cdot j^{-1}$ )	0,3	4,953	4,863	4,841	4,844	4,851	4,857
	1	4,760	4,859	4,957	5,029	5,071	5,094
	8	0,243	0,437	0,575	0,620	0,621	0,612
<b>Oxygène</b> ( $g_{DCO} \cdot m^{-2} \cdot j^{-1}$ )	0,3	7,695	7,988	8,131	8,194	8,221	8,231
	1	7,432	7,98	8,283	8,428	8,494	8,523
	8	0,3995	0,7358	1,016	1,165	1,246	1,297
<b>Substrat</b> ( $g_{DCO} \cdot m^{-2} \cdot j^{-1}$ )	0,3	12,91	13,03	13,09	13,12	13,13	13,13
	1	12,43	13,02	13,36	13,54	13,62	13,66
	8	0,6563	1,197	1,624	1,815	1,899	1,939

Au niveau du Tableau 5-2, si l'on compare les données simulées pour le flux de détachement ( $F_{det}$ ) des valeurs de TSH (0,3 et 1h) et suivant les différents jours, il apparait que :

- pour le jour 7 : lorsque la valeur du TSH augmente (passage de 0,3 à 1 h), le flux de détachement  $F_{det}$  diminue très légèrement ( $F_{det \text{ TSH } 0,3 \text{ h}} = 4,953 \rightarrow F_{det \text{ TSH } 1 \text{ h}} = 4,760 \text{ } g_{DCO_x} \cdot m^{-2} \cdot j^{-1}$ ).
- par contre, au jour 14, les valeurs de  $F_{det \text{ TSH } 0,3 \text{ h}}$  et  $F_{det \text{ TSH } 1 \text{ h}}$  sont à l'équilibre pour les deux valeurs de TSH et le flux est égal à  $4,85 \text{ } g_{DCO_x} \cdot m^{-2} \cdot j^{-1}$ .
- Puis pour les jours 21 à 42, les valeurs de  $F_{det \text{ TSH } 0,3 \text{ h}} < F_{det \text{ TSH } 1 \text{ h}}$ .

On peut remarquer le même phénomène pour les flux d'oxygène  $F_{O_2}$  et de substrat  $F_s$ . Cette évolution peut s'expliquer par la croissance du biofilm. La variation de la valeur du TSH n'a pas d'influence au niveau du flux si l'on travaille avec un TSH court. Par contre, au TSH

long, le flux de substrat qui va vers le biofilm est plus faible. La diminution de flux est donc la conséquence de la faible croissance du biofilm pour le TSH de 8 h.

#### 5.2.4 Estimation des régimes de croissance dans le biofilm

Le calcul du facteur G permet d'évaluer et de caractériser le type de croissance et la structure de nos biofilms. Ce coefficient correspond au rapport du taux maximum de croissance de la biomasse sur le taux maximum de transport de substrat.

Le coefficient G calculé d'après les résultats expérimentaux, montre que pour les différents TSH, le facteur G est très élevé. Les simulations de Picioreanu *et al.* (1998) démontrent que lorsque le coefficient G est élevé, la structure du biofilm est sensible au changement et que le transfert devient de plus en plus limitant dans le biofilm. En effet, par des simulations, il avait montré l'influence de la rugosité de la surface, de la structure sur le transfert vers le biofilm.

La Figure 5-3 montre les valeurs du facteur G calculées à partir des données provenant de la simulation (courbes) et les valeurs calculées à partir des données expérimentales. La concentration en biomasse utilisée pour le calcul du G expérimental est la valeur moyenne de la densité du biofilm ( $19\ 000\ \text{g}_{\text{DCO}}\cdot\text{m}^{-3}$ ). On a utilisé cette même valeur pour le calcul du G simulé. Le coefficient de diffusion est celui du glucose à  $45^{\circ}\text{C}$  et le taux de croissance maximum est de  $22\ \text{j}^{-1}$ .

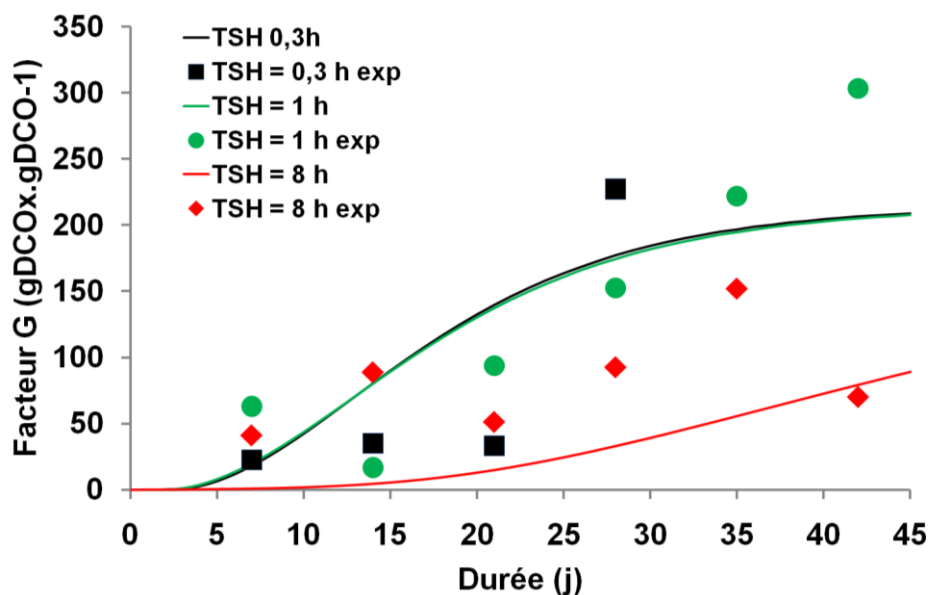


Figure 5-3 Evolution du facteur G calculé pour les trois conditions de croissance (TSH 0,3h (noir), 1h (vert) et 8h (rouge)) d'après les résultats de la simulation et des données expérimentales.



Nous remarquons que les valeurs obtenues à partir de la simulation sont similaires avec les valeurs expérimentales (TSH de 0,3 h et de 1h). Pour chaque valeur de TSH, les données simulées et expérimentales évoluent de la même manière. Pour une faible valeur du TSH, G passe de 40-45 à 225 voir 300 pour le TSH de 1 h. Alors que les simulations pour ces deux valeurs de TSH, donnent des G identiques (courbes noir et vert se superposent). On observe aussi que le facteur G est inférieur à 1 durant les trois premiers jours de croissance. Puis il commence de croître avant de se stabiliser à partir du 35<sup>ème</sup> jour pour un G de 210. Pour le TSH de 8h, la valeur du coefficient G est deux fois plus petite que les valeurs de G à TSH de 0,3 et 1 h. Après 40 jours, on obtient un G de 100. L'évolution de cette courbe nous indique que le biofilm croît lentement. La valeur de G est inférieure à 1 pendant les 7 premiers jours de la croissance du biofilm. Le biofilm est limité par sa croissance durant toute cette première période avant de commencer à croître. En effet, ce facteur G estime la quantité de biomasse produite suivant la quantité de substrat transportée.

Durant les 7 premiers jours, le biofilm est presque inexistant. Il n'y a pas de limitation du transport du substrat car l'épaisseur est très faible, et donc la diffusion se fait dans toute l'épaisseur du biofilm. Donc seul, la vitesse de croissance des cellules limite la croissance du biofilm, qui est elle-même limitée par le flux du substrat allant de la phase liquide vers le biofilm. Si l'on compare ces valeurs obtenues pour un TSH de 8 h avec les données expérimentales, il apparaît un écart de 60% entre les deux jeux de données. L'hypothèse la plus probable est que la valeur de G expérimental est biaisée par la valeur expérimentale de l'épaisseur du biofilm qui a été étudié à 8 h (entre les jours 0 et 28). Il ne peut être dû à la variation de la densité du biofilm observée expérimentalement. En effet, à l'échelle expérimentale, la densité du biofilm est de  $24 \text{ kg}_{\text{DCOx}} \cdot \text{m}^{-3}$  pour le TSH de 8h et au niveau du modèle la valeur est seulement de  $19 \text{ kg}_{\text{DCOx}} \cdot \text{m}^{-3}$ . Mais la modification de cette valeur au niveau du modèle entrainerait une diminution de l'épaisseur du biofilm au cours du temps.

L'analyse de ce facteur G « simulé » permet de mettre en évidence et de confirmer que le biofilm au cours de sa formation est limité par son épaisseur qui limite le transfert du substrat en profondeur. De plus, les variations des valeurs du flux vers le biofilm ( $F_s$ ) et ( $F_{O_2}$ ) qui sont bas pour le TSH de 8 h indiquent que l'augmentation du TSH diminue la vitesse de transport du liquide. Donc cela va provoquer également une limitation du transfert vers celui-ci. La croissance des microorganismes dans le biofilm exige un flux plus important de

substrat (augmentation des valeurs de  $F_{-S}$  et  $F_{-O_2}$  au cours du temps). Cela permet de mettre en évidence que même si le biofilm est toujours limité par le glucose, l'oxygène apporté au biofilm diminue avec l'augmentation de l'épaisseur du biofilm, ce qui vient confirmer que le biofilm est aussi limité par le transport de l'oxygène lorsque le TSH est court.

### 5.2.5 Bilans globaux

Le Tableau 5-3, présenté par la suite, donne les bilans globaux au cours du temps. Ils sont calculés d'après les sorties des trois simulations à TSH 0,3, 1h et 8h. Ces bilans prennent en considération tous les flux rapportés à la surface (qui dans notre cas est constante) qui sont présents dans le système du réacteur à biofilm. On a considéré que les flux d'entrée qui vont dans le réacteur se répartissent entre la biomasse planctonique et le biofilm. Connaissant le flux de substrat vers le biofilm (e) ainsi que le flux de biomasse détachée (h) et la concentration totale de biomasse dans l'effluent de sortie, il est possible d'estimer la quantité de biomasse planctonique réelle présente dans le réacteur (i). Les débits utilisés sont les débits spécifiques à nos trois études ( $86,4 \text{ L.j}^{-1}$ ,  $28,8 \text{ L.j}^{-1}$  et  $3,4 \text{ L.j}^{-1}$  pour des TSH de 0,3 h, 1 h et 8 h respectivement). Les flux sont calculés par rapport à une surface  $A_f$  de  $0,252 \text{ m}^2$ . Le taux de conversion  $Y_H$  est de  $0,42 \text{ g}_{\text{DCO}_x} \cdot \text{g}_{\text{DCO}}^{-1}$ . Les calculs des flux sont décrits dans le Tableau 5-3 par la ligne « calcul ». La conversion de la  $\text{DCO}_x$  en DCO a été faite à partir des bilans globaux sur la biomasse et sur le substrat, des paramètres cinétiques et du taux de conversion  $Y_H$ .

Tableau 5-3 Tableau récapitulatifs de bilans matières globaux obtenus par la simulation dans des réacteurs à biofilm, pour les trois valeurs des TSH.

Flux	entrée glucose	sortie glucose	substrat total consommé dans le système	substrat consommé par le biofilm	sortie biomasse planctonique active (totale)	sortie biomasse planctonique inerte (totale)	Détachement du biofilm	Biomasse active planctonique réel
calcul	a	b	d=a-b	e	f	G	h	i=f+g-h
unité	$g_{DCO}.m^{-2}.j^{-1}$							
période (j)								
<b>TSH 0,3 h</b>								
7	24,456	9,453	15,003	12,910	13,869	0,003	11,793	2,079
14	24,456	9,552	14,904	13,030	13,429	0,003	11,579	1,853
21	24,456	9,617	14,839	13,090	13,249	0,003	11,526	1,725
28	24,456	9,651	14,805	13,120	13,200	0,003	11,533	1,669
35	24,456	9,665	14,791	13,130	13,192	0,003	11,550	1,644
42	24,456	9,672	14,784	13,130	13,192	0,003	11,564	1,630
<b>TSH 1 h</b>								
7	24,457	3,010	21,447	12,430	20,220	0,003	11,333	8,887
14	24,457	3,181	21,277	13,020	19,703	0,003	11,569	8,134
21	24,457	3,289	21,168	13,360	19,491	0,003	11,802	7,689
28	24,457	3,345	21,112	13,540	19,434	0,003	11,974	7,460
35	24,457	3,374	21,083	13,620	19,423	0,003	12,074	7,349
42	24,457	3,386	21,071	13,660	19,423	0,003	12,129	7,295
<b>TSH 8 h</b>								
7	24,453	0,048	24,405	0,656	22,808	0,008	0,579	22,237
14	24,453	0,047	24,405	1,197	22,749	0,008	1,040	21,718
21	24,453	0,047	24,406	1,624	22,678	0,009	1,370	21,317
28	24,453	0,047	24,405	1,815	22,606	0,009	1,475	21,140
35	24,453	0,048	24,405	1,899	22,547	0,009	1,479	21,077
42	24,453	0,048	24,404	1,939	22,498	0,009	1,456	21,051

Le Tableau 5-3 montre que la charge surfacique d'entrée est la même pour les trois conditions testées, mais que le flux surfacique en glucose (b) dans l'effluent liquide diminue avec le temps de séjour. Il passe de 9 à 3 puis à 0,048  $\text{g}_{\text{DCO}}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{j}^{-1}$  entre les TSH de 0,3h, 1h et 8 h. Donc, la consommation de substrat évolue avec le temps de séjour hydraulique (d). La concentration de biomasse active en sortie (f) regroupe la biomasse qui a poussé dans le liquide (i) et celle qui s'est détachée du biofilm (h).

Nous remarquons que le flux de biomasse en sortie (f) augmente fortement avec le temps de séjour. Il varie entre 13 et 19 puis entre 19 et 22  $\text{g}_{\text{DCO}}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{j}^{-1}$  pour des valeurs de TSH de 0,3h, 1h et 8 h. Ce flux est dominant durant les premiers jours de la croissance du biofilm, puis il diminue lorsque le biofilm apparaît. La colonne de calcul (i) donne la quantité réelle de biomasse qui est produite dans la phase liquide. On peut voir au jour 7, que l'on a une forte croissance de la biomasse planctonique, mais celle-ci décroît avec le temps pour les trois cas d'étude abordés (cf. *Tableau 5-2*).

Ce tableau met aussi en évidence la domination du détachement pour le TSH de 0,3h (11  $\text{g}_{\text{DCO}}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{j}^{-1}$ ) et de 1h par rapport à la production de biomasse planctonique dans le système. En effet, nous pouvons confirmer, d'après ces données que la biomasse détachée du biofilm, que celle-ci présente dans le liquide pour un TSH de 0,3 h et que sa quantité est supérieure par rapport à la biomasse planctonique produite dans la phase liquide. Pour le TSH de 1 h, on a la même domination mais son influence est moins marquée car la production de biomasse planctonique est un peu plus importante, la vitesse de lessivage étant un peu plus faible. Nous pouvons penser que dans ce dernier cas de figure, la quantité de biomasse présente dans le milieu liquide est proche de la quantité « produite » dans le biofilm car le flux de détachement représente plus de la moitié de la biomasse planctonique présente dans le milieu liquide.

### 5.2.6 Discussion

Cette première approche par la modélisation nous a permis de confirmer et d'expliquer les résultats que nous avons obtenus au cours des expériences. Il apparaît clairement que le TSH a une influence importante sur la répartition de la biomasse dans le réacteur mais aussi sur la croissance du biofilm. En effet, pour un TSH faible, le biofilm est bien plus important en termes d'épaisseur et de croissance de la biomasse. Il a été mis en avant que les flux qui vont

vers le biofilm diminuent avec l'augmentation du TSH. La présence en abondance de la biomasse dans le milieu liquide et les processus de convection dans le liquide facilitent le transport (de Beer et Stoodley, 1995; Stewart, 2003) et la consommation du substrat par cette biomasse planctonique au détriment de la consommation par le biofilm. Ces phénomènes limitent donc le flux du substrat vers biofilm (cas TSH à 8h). Cela permet aussi d'expliquer la faible concentration en substrat que l'on a observé au niveau des résultats de la simulation.

Pour les TSH courts, la croissance du biofilm est possible car le lessivage important de la biomasse permet d'avoir un flux de substrat vers le biofilm qui est plus élevé et de limiter le flux de substrat vers la biomasse planctonique qui est lessivée. De plus, la présence de biomasse détachée en quantité importante au niveau de la biomasse libre indique que la quantité de biomasse planctonique est négligeable pour le temps de séjour de 0,3 h. Cette faible croissance peut aussi expliquer l'augmentation de la valeur de la concentration en substrat au sein du milieu liquide

Donc, le glucose, mobilisé par la biomasse planctonique, est apporté en faible quantité aux cellules attachées. De plus, toute la biomasse présente dans le liquide ne provient pas seulement de la croissance mais aussi du détachement. D'après les résultats obtenus par simulation, le flux de détachement est important pour les TSH courts et la croissance dans le liquide est quasi inexistante. Cela permet d'affirmer que la majeure partie de la biomasse présente dans le liquide est issue du détachement du biofilm et non de la croissance. Cette présence de biomasse détachée peut expliquer la présence de biomasse planctonique pour des TSH courts ne permettant pas la croissance (cas du réacteur A pour un TSH de 0,3 h). Cela peut aussi justifier et expliquer les résultats obtenus en microbiologie, c'est-à-dire que les populations présentes dans le liquide sont similaires aux populations du liquide pour un TSH court.

Cependant, la différence importante qui existe entre les concentrations du substrat résiduel peut se justifier au niveau des expériences par la croissance de la biomasse détachée, ou bien que par le stockage d'une partie du substrat. Il aurait été intéressant de compléter nos données expérimentales en faisant une étude plus précise de la biomasse planctonique en sorties du réacteur, en adaptant, par exemple un système de mesure granulométrique afin d'identifier la biomasse qui peut être détachée et celle qui croit dans le liquide. Maintenant, un modèle multi-espèces va être utilisé pour caractériser la distribution des espèces entre le biofilm et la

phase liquide. Ce modèle permet de concrétiser les observations faites dans le chapitre 4 avec les analyses statistiques.

### 5.3 Modèle multi-espèces

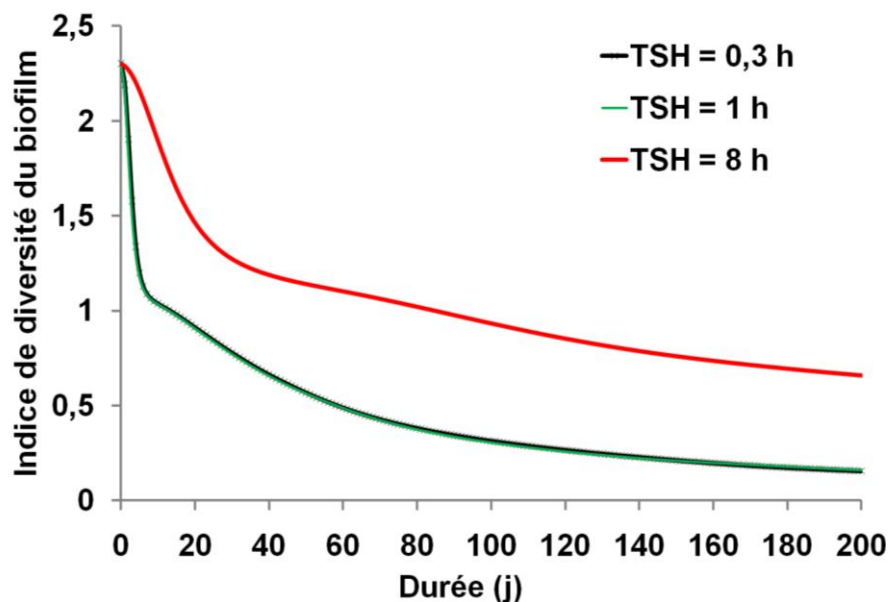
Dans cette deuxième partie, nous avons modifié le modèle pour y introduire une certaine diversité microbienne. Le modèle multi-espèce utilisé correspond à plusieurs modèles mono-espèces qui sont simulés simultanément. Chaque biomasse identifiée ( $X_{\text{het}1}$ ,  $X_{\text{het}2}\dots$ ) va correspondre à une espèce qui va se développer dans notre réacteur à biofilm. Il a été simulé 10 biomasses différentes dans notre modèle. Ces biomasses diffèrent par leurs paramètres cinétiques. Les valeurs des couples du taux de croissance et de la constante d'affinité de Monod ont été choisies après plusieurs tests réalisés sous AQUASIM®. Ces tests consistaient à faire varier la valeur de  $\mu_H$  et de  $K_S$  à plus ou moins 1%, 2%, 5% et 10% autour des valeurs du modèle mono-espèce. L'originalité de notre approche est de développer un système simple mais faisant intervenir la multiplicité au niveau de la biomasse, donc les paramètres  $\mu$  et  $K_S$  ont été choisis de manière à illustrer et expliquer nos résultats expérimentaux. Pour établir les valeurs de nos paramètres, il aurait été intéressant d'utiliser une méthode de filtrage des données pour pouvoir caler nos petits modèles aux données expérimentales comme l'a réalisé Ramirez *et al.* (2009) Il est apparu que des couples choisis dans une gamme de 2% autour de la valeur de  $\mu_H$  et de  $K_S$  sont les valeurs les plus propices pour illustrer la compétition dans le réacteur. Un indice de diversité calculé sous AQUASIM® nous a influencés dans le choix de ces coefficients. Chaque couple est défini à partir de trois valeurs de  $\mu_H$  à 2% (21,56, 22 et 22,44  $\text{j}^{-1}$ ) et trois valeurs de  $K_S$  à 2% (19,6, 20 et 20,4  $\text{mg}_{\text{DCO}_x}\cdot\text{L}^{-1}$ ). Le dernier couple a été choisi à partir des différents résultats de simulations réalisées qui mettent en évidence une espèce dominante. Le  $\mu_H$  choisi est de 23  $\text{j}^{-1}$  et le  $K_S$  de 20  $\text{mg}_{\text{DCO}_x}\cdot\text{L}^{-1}$ . La valeur  $\mu_H$  est supérieure aux autres valeurs de  $\mu_H$  car nous souhaitons approcher par ce modèle, la stratification des espèces dans le biofilm et faire le lien avec nos résultats obtenus en microbiologie.

La concentration initiale ( $X_{\text{het-initiale}}$ ) a été fixée à 13,4  $\text{mg}_{\text{DCO}_x}\cdot\text{L}^{-1}$  pour chaque biomasse étudiée ( $X_{\text{het-initiale}_1} = X_{\text{het-initiale}_2} = \dots$ ) de manière à ce que le cumul de  $X_{\text{het-initiale}}$  soit égal à 134  $\text{mg}_{\text{DCO}_x}\cdot\text{L}^{-1}$ . Cette valeur correspond à la concentration initiale utilisée pour faire les simulations avec le modèle mono-espèce. Les simulations ont été faites pour les trois valeurs

de TSH. La répartition des différentes biomasses dans le liquide et dans le biofilm a été évaluée sur une période de 200 jours. Le logarithme négatif de Simpson, obtenu d'après l'expression de l'indice de diversité de Simpson, a été utilisé comme indice pour estimer la diversité de notre biomasse. Il sera appelé dans la suite de ce paragraphe Indice de Diversité (ID).

### 5.3.1 Suivi de la diversité du biofilm et de la biomasse planctonique

Afin de faire la caractérisation de la compétition entre les espèces présentes dans le biofilm et le liquide, une première approche a été d'estimer la diversité dans notre biomasse au cours du temps. Un indice de diversité a été calculé à partir des valeurs de la fraction de la biomasse qui est présente dans le biofilm et dans le liquide. La Figure 5-4 présente l'ID obtenu dans leu biofilm au cours du temps.



**Figure 5-4** Dynamique de l'indice de diversité (calculé d'après le logarithme négatif de Simpson) pour le biofilm suivant les trois conditions d'études abordées (TSH 0,3h (noir), 1h (vert) et 8h (rouge)).

D'après la Figure 5-4, la valeur de l'ID évolue de manière décroissante au cours du temps. Pour des valeurs de TSH de 0,3 h et 1 h, l'ID est identique dans le biofilm, ce qui laisse penser que les deux biofilms possèdent les mêmes biomasses. Sa valeur passe de 2,3, au jour 0, puis à 1,1 au jour 7, et 0,7 au jour 42. Puis il continue de décroître jusqu'à atteindre une valeur de 0,1 voir 0,05 après 200 jours de croissance.

Pour le TSH de 8 h, l'ID évolue de manière différente des autres temps de séjour. Il est de 2,4 au jour 7, puis de 1,1 au jour 42 avant de continuer à décroître pour atteindre une valeur de 0,6 au 200<sup>ème</sup> jour. Cette différence entre les données du TSH de 8 h et celles des TSH faibles, nous montre que la biomasse est plus diversifiée et riche dans notre biofilm pour des TSH élevés.

Dans ce cas, le TSH a bien une influence sur la diversification de la biomasse (indice calculé sur 10 biomasses) tandis que dans le chapitre 4, l'indice de diversité présenté prend en considération des paramètres liés au nombre d'espèces estimé à partir des profils microbiens (des dizaines d'espèces présentes). En effet, si nous comparons cet indice avec les valeurs mesurées à partir des profils CE-SSCP, nous observons que durant les 42 premiers jours de croissance, l'ID mesuré expérimentalement a une dynamique d'évolution faible. En effet, les valeurs de l'ID<sub>expérimental</sub> varient autour de 2,89 +/- 0,54 pour un TSH de 8h, de 2,44 +/- 0,43 pour un TSH de 1 h, et de 2,56 +/- 0,49 pour le TSH de 0,3 h. L'écart qui existe entre les valeurs de l'ID simulées et mesurées expérimentalement, est donc probablement lié à l'extrême simplification proposée dans le modèle (10 espèces avec la même distribution initiale).

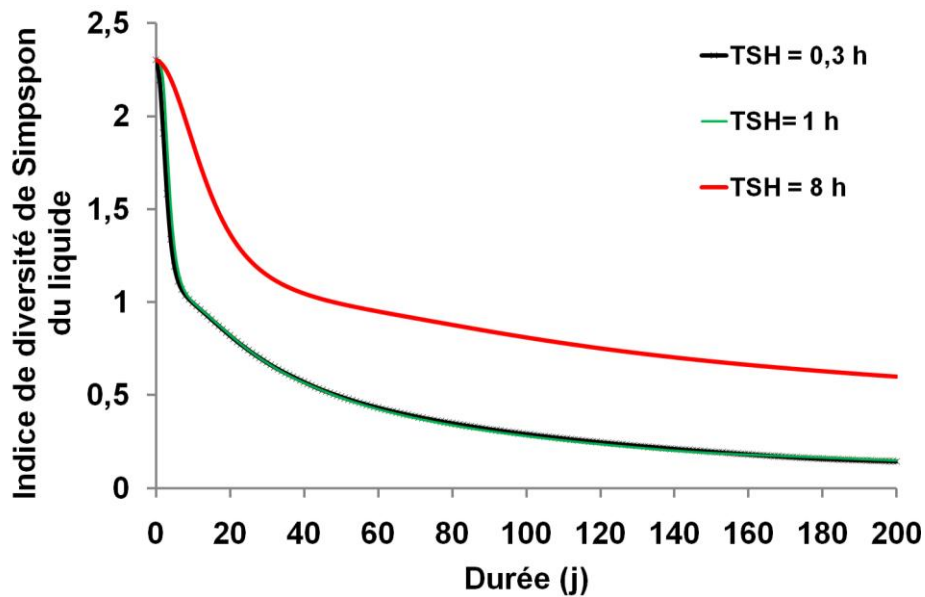
La réalité est évidemment beaucoup plus complexe, et pour pouvoir faire une bonne comparaison des indices de diversité, il faudrait prendre en considération le même nombre d'individu. Les indices de Simpson, calculés en microbiologie, prennent en considération l'abondance des espèces dans une population, pas l'abondance spécifique à « chaque » espèce, c'est-à-dire que nos empreintes moléculaires ne permettent pas de connaître la richesse réelle de l'échantillon car les espèces les plus rares sont masquées par les espèces dominantes et le bruit de fond (Forney *et al.*, 2004). Pour le calcul de l'ID obtenu par simulation, il a été considéré la quantité de biomasse produite réellement dans notre compartiment biofilm. Donc cette différence au niveau entre les résultats simulés et les valeurs expérimentales peut provenir des différentes origines utilisées pour calculer cet indice.

La Figure 5-5 présente la dynamique de l'indice de la diversité dans la phase liquide.

Pour les trois cas, l'ID décroît au cours du temps. Les courbes ont la même dynamique que celles obtenues pour le biofilm. De plus, les valeurs estimées par le modèle sont du même ordre de grandeur avec les valeurs identifiées pour l'ID en microbiologie. Nous avons trouvé



que sa valeur varie autour de 2,99 +/- 0,44 pour un TSH de 8 h et de 2,27 +/- 0,39 et 2,07 +/- 0,29 pour des TSH de 0,3 h et 1 h respectivement.



**Figure 5-5** Dynamique de l'indice de diversité (calculé d'après le logarithme de Simpson) pour la phase liquide suivant les trois conditions d'études abordées (TSH 0,3h (noir), 1h (vert) et 8h (rouge)).

Au TSH de 8h, les valeurs d'ID sont légèrement plus faibles dans la phase liquide que dans le biofilm : 2 au jour 7, 1 au jour 42 et, 0,6 au 200<sup>ème</sup> jour de croissance du biofilm. Il apparaît que, après comparaison avec les valeurs présentées sur la Figure 5-4, la diversité de la biomasse planctonique est plus faible que celle du biofilm.

La dynamique de l'ID montre donc que les communautés microbiennes dans le biofilm et dans le liquide se simplifient au cours du temps. Mais il est intéressant de constater que cette dynamique et le degré de similitude dans l'évolution du biofilm et de la biomasse planctonique dépendent du TSH.

### 5.3.2 Influence du TSH sur la distribution des espèces dans la biomasse planctonique

La Figure 5-6 présente la dynamique temporelle de la distribution des différentes biomasses dans la phase liquide sur 200 jours. Cette Figure 5-6 a été obtenue à partir des concentrations des dix biomasses dans la phase liquide. Elle met en avant les espèces dominantes et celles qui disparaissent au cours du temps. Chaque biomasse est définie suivant un couple  $\mu_H$  et  $K_s$ .

Les valeurs de ces différents couples ont été résumées au sein du chapitre 2. Le Tableau 2-9 est rappelé ci-dessous, afin d'avoir une référence visuelle des couples  $\mu_H$  et  $K_S$  simulés par notre modèle :

**Tableau 2-9 Paramètres biologiques pour différentes espèces hétérotrophes.**

Numéro de l'espèce $X_{het}$	Taux de croissance spécifique maximum $\mu_H$ ( $j^{-1}$ )	Constante d'affinité pour le substrat $K_S$ ( $g_{DCO}.m^{-3}$ )
1	21,56	19,6
2	21,56	20
3	21,56	20,4
4	22	19,6
5	22	20
6	22	20,4
7	22,44	19,6
8	22,44	20
9	22,44	20,4
10	23	20

D'après la Figure 5-6, nous remarquons que pour l'ensemble des résultats obtenus, une espèce devient rapidement dominante quel que soit le temps de séjour étudié. Les 10 espèces présentes dans le réacteur se maintiennent toutes durant les huit premiers jours (pour toutes les valeurs de TSH), mais une rapide sélectivité apparaît pour les TSH de 0,3 h et 1 h. Certaines espèces présentes dans le liquide sont rapidement lessivées et celles qui possèdent un taux de croissance élevé ( $\mu_H \geq 22$ ) et une constante d'affinité  $K_S$  faible ( $K_S \leq 20$ ) restent majoritairement présentes dans le milieu liquide et continuent de croître au cours du temps. C'est le cas pour les biomasses  $X_{het10}$  et  $X_{het7}$  qui possèdent respectivement des taux de croissance  $\mu_H$  de 23 et 22,44  $j^{-1}$  et des  $K_S$  de 20 et 19,6  $mg_{DCOx}.L^{-1}$ . Le taux de croissance observé ( cf. cas B, Figure 1-4).

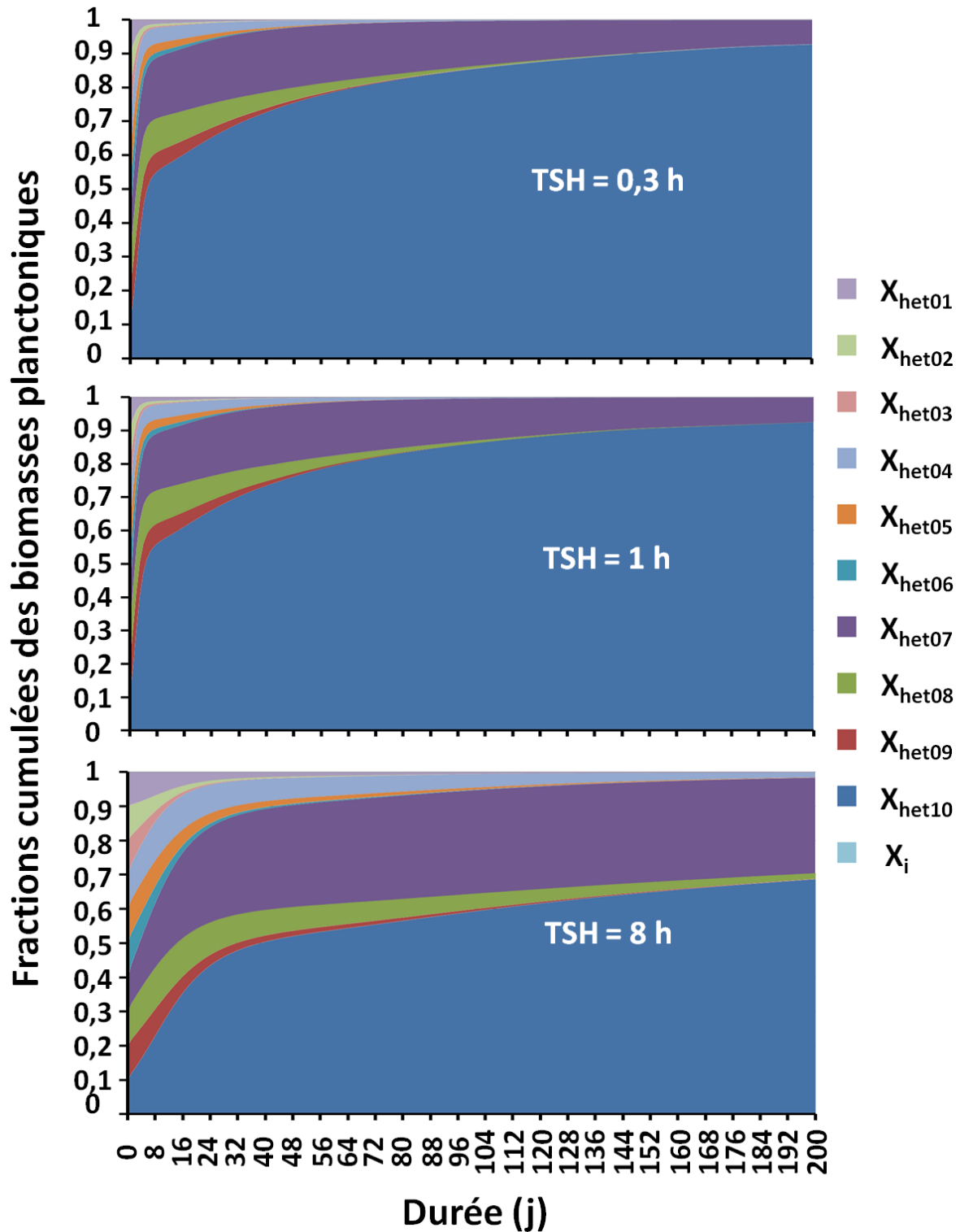


Figure 5-6 Evolution de la prédiction de la fraction cumulée des 10 biomasses obtenues dans la biomasse planctonique à l'aide d'AQUASIM® au cours du temps (l'axe des abscisses correspond à l'échelle de temps exprimé en jour).

Si l'on devait ordonner les espèces suivant leur abondance (cf. Figure 5-6), il semble que  $X_{het10} > X_{het7}$  à 200 jours lorsque le TSH est court. Par contre, pour le TSH de 8 h, le nombre d'espèces qui se maintiennent dans la phase liquide est plus élevé, l'ordre des abondances est

$X_{het10} > X_{het7} > X_{het8} > X_{het4}$  au jour 200. C'est-à-dire que  $X_{het10}$  représente la biomasse la plus abondante et  $X_{het4}$  la biomasse la moins abondante et présente dans la biomasse totale. La population  $X_{het10}$  qui a le taux de croissance le plus élevé se développe prioritairement, ce qui explique la diminution rapide de l'indice de diversité. La biomasse inerte est quasi-inexistante car au niveau du modèle elle s'accumule dans le compartiment du biofilm.

Si l'on observe respectivement leur valeur de  $\mu_H$ , pour un TSH de 8h, nous avons  $23 > 22,44 > 22,44 > 22$  et pour  $K_S$ , nous avons  $20 > 19,6 > 20 > 19,6$  si l'on suit l'ordre de classements des biomasses. Donc nous voyons que nos biomasses se développent en fonction de la valeur du taux de croissance, mais aussi en fonction de  $K_S$  : seules les biomasses qui possèdent une valeur de  $K_S$  inférieure ou égale à la valeur de  $K_S$  de la biomasse dominante ( $X_{het10}$ ), restent présentes. En effet, des simulations non présentées ici et réalisées pour choisir les valeurs du dernier couple  $\mu_{H10}$  et  $K_{S10}$ , ont confirmé ce point. De plus, cette démarche montre la présence de biomasses qui peuvent coexister ou qui ne peuvent pas coexister suivant la valeur du TSH choisie.  $\mu_H$  et  $K_S$  sont bien les facteurs cinétiques qui gèrent la compétition (Harder et Kuenen, 1977) dans notre modèle. Il aurait peut-être été intéressant de voir l'effet de la variation du taux de décès, et de voir si une population dominerait plus que les autres.

Le temps de séjour a bien une influence sur la structure des populations de la biomasse. Si l'on rapproche ces résultats observés par la simulation avec les données microbiologiques, on obtient une évolution similaire en termes de différences entre les populations bactériennes obtenues dans le liquide. Les résultats expérimentaux obtenus en microbiologie ont montré que pour la phase liquide, les populations pour des TSH courts étaient proches entre elles, par contre lorsque le TSH augmente, celles-ci divergent. Les résultats de la simulation montrent que, pour la phase liquide, cette compétition des espèces dans les populations planctoniques est liée au TSH. Plus le TSH est long, plus il y aura des espèces qui se maintiennent dans la phase liquide. Au niveau du nombre d'espèces qui se développent, le modèle se limite seulement à dix espèces et ne peut pas représenter la diversité réelle qui existe dans les populations étudiées en microbiologie.

Pour des TSH courts, il est apparu que les biomasses au niveau du modèle étaient très proches (seulement deux espèces  $X_{het10}$  et  $X_{het7}$ ), et qu'il en était de même au niveau des résultats expérimentaux (on avait, pour le résultat du t-test 15% de différence entre les populations de

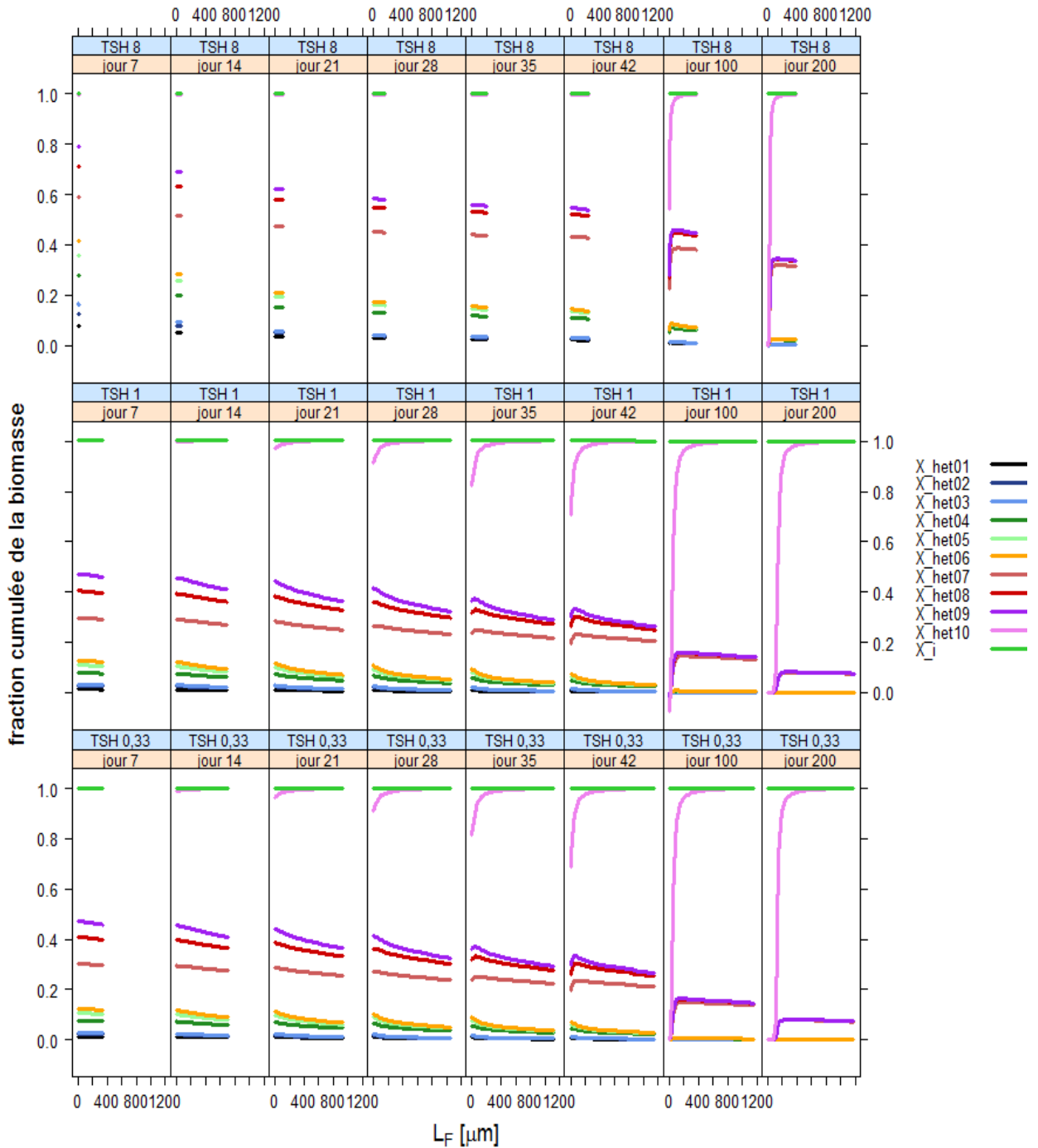
liquide pour les TSH courts et environ 35% entre les groupements TSH courts et le TSH fort). Cela peut s'expliquer par une croissance dans le milieu liquide qui est très peu présente car la biomasse est lessivée. Les résultats expérimentaux ont également montré que les populations du liquide et du biofilm sont proches pour un faible TSH (20% pour le TSH de 0,3h et 33% pour le TSH de 1 h). Nous en avons conclu que cette biomasse présente dans la phase liquide provenait du détachement du biofilm. Pour confirmer cette hypothèse, nous avons estimé l'évolution de la compétition microbienne présente dans le biofilm au cours du temps et suivant les trois conditions testées.

### 5.3.3 Influence du temps de séjour sur la distribution des espèces dans le biofilm

Nous avons recherché ensuite à caractériser par la simulation la distribution des espèces dans le biofilm. La Figure 5-7 présente les résultats obtenus en simulations pour la distribution de la biomasse dans la profondeur du biofilm et pour les trois temps de séjour : 0,3 h, 1h et 8 h. Dans cette Figure 5-7, les différents biofilms ont été représentés dans un tableau afin de pouvoir comparer les évolutions de la distribution des différentes espèces dans l'épaisseur du biofilm au cours du temps. Chaque ligne correspond à une valeur de TSH, chaque colonne à un temps donné correspondant aux dates de prélèvements des expériences. Pour chaque cellule, on a la distribution des espèces (en ordonnée) en fonction de l'épaisseur (en abscisse).

Si on fait une analyse TSH par TSH au cours du temps, on observe que pour un temps de séjour de 8 h, les dix biomasses se développent au niveau de notre biofilm (jour 7) avec la biomasse inerte. Puis, au cours du temps, les espèces qui ont un couple  $\mu_H$  et  $K_S$  favorable continuent de croître et deviennent dominante dans le biofilm avec la biomasse inerte qui continue à s'accumuler. En effet, lorsque l'épaisseur du biofilm augmente, les espèces qui ont les couples ( $\mu_H$  et  $K_S$ ) les plus favorables se développent dans la couche du biofilm. Pour le TSH de 8h, toutes les espèces présentes dans le réacteur colonisent le support et se développent au fur et à mesure de la croissance du biofilm. La croissance du biofilm étant très lente, la diversité au niveau de la biomasse perdure dans le temps pendant les 50 premiers jours pour diminuer progressivement par la suite. Si on analyse les résultats obtenus aux TSH de 0,3h et 1h, les évolutions de la distribution des biomasses au sein du biofilm sont identiques. Au jour 7, cinq biomasses dominent dans le biofilm  $X_{het10} > X_{het07} > X_{het08} > X_{het09} > X_{het04}$  avec une biomasse inerte faible. Ces cinq biomasses représentent environ

83% du volume global de biofilm. Les autres biomasses sont aussi présentes, mais en très faibles quantités, avant de disparaître au cours du temps.



**Figure 5-7** Dynamique de la distribution de la biomasse au sein du biofilm, pour les 3 TSH. Cette distribution est présentée pour les jours 7, 14, 21, 28, 35, 42, 100 et 200. Ces fractions sont cumulées et sont représentées en fonction de leur épaisseur du biofilm (0 indique le support, 1200 l'épaisseur maximale). X<sub>het,i</sub> représente les différentes biomasses et X<sub>i</sub> la biomasse inerte.

Les espèces  $X_{het10}$  et  $X_{het07}$  qui possèdent les couples  $\mu_H$  et  $K_S$  favorables vont dominer dans le biofilm après une longue période ( $t = 200$  jours) avec la biomasse inerte.

Nous remarquons aussi que dans la profondeur du biofilm, les biomasses possédant des couples  $\mu_H$  et  $K_S$  défavorables restent présentes plus longtemps, alors que dans la couche supérieure du biofilm elles disparaissent rapidement au profit des biomasses ayant un couple  $\mu_H$  et  $K_S$  favorables comme dans la phase liquide. Le temps de rétention des microorganismes est donc différent pour les espèces présentes dans la profondeur du biofilm et en surface. L'âge local des boues est différent. On a donc une diversité plus élevée à la base du biofilm qu'à la surface. Ce résultat a été observé expérimentalement dans des conditions très similaires par Rochex *et al.* (2009). Ce temps de rétention cellulaire va être fonction du détachement présent.

Au niveau des simulations, les biomasses ( $X_{het10}$ ,  $X_{het07}$ ) sont présentes à la fois dans le liquide et dans le biofilm, pour toutes les conditions d'études. Cependant, lorsqu'on travaille à un TSH de 0,3 h ou de 1 h, les biomasses présentes dans le biofilm (en profondeur, près du support, donc dans la couches base) sont  $X_{het10} > X_{het07} > X_{het08} > X_{het04} > X_{het09}$  avec de la biomasse inerte  $X_i$  et  $X_{het10} > X_{het08} > X_{het07} > X_{het04}$  dans le liquide au bout de 42 jours. Les biomasses sont presque identiques. Par contre, pour le TSH de 8 h, les 10 biomasses  $X_{het10}$ ,  $X_{het09}$ ,  $X_{het08}$ ,  $X_{het07}$ ,  $X_{het06}$ ,  $X_{het05}$ ,  $X_{het04}$ ,  $X_{het03}$ ,  $X_{het02}$ ,  $X_{het01}$  sont présentes dans le biofilm à 42 jours, alors que dans le liquide, nous n'en avons que 7. Nous voyons les biomasses  $X_{het10}$ ,  $X_{het08}$ ,  $X_{het07}$ ,  $X_{het05}$ ,  $X_{het04}$ ,  $X_{het02}$ ,  $X_{het01}$ .

Il existe bien une différence entre les biomasses du liquide et du biofilm qui est fonction du TSH. A l'échelle expérimentale, il avait été démontré que les populations du biofilms changeaient avec la valeur du TSH. Le t-test rapporte que la différence entre les populations augmentait avec la valeur du TSH. Les valeurs passaient de 20% à 33% entre 0,3 h et 1 h à 71% pour un TSH de 8h.

Les données expérimentales présentées dans le chapitre 4 vont dans le même sens que les données obtenues par simulation. En effet, ces données expérimentales montrent que, lorsque le TSH est court, les communautés microbiennes sont proches entre le liquide et le biofilm alors qu'elles divergent avec un TSH long.

Maintenant si nous nous intéressons à la stratification dans le biofilm et que nous comparons les espèces présentes dans la couche basale du biofilm et dans la couche supérieure (coté liquide), il en ressort que :

- Pour un TSH court à 42 jours : dans la couche basale, les espèces présentes sont  $X_{het10} > X_{het07} > X_{het08} > X_{het04} > X_{het05} > X_{het09} > X_{het06}$  et  $X_i$ . Alors que dans la couche supérieure, on trouve  $X_{het10} > X_{het07} > X_{het08} > X_{het04} > X_{het09}$ . Les espèces ( $X_{het05}$  et  $X_{het06}$ ) sont présentes dans la couche basale alors qu'elles ne sont pas présentes à la surface du biofilm. Si l'on compare les résultats au bout de 200 jours, il apparaît seulement deux espèces qui dominent dans la couche supérieure du biofilm contre 4 dans la couche basale
- Pour le TSH long à 42 jours, il apparaît que les dix espèces ( $X_{het10}$ ,  $X_{het09}$ ,  $X_{het08}$ ,  $X_{het07}$ ,  $X_{het05}$ ,  $X_{het04}$ ,  $X_{het02}$ ,  $X_{het01}$ ) sont présentes à la fois dans la couche supérieure et inférieure du biofilm car celui-ci à une épaisseur faible.

Donc le biofilm pour un court TSH, présente dans la profondeur de son épaisseur une stratification des espèces. La couche basale est plus « diversifiée » ou riche (Jackson *et al.*, 2001 ; Rochex *et al.*, 2009) que la couche supérieure du biofilm.

Cette stratification évolue au cours du temps, il apparaît que les espèces possédant le taux de croissance le plus élevé se situent dans la couche supérieure du biofilm.

Si l'on compare avec les espèces présentes dans le liquide au 42<sup>ème</sup> jour, il apparaît que (cf. Figure 5-6):

- Pour des TSH courts  $X_{het10} > X_{het07} > X_{het08} > X_{het04} > X_{het09}$  sont présentes dans la phase liquide.
- Pour des TSH élevés (8h) : on a dans le liquide :  $X_{het10}$ ,  $X_{het09}$ ,  $X_{het08}$ ,  $X_{het07}$ ,  $X_{het06}$ ,  $X_{het05}$ ,  $X_{het04}$ ,  $X_{het02}$ ,  $X_{het01}$ .

Il apparaît donc que les populations entre les deux phases liquides (TSH courts et longs) ont une composition différente. Il apparaît aussi que les espèces présentes dans le liquide sont celles présentes dans la couche supérieure du biofilm (on a 5 espèces pour chaque phase). Ces résultats confortent les observations faites en microbiologie. Pour le TSH de 8 h, on peut voir que 9 espèces sont présentes dans la phase liquide alors que 10 espèces sont présentes au sein du biofilm pour le jour 42. La distribution entre les espèces du biofilm et du liquide semble différente mais cela est peu visible à 42 jours. Si l'on fait la même comparaison au jour 200, il



en ressort que 4 espèces sont présentes dans le liquide et 5 dans le biofilm. Les espèces présentes dans le liquide ne proviennent pas du détachement mais plutôt de la croissance car les espèces dans le biofilm et le liquide sont différentes. Cette approche confirme les résultats obtenus en microbiologie. La différence entre le biofilm et le liquide était importante (ANOSIM-R =0,74 et 74% pour le t-test).

#### 5.3.4 Discussion

Durant la croissance d'un biofilm, les espèces qui possèdent un  $\mu_H$  élevé et un  $K_S$  faible vont croître plus rapidement et dominer petit à petit dans la communauté du biofilm. Ce phénomène est observé quel que soit le TSH. Cependant, lorsque celui-ci est élevé, le processus de croissance du biofilm est plus lent en raison de la compétition avec les bactéries libres qui peuvent se maintenir dans le réacteur. Ce phénomène laisse du temps aux autres bactéries présentes de se développer, ce qui permet d'avoir un biofilm plus riche.

Cette étude montre, outre l'effet direct du TSH sur la compétition entre la flore planctonique et le biofilm (qui se traduit par un lessivage plus ou moins important de la biomasse), que l'on a un effet indirect sur le biofilm et la structuration des populations qui le composent. Le TSH a un effet direct sur la vitesse de croissance du biofilm et donc la vitesse à laquelle le biofilm atteint un équilibre entre croissance et détachement. Des études ont montrées que l'hétérogénéité de la structure du biofilm peut influencer les propriétés physiques (densité, diffusion...); cette hétérogénéité peut influencer aussi la composition biologique et chimique (Zhang et Bishop, 1994b, Okabe *et al.* 1996). De plus, les études de Jackson *et al.* (2001) ont mis en avant qu'il existe une stratification des espèces au sein du biofilm. Notre étude met en évidence que la stratification des espèces dans le biofilm va jouer un rôle dans la distribution des espèces de la biomasse attachée et planctonique.

L'approche de la compétition entre le biofilm et le liquide a permis de mettre en évidence l'importance de la structure du biofilm. En effet, les espèces qui sont dans le liquide proviennent de la croissance dans cette phase mais aussi du détachement du biofilm. La structuration du biofilm va donc jouer un rôle sur la dynamique de la diversité. Le biofilm est plus diversifié en profondeur qu'à sa surface. Même s'il existe des liens avec la croissance, une étude récente (Rochex *et al.*, 2009) avait montré que la couche basale du biofilm était

plus diversifiée. La composition en espèces microbiennes de la fraction planctonique est directement liée à celle de la couche externe du biofilm sujette au détachement lorsque le TSH est faible. Pour le TSH de 8 h, même si la croissance du biofilm est lente, il est apparu que ce biofilm est plus diversifié que le biofilm cultivé pour des valeurs de TSH faible.

## 5.4 Synthèse

Ce chapitre avait pour objectif de caractériser et d'expliquer par des outils mathématiques, l'influence du TSH sur la distribution de la biomasse et des espèces qui la composent. Deux approches ont donc été réalisées en modélisation en faisant varier le temps de séjour dans un système mono-espèce et multi-espèces.

- Concernant la distribution de la biomasse dans le réacteur, le temps de séjour a une influence sur la croissance de la biomasse dans le liquide mais aussi dans le biofilm.
- Les variations de la concentration en substrat résiduel sont liées à la croissance de la biomasse planctonique qui est plus ou moins lessivée suivant le temps de séjour. De plus, la croissance du biofilm est très différente suivant le TSH.
- Concernant la distribution des flux du substrat au sein du système, la présence de biomasse planctonique limite l'apport de substrat vers le biofilm. Cela signifie que le flux de détachement est plus faible lorsque le TSH est important.
- Les espèces qui sont présentes dans la couche supérieure du biofilm sont les mêmes que les espèces présentes dans la phase liquide. Le flux de détachement entraîne les espèces en surface s'il y a un phénomène d'érosion ou bien les espèces en profondeur par l'intermédiaire d'un détachement partiel (sloughing). Pour les temps de séjour faibles, le détachement est la source majoritaire de la biomasse planctonique. Ces observations expérimentales sont confirmées par les résultats du modèle.
- Cette approche par la modélisation permet de développer un outil qui permettra de prédire la « diversité » présente dans le biofilm et/ou le liquide suivant une condition opératoire donnée.



## **Conclusion Générale**



Ces travaux de thèse avaient pour but de contribuer à la compréhension de la distribution des microorganismes entre le biofilm et le liquide, mais aussi dans le biofilm et du liquide. Elle avait pour objectif de caractériser la dynamique de cette compétition à l'échelle macroscopique (production de la biomasse) mais aussi à l'échelle microscopique (population microbienne). Grâce aux outils du génie des procédés, de la microbiologie moléculaire et de la modélisation, nous avons pu estimer l'influence du temps de séjour hydraulique sur les phénomènes de compétition entre populations microbiennes dans un tel système.

L'étude à l'échelle macroscopique a permis de mieux comprendre la distribution de la biomasse dans le réacteur, entre le biofilm et la phase liquide. L'utilisation de réacteurs annulaires rotatifs a permis de consacrer notre étude à l'influence du temps de séjour hydraulique et de travailler dans des conditions environnementales maîtrisées, notamment d'un point de vue hydrodynamique. Les principaux résultats obtenus sont que le temps de séjour hydraulique a un impact important sur la distribution de la biomasse entre le biofilm et la phase liquide. Le développement du biofilm est favorisé lorsque la valeur du temps de séjour hydraulique est faible. Le temps de séjour correspond à l'inverse du taux de dilution et indique le lessivage de la biomasse planctonique lorsque la valeur du temps de séjour est petite. Avec un TSH long, il y a une présence importante de biomasse dans le liquide qui va avoir un impact sur la quantité de substrat qui va être allouée pour le biofilm. Le flux de substrat allant vers le biofilm est limité par la quantité de substrat utilisé par la biomasse planctonique. Pour des temps de séjour hydraulique courts, nous avons obtenu un biofilm de 1 mm au bout de 35 à 42 jours alors que pour un temps de séjour long, l'épaisseur du biofilm n'était que de 300  $\mu\text{m}$ . Le calcul du coefficient G a permis de montrer que, durant la croissance du biofilm, il existe une limitation de la croissance durant les 10 premiers jours puis une limitation liée au transport du substrat. Ce facteur G est lié à l'épaisseur du biofilm. Il est plus faible lorsque le temps de séjour était élevé. Enfin, les performances du réacteur sont améliorées lorsque le temps de séjour est long. Il a aussi été mis en évidence que la modification du temps de séjour avait peu d'impact sur la structure du biofilm en termes de porosité et de facteur de diffusion. La porosité mesurée au niveau de nos biofilms est de 0,8, pour un facteur de diffusion de 0,4.

L'étude microbiologique du biofilm et de la biomasse planctonique a permis d'établir une certaine relation entre le temps de séjour et la distribution des espèces du liquide et du biofilm. Une approche réalisée par PCR-SSCP nous a permis d'établir les profils des espèces

majoritaires présentes parmi les populations du liquide et du biofilm. A l'aide d'outils statistiques, nous avons mis en évidence que le temps de séjour a un impact sur la structure des communautés microbiennes du biofilm et du liquide. Les calculs réalisés à partir des empreintes moléculaires obtenues indiquent que l'indice de diversité est de 2 pour la phase liquide et de 2,5 à 3 pour le biofilm en moyenne. Il n'a pas été noté d'évolution de cet indice au cours du temps. Néanmoins, des tests statistiques (ANOSIM et t-test) et des ACP ont permis d'établir que les communautés du liquide pour un TSH court sont proches entre elles et que celle du biofilm aussi. Les communautés présentes dans la phase liquide pour des TSH courts sont proches des communautés du biofilm cultivées dans la même condition. A l'inverse, pour le TSH long, les populations entre le liquide et le biofilm sont différentes. Les communautés du biofilm et du liquide évoluent avec l'augmentation du TSH. Cette proximité des populations entre le biofilm et le liquide à TSH court s'explique par l'origine de la biomasse planctonique liée au détachement du biofilm.

L'approche par la modélisation a permis d'expliquer dans un premier temps les résultats expérimentaux à l'échelle macroscopique en développant un modèle mono-espèce. Ce modèle a pu mettre en évidence que la présence de biomasse planctonique limitait la croissance du biofilm en limitant le flux de substrat. Le transport du substrat organique devient rapidement limitant lorsque on a des valeurs de TSH courts, de même que le transport de l'oxygène. Les flux entre le liquide et le biofilm sont importants lorsque le TSH est court, il en est de-même avec le flux de détachement.

Le développement d'un modèle multi-espèces a permis d'établir une stratification des espèces dans la profondeur du biofilm. Grâce à cette approche, il a pu être mis en avant que les espèces présentes dans le liquide pour un temps de séjour court proviennent du détachement du biofilm soit en surface (érosion) soit dans la profondeur du biofilm (sloughing).

Grâce à une approche largement pluridisciplinaire, les données recueillies lors de cette thèse contribuent à une meilleure compréhension des phénomènes biologiques mis en jeu dans un système faisant intervenir la croissance d'un biofilm.

## Perspectives

Suite aux travaux de cette thèse, différentes pistes ont été mises en évidence à l'échelle de la microbiologie mais aussi au niveau du génie des procédés.

Il serait intéressant de réaliser d'autres études expérimentales en faisant varier la charge surfacique en entrée afin de pouvoir confronter et caractériser la compétition présentes entre les espèces du biofilm et du liquide ou bien de voir l'impact suivant les conditions hydrodynamiques du milieu.

Une autre approche peut consister à mesurer les espèces présentes dans les couches du biofilm par microscopie confocale laser ou à partir de tests d'érosion permettant d'analyser les couches de cohésion décroissante.

A l'échelle de la modélisation, il serait intéressant de pouvoir, à moyen terme, intégrer différents processus biologiques tels que la production d'Exo-polymères ou le stockage de composés intracellulaires. Ces mécanismes peuvent avoir un impact sur les espèces présentes dans le biofilm et donc de la compétition entre les différentes espèces. Les mécanismes de détachement sont également à étudier de façon plus systématique (phénomène de sloughing...).

Sur le plan applicatif, le développement du modèle-multi-espèces a permis de développer un outil qui peut permettre de faire une estimation des espèces qui se développent ou qui se détachent du biofilm.





## **Bibliographie**



## A

- Ahimou, F., Semmens, M.J., Novak, P.J., and Haugstad, G. (2007) Biofilm cohesiveness measurement using a novel atomic force microscopy methodology. *Applied and Environmental Microbiology* **73**: 2897-2904.
- Allison, D.G. (2003) Molecular architecture of the biofilm matrix. In *Biofilms in Medicine, Industry and Environmental Biotechnology - Characteristics, Analysis and Control*, Lens, P., Moran, A.P., Stoodley, T.P.M. and O'Flaherty, V. (ed.). pp. 81 – 90, London: IWA Publishing.
- Alpkvist, E., Picioreanu, C., van Loosdrecht, M.C.M., and Heyden, A. (2006) Three-dimensional biofilm model with individual cells and continuum EPS matrix. *Biotechnology and Bioengineering* **94**: 961-979.
- Andersson, S., Rajarao, G.K., Land, C.J., and Dalhammar, G. (2008) Biofilm formation and interactions of bacterial strains found in wastewater treatment systems. *Fems Microbiology Letters* **283**: 83-90.
- Andrreck, C.D., Liu, S.S., and Swinney, H.L. (1986) Flow regimes in circular Couette system with independently rotating cylinders. *Journal of Fluid Mechanics* **164**: 155-183.
- Annachhatre, A.P., and Bhamidimarri, S.M.R. (1992) Microbial attachment and growth in fixed-film reactors - Process stratup considerations. . *Bitechnology Advances* **10**: 69-91.

## B

- Bakke, R., Trulear, M.G., Robinson, J.A., and Characklis, W.G. (1984) Activity of *Pseudomonas aeruginosa* in biofilms: Steady state. *Biotechnology and Bioengineering* **26**: 1418-1424.
- Baumgärtl, H., and Lübbers, D.W. (1983) Microcoaxial needle sensor for polarographic measurement of local O<sub>2</sub> pressure in the cellular range of living tissue: Its construction and properties. In *Polarographic oxygen sensors: Aquatic and physiological applications*. Forstner, E.G.a.H. (ed). NewYork: Springer-Verlag, pp. 37-65.
- Beech, I.B. (2004) Corrosion of technical materials in the presence of biofilms - current understanding and state-of-the art methods of study. *International Biodeterioration & Biodegradation* **53**: 177-183.
- Beuling, E. (1998) *Mass transfer properties of biofilms*. PhD thesis. University of Amsterdam. Wageningen: Ponsen and Looijen BV.

- Beyenal, H., and Tanyolac, A. (1994) The calculation of simultaneous effective diffusion - Coefficients of the substrates in a fluidized-bed biofilm reactor. *Water Science and Technology* **29**: 463-470.
- Beyenal, H., and Lewandowski, Z. (2000) Combined effect of substrate concentration and flow velocity on effective diffusivity in biofilms. *Water Research* **34**: 528-538.
- Beyenal, H., and Lewandowski, Z. (2002) Internal and external mass transfer in biofilms grown at various flow velocities. *Biotechnology Progress* **18**: 55-61.
- Beyenal, H., Tanyolac, A., and Lewandowski, Z. (1998) Measurement of local effective diffusivity in heterogeneous biofilms. *Water Science and Technology* **38**: 171-178.
- Bishop, P.L. (1997) Biofilm structure and kinetics. *Water Science and Technology* **36**: 287-294.
- Bishop, P.L., and Yu, T. (1999) A microelectrode study of redox potential change in biofilms. *Water Science and Technology* **39**: 179.
- Boessmann, M., Neu, T.R., Horn, H., and Hempel, D.C. (2004) Growth, structure and oxygen penetration in particle supported autotrophic biofilms. *Water Science and Technology* **49**: 371-377.
- Boltz, J.P., Morgenroth, E., Brockmann, D., Bott, C., Gellner, W.J., and Vanrolleghem, P.A. (2010) Critical components of Biofilm models for engineering Practice. In *2nd IWA/WEF Wastewater Treatment Modelling Seminar*. IWA (ed). Mont-Sainte-Anne, Quebec, Canada, March 28-30, 2010.
- Bradford, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantification of micrograms quantities of protein utilising the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* **72**: 248-254.
- Brockmann, D. (2006) Modelling nitrification and deammonification in biofilms: sensitivity analysis, identifiability analysis and design of experiments. In *Veröffentlichungen des Institutes für Siedlungswasserwirtschaft und Abfalltechnik*. Hannover: Universität Hannover.
- Bryers, J.D. (1984) Biofilm formation and chemostat dynamics: pure and mixed culture considerations. *Biotechnology and Bioengineering* **26**: 948-958.
- Bryers, J.D. (2000) Process engineering. In *Biofilms II: Process analysis and applications*. Mitchell, R. (ed). New York: Wiley-Liss, p. 432.
- Bungay, H.R., Whalen, W.J., and Sanders, W.M. (1969) Microprobe techniques for determining diffusivities and respiration rates in microbial slime systems. *Biotechnology and Bioengineering* **11**: 765-772.

Busscher, H.J., and van der Mei, H.C. (2000) *initial microbial adhesion events: mechanisms and implications*: , Cambridge University Press.

Busscher, H.J., Bos, R., and van der Mei, H.C. (1995) Initial microbial adhesion is a determinant for the strength of biofilm adhesion. *FEMS Microbiology Letters* **128**: 229-234.

## C

Cao, Y.S., and Alaerts, G.J. (1995a) Aerobic biodegradation and microbial- population of a synthetic waste-water in a channel with suspended and attached biomass. *Water Science and Technology* **31**: 181-189.

Cao, Y.S., and Alaerts, G.J. (1995b) Influence of reactor type and shear-stress on aerobic biofilm morphology, population and kinetics. *Water Research* **29**: 107-118.

Chang, H.T., and Rittmann, B.E. (1987) Mathematical modeling of biofilm on activated carbon. *Environmental Science & Technology* **21**: 273-280.

Chang, H.T., Parulekar, S.J., and Ahmed, M. (2005) A dual-growth kinetic model for biological wastewater reactors. *Biotechnology Progress* **21**: 423-431.

Chang, H.T., Rittmann, B.E., Amar, D., Heim, R., Ehrlinger, O., and Lesty, Y. (1991) Biofilm detachment mechanisms in a liquid fluidized bed. *Biotechnology and Bioengineering* **38**: 499-506.

Characklis, W.G. (1990) Biofilm processes. In *Biofilms*. Characklis, W.G., and Marshall, K.C. (eds). New York: Wiley, pp. 195-231.

Characklis, W.G. (2009) Fouling Biofilm Development: A Process Analysis. *Biotechnology and Bioengineering* **102**: 310-347.

Characklis, W.G., and Marshall, K.C. (1990) *Biofilms*. New York: John Wiley.

Chen, M.I., Zhang Z. and Bott, T.R; (1998) Direct measurement of adhesive strength of biofilms in pipes by micromanipulation. *Biotechnology Techniques* **12**: 875-880.

Chen, S.Y., and Huang, S.Y. (2000) Shear stress effects on cell growth and L-DOPA production by suspension culture of *Stizolobium hassjoo* cells in an agitated bioreactor. . *Bioprocess Engineering* **22**: 5-12.

Choi, Y.C., and Morgenroth, E. (2003) Monitoring biofilm detachment under dynamic changes in shear stress using laser-based particle size analysis and mass fractionation. *Water Science and Technology* **47**: 69-76.

- Clark, L.C., Wolf, R., Granger, D., Taylor, Z. (1953) Continuous recording of blood oxygen tensions by polarography. *Journal of Applied Physiology* **6**: 185-191.
- Costerton, J.W., Stewart, P.S., and Greenberg, E.P. (1999) Bacterial biofilms: A common cause of persistent infections. *Science* **284**: 1318-1322.
- Coufort, C. (2004) Analyse expérimentale de la floculation en réacteur de Taylor-Couette: Influence de l'hydrodynamique sur les phénomènes d'agglomération et de rupture. Thèse de Doctorat. Institut National des Sciences Appliquées, Toulouse.
- Cresson, R. (2006) Etude du démarrage de procédés intensifs de méthanisation. Impact des conditions hydrodynamiques et de la stratégie de montée en charge sur la formation et l'activité du biofilm. Thèse de Doctorat. Université Montpellier II.
- Cresson, R. (2007) Competition between planktonic and fixed microorganisms during the start-up of methanogenic biofilms reactors. *Water Research* **42**: 792-800.
- Cronenberg, C.C.H., Van den Heuvel, J.C. (1991) Determination of glucose coefficient in biofilms with microelectrodes. *Biosensors and bioelectronics* **6**: 255-262.

## D

---

- Dabert, P., Delgenès, J.-P., Moletta, R., and Godon, J.-J. (2002) Contribution of molecular microbiology to the study in water pollution removal of microbial community dynamics. *Re/Views in Environmental Science & Bio/Technology* **1**: 39-49.
- Damgaard, L.R., Nielsen, L.P., and Revsbech, N.P. (2001) Methane microprofiles in a sewage biofilm determined with a microscale biosensor. *Water Research* **35**: 1379-1386.
- Davey, A. (1962) The growth of Taylor vortices in flow between rotating cylinders. *Journal of Fluid Mechanics* **10**: 593-610.
- de Beer, D. (1989) Measurement of nitrate gradients with an ion - Selective microelectrode. *Analytica Chimica Acta* **219** 351
- de Beer, D., and Stoodley, P. (1995) Relation between the structure of an aerobic biofilm and transport phenomena? *Water Science and Technology* **32**: 11-18.
- de Beer, D., Stoodley, P., and Lewandowski, Z. (1997a) Measurement of local diffusion coefficients in biofilms by microinjection and confocal microscopy. *Biotechnology and Bioengineering* **53**: 151-158.
- de Beer, D., Schramm, A., Santegoeds, C.M., and Kühn, M. (1997b) A nitrite microsensor for profiling environmental biofilms. *Applied and Environmental Microbiology* **63**: 973-977.

- Denkhaus, E., Meisen, S., Telgheder, U., Wingender, J., and Sx (2007) Chemical and physical methods for characterisation of biofilms. *Microchimica Acta* **158**: 1-27.
- Derlon, N. (2008) Analyse de la compétition microbienne entre les bactéries autotrophes et hétérotrophes au sein d'un biofilm éliminant l'azote. Thèse de Doctorat. Institut National des Sciences Appliquées, Toulouse.
- Derlon, N., Massé, A., Escudié, R., Bernet, N., and Paul, E. (2008) Stratification in the cohesion of biofilms grown under various environmental conditions. *Water Research* **42**: 2102-2110.
- Dorigo, U., Volatier, L., and Humbert, J.-F. (2005) Molecular approaches to the assessment of biodiversity in aquatic microbial communities (Review). *Water Research* **39**: 2207-2218.
- Dreywood, R. (1946) Qualitative Test for Carbohydrate Material. In *Industrial Engineering & Chemistry* Edition, A. (ed): American Chemical Society, p. 499.
- Dumont, M. (2008) Apports de la modélisation des interactions pour une compréhension fonctionnelle d'un écosystème. Application à des bactéries nitrifiantes en chemostat. Thèse de Doctorat. Université Montpellier II.

---

## E

- Ebert, A., and Brune, A. (1997) Hydrogen concentration profiles at the oxic-anoxic interface: a microsensor study of the hindgut of the wood-feeding lower termite *Reticulitermes flavipes* (Kollar). *Applied and Environmental Microbiology* **63**: 4039-4046.
- Edeline, F. (1997) *L'épuration biologique des eaux : théorie et technologie des réacteurs*. Liège: CEBEDOC-Lavoisier TEC & DOC.
- 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 Research* **41**: 4657-4671.

---

## F

- Filloux, A., and Vallet, I. (2003) Biofilm: positioning and organization of bacterial communities. *M S-Medecine Sciences* **19**: 77-83.
- Flemming, H.C., Szewzyk, U., and Griebe, T. (2000) *Biofilms Investigative Methods & Applications*. Lancaster, Pennsylvania, USA: Technomic.
- Flemming, H.C., and Wingender, J. (2001a) Relevance of microbial extracellular polymeric substances (EPSs) - Part II: Technical aspects. *Water Science and Technology* **43**: 9-16.



- Flemming, H.C., and Wingender, J. (2001b) Relevance of microbial extracellular polymeric substances (EPSs) - Part I: Structural and ecological aspects. *Water Science and Technology* **43**: 1-8.
- Flemming, H.C., Griebe, T., and Schaule, G. (1996) Antifouling strategies in technical systems - A short review. *Water Science and Technology* **34**: 517-524.
- Flemming, H.C., Schaule, G., Griebe, T., Schmitt, J., and Tamachkiarowa, A. (1997) Biofouling - the Achilles heel of membrane processes. *Desalination* **113**: 215-225.
- Forney, L., Zhou, X., and Brown, C.J. (2004) Molecular microbial ecology: land of the one-eyed king. *Current Opinion in Microbiology* **7**: 210-220.
- Fromin, N., Hamelin, J., Tarnawski, S., D., R., Jourdain-Miserez, K., Forestier, N. et al. (2002) Statistical analysis of denaturing gel electrophoresis (DGE) fingerprinting patterns. *Environmental Microbiology* **4**: 634-643
- Fruhen, M., Christian, E., Gujer, W., and Wanner, O. (1991) Significance of spatial distribution of microbial species in mixed culture biofilms. *Water Science and Technology* **23**: 1365-1374.
- Fuller, R., and Gibson, G.R. (1997) Modification of the intestinal microflora using probiotics and prebiotics. *Scandinavian Journal of Gastroenterology. Supplement* **222**: 28-31.

## G

---

- Garny, K., Horn, H., and Neu, T. (2008) Interaction between biofilm development, structure and detachment in rotating annular reactors. *Bioprocess and Biosystems Engineering* **31**: 619-629.
- Garrett, T.R., Bhakoo, M., and Zhang, Z.B. (2008) Bacterial adhesion and biofilms on surfaces. *Progress in Natural Science* **18**: 1049-1056.
- Ghiglione, J., Larcher, M., and Lebaron, P. (2005) Spatial and temporal scales of variation in bacterioplankton community structure in the NW Mediterranean Sea. *Aquatic Microbial Ecology* **40**: 229-240.
- Gjaltema, A., and Griebe, T. (1995) Laboratory biofilm reactors and on-line monitoring: Report of the discussion session. *Water Science and Technology* **32**: 257-261.
- Glud, R.N., Santegoeds, C.M., de Beer, D., Kohls, O., and Ramsing, N.B. (1998) Oxygen dynamics at the base of a biofilm studied with planar optodes. *Aquatic Microbial Ecology* **14**: 223-233.

- Godon, J.-J., Zumstein, E., Dabert, P., Habouzit, F., and Moletta, R. (1997) Microbial 16S rDNA diversity in an anaerobic digester. *Water Science and Technology* **36**: 49-55.
- Godon, J.-J., Duthoit, F., Delbès, C., Millet, L., and Montel, M.C. (2001) Utilisation d'une technique d'empreinte moléculaire dans l'étude d'écosystèmes microbiens complexes. Application à la fabrication d'un fromage au lait cru «l'AOC Salers». *Le Lait* **81**: 257-262.
- Grady, L., Daigger, G.T., and Lim, H. (1999) *Biological wastewater treatment*. New York: Marcel Dekker.

---

## H

---

- Haegeman, B., Godon, J.-j., Sen, B., and Hamelin, J. In vivo and in silico relevance of Simpson diversity index to characterise microbial ecosystem diversity using molecular fingerprints. *Environmental Microbiology* Submitted.
- Harder, W., and Kuenen, J.G. (1977) A review of microbial selection in continuous culture. *Journal of Applied Bacteriology* **43**: 1-24.
- Heijnen, J.J., van Loosdrecht, M.C.M., Mulder, A., and Tjihuis, L. (1992) Formation of biofilms in a biofilm airlift suspension reactor. *Water Science and Technology* **26**: 647-654.
- Heijnen, J.J., van Loosdrecht, M.C.M., Mulder, R., Weltevrede, R., and Mulder, A. (1993) Development and scale-up of an aerobic biofilm air-lift suspension reactor. *Water Science and Technology* **27**: 253-261.
- Heineman, W.R. (1989) Voltammetry: Basic concepts and hydrodynamic techniques. In *Chemical instrumentation: A systematic approach. 3rd ed.* Heineman, W.R. and Strobel, H.A. (ed). New York: John Wiley & Sons, pp. 1055-1111.
- Henze, M., Harremoës, P., la Cour Jansen, J., and Arvin, E. (2002) *Wastewater treatment: biological and chemical processes*. Berlin: Springer-Verlag.
- Herald, P.J., and Zottola, E.A. (1988a) Scanning electron microscopic examination of *Yersinia enterocolitica* attached to stainless steel at elevated temperature and pH values. . *Journal of Food Protection* **51**: 445-448.
- Herald, P.J., and Zottola, E.A. (1988b) Attachment of *Listeria monocytogenes* to stainless steel surfaces at various temperatures and pH values. *Journal of Food Science* **53**:1549-1552.

- Hinkers, H., Sundermeier, C., Lürrik, R., Walfort, F., Cammann, K., Knoll, M. (1995) Amperometric microelectrode array in containment technology. *Sensors and Actuators B: Chemical* **27**:398-400.
- Hinson, R.K., and Kocher, W.M. (1996) Model for effective diffusivities in aerobic biofilms. *Journal of Environmental Engineering-Asce* **122**: 1023-1030.
- Horn, H. (2000) Microelectrodes and tube reactors in biofilm research. In *Biofilms: investigative methods and applications*. Flemming, H.-C., Szewzyk, U., Griebe, T. (ed). Lancaster: Technomic, pp. 125–140 (Chapter 114).
- Horn, H., and Hempel, D.C. (1997a) Growth and decay in an auto-/heterotrophic biofilm. *Water Research* **31**: 2243-2252.
- Horn, H., and Hempel, D.C. (1997b) Substrate utilization and mass transfer in an autotrophic biofilm system: Experimental results and numerical simulation. *Biotechnology and Bioengineering* **53**: 363-371.
- Horn, H., and Morgenroth, E. (2006) Transport of oxygen, sodium chloride, and sodium nitrate in biofilms. *Chemical Engineering Science* **61**: 1347-1356.
- Horn, H., Hempel, D.C., and Uc (1995) Mass transfer coefficients for an autotrophic and a heterotrophic biofilm system. *Water Science and Technology* **32**: 199-204.
- Horn, H., Reiff, H., and Morgenroth, E. (2003) Simulation of growth and detachment in biofilm systems under defined hydrodynamic conditions. *Biotechnology and Bioengineering* **81**: 607-617.
- Howell, J.A., and Atkinson, B. (1976) Sloughing of microbial film in trickling filters. *Water Research* **10**: 307-315.
- Huang, J.C., and Liu, Y.C. (1993) Relationship between oxygen flux and biofilm performance. *Water Science and Technology* **28**: 153-158.
- Hugenholtz, P., Tyson, G.W., and Blackall, L.L. (2002) Design and evaluation of 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes for fluorescence in situ hybridization. *Methods in Molecular Biology* **179**: 29-42.

---

**J**

- Jackson, G., Beyenal, H., Rees, W.M., and Lewandowski, Z. (2001) Growing reproducible biofilms with respect to structure and viable cell counts. *Journal of Microbiological Methods* **47**: 1-10.

Jeroschewski, P., Steuckart, C., and Kühl, M. (1996) An amperometric microsensor for the determination of H<sub>2</sub>S in aquatic environments. *Analytica chemistry* **68**: 4351-4357.

---

## K

---

Kataoka, K. (1986) Chapitre 9: Taylor vortices and instabilities in circular Couette flows. In *Encyclopedia of Fluid Mechanics*. Cheremisinoff, E. (ed).

Koza, A., Hallett, P.D., Moon, C.D., and Spiers, A.J. (2009) Characterization of a novel air-liquid interface biofilm of *Pseudomonas fluorescens* SBW25. *Microbiology* **155**: 1397-1406.

Kreft, J.U., Booth, G., and Wimpenny, J.W.T. (1998) BacSim, a simulator for individual-based modelling of bacterial colony growth. *Microbiology* **144**: 3275-3287.

Kreft, J.U., Picioreanu, C., Wimpenny, J.W.T., and van Loosdrecht, M.C.M. (2001) Individual-based modelling of biofilms. *Microbiology-Sgm* **147**: 2897-2912.

Kuhl, M., and Jørgensen, B.B. (1992) Microsensor measurements of sulfate reduction and sulfide oxidation in compact microbial communities of aerobic biofilms. *Applied and Environmental Microbiology* **58**: 1164-1174.

Kumar, C.G., Anand, S.K., and Hc (1998) Significance of microbial biofilms in food industry: a review. *International Journal of Food Microbiology* **42**: 9-27.

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. *Biotechnology and Bioengineering* **58**: 400-407.

---

## L

---

Lawrence, J.R., Wolfaardt, G.M., and Korber, D.R. (1994) Determination of diffusion-coefficients in biofilms by confocal laser microscopy. *Applied and Environmental Microbiology* **60**: 1166-1173.

Lazarova, V., and Manem, J. (1995) Biofilm characterization and activity analysis in water and waste-water treatment. *Water Research* **29**: 2227-2245.

Legendre, P., and Legendre, L. (1998) *Numerical ecology*. Amsterdam: Elsevier.

Lennox, J.E., and Blaha, T. (1991) Leaching of copper ore by *Thiobacillus ferrooxidans*. *The American Biology Teacher* **53**: 361-386.

Lewandowski, Z. (2000) Notes on biofilm porosity. *Water Research* **34**: 2620-2624.

- Lewandowski, Z., Walser, G., and Characklis, W.G. (1991) Reaction kinetics in biofilms. *Biotechnology and Bioengineering* **38**: 877–882.
- Lewandowski, Z., Stoodley, P., and Altobelli, S. (1995) Experimental and conceptual studies on mass-transport in biofilms. *Water Science and Technology* **31**: 153-162.
- Lewandowski, Z., Beyenal, H., Myers, J., and Stookey, D. (2007) The effect of detachment on biofilm structure and activity: the oscillating pattern of biofilm accumulation. *Water Science and Technology* **55**: 429-436.
- Liu, C.I., Lee, D.J., and Xr (1999) Micromixing effects in a couette flow reactor. *Chemical Engineering Science* **54**: 2883-2888.
- Liu, Y., and Tay, J.H. (2001a) Detachment forces and their influence on the structure and metabolic behaviour of biofilms. *World Journal of Microbiology & Biotechnology* **17**: 111-117.
- Liu, Y., and Tay, J.H. (2001b) Metabolic response of biofilm to shear stress in fixed-film culture. *Journal of Applied Microbiology* **90**: 337-342.
- Liu, Y., and Tay, J.H. (2002) The essential role of hydrodynamic shear force in the formation of biofilm and granular sludge. *Water Research* **36**: 1653-1665.
- Loisel, P., Harmand, J., Zemb, O., Latrille, E., Lobry, C., Delgenès, J.P., and Godon, J.J. (2006) Denaturing gradient electrophoresis (DGE) and single-strand conformation polymorphism (SSCP) molecular fingerprintings revisited by simulation and used as a tool to measure microbial diversity. *Environmental Microbiology* **8**: 720-731.
- Lu, T., Saikaly, P.E., and Oerther, D.B. (2007) Modelling the competition of planktonic and sessile aerobic heterotrophs for complementary nutrients in biofilm reactor. *Water Science and Technology* **55**: 227-235.

## M

---

- Madigan, M.T., Martinko, J.M., and Parker, J. (1997) *Brock biology of micro-organisms*. USA: Prentice-Hall.
- Magurran, A.E. (2004) *Measuring biological diversity*: Blackwell Publishing.
- Manz, B., Volke, F., Goll, D., and Horn, H. (2003) Measuring local flow velocities and biofilm structure in biofilm systems with magnetic resonance imaging (MRI). *Biotechnology and Bioengineering* **84**: 424-432.

- Martiny, A.C., Jorgensen, T.M., Albrechtsen, H.J., Arvin, E., and Molin, S. (2003) Long-term succession of structure and diversity of a bioWlm formed in a model drinking water distribution system. *Applied and Environmental Microbiology* **69**: 6899-6907.
- McBain, A.J., and Macfarlane, G.T. (1998) Ecological and physiological studies on large intestinal bacteria in relation to production of hydrolytic and reductive enzymes involved in formation of genotoxic metabolites. *Journal of Medical Microbiology* **47**: 407-416.
- McLean, R.J.C. (2002) An overview of biofilm molecular ecology. *Molecular Ecology of Biofilms*: 1-21.
- Meijer, J.J., Hoopen, T., Luyben, H.J.G., and Libbenga, A.M. (1993) Effects of hydrodynamic stress on cultured plant cells: a literature survey. *Enzyme Microbial Technology* **15** . 234-238.
- Meylheuc, T. (2000) Influence de biosurfactants sur l'adhésion de la *Listeria Monocytogenes* a des surfaces inertes-Conséquences sur la désinfection. In *Microbiologie*. Paris: Universit& Paris XI.
- Michelland, R.J., Dejean, S., Combes, S., Fortun-Lamothe, L., and Cauquil, L. (2009) StatFingerprints: a friendly graphical interface program for processing and analysis of microbial fingerprint profiles. *Molecular Ecology Resources* **9**: 1359-1363.
- Monier, J.M., Haddour, N., Niard, L., and Vogel, T. (2006) Les biopiles. *La revue 3EI* **47**.
- Moreira, J.L., Alves, P.M., Aunins, J.G., and Carrondo, M.J.T. (1995) Hydrodynamic effects on BHK cells grown as suspended natural aggregates. *Biotechnology and Bioengineering* **46**: 351-360.
- Morgenroth, E. (2008) Modelling biofilms. In *Biological wastewater treatment: principles, modelling and design*. Henze, M., van Loosdrecht, M., Ekama, G.A., and Brdjanovic, D. (eds). London, UK: IWA publishing.
- Morgenroth, E., and Wilderer, P.A. (1999) Controlled biomass removal - The key parameter to achieve enhanced biological phosphorus removal in biofilm systems. *Water Science and Technology* **39**: 33.
- Morgenroth, E., and Wilderer, P.A. (2000) Influence of detachment mechanisms on competition in biofilms. *Water Research* **34**: 417-426.
- Muyzer, G. (1998) Structure, function and dynamics of microbial communities: The molecular biological approach. *Advances in Molecular Ecology* **306**: 87-117.
- Muyzer, G., and Ramsing, N.B. (1995) Molecular methods to study the organization of microbial communities. *Water Science and Technology* **32**: 1-9.

## N

- Nakatsu, C., Torsvik, V., and Øvreas, L. (2000) Soil community analysis using DGGE of 16SrDNA polymerase chain reaction products. . *Soil Science Society of America Journal* **64**: 1382-1388.
- Neu, T.R., and Lawrence, J.R. (2009) Extracellular polymeric substances microbial biofilms. In *Microbial Glycobiology: Structures, Relevance and Applications* Moran, A.P., Holst, O., Brennan, P.J., and von Itzstein, M. (eds), pp. 735-758.
- Nicolella, C., van Loosdrecht, M.C.M., van der Lans, R., and Heijnen, J.J. (1998) Hydrodynamic characteristics and gas-liquid mass transfer in a biofilm airlift suspension reactor. *Biotechnology and Bioengineering* **60**: 627-635.
- Nielsen, P.H., Jahn, A., and Palmgren, R. (1997) Conceptual model for production and composition of exopolymers in biofilms. *Water Science and Technology* **36**: 11-19.
- Noguera, D.R., and Picioreanu, C. (2004) Results from the multi-species Benchmark Problem 3 (BM3) using two-dimensional models. *Water Science and Technology* **49**: 169-176.
- Nollert, M.U., Diamond, S.L., and McIntire, L.V. (1991) Hydrodynamic shear stress and mass transport modulation of endothelial cell metabolism. *Biotechnology and Bioengineering* **38**: 588-602.
- Noui-Mehidi, M.N., Ohmura, N., Kataoka, K., and Sr (2005) Dynamics of the helical flow between rotating conical cylinders. *Journal of Fluids and Structures* **20**: 331-344.

## O

- Ochoa, J.-C., Coufort, C., Escudié, R., Line, A., and Paul, E. (2007) Influence of non-uniform distribution of shear stress on aerobic biofilms. *Chemical Engineering Science* **62**: 3672-3684.
- Ohashi, A., and Harada, H. (1994a) Adhesion strength of biofilm developed in an attached-growth reactor. *Water Science and Technology* **29**: 281-288.
- Ohashi, A., and Harada, H. (1994b) Characterization of detachment mode of biofilm developed in an attached-growth reactor. *Water Science and Technology* **30**: 35-45.
- Ohashi, A., and Harada, H. (1996) A novel concept for evaluation of biofilm adhesion strength by applying tensile force and shear force. *Water Science and Technology* **34**: 201-211.

- Ohashi, A., Desilva, D.G.V., 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**: 75-84.
- Ohl, A.L., Horn, H., and Hempel, D.C. (2004) Behaviour of biofilm systems under varying hydrodynamic conditions. *Water Science and Technology* **49**: 345-351.
- Ohmura, N., Kataoka, K., Shibata, Y., and Makino, T. (1997) Effective mass diffusion over cell boundaries in a Taylor-Couette flow system. *Chemical Engineering Science* **52**: 1757-1765.
- Okabe, S., Hirata, K., and Watanabe, Y. (1995) Dynamic changes in spatial microbial distribution in mixed-population biofilms: Experimental results and model simulation. *Water Science and Technology* **32**: 67-74.
- Okabe, S., Hiratia, K., Ozawa, Y., and Watanabe, Y. (1996) Spatial microbial distributions of nitrifiers and heterotrophs in mixed-population biofilms. *Biotechnology and Bioengineering* **50**: 24-35.
- Okkerse, W.J.H., Ottengraf, S.P.P., and B., O.-K. (2000) Biofilms thickness variability investigated with laser triangulation sensor. *Biotechnology and Bioengineering* **70**: 619-629.

---

## P

---

- Pais-Correia, A.-M., Sachse, M., Guadagnini, S., Robbiati, V., Lasserre, R., Gessain, A. et al. (2010) Biofilm-like extracellular viral assemblies mediate HTLV-1 cell-to-cell transmission at virological synapses. *Nature Medicine* **16**: 83-89.
- Palmer, J., Flint, S., and Brooks, J. (2007) Bacterial cell attachment, the beginning of a biofilm. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* **34**: 577-588.
- Park, J., Chang, J.-h., Choi, M., Pak, J.J., Lee, D.-Y., and Pak, Y.K. (2007) Microfabricated Clark-type Sensor for Measuring Dissolved Oxygen. In *IEEE Sensors Conf*, pp. 1412-1415.
- Pereira, M.O., Kuehn, M., Wuertz, S., Neu, T., and Melo, L.F. (2002) Effect of flow regime on the architecture of a *Pseudomonas fluorescens* biofilm. *Biotechnology and Bioengineering* **78**: 164-171.
- Perez, J., Picioreanu, C., and van Loosdrecht, M. (2005) Modeling biofilm and floc diffusion processes based on analytical solution of reaction-diffusion equations. *Water Research* **39**: 1311-1323.



- Perry, R.H., and Green, D.W. (1984) *Perry's Chemical Engineers' Handbook*. USA: McGraw-Hill.
- 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. *Biotechnology and Bioengineering* **58**: 101-116.
- Picioreanu, C., van Loosdrecht, M.C.M., and Heijnen, J.J. (2000a) Effect of diffusive and convective substrate transport on biofilm structure formation: A two-dimensional modeling study. *Biotechnology and Bioengineering* **69**: 504-515.
- Picioreanu, C., van Loosdrecht, M., and Heijnen, J.J. (2000b) Modelling and predicting biofilm structure. In *Community structure and co-operation in biofilms*. Allison, D.G., Gilbert, P., Lappin-Scott, H.M. and Wilson M. (eds). Society for General Microbiology, Cambridge.
- 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. *Biotechnology and Bioengineering* **72**: 205-218.

## R

---

- Racina, A., and Kind, M. (2006) Specific power input and local micromixing times in turbulent Taylor-Couette flow. *Experiments in Fluids* **41**: 513-522.
- Ramasamy, P., and Zhang, X. (2005) Effects of shear stress on the secretion of extracellular polymeric substances in biofilms. *Water Science and Technology* **52**: 217-223.
- Australia, 2007/09/23-27, pp. Session PP4B – Modelling - 6 pages sur cdrom.
- Ramirez, I., Volcke, E.I.P., Rajinikanth, R., and Steyer, J.-P. (2009) Modeling microbial diversity in anaerobic digestion through an extended ADM1 model. *Water Research* **43**: 2787-2800.
- Ramirez, I.D. (2008) Modélisation de la diversité microbienne dans les procédés de digestion anaérobie. Thèse de doctorat. Université Montpellier II.
- Ras, M. (2008) Extraction exhaustive et analyse biochimique des Substances Polymériques Extracellulaires (EPS) des agrégats microbiens issus des procédés de traitement des eaux. Thèse de Doctorat. Institut National des Sciences Appliquées, Toulouse.
- Reichert, P. (1998) AQUASIM 2.0-User Manual: Computer Program for identification and Simulation of Aquatic Systems. In. Dübendorf: Swiss Federal Institute for Environmental Science and Technology (EAWAG).

- Revsbech, N.P., Christensen, P.B., Nielsen, L.P., and Sorensen, J. (1989) Denitrification in a trickling filter biofilm studied by a microsensor for oxygen and nitrous oxide. *Water Research* **23**: 867-871.
- Rittmann, B.E. (1982) The effect of shear stress on biofilm loss rate. *Biotechnology and Bioengineering* **24**: 501-506.
- Rittmann, B.E. (1989) Detachment from biofilms. In *Structure and Function of Biofilms*. New York, USA: Characklis, W.G., Wilderer, P.A., pp. 49-58.
- Rittmann, B.E., and McCarty, P.L. (2001) *Environmental Biotechnology: Principles and Applications*. New York.
- Rittmann, B.E., and Stilwell, D. (2002) Modelling biological processes in water treatment: the integrated biofiltration model. *Journal of Water Supply Research and Technology-Aqua* **51**: 1-14.
- Rittmann, B.E., Schwarz, A.O., Eberl, H.J., Morgenroth, E., Perez, J., van Loosdrecht, M., and Wanner, O. (2004) Results from the multi-species Benchmark Problem (BM3) using one-dimensional models. *Water Science and Technology* **49**: 163-168.
- Robinson, J.A., Trulear, M.G., and Characklis, W.G. (1984) Cellular reproduction and extracellular polymer formation by *Pseudomonas Aeruginosa* in continuous culture. *Biotechnology and Bioengineering* **26**: 1409-1417.
- Rochex, A., Godon, J.-J., Bernet, N., and Escudié, R. (2008) Role of shear stress on composition, diversity and dynamics of biofilm bacterial communities. *Water Research* **42**: 4915-4922.
- Rochex, A., Massé, A., Escudié, R., Godon, J.J., and Bernet, N. (2009) Influence of abrasion on biofilm detachment: evidence for stratification of the biofilm. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* **36**: 467-470.
- Rodier, J. (1975) *L'analyse de l'eau, eaux naturelles, eaux résiduaires, eau de mer*. Paris: Dunod.
- Ross, B., Cammann, K., Mokwa, W., Rospert, M. (1992) Ultramicroelectrode array as transducers for new amperometric oxygen sensors. *Sens. Actuators* **B** 763-768.
- Roustan, M. (ed) (2003) *Transferts gaz-liquide dans les procédés de traitement des eaux et des effluents gazeux*. Paris: Editions Tec&Doc Lavoisier.

## S

- Saikaly, P.E., and Oerther, D.B. (2004) Bacterial competition in activated sludge: Theoretical analysis of varying solids retention times on diversity. *Microbial Ecology* **48**: 274–284.
- Santegoeds, C.M., Schramm, A., and de Beer, D. (1998) Microsensors as a tool to determine chemical microgradients and bacterial activity in wastewater biofilms and flocs. *Biodegradation* **9**: 159-167.
- Schinkel, A.P., and Klose, W. (2002) Heat-transport-determined carbonisation of biomass in a rotary tube reactor. *Chemie Ingenieur Technik* **74**: 350-355.
- Schneiderman, G., Goldstick, T.K. (1978) Oxygen electrode design criteria and performance characteristics: recessed cathode. *Journal Appl. Physiol.* **45**: 145-154.
- Scholz, F., and Schröder, U. (2003) Bacterial batteries. *Nature biotechnology* **21**: 3-4.
- Schramm, A. (2003) In situ analysis of structure and activity of the nitrifying community in biofilms, aggregates, and sediments. *Geomicrobiology Journal* **20**: 313-333.
- Schramm, A., Larsen, L.H., Revsbech, N.P., and Amann, R.I. (1997) Structure and function of a nitrifying biofilm as determined by microelectrodes and fluorescent oligonucleotide probes. *Water Science and Technology* **36**: 263-270.
- Shannon, E., and Weaver, W. (1962) The mathematical theory of communication. In *The University of Illinois Press*. Urbana, Illinois, USA.
- Simpson, E.H. (1949) Measurement of diversity. *Nature* **163**: 672-688.
- Speitel, G.E., and DiGiano, F.A. (1987) Biofilm shearing under dynamic conditions. *Journal of Environmental Engineering- ASCE* **113**: 464-475.
- Stanley, P.M. (1983) Factors affecting the irreversible attachment of *Pseudomonas aeruginosa* to stainless steel. *Journal of Microbiology* **29**: 1493-1499.
- Staudt, C., Horn, H., Hempel, D.C., and Neu, T.R. (2004) Volumetric measurements of bacterial cells and extracellular polymeric substance glycoconjugates in biofilms. *Biotechnology and Bioengineering* **88**: 585-592.
- Stewart, P.S. (1993) A model of biofilm detachment. *Biotechnology and Bioengineering* **41**: 111-117.
- Stewart, P.S. (1998) A review of experimental measurements of effective diffusive permeabilities and effective diffusion coefficients in biofilms. *Biotechnology and Bioengineering* **59** 261 - 272.
- Stewart, P.S. (2003) Diffusion in biofilms. *Journal of Bacteriology* **185**: 1485-1491.

- Stewart, P.S., McFeters, G.A., and Huang, C.T. (2000) Biofilm formation and persistence. In *Biofilms II: process analysis and application*. New-York: Wiley- Liss, pp. 373-405.
- Stewart, P.S., Murga, R., Srinivasan, R., and de Beer, D. (1995) Biofilm structural heterogeneity visualized by three microscopic methods. *Biotechnology and Bioengineering* **29**: 2006-2009.
- Steyer, J.-P., Gleize, D., Harmand, J., and Moletta, R. (1997) Control-BUFFER : une Solution à l'Automatisation des Procédés de Dépollution. *L'eau, l'industrie, les nuisances* **206**: 46-49.
- Stoodley, P., de Beer, D., and Lewandowski, Z. (1994) Liquid flow in biofilm systems. *Applied and Environmental Microbiology* **60**: 2711-2716.
- Stoodley, P., Yang, S.N., LappinScott, H., and Lewandowski, Z. (1997) Relationship between mass transfer coefficient and liquid flow velocity in heterogenous biofilms using microelectrodes and confocal microscopy. *Biotechnology and Bioengineering* **56**: 681-688.
- Stoodley, P., Dodds, I., Boyle, J.D., and Lappin-Scott, H.M. (1999) Influence of hydrodynamics and nutrients on biofilm structure. *Journal of Applied Microbiology* **85**: 19S-28S.
- Stoodley, P., Sauer, K., Davies, D.G., and Costerton, J.W. (2002a) Biofilms as complex differentiated communities. *Annual Review of Microbiology* **56**: 187-209.
- Stoodley, P., Cargo, R., Rupp, C.J., Wilson, S., and Klapper, I. (2002b) Biofilm material properties as related to shear-induced deformation and detachment phenomena. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* **29**: 361-367.
- Sutherland, I.W. (2001) Biofilm exopolysaccharides: a strong and sticky framework. *Microbiology* **147**: 3-9.
- Suzuki, H., Kojima, N., Sugama, A., Takei, F. (1990) Development of a miniature Clark-type oxygen electrode using semiconductor technology and its improvement for practical applications, *Sens. Sens. Actuators* **B** 185-191.

---

## T

- ten Cate, J.M. (2006) Biofilms, a new approach to the microbiology of dental plaque. *Odontology* **94**: 1-9.
- Tijhuis, L., van Loosdrecht, M.C.M., and Heijnen, J.J. (1994) Formation and growth of heterotrophic aerobic biofilms on small suspended particles in airlift reactors. *Biotechnology and Bioengineering* **44**: 595-608.

- Tijhuis, L., Huisman, J.L., Hekkelman, H.D., van Loosdrecht, M.C.M., and Heijnen, J.J. (1995) Formation of nitrifying biofilms on small suspended particles in airlift reactors. *Biotechnology and Bioengineering* **47**: 585-595.
- Trulear, M.G., and Characklis, W.G. (1982) Dynamics of biofilm processes. *Journal Water Pollution Control Federation* **54**: 1288-1310.

## V

- van Loosdrecht, M., and Henze, M. (1999) Maintenance, endogenous respiration, lysis, decay and predation. *Water Science and Technology* **39**: 107-117.
- van Loosdrecht, M.C.M., Lyklema, J., Norde, W., and Zehnder, A.J.B. (1990) Influence of interfaces on microbial activity. *Microbiology and Molecular Biology Review* **54**: 75-87.
- van Loosdrecht, M.C.M., Tijhuis, L., Wijdicks, A.M.S., and Heijnen, J.J. (1995) Population distribution in aerobic biofilms on small suspended particles. *Water Science and Technology* **31**: 163-171.
- van Loosdrecht, M.C.M., Heijnen, J.J., Eberl, H., Kreft, J., and Picioreanu, C. (2002) Mathematical modelling of biofilm structures. *Antonie Van Leeuwenhoek International Journal of General and Molecular Microbiology* **81**: 245-256.
- Vieira, M.J., Melo, L.F. and Pinheiro, M.M. (1993) Biofilm formation: Hydrodynamic effects on internal diffusion and structure.

## W

- Wanner, O. (1996) Modelling of biofilms. *Biofouling* **10**: 31-41.
- Wanner, O. (2006) *Mathematical modeling of biofilms*. London: IWA task group on Biofilm Modeling.
- Wanner, O., and Gujer, W. (1986) A multispecies biofilm model. *Biotechnology and Bioengineering* **28**: 314-328.
- Wanner, O., and Morgenroth, E. (2004) Biofilm modeling with AQUASIM. *Water Science and Technology* **49**: 137-144.
- Wäsche, S., Horn, H., and Hempel, D.C. (2000) Mass transfer phenomena in biofilm systems. *Water Science and Technology* **41**: 357-360.

- Wäsche, S., Horn, H., and Hempel, D.C. (2002) Influence of growth conditions on biofilm development and mass transfer at the bulk/biofilm interface. *Water Research* **36**: 4775-4784.
- Wereley, S.T., and Lueptow, R.M. (1998) Spatio-temporal character of non-wavy and wavy Taylor-Couette flow. *Journal Fluid Mechanic* **364**: 59-80.
- Wereley, S.T., and Lueptow, R.M. (1999) Velocity field for Taylor–Couette flow with an axial flow. *Physics of fluids* **11**: 3637-3649.
- Westall, F. (2010) La géologie et l'origine de la vie. In *Géosciences*.
- Wijeyekoon, S., Mino, T., Satoh, H., and Matsuo, T. (2004) Effects of substrate loading rate on biofilm structure. *Water Research* **38**: 2479-2488.
- Wilderer, P.A., Bungartz, H.J., Lemmer, H., Wagner, M., Keller, J., and Wuertz, S. (2002) Modern scientific methods and their potential in wastewater science and technology. *Water Research* **36**: 370-393.
- Willcock, L., Gilbert, P., Holah, J., Wirtanen, G., and Allison, D.G. (2000) A new technique for the performance evaluation of clean-in-place disinfection of biofilms. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* **25**: 235-241.
- Wimpenny, J.W.T., and Colasanti, R. (1997) A unifying hypothesis for the structure of microbial biofilms based on cellular automaton models. *FEMS Microbiology Ecology* **22**: 1-16.
- Wolf, G., Crespo, J.G., and Reis, M.A.M. (2002) Optical and spectroscopic methods for biofilm examination and monitoring. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology* **1**: 227-251.

---

## X

---

- Xavier, J.B., Picioreanu, C., and van Loosdrecht, M.C.M. (2004) Assessment of three-dimensional biofilm models through direct comparison with confocal microscopy imaging. *Water Science and Technology* **49**: 177-185.
- Xavier, J.B., Picioreanu, C., and van Loosdrecht, M.C.M. (2005) A general description of detachment for multidimensional modelling of biofilms. *Biotechnology and Bioengineering* **91**: 651-669.

**Z**

---

- Zemb, O., Haegeman, B., Delgenès, J.-P., Lebaron, P., and Godon, J.-J. (2007) Safum: statistical analysis of SSCP fingerprints using PCA projections, dendrograms and diversity estimators. *Molecular Ecology Notes* **7**: 767-770.
- Zhang, T.C., and Bishop, P.L. (1994a) Evaluation of tortuosity factors and effective diffusivities in biofilms. *Water Research* **28**: 2279-2287.
- Zhang, T.C., and Bishop, P.L. (1994b) Density, porosity, and pore structure of biofilms. *Water Research* **28**: 2267-2277.
- Zhang, T.C., and Bishop, P.L. (1994c) Experimental determination of the dissolved oxygen boundary layer and mass transfer resistance near the fluid-biofilm interface. *Water Science and Technology* **30**: 47-58.
- Zhang, X., and Bishop, P.L. (2001) Spatial distribution of extracellular polymeric substances in biofilms. *Journal of Environmental Engineering* **127**: 850-856.
- Zumstein, E., Moletta, R., and Godon, J.-J. (2000) Examination of two years of community dynamics in an anaerobic bioreactor using fluorescence polymerase chain reaction (PCR) single-strand conformation polymorphism analysis. *Environmental Microbiology* **2**: 69-78.

## **ANNEXES**



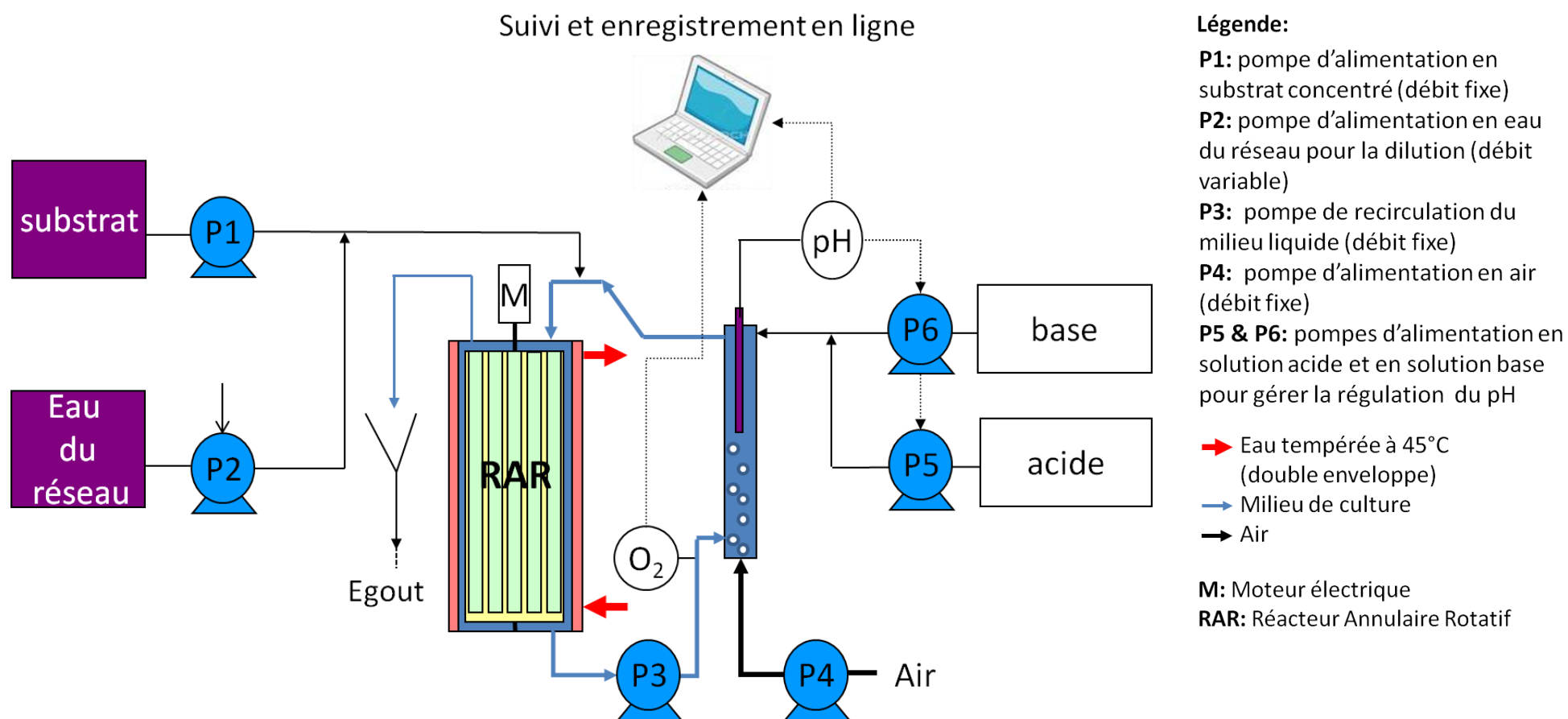


## Tables des Annexes

Annexe I : Schéma du dispositif expérimental.....	193
Annexe II : Mesure des incertitudes sur les pesées .....	195
Annexe III : Calcul d'incertitude sur les mesures .....	199
Annexe IV : Procédure d'arrêt et de démarrage du réacteur .....	203



## Annexe I : Schéma du dispositif expérimental





## Annexe II : Mesure des incertitudes sur les pesées

### Maitrise du pesage

Afin de réaliser une bonne pesée de la masse humide en utilisant la microbalance électronique, le choix et la validation de la méthode mise en place par (Horn et Hempel, 1997b, Staudt *et al*, 2004) est validé par un processus bien défini :

Tout d'abord l'utilisation de la balance pour avoir les résultats les plus fiables possibles:

- La mise de niveau vérifier que la bulle d'air est bien centrée par rapport au repère, corriger le niveau si nécessaire et calibrer la balance.
- La présence d'un pare brise qui permet la limitation des courants d'air et donc la variation de température
- La mise sous tension: la balance doit être toujours reliée au secteur et allumée, de manière à ce qu'un équilibre thermique puisse s'établir au sein de la balance (donc mettre toujours la balance en veille).
- Le récipient de pesée: il faut que celui-ci soit le plus petit possible, et il est déconseillé d'utiliser les récipients en plastique et en verre (si le taux d'humidité dans l'air est de 30 ou 40%). De plus, celui-ci doit être toujours à la même température que l'environnement de pesée. Donc bien faire attention lorsqu'on transfère l'objet à peser dans la chambre de pesée.
- Le plateau: posez le produit au centre du plateau afin d'éviter toute erreur liée aux charges excentrées
- La lecture du résultat: vérifier avant chaque mesure que la balance est bien à zéro et la tarer si nécessaire. On évitera toute erreur due au zéro. Attendre que le détecteur de stabilité (ici l'affichage de "g" de gramme) se stabilise.
- Le calibrage: la balance se calibre automatiquement et régulièrement, souvent après une remise de niveau ou un nettoyage du plateau.
- L'entretien: il faut que la chambre de pesée soit toujours propre et il faut que les récipients soient toujours propres.

Les influences physiques qui peuvent provoquer une instabilité et fait que le poids peut augmenter ou diminuer lentement et donc 'obtenir que les valeurs vont être erronées.

- **La température:** la valeur du poids va varier constamment. Il est important de prendre en considération cet effet. La variation de la pellicule d'eau varie avec la température. Donc un objet froid semble être plus lourd, un objet chaud plus léger. Il faudra prendre cet effet en considération plus particulièrement lors des différentes pesées sur les microbalances. Pour remédier à cela, il est important de ne pas peser un échantillon sorti directement du dessiccateur ou du réfrigérateur.  
Il est donc important d'acclimater l'échantillon à la température du local de pesage, de ne pas introduire à la main directement l'échantillon dans la chambre de pesée, et de choisir un récipient porte-échantillon à la surface faible.
- **L'évaporation ou l'absorption d'humidité:** souvent le poids d'un produit à peser augmente ou diminue sans cesse. Il se produit que la perte de poids est dû à l'évaporation de l'eau. S'il y a une augmentation de poids, cela va nous indiquer que notre produit devient hygroscopique (absorption de l'humidité de l'air). Il est donc important d'utiliser des récipients propres et secs et de conserver la plateforme de pesage bien propre et bien sèche. Les récipients doivent avoir un col serré et la présence d'un couvercle limitera les pertes. Il est important aussi de retirer les supports à base de carton ou de liège.
- **L'électricité statique:** ce phénomène apparaît lorsque pour chaque pesée, on obtient un poids différent. La valeur du poids n'est pas stable et les résultats ne sont pas reproductibles. Pour éliminer ce type de phénomène, il existe plusieurs possibilités, notamment en augmentant l'humidité de l'air (entre 45 et 60% d'humidité), ou faire un blindage du récipient, ou mettre la balance à la terre.
- **Le magnétisme:** le produit pesé présente, suivant sa position sur le plateau, un poids différent et les résultats ne sont pas reproductibles. Etant donné que la force d'attraction diminue avec la distance, la pesée peut être placée plus loin du plateau à l'aide d'un support amagnétique.
- **La poussée aérostatique:** celle-ci intervient lorsque le poids du produit pesé dans l'air ambiant et dans le vide n'a pas le même poids (loi d'Archimède). Sachant que la balance est calibrée avec des poids de calibrage d'une masse volumique de 8.0 g/cm<sup>3</sup>, il en résulte des erreurs dues à la poussée aérostatique dans l'air lorsque l'on pèse des produits de masse volumique plus faible. Si on fait du pesage de grande précision. Le poids affiché doit être corrigé en conséquence. Il est important de contrôler la pression atmosphérique, le taux d'humidité de l'air et la température. Cela peut nous permettre d'en déduire la masse volumique exacte de l'air.

La correction qui peut être faite sur la pesée:

1/ détermination de la masse volumique de l'air:

a=masse volumique de l'air en kg/m<sup>3</sup>

p=pression atmosphérique en hPa (mbar)

h=taux d'humidité relative en %

t=température en °C

$$a \approx \frac{0,348444 \cdot p - (0,00252 \cdot t - 0,020582) \cdot h}{273,15 + t}$$

2/Correction de la poussée aérostatique dans l'air

M=Masse

R= valeur affichée par la balance

$\rho$  = masse volumique du produit à peser.

$$m \approx R \cdot \frac{1 - \frac{a}{8000 \text{ kg/m}^3}}{1 - \frac{a}{\rho}}$$

- **La gravitation:** ce phénomène peut influencer la mesure suivant la mauvaise calibration de la balance suite à un déplacement de celle-ci. La balance mesure une force de gravitation, autrement dit une force d'attraction entre la terre et le produit à peser. Cette force dépend essentiellement de la latitude terrestre du lieu d'emplacement et de l'altitude (distance jusqu'au centre de la terre. La variation de poids va donc reposer sur une réduction de la force de gravitation. Il est donc important de bien calibrer la balance après chaque changement de la balance).

Calcul des erreurs techniques d'analyse:

La précision d'affichage de la balance est de 1mg

- **Dérivée de la sensibilité:** la sensibilité en fonction de la température est l'écart réversible de la valeur de mesure sous l'influence d'une variation de la température environnante. On peut la caractériser par le coefficient de température de la sensibilité, qui donne l'écart en % du poids affiché par degré Celsius.

Ce coefficient peut être calculé d'après la relation suivant:



$\Delta E$  représente la variation de la sensibilité

$\Delta T$  représente la variation de la température

$\Delta R$  correspond à la variation du résultat

M est la charge effective.

$$TC = \frac{\Delta E}{\Delta T} = \frac{\left(\frac{\Delta R}{m}\right)}{\Delta T} = \left(\frac{\Delta R}{m \cdot \Delta T}\right)$$

Cette indication nous permet de calculer l'écart du résultat de la mesure qui va nous intéresser pour une variation de la température donnée. Donc nous pouvons en déduire que:

$$\Delta R = (TC \cdot \Delta T) \cdot m$$

La précision d'affichage d'une balance est le plus petit écart entre deux valeurs de mesure pouvant être lu sur l'affichage. On le nomme souvent l'échelon. Il correspond sur un affichage numérique, au plus petit pas numérique.

Les mesures seront répétées 3 fois par échantillon.

### Annexe III : Calcul d'incertitude sur les mesures

➤ **Incertitude sur la mesure :**

$$I_a(M) = I_{ac}(M) + I_{al}(M)$$

Or  $I_{ac}(M)$  = incertitude absolue du constructeur

$$I_a(M) = \frac{\text{Précision (\%)}}{100} * \text{étendue.de.mesure}$$

Et  $I_{al}(M)$  = incertitude de lecture.

➤ **Calcul d'incertitude.**

➔ **Addition** et **soustraction** des mesures: on additionne les erreurs absolues.

➔ **Multiplication** et **division** des mesures: on additionne les erreurs relatives.

➤ **Calcul des incertitudes sur les concentrations massiques**

$$c = \frac{m}{V}$$

On prend le logarithme :  $\ln(c) = \ln\left(\frac{m}{V}\right)$  soit  $\ln(c) = \ln(m) - \ln(V)$

On effectue la différentielle :

$$d(\ln(c)) = d[\ln(m) - \ln(V)]$$

$$\frac{dC}{C} = \frac{dm}{m} - \frac{dV}{V}$$

Dans la mesure où les incertitudes sont faibles, on assimile les incertitudes absolues des grandeurs physiques aux différentielles :

$$\frac{I_a(c)}{c} = \frac{I_a(m)}{m} - \frac{I_a(V)}{V} \text{ soit}$$

$$Ia(c) = c * \left( \frac{Ia(m)}{m} - \frac{Ia(V)}{V} \right)$$

➤ **Incertitude sur les dilutions:**

À l'équilibre on a :  $C_A V_A = C_B V_B$

on prend le logarithme :  $\ln(C_A V_A) = \ln(C_B V_B)$  soit  $\ln(C_A) = \ln(C_B) + \ln(V_B) - \ln(V_A)$

On effectue la différentielle :

$$d(\ln(C_A)) = d[\ln(C_B) + \ln(V_B) - \ln(V_A)]$$

$$\frac{dC_A}{C_A} = \frac{dC_B}{C_B} + \frac{dV_B}{V_B} - \frac{dV_A}{V_A}$$

Dans la mesure où les incertitudes sont faibles, on assimile les incertitudes absolues des grandeurs physiques aux différentielles :

$$\frac{Ia(C_A)}{C_A} = \frac{Ia(C_B)}{C_B} + \frac{Ia(V_B)}{V_B} - \frac{Ia(V_A)}{V_A} \text{ soit}$$

$$Ia(C_A) = C_A * \left( \frac{Ia(C_B)}{C_B} + \frac{Ia(V_B)}{V_B} - \frac{Ia(V_A)}{V_A} \right)$$

➤ **Incertitude sur l'absorbance:**

Loi de Beer-Lambert :  $A = \varepsilon(\lambda) * l * c$  avec :  $\varepsilon(\lambda)$  : coefficient d'absorption en  $\text{cm}^{-1} \text{mol}^{-1}$

$l$  : épaisseur de la cuve en cm

$c$  : concentration en  $\text{mol.L}^{-1}$

On obtient l'incertitude suivante :  $Ia(A) = A * \left( \frac{Ia(C)}{C} \right)$

Quelques remarques au niveau des incertitudes : pour les concentrations, afin d'estimer une incertitude sur l'extraction des solutions, nous avons estimé celle-ci en fonction de degré de volatilité du chloroforme, du volume de l'ampoule à décanter et on a pris une marge d'erreur sur la manipulation (0,0001).

Cela revient à obtenir l'incertitude suivant : +/- 0,0021 mL



## Annexe IV : Procédure d'arrêt et de démarrage du réacteur

Afin d'effectuer des mesures du biofilm sans perturber son développement et générer du détachement par un arrêt brutal, une procédure d'arrêt du réacteur a été mise en place. L'objectif à atteindre était de trouver une procédure permettant d'arrêter et de redémarrer le réacteur pour faire les prélèvements des coupons sans provoquer de détachement de la biomasse. Les questions soulevées sont : quel pas de vitesse permet de limiter le détachement de biofilm ? Quel est l'impact des arrêts consécutifs et ponctuels ? Des études décrivent que la structure du biofilm est plus cohésive lorsque le cisaillement est plus important et que l'on a une faible charge.

Une culture de biofilm a été réalisée en continu et le comportement du biofilm après différents arrêts a été testé. Afin de trouver la procédure optimale, des tests ont été réalisés à l'aide d'un réacteur annulaire de type Couette Taylor. Différents pas de vitesse ont été testés afin d'arrêter la rotation du cylindre et de le redémarrer. Des mesures de l'épaisseur du biofilm ainsi que de la biomasse libre ont été aussi effectuées. Une observation de l'influence des arrêts successifs et hebdomadaires a été aussi étudiée.

La mesure de l'épaisseur, de quantité de matière attachée, et de la biomasse libre seront quantifiées selon les méthodes de mesure décrites dans la suite de ce chapitre 2.

### *Préparation de l'expérience :*

Un démarrage de réacteur a été réalisé pour une charge élevée ( $78\text{g}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{j}^{-1}$ ), et un temps de séjour court (lessivage de la biomasse planctonique). Le réacteur a étéensemencé avec 100mL d'effluent papetier et acclimaté durant 24h. Le choix de ces conditions opératoires vise à produire un biofilm dont la structure sera particulièrement sensible au détachement par cisaillement. La charge appliquée était plus élevée ( $78\text{g}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{j}^{-1}$ ) que la charge à laquelle les différentes études ont été réalisées ( $25\text{g}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{j}^{-1}$ ) pour un temps de séjour de 15 minutes. La phase liquide est aérée à l'aide d'une boucle de recirculation. L'étude a été réalisée en régime turbulent avec un cisaillement de 0,324Pa (50rpm). Différents pas de vitesse ont été testés : 5rpm, 10rpm, 25rpm et 50rpm. Pour chaque arrêt, l'alimentation a été arrêtée afin de conserver toute la biomasse qui aura été détachée par cette phase d'arrêt et de démarrage du réacteur. Un échantillonnage de liquide a été réalisé avant et après le redémarrage des pompes d'alimentation afin de quantifier la quantité de biomasse détachée par l'arrêt du cylindre

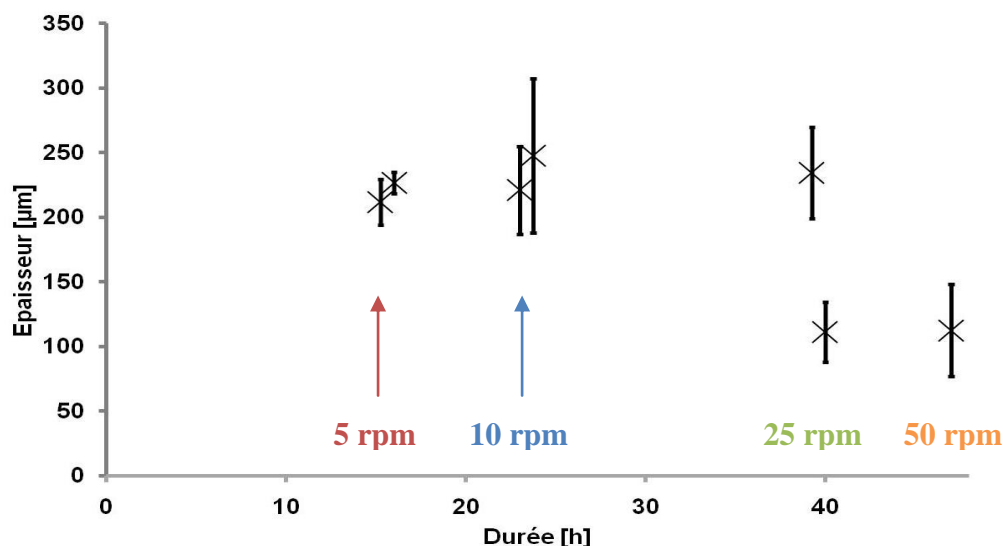
interne. Le nombre de paliers obtenu suivant l'incrémentation du pas de vitesse est fixé à partir de la vitesse de rotation du cylindre. Le Tableau A1 suivant présente le nombre de paliers effectués pour une vitesse de rotation de 50 rpm. Après chaque incrémentation de vitesse, on attend une minute pour stabiliser le système et limiter le décrochement du biofilm.

**Tableau A1: Tableau résumant le nombre de paliers à effectuer pour arrêter le réacteur en rotation à 50 rpm suivant le pas de vitesse**

pas de vitesse (rpm)	nombre de paliers
5	10
10	5
25	2
50	1

Ce nombre de paliers va gérer la durée de cette phase d'arrêt et de redémarrage. Les coupons ont été prélevés sur 3 zones différentes du cylindre afin d'avoir une bonne représentation du biofilm au sein du réacteur.

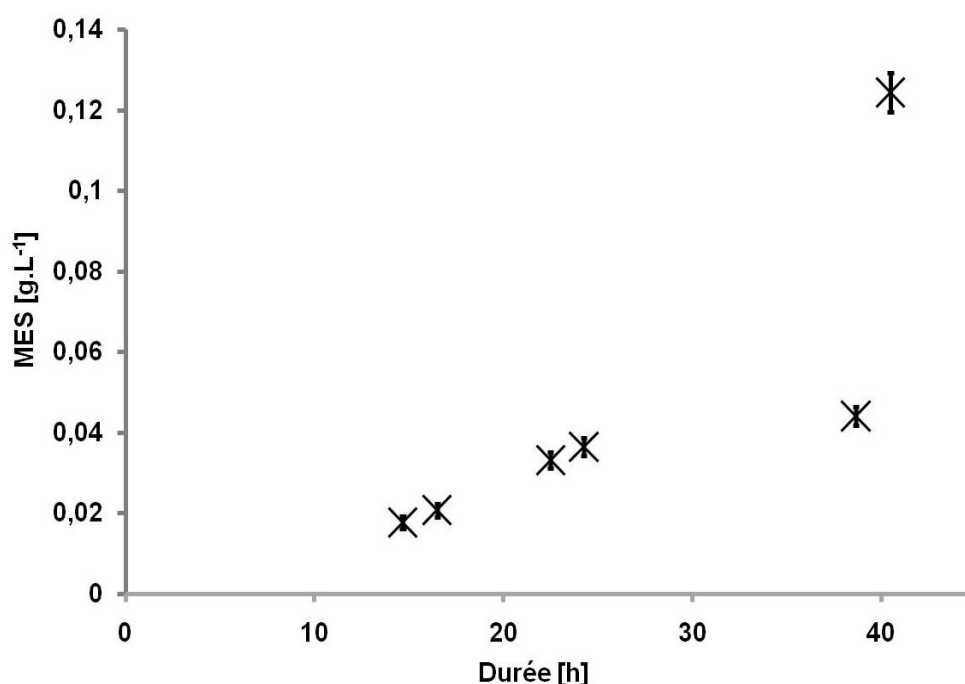
*Analyse des résultats obtenus.*



**Figure AI : Evolution de l'épaisseur du biofilm suivant les arrêts consécutifs à différents pas de vitesse.**

La Figure AI présente l'évolution de l'épaisseur suivant différents arrêts successifs à différents pas de vitesse. Cette épaisseur est obtenue d'après une méthode gravimétrique décrite dans la continuité de ce chapitre 2. D'après la première analyse, il apparaît que lorsque le pas de vitesse est faible, l'épaisseur du biofilm n'est pas influencée par l'arrêt. Cependant, lorsque l'on augmente ce pas de vitesse (25 rpm), il semble que la structure du biofilm soit influencée par le changement brusque de ce pas de vitesse (passage de l'épaisseur de 240 à 100 $\mu\text{m}$  durant un laps de temps de 2 heures).

Au niveau des arrêts successifs (écart entre les prélèvements de 2h maximum), il semble que cela ait peu d'influence sur ce paramètre caractéristique du biofilm. L'épaisseur mesurée entre les deux arrêts varie peu. La Figure AII présente la concentration de biomasse planctonique prélevée avant et après le redémarrage des pompes d'alimentation. Il apparaît clairement que lorsque l'on augmente le pas de vitesse et que l'on se rapproche d'un arrêt brusque (50 rpm), c'est-à-dire équivalent à la vitesse d'étude, le biofilm se détache et la quantité de biomasse planctonique augmente (test où le pas est de 25rpm).



**Figure AII Evolution de la quantité de biomasse planctonique suivant les arrêts consécutifs à différents pas de vitesse.**

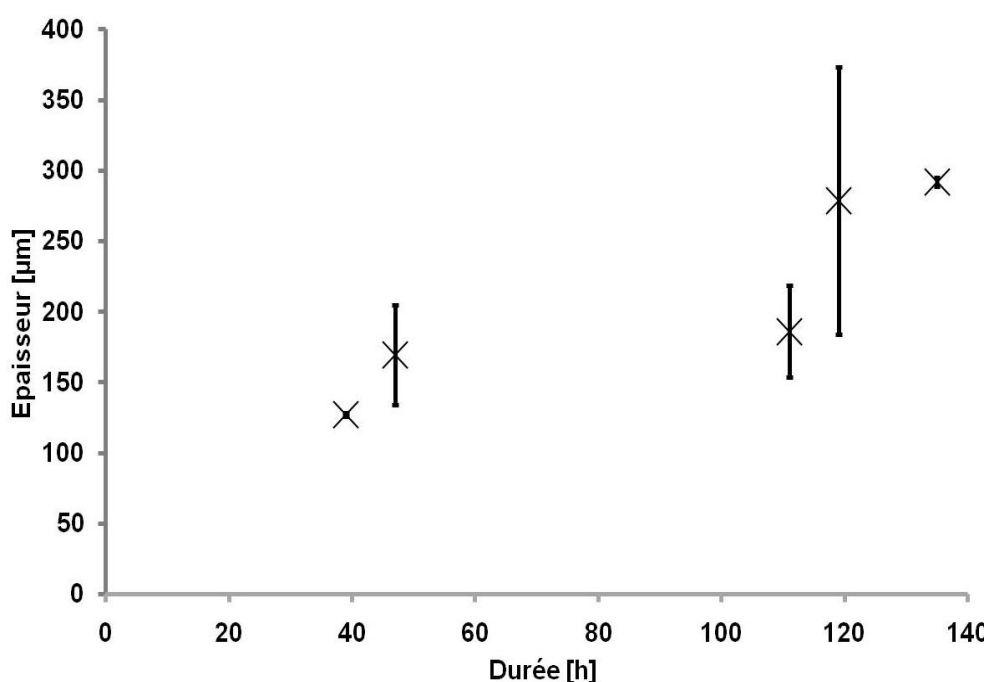
Au niveau des arrêts successifs, il apparaît qu'une légère quantité de biomasse passe du biofilm vers le liquide. Cette faible perte provient d'un détachement de biofilm à proximité des sections des supports qui ont été prélevés. Cette biomasse se détache durant le



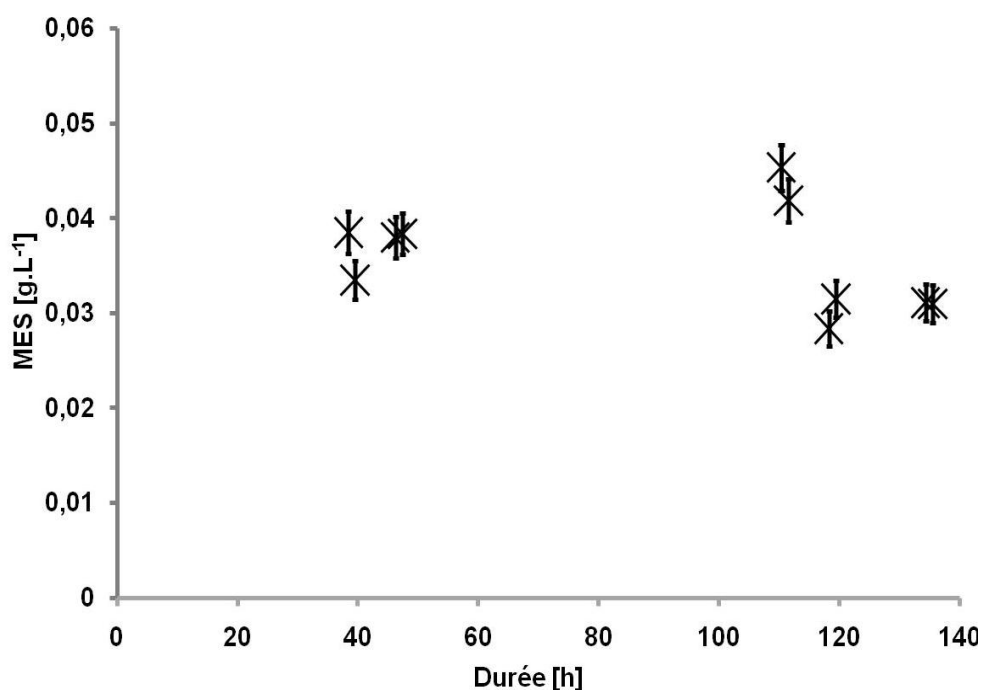
redémarrage du réacteur et passe dans le liquide. Donc les arrêts consécutifs risquent au niveau de ce type de réacteur de fragiliser la structure.

Il semble donc que la vitesse de rotation de 5rpm soit la vitesse la plus sûre pour arrêter et redémarrer les réacteurs lorsque la structure est plus ou moins cohésive. Cependant les arrêts successifs semblent fragiliser le biofilm présent au niveau des coupons sur le cylindre interne. Pour effectuer des arrêts consécutifs dans ce type de réacteur, il faudrait augmenter la surface de colonisation de chaque coupon afin de limiter les pertes. Une nouvelle analyse est réalisée en conservant des pas de vitesse de 5rpm et en réalisant des prélèvements ponctuels et non successifs avec un écart de temps supérieur à 8h. Après le démarrage du réacteur, le second prélèvement de liquide est effectué après une durée en fonctionnement continu qui est égale à la valeur du temps de séjour hydraulique étudié, afin d'observer si le détachement est ponctuel (provenant du détachement causé par la fragilisation du biofilm par le prélèvement du coupon); ou bien continu, provenant de l'érosion causée par le cisaillement.

La Figure AIII présente l'évolution d'épaisseur du biofilm au cours du temps et pour un suivi ponctuel, la Figure AIV, présente l'évolution de la biomasse planctonique.



**Figure AIII Evolution de l'épaisseur du biofilm suivant les arrêts ponctuels pour un pas de vitesse de 5rpm.**



**Figure AIV. Evolution de la biomasse planctonique suivant les arrêts ponctuels pour un pas de vitesse de 5rpm**

Il apparaît clairement que les arrêts ponctuels n'influencent pas l'épaisseur du biofilm. La biomasse planctonique n'évolue pas, ou très peu. Il y a peu de perte de biomasse entre les deux arrêts, donc cette méthode d'arrêt permet de prélever les coupons de biofilm sans avoir des pertes de biomasse par un détachement du à un arrêt brusque.

La meilleure condition d'étude serait de faire des arrêts toutes les 3 à 4 jours, afin de limiter la fragilité du biofilm, et de faire des arrêts en faisant des pas de 5 rpm/min. Des pas de 10 rpm/min influencent aussi peu le détachement du biofilm mais pourra être appliqué dans une phase à forte turbulence car le biofilm sera plus cohésif. Les échantillons de la phase liquide seront effectués avant et après l'arrêt des pompes d'alimentation. La vitesse de rotation va décroître en faisant des pas de 5 rpm. Puis trois coupons vont être retirés et remplacés par trois coupons propres.



# **Etude et modélisation de la compétition entre bactéries planctoniques et attachées dans un réacteur aérobie à biofilm**

## **Résumé**

Dans les systèmes mettant en jeu des biofilms, le temps de séjour hydraulique (TSH) peut être un élément clé pour le développement du biofilm. Nous avons cherché à caractériser l'influence de ce paramètre sur le développement du biofilm et la compétition entre les bactéries fixées et les bactéries planctoniques. Des Réacteurs Annulaires Rotatifs (RAR) ont été mis en œuvre afin d'estimer expérimentalement la répartition de la biomasse totale entre le liquide et le biofilm. Puis à l'aide d'outils moléculaires (PCR-SSCP) et de traitements statistiques des empreintes moléculaires obtenues, les structures des communautés microbiennes libres et attachées ont été estimées et reliées aux paramètres opératoires. Dans un troisième temps, un modèle microbien simple à une dimension (1D) a été adapté pour intégrer une certaine diversité microbienne (10 espèces). La confrontation entre les données expérimentales et les simulations permet d'expliquer l'évolution de la diversité entre le liquide et le biofilm suivant différentes valeurs du TSH. Les résultats obtenus confirment l'importance du TSH sur la formation du biofilm et l'évolution de la diversité dans le biofilm et la flore planctonique. Si le temps de séjour est élevé (8 heures), alors la croissance dans la phase liquide est importante au détriment de celle du biofilm. Pour des temps de séjour courts (0,3 et 1 heure), la croissance du biofilm est favorisée. La biomasse planctonique est principalement issue du détachement du biofilm. Les sorties du modèle indiquent que la diversité diminue durant la croissance du biofilm.

## **Abstract**

In biofilm systems, hydraulic retention time (HRT) may have a significant impact on biofilm development. The influence of this parameter on biofilm development and competition between planktonic and attached bacteria has been investigated. Rotating Annular Reactors (RAR) have been used to determine biomass distribution between the bulk phase and the biofilm. Molecular tools (PCR-SSCP) and statistical treatment of molecular fingerprints have been applied to evaluate the impact of operating parameters on the structure of fixed and attached microbial communities. Then, a simple biofilm model (1D) has been adapted to include microbial diversity (10 species). Comparing experimental data and simulation results, it is possible to explain the evolution of diversity at different HRTs. At high HRT, (8 hours) planktonic bacteria are favoured compared to biofilm microorganisms. At low HRT, biofilm growth is favoured by planktonic bacteria wash-out. Simulations indicate a decrease of diversity over biofilm growth period.

*Mots clés* : Biofilms, compétition, diversité, temps de séjour hydraulique, modèle, diffusion