



HAL
open science

Etude et modélisation du compartiment nitrificateur de la boucle MELiSSA : coculture sur ammonium et triculture sur urée

Nelly Cruvellier

► **To cite this version:**

Nelly Cruvellier. Etude et modélisation du compartiment nitrificateur de la boucle MELiSSA : coculture sur ammonium et triculture sur urée. Génie des procédés. Université Clermont Auvergne [2017-2020], 2017. Français. NNT : 2017CLFAC007 . tel-01791291

HAL Id: tel-01791291

<https://theses.hal.science/tel-01791291>

Submitted on 14 May 2018

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.

**ECOLE DOCTORALE DES SCIENCES DE LA VIE, SANTE,
AGRONOMIE, ENVIRONNEMENT**

N° d'ordre 716

Thèse présentée à l'Université Clermont Auvergne pour l'obtention du
grade de

Docteur d'Université

(Spécialité : Génie des Procédés)

Soutenue publiquement le 06 Avril 2017

Nelly CRUVELLIER

**Etude et modélisation du compartiment
nitrificateur de la boucle MELiSSA :
coculture sur ammonium et triculture
sur urée**

Rapporteurs : Natalie Leys, Directrice de Recherche, SCK-CEN, Belgique
Jérôme Morchain, Maître de conférences HDR, INSA Toulouse

Examineur : Christel Paillé, Ingénieur ESA, ESA/ESTEC, Pays-Bas

Directeur de thèse : C-Gilles DUSSAP, Professeur des Universités, Polytech/Université
Clermont Auvergne

**ECOLE DOCTORALE DES SCIENCES DE LA VIE, SANTE,
AGRONOMIE, ENVIRONNEMENT**

N° d'ordre 716

Thèse présentée à l'Université Clermont Auvergne pour l'obtention du
grade de

Docteur d'Université

(Spécialité : Génie des Procédés)

Soutenue publiquement le 06 Avril 2017

Nelly CRUVELLIER

**Etude et modélisation du compartiment
nitrificateur de la boucle MELiSSA :
coculture sur ammonium et triculture
sur urée**

Rapporteurs : Natalie Leys, Directrice de Recherche, SCK-CEN, Belgique
Jérôme Morchain, Maître de conférences HDR, INSA Toulouse

Examineur : Christel Paillé, Ingénieur ESA, ESA/ESTEC, Pays-Bas

Directeur de thèse : C-Gilles DUSSAP, Professeur des Universités, Polytech/Université
Clermont Auvergne

RÉSUMÉ

Les procédés actuellement utilisés à bord de la Station Spatiale Internationale permettent un traitement physico-chimique des déchets avec un recyclage partiel des éléments en minimisant le réapprovisionnement en eau et oxygène. Voyager plus loin et sur de plus longues durées n'est possible que si un système de support de vie, permettant d'assurer une autonomie plus importante, est mis en place. Le projet MELiSSA est un système de support de vie biorégénératif ayant pour objectifs de recycler les déchets produits par l'homme, de régénérer l'oxygène et l'eau et d'assurer une production de nourriture. L'utilisation de microorganismes pour assurer ces différentes fonctions, n'est réalisable qu'en ayant la meilleure connaissance possible et surtout la maîtrise des processus et des souches impliqués. L'objectif de cette thèse est de développer un modèle prédictif pour le compartiment nitrificateur de la boucle MELiSSA. Dans un premier temps, les souches *Nitrosomonas europaea* ATCC® 19718 et *Nitrobacter winogradskyi* ATCC® 25391 ont été étudiées et ont permis de définir un modèle cinétique de ces deux bactéries en culture immergée. Dans un second temps, ce modèle a été combiné à un modèle N-bacs en série pour composer un modèle de nitrification dans une colonne à lit fixe à biomasse fixée : le modèle NitriSim. Ce modèle a été testé sur une expérience de long-terme menée dans une colonne à lit fixe dont le support est composé de billes Biostyr®. Le dernier chapitre de ce manuscrit décrit l'utilisation d'une souche dégradant l'urée, *Cupriavidus pinatubonensis*, dans le réacteur à lit fixe. Les différents résultats ont permis de définir un modèle de nitrification dans un réacteur à lit fixe et de présenter des perspectives possibles pour le traitement de l'urine au niveau du compartiment nitrifiant de MELiSSA.

Mots-clés : MELiSSA, *Nitrosomonas europaea* ATCC® 19718, *Nitrobacter winogradskyi* ATCC® 25391, colonne à lit fixe, Modélisation

ABSTRACT

Physico-chemical processes are used on the International Space Station for partial recycling of wastes in order to minimize the resupplies of oxygen and water. Further and longer explorations can only be possible if a life support system is applied to enhance autonomy to the station. MELiSSA is a biological life support system project aiming for waste recycling, water and air regeneration and production of simple food. The only way to assure these functions is the use of microorganisms which is requiring a high knowledge and a perfect control of processes implicated. The thesis objectives consist in developing a predictive model for the MELiSSA nitrifying compartment. First, a kinetic study of *Nitrosomonas europaea* ATCC® 19718 and *Nitrobacter winogradskyi* ATCC® 25391 in submerged bioreactors allowed defining a kinetic model of nitrification. Secondly, this model was combined to an N-tanks in series one to compose a nitrification model in fixed-bed bioreactors : NitriSim. It was applied on a long-term experiment in a fixed-bed bioreactors where the bed was composed of Biostyr® beads. The last part of this work was about the use of a urea-degradating bacteria, *Cupriavidus pinatubonensis*, in the fixed-bed bioreactor. All of these results led to the development of a nitrification in fixed-bed reactors model and opened up interesting prospects for the urine degradation in the nitrifying compartment of MELiSSA.

Keywords : MELiSSA, *Nitrosomonas europaea* ATCC® 19718, *Nitrobacter winogradskyi* ATCC® 25391, fixed-bed reactor, Modeling

REMERCIEMENTS

Ces travaux ont été menés au sein de l'axe Génie des Procédés, Energétique et Biosystèmes de l'Institut Pascal. Je souhaite remercier Evelyne GIL, directrice de l'Institut Pascal, notamment pour le soutien qu'elle a su apporter aux doctorants ces dernières années. Je tiens à remercier le Pr C-Gilles DUSSAP de m'avoir accepté au sein de l'axe GePEB de l'Institut Pascal et de m'avoir donné l'opportunité d'effectuer une thèse dans les conditions qui m'ont été offertes.

Je voudrais remercier Mr Christophe LASSEUR, « Project Manager de MELiSSA », pour ses discussions intéressantes autour des systèmes de support de vie et autres durant les nombreuses réunions et rencontres que nous avons partagé.

Merci aux membres du jury d'avoir accepté d'évaluer ce travail de thèse malgré la langue et la difficulté de trajet jusqu'à Clermont-ferrand : Natalie LEYS, Christel PAILLE et Jérôme MORCHAIN. Merci d'avoir consacré du temps à mon travail et d'avoir permis une discussion intéressante le jour de la soutenance. Merci à Christel PAILLE, présidente d'un jury de thèse pour la première fois, qui a su me mettre à l'aise dès le début de la soutenance mais aussi dès les premières réunions MELiSSA.

Cette thèse n'aurait pu être possible sans l'accompagnement de mes encadrants : Catherine CREULY et Laurent POUGHON. Catherine, merci de m'avoir soutenu toutes ces années. Tes conseils, ton écoute et tes connaissances m'ont permis et me permettent encore d'avancer aujourd'hui. Laurent, merci de m'avoir prêté la colonne à lit fixe pendant quelques mois, je sais que ce n'est pas évident de « lâcher » son bébé à quelqu'un d'autre ! Mais surtout, merci pour votre soutien et les heures de conseils/correction/discussion/bière que vous m'avez consacrés. Sans vous, cette thèse ne serait pas la même et la modélisation me paraîtrait encore plus loin qu'elle ne l'est aujourd'hui pour moi. Merci à tous les deux d'avoir accepté de m'encadrer de manière officieuse mais efficace et de m'avoir soutenu dans toutes les situations même les plus délicates. Je vous souhaite le meilleur pour la suite et surtout un Pokédex complet (je peux recommencer à chasser maintenant !).

Mr Duchez, merci de m'avoir soutenu dans mes détresses chromatographiques et notamment d'avoir proposé ton aide lorsque je souhaitais la jeter par la fenêtre ! Merci pour tes nombreuses explications sur ces appareils d'analyse parfois diaboliques. Merci d'avoir répondu présent aux pannes informatiques internes et externes au laboratoire ;)

Merci à tous mes collègues de laboratoire qui m'ont offert de précieux conseils et des discussions intéressantes. Merci pour cet environnement de travail qui m'a donné envie de m'investir dans le laboratoire.

Je tiens à remercier mes collègues les plus proches et, je dois avouer que si je n'ai pas pleuré le jour de ma soutenance, les larmes sont là au moment où j'écris ces lignes. Les thésards, de mon bureau ou d'un autre, merci à tous pour votre bonne humeur. Paolo et Lucie (Tata Lulu !), un grand merci à vous que ce soit sur le plan professionnel, personnel ou sportif : vous êtes devenus rapidement plus que des collègues et merci pour tous ces moments (sauf peut être la planche à repasser...). Alex Noblewesh, ne lâche rien et fait péter les taux de production de gaz (petit jeu de mot placé héhé). Je vous souhaite à tous (les vieux comme les nouveaux Caroline, Amélie et Maarouf) de vous épanouir dans vos travaux respectifs sans vous y enfermez ! Bonne continuation à vous les doctorants ;) J'en viens à mes collègues non-thésards : La fouine, Pompon et Tata-Véro (oui tu es dans cette catégorie !). Je vous remercie pour votre bonne humeur, votre culture musicale et vos vannes (parfois douteuses) ! Nicolas, Grégory je vous souhaite de pouvoir continuer votre activité le plus longtemps possible.

Mes anciens collègues, notamment membres du très prisé « Club des docteurs », merci pour les années passées ensemble, vos conseils de rédaction et de soutenance (le riz, des chaussures confortables, etc... lol). Ghiles, Vanessa merci à vous sur tous les plans, vous êtes géniaux. D'une manière générale, je dois remercier mes amis, et ils se reconnaîtront, pour leur amour, joie et soutien (notamment pour occuper Chloé pendant que papa et maman boivent un coup). Vous avez une place particulière dans mon cœur et, j'espère vous revoir pendant encore de nombreuses années. Les filles (Azin, Eglantine, Vanessa, Véro, Lulu) merci pour les tea-gathering, les voyages, les restaurants et le baby-sitting... Je vous aime toutes, à très vite sur Whatsapp !

La fin de ces remerciements sera consacrée à ma famille de sang et de cœur. Merci à mes parents pour leur soutien et encouragements au cours de ces années pas toujours évidentes. Papa, merci de m'avoir permis de continuer mes études même si ça n'a pas toujours été facile sur le plan financier et à cause de mon caractère ! Ma Marion, tu m'as suivie à Clermont (oui je suis sûre qu'en vrai tu es venue pour moi) et tu as toujours été là. Merci à ma famille d'une manière générale : mes frères, Fred, mes beaux-parents, ma belle-famille...

Je dédie ces travaux aux deux personnes essentielles à ma vie : Damien et ma Chloé. Damien, tu sais déjà tout mais merci d'avoir été la toutes ces années pas toujours évidentes (cf caractère ^^). Merci d'avoir fait de mes choix une priorité, je t'aime. Ma Chloé, tu as été la bouffée d'oxygène pendant ces travaux de thèse et tu m'as permis de prendre conscience de ce qui compte vraiment dans la vie.

LISTE DES ABREVIATIONS

μ_{\max} Voir Taux de croissance maximum	FNA Voir Free nitrous acid - acide nitreux
ADN Voir Acide désoxyribonucléique	HAO Voir Hydroxylamine-oxydoréductase
AMO Voir Ammonium-monoxygénase	IPEV Voir Institut Paul Emile Victor
AOB Voir Bactéries oxydatrices d'ammonium	ISS Voir Station Spatiale Internationale
ATP Voir Adénosine triphosphate	LB Voir Milieu Luria Bertani
b Voir Terme de létalité	LSS Voir Système de Support de Vie
BLSS Voir Systèmes biologiques ou « biorégénératifs »	m Voir Terme de maintenance
CELSS Voir Closed Ecological Life Support System - système de support de vie clos	MELISSA Voir Micro-Ecological Life Support System Alternative
CO ₂ Voir Dioxyde de carbone	MES Voir Matières en suspension
DA Voir Distillation Assembly	MPP Voir MELISSA Pilot Plant
DBO Voir Demande biologique en oxygène	N ₂ Voir diazote
DBO ₅ Voir Quantité d'oxygène consommée en 5 jours	N ₂ O Voir Oxyde nitreux
DCO Voir Demande chimique en oxygène	NDF Voir Numerical Differentiation Formula
DNRA Voir Réduction dissimilative du nitrate en ammonium	NH ₃ Voir Ammoniac
DSMZ® Voir Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH	NH ₄ ⁺ Voir Ion ammonium
ECLSS Voir Environmental Control Life Support System - Système de Support Vie et de Contrôle Environnemental	NO Voir Monoxyde d'azote
ENEA Voir Agence Nationale Italienne pour les Nouvelles Technologies, l'Energie et le Développement Durable	NO ₂ ⁻ Voir Ion nitrite
EPS Voir Exopolysaccharides	NO ₃ ⁻ Voir Ion nitrate
EqH Voir Equivalent habitant	NOB Voir Bactéries oxydatrices de nitrite
ESA Voir Agence Spatiale Européenne	NXR Voir Nitrite oxydoréductase
FA Voir Free ammonia - ammoniac libre	O ₂ Voir Dioxygène
	ODE Voir Système d'équations différentielles ordinaires
	RubisCO) Voir Ribulose Bisphosphate Carboxylase
	SND Voir Nitrification-dénitrification simultanée
	TSA gélose <i>Trypto-caséine soja</i> , Voir Tryptic Soy Agar
	UPA Voir Urine Processor Assembly
	WPA Voir Water Processor Assembly
	WRS Voir Water Recovery System

LISTE DES FIGURES

Figure I-1: Schéma simplifié du cycle de l'azote (Bernhard, 2012).....	9
Figure I-2: Processus de fixation de l'azote par le complexe enzymatique Nitrogénase/Déshydrogénase Réductase	12
Figure I-3: Proposition du déroulement de l'anammox chez les Planctomycètes (Kartal et al., 2011).....	14
Figure I-4: Réduction du nitrate au sein du cycle de l'azote (Sparacino-Watkins et al., 2013)	15
Figure I-5: Exemple du procédé de dénitrification chez <i>Pseudomonas stutzeri</i> p559 (Brock Thomas D. et al., 2005).....	16
Figure I-6: Chaînes respiratoires chez (a) <i>Nitrosomonas</i> et (b) <i>Nitrobacter</i> (Bertrand et al., 2015).....	20
Figure I-7: Représentation du circuit de l'azote lors du traitement des eaux usées (Deronzier et al., 2001)	23
Figure I-8: Boues activées dans le bassin d'aération de la station d'épuration d'Aigueperse (63). Source : Site web SEMERAP	24
Figure I-9: Photo d'un lit bactérien arrosé par les eaux issues de traitement primaire.....	25
Figure I-10: Biostyrène® entrant dans la composition de la technologie Biostyr®	25
Figure I-11 : Schéma du circuit des eaux usées et du traitement de l'eau à bord de l'ISS (Tabb and Carter, 2015).....	28
Figure I-12: Evolution de la masse du système de support vie en fonction de la technologie mise en œuvre et de la durée d'une mission (Poughon, 1998). Les ronds représentent les points de rupture du ECLSS envisagé et indique qu'un changement de technologie serait plus adapté à la mission envisagé	31
Figure I-13: L'écosystème artificiel de la boucle MELiSSA. Compléter les phases 1-5	37
Figure I-14: Représentation de la boucle MELiSSA et des différents compartiments qui la composent.....	38
Figure I-15: Schéma général des réactions assurant la dégradation anaérobie des déchets. Seulement les deux premières réactions se déroulent dans le compartiment liquéfacteur de la boucle MELiSSA (d'après Montràs, 2009)	39
Figure I-16: Plan du MELiSSA Pilot Plant et localisation des différents réacteurs représentatifs de chacun des compartiments. 9A : Sas de préparation pour accéder à la salle axénique 9E ; 9B : Sas de préparation et d'accès à la salle 9C ; 9C : réacteurs C1 et C2 et unité de préparation des déchets ; 9D : C4b (plantes supérieures) et C5 fonctionnant avec des rats ; 9E : salle axénique avec C3 et C4a ; 9F/G/H : salles de supervision et contrôle des	

installations ; 9K : pièce d'analyse contenant un PSM et divers équipements pour le traitement des prélèvements et échantillons.....	42
Figure I-17: Schéma du réacteur du compartiment 1, de ses deux unités et du module de filtration	43
Figure I-18: Représentation schématique du compartiment 2 au MPP	44
Figure I-19: Représentation schématique (droite) et photo (gauche) du réacteur du compartiment C4a	45
Figure I-20: Représentation du compartiment plantes supérieures du MELiSSA Pilot Plant .	45
Figure I-21: Schéma du réacteur du compartiment C5 (gauche) et photo lors d'une manipulation (droite).....	46
Figure I-22: Planning du couplage des compartiments 3, 4a et 5 au MELiSSA Pilot Plant....	47
Figure I-23: Représentation schématique (gauche) et photo (droite) de la colonne à lit fixe représentative du compartiment C3 de la boucle MELiSSA. (1) Lit fixe ; (2) Section inférieure dédiée à l'aération, aux capteurs et à la circulation liquide ; (3) Section supérieure avec sonde et recirculation du gaz ; (4) Arrivée du gaz d'aération ; (5) Condenseur ; (6) Entrée du gaz (oxygène/azote) ; (7) Entrée liquide ; (8) Recirculation liquide ; (9) Sortie liquide/effluent ; (10) et (11) Contrôle pH ; (12) Sondes température ; (13) Sondes oxygène ; (14) Sondes pH ; (15) et (16) Contrôle température ; (17) Module de prélèvement.....	49
Figure I-24: Installation du compartiment C3 au MELiSSA Pilot Plant. En rouge le réacteur à lit fixe et en vert les tanks d'alimentation et sortie liquide	51
Figure I-25: Evolution de l'activité de <i>Nitrosomonas</i> (A) et <i>Nitrobacter</i> (B) en fonction du pH du milieu de culture (Grunditz C. and Dalhammar G., 2001).....	57
Figure I-26: Evolution de l'activité de <i>Nitrosomonas</i> (A) et <i>Nitrobacter</i> (B) en fonction de la température (Grunditz C. and Dalhammar G., 2001)	58
Figure I-27: Représentation de la croissance de <i>Nitrosomonas</i> et <i>Nitrobacter</i> en conditions optimales. Les concentrations des composés azotés sont données en mg N/L, les traits oranges représentent les zones de croissance de <i>Nitrosomonas europaea</i> et les traits bleus celles de <i>Nitrobacter winogradskyi</i>	60
Figure I-28: Modèle de l'expression des gènes chez <i>Nitrosomonas europaea</i> et <i>Nitrobacter winogradskyi</i> cultivées séparément et en coculture (d'après Pérez et al., 2015).....	61
Figure I-29 : Les différentes étapes de formation du biofilm (d'après Stoodley et al., 2002) 1. Attachement initial, 2. Attachement irréversible, 3. Formation primaire de la structure du biofilm, 4. Maturation du biofilm, 5. Détachement et retour à l'état planctonique	64
Figure I-30: Evolution des concentrations en oxygène dissous, ammonium, nitrate, biomasse et du pH au sein du biofilm de bactéries nitrifiantes	66
Figure I-31: Modèles utilisés pour le traitement des eaux et répartition par organisation (Hauduc et al., 2009).....	67

Figure I-32: Modélisation de la nitrification dans le modèle ASM2 (Henze, 2007). μ_{AUT} est le taux de croissance maximum des autotrophes nitrifiants et il vaut 1 j^{-1} ; b_{AUT} le taux de létalité vaut 0.15 j^{-1} ; X_{AUT} est la concentration bactérienne; K_{O_2} , K_{NH_4} , K_P et K_{ALK} sont les coefficients de saturation à 20°C respectivement pour l'oxygène ($0.50 \text{ gO}_2 \cdot \text{m}^{-3}$), l'ammonium ($1.00 \text{ gN} \cdot \text{m}^{-3}$), le phosphore ($0.01 \text{ gP} \cdot \text{m}^{-3}$) et la base ($0.50 \text{ mol HCO}_3^- \cdot \text{m}^{-3}$).	67
Figure I-33: Représentation du réacteur à biofilm dans le modèle AQUASIM (Wanner and Morgenroth, 2004). Les flèches noires représentent les flux avec les autres compartiments et les flèches grises, les flux à l'intérieur du compartiment.	68
Figure I-34 : Représentation schématique de la transformation de l'urée en nitrate sous l'action de la « tri-culture ».....	72
Figure II-1: Courbe étalon du dosage de l'urée selon Knorst <i>et al</i> , 1997.....	86
Figure II-2: Représentation schématique d'un bioréacteur de culture bactérienne.....	88
Figure II-3 : Bioréacteurs de 500 mL utilisés pour la caractérisation cinétique des bactéries nitrifiantes.....	89
Figure II-4 : Réacteur de 4 L pour la coculture de bactéries nitrifiantes en cellules libres	91
Figure II-5 : Vue éclatée de la colonne à lit fixe (droite) et représentation de l'hydrodynamique du réacteur (gauche)	93
Figure II-6: La colonne à lit fixe présente à l'Institut Pascal et ses constituants. 1. Bouteille de base et balance; 2. Bidon de stock de sortie de réacteur; 3. Pompes péristaltiques; 4. Bidon d'alimentation; 5. Cryostat pour la régulation température de la colonne et du condenseur; 6. Unité d'acquisition des paramètres on-line; 7. Analyse gaz placé en sortie de réacteur.....	94
Figure II-7: Equivalence entre pourcentage et débit réel délivré par le débitmètre situé sur la colonne	96
Figure II-8: Corrélacion entre le réglage de la pompe et le débit assuré par les deux tuyaux sélectionnés	97
Figure II-9: Approche utilisée pour la modélisation de la nitrification.....	99
Figure II-10: Schéma du modèle N-tanks en série utilisé pour modéliser la colonne à lit fixe. G_{in} est le débit de gaz en entrée de réacteur, F_{in} celui de l'alimentation liquide; F_{recy} est le débit de la boucle de recirculation liquide; $F_{back-mix}$ représente le rétro-mélange entre les bacs du lit fixe.....	101
Figure II-11: Principe de la limitation de la diffusion en oxygène dans le biofilm	103
Figure II-12: Interface de NitriSim pour résoudre le système d'équations	106
Figure III-1: Evolution de la concentration bactérienne durant les cultures pures de <i>Nitrosomonas europaea</i> . A. Réacteur 1; B. Réacteur 2; C. Réacteur 3; D. Réacteur 4; les flèches 1 et 2 représentent respectivement les ajouts 1 et 2 d'ammonium dans chaque réacteur. Le réacteur 2 (B) a été arrêté plus tôt en raison d'un problème technique.	113

Figure III-2: Evolution des concentrations en ammonium et nitrite (gN/L) dans chaque réacteur durant les cultures pures de <i>Nitrosomonas europaea</i> . A. Réacteur 1 ; B. Réacteur 2 ; C. Réacteur 3 ; D. Réacteur 4 ; N-NO ₂ ⁻ : carré rouge ; N-NH ₄ ⁺ : losange bleu.....	114
Figure III-3: Détermination du taux de croissance spécifique observé μ_{obs} par régression linéaire pour le Réacteur 3 durant les cultures pures de <i>Nitrosomonas europaea</i>	115
Figure III-4: Courbe $q_{obs}=f(\mu_{obs})$ pour les cultures pures de <i>Nitrosomonas europaea</i>	116
Figure III-5: Suivi de la concentration bactérienne durant les cultures pures de <i>Nitrobacter winogradskyi</i> . Les flèches 1, 2, 3 et 4 représentent respectivement les ajouts 1, 2, 3 et 4 de nitrite dans les réacteurs.	117
Figure III-6: Evolution du nitrite et du nitrate dans le réacteur 3 au cours des cultures pures de <i>Nitrobacter winogradskyi</i>	118
Figure III-7: Détermination du taux de croissance spécifique observé μ_{obs} par régression linéaire pour le Réacteur 3 durant les cultures pures de <i>Nitrobacter winogradskyi</i>	119
Figure III-8: Evolution de la concentration bactérienne durant la coculture A. Flèche 1 : Fed-batch 1 ; Flèche 2 : Fed-batch 2.	123
Figure III-9: Evolution des composés azotés durant la coculture A. Les concentrations sont données en gN/L.....	123
Figure III-10: Comparaison des termes de limitation de la croissance de <i>Nitrosomonas</i> en fonction de la concentration en ammonium	125
Figure III-11: Comparaison entre les concentrations bactériennes expérimentales (rouge) et prédites (noire).....	125
Figure III-12: Evolution des concentrations en ammonium (A) et nitrate (B) expérimentale (rouge) et prédite (noire) dans la coculture A.....	126
Figure III-13: Evolution de la concentration en nitrite expérimentale (rouge) et prédite par le modèle (noire) dans la coculture A	126
Figure III-14 : Comparaison entre les données expérimentales (trait pointillés) et prédites par NitriSimR (trait plein) durant la coculture A. A. Ajout de base dans le réacteur, valeurs normalisées ; B. Evolution de la concentration en oxygène dissous.	127
Figure III-15: Comparaison entre les données expérimentales (rouge) et prédites par le modèle de nitrification (noire) durant la coculture B ; A. Ammonium ; B. Nitrite ; C. Nitrate.	128
Figure III-16 : Comparaison entre les données expérimentales (rouge) et prédites par le modèle de nitrification (noire) durant la coculture C ; A. Ammonium ; B. Nitrite ; C. Nitrate.	129
Figure III-17 : Comparaison entre les données expérimentales (rouge) et prédites par le modèle de nitrification (noire) durant la coculture D ; A. Ammonium ; B. Nitrite ; C. Nitrate.	130
Figure III-18 : Comparaison entre les données expérimentales (rouge) et prédites par le modèle de nitrification (noire) durant la coculture E ; A. Ammonium ; B. Nitrite ; C. Nitrate.	131

Figure III-19: Ajout de base dans le réacteur 3 et évolution de la concentration bactérienne durant la culture pure de <i>Nitrosomonas europaea</i> . La courbe en pointillés représente l'ajout de base et les points bleus, les mesures de la concentration bactérienne.	133
Figure III-20: Comparaison de l'ajout de base et de la concentration en oxygène dissous dans le réacteur 3 de <i>Nitrosomonas europaea</i> . La courbe en pointillés représente l'ajout de base et la courbe rouge, l'évolution de l'oxygène dissous.	134
Figure III-21: Suivi de l'ajout de base et de la concentration en oxygène dissous durant la coculture A. La courbe en pointillés représente l'ajout de base ; la courbe en trait plein, la concentration en oxygène dissous ; flèches 1, phases d'oxydation de l'ammonium ; flèches 2, phases d'oxydation du nitrite.	135
Figure III-22: Comparaison entre les données expérimentales (trait pointillés) et prédites par NitriSim (trait plein) durant la coculture B. A. Ajout de base dans le réacteur, l'acquisition de la base n'est disponible qu'à partir de 135 h ; B. Evolution de la concentration en oxygène dissous.	136
Figure III-23: Preuve expérimentale de la nitrification partielle durant la coculture B (seconde phase de consommation d'ammonium). A. Données prédites par NitriSim : consommation de l'oxygène (trait plein) et ratio théorique H^+/O_2 (trait pointillé), phase 1 : nitrification partielle et accumulation de nitrite, phase 2 : oxydation du nitrite accumulé ; B. Données expérimentales de la consommation d'oxygène (trait plein) et du ratio H^+/O_2 (trait pointillé) ; C. Evolution des concentrations expérimentales des composés azotés durant la coculture B, l'encadré bleu représente la période représentée en Figure III-23A et B.	137
Figure IV-1: Schéma de fonctionnement de la colonne à lit fixe.	144
Figure IV-2: Profil obtenu lors de la détermination de T_R pour l'expérience J en absence de lit fixe, débit liquide d'alimentation de 2.29 mL/min, recyclage liquide 13.78 et débit de gaz de 0.3 L/min.	146
Figure IV-3: Profil obtenu lors de la détermination de T_R avec et sans recyclage liquide dans la colonne à lit fixe. Courbe rouge, expérience E : débit liquide d'alimentation de 1.91 mL/min, débit de gaz de 0.3 L/min et pas de recyclage liquide ; Courbe noire, expérience G : débit liquide d'alimentation de 1.87 mL/min, recyclage liquide 11.20 et débit de gaz de 0.3 L/min.	146
Figure IV-4: Expérience de distribution de temps de séjour dans le C3 au MPP pour débit liquide d'alimentation de 0.85 mL/min, débit de gaz de 0.04 L/min et recyclage liquide de 4.5 mL/min. Les points noirs représentent les données expérimentales et la courbe en trait plein les données modélisées (Pérez et al., 2005).	147
Figure IV-5: Volume de gaz en fonction du débit d'air appliqué dans la colonne à lit fixe.	149
Figure IV-6: Détermination expérimentale du coefficient volumétrique de transfert d'oxygène K_La dans la colonne à lit fixe. Des duplicats ont été réalisés pour chaque d'air testé.	150

Figure IV-7: Comparaison des mesures de coefficient volumétrique de transfert de l'oxygène en fonction des vitesses superficielles d'air dans les différents réacteurs et la colonne à lit fixe.	152
Figure IV-8: Comparaison des mesures de coefficient volumétrique de transfert de l'oxygène en fonction du VVM dans les différents réacteurs et la colonne à lit fixe.	152
Figure IV-9: Evolution des composés azotés et de la charge entrante en azote dans la colonne à lit durant la mise en place de la nitrification totale.	156
Figure IV-10: Bilan azote durant la mise en place de la nitrification. La droite en pointillés représente le moment où la nitrification totale est atteinte.	157
Figure IV-11: Efficacité de nitrification durant l'établissement de la nitrification totale par <i>N. europaea</i> et <i>N. winogradskyi</i> . La droite en pointillés représente le moment où la nitrification totale est atteinte.	158
Figure IV-12: Photo du lit fixe après la mise en place du mode continu à 55 jours.	159
Figure IV-13: Evolution des composés azotés et de la charge réelle en azote pendant les quatre premières phases d'étude.	160
Figure IV-14: Evolution des composés azotés et de la charge réelle en azote durant les phases P6 à P9. L'étoile orange représente la diminution de la charge en azote entrante en réponse à la lyse cellulaire causée par les coupures d'électricité et d'air.	161
Figure IV-15: Variation de la valeur du pH au cours de la nitrification dans la colonne à lit fixe.	162
Figure IV-16: Evolution des composés azotés et de la charge réelle en azote durant les phase P9.A1 à P13.	164
Figure IV-17: Evolution de la concentration en oxygène dissous et de la vitesse d'ajout de base dans la colonne à lit fixe durant la période de 50 à 150 jours.	165
Figure IV-18: Evolution des composés azotés et de la charge réelle en azote durant les phases P13 à P19 de variations de temps de séjour T_R . L'étoile représente une variation de charge due au changement de la concentration en azote dans le bidon d'alimentation.	166
Figure IV-19: Développement de la biomasse en bas de réacteur (gauche) et dans la partie centrale (droite) à la fin de la phase P19. La biomasse crée une zone marron, elle est peut perceptible sur le lit fixe.	167
Figure IV-20: Evolution des composés azotés et de la charge réelle en azote durant les phases P20 à P24. L'étoile représente une variation de charge due au changement de la concentration en azote dans le bidon d'alimentation.	168
Figure IV-21: Evolution de la charge en azote et des composés azotés durant les tests sur urée.	170

Figure IV-22: Evolution des composés azotés et de la charge réelle entrante en azote durant la deuxième série de charges élevées. Les phases numérotées en rouge sont celles où se sont déroulés les incidents techniques.	172
Figure IV-23: Evolution de la colonisation du lit fixe par la biomasse avant (gauche) et après (droite) l'application de fortes charges en azote en entrée de colonne.....	173
Figure IV-24: Colonisation de la colonne deux mois après la fin de la phase P42	173
Figure IV-25: Bilan sur l'azote pendant la caractérisation de la nitrification dans la colonne à lit fixe. La ligne rouge représente la valeur attendue de 100 %.....	174
Figure IV-26: Efficacité de nitrification pendant la caractérisation de la nitrification dans la colonne à lit fixe. Les barres bleues représentent les phases où la nitrification est totale, les barres rouges celles où la nitrification est partielle.....	175
Figure IV-27: Charge en ammonium éliminée dans la colonne à lit fixe. Les barres rouges représentent la charge en azote entrante qui n'a pas été oxydée et les barres bleues la charge éliminée en azote.	177
Figure IV-28: Evolution du débit de rétro-mélange en fonction du nombre de bacs pour 3 expériences de distributions de temps de séjour (Exp. B, G et K)	179
Figure IV-29: Comparaison entre les données prédites (en noir) et les données expérimentales (losange bleu) de la concentration en $N-NH_4^+$ en sortie de réacteur. Les données entourées par les rectangles rouges représentent les incidents techniques.....	182
Figure IV-30: Comparaison entre les données prédites (en noir) et les données expérimentales (carré rouge) de la concentration en $N-NO_2^-$ en sortie de réacteur.....	183
Figure IV-31: Comparaison entre les données prédites (en noir) et les données expérimentales (triangle vert) de la concentration en $N-NO_3^-$ en sortie de réacteur. Les données entourées par les rectangles rouges représentent les incidents techniques.....	184
Figure IV-32: Prédiction de la répartition de <i>Nitrosomonas europaea</i> (A) et <i>Nitrobacter winogradskyi</i> (B) dans les différents bacs composant le lit fixe du réacteur.	184
Figure IV-33: Prédiction de la répartition de la biomasse inerte fixée dans le lit fixe	185
Figure IV-34: Prédiction de l'évolution de l'oxygène au sein du lit fixe durant l'expérience..	186
Figure IV-35: Evolution de la concentration en oxygène dissous expérimentale (courbe bleue) et vitesse de l'ajout de base expérimentale (courbe rouge) dans la colonne à lit fixe.	187
Figure IV-36: Evolution du ratio H^+/O_2 et de la concentration en ammonium durant la nitrification dans la colonne à lit fixe. Les données sont calculées à partir des prédictions obtenues avec NitriSim.....	188
Figure IV-37: Evolution des données prédites pour le ratio H^+/O_2 et la concentration en ammonium et nitrite durant les phases P11 (A) et P40 (B).	188

Figure IV-38: Evolution des composés azotés et de la charge entrante en azote dans la colonne à lit fixe durant l'étape de caractérisation.....190

LISTE DES TABLEAUX

Tableau II-1: Récapitulatif des formes de l'azote, de leur état d'oxydation et de leurs principales caractéristiques.	10
Tableau II-2: Principales réactions intervenant dans le cycle de l'azote.	11
Tableau II-3: Exemple de microorganismes intervenant dans le cycle de l'azote.	16
Tableau II-4: Composition moyenne des eaux usées et concentrations imposées pour leur rejet en mg/L.	22
Tableau II-5: Fonctions assurées par un ECLSS.	30
Tableau II-6: Masse relative à embarquer en fonction du niveau du système de support vie choisi (Poughon, 1998).	32
Tableau II-7: Besoins journaliers à assumer au sein d'une station spatiale.	33
Tableau II-8: Déchets journaliers produits au sein d'une station spatiale (Eckart, 1996).	33
Tableau II-9 : Récapitulatif des systèmes de support de vie au cours des années (Eckart, 1996; Nelson et al., 2010; Tako et al., 2011).	34
Tableau II-10: Composition du milieu artificiel du compartiment 1 simulant les déchets produits par un homme.	43
Tableau II-11: Caractéristiques physiques du réacteur pilote au MPP du compartiment C3 de la boucle MELISSA.	50
Tableau II-12: Paramètres cinétiques de <i>Nitrosomonas</i> et <i>Nitrobacter</i> trouvés dans la littérature.	53
Tableau II-13: Recensement des variantes du modèle de Pirt utilisées pour la représentation de la nitrification.	69
Tableau II-14 : Composition de l'urine de l'homme.	70
Tableau II-15: Composition de l'urine synthétique (Brooks and Keevil, 1997).	71
Tableau II-16 : Taux de croissance maximum μ_{max} référencés dans la littérature pour <i>C. pinatubonensis</i>	74
Tableau III-1 : Milieu de culture ATCC® #2265 pour <i>Nitrosomonas europaea</i>	79
Tableau III-2 : Milieu de culture ATCC® #480 pour <i>Nitrobacter winogradskyi</i>	80
Tableau III-3 : Milieu riche #756 pour <i>Nitrobacter winogradskyi</i>	80
Tableau III-4 : Composition du milieu de coculture pour les cultures mixtes de <i>Nitrosomonas europaea</i> et <i>Nitrobacter winogradskyi</i>	81
Tableau III-5: Composition du milieu de culture LB pour <i>Cupriavidus pinatubonensis</i>	81
Tableau III-6 : Conditions de culture dans les bioréacteurs de 500 mL.	90
Tableau III-7 : Conditions de culture pour la stratégie A.	91
Tableau III-8 : Phases de Fed-batch pour la stratégie B.	92
Tableau III-9: Modèle hydrodynamique de la colonne à lit fixe.	101

Tableau III-10: Paramètres physiques et cinétiques utilisés dans le modèle de nitrification. Les lettres P, C et I signifient que le paramètre est respectivement défini par l'opérateur, doit être calibré ou mesuré et est une variable interne du programme.	104
Tableau IV-1: Rendements théoriques des réactions de croissance et maintenance pour <i>Nitrosomonas europaea</i> et <i>Nitrobacter winogradskyi</i> (Poughon et al., 2001).....	109
Tableau IV-2: Modèles cinétiques de Pirt utilisés pour la description de bactéries nitrifiantes.	110
Tableau IV-3: Caractéristiques des cultures pures de <i>Nitrosomonas europaea</i> et <i>Nitrobacter winogradskyi</i>	112
Tableau IV-4: Détermination du taux de croissance spécifique observé μ_{obs} par phase et par réacteur pendant les cultures pures de <i>N. europaea</i> . Les écarts-type sont donnés entre parenthèses.	115
Tableau IV-5: Détermination du taux de croissance spécifique observé μ_{obs} par phase et par réacteur pendant les cultures pures de <i>Nitrobacter winogradskyi</i> . Les écarts-types sont donnés entre parenthèses.....	119
Tableau IV-6: Paramètres cinétiques calculés pendant les cultures pures de <i>Nitrobacter winogradskyi</i> . Valeurs moyennes calculées sur les trois dernières phases, les écarts-types sont donnés entre parenthèses.	120
Tableau IV-7: Récapitulatif des paramètres cinétiques de <i>Nitrosomonas europaea</i> et <i>Nitrobacter winogradskyi</i> qui seront utilisés dans le modèle de croissance.....	120
Tableau IV-8: Paramètres sélectionnés pour la simulation de la coculture A.	124
Tableau IV-9: Paramètres sélectionnés pour la simulation de la coculture B.	127
Tableau IV-10 : Paramètres sélectionnés pour la simulation de la coculture C.	128
Tableau IV-11 : Paramètres sélectionnés pour la simulation de la coculture D.	130
Tableau IV-12 : Paramètres sélectionnés pour la simulation de la coculture E.	131
Tableau IV-13 : Récapitulatif des paramètres cinétiques définis lors des cultures pures de <i>Nitrosomonas europaea</i> ATCC® 19718 et <i>Nitrobacter winogradskyi</i> ATCC® 25391.....	138
Tableau V-1: Résultats expérimentaux obtenus lors des déterminations du temps de séjour T_R dans différentes conditions.	145
Tableau V-2: Volumes de la colonne exprimés en mL déterminés sur trois expériences différentes.	148
Tableau V-3 : Comparaison des coefficients de transfert volumétriques de l'oxygène de différents réacteurs. GePEB1 est la colonne à lit fixe de l'Institut Pascal de diamètre 60 mm ; C50 est une colonne de 53 mm de diamètre composée d'un lit fixe seul (Poughon, 1999) ; UAB1 et UAB2 sont des colonnes à lit fixe de petit diamètre (0.038 m) utilisés pour la caractérisation hydrodynamique du réacteur du C3 (Pérez et al., 1999; Poughon, 1999)...	151

Tableau V-4: Définition des conditions nominales de fonctionnement de la colonne à lit fixe.	153
Tableau V-5: Plan expérimental appliqué sur la colonne à lit regroupant les principales conditions testées.....	154
Tableau V-6: Les différentes variations de conditions expérimentales durant la mise en place de la nitrification totale dans la colonne à lit fixe pendant la phase P0.....	155
Tableau V-7: Variation des conditions expérimentales durant les phases P1 à P5.	159
Tableau V-8: Variation des conditions expérimentales durant les phases P6 à P9.	161
Tableau V-9: Variation des conditions expérimentales durant les phases P9.A1 à P13.....	163
Tableau V-10: Variation des conditions expérimentales durant les phases P14 à P19.	165
Tableau V-11: Variation des conditions expérimentales durant les phases P20 à P24.	167
Tableau V-12: Variation des conditions expérimentales durant les phases de test sur urée P25 à P34.	169
Tableau V-13: Variation des conditions expérimentales durant les phases P35 à P42.	171
Tableau V-14: Calcul du ratio Oxygène/Azote à oxyder de la phase P36 à P42.	171
Tableau V-15 : Causes possibles des bilans aberrants observés au cours de l'expérience de nitrification dans la colonne à lit fixe.	175
Tableau V-16: Phases de nitrification partielle et cause associée.....	176
Tableau V-17 : Récapitulatif des données physiques de la colonne pour NitriSim.	178
Tableau V-18: Détermination du débit de rétro-mélange pour plusieurs déterminations expérimentales de temps de séjour.	180
Tableau V-19: Paramètres biologiques utilisés dans le modèle NitriSim.....	181

SOMMAIRE

Introduction	1
Chapitre I : Etude bibliographique	9
I.1 L'azote dans l'environnement et la nitrification	9
I.1.1 L'azote, omniprésent dans l'environnement.....	9
I.1.1.1 La fixation de l'azote	11
I.1.1.2 L'assimilation de l'ammonium et l'ammonification	12
I.1.1.3 La nitrification.....	13
I.1.1.4 L'anammox	13
I.1.1.5 La réduction du nitrate	14
I.1.2 Plantes, bactéries et archées : les acteurs du cycle.....	16
I.1.3 La nitrification	17
I.1.3.1 La nitrification comme source d'énergie et le CO ₂ comme source de carbone.	18
I.1.3.2 La respiration aérobie et le transfert d'électrons.....	19
I.1.3.3 La nitrification hétérotrophe.....	20
I.1.3.4 La nitrification dans l'environnement	20
I.2 Procédés d'élimination de l'azote	21
I.2.1 Composition et caractérisation des eaux usées.....	21
I.2.2 Elimination de l'azote en station d'épuration	22
I.2.3 Les boues activées.....	23
I.2.4 Les cultures fixées.....	24
I.2.5 L'azote en environnements confinés et/ou extrêmes	26
I.2.5.1 Les sous-marins.....	26
I.2.5.2 La base antarctique Concordia	27
I.2.5.3 L'exploration spatiale	27
I.2.5.3.1 L' « Urine Processor Assembly » UPA.....	28
I.2.5.3.2 Le « Water Processor Assembly » WPA.....	29
I.3 Les Systèmes de Support Vie et Contrôle Environnemental et le projet MELiSSA.....	29
I.3.1 Les Système de Support Vie et de Contrôle Environnemental.....	29

I.3.1.1 Définition.....	29
I.3.1.2 Le développement d'un système de support vie.....	30
I.3.1.3 Les contraintes de développement des ECLSS	31
I.3.1.4 Les besoins et les déchets de l'homme.....	32
I.3.1.5 Les LSS physico-chimiques et régénératifs.....	34
I.3.1.6 Historique des ECLSS régénératifs.....	34
I.3.2 MELiSSA.....	36
I.3.2.1 Contexte	36
I.3.2.2 Description du projet.....	36
I.3.2.3 Développement de MELiSSA.....	38
I.3.2.4 Les compartiments de la boucle MELiSSA.....	39
I.3.3 Le démonstrateur : MELiSSA Pilot Plant	41
I.3.3.1 Présentation.....	41
I.3.3.2 Organisation et plan du MPP	42
I.3.3.3 Les réacteurs pilotes des compartiments	43
Le compartiment 1 – C1.....	43
Le compartiment 2 – C2.....	44
Le compartiment 3 – C3.....	44
Le compartiment 4 – C4.....	44
Le compartiment 5 – C5.....	46
I.3.3.4 Le couplage des compartiments	46
I.3.4 Description, objectifs et contraintes du compartiment 3	47
I.3.5 Le réacteur du compartiment 3.....	49
I.3.6 Les souches utilisées	52
I.3.6.1 <i>Nitrosomonas europaea</i> ATCC® 19718.....	52
I.3.6.2 <i>Nitrobacter winogradskyi</i> ATCC® 25391.....	52
I.3.7 Modélisation du compartiment 3.....	52
I.4 Culture des bactéries nitrifiantes <i>N. europaea</i> et <i>N. winogradskyi</i>	53
I.4.1 Cinétiques de croissance de <i>N. europaea</i> et <i>N. winogradskyi</i>	53

I.4.2 Facteurs influençant la croissance.....	54
I.4.2.1 La concentration en oxygène dissous	54
I.4.2.2 La lumière	54
I.4.2.3 Concentration en substrats et produits	55
I.4.2.4 Le pH	57
I.4.2.5 La température.....	58
I.4.2.6 La salinité.....	58
I.4.2.7 Ions métalliques dissous	59
I.4.2.8 Paramètres de culture à privilégier	59
I.4.3 cocultures des deux souches	60
I.4.3.1 Interactions et adaptation en coculture libre	61
I.4.3.2 Interactions et répartition au sein des cocultures en biofilm.....	62
I.4.4 Cultures en biofilm.....	62
I.4.4.1 Pourquoi former un biofilm ?	63
I.4.4.2 Formation du biofilm.....	64
I.4.4.3 Phénomènes de transfert au sein du biofilm	65
I.5 Modélisation de la nitrification	66
I.5.1 Modélisation de la nitrification.....	66
I.5.1.1 Modèle de nitrification en traitement des eaux	67
I.5.1.2 Modèle de croissance des bactéries nitrifiantes existants	69
I.5.1.3 Modèle développé pour MELISSA : NitriSim	70
I.6 La dégradation de l'urée et de l'urine	70
I.6.1 Composition de l'urine	70
I.6.2 Sélection d'une souche dégradant l'urée : <i>Cupriavidus pinatubonensis</i>	73
I.6.2.1 Description morphologique.....	73
I.6.2.2 Métabolisme	73
I.6.2.3 Cinétique de croissance.....	74
I.6.3 Une tri-culture pour dégrader l'urine au sein de la colonne à lit fixe	74
I.7 Objectifs de la thèse	75

Chapitre II : Matériel et méthodes.....	79
II.1 Description des souches utilisées	79
II.1.1 Souches	79
II.1.2 Milieux de culture.....	79
II.1.2.1 Nitrosomonas europaea ATCC® 19718.....	79
II.1.2.2 Nitrobacter winogradskyi ATCC® 25931	79
II.1.2.3 Le milieu de coculture de N. europaea et N. winogradskyi	81
II.1.2.4 Cupriavidus pinatubonensis : milieu riche	81
II.1.2.5 Cupriavidus pinatubonensis : milieu de coculture modifié	82
II.1.3 Maintien des souches	82
II.1.4 Cultures de <i>Cupriavidus pinatubonensis</i>	83
II.1.4.1 Détermination du taux de croissance maximum en microplaque	83
II.1.4.2 Observation du métabolisme en Erlenmeyers	83
II.2 Méthodes analytiques	84
II.2.1 Le suivi de la concentration en biomasse	84
II.2.1.1 Suivi spectrophotométrique.....	84
II.2.1.2 Mesure du poids sec	84
II.2.2 Le suivi des composés azotés.....	84
II.2.2.1 Les dosages colorimétriques.....	85
II.2.2.1.1 Titration de l'ammonium	85
II.2.2.1.2 Titration du nitrite.....	85
II.2.2.1.3 Titration de l'urée.....	85
II.2.2.2 La chromatographie ionique.....	86
II.2.2.2.1 Principe	86
II.2.2.2.2 Préparation des échantillons.....	86
II.2.2.2.3 Dosage des cations	87
II.2.2.2.4 Dosages des anions	87
II.2.2.3 La Chromatographie Liquide Haute Performance (HPLC).....	87
II.3 Les bioréacteurs utilisés.....	87

II.3.1 Les bioréacteurs de 500mL en parallèle	88
II.3.1.1 Description des réacteurs et du système de contrôle	89
II.3.1.2 Préparation des réacteurs et des solutions	89
II.3.1.3 Stratégie et conditions de cultures	90
II.3.2 Réacteur parfaitement agité (4L)	90
II.3.2.1 Description du réacteur et du système de contrôle.....	90
II.3.2.2 Stratégie et conditions de cultures pour les cocultures <i>N. europaea</i> – <i>N. winogradskyi</i>	91
II.3.2.2.1 Conditions de culture Stratégie A	92
II.3.2.2.2 Conditions de culture Stratégie B	92
II.3.2.3 Stratégie et conditions de culture pour <i>Cupriavidus pinatubonensis</i>	93
II.3.3 La colonne à lit fixe.....	93
II.3.3.1 Description du pilote.....	93
II.3.3.2 L'installation de la colonne à lit fixe et le système de contrôle	94
II.3.3.3 Support du lit fixe	95
II.3.3.4 Préparation du réacteur et des solutions	95
II.3.3.4.1 Procédure de stérilisation de la colonne	95
II.3.3.4.2 Procédure de stérilisation des solutions et accessoires	96
II.3.3.4.3 Calibration des débitmètres massique et des pompes d'alimentation	96
II.3.4 Caractérisation des réacteurs.....	97
II.3.4.1 Détermination du K_La	97
II.3.4.2 Détermination du temps de séjour T_R dans la colonne à lit fixe	98
II.4 Modélisation et méthodes numériques.....	99
II.4.1 Approche mécaniste de la modélisation	99
II.4.2 Modèle biologique de la nitrification	99
II.4.2.1 Modèle métabolique.....	100
II.4.2.2 Modèle cinétique.....	100
II.4.3 Modèle de la colonne de nitrification à lit fixe.....	100
II.4.3.1 Modèle N-tanks en série	100

II.4.3.2 NitriSim	105
Chapitre III : Cultures pures libres de <i>N. europaea</i> ATCC® 19718 et <i>N. winogradskyi</i> ATCC® 25391	109
III.1 La modélisation de la nitrification	109
III.1.1 Le modèle stœchiométrique	109
III.1.2 Le modèle cinétique	110
III.2 Les cultures pures de <i>Nitrosomonas europaea</i> ATCC® 19718 et <i>Nitrobacter winogradskyi</i> ATCC® 25391	112
III.2.1 Objectifs et plan expérimental.....	112
III.2.2 Réalisation des cultures pures.....	112
III.2.3 Les cultures pures de <i>Nitrosomonas europaea</i>	113
III.2.3.1 Suivi de biomasse	113
III.2.3.2 Suivi des composés azotés.....	114
III.2.3.3 Détermination des paramètres cinétiques	115
III.2.4 Les cultures de <i>Nitrobacter winogradskyi</i>	117
III.2.4.1 Suivi de biomasse	117
III.2.4.2 Suivi des composés azotés.....	118
III.2.4.3 Détermination des paramètres cinétiques	118
III.2.5 Récapitulatif des paramètres du modèle de croissance des bactéries nitrifiantes	120
III.3 Calibration et validation du modèle de croissance en co-cultures de <i>Nitrosomonas europaea</i> et <i>Nitrobacter winogradskyi</i>	121
III.3.1 Modèle du réacteur parfaitement agité : NitriSimR.....	121
III.3.2 Evaluation du modèle sur une coculture de <i>N. europaea</i> et <i>N. winogradskyi</i>	122
III.3.3 Application du modèle de nitrification à d'autres co-cultures.....	127
III.3.3.1 La coculture B.....	127
III.3.3.2 La coculture C.....	128
III.3.3.3 La coculture D.....	130
III.3.3.4 La coculture E.....	131
III.3.4 Conclusions sur l'utilisation de NitriSimR.....	132

III.4 Différentiation entre nitrification partielle et totale : deux nouveaux paramètres identifiés	132
III.5 Conclusions générales.....	138
Chapitre IV : Etude de la nitrification dans la colonne à lit fixe et validation du modèle NitriSim	143
IV.1 Caractérisation physique de la colonne	143
IV.1.1 Distribution du temps de séjour	144
IV.1.2 Détermination expérimentale des volumes et du degré de vide de la colonne...	147
IV.1.3 Analyse expérimentale du coefficient d'échange gaz/liquide	150
IV.2 Caractérisation de la colonne : fonctionnement en continu de la colonne à lit fixe ...	153
IV.2.1 Définition des conditions nominales	153
IV.2.2 Plan expérimental	153
IV.2.3 Démarrage du réacteur : phase de colonisation et de mise en fonctionnement continu	155
IV.2.4 Variation de la charge en azote par la variation de la concentration entrante à T_R constant	159
IV.2.5 Variation de la charge en azote par la variation de la concentration entrante à T_R constant et débit d'air maximal	160
IV.2.6 Mise en place du T_R nominal et variation de concentration entrante en azote ...	163
IV.2.7 Variation de la charge en azote par variation du T_R dans le réacteur	165
IV.2.8 Fonctionnement réduit du réacteur et remise en fonctionnement nominal.....	167
IV.2.9 Variation de la source d'azote entrante : utilisation de l'urée	169
IV.2.10 Variation du temps de séjour et de la concentration entrante en azote : application de fortes charges entrantes en azote.....	170
IV.2.11 Bilan azoté et efficacité de nitrification.....	174
IV.2.12 Conclusions sur les 270 jours de fonctionnement de la colonne.....	176
IV.3 Calibration du modèle NitriSim et application à l'expérience dans la colonne à lit fixe	178
IV.3.1 Définition de la colonne pour la modélisation	178
IV.3.2 Définition du nombre de bacs et du rétro-mélange du réacteur	178
IV.3.3 Rappel des paramètres biologiques du modèle.....	180

IV.3.4 Utilisation du modèle NitriSim pour la caractérisation de la colonne à lit fixe	181
IV.3.5 Utilisation de l'ajout de base et de la concentration en oxygène	186
IV.4 Conclusions générales	189
Chapitre V : Vers la création d'un module de traitement de l'urine	195
V.1 Cultures pures de <i>Cupriavidus pinatubonensis</i>	195
V.1.1 Plan expérimental	195
V.1.2 Suivi de biomasse et calcul du taux de croissance maximum.....	196
V.1.3 Cultures préliminaires en Erlenmeyers	197
V.1.4 Dégradation de l'urée par <i>Cupriavidus pinatubonensis</i>	199
V.1.5 Conclusions sur les cultures pures de <i>C. pinatubonensis</i>	201
V.2 Mise en place d'une triculture dans la colonne à lit fixe.....	202
V.2.1 Plan expérimental	202
V.2.2 Suivi de culture	203
V.2.3 Inoculation de <i>C. pinatubonensis</i> et culture fed-batch	203
V.2.4 Phase de colonisation du lit fixe par <i>C. pinatubonensis</i>	203
V.2.5 Culture en mode continu dans la colonne à lit fixe.....	206
V.2.6 Bilan de culture de <i>C. pinatubonensis</i> dans la colonne à lit fixe.....	207
V.3 Conclusions sur l'étude préliminaire de <i>C. pinatubonensis</i>	208
Conclusions - Perspectives	211
Annexe 1	229

Introduction

Introduction

L'exploration spatiale a toujours fasciné l'homme, comme en témoignent les nombreux ouvrages portant sur les voyages au cœur de notre système solaire. Ces documents montrent souvent la vie déjà installée sur une autre planète mais peu d'ouvrages de science fiction traitent de façon réaliste des contraintes scientifiques et techniques requises pour ce genre d'expédition. En effet, l'exploration spatiale, et notamment la mise en place d'une base par exemple sur Mars, est beaucoup plus complexe qu'un séjour à bord de la Station Spatiale Internationale. Les ravitaillements ne sont pas possibles à cause de la distance et du poids des ressources à envoyer. La base spatiale doit pouvoir fonctionner de manière autonome : régénérer l'eau potable et l'oxygène, traiter les déchets et produire de la nourriture. Ce dernier critère ne peut être satisfait que par l'introduction du « vivant » dans le système de support vie : des plantes et des bactéries. La production de nourriture passe obligatoirement par la biosynthèse de produits qui possèdent les qualités nutritionnelles essentielles à la vie humaine sur Terre ou au-delà de la Terre. Corrélativement, la synthèse de ces constituants consommables par l'Homme s'effectue conjointement au recyclage des déchets, qu'il s'agisse en premier lieu du recyclage des eaux usées, de la production d'oxygène ou encore de la fixation du carbone inorganique (CO_2). Une analyse simple indique donc clairement que le système de recyclage est complètement différent suivant les fonctions qui lui sont fixées : recyclage de l'eau uniquement, production d'oxygène associée au recyclage de l'eau, élimination du CO_2 , recyclage du carbone associé au recyclage de l'azote et à la production de nutriments, etc. L'objectif des systèmes de support de vie biorégénératifs dont fait partie le projet MELiSSA (Micro-Ecological Life Support System Alternative) qui est piloté par l'Agence Spatiale Européenne, est d'étudier un système intégré associant les différentes fonctions de recyclage, en visant un taux de recyclage de la masse de consommables le plus élevé possible.

Ce projet repose sur l'utilisation de microorganismes (bactéries et cyanobactéries) et de végétaux afin de subvenir aux besoins d'un équipage mais aussi de gérer les déchets générés par l'équipage (dioxyde de carbone, déchets ménagers, eaux usées). MELiSSA est une boucle composée de 5 compartiments, ayant chacun une fonction spécifique au sein du système et liés entre eux par des flux de matière. Il s'agit donc d'un système global de recyclage à forte connectivité interne. Le contrôle d'un système de ce type suppose que chacune des étapes élémentaires soit connue et caractérisée. La nomenclature de l'ordre des compartiments suit le flux principal de matière et d'eau. Globalement, les premières étapes consistent à décomposer les macromolécules constituant les déchets en éléments chimiques simples qui, dans un deuxième temps, sont utilisés pour synthétiser des produits consommables, de l'oxygène et régénérer l'eau. Le premier compartiment assure, la dégradation anaérobie des déchets produits par l'équipage en composés assimilables par

Introduction

les autres compartiments : des acides gras volatils, de l'ammonium et les éléments minéraux. Le second compartiment termine le traitement des déchets en assurant l'élimination des acides gras volatils et leur dégradation en CO₂. Le compartiment suivant est le compartiment nitrifiant. Ce compartiment transforme le composant principal des déchets azotés, l'ammonium, en nitrate qui est la source d'azote principale assimilable par les compartiments photosynthétiques. Les compartiments suivants sont donc les compartiments photosynthétiques, ayant pour objectif la production d'oxygène et de nourriture à partir d'une source de carbone sous forme de CO₂ et d'une source d'azote sous forme de nitrate. Cette étape photosynthétique, qui est essentielle pour produire de la nourriture, est décomposée en deux compartiments différents : le compartiment microbien, colonisé par la microalgue *Arthrospira platensis*, et le compartiment plantes supérieures. Le dernier compartiment de la boucle MELiSSA est composé de l'équipage qui est à la fois initiateur, car producteur des déchets, et bénéficiaire de la boucle puisqu'il consomme les ressources produites ou régénérées. Les différents compartiments sont supposés fonctionner en continu afin d'assurer une production de ressources et une gestion des déchets permanentes. La boucle MELiSSA permet donc d'assurer une autonomie importante à une station spatiale ou une base planétaire, puisque les fonctions d'épuration de l'eau, de traitement du CO₂, de production d'oxygène et de nourriture sont assurées. Cependant, la mise en fonctionnement d'un écosystème clos de ce type, imposant l'utilisation de microorganismes, doit être totalement maîtrisée. Les écosystèmes artificiels diffèrent de leur modèle, la biosphère terrestre, par les mécanismes de contrôle assurant l'équilibre du système. La biosphère terrestre est durable grâce à un contrôle stochastique et à des constantes de temps très importantes. En revanche, dans un écosystème artificiel clos comme MELiSSA, un contrôle déterministe est une condition nécessaire pour maintenir le système à l'équilibre. Il est alors essentiel de développer des modèles de connaissance et de contrôle pour chacun des compartiments. Ces modèles permettent une surveillance efficace des procédés utilisés et aussi la prédiction optimale des variables de commande des processus élémentaires et du procédé de traitement dans son ensemble. Ils doivent permettre de contrôler efficacement le fonctionnement du système sur des échelles de court, moyen et long terme, afin de prévenir les dysfonctionnements au sein du système, des situations de pénurie ou d'excès des composés intermédiaires ou finaux et d'engager les solutions de gestion globale des flux de matière. L'utilisation de ces systèmes de support de vie n'est donc envisageable que si l'on a établi des modèles précis et efficaces, utilisables en contrôle commande.

La thèse présentée dans ce manuscrit porte sur l'étude du troisième compartiment de la boucle MELiSSA. Ce compartiment, aussi appelé compartiment nitrifiant, a pour objectif d'assurer l'oxydation de l'ammonium, provenant de la dégradation des déchets, en nitrate qui

Introduction

sert de substrat azoté pour la culture de végétaux (tomate, pomme de terre, laitue, etc.) destinés à l'alimentation. Ce processus est assuré par deux genres bactériens : *Nitrosomonas* et *Nitrobacter*. Le réacteur choisi pour ce compartiment de la boucle MELiSSA est une colonne à lit fixe. L'utilisation d'un réacteur à lit fixe est essentielle pour les souches bactériennes utilisées dans ce compartiment dont les taux de croissance sont faibles. L'hypothèse de fonctionnement de ce troisième compartiment de la boucle MELiSSA repose sur un fonctionnement en autotrophie, la source de carbone étant le CO₂. L'utilisation des souches de *Nitrosomonas* et *Nitrobacter* en autotrophie dans un réacteur agité s'effectue à vitesse de croissance faible, ce qui nécessite en continu un taux de dilution faible, c'est-à-dire un temps de séjour de la phase liquide important. Ceci conduirait à des volumes de réacteur importants impossibles à mettre en place dans le cadre de MELiSSA. Pour être modélisé, le procédé de lit fixe à biomasse fixée doit donc tenir compte de l'hétérogénéité du lit fixe, la caractérisation hydrodynamique étant un point clé de la représentation qui doit être couplé avec la caractérisation de la croissance cellulaire en autotrophie, des transferts gaz / liquide et des processus d'oxydation des ions ammonium, qui sont les processus principaux à prendre en compte. L'objectif est qu'en sortie de réacteur, les effluents soient exempts de nitrite et comportent principalement des ions nitrate, utilisables comme source d'azote par les organismes des compartiments photosynthétiques.

L'utilisation d'un système de support de vie destiné à l'exploration spatiale est donc soumise à des contraintes fortes, dont la principale est la connaissance approfondie et la maîtrise des processus biologiques et physiques mis en jeu. Ainsi, l'objectif global de cette thèse est de définir et valider un modèle de nitrification prédictif applicable au compartiment nitrificateur. Le travail présenté dans ce manuscrit est réalisé à l'échelle pilote de laboratoire, mais est destiné à être appliqué au MELiSSA Pilot Plant (MPP) qui est le démonstrateur terrestre de MELiSSA à l'échelle 1-homme, implanté à l'Universitat Autònoma de Barcelona. L'objectif scientifique est donc d'arriver à une compréhension suffisante pour que les modèles et les interprétations qui sont faites soient, d'une part, extrapolables à des tailles de réacteurs plus importantes et, d'autre part, susceptibles de servir de briques de base pour des modèles de contrôle prédictifs des variables d'action sur le procédé.

Ce manuscrit retrace le travail réalisé durant cette thèse ; il est divisé en cinq parties. Le Chapitre I présente une étude bibliographique. Cette étude concerne tout d'abord la description de différentes étapes du cycle de l'azote sur Terre et le traitement des différents produits intermédiaires. Un survol de différents systèmes de support de vie (dont le projet MELiSSA) et la description du compartiment nitrifiant font également partie de ce chapitre. Les aspects modélisation et dégradation de l'urée sont aussi abordés dans ce chapitre introductif.

Introduction

Le Chapitre II décrit les matériels et les méthodes utilisés pour mener et analyser les différentes expériences réalisées au cours de cette thèse.

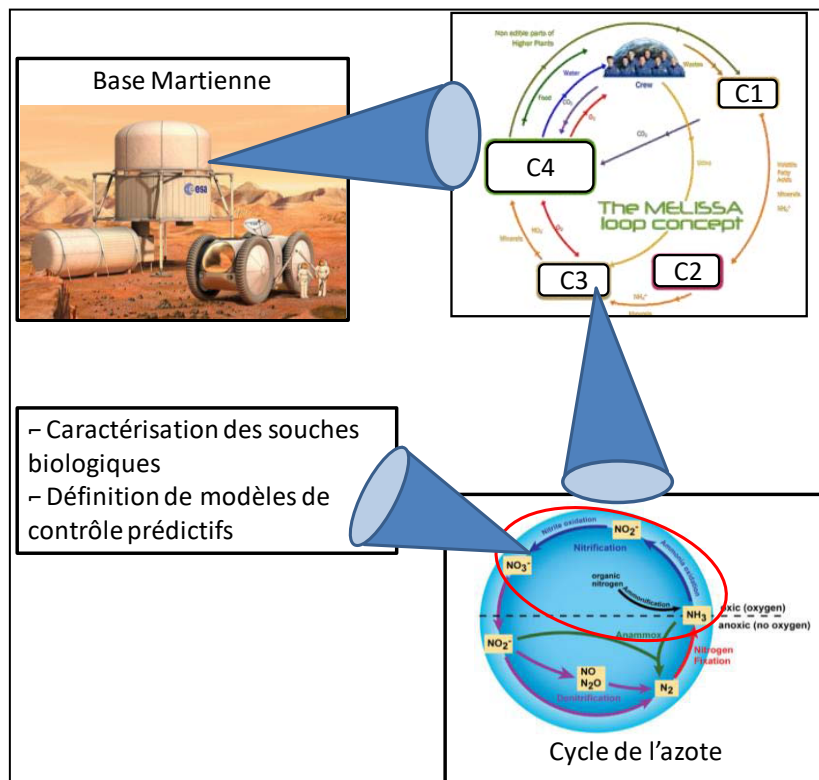
Les trois derniers chapitres de ce manuscrit regroupent les résultats obtenus. Le Chapitre III porte sur la caractérisation des souches microbiennes utilisées dans le compartiment nitrifiant et la calibration du modèle cinétique de croissance associé à ces souches. Pour cela, les souches bactériennes ont été étudiées et les paramètres cinétiques de la croissance et de l'oxydation des formes d'azote sont déterminés lors de cultures pures : taux de croissance maximum, taux de létalité et terme de maintenance. Le modèle biologique est ensuite validé sur des cocultures de *Nitrosomonas europaea* et *Nitrobacter winogradskyi*.

Le Chapitre IV présente la caractérisation de la colonne à lit fixe. Un aspect important est le couplage entre les modèles de mélange des phases liquide et gaz et les cinétiques de croissance de la biomasse fixée. Un modèle N-bacs en série avec rétro-mélange est calibré pour la phase liquide. Dans un second temps, ce chapitre décrit une culture menée en continu pendant presque une année, où l'objectif est de faire varier les charges entrantes en azote pour observer le comportement bactérien et la réponse du processus d'oxydation. Ce chapitre regroupe le suivi analytique de 330 jours d'expériences sur la colonne à lit fixe. Le chapitre se termine sur l'utilisation du modèle pour prédire le processus de nitrification et le contrôle de variables masquées (qui ne peuvent être suivies expérimentalement de façon directe, comme la croissance cellulaire et la répartition de la biomasse sur le support solide).

Le Chapitre V présente une étude complémentaire de la colonne à lit fixe précédente avec l'utilisation d'une triculture, où une souche capable de dégrader l'urée, composant azoté principal de l'urine, a été inoculée dans la colonne à lit fixe en plus de la coculture *Nitrosomonas/Nitrobacter* déjà établie. Comme pour les chapitres précédents, des expériences en cultures pures sont présentées. Les résultats sont interprétés de façon à ce que cette dernière partie de l'étude puisse être utilisée pour mettre en place un système de traitement de l'urée dans la boucle MELiSSA.

Chapitre I

Etude bibliographique



Résumé graphique du Chapitre I : Application du cycle de l'azote et plus précisément de la nitrification au sein d'un écosystème clos utilisable dans une base Martienne.

Chapitre I : Etude bibliographique

I.1 L'azote dans l'environnement et la nitrification

L'azote est l'un des éléments essentiels à la vie. Il est omniprésent dans diverses biomolécules comme les protéines ou l'ADN. L'azote existe sous forme organique (urée, acides nucléiques, protéines ou encore acides aminés) comme sous forme inorganique (ammonium, nitrite, nitrate). Depuis les années 90, les activités humaines impactent directement le cycle de l'azote notamment en augmentant son apport dans les sols via l'utilisation intensive d'engrais.

I.1.1 L'azote, omniprésent dans l'environnement

Le cycle de vie de l'azote fait apparaître différents états d'oxydation et états physiques : il est présent aussi bien sous forme de gaz que dissous dans du liquide. Les principales transformations de l'azote sont la fixation, la nitrification, la dénitrification, l'anammox et l'ammonification, toutes étapes du cycle de l'azote, Figure I-1.

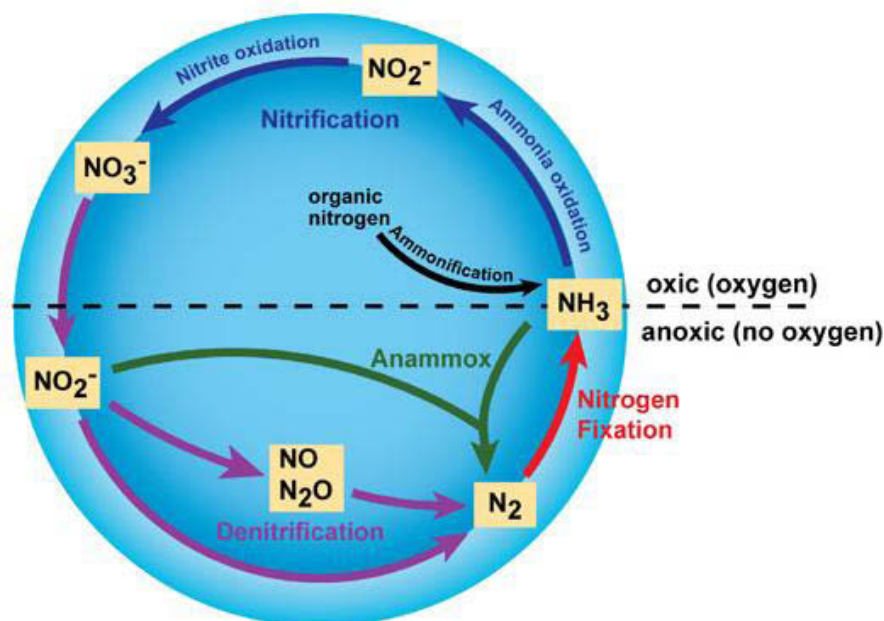


Figure I-1: Schéma simplifié du cycle de l'azote (Bernhard, 2012).

Le Tableau I-1 regroupe les différentes formes de l'azote trouvées dans l'environnement et leurs principales caractéristiques. Les réactions impliquées dans le cycle de l'azote sont regroupées dans le Tableau I-2.

Tableau I-1: Récapitulatif des formes de l'azote, de leur état d'oxydation et de leurs principales caractéristiques.

Nom	Formule	Niveau oxydation*	Caractéristiques
Ammoniac	NH ₃	-3 ^a	Gaz incolore à odeur piquante. Seuil perception 5-50 ppm et CL ₅₀ = 17710 mg.min/m ³ (Tissot and Pichard, 2003). Soluble de l'eau, il est utilisé comme réfrigérant, engrais et est un réactif de chimie organique. Polluant de l'air il participe à l'eutrophisation et pluies acides.
Ion ammonium	NH ₄ ⁺	-3 ^b	Incolore en solution. Forme le couple acide/base : NH ₄ ⁺ /NH ₃ . Largement répandu sous forme de sels d'ammonium et utilisé en chimie dans les résines échangeuses d'ions par exemple. Il a été utilisé comme engrais dans l'agriculture industrielle.
Acide nitrique	HNO ₃	+5 ^b	Solution incolore à jaune-brun Il a été utilisé comme oxydant pour missiles, il intervient dans la fabrication des explosifs mais aussi du nylon.
Ion Nitrate	NO ₃ ⁻	+5 ^a	Incolore en solution. Puissant eutrophisant, son seuil maximal dans l'eau potable est 50 mg/L ("OMS Les maladies liées à l'eau," n.d.). C'est la forme de l'azote la plus oxydée.
Acide nitreux	HNO ₂	+3 ^b	Solution bleue Utilisé pour la préparation de dérivés azoïques.
Ion nitrite	NO ₂ ⁻	+3 ^a	Incolore en solution. Empêche la fixation de l'oxygène par l'hémoglobine lorsqu'ils sont présents dans le sang. Utilisés pour la conservation de la viande.
Monoxyde d'azote	NO	+2 ^a	Gaz incolore. Seuil perception 0.3 ppm. A été utilisé en anesthésie, devient toxique quand il s'oxyde en NO ₂ .
Dioxyde d'azote	NO ₂	+4 ^a	Gaz brun-rouge. Toxique par inhalation : seuil perception 0.2 ppm, CL ₅₀ =320 mg.min/m ³ (Tissot and Pichard, 2004). Précurseur de la production industrielle de HNO ₃ . Polluant issu de moteurs et centrales thermiques. Il participe à l'effet de serre et cause les pluies acides.
Diazote	N ₂	0 ^a	Gaz incolore composant 78 % de l'air. Peut être utilisé comme gaz cryogénique ou pour créer des atmosphères inertes pour les aliments par exemple.
Protoxyde d'azote – Oxyde nitreux	N ₂ O	+1 ^a	Gaz incolore. Gaz hilarant, utilisé en anesthésie. Peut être utilisé comme comburant dans les moteurs à protoxyde d'azote.
Urée	CO(NH ₂) ₂	-3 ^b	Incolore en solution. Constituant principal de l'urine, largement utilisé comme engrais et en alimentation animale.
Azote organique	R-NH ₂	-3 ^a	Peut provenir de la dégradation de matière organique, trouvé dans les acides aminés et nucléiques

^a Madigan et al, 2010

^b Valeurs calculées

Tableau I-2: Principales réactions intervenant dans le cycle de l'azote.

Nitrification	$\text{NH}_4^+ + 1.5 \text{O}_2 \rightarrow \text{NO}_2^- + 2\text{H}^+ + \text{H}_2\text{O}$	$\Delta G0' = -288 \text{ kJ/mol}^a$
	$\text{NO}_2^- + 0.5 \text{O}_2 \rightarrow \text{NO}_3^-$	$\Delta G0' = -74.1 \text{ kJ/mol}^a$
Fixation	$\text{N}_2 + 8\text{H}^+ + 8\text{e}^- \rightarrow 2\text{NH}_3 + \text{H}_2$	$\Delta G0' = -507.6 \text{ kJ/mol}^b$
Anammox	$\text{NH}_4^+ + \text{NO}_2^- \rightarrow \text{N}_2 + 2\text{H}_2\text{O}$	$\Delta G0' = -357 \text{ kJ/mol}^a$
Dénitrification	$\text{NO}_3^- + 2\text{e}^- + 2\text{H}^+ \rightarrow \text{NO}_2^- + \text{H}_2\text{O}$	$\Delta G0' = -81.2 \text{ kJ/mol}^c$
	$\text{NO}_2^- + 2\text{H}^+ + \text{e}^- \rightarrow \text{NO} + \text{H}_2\text{O}$	$\Delta G0' = -36.1 \text{ kJ/mol}^c$
	$2\text{NO} + 2\text{H}^+ + 2\text{e}^- \rightarrow \text{N}_2\text{O} + \text{H}_2\text{O}$	$\Delta G0' = -227 \text{ kJ/mol}^c$
	$\text{N}_2\text{O} + 2\text{H}^+ + 2\text{e}^- \rightarrow \text{N}_2 + \text{H}_2\text{O}$	$\Delta G0' = -260.9 \text{ kJ/mol}^c$
Ammonification	$\text{R-NH}_2 \rightarrow \text{NH}_4^+$	ND

^a (Madigan et al., 2010)

^b Calculated with <http://equilibrator.weizmann.ac.il/>

^c (Warakomski et al., 2007)

ND : non déterminé

1.1.1.1 La fixation de l'azote

L'azote est un élément essentiel à la vie. Il entre dans le cycle sous forme de diazote et évolue sous différentes formes et plusieurs états d'oxydation. Les bactéries sont essentielles au déroulement du cycle de l'azote mais ce ne sont pas les seuls organismes y intervenant. Les différents mécanismes intervenant dans le cycle de l'azote sont décrits ci-dessous.

L'azote est assimilé et donc fixé sous forme de diazote (N_2) et est réduit en ammoniac (NH_3), forme utilisable par les organismes le fixant. Il existe plus d'une centaine de bactéries capables de fixer le diazote : *Azotobacter*, *Clostridium*, *Thiobacillus*, *Klebsiella* ou encore *Pseudomonas* par exemple, mais les cyanobactéries restent prédominantes (genres *Anabaena*, *Nostoc*). Les bactéries du sol ont une capacité de fixation du N_2 de 1 à 2 kgN/hectare/an (Pepper et al., 2014). Afin d'améliorer la capacité de fixation de l'azote, les bactéries peuvent s'associer à des végétaux comme des légumineuses par exemple. Cette relation de symbiose prend forme au niveau des racines des végétaux que la bactérie infecte en formant un nodule (Jones et al., 2007). La symbiose la plus étudiée est celle de la bactérie *Rhizobium* avec du soja, des pois, des haricots ou encore des trèfles. Dans ces conditions, le taux de fixation d'azote varie entre 200 et 300 kgN/hectare/an : ce système est 200 fois efficace que la fixation de l'azote par des bactéries libres. La formation de nodules permet à la bactérie d'être protégée et d'acquérir de l'énergie directement de la plante. Il permet aussi une protection contre l'oxygène du système enzymatique bactérien permettant la fixation de l'azote. Le complexe permettant la fixation de l'azote est composé de deux enzymes :

- Une dinitrogénase qui assure la réduction du N_2 en NH_3

- Une déshydrogénase réductase qui produit de 8 électrons nécessaires à la réduction assurée par la dinitrogénase

Le processus de fixation du N₂ est représenté en Figure I-2:

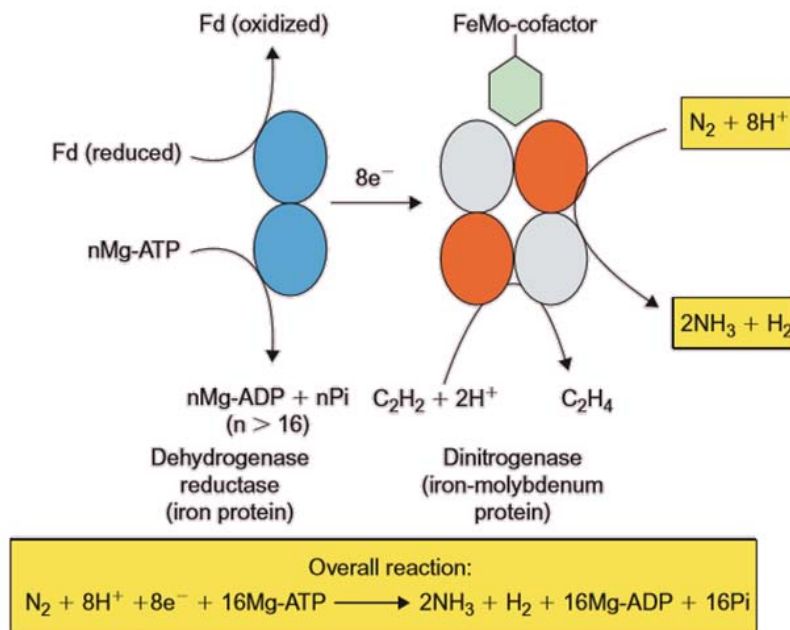


Figure I-2: Processus de fixation de l'azote par le complexe enzymatique Nitrogénase/Déshydrogénase Réductase (Zhao et al., 2006).

L'action combinée des deux enzymes assure la réduction du diazote en azote assimilable. La réductase ne produit qu'un électron à la fois, et la réduction d'une molécule de diazote prend 1.25 secondes.

La fixation de l'azote est un mécanisme coûteux en énergie et n'est mis en place que si de l'azote est nécessaire pour la croissance. L'ammoniac alors produit, exerce une rétro-inhibition sur le complexe enzymatique empêchant alors la fixation inutile d'azote (Pepper et al., 2014).

1.1.1.2 L'assimilation de l'ammonium et l'ammonification

L'azote est assimilé par les organismes pour la formation de protéines, d'acides aminés et de composants cellulaires. Ce processus est l'assimilation, aussi appelé immobilisation. L'assimilation de l'azote se déroule selon deux mécanismes (Madigan et al., 2010):

- Lorsque la concentration en ammonium est forte (>0.1 mM ou 0.5 mgN/kg sol) : l'ammonium est incorporé et forme du glutamate via une glutamate déshydrogénase. Cette réaction est réversible et peut aussi engendrer la production d'ammonium.

- Lorsque la concentration est faible, l'ammonium forme de la glutamine sous l'action d'une glutamine synthétase et d'ATP. Cette molécule sert à la formation de deux molécules de glutamate.

Dans les environnements terrestres et aquatiques, l'ammonium est souvent présent en faibles concentrations et le principal mécanisme d'assimilation trouvé sera le deuxième.

L'ammonification est le phénomène inverse de l'assimilation : c'est la production d'ammonium à partir d'organismes morts (animaux, plantes, bactéries, etc.). Elle peut être intracellulaire : l'action de la glutamate déshydrogénase étant réversible, une production d'ammonium à partir de glutamate est possible. Cependant les microorganismes libèrent de nombreuses enzymes extracellulaires dans l'environnement : protéase, lysozymes ou encore uréase. L'urée est une forme de produit terminal de dégradation de l'azote, et peut être à son tour dégradée en ammonium sous l'action de l'uréase.

1.1.1.3 La nitrification

La nitrification est l'oxydation de l'ammonium en nitrate. Le nitrite est un intermédiaire de la réaction. L'oxydation de l'ammonium en nitrite est assurée par des bactéries des genres *Nitrosomonas*, *Nitrosococcus*, *Nitrosolobus*, *Nitrospira* ou encore *Nitrosovibrio*. L'oxydation du nitrite en nitrate, produit final de la nitrification, est assurée par les bactéries des genres *Nitrobacter*, *Nitrospira*, *Nitrococcus* ou encore *Nitrospina*. Cette étape du cycle de l'azote sera détaillée dans la partie 1.1.3.

1.1.1.4 L'anammox

Découvert plus récemment, l'anammox est le nom donné à l'oxydation anaérobie de l'ammonium où le nitrite est l'accepteur final d'électrons (Kuenen, 2008). Cette réaction assure la production de nitrate (NO_3^-) et diazote (N_2), et est retrouvée fréquemment dans les zones où les concentrations d'oxygène sont faibles. Les bactéries réalisant l'anammox sont des *Planctomycètes* (Jetten et al., 2009). Ce processus nécessite de l'ammonium et du nitrite. Le nitrite est produit par la première étape de la nitrification ou par réduction du nitrate. L'ammonium est produit par le phénomène d'ammonification ou réduction dissimilative du nitrate en ammonium (DNRA). L'anammox se déroule alors souvent aux interfaces aérobie/anaérobie où l'oxygène permet la nitrification et l'anoxie l'anammox. Les planctomycètes possèdent un anammoxosome, une organelle où se déroule l'anammox (Jetten et al., 2009; Kartal et al., 2011; Niftrik et al., 2004; Niftrik and Jetten, 2012), Figure I-3.

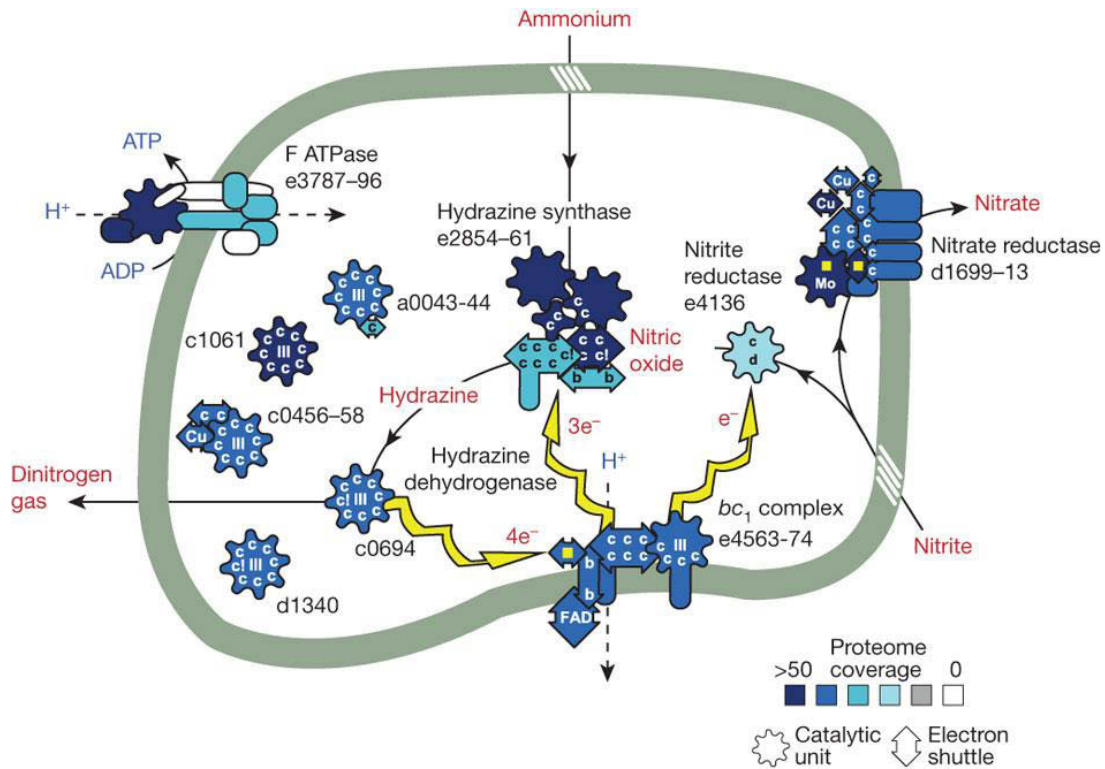


Figure I-3: Proposition du déroulement de l’anammox chez les Planctomycètes (Kartal et al., 2011).

L’anammox produit du nitrate et du diazote à partir d’ammonium et du nitrite utilisés respectivement comme donneurs et accepteurs d’électrons.

1.1.1.5 La réduction du nitrate

La réduction du nitrate dans le cycle de l’azote suit deux voies (i) la réduction assimilative où le nitrate est réduit pour satisfaire les besoins liés à la croissance cellulaire, et (ii) la réduction dissimilative où le nitrate joue le rôle d’accepteur final d’électrons.

La réduction assimilative du nitrate est aussi appelée assimilation du nitrate. Le nitrate est réduit en ammonium et est incorporé à la biomasse. La réaction est catalysée par une nitrate réductase *Nas* et le NAD(P)H est accepteur final d’électrons (Simon, 2002), Figure I-4.

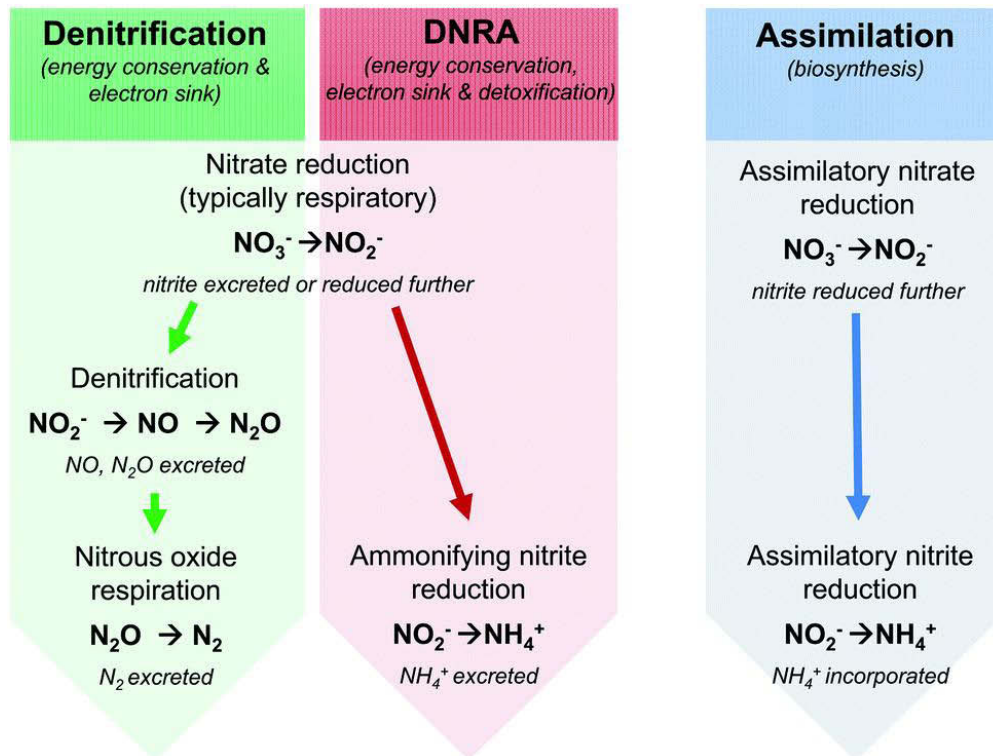


Figure I-4: Réduction du nitrate au sein du cycle de l'azote (Sparacino-Watkins et al., 2013).

La réduction dissimilative du nitrate est divisée en deux phénomènes : la DNRA et la dénitrification, Figure I-4. La DNRA est une respiration anaérobie où le nitrate est accepteur final d'électrons. Le nitrate est d'abord réduit en nitrite par une nitrate réductase. Une nitrite réductase permet la réduction du nitrite en ammonium qui est alors produit. Ce mécanisme est responsable de 5 à 15% de la réduction du nitrate dans les eaux douces (Sgouridis et al., 2011). Cependant il peut jouer un rôle plus important allant jusqu'à être le seul phénomène de réduction du nitrate dans les sols limités en azote comme ceux des forêts tropicales (Huygens et al., 2007).

Le second mécanisme de réduction du nitrate est la dénitrification. Le nitrate est tout d'abord réduit en nitrite comme décrit précédemment. La dénitrification permet ainsi la réduction du nitrite en oxyde nitreux (N_2O) en formant du monoxyde d'azote (NO) comme intermédiaire. Les deux composés produits durant la dénitrification sont gazeux et sont alors libérés dans l'atmosphère. L'oxyde nitreux est ensuite réduit en diazote libéré dans le sol ou l'atmosphère. Il peut alors être fixé et assimilé comme décrit précédemment. La dénitrification est réalisée sous l'action de différentes enzymes périplasmiques ou cytoplasmiques, Figure I-5.

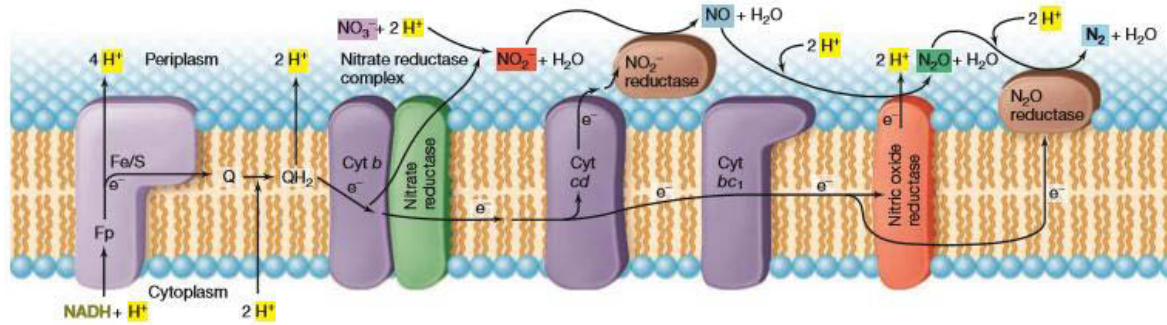


Figure I-5: Exemple du procédé de dénitrification chez *Pseudomonas stutzeri* (Brock Thomas D. et al., 2005).

La dénitrification est donc une étape essentielle pour l'élimination de l'azote dans l'environnement car elle permet son relargage sous forme gazeuse. Elle est primordiale dans le traitement de l'azote dans les stations d'épuration notamment.

I.1.2 Plantes, bactéries et archées : les acteurs du cycle

L'homme, les microorganismes ou les plantes interviennent directement dans les cycles des éléments essentiels à la vie. Les différentes étapes du cycle de l'azote sont assurées par différents genres bactériens dont une liste non-exhaustive est donnée dans le Tableau I-3.

Tableau I-3: Exemple de microorganismes intervenant dans le cycle de l'azote.

Nitrification	
$\text{NH}_4^+ \rightarrow \text{NO}_2^-$	<i>Nitrosomonas, Nitrosococcus, Nitrosolobus, Nitrospira, Nitrosovibrio</i>
$\text{NO}_2^- \rightarrow \text{NO}_3^-$	<i>Nitrobacter, Nitrospira, Nitrococcus, Nitrospina</i>
Dénitrification $\text{NO}_3^- \rightarrow \text{N}_2$	<i>Bacillus, Paracoccus, Pseudomonas</i>
Fixation de l'azote	
Aérobie	<i>Azotobacter, Cyanobactéries (Anabaena, Nostoc)</i>
Anaérobie	<i>Clostridium, Algues vertes et rouges</i>
Symbiose avec des plantes	<i>Rhizobium, Bradyrhizobium, Frankia</i>
Ammonification (Azote organique $\rightarrow \text{NH}_4^+$)	Bactéries aérobies (<i>Bacillus, Pseudomonas</i>), Bactéries anaérobies (<i>Proteus, Serratia, Clostridium</i>), Moisissures (<i>Aspergillus, Penicillium, Rhizopus</i>)
Anammox	<i>Planctomycètes (Brocadia anammoxidans)</i>

Parmi les microorganismes intervenant dans le cycle de l'azote les archées sont capables d'assurer des transformations intervenant dans le cycle de l'azote. Les archées sont des procaryotes unicellulaires souvent appelées « extrémophiles » car trouvées dans des environnements non favorables à la croissance des microorganismes « courants » :

température élevée ou salinité forte par exemple. Les archées réalisent plusieurs étapes du cycle de l'azote : de la fixation de l'azote à la dénitrification. Certaines possèdent des gènes impliqués dans la fixation de l'azote ou encore l'assimilation de l'ammonium. Des « ammonia-oxidizing archaea » ont été découvertes dans la mer : *Nitrosopumilus maritimus* (Könneke et al., 2005), ou le parc du Yellowstone : *Nitrosocaldus yellowstonii* (de la Torre et al., 2008). Les archées réalisent aussi la réduction du nitrate et possèdent toutes les enzymes nécessaires à cette transformation (Cabello et al., 2004). Les archées sont capables de réaliser le cycle de l'azote car elles peuvent assumer les voies assimilatives comme dissimilatives du cycle.

Les plantes ont, comme tout organisme, besoin d'azote pour leur croissance et la synthèse : de nucléotides, d'acides aminés ou de protéines. C'est la raison qui a poussé l'homme à utiliser en grande quantité des engrais enrichis en azote dans le domaine de l'agriculture. Les plantes absorbent principalement l'azote au niveau du sol sous des formes organiques ou inorganiques. Elles s'adaptent ainsi au sol qui les héberge et utilisent les différentes formes d'azote à leur disposition. Cependant, le nitrate reste la principale source d'azote utilisée par les plantes (Wang et al., 2012). Elles peuvent aussi coopérer avec des microorganismes afin de fixer le diazote ce qui assure une accélération de leur métabolisme de croissance. La formation de nodules bactériens au niveau des racines des plantes permet alors aux bactéries d'être protégées et d'augmenter leur taux de fixation d'azote. Les bactéries vont produire de l'ammonium suite à l'assimilation de l'ammoniac et fournir alors, une source d'azote assimilable par les plantes sous l'action d'une glutamine synthétase (Madigan et al., 2010).

Tous les règnes participent au déroulement du cycle de l'azote. L'action anthropique sur la concentration en azote produite dans les sols et les nappes phréatiques a de lourdes conséquences. Cela a poussé l'homme à chercher des alternatives de traitements des sols mais aussi à s'intéresser à la compréhension et à la maîtrise du cycle de l'azote en totalité.

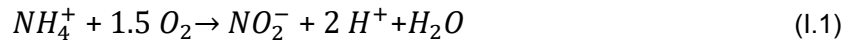
I.1.3 La nitrification

La nitrification a été découverte en 1846 et a longtemps été assimilée à un phénomène chimique. Dans les années 1880, Pasteur prouve que la nitrification est un processus biologique. En 1890, Winogradsky isole les premières bactéries nitrifiantes (Winogradsky, 1890). Les études suivantes ont permis de montrer que la nitrification était un processus découpé en deux étapes. La plupart des bactéries nitrifiantes sont incapables de pousser sur gélose ce qui rend leur culture et leur isolement difficile.

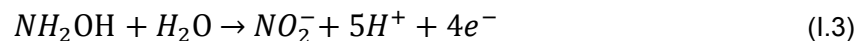
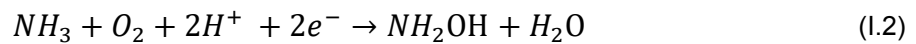
Nitrosomonas a été la première bactérie nitrifiante isolée. Elle est la plus répandue dans le sol. Depuis, de nombreux autres genres bactériens nitrifiants ont été mis en évidence (Tableau I-3).

1.1.3.1 La nitrification comme source d'énergie et le CO₂ comme source de carbone

La nitrification se déroule en deux étapes : l'oxydation de l'ammonium en nitrite par la suite oxydé en nitrate. La nitritation, assurée par les bactéries oxydatrices d'ammonium (AOB), est décrite par l'équation :



C'est une réaction exergonique avec un $\Delta G_0' = -288$ kJ/mol (Tableau I-2). Ainsi l'énergie produite permet à la cellule de fixer le carbone nécessaire à son métabolisme. L'oxydation de l'ammonium en nitrite par le genre *Nitrosomonas* se déroule en deux étapes catalysées par deux enzymes. L'ammonium est oxydé en hydroxylamine via l'ammonium-monoxygénase (AMO), Eq. I.2. Ce composé intermédiaire sera oxydé en nitrite par une hydroxylamine-oxydoréductase (HAO), Eq. I.3.



L'oxygène présent dans l'hydroxylamine provient de l'oxygène atmosphérique (Dua et al., 1979). Le second atome d'oxygène du nitrite provient alors de l'eau (Hooper, 1984). Parmi les quatre électrons générés à l'issue de ces deux réactions, deux permettent l'oxydation de l'ammonium (Prosser, 1989) et les deux autres servent à la réduction du nitrite ou du NAD⁺ (Whittaker et al., 2000).

Il a longtemps été supposé que l'ammonium entrait dans les cellules bactériennes par un processus de diffusion passive (Kleiner, 1985). Le séquençage du génome de *Nitrosomonas europaea* (Chain et al., 2003) a permis de mettre en évidence un système de transport actif de l'ammonium au sein de la bactérie. Une protéine similaire à celle impliquée dans le transport de cette molécule au sein d'*Escherichia coli* ou encore *Saccharomyces cerevisiae* a été mise en évidence (Schmidt et al., 2004). L'équipe a aussi montré qu'il y avait une accumulation intracellulaire de l'ammonium dont la concentration diminuait dès lors que l'ammonium extracellulaire était consommé (Schmidt et al., 2004). Une autre équipe a montré la présence d'une protéine Rh1 (de type rhésus) jouant le rôle de transporteur de l'ammonium au cœur de *Nitrosomonas europaea* (Weidinger et al., 2007).

Etude Bibliographique

La deuxième étape de la nitrification, la nitratation, assurée par les bactéries oxydatrices de nitrite (NOB), est décrite par l'équation :



Comme la nitritation, c'est un processus exergonique avec un $\Delta G_0' = -74.1$ kJ/mol (Tableau I-2). L'oxydation du nitrite en nitrate par *Nitrobacter* est catalysée par une nitrite oxydoréductase (NXR). L'enzyme NXR est une protéine membranaire composée de deux sous-unités : une sous-unité α de grande taille et une sous-unité β de petite taille (Spieck et al., 1996). L'oxygène incorporé pour former le nitrate provient de l'eau (Bock and Wagner, 2006). L'oxydation du nitrite est réversible et en condition anoxique, la NXR peut aussi réduire le nitrate en nitrite (Sundermeyer-Klinger et al., 1984). L'entrée du nitrite dans *Nitrobacter winogradskyi* est assurée grâce à une protéine narK qui est un transporteur de diffusion facilitée de la superfamille des Major Facilitator Superfamily (MFS), (Starkenbourg et al., 2006).

Les bactéries nitrifiantes utilisent le dioxyde de carbone (CO_2) comme source de carbone et l'oxygène comme accepteur final d'électrons. Pour fixer 1 mole de CO_2 , 34 moles d'ammonium doivent être oxydées pour la nitritation et 100 moles de nitrite pour la nitratation. La fixation du carbone s'effectue selon le cycle de Calvin. Les AOB et NOB possèdent une enzyme Ribulose Bisphosphate Carboxylase (RubisCO) qui assure l'intégration du CO_2 dans le cycle de Calvin. Ce cycle a pour objectif la formation de molécules organiques pouvant être utilisées par les microorganismes pour leur métabolisme. *Nitrosomonas europaea* possède une RubisCO de type 1, codée par 5 gènes, similaire à celle trouvée chez les cyanobactéries (Wei et al., 2004). En revanche, *Nitrosomonas europaea* est la seule à posséder une RubisCO similaire aux algues vertes alors que la plupart des AOB présente une RubisCO similaire aux algues rouges (Cébron A., 2004). *Nitrobacter* utilise aussi une RubisCO de type 1 (Starkenbourg et al., 2006) pour initialiser le cycle de Calvin.

1.1.3.2 La respiration aérobie et le transfert d'électrons

Lors de l'oxydation de l'ammonium ou du nitrite, les électrons formés sont transférés à la chaîne respiratoire, Figure I-6.

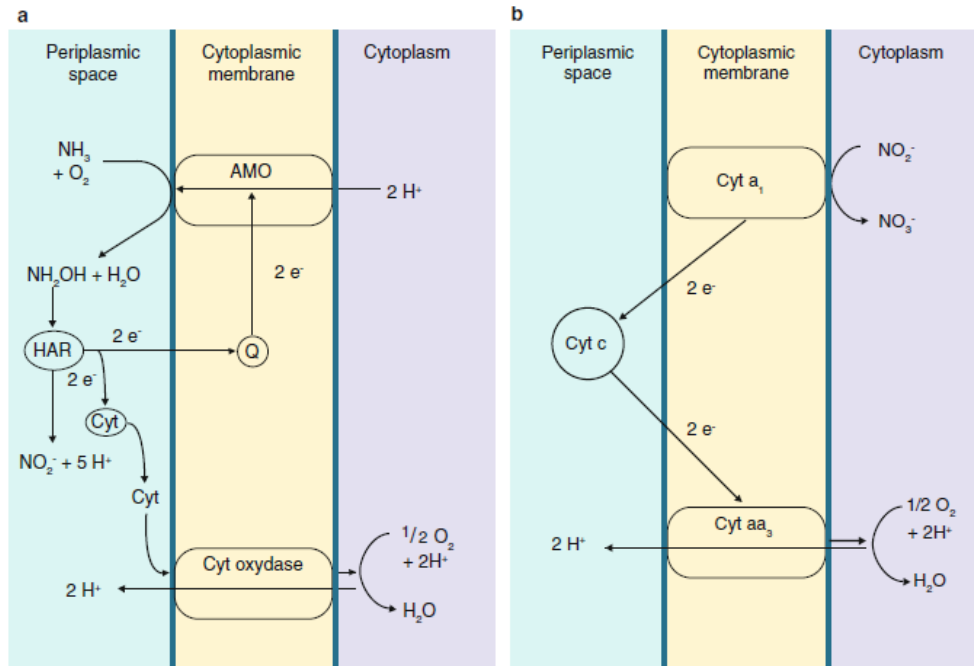


Figure I-6: Chaînes respiratoires chez (a) *Nitrosomonas* et (b) *Nitrobacter* (Bertrand et al., 2015).

L'ammonium et le nitrite ont un fort pouvoir réducteur ce qui entraîne la création d'un gradient de protons. Associées à la fixation du CO_2 , ces réactions assurent la formation d'Adénosine Triphosphate (ATP) et donc d'énergie pour les cellules. Durant l'oxydation de l'ammonium, 4 électrons sont générés (Figure I-6a). Ils servent alors à une nouvelle oxydation de l'ammonium ou à la réduction du NAD^+ . Lors de l'oxydation du nitrite, aucun électron n'est produit en surplus (Figure I-6b).

1.1.3.3 La nitrification hétérotrophe

Certains organismes comme les champignons ou les bactéries hétérotrophes sont aussi capables de réaliser la nitrification. Leur source de carbone n'est alors plus le CO_2 mais une molécule organique. La nitrification fongique est par exemple liée à la dégradation de la lignine (Prosser, 2005). Les bactéries hétérotrophes possèdent des enzymes similaires aux bactéries nitrifiantes autotrophes. Parmi ces bactéries hétérotrophes on trouve par exemple : *Pseudomonas* (Mével and Prieur, 2000; Zhang et al., 2011) et *Alcaligenes* (Wen and Wei, 2013). La plupart des hétérotrophes nitrifiants sont aussi capables de réaliser la dénitrification : le nitrite ou le nitrate alors produit peut directement être réduit. On parle alors de nitrification-dénitrification simultanée (SND) (Stein, 2011).

1.1.3.4 La nitrification dans l'environnement

La nitrification est une étape essentielle dans le cycle de vie de l'azote. L'accumulation d'ammonium et/ou nitrate dans l'environnement peut entraîner des troubles comme par exemple l'eutrophisation des lacs et des cours d'eau. En effet, l'accumulation de nutriments

azotés et phosphatés dans les eaux stagnantes peut encourager la formation de « bloom » d'algues. L'apport d'effluents domestiques, industriels ou encore agricoles en accélère le processus. Le domaine de l'agriculture a longtemps été mis en cause dans les pollutions en azote suite à l'usage intensif d'engrais riches en éléments azotés. Ces dernières années, leur usage a été contrôlé afin de limiter les rejets dans les sols et eaux. La nitrification naturelle permet alors l'élimination de l'ammonium dans l'environnement mais doit être couplé à la dénitrification pour permettre la libération d'azote atmosphérique.

Que ce soit dans les sols, les océans, les eaux douces ou encore les stations d'épuration, la nitrification est une étape essentielle du cycle de l'azote. Cependant, elle doit être associée à d'autres processus pour assurer la libération d'azote dans l'atmosphère et éviter l'accumulation de formes nutritives. Dans le traitement des eaux la nitrification est alternée avec des étapes de dénitrification afin d'optimiser au maximum l'élimination de l'azote.

I.2 Procédés d'élimination de l'azote

Il existe trois catégories d'eaux usées : les eaux domestiques, les eaux industrielles et les eaux pluviales. Pour son usage domestique, l'homme utilise entre 100 et 200 L eau/jour répartis dans la boisson, le lavage, la cuisine, l'arrosage et la chasse d'eau. Dans cette partie sera décrit le traitement des eaux usées domestiques auxquelles se mêlent les eaux pluviales.

I.2.1 Composition et caractérisation des eaux usées

Les eaux usées domestiques sont composées de : 70 à 90 g de matière en suspension, 60 à 70 g de matières organiques, 15 à 17 g de matières azotées, 4 g de phosphore et de nombreux microorganismes par litre d'eau. La matière azotée composant les eaux usées regroupe l'urée, les acides aminés et l'ammonium.

Trois paramètres permettent de caractériser les eaux usées domestiques :

- Les matières en suspension (MES) : matières non dissoutes dont le diamètre est supérieur à 1 μm
- La demande biologique en oxygène (DBO) : indique la quantité d'oxygène nécessaire pour la dégradation des matières organiques contenues dans les eaux usées. La DBO_5 est souvent utilisée et correspond à la quantité d'oxygène consommée en 5 jours.
- La demande chimique en oxygène (DCO) : indique la quantité d'oxygène nécessaire pour l'oxydation chimique des matières organiques contenues dans les eaux usées.

La configuration d'une station d'épuration dépend de la quantité d'effluent qu'elle reçoit mais aussi de la stratégie d'épuration appliquée (boues activées, cultures fixées). En traitement des eaux, un paramètre supplémentaire est fréquemment utilisé : l'équivalent habitant (EqH). Un équivalent habitant représente une DBO₅ de 60 g d'oxygène/jour. Cette notion est utilisée pour décrire la capacité de traitement d'une station d'épuration urbaine. La composition moyenne des eaux usées est donnée en Tableau I-4 :

Tableau I-4: Composition moyenne des eaux usées et concentrations imposées pour leur rejet en mg/L.

	Influent type (mg/L) (Sperling, 2007)	Norme de rejet à respecter (mg/L)
DBO ₅	300	25
DCO	600	125
MES	1100	35
Azote	45	10-15
Phosphore	7	1-2

La réglementation française impose des concentrations maximales en azote à ne pas dépasser en sortie de station. Pour une station de capacité variant de 10000 à 100000 EqH, la concentration en azote total ne doit pas dépasser 15 mg/L ; pour une capacité supérieure, elle est de 10 mg/L (Deronzier et al., 2001).

I.2.2 Elimination de l'azote en station d'épuration

Les effluents ne sont pas envoyés directement dans les bassins de traitement biologique. A l'arrivée dans la station d'épuration les eaux subissent un prétraitement grâce auquel les débris, le sable, les graviers ou encore les graisses domestiques sont éliminés. Les effluents subissent ensuite un traitement primaire où les particules décantables, constituant la matière en suspension, sédimentent. Suit un traitement secondaire qui permet la séparation des espèces colloïdales (silice, métaux lourds, argile, etc.) dont la taille est inférieure au micron et qui ne peuvent sédimenter de manière naturelle. Le traitement peut être physico-chimique : des agents flocculants sont ajoutés, ou biologique : le traitement est réalisé en même temps que l'élimination de l'azote. Le traitement biologique peut être assuré par des boues activées ou des lits bactériens.

Que la station d'épuration soit équipée de procédés utilisant les boues activées ou les lits fixes, l'élimination de l'azote impose quelques contraintes. L'assimilation, l'ammonification, la nitrification et la dénitrification doivent être assurées afin d'éliminer l'azote des eaux

résiduelles. Pour cela, il faut alterner des conditions aérobies et anaérobies pour que les effluents soient correctement traités, Figure I-7.

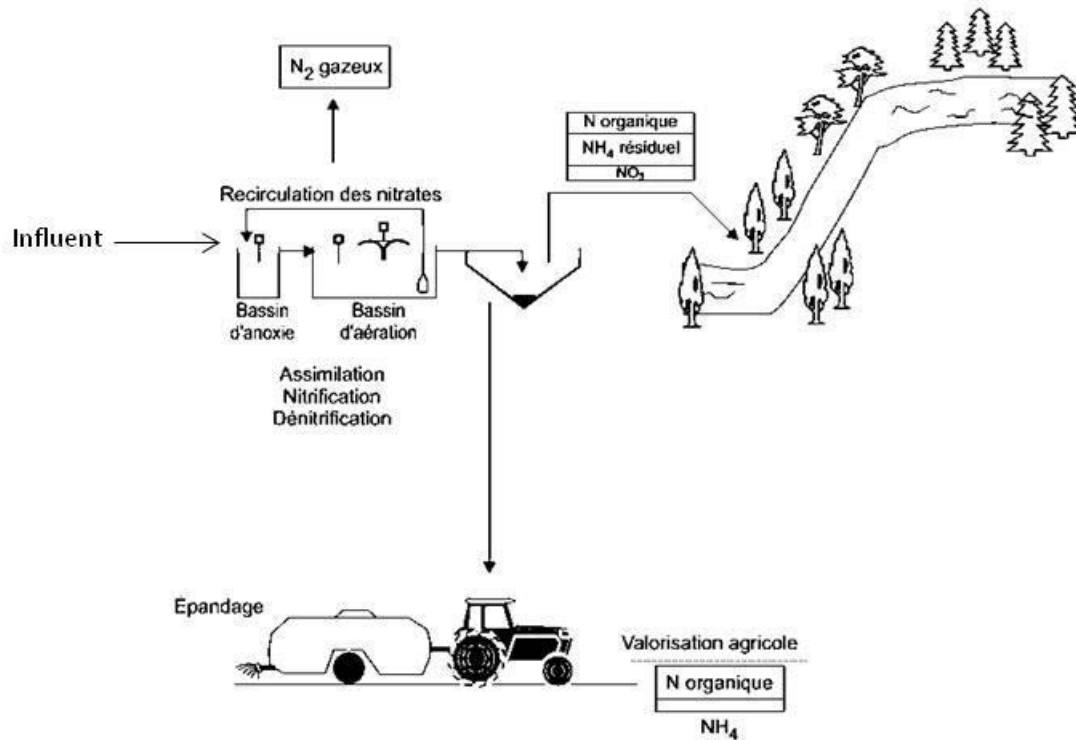


Figure I-7: Représentation du circuit de l'azote lors du traitement des eaux usées (Deronzier et al., 2001).

Les eaux recirculent entre les bassins d'anoxie et d'aération afin d'optimiser l'élimination de l'azote des effluents. Dans certaines stations d'épuration, des végétaux peuvent être utilisés pour réaliser un traitement final de l'eau et affiner l'élimination de l'azote. Dans ces stations, les végétaux supérieurs peuvent utiliser jusqu'à 15% de l'azote contenue dans les eaux. Lorsque des microalgues sont utilisées, cette élimination est encore plus importante. L'action des végétaux n'est que complémentaire à la nitrification et dénitrification qui restent les mécanismes d'élimination principaux dans ces techniques de lagunage naturel.

1.2.3 Les boues activées

Les boues activées représentent le traitement biologique des eaux usées par des cultures de microorganismes dans le bassin d'aération, Figure I-8.



Figure I-8: Boues activées dans le bassin d'aération de la station d'épuration d'Aigueperse (63). Source : Site web SEMERAP.

Le bassin d'aération dispose d'un système d'aération fonctionnant en discontinu. Les phases d'aération créent des conditions aérobies au cours desquelles les microorganismes nitrifient l'ammonium présent dans les effluents. Pendant les phases d'anoxie (en absence d'aération), les bactéries dénitrifient le nitrate produits et permettent l'élimination de l'azote des effluents sous forme de diazote. Les microorganismes s'agglomèrent et forment des floccs dont l'accumulation constitue les boues par décantation dans un bassin clarificateur. Ces boues sont récupérées et réinjectées en partie dans le bassin de traitement afin de maintenir la population bactérienne.

Une autre configuration est possible lorsque l'on travaille en boues activées ; cette configuration repose sur le placement d'un bassin d'anoxie en amont du bassin d'aération. Cette disposition permet d'avoir une dénitrification primaire. Les effluents recirculent entre les deux bassins afin d'augmenter l'élimination de l'azote au maximum.

Le procédé par boues activées est le plus courant dans les stations d'épuration. Ce procédé permet une nitrification et une dénitrification intensives. Cependant, cette configuration nécessite une maintenance et des réglages approfondis, contraintes que n'imposent pas les cultures fixées.

I.2.4 Les cultures fixées

Les lits bactériens sont l'exemple le plus courant de traitement biologique par biomasse fixée. Les microorganismes sont cultivés sur un support poreux au travers duquel s'écoulent les eaux issues du traitement primaire, Figure I-9.



Figure I-9: Photo d'un lit bactérien arrosé par les eaux issues de traitement primaire.

La biomasse décrochée sédimente et est réinjectée au niveau du lit. L'élimination de l'azote repose principalement sur les processus d'assimilation et de nitrification lorsque les conditions optimales sont réunies. Au sein du biofilm, des zones anoxiques favorisent le déroulement de la dénitrification.

Il existe aussi des lits d'infiltration-percolation sur sable, où la biomasse est fixée sur des grains de sable. L'élimination des composés azotés est principalement assurée par la nitrification et la dénitrification qui va se dérouler dans les zones anoxiques du bassin.

Les biofiltres sont l'exemple de la combinaison des processus physiques et biologiques permettant le traitement de l'azote. Ils sont constitués d'un matériau filtrant immergé et pouvant être aéré selon le procédé ciblé. La population bactérienne se développe et permet l'élimination de l'azote par nitrification et/ou dénitrification sur un ou plusieurs filtres.

L'un des exemples les plus connus en technologie de biomasse fixée pour le traitement des eaux usées est Biostyr[®] (Veolia, 2008). Le procédé Biostyr[®] repose sur une filtration ascendante à travers un matériau granulaire immergé ou flottant appelé Biostryrène[®] (Figure I-10) :



Figure I-10: Biostryrène[®] entrant dans la composition de la technologie Biostyr[®].

Ce matériau sert de support pour la biomasse épuratrice et assure en même temps la filtration de l'influent. De l'air insufflé dans le système permet d'assurer la nitrification et/ou la

dénitrification biologique. Le filtre peut alors assurer l'élimination de la pollution carbonée et azotée et des matières en suspension. Le système Biostyr® a plusieurs avantages :

- Une grande surface d'échange et une compacité importante
- Forte capacité épuratrice de l'azote : jusqu'à $1\text{kg N-NH}_4^+/\text{m}^3\cdot\text{j}$
- Forte capacité épuratrice du carbone : respectivement 8-10 et 5-6 $\text{kg DCO}/\text{m}^3\cdot\text{j}$ pour le traitement du carbone seul et combiné au traitement azote (Canler et Perret, 1994; Le Tallec *et al.*, 1997)

Les cultures fixées sont intéressantes dans le cas de petites structures où les charges en azote à traiter sont faibles. Leur principal avantage est la faible surface occupée par l'installation. Cependant, ce sont des installations plus coûteuses à construire (HYDRATEC, 2010). Les boues activées restent le processus le plus répandu même s'il est compliqué à mettre en place car une quantité importante de biomasse est produite et que les volumes de cultures sont grands. Des recherches portent sur la réduction des boues générées en traitement des eaux par l'utilisation de méthodes physico-chimiques (Capodaglio *et al.*, 2015; Lee *et al.*, 2006; Paul *et al.*, 2003). A ce jour, dans les stations d'épuration, l'azote est principalement éliminé par voie biologique. Cependant, l'utilisation des voies biologiques ne peut être appliquée dans certains environnements confinés : la taille des structures et les risques microbiologiques rendent ces traitements impossibles. Des alternatives au traitement classique ont donc été mises en place.

1.2.5 L'azote en environnements confinés et/ou extrêmes

Dans les environnements confinés, il est impossible de construire des structures de la taille d'une station d'épuration. Certes, la concentration en azote est plus faible car le nombre de personnes à « gérer » est plus faible, mais la surface mise à disposition pour ces équipements l'est aussi. Le dimensionnement des structures dépend alors de la quantité de déchets azotés impliquée et de la durée de fonctionnement des installations. De plus, l'utilisation de microorganismes n'est pas encore appliquée pour ces environnements spécifiques. Dans les exemples suivants, les durées de fonctionnement des installations ne sont pas les mêmes et ainsi, les stratégies de traitement physico-chimiques des déchets azotés diffèrent également.

1.2.5.1 Les sous-marins

Un équipage de sous-marin comporte au minimum 75 personnes et les missions durent entre 5 et 8 semaines. L'urine et les fèces sont traitées à bord du sous-marin afin de produire de l'eau utilisable par l'équipage. L'urine est distillée à basse pression et l'eau obtenue est mélangée aux eaux grises (de lavage par exemple) afin d'être traitée dans le « Water

Processor ». La distillation permet de concentrer les sels composant l'urine, notamment l'urée, et de les éliminer du circuit par filtration (Ek et al., 2006; Tabb and Carter, 2015). Ces « déchets » sont stockés afin d'être évacués : ce sont des résidus finaux du traitement de l'urine. La qualité de l'eau traitée est contrôlée par la conductivité. L'eau est renvoyée dans le circuit des eaux grises si la conductivité est trop élevée.

1.2.5.2 La base antarctique Concordia

Fruit d'une collaboration franco-italienne entre l'Institut Paul Emile Victor (IPEV) et l'Agence Nationale Italienne pour les Nouvelles Technologies, l'Energie et le Développement Durable (ENEA), la station Concordia voit le jour en 2004. Située sur le plateau Antarctique, elle est composée de deux zones : le bâtiment d'été pouvant héberger une quarantaine de personnes et les bâtiments d'hiver pour une quinzaine de personnes (Tafforin, 2009). La station permet la réalisation d'études climatiques, astronomiques mais aussi comportementales. Un système de traitement des eaux, développé par l'Agence Spatiale Européenne (ESA), permet l'autonomie de la station pendant les durées d'hivernage (Mekarnia and Frenot, 2012). Les eaux grises sont collectées et traitées par plusieurs étapes de filtration sur membrane, ultrafiltration et nanofiltration combinées à deux étapes d'osmose inverse (Gröndahl et al., 2009). Les eaux noires sont traitées par digestion aérobie et anaérobie, et par nitrification (Gröndahl et al., 2009). Les déchets solides issus du traitement sont filtrés et stockés afin d'être évacués à la fin de la période d'hivernage (Wieland, 1998).

1.2.5.3 L'exploration spatiale

Depuis le début de l'exploration spatiale, les stratégies de gestion du « problème » déchets azotés ont évolué. Durant les premières missions spatiales, les eaux usées (urine et fèces) étaient stockées à bord ou évacuées. Il n'y avait pas de traitement prévu pour ces eaux. A bord de la Station Spatiale Internationale (ISS), lancée en 1998, les déchets étaient d'abord stockés comme sur les missions précédentes. Les technologies ayant évolué et depuis le 14 Novembre 2008, l'ISS dispose d'un système de traitement physico-chimique des eaux (Carter et al., 2015). Il est appelé le « Water Recovery System » (WRS) et est composé de deux parties : l' « Urine Processor Assembly » (UPA) et le « Water Processor Assembly » (WPA), Figure I-11.

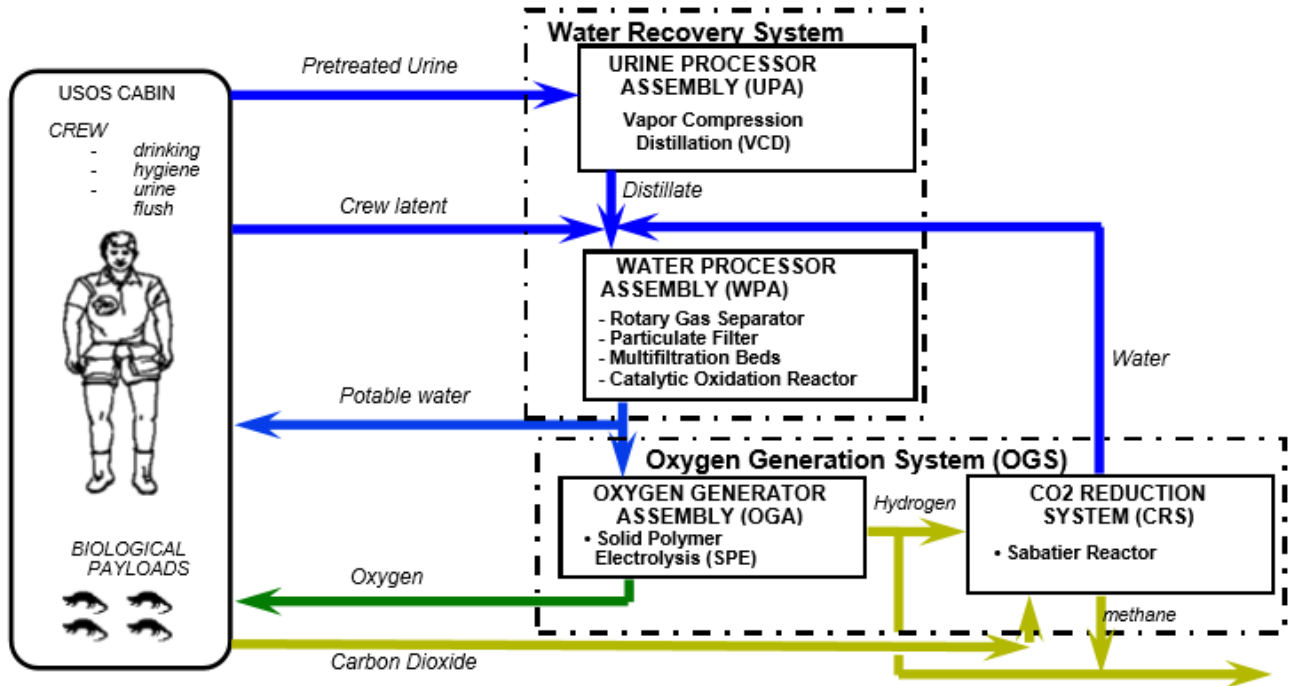


Figure I-11 : Schéma du circuit des eaux usées et du traitement de l'eau à bord de l'ISS (Tabb and Carter, 2015).

Les deux unités assurent un traitement de la totalité des eaux présentes dans la station. Une réserve d'eau potable d'environ 700 L est maintenue à bord. L'eau recyclée peut alors être utilisée par l'équipage, pour alimenter le système de régénération de l'oxygène, la chasse d'eau mais aussi pour la consommation.

1.2.5.3.1 L' « Urine Processor Assembly » UPA

L'urine de l'équipage est collectée dans le « Waste and Hygiene compartment » où elle est traitée chimiquement afin d'assurer sa stabilité. Ce traitement combine de l'Oxone®, un biocide limitant le développement bactérien, et de l'acide sulfurique afin de diminuer le pH de l'urine pour limiter aussi le développement bactérien et la volatilisation d'ammoniac (Akse et al., 2011). L'urine prétraitée contenue dans ce tank est composée de l'urine des astronautes, de l'eau de la chasse d'eau et d'un traitement chimique à base d'acide sulfurique et de trioxyde de chrome. Quand le volume du container est suffisant, le processus de traitement se met en marche. L'effluent est transféré dans le « Distillation Assembly » (DA) où le mélange est distillé (Tabb and Carter, 2015). Le distillat d'urine est envoyé dans le WPA pour être traité. Cette unité permet ainsi, de récupérer jusqu'à 85% de l'eau contenue dans l'urine prétraitée et est capable de gérer jusqu'à 9 kg urine/jour ce qui correspond à la quantité produite par 6 astronautes (Tabb and Carter, 2015).

1.2.5.3.2 Le « Water Processor Assembly » WPA

Le WPA recueille les eaux provenant de la condensation, le distillat d'urine produit par l'UPA et l'eau produite par le module de Sabatier (assurant l'élimination du CO₂ dans l'air). Les eaux sont stockées dans le « Waste Water Tank » où les gaz et les contaminants odorants sont traités par un filtre séparateur. L'air est alors rejeté dans la cabine de l'ISS. Les effluents stockés sont pompés et filtrés par deux « Multifiltration Beds » afin d'éliminer les contaminants inorganiques et organiques non-volatils. La filtration permet notamment d'éliminer le phosphore, le potassium et le soufre de l'urine (Ek et al., 2006). L'effluent entre ensuite dans le « Catalytic Reactor » où les molécules organiques restantes sont oxydées. L'eau ainsi traitée est contrôlée par mesure de la conductivité avant de passer par une « Ion Exchange Bed » qui fixe les produits de l'oxydation et permet notamment l'élimination de l'ammonium restant (Capodaglio et al., 2015; Carter et al., 2015; Jorgensen and Weatherley, 2003). Ce procédé utilise l'ajout d'iode dans l'eau afin d'assurer le contrôle microbologique (Carter et al., 2015).

La combinaison des procédés présents dans l'UPA (distillation) et dans le WPA (filtration, oxydation et colonne échangeuse d'ions) assurent l'élimination de l'azote dans les effluents de la station spatiale internationale. Les déchets organiques sont éliminés par filtration et stockés, l'urée est concentrée par distillation et l'ammonium est éliminé dans le résidu de distillation. Les déchets résultant de ces traitements sont stockés et sont évacués avec les déchets de la station. Même si le WRS est efficace et permet actuellement de recycler une partie de l'eau utilisée par les astronautes, le bilan n'est pas complet : seulement 85% de l'eau est récupérée. Le ravitaillement en eau et consommables (nourriture, minéraux...) est donc encore nécessaire pour assurer les besoins des astronautes. Aussi, les agences spatiales travaillent-elles ainsi sur des projets de supports de vie biorégénératifs. Ces systèmes représentent l'avenir de l'exploration spatiale où une station pourrait fonctionner en totale autonomie. Depuis 25 ans, l'Agence Spatiale Européenne (ESA) a développé son propre projet, et c'est dans ce cadre que ma thèse a été réalisée.

1.3 Les Systèmes de Support Vie et Contrôle Environnemental et le projet MELiSSA

1.3.1 Les Système de Support Vie et de Contrôle Environnemental

1.3.1.1 Définition

ECLSS est l'acronyme de « Environmental Control Life Support System » soit en français « Système de Support Vie et de Contrôle Environnemental ». Ce système a différentes fonctions à assumer (Tableau I-5):

Tableau I-5: Fonctions assurées par un ECLSS.

Fonctions de survie	Fonctions de sécurité
Gestion de l'air	Détection et piégeage des contaminants
Gestion de l'eau	Contrôle qualité chimique et microbiologique
Production et préparation de nourriture	Sécurité et fiabilité du système
Gestion des déchets	

L'exploration spatiale habitée n'est possible que par la mise en place de ces systèmes. On estime la quantité de consommables nécessaire à la survie d'un homme à 5kg/j. Lors de missions courtes (de l'ordre de quelques jours), il sera aisé de stocker les déchets générés par l'équipage et les ressources nécessaires. En revanche, lorsque des missions plus longues ou plus lointaines sont envisagées, il est impossible de fonctionner avec cette stratégie : pour une mission de 3 ans, 5.5 tonnes de consommables seront nécessaires. Il est impossible d'emporter une telle quantité de ressource au lancement. Il était nécessaire de trouver un système pour limiter la quantité emportée initiale et la quantité de déchets stockés durant la mission. C'est avec cet objectif que les programmes de recherches portant sur les Closed Ecological Life Support System (CELSS), des systèmes de support-vie clos assurant une totale autonomie, sont apparus.

1.3.1.2 Le développement d'un système de support vie

Le développement d'un système de support vie se divise en plusieurs phases (Eckart, 1996):

Phase A : Etude du concept et analyse préliminaire. Analyse de la faisabilité du projet, définition des objectifs et études préliminaires du système (simulations et expérimentations)

Phase B : Design préliminaire. Analyse des études préliminaires réalisées en phase A, choix des nouvelles technologies, définition de procédés alternatifs.

Phase C/D : Développement et conception du système opérationnel. Développement du système spatialisable, tests d'intégration des sous-unités du système, but ultime : design final, fabrication, test et vérification du système à l'échelle du vaisseau.

Ces phases sont nécessaires au développement d'un projet d'une telle envergure. Pour la survie d'un équipage, le développement d'un ECLSS doit suivre de nombreuses étapes et ne peut pas se faire en quelques mois. Les verrous secondaires de fonctionnement d'un LSS sont la réponse aux besoins vitaux des astronautes et la gestion de leurs déchets.

1.3.1.3 Les contraintes de développement des ECLSS

Les enjeux d'un ECLSS sont de reproduire l'environnement terrestre et son fonctionnement : régénérer l'atmosphère mais aussi « traiter » les déchets tels que l'eau et les déchets ménagers. Cependant, le développement de ces ECLSS est soumis à de nombreuses contraintes :

- La masse et le volume occupé par le système doivent être les plus faibles possibles
- Le système doit consommer le moins d'énergie possible
- La sécurité de fonctionnement doit être la plus élevée
- Le procédé doit être totalement maîtrisé afin de pouvoir être contrôlé et maîtrisé

La masse du système de support vie est une composante essentielle à son développement. Pour que le projet soit réalisable, celle-ci doit être la plus faible possible. La masse du système varie selon le type de ECLSS envisagé, Figure I-12.

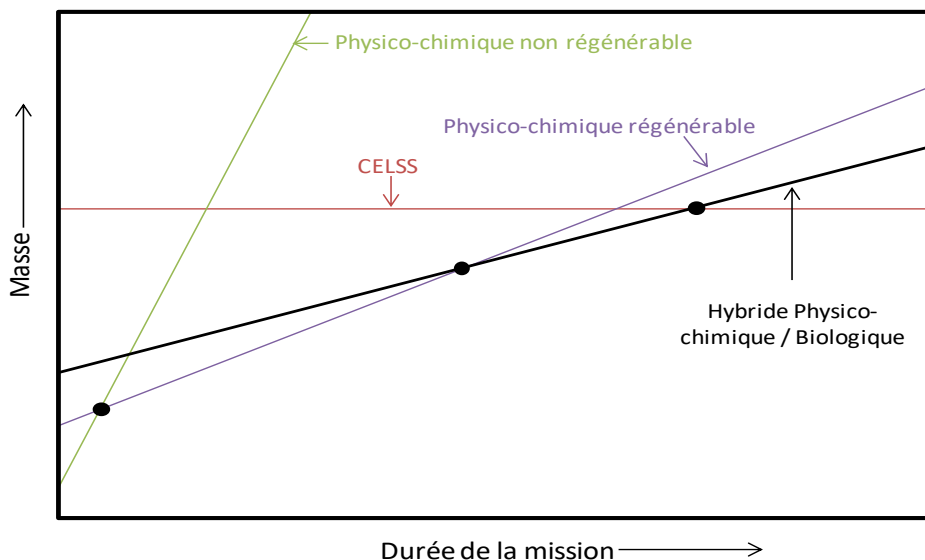


Figure I-12: Evolution de la masse du système de support vie en fonction de la technologie mise en œuvre et de la durée d'une mission (Poughon, 1998). Les ronds représentent les points de rupture du ECLSS envisagé et indique qu'un changement de technologie serait plus adapté à la mission envisagé.

La masse du système du ECLSS varie selon son type, lorsque celui-ci n'est pas clos sa masse est faible. Cependant, plus l'ECLSS se rapproche d'une boucle fermée, plus la masse initiale du système augmente. En effet, il sera nécessaire d'emporter plus de technologies (réacteurs, réservoirs de stockage, séparateurs, systèmes de sauvegarde, etc.) à bord, augmentant considérablement la masse initiale du système. La masse relative du système représentant la masse totale des consommables à emporter pour la survie de l'équipage va elle, diminuer. Lorsque la station fonctionne en boucle ouverte, c'est-à-dire qu'aucun ECLSS n'est mis en place, la masse relative à embarquer est de 100% : tous les consommables

sont emportés et stockés. Cette masse diminue au fur et à mesure que le niveau du ECLSS augmente (Tableau I-6).

Tableau I-6: Masse relative à embarquer en fonction du niveau du système de support vie choisi (Poughon, 1998).

Niveau	LSS utilisé	Masse relative à embarquer
0	Boucle ouverte	100%
1	Recyclage des eaux usées	45%
2	1 + Absorption régénérative du CO ₂	30%
3	2 Régénération de l'oxygène	20%
4	3 + Production de nourriture à partir des déchets recyclés	10%
5	4 + Elimination des fuites	5%

Ainsi, l'optimisation technologique du LSS a pour critère principal la réduction de la masse embarquée. Actuellement, le niveau atteint à bord de l'ISS est de 3 : les eaux usées sont recyclées, le CO₂ est traité et l'oxygène est régénéré. C'est le niveau maximal pouvant être atteint pour le moment. En effet, pour atteindre un système de recyclage plus complet et produire de la nourriture, il est impératif d'utiliser des systèmes biologiques vivants (bactéries, plantes). Le LSS a alors un caractère biologique ; les projets traitant de ces problématiques ne sont encore qu'à l'étape recherche et développement.

Ces contraintes sont indispensables au développement de l'ECLSS car celui-ci fonctionnera dans un environnement confiné et tout défaut ou dérive de fonctionnement aura des conséquences catastrophiques pour l'équipage.

1.3.1.4 Les besoins et les déchets de l'homme

Une des fonctions du ECLSS est de subvenir aux besoins de l'équipage y compris ses besoins nutritionnels. L'alimentation doit apporter au corps humain l'énergie nécessaire à sa survie mais aussi différents nutriments.

L'alimentation apporte des glucides, des protéines et des lipides sources d'acides aminés et d'acides gras essentiels à la santé (Calloway and Pace, 1972). La dépense énergétique moyenne d'un astronaute varie entre 2740 et 3490 kcal/jour, le maximum étant atteint lorsqu'il y a une sortie extra véhiculaire (Poughon et al., 2002). Les besoins journaliers sont répertoriés dans le Tableau I-7.

Tableau I-7: Besoins journaliers à assumer au sein d'une station spatiale.

Besoins journaliers	(Eckart, 1996)	(Nelson et al., 2010)
Besoin énergétique (kcal/j)	2990 (2740-3490)	-
Nourriture sèche (kg/homme·jour)		0.6
Glucides (kg/homme·jour)	0.3-0.6	-
Protéines (kg/homme·jour)	0.05-0.3	-
Lipides (kg/homme·jour)	0.05-0.15	-
Eau potable (kg/homme·jour)	1.6	1.8
Eau hygiène (kg/homme·jour)	20.05	20.6
Oxygène (kg/homme·jour)	0.85	0.9

L'homme produit plusieurs types de déchets au cours d'une journée : les déchets métaboliques (CO₂, urine, fèces, etc.) mais aussi des déchets alimentaires, de l'eau sale (douche, entretien, etc.). Leur quantité est stable au sein d'un environnement confiné comme une station spatiale, Tableau I-8.

Tableau I-8: Déchets journaliers produits au sein d'une station spatiale (Eckart, 1996).

Déchets journaliers	
CO ₂ (kg/homme·jour)	1
Eau de respiration (kg/homme·jour)	2.28
Urine liquide / solide (kg/homme·jour)	1.5 / 0.06
Fèces liquide / solide (kg/homme·jour)	0.09 / 0.03
Eau hygiène (kg/homme·jour)	13.51
Eau entretien (kg/homme·jour)	11.96
Déchets solides (m ³ /homme·jour)	0.0028

Les contraintes biologiques du développement d'un Système de Support de Vie (LSS) regroupent les besoins journaliers vitaux mais aussi les rejets engendrés par un équipage. L'équipage à bord de l'ISS est composé de 6 personnes. Les quantités de ressources à stocker sont importantes et le traitement à bord de certains déchets permet de réduire ces quantités. Ainsi, un système de recyclage primaire est déjà en place : une ébauche d'ECLSS est ainsi présente à bord de la station.

1.3.1.5 Les LSS physico-chimiques et régénératifs

Il existe deux types de systèmes de support de vie : les systèmes régénératifs basés le recyclage des éléments et les non-régénératifs basés sur leur stockage et évacuation. Les systèmes régénératifs reposent sur des procédés physico-chimiques et/ou biologiques.

Les procédés physico-chimiques incluent les séparateurs physiques ou chimiques, les procédés d'oxydation, de concentration, les filtres, etc. Ils sont déjà couramment utilisés dans les stations spatiales pour le recyclage de l'eau et de l'urine notamment. Les systèmes biologiques ou « biorégénératifs » (BLSS) reposent sur l'utilisation du vivant tel que les plantes ou les microorganismes (bactéries, algues, champignons). Ces BLSS assurent la production de nourriture, la régénération de l'oxygène et de l'eau mais aussi le recyclage d'une partie des déchets.

A ce jour, le système de soutien de vie à bord de l'ISS est un système physico-chimique « ouvert » : les déchets sont stockés avant d'être évacués et les eaux et le dioxyde de carbone sont directement traités à bord. Une boucle de recyclage est ainsi déjà mise en place. Cependant, pour d'éventuelles missions vers Mars ou l'établissement de nouvelles bases, il sera nécessaire de fermer de plus en plus les boucles de recyclage et de faire tendre les stations spatiales vers une autonomie totale.

1.3.1.6 Historique des ECLSS régénératifs

Les différentes agences spatiales ont travaillé sur plusieurs projets d'ECLSS. Les agences se sont ensuite associées pour partager leur recherche et aboutir à des projets de plus en plus avancés, Tableau I-9.

Tableau I-9 : Récapitulatif des systèmes de support de vie au cours des années (Eckart, 1996; Nelson et al., 2010; Tako et al., 2011; Verseux et al., 2016).

	USA	1961	Régénération de l'oxygène par microalgues. Tests avec singes et microalgues.
Bios 1 et 2	Union Soviétique	1961	Régénération de l'oxygène par microalgues. Tests sur rats et hommes
CELSSUS	Japon	1977	Croissance de plantes en milieu contrôlé
Bios3	Russie	1972-1984	Utilisation de plantes pour traiter l'eau et produire de la nourriture. Expérience de 6 mois avec un équipage
Biosphere 2	USA	1984	Système de support vie fermé. Expérience de 2 ans (1991-1993) avec 8 personnes en continu. Représente 7 biomes dont un espace d'agriculture intensive et un habitat humain.
CEBAS	Europe	1985	Aquarium combinant poissons, plantes et bactéries et fonctionnant comme une boucle fermée. Vols dans les missions STS-89 et

Etude Bibliographique

			STS-90.
MELiSSA	Europe	1989*	Boucle fermée conçue pour des missions longues. Décrit plus en détail dans la suite du manuscrit. Une pilote représentatif de la boucle est construit en 2005.
CEEF	Japon	1994	Combinaison de plusieurs modules permettant le fonctionnement en boucle fermée. Expériences récentes avec deux personnes (appelées Econautes).
LMLSTP	USA	1995-1997	Combinaison de systèmes physicochimiques et biologiques pour la régénération de l'air ambiant. Expérience sur 4 personnes pendant 90 jours.
BioPlex	USA	1997	Construit au Johnson Space Center ; enchaînement de pièces à atmosphère contrôlée. Prévu pour une mission de 4 personnes pendant 1 an.
CAB	Italy	2006*	Combinaison de plantes supérieures et processus biologiques et physico-chimiques. En cours de phase 1.
MARS-500	Russie, Europe et Chine	2007	Simulation de missions de 520 jours dans le « Ground Experimental Complex » situé à Moscou. Trois missions ont été réalisées (15 jours en 2007, 105 jours en 2009 et 520 jours sur 2010-2011)
« Multibiological system »	China	2008*	Utilisation de laitue, microalgues et vers à soie. Plusieurs expérimentations ont été menées dont une de 9 mois avec un homme.
Lunar Palace 1	Chine	2014*	Plateforme de test construite en 2013. Première mission de 105 jours en 2014 avec 3 personnes. Système multibiologique avec cultures de vers à soie, biofermentation des déchets
CyBLISS	USA, Europe	2015*	Utilisation de cyanobactéries pour exploiter les ressources disponibles sur Mars et subvenir aux besoins des organismes du BLSS.

*Ces projets sont toujours en cours de développement

Les premières recherches de support-vie portaient sur des systèmes simples essentiellement concentrés sur la régénération physico-chimique de l'oxygène. Au fil des années, les ECLSS ont évolué et incluent de plus en plus souvent des systèmes biologiques. Des démonstrateurs ont été développés pour simuler les couplages des ECLSS et vérifier leur fonctionnement : le Ground Experimental Complex (Moscou, Russie) (Kurmazenko et al., 2012) ou le MELiSSA Pilot Plant (Barcelone, Espagne) par exemple. L'évolution des connaissances en BLSS et en procédés a permis une amélioration des supports de vie. Cependant, l'avancée technologique impacte sur une des principales contraintes de

développement des ECLSS : la masse et le volume de l'installation. Les démonstrateurs reflètent cette problématique : Biosphere 2 occupe une surface de 12800 m² pour 8 personnes (Eckart, 1996) et le MELiSSA Pilot Plant dimensionné pour un homme occupe 214 m² (Moyano and Peiro, 2015).

I.3.2 MELiSSA

Actuellement, à bord de l'ISS, le traitement de l'eau et la régénération de l'oxygène sont assurés par des procédés physico-chimiques. L'urine des astronautes est recyclée et la vapeur d'eau de l'air est condensée avant d'être traitée elle aussi, comme décrit en partie I.2.5.2. L'oxygène est régénéré via l'électrolyse de l'eau et géré par l' « Oxygen Generating System ». Le dioxyde de carbone est éliminé par réaction de Sabatier via l'Air Revitalisation System. Aucun microorganisme n'est actuellement utilisé à bord et ceci ne permet pas, pour l'instant, un fonctionnement autonome de la station du point de vue de la production de nourriture. Pour remédier à ceci le projet MELiSSA, envisage l'utilisation d'organismes vivants assurant différentes fonctions de recyclage et de production de nourriture. C'est le challenge du projet MELiSSA.

MELiSSA est l'acronyme de Micro-Ecological Life Support System Alternative. C'est un système biorégénératif de support de vie basé sur un écosystème. Le système est conçu pour subvenir aux besoins d'un équipage dans des missions longues et/ou éloignées telle qu'une mission vers Mars de 18 mois comptant : 6 mois pour le trajet aller, 6 mois de séjour et 6 mois pour le trajet retour. L'objectif est d'assurer une quasi-totale autonomie.

1.3.2.1 Contexte

Lorsque le projet MELiSSA a démarré, différentes missions spatiales ont déjà eu lieu : VOSTOK (1960-1963), MERCURY (1960-1963), APOLLO (1968-1972)... Différentes stations spatiales ont déjà été placées en orbite et habitées : Salyut 1-7 (1971-1982), Skylab (1973), Mir (1986) (Diamant and Humphries, 1990). Durant ces vols et missions habitées, les eaux usées sont stockées et évacuées sauf pour Salyut 6 et 7 et Mir, où les eaux sont condensées et traitées à bord. L'atmosphère est régénérée via des réservoirs d'azote et d'oxygène et l'urine et les fèces sont principalement stockées dans des containers ou des sacs.

1.3.2.2 Description du projet

MELiSSA est un système de support-vie biorégénératif ayant pour objectifs :

- Le recyclage des déchets produits par l'équipage.
- Le recyclage des eaux usées produites dans la station.

Etude Bibliographique

- La régénération de l'oxygène pour la survie de l'équipage.
- La production de nourriture « in-situ » pour compléter l'alimentation de l'équipage.

Basée sur un écosystème et construit comme une boucle, MELiSSA permettra à la station de fonctionner en totale autonomie. Inspiré d'un environnement lacustre, cinq processus ont été identifiés et isolés pour constituer MELiSSA, Figure I-13.

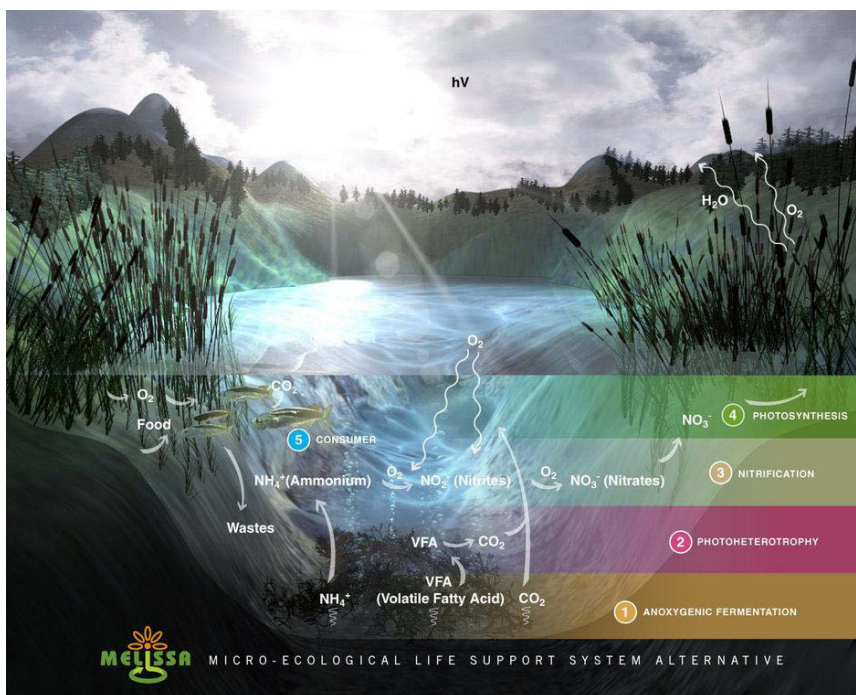


Figure I-13: L'écosystème artificiel de la boucle MELiSSA inspiré d'un environnement lacustre. Les différentes réactions impliquées sont la fermentation anaérobie (1), la photohétérotrophie (2), la nitrification (3), la photosynthèse (4) et les producteurs de déchets/consommateurs de ressources initiant la boucle (5).

Cinq zones ont été mise en évidence et sont présentes dans MELiSSA sont :

- 1) la fermentation anaérobie ;
- 2) la photohétérotrophie ;
- 3) la nitrification ;
- 4) la photosynthèse ;
- 5) la présence de consommateurs de ressources produisant les déchets nécessaire au fonctionnement de l'environnement lacustre.

L'approche ingénierie utilisée dans MELiSSA consiste à isoler chacune de ces opérations unitaires afin de l'étudier individuellement pour la comprendre, la caractériser et développer un modèle pour son contrôle. L'étude du système complet et des différentes phases associées n'étant réalisée qu'après les caractérisations de chacun des processus. Chaque

zone de la Figure I-13 a donc été « confinée » dans un compartiment constituant la boucle MELiSSA, Figure I-14.

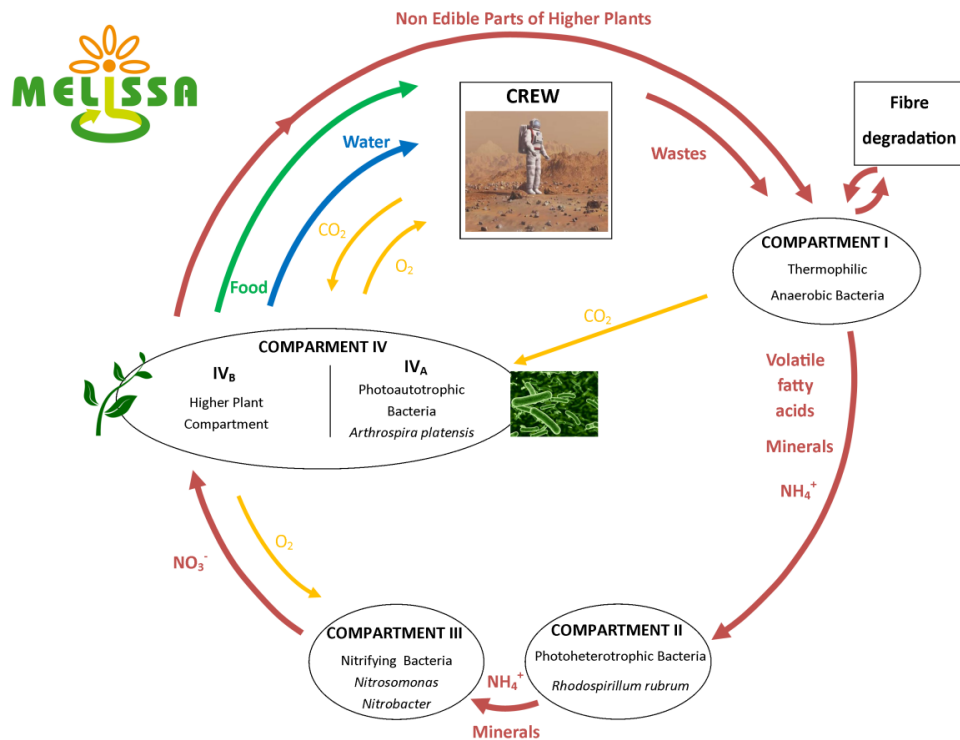


Figure I-14: Représentation de la boucle MELiSSA et des différents compartiments qui la composent.

1.3.2.3 Développement de MELiSSA

MELiSSA a été créée en 1989 par l'ESA. A la création, plusieurs partenaires participent à la définition du projet. La majorité des partenaires proviennent de l'Union Européenne : France, Pays-Bas, Belgique, Espagne, Italie. MELiSSA bénéficie aussi de la participation de l'Université de Guelph au Canada. Le projet MELiSSA est structuré en cinq phases :

- **Phase 1 :** Recherche préliminaire et développement du projet. Activité principale de MELiSSA : étude compartiment par compartiment, modélisation, contrôle et avancée du MELiSSA Pilot Plant (MPP).
- **Phase 2 :** Vols expérimentaux préliminaires. Débutée en 2002, cette phase repose sur l'étude de la microgravité ou gravité réduite sur les bactéries et les procédés de la boucle. Collaboration avec la Station Spatiale Internationale.
- **Phase 3 :** Démonstration au sol et spatiale. La démonstration au sol est permise grâce au MELiSSA Pilot Plant situé à Barcelone. Des démonstrations spatiales ont été réalisées en collaboration avec les astronautes belge et italien Franck De Winne et Samantha Cristoforetti.

- **Phase 4** : Transfert de technologie. Regroupe les applications terrestres des technologies utilisées au sein de MELiSSA.
- **Phase 5** : Communication. Pour faire connaître le projet, diverses communications sont réalisées par les partenaires lors de congrès, de réunions ouvertes au public. De récentes expériences en collèges et lycées en partenariat avec Samantha Cristoforetti à bord de l'ISS ont été réalisées.

MELiSSA a fêté ses 25 ans en 2015 et, à ce jour, les différentes phases du projet sont en cours d'avancement. La démonstration au sol est depuis quelques années mise en place dans le MPP situé à l'Universitat Autònoma de Barcelona en Espagne.

1.3.2.4 Les compartiments de la boucle MELiSSA

La boucle MELiSSA est composée de cinq compartiments (Figure I-14) auxquels une fonction propre est associée. Au cours du développement du projet, ces compartiments ont évolué afin d'optimiser au maximum leur fonctionnement et leur intégration dans la boucle. Les caractéristiques plus détaillées des compartiments seront données dans la partie 1.3.3.3.

Le compartiment 1 – C1

Le compartiment liquéfacteur est la première étape de la boucle MELiSSA. Il a pour objectif d'amorcer la dégradation des déchets produits par les astronautes : les déchets biologiques (fèces, urine) comme les déchets de la vie courante (papier, partie non-comestibles des végétaux ou papier toilette). Ce compartiment repose sur l'action d'un consortium bactérien qui permet le déroulement de nombreuses réactions résumées dans la Figure I-15.

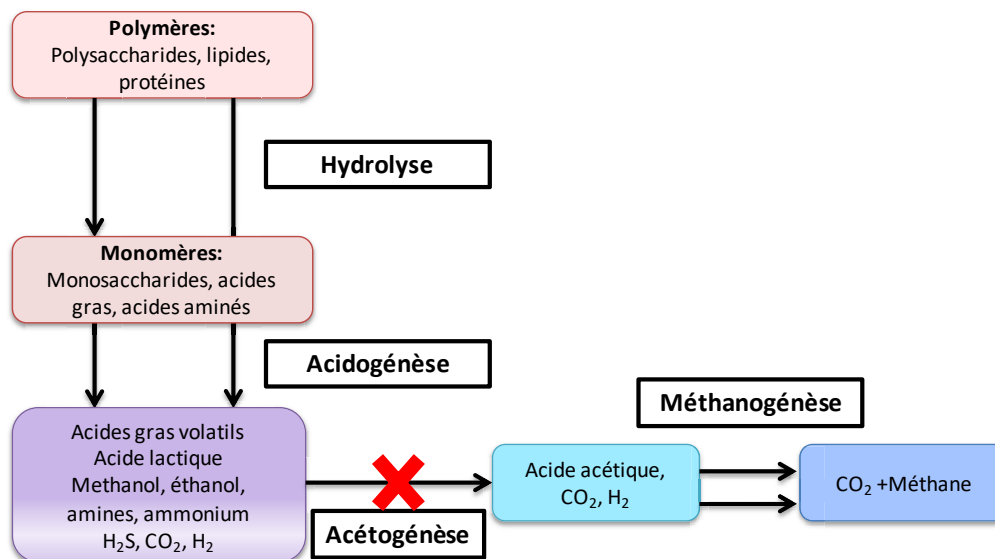


Figure I-15: Schéma général des réactions assurant la dégradation anaérobie des déchets. Seulement les deux premières réactions se déroulent dans le compartiment liquéfacteur de la boucle MELiSSA (d'après Montràs, 2009).

Chapitre I

Des acides gras volatils, de l'ammonium, des minéraux et du CO₂ seront produits dans ce premier compartiment et servent à alimenter la suite de la boucle. Les principales contraintes de ce compartiment sont :

- L'utilisation de fèces pouvant entraîner la prolifération de bactéries pathogènes et requiert une température de travail élevée.
- La dégradation de la lignine provenant des restes d'alimentation.
- La production de dihydrogène qui doit être limitée.

Le compartiment 2 – C2

Colonisé par *Rhodospirillum rubrum*, le compartiment 2 a pour objectif d'achever la dégradation des déchets organiques débutée en C1. Cette bactérie pourpre non-sulfureuse dégrade les acides gras volatils produits en C1 en dioxyde de carbone, ammonium et minéraux. Ce compartiment a pour objectif de produire le maximum de dioxyde de carbone pour alimenter les compartiments C4a et C4b. Cette production dans des conditions anaérobies entraîne une production de biomasse importante qui est réinjectée au niveau du C1. Ce recyclage entraîne une augmentation de la productivité du C1 et le C2 doit produire plus de biomasse pour assurer la totale dégradation des déchets.

Le compartiment 3 – C3

Ce compartiment est le principal impliqué dans la dégradation des déchets azotés. Ici, une coculture de bactéries nitrifiantes permet l'oxydation de l'ammonium en nitrate, utilisables dans le compartiment 4. Le compartiment nitrifiant sera détaillé dans la Partie I.3.4.

Le compartiment 4 – C4

Ce compartiment photosynthétique a pour objectifs de régénérer l'oxygène, de purifier l'eau et de produire de la biomasse consommable pour l'équipage. Il est divisé en deux sous-unités :

- Le compartiment C4a est une culture de cyanobactéries. Compartiment le plus étudié de MELISSA, il a pour objectif de produire de la biomasse comestible tout en utilisant le CO₂ provenant des autres compartiments comme source de carbone et du nitrate provenant du C3 comme source d'azote. *Arthrospira platensis*, aussi appelée Spiruline, a été choisie pour ce compartiment. De haute valeur nutritive, elle assure la production d'oxygène tout en étant un complément alimentaire intéressant.
- Le compartiment C4b est le compartiment plantes supérieures. Ses objectifs sont la production de biomasse comestible, la régénération de l'atmosphère et la purification

de l'eau. De nombreuses études ont portées sur la sélection de plantes utilisables dans MELiSSA comme : la laitue, les tomates, les épinards, les patates, le soja...

La combinaison de ces deux sous-unités permet la régénération de l'atmosphère. La production de biomasse comestible comme des végétaux ou de la Spiruline est un avantage du système MELiSSA. La production de nourriture, outre le fait de contribuer aux besoins nutritionnels, a aussi un impact direct sur l'état psychologique des astronautes. Les contraintes de ce compartiment sont :

- La consommation d'énergie pour l'éclairage des plantes et cyanobactéries.
- La régulation température des deux compartiments : l'éclairage entraine la nécessité d'évacuer la chaleur produite par le système d'éclairage choisi.
- La régénération de l'oxygène à assurer pour alimenter la station et le C3.

Le compartiment 5 – C5

Il est constitué par l'équipage. Point initial et final de la boucle, il est la source et la cible des effluents des compartiments. Ainsi, la boucle est dimensionnée pour un nombre de personnes précis.

La phase 3 du projet MELiSSA (cf partie I.3.2.3) comporte une démonstration terrestre de la boucle. Les compartiments et leurs réacteurs à l'échelle laboratoire ont été étudiés séparément. Mais le but du démonstrateur est l'observation du fonctionnement des compartiments en tant que boucle fermée, c'est-à-dire en interaction les uns avec les autres. Pour cela, des réacteurs pilotes de chacun des compartiments ont été construits et réunis au sein du MELiSSA Pilot Plant.

I.3.3 Le démonstrateur : MELiSSA Pilot Plant

Le MELiSSA Pilot Plant est localisé dans le département de Génie Chimique à l'Universitat Autònoma de Barcelona en Espagne.

I.3.3.1 Présentation

Le MELiSSA Pilot Plant est une plateforme de test à l'échelle pilote de la boucle MELiSSA occupant une surface totale de 214 m². Construite en 2005, elle dispose de chacun des réacteurs de la boucle MELiSSA. L'objectif du MPP est de tester chacun des compartiments et de vérifier leur efficacité et fonctionnement ; à court terme, chaque réacteur est testé séparément. A long terme les réacteurs seront raccordés un à un, cette étape doit permettre de vérifier que le couplage des compartiments est possible et fonctionnel. Le MPP est

dimensionné pour un homme : en fonctionnement les réacteurs doivent subvenir aux besoins vitaux d'un homme.

1.3.3.2 Organisation et plan du MPP

Les réacteurs pilotes des compartiments MELISSA sont répartis en trois salles, Figure I-16.

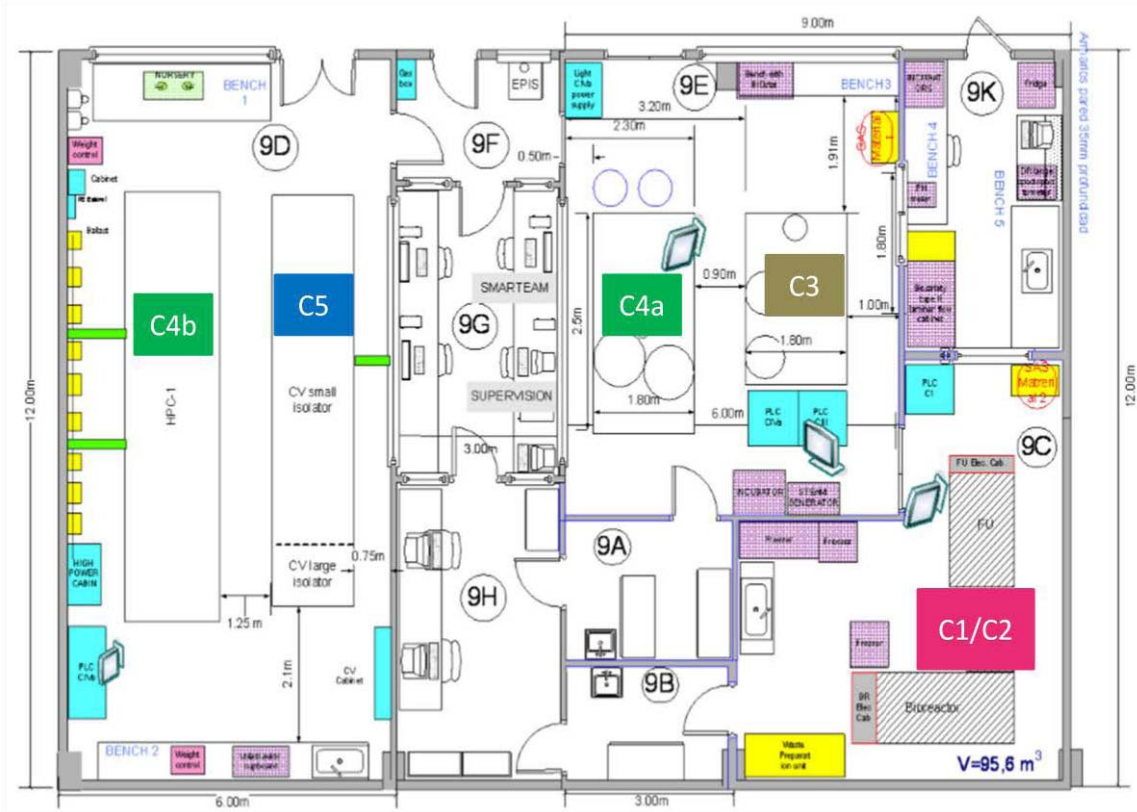


Figure I-16: Plan du MELISSA Pilot Plant et localisation des différents réacteurs représentatifs de chacun des compartiments. 9A : Sas de préparation pour accéder à la salle axénique 9E ; 9B : Sas de préparation et d'accès à la salle 9C ; 9C : réacteurs C1 et C2 et unité de préparation des déchets ; 9D : C4b (plantes supérieures) et C5 fonctionnant avec des rats ; 9E : salle axénique avec C3 et C4a ; 9F/G/H : salles de supervision et contrôle des installations ; 9K : pièce d'analyse contenant un PSM et divers équipements pour le traitement des prélèvements et échantillons.

Les réacteurs axéniques à savoir le C3 et le C4a sont localisés dans la même salle où l'entrée est contrôlée et ne se fait qu'avec des équipements de protection. Cette salle dispose d'un sas de transfert vers la salle d'analyse (9K). Les réacteurs C1 et C2 sont localisés dans la même pièce que l'unité de préparation des déchets. Le C4b et le C5 sont situés dans une autre pièce étant donné le volume de ces deux réacteurs. Les compartiments ont été, à ce jour, tous étudiés séparément.

1.3.3.3 Les réacteurs pilotes des compartiments

Le compartiment 1 – C1

Le compartiment 1 occupe une salle de 21.3 m² avec le Compartiment 2. Le C1 est un réacteur anaérobie de 100 L fonctionnant à 55 °C et est accompagné de deux unités : un tank d'entrée (60 L ; 4°C) et un tank de sortie (60 L ; 2°C) situé après une membrane de filtration, (Figure I-17).

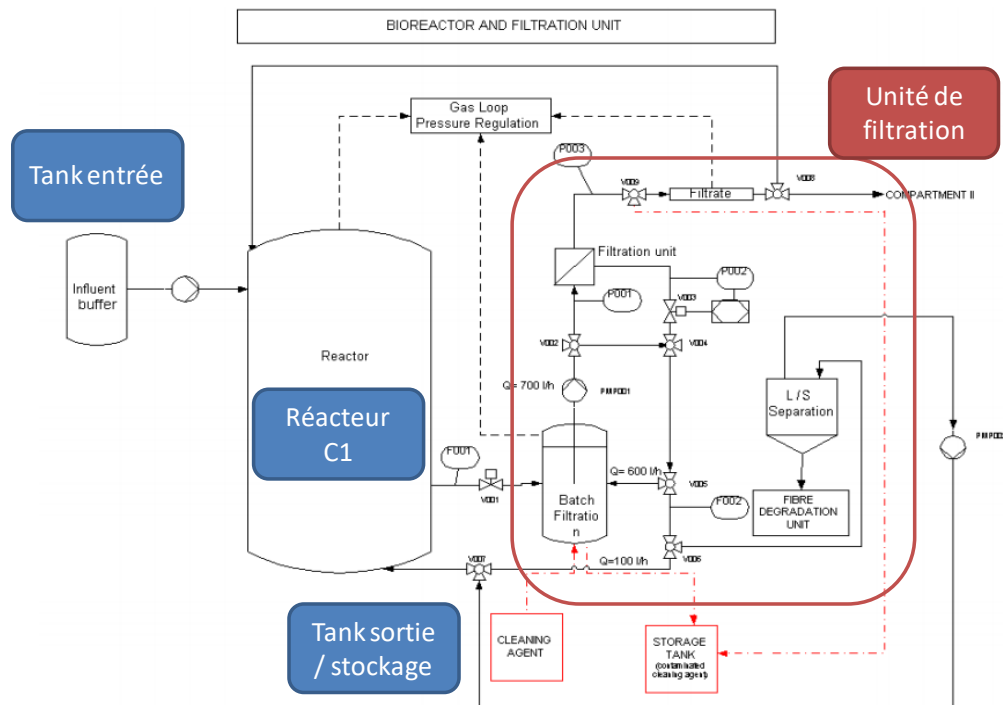


Figure I-17: Schéma du réacteur du compartiment 1, de ses deux unités et du module de filtration.

Ce compartiment fonctionne avec un temps de séjour $T_R=10$ j. Il assure en partie ou en totalité l'hydrolyse des différents composés composant son entrée : protéines : 40 %, lipides : 60 %, sucre : 80 %, fibres : 15 % et urée : 100 %. La quantité de fèces produite par un homme est estimée à 30 g matière organique/j dont la composition est répartie de la manière suivante : protéines : 10 %, lipides : 20 %, sucres : 10 %, fibres : 60 %. Le milieu artificiel du C1 a une composition similaire aux déchets produits par un homme en une journée, (Tableau I-10) :

Tableau I-10: Composition du milieu artificiel du compartiment 1 simulant les déchets produits par un homme.

Acétate	0.77 g/L	Iso-butyrate	0.1 g/L
Butyrate	0.15 g/L	Iso-valérate	0.15 g/L
Valérate	0.17 g/L	(NH ₄) ₂ SO ₄	1.82 g/L

Propionate	0.27 g/L	
------------	----------	--

Le compartiment 2 – C2

Le réacteur du C2 est photohétérotrophe et mésophile, il fonctionne à 30°C et est colonisé par *Rhodospirillum rubrum*. D'un volume utile de 13.2 L, il est connecté sur le réservoir de stockage des effluents en sortie du C1. Il fonctionne avec un $T_R=24$ h et doit assurer la dégradation des VFAs produits en C1 dont la concentration s'élève à 57 gVFA/j.

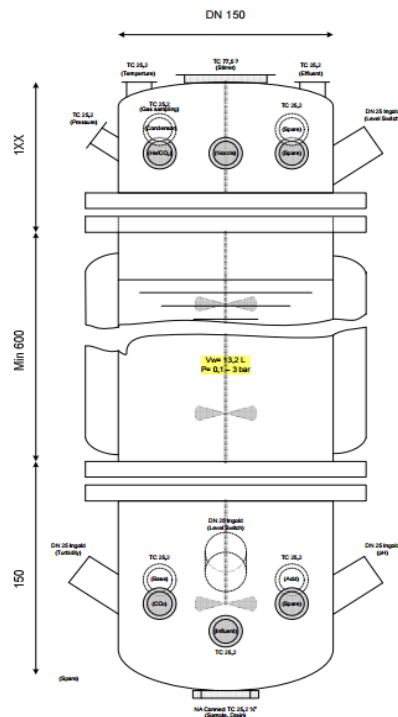


Figure I-18: Représentation schématique du compartiment 2 au MPP.

Le compartiment 3 – C3

Le C3 est représenté par un réacteur à lit fixe en forme de cylindre. Ce réacteur sera décrit en détail dans la partie I.3.5.

Le compartiment 4 – C4

Le compartiment C4a est un photobioréacteur de 77 L fonctionnant avec un temps de séjour $T_R=195$ h, Figure I-19.

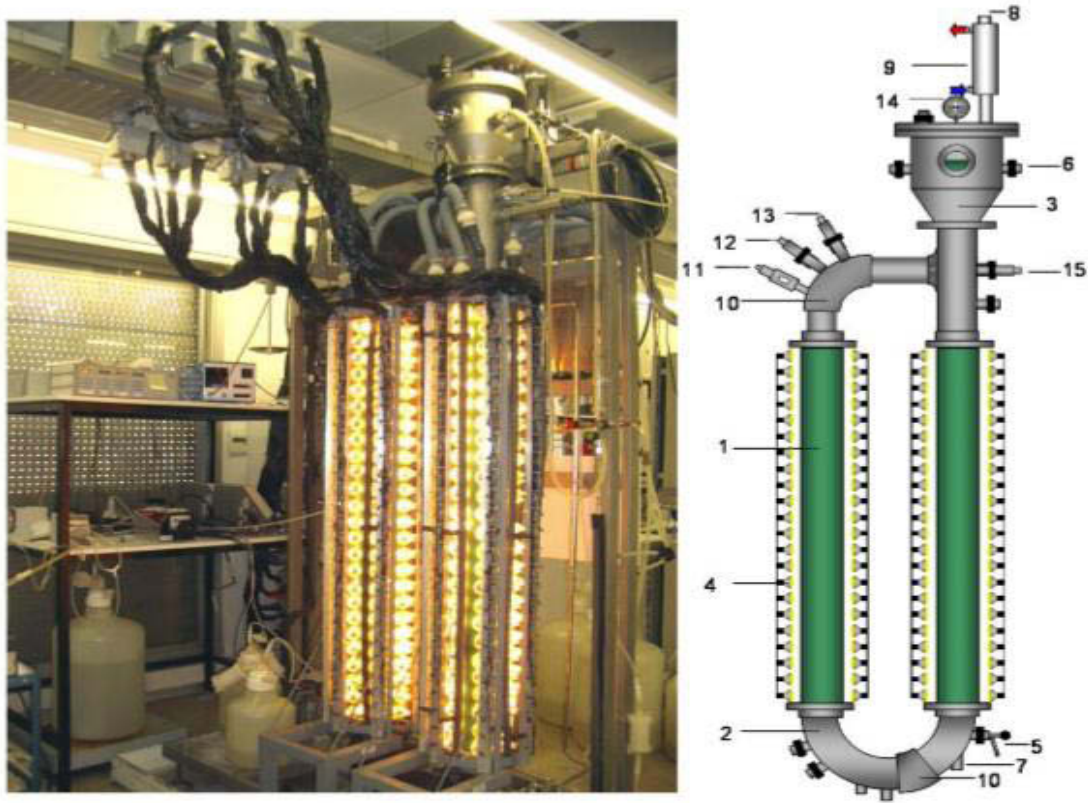


Figure I-19: Représentation schématique (droite) et photo (gauche) du réacteur du compartiment C4a.

Dans ce réacteur, *Arthrospira platensis* est cultivée pour assurer la production d'oxygène et l'élimination du nitrate dans la boucle dont la concentration en sortie de C3 s'élève à 4.20 gN/j. Riche en protéines et nutriments, cette cyanobactérie est un excellent complément alimentaire.

Le compartiment C4b est une chambre de culture hermétique. Elle dispose de deux unités de culture de 5 m² chacune, Figure I-20.

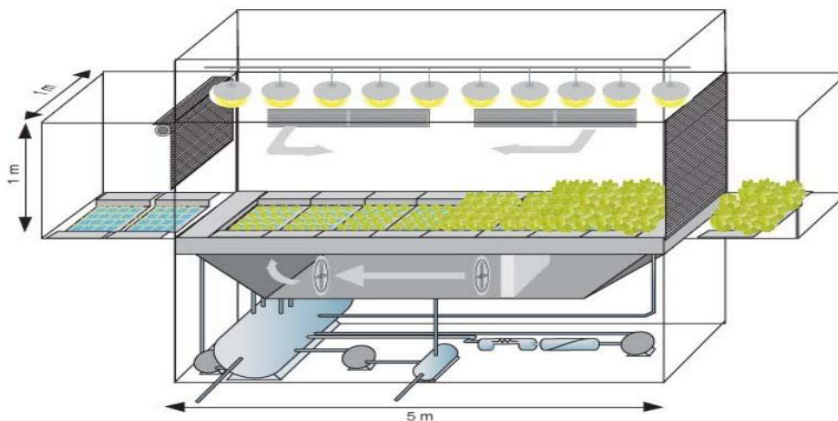


Figure I-20: Représentation du compartiment plantes supérieures du MELiSSA Pilot Plant.

Un système d'éclairage, un contrôle de l'atmosphère et de l'eau apportée permet d'optimiser au maximum la croissance des plantes sélectionnées. Le compartiment C4b est la principale unité apportant l'oxygène pour l'équipage. L'oxygène produit par le C4a sert également au C3, compartiment oxydatif qui nécessite de l'oxygène. Il a pour objectif de produire 140 g de plantes/j et doit participer à la production d'1 gO₂/j nécessaire à la survie d'un homme. Plusieurs végétaux ont été étudiés pour la culture dans MELiSSA : laitue, tomate, soja, haricots, épinards, etc.

Le compartiment 5 – C5

Le compartiment C5 représente l'équipage dans la station : le consommateur et producteur, soit le point initial de la boucle. Au MPP, l'équipage est remplacé par des rats dont le nombre est déterminé de manière à simuler la même consommation d'oxygène et production de CO₂ : 1 kg O₂/j et 1.05 kg CO₂/j. Dans ces conditions, la boucle pourra être en totalité simulée dès que les couplages de compartiments auront été réalisés. Le réacteur représentatif de « l'équipage » est une cage hermétique où tous les paramètres assurant la survie des animaux (température, eau, oxygène) sont contrôlés.



Figure I-21: Schéma du réacteur du compartiment C5 (gauche) et photo lors d'une manipulation (droite).

Plusieurs des réacteurs de la boucle MELiSSA au MPP ont fait l'objet d'un « redesign » au cours des années. C'est le cas des compartiments 3 et 4b par exemple, où de nouveaux réacteurs sont venus remplacer les anciennes versions. Après le test de chacun des réacteurs, il est nécessaire de tester les couplages entre chaque étape de la boucle. Ce test est prévu sur plusieurs années et a déjà commencé au MPP.

1.3.3.4 Le couplage des compartiments

Le couplage des différents réacteurs de la boucle MELiSSA est une étape complexe dans le déroulement du projet. Les premières étapes du couplage s'articulent autour du réacteur le

mieux connu de la boucle : le compartiment 4a. C'est le réacteur le plus maîtrisé en termes de connaissance, de modèle et de contrôle. Il supporte deux fonctions essentielles : la régénération de l'oxygène et la production de nourriture. Depuis deux ans, le couplage des réacteurs a commencé au MPP selon le plan représenté en Figure I-22.

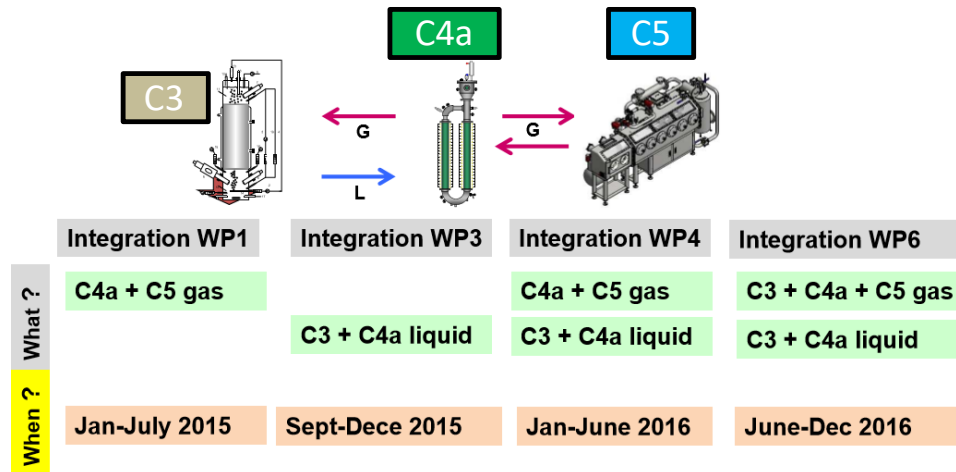


Figure I-22: Planning du couplage des compartiments 3, 4a et 5 au MELiSSA Pilot Plant.

Le premier couplage concerne la connexion liquide entre le C3 et le C4a. Il a été réalisé et a fourni des résultats positifs et concluants. Les couplages suivants n'ont pas encore été réalisés mais sont en cours de planification.

Le MELiSSA Pilot Plant est une plateforme de test de la boucle MELiSSA. Il dispose d'une représentation à l'échelle pilote de la boucle. Cette installation permet notamment de tester et de peaufiner les modèles de contrôle associés à chaque compartiment. Le couplage des compartiments est une étape complexe mais indispensable pour l'avancée du projet. Le compartiment nitrifiant de MELiSSA

Le compartiment nitrifiant de la boucle MELiSSA assure l'oxydation de l'ammonium en nitrate. Cette transformation est essentielle pour traiter les déchets azotés de l'équipage et assurer la régénération de l'oxygène au sein de la station spatiale. L'étude de procédé représente la problématique principale de ce travail de thèse.

I.3.4 Description, objectifs et contraintes du compartiment 3

Description du compartiment

Les bactéries nitrifiantes ayant des taux de croissance faibles, un réacteur avec une biomasse fixée a été choisi. Ce type de réacteur permet d'augmenter la quantité de biomasse dans un volume réduit. Il correspond ainsi aux contraintes imposées par un système de support-vie à application spatiale. Le réacteur choisi est une colonne à lit fixe où

l'alimentation liquide et gaz se fait par la partie inférieure du réacteur. Une régulation température et pH sont assurées afin de maintenir des conditions de cultures optimales. Le réacteur est en verre pour le modèle à l'échelle laboratoire et en inox pour la version pilote installée au MELiSSA Pilot Plant.

Objectifs du compartiment

Le C3 assure la nitrification au sein de la boucle. Son objectif principal est l'oxydation totale de l'ammonium en nitrate, afin d'éliminer l'ammonium et le nitrite dans l'effluent liquide. Il contribue à la fonction de recyclage de l'eau au sein du ECLSS et produit le nitrate qui est la source d'azote pour les compartiments C4a et C4b. Pour réaliser cet objectif, divers prérequis sont nécessaires :

- La colonisation rapide et intense du lit fixe par la biomasse.
- Une nitrification totale à la charge maximale en azote.
- L'établissement d'un modèle prédictif afin de contrôler le compartiment et d'anticiper les événements pouvant avoir lieu en amont et/ou en aval tout en maintenant les conditions de fonctionnement optimales.

Contraintes du compartiment

Les contraintes de ce compartiment sont physiques mais aussi biologiques et donc directement liées aux souches bactériennes utilisées. En effet, les bactéries nitrifiantes ont une vitesse de croissance faible. Ceci influe directement sur la durée de colonisation du lit fixe par la biomasse qui peut alors prendre plusieurs semaines ou mois. Le compartiment nitrifiant est l'un des seuls à utiliser de l'oxygène au sein de la boucle MELiSSA et entre donc en concurrence avec le compartiment C5 (équipage). L'apport d'oxygène doit être totalement contrôlé au sein du réacteur. En effet, sur le long terme, l'oxygène apporté sera produit par le compartiment 4 et il est nécessaire que celui-ci ne soit pas apporté en excès pour ne pas être « gaspillé ». Sur le plan physique, ce réacteur doit fonctionner plusieurs mois et nécessite donc une maintenance conséquente au niveau de l'installation. *Nitrosomonas* et *Nitrobacter* vont former des « floccs » et du biofilm sur toutes les surfaces, il est, par exemple, courant de voir des connecteurs bouchés à cause de leur accumulation.

La principale contrainte liée au fonctionnement du C3 est d'éviter la formation et l'accumulation de nitrite (NO_2^-) dans le réacteur. La conséquence directe serait une diffusion du nitrite jusqu'à l'eau produite pour la consommation de l'équipage. Le nitrite est toxique pour l'homme : il empêche la fixation de l'oxygène par l'hémoglobine notamment. Sa concentration ne doit pas dépasser 0.1 mg/L (Brémond and Vuichard, 1973).

Ces contraintes auront un impact lors de la mise en place et du fonctionnement du compartiment 3. Elles nécessiteront une vigilance tout au long de la culture dans le réacteur.

I.3.5 Le réacteur du compartiment 3

Le compartiment nitrifiant de la boucle MELiSSA est une colonne à lit fixe dont le support est constitué de billes en polystyrène BIOSTYR®. C'est un bioréacteur en inox permettant de protéger la biomasse de la lumière car les bactéries nitrifiantes sélectionnées sont sensibles à la lumière (cf partie I.4.2.2) Figure I-23.

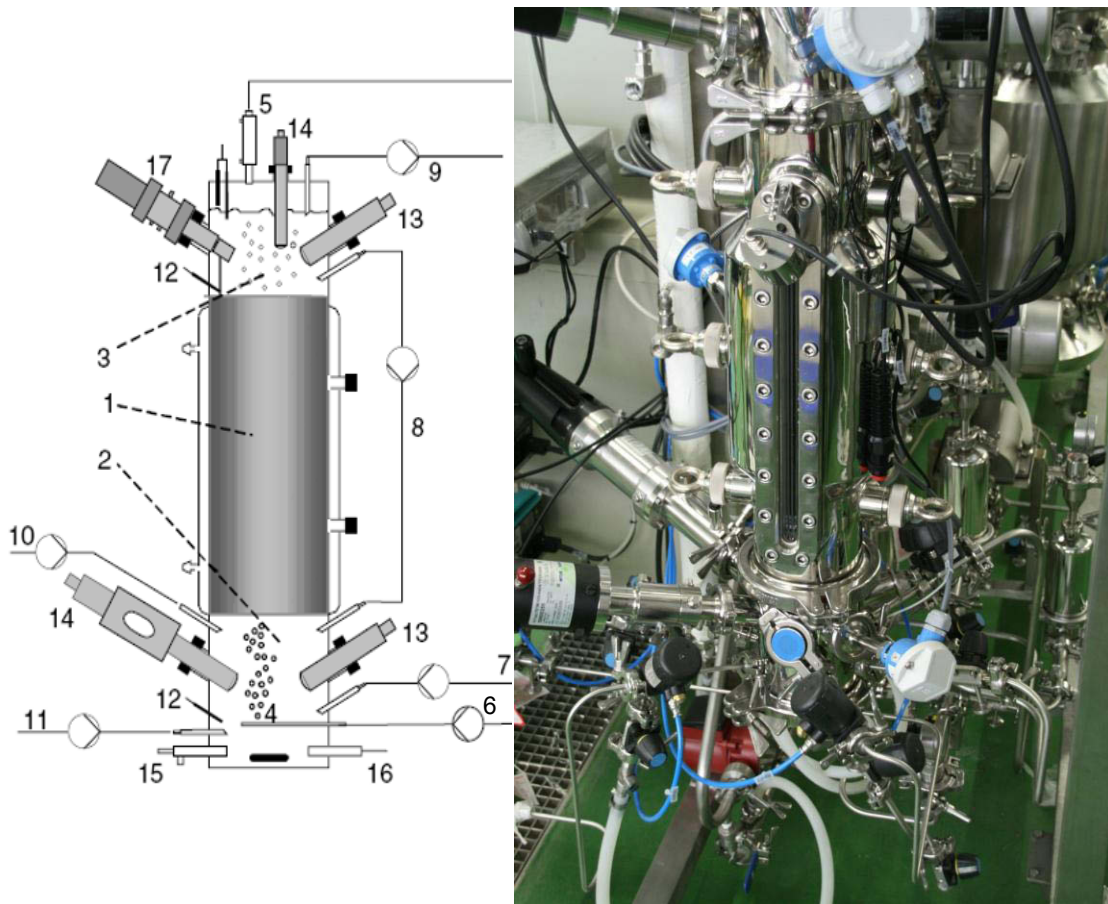


Figure I-23: Représentation schématique (gauche) et photo (droite) de la colonne à lit fixe représentative du compartiment C3 de la boucle MELiSSA. (1) Lit fixe ; (2) Section inférieure dédiée à l'aération, aux capteurs et à la circulation liquide ; (3) Section supérieure avec sonde et recirculation du gaz ; (4) Arrivée du gaz d'aération ; (5) Condenseur ; (6) Entrée du gaz (oxygène/azote) ; (7) Entrée liquide ; (8) Recirculation liquide ; (9) Sortie liquide/effluent ; (10) et (11) Contrôle pH ; (12) Sondes température ; (13) Sondes oxygène ; (14) Sondes pH ; (15) et (16) Contrôle température ; (17) Module de prélèvement.

Les caractéristiques physiques du réacteur pilote du C3 au MPP ont été répertoriées dans le Tableau I-11.

Tableau I-11: Caractéristiques physiques du réacteur pilote au MPP du compartiment C3 de la boucle MELiSSA.

Réacteur pilote (C3)		
Partie supérieure (L)	1.5	17 %
Partie centrale (L)	6.2	72 %
Partie inférieure (L)	0.9	11 %
Volume total (L)	8.6	
Diamètre (cm)	11.2	
Hauteur (cm)	80	
Ratio diamètre / Ø billes (lit)	25	
Ratio diamètre / hauteur (lit)	0.194	
Degré de vide du lit	0.37	

Le C3 est un réacteur vertical où l'alimentation liquide et gazeuse s'effectue par la partie inférieure du réacteur, Figure I-23. Le gaz utilisé dans le réacteur est de l'air et des ajouts d'oxygène sont réalisés pour maintenir sa concentration. Le débit d'air est contrôlé et est filtré avant d'entrer en bas de colonne. Il traverse le lit fixe sous forme de bulles et atteint le haut du réacteur. Une partie de l'effluent gazeux passe par le condenseur afin d'être acheminée vers l'analyseur de gaz et l'autre partie passe par le bidon d'évacuation où le gaz est de nouveau redirigé vers l'analyseur de gaz. Ce circuit de l'air au sein du lit permet d'assurer une homogénéisation des composés entre les billes. De la même manière, l'alimentation liquide s'effectue par la partie inférieure du réacteur. L'effluent traverse le lit fixe et est évacué via la partie supérieure du réacteur dans un bidon de sortie. Un piquage situé à environ 75% de la hauteur du lit fixe permet la recirculation du liquide du haut vers le bas du réacteur. Cette recirculation permet d'assurer la nitrification totale au sein du réacteur. La recirculation s'effectue à un débit 6 fois supérieur à celui de l'alimentation liquide.

La colonne dispose d'un système de suivi on-line de paramètres (température, pH, concentration en oxygène dissous) grâce à des sondes disposées dans les sections supérieure et inférieure du réacteur. L'installation est accompagnée de deux réservoirs de stockage correspondant à l'alimentation et à la sortie liquide, Figure I-24.

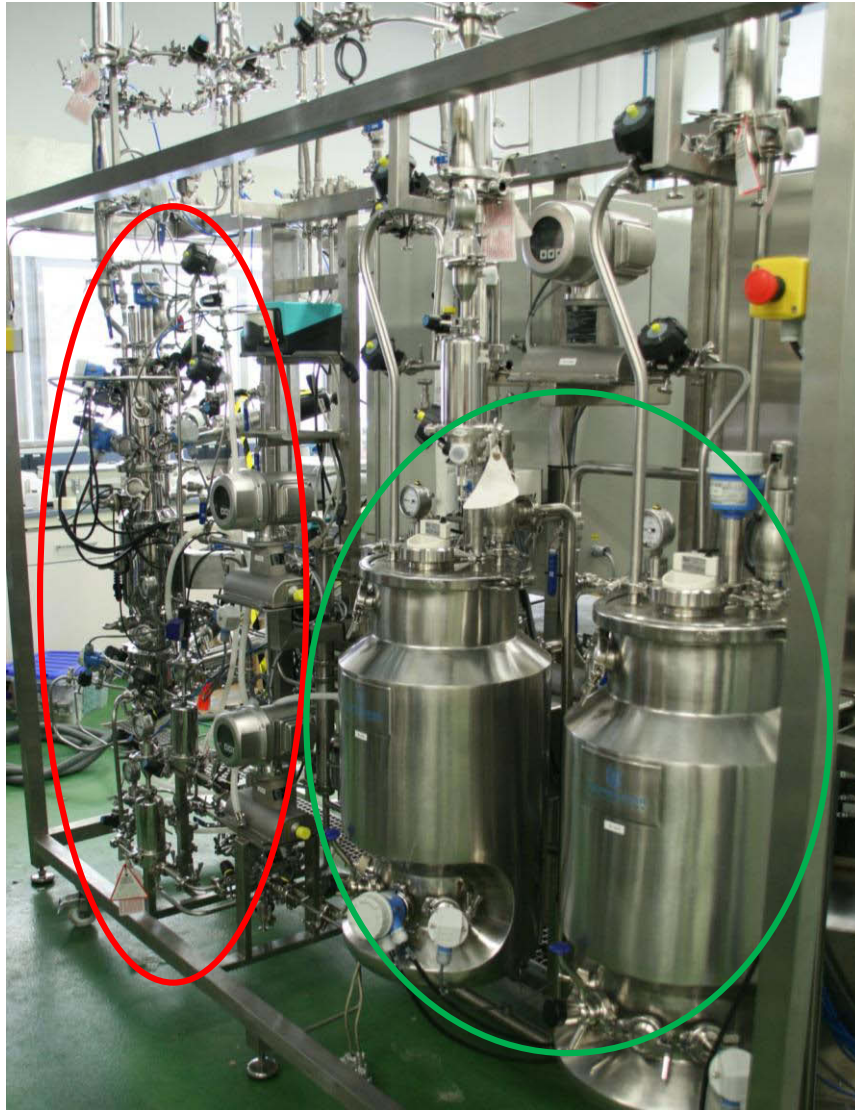


Figure I-24: Installation du compartiment C3 au MELiSSA Pilot Plant. En rouge le réacteur à lit fixe et en vert les tanks d'alimentation et sortie liquide.

Le compartiment fonctionne en mode continu en conditions nominales avec un temps de résidence $T_R=8$ h et doit gérer une charge d'azote de 0.7 gN/L.j. Des étapes de batch ou à de très grand temps de séjour sont mises en place durant la colonisation du réacteur par la biomasse. La biomasse adhère sur les billes et forme un biofilm (cf Partie I.4.4). Le choix d'une culture en lit fixe repose sur les faibles vitesses de croissance des microorganismes utilisés dans le C3. Si l'on voulait travailler en cultures en suspension avec les mêmes bactéries, un phénomène de lessivage éliminerait la biomasse du réacteur. Le volume du réacteur serait augmenté afin d'accumuler assez de biomasse pour gérer les charges en azote entrant au niveau du C3. La culture en lit fixe permet ainsi de réduire le volume du réacteur tout en augmentant la population bactérienne présente. La fixation sur des billes permet d'augmenter la surface d'échange avec les nutriments et l'oxygène.

Le C3 présentant un grand volume, le temps de colonisation du support est long. Une colonne à lit aux dimensions proportionnelles au réacteur installé au MPP a été développée et installée à l'Institut Pascal afin d'étudier l'hydrodynamique et de réaliser différentes expériences tests.

I.3.6 Les souches utilisées

Dans un projet de support de vie, l'utilisation de microorganismes doit être contrôlée. Les souches utilisées doivent être parfaitement caractérisées et étudiées. Dès les premières années du projet MELiSSA, les souches nitrifiantes *Nitrosomonas europaea* ATCC® 19718 et *Nitrobacter winogradskyi* ATCC® 25391 ont été sélectionnées. De nombreuses études ont permis leur caractérisation biologique et l'observation de leur capacité à former un biofilm sur un support adapté.

I.3.6.1 *Nitrosomonas europaea* ATCC® 19718

Le genre *Nitrosomonas* appartient aux AOB largement répandues dans les sols, les eaux douces ou les eaux saumâtres (Koops and Pommerening-Röser, 2005). *Nitrosomonas europaea* est une β -protéobactérie, en bâtonnet avec des flagelles polaires (Cébron A., 2004). De taille avoisinant 0.8-1.1 x 1-1.7 μm , cette bactérie gram négative ne possède pas d'uréase (Brenner et al., 2005).

I.3.6.2 *Nitrobacter winogradskyi* ATCC® 25391

Le genre *Nitrobacter* fait partie des NOB et est trouvé dans le sol et les eaux douces (Spieck and Bock, 2005). *Nitrobacter winogradskyi* est une α -protéobactérie en forme de bâtonnet et de dimension 0.5-0.8 x 1.0-2.0 μm (Cébron A., 2004; Winogradsky, 1892).

I.3.7 Modélisation du compartiment 3

La maîtrise du contrôle et la connaissance du compartiment sont des prérequis à toute utilisation d'un objet ou d'un système dans le domaine spatial. Pour développer les ECLSS, la validation de modèles de contrôle mécaniste et prédictif est une nécessité. Chaque compartiment doit être contrôlé et maîtrisé de manière individuelle mais aussi dans la prévision du couplage de chacun des compartiments. Le modèle NitriSim, basé sur une représentation de la colonne en N-tanks en série, a été développé pour le compartiment 3 de MELiSSA, (Pérez et al., 2005; Poughon et al., 2001). Ce modèle sera détaillé dans le Chapitre II de ce manuscrit. Le modèle biologique de la nitrification associé au modèle hydrodynamique de N-tanks en série est basé sur celui de Hunik et al., (1994). Il n'a jamais été calibré ni réellement validé pour les souches et le procédé utilisés pour le C3 de

MELISSA. Une partie importante du travail réalisé dans le cadre de cette thèse sera de valider, au besoin adapter, puis calibrer le modèle biologique de la nitrification par NitriSim.

I.4 Culture des bactéries nitrifiantes *N. europaea* et *N. winogradskyi*

Les bactéries nitrifiantes ont un métabolisme lent sur lequel de nombreux facteurs peuvent impacter. Plusieurs équipes ont travaillé sur la caractérisation de leur croissance et la détermination des seuils de toxicité de certains composés.

I.4.1 Cinétiques de croissance de *N. europaea* et *N. winogradskyi*

Comme la plupart des AOB, *Nitrosomonas* présente une croissance lente avec un taux de croissance maximal variant de 0.02 à 0.09 h⁻¹, Tableau I-12.

Tableau I-12: Paramètres cinétiques de Nitrosomonas et Nitrobacter trouvés dans la littérature.

	Espèce	μ_{\max} (h ⁻¹) , m (gNH ₃ or HNO ₂ .gBiomasse ⁻¹ .h ⁻¹ ; b (h ⁻¹)	Référence
Nitrosomonas	<i>N. europaea</i> (Cultures de laboratoire)	$\mu_{\max}=0.088$	(Skinner and Walker, 1961)
	<i>N. europaea</i>	$\mu_{\max}=0.02-0.03$	(Drozd, 1980)
	<i>N. europaea</i> ATCC	$\mu_{\max}=0.052-0.066$	(Belser and Schmidt, 1980)
	<i>N. europaea</i> (Prélèvement estuaire)	$\mu_{\max}=0.036$	(Helder and De Vries, 1983)
	<i>N. europaea</i> (Isolat de sol)	$\mu_{\max}=0.017^*$; m=0.42 ; b=0.010-0.026	(Keen and Prosser, 1987)
	<i>N. europaea</i> (NCIMB / Prélèvement de la Seine)	$\mu_{\max}=0.05$; m=0.032–0.322 ; b=0.001	(Brion and Billen, 1998)
	<i>N. europaea</i> ATCC 19718	$\mu_{\max}=0.057$; m=0.146	(Hunik et al., 1994)
	<i>Nitrosomonas</i> sp.	$\mu_{\max}=0.043$; m _c =0.116 ** ; m _v =0.008** ; b=0.011	(Vadivelu et al., 2006a)
Nitrobacter	<i>Nitrobacter</i> sp. (ND)	$\mu_{\max}=0.058$	(Gould and Lees, 1960)
	<i>Nitrobacter</i> sp. (Isolat de sol)	$\mu_{\max}=0.039^*$	(Gay and Corman, 1984)
	<i>Nitrobacter</i> sp. (Isolate de sol)	$\mu_{\max}=0.025^*$	(Gay and Corman, 1984)
	<i>Nitrobacter</i> sp. (Isolate de sol)	$\mu_{\max}=0.043^*$; m=0.70	(Keen and Prosser, 1987)
	<i>N. winogradskyi</i> (NCIMB / prélèvement de la Seine)	$\mu_{\max}=0.051$; m=0.374–0.534 ; b=0.001	(Brion and Billen, 1998)
	<i>N. agilis</i> ATCC 14123	$\mu_{\max}=0.036$; m=0.1034	(Hunik et al., 1994)

	<i>Nitrobacter sp.</i>	$\mu_{\max}=0.02$; $m_c=0.083$ ** ; $m_v=0.576$ ** ; $b=0.003$	(Vadivelu et al., 2006b)
--	------------------------	--------------------------------------------------------------------	--------------------------

NCIMB is National Collections of Industrial, Marine and Food Bacteria, ND: no data,

*indicates studies where Monod growth model was used.

** calculated assuming 1.7 gCOD/gbiomass , for a biomass formula $C_5H_7O_2N$

La gamme de taux de croissance maximum trouvée dans la littérature pour *Nitrobacter* est large et cette variabilité peut être expliquée par l'origine variable des souches dans chacune des études : 0.02 à 0.06 h⁻¹, Tableau I-12.

1.4.2 Facteurs influençant la croissance

Les bactéries nitrifiantes sont difficiles à cultiver notamment du fait de leur croissance lente (Tableau I-12). De plus, différents facteurs affectent également leur croissance.

1.4.2.1 *La concentration en oxygène dissous*

La nitrification assurée par *N. europaea* et *N. winogradskyi* nécessite de l'oxygène. Ce substrat est essentiel dans la culture de ces deux bactéries et une concentration minimale en oxygène dissous est nécessaire pour obtenir une conversion de l'ammonium. En effet, en dessous de 1 mg O₂/L, une accumulation de nitrite est observée. Au-dessus de 2.5 mgO₂/L, l'ammonium est totalement oxydé et la seule limitation est sa concentration en entrée de réacteur (Garrido et al., 1997). Lors d'une coculture, dans le but de parvenir à une nitrification totale, il est indispensable de maintenir une concentration en oxygène suffisante pour subvenir aux besoins de chacune des deux bactéries. Pour obtenir une nitrification complète, 4.6 mg O₂ sont requis par mg N-NH₄⁺ oxydé (Lytle et al., 2013).

Lorsque la concentration en oxygène devient limitante, les AOB prennent le dessus sur les NOB ; une nitrification partielle avec accumulation de nitrite est alors observable (Blackburne et al., 2008). En effet (Tokutomi, 2004) a montré que pour une concentration en oxygène dissous inférieure à 1 mg/L, la croissance des AOB était 2.6 fois plus rapide que celle des NOB.

1.4.2.2 *La lumière*

La photosensibilité des bactéries nitrifiantes a été mise en évidence dès les premières études menées sur ces populations.

Nitrosomonas europaea est affectée par les longueurs proches de la limite UV-visible. En effet, exposées à des longueurs d'onde inférieures à 400 nm, les enzymes AMO et HAO sont détruites (Hooper and Terry, 1974). Au-delà de 400 nm, l'HAO n'est plus inhibée et serait même stimulée. L'AMO a sa totale capacité d'oxydation lorsque les longueurs d'onde

sont au dessus de 430 nm. Des études postérieures ont montré que l'inhibition de ces enzymes serait liée à une photooxydation des cytochromes c (Bock et al., 1986). 90% des cellules de *Nitrosomonas europaea* inactivées par la lumière, retrouvent un métabolisme fonctionnel 10 heures après la fin de l'exposition (Hooper and Terry, 1974).

Nitrobacter présente une photosensibilité dans la même gamme de longueur d'onde que *Nitrosomonas europaea*. En revanche, l'inhibition n'aurait lieu que lors d'expositions d'au minimum 4 h, et lorsque la concentration cellulaire est supérieure à 10^6 cellules/mL (Guerrero and Jones, 1997). Comme chez *Nitrosomonas*, l'inhibition serait liée à une photooxydation des cytochromes c (Olson, 1981).

Pour récapituler et éliminer ces phénomènes de photo-inhibition,, il est nécessaire de placer les cultures de *Nitrosomonas europaea* et *Nitrobacter winogradskyi* dans le noir..

1.4.2.3 Concentration en substrats et produits

Les bactéries nitrifiantes présentent une croissance plus rapide que les bactéries nitrifiantes. Dans l'environnement ou lors de cocultures en laboratoire, cela peut se traduire par une accumulation de nitrite. Les bactéries nitrifiantes peuvent subir une inhibition à la fois par leur substrat (ammonium et nitrite) et leur produit (nitrite et nitrate). Cela rajoute une contrainte au pilotage des cultures car il faut à la fois faire attention à la concentration de substrat mais aussi à la concentration des produits atteinte à l'issue de cultures en batch par exemple.

Les AOB sont sensibles à la concentration en ammonium dans le milieu de culture. Lorsque cette concentration est trop faible, inférieure à $1 \mu\text{g N-NH}_4^+/\text{L}$, le taux de croissance maximum de *Nitrosomonas europaea* est divisé par 5 (Prosser, 1989). Dans cette condition, 86% du substrat sert à la maintenance de la bactérie. Des études complémentaires ont montré que la gamme de concentrations optimales à la culture de *Nitrosomonas europaea* est comprise entre 28 et 420 mg N-NH₄⁺/L (Watson et al., 1989). Lors d'une culture de *Nitrosomonas*, la concentration en ammonium n'est pas le seul inhibiteur possible : la concentration en ammoniac libre (Free ammonia ; FA) peut jouer un rôle inhibiteur sur le métabolisme de *Nitrosomonas europaea*. Tant que la concentration reste inférieure à 16 mg N-NH₃/L, aucune inhibition n'est constatée sur la croissance de *Nitrosomonas* (Vadivelu et al., 2006). L'équilibre entre ammonium et ammoniac est régi par le pH et la température du milieu de culture ou de l'environnement. Le pKa de l'équilibre NH₄⁺/NH₃ est 9.2. En conséquence, à un pH inférieur la forme ammonium prédomine (Anthonisen et al., 1976). Afin de limiter la concentration en ammoniac libre, il faut alors se placer à un pH inférieur mais compatible avec la gamme optimale pour la croissance de *Nitrosomonas europaea*. La concentration en nitrite est un inhibiteur non négligeable de la croissance de *Nitrosomonas europaea*. Au dessus de 276 mg N-NO₂⁻/L, la quantité d'ammonium oxydée est divisée par

deux, traduisant l'effet inhibitoire du nitrite sur le métabolisme de *N. europaea* (Stein and Arp, 1998). Il existe un équilibre de prépondérance entre le nitrite et sa forme acide l'acide nitreux (Free nitrous acid ; FNA) dont le pKa est de 3.3 (C. P. Leslie Grady Jr et al., 2011). Ainsi plus le pH est acide dans l'environnement de *Nitrosomonas europaea* et plus la communauté sera exposée à une concentration de FNA importante. Néanmoins, à partir de 0.40 mg N-HNO₂/L, l'anabolisme de *Nitrosomonas* est totalement inhibé (V. M. Vadivelu et al., 2006). L'oxydation de l'ammonium entraînant une acidification du milieu, il est important d'avoir une régulation pH lors de cultures de *Nitrosomonas*.

Les NOB sont sensibles aux différents composés azotés auxquels ils sont exposés. Ils sont par exemple plus sensibles au FA que les AOB. En effet, une concentration supérieure à 6 mg N-NH₃/L inhibe totalement la croissance de *Nitrobacter winogradskyi* (Vadivelu et al., 2007). En revanche l'ammonium a un effet antagoniste sur *Nitrobacter winogradskyi*. Lorsque les concentrations sont fortes, une inhibition de l'activité est observée mais jusqu'à 10 mg N-NH₄⁺/L, une augmentation du taux de nitrification est observée (Ma et al., 2014). L'inhibition par l'ammonium est probablement liée à une concentration en FA dépassant le seuil de toxicité. Pour une concentration de 10 mg N-NH₄⁺/L, une concentration en FA de 2.47 mg N-NH₃/L est constatée qui est une valeur inférieure au seuil de toxicité. Ainsi, une faible concentration en ammonium est nécessaire pour optimiser le taux de nitrification. Le substrat de *Nitrobacter*, le nitrite, influe fortement sur sa croissance. Lorsque la concentration en nitrite est inférieure à 1 µg/L, le taux de croissance maximum est divisé par quatre et 81% du substrat ne sert qu'à la maintenance (Prosser, 1989). La gamme optimale de concentration en nitrite s'étend de 28 à 420 mg N-NO₂⁻/L pour *Nitrobacter* (Watson et al., 1989). Les effets du FNA sur le métabolisme des NOB ont été étudiés : le genre *Nitrospira* est par exemple plus sensible à l'acide nitreux que le genre *Nitrobacter* (Blackburne et al., 2007). Une diminution de moitié de l'activité de *Nitrobacter* a été mise en évidence pour une concentration en FNA supérieure à 0.03 mg N-HNO₂/L (Blackburne et al., 2007). Le produit de la nitrification, le nitrate, peut causer une rétroinhibition sur cette réaction. Une inhibition du métabolisme de *Nitrobacter* est constatée lorsque la concentration en nitrate dépasse 4 g N-NO₃⁻/L.

En résumé, pour obtenir des cocultures de *Nitrosomonas europaea* et *Nitrobacter winogradskyi* dont le taux de nitrification est élevé, il faut tenir compte des différents seuils de toxicité des substrats et produits. Il est notamment essentiel d'éviter l'accumulation de nitrite afin de limiter les effets de celui-ci et du FNA sur les deux souches.

1.4.2.4 Le pH

Le pH est un paramètre dont le contrôle est essentiel pour les cultures de bactéries nitrifiantes. Grunditz et Dalhammar (2001) ont montré que pour *Nitrosomonas* et *Nitrobacter*, le pH optimal se situe entre 7.5 et 8.5, Figure I-25.

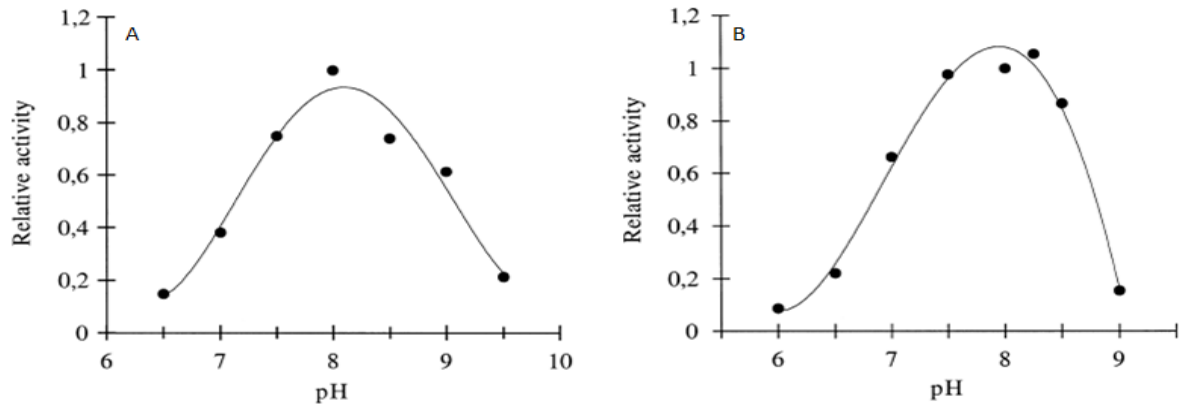


Figure I-25: Evolution de l'activité de *Nitrosomonas* (A) et *Nitrobacter* (B) en fonction du pH du milieu de culture (Grunditz C. and Dalhammar G., 2001).

A $pH=8\pm 0.5$, l'activité de *Nitrosomonas* et *Nitrobacter* est à 80 % de l'activité maximale. Au dessus de 8.5, l'activité de *Nitrobacter* chute plus fortement que celle de *Nitrosomonas*. Dans le cadre d'une coculture de ces deux bactéries, une augmentation du pH au dessus de 8.5 pourrait engendrer l'accumulation de nitrite : pour un rapport de population donné entre les deux souches, *Nitrosomonas* a un métabolisme plus actif que *Nitrobacter* qui n'arrive pas à oxyder tout le nitrite produit.

De plus, comme ceci est décrit dans la partie 1.4.2.3, le pH a une influence directe sur les concentrations d'ammoniac et d'acide nitreux libres auxquelles sont exposées les bactéries. A $pH=8$ qui semble être le pH idéal pour une coculture entre *Nitrosomonas* et *Nitrobacter*, l'équilibre entre l'ammonium et l'ammoniac libre est tel qu'à 30 °C, il y a 7.5 % de $N-NH_3$ (Boyd, 2015). Le pH a une influence directe sur la proportion d'ammonium, de nitrite et nitrate en solution :

$$[NH_4^+] = \frac{[NH_3] \times 10^{-pH}}{K_a} \text{ avec } K_a=6.3 \cdot 10^{-10} \text{ et } pK_a=9.2 \quad (1.5)$$

$$[NO_2^-] = \frac{K_a \times [HNO_2]}{10^{-pH}} \text{ avec } K_a=4 \cdot 10^{-4} \text{ et } pK_a=3.3 \quad (1.6)$$

$$[NO_3^-] = \frac{K_a \times [HNO_3]}{10^{-pH}} \text{ (} K_a > 1 \text{ et } pK_a < 1 \text{ car } HNO_3 \text{ est un acide fort)} \quad (1.7)$$

Ce critère doit alors être pris en compte lors du calcul des concentrations initiales en ammonium dans le milieu de culture afin de limiter l'exposition des bactéries à de trop fortes concentrations en FA.

Il est alors essentiel d'avoir une régulation du pH afin de maintenir une valeur de la gamme permettant une croissance optimale de ces bactéries.

1.4.2.5 La température

Dans l'environnement, la nitrification se déroule dans des conditions variables. La température est un paramètre essentiel influant sur l'activité nitrifiante. En effet, la température a un impact direct sur la concentration en oxygène dissous du milieu mais aussi sur la proportion de NH_3 ou NO_2^- accessible pour les bactéries nitrifiantes (Laudelout et al., 1976). La Figure I-26 décrit l'influence de la température sur l'activité de *Nitrosomonas* et *Nitrobacter*.

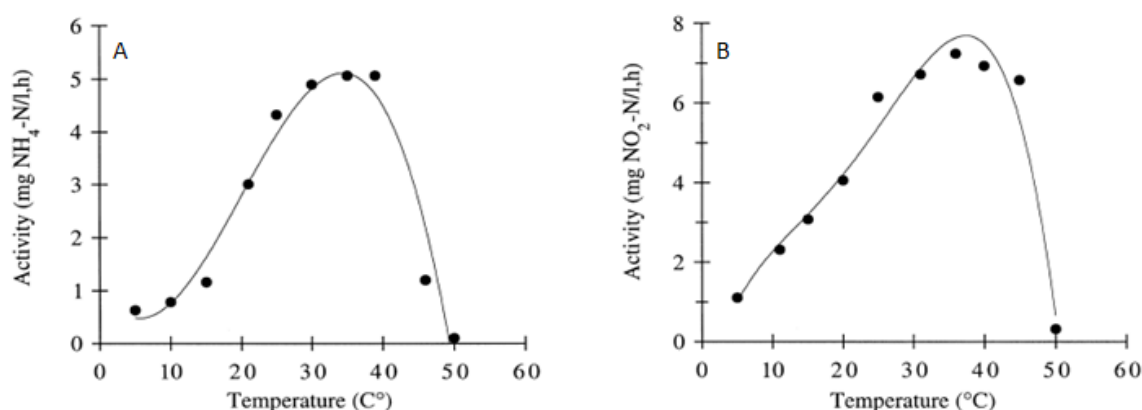


Figure I-26: Evolution de l'activité de *Nitrosomonas* (A) et *Nitrobacter* (B) en fonction de la température (Grunditz C. and Dalhammar G., 2001).

Nitrosomonas présente une activité faible pour des températures inférieures à 20 °C et supérieures à 45 °C. La croissance et l'activité sont les meilleures lorsque la température se situe entre 25 et 40 °C. Même s'il est actif à des températures comprises entre 12 et 25 °C, le genre *Nitrobacter* a une gamme de température de fonctionnement maximal similaire à celle de *Nitrosomonas*.

Une coculture de ces deux genres sera la plus efficace pour des températures mésophiles allant de 25 à 40 °C, avec un optimum entre 30 et 35 °C.

1.4.2.6 La salinité

Un milieu avec une forte salinité peut entraîner une inhibition de certaines enzymes ou un phénomène de plasmolyse : la bactérie évacue l'eau qu'elle contient dans l'environnement (Uygur, 2006). Lorsque la salinité du milieu passe de 0 à 6 %, l'activité nitrifiante est divisée par 3 et celle-ci diminue à 15 % lorsque la salinité du milieu atteint 9 % (Sudarno et al., 2011; Uygur, 2006). *Nitrosomonas europaea* voit son activité divisée par 2 lorsque la concentration en sels dépasse 250 mM NaNO_3 , et par 10 lorsque celle-ci dépasse 400 mM NaNO_3 (Hunik

et al., 1992). Chez *Nitrobacter*, l'inhibition de l'activité est encore plus marquée : à partir de 250 mM NaNO₃, celle-ci est divisée par 5 (Hunik et al., 1993). Cependant les bactéries sont aussi capables d'adaptation à leur environnement et notamment à la salinité. En effet, des taux de nitrification supérieurs à 40 % peuvent être obtenus en traitement d'eaux usées salines dont la concentration en sels est de 3.5 % (Rene et al., 2008).

Dans les milieux utilisés couramment, les bactéries nitrifiantes sont peu exposées à des salinités assez fortes qui pourraient causer une inhibition.

1.4.2.7 Ions métalliques dissous

Différentes études ont mis en évidence l'inhibition par la présence d'ions métalliques dissous sur la nitrification notamment dans le cas des traitements d'eaux usées (Hu et al., 2004; Madoni et al., 1999). Certains cations peuvent inhiber la nitrification comme le cadmium qui diminue l'activité de l'enzyme *amoA* chez *Nitrosomonas europaea* (Chandran and Love, 2008). En revanche, cette même enzyme sera surexprimée lors d'une exposition au zinc (Radniecki et al., 2009). La présence de magnésium réduirait l'effet inhibiteur du zinc car ces deux composants semblent être en compétition pour leur entrée dans la cellule via les canaux servant à l'incorporation du magnésium par la cellule (Radniecki et al., 2009). Radniecki *et al.* ont aussi montré que la présence de certains composants, comme le magnésium ou le cuivre, permet de limiter l'action inhibitrice du zinc par exemple.

Chez *Nitrobacter*, le cuivre inhiberait la croissance à partir de 17 mM alors que le nickel et l'uranium commenceraient à inhiber le métabolisme à une concentration de 0.17 mM (Tsai and Tuovinen, 1985). Cependant, le cuivre est un co-facteur d'enzyme et est nécessaire pour la croissance des bactéries nitrifiantes. Ainsi, pour une coculture de *Nitrosomonas europaea* et *Nitrobacter winogradskyi*, des traces de cuivre et zinc peuvent être tolérées dans le milieu de culture.

1.4.2.8 Paramètres de culture à privilégier

Les paramètres de cultures de *Nitrosomonas europaea* et *Nitrobacter winogradskyi* sont résumés dans la Figure I-27 :

Chapitre I

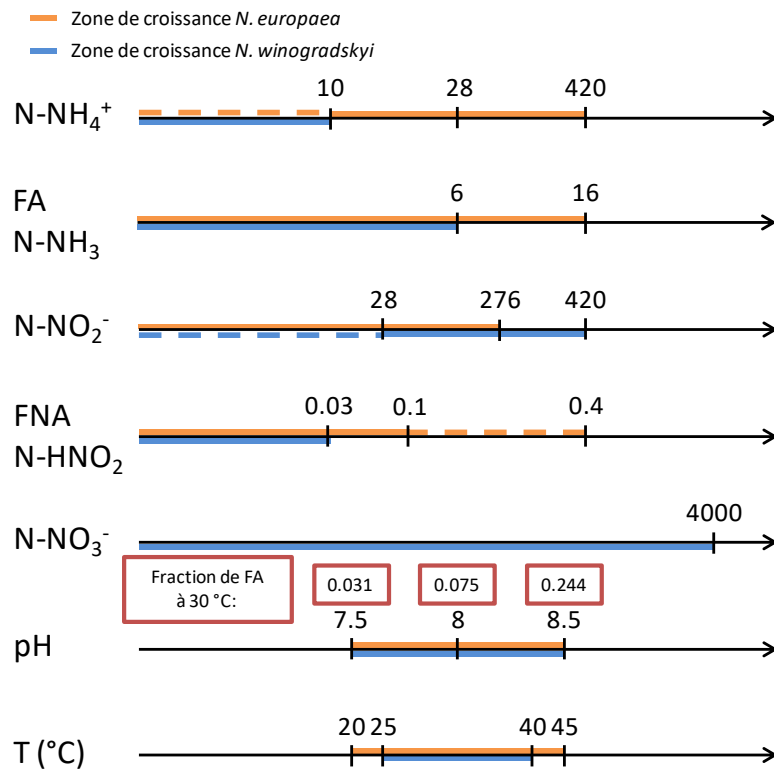


Figure I-27: Représentation de la croissance de *Nitrosomonas* et *Nitrobacter* en conditions optimales. Les concentrations des composés azotés sont données en mg N/L, les traits oranges représentent les zones de croissance de *Nitrosomonas europaea* et les traits bleus celles de *Nitrobacter winogradskyi*.

Une coculture efficace entre ces deux bactéries résulte de la combinaison de leurs zones de croissance optimale. Il est important de vérifier que chaque étape de culture respecte ces zones sans quoi une inhibition apparaît ; l'efficacité de nitrification en est donc affectée.

I.4.3 Cocultures des deux souches

Les microorganismes sont souvent cultivés en conditions axéniques. Ce type de culture permet d'étudier les caractéristiques d'un microorganisme sélectionné. Cependant, lorsque plusieurs microorganismes sont cultivés ensemble sous forme de consortium, certains procédés peuvent alors être effectués avec une plus grande efficacité. C'est par exemple le cas dans le traitement des eaux en station d'épuration. Afin de combiner les métabolismes de chaque famille de bactéries, on les cultive ensemble. Cela permet une plus grande vitesse de réaction car les substrats sont disponibles dès lors qu'ils sont produits par d'autres bactéries. Au delà de l'aspect réactionnel, la vie en consortium permet parfois aux bactéries de développer une résistance à certaines substances habituellement nocives. Le « quorum sensing » est le moyen de communication des bactéries qui leur permet par exemple d'échanger des gènes (Withers et al., 2001).

Les cultures mixtes de *Nitrosomonas europaea* et *Nitrobacter winogradskyi* présentent donc des différences avec des cultures pures de chacune des bactéries.

1.4.3.1 Interactions et adaptation en coculture libre

La coculture de *Nitrosomonas* et *Nitrobacter* présente plusieurs avantages dans un processus de nitrification. Le nitrite produit par *Nitrosomonas* ne s'accumule pas dans le milieu environnemental ; il est directement consommé par *Nitrobacter*. Le risque d'exposition à des concentrations inhibitrices de nitrite ou d'acide nitreux est donc rare. *Nitrobacter* n'est pas inhibé par la concentration en ammoniac libre ou ammonium car celui-ci est rapidement oxydé par *Nitrosomonas*. Il a alors longtemps été supposé que les deux bactéries « collaboraient » : l'une n'exerçant aucune répression sur l'autre (Costa et al., 2006). Pérez et al., (2015) ont récemment étudié l'expression des gènes de *Nitrosomonas europaea* et *Nitrobacter winogradskyi* en cultures pures et en cocultures (Figure I-28).

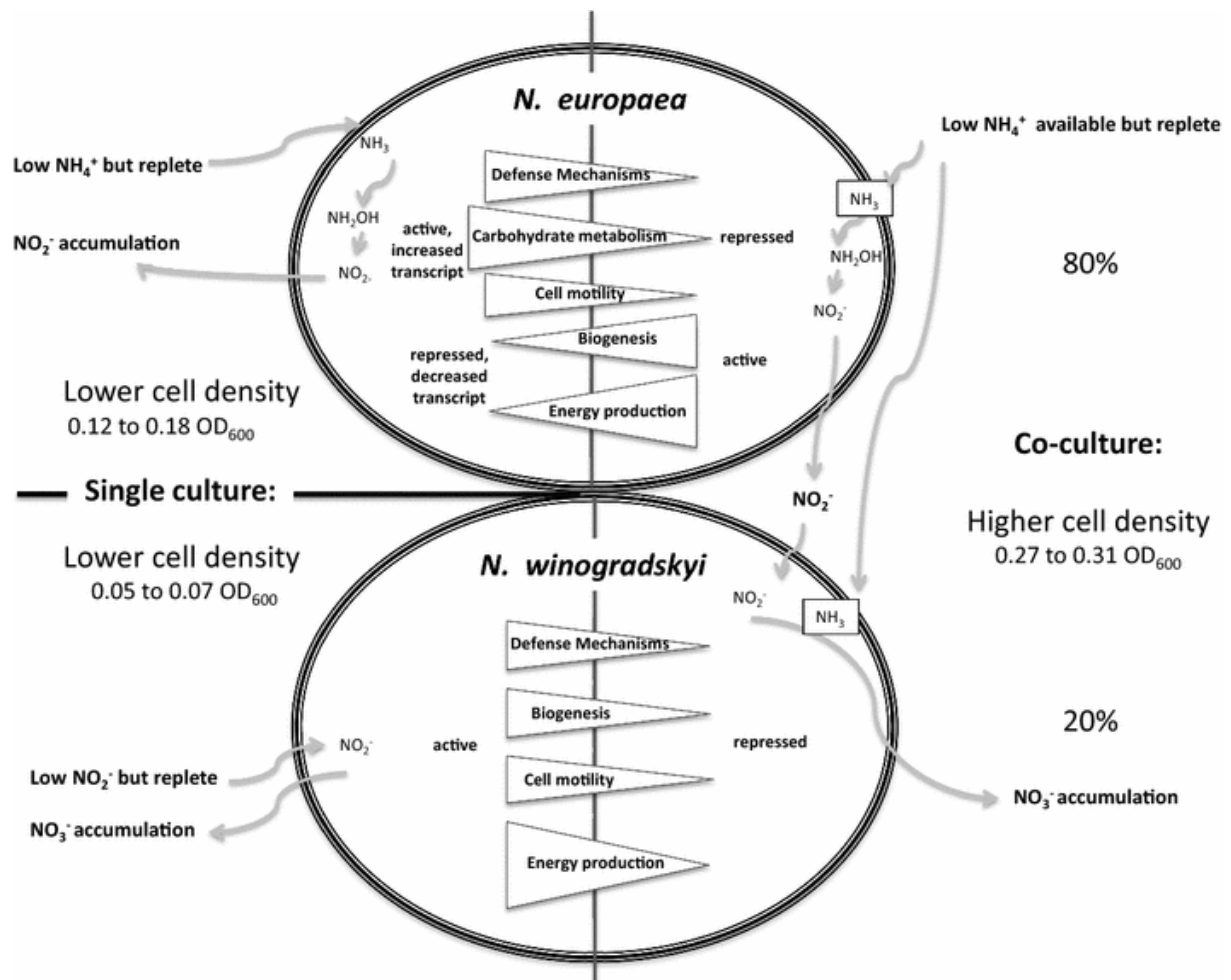


Figure I-28: Modèle de l'expression des gènes chez *Nitrosomonas europaea* et *Nitrobacter winogradskyi* cultivées séparément et en coculture (d'après Pérez et al., 2015).

Lors de la coculture des deux bactéries, les études transcriptomiques montrent que 30 et 12 % des gènes exprimés respectivement chez *N. europaea* et *N. winogradskyi*, le sont en quantité différente par rapport aux cultures pures de chacune des bactéries. En coculture, les gènes impliqués dans les réponses au stress et les mécanismes de défense (réparation de l'ADN, synthèse de flagelle, etc.) sont sous-exprimés. Ceci est normal car, exposées à de faibles concentrations en inhibiteurs, les bactéries sont moins « stressées ». Cette étude a aussi permis de montrer que les deux bactéries ne sont pas présentes en quantités égales dans la coculture mais que le ratio *Nitrosomonas* / *Nitrobacter* est 4:1.

N. europaea et *N. winogradskyi* s'adaptent à la vie en coculture en suspension. Lors de la culture en biofilm, il est possible de s'interroger sur la persistance de ce phénomène avec une répartition hétérogène de la biomasse tout au long d'un lit fixe représentant le compartiment nitrifiant de MELiSSA par exemple.

1.4.3.2 Interactions et répartition au sein des cocultures en biofilm

Une étude sur la répartition spatiale de *N. europaea* et *N. winogradskyi* dans une colonne à lit fixe a déjà été menée dans le cadre du projet MELiSSA. Montras et al., (2008) ont étudié la répartition des deux bactéries dans un lit fixe maintenu en activité pendant une durée de cinq ans. A l'entrée du lit fixe, où l'azote et le carbone sont en concentrations importantes, le ratio *Nitrosomonas* / *Nitrobacter* est 9:1. Au milieu du lit, le ratio évolue vers 7:3 car la population de *Nitrobacter* augmente, mais en haut du lit fixe on trouve un ratio 1:1 traduisant l'équilibre entre les deux souches. Il y a ainsi une répartition spatiale de la biomasse se basant sur la répartition du substrat. En effet, en entrée de colonne le seul composant azoté étant l'ammonium, *Nitrosomonas* s'y trouve en majorité. Le nitrite produit est alors mélangé au sein du lit et est transporté vers le milieu et le haut de la colonne. C'est dans ces zones-là que les concentrations en *Nitrobacter* sont les plus fortes.

De la même façon, la concentration en biomasse évolue en fonction de la hauteur du lit : alors qu'en bas du lit on trouve des concentrations fortes en biomasse, en haut du lit les concentrations sont faibles (Montras et al., 2008; Pérez et al., 2005). Une étude transcriptomique d'un lit fixe serait certainement intéressante pour vérifier les niveaux d'expression des gènes de *N. europaea* et *N. winogradskyi* afin de la corrélérer avec celle réalisée lors de coculture en suspension. Cette étude n'a pas encore été réalisée.

1.4.4 Cultures en biofilm

Un biofilm est une communauté de microorganismes adhérant sur une surface. La formation d'un biofilm peut être induite par différents phénomènes (Jefferson, 2004):

Etude Bibliographique

- La réponse à un stress et la protection lors de l'exposition à des conditions environnementales extrêmes.
- La colonisation d'une zone riche en substrat.
- la coopération bénéfique entre différents microorganismes.
- la formation de biofilm comme mode de croissance de base (l'état « en suspension » n'étant qu'un état passager ou contraint par le milieu environnemental).

Le passage des bactéries de l'état planctonique à l'état biofilm nécessite des changements physiques traduits au niveau métabolique. Les bactéries doivent sécréter des substances pour leur permettre d'adhérer entre elles (formation de « flocs ») et au support qu'elles colonisent.

1.4.4.1 Pourquoi former un biofilm ?

La formation du biofilm peut être induite par des phénomènes ayant un effet inhibiteur sur la croissance (toxicité d'un composé, stress environnemental) mais aussi par des environnements propices à la croissance (concentration importante en substrat, environnement stable).

L'un des principaux avantages à la formation d'un biofilm bactérien est la constitution d'une matrice extracellulaire. Elle permet une fixation irréversible du biofilm sur le support et joue un rôle de protection en le « recouvrant » (Davey and O'toole, 2000). Elle peut ainsi permettre l'entrée de composants dans le biofilm par des phénomènes de diffusion ou bloquer certains composants pathogènes pour les bactéries (Gilbert et al., 1997). La matrice extracellulaire permet de limiter voir bloquer les stress environnementaux tels que : l'exposition aux rayons UV, les changements de pH, les chocs osmotiques et la dessiccation (Flemming, 1993). Une bactérie qui a acquis la capacité de se fixer sur un support fixe possède donc un avantage sélectif par rapport à celles qui ont un développement essentiellement planctonique.

Dans l'environnement, la formation de biofilms permet notamment le transfert horizontal de gènes. Cette compétence génétique associée au rejet croissant d'antibiotiques dans les eaux usées est une des explications de l'apparition de bactéries multi-résistantes (Davies, 1994).

De par sa structure, le biofilm offre une résistance mécanique à la biomasse. Sur un support comme des billes de polystyrène utilisées dans le cadre du projet MELISSA, le biofilm a une grande surface de colonisation. Par ailleurs l'épaisseur de la couche limite qui environne le microorganisme fixé est plus importante que si le microorganisme est libre. A la condition que cette couche limite ne freine pas excessivement les transferts de substrats et de

produits entre le milieu et le microorganisme, la protection au cisaillement devient un avantage sélectif pour le microorganisme fixé. Le lit fixe formé sera alors plus résistant qu'une suspension de bactéries. De plus, le support permet de maintenir une concentration en biomasse élevée afin d'avoir une efficacité de nitrification au maximum.

1.4.4.2 Formation du biofilm

La formation du biofilm est induite par des signaux environnementaux captés par les bactéries. Comme décrit précédemment, ces signaux peuvent être liés à une zone favorable ou non à la croissance, ou à une coopération bénéfique entre microorganismes (Davies et al., 1998; Jefferson, 2004; O'Toole et al., 2000). La formation du biofilm est divisée en cinq étapes représentées par la Figure I-29.

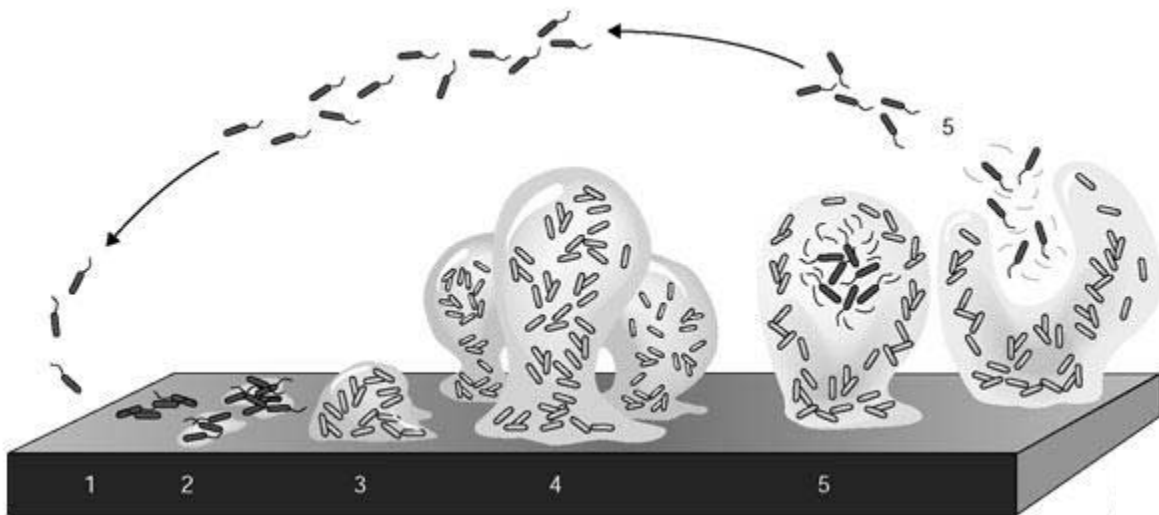


Figure I-29 : Les différentes étapes de formation du biofilm (d'après Stoodley et al., 2002) 1. Attachement initial, 2. Attachement irréversible, 3. Formation primaire de la structure du biofilm, 4. Maturation du biofilm, 5. Détachement et retour à l'état planctonique.

L'attachement initial

Les bactéries se déplacent sur le support et s'y déposent. L'attachement des bactéries est pour l'instant encore réversible, aucune substance n'a été produite pour y remédier. Les flagelles et pili sont nécessaires à cette étape d'adhérence initiale (Davey and O'toole, 2000).

L'attachement irréversible

Les bactéries se multiplient et adhèrent de manière irréversible entre elles et au support grâce à la sécrétion de substances extracellulaires. Ces substances forment la matrice

extracellulaire constituée d'eau, d'exopolysaccharides (EPS), d'acides nucléiques et de protéines (O'Toole et al., 2000; Sutherland, 2001).

La maturation du biofilm

Représentée par les étapes 3 et 4 de la Figure I-29, la maturation du biofilm est définie comme la construction de l'architecture du biofilm. Des canaux et des pores sont mis en place pour faciliter les flux de substrats et de composés (Davies et al., 1998). Les bactéries se réorganisent sur le support afin de parfaire sa colonisation.

Détachement et retour à l'état planctonique

Cette étape de la vie du biofilm traduit un décrochement de biomasse sous forme de « flocc ». Le détachement peut être induit par le biofilm mais ce cas de figure est le moins courant (Stoodley et al., 2001). La principale cause du détachement bactérien est la réduction de la concentration en EPS (Allison et al., 1998). Ceci peut être expliqué par une diminution de la quantité du substrat au sein du biofilm ou l'exposition trop forte à un stress chimique ou mécanique auquel le biofilm n'est pas ou plus capable de résister.

Même si la formation d'un biofilm est complexe et exige une modification morphologique de la population bactérienne, ce mode de croissance confère de nombreux avantages aux populations bactériennes.

1.4.4.3 Phénomènes de transfert au sein du biofilm

Un biofilm est principalement constitué d'eau. Pour comprendre la diffusion d'un composé au sein du biofilm, il faut déjà étudier sa diffusion dans l'eau (Stewart, 2003). Dans les biofilms de bactéries nitrifiantes, il a été mis en évidence que les AOB étaient présentes dans les couches supérieures du biofilm alors que les NOB se trouvaient dans les couches profondes (Okabe et al., 1999). Un gradient d'oxygène prend place au sein du biofilm créant ainsi des zones anoxiques dans les zones les plus profondes (Schramm et al., 1996). L'utilisation de billes comme support de biofilm permet de limiter ces zones anoxiques. En effet, le vide entre chaque bille permet un transfert de l'oxygène même au milieu du lit fixe. Des gradients de solutés peuvent aussi se créer entre les couches du biofilm. En revanche, des canaux d'eau permettent le transfert de solutés dans les couches profondes du biofilm afin de limiter les carences (Stewart, 2003). Au sein d'un biofilm de bactéries nitrifiantes, la concentration en ammonium est faible dans les couches profondes alors que celle en nitrate sera plus élevée (Li and Bishop, 2004) : ce phénomène est directement lié à la répartition de la biomasse comme ceci a été énoncé ci-dessus. La Figure I-30 schématise les concentrations des différents composés au sein du biofilm :

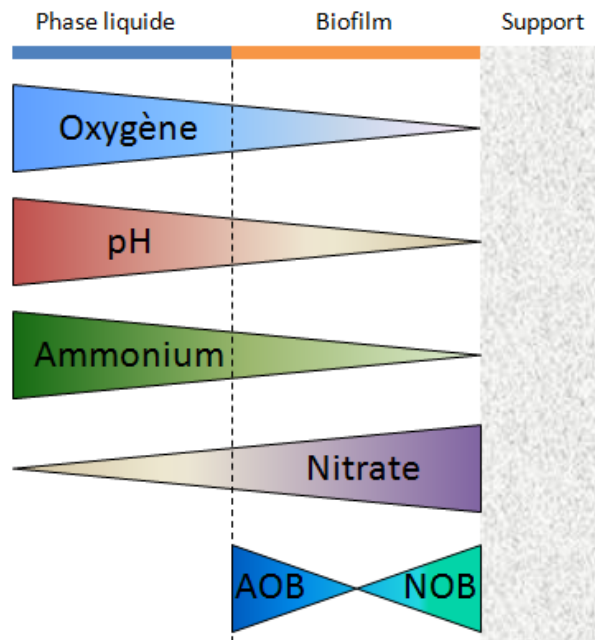


Figure I-30: Evolution des concentrations en oxygène dissous, ammonium, nitrate, biomasse et du pH au sein du biofilm de bactéries nitrifiantes.

Un équilibre se crée entre la répartition des bactéries au sein du biofilm et des composés azotés associés à leur métabolisme. Il existe ainsi une répartition horizontale des AOB/NOB au sein du lit fixe mais aussi verticale comme décrite dans la partie I.4.3.2.

Dans le cadre du projet MELiSSA, l'utilisation d'un réacteur nitrifiant à lit fixe est la plus intéressante. Celui-ci permet d'obtenir une biomasse en forte concentration, résistante à de nombreux stress notamment les variations de pH et de concentrations en substrats et oxygène auxquelles elle risque d'être exposée. Les paramètres permettant de favoriser la formation du biofilm devront ainsi être identifiés et maîtrisés.

I.5 Modélisation de la nitrification

I.5.1 Modélisation de la nitrification

La nitrification est un procédé connu et modélisé depuis de nombreuses années. La plupart des modèles utilisés en traitement des eaux considèrent que la nitrification se déroule en une seule étape et ne tiennent pas compte des éventuelles concentrations en nitrite (Sin et al., 2008). Dans les procédés de traitements des eaux, l'accumulation de nitrite est effectivement négligeable et l'utilisation de modèles de nitrification en une étape n'est alors pas problématique. Cependant, dans le cadre de MELiSSA, il est essentiel de modéliser la nitrification dans son intégralité et donc ses deux étapes distinctes. Ainsi, la concentration en nitrite devra être partie intégrante de la description et aussi représentée par le modèle.

1.5.1.1 Modèle de nitrification en traitement des eaux

Pour le traitement des eaux par boues activées, différents modèles sont couramment utilisés (Figure I-31):

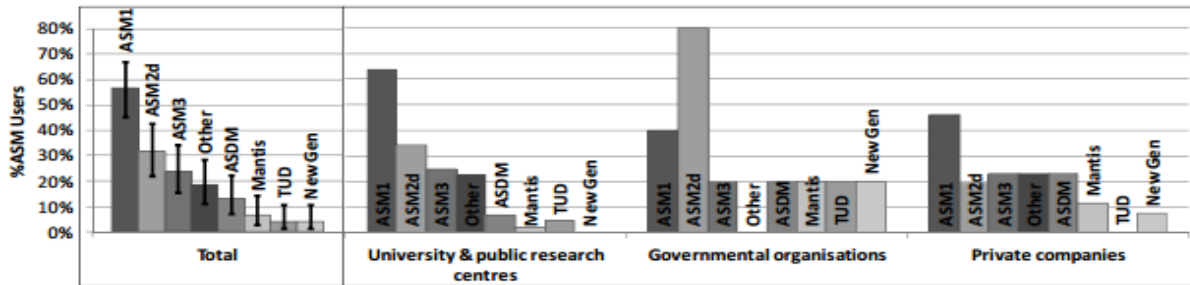


Figure I-31: Modèles utilisés pour le traitement des eaux et répartition par organisation (Hauduc et al., 2009).

Les modèles ASM sont construits en matrices et ne concernent pas que la nitrification : ils regroupent aussi les procédés de dénitrification. Dans le modèle ASM2, par exemple, la nitrification est basée sur un modèle de Monod :

Nitrifying organisms (autotrophic organisms): X_{AUT}

$$18 \text{ Aerobic growth of } X_{AUT} \quad \mu_{AUT} \cdot \frac{S_{O_2}}{K_{O_2} + S_{O_2}} \cdot \frac{S_{NH_4}}{K_{NH_4} + S_{NH_4}} \cdot \frac{S_{PO_4}}{K_P + S_{PO_4}} \cdot \frac{S_{ALK}}{K_{ALK} + S_{ALK}} \cdot X_{AUT}$$

$$19 \text{ Lysis of } X_{AUT} \quad b_{AUT} \cdot X_{AUT}$$

Figure I-32: Modélisation de la nitrification dans le modèle ASM2 (Henze, 2007). μ_{AUT} est le taux de croissance maximum des autotrophes nitrifiants et il vaut 1 j^{-1} ; b_{AUT} le taux de létalité vaut 0.15 j^{-1} ; X_{AUT} est la concentration bactérienne; K_{O_2} , K_{NH_4} , K_P et K_{ALK} sont les coefficients de saturation à 20°C respectivement pour l'oxygène ($0.50 \text{ gO}_2 \cdot \text{m}^{-3}$), l'ammonium ($1.00 \text{ gN} \cdot \text{m}^{-3}$), le phosphore ($0.01 \text{ gP} \cdot \text{m}^{-3}$) et la base ($0.50 \text{ mol HCO}_3^- \cdot \text{m}^{-3}$).

Les modèles ASM ne sont pas adaptés pour modéliser les traitements d'eaux usées par biomasse fixée. Le modèle AQUASIM a été développé pour simuler un biofilm multi-espèces utilisant plusieurs substrats. Ce modèle calcule le développement microbien dans un réacteur à biofilm, lui-même divisé en trois zones : la zone liquide (Bulk Fluid), le biofilm et la couche de surface limite (Liquid Boundary Layer), Figure I-33.

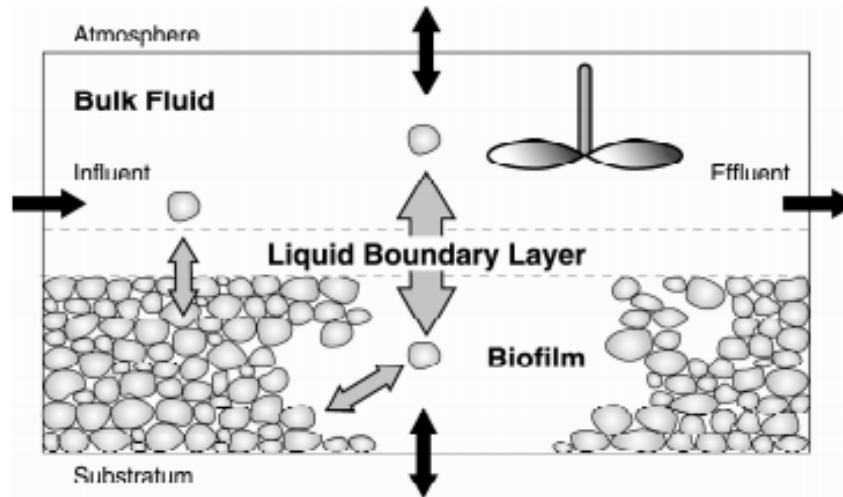


Figure I-33: Représentation du réacteur à biofilm dans le modèle AQUASIM (Wanner and Morgenroth, 2004). Les flèches noires représentent les flux avec les autres compartiments et les flèches grises, les flux à l'intérieur du compartiment.

AQUASIM est capable de simuler l'évolution des composés au sein du biofilm mais aussi entre le biofilm et la partie liquide circulante. Il peut modéliser la croissance des bactéries nitrifiantes (Pérez et al., 2009) :

$$\mu = \mu_{max} \prod \frac{S_i}{K_{S_i} + S_i + \left(\frac{S_i^2}{I_{S_i}}\right)} \quad (I.8)$$

μ_{max} : taux de croissance maximum (j^{-1}),

S_i : concentration en substrat i ,

K_{S_i} : constante de demi-saturation du substrat S_i (gS/L)

I_{S_i} : constante d'inhibition du substrat S_i (gS/L)

Le modèle AQUASIM est capable de simuler le détachement de la biomasse du biofilm vers le circuit liquide (Wanner and Morgenroth, 2004). La limite principale d'AQUASIM est la considération du biofilm comme une zone d'une dimension : dans ce contexte les concentrations sont moyennées au sein du biofilm. Les résultats expérimentaux montrent le phénomène inverse : il existe des gradients de concentration au sein du biofilm, comme cela a été décrit dans le paragraphe I.4.4.3.

Dans le traitement des eaux, les modèles de type ASM sont fréquemment utilisés et ne représentent pas les variations de nitrite car elles n'existent pas dans ce procédé (Wiesmann et al., 2007). Dans le cadre du projet MELiSSA, chaque composé intervenant dans les procédés doit être modélisé et contrôlé. Dans cette optique, les modèles courants de traitement des eaux ne pourront pas être utilisés pour modéliser le compartiment 3. La

modélisation de colonne à lit fixe est pour l'instant inspirée du modèle AQUASIM et combinée à un modèle de nitrification (Pérez et al., 2009, 2005 ; Poughon et al., 2001).

1.5.1.2 Modèle de croissance des bactéries nitrifiantes existants

De nombreuses équipes ont travaillé sur le développement de modèles de nitrification en deux étapes. Le phénomène de maintenance est un aspect essentiel de la nitrification et il doit apparaître dans le modèle de nitrification. La maintenance correspond à l'énergie consommée pour des fonctions autres que la croissance cellulaire. Le Tableau I-13 recense les différentes variantes du modèle de Pirt utilisées depuis plus de 30 ans, certaines avec de la maintenance, pour modéliser la nitrification.

Tableau I-13: Recensement des variantes du modèle de Pirt utilisées pour la représentation de la nitrification.

(Keen and Prosser, 1987)	Modèle de Pirt $R_S = D(S_t - S) - \frac{\mu_X}{Y}$
(Beefink et al., 1990) Réutilisé par (de Gooijer et al., 1991; Hunik et al., 1994; Leenen et al., 1997; Pérez et al., 2005)	Modèle mixte de Pirt et Herbert avec 2 termes de maintenance $q = \frac{\mu_{max}}{Y_{S/X}} \cdot M_0 + \frac{M}{Y_{S/X}} \cdot M_0$
(Tappe et al., 1999)	Modèle de Pirt avec un terme de maintenance $R_S = M_s \cdot X_t + \frac{R_x}{Y_{X/S_maint}}$
(Poughon et al., 2001)	Modèle de Pirt avec 2 termes de maintenance $q = Y_{S/S_maint} \cdot lim \cdot \left(m_c + m_v \left(1 - \frac{\mu}{\mu_{max}} \right) \right) + Y_{S/X} \cdot \mu$
(Vadivelu et al., 2006a, 2006b)	Modèle de Monod et 2 termes de maintenance $q = \frac{\mu}{Y_G} + m^0 + m' \cdot (1 - k \cdot \mu)$

Les diversités entre les différents modèles utilisés reposent sur les inhibitions par l'ammoniac ou l'acide nitreux : une fonction « switch » peut être utilisée mais aussi une cinétique d'Haldane (Sin et al., 2008). Dans d'autres types de modèles non référencés ici, la limitation par le carbone inorganique est représentée par un terme de Monod (le carbone n'est alors pas limitant pour la croissance) ou un terme exponentiel (le carbone limite la croissance cellulaire).

Le choix d'un modèle dépendra de l'utilisation de celui-ci. Ces modèles de nitrification ont inspiré le modèle de nitrification utilisé pour le Compartiment 3 de MELiSSA tel qu'il sera développé dans ce mémoire.

1.5.1.3 Modèle développé pour MELiSSA : NitriSim

Pour le compartiment nitrifiant, nous avons choisi de travailler à partir d'un modèle de Pirt avec létalité et un terme de maintenance inspiré de Poughon et al. (2001).

Comme nous l'avons déjà mentionné, il est important de pouvoir prendre en compte l'évolution de la population bactérienne dans le lit fixe et les propriétés de mélange, c'est-à-dire les gradients de concentrations. La colonne à lit fixe est représentée par un modèle N-bacs en série. Les deux modèles seront développés dans la partie méthode numérique du Chapitre II : Matériel et Méthodes. Ces modèles nécessitent une calibration biologique et physique, la calibration biologique étant basée sur la détermination des constantes cinétiques de *N. europaea* et *N. winogradskyi*. La calibration physique du modèle repose sur la caractérisation du réacteur à lit fixe utilisé pour réaliser la nitrification. Les procédures de calibration et validation du modèle développé seront décrites dans le Chapitre II.

1.6 La dégradation de l'urée et de l'urine

Dans la boucle MELiSSA, l'urine et les fèces sont injectés au niveau du compartiment 1 : l'urée est dégradée en ammonium. Cependant, il est possible d'imaginer une autre voie de traitement pour l'urine. En effet, pour limiter le volume de l'influent apporté en C1, l'urine peut être collectée pour être directement traitée dans le C3 qui assure déjà la nitrification. Dans sa configuration actuelle, le C3 n'est pas capable de dégrader l'urine compte tenu de sa composition bactérienne.

1.6.1 Composition de l'urine

L'urine est une solution complexe regroupant différents composants. Sa composition varie d'un individu à l'autre tout comme son pH. La composition moyenne de l'urine humaine est récapitulée dans le Tableau I-15:

Tableau I-14 : Composition de l'urine de l'homme.

	(Chang et al., 2013)	(Ciba-Geigy, 1977)	(Putnam, 1971)
Total de solutés (g/L)		-	36.7-46.7
N-NH₄⁺ (g/L)	2.5-8.1	-	
Azote total (g/L)	8-10	8.83	8.123

Etude Bibliographique

Urée (g/L)	5-9	-	9.3-23.3
COD (g/L)	8-10	-	8
Cl ⁻ (g/L)	-	4.97	18-8.4
Na ⁺ (g/L)	-	3.45	1-4
K ⁺ (g/L)	-	2.74	0.7-2.6
Créatinine (g/L)	-	-	0.7-2.2
S (g/L)	-	1.32	0.2-1.8
P (g/L)	0.7-2	0.8-2	0.5-1.1
B (µg/L)	500-3300	970	-
Fe (µg/L)	34-540	-	-
Cu (µg/L)	42-50	-	-
Zn (µg/L)	270-850	-	-
Mn (µg/L)	0.12-20	19	-
Mo (µg/L)	24-130	-	-

Même si la variabilité de la composition de l'urine rend compliquée la mise au point d'un procédé de traitement, Brooks and Keevil, (1997) ont développé un milieu d'urine synthétique utilisé pour la culture de bactéries urinaires pathogènes (Tableau I-15) :

Tableau I-15: Composition de l'urine synthétique (Brooks and Keevil, 1997).

Composant	Concentration (g/L)
Urée (CO(NH ₂) ₂)	10 (4.65 gN/L)
Chlorure de sodium (NaCl)	5.2
Sulfate de sodium hydraté (10x) (Na ₂ SO ₄ ·10H ₂ O)	3.2
Bicarbonate de sodium (NaHCO ₃)	2.1
Chlorure d'ammonium (NH ₄ Cl)	1.3 (0.34 gN/L)
Hydrogénophosphate de potassium (K ₂ HPO ₄)	1.2
Peptone L37	1
Phosphate de potassium monobasique (KH ₂ PO ₄)	0.95
Créatinine (C ₄ H ₇ N ₃ O)	0.8
Sulfate de magnésium (MgSO ₄ , 7H ₂ O)	0.49
Acide citrique (C ₆ H ₈ O ₇)	0.4
Chlorure de calcium (CaCl ₂ , 2H ₂ O)	0.37
Acide lactique (C ₃ H ₆ O ₃)	0.1

Acide urique ($C_5H_4N_4O_3$)	0.07
Extrait de levure	0.005
Sulfate de fer II ($FeSO_4$)	0.0012

L'urée est donc le principal composé azoté de cette urine synthétique. Ainsi, si l'on veut créer un module de traitement d'urine avec la colonne à lit fixe dont on dispose à l'Institut Pascal, il faudra trouver un moyen de convertir cette urée en source d'azote assimilable par *N. europaea*. Trois options se présentent alors :

- La dégradation thermique : la thermolyse de l'urée en NH_3 s'opère à des températures supérieures à 150 °C (Bernhard et al., 2012).
- L'utilisation d'uréase : l'ajout d'enzyme à l'effluent.
- L'utilisation d'une troisième souche bactérienne possédant une uréase, Figure I-34 :

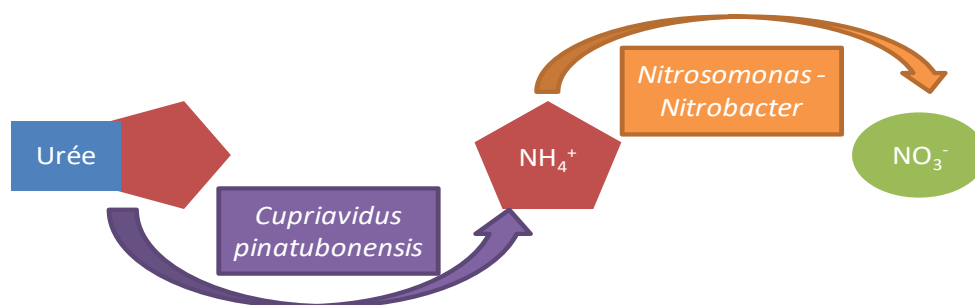


Figure I-34 : Représentation schématique de la transformation de l'urée en nitrate sous l'action de la « tri-culture ».

Dans le cadre de notre étude, il nous faut un moyen simple d'assurer la transformation de l'urée en ammonium. La dégradation thermique semble alors compliquée à mettre en place en raison de la faible efficacité du processus, des températures élevées de travail et de leur effet sur le reste du milieu de culture. De même pour l'ajout d'uréase dans l'effluent d'entrée, l'utilisation d'un additif ne paraît pas très réaliste pour une utilisation en conditions de systèmes de support vie. L'uréase devient un consommable supplémentaire à emporter lors du lancement, ce qui ne respecte pas la stratégie de MELiSSA qui est de réduire au maximum la masse emportée.

La solution la plus envisageable est alors l'ajout d'une souche possédant une uréase dans la colonne à lit fixe afin que l'urine soit dégradée de manière biologique sans apport d'un procédé ou de composés supplémentaires.

1.6.2 Sélection d'une souche dégradant l'urée : *Cupriavidus pinatubonensis*

Il s'agit ici d'un procédé qui n'est pas encore développé dans MELiSSA pour lequel nous avons réalisé quelques études préliminaires. Pour développer un module de traitement d'urine par voie biologique, il faut sélectionner une souche capable de dégrader l'urée présente dans l'urine et dont les conditions de croissance sont compatibles avec celles des deux bactéries déjà présentes dans le lit fixe.

La bactérie *Cupriavidus pinatubonensis* a été sélectionnée pour assurer la dégradation enzymatique de l'urée. Découverte dans un volcan (Sato et al., 2006), elle semble adaptée aux conditions extrêmes, et possède un métabolisme polyvalent lui permettant de dégrader différents composés. La « tri-culture » envisagée devra être composée de *Cupriavidus pinatubonensis*, *Nitrosomonas europaea* et *Nitrobacter winogradskyi*. Ce consortium devrait ainsi assurer la transformation de l'urée en nitrate grâce à l'action de trois bactéries.

1.6.2.1 Description morphologique

Cupriavidus pinatubonensis a été isolée dans des coulées de boues volcaniques du Mont Pinatubo aux Philippines (Sato et al., 2006). C'est une β -protéobactérie aérobie et GRAM négative. *C. pinatubonensis* est un bacille flagellé mesurant 0.3-0.6 x 0.8-1.6 μm (Sato et al., 2006). Elle forme des colonies circulaires convexes et blanches sur milieu gélosé.

Après un séquençage, il a été montré que *Cupriavidus pinatubonensis* était en fait *Ralstonia eutropha*, bactérie déjà connue et caractérisée (Mayer et al., 2010). Les dénominations de cette bactérie ont évolué au fil des années de recherche et depuis une dizaine d'années on la connaît sous le nom de *Cupriavidus necator* (Grousseau, 2012; Ledger et al., 2011).

1.6.2.2 Métabolisme

C. pinatubonensis présente un métabolisme autotrophe ou hétérotrophe selon les conditions dans lesquelles elle se trouve (Grousseau, 2012). Elle possède un panel d'enzymes large : oxydase, catalase, uréase, etc. Elle est aussi capable de réduire le nitrate en nitrite. Elle est notamment connue pour dégrader des composés aromatiques et on la trouve ainsi dans des sols pollués au méthanitrophénol par exemple (Ledger et al., 2011). Plus de soixante composés aromatiques peuvent lui servir de source de carbone et d'énergie (Pérez-Pantoja et al., 2008). *Cupriavidus pinatubonensis* est aussi capable de pousser en symbiose avec des plantes comme *Arabidopsis thaliana* and *Acacia caven* (Ledger et al., 2011; Platero et al., 2016).

1.6.2.3 Cinétique de croissance

De nombreux auteurs ont travaillé sur les cinétiques de croissance de *Cupriavidus*, et sur différents substrats dont une liste non exhaustive est donnée (Tableau I-16).

Tableau I-16 : Taux de croissance maximum μ_{\max} référencés dans la littérature pour le genre *Cupriavidus*.

Substrat	μ_{\max} (h^{-1})	Auteurs
Acide formique	0.18	(Grunwald et al., 2015)
	0.17	(Friedrich et al., 1979)
	0.23	(Friedebold and Bowien, 1993)
Acide propionique	0.025-0.2	(Kim et al., 1992)
	0.26	(Grousseau, 2012)
Acide butyrique	0.33	(Grousseau, 2012)
Acide acétique	0.06-0.2	(Wang and Yu, 2000)
	0.32	(Grousseau, 2012)
	0.27	(Aragao, 1996)
Glucose	0.25	(Aragao, 1996)
	0.26	(Gaudin, 1998)
Milieu minéral	0.25	(Kim et al., 1992)
Milieu riche	0.25	(Wang and Yu, 2000)

Cupriavidus pinatubonensis est donc une bactérie au métabolisme varié. Elle semble être un candidat intéressant pour dégrader de l'urée et créer un module compact de traitement de l'urine.

1.6.3 Une tri-culture pour dégrader l'urine au sein de la colonne à lit fixe

La colonne à lit fixe, réacteur à l'échelle laboratoire du compartiment nitrifiant de MELiSSA, est destinée à assurer la nitrification.

Cependant, dans une optique d'extension de la technologie développée à cet effet, nous avons pensé à modifier son objectif principal. Ainsi, le module qui sera mis en place devrait permettre de dégrader l'urine directement. On peut imaginer des applications possibles dans des installations ne disposant pas de systèmes de traitement des eaux. Par exemple : des habitations mobiles (camping-car, mobil-home), des bateaux (de loisirs ou de recherche scientifique), en aquaponie pour la culture simultanée de poissons et de plantes, ou encore dans une vision écologique afin de recycler l'eau des chasses d'eau. Ce module peut très bien être couplé avec une adaptation du compartiment de cultures de plantes supérieures.

En effet, ce couplage peut être intéressant lors d'expéditions à des fins scientifiques à bord de bateaux en conditions extrêmes (Antarctique).

En d'autres termes, cette première analyse des possibilités de dégradation microbiologique de l'urée et de l'oxydation simultanée de l'ammonium en nitrate indique que des potentialités sont à explorer. Il s'agit ici d'une extension du fonctionnement 'normal' du troisième compartiment de la boucle MELISSA. C'est un sujet qui sera repris plus loin dans ce manuscrit, sachant que la maîtrise de la colonne de nitrification et sa compréhension ouvrent la porte à de nouveaux champs d'étude, intéressant à la fois le développement de système de support vie pour l'exploration spatiale et des systèmes modulaires en général ciblés sur des applications terrestres particulières.

I.7 Objectifs de la thèse

Le travail présenté dans cette thèse porte sur le compartiment C3 de la boucle MELISSA. Dans le C3, une coculture de deux bactéries doit assurer la transformation de l'ammonium présent dans l'effluent en nitrate qui est la source d'azote pour le compartiment C4a (*Athrospira platensis*) et C4b (plantes supérieures). L'approche suivie pour l'étude de la boucle MELISSA, implique une compréhension fine de chaque compartiment afin d'en établir des modèles de connaissance et des modèles de contrôle. Dans cette perspective, les travaux présentés dans ce manuscrit s'articulent en trois objectifs :

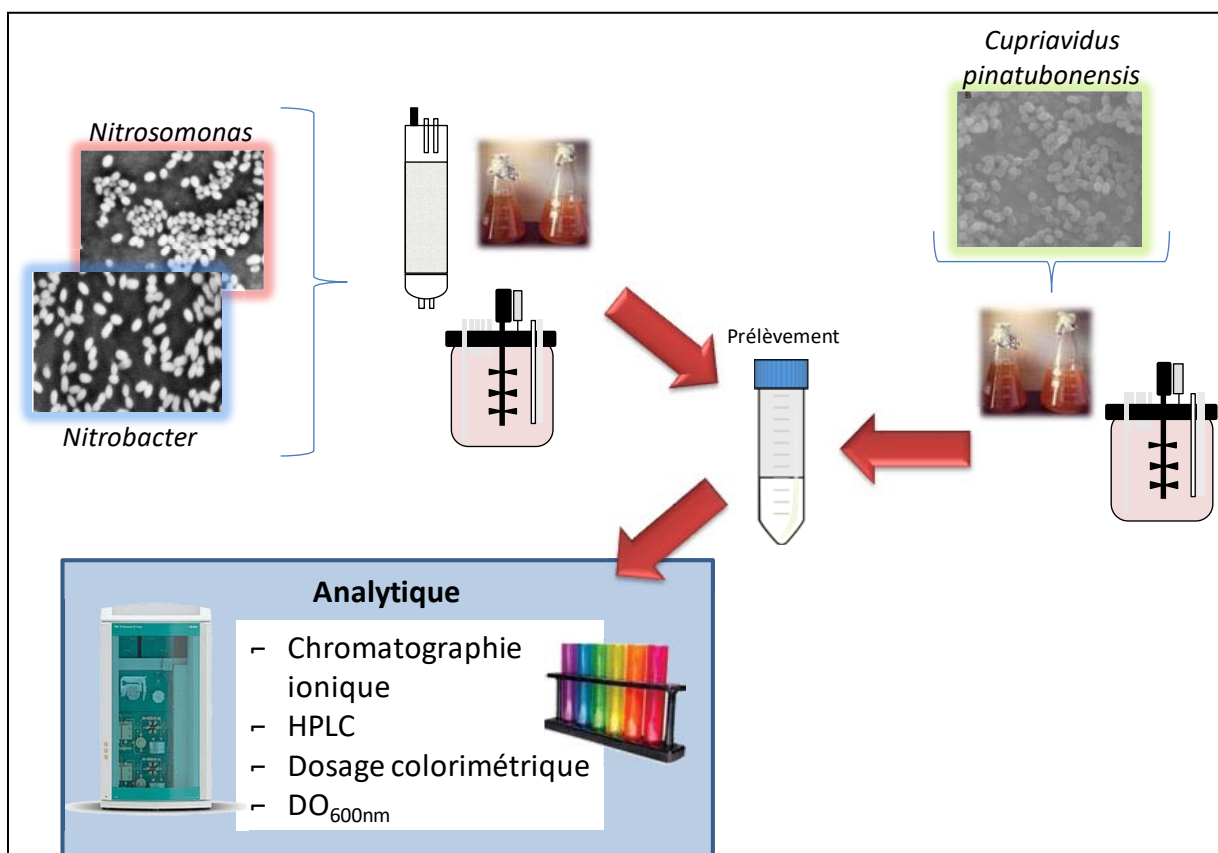
(i) La calibration et la validation d'un modèle cinétique de nitrification. Des cultures pures ont été réalisées pour définir les paramètres cinétiques des deux souches utilisées dans le compartiment C3 : *Nitrosomonas europaea* et *Nitrobacter winogradskyi*. Le modèle défini sera alors testé dans des cocultures de ces bactéries réalisées en réacteur.

(ii) Coculture des deux souches en réacteur à lit fixe et couplage du modèle cinétique validé en (i) et du modèle du réacteur à lit fixe. Une expérience de plusieurs mois a été réalisée dans la coculture à lit fixe avec *Nitrosomonas europaea* et *Nitrobacter winogradskyi* comme bactéries nitrifiantes. Durant cette expérience, différentes charges entrantes en azote vont être appliquées pour observer la réponse de la coculture. Des stress vont aussi être testés pour étudier les effets sur le réacteur et la reprise de la nitrification. Un modèle représentant l'hydrodynamique au sein de la colonne à lit fixe sera combiné au modèle cinétique de nitrification développé dans le chapitre précédent. Le nouveau modèle, NitriSim, sera utilisé et comparé avec les résultats expérimentaux de l'expérience de long terme menée dans la colonne lit fixe.

(iii) **L'étude d'un candidat pour la réalisation d'une triculture assurant la dégradation de l'urée en nitrate.** Le métabolisme d'une bactérie possédant une uréase, *Cupriavidus pinatubonensis*, sera étudié. Le taux de croissance maximum de la souche sera calculé. Après avoir vérifié la dégradation de l'urée en ammonium par la souche, celle-ci sera inoculée dans la colonne à lit fixe où *Nitrosomonas europaea* et *Nitrobacter winogradskyi* sont déjà présentes. Cette dernière partie présentera des perspectives de recherche pour l'injection de l'urine directement au niveau du compartiment C3 de MELiSSA.

Chapitre II

Matériel et méthodes



Résumé graphique du Chapitre II : Cultures en Erlenmeyers et bioréacteurs des trois souches étudiées dans ce manuscrit. Les méthodes utilisées pour l'analytique sont des appareils chromatographiques et des dosages spectrophotométriques.

Chapitre II : Matériel et méthodes

II.1 Description des souches utilisées

II.1.1 Souches

Deux souches bactériennes ont été sélectionnées pour faire fonctionner le compartiment 3 de la boucle MELiSSA. La nitrosation est assurée par *Nitrosomonas europaea* ATCC® 19718™ et *Nitrobacter winogradskyi* ATCC® 25931™ est la bactérie nitrifiante choisie. Ces souches sont conservées sur billes et congelées à -80 °C. Des cultures liquides sont réalisées et maintenues afin d'avoir à disposition les deux bactéries. En effet, *N. europaea* et *N. winogradskyi* ne poussent pas sur gélose. Les cultures liquides sont alors maintenues axéniques et sont repiquées régulièrement.

La souche *Cupriavidus pinatubonensis* est conservée sur gélose TSA (Tryptic Soy Agar). La souche est aussi maintenue en culture liquide dans du milieu Luria Bertani (LB).

II.1.2 Milieux de culture

II.1.2.1 *Nitrosomonas europaea* ATCC® 19718

Le milieu de *Nitrosomonas europaea* est le milieu ATCC® #2265 décrit dans le Tableau II-1. Les trois solutions sont préparées et la solution 2 est ajustée à pH=8 avec du NaOH 10 N. La solution 1 est filtrée sur un filtre Millipore® 0.22 µm et les solutions 2 et 3 sont combinées puis filtrées.

Tableau II-1 : Milieu de culture ATCC® #2265 pour *Nitrosomonas europaea*.

Solution 1	(NH ₄) ₂ SO ₄	4.95 g	Solution 2	KH ₂ PO ₄	8.2 g
	KH ₂ PO ₄	0.62 g		NaHPO ₄	0.7 g
	MgSO ₄	0.27 g		Eau distillée	0.3 L
	CaCl ₂	0.04 g	Solution 3	Na ₂ CO ₃	0.6 g
	FeSO ₄	0.5 mL		Eau distillée	12 mL
	CuSO ₄	0.2 mg			
	Eau distillée	1.2 L			

II.1.2.2 *Nitrobacter winogradskyi* ATCC® 25931

Nitrobacter winogradskyi peut croître en milieu minéral, milieu ATCC® #480 composé de 6 solutions différentes et décrit dans le Tableau II-2.

Tableau II-2 : Milieu de culture ATCC® #480 pour *Nitrobacter winogradskyi*.

	Préparation de la solution intermédiaire		Volume de solution pour 1 L milieu final
Solution A	CaCl ₂	20 g/L	0.5 mL
Solution B	MgSO ₄ , 7H ₂ O	200 g/L	0.5 mL
Solution C	EDTA	0.14 g	1 mL
	FeSO ₄ , 7H ₂ O	0.5 g	
	H ₂ SO ₄	0.05 mL	
	Eau distillée	100 mL	
Solution D	Na ₂ MoO ₄ , 2H ₂ O	0.1 g	0.5 mL
	MnCl ₂ , 4H ₂ O	0.2 g	
	CoCl ₂ , 6H ₂ O	2 mg	
	ZnSO ₄ , 7H ₂ O	0.1 g	
	CuSO ₄ , 5H ₂ O	0.02 g	
	Eau distillée	1 L	
Solution E	NaNO ₂	414 g/L	0.5 mL
Solution F	K ₂ HPO ₄	17.4 g/L	2 gouttes
Eau distillée			1 L

Les solutions sont mélangées et la solution finale est stérilisée par autoclave à 121 °C et 1 bar pendant 20 min.

Le milieu de croissance riche fourni par la compagnie allemande Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ®) est le milieu DSMZ® #756, et a été modifié en ajoutant du NaNO₂ à 2 g/L afin d'avoir une source de nitrite dans le milieu.

Tableau II-3 : Milieu riche #756 pour *Nitrobacter winogradskyi*.

	Préparation de la solution intermédiaire		
NaNO ₂			2 g
Extrait de levure			1.5 g
Peptone			1.5 g
Na-pyruvate			0.55 g
Solution éléments trace	MnSO ₄ , xH ₂ O	33.8 mg	1 mL
	H ₃ BO ₃	49.40 mg	
	ZnSO ₄ , 7H ₂ O	43.10 mg	
	(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄	37.10 mg	
	FeSO ₄ , 7H ₂ O	97.30 mg	
	CuSO ₄ , 5H ₂ O	25 mg	

Matériel et Méthodes

	Eau distillée	1 L	
Solution stock	CaCO ₃	0.07 g	100 mL
	NaCl	5 g	
	MgSO ₄ , 7H ₂ O	0.5 g	
	KH ₂ PO ₄	1.5 g	
	Eau distillée	1 L	
Eau distillée			899 mL

Après préparation, le milieu de culture est stérilisé à l'autoclave à 121 °C et 1 bar pendant 20 min.

II.1.2.3 Le milieu de coculture de *N. europaea* et *N. winogradskyi*

Pour les cocultures de *N. europaea* et *N. winogradskyi*, un milieu de coculture a été mis au point dans le cadre du projet MELISSA (Montras et al., 2008). Ce milieu de culture est minéral et combine les milieux #2265 et #480 avec une source d'ammonium. La composition du milieu est décrite dans le Tableau II-4.

Tableau II-4 : Composition du milieu de coculture pour les cultures mixtes de *Nitrosomonas europaea* et *Nitrobacter winogradskyi*.

(NH ₄) ₂ SO ₄	1.32 g/L	CaCl ₂ , 2H ₂ O	0.74 mg/L
KH ₂ PO ₄	0.68 g/L	FeSO ₄ , 7H ₂ O	2.5 mg/L
Na ₂ HPO ₄	0.71 g/L	CuSO ₄ , 5H ₂ O	4 µg/L
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ , 4H ₂ O	0.177 g/L	NaHCO ₃	0.8 g/L
ZnSO ₄ , 7H ₂ O	4.3 µg/L	Rouge crésol	0.125 mg/L
MgSO ₄ , 7H ₂ O	52 mg/L		

Le milieu préparé est autoclavé pendant 20 min à 121 °C et 1 bar.

II.1.2.4 *Cupriavidus pinatubonensis* : milieu riche

La souche *C. pinatubonensis* est conservée sur gélose Trypto-caséine soja (TSA) à 4 °C, et cultivée dans un milieu LB de composition décrite dans le Tableau II-5:

Tableau II-5: Composition du milieu de culture LB pour *Cupriavidus pinatubonensis*.

Tryptone	10 g
Chlorure de sodium	10 g
Extrait de levure	5 g

Le milieu préparé est autoclavé pendant 20 min à 121 °C et 1 bar.

Chapitre II

II.1.2.5 *Cupriavidus pinatubonensis* : milieu de coculture modifié

La souche *C. pinatubonensis* est aussi cultivée sur un milieu minéral : le milieu de coculture (décrit en II.1.2.3) où la source majoritaire de l'azote est l'urée. Ce milieu sera utilisé lors de culture en Erlenmeyer afin de tester la capacité de dégradation de l'urée par *C. pinatubonensis* tout en utilisant le CO₂ comme source de carbone.

Tableau II-6: Composition du milieu de coculture modifié utilisé pour cultiver *Cupriavidus pinatubonensis*.

CO(NH ₂) ₂	1.32 g/L	CaCl ₂ , 2H ₂ O	0.74 mg/L
KH ₂ PO ₄	0.68 g/L	FeSO ₄ , 7H ₂ O	2.5 mg/L
Na ₂ HPO ₄	0.71 g/L	CuSO ₄ , 5H ₂ O	4 µg/L
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ , 4H ₂ O	0.177 g/L	NaHCO ₃	0.8 g/L
ZnSO ₄ , 7H ₂ O	4.3 µg/L	Rouge crésol	0.125 mg/L
MgSO ₄ , 7H ₂ O	52 mg/L		

Le milieu préparé est autoclavé pendant 20 min à 121 °C et 1 bar.

II.1.3 Maintien des souches

Les cultures de *Nitrosomonas europaea* ATCC® 19718 et *Nitrobacter winogradskyi* ATCC® 25931™ sont difficiles et longues à mettre en œuvre. Ainsi, les pré-cultures ne sont pas réalisées juste avant l'ensemencement en bioréacteurs et sont maintenues toute l'année par repiquages réguliers. Les cultures de *Nitrosomonas europaea* ATCC® 19718 sont incubées dans des flacons en position horizontale à 28°C, à l'obscurité et sans agitation. Le pH est ajusté régulièrement à 7.5 - 8 à l'aide d'une solution de KOH 0.1 N. Les cultures sont repiquées au 1/20^{ème} en moyenne toutes les 6 semaines quand les concentrations bactériennes obtenues permettent d'avoir une DO_{600nm} après repiquage supérieure à 0.02.

Les cultures de *Nitrobacter winogradskyi* ATCC® 25931 sont réalisées en Erlenmeyers et placées à 28 °C avec agitation et à l'obscurité. Des ajouts de nitrite (NaNO₂ 200 g/L) sont réalisés dès que le substrat est entièrement consommé. Ces ajouts peuvent être ponctuels ou fréquents (toutes les 48 h) selon l'âge de la culture. Le pH n'est pas modifié par cette étape de la nitrification, il n'est donc pas nécessaire de contrôler et d'ajuster le pH des précultures. Celles-ci sont repiquées au 1/20^{ème} en moyenne toutes les 4 semaines quand les concentrations bactériennes obtenues permettent d'avoir une DO_{600nm}, après repiquage, supérieure à 0.02.

Les cultures mixtes sont placées à 26 °C avec agitation et à l'obscurité. Le pH est contrôlé et ajusté à l'aide d'une solution de KOH 0.1 N. Les cultures sont repiquées au 1/20^{ème} en

moyenne toutes les 6 semaines quand les concentrations bactériennes obtenues permettent d'avoir une DO_{600nm} après repiquage supérieure à 0.02.

Cupriavidus pinatubonensis est conservée sur gélose TSA. Pour la préparation d'une culture liquide, une colonie est ensemencée dans 5mL de milieu LB. Au bout de 24 h, cette pré-culture est repiquée à 10 % dans 45 mL de milieu LB. L'opération est répétée de manière à obtenir le volume attendu de culture.

II.1.4 Cultures de *Cupriavidus pinatubonensis*

Des cultures pures de *C. pinatubonensis* ont été réalisées pour déterminer ses paramètres cinétiques et observer son métabolisme.

II.1.4.1 *Détermination du taux de croissance maximum en microplaque*

C. pinatubonensis présentant des taux de croissance élevés, sa croissance a été étudiée en microplaque afin d'avoir un grand nombre de réplicats. Dans une microplaque 96 puits stérile (ThermoFischer Scientific®, USA), est disposé 180 μ L de milieu de culture LB (Partie II.1.2.4). Chaque premier puits de chaque colonne est utilisé comme témoin négatif. Les autres puits sont inoculés avec 20 μ L d'une préculture de *C. pinatubonensis*. La microplaque est placée dans un incubateur-lecteur de plaque (Victo X3, PerkinElmer®, USA) contrôlé par ordinateur où la densité optique à 600 nm est relevée toutes les 30 minutes après agitation de la plaque et la température maintenue à 28 °C. Les données sont relevées pendant 24 h.

II.1.4.2 *Observation du métabolisme en Erlenmeyers*

Pour observer le métabolisme de *C. pinatubonensis* et vérifier notamment que la souche dégrade l'urée, des cultures en Erlenmeyers sont réalisées en parallèle. Les conditions testées sont les suivantes :

Tableau II-7: Protocole opératoire pour les cultures en Erlenmeyers de *C. pinatubonensis*.

	Erlenmeyer A	Erlenmeyer B
Milieu de culture	Milieu LB	Milieu de coculture modifié
Agitation	100 rpm	
Température	30 °C	
Mesures réalisées	Lecture DO_{600nm} , Dosages urée, ammonium et acétate	

Des prélèvements réguliers sont réalisés dans les deux Erlenmeyer pour comparer les croissances dans les deux conditions.

II.2 Méthodes analytiques

II.2.1 Le suivi de la concentration en biomasse

II.2.1.1 Suivi spectrophotométrique

Le suivi de la densité bactérienne est assuré par une mesure de turbidimétrie à 600 nm (DO_{600nm}). La concentration bactérienne augmente proportionnellement avec la turbidité de la solution à analyser mais reste toujours très faible atteignant au maximum 0.1 dans les cultures en Erlenmeyers en milieu minéral pour *Nitrosomonas europaea* et *Nitrobacter winogradskyi*.

II.2.1.2 Mesure du poids sec

Afin d'estimer la concentration bactérienne massique lors de cultures, des mesures de poids sec sont réalisées. Comme les bactéries nitrifiantes ont un faible taux de croissance et n'atteignent que de faibles concentrations même après plusieurs jours/semaines de culture, il est difficile de mesurer le poids sec. Cependant, lors de cultures en bioréacteurs où les concentrations bactériennes sont plus élevées ces mesures sont réalisables. Pour les cultures de *Cupriavidus pinatubonensis*, les mesures de poids sec ont facilement été réalisables.

Des tubes de 50 mL sont préalablement séchés à 110 °C puis pesés, après une mise à température ambiante dans un dessiccateur. On note M_0 la masse du tube après la pesée initiale. On ajoute 50 mL de suspension bactérienne dont la densité optique a été mesurée au préalable. Les tubes sont centrifugés 20 minutes à 10000 g. Après la centrifugation, le surnageant est éliminé et les tubes ouverts sont replacés au four à 110 °C. Après 72 h, les tubes sont pesés après une mise à température ambiante dans un dessiccateur. On note M_1 , la masse du tube après la seconde pesée. La soustraction $M_1 - M_0$ donne la masse sèche de bactéries contenues dans les 50 mL de solution initiale. On peut alors en déduire une concentration massique bactérienne. Cette concentration est rapportée à la densité optique mesurée initialement afin d'établir une corrélation DO_{600nm} /concentration massique.

II.2.2 Le suivi des composés azotés

Les composés azotés peuvent être dosés en utilisant des techniques différentes. Des dosages colorimétriques permettent de doser les ions ammonium et nitrite. Un appareillage de chromatographie ionique peut servir à titrer les ions ammonium, nitrite et nitrate. La concentration en urée a été mesurée par un kit fourni par Megazyme®.

II.2.2.1 Les dosages colorimétriques

II.2.2.1.1 Titration de l'ammonium

Les ions ammonium sont dosés selon la réaction de Berthelot, (Patton, and Crouch, 1977) ; ils réagissent avec la javel et le phénol pour former un complexe bleu détectable à 570 nm. 50 µL d'échantillon est mélangé à 500 µL de javel, 500 µL de phénol nitropussiate et 3 mL d'eau distillée. Les tubes sont passés au vortex et placés à l'obscurité pendant une heure. Une gamme étalon de 0 à 80 mg NH₄⁺/L est réalisée à partir d'une solution de NH₄Cl à 80 mg NH₄⁺/L.

II.2.2.1.2 Titration du nitrite

Les ions nitrite sont dosés selon la méthode de GRIESS (Keeney and Nelson, 1982). Le nitrite forme, avec le réactif de GRIESS, un complexe rose détectable à 540 nm. 50 µL de réactif de GRIESS sont ajoutés à 1mL d'échantillon et les tubes sont incubés 2 minutes à l'obscurité avant de lire la DO à 540 nm. Une gamme étalon de 0 à 80 mg NO₂⁻/L est préparée à partir d'une solution NaNO₂ à 80 mg NO₂⁻/L.

II.2.2.1.3 Titration de l'urée

Le dosage de l'urée est réalisé selon la méthode décrite par Knorst *et al*, 1997. Ce dosage colorimétrique repose sur l'utilisation du p-diméthylaminobenzaldéhyde (DMBA) de formule C₉H₁₁NO. Ce réactif va entraîner la formation d'un composé jaune par dérivatisation de l'urée. Le réactif du dosage est composé de 4 % (w/v) de DMBA et 4 % (w/v) d'acide sulfurique dans de l'éthanol absolu (Knorst *et al.*, 1997). 0.5 mL de cette solution est ajouté à 2 mL d'échantillon et l'absorbance à 422 nm est lue après 10 min d'incubation. Une gamme étalon est réalisée à chaque dosage, Figure II-1 :

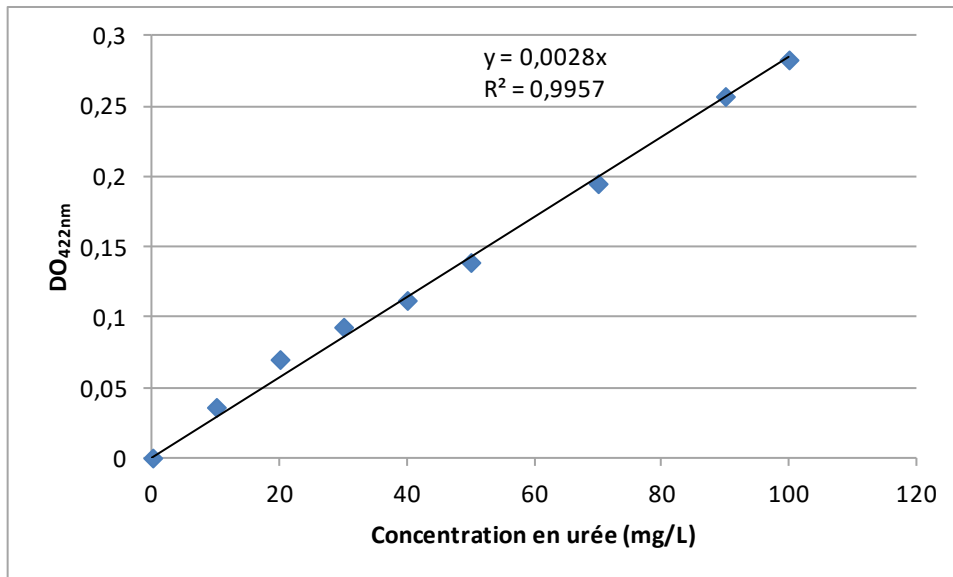


Figure II-1: Courbe étalon du dosage de l'urée selon Knorst et al, 1997.

Ce dosage est réalisé sur des échantillons déprotéinés (Partie II.2.2.2.2) et dilués de manière à ce que l'absorbance lue se trouve dans la gamme de la courbe étalon.

II.2.2.2 La chromatographie ionique

II.2.2.2.1 Principe

Connue sous le nom de résine échangeuse d'ions, la chromatographie ionique permet de doser différents ions dans une solution. Pour doser des cations tels que les ions ammonium, une colonne chargée négativement est utilisée. Pour doser le nitrite et le nitrate, une colonne chargée positivement est utilisée. L'interaction entre les ions et la résine de la colonne étant différente pour chaque ion, ces derniers sont élués par la phase mobile et répondent à des temps différents pour chaque espèce dosée. La détection est réalisée par conductimétrie. Grâce à un étalonnage de l'appareil, il est alors possible d'avoir une détermination précise de la concentration de chaque ion dans l'échantillon testé.

La chromatographie ionique utilisée pour ces analyses est une 882 Compact IC plus fournie par Metrohm®.

II.2.2.2.2 Préparation des échantillons

Les échantillons doivent être déprotéinés et filtrés sur 0.22 µm avant d'être injectés dans la chromatographie cationique. La déprotéinisation est réalisée en ajoutant 125 µL de baryte de sodium 0.3 M et 125 µL de sulfate de zinc à 3 %, à 1 mL d'échantillon. L'ensemble est passé au vortex et centrifugé pendant 5 minutes à 10000 g avant d'être filtré à 0.22 µm.

II.2.2.2.3 Dosage des cations

Les cations sont dosés avec une colonne à résine négative Metrosep C450, Metrohm®. La phase mobile est composée d'acide nitrique 65 % à une concentration finale de 117.5 µL/L d'éluant, et d'acide dipicolinique à une concentration finale de 0.117 g/L. La boucle d'injection présente un volume de 100 µL, et il est nécessaire d'injecter 1.5 mL d'échantillon pour une analyse.

II.2.2.2.4 Dosages des anions

Les anions sont dosés avec une colonne à résine positive Metrosep A Supp 5, Metrohm®. La phase mobile est composée de bicarbonate de sodium à 0.084 g/L et de carbonate de sodium à 0.339 g/L. La boucle d'injection présente un volume de 20 µL, et il est nécessaire d'injecter 1 mL d'échantillon pour une analyse.

II.2.2.3 La Chromatographie Liquide Haute Performance (HPLC)

Durant les cultures de *C. pinatubonensis*, l'HPLC a permis de déterminer les concentrations en acétate dans les échantillons. La chaîne utilisée est composée de deux colonnes d'exclusion ionique en série (Phénomenex® Rezex ROA 300 x 7.8 mm). Les colonnes sont placées dans un four à 50 °C, et l'éluant est une solution à 2 mM d'acide sulfurique dans de l'eau ultra-pure. L'éluant est dégazé à l'entrée de l'appareil et circule à un débit de 0.7 mL/min. La détection des composés est assurée par un réfractomètre (HP série 1100). L'acquisition et l'intégration des résultats sont réalisées grâce au logiciel ChemStation (Agilent®, USA). L'injection des échantillons est automatisée et ceux-ci doivent être traités avant analyse comme pour l'analyse par Chromatographie Ionique (Partie II.2.2.2.2).

II.3 Les bioréacteurs utilisés

Nitrosomonas europaea ATCC® 19718™ et *Nitrobacter winogradskyi* ATCC® 25931™ sont cultivées en bioréacteurs en cultures pures puis en culture mixte en utilisant des réacteurs de volumes différents selon les objectifs attendus. Les cultures pures, réalisées en réacteurs de 500mL, ont pour objectif de caractériser les souches bactériennes : taux de croissance maximum, rendement, létalité, etc. Ces paramètres serviront à calibrer le modèle de culture des deux souches. Les cocultures, réalisées en réacteur de 4L, Figure II-2, permettront une calibration finale du modèle.

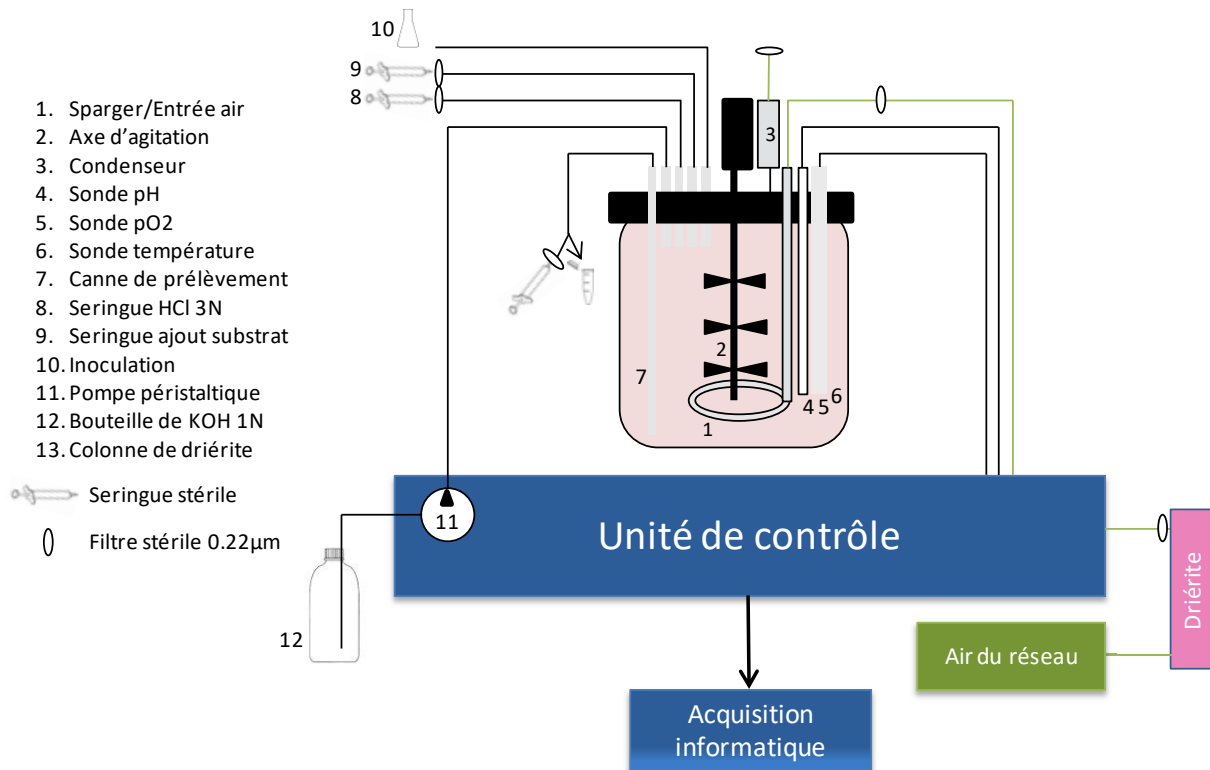


Figure II-2: Représentation schématique d'un bioréacteur de culture bactérienne.

Les bioréacteurs permettent de maintenir les conditions de cultures choisies par l'utilisateur. L'air utilisé pour les cultures est l'air du réseau de même composition que l'air atmosphérique. Les bioréacteurs utilisés ont ensuite des volumes variables et des unités de contrôle adaptées et seront décrits dans les paragraphes II.3.1 à II.3.3.

II.3.1 Les bioréacteurs de 500mL en parallèle

Des cultures pures de chacune des bactéries utilisées ont été réalisées afin de définir leurs paramètres cinétiques.

Quatre réacteurs en parallèle ont été utilisés pour ces études, Figure II-3.

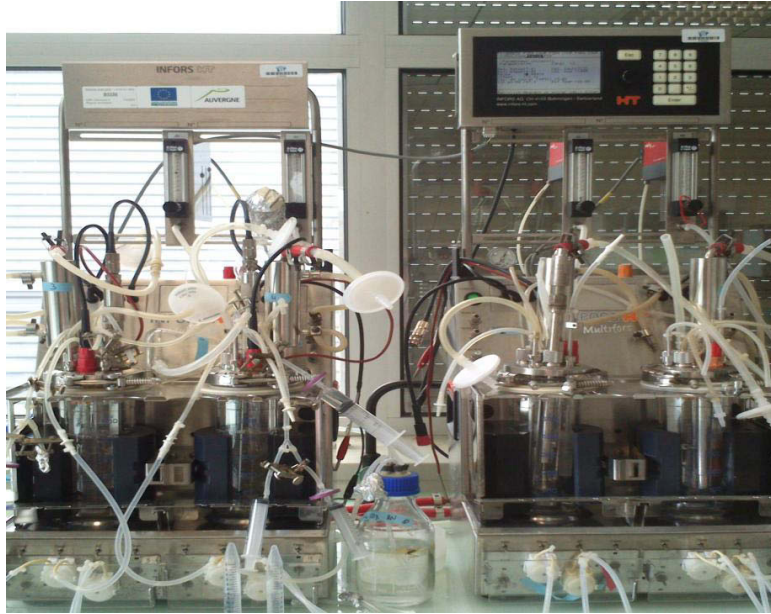


Figure II-3 : Bioréacteurs de 500 mL utilisés pour la caractérisation cinétique des bactéries nitrifiantes.

Ces réacteurs, fonctionnant en parallèle, permettent de réaliser des études dans les mêmes conditions et sont commercialisés par Infors-HT[®]. Il est alors possible de réaliser des réplicats de la même expérience en parallèle.

II.3.1.1 Description des réacteurs et du système de contrôle

Les bioréacteurs sont composés d'une cuve de 500 mL de volume utile. Sur chacun des réacteurs, différents piquages permettent d'insérer des sondes de pH, pO₂ et de température. Une pompe permet l'ajout d'une solution de base au sein du réacteur afin de maintenir le pH sélectionné et régulé par la station de contrôle des réacteurs. Le maintien de la température est assuré par un bloc thermo-régulé qui entoure le bioréacteur.

Le logiciel Iris (Infors-HT[®]) est utilisé pour le contrôle des réacteurs et l'acquisition on-line des paramètres de cultures comme le pH, la concentration en oxygène dissous ou encore la quantité de base ajoutée au cours de la culture.

II.3.1.2 Préparation des réacteurs et des solutions

Afin de réaliser les cultures dans des conditions axéniques, les réacteurs et le milieu de culture sont préparés afin d'être autoclavés. Les sondes pH et pO₂ sont étalonnées. Une solution de base (K₂CO₃ 2N ou KOH 1N) est préparée dans une bouteille de transfert. Un Erlenmeyer piqué est aussi préparé afin de réaliser l'inoculation de la biomasse dans le réacteur. Tous ces éléments sont autoclavés pendant 20 minutes à 121 °C, 1 bar.

Chapitre II

II.3.1.3 Stratégie et conditions de cultures

En sortie d'autoclave, les réacteurs sont réglés aux conditions sélectionnées décrites dans le Tableau II-8.

Tableau II-8 : Conditions de culture dans les bioréacteurs de 500 mL.

Température	28 °C
Débit d'air	0.3 L/min
pH	7.9
Agitation	200 rpm

Le milieu utilisé est celui spécifique de la souche en culture et, dans le cas d'une coculture, le milieu de coculture décrit en partie II.1.2 est utilisé.

Quand les réacteurs sont équilibrés, on inocule les bactéries dans les réacteurs. Les cultures sont réalisées en mode Fed-batch : des ajouts de substrats sont réalisés lorsque la croissance bactérienne atteint la phase stationnaire. Ce type de cultures permet d'obtenir des productions de biomasse maximale mais aussi de réaliser plusieurs phases de croissance afin de pouvoir réaliser l'identification des paramètres cinétiques.

II.3.2 Réacteur parfaitement agité (4L)

Un réacteur d'un volume utile de quatre litres BIOSTAT MD, B Braun Biotech International®, est utilisé pour réaliser des cocultures de *Nitrosomonas europaea* ATCC® 19718™ et *Nitrobacter winogradskyi* ATCC® 25931™, mais aussi pour réaliser une culture pure de *Cupriavidus pinatubonensis*.

II.3.2.1 Description du réacteur et du système de contrôle

Le réacteur utilisé de 4L de volume utile est similaire à ceux précédemment décrits dans la partie II.3.1.1. Cependant, il n'y a ici qu'un seul réacteur d'un volume utile de 4 L, Figure II-4.



Figure II-4 : Réacteur de 4 L pour la coculture de bactéries nitrifiantes en cellules libres.

La régulation de température est assurée par une double-enveloppe où circule de l'eau à la température sélectionnée.

Le logiciel MFCS, B Braun Biotech International®, recueille les données des paramètres on-line tels que le pH, la pression partielle en oxygène dissous (pO_2), la quantité de base ajoutée.

La préparation du réacteur et des solutions nécessaires à la culture est la même que celle décrite en Partie II.3.1.2.

*II.3.2.2 Stratégie et conditions de cultures pour les cocultures *N. europaea* – *N. winogradskyi**

Deux stratégies de cultures ont été appliquées pour la réalisation des cocultures. La première, stratégie A, est un Fed-batch basique, comme pour les cultures en 500 mL. La seconde, stratégie B, est mise en place dans le cas d'inoculum de faible concentration bactérienne. Les conditions de cultures dans les deux stratégies sont décrites dans le Tableau II-9.

Tableau II-9 : Conditions de culture pour la coculture de *Nitrosomonas europaea* et *Nitrobacter winogradskyi* dans le réacteur agité.

Température	28 °C
Débit d'air	0.5 L/min
pH	7.9
Agitation	250 rpm

II.3.2.2.1 Conditions de culture Stratégie A

Cette stratégie est utilisée dans le cas où l'inoculum présente une concentration en biomasse haute ($DO_{600nm} > 0.1$). C'est le cas lorsqu'on utilise une pré-culture provenant d'une culture en bioréacteur de 500 mL par exemple. Le volume d'inoculum détermine le volume de milieu de coculture placé dans le réacteur. Le volume du réacteur est fixe du début jusqu'à la fin de la culture. Des ajouts d'ammonium (NH_4Cl à 40 g/L, le volume ajouté est déterminé en fonction de la DO_{600nm}) sont réalisés quand la phase stationnaire de croissance est atteinte afin d'obtenir une biomasse plus importante.

II.3.2.2.2 Conditions de culture Stratégie B

Cette stratégie de culture est utilisée dans le cas où l'inoculum est de faible concentration bactérienne ($DO_{600nm} < 0.1$). C'est le cas, lorsqu'on utilise des cultures maintenues en Erlenmeyer notamment. Le volume final de quatre litres sera atteint en plusieurs phases contrairement à la Stratégie A, Tableau II-10.

Tableau II-10 : Phases de Fed-batch pour la stratégie B.

Phase 1	Volume milieu coculture (L)	1.8
	Volume inoculum (L)	0.2
	Volume final (L)	2
Phase 2	Volume milieu coculture ajouté (L)	0.5
	Volume final (L)	2.5
Phase 3	Volume milieu coculture ajouté (L)	0.5
	Volume final (L)	3
Phase 4	Volume milieu coculture ajouté (L)	1
	Volume final (L)	4

Le volume du bioréacteur augmente au cours de la culture. Selon la vitesse à laquelle les bactéries réalisent la nitrification, il est possible de combiner les phases 3 et 4 pour n'en former qu'une seule. Dans ce cas-là, 1.5 L de milieu de coculture seront directement ajoutés dans le bioréacteur.

Après ces différentes phases pour atteindre le volume final désiré de quatre litres, il est possible de réaliser des ajouts d'ammonium (NH_4Cl à 40 g/L, le volume ajouté est déterminé en fonction de la DO_{600nm}). Ces « pulses », de fortes concentrations, vont permettre d'augmenter la biomasse finale et la quantité de nitrate produit.

II.3.2.3 Stratégie et conditions de culture pour Cupriavidus pinatubonensis

Une culture pure de *C. pinatubonensis* en réacteur agité a été réalisée pour observer la croissance et les conditions préférentielles de la souche. Cette bactérie ayant un taux de croissance rapide (Tableau I-16), il n'est pas nécessaire d'adopter de stratégie de cultures comme indiqué précédemment pour *Nitrosomonas europaea* et *Nitrobacter winogradskyi*. Les conditions initiales de culture sont les mêmes que celles décrites dans le Tableau II-9. En fonction du métabolisme, les paramètres pourront être adaptés : si une limitation en oxygène apparaît, l'agitation et l'aération seront augmentées jusqu'à atteindre une concentration en oxygène dissous supérieure à 20 %.

II.3.3 La colonne à lit fixe

Les bactéries nitrifiantes ayant un taux de croissance faible, il était nécessaire de développer un réacteur permettant de concentrer le maximum de biomasse dans un volume minimum. S'inspirant des dispositifs en lit fixe utilisés en traitement des eaux, le compartiment 3 de la boucle MELiSSA est une colonne à lit fixe.

II.3.3.1 Description du pilote

La colonne à lit fixe présente à l'Institut Pascal est un bioréacteur en verre divisée en trois parties, Figure II-5.

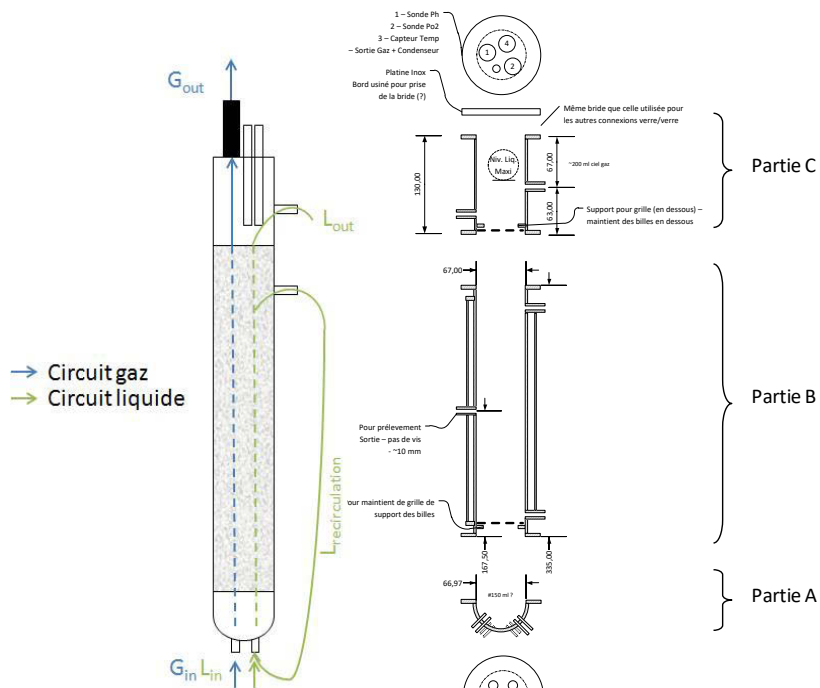


Figure II-5 : Vue éclatée de la colonne à lit fixe (droite) et représentation de l'hydrodynamique du réacteur (gauche).

La partie A de la colonne correspond à la partie située en bas du réacteur, la partie B est la partie tubulaire centrale et la partie C est la partie haute du bioréacteur. Les parties sont scellées entre elles par une bride en acier, l'étanchéité étant assurée par des joints toriques en caoutchouc. Au même emplacement, des grilles en acier permettent de délimiter le lit fixe présent dans la partie B. D'une hauteur totale de 465 mm et d'un diamètre interne de 60 mm, la colonne a un volume total de 1.25 L. Les volumes des parties A, B et C sont respectivement 90, 920 et 240 mL. Un piquage aux $\frac{3}{4}$ de la partie B est utilisé pour l'ajout de base dans le réacteur. Dans la partie C, deux piquages sont présents : un pour la recirculation liquide et un relié à un tank de stockage représentant la sortie du réacteur. Une recirculation liquide est mise en place au niveau de la partie haute de la colonne. Avec un débit six fois supérieur à celui d'alimentation du réacteur, le liquide entre en bas de la colonne de la même manière que l'alimentation liquide. Cette recirculation liquide permet une meilleure homogénéisation des composés et de l'oxygène au sein du bioréacteur.

II.3.3.2 L'installation de la colonne à lit fixe et le système de contrôle

La colonne à lit fixe fonctionne avec certains appareils périphériques. L'installation complète occupe environ deux mètres de paillasse, Figure II-6.

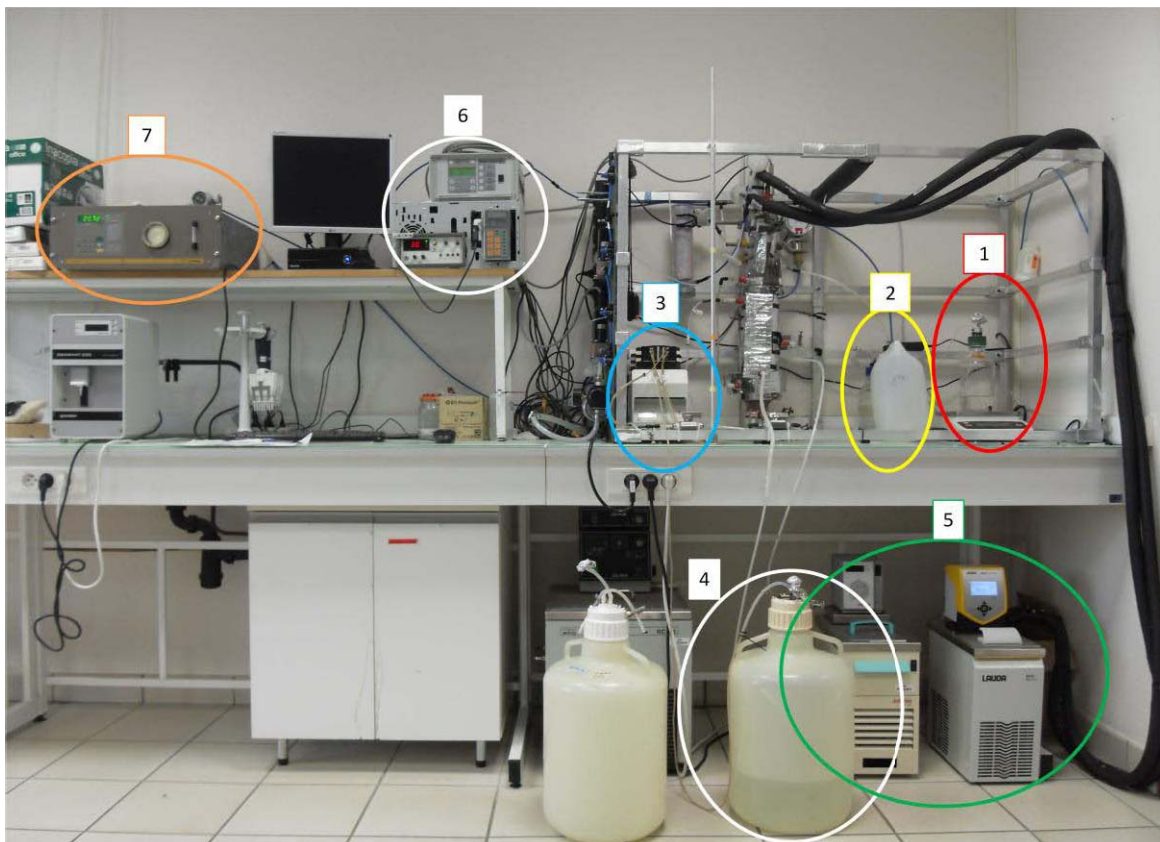


Figure II-6: La colonne à lit fixe présente à l'Institut Pascal et ses constituants. 1. Bouteille de base et balance ; 2. Bidon de stock de sortie de réacteur ; 3. Pompes péristaltiques ; 4. Bidon d'alimentation ; 5. Cryostat pour la régulation température de

la colonne et du condenseur ; 6. Unité d'acquisition des paramètres on-line ; 7. Analyse gaz placé en sortie de réacteur.

La régulation température du réacteur est assurée grâce à deux cryostats : un réglé sur 28°C maintient la température de culture (Julabo® F12) et un réglé sur 4°C est relié au condenseur et limite les pertes en eau par évaporation ainsi que les points de condensation dans le circuit en aval du condenseur (Lauda® ECO RE415). Le débitmètre massique utilisé pour réguler le débit entrant de gaz est un Start Mass Flow, Brooks®, et a une gamme de fonctionnement de 0 à 500 cm³/min. Deux pompes péristaltiques sont utilisées : une pour l'ajout de base (Minipulse2, Gibson®) et une pour la circulation liquide au sein du réacteur (Minipulse2, Gibson®). La pompe au premier plan sert à l'alimentation liquide de la colonne et aussi à la recirculation liquide. La pompe reliée à la base fonctionne via un boîtier de régulation pH HI 8711, HANNA Instruments®. Ce boîtier contient un relais qui actionne une pompe péristaltique permettant l'ajout de base lorsque la valeur du pH est en dessous de la valeur seuil. La valeur de base ajoutée au cours du temps est mesurée grâce à une balance (Sartorius®). Cette balance est reliée au système d'acquisition afin de mesurer en continu la masse de la bouteille de base et ainsi la quantité de base ajoutée au cours du temps. Le boîtier d'acquisition (Régulateur 3C 1.1 S.O₂, DEMCA®) de la concentration en oxygène dissous en haut de colonne est relié au système informatique assurant l'acquisition de toutes les données. Un analyseur de gaz (SIEMENS®) est placé en sortie de réacteur après le condenseur : la concentration en oxygène est acquise en temps réel. Un logiciel d'acquisition a été créé sous MatLab® afin de permettre l'acquisition des paramètres on-line tels que le pH, la pO₂, la quantité de base ajoutée, les pressions en bas et haut de colonne, les pressions partielles dans le gaz en sortie de colonne.

II.3.3.3 Support du lit fixe

Le biofilm bactérien nécessite un support pour pouvoir adhérer. Dans la colonne à lit fixe, des billes de polystyrène Biostyr® sont utilisées. Ces billes ont un diamètre de 4.1 mm. Le lit fixe représente un volume variant de 40 à 50 % du volume du lit fixe selon le compactage des billes à l'intérieur.

II.3.3.4 Préparation du réacteur et des solutions

La colonne à lit fixe est autoclavable comme un bioréacteur basique. Cependant, le lit fixe composé de billes de polystyrène n'est pas autoclavable. Une procédure de stérilisation chimique est alors mise en place.

II.3.3.4.1 Procédure de stérilisation de la colonne

La stérilisation chimique est basée sur la répétition de cycles de lavage avec des solutions successives d'acide stérile, d'eau stérile, de base stérile et de nouveau d'eau stérile. La

colonne est remplie de billes et branchée comme en fonctionnement continu afin de stériliser toutes les connexions utilisables. Les sondes sont mises en places pour être stérilisées aussi. Les cycles sont réalisés à un faible débit (0.45 mL/min) et sont les suivants :

- (i) Acide : HCl 2 N pendant 2 h
- (ii) Eau distillée pendant 2 h
- (iii) Base : NaOH 2 N pendant 2 h
- (iv) Eau distillée pendant la nuit

Les étapes (i)-(iv) sont répétées deux fois et à la fin de la dernière étape, le réacteur est rempli de milieu de coculture (partie II.1.2) en attente de l'inoculation.

II.3.3.4.2 Procédure de stérilisation des solutions et accessoires

Les solutions utilisées au cours de la culture comme les bidons d'alimentation ou les solutions de base sont autoclavées de manière classique (121 °C, 1 bar pendant 20 min). Des tuyaux des pompes péristaltiques sont autoclavés de façon à pouvoir les changer régulièrement lors des étapes de maintenance.

II.3.3.4.3 Calibration des débitmètres massique et des pompes d'alimentation

Le débitmètre est le composant qui assure un débit d'air injecté constant dans le réacteur. Il est exprimé en pourcentage et il est donc nécessaire de déterminer sa gamme de fonctionnement et d'établir une corrélation entre % et débit volumique de gaz. Cette équivalence est donnée par le graphique suivant :

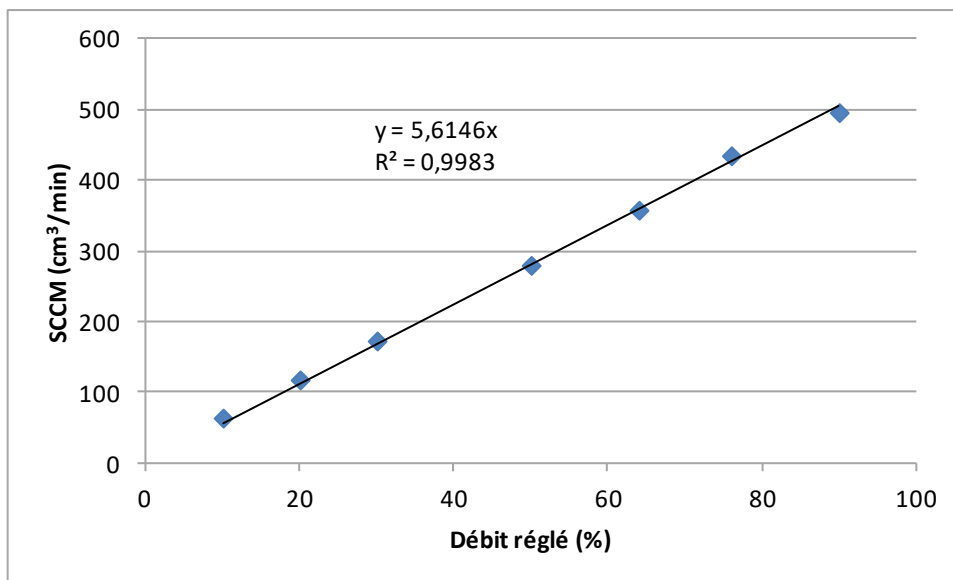


Figure II-7: Equivalence entre pourcentage et débit réel délivré par le débitmètre situé sur la colonne.

La pompe d'alimentation sert à la fois à l'alimentation liquide en azote et à la recirculation liquide qui participe au mélange du réacteur. Le débit de la recirculation est 6 fois plus grand que celui de l'alimentation. Comme une seule pompe péristaltique est utilisée et qu'il n'est pas possible de régler deux débits différents sur ce seul appareil, les diamètres des tuyaux utilisés ne sont pas les mêmes. Le tuyau d'alimentation a un diamètre de 1.02 mm, et celui de la recirculation liquide 3.17 mm, assurant un facteur 6 entre les deux débits, Figure II-8.

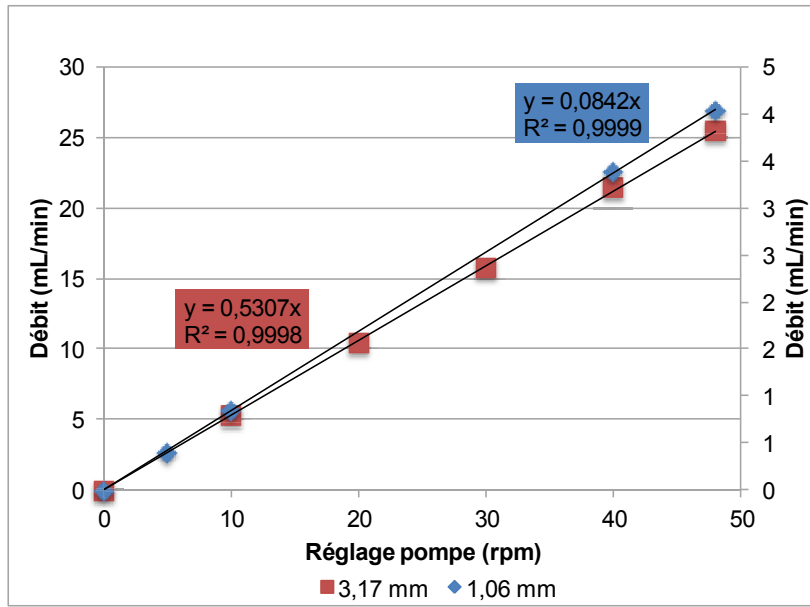


Figure II-8: Corrélation entre le réglage de la pompe et le débit assuré par les deux tuyaux sélectionnés.

Ces tuyaux sont sollicités 24 h/24, il est nécessaire de surveiller fréquemment leur état et de les remplacer avant qu'ils ne craquent et n'entraînent une vidange du réacteur.

II.3.4 Caractérisation des réacteurs

II.3.4.1 Détermination du K_La

Le coefficient de transfert volumétrique de l'oxygène K_La est un paramètre important dans la caractérisation d'un bioréacteur. Il a été déterminé en utilisant une méthode au sulfite (Poughon et al., 2003). Pour cela le bioréacteur est rempli et aéré avec un débit fixé. On place en sortie de condenseur un analyseur de gaz permettant de connaître la concentration en oxygène en sortie de réacteur. On note la fraction initiale d'oxygène dans l'air y_E , avant chaque essai, on ajoute au temps t_0 une solution en sulfites de concentration connue (Na_2SO_3 à 20 g/L dans le réacteur). En sortie de réacteur, la fraction molaire d'oxygène dans l'air y_S , est relevée quand le régime permanent est atteint. Ces deux données permettent de calculer le K_La du réacteur selon l'Equation II.9 pour la colonne à lit fixe (écoulement piston pour la phase gaz) et II.10 pour un réacteur parfaitement agité :

$$K_L a = \frac{\frac{1}{1-y_E} - \frac{1}{1-y_S} + \text{Ln}\left(\frac{y_E(1-y_S)}{y_S(1-y_E)}\right)}{\frac{V_L \times P}{G_E \times H_E(T)}} \quad (\text{II.9})$$

$$K_L a = \frac{G_E \times H_E(T)}{V_L \times P} \frac{y_E - y_S}{y_S} \quad (\text{II.10})$$

Avec y_E la fraction d'O₂ en entrée de réacteur,
 y_S la fraction d'O₂ en sortie de réacteur,
 V_L le volume liquide du bioréacteur (L),
 P la pression au sein du réacteur (Pa),
 G_E le débit de gaz en entrée de réacteur (mol·h⁻¹)
 $H_E(T)$ la constante de Henry propre à la solution utilisée (ici pour le sulfite à 20 g/L: 774.77 L·Pa·mol⁻¹)

L'Equation II.4 est utilisée dans des conditions où phase gazeuse est en « plug-flow ».

II.3.4.2 Détermination du temps de séjour T_R dans la colonne à lit fixe

Le temps de séjour correspond au temps moyen que met un composé pour traverser le réacteur. Pour le déterminer on utilise un traceur dont le suivi est assuré par colorimétrie ou conductimétrie pour les méthodes les plus courantes. Dans notre cas, la conductimétrie est utilisée pour suivre l'évolution d'un pulse d'une solution de NaCl à 100 g/L dans le réacteur (Villiermaux, 1994). Le suivi de la conductivité est assuré par une sonde (RadioMeter® CDC745-9) en sortie du réacteur à lit fixe et un conductimètre (RadioMeter® CDM210) dont l'acquisition en ligne est programmée toutes les secondes. L'acquisition de la conductivité est réalisée jusqu'à ce que le signal revienne à la valeur initiale, traduisant que la totalité du traceur a traversé le réacteur et n'y est plus présent. On injecte la solution saline à 100 g/L (2 mL) en entrée de réacteur, soit en bas de la colonne. Le temps de séjour T_R est calculé comme :

$$T_R = \frac{\sum (T_{n+1} - T_n) \times (\sigma_n T_n + \sigma_{n+1} T_{n+1}) / 2}{\sum \frac{(T_{n+1} T_n) \times (\sigma_{n+1} \sigma_n)}{2}} \quad (\text{II.11})$$

Avec T_n le temps n (h)

T_{n+1} le temps n+1 (h)

σ_n la conductivité au temps n (S/m)

σ_{n+1} la conductivité au temps n+1 (S/m)

II.4 Modélisation et méthodes numériques

II.4.1 Approche mécaniste de la modélisation

La modélisation dans MELiSSA suit une approche mécaniste divisée en deux parties, Figure II-9 :

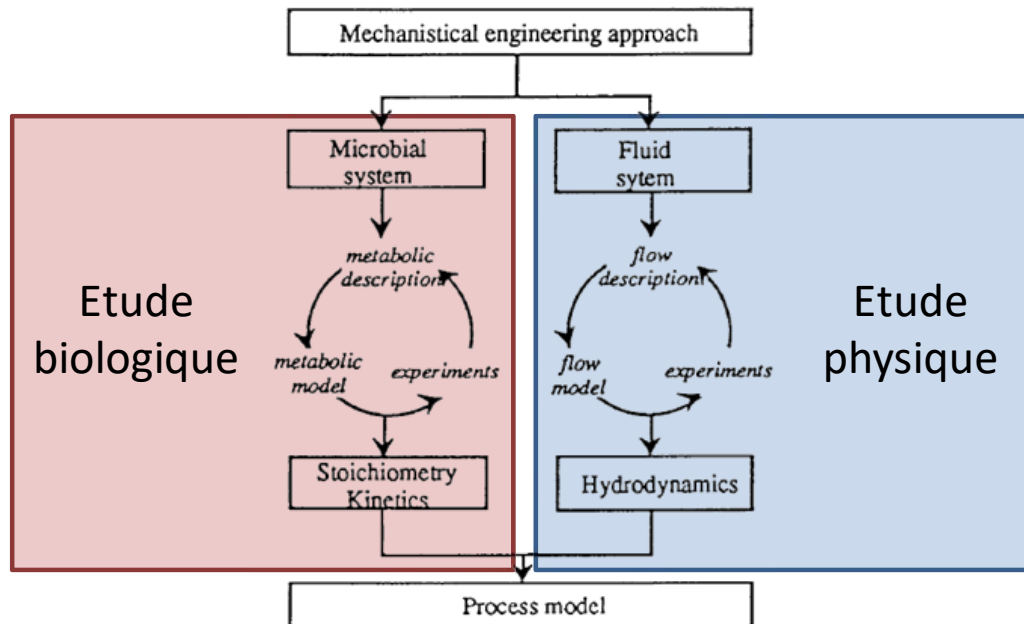


Figure II-9: Approche utilisée pour la modélisation de la nitrification à l'Institut Pascal.

L'étude biologique repose sur la caractérisation cinétique des souches utilisées dans le compartiment C3. Cette étude permet de déterminer le modèle biologique de la nitrification assurée par *Nitrosomonas europaea* et *Nitrobacter winogradskyi*. Cette étape englobe la détermination des cinétiques des deux souches utilisées mais aussi des réactions mises en jeu. La deuxième partie du modèle est l'étude physique du réacteur utilisé pour la nitrification. Cela englobe l'étude des flux gazeux et liquides, des distributions de temps de séjour, la détermination du coefficient volumétrique de transfert de l'oxygène, etc.

Ces deux études sont menées séparément et seront regroupées pour former le modèle du procédé général.

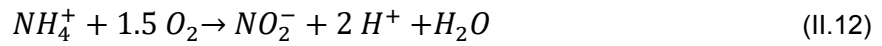
II.4.2 Modèle biologique de la nitrification

Pour *Nitrosomonas europaea* et *Nitrobacter winogradskyi*, le modèle a été divisé en deux parties :

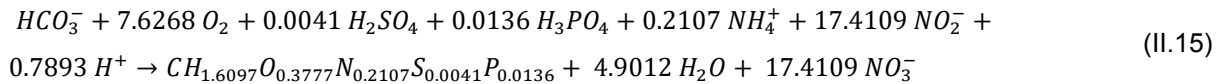
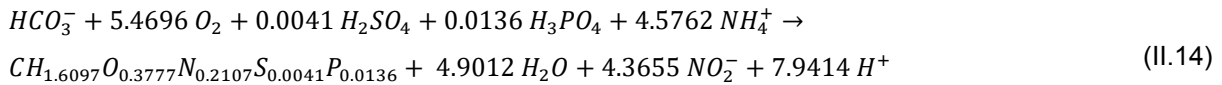
- La construction d'un modèle métabolique de la nitrification dont on peut déduire des équations stœchiométriques traduisant le principe de conservation des éléments, et à partir desquelles peuvent être calculés les rendements des réactions.
- Les cinétiques des réactions.

II.4.2.1 Modèle métabolique

Le modèle métabolique est basé sur les réactions mises en jeu lors de la nitrification. L'oxydation des éléments azotés assure la production d'énergie métabolique par la croissance et la maintenance (Poughon et al., 2001). Les équations stœchiométriques de la maintenance pour *Nitrosomonas europaea* et *Nitrobacter winogradskyi* sont décrites par les Equations II.12 et II.13 :



Les équations stœchiométriques représentant la croissance de *N. europaea* et *N. winogradskyi* sont respectivement traduites par les Equations II.9 et II.10 :



II.4.2.2 Modèle cinétique

Dans un deuxième temps, les cinétiques des réactions II.12, II.13, II.14 et II.15 seront établies pour compléter le modèle de nitrification. La détermination des modèles et de leurs paramètres fait l'objet du Chapitre III de cette thèse.

II.4.3 Modèle de la colonne de nitrification à lit fixe

II.4.3.1 Modèle N-tanks en série

Le réacteur du compartiment 3 de la boucle MELiSSA est une colonne à lit fixe (Figure II-5). L'objectif de la modélisation du réacteur est de représenter au mieux les échanges qui se déroulent au sein du réacteur que ce soit pour les composés liquides ou gazeux. Le modèle hydrodynamique choisi est un N-bacs en série avec rétro-mélange, déjà utilisé pour des expériences similaires (Pérez et al., 2005; Poughon et al., 1999), Figure II-10.

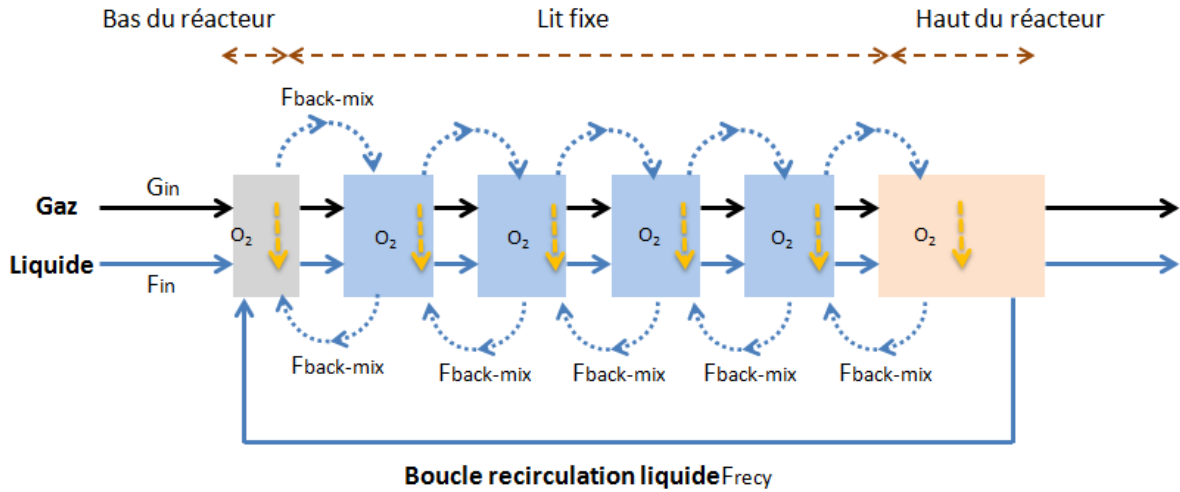


Figure II-10: Schéma du modèle N-tanks en série utilisé pour modéliser la colonne à lit fixe. G_{in} est le débit de gaz en entrée de réacteur, F_{in} celui de l'alimentation liquide ; F_{recy} est le débit de la boucle de recirculation liquide ; $F_{back-mix}$ représente le rétro-mélange entre les bacs du lit fixe.

Le nombre de bacs est déterminé lors d'études expérimentales afin de représenter au mieux les données expérimentales. Le système d'équation pour ce modèle de N-bacs en série est résumé dans le Tableau II-11 :

Tableau II-11: Modèle hydrodynamique de la colonne à lit fixe.

Liquide	$\frac{dVL^n \cdot S^n}{dt} = (F_{IN} + F_{RECY} + F_{Backmix}) \cdot (S^{n-1} - S^n) + F_{Backmix} \cdot (S^{n+1} - S^n) + VL^n \cdot RLS^n + VL^n \cdot RFS^n + VL^n \cdot EGLS^n$	(II.16)
	$\frac{dVL^1 \cdot S^1}{dt} = F_{IN} \cdot S_{IN} + F_{RECY} \cdot S^{N+2} + F_{Backmix} \cdot (S^2 - S^1) - (F_{IN} + F_{RECY}) \cdot S^1 + VL^1 \cdot RLS^1 + VL^1 \cdot EGLS^1$	(II.17)
	$\frac{dVL^{N+2} \cdot S^{N+2}}{dt} = (F_{IN} + F_{RECY} + F_{Backmix}) \cdot (S^{N+1} - S^{N+2}) + VL^{N+2} \cdot RLS^1 + VL^{N+2} \cdot EGLS^1$	(II.18)
Gaz	$\frac{dVG^n \cdot Sg^n}{dt} = (G_{IN} + G_{RECY}) \cdot (Sg^{n-1} - Sg^n) - VL^n \cdot EGLS^n$	(II.19)
	$\frac{dVG^1 \cdot Sg^1}{dt} = G_{IN} \cdot Sg_{IN} + G_{RECY} \cdot Sg^{N+2} - (G_{IN} + G_{RECY}) \cdot (Sg^1) - VL^n \cdot EGLS^n$	(II.20)
Solide	$\frac{dSb^n}{dt} = RFS^n$	(II.21)

Avec : n est l'indice du bac. n=1 pour la partie inférieure, n=N+2 pour la partie supérieure, et n=[2 ; N+1] pour le lit fixe

S^n est la concentration du composé S dans la fraction liquide dans le bac n (g/L)

Sg^n est la concentration du composé gazeux S dans le bac n (g/L)

Chapitre II

$\%Sg^n$ est le pourcentage du composé gazeux S dans le bac n (% moles)

$EGLs^n$ est le coefficient de transfert gaz/liquide (g/L)

RFs^n est la réaction catalysée par la biomasse fixée (g/L)

RLs^n est la réaction catalysée par la biomasse libre (g/L)

Tous les composés intervenant dans le procédé au sein de la colonne à lit fixe sont représentés grâce au modèle développé. De la même manière que le modèle biologique, des paramètres seront à déterminer par des expériences : N le nombre total de bacs du lit fixe, le K_La , le temps de séjour, les différents débits de liquide et de gaz...

Pour le modèle hydrodynamique, la croissance bactérienne est présente sous deux états :

- (i) la vitesse de croissance de la biomasse libre (en phase liquide) : RLx
- (ii) la vitesse de croissance des bactéries fixées en biofilm sur le support du lit fixe ou la croissance des bactéries fixées en biofilm sur les parois du réacteur en bas et en haut de la colonne : RFx

L'épaisseur du biofilm est également calculée par l'Equation II.22 lors de la croissance sur les billes et l'Equation II.23 lors de la croissance sur les parois du réacteur :

$$h = \frac{\text{Volume du biofilm}}{\text{Surface Billes}} = \frac{D_{\text{billes}}}{2} \left(\left(\frac{X^{\text{Fixée}} \cdot VL^n}{\rho_X \cdot V_{\text{Billes}}^n} + 1 \right)^{\frac{1}{3}} - 1 \right) \quad (\text{II.22})$$

Avec h: Epaisseur du biofilm sur une bille (m)

D_{billes} : Diamètre des billes de polystyrène (m)

ρ_X : Masse volumique de la biomasse (270 g/L)

$X^{\text{Fixée}}$: Concentration en biomasse fixée sur le support sous forme de biofilm (g/L)

VL^n : Volume liquide dans le bac n (L)

V_{Billes}^n : Volume du bac n dans le lit fixe (L)

$$h = \frac{\text{Volume du biofilm}}{\text{Volume parois du réacteur}} = \frac{X_{\text{fixée}}^{1, n+2} \cdot VL^{1, n+2} / \rho_X}{S_{\text{parois}}} \quad (\text{II.23})$$

Avec h : Epaisseur du biofilm dans les bacs 1 et n+2 (m)

$X_{\text{fixée}}^{1, n+2}$: Concentration de biomasse en biofilm dans les bacs 1 et n+2 (g/L)

$VL^{1, n+2}$: Volume liquide dans les bacs 1 et n+2 (L)

ρ_X : Masse volumique de la biomasse (270 g/L)

S_{parois} : Surface des parois du réacteur (m)

Le calcul de l'épaisseur du biofilm est un élément important du modèle dès l'instant où l'on prend en compte le problème de la limitation du substrat par diffusion dans le biofilm. Dans

Matériel et Méthodes

le cas de la nitrification, il est postulé que le principal substrat potentiellement limitant est l'oxygène ; aussi seule une limitation de la diffusion d'oxygène dans le biofilm est prise en compte (Figure II-11). L'épaisseur limite $h_{O_2}^{lim}$ pour laquelle la concentration en oxygène devient nulle est calculée par la relation II.24.

$$h_{O_2}^{lim} = \sqrt{\frac{2 \cdot O_2^n \cdot diff_{O_2}}{RF_{O_2}^n}} \quad (II.24)$$

Avec : $h_{O_2}^{lim}$: Epaisseur limite en O_2 (m)

O_2^n : Concentration en oxygène dissous dans le bac n (gO_2/L)

$diff_{O_2}$: Coefficient de diffusion de l' O_2 (m^2/h)

$RF_{O_2}^n$: Vitesse de consommation de l' O_2 ($gO_2/L.h$)

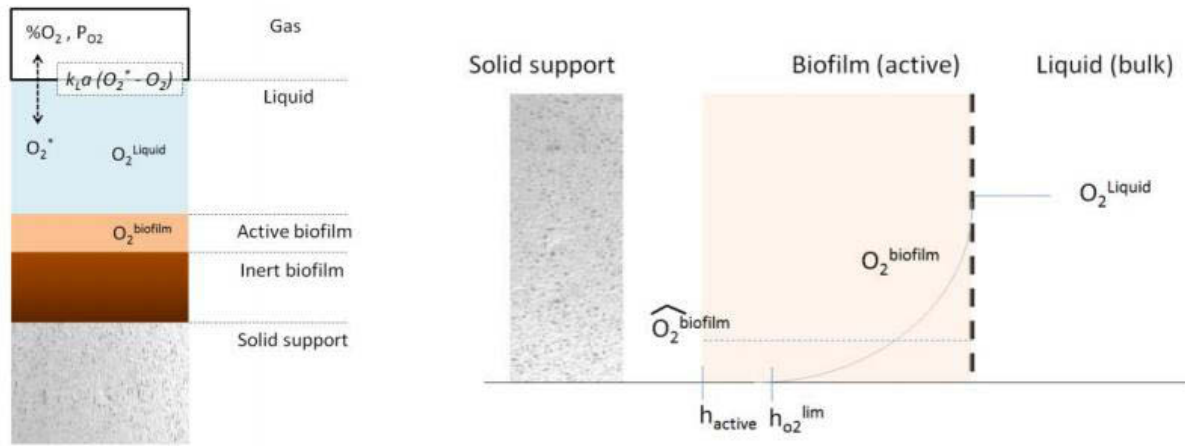


Figure II-11: Principe de la limitation de la diffusion en oxygène dans le biofilm.

Pour simplifier la prise en compte de la limitation par diffusion dans le biofilm dans le modèle, il a été choisi de faire porter le phénomène de limitation sur la quantité de biomasse capable de réaliser la réaction de nitrification :

$$\widehat{XF}^n = XF_{active}^n \cdot \left(\min \left\{ 1; \frac{h_{O_2}^{lim}}{3 \cdot h_{active}^n} \right\} \right)^2 \quad (II.25)$$

Avec : \widehat{XF}^n : Quantité de biomasse fixée en mesure d'effectuer la nitrification (g/L)

XF_{active}^n : Quantité de biomasse fixée active (vivante) dans le bac n (g/L)

$h_{O_2}^{lim}$: Epaisseur limite en O_2 (m)

h_{active}^n : Epaisseur du biofilm formé par la biomasse active dans le bac n (m)

Le modèle hydrodynamique est aussi capable de représenter aussi l'ajout de base dans le réacteur nécessaire pour maintenir le pH constant. Ce paramètre est basé sur la production d'ions H^+ engendré par l'oxydation de l'ammonium. Le contrôle pH est défini par :

Chapitre II

$$R_{base}^n = \frac{(RL_{H^+}^{Ns, n} + RL_{H^+}^{Nb, n} + RF_{H^+}^{Ns, n} + RF_{H^+}^{Nb, n})}{VL^n} \cdot \frac{1}{base_{H^+} \cdot base_{Molarité} \cdot 1000} \quad (II.26)$$

- Avec R_{base}^n : Taux d'addition de base dans le bac n (mL/min)
- $RL_{H^+}^{Ns, n}$: Taux de production de H^+ par *Nitrosomonas* non fixée
- $RL_{H^+}^{Nb, n}$: Taux de production de H^+ par *Nitrobacter* non fixée
- $RF_{H^+}^{Ns, n}$: Taux de production de H^+ par *Nitrosomonas* en biofilm
- $RF_{H^+}^{Nb, n}$: Taux de production de H^+ par *Nitrobacter* en biofilm
- VL^n : Volume liquide dans le bac n (L)
- $base_{H^+}$: Nombre de H^+ neutralisé par 1 mole de base ajoutée
- $base_{Molarité}$: Concentration molaire de la base ajoutée (mol/L)

Les différents paramètres intervenant dans le modèle sont regroupés dans le Tableau II-12:

Tableau II-12: Paramètres physiques et cinétiques utilisés dans le modèle de nitrification. Les lettres P, C et I signifient que le paramètre est respectivement défini par l'opérateur, doit être calibré ou mesuré et est une variable interne du programme.

Paramètres physiques du bioréacteur		
P	F.in (ml/min)	Débit de l'alimentation liquide
P	F.recy (ml/min)	Débit de la recirculation liquide
P	G.in (L/min)	Débit de gaz entrant
P	G.recy (L/min)	Débit de gaz de la boucle de recyclage
P	h-A (m)	Hauteur partie inférieure du réacteur
P	h-B (m)	Hauteur du lit fixe
P	h-C1 (m)	Hauteur partie supérieure jusqu'à circuit recirculation liquide
P	h-C2 (m)	Hauteur partie supérieure du réacteur
P	diam. (m)	Diamètre de la colonne
P	bead.diam (m)	Diamètre des billes du support
P	pH(regul&in_tank)	Valeur sélectionnée du pH
C	%Hold.Up'	Volume de gaz « hold-up »
C	structural.voidage	Degré de vide du lit fixe
C	f.back (ml/min)	Débit du mélange dans le lit fixe
C	Pressure (atm)	Pression en haut du réacteur
C	$K_L a.A.C$ (1/h)	$K_L a$ dans la partie supérieure et inférieure du réacteur -1 si calculé par corrélation
C	$K_L a$ (1/h)	$K_L a$ dans le lit fixe -1 si calculé par corrélation
C	O_2^* (g/l)	Concentration en oxygène dissous à saturation -1 si calculé par corrélation

Matériel et Méthodes

P	NH3.in (g/l)	Concentration entrante en NH ₃	
P	HNO2.in (g/l)	Concentration entrante en NO ₂ ⁻	
P	HNO3.in (g/l)	Concentration entrante en NO ₃ ⁻	
P	O2.liq.in (g/l)	Concentration entrante en O ₂	
P	O2.gas.in (%)	Fraction d'O ₂ dans le gaz entrant	
P	Ns.E.Free.in (g/l)	Concentration de <i>N. europaea</i> dans l'alimentation liquide	
P	Nb.W.Free.in (g/l)	Concentration de <i>N. winogradskyi</i> dans l'alimentation liquide	
C	N.bacs	Nombre de bacs sélectionnés, N+2 pour description du réacteur	
I	bio_density (g/l)	Concentration en biomasse	
I	diff_o2_biofilm (m ² /h)	Diffusion de l'O ₂ dans le biofilm	
P	Temperature (°K)	Température de culture	
I	gas_mol_volume (L/mol)	Volume molaire du gaz à 30°C, 1atm.	
Constantes cinétiques des souches nitrifiantes			
I	<i>Nitrosomonas europaea</i>	<i>Nitrobacter winogradskyi</i>	
	μ _{max}	μ _{max}	Taux de croissance maximale (h ⁻¹)
	m	m	Terme de maintenance
	b	lethal	Taux de létalité
	K(NH3)	K(NH3)	Constante de saturation pour NH ₃
	K(O2)	K(O2)	Constante de saturation pour l'O ₂
		K(HNO2)	Constante de saturation pour NO ₂ ⁻
	YX(NH3)	YX(NH3)	Rendement NH ₃ /biomasse
	YX(O2)	YX(O2)	Rendement O ₂ /biomasse
	YX(HNO2)	YX(HNO2)	Rendement NO ₂ ⁻ /biomasse
	YXH	YXH	Rendement H ⁺ /biomasse
		YX(HNO3)	Rendement NO ₃ ⁻ /biomasse
	Ym(NH3)		Rendement NH ₃ pour maintenance
		Ym(HNO3)	Rendement NO ₃ ⁻ pour maintenance
	Ym(O2)	Ym(O2)	Rendement O ₂ pour maintenance
	Ym(HNO2)	Ym(HNO2)	Rendement NO ₂ ⁻ pour maintenance
	YmH	YmH	Rendement H ⁺ pour maintenance

II.4.3.2 NitriSim

NitriSim est une « toolbox » développée sous Matlab® pour décrire le système d'équations différentielles ordinaires (ODE) du modèle de nitrification en colonne à lit fixe décrit dans le Tableau II-11. Le solveur ode15s, utilisé pour résoudre le système d'équations, est basé sur la méthode Numerical Differentiation Formula (NDF), et permet de gérer des systèmes d'équations que des solveurs plus simples, comme ode45, n'arrive pas à résoudre.

L'interface de NitriSim permet de gérer l'ensemble des paramètres manipulables du modèle (Tableau II-12), Figure II-12.

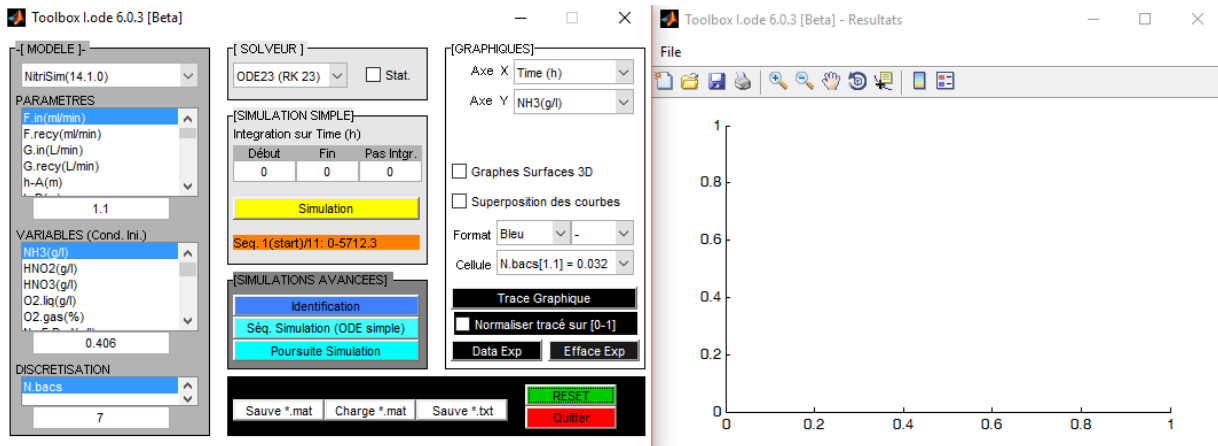


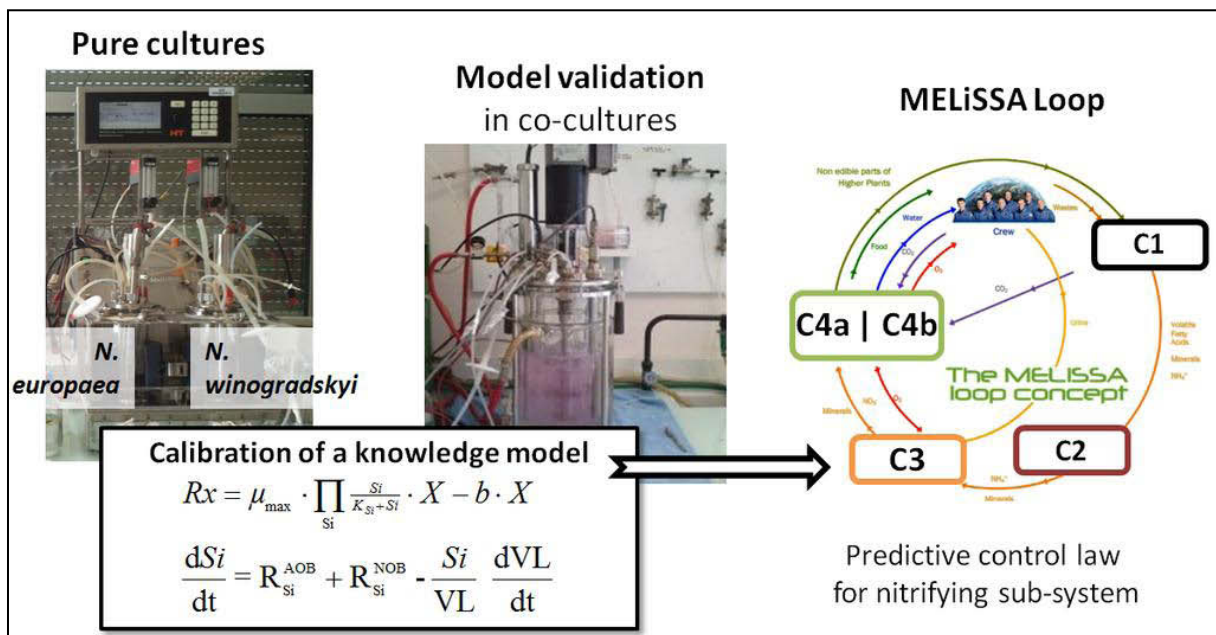
Figure II-12: Interface de NitriSim pour résoudre le système d'équations.

La suite de ce manuscrit est divisée en trois parties. Le Chapitre III porte sur la réalisation de cultures pures de chacune des souches bactériennes. Ces cultures ont pour objectif le calcul des paramètres cinétiques propres à chaque souche. Dans une seconde partie de ce chapitre, le modèle de nitrification est calibré et validé sur des cocultures de *N. europaea* et *N. winogradskyi*. Le Chapitre IV porte sur l'étude de la nitrification dans une colonne à lit fixe par *N. europaea* et *N. winogradskyi*. Dans un premier temps, la caractérisation physique du réacteur a été réalisée pour permettre l'ajustement du modèle NitriSim. Le réacteur a ensuite été inoculé avec une coculture des deux bactéries nitrifiantes et progressivement placé en mode de fonctionnement continu. Durant cette étude, différentes charges entrantes en azote ont été appliquées sur le réacteur afin d'étudier la réponse de la biomasse. Différents temps de séjour ont aussi été testés pour évaluer les conditions de fonctionnement du réacteur pour lesquelles la nitrification est toujours totale. Le Chapitre V présente des résultats préliminaires de l'élimination de l'urée dans la colonne à lit fixe grâce à l'ajout d'une troisième souche : *Cupriavidus pinatubonensis*. Des cultures pures ont été réalisées pour déterminer le taux de croissance maximum de *C. pinatubonensis*. Cette souche a ensuite été ajoutée dans la colonne à lit fixe pour assurer la transformation de l'urée en nitrate grâce à la tri-culture composée de *C. pinatubonensis*, *N. europaea* et *N. winogradskyi*.

Dans chacun de ces chapitres, l'aspect modélisation est une part intégrante des résultats. Les expériences présentées servent à la caractérisation d'un ECLSS, la prédiction et le contrôle sont donc des aspects essentiels des résultats obtenus.

Chapitre III

Cultures pures libres de *N. europaea*
ATCC® 19718 et *N. winogradskyi*
ATCC® 25391



Résumé graphique du Chapitre III : Cultures pures de *Nitrosomonas europaea* et *Nitrobacter winogradskyi* permettant la définition des paramètres cinétiques des deux souches dans le modèle NitrSimR. Des cultures mixtes sont utilisées pour valider ce modèle de nitrification.

Chapitre III : Cultures pures libres de *N. europaea* ATCC® 19718 et *N. winogradskyi* ATCC® 25391

La modélisation de la nitrification pour MELiSSA repose sur une approche mécaniste, Figure II-9. Cette approche est basée sur l'étude stœchiométrique des réactions impliquées et des cinétiques qui y sont liées. Les équations stœchiométriques des réactions impliquées dans la nitrification ont déjà été établies. Cependant, dans le cadre de MELiSSA, les cinétiques n'avaient jamais été caractérisées. Ce chapitre regroupe les résultats obtenus lors des cultures libres de *N. europaea* ATCC® 19718 et *N. winogradskyi* ATCC® 25391. Les résultats de ces cultures ont permis de déterminer des paramètres essentiels pour le modèle cinétique : le taux de croissance μ_{max} , le taux de létalité b et le terme de maintenance m . Le modèle, alors calibré, a été utilisé et validé dans des cultures mixtes des deux bactéries. Ces cocultures ont aussi mis en évidence deux paramètres facilement mesurables pouvant être utilisés comme indicateurs de la nitrification partielle. Les résultats présentés dans ce Chapitre ont fait l'objet d'une publication dans le journal *Bioresource Technology* (Annexe 1) :

Cruvellier, N., Poughon, L., Creuly, C., Dussap, C. G., & Lasseur, C. (2016). Growth modelling of *Nitrosomonas europaea* ATCC® 19718 and *Nitrobacter winogradskyi* ATCC® 25391: A new online indicator of the partial nitrification. *Bioresource Technology*, 220, 369-377

III.1 La modélisation de la nitrification

III.1.1 Le modèle stœchiométrique

Le modèle stœchiométrique de la nitrification est basée sur les 4 réactions décrivant la croissance et la maintenance de *N. europaea* ATCC® 19718 et *N. winogradskyi* ATCC® 25391, Eq II.12 à Eq II.15. Ces équations ont permis de calculer les rendements des réactions de maintenance et de croissance (Tableau III-1):

Tableau III-1: Rendements théoriques des réactions de croissance et maintenance pour *Nitrosomonas europaea* et *Nitrobacter winogradskyi* (Poughon et al., 2001).

	<i>Nitrosomonas europaea</i> ATCC® 19718		<i>Nitrobacter winogradskyi</i> ATCC® 25391	
	$Y_{S/X}$ (gS/gX) pour la croissance	Y_{S/NH_4^+} (gS/gN-NH ₄ ⁺) pour la maintenance	$Y_{S/X}$ (gS/gX) pour la croissance	$Y_{S/N-NO_2^-}$ (gS/gN-NO ₂ ⁻) pour la maintenance
N-NH₄⁺	-2.7667	-1	-0.1274	--

N-NO₂⁻	2.6394	1	-10.5266	-1
N-NO₃⁻	0	--	10.5266	1
O₂	-7.5586	-3.4286	-0.3294	-1.1429
HCO₃⁻	-2.6351	--	-0.0432	--
H⁺*	0.3429	0.1429	-0.0341	--

*calculé à partir des formes ioniques du composé impliqué dans la réaction

III.1.2 Le modèle cinétique

Différents modèles cinétiques peuvent être utilisés pour modéliser la nitrification réalisée par *Nitrosomonas europaea* et *Nitrobacter winogradskyi* (Tableau III-2).

Tableau III-2: Modèles cinétiques de Pirt utilisés pour la description de bactéries nitrifiantes.

P1	Modèle de Pirt simple	$\mu_{obs} = \mu - b$ $q_{obs} = Y_{S/S_{maint}} \cdot \text{lim} \cdot m_c + Y_{S/X} \cdot \mu$
P2	Modèle de Pirt avec un terme de maintenance variable (dépendant de la croissance) et un constant	$\mu_{obs} = \mu - b$ $q_{obs} = Y_{S/S_{maint}} \cdot \text{lim} \cdot \left(m_c + m_v \cdot \left(1 - \frac{\mu}{\mu_{max}} \right) \right) + Y_{S/X} \cdot \mu$
P3	Modèle de Pirt où la létalité dépend de la maintenance	$\mu_{obs} = \mu + \frac{m_c}{Y_{S_{maint}/X}} \left(1 - \frac{\mu}{\mu_{max}} \right)$ $q_{obs} = Y_{S/S_{maint}} \cdot \text{lim} \cdot m_c + Y_{S/X} \cdot \mu$
P4	Adaptation des modèles P2 et P3	$\mu_{obs} = \mu - b \left(1 - \frac{\mu}{\mu_{max}} \right)$ $q_{obs} = Y_{S/S_{maint}} \cdot \text{lim} \cdot \left(m_c + m_v \cdot \left(1 - \frac{\mu}{\mu_{max}} \right) \right) + Y_{S/X} \cdot \mu$

Avec : μ_{obs} : taux de croissance observé (h⁻¹)

μ : taux de croissance spécifique (h⁻¹)

b : taux de létalité (h⁻¹)

q_{obs} : taux de consommation du substrat observé (gS.gX⁻¹.h⁻¹)

$Y_{(S/S_{maint})}$: rendement massique du substrat pour la réaction de maintenance (gS.gX⁻¹)

Lim : terme de limitation

m_c : coefficient constant de maintenance (g_{substrat}.gX⁻¹.h⁻¹)

m_v : coefficient variable de maintenance (g_{substrat}.gX⁻¹.h⁻¹)

$Y_{S/X}$: Rendement massique du substrat pour la réaction de croissance (gS.gX⁻¹)

Ces modèles sont ceux trouvés le plus fréquemment dans la littérature. En revanche, beaucoup d'auteurs se sont intéressés aux souches extraites d'échantillons environnementaux (Tableau I-12). Dans le cadre du projet MELiSSA, les souches avec lesquelles nous travaillons sont des souches pures fournies par l'ATCC®. Une partie du

travail de caractérisation du compartiment C3 repose sur la caractérisation de ces souches ATCC®.

Un modèle de Pirt avec létalité a été choisi pour représenter la croissance de *Nitrosomonas europaea*. Les paramètres cinétiques à déterminer sont le taux de létalité b , le taux de croissance maximal μ_{\max} et le terme de maintenance m . Le modèle choisi est décrit par les Equations III.27 et III.28:

$$\mu_{obs} = \mu - b, \text{ avec } \mu = \mu_{\max} \cdot \lim_G \quad (\text{III.27})$$

$$q_{obs} = Y_{S/S_{maint}} \cdot \lim \cdot m + Y_{S/X} \cdot \mu_{\max} \quad (\text{III.28})$$

Avec μ_{obs} : taux de croissance spécifique observé (h^{-1})

μ : taux de croissance spécifique (h^{-1})

b : taux de létalité (h^{-1})

μ_{\max} : taux de croissance maximum (h^{-1})

\lim_G : terme de limitation de la croissance par le substrat

q_{obs} : taux de consommation du substrat observé ($gS \cdot gX^{-1} \cdot h^{-1}$)

$Y_{S/S_{maint}}$: rendement de maintenance ($gS/g_{substrat \text{ maintenance}}$)

\lim : terme de limitation de la maintenance par le substrat

m : coefficient de maintenance ($g_{S_{maint}} \cdot gX^{-1} \cdot h^{-1}$)

$Y_{S/X}$: Rendement de consommation du substrat sur la production de biomasse théorique ($gS \cdot gX^{-1}$)

Les rendements théoriques utilisés, sont ceux décrits par les équations stœchiométriques (Tableau III-1).

Le taux de létalité b , est identifié à partir des courbes de biomasse en absence de substrat. Ce paramètre est alors calculé par régression linéaire à partir de la courbe de croissance bactérienne tracée en échelle logarithmique : $\ln X = \mu_{obs} \cdot t$, avec $\mu_{obs} = \mu_{\max} - b$. Dans un contexte où il n'y a plus de substrat à consommer et qu'il n'y a donc pas de croissance, le μ_{\max} est nul, le taux de létalité est alors identifié comme : $\mu_{obs} = -b$.

Le paramètre m peut être calculé à partir de l'Equation III.29 :

$$q_{obs} = Y_{S/S_{maint}} \cdot m + Y_{S/X} \cdot (\mu_{obs} + b) \text{ avec } \lim = 1 \text{ et } \lim \neq \lim_G \quad (\text{III.29})$$

Avec q_{obs} : Taux de consommation du substrat observé ($gS \cdot gX^{-1} \cdot h^{-1}$)

$Y_{S/S_{maint}}$: Rendement de maintenance ($gS/g_{substrat \text{ maintenance}}$)

m : Coefficient de maintenance ($g_{S_{maint}} \cdot gX^{-1} \cdot h^{-1}$)

$Y_{S/X}$: Rendement de croissance théorique ($gS \cdot gX^{-1}$)

μ_{obs} : Taux de croissance spécifique observé (h^{-1})

b : Taux de létalité (h^{-1})

lim et lim_G : Termes de limitation respectivement de la maintenance et de la croissance par le substrat

Dans le calcul du terme de maintenance, on différencie la limitation de la croissance et la limitation de la réaction de maintenance. En effet, si la croissance est limitée sans que le substrat soit manquant alors, l'inhibition n'est pas supposée affecter la réaction de maintenance.

III.2 Les cultures pures de *Nitrosomonas europaea* ATCC® 19718 et *Nitrobacter winogradskyi* ATCC® 25391

III.2.1 Objectifs et plan expérimental

Les objectifs de ces cultures pures des souches *N. europaea* ATCC® 19718 et *N. winogradskyi* ATCC® 25391 sont :

- La détermination des paramètres cinétiques des deux souches ATCC® essentiels pour le modèle de nitrification : taux de croissance maximum μ_{max} , taux de létalité b et terme de maintenance m
- La répétition de fed-batch pour atteindre la concentration maximale en biomasse

III.2.2 Réalisation des cultures pures

Le plan expérimental est le même pour les deux souches. Plusieurs ajouts de substrats sont réalisés durant les cultures (Tableau III-3) ; l'objectif est de répéter les phases de croissance maximale pour obtenir plusieurs calculs du taux de croissance maximale μ_{max} et une concentration maximale en biomasse.

Tableau III-3: Caractéristiques des cultures pures de *Nitrosomonas europaea* et *Nitrobacter winogradskyi*.

	<i>Nitrosomonas europaea</i> ATCC® 19718	<i>Nitrobacter winogradskyi</i> ATCC® 25391
Milieu de culture	ATCC® 2265	ATCC® 480
Solution ajoutée	NH ₄ Cl	NaNO ₂
Nombre de Fed-batch	3	5
Concentration des ajouts	1.55 gN-NH ₄ ⁺ /L	0.3 gN-NO ₂ ⁻ /L

L'inoculation des réacteurs est réalisée avec une pré-culture de la souche qui est aliquotée extemporanément. La pré-culture est obtenue par repiquage d'une culture liquide comme décrit en Partie II.1.3. Les ajouts de substrat sont réalisés après l'observation d'une phase de décroissance cellulaire dans le réacteur. Ces phases de déclin seront utilisées pour calculer le taux de létalité b , de chaque souche.

III.2.3 Les cultures pures de *Nitrosomonas europaea*

III.2.3.1 *Suivi de biomasse*

Le suivi de la concentration en biomasse est réalisé par lecture de la densité optique à 600 nm dont les valeurs sont converties en concentration massique en utilisant l'équivalence : 1 unité DO_{600nm} équivaut à $0.45 \text{ g}_{\text{Biomasse}}/\text{L}$. Cette corrélation biomasse/poids sec est une moyenne expérimentale. Les concentrations bactériennes obtenues durant les cultures pures de *N. europaea* varient pour chacun des réacteurs, Figure III-1 :

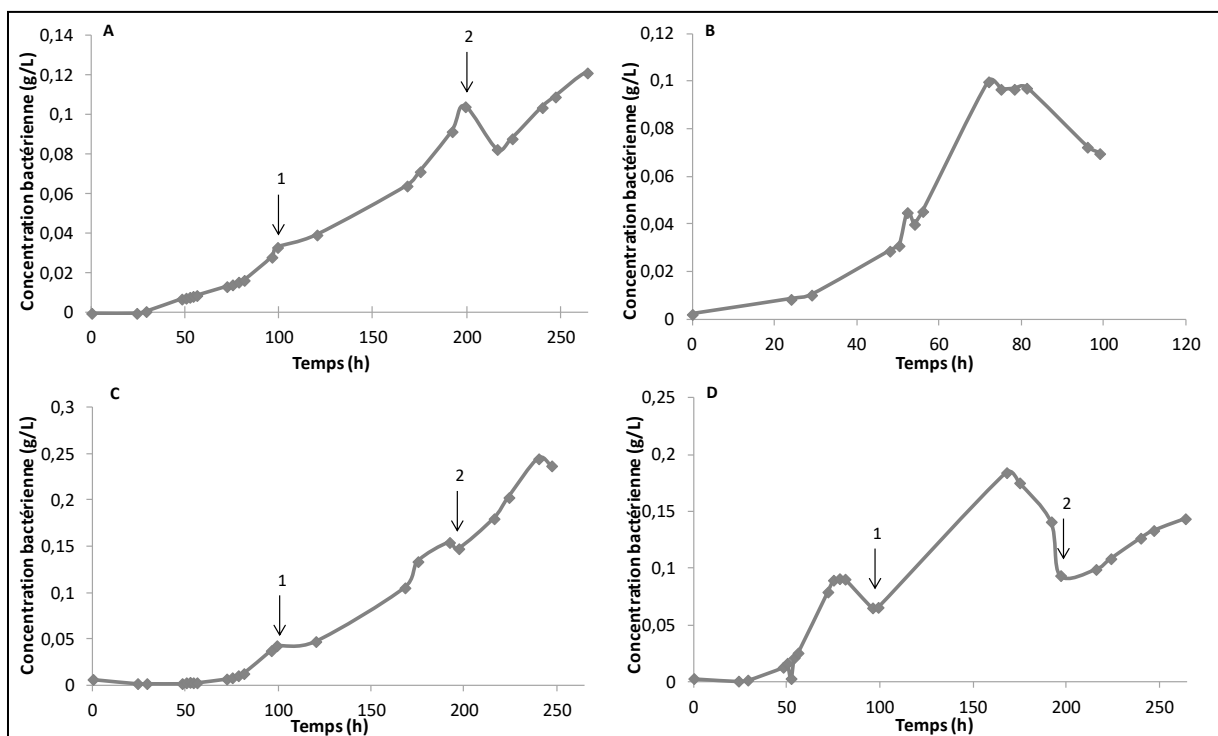


Figure III-1: Evolution de la concentration bactérienne durant les cultures pures de *Nitrosomonas europaea*. A. Réacteur 1 ; B. Réacteur 2 ; C. Réacteur 3 ; D. Réacteur 4 ; les flèches 1 et 2 représentent respectivement les ajouts 1 et 2 d'ammonium dans chaque réacteur. Le réacteur 2 (B) a été arrêté plus tôt en raison d'un problème technique.

Il y a trois phases de consommation de substrat dans chacun des réacteurs excepté le Réacteur 2 qui a été arrêté après la phase 1 en raison d'un problème technique. La première phase correspond à la consommation du substrat présent initialement dans le milieu de

culture. La phase 2 correspond à la consommation de l'ammonium apporté par l'ajout 1 (flèche 1 sur Figure III-1). La phase 3 correspond à la consommation de l'ammonium apporté par l'ajout 2 (flèche 2 sur Figure III-1). A la fin des trois phases de consommation d'ammonium, la concentration bactérienne atteint 0.122, 0.245 et 0.147 $\text{g}_{\text{Biomasse}}/\text{L}$ respectivement dans les réacteurs 1, 3 et 4.

III.2.3.2 Suivi des composés azotés

Le suivi des composés est réalisé dans chacun des réacteurs, Figure III-2 :

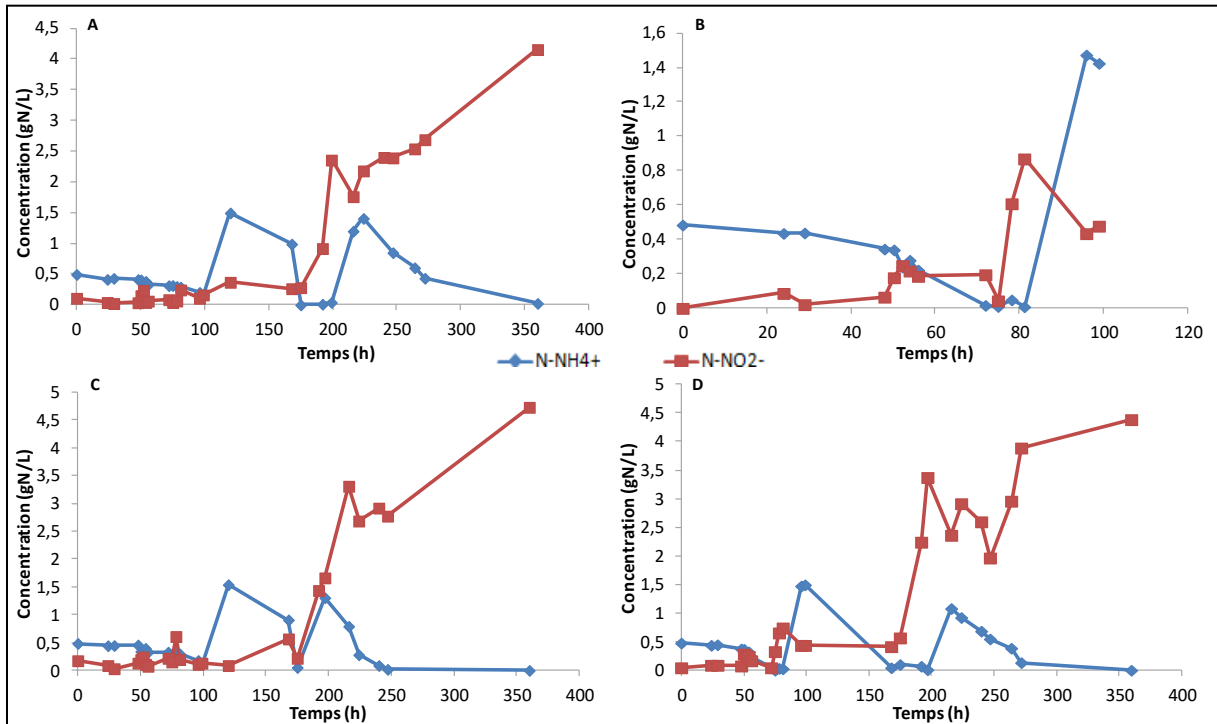


Figure III-2: Evolution des concentrations en ammonium et nitrite (gN/L) dans chaque réacteur durant les cultures pures de *Nitrosomonas europaea*. A. Réacteur 1 ; B. Réacteur 2 ; C. Réacteur 3 ; D. Réacteur 4 ; N-NO₂⁻ : carré rouge ; N-NH₄⁺ : losange bleu.

A la fin des trois phases de consommation d'ammonium, la concentration en nitrite atteint respectivement 4.44, 4.71 et 4.38 $\text{gN-NO}_2^-/\text{L}$ dans les réacteurs 1, 3 et 4. Le seuil d'inhibition de la croissance de *Nitrosomonas europaea* par le nitrite est 0.276 $\text{gN-NO}_2^-/\text{L}$ (Stein and Arp, 1998). A la phase de la première phase d'oxydation, le seuil n'est pas encore atteint puisque les concentrations en nitrite dans les réacteurs 1, 3 et 4 sont respectivement de 0.174, 0.196 et 0.240 $\text{gN-NO}_2^-/\text{L}$. Le nitrite n'a pas d'effet inhibiteur sur la croissance lors de la première phase d'oxydation de l'ammonium mais dans les phases suivantes, une inhibition de la croissance pourrait être observée.

III.2.3.3 Détermination des paramètres cinétiques

Les paramètres cinétiques sont déterminés en suivant la méthode décrite dans la Partie III.1.2. Le taux létalité a pu être calculé sur certaines phases lors des cultures pures de *N. europaea* et une valeur moyenne de 0.003 h^{-1} a été obtenue.

Le taux de croissance maximum μ_{\max} est identifié à partir de la phase de croissance exponentielle et donc non limitante de croissance et est défini par l'Equation III.27. Le taux de croissance spécifique observé μ_{obs} est calculé comme étant le coefficient directeur de la courbe de croissance bactérienne tracée en échelle logarithmique en fonction du temps, Figure III-3 :

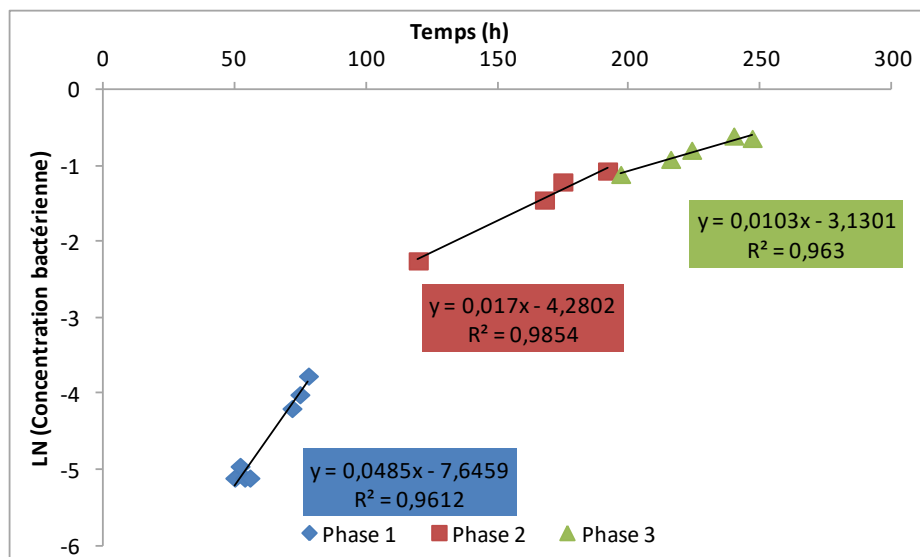


Figure III-3: Détermination du taux de croissance spécifique observé μ_{obs} par régression linéaire pour le Réacteur 3 durant les cultures pures de *Nitrosomonas europaea*.

Le calcul du μ_{obs} pour les cultures pures de *N. europaea* a mis en évidence une variation des valeurs entre les trois phases : pour les phases 2 et 3, le μ_{obs} calculé est plus faible que celui de la phase 1 (Tableau III-4).

Tableau III-4: Détermination du taux de croissance spécifique observé μ_{obs} par phase et par réacteur pendant les cultures pures de *N. europaea*. Les écarts-type sont donnés entre parenthèses.

	Phase 1	Phase 2	Phase 3
Réacteur 1	0.026 (0.001)	0.011 (0.001)	0.008 (0.001)
Réacteur 2	0.057 (0.006)	ND	ND
Réacteur 3	0.049 (0.004)	0.017 (0.002)	0.010 (0.001)
Réacteur 4	0.074 (0.002)	0.015 (0.001)	0.010 (0.001)
μ_{obs} moyen	0.051 (0.020)	0.014 (0.003)	0.010 (0.002)

Cette observation a permis de constater que seule la première phase de consommation de substrat correspond à une phase de croissance exponentielle. Entre les phases 1 et 2, le μ_{obs} moyen est divisé par 3.5 et entre les phases 1 et 3, il est divisé par 5. Ainsi, l'hypothèse émise dans la Partie III.2.3.2 a été vérifiée : dans les phases 2 et 3 la croissance de *Nitrosomonas europaea* est inhibée par le nitrite produit et ces phases ne peuvent être utilisées pour déterminer les caractéristiques cinétiques de la souche. La valeur retenue de μ_{obs} pour *Nitrosomonas europaea* est la valeur moyenne calculée sur la phase 1 pour les 4 réacteurs : $\mu_{\text{obs}} = 0.051 \text{ h}^{-1}$.

Les valeurs du taux de croissance spécifique μ_{obs} et du taux de létalité b étant définies pour *Nitrosomonas*, il est alors possible de calculer le taux de croissance maximum μ_{max} comme défini dans l'Equation III.27 : $\mu_{\text{max}} = 0.054 \text{ h}^{-1}$.

Durant les cultures pures de *Nitrosomonas europaea*, le taux de consommation du substrat observé q_{obs} , le rendement massique du substrat observé $Y_{S/X}^{\text{observé}}$ et le terme de maintenance m ont donc été calculés. Le qualificatif « observé » signifie que les valeurs ont été déterminées expérimentalement. Le terme de maintenance m est obtenu à partir de la courbe $q_{\text{obs}}=f(\mu_{\text{obs}})$, Figure III-4.

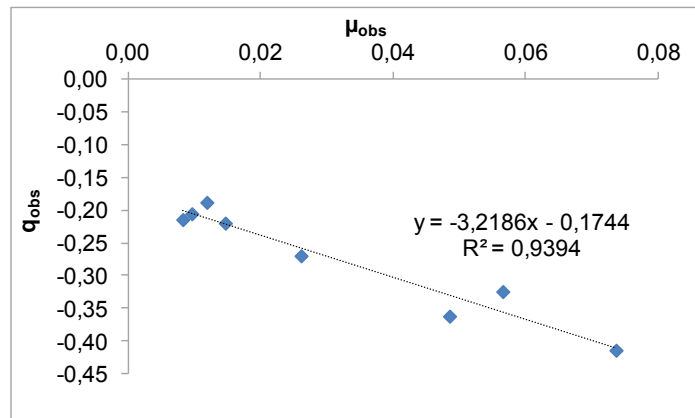


Figure III-4: Courbe $q_{\text{obs}}=f(\mu_{\text{obs}})$ pour les cultures pures de *Nitrosomonas europaea*.

Le rendement $Y_{S/X}^{\text{observé}}$ correspond au coefficient directeur de la droite de corrélation de la Figure III-4, sa valeur est $-3.22 \text{ gN-NH}_4^+ \cdot \text{gX}^{-1}$. Le q_{obs} calculé pour les cultures pures de *N. europaea* est $-0.282 \text{ gN-NH}_4^+ \cdot \text{gX}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$. Le terme de maintenance m correspond à l'ordonnée à l'origine de la courbe $q_{\text{obs}}=f(\mu_{\text{obs}})$. La valeur de 0.174 est exprimée en $\text{gNH}_4^+ \cdot \text{gX}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$, pour pouvoir être comparée et utilisée dans le modèle elle est convertie en $\text{gN-NH}_4^+ \cdot \text{gX}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$, le terme de maintenance m est alors égal à $0.135 \text{ gN-NH}_4^+ \cdot \text{gX}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$. Les données de la littérature présentent une gamme de terme de maintenance variant de 0.120 à 0.346 gN-

$\text{NH}_4^+ \cdot \text{gX}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ (Hunik et al., 1994; Keen and Prosser, 1987), la valeur obtenue expérimentalement est comprise dans cette gamme.

Les paramètres cinétiques de *Nitrosomonas europaea* ont été calculés pour un modèle de Pirt avec létalité et un terme de maintenance. Ils serviront au développement du modèle de nitrification utilisé pour la coculture de *N. europaea* et *N. winogradskyi*.

III.2.4 Les cultures de *Nitrobacter winogradskyi*

III.2.4.1 Suivi de biomasse

Les concentrations bactériennes durant les cultures pures de *Nitrobacter winogradskyi* ont été calculées à partir du suivi de la densité optique à 600nm, Figure III-5.

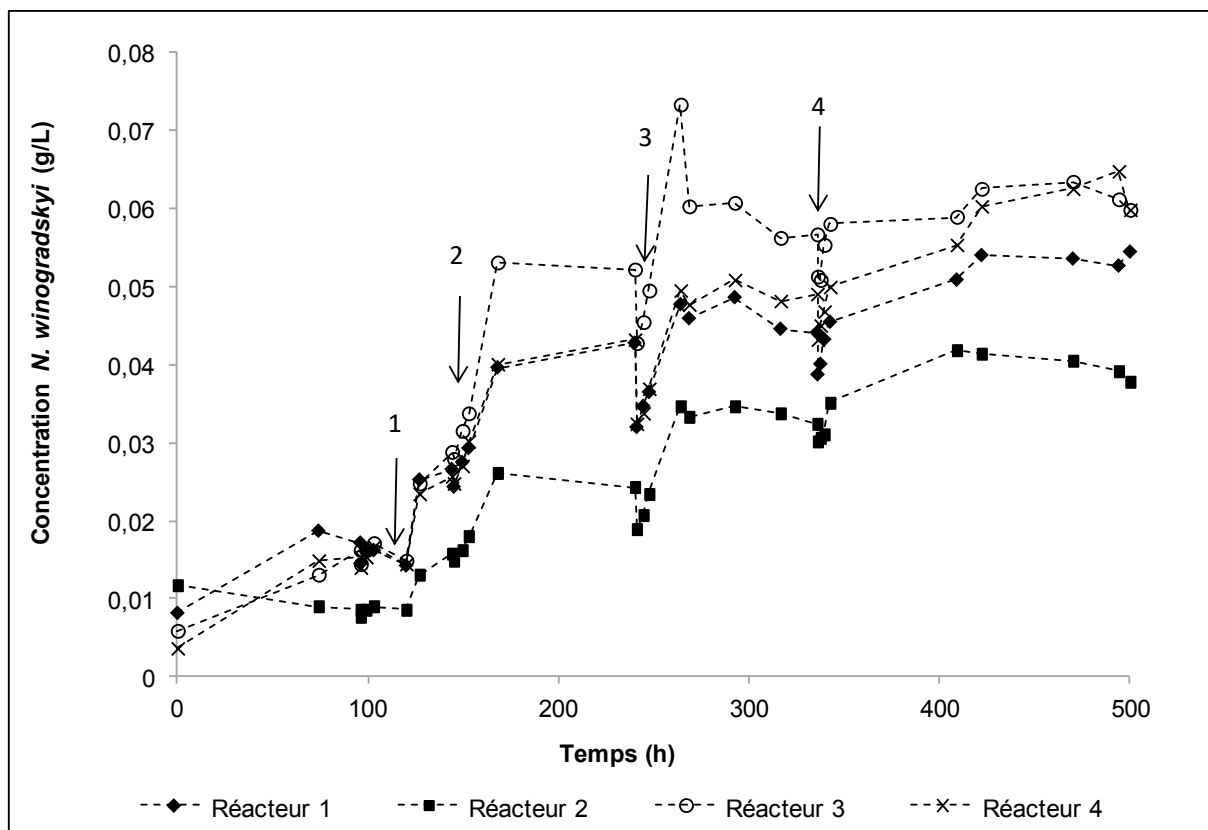


Figure III-5: Suivi de la concentration bactérienne durant les cultures pures de *Nitrobacter winogradskyi*. Les flèches 1, 2, 3 et 4 représentent respectivement les ajouts 1, 2, 3 et 4 de nitrite dans les réacteurs.

Il y a cinq phases de consommation de substrat dans chacun des réacteurs. La première phase correspond à la consommation du substrat présent initialement dans le milieu de culture. Les phases 2, 3, 4 et 5 correspondent à la consommation du nitrite apporté par les ajouts représentés respectivement par les flèches 1, 2, 3 et 4 (Figure III-5). Les concentrations en biomasse atteignent respectivement 0,05, 0,04, 0,06 et 0,065 dans les réacteurs 1, 2, 3 et 4.

III.2.4.2 Suivi des composés azotés

Le suivi du nitrite et du nitrate est réalisé par chromatographie ionique durant les cultures pures de *Nitrobacter winogradskyi*.

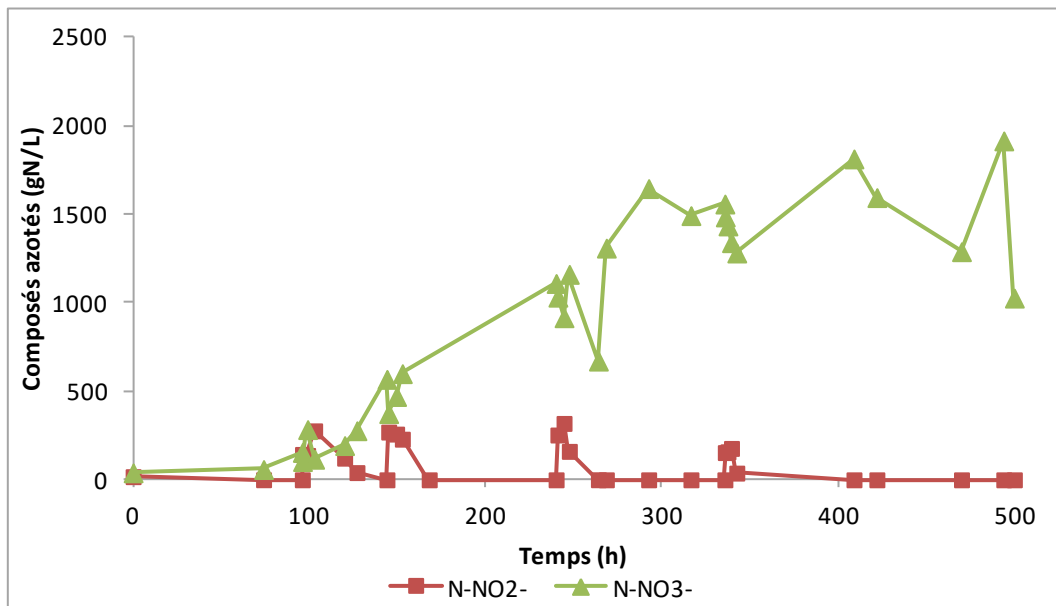


Figure III-6: Evolution du nitrite et du nitrate dans le réacteur 3 au cours des cultures pures de *Nitrobacter winogradskyi*.

A la fin des cinq phases d'oxydation du nitrite, la concentration en nitrate atteint respectivement 1.89, 2.20, 2.58 et 2.31 gN-NO₃⁻/L dans les réacteurs 1, 2, 3 et 4. Ces valeurs sont en-dessous du seuil d'inhibition du nitrate sur la croissance de *Nitrobacter* qui est de 4 gN-NO₃⁻/L. Tout comme pour *N. europaea*, les phases de croissance obtenues seront utilisées pour calculer les paramètres cinétiques de *Nitrobacter winogradskyi*.

III.2.4.3 Détermination des paramètres cinétiques

Le modèle de croissance choisi pour *Nitrobacter winogradskyi* est le même que celui de *Nitrosomonas europaea* : un modèle de Pirt avec létalité et un terme de maintenance.

Les paramètres cinétiques sont définis de la même manière que pour *Nitrosomonas* dans la Partie III.1.2.

Un taux de létalité $b = 0.001 \text{ h}^{-1}$ a été calculé durant ces cultures pures de *Nitrobacter winogradskyi*.

Le μ_{obs} est défini comme la pente des courbes $\text{LN}(X)=f(\text{temps})$, Figure III-7:

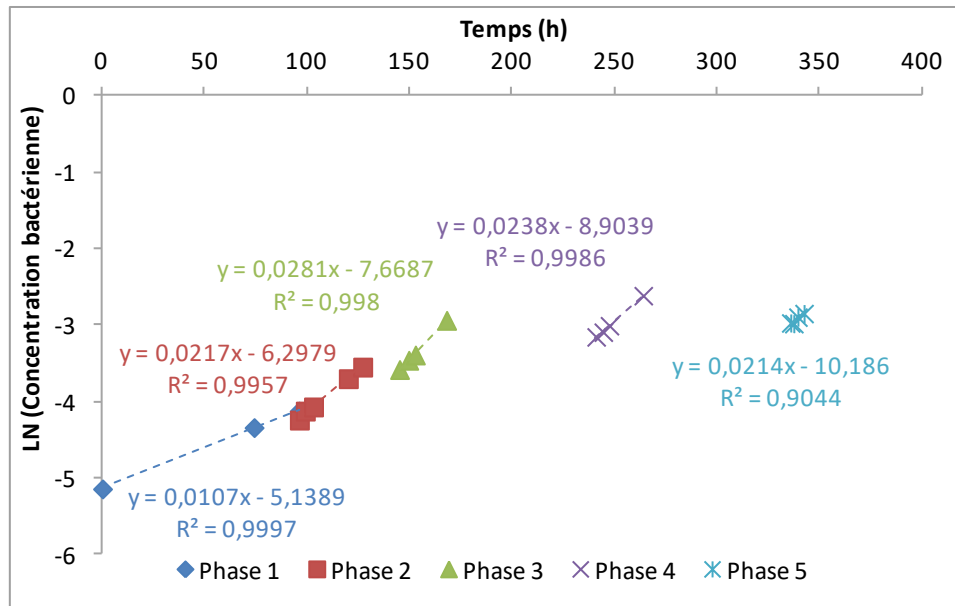


Figure III-7: Détermination du taux de croissance spécifique observé μ_{obs} par régression linéaire pour le Réacteur 3 durant les cultures pures de *Nitrobacter winogradskyi*.

Au cours des cinq phases de consommation du substrat, le μ_{obs} évolue de manière différente : il est plus faible dans les premières phases et est maximum dans les trois dernières (Tableau III-5).

Tableau III-5: Détermination du taux de croissance spécifique observé μ_{obs} par phase et par réacteur pendant les cultures pures de *Nitrobacter winogradskyi*. Les écarts-types sont donnés entre parenthèses.

	Phase 1	Phase 2	Phase 3	Phase 4	Phase 5
Réacteur 1	0.009 (0.003)	0.013 (0.001)	0.021 (0.001)	0.014 (0.002)	0.026 (0.003)
Réacteur 2	ND	0.015 (0.001)	0.025 (0.001)	0.026 (0.001)	0.023 (0.006)
Réacteur 3	0.011 (0.000)	0.016 (0.001)	0.028 (0.001)	0.024 (0.001)	0.021 (0.005)
Réacteur 4	0.016 (0.003)	0.013 (0.001)	0.021 (0.001)	0.019 (0.001)	0.022 (0.001)
μ_{obs} moyen	0.012 (0.001)	0.014 (0.001)	0.024 (0.001)	0.021 (0.001)	0.023 (0.002)

La valeur de μ_{max} pour *Nitrobacter* sera donc déterminée avec les trois dernières phases de consommation de nitrite. Cette observation est l'opposée de celle formulée pour *Nitrosomonas*, où seule la première de croissance était exponentielle en raison de l'inhibition du nitrite sur la croissance bactérienne. Ici, il n'y a pas d'inhibition par le produit puisque les concentrations en nitrate sont en-dessous du seuil d'inhibition. Les deux premières phases de consommation semblent être des phases d'adaptation de la biomasse. Le μ_{obs} utilisé pour *Nitrobacter* est la valeur moyenne calculée pour les phases 3, 4 et 5 pour les 4 réacteurs : $\mu_{obs} = 0.023 \text{ h}^{-1}$.

Les valeurs du taux de croissance spécifique μ_{obs} et du taux de létalité b étant définies pour *Nitrobacter*, il est alors possible de calculer le taux de croissance maximum μ_{max} comme défini dans l'Equation III.27 : $\mu_{max}=0.024 \text{ h}^{-1}$. Cette valeur est cohérente avec celles trouvées dans la littérature (Tableau I-12) même si elle est dans la partie inférieure de la gamme présentée.

Le paramètre m est calculé à partir de l'Equation III.29 et de la détermination de q_{obs} , et $Y_{S/X}^{observed}$ comme pour *Nitrosomonas europaea*. Le rendement massique $Y_{S/X}^{observed}$ a été calculé comme la moyenne des valeurs obtenues pour les trois dernières phases de consommation du substrat dans les 4 réacteurs (Tableau III-6):

Tableau III-6: Paramètres cinétiques calculés pendant les cultures pures de *Nitrobacter winogradskyi*. Valeurs moyennes calculées sur les trois dernières phases, les écarts-types sont donnés entre parenthèses.

	$Y_{S/X}^{observed}$ (gN-NO ₃ ⁻ .gX ⁻¹)	q_{obs} (gN-NO ₃ ⁻ .gX ⁻¹ .h ⁻¹)	m (gN-NO ₂ ⁻ .gX ⁻¹ .h ⁻¹)
Réacteur 1	29.30 (5.63)	0.589 (0.113)	0.325 (0.062)
Réacteur 2	37.36 (5.37)	0.923 (0.133)	0.659 (0.095)
Réacteur 3	32.88 (3.45)	0.804 (0.084)	0.540 (0.057)
Réacteur 4	29.71 (3.45)	0.610 (0.071)	0.346 (0.040)
Moyenne	32.31 (3.73)	0.732 (0.161)	0.467 (0.161)

Le terme de maintenance moyen calculé sur les cultures pures de *Nitrobacter* est 0.467 gN-NO₂⁻.gX⁻¹.h⁻¹. Les termes de maintenance trouvés dans la littérature présentent une large gamme : 0.071-0.208 gN-NO₂⁻.gX⁻¹.h⁻¹ (Hunik et al., 1994; Keen and Prosser, 1987). Il est, de plus, important de préciser que le calcul du terme de maintenance est directement dépendant de la valeur de μ_{obs} obtenue durant la culture. Ainsi, si le μ_{obs} calculé est faible, le terme de maintenance sera d'autant plus élevé.

III.2.5 Récapitulatif des paramètres du modèle de croissance des bactéries nitrifiantes

Les deux séries d'expérimentations ont permis de déterminer les paramètres cinétiques de *Nitrosomonas europaea* et *Nitrobacter winogradskyi* : le taux de croissance maximum μ_{max} , le taux de létalité b et le terme de maintenance m (Tableau III-7).

Tableau III-7: Récapitulatif des paramètres cinétiques de *Nitrosomonas europaea* et *Nitrobacter winogradskyi* qui seront utilisés dans le modèle de croissance.

	<i>Nitrosomonas europaea</i>	<i>Nitrobacter winogradskyi</i>
μ_{obs}	0.051±0.009 h ⁻¹	0.023±0.008 h ⁻¹
q_{obs}	-0.282±0.16 gN-NH ₄ ⁺ .gX ⁻¹ .h ⁻¹	0.732±0.16 gN-NO ₃ ⁻ .gX ⁻¹ .h ⁻¹
$Y_{S/X}^{observed}$	-3.22±0.33 gN-NH ₄ ⁺ .gX ⁻¹	32.31±10.26 gN-NO ₃ ⁻ .gX ⁻¹
μ_{max}	0.054±0.009 h ⁻¹	0.024±0.008 h ⁻¹
m	0.135±0.041 gN-NH ₄ ⁺ .gX ⁻¹ .h ⁻¹	0.467±0.102 gN-NO ₂ ⁻ .gX ⁻¹ .h ⁻¹
b	0.003±0.0008 h ⁻¹	0.001±0.001 h ⁻¹

Les paramètres du modèle étant définis, il faut maintenant vérifier que le modèle cinétique représente correctement la culture des deux bactéries ensemble. Dans ce cadre-là, des cocultures de *N. europaea* et *N. winogradskyi* ont été réalisées et comparées aux données calculées par le modèle combinant les deux souches en réacteur agité parfaitement mélangé.

III.3 Calibration et validation du modèle de croissance en cocultures de *Nitrosomonas europaea* et *Nitrobacter winogradskyi*

Les paramètres du modèle cinétique ont été calculés et le modèle de nitrification doit maintenant être calibré et validé. Différentes cultures ont été réalisées : une pour calibrer le modèle de nitrification (coculture A), et d'autres pour valider l'efficacité de prédiction du modèle (cocultures B-E).

III.3.1 Modèle du réacteur parfaitement agité : NitriSimR

La détermination des paramètres cinétiques de *Nitrosomonas europaea* ATCC® 19718 et *Nitrobacter winogradskyi* ATCC® 25391 a été réalisée à partir de cultures menées dans des réacteurs parfaitement agités. Un modèle de réacteur parfaitement agité décrivant l'évolution de la biomasse et des concentrations en substrat et produits a été développé, Eq. III.30-III.34 :

$$\frac{dS_i}{dt} = R_{S_i}^{AOB} + R_{S_i}^{NOB} - \frac{S_i}{V_L} \frac{dV_L}{dt} \quad (III.30)$$

$$\frac{dO_2}{dt} = R_{O_2}^{AOB} + R_{O_2}^{NOB} + K_L a (O_2^* - O_2) - \frac{O_2}{V_L} \frac{dV_L}{dt} \quad (III.31)$$

$$\frac{dCO_2}{dt} = R_{CO_2}^{AOB} + R_{CO_2}^{NOB} + K_L a (CO_2^* - CO_2) - \frac{CO_2}{V_L} \frac{dV_L}{dt} \quad (III.32)$$

$$\frac{dV_{base}}{dt} = (R_{H^+}^{AOB} + R_{H^+}^{NOB}) \cdot \frac{V_L}{N_{base}} \quad (III.33)$$

$$\frac{dV_L}{dt} = \frac{dV_{base}}{dt} \quad (III.34)$$

Chapitre III

Avec : R_{Si}^{AOB} : Vitesse de production/consommation du substrat Si par *Nitrosomonas*

R_{Si}^{NOB} : Vitesse de production/consommation du substrat Si par *Nitrobacter*

S_i : Concentration du substrat Si (g/L)

V_L : Volume liquide du réacteur (L)

$K_L a$: Coefficient de transfert volumétrique de l'oxygène (h^{-1})

O_2^* : Concentration en oxygène à saturation avec la phase gazeuse ($mol \cdot m^{-3}$)

O_2 : Concentration en oxygène dans le réacteur parfaitement mélangé ($mol \cdot m^{-3}$)

CO_2^* : Concentration en dioxygène à saturation avec la phase gazeuse ($mol \cdot m^{-3}$)

CO_2 : Concentration en dioxygène dans le réacteur parfaitement mélangé ($mol \cdot m^{-3}$)

N_{base} : Normalité de la base (N)

Dans l'Eq. III.30, S_i représente la biomasse bactérienne ou la concentration d'un composé azoté. Le modèle est capable de décrire l'ajout de base dans le réacteur pour maintenir le pH à la valeur voulue grâce à l'Eq. III.33. Les variations de volume causées par cette addition de base sont représentées par l'Eq. III.34. Le modèle a été développé et résolu sous Matlab™ R2010a.

III.3.2 Evaluation du modèle sur une coculture de *N. europaea* et *N. winogradskyi*

Le réacteur Biostat MD de 4 L a été inoculé avec une pré-culture de *N. europaea* et *N. winogradskyi* réalisée en Erlenmeyer. Durant cette culture maintenue 300 h, deux Fed-batch de $0.324 \text{ gN-NH}_4^+/\text{L}$ ont été réalisés : il y a donc trois phases de croissance. Durant la coculture A, l'ammonium, le nitrite et le nitrate ont été suivis par chromatographie ionique. Le suivi de la biomasse a été réalisé selon le même protocole que les cultures pures de *N. europaea* et *N. winogradskyi*.

Le suivi de la biomasse au cours du temps indique que la concentration bactérienne atteinte en fin de culture est 0.29 g/L , Figure III-8:

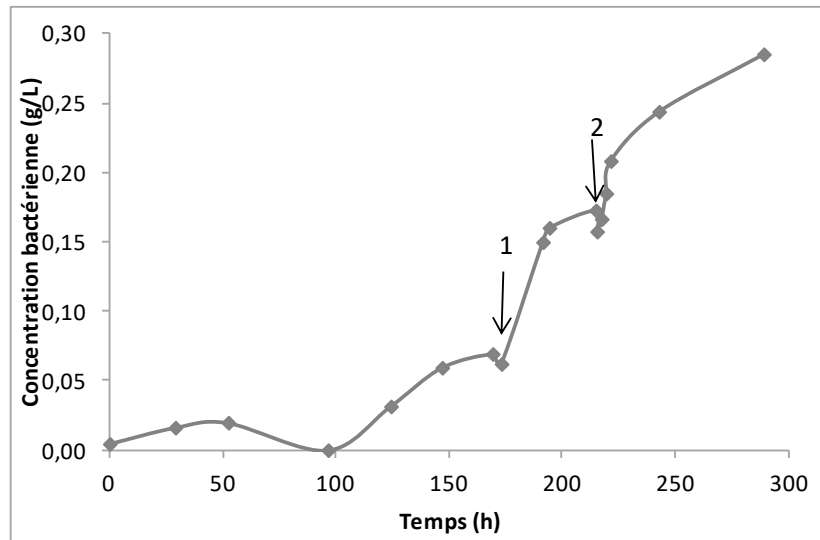


Figure III-8: Evolution de la concentration bactérienne durant la coculture A. Flèche 1 : Fed-batch 1 ; Flèche 2 : Fed-batch 2.

Le suivi des composés azotés indique que la concentration finale en nitrate atteinte est 1.1 gN-NO₃⁻/L, Figure III-9 :

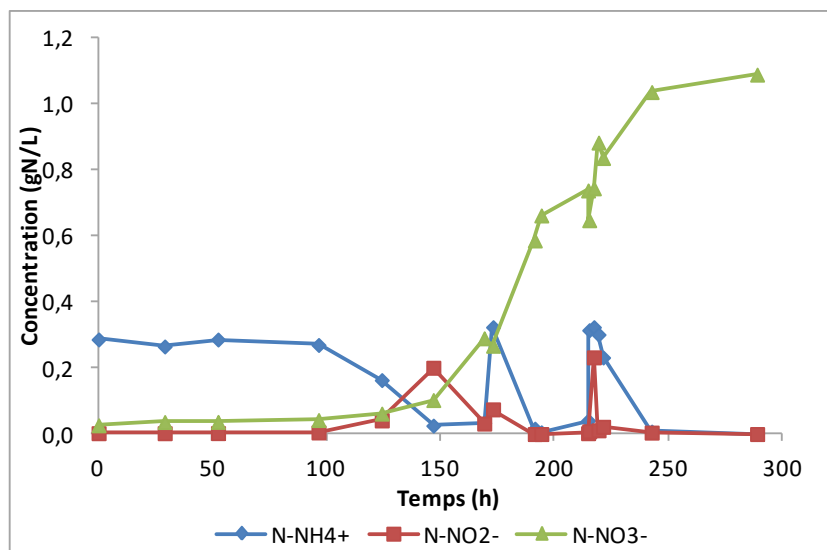


Figure III-9: Evolution des composés azotés durant la coculture A. Les concentrations sont données en gN/L.

Durant la coculture A, il y a eu deux additions d'ammonium ; celles-ci sont suivies d'un pic de nitrite marquant les métabolismes des deux différentes souches. *Nitrobacter* semble avoir un métabolisme plus lent, le nitrite produit par *Nitrosomonas* a ainsi le temps de s'accumuler dans le réacteur avant d'être oxydé. Cependant, durant les trois phases de nitrification, la concentration en nitrite ne dépasse le seuil d'inhibition de 0.276 gN-NO₂⁻/L. La concentration en nitrate n'est pas inhibitrice non plus. La coculture A peut donc être utilisée pour vérifier le

modèle cinétique dont les paramètres ont été calculés en Partie III.2.2. Une simulation de la coculture A a donc été réalisée avec les paramètres suivants (Tableau III-8):

Tableau III-8: Paramètres sélectionnés pour la simulation de la coculture A.

K_La (h⁻¹)	40
pH	7.9
Volume (L)	4
Concentration ammonium initiale (gN-NH₄⁺/L)	0.288
Concentration nitrite initiale (gN-NO₂⁻/L)	0
Concentration nitrate initiale (gN-NO₃⁻/L)	0
Concentration <i>N. europaea</i> initiale (g/L)	0.0015
Concentration <i>N. winogradskyi</i> initiale (g/L)	0.001
Nombre de Fed-batch	2
Concentration des Fed-batch (gN-NH₄⁺/L)	0.324

La simulation permet d'obtenir le profil des différents composés essentiels dans la nitrification : la biomasse, l'ammonium, le nitrite, le nitrate, etc.

Les premières comparaisons ont montré un fort décalage entre les valeurs expérimentales et celles prédites par le modèle. Il est apparu dans le modèle que, la croissance de *Nitrobacter winogradskyi*, était limitée alors que son substrat, le nitrite, était toujours présent. C'est l'absence d'ammonium qui influait sur le comportement de *Nitrobacter*. Dans le modèle de croissance, *Nitrobacter* a besoin d'une source de composé azoté qui ne peut être le nitrite. Dans les conditions de culture présentes, seul l'ammonium peut jouer ce rôle. Dans le modèle développé, la limitation de la croissance pour *Nitrosomonas* et *Nitrobacter* par le substrat est traduite par un terme de Monod, qui est classiquement utilisé dans la modélisation de la nitrification, Equation III.35:

$$lim = \prod S_i \frac{S_i}{K_{Si} + S_i} \quad (III.35)$$

Avec : S_i : Concentration en substrat i

K_{Si} : Constante de demi-saturation du substrat i

Cependant, dans le cas de l'utilisation de ce terme de limitation de la croissance pour *Nitrosomonas*, la concentration en ammonium chute très rapidement vers 0 et la croissance de *Nitrobacter* est stoppée. Nous avons choisi de modifier le terme de limitation de la croissance par l'ammonium et l'avons complété avec un terme sigmoïde pour la croissance de *Nitrosomonas*, Eq. III.36 :

$$lim = \frac{(S_{NH3})^n}{(K_{SNH3})^n + (S_{NH3})^n} \quad (III.36)$$

Avec S_{NH_3} : Concentration en ammonium

$K_{S_{NH_3}}$: Constante de demi-saturation de l'ammonium

Pour $n = 3$, ce terme permet d'éviter que d'un point de vue numérique, la concentration en ammonium ne tende vers 0 quand celui-ci devient limitant pour *Nitrosomonas*, Figure III-10:

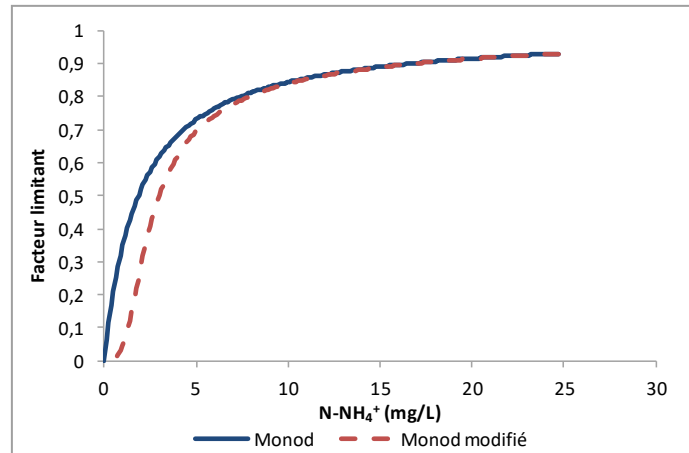


Figure III-10: Comparaison des termes de limitation de la croissance de *Nitrosomonas* en fonction de la concentration en ammonium.

Les deux termes de limitation ont un comportement similaire jusqu'à ce que la concentration en ammonium soit égale au $K_{S_{NH_4^+}}$ dont la valeur est 2.25 mg N-NH₄⁺/L. En dessous de cette valeur, les deux termes se comportent différemment : avec le terme de Monod modifié, la croissance de *Nitrosomonas* est limitée alors qu'il reste encore de l'ammonium dans le milieu. Cette source d'azote pourra alors être utilisée par *Nitrobacter*.

En réutilisant les paramètres de simulation du Tableau III-8, une simulation de la coculture A a pu être réalisée, Figure III-11 :

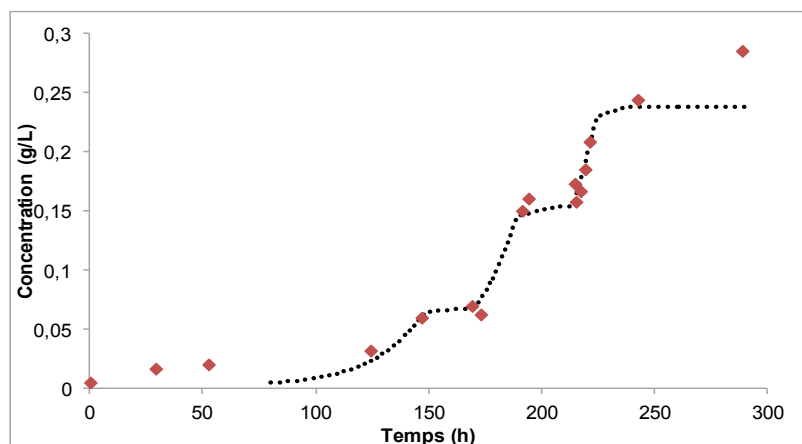


Figure III-11: Comparaison entre les concentrations bactériennes expérimentales (rouge) et prédites (noire).

Le modèle modifié prédit précisément l'évolution de la biomasse au cours de la culture. Les points expérimentaux sont proches des données calculées.

Le modèle prédit également correctement les concentrations en ammonium et nitrate durant la culture, Figure III-12 :

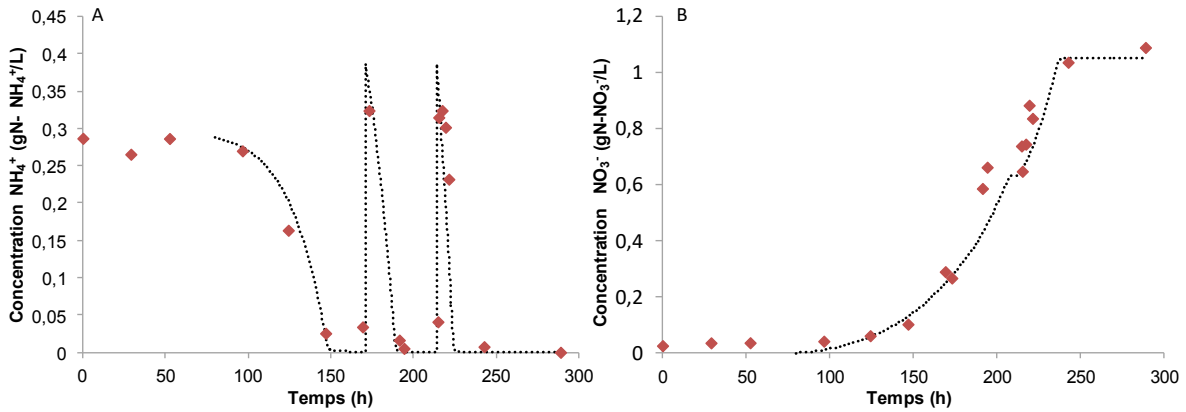


Figure III-12: Evolution des concentrations en ammonium (A) et nitrate (B) expérimentale (rouge) et prédite (noire) dans la coculture A.

Le modèle de nitrification mis au point est capable de représenter l'évolution de l'ammonium et du nitrate durant la coculture de *N. europaea* et *N. winogradskyi*. Dans les contraintes du compartiment nitrificateur de MELiSSA, le cas du nitrite est un point critique. Le nitrite ne doit pas s'accumuler dans la boucle, le modèle doit ainsi être capable de représenter son évolution dans le réacteur durant la coculture, Figure III-13 :

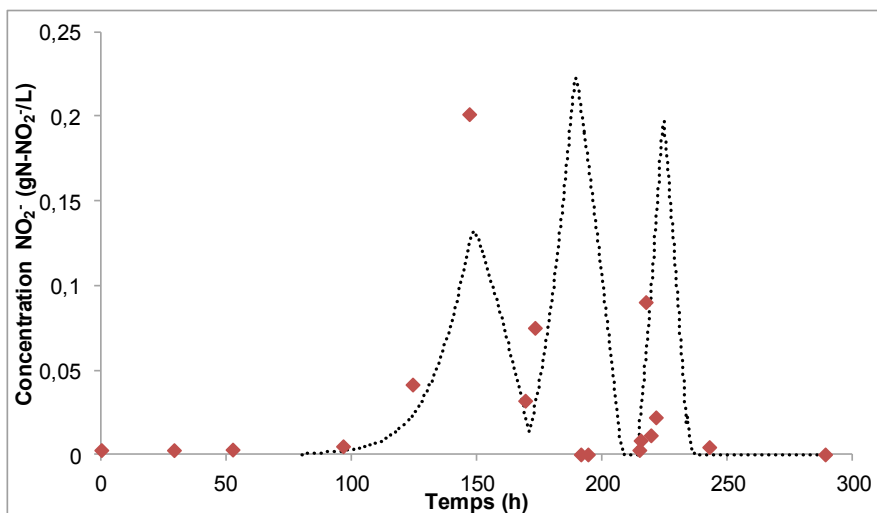


Figure III-13: Evolution de la concentration en nitrite expérimentale (rouge) et prédite par le modèle (noire) dans la coculture A.

Lorsqu'il n'y a pas de nitrite présent dans le milieu, le modèle n'en prédit pas et inversement. De légères variations sont observables entre le modèle et les données expérimentales. Pour

le premier pic à 150 h, le modèle a tendance à sous-estimer la concentration en nitrite. Le modèle NitriSimR est aussi capable de prédire l'évolution de la base ajoutée et de la concentration en oxygène dissous durant la croissance de *Nitrosomonas* et *Nitrobacter*, Figure III-14.

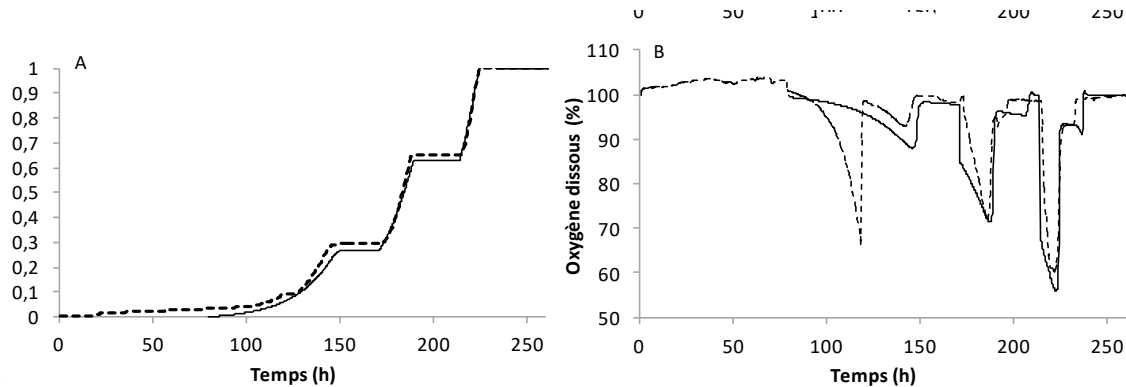


Figure III-14 : Comparaison entre les données expérimentales (trait pointillés) et prédites par NitriSimR (trait plein) durant la coculture A. A. Ajout de base dans le réacteur, valeurs normalisées ; B. Evolution de la concentration en oxygène dissous.

NitriSimR représente fidèlement l'évolution de l'ajout de base dans le réacteur et de l'évolution de la concentration en oxygène dissous durant la coculture A.

Cette première coculture a permis d'adapter le modèle de nitrification développé avec les paramètres calculés durant les cultures pures de *N. europaea* et *N. winogradskyi*.

III.3.3 Application du modèle de nitrification à d'autres co-cultures

III.3.3.1 La coculture B

La coculture B est basée sur l'utilisation du modèle comme outil prédictif. Cette culture fonctionnait en conditions de limitation par la source de carbone ; celui-ci étant seulement apporté par l'air entrant dans le réacteur à la différence de la coculture A pour laquelle, le carbone était apporté par l'air et la solution de base qui contenait des carbonates.

Le réacteur Biostat MD de 4 L a été inoculé avec une pré-culture de *N. europaea* et *N. winogradskyi* réalisée en Erlenmeyer. Durant cette culture de 300 h, deux Fed-batch ont été réalisés : il y a donc trois phases de croissance. Les résultats obtenus seront comparés à une simulation avec les paramètres suivants (Tableau III-9):

Tableau III-9: Paramètres sélectionnés pour la simulation de la coculture B.

K_{La} (h^{-1})	10
pH	7.9
Volume (L)	4

Concentration ammonium initiale (gN-NH ₄ ⁺ /L)	0.175
Concentration nitrite initiale (gN-NO ₂ ⁻ /L)	0
Concentration nitrate initiale (gN-NO ₃ ⁻ /L)	0.08
Concentration <i>N. europaea</i> initiale (g/L)	0.002
Concentration <i>N. winogradskyi</i> initiale (g/L)	0.003
Nombre de Fed-batch	2
Concentration des Fed-batch (gN-NH ₄ ⁺ /L)	0.33 / 0.26

La simulation permet d'obtenir le profil des différents composés essentiels dans la nitrification : l'ammonium, le nitrite, le nitrate, Figure III-15.

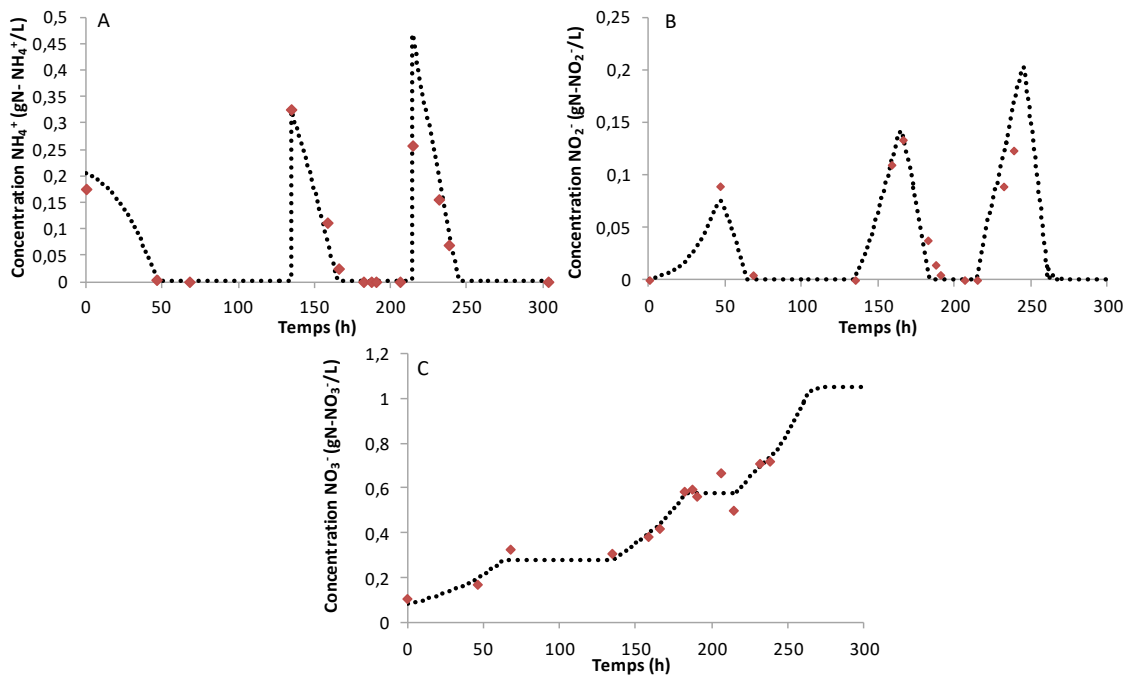


Figure III-15: Comparaison entre les données expérimentales (rouge) et prédites par le modèle de nitrification (noire) durant la coculture B ; A. Ammonium ; B. Nitrite ; C. Nitrate.

Il y a une bonne représentation de la coculture B par le modèle NitriSimR. Que ce soit pour l'ammonium, le nitrite ou le nitrate, le modèle est fidèle aux résultats expérimentaux.

III.3.3.2 La coculture C

Un réacteur Infors de 500 mL a été inoculé avec une pré-culture de *N. europaea* et *N. winogradskyi* réalisée en Erlenmeyer. Elle a été maintenue 260 h et deux fed-batch ont été réalisés. Les paramètres utilisés pour la simulation sont regroupés dans le Tableau III-10 :

Tableau III-10 : Paramètres sélectionnés pour la simulation de la coculture C.

K _{La} (h ⁻¹)	40
pH	7.9
Volume (L)	0.5

Concentration ammonium initiale (gN-NH₄⁺/L)	0.241
Concentration nitrite initiale (gN-NO₂⁻/L)	0.025
Concentration nitrate initiale (gN-NO₃⁻/L)	0.182
Concentration <i>N. europaea</i> initiale (g/L)	0.001
Concentration <i>N. winogradskyi</i> initiale (g/L)	0.001
Nombre de Fed-batch	2
Concentration des Fed-batch (gN-NH₄⁺/L)	0.14 / 0.33

Le modèle a été utilisé pour prédire les résultats de la coculture C, Figure III-16:

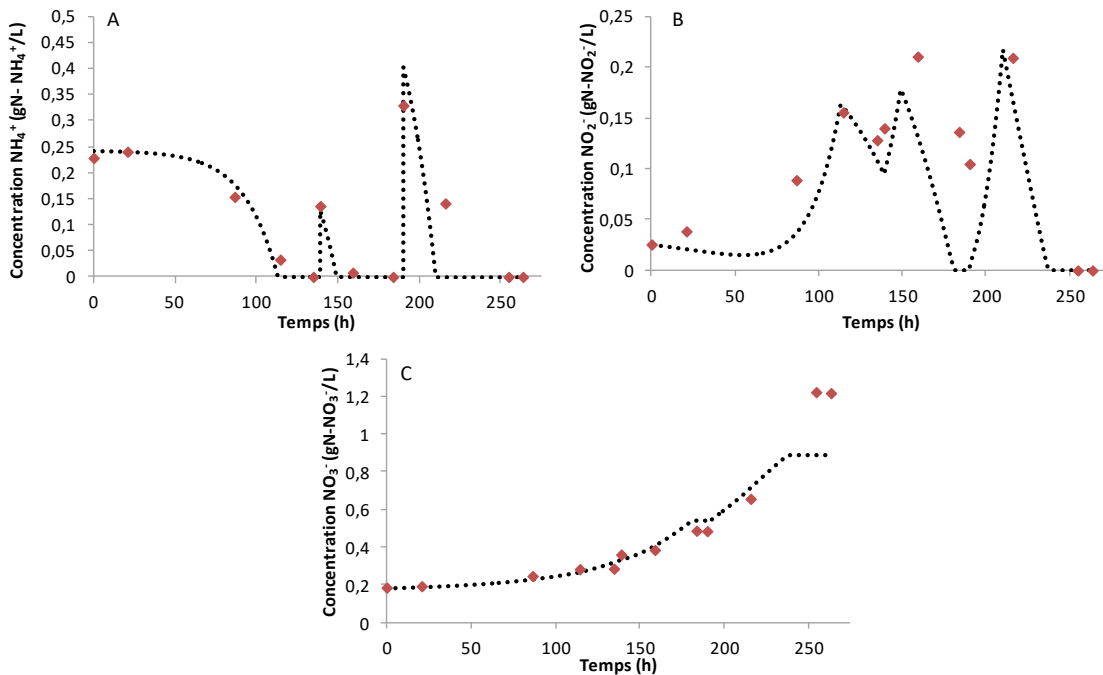


Figure III-16 : Comparaison entre les données expérimentales (rouge) et prédites par le modèle de nitrification (noire) durant la coculture C ; A. Ammonium ; B. Nitrite ; C. Nitrate.

Le modèle prédit correctement l'évolution des composés azotés durant le début de la coculture C. Les concentrations finales expérimentales et prédites de nitrate et nitrite divergent et ceci peut s'expliquer par les variations de volume durant la culture. En effet, la coculture C a été réalisée dans un réacteur de 500 mL et, dans ce type de réacteur, la condensation du gaz en sortie durant la culture n'est pas optimale. Ceci implique une évaporation du milieu et un volume final plus faible que l'initial. Ainsi, il est possible de constater une augmentation de la concentration en nitrate expérimentale : la quantité de nitrate produit reste la même mais le volume de liquide diminuant, sa concentration finale est plus élevée. Le modèle NitriSimR prend en compte les variations de volume causées par les prélèvements mais ne peut pas prédire l'évaporation causée par l'inefficacité des condenseurs.

III.3.3.3 La coculture D

La coculture D a été réalisée dans le Biostat MD de 4 L pendant 600 heures et 4 fed-batch ont été réalisés. Les paramètres utilisés pour la simulation des données sont regroupés dans le Tableau III-11 :

Tableau III-11 : Paramètres sélectionnés pour la simulation de la coculture D.

K_{La} (h^{-1})	10
pH	7.9
Volume (L)	4
Concentration ammonium initiale ($gN-NH_4^+/L$)	0.253
Concentration nitrite initiale ($gN-NO_2^-/L$)	0.002
Concentration nitrate initiale ($gN-NO_3^-/L$)	0.102
Concentration <i>N. europaea</i> initiale (g/L)	0.001
Concentration <i>N. winogradskyi</i> (g/L)	0.001
Nombre de Fed-batch	4
Concentration des Fed-batch ($gN-NH_4^+/L$)	0.011 / 0.088 / 0.732 / 0.287

Cette culture a été plus longue que les précédentes et permet de tester le modèle dans des conditions différentes : nombre et concentration des fed-batch et durée de culture. Là encore le modèle représente fidèlement l'évolution des concentrations des espèces azotées dans le réacteur, Figure III-17 :

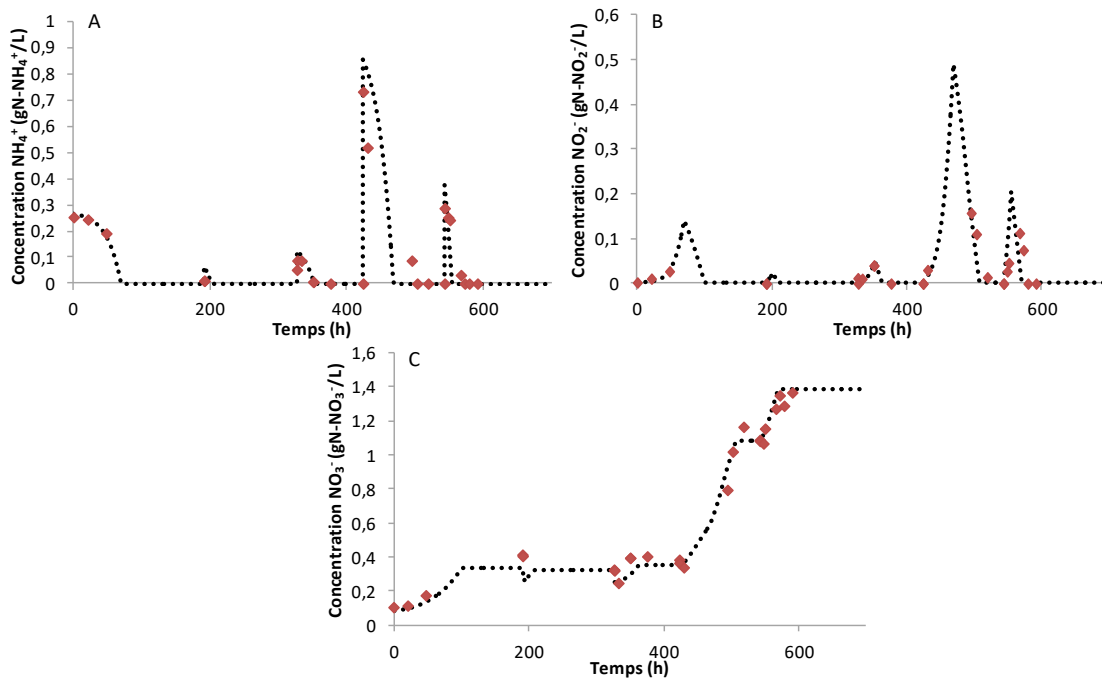


Figure III-17 : Comparaison entre les données expérimentales (rouge) et prédites par le modèle de nitrification (noire) durant la coculture D ; A. Ammonium ; B. Nitrite ; C. Nitrate.

La coculture D a été maintenue 2.5 fois plus longtemps que la coculture C réalisée dans le réacteur de 500 mL. Les résultats prédits sont plus cohérents que ceux qui ont été produits pour la coculture C. Cette observation confirme que la différence entre les données prédites et expérimentales de la coculture C n'était pas due à une défaillance du modèle pour la prédiction mais était directement liée aux variations de volume durant la culture.

III.3.3.4 La coculture E

La coculture E a été maintenue 420 h dans le Biostat MD de 4 L et trois fed-batch ont été réalisés. Les paramètres du modèle sont reportés dans le Tableau III-12

Tableau III-12 : Paramètres sélectionnés pour la simulation de la coculture E.

K_{La} (h^{-1})	10
pH	7.9
Volume (L)	4
Concentration ammonium initiale ($gN-NH_4^+/L$)	0.199
Concentration nitrite initiale ($gN-NO_2^-/L$)	0
Concentration nitrate initiale ($gN-NO_3^-/L$)	0.339
Concentration <i>N. europaea</i> initiale (g/L)	0.001
Concentration <i>N. winogradskyi</i> initiale (g/L)	0.001
Nombre de Fed-batch	3
Concentration des Fed-batch ($gN-NH_4^+/L$)	0.36 / 0.36 / 0.39

Le modèle a de nouveau été utilisé pour calculer les concentrations en ammonium, nitrite et nitrate durant la coculture E, Figure III-18:

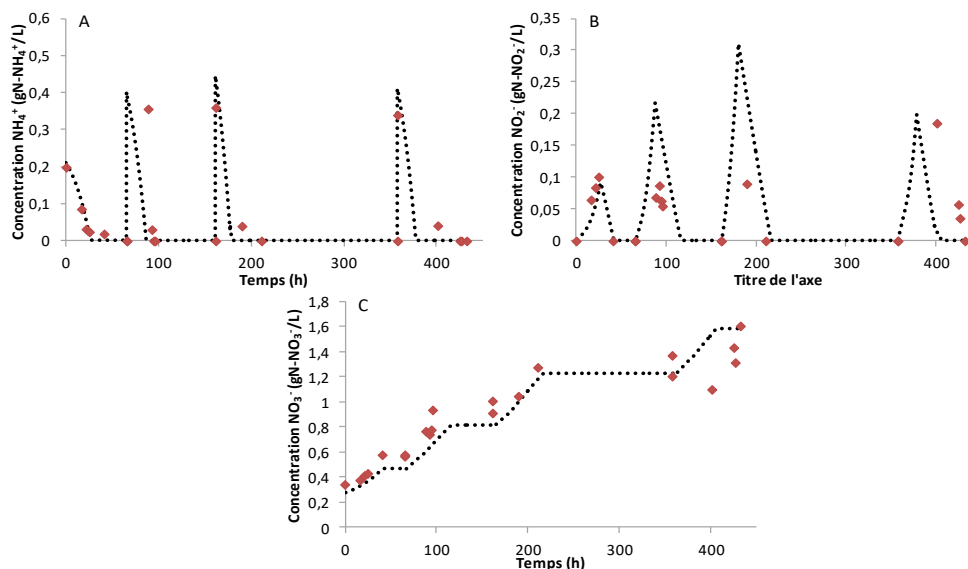


Figure III-18 : Comparaison entre les données expérimentales (rouge) et prédites par le modèle de nitrification (noire) durant la coculture E ; A. Ammonium ; B. Nitrite ; C. Nitrate.

Le modèle suit de façon très satisfaisante les données expérimentales, il est possible d'obtenir une prédiction correcte de la concentration en nitrate durant les phases de nitrification par exemple.

III.3.4 Conclusions sur l'utilisation de NitriSimR

Le modèle développé grâce aux cultures pures et validé en cocultures en bioréacteurs de *N. europaea* ATCC® 19718 et *N. winogradskyi* ATCC® 25391 permet d'obtenir des prédictions correctes des concentrations en ammonium, nitrite et nitrate. Les consommations de l'ammonium sont correctement représentées et si des pics de nitrite sont présents expérimentalement, le modèle les représente aussi. Durant la coculture C, l'évaporation du milieu de culture et la diminution du volume au cours de la culture entraîne un décalage entre les concentrations finales expérimentales et prédites de nitrate. Cette variation de volume due à la défaillance du condensateur du réacteur ne peut être prédite par le modèle et la prédiction n'est pas aussi fidèle que ce que l'on attendait. Malgré ce résultat, le modèle présente des prédictions correctes pour les autres cocultures. NitriSimR peut être utilisé comme outil prédictif pour les cultures planctoniques en batch ou fed-batch, avec ou sans variations de volume et avec ou sans limitation par le transfert pour la source de carbone. Ce modèle est capable de prédire :

- (i) Les concentrations en ammonium, nitrite et nitrate
- (ii) La concentration en biomasse
- (iii) La concentration en oxygène dissous
- (iv) L'ajout de base durant la culture

III.4 Différentiation entre nitrification partielle et totale : deux nouveaux paramètres identifiés

La nitrification partielle est un état de nitrification qui doit être évité dans la boucle MELiSSA. En effet, le fonctionnement en boucle fermée implique que tous les composés circulent s'ils ne sont pas consommés dans un des compartiments. La nitrification partielle peut induire une production et accumulation de nitrite, qui peut alors se retrouver dans l'eau utilisée pour la consommation des astronautes. Ce composé étant toxique, il faut absolument éviter sa propagation dans la boucle liquide de MELiSSA. Pour connaître l'état de nitrification et savoir si du nitrite est produit, il est nécessaire de déterminer analytiquement la concentration de ce composé. La nécessité de prélever induit une contrainte supplémentaire pour l'expérimentateur. Un des objectifs de la modélisation dans la boucle MELiSSA est l'aspect

prédictif des procédés. Ainsi, s'il était possible de déterminer plus facilement l'état de nitrification dans le compartiment C3, cela faciliterait le suivi et le contrôle du compartiment.

Lors des cultures pures de *Nitrosomonas europaea*, nous avons remarqué que la régulation pH ajoutait de la base à chaque phase de consommation de l'ammonium pour maintenir le pH à 8. L'ajout de la base dans le réacteur est ainsi directement corrélé à la courbe de la concentration bactérienne dans le réacteur, Figure III-19:

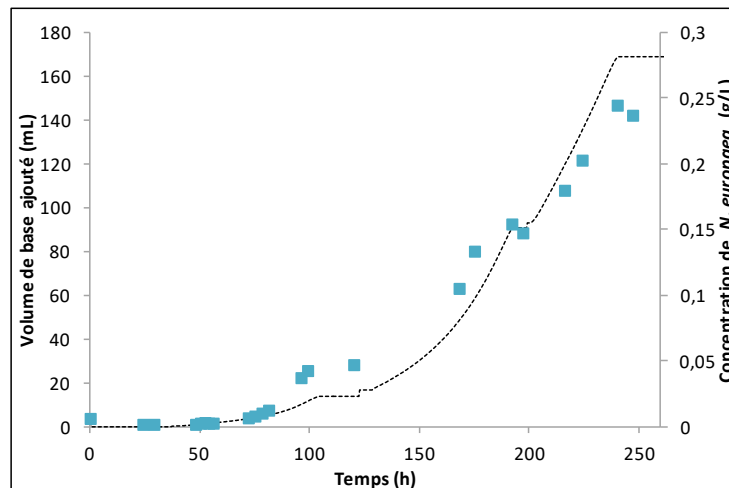


Figure III-19: Ajout de base dans le réacteur 3 et évolution de la concentration bactérienne durant la culture pure de *Nitrosomonas europaea*. La courbe en pointillés représente l'ajout de base et les points bleus, les mesures de la concentration bactérienne.

On constate que de la base est ajoutée durant la croissance de *Nitrosomonas europaea*. Cette observation est due à l'acidification du milieu entraînée par le relargage de protons lors de la nitrification (Eq. I.5). Lorsque l'ammonium est consommé, des protons sont produits et le milieu s'acidifie. Le suivi de l'ajout de base est réalisé tout au long de la culture car il est mesuré de manière automatique par le logiciel de suivi de la culture. Il est ainsi possible, grâce à ce suivi, de savoir quand débute la croissance de *N. europaea* ou l'oxydation de l'ammonium.

Un autre paramètre on-line peut permettre de suivre le métabolisme de *N. europaea* : la concentration en oxygène dissous dans le réacteur, Figure III-20 :

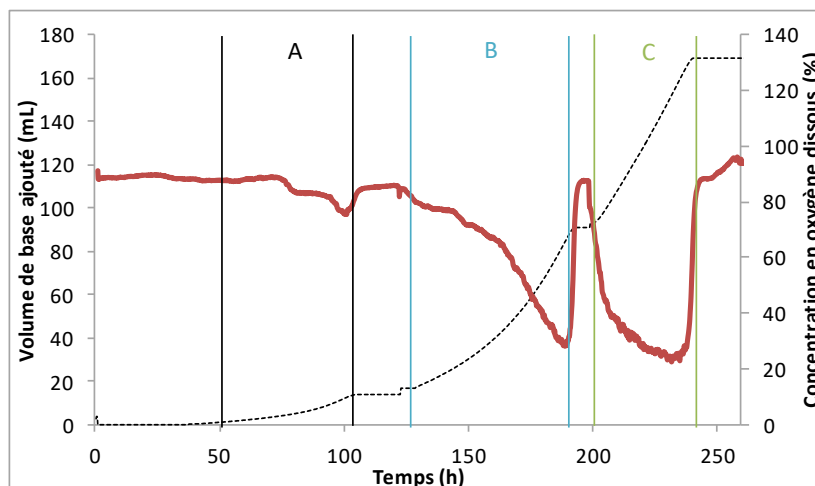


Figure III-20: Comparaison de l'ajout de base et de la concentration en oxygène dissous dans le réacteur 3 des cultures pures de *Nitrosomonas europaea*. La courbe en pointillés représente l'ajout de base et la courbe rouge, l'évolution de l'oxygène dissous.

Durant la culture de *N. europaea*, il y a trois phases de consommation de l'ammonium. Sur la Figure III-20, ces phases sont représentées par les lettres A, B et C. Dès que *Nitrosomonas* commence à oxyder l'ammonium, de la base est ajoutée dans le réacteur et la concentration en oxygène dissous dans le milieu commence à diminuer. La vérification de ces deux paramètres se fait sans prélèvements dans le réacteur et permet de savoir quand la réaction de nitrification se déroule.

Pour la croissance de *Nitrobacter*, il n'y a pas d'acidification du milieu et donc, pas d'ajout de base dans le réacteur. Mais la réaction de nitrification conduit comme pour *Nitrosomonas*, à une baisse de la pO_2 (Eq. I.4).

D'un point de vue purement théorique on constate que :

- (i) Pour la nitrification, le rapport de la vitesse de production de H^+ sur la vitesse de consommation de l' O_2 , H^+/O_2 , est égal à 1.33
- (ii) Pour la nitrification, $H^+/O_2=0$
- (iii) Pour la nitrification, $H^+/O_2=1$

Une nitrification partielle avec production de nitrite s'observe lorsque $1 < H^+/O_2 < 1.33$. Pour H^+/O_2 proche de 1.33, il n'y a pas de nitrification et pour $H^+/O_2=0$ associé à une consommation d'oxygène, il n'y a que de la nitrification. L'ajout de base peut directement être corrélé à la vitesse de production de protons et la mesure du bilan en O_2 (ou plus indirectement la mesure de la pO_2) peut être corrélée à la vitesse de consommation d' O_2 . Le suivi de ces paramètres a été réalisé durant les cocultures de *Nitrosomonas* et *Nitrobacter*, Figure III-21.

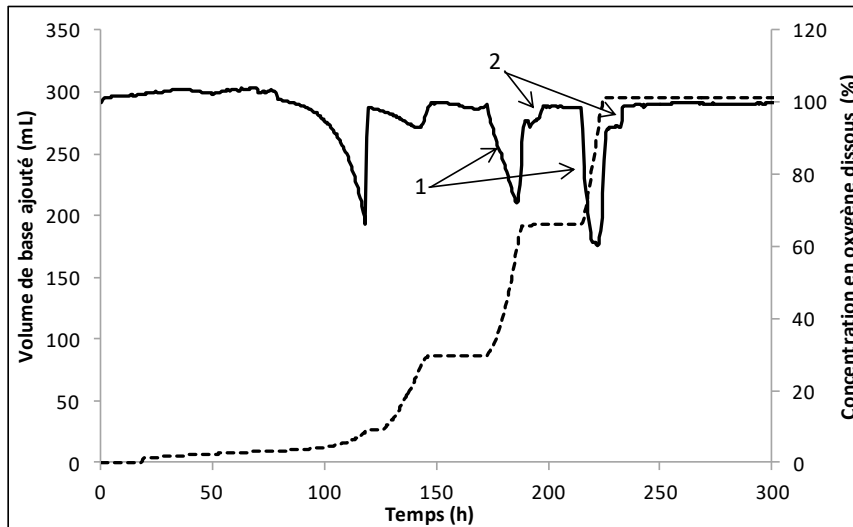


Figure III-21: Suivi de l'ajout de base et de la concentration en oxygène dissous durant la coculture A. La courbe en pointillés représente l'ajout de base ; la courbe en trait plein, la concentration en oxygène dissous ; flèches 1, phases d'oxydation de l'ammonium ; flèches 2, phases d'oxydation du nitrite.

Durant la coculture A, deux phases se distinguent sur les courbes de concentration en oxygène dissous. Ceci n'est pas observable pour la première phase de consommation de l'ammonium, où la concentration en oxygène dissous n'est pas exploitable car elle a été modifiée suite à une intervention sur le réacteur. Sur les deux autres phases d'oxydation, deux parties peuvent être mises en évidence :

- (i) celles représentées par les flèches 1 qui sont corrélées à l'ajout de base et correspondent donc à l'oxydation de l'ammonium par *Nitrosomonas europaea*
- (ii) celles représentées par les flèches 2 où il n'y a pas d'ajout de base et qui correspondent donc à l'oxydation du nitrite par *Nitrobacter winogradskyi*

Ainsi, à la fin de la phase de consommation de l'ammonium par *Nitrosomonas*, la concentration en oxygène dissous remonte jusqu'à 90 % environ. A ce moment-là, la concentration en oxygène stagne avant de remonter à 100 % : ce décalage correspond à la fin de la consommation du nitrite par *Nitrobacter*. Il est ainsi possible de différencier les deux phases de la nitrification en combinant l'observation de la quantité de base ajoutée dans le réacteur et l'évolution de la concentration en oxygène dissous. Le suivi de ces paramètres peut donc être utilisé pour vérifier que la nitrification est bien en cours dans le réacteur.

Ces observations ont été également vérifiées dans la coculture B, Figure III-22 :

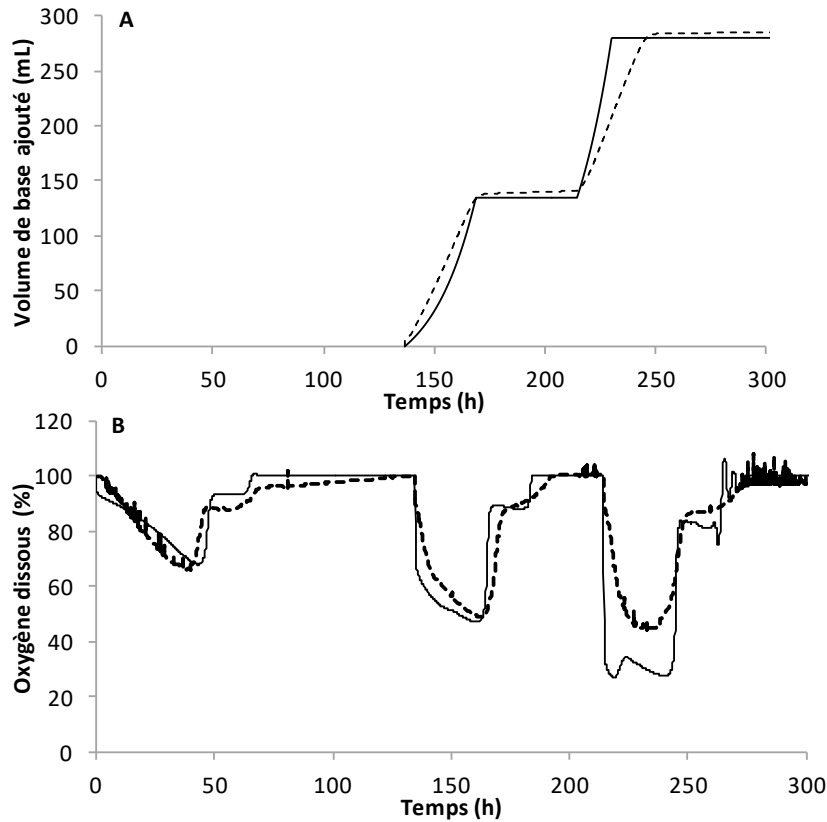


Figure III-22: Comparaison entre les données expérimentales (trait pointillés) et prédites par NitriSim (trait plein) durant la coculture B. A. Ajout de base dans le réacteur, l'acquisition de la base n'est disponible qu'à partir de 135 h ; B. Evolution de la concentration en oxygène dissous.

Tout comme la coculture A le modèle, pour la coculture B, représente fidèlement l'ajout de base dans le réacteur mais aussi les oxydations de l'ammonium et du nitrite observables sur les courbes de la concentration en oxygène dissous. Cette observation est aussi vraie pour les autres cocultures étudiées (C-E). Cependant, l'observation visuelle n'est pas pratique pour connaître l'état de la nitrification et l'utilisation de l'indicateur H^+/O_2 est beaucoup plus pertinent.

Pour connaître l'état de nitrification du réacteur, le ratio du taux de production de protons sur la consommation en O_2 peut être calculé dans le réacteur en batch par l'Equation III.37:

$$\frac{H^+}{O_2} = \frac{Base_{rate}}{(100 - O_2\%)} \cdot \frac{N_{base}}{10 \cdot V \cdot K_L a \cdot O_2^*} \quad (III.37)$$

Avec $Base_{rate}$: Vitesse d'ajout de la base (mol/h)

$O_2\%$: Concentration en oxygène dissous dans le réacteur (%)

N_{base} : Normalité de la base utilisée (N)

V : Volume du réacteur (L)

$K_L a$: Coefficient de transfert volumétrique de l'oxygène (h^{-1})

O_2^* : Concentration en oxygène dissous à saturation

Le calcul du ratio molaire H^+/O_2 peut fournir l'état de la nitrification dans le réacteur, Figure III-23 :

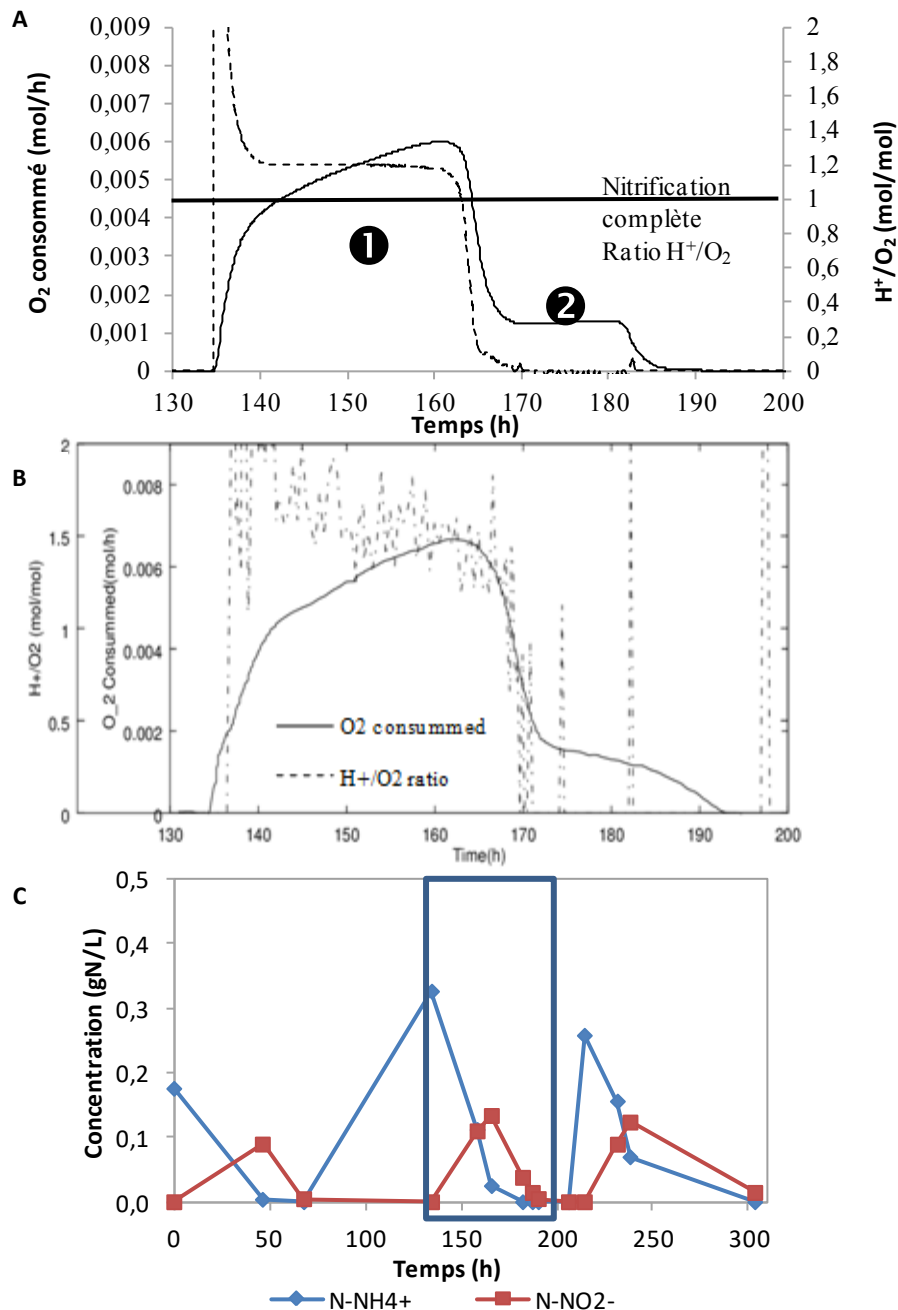


Figure III-23: Preuve expérimentale de la nitrification partielle durant la coculture B (seconde phase de consommation d'ammonium). A. Données prédites par NitriSim : consommation de l'oxygène (trait plein) et ratio théorique H^+/O_2 (trait pointillé), phase 1 : nitrification partielle et accumulation de nitrite, phase 2 : oxydation du nitrite accumulé ; B. Données expérimentales de la consommation d'oxygène (trait plein) et du ratio H^+/O_2 (trait pointillé) ; C. Evolution des concentrations expérimentales des

composés azotés durant la coculture B, l'encadré bleu représente la période représentée en Figure III-23A et B.

Si le ratio H^+/O_2 est supérieur à 1, cela signifie qu'il y a plus de protons produits que d'oxygène consommé : l'oxydation de l'ammonium en nitrate n'est pas totale et la nitrification s'arrête à l'étape de nitritation. Cette étape est représentée par la phase 1 sur la Figure III-23A. Lors de la phase 2, le ratio est largement inférieur à 1 décrivant une consommation d'oxygène sans production de protons H^+ : c'est la phase de consommation du nitrite. Cette phase correspond au décalage qui était observé sur les courbes de concentration en oxygène dissous en Figure III-21 et Figure III-14. Le tracé du ratio H^+/O_2 en temps réel permet ainsi de suivre la nitrification dans le réacteur.

III.5 Conclusions générales

Ce chapitre regroupe les résultats de la calibration et de la validation du modèle NitriSimR sur des cultures de *Nitrosomonas europaea* et *Nitrobacter winogradskyi*. Un modèle de Pirt avec létalité et un terme de maintenance a été sélectionné pour le modèle cinétique des souches. Les paramètres cinétiques des deux souches ont été déterminés lors de cultures pures. Les valeurs ainsi déterminées ont permis la mise en place d'un modèle cinétique de *Nitrosomonas europaea* ATCC® 19718 et *Nitrobacter winogradskyi* ATCC® 25391 (Tableau III-13):

Tableau III-13 : Récapitulatif des paramètres cinétiques définis lors des cultures pures de *Nitrosomonas europaea* ATCC® 19718 et *Nitrobacter winogradskyi* ATCC® 25391.

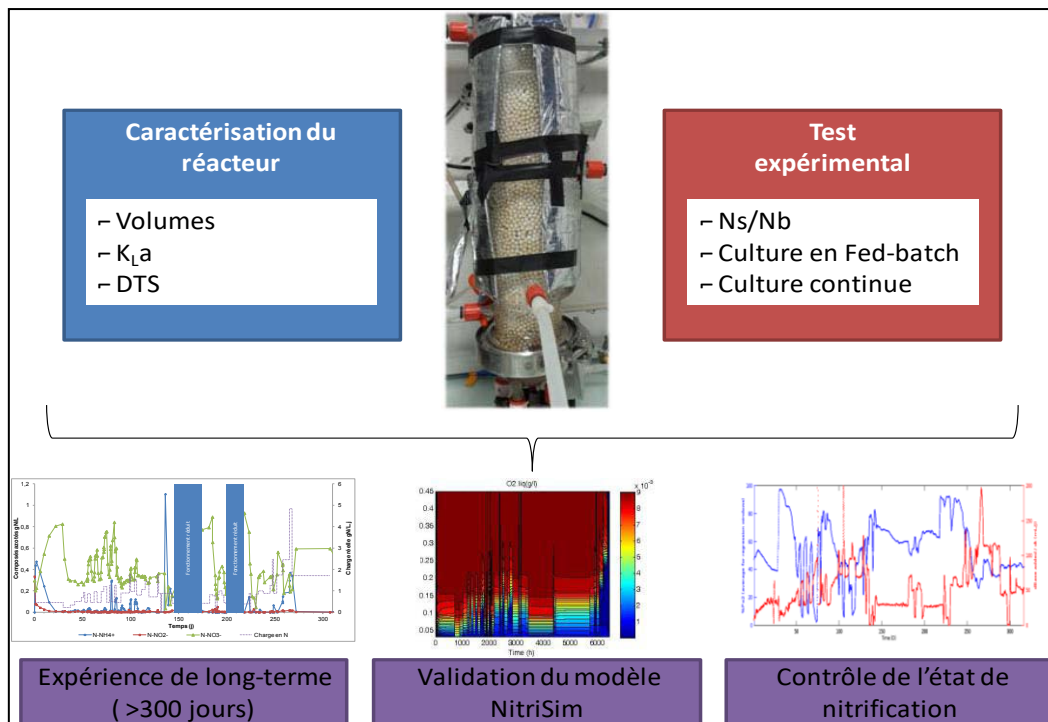
	<i>Nitrosomonas europaea</i> ATCC® 19718	<i>Nitrobacter winogradskyi</i> ATCC® 25391
μ_{obs}	0.051±0.009 h ⁻¹	0.023±0.008 h ⁻¹
q_{obs}	-0.282±0.16 gN-NH ₄ ⁺ .gX ⁻¹ .h ⁻¹	0.732±0.16 gN-NO ₃ ⁻ .gX ⁻¹ .h ⁻¹
$\gamma_{S/X}^{observed}$	-3.22±0.33 gN-NH ₄ ⁺ .gX ⁻¹	32.31±10.26 gN-NO ₃ ⁻ .gX ⁻¹
μ_{max}	0.054±0.009 h ⁻¹	0.024±0.008 h ⁻¹
m	0.135±0.041 gN-NH ₄ ⁺ .gX ⁻¹ .h ⁻¹	0.467±0.102 gN-NO ₂ ⁻ .gX ⁻¹ .h ⁻¹
b	0.003±0.0008 h ⁻¹	0.001±0.001 h ⁻¹

Le modèle a ensuite été validé dans des cocultures des deux souches. La coculture A a permis de réaliser la calibration finale du modèle en modifiant le terme de limitation de la croissance de *Nitrosomonas*. Les cocultures B-E ont été utilisées pour la validation finale du modèle et montrent des données prédites proches des valeurs expérimentales. NitriSimR est aussi capable de prédire la nitrification lorsqu'une limitation en carbone due au transfert de CO₂ de la phase gaz à liquide, est présente lors de la culture. Le modèle cinétique sera utilisé pour la modélisation de la nitrification en colonne à lit fixe où la biomasse est fixée.

Dans un second temps, une observation intéressante a permis de mettre en évidence un nouvel outil pour connaître l'état de nitrification du réacteur sans analyse off-line. En effet, en combinant le suivi de l'ajout de base et de la consommation d'oxygène dans le réacteur, il est possible de déterminer un ratio H^+/O_2 . Le ratio est inférieur à 1.33 lorsque la nitrification est partielle. Ce calcul peut être réalisé avec le suivi des deux paramètres on-line. Aucun prélèvement et analyse quantitative n'est nécessaire. Il permet de déterminer rapidement la présence ou absence de nitrite dans le réacteur et ainsi, une réponse rapide en cas de production importante de ce composé. Cependant l'utilisation de cet indicateur est très sensible au $K_L a$ du réacteur et à la mesure de l'oxygène dissous. En effet, durant les expériences réalisées, nous avons pu constater que la sensibilité des sondes pO_2 n'est pas toujours suffisante pour le calcul de la consommation d'oxygène. De plus, en vieillissant, ces sondes ont tendance à dériver vers des valeurs plus faibles. La détermination de la consommation d'oxygène est par ailleurs plus fiable si on utilise un analyseur d' O_2 différentiel qui mesure la différence de concentration en O_2 entre l'entrée et la sortie du réacteur. L'indicateur est fiable lorsque les données sont prédites par le modèle et est cohérent avec les données expérimentales. Ainsi, si l'indicateur calculé combiné à la consommation d' O_2 peut mettre en évidence les phases de nitrification partielle, il n'est cependant pas assez sensible pour observer des faibles pics de nitrite. Les mesures expérimentales sont souvent parasitées par du « bruit » causé notamment par les limites du matériel analytique.

Chapitre IV

Etude de la nitrification dans la colonne à lit fixe et validation du modèle NitriSim



Résumé graphique du Chapitre IV : Etude hydrodynamique de la colonne à lit fixe et inoculation d'une coculture *N. europaea* et *N. winogradskyi*. Expérience de 300 jours qui permet la définition d'un modèle de nitrification dans une colonne à lit fixe représentée par un modèle N-bacs en série.

Chapitre IV : Etude de la nitrification dans la colonne à lit fixe et validation du modèle NitriSim

Un modèle biologique de nitrification par *Nitrosomonas europaea* et *Nitrobacter winogradskyi* a été calibré et validé lors de cocultures libres. Il doit aussi être testé dans un réacteur du même type que le compartiment C3 de la boucle MELiSSA puisque l'objectif final est le développement d'un modèle prédictif pour ce compartiment. Ce chapitre présente une expérience de plusieurs mois dans une colonne à lit fixe. Les différents objectifs sont :

- Compréhension de l'hydrodynamique du réacteur
- Comportement de la nitrification au sein du réacteur
- Validation du modèle sur une expérience de longue durée
- Utilisation du modèle lors de « stress » comme des coupures d'électricité entraînant une rupture de l'alimentation liquide et en gaz, ou des coupures de gaz seulement

La colonne est colonisée à partir de cultures pures de *Nitrosomonas* et *Nitrobacter*. Différentes charges en azote sont appliquées en entrée de réacteur afin d'observer la dynamique des réponses en sortie de réacteur. A l'issue de cette expérimentation, le modèle NitriSim est utilisé pour simuler l'évolution des composés azotés et de la biomasse dans le réacteur. La comparaison de ces simulations aux points expérimentaux permettra de vérifier la précision du modèle.

IV.1 Caractérisation physique de la colonne

La caractérisation physique de la colonne s'effectue en conditions abiotiques. Ces expériences préliminaires permettent de caractériser le réacteur à lit fixe et d'identifier les paramètres tels que le K_{La} , le temps de séjour et les volumes du réacteur. En effet, selon le compactage des billes, certains volumes ou paramètres peuvent varier. Le principe de fonctionnement de la colonne à lit fixe est représenté dans la Figure IV-1 :

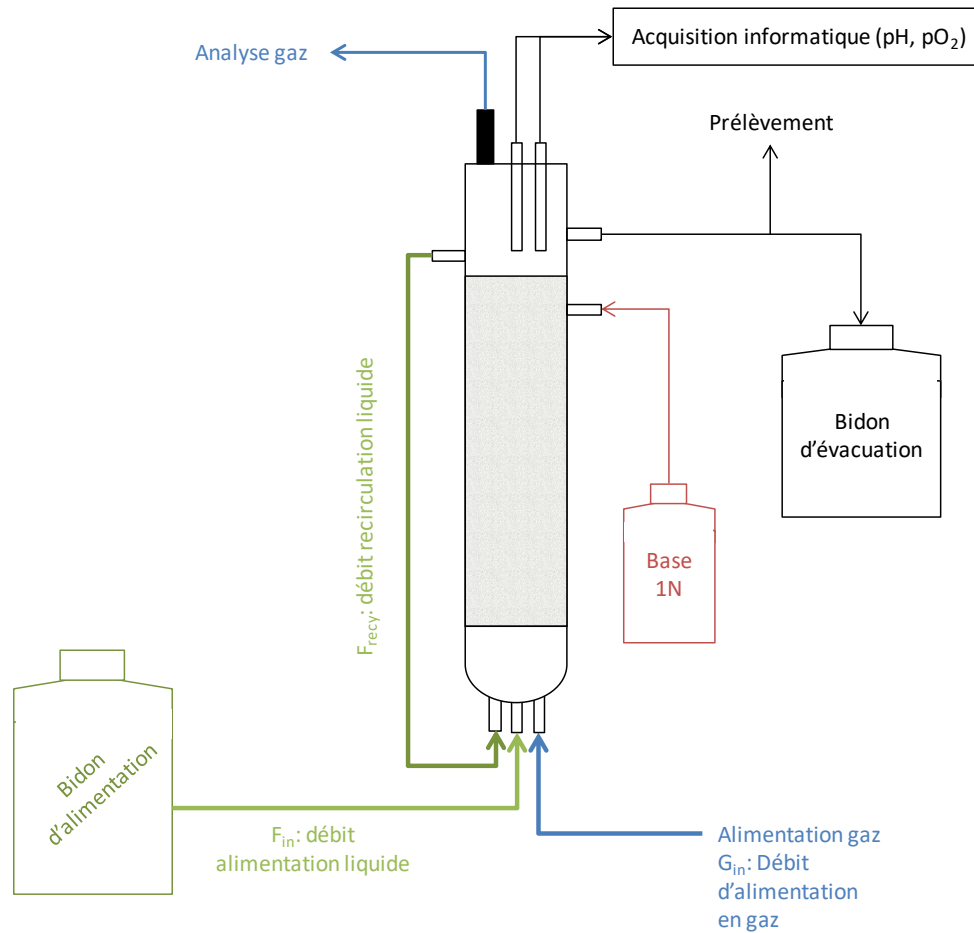


Figure IV-1: Schéma de fonctionnement de la colonne à lit fixe installée à l'Institut Pascal.

Ce schéma permet de mettre en évidence les entrées des alimentations liquides au sein de la colonne à lit fixe.

IV.1.1 Distribution du temps de séjour

L'analyse du temps de séjour ou temps de résidence T_R , permet de déterminer le comportement hydrodynamique du bioréacteur. Lors des essais expérimentaux, T_R a été calculé à différents débits liquides et gazeux et avec ou sans lit fixe à partir de l'Equation II.6 (Tableau IV-1). Ces essais permettent aussi de calculer le volume liquide total (V_L) de la colonne qui est défini par l'Equation IV.38:

$$V_L = T_R \times F \quad (IV.38)$$

Avec : V_L : le volume liquide total (mL)

T_R : le temps de résidence (h)

F : le débit d'alimentation liquide (mL/h)

Tableau IV-1: Résultats expérimentaux obtenus lors des déterminations du temps de séjour T_R dans différentes conditions.

Exp.	Débit liquide (mL/min)	Débit recyclage (mL/min)	Débit gaz (L _{air} /min)	T_R (h)	Volume (mL)	Remarques
A	1.97	0	0.67	5.09	602	Fort débit d'air
B	1.82	10.92	0.67	5.68	517	
C	2.51	15.06	0.67	3.99	600	
D	2.79	16.74	0.67	3.74	626	
E	1.91	0	0.3	4.44	510	Sans recirculation
F	1.91	0	0.3	4.50	517	
G	1.87	11.20	0.3	4.48	502	Recirculation liquide
H	2.41	0	0	4.60	667	Sans recirculation et gaz
I	2.14	0	0	4.99	640	
J	2.29	13.78	0.3	5.65	778	Sans lit fixe
k	2.37	14.23	0.3	4.19	597	Lit fixe différent

Des variations de débits sont observées pour un même réglage de pompe et peuvent être expliquées par les manipulations et changements de tuyaux au niveau de cette pompe.

Pour déterminer le comportement du réacteur, le signal de conductivité normé est représenté en fonction du temps normé θ défini par l'Equation IV.39:

$$\theta = \frac{t}{T_R} \quad (\text{IV.39})$$

Avec : θ : temps normé (h)

t : temps expérimental (h)

T_R : temps de résidence (h)

Lors de la détermination du temps de séjour sans lit fixe, la colonne à lit fixe se comporte comme un réacteur parfaitement agité, Figure IV-2 :

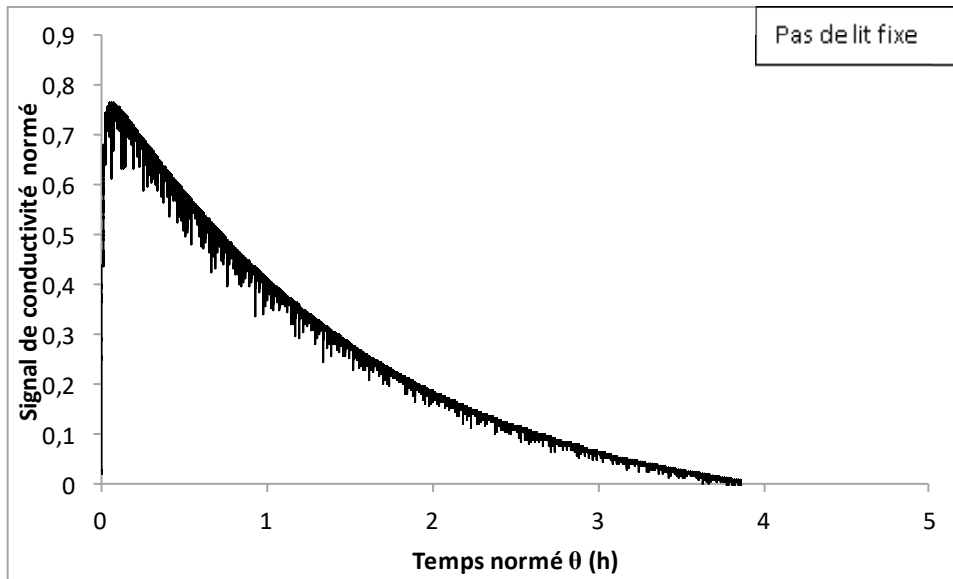


Figure IV-2: Profil obtenu lors de la détermination de T_R pour l'expérience J en absence de lit fixe, débit liquide d'alimentation de 2.29 mL/min, recyclage liquide 13.78 et débit de gaz de 0.3 L/min.

Le pic de conductivité apparaît au bout de 0,1 temps de séjour après le pulse de NaCl : c'est le temps nécessaire pour que l'on puisse faire l'hypothèse que le réacteur est parfaitement mélangé en l'absence de lit fixe.. Cette valeur de 0,1 temps de séjour donne un ordre de grandeur du temps de mélange. Il est intéressant de comparer le profil expérimental obtenu sans lit fixe (Figure IV-2) à différents profils obtenus avec le lit fixe dans le réacteur, Figure IV-3.

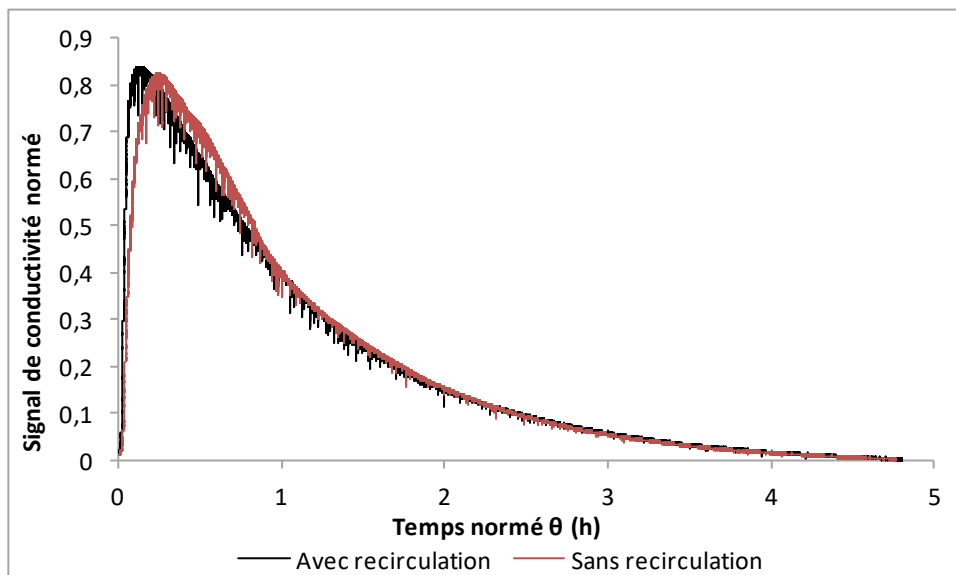


Figure IV-3: Profil obtenu lors de la détermination de T_R avec et sans recyclage liquide dans la colonne à lit fixe. Courbe rouge, expérience E : débit liquide d'alimentation de 1.91 mL/min, débit de gaz de 0.3 L/min et pas de recyclage liquide ; Courbe noire, expérience G : débit liquide d'alimentation de 1.87 mL/min, recyclage liquide 11.20 et débit de gaz de 0.3 L/min.

Les courbes présentées en Figure IV-3 diffèrent par l'absence (expérience E, courbe rouge) ou la présence (expérience G, courbe noire) de la boucle de recyclage dans la colonne à lit fixe. Les profils sont semblables mais le mélange, au sein de la colonne, est amélioré lorsque la recirculation liquide est présente : il faut respectivement 0.13 et 0.24 temps de séjour pour atteindre le pic de signal de conductivité au début de l'expérience avec et sans recyclage. Ainsi, un comportement « piston » est sensiblement observable dans le lit fixe lorsque la boucle de recyclage n'est pas active. Dans les conditions nominales de fonctionnement de la colonne à lit fixe (courbe noire en Figure IV-3) un temps de séjour T_R de 4.48 h est obtenu (Tableau IV-1). Le régime stationnaire est atteint après 3 à 5 temps de séjour.

Des expériences de caractérisation des distributions de temps de séjour ont été menées dans le réacteur du compartiment C3 au MELiSSA Pilot Plant, Figure IV-4:

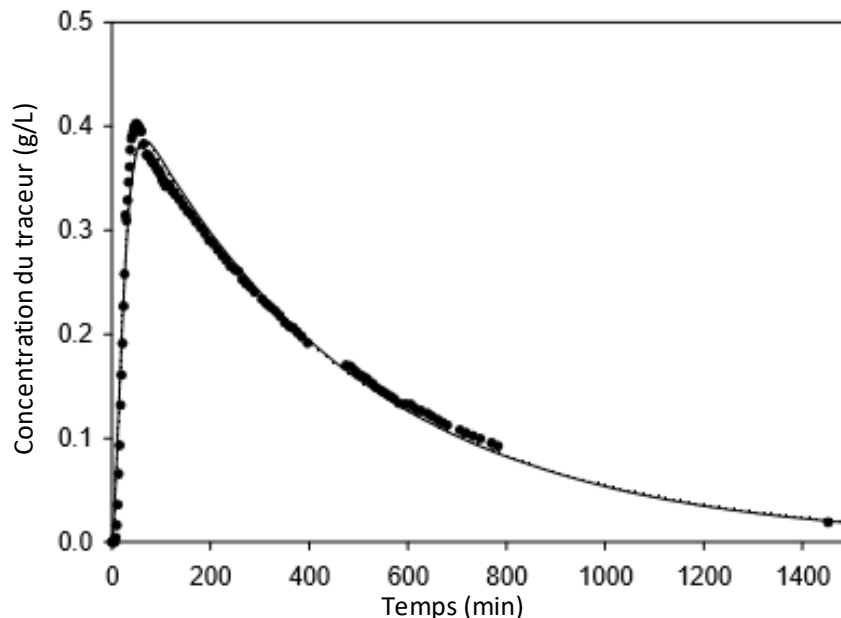


Figure IV-4: Expérience de distribution de temps de séjour dans le C3 au MPP pour débit liquide d'alimentation de 0.85 mL/min, débit de gaz de 0.04 L/min et recyclage liquide de 4.5 mL/min. Les points noirs représentent les données expérimentales et la courbe en trait plein les données modélisées (Pérez et al., 2005).

Le réacteur du compartiment C3 présent au MPP présente un comportement de réacteur parfaitement agité et le pic de mélange est obtenu vers 0.1 temps de séjour. Les deux colonnes à lit fixe présentent des profils de réacteur agité similaires.

IV.1.2 Détermination expérimentale des volumes et du degré de vide de la colonne

Les dimensions du réacteur sont connues, il est facile de mesurer le volume total de la colonne. Cependant, comme une partie du réacteur est composée de billes il est nécessaire

de déterminer ce volume ainsi que le volume réel de liquide contenu dans la colonne. Le compactage des billes du lit fixe n'est jamais le même à chaque mise en place du réacteur. En effet, les billes ne s'organisant pas toujours de la même manière, il est nécessaire de réaliser ces mesures à chaque montage du réacteur. Plusieurs expériences ont permis de déterminer les volumes du réacteur (Tableau IV-2) :

Tableau IV-2: Volumes de la colonne exprimés en mL déterminés sur trois expériences différentes.

	Exp 1	Exp 2	Exp 3
Volume utile total	1272	1265	1174
Volume partie inférieure	90	ND	90
Volume partie centrale (sans lit)	918	ND	904
Volume partie supérieure	264	ND	180
Volume du lit fixe	545	600	552
Volume de gaz (débit 0.3 L/min)	ND	ND	90.4

L'expérience 3 représente le montage du réacteur utilisé pour l'expérience décrite dans la Partie IV.2. Le volume utile total de la colonne a été déterminé sans lit fixe en remplissant la colonne et en mesurant la masse du volume d'eau après soutirage. Le volume du lit fixe est déterminé après la mise en place des billes dans le réacteur. Le volume d'eau remplissant la colonne est alors mesuré et, par différence avec le volume total liquide défini au préalable on peut déterminer le volume du lit fixe. A partir de ces mesures, on peut calculer le degré de vide ε au sein de la partie centrale de la colonne :

$$\varepsilon = \frac{\text{Volume partie centrale} - \text{Volume du lit fixe}}{\text{Volume partie centrale}} = \frac{904 - 552}{904} = 0.31 \quad (\text{IV.40})$$

Le degré de vide calculé expérimentalement est 0.31 et la valeur théorique est de 0.364 pour un lit fixe composé de billes en verre dont le diamètre est 4 mm (Poughon et al., 2002). La différence entre les deux valeurs peut s'expliquer par les variations au niveau des mesures expérimentales notamment dans la composition du lit fixe comme expliqué précédemment et, par le caractère compressible du polystyrène du support. L'opérateur met en place le lit fixe et influe sur son compactage. Le volume de gaz à l'intérieur de la colonne est mesuré en collectant le volume d'eau déplacé lorsque le débit d'air est appliqué à l'entrée du réacteur, Figure IV-5.

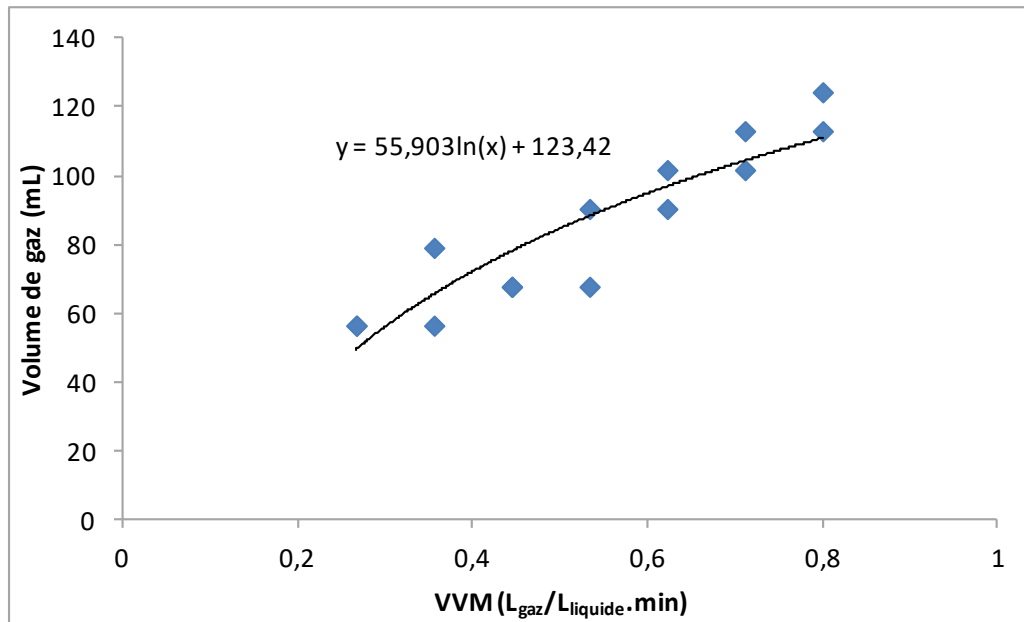


Figure IV-5: Volume de gaz en fonction du débit d'air appliqué dans la colonne à lit fixe.

La courbe de tendance obtenue permet de calculer le volume de gaz circulant dans la colonne pour les débits d'air utilisés lors de la caractérisation de la colonne dans la Partie IV.2. Le volume de gaz au sein de la colonne varie en fonction du débit d'air mais il peut aussi être affecté par la présence de « zone piège » où des bulles d'air sont coincées et ne peuvent pas circuler. La grille présente en bas du lit fixe impacte fortement sur le passage de l'air dans le réacteur : si le diamètre du maillage est trop faible, l'air ne peut pas entrer dans le réacteur. Dans la colonne à lit fixe, la grille soutenant le lit fixe présente des pores dont la taille (3 mm) est sensiblement inférieure au diamètre des billes de polystyrène. Ainsi, les billes ne peuvent pas passer par la grille mais le maillage est assez grand pour permettre une circulation correcte de l'air dans le réacteur. Les volumes définis précédemment permettent de calculer le « hold-up » représentant la fraction de gaz dans le réacteur :

$$Hold - up = \frac{V_{gaz}}{V_{liq}} \quad (IV.41)$$

Avec : Hold-up : Fraction de gaz dans le réacteur (%)

V_{gaz} : Volume de gaz (mL)

V_{liq} : Volume liquide dans le réacteur (mL)

Ainsi, des valeurs de hold-up de 20 et 17 % ont été calculées pour des débits d'air respectivement de 0.67 et 0.45 L_{air}/min. Ces données seront utilisées dans le modèle NitriSim et influent directement sur l'hydrodynamique au sein du réacteur.

IV.1.3 Analyse expérimentale du coefficient d'échange gaz/liquide

Dans la nitrification réalisée par *Nitrosomonas* et *Nitrobacter*, le transfert de l'oxygène au sein du réacteur est un facteur critique. Ce paramètre est représenté dans le modèle de nitrification développé par le coefficient de transfert volumétrique de l'oxygène : K_La . L'efficacité de transfert détermine, en grande partie, la charge maximale en azote qui peut être traitée par la colonne de nitrification. Le coefficient K_La est le produit de deux variables : K_L qui est le coefficient de transfert de l' O_2 dans le liquide (m/s), et de a qui est la surface d'échange gaz/liquide par unité de volume de liquide (m^2/m^3). On définit la capacité de transfert de l'oxygène, OTR (Oxygen Transfer Rate), par:

$$OTR = K_La \times (C^* - C) \tag{IV.42}$$

Avec : OTR : Vitesse de transfert de l'oxygène ($mol \cdot m^{-3} \cdot s^{-1}$)

K_La : Coefficient volumétrique de transfert de l'oxygène (s^{-1})

C^* : Concentration en oxygène à saturation avec la phase gazeuse ($mol \cdot m^{-3}$)

C : Concentration en oxygène dans le réacteur parfaitement mélangé ($mol \cdot m^{-3}$)

La vitesse de transfert de l'oxygène au sein du réacteur est directement dépendante du K_La . Ainsi, pour améliorer le transfert d'oxygène au sein d'un réacteur, il faudra augmenter la surface d'échange gaz liquide c'est-à-dire créer des bulles de petites tailles et nombreuses dans un réacteur agité et casser les bulles d'air à l'entrée d'un réacteur à lit fixe.

De la même manière que pour la distribution du temps de séjour, différents débits d'air ont été testés afin d'obtenir une gamme de variation du K_La selon différentes conditions opératoires, Figure IV-6.

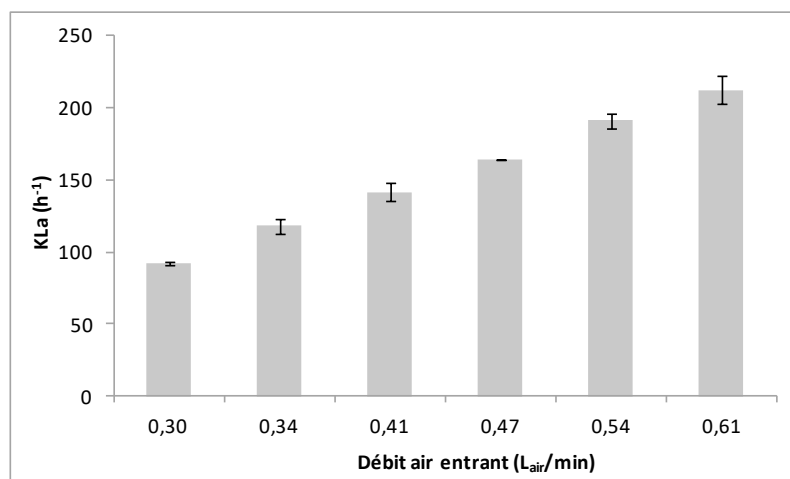


Figure IV-6: Détermination expérimentale du coefficient volumétrique de transfert d'oxygène K_La dans la colonne à lit fixe. Des duplicats ont été réalisés pour chaque d'air testé.

Ainsi pour un débit d'air de 0.45 L_{air}/min, qui est le débit d'air le plus utilisé lors du fonctionnement de la colonne à lit fixe, le K_La moyen est 155 h⁻¹.

Il est possible de comparer les valeurs des coefficients volumétriques de transfert d'oxygène au sein de la colonne à lit avec d'autres colonnes à lit fixe dont les caractéristiques sont données dans le Tableau IV-3:

Tableau IV-3 : Comparaison des coefficients de transfert volumétriques de l'oxygène de différents réacteurs. GePEB1 est la colonne à lit fixe de l'Institut Pascal de diamètre 60 mm ; C50 est une colonne de 53 mm de diamètre composée d'un lit fixe seul (Poughon, 1999) ; UAB1 et UAB2 sont des colonnes à lit fixe de petit diamètre (0.038 m) utilisés pour la caractérisation hydrodynamique du réacteur du C3 (Pérez et al., 1999; Poughon, 1999).

Nom	Diamètre (m)	Volume liquide (L)	Degré de vide ε	Type
UAB1	0.038	0.622	0.55	Réacteurs composés de trois parties dont une est le lit fixe
UAB2	0.038	0.622	0.40	
Colonne à lit fixe	0.060	0.532	0.31	
C50	0.053	0.686	0.36	Lit fixe seul

Pour comparer le K_La de différents réacteurs, il faut comparer les valeurs de vitesses superficielles de gaz dans le lit fixe tenant compte de la surface de la section de la colonne et du degré de vide du lit fixe (Equation IV.43), Figure IV-7:

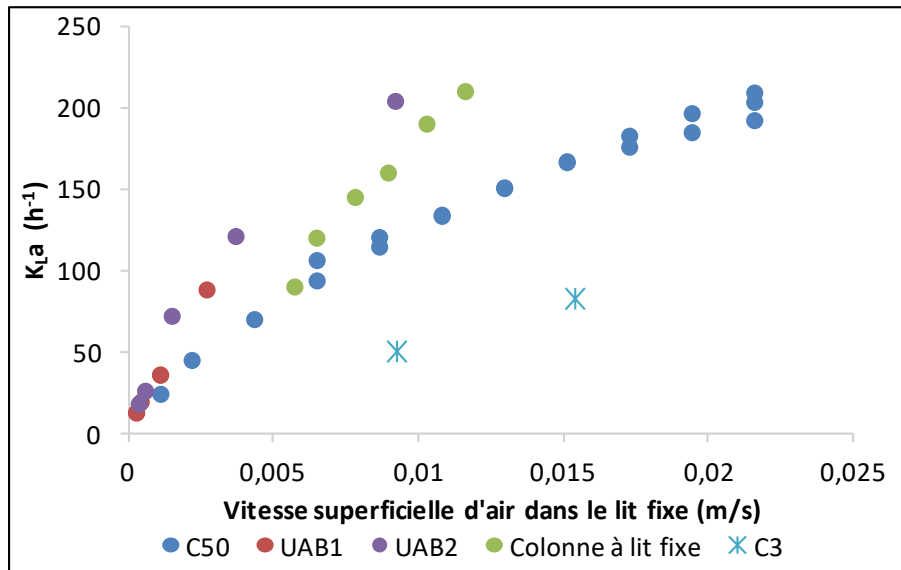
$$Vit_{gaz} = \frac{G_E}{S \cdot \varepsilon} \quad (IV.43)$$

Avec Vit_{gaz} : Vitesse superficielle d'air dans le lit fixe (m/s)

G_E : Débit d'air entrant dans le réacteur (m³/s)

S : Surface de la section du lit fixe (m²)

ε : Degré de vide du lit fixe



comparés. Le réacteur utilisé pour la suite de l'étude présente alors une capacité de transfert de l'oxygène similaire à celle du réacteur du compartiment C3.

IV.2 Caractérisation de la colonne : fonctionnement en continu de la colonne à lit fixe

IV.2.1 Définition des conditions nominales

Lors du fonctionnement de la colonne à lit fixe, certains paramètres sont nommés « nominaux ». Les paramètres nominaux correspondent au fonctionnement de la colonne à lit fixe dans les conditions applicables dans MELiSSA. Ces valeurs sont des valeurs « références » et doivent permettre un fonctionnement en nitrification totale (Tableau IV-4):

Tableau IV-4: Définition des conditions nominales de fonctionnement de la colonne à lit fixe.

Paramètre	Valeur nominale
Temps de séjour T_R (h)	8
Taux de dilution D (h^{-1})	0.125
Coefficient de transfert volumétrique K_{La} (h^{-1})	92-191
Charge théorique en azote (gN/L.j)	0.87
Débit d'air (L_{air}/min)	0.45

Les conditions nominales sont notamment des données communes avec le Compartiment C3 présent au MELiSSA Pilot Plant à Barcelone. Le fonctionnement de la colonne dans ces mêmes conditions permettra de comparer les résultats obtenus entre les deux réacteurs. Au MPP, le fonctionnement nominal du réacteur à lit fixe respecte les paramètres suivants : $T_R = 8.4$ h, charge 0.86 gN/L.j et débit d'air 3 L_{air}/min . Le débit d'air appliqué étant dépendant du dimensionnement du réacteur, un débit plus faible sera appliqué dans la colonne à lit fixe, de l'ordre de 0.45 L_{air}/min . Cependant, le temps de résidence et la charge nominaux seront les mêmes pour les deux réacteurs.

IV.2.2 Plan expérimental

La colonne à lit fixe est stérilisée et remplie de milieu de coculture stérile. Une fois le réacteur équilibré : calibration des sondes, température du réacteur stabilisée, il faut procéder à l'inoculation. On réalise une pré-culture de *N. europaea* et *N. winogradskyi* avec une concentration bactérienne maximum : plusieurs fed-batch sont réalisés comme lors des

cocultures décrites dans le Chapitre III. Les premières étapes de colonisation se déroulent en fed-batch et non en continu. Cette étape permet d'éviter le lessivage de la biomasse.

La pré-culture est placée dans une bouteille de transfert stérile et qui est branchée sur la pompe d'alimentation de la colonne. Le contenu de la bouteille est transféré entièrement dans le réacteur et le circuit d'alimentation est ensuite coupé alors que la recirculation est active mais à très faible débit. La colonne fonctionne alors en batch. Des prélèvements sont réalisés afin de contrôler la présence/absence d'ammonium. Le gaz circulant dans la colonne et le circuit de recirculation liquide permettent d'assurer le mélange et l'oxydation de la totalité de l'ammonium présent dans le milieu. Lorsqu'il n'y a plus d'ammonium dans le milieu, on procède alors à un fed-batch. On remplace la moitié du volume du réacteur par du milieu neuf et on isole de nouveau la colonne. Lorsque l'ammonium est totalement consommé, le mode continu est alors mis en place. On se place à un débit très faible ($T_R=50$ h, débit d'alimentation : 0.18 mL/min, taux de dilution $D=0.02$ h⁻¹), afin d'assurer l'alimentation en ammonium tout en ne décrochant pas la biomasse qui a commencé à adhérer sur le support ce qui permet de limiter le risque de lessivage. D étant inférieur aux taux de croissance maximum de *Nitrosomonas europaea* et *Nitrobacter winogradskyi* calculés dans le Chapitre III (respectivement 0.054 et 0.023 h⁻¹), ces conditions permettent d'éviter le phénomène de lessivage pour les bactéries non fixées tout en permettant la fixation progressive des bactéries sur le support solide. Petit à petit, le débit sera augmenté de manière à atteindre la valeur nominale de $T_R = 8$ h où $D = 0.13$ h⁻¹. Puisque la biomasse est alors fixée le lessivage est évité.

Le plan expérimental mis en place pour étudier la nitrification au sein de la colonne à lit fixe est divisé en plusieurs phases (Tableau IV-5):

Tableau IV-5: Plan expérimental appliqué sur la colonne à lit regroupant les principales conditions testées.

Phases	Conditions testées
P0	Démarrage du réacteur et mise en place du mode continu
P1-P9	Mise en place de la nitrification dans la colonne et alternance de différentes concentrations en azote en entrée de colonne
P10-P14	Variation de la concentration en azote en entrée de la colonne avec un T_R fixe
P15-P20	Variation du temps de séjour pour une seule concentration en azote en entrée
P21-P24	Fonctionnement réduit de la colonne et remise en conditions nominales

P25-P29 Variation de la source d'azote en entrée de colonne (urée)

P30 Fonctionnement réduit de la colonne

P31-P34 Variation de la source d'azote en entrée de colonne (urée)-Répétition

P35-P42 Variation du temps de séjour et de la concentration en azote en entrée de colonne

Chacune des phases sera détaillée dans la suite de ce chapitre en amont des résultats expérimentaux obtenus.

IV.2.3 Démarrage du réacteur : phase de colonisation et de mise en fonctionnement continu

La première étape de cette expérimentation est d'atteindre une nitrification totale dans le réacteur en fonctionnement continu. La phase 0 correspond à cet objectif (Tableau IV-6):

Tableau IV-6: Les différentes variations de conditions expérimentales durant la mise en place de la nitrification totale dans la colonne à lit fixe pendant la phase P0.

Etape	Temps (j)	T _R (h)	Charge en entrée (gN/L.j)
A	0	18.77	1.168
B	0.17	25.5	0.861
C	1.07	50	0,447
D	30	33.1	0.222
E	37.15	21.8	0.337
F	42	14.55	0.505
G	49	10.85	0.677
H	51	7.9	0.928
I	52.2	16.32	0.450

Le suivi chromatographique des composés azotés permet de contrôler l'état de la nitrification au sein du réacteur : partielle ou totale. L'objectif de cette première étape de culture est d'obtenir une nitrification totale dans le réacteur : en sortie de réacteur on ne doit trouver que du nitrate. Les résultats obtenus pendant la mise en place de la nitrification totale sont représentés en Figure IV-9 :

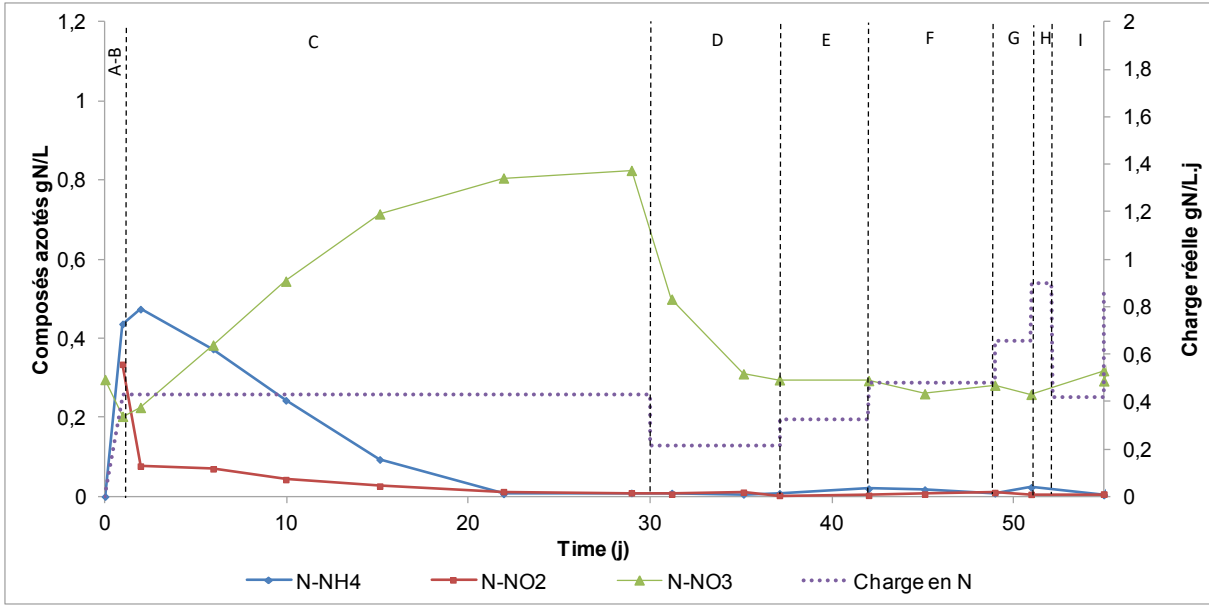


Figure IV-9: Evolution des composés azotés et de la charge entrante en azote dans la colonne à lit durant la mise en place de la nitrification totale.

Les vingt premiers jours de la culture schématisent l'adaptation métabolique des microorganismes dans le réacteur. Initialement, les trois formes azotées sont présentes en sortie de colonne : le métabolisme nitrifiant est en place mais il n'est pas assez efficace pour oxyder la totalité de l'azote entrant en bas de colonne. La concentration en nitrate augmente graduellement alors que celles en ammonium et nitrite diminuent proportionnellement. A partir de 20 j, la nitrification totale est atteinte : les conditions sont maintenues pendant au moins 4 temps de séjour pour atteindre le régime permanent (ici 4.8 T_R soit une dizaine de jours car $T_R = 50$ h). A la fin de ce régime permanent il est alors possible de calculer le bilan de l'azote en sortie de réacteur par rapport à la concentration entrante en azote :

$$\text{Bilan N} = \frac{([N - NH_4^+]_{\text{sortie}} + [N - NO_2^-]_{\text{sortie}} + [N - NO_3^-]_{\text{sortie}})}{[N - NH_4^+]_{\text{entrée}}} \quad (\text{IV.44})$$

Où $[N - NH_4^+]_{\text{sortie}}$, $[N - NO_2^-]_{\text{sortie}}$ et $[N - NO_3^-]_{\text{sortie}}$ sont les concentrations en sortie de réacteur en gN/L

$[N - NH_4^+]_{\text{entrée}}$ la concentration en ammonium en entrée de réacteur en gN/L

Ce calcul n'est possible que lorsque le réacteur est en état stationnaire. Un bilan azote de 100% est normalement attendu car l'azote entrant doit forcément se retrouver en sortie de réacteur sous n'importe quelle forme : ammonium, nitrite et/ou nitrate. Les résultats sont représentés en pourcentage au cours du temps, Figure IV-10 :

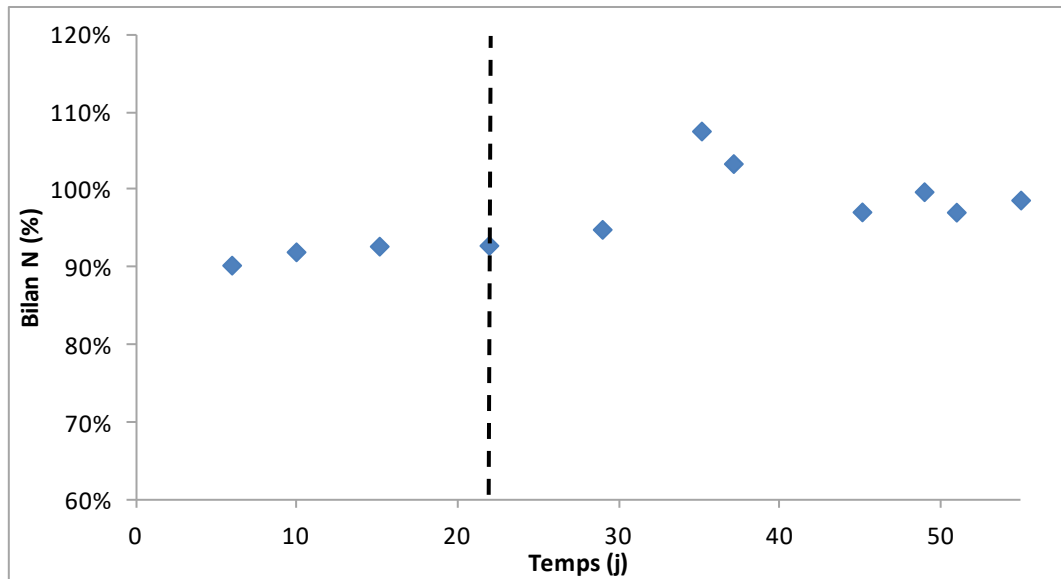


Figure IV-10: Bilan azote durant la mise en place de la nitrification. La droite en pointillés représente le moment où la nitrification totale est atteinte.

Durant les premiers jours de culture, le bilan en azote n'est pas complet : ceci peut s'expliquer par des variations au niveau des concentrations azotées dues au métabolisme bactérien. De plus, les temps de séjour durant cette période sont élevés (de 18.77 à 50 h), les mélanges liquides sont lents et des discordances peuvent alors apparaître au niveau des concentrations. Lorsque la nitrification totale est atteinte et que la colonne est stable, le bilan varie entre 97 et 108%. Les variations peuvent être dues aussi aux fortes dilutions nécessaires lors du dosage chromatographique dont la gamme s'étend de 0 à 0.047 gN-NH₄⁺/L, 0.018 gN-NO₂⁻/L ou 0.013 gN-NO₃⁻/L.

Dans un second temps, il est possible de calculer l'efficacité de nitrification qui permet d'indiquer si la colonne se trouve en nitrification partielle ou totale. Elle est définie par :

$$Efficacité\ de\ nitrification = 1 - \frac{[NH_4^+]_{sortie} + [NO_2^-]_{sortie}}{[NH_4^+]_{entrée}} \quad (IV.45)$$

Où $[NH_4^+]_{sortie}$ et $[NO_2^-]_{sortie}$ sont respectivement les concentrations en ammonium et en nitrite en sortie; et $[NH_4^+]_{entrée}$ la concentration en ammonium en entrée de réacteur.

L'efficacité de nitrification attendue est 0.98 car une partie de l'azote sert au métabolisme bactérien et ne sera pas oxydée en nitrate. Les résultats obtenus pendant cette phase sont représentés graphiquement, Figure IV-11 :

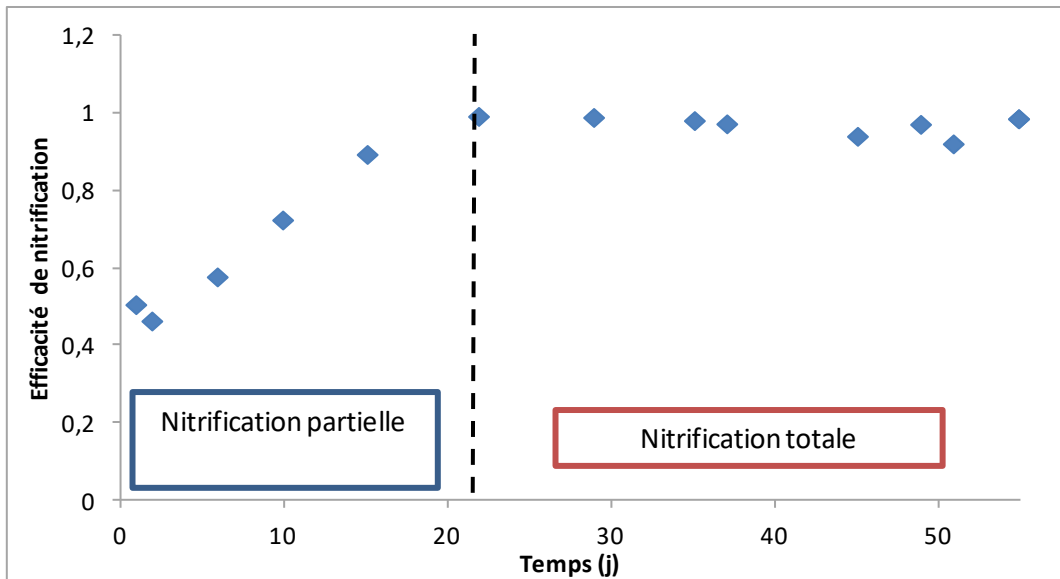


Figure IV-11: Efficacité de nitrification durant l'établissement de la nitrification totale par *N. europaea* et *N. winogradskyi*. La droite en pointillés représente le moment où la nitrification totale est atteinte.

Dans les 20 premiers jours de cultures, l'efficacité de nitrification est très inférieure à la valeur attendue. La colonne se trouve en nitrification partielle, l'ammonium n'est pas totalement converti. En revanche, lorsque la nitrification totale est atteinte, l'efficacité de nitrification varie entre 0.933 et 0.986. Ces valeurs sont proches de la valeur attendue de 0.98 à une erreur de 5 % près.

La nitrification totale a été atteinte en vingt jours dans la colonne à lit fixe colonisée par *N. europaea* et *N. winogradskyi*. Cette étape préliminaire était indispensable à une caractérisation de la nitrification dans le réacteur. A la fin de cette étape, la biomasse n'est pas visible sur le lit fixe, Figure IV-12:



Figure IV-12: Photo du lit fixe après la mise en place du mode continu à 55 jours.

La biomasse est présente dans le réacteur puisque la nitrification est en place et effective. Cependant, le biofilm n'est pas encore visible sur le lit fixe et devrait s'intensifier au cours de l'expérimentation.

A l'issue de la mise en place du mode continu, la caractérisation de la nitrification dans la colonne à lit fixe peut débuter.

IV.2.4 Variation de la charge en azote par la variation de la concentration entrante à T_R constant

Cette première série de tests se déroule au même temps de résidence ($T_R = 16$ h) mais la concentration entrante en azote varie et le débit de gaz aussi (Tableau IV-7) :

Tableau IV-7: Variation des conditions expérimentales durant les phases P1 à P5.

Phase	Temps (j)	T_R (h)	Charge en entrée (gN/L-j)	Conditions expérimentales
P1	55	16.32	0.859	0.36 L_{air}/min + N2X
P2	58	16.32	0.446	0.36 L_{air}/min + N1X
P3	62	16.32	0.957	0.36 L_{air}/min + N2X
P4	65	16.32	0.446	0.36 L_{air}/min + N1X
P4.I1	67.3	16.32	0.446	0.56 L_{air}/min + N1X
P5	69	16.32	0.957	0.56 L_{air}/min + N2X

N1X : Concentration théorique 0.285 gN/L ; N2X : Concentration théorique 0.57 gN/L

Les phases sont découpées en fonction des répétitions pour pouvoir les comparer. Par exemple les quatre premières phases d'études alternent deux concentrations en azote en entrée différentes pour un même temps de séjour, Figure IV-13 :

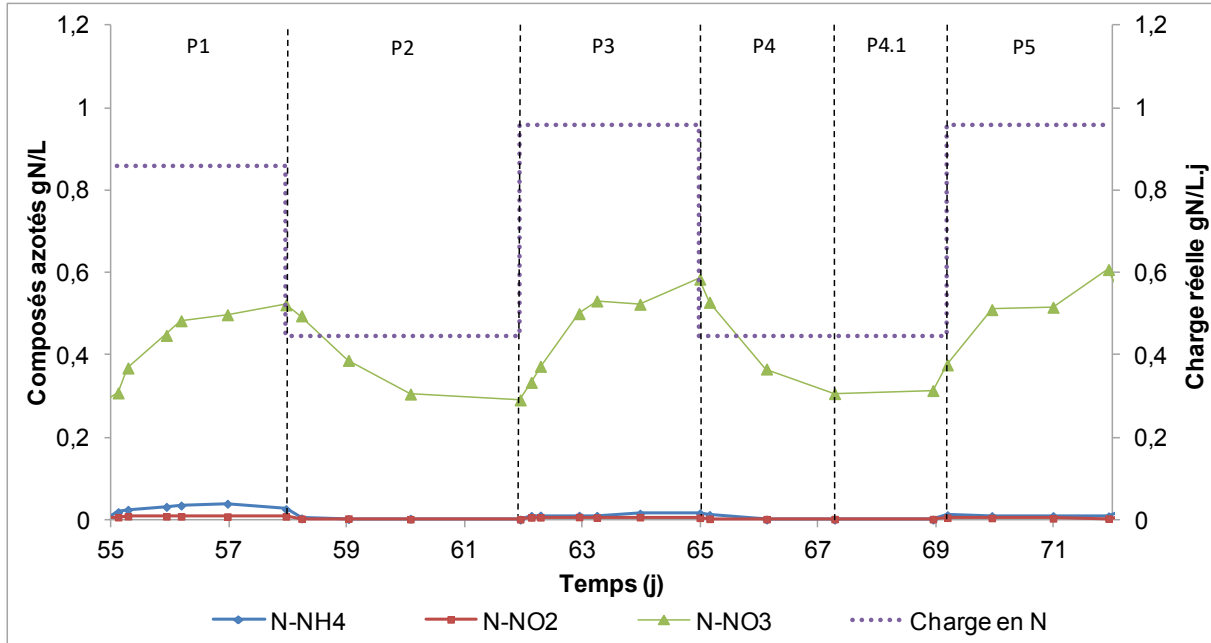


Figure IV-13: Evolution des composés azotés et de la charge réelle en azote pendant les quatre premières phases d'étude.

Lorsque la charge en azote est d'environ 0.45 gN/L.j, aucune trace d'ammonium et de nitrite n'est détectée en sortie de réacteur : la nitrification est totale. En régime stationnaire, la concentration en nitrate atteint respectivement 0.291, 0.306 et 0.313 gN-NO₃⁻/L en fin de phases P2, P4 et P4.1. Lorsque la charge entrante en azote est forte (0.859-0.957 gN/L.j), des traces d'ammonium sont trouvés en sortie de réacteur durant les phases P1 et P3 mais pas P5. La concentration en nitrate augmente graduellement pour atteindre respectivement 0.495 et 0.584 gN-NO₃⁻/L en fin de phases P1 et P3, la phase P3 se terminant en nitrification totale. La phase 5, où le débit d'air appliqué dans la colonne est plus élevé, présente les mêmes résultats que les phases P1 et P3 dont la charge est équivalente. La différence de débit d'air n'a pas d'influence sur la nitrification qui est déjà totale pour un débit plus faible.

IV.2.5 Variation de la charge en azote par la variation de la concentration entrante à T_R constant et débit d'air maximal

Cette série de test consiste à fonctionner au débit d'air maximal dans le réacteur en alternant les concentrations entrantes en azote (Tableau IV-8) :

Tableau IV-8: Variation des conditions expérimentales durant les phases P6 à P9.

Phase	Temps (j)	T _R (h)	Charge en entrée (gN/L·j)	Conditions expérimentales
P6	72	16.32	1.203	0.56 L _{air} /min + N3X
P7	75.1	18.58	0.445	0.56 L _{air} /min + N1X
P8	78.1	18.58	1.262	0.56 L _{air} /min + N3X
P9	85.2	16.18	0.453	0.56 L _{air} /min + N1X

N1X : Concentration théorique 0.285 gN/L ; N3X : Concentration théorique 0.855 gN/L

Les phases P6-P9 alternent de très fortes charges en azote (1.032 et 1.178 gN/L·j) et la charge nominale correspondant à une concentration 1X du milieu de coculture utilisé comme influent (0.369 et 0.423 gN/L·j), Figure IV-14.

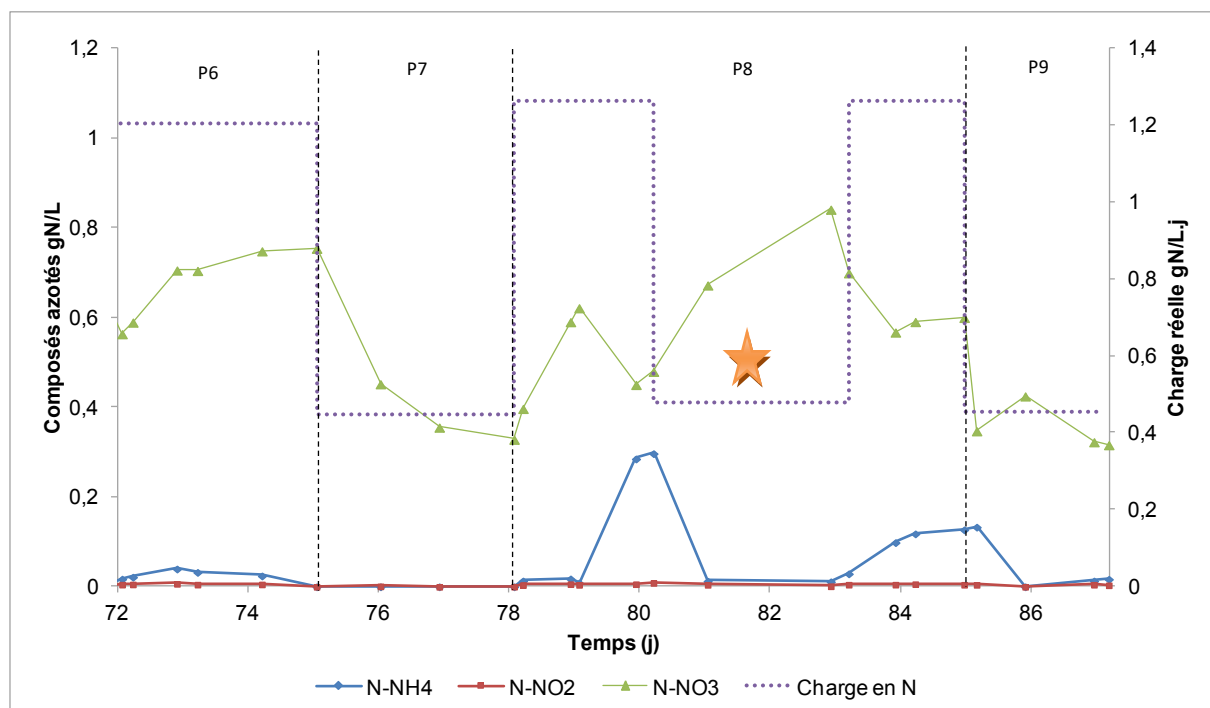


Figure IV-14: Evolution des composés azotés et de la charge réelle en azote durant les phases P6 à P9. L'étoile orange représente la diminution de la charge en azote entrante en réponse à la lyse cellulaire causée par les coupures d'électricité et d'air.

Durant la phase P6, la concentration en nitrate en sortie de réacteur augmente graduellement en réponse à la forte charge en azote en entrée. Une accumulation d'ammonium en sortie de la colonne est aussi observable. En phase P7, la concentration en nitrate en sortie de colonne diminue alors que la charge en entrée diminue elle aussi. A ce moment, il n'y a pas d'ammonium ni de nitrite en sortie de réacteur : la nitrification est totale.

La phase 8 est une phase particulière pendant laquelle différents incidents ont eu lieu : des coupures de gaz et d'électricité, représentées par une étoile orange sur la Figure IV-14. Ces événements, ont perturbé la nitrification et la biomasse. Les coupures d'électricité ont

engendré une acidification de la colonne due au non-fonctionnement de la régulation pH. Les coupures de gaz ont, elles, entraîné une augmentation de pH dans le réacteur : l'absence de gaz empêchant le mélange au sein du réacteur, un surplus de base a été ajouté. L'acquisition du pH en fonction durant l'expérience montre les variations autour de la valeur choisie du pH, Figure IV-15:

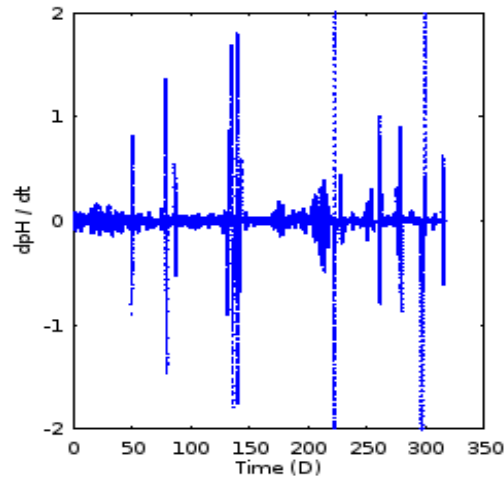


Figure IV-15: Variation de la valeur du pH au cours de la nitrification dans la colonne à lit fixe.

Le pH augmente jusqu'à 12 lorsque des incidents techniques apparaissent. Dans les deux cas, ces perturbations ont causé une lyse cellulaire se traduisant par la production de mousse en quantité importante. Cette mousse a d'ailleurs bouché certains filtres situés en sortie de colonne. Pour faire face à ces problèmes, la charge en azote a donc été baissée provisoirement (à $t = 80$ jours) pour permettre à la biomasse d'atteindre de nouveau la nitrification totale. Vers 83 jours, une forte concentration en nitrate est présente en sortie de réacteur malgré la faible charge appliquée. Ceci s'explique par l'accumulation d'ammonium au sein de la colonne au cours des incidents techniques perturbant le mélange. A ce moment, la nitrification totale est atteinte : la charge en azote est alors augmentée conduisant à la présence d'ammonium en sortie de colonne de 84 à 86 jours. En fin de phase, la nitrification totale n'était toujours pas atteinte : le choix a été fait de passer en phase P9 avec une charge entrante en azote plus faible pour stabiliser le réacteur. En effet, les incidents rencontrés en phase P8 ont conduit à une forte lyse cellulaire : la biomasse et sa distribution dans la colonne en phase P9 n'est ainsi pas la même qu'en phases P6 et P7. Ceci explique que le réacteur n'arrive pas à gérer une charge en azote qu'il avait précédemment oxydée avec succès. Il faudra du temps avant de retrouver la concentration en biomasse et l'activité atteinte dans les phases antérieures.

La charge théorique maximale de la colonne est 1.6 gN-NH₄⁺/L.j pour le support Biostyr® (Note Technique TN2, n.d.). Dans cette première série de charges fortes, cette valeur maximale n'est pas atteinte et la nitrification totale n'est pas atteinte. Pour le débit d'air utilisé, le K_La moyen mesuré est 202 h⁻¹, ce qui permet en théorie le transfert de 1.1 mol O₂/L.j. Cette valeur est suffisante pour l'oxydation d'un charge allant jusqu'à 7.8 gN/L.j. La mesure en oxygène dissous en haut de colonne à ce moment-là montre que l'on n'est pas limitant en oxygène : les valeurs sont supérieures à 29 % de la concentration à saturation par l'air. L'incapacité de la colonne à oxyder de fortes charges en azote est liée à une trop faible colonisation du lit fixe.

IV.2.6 Mise en place du T_R nominal et variation de concentration entrante en azote

Ces phases représentent la mise en place du temps de résidence nominal (T_R = 8 h), et la variation de charges en azote dans le réacteur (Tableau IV-9) :

Tableau IV-9: Variation des conditions expérimentales durant les phases P9.A1 à P13.

Phase	Temps (j)	T _R (h)	Charge en entrée (gN/L.j)	Conditions expérimentales
P9.A1	87	16.18	0.453	0.45 L _{air} /min + N1X
P10	90	8.17	0.898	0.45 L _{air} /min + N1X
P11	99	8.17	1.754	0.45 L _{air} /min + N2X
P12	100.25	8.17	0.968	0.45 L _{air} /min + N1X
P13	104	8.17	1.524	0.45 L _{air} /min + N2X

N1X : Concentration théorique 0.285 gN/L ; N2X : Concentration théorique 0.57 gN/L

En phase P9.A1, le débit d'air a été baissé à 80% de manière à ne pas apporter plus d'air et donc plus d'oxygène que nécessaire pour nitrifier la quantité d'azote entrante. Le débit d'air est suffisant puisqu'en fin de phase P9.A1, la nitrification est totale : il n'y a pas d'ammonium ou de nitrite en sortie de réacteur, Figure IV-16 :

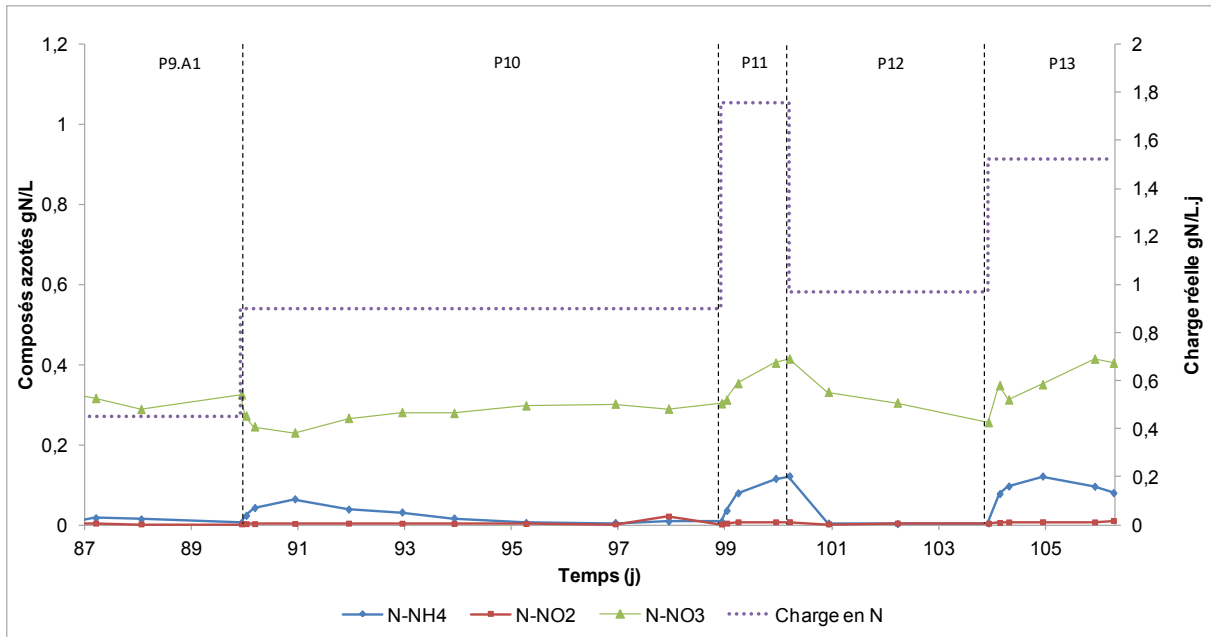


Figure IV-16: Evolution des composés azotés et de la charge réelle en azote durant les phases P9.A1 à P13.

A partir de la phase P10, le réacteur est placé dans les conditions nominales de fonctionnement du compartiment 3 de la boucle MELiSSA. C'est-à-dire qu'un temps de résidence $T_R=8$ h est appliqué au réacteur. Le débit d'alimentation est alors plus rapide augmentant la charge d'azote en entrée de la colonne. Dans les premiers jours, la présence d'ammonium est constatée à la sortie du réacteur traduisant un état de nitrification partielle. Lorsque la nitrification totale est atteinte, la charge en azote est augmentée sans changer le temps de résidence T_R , en augmentant la concentration en azote du bidon d'alimentation. Les phases P11 et P13 sont une répétition des mêmes conditions et des résultats similaires sont observés. La concentration en nitrate augmente mais la nitrification n'est pas totale : de l'ammonium s'accumule à la sortie du réacteur à hauteur de 0.1 gN/L. Dans ces deux phases, la charge appliquée est proche ou supérieure à la charge théorique maximale du support Biostyr® (1.6 gN-NH₄⁺/L.j, (Note Technique TN2, n.d.). La différence de charge observée graphiquement entre P11-P13 et P10-P12, est une dérive expérimentale due aux manipulations nécessaires à la préparation du bidon d'azote : pesée des constituants, mesure du volume, etc. La phase P12 est un réplicat de la phase P10, et le même résultat est observé : une nitrification totale avec 0.3 gN-NO₃⁻/L produits en sortie du réacteur. Durant les phases P11 et P13 (charge 1.524-1.754 gN/L.J), une accumulation de 0.2 gN-NH₄⁺/L d'ammonium est présente en sortie du réacteur. Dans les phases P6 et P8, la charge en azote était de 1.203-1.262 gN/L.j pour un débit deux fois plus lent ($T_R=16.32-18.58$ h), et la nitrification était également partielle, avec une accumulation d'ammonium d'environ 0.15 gN-NH₄⁺/L. Il est probable que la charge appliquée en P8 serait maintenant complètement

absorbée par la colonne. On peut se demander si en augmentant la durée d'application de ces conditions, la biomasse aurait eu le temps de se multiplier et se serait adaptée à cette charge ou si la biomasse se trouvait en limitation par l'oxygène. Pour le débit d'air utilisé durant les phases P9.A1 à P13, le $K_L a$ moyen mesuré est 155 h^{-1} , ce qui permet en théorie le transfert d' $0.86 \text{ mol O}_2/\text{L.j}$. Cette valeur est suffisante pour l'oxydation d'un charge allant jusqu'à 6 gN/L.j . *Nitrosomonas europaea* n'est pas en limitation d'oxygène. La nitrification partielle n'est pas due à un manque d'oxygène. L'observation de la variation de la concentration en oxygène sur cette période permet de vérifier cette information, Figure IV-17 :

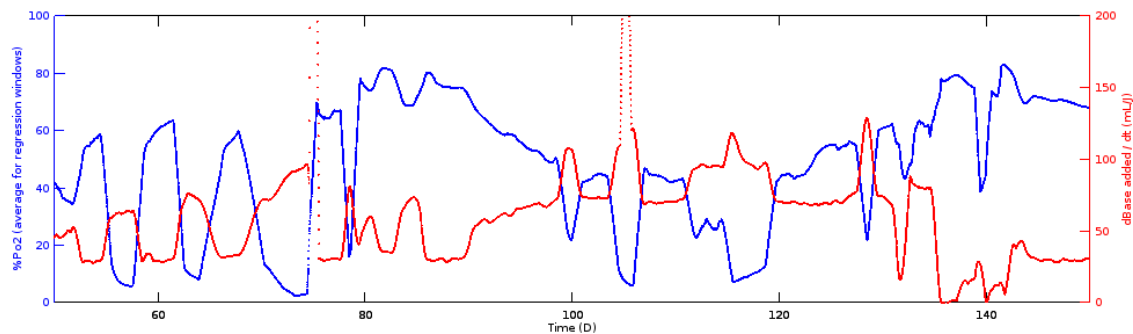


Figure IV-17: Evolution de la concentration en oxygène dissous et de la vitesse d'ajout de base dans la colonne à lit fixe durant la période de 50 à 150 jours.

La concentration diminue fortement lorsque les charges sont fortes (P11 et P13) mais n'atteignent des valeurs limitantes qu'en début de culture continu. Ainsi, l'augmentation de la durée de ces phases aurait pu être une solution pour atteindre la nitrification totale car elle aurait permis une colonisation plus avancée du lit fixe, et devra être prise en compte dans la suite des résultats.

IV.2.7 Variation de la charge en azote par variation du T_R dans le réacteur

La série de tests suivante est basée sur la variation du temps de séjour dans la colonne à lit fixe (Tableau IV-10) :

Tableau IV-10: Variation des conditions expérimentales durant les phases P14 à P19.

Phase	Temps (j)	T_R (h)	Charge en entrée (gN/L.j)	Conditions expérimentales
P14	106.3	8.17	0.795	$0.45 L_{air}/\text{min} + N1X$
P15	111.25	6.11	1.063	$0.45 L_{air}/\text{min} + N1X$
P16	115	4.04	1.433	$0.45 L_{air}/\text{min} + N1X$
P17	119.15	8.22	0.709	$0.45 L_{air}/\text{min} + N1X$
P18	128	4.04	1.774	$0.45 L_{air}/\text{min} + N1X$
P19	129	8.22	0.878	$0.45 L_{air}/\text{min} + N1X$

N1X : Concentration théorique 0.285 gN/L

Durant les phases P14 à P16, le temps de résidence T_R a graduellement augmenté de manière à intensifier la charge en azote entrante sans varier la concentration en azote entrante. Le débit de gaz reste inchangé ($0.45 L_{air}/min$ soit $0.09 LO_2/min$) car il a été montré que celui-ci apportait suffisamment d'oxygène pour assurer la nitrification, Figure IV-18 :

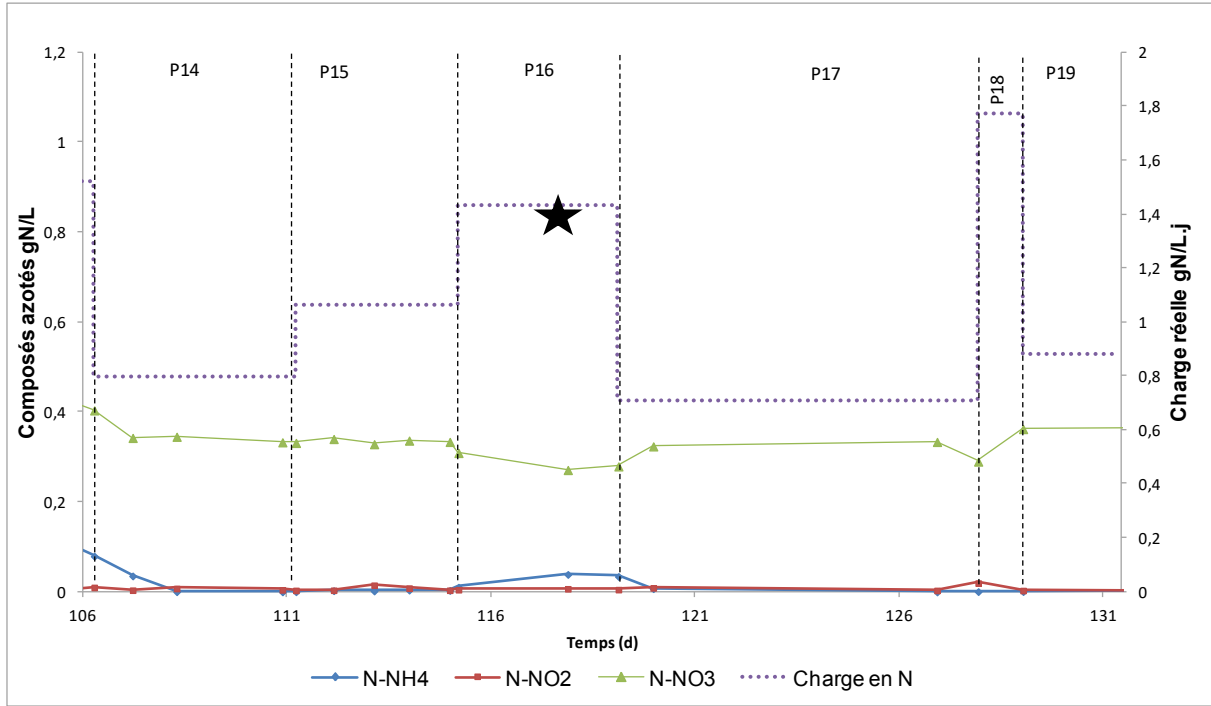


Figure IV-18: Evolution des composés azotés et de la charge réelle en azote durant les phases P13 à P19 de variations de temps de séjour T_R . L'étoile représente une variation de charge due au changement de la concentration en azote dans le bidon d'alimentation.

La phase P14 correspond au fonctionnement nominal du réacteur et permet à la biomasse de se replacer en condition de nitrification totale. La phase P15 correspond à $T_R=6.11$ h : le débit liquide est augmenté et la nitrification est toujours totale. La charge en azote de 1.063 gN/L.j est totalement assimilée par *Nitrosomonas* et *Nitrobacter*. La phase P16 simule une très forte charge en azote à un très faible temps de résidence : 1.433 gN/L.j pour $T_R=4.04$ h. Cette phase a été maintenue pendant 4 jours soit environ 24 temps de séjour. La phase P17 est une répétition de la P14 et montre une nitrification totale, résultat attendu puisque ce sont les conditions nominales de fonctionnement du réacteur. La P18 est une répétition de la P16 sur une durée beaucoup plus courte : 24 h soit 6 temps de séjour. En revanche, contrairement à la phase P16, à la fin de cette nouvelle phase de charge extrême, la nitrification est totale. Tout se passe comme si la biomasse s'était adaptée à la forte charge qu'elle n'avait pas pu gérer précédemment. Cette adaptation se traduit par une augmentation de la biomasse permettant d'augmenter la capacité de nitrification du réacteur. Nous avons, remarqué, visuellement, que la colonisation du lit fixe était plus marquée lorsque de fortes

charges en azote entraînent dans le réacteur. Ainsi, à la fin de la phase P19, la biomasse commence à être visible sur le lit fixe, Figure IV-19.



Figure IV-19: Développement de la biomasse en bas de réacteur (gauche) et dans la partie centrale (droite) à la fin de la phase P19. La biomasse crée une zone marron, elle est peut perceptible sur le lit fixe.

Durant cette phase P18, la charge maximale théorique a été dépassée et la nitrification est totale. Cela montre que le support peut influencer sur la charge oxydable en azote mais le principal facteur la contrôlant reste la biomasse et sa quantité dans le réacteur. Des expérimentations sur les variations de charge et de temps de séjour ont été de nouveau réalisées afin de vérifier la réponse du réacteur à quelques mois d'intervalle et avec une biomasse plus importante. Ces essais se sont déroulés durant les phases P35 à P42.

IV.2.8 Fonctionnement réduit du réacteur et remise en fonctionnement nominal

L'expérience menée dans la colonne à lit fixe a duré plusieurs mois. Sur cette durée, il a été nécessaire d'effectuer des mises en fonctionnement réduit du réacteur lors des périodes de fermeture du laboratoire par exemple (Tableau IV-11).

Tableau IV-11: Variation des conditions expérimentales durant les phases P20 à P24.

Phase	Temps (j)	T_R (h)	Charge en entrée (gN/L.j)	Conditions expérimentales
P20	131.43	0	0	Coupage électricité
P21	132.15	8.22	0.878	0.45 L_{air}/min + N1X
P22	143.3	50	0.414	0.28 L_{air}/min + N3X
P23	182.3	23.8	0.817	0.45 L_{air}/min + N3X
P24	185	8.22	0.770	0.45 L_{air}/min + N1X

N1X : Concentration théorique 0.285 gN/L ; N3X : Concentration théorique 0.855 gN/L

La phase P20 représente une coupure programmée d'électricité d'une journée. Cette perturbation entraînent les mêmes résultats sur la phase suivante P21 que décrits

précédemment pour la phase P8. Une forte concentration en ammonium est observée alors que la concentration en nitrate a fortement chuté résultant de l'arrêt de la nitrification dans le réacteur, Figure IV-20. La coupure d'électricité entraine une acidification du réacteur et lors de la remise en route du système de régulation, en phase P21, l'ajout de base et le mélange au sein du réacteur entraînent de fortes perturbations pour la biomasse et la nitrification. Il y a des fortes variations de pH durant cette phase (Figure IV-15) et le réacteur met ainsi plusieurs jours pour atteindre un état d'équilibre et de nitrification totale.

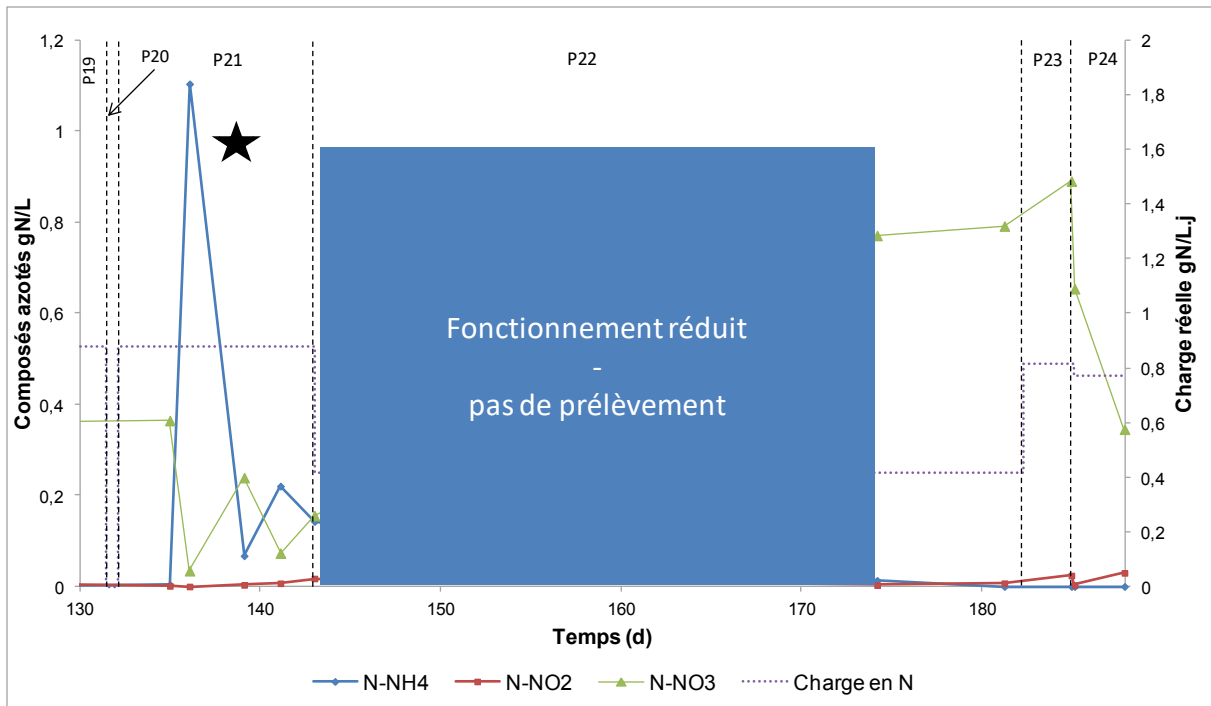


Figure IV-20: Evolution des composés azotés et de la charge réelle en azote durant les phases P20 à P24. L'étoile représente une variation de charge due au changement de la concentration en azote dans le bidon d'alimentation.

Les phases P22 et P23 correspondent à la mise en régime réduit du réacteur. En P22, le temps de séjour est de 50h, et le milieu en entrée est fortement concentré de manière à avoir une charge entrante en azote permettant de maintenir la biomasse active : 0.414 gN/L.j. En revanche le débit d'alimentation est très faible : 0.18 mL/min. Le débit d'air est lui aussi diminué à 0.28 L_{air}/min. Ces deux derniers points impactent directement sur le mélange au sein du réacteur qui est ralenti. La phase P23 correspond à la remise en route du réacteur, le temps de séjour est augmenté à 23.8 h et le débit d'air est fixé à la valeur nominale 0.45 L_{air}/min. Cette étape permet de replacer la colonne dans des conditions de charges nominales pour un fort temps de séjour. Elle est maintenue trois jours avant de revenir aux conditions nominales de culture en phase P24.

IV.2.9 Variation de la source d'azote entrante : utilisation de l'urée

Une solution d'urée a été utilisée pour remplacer la source d'azote dans le bidon d'alimentation de la colonne à lit fixe. Cette expérience avait deux objectifs :

- (i) vérifier que *Nitrosomonas* et *Nitrobacter* n'assimilent pas l'azote sous cette forme
- (ii) évaluer si la biomasse est capable de réaliser la nitrification en présence d'urée

Cette étude a été menée pendant 45 jours et a permis d'atteindre les deux objectifs mis évoqués. Le test a été réalisé en deux séries : de la phase P25 à P29 et la phase P31 à P34 (Tableau IV-12).

Tableau IV-12: Variation des conditions expérimentales durant les phases de test sur urée P25 à P34.

Phase	Temps (j)	T _R (h)	Charge en urée en entrée (g _{urée} /L)	Conditions expérimentales
P25	188	8.2	0.225	0.45 L _{air} /min + U1X
P26	190	8.2	0.822	0.45 L _{air} /min + N1X
P27	192	8.2	1.001	0.45 L _{air} /min + U/N1X
P28	195	8.2	0.793	0.45 L _{air} /min + N1X
P29	197	8.2	0.446	0.45 L _{air} /min + U1'X
P30	199	50	0.386	0.28 L _{air} /min + N3X-Stand-by
P31	223.15	8.2	0.877	0.45 L _{air} /min + N1X
P32	225	8.2	0.037	0.45 L _{air} /min + U1X
P33	230.1	8.2	0.850	0.45 L _{air} /min + N1X
P34	233	8.2	1.001	0.45 L _{air} /min + U/N1X
P35	237.5	8.2	0.877	0.45 L _{air} /min + N1X

U1X : Solution d'urée à une concentration en N similaire au milieu de coculture N1X, soit 0.296 gN/L ;

U/N1X : Solution mélange d'urée et d'ammonium dont les concentrations respectives sont : 1.41 g/L et 0.438 g/L ; U1'X : Solution U1X qui a subi un traitement thermique 30 min/ 2 bars/ 135°C.

Au moment de l'expérimentation, nous ne disposons pas encore d'une méthode fiable de dosage de l'urée. Cette série de test a été réalisée avant la mise au point du dosage de l'urée décrit dans le Chapitre II. Le suivi des composés est donc le même que dans la partie précédente : l'ammonium, le nitrite et le nitrate sont dosés par chromatographie ionique. La concentration en urée n'est pas déterminée. Si l'urée entrant dans le réacteur n'est pas consommée, il n'y aura pas de nitrate produit et sa concentration en sortie de réacteur devra diminuer. En revanche, si l'urée est dégradée partiellement lors du traitement thermique, l'ammonium ainsi libéré sera oxydé en nitrate. Chaque bidon d'alimentation subit un traitement thermique car il est autoclavé pendant 20 min à 121 °C. Dans le cas de la phase P29, le traitement thermique est plus poussé puisqu'il s'agit d'un autoclave de 30 min à 2 bars soit 135 °C. Cette étape a pour objectif de vérifier si l'augmentation de température est

suffisante pour hydrolyser l'urée en ammonium. La Figure IV-21 résume les résultats obtenus durant la série de test :

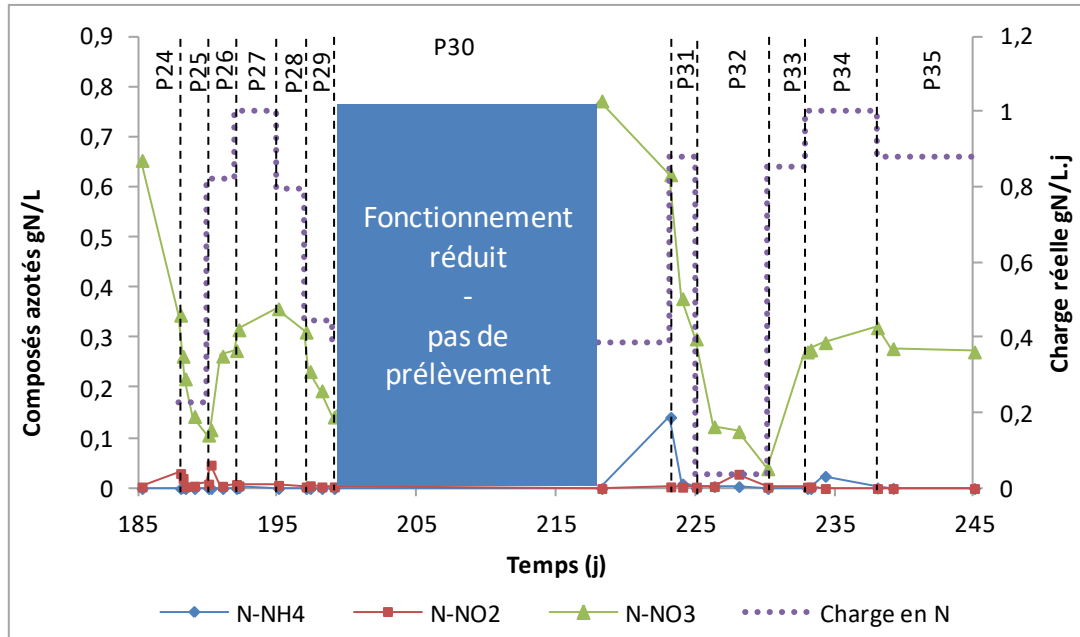


Figure IV-21: Evolution de la charge en azote et des composés azotés durant les tests sur urée.

Lorsque la forme d'azote entrante est exclusivement de l'urée : phases P25 et P32, la concentration en nitrate en sortie de réacteur diminue : la biomasse n'est pas capable d'assimiler cette forme d'azote. C'était le résultat attendu, puisque ni *Nitrosomonas* ni *Nitrobacter* ne possèdent d'enzyme permettant d'assimiler l'urée. En revanche, il est intéressant de constater que lorsque la source d'azote redevient l'ammonium (phases P26, P28, P30, P33), la nitrification se remet en route rapidement. En effet, la concentration en nitrate augmente en sortie de réacteur. Le métabolisme de *Nitrosomonas* et *Nitrobacter* ne semble pas être affecté par l'urée circulant dans le réacteur.

Cette série de tests a permis de vérifier que *Nitrosomonas* et *Nitrobacter* n'étaient pas affectées par la présence d'urée, que celles-ci n'étaient pas capable de le métaboliser mais aussi, qu'il n'existait pas non plus dans le réacteur, de contaminants capables de métaboliser ce substrat.

IV.2.10 Variation du temps de séjour et de la concentration entrante en azote : application de fortes charges entrantes en azote

Une deuxième série de variations de charges en azote a été réalisée en faisant varier le temps de séjour et la concentration entrante en azote. Ces essais sont réalisés pendant les phases P35-P42 (Tableau IV-13).

Tableau IV-13: Variation des conditions expérimentales durant les phases P35 à P42.

Phase	Temps (j)	T _R (h)	Charge en entrée (gN/L.j)	Conditions expérimentales
P36	245	5.79	1.238	0.45 L _{air} /min + N1X
P37	247.3	2.89	2.477	0.45 L _{air} /min + N1X
P38	248.5	8.22	0.877	0.45 L _{air} /min + N1X
P39	252.1	8.22	1.741	0.45 L _{air} /min + N2X
P40	258.1	5.79	2.458	0.45 L _{air} /min + N2X
P41	265.15	2.89	4.830	0.45 L _{air} /min + N2X
P42	268.05	8.22	1.711	0.45 L _{air} /min + N2X
P43	307	28	0.724	0.45 L _{air} /min + N3X

N1X: Concentration théorique 0.285 gN/L; N2X: Concentration théorique 0.57 gN/L; N3X: Concentration théorique 0.855 gN/L

Cette série de tests correspond à de très fortes charges allant jusqu'à 4.8 gN/L.j. En particulier pour les phases P37, P40 et P41 où la charge dépasse la valeur théorique maximale (1.6 gN-NH₄⁺/L.j) établie lors de la sélection du Biostyr® comme support dans le lit fixe (Note Technique TN2, n.d.). Il est nécessaire de vérifier que d'un point de vue théorique, la capacité de transfert moyenne d'oxygène au sein du réacteur permet d'oxyder la totalité de l'ammonium entrant (Tableau IV-14):

Tableau IV-14: Calcul du ratio Oxygène/Azote à oxyder de la phase P36 à P42.

Phase	Charge entrante en N (mol N/L.j)	Charge oxygène transférée (mol O ₂ /L.j)	Ratio O ₂ /N
P36	0.088	0.86	10
P37	0.177	0.86	5
P38	0.063	0.86	14
P39	0.124	0.86	7
P40	0.176	0.86	5
P41	0.345	0.86	2
P42	0.122	0.86	7

Le ratio O₂/N est le rapport entre charge d'oxygène transférée et la charge d'azote entrante.

Même pour la phase P41 où la charge est la plus forte, il y a assez d'oxygène transféré pour assurer une nitrification totale. Des incidents techniques ont perturbé le fonctionnement à lit fixe, Figure IV-22 :

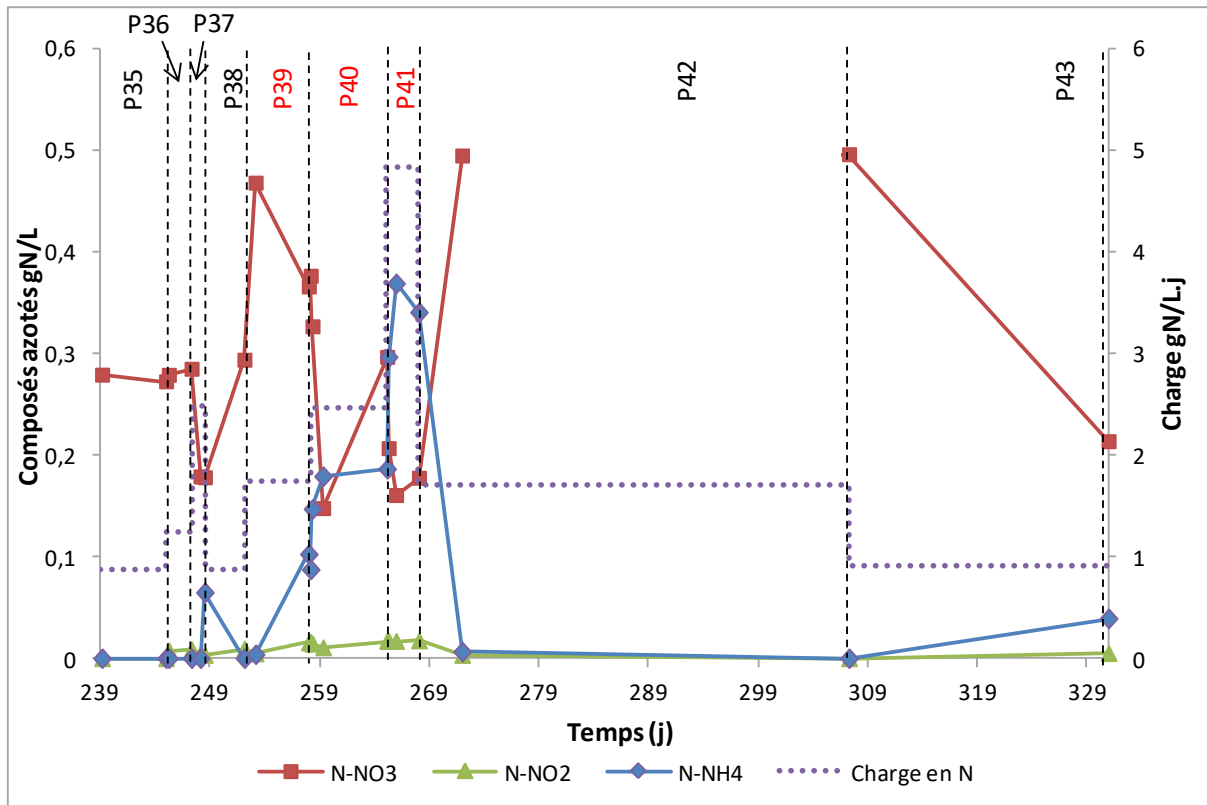


Figure IV-22: Evolution des composés azotés et de la charge réelle entrante en azote durant la deuxième série de charges élevées. Les phases numérotées en rouge sont celles où se sont déroulés les incidents techniques.

Les phases P39 et P42 ont des charges entrantes en azote de 1,7 gN/L.j. Ces valeurs sont proches de la valeur maximale théorique assimilable par le lit fixe. Si pour la phase P39, on constate que la nitrification est partielle, pour P42, la nitrification totale est maintenue plusieurs jours.

Les phases P37, P40 et P41 sont réalisées à très fortes charges (2,5-4,8 gN/L.j). D'après le Tableau IV-14, ces charges sont théoriques assimilables car il y a assez d'oxygène fourni pour assurer l'oxydation totale. Cependant, durant ces phases, une accumulation d'ammonium en sortie de réacteur est constatable. L'oxygène n'étant pas limitant, la nitrification partielle peut s'expliquer par une biomasse insuffisante pour épurer la charge en azote entrante. De plus, durant les phases P40 et P41, plusieurs coupures d'électricité ont perturbé le fonctionnement du réacteur. Ces incidents ont entraîné comme précédemment, une augmentation du pH et une lyse cellulaire au sein du lit fixe (Figure IV-15).

Les charges appliquées sont supérieures à la charge maximale théorique assimilable par le support. Combinées à une colonisation insuffisante du lit fixe, ces hypothèses peuvent expliquer la nitrification partielle constatée.

Cette série de test a permis d'intensifier la colonisation du support par la biomasse, Figure IV-23 :

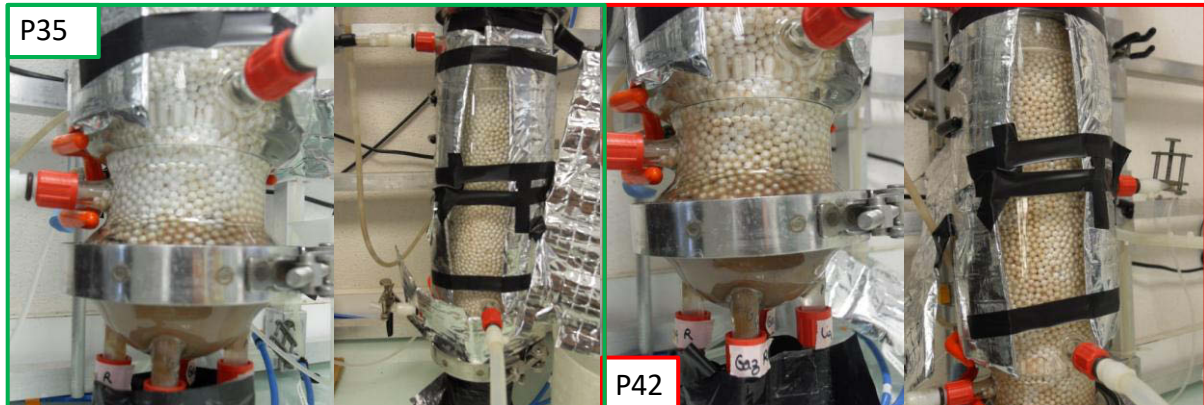


Figure IV-23: Evolution de la colonisation du lit fixe par la biomasse avant (gauche) et après (droite) l'application de fortes charges en azote en entrée de colonne.

Petit à petit, la biomasse colonise toute la hauteur du réacteur. Le développement n'est pas uniforme et traduit sans doute des écoulements préférentiels de l'air ou du liquide au sein de la colonne. Plusieurs semaines après cette série de tests, la biomasse s'est largement développée dans le bioréacteur suite à l'application maintenue d'une charge de 1.7 gN/L.j, Figure IV-24:



Figure IV-24: Colonisation de la colonne deux mois après la fin de la phase P42.

Différentes charges en azote ont été appliquées en entrée du bioréacteur à lit fixe colonisé par *Nitrosomonas europaea* et *Nitrobacter winogradskyi*. Ces variations de charges ont été réalisées soit en faisant varier la concentration en azote entrante soit en modifiant le temps de séjour appliqué au réacteur soit en agissant sur ces deux paramètres. Elles ont conduit à une forte colonisation du bioréacteur par la biomasse. La charge maximale entrante en azote

assimilable par le système a évolué au cours de l'expérimentation. En effet, la biomasse s'est développée au cours de l'expérience, permettant ainsi d'augmenter la quantité d'ammonium oxydée. En fin de test, la charge la plus forte assimilable par le réacteur est 1.711 gN/L.j pour $T_R=8.22$ h, en phase P42. Le temps de séjour appliqué étant celui du fonctionnement nominal du réacteur, cette charge sera la valeur maximale pouvant être appliquée pour obtenir une nitrification totale dans la colonne à lit fixe.

IV.2.11 Bilan azoté et efficacité de nitrification

Le bilan en azote est défini par l'équation IV.44 et représente le rapport de la quantité d'azote en sortie de réacteur sur la quantité d'azote entrante. Quel que soit l'état de nitrification dans lequel se trouve le bioréacteur, ce bilan doit toujours être 100 %. En effet, en nitrification partielle, l'azote entrant qui n'est pas oxydé totalement en nitrate peut se trouver sous la forme ammonium ou nitrite en sortie de réacteur. Mais au final, les rapports des concentrations doivent être de 100%. Les bilans sont calculés pour chacune des phases étudiées précédemment sauf dans les phases :

- (i) de fonctionnement réduit pendant lesquelles il n'y a pas ou peu de suivi analytique, les phases de remise en route et lors des phases où il y a moins de trois prélèvements : P18 à P24 et P36 à P38
- (ii) de test avec l'urée en raison de l'absence du dosage fiable de l'urée : P25-P34

Pour chacune des phases étudiées précédemment, un bilan moyen a été calculé et représenté, Figure IV-25 :

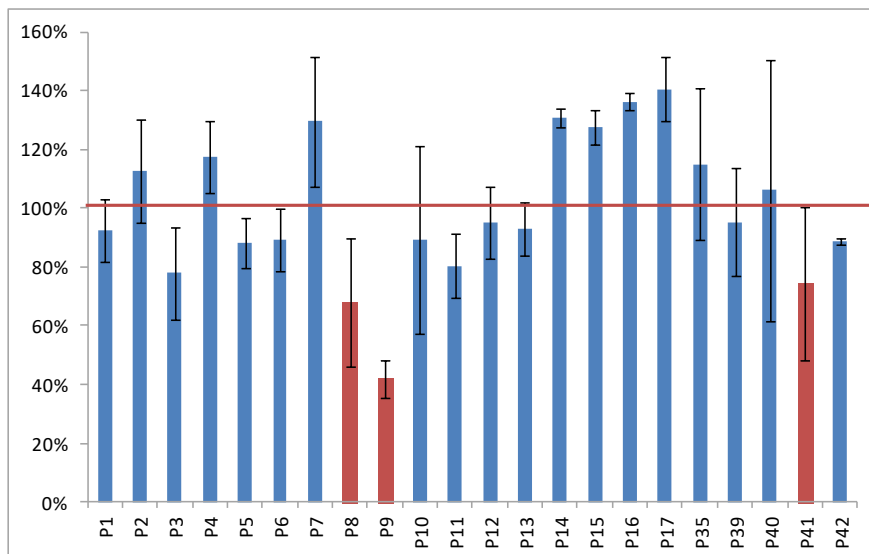


Figure IV-25: Bilan sur l'azote pendant la caractérisation de la nitrification dans la colonne à lit fixe. La ligne rouge représente la valeur attendue de 100 %.

Le bilan est proche de 100 % sur plusieurs phases. Il s'éloigne de cette valeur, lorsque les charges en azote sont fortes et que le temps de résidence est de plus en plus faible (P14-P17) et que les charges entrantes en azote sont fortes (Tableau IV-15).

Tableau IV-15 : Causes possibles des bilans aberrants observés au cours de l'expérience de nitrification dans la colonne à lit fixe.

Phase	Perturbations impactant le bilan
P8-P9	Coupages électriques
P41	Forte charge en entrée

Le bilan en azote est directement affecté par la méthode analytique utilisée pour doser les espèces azotées. En effet, les ions nitrite et nitrate sont dosés par la même colonne chromatographique. Cependant, les concentrations en nitrite sont toujours beaucoup plus faibles que celles en nitrate qui imposent une forte dilution de l'échantillon. Ainsi, les incertitudes dues au dosage chromatographique ont un fort impact sur les concentrations en nitrate. Ce phénomène influe directement sur le calcul du bilan azoté au cours de chaque phase.

L'efficacité de nitrification est définie par l'Equation IV.45 et doit être égale à 0.98. En effet, 98 % de l'ammonium est transformé en nitrate durant la nitrification. Ce bilan permet de compléter les observations réalisées précédemment, Figure IV-26 :

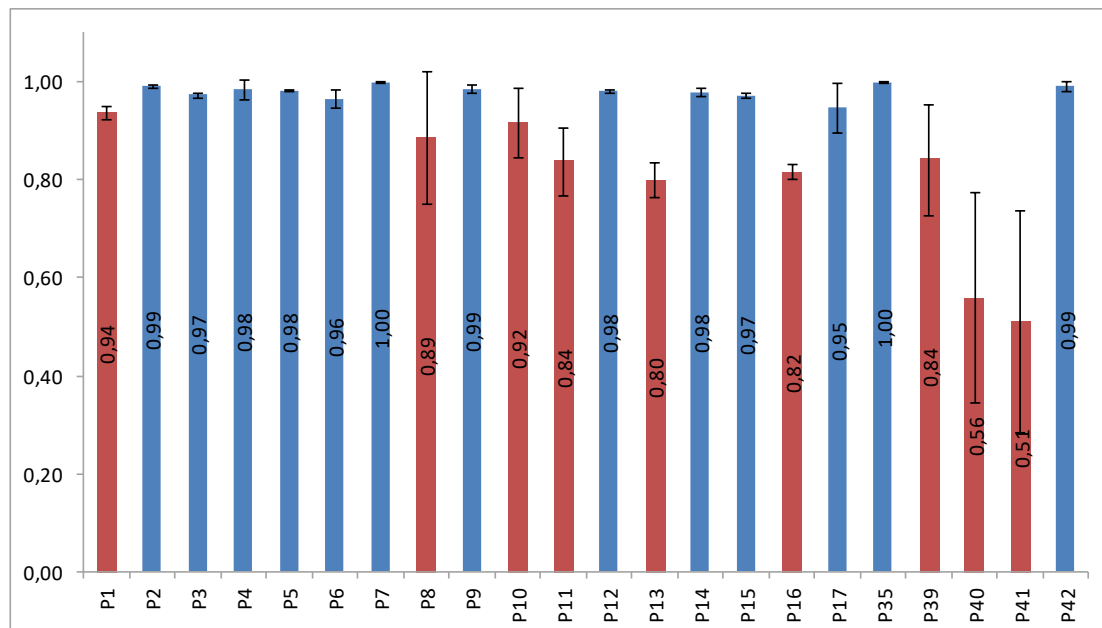


Figure IV-26: Efficacité de nitrification pendant la caractérisation de la nitrification dans la colonne à lit fixe. Les barres bleues représentent les phases où la nitrification est totale, les barres rouges celles où la nitrification est partielle.

Nous avons considéré que la nitrification était partielle lorsque l'efficacité était inférieure à 0.94. Les phases dont l'efficacité de nitrification indique une nitrification partielle (barres rouges sur Figure IV-26) sont celles dont la représentation graphique montre une accumulation d'ammonium et/ou de nitrite en sortie de réacteur. Ces phases et l'explication de la nitrification partielle sont résumées (Tableau IV-16) :

Tableau IV-16: Phases de nitrification partielle et cause associée.

Phase	Cause de la nitrification partielle
P1	Mise en place du mode continu
P6	Augmentation de la charge entrante en azote
P8	Coupure électrique/gaz
P10	Diminution du temps de séjour
P11	Augmentation de la charge entrante en azote
P13	Augmentation de la charge entrante en azote
P16	Forte charge et faible temps de séjour
P39-P41	Coupures électriques

La nitrification partielle dans la colonne à lit fixe est toujours liée à un incident technique ou une colonisation insuffisante du lit fixe par la biomasse. On peut imaginer qu'avec une colonisation plus intense du lit fixe, les seules phases de nitrification partielle seraient celles où se déroulent des incidents techniques.

IV.2.12 Conclusions sur les 270 jours de fonctionnement de la colonne

Le réacteur a été maintenu pendant 270 jours de fonctionnement en continu et aucun problème de colmatage n'a été constaté. Différents incidents ont perturbé le fonctionnement de la colonne : coupure d'air et coupures d'électricité. Ces événements ont entraîné des épisodes de lyse cellulaire mais la nitrification a toujours été rétablie après quelques jours de remise en route. Le réacteur à lit fixe a montré une forte capacité à rétablir un état fonctionnel après un état dégradé. La capacité épuratoire de la colonne évolue au cours de l'expérience, Figure IV-27:

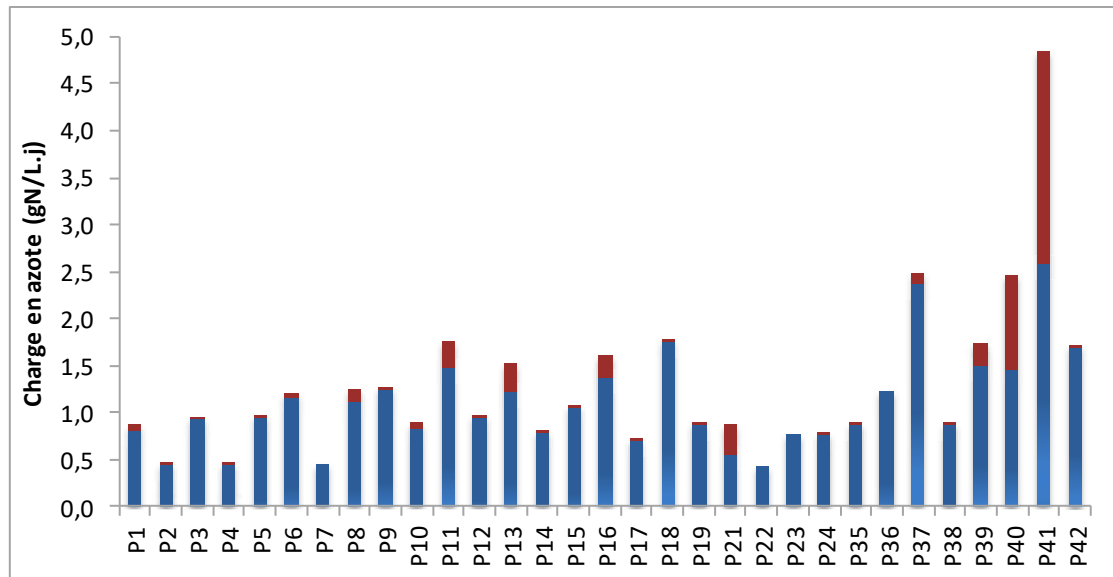


Figure IV-27: Charge en ammonium éliminée dans la colonne à lit fixe. Les barres rouges représentent la charge en azote entrante qui n'a pas été oxydée et les barres bleues la charge éliminée en azote.

Toutes conditions opératoires confondues, le réacteur est capable d'éliminer de fortes charges en azote allant jusqu'à 2.5 gN/L.j. La valeur théorique maximale de 1.6 gN/L.j est largement dépassée. La colonisation du support par la biomasse a permis d'assurer l'oxydation de plus grandes charges d'azote. Même si dans la phase P41 par exemple, seulement 50 % de la charge est éliminée et que la nitrification est partielle, la charge totale éliminée dans les conditions nominales ($T_R = 8h$) est 1.7 gN/L.j. Cette valeur est supérieure à celle attendue pour le fonctionnement du Compartiment 3 de la boucle MELiSSA et pour produire assez de nitrate pour alimenter les Compartiments 4a et 4b qui est de 0.9 gN/L.j.

Les conditions axéniques n'ont pas pu être respectées dans le réacteur sur toute la durée de fonctionnement. Les divers incidents ont parfois nécessité des interventions sur le réacteur : évacuation de la mousse entraînée par la lyse cellulaire par exemple. Cependant, tout le matériel et les solutions entrantes dans le réacteur ont toujours été traités par autoclave avant d'être utilisés. De plus, l'utilisation d'un milieu minéral a permis de limiter le développement de bactéries hétérotrophes grâce à l'absence de composés organiques entrants dans le réacteur. Les premiers tests sur urée ont permis de vérifier qu'aucun potentiel contaminant dans le réacteur n'était capable de métaboliser l'urée. Ainsi, même si le critère d'axénicité n'a pas été respecté sur la totalité du fonctionnement du réacteur, nous avons remarqué que cela n'avait aucune influence sur le fonctionnement de la colonne et ceci, même lors de l'utilisation d'un substrat organique. La capacité épuratrice atteinte en fin d'expérience dépasse la valeur de fonctionnement du compartiment 3. En effet, la charge

éliminée est supérieure aux valeurs de charges en azote entrantes dans les conditions de fonctionnement pour une personne.

IV.3 Calibration du modèle NitriSim et application à l'expérience dans la colonne à lit fixe

IV.3.1 Définition de la colonne pour la modélisation

Le Tableau II-11 regroupe les différents paramètres utilisés dans le modèle NitriSim. Le dimensionnement de la colonne et du lit fixe utilisé pour l'expérience décrite précédemment, a été réalisé dans la Partie IV.1. Les données théoriques liées aux dimensions de la colonne et les données calculées sont les suivantes (Tableau IV-17) :

Tableau IV-17 : Récapitulatif des données physiques de la colonne pour NitriSim.

h_A (m) V_A (L)	ND 0.09
h_B (m) V_B (L) *	0.33 0.532
h_{C1} (m) V_{C1} (L)	0.035 0.18
h_{C2} (m) V_{C2} (L)	0.085 0.26
Diamètre de la colonne (m)	0.060
Volume liquide (L)	0.532
Volume du lit fixe (L)	0.552
Diamètre du support (m)	0.004
Degré de vide	0.31
Temps de séjour (h)	2.9-50
$K_L a$ (h^{-1})	155-202
Nombre de bacs N	A déterminer
Débit de rétro-mélange (mL/min)	A déterminer

* Les mesures sont les valeurs théoriques sans support.

Les données liées au fonctionnement de la colonne et dépendantes des débits d'alimentation liquide ou d'air dans le réacteur sont présentées sous forme de gamme : temps de séjour et $K_L a$. Ces paramètres sont variables au cours de l'expérimentation.

IV.3.2 Définition du nombre de bacs et du rétro-mélange du réacteur

Un des paramètres essentiels du modèle de la colonne à lit fixe est le nombre de bacs utilisés pour « segmenter » le réacteur. Le nombre de bacs choisis comprendra un bac pour la partie supérieure et un pour la partie inférieure de la colonne.

La définition du nombre de bacs dans le modèle permet de définir le rétro-mélange au sein du réacteur. Aussi appelé « back-mixing », ce paramètre dépend des débits d'alimentation liquide et en air au sein du réacteur mais aussi du nombre de bacs composant le réacteur. Le rétro-mélange permet de représentation la diffusion axiale des composés au sein du réacteur et du lit fixe et est directement lié au nombre de bacs composant le lit fixe du réacteur, Figure IV-28 :

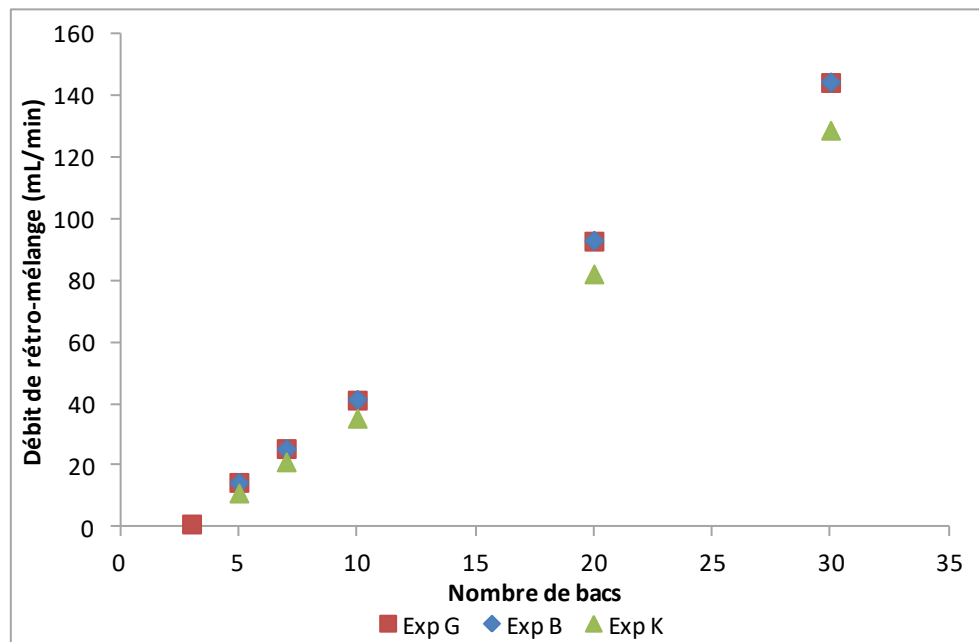


Figure IV-28: Evolution du débit de rétro-mélange en fonction du nombre de bacs pour 3 expériences de distributions de temps de séjour (Exp. B, G et K).

Pour les trois expériences, le débit de rétro-mélange évolue de la même manière en fonction du nombre de bacs choisis pour simuler le réacteur à lit fixe. L'expérience K présente des valeurs de rétro-mélange légèrement plus faibles que les deux autres expériences. Ceci peut être expliqué par les débits liquides d'alimentation et de recirculation qui sont plus élevés : le mélange au sein du lit est plus fort et le terme identifié de rétro-mélange est donc plus faible. Le modèle en N-bacs en série est utilisé pour représenter la fraction de biomasse qui est fixée sur le support. Les phases liquides et gazeuses sont parfaitement mélangées et permettent d'apporter les éléments nécessaires à la croissance de la biomasse au sein du support. Il est ainsi important de trouver le bon équilibre pour le nombre de bacs représentant le lit fixe : il doit être suffisant pour schématiser la segmentation du lit en bacs mais pas trop élevés pour représenter le lit de manière réaliste. En effet, sur le nombre de bacs choisis, deux représentent les parties liquides haute (partie C) et basse (partie A) de la colonne à lit fixe (Tableau IV-17). Si on choisit $N=3$, le lit est alors représenté par un bac, pour $N=5$: 3bacs, pour $n=7$: 5bacs, etc. Etant données les dimensions de la colonne à lit fixe utilisée dans cette étude (Tableau IV-17), nous avons porté notre choix sur une

segmentation du lit fixe en 5 bacs pour obtenir un volume de billes de 76 cm³ et une surface disponible pour le biofilm de 955 cm² par bac. Le nombre de bacs utilisés dans NitriSim pour représenter le réacteur sera donc N=7.

Plusieurs expériences de distribution du temps de séjour ont été réalisées (Tableau IV-1) mais, pour la détermination du rétro-mélange, seules les expériences se rapprochant des essais expérimentaux ont été conservées (débit liquide d'alimentation ou d'air). En fixant le nombre de bacs à 7 et les conditions expérimentales de chaque mesure, le débit de rétro-mélange correspondant aux données expérimentales est identifié (Tableau IV-18) :

Tableau IV-18: Détermination du débit de rétro-mélange pour plusieurs déterminations expérimentales de temps de séjour.

Exp.	Débit liquide alimentation (mL/min)	Recyclage liquide	Débit gaz (VVM ou L _{air} /min)	Hold-up (%)	Débit rétro-mélange (mL/min)	Ecart-type	Critère ^a
A	1.97	Non	1.06 / 0.67	22	68.7	35.2	0.55
B	1.82	Oui	1.06 / 0.67	22	27.3	13	2.6
E	1.91	Non	0.47 / 0.3	14	25.2	12.3	0.35
G	1.87	Oui	0.47 / 0.3	14	27.4	13.4	0.54
K	2.37	Oui	0.47 / 0.3	14	22.2	11	0.9

^a Critère est la somme des écarts au carré

Le débit de rétro-mélange varie entre 22.2 et 27.4 mL/min (Expériences E, G et K) pour un débit d'air entrant dans le réacteur de 0.3 L_{air}/min et un T_R variant entre 4.2 et 4.5 h. Lorsque l'on travaille à un débit d'air de 0.67 L_{air}/min, le hold-up correspondant est 20 % et pour un débit d'air de 0.45 L_{air}/min, 17 %. Le rétro-mélange dépend aussi du débit d'air et du T_R appliqués au réacteur. Si on ne compare que les données pour lesquelles, la boucle de recyclage est fonctionnelle (expériences B, G et K), le débit de rétro-mélange varie entre 22.2 et 27.4 mL/min. La gamme de valeur est serrée et nous avons fait le choix de fixer le débit de rétro-mélange sur une seule valeur pour l'intégrer dans NitriSim. La valeur moyenne de la gamme précédente est 25.6 mL/min, ce sera celle utilisée pour les simulations réalisées avec NitriSim.

IV.3.3 Rappel des paramètres biologiques du modèle

Les paramètres biologiques utilisés dans le modèle de nitrification ont été déterminés dans le Chapitre III et sont regroupés dans le Tableau IV-19 :

Tableau IV-19: Paramètres biologiques utilisés dans le modèle NitriSim.

Paramètres biologiques expérimentaux		<i>Nitrosomonas europaea</i>	<i>Nitrobacter winogradskyi</i>
	Taux de croissance maximum μ_{\max} (h^{-1})		0.054
Létalité b (h^{-1})		0.003	0.001
Maintenance m ($gN \cdot gX^{-1} \cdot h^{-1}$)		0.135	0.467
$Y_{S/X}$ ($gN-NH_4^+ \cdot gX^{-1} / gN-NO_3^- \cdot gX^{-1}$)		-3.21	32.31
Paramètres biologiques théoriques	$Y_{N-NH_4^+/X}$ ($gN-NH_4^+ \cdot gX^{-1}$)	-2.77	-0.13
	$Y_{N-NO_2^-/X}$ ($gN-NO_2^- \cdot gX^{-1}$)	2.64	-10.53
	$Y_{O_2/X}$ ($gO_2 \cdot gX^{-1}$)	-7.56	-0.33
	$Y_{H^+/X}$ ($gH^+ \cdot gX^{-1}$)	0.34	-0.03
	$Y_{N-NO_3^-/X}$ ($gN-NO_3^- \cdot gX^{-1}$)	--	10.53
	$Y_{m_{N-NH_4^+/S}}$ ($gN-NH_4^+/gN-NH_4^+ / gN-NH_4^+/gN-NO_3^-$)	-1	--
	$Y_{m_{N-NO_3^-/S}}$ ($gN-NO_3^-/gN-NH_4^+ / gN-NO_3^-/gN-NO_3^-$)	--	1
	$Y_{m_{N-NO_2^-/S}}$ ($gN-NO_2^-/gN-NH_4^+ / gN-NO_2^-/gN-NO_3^-$)	1	-1
	$Y_{m_{O_2/S}}$ ($gO_2/gN-NH_4^+ / gO_2/gN-NO_3^-$)	-3.43	-1.14
	$Y_{m_{H^+/S}}$ ($gH^+/gN-NH_4^+ / gH^+/gN-NO_3^-$)	0.14	--
	$K_{S_{N-NH_4^+}}$ ($gN-NH_4^+/L$)	0.0046	0.000008
	$K_{S_{O_2}}$ (gO_2/L)	0.00016	0.00054
$K_{S_{N-NO_2^-}}$ ($gN-NO_2^-/L$)	--	0.0015	

$Y_{S/X}$ sont les rendements du substrat utilisé pour la croissance sur la concentration bactérienne ; $Y_{m_{S/N-NH_4^+}}$ ou $Y_{m_{S/N-NO_3^-}}$ sont les rendements du substrat sur le substrat consommé pour la maintenance.

La définition des paramètres biologiques et physiques (propres au réacteur) permettent de définir un modèle de nitrification en réacteur à lit fixe. Ce modèle est appliqué à l'expérience de long-terme menée dans la colonne à lit fixe et décrite en Partie IV.2.

IV.3.4 Utilisation du modèle NitriSim pour la caractérisation de la colonne à lit fixe

Le modèle de nitrification a été défini, calibré et validé dans le Chapitre III. Les paramètres du modèle N-tanks en série ont été définis dans ce chapitre. Les deux modèles ont été combinés afin de créer NitriSim qui n'avait, à ce jour, pas été calibré et validé pour les paramètres biologiques. Les valeurs des paramètres cinétiques étaient tirées de la

littérature. Les valeurs expérimentales ont été intégrées au modèle et celui-ci a été testé sur l'expérience de longue durée menée dans la colonne à lit fixe. La modélisation s'étend de la phase P1 à P42 et la partie intermédiaire de test sur l'urée a été supprimée. En effet, pour prédire les comportements des composés azotés, les valeurs de charges entrantes en azote doivent être connues.

Les résultats expérimentaux de la concentration en ammonium en sortie de réacteur (courbe bleue) sont comparés avec les valeurs calculées par le modèle (courbe noire), Figure IV-29 :

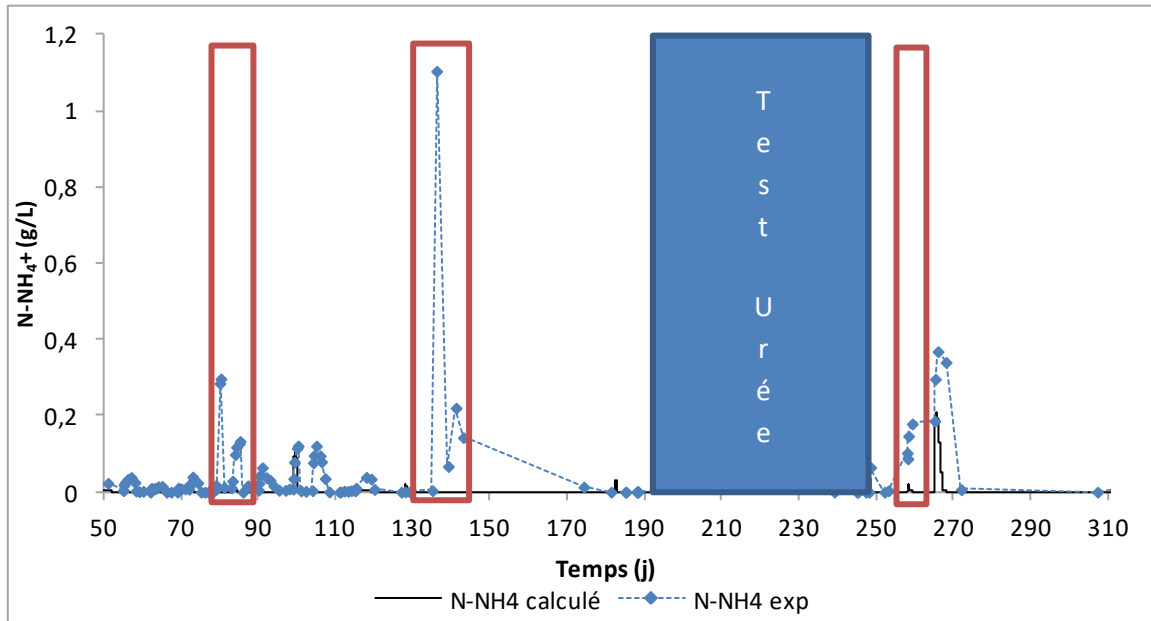


Figure IV-29: Comparaison entre les données prédites (en noir) et les données expérimentales (losange bleu) de la concentration en $N-NH_4^+$ en sortie de réacteur. Les données entourées par les rectangles rouges représentent les incidents techniques.

Certains pics expérimentaux d'ammonium en sortie de réacteur ne sont pas prédits par le modèle. Ces pics encadrés, sont expliqués par les coupures d'électricité et de gaz survenues en phase P8, P20 et P39-P41. Le modèle n'est pas capable de simuler les incidents techniques entraînant une lyse cellulaire. Une coupure d'électricité est représentée, dans le modèle, par des débits d'alimentation liquide, de recyclage et d'air nuls. Ceci ne suffit pas à ce que le modèle prédise les conséquences auxquelles on s'attend : la régulation pH non fonctionnelle et la lyse cellulaire notamment. Malgré les écarts observés lors des coupures d'électricité, le modèle propose une représentation correcte de l'ammonium en sortie de colonne durant la caractérisation de la nitrification lorsque la charge entrante en azote est comprise dans la gamme assimilable par la biomasse.

Le nitrite est un composé dont la prédiction doit être la plus fidèle possible par NitriSim. Dans le Chapitre III, il a été montré que le modèle représentait fidèlement les pics de nitrite au

cours d'une culture en réacteur agité. Dans le cas de l'expérimentation menée dans la colonne à lit fixe, il est plus compliqué d'avoir une bonne prédiction du modèle. En effet, les concentrations en nitrite en sortie du réacteur sont toujours restées inférieures à 30 mg N-NO₂⁻/L, Figure IV-30, et ces faibles concentrations sont rapidement assimilées par *Nitrobacter winogradskyi*.

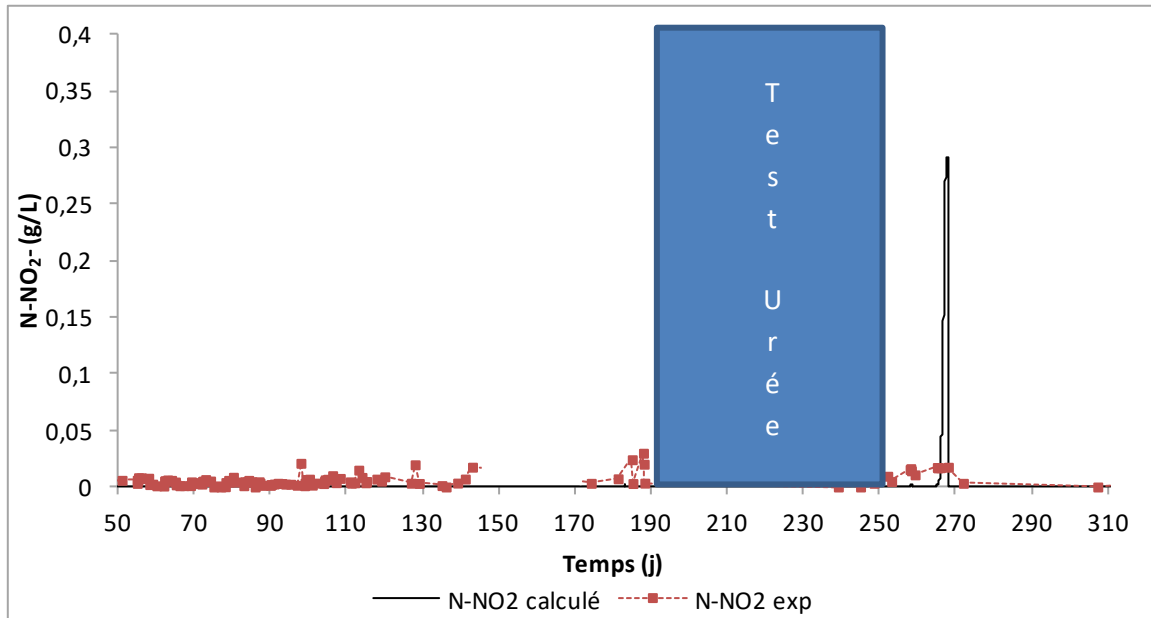


Figure IV-30: Comparaison entre les données prédites (en noir) et les données expérimentales (carré rouge) de la concentration en N-NO₂⁻ en sortie de réacteur.

Entre 250 et 270 jours de culture, une accumulation de nitrite de 17 mg N-NO₂⁻/L est observée sur les résultats expérimentaux. Le même résultat était observable pour l'ammonium en Figure IV-29. Sur cette période, la charge en azote entrante a varié entre 1.74 et 4.83 gN/L.j et des coupures d'électricité ont perturbé la biomasse. Le modèle ne représente qu'un seul pic pour la charge entrante en azote la plus forte. Expérimentalement comme dans les données prédites par le modèle, il n'y a pas d'accumulation significative de nitrite. Même lors des phases où la nitrification est partielle (Tableau IV-16), seul de l'ammonium s'accumule en sortie de réacteur.

Le modèle est précis quand à la prédiction du nitrate pendant le maintien de l'expérience, Figure IV-31 :

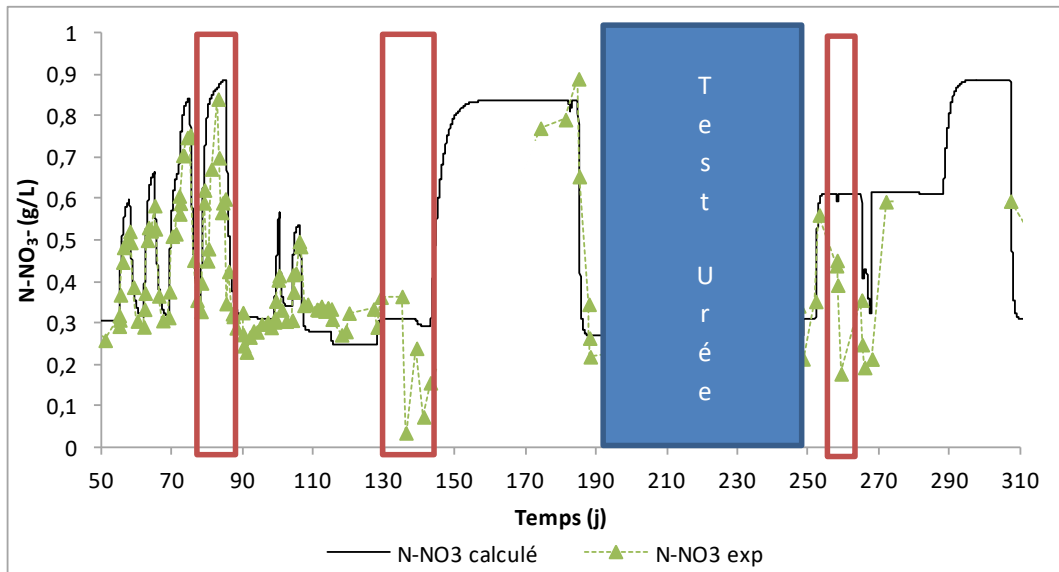


Figure IV-31: Comparaison entre les données prédites (en noir) et les données expérimentales (triangle vert) de la concentration en $N-NO_3^-$ en sortie de réacteur. Les données entourées par les rectangles rouges représentent les incidents techniques.

Au début de l'expérience, la prédiction de la concentration en nitrate en sortie de réacteur est fidèle aux données expérimentales. Lors des deux coupures d'électricité, vers 135 et 260 jours, comme pour les deux autres composés azotés, les deux séries de données présentent des discordances. Vers 135 jours, le réacteur est placé en fonctionnement batch car une trop grosse quantité d'ammonium est présente en sortie. La concentration en nitrate est alors très faible car la les cellulaire et le changement Dans des conditions de fonctionnement normales, le modèle prédit de manière précise les différents composés azotés de la nitrification.

Le modèle NitriSim peut aussi être utilisé pour prédire le développement de la biomasse vivante dans le réacteur. Les prédictions du modèle permettent de représenter l'évolution de *Nitrosomonas* et *Nitrobacter* dans les différents bacs qui composent le lit fixe, Figure IV-32 :

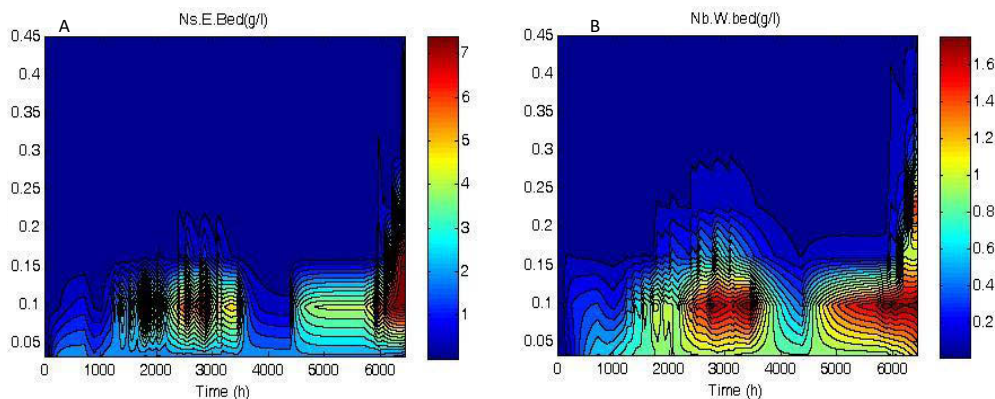


Figure IV-32: Prédiction de la répartition de *Nitrosomonas europaea* (A) et *Nitrobacter winogradskyi* (B) dans les différents bacs composant le lit fixe du réacteur.

Le modèle prédit une forte production de biomasse lors des tests en fortes charges en azote. Ceci est corrélé avec les observations visuelles du lit fixe où le développement du biofilm est intensifié dans ces phases. Le modèle est donc capable de prédire la formation de la biomasse en fonction de l'azote apporté au bioréacteur. Il est aussi possible de prédire le développement de la biomasse inerte fixée dans le lit fixe, Figure IV-33:

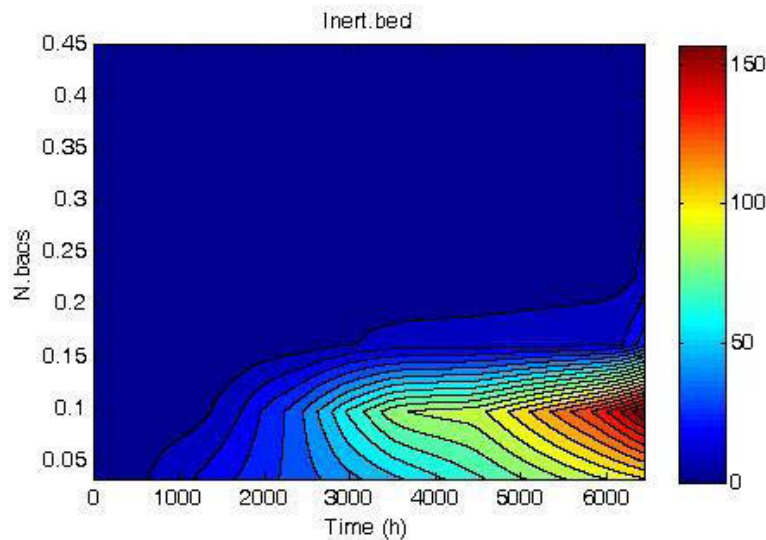


Figure IV-33: Prédiction de la répartition de la biomasse inerte fixée dans le lit fixe.

La biomasse inerte est plus importante en fin d'expérience : après 300 jours de culture, une partie de la biomasse meurt tout en restant accrochée au support. Cette couche de biomasse morte sert à l'adhérence de nouvelles bactéries. Pour vérifier l'exactitude des valeurs quantitatives de biomasse, il faudrait réaliser des analyses génomiques sur le lit fixe directement. En effet, pour quantifier chacune des deux souches dans chacun des « bacs » du lit fixe, une analyse de PCR quantitative est nécessaire. Cette analyse implique un démantèlement du réacteur pour récupérer les billes qui devront être traitées. A l'heure actuelle, cette analyse n'est pas possible puisque le réacteur est toujours en fonctionnement. NitriSim peut aussi être utilisé pour la prédiction de l'évolution de l'oxygène au sein du lit fixe, Figure IV-34:

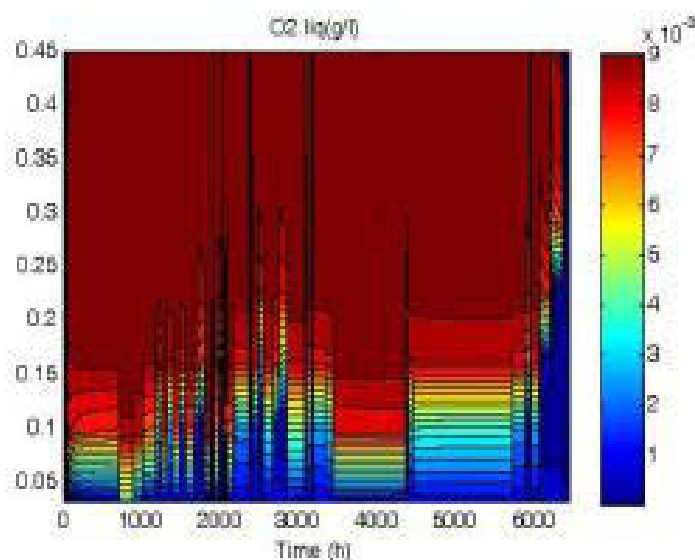


Figure IV-34: Prédiction de l'évolution de l'oxygène au sein du lit fixe durant l'expérience.

La concentration en oxygène dans la partie basse du lit fixe est la plus faible : c'est dans la moitié inférieure que se déroule en grande partie la nitrification. Le substrat arrivant en bas de colonne, il est normal de constater de faibles concentrations en oxygène dans cette zone. Au fur et à mesure de l'expérience (augmentation de la charge entrante) et de la colonisation du lit, la concentration en oxygène diminue aussi dans la partie centrale et supérieure du lit. La nitrification se développe du bas vers le haut de la colonne à lit fixe.

Le modèle NitriSim développé et calibré pour représenter la nitrification réalisée par *Nitrosomonas europaea* et *Nitrobacter winogradskyi* au sein d'une colonne à lit fixe. Ce modèle prédit précisément les concentrations des composés azotés dans le réacteur. Il peut être utilisé pour prédire le développement de la biomasse qui est corrélé avec les observations visuelles menées durant l'expérimentation.

IV.3.5 Utilisation de l'ajout de base et de la concentration en oxygène

Dans le chapitre III, il a été montré que le suivi de la nitrification pouvait être réalisé à partir de l'ajout de base et de la consommation en oxygène dans un réacteur agité (Partie III.4). Le suivi de ces paramètres est réalisé dans l'expérience menée sur la colonne à lit fixe. La quantité de base ajoutée au cours du temps est acquise durant toute l'expérience :

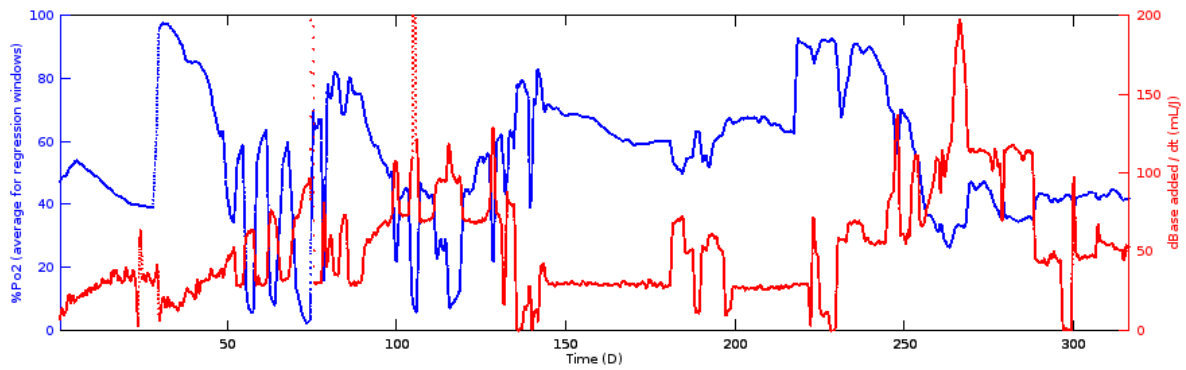


Figure IV-35: Evolution de la concentration en oxygène dissous expérimentale (courbe bleue) et vitesse de l'ajout de base expérimentale (courbe rouge) dans la colonne à lit fixe.

Cette figure permet d'observer la variation de l'ajout de base et de la concentration en oxygène dissous au cours de l'expérience. Lorsque les conditions expérimentales sont maintenues la courbe de la pente de l'ajout de base est une droite : l'ajout est constant et sa pente aussi. Cependant dès que les conditions changent, la pente n'est plus constante et présente des profils croissants ou décroissants. La quantité de base varie en fonction de la charge en azote entrante : pour les fortes charges (entre 69 et 85 jours puis 100 et 130 jours), il y a des pics d'ajout de base. Ce résultat était attendu puisque : plus il y a de l'azote qui entre dans le réacteur, plus il y a de protons produits ce qui cause l'acidification du milieu et donc l'ajout de base dans le réacteur. Ainsi, avec le suivi de ces paramètres en ligne il est possible de suivre la nitrification : la concentration en oxygène diminue lorsque la nitrification est réalisée. Il est cependant compliqué d'observer le décrochement sur les courbes d'oxygène et qui correspond à l'oxydation du nitrite qui avait été mise en évidence dans le Chapitre III (Cruvellier et al., 2016). En effet, le mode de culture continu dans la colonne à lit fixe implique un apport constant en ammonium en entrée. Il n'y a ainsi pas d'oxydation seule du nitrite, celle-ci est toujours couplée à la nitritation.

Lorsque l'on compare l'évolution de la concentration en oxygène, on constate que pour avoir des données utilisables, il est nécessaire d'avoir des sondes avec une haute sensibilité. Ainsi pour réaliser des graphiques sous le même format que ceux présentés dans le Chapitre III, Figure III-22, le suivi on-line actuellement en place sur le réacteur n'est pas suffisant. Le modèle NitriSim est alors utilisé pour prédire l'évolution du ratio H^+/O_2 , Figure IV-36:

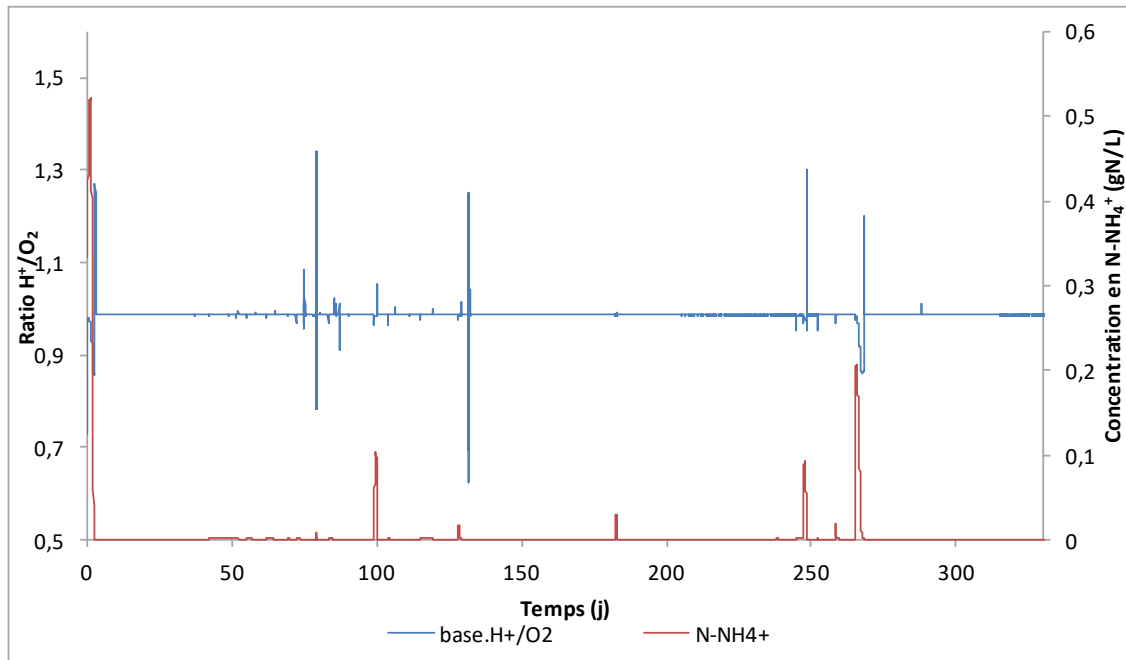


Figure IV-36: Evolution du ratio H^+/O_2 et de la concentration en ammonium durant la nitrification dans la colonne à lit fixe. Les données sont calculées à partir des prédictions obtenues avec NitriSim.

Le ratio H^+/O_2 est proche de 1, la valeur attendue, durant l'expérience. Il varie de sa valeur lorsque des incidents techniques ou une forte charge entrante causent une accumulation d'ammonium et/ou de nitrite en sortie de réacteur, Figure IV-37:

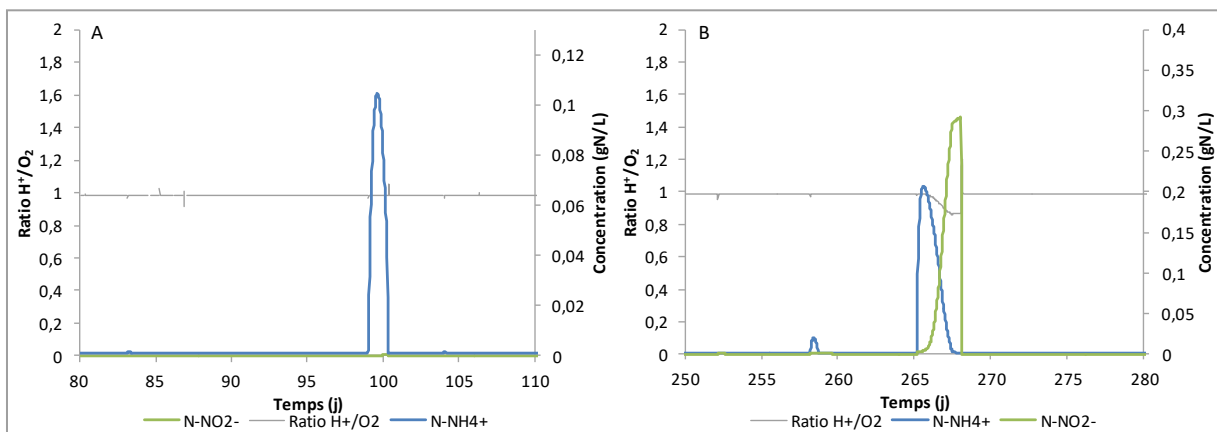


Figure IV-37: Evolution des données prédites pour le ratio H^+/O_2 et la concentration en ammonium et nitrite durant les phases P11 (A) et P40 (B).

Durant la phase P11, la charge entrante en azote est 1.75 gN/L.j. Un pic d'ammonium est observable en sortie de réacteur (Figure IV-37A), cependant il n'y a pas de décrochage de la courbe du ratio H^+/O_2 . En revanche lorsque le réacteur à lit fixe se trouve réellement en nitrification partielle et qu'il y a accumulation de nitrite comme lors de la phase P40 (Figure IV-37B) à cause d'incidents techniques, il est possible de remarquer une diminution du ratio H^+/O_2 , mettant en évidence la consommation d'oxygène non liée à une production de

protons et donc essentiellement liée à l'oxydation du nitrite. Le modèle NitriSim est ainsi capable de mettre en évidence l'oxydation du nitrite seule, même si la quantité de nitrite accumulée est faible ($0.3 \text{ gN-NO}_2^-/\text{L}$). Le modèle prédit un pic de nitrite dont la concentration est supérieure aux valeurs déterminées expérimentalement qui sont inférieures à $0.03 \text{ gN-NO}_2^-/\text{L}$. Cette variation peut s'expliquer par la présence d'incidents techniques qui perturbent la prédiction obtenue avec NitriSim. Durant l'expérience, il y a très peu d'accumulation de nitrite. Celle-ci est souvent une réponse à une très forte charge comme en phase P40. Dans le fonctionnement de la boucle MELiSSA, cette valeur de charge ne sera jamais atteinte : les fluctuations seront toujours proches de la valeur théorique de charge. L'accumulation de nitrite au sein de la colonne à lit fixe peut ainsi être surveillée en utilisant NitriSim et en évitant un prélèvement et une analyse quantitative des composés azotés.

Appliqué au Compartiment C3 de MELiSSA, NitriSim peut prétendre à des fonctions de contrôle et de prédiction afin de surveiller les accumulations de nitrite et la nitrification partielle. Le modèle représente correctement l'évolution des paramètres on-line mis en évidence dans le Chapitre III pour surveiller l'état de la nitrification dans le réacteur. Il est difficile d'observer les deux phases de consommation de l'oxygène mais l'observation graphique du ratio H^+/O_2 permet de mettre en évidence les éventuels pics de nitrite.

IV.4 Conclusions générales

L'objectif de ce chapitre était de mettre en place une culture de bactéries nitrifiantes dans une colonne à lit fixe sur plusieurs mois. L'hydrodynamique de la colonne à lit fixe a été étudiée expérimentalement. Pour les conditions de fonctionnement de la colonne à lit fixe, un $K_L a$ variant de 92 à 191 h^{-1} et un temps de séjour T_R de 2.9 à 50 h ont été testés. La colonne à lit fixe présente un comportement similaire à un réacteur parfaitement agité. Le transfert de l'oxygène au sein de ce réacteur est semblable à d'autres réacteurs à lit fixe. La colonne à lit fixe présente notamment le même profil hydrodynamique que le réacteur du compartiment C3 au MPP, tant pour la distribution du temps de séjour que pour le transfert de l'oxygène. Les volumes de la colonne à lit fixe ont été mesurés expérimentalement et, le degré de vide du lit fixe est de 0.31 pour un volume de 0.55 L .

Après la caractérisation physique du réacteur, une expérimentation de plusieurs mois a été menée sur la colonne à lit fixe, Figure IV-38.

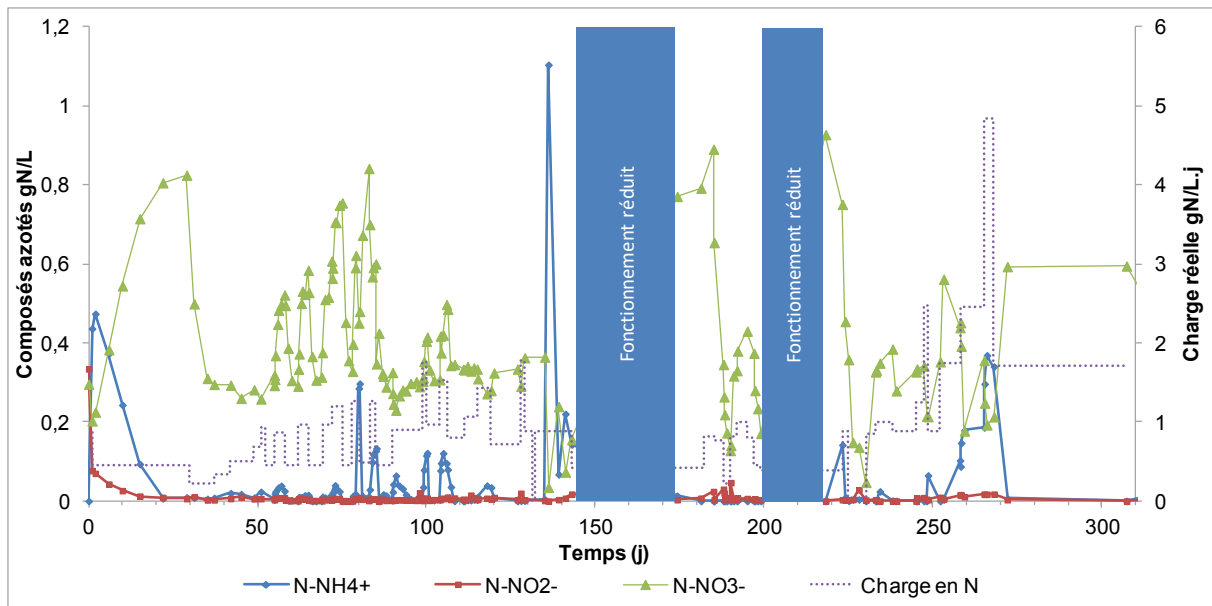


Figure IV-38: Evolution des composés azotés et de la charge entrante en azote dans la colonne à lit fixe durant l'expérience de caractérisation de la nitrification.

Le réacteur a été inoculé avec une co-culture de *N. europaea* et *N. winogradskyi*. Différentes charges en azote ont été appliquées en entrée de réacteur pour intensifier la colonisation du lit fixe et étudier la réponse de la biomasse à ces variations opératoires. Différents temps de séjour ont été appliqués pour faire varier la charge entrante en azote dans le réacteur. Durant cette étude, la charge en azote maximale assimilable par la biomasse présente dans le réacteur est 1.7 gN/L.j en nitrification totale (P18) et peut aller jusqu'à 2.5 gN/L.j en nitrification partielle (P37 et P41). Des incidents techniques (coupure d'électricité et de gaz) ont perturbé le fonctionnement du réacteur en causant une forte augmentation du pH et une lyse cellulaire. Après un temps de rééquilibrage, la colonne retrouve cependant, une nitrification totale.

Des bilans en azote et l'efficacité de la nitrification ont pu être calculés sur les différentes phases de test. Le bilan en azote reste proche de 100 % hormis dans des conditions dégradées (incidents techniques). L'observation de nitrification partielle (efficacité < 0.94) peut être corrélée aux incidents techniques et aux fortes charges en azote entrantes. Lors de cette expérience de long-terme, aucune accumulation de nitrite n'a été observée. Ce point critique dans MELiSSA est totalement respecté.

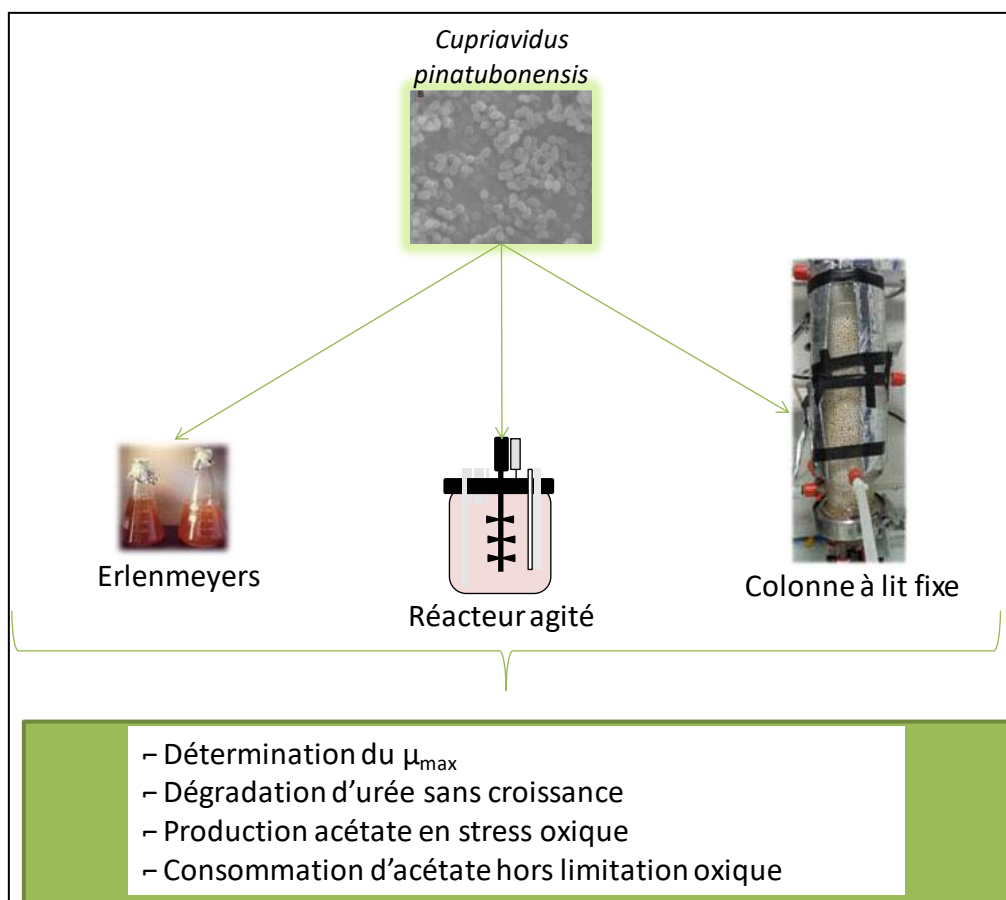
Le compartiment C3 de MELiSSA pourrait être amené à recevoir directement l'urine collectée dans la station spatiale. Dans cette optique, une expérience complémentaire a été menée sur la colonne à lit fixe colonisée par *N. europaea* et *N. winogradskyi*. L'idée était de travailler sur l'urée qui est la principale source d'azote présente dans l'urine. Nous avons voulu vérifier que l'urée n'était pas assimilable par la biomasse déjà présente dans le

réacteur et que la présence de ce composé ne perturbait pas la nitrification. Il a été vérifié que la stérilisation thermique (autoclave) du bidon d'alimentation ne suffisait pas pour assurer l'hydrolyse de l'urée en ammonium : ce traitement thermique étant de faible température (121 ou 135 °C). L'urée n'est pas directement assimilable par la biomasse puisque si c'est la seule source d'azote entrante, la concentration en nitrate en sortie de réacteur diminue, traduisant une absence de nitrification. La présence d'urée n'a pas non plus perturbé la biomasse nitrifiante qui a retrouvé une activité normale lorsque la source d'azote était du sulfate d'ammonium, composé utilisé tout au long de l'expérience précédente. Cette dernière expérience a mis en évidence le besoin d'une technique alternative pour assurer la dégradation de l'urine dans le compartiment C3 car la biomasse le composant actuellement est incapable d'assurer sa dégradation.

Le modèle NitriSim, utilisé pour prédire et contrôler la nitrification dans la colonne à lit fixe, est composé d'un modèle de nitrification et d'un modèle en N-bacs en série. Le modèle de nitrification a été calibré et validé dans le Chapitre III et la deuxième partie du Chapitre IV porte sur l'identification des paramètres requis dans le modèle N-bacs en série. Ainsi, la colonne à lit fixe est représentée par 7 bacs et un débit de rétro-mélange de 26 mL/min. Les paramètres biologiques et physiques du modèle NitriSim étant définis, ce dernier a été appliqué à l'expérience menée dans la colonne à lit fixe. Les résultats prédits pour chacun des composés azotés sont proches des valeurs expérimentales. Le modèle est capable de représenter la nitrification au sein de la colonne à lit fixe. Il peut aussi être utilisé pour prédire l'évolution de la concentration en oxygène et en biomasse dans le réacteur. L'aspect prédictif du modèle peut servir à surveiller l'accumulation du nitrite au sein du réacteur grâce à l'observation du ratio H^+/O_2 . Ce ratio, s'il est inférieur à 1, indique que la nitrification est partielle et qu'il y a une accumulation de nitrite. C'est un paramètre facile à calculer qui permet de savoir rapidement si le réacteur de nitrification est totalement fonctionnel.

Chapitre V

Vers la création d'un module de traitement de l'urine



Résumé graphique du Chapitre V : Etude préliminaire de *Cupriavidus pinatubonensis* en erlens et réacteur. Inoculation dans la colonne à lit fixe en cohabitation avec *N. europaea* et *N. winogradskyi* pour étudier la transformation urée-nitrate.

Chapitre V : Vers la création d'un module de traitement de l'urine

Le compartiment C3 de la boucle MELiSSA a pour objectif d'assurer la dégradation des déchets azotés en nitrate afin d'alimenter les compartiments C4a et C4b. Actuellement, seules les fèces sont incluses dans la boucle MELiSSA au niveau du compartiment C1. Le point d'incorporation de l'urine dans la boucle n'est pas encore défini. Son entrée pourrait se faire au niveau du compartiment C1 dont le volume de déchets apporté augmenterait alors, ou au niveau du compartiment C3 par exemple. Cette dernière possibilité impliquerait une modification du consortium du C3 qui ne peut, en l'état, dégrader l'urine dont l'urée est le principal constituant. Dans ce dernier chapitre, nous avons voulu tester l'ajout d'une souche dégradant l'urée avec la coculture déjà utilisée dans la colonne à lit fixe. Le choix s'est porté sur *Cupriavidus pinatubonensis*, une souche déjà étudiée à l'ESA. Dans un premier temps, des cultures pures de *C. pinatubonensis* ont été menées afin de caractériser sa croissance. Dans un second temps, la souche a été inoculée dans la colonne à lit fixe et sa colonisation du lit a été mise en place sur du milieu de coculture modifié dont la source d'azote est l'urée. Les objectifs de cette étude sont :

- Déterminer le taux de croissance maximum de *Cupriavidus pinatubonensis*
- Observer la dégradation de l'urée par *Cupriavidus pinatubonensis* en culture pure
- Inoculer la souche dans la colonne à lit fixe et mettre en place une culture en continu avec du milieu de coculture modifié comme substrat

V.1 Cultures pures de *Cupriavidus pinatubonensis*

Dans cette première partie, nous nous sommes intéressés à la culture de *Cupriavidus pinatubonensis* dans un milieu riche. Les cultures pures en microplaque ont permis d'obtenir une quinzaine de réplicats pour déterminer le μ_{max} de la souche. Dans un second temps, une culture de *C. pinatubonensis* en réacteur a servi à étudier la dégradation de l'urée par la souche.

V.1.1 Plan expérimental

C. pinatubonensis est conservée sur gélose TSA et est remise en suspension quand nécessaire. Les cultures pures ont été réalisées en microplaque dans un volume de culture de 200 μ L à une dilution de 10 %. Une pré-culture de 48 h est utilisée comme inoculum. Les cultures sont suivies pendant 24 h avec une lecture de densité optique toutes les 30 minutes.

Ce mode de culture permet un nombre important de réplicats. Les cultures sont réalisées à 28 °C afin de se placer dans les mêmes conditions que dans la colonne à lit fixe.

V.1.2 Suivi de biomasse et calcul du taux de croissance maximum

La DO_{600nm} est mesurée toutes les 30 minutes. Les courbes de la densité optique sont tracées pour chaque puits afin de déterminer les phases exponentielles de croissance, Figure V-1:

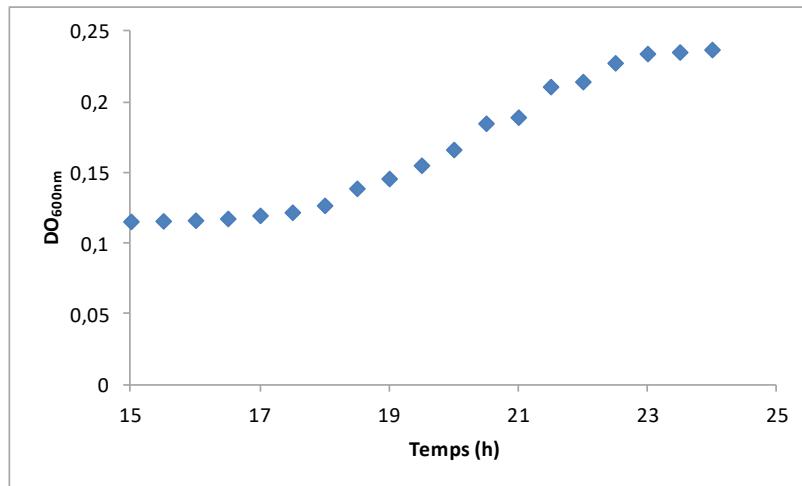


Figure V-1: Evolution de la densité optique à 600 nm dans une des cultures pures de *C. pinatubonensis*.

La phase de latence est d'environ 16 heures : c'est une latence longue mais qui est expliquée par l'état stationnaire de l'inoculum utilisé. Les taux de croissance maximum sont calculés pour chaque puits en traçant le $\ln(DO_{600nm})$ en fonction du temps, Figure V-2:

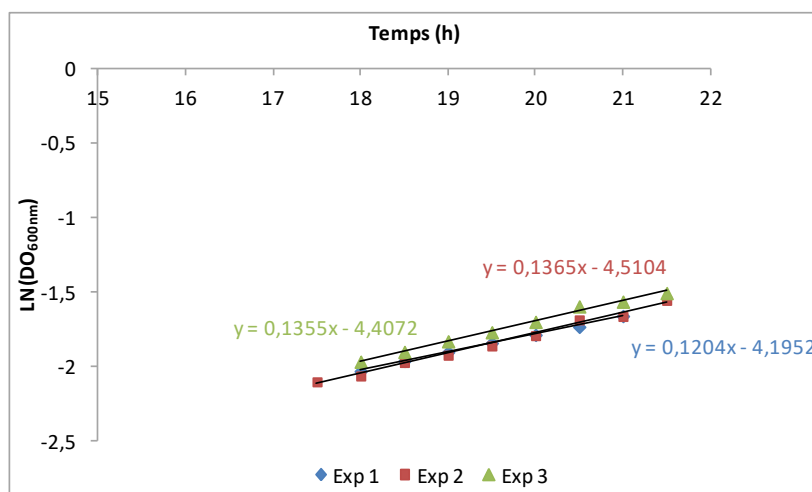


Figure V-2: Détermination du taux de croissance maximum μ_{max} , pour trois cultures pures.

Les taux de croissance maximaux, μ_{max} , ont été déterminés dans chaque puits et la valeur moyenne est $0.13 \text{ h}^{-1} \pm 0.005$. Cette valeur est dans la partie inférieure de la gamme présente dans la littérature (Tableau I-16) : 0.06 à 0.33 h^{-1} . Cette observation peut être expliquée par la température fixée pour ces cultures pures qui est dans la partie basse de la gamme de température de culture du genre *Cupriavidus* : $27-41 \text{ }^\circ\text{C}$ (Sato et al., 2006). Le faible μ_{max} peut aussi mettre en évidence une limitation de la croissance par la bactérie dans ce mode de culture.

C. pinatubonensis présente un μ_{max} respectivement 2.5 et 5 fois plus élevé que *N. europaea* et *N. winogradskyi*. Il sera important de vérifier que la vitesse de production d'ammonium par *C. pinatubonensis* ne soit pas plus rapide que la vitesse de consommation de ce même composé par *Nitrosomonas europaea*. En effet, de l'ammonium pourrait alors s'accumuler et inhiber les deux bactéries nitrifiantes déjà présentes dans le réacteur.

V.1.3 Cultures préliminaires en Erlenmeyers

Pour étudier le métabolisme de *Cupriavidus pinatubonensis*, des cultures préliminaires ont été réalisées en Erlenmeyers. Dans la culture A, *C. pinatubonensis* est cultivée dans le milieu LB, milieu riche contenant diverses sources d'azote ; la culture B est réalisée dans du milieu de coculture modifié où la principale source d'azote est l'urée. Ces cultures sont incubées à $30 \text{ }^\circ\text{C}$ avec une agitation de 100 rpm . Dans la culture A, on remarque une phase de croissance très courte, Figure V-3:

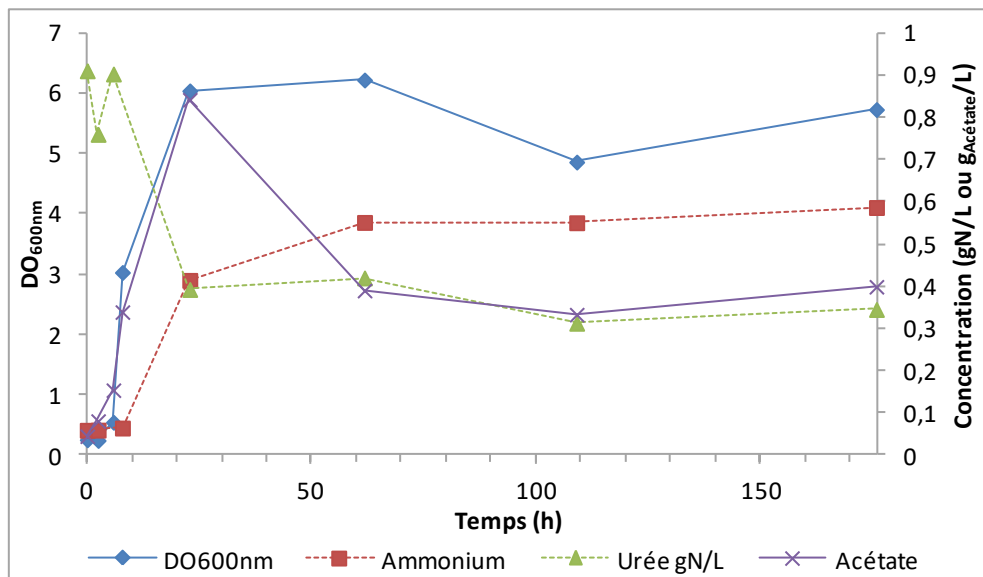


Figure V-3: Culture de *C. pinatubonensis* dans le milieu LB dans l'Erlenmeyer A.

Dans les 20 premières heures de culture, la biomasse bactérienne est multipliée par un facteur 24. Durant cette croissance, l'urée est consommé et de l'ammonium et de l'acétate

sont produits. Sur toute la culture, il y a 0.57 gN-urée/L consommé et 0.53 gN-NH₄⁺/L produit. Dans les premières heures de culture, il est possible de constater que l'urée n'est pas encore consommé, bien que *C. pinatubonensis* produise de l'acétate. Quand la consommation de l'urée est stoppée, la bactérie consomme l'acétate qu'elle a produit précédemment. Cette observation est intéressante et, montre que *Cupriavidus* a un métabolisme qui s'adapte à des conditions de culture différentes. Cette culture en milieu riche permet de montrer que *C. pinatubonensis* transforme bien l'urée en ammonium et qu'elle peut être utilisée pour cette capacité.

Une seconde culture a été réalisée pour vérifier la dégradation d'urée par *C. pinatubonensis* dans le milieu de coculture modifié qui est un milieu minéral (Figure V-4).

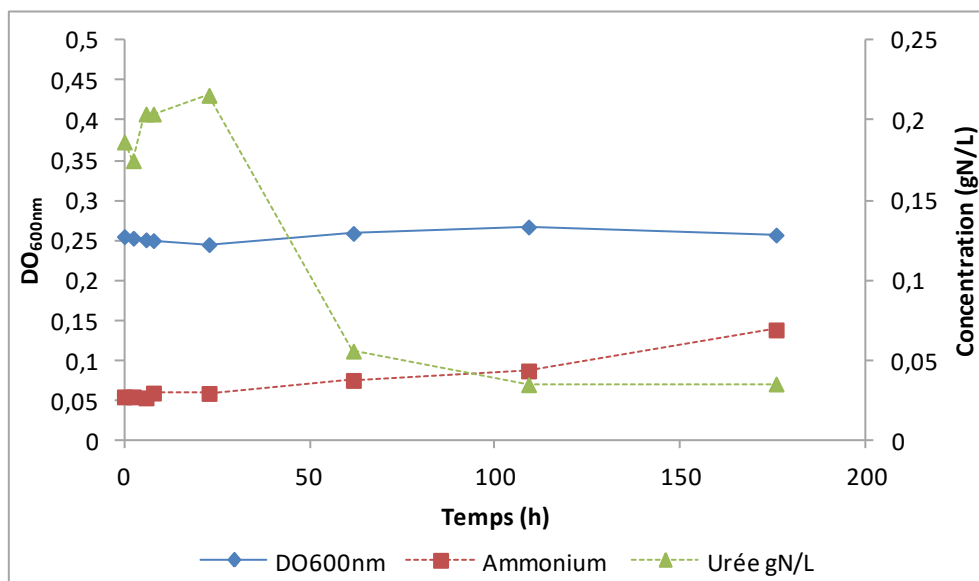


Figure V-4: Culture de *C. pinatubonensis* dans le milieu de coculture modifié dans l'Erlenmeyer B.

L'objectif de cette culture était de vérifier que *C. pinatubonensis* dégradait quand même l'urée dans un milieu minéral où la source de carbone est le CO₂. Dans l'Erlenmeyer B, on observe une consommation de l'urée mais aucune croissance bactérienne. Ainsi, cela pourra être problématique si on souhaite utiliser *C. pinatubonensis* dans la colonne à lit fixe puisque la croissance de la bactérie est nécessaire à sa fixation dans le réacteur. Cette culture sur milieu minéral a montré que *C. pinatubonensis* dégrade l'urée sans faire de croissance.

Les cultures A et B ont permis de vérifier que *C. pinatubonensis* pouvait métaboliser l'urée. Elles ont aussi montré que cette dégradation n'était pas forcément liée à une croissance bactérienne. L'acétate est produit durant la culture A et est reconsommé quand *C. pinatubonensis* arrête de consommer l'urée. Un point intéressant à observer est que, la souche ne consomme jamais la totalité de l'urée. On peut émettre l'hypothèse que la

consommation d'urée s'arrête car la concentration en ammonium atteinte devient inhibitrice pour la souche.

V.1.4 Dégradation de l'urée par *Cupriavidus pinatubonensis*

Un réplicat de la culture A réalisée en Erlenmeyer a été mené en réacteur agité. Ce mode de culture permet d'avoir un suivi de la concentration en oxygène et du pH durant la culture. Dès les premières heures de cultures nous avons remarqué que *Cupriavidus* se trouvait en limitation par l'oxygène lorsque les conditions opératoires étaient : aération : 0.5 L/min et agitation : 250 rpm. En augmentant progressivement les deux paramètres jusqu'à 3 L/min et 600 rpm, nous avons réussi à maintenir une valeur d'oxygène dissous supérieure à 20 %. Le suivi de la biomasse et des concentrations en urée et ammonium a montré des résultats intéressants, Figure V-5:

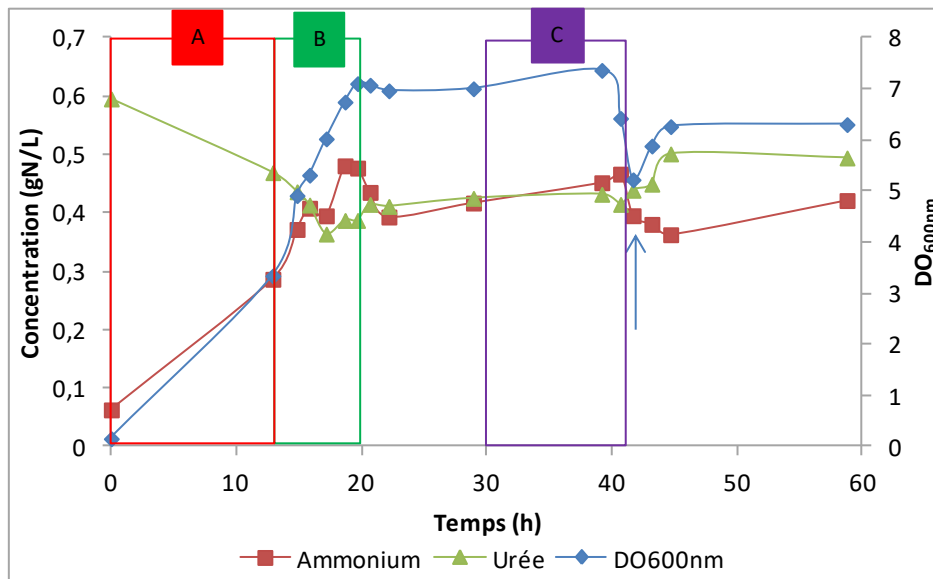


Figure V-5: Suivi de la biomasse et des concentrations en urée et ammonium durant la culture de *C. pinatubonensis*. Différentes zones ont été mises en évidence : A. Limitation en O₂ ; B. Pas de limitation en O₂ ; C. Limitation en carbone ; la flèche représente le Feb-batch réalisé à 42 h.

Durant la première phase de culture, la phase A, on constate une croissance bactérienne et une dégradation d'urée entraînant une production d'ammonium. Durant cette phase, la culture se trouve pourtant en limitation en oxygène : il n'y avait aucune régulation au niveau de la pO₂ et celle-ci devient nulle. A ce moment de la culture, les conditions sont identiques à celles de l'Erlenmeyer A où il n'y a pas de contrôle de la concentration en oxygène. Dans cette période de stress, la bactérie produit de l'acétate comme observé dans l'Erlen A (Figure V-3), Figure V-6 :

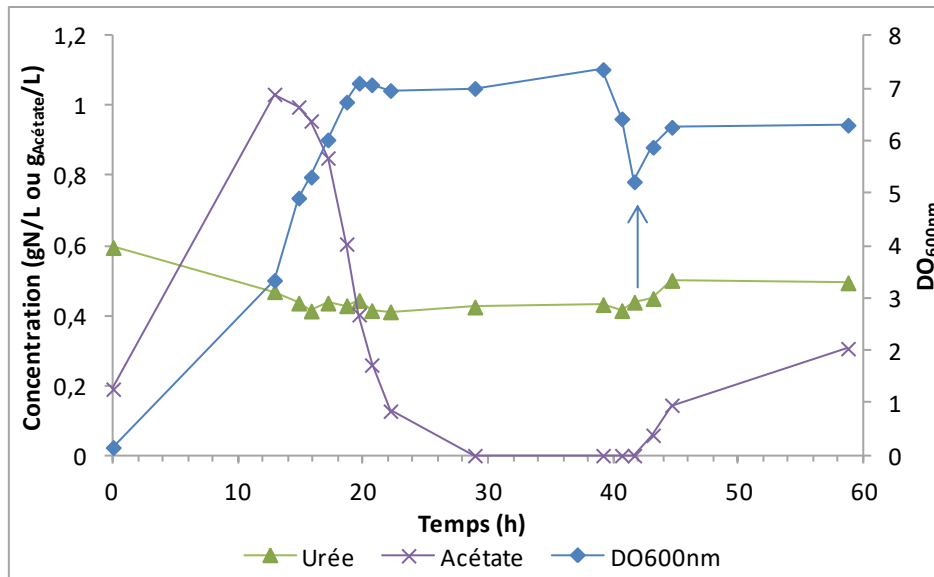


Figure V-6: Suivi de la biomasse et de l'acétate durant la culture de *C. pinatubonensis*. La flèche représente le Fed-batch réalisé à 42 h.

C. pinatubonensis dégrade l'urée en même temps qu'elle produit l'acétate entre 0 et 12 h. Lorsqu'à 12 h, les conditions opératoires sont modifiées et que la concentration en oxygène n'est plus limitante, c'est-à-dire la phase B sur Figure V-5, *C. pinatubonensis* consomme l'acétate qu'elle a produit. Ceci n'est pas nouveau car différents auteurs avaient déjà observé ce métabolisme du genre *Cupriavidus* pour les acides organiques tels que l'acétate (Tableau I-16). Sur cette même période, la dégradation de l'urée diminue et la concentration en ammonium se stabilise. Suite à cette constatation, entre 20 et 41 h de culture, nous avons décidé de replacer la bactérie en limitation d'oxygène pour vérifier si ce facteur influait sur la dégradation de l'urée. Les paramètres d'agitation et d'aération ont progressivement été ramenés aux valeurs d'origine. Même en se replaçant dans les conditions de culture initiales, nous n'avons pas constaté de reprise de la dégradation de l'urée par *C. pinatubonensis*. La concentration en oxygène n'a visiblement pas d'impact sur la dégradation de l'urée. L'arrêt de ce phénomène est similaire à l'observation réalisée en Erlenmeyers et corrobore l'hypothèse d'une inhibition de l'uréase par l'ammonium.

Durant la phase C débutant à 30 h de culture, on constate qu'il n'y a plus d'acétate dans le milieu de culture : la souche se retrouve en limitation par l'oxygène et par le carbone. Les conditions initiales étant recréées, une nouvelle production d'acétate aurait pu être une réaction logique de *C. pinatubonensis*. Cependant, on ne constate pas ce phénomène et la bactérie est en phase stationnaire : il n'y a pas de croissance. La comparaison des résultats avec la culture en Erlenmeyer (Partie V.1.3) montre que si la consommation d'urée n'est pas liée à la croissance bactérienne, la production d'acétate semble l'être. Ceci a été vérifié en réalisant un Fed-batch à 42 h de culture. Ce fed-batch correspond à un ajout de 0,4 L de

milieu LB dans le réacteur. Les paramètres d'agitation et d'aération sont conservés afin de se placer dans les mêmes conditions qu'en début de culture. On observe de manière logique une diminution de la biomasse et de la concentration en ammonium causée par l'augmentation du volume du réacteur. Et on constate une augmentation de la concentration en urée due à sa présence dans le milieu ajouté. A la suite de ce Fed-batch, on constate une croissance bactérienne ainsi qu'une production d'acétate : ceci semble confirmer le lien entre la croissance et la production d'acétate. En revanche, il n'y a pas de consommation d'urée ni de production d'ammonium (Figure V-5). Dans la partie V.1.3, l'hypothèse d'une inhibition de l'ammonium sur *C. pinatubonensis* avait été émise. Les résultats de ce Fed-batch confirment cette hypothèse : il y a une légère production d'ammonium et consommation d'urée en fin de culture (Figure V-5). Si on considère que l'ajout de milieu a créé une dilution dans le réacteur, cette légère reprise du métabolisme est logique. Mais, celui-ci est rapidement stoppé lorsque la concentration en ammonium se retrouve proche de celle avant le Fed-batch : $0.55 \text{ gN-NH}_4^+/\text{L}$ en fin de culture contre $0.52 \text{ gN-NH}_4^+/\text{L}$ avant le Fed-batch.

La culture en réacteur a permis de montrer que *C. pinatubonensis* était sensible à la concentration en oxygène dans le milieu. Lorsqu'elle est en carence d'oxygène, la bactérie produit de l'acétate de la même manière qu'une bactérie anaérobie réalise l'acétogénèse pour produire de l'acétate. Cette culture a permis de corroborer l'hypothèse de l'inhibition de l'ammonium sur la dégradation de l'urée. Dès qu'une certaine concentration en ammonium est atteinte, la dégradation de l'urée est stoppée.

V.1.5 Conclusions sur les cultures pures de *C. pinatubonensis*

Les cultures pures en microplaque de *C. pinatubonensis* ont permis de déterminer son taux de croissance maximum en milieu LB. Les cultures sur deux milieux différents ont montré que *C. pinatubonensis* était capable d'utiliser l'urée et le transformer en ammonium même dans un milieu minéral sans source de carbone organique. Les différentes cultures ont permis de mettre en évidence les conclusions suivantes :

- En limitation d'oxygène, *C. pinatubonensis* produit de l'acétate.
- En milieu riche et sans limitation par l'oxygène, *C. pinatubonensis* consomme l'acétate avec (culture en réacteur, Figure V-6) ou sans croissance bactérienne (culture en Erlenmeyer, Figure V-3).
- La dégradation de l'urée par *C. pinatubonensis* est inhibée par l'ammonium et n'est pas forcément liée à une croissance bactérienne (Erlenmeyer B, Figure V-4).
- En milieu de coculture modifié (*ie* CO_2 comme source de carbone), il n'y a pas de croissance bactérienne.

Ces résultats préliminaires confirment que *C. pinatubonensis* peut être utilisée comme souche dégradant l'urée au niveau du compartiment C3. Il reste, cependant, à réaliser une étude plus complète du métabolisme de *C. pinatubonensis* qui manifestement nécessite une source de carbone et d'oxygène pour dégrader l'urée de façon efficace.

La suite de ce travail présente l'inoculation et la culture de *C. pinatubonensis* dans la colonne à lit fixe. Il faudra éviter de se placer en limitation par l'oxygène pour limiter la production d'acétate par *C. pinatubonensis*. De plus, on pourra vérifier l'effet inhibiteur de l'ammonium sur *C. pinatubonensis* puisque sa concentration est normalement nulle dans la colonne. Une consommation de la totalité de l'urée devrait alors être observée dans la colonne à lit fixe.

V.2 Mise en place d'une triculture dans la colonne à lit fixe

La seconde partie de ce chapitre porte sur l'inoculation de *C. pinatubonensis* dans la colonne à lit fixe où la coculture *Nitrosomonas europaea* - *Nitrobacter winogradskyi* est déjà présente. Les résultats préliminaires décrits dans la Partie V.1 ont montré que *C. pinatubonensis* est un candidat potentiel pour la composition d'une triculture dans la colonne à lit fixe. En suivant le même protocole que dans le Chapitre IV, la bactérie *C. pinatubonensis* est inoculée dans la colonne à lit fixe. Les objectifs de la mise en place de cette triculture sont :

- Réaliser une triculture pour dégrader l'urée dans la colonne à lit fixe.
- Mettre en place le mode continu et maintenir ce mode de culture.
- Vérifier la dégradation globale de l'urée en nitrate.
- Etudier le fonctionnement du réacteur avec *C. pinatubonensis*.

V.2.1 Plan expérimental

Le plan expérimental suivi est le même que dans le Chapitre IV. Le réacteur étant déjà colonisé par *Nitrosomonas* et *Nitrobacter*, les étapes de stérilisation et stabilisation ne sont pas nécessaires. Une préculture de *Cupriavidus pinatubonensis* réalisée en milieu LB est inoculée dans la colonne à lit fixe grâce à une bouteille de transfert. Des étapes de fed-batch sont réalisées pour permettre la colonisation du réacteur par la biomasse. Une fois l'urée consommée, le mode continu sera mis en place avec des T_R décroissants jusqu'à atteindre 8h.

V.2.2 Suivi de culture

Aucun suivi de biomasse n'est réalisé durant la phase d'inoculation et de culture en fed-batch dans la colonne à lit fixe. L'ammonium, le nitrite et le nitrate sont suivis par Chromatographie ionique comme dans le Chapitre IV. L'urée est dosé avec le protocole décrit dans la Partie II.2.2.1.3, selon la méthode de Knorst *et al.*, 1997.

V.2.3 Inoculation de *C. pinatubonensis* et culture fed-batch

L'inoculation de *C. pinatubonensis* dans la colonne à lit fixe suit le même protocole que celle de *Nitrosomonas* et *Nitrobacter* décrite dans le Chapitre IV, Partie IV.2.2.

Les cultures en fed-batch sont réalisées à partir d'un milieu de coculture modifié. Le milieu est le même que celui utilisé dans le Chapitre IV sauf que la source d'azote (initialement du sulfate d'ammonium, Tableau II-4) a été remplacée par de l'urée à une concentration de 1.32 g_{Urée}/L, soit 0.6 gN-urée/L, Tableau II-6. Lors de chaque fed-batch, l'équivalent de la moitié du volume liquide de la colonne est remplacé par ce milieu de coculture modifié.

V.2.4 Phase de colonisation du lit fixe par *C. pinatubonensis*

Dans les premiers jours de la phase de colonisation par *C. pinatubonensis*, une dégradation d'urée et une augmentation de la concentration en nitrate doivent être observées. La phase de colonisation a été divisée en différentes étapes :

Tableau V-1: Etapes de la colonisation de la colonne à lit fixe par *Cupriavidus pinatubonensis*.

Phase	Temps (j)	T _R (h)	Charge en entrée (gN-urée/L.j)	Description
P47	561	0	0	Inoculation <i>C. pinatubonensis</i>
P47.A1	575	0	0	Fed-batch 1: Ajout de milieu alimentation
P48	603	30	0.474	Mode continu
P48.I1	619	0	0	Tuyau bouché: pas d'alimentation liquide
P49	626	0	0	Arrêt du mode continu et nouvelle inoculation de <i>C. pinatubonensis</i>

Les différents composés azotés ont été suivis durant la phase de colonisation de la colonne par *C. pinatubonensis*, Figure V-7 :

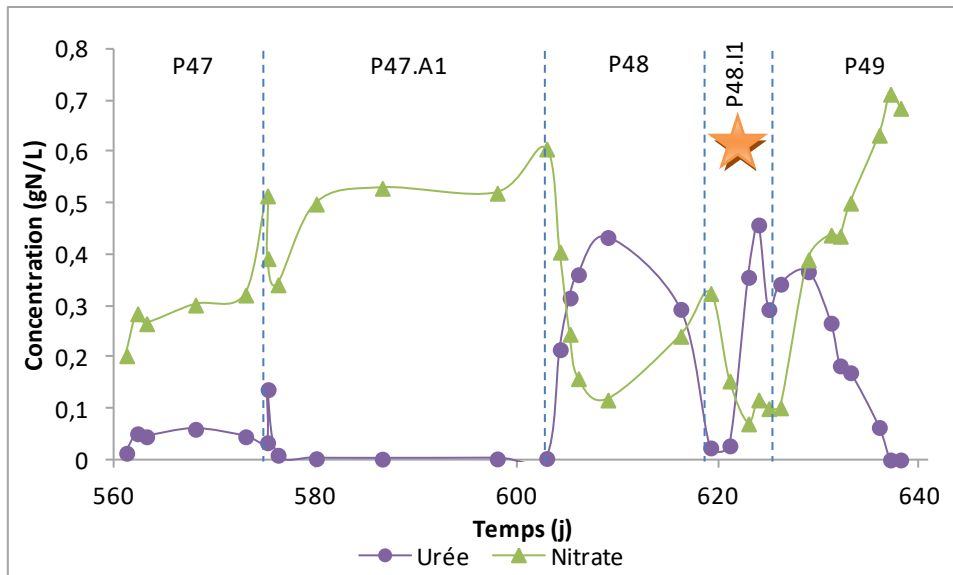


Figure V-7: Evolution de la concentration en urée et en nitrate durant la phase de colonisation. L'étoile indique un mode dégradé où le mode continu est suspendu sur plusieurs jours.

Durant la phase d'inoculation (P47) et le premier Fed-batch (P47.A1), on constate une consommation de la totalité de l'urée et une production de nitrate qui se stabilise entre 580 et 600 jours. Le mode continu a été démarré à 603 jours de culture puisque les deux phases précédentes avaient été concluantes. Malheureusement, un souci technique à 619 jours a perturbé cette mise en route, événement P48.I1 sur la Figure V-7. Le tuyau d'alimentation liquide s'est bouché par accumulation de biomasse et a suspendu le mode continu pendant plusieurs jours : la phase P48 équivaut alors à un Fed-batch. La concentration en urée diminue alors que celle en nitrate augmente. Lorsque l'alimentation liquide est réparée, en milieu de phase P48.I1, la concentration en urée augmente alors que celle en nitrate diminue jusqu'à 0,1 gN-NO₃⁻/L. A 626 jours, l'urée ne semble pas être dégradée : le mode continu est arrêté et une nouvelle inoculation de *C. pinatubonensis* est réalisée. A partir de ce moment, l'alimentation liquide la colonne à lit fixe est stoppée. On constate ainsi une consommation progressive de la totalité de l'urée et la concentration en nitrate augmente jusqu'à 0,7 gN-NO₃⁻/L. Trois fed-batch ont été réalisés après la première inoculation de *C. pinatubonensis* dans la colonne à lit fixe.

Le suivi des concentrations en urée et nitrate dans la colonne à lit fixe (Figure V-7) montre que l'urée est consommée en totalité durant les Fed-batch, contrairement à ce qui était observé dans les cultures en Erlenmeyers (Figure V-3 et Figure V-4). L'explication possible de l'inhibition par l'ammonium est alors justifiée par ces observations : de la phase P47 à P49, la concentration en ammonium est nulle en sortie de réacteur. Il n'y a alors pas de rétro-inhibition de l'uréase par l'ammonium, et l'urée est consommée en totalité. Dans la colonne à

lit fixe, il y a très peu d'accumulation d'ammonium en sortie de colonne. Ces accumulations sont dues à des incidents techniques comme cela a été présenté en Chapitre IV. *C. pinatubonensis* est donc un candidat intéressant pour la triculture du compartiment C3.

L'observation des paramètres on-line lors de ces 80 jours de culture ont montré qu'il n'y avait pas ou très peu d'ajout de base dans la colonne à lit fixe, Figure V-8:

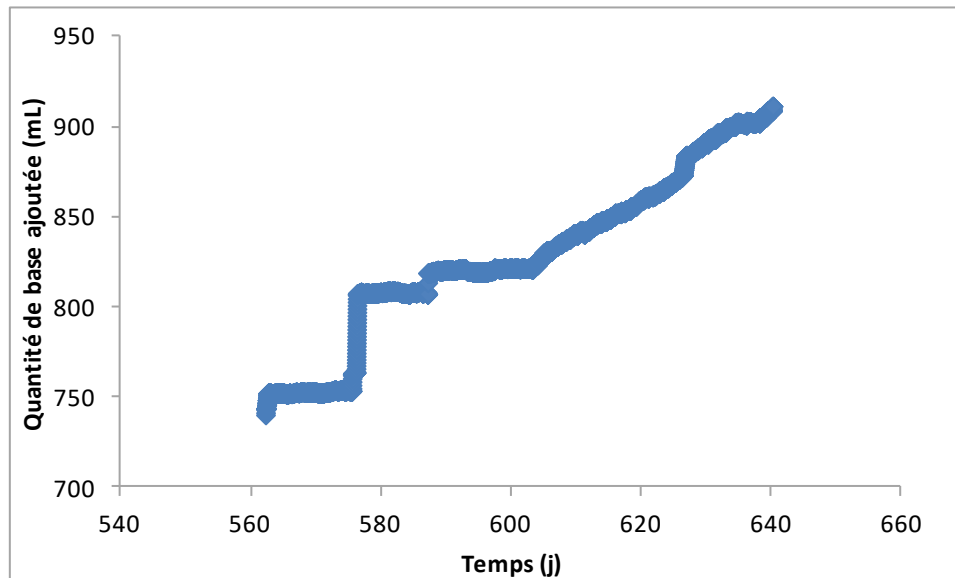


Figure V-8: Ajout de base durant l'inoculation et les fed-batch dans la colonne à lit fixe durant la phase de colonisation par *Cupriavidus pinatubonensis*.

Durant les 80 jours de colonisation du réacteur par *C. pinatubonensis*, il y a 170 mL de base ajoutée. Cela correspond à une vitesse d'ajout de base d'environ 2 mL/j dans le réacteur. Lors de la culture de *N. europaea* et *N. winogradskyi*, les vitesses d'ajout de base dans la colonne étaient beaucoup plus élevées. Par exemple, pour la phase P4 où la charge entrante en azote est similaire à celle appliquée durant la colonisation de *C. pinatubonensis*, la vitesse d'ajout de base dans la colonne est de 36 mL/j. Il y a eu 145 mL de base ajoutée en 4 jours : une quantité similaire à celle ajoutée en phases P47-P50 mais sur 80 jours d'étude. La nitrification est un procédé acidifiant : des protons sont libérés ce qui entraîne une acidification du milieu. Lorsque la troisième souche est présente et dégrade l'urée, il y a moins de base ajoutée alors que la quantité de protons produite par *Nitrosomonas* est la même car les charges entrantes en azote sont similaires. On peut émettre l'hypothèse que le procédé de dégradation de l'urée par *Cupriavidus* est une réaction alcalinisante. La triculture de ces souches est possible mais elle compromet les paramètres mis en évidence dans les Chapitre III et IV pour le suivi on-line de la nitrification puisque l'ajout de base dans le réacteur est modifié.

V.2.5 Culture en mode continu dans la colonne à lit fixe

Après les trois fed-batches concluants présentés dans la Partie V.2.4, le mode continu a été démarré dans la colonne à lit fixe (Tableau V-2).

Tableau V-2: Conditions opératoires appliquées durant le mode continu pour la culture de *Cupriavidus pinatubonensis* dans la colonne à lit fixe.

Phase	Temps (j)	T _R (h)	Charge en entrée (gN/L·j)	Description
P50	640	30	0.474	Mode continu

Le temps de séjour de 30 h, a été sélectionné pour ne pas lessiver *C. pinatubonensis* qui un μ_{\max} de 0.13 h^{-1} . Cependant, les résultats observés sur 15 jours montrent une accumulation d'urée en sortie de réacteur, Figure V-9 :

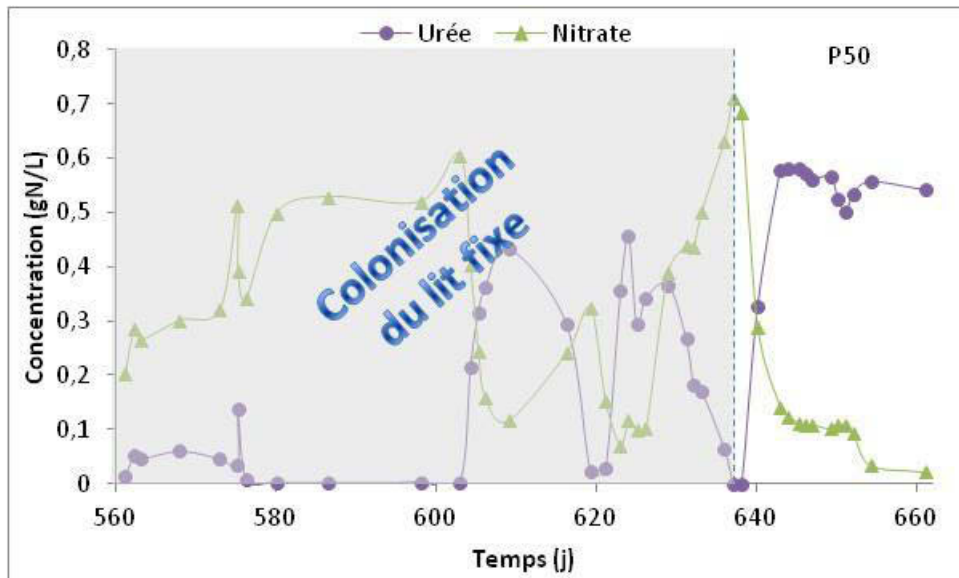


Figure V-9: Evolution des concentrations en urée et nitrate durant l'application du mode continu à partir du 640^{ème} jour de culture.

Lorsque le régime permanent est atteint (au moins 3 temps de séjour), on constate que l'urée s'accumule à 0.6 gN/L et que la concentration en nitrate diminue et se stabilise à 0.1 gN-NO₃⁻/L. Ces premiers résultats indiquent que *Cupriavidus* ne dégrade pas l'urée dans le réacteur. Plusieurs hypothèses peuvent alors être mises en avant :

- Le métabolisme de dégradation de l'urée est stoppé
- C. pinatubonensis* est lessivée

Hypothèse A : nous avons vu précédemment que *C. pinatubonensis* dégrade l'urée même lorsqu'elle est en stress oxydant. Dégradant totalement l'urée lors des Fed-batch, le stress

serait uniquement présent lors du mode continu. La seule variation de conditions entre ces deux états est l'alimentation liquide, ce peut donc être la seule source de stress auquel la bactérie est exposée. L'hypothèse d'un stress « hydrodynamique » dans le réacteur est très peu probable.

Hypothèse B : la phase de colonisation a pour objectif la fixation de *C. pinatubonensis* dans le lit fixe. Si la bactérie est lessivée, c'est que celle-ci ne se fixe pas ou pas suffisamment. Compte tenu de l'historique de la colonne à lit fixe, plus de 18 mois de fonctionnement, il est normal que *C. pinatubonensis* ne puisse adhérer au support du lit. En revanche, celle-ci aurait pu être piégée dans les « mailles » du biofilm déjà présent. L'échec de cette fixation peut être dû à un temps de séjour trop élevé ou une durée de colonisation trop faible. Comme observé précédemment dans la culture B en Erlenmeyer (Figure V-4), *C. pinatubonensis* dégrade l'urée sans croissance bactérienne. Il semblerait ainsi que *C. pinatubonensis* soit incapable d'utiliser le CO₂ comme source de carbone dans les conditions de cultures actuelles. Il est en effet précisé dans la littérature qu'elle nécessite un donneur d'électrons comme le H₂ pour croître dans ces conditions (Sato et al., 2006). Sa croissance, durant la phase de colonisation, est alors impossible puisque c'est la seule source de carbone à disposition dans la colonne à lit fixe. Le lessivage de la biomasse est ainsi probablement dû à l'absence de croissance/fixation de *C. pinatubonensis* dans la colonne à lit fixe.

V.2.6 Bilan de culture de *C. pinatubonensis* dans la colonne à lit fixe

L'inoculation de *Cupriavidus pinatubonensis* a été réalisée en suivant le même protocole que pour l'inoculation de *Nitrosomonas europaea* et *Nitrobacter winogradskyi* dans le Chapitre IV. L'étape de colonisation du réacteur par *C. pinatubonensis* a bien démarré : l'urée a été consommé en totalité durant chacun des fed-batch et a entraîné une production de nitrate. La tri-culture est fonctionnelle : l'urée est assimilée par *C. pinatubonensis* et la nitrification se poursuit immédiatement pour aboutir à la production de nitrate. En revanche, lorsque le mode continu est mis en place, le processus n'est plus réalisé correctement. L'urée n'est pas consommé et sa concentration augmente jusqu'à 0.6 gN-urée/L en sortie de colonne. La concentration en nitrate diminue jusqu'à 0.03 gN-NO₃⁻/L. Au bout de 15 jours de mode continu, le nitrate accumulé précédemment est totalement lessivé. L'explication de ce phénomène est l'absence de croissance de *C. pinatubonensis* dans les conditions opératoires actuellement en place.

V.3 Conclusions sur l'étude préliminaire de *C. pinatubonensis*

Dans ce chapitre ont été présentés des résultats préliminaires de l'étude de *C. pinatubonensis*. Dans un premier temps, des cultures en microplaque ont permis de déterminer le taux de croissance maximum de la bactérie et $\mu_{\max}=0.13 \text{ h}^{-1}$. Cette valeur est cohérente avec celles trouvées dans la littérature pour le genre *Cupriavidus*. Les cultures pures en Erlenmeyers et en réacteur ont mis en avant plusieurs conclusions :

- *Cupriavidus* peut dégrader l'urée sans faire de biomasse.
- En anaérobie, elle produit de l'acétate qu'elle reconsume en aérobie.
- L'ammonium exerce une rétro-inhibition sur l'uréase, empêchant la dégradation de la totalité de l'urée lors des cultures en Erlenmeyer.

Dans un second temps, *C. pinatubonensis* a été inoculé dans la colonne à lit fixe afin d'observer son comportement en cohabitation avec la coculture déjà installée. La triculture est efficace durant les différents Fed-batch réalisés : l'urée est totalement transformé en nitrate. La rétro-inhibition exercée par l'ammonium n'est pas constatée, puisqu'il n'y a pas d'accumulation de ce composé dans la colonne : celui-ci est directement consommé par *N. europaea*. En revanche, nous n'avons pas réussi à mettre en place un mode continu fonctionnel. La concentration en urée en sortie de réacteur augmente progressivement jusqu'à atteindre la concentration entrante. Le nitrate en sortie est lessivé progressivement. La première explication est que *C. pinatubonensis* ne se fixe pas au biofilm déjà présent. La biomasse inoculée avant les Fed-batch est alors progressivement lessivée. L'explication que nous donnons est que ceci est directement lié au métabolisme de *C. pinatubonensis*. La consommation de l'urée par cette bactérie est possible sans croissance bactérienne. La biomasse inoculée est donc active lors des Fed-batch car il n'y pas d'entrée et de soutirage liquide. En revanche, dès que la colonne est en mode continu, la biomasse active est progressivement lessivée puisque celle-ci est incapable de croître dans les conditions actuellement en place. Trois options s'offrent alors pour éviter ce lessivage :

- **Fonctionner exclusivement en mode Fed-batch.** Cependant dans le cadre de MELISSA, ce type de fonctionnement n'est pas envisageable. De plus, il faudrait mettre en place des inoculations régulières de *C. pinatubonensis* dans le réacteur pour remplacer la biomasse lessivée lors des Fed-batch : cette option ne peut être retenue.
- **Ajouter une source d'énergie pour assurer la croissance dans les conditions de fonctionnement du compartiment 3.** Sato *et al.* (2006) ont montré que *Cupriavidus*

pinatubonensis pouvait croître en utilisant l'oxygène et le CO₂ à condition d'utiliser le H₂ comme donneur d'électrons.

- **Ajouter une source de carbone organique pour assurer la croissance de *C. pinatubonensis* dans le réacteur.** Le milieu d'alimentation pourrait être supplémenté en acétate par exemple, puisque c'est un composé que *C. pinatubonensis* est capable d'assimiler.

Les différentes perspectives de recherche mises en évidence dans ce Chapitre V, donnent des pistes intéressantes pour transformer l'urée en nitrate, bien que des travaux soient encore nécessaires au sein de MELiSSA. Mais nous montrons qu'il est possible d'envisager la dégradation de l'urée en jouant sur les conditions de culture au niveau de ce compartiment. Ceci devrait constituer un progrès significatif dans l'intégration du compartiment C3 au sein de l'écosystème dans son ensemble.

Conclusions - Perspectives

Le projet MELiSSA consiste en un système de support de vie biorégénératif composé de cinq compartiments. Ce système a pour objectif d'assurer l'autonomie d'un équipage sur des bases spatiales établies sur des planètes éloignées. Ce travail de thèse porte sur l'étude du compartiment nitrifiant de MELiSSA. Il est au cœur de l'étude du cycle de l'azote dans ce type de système de support vie. Le survol bibliographique présenté dans le premier chapitre de ce mémoire a clairement indiqué que la maîtrise du cycle de l'azote implique des bioconversions, c'est-à-dire une ou plusieurs étapes de conversion réalisées par des organismes vivants. L'étude d'un compartiment nitrifiant est donc essentielle dans le développement de systèmes de support vie biorégénératifs (BLSS). Par contre, ceci nécessite de connaître, comprendre et maîtriser le fonctionnement de systèmes microbiens, c'est-à-dire de connaître et caractériser les microorganismes utilisés et d'établir des modèles de contrôle prédictifs tenant compte du ou des comportements métaboliques et de déterminer comment ces comportements sont couplés aux variables de commande et aux variables des procédés. Cette démarche s'applique d'ailleurs non seulement au compartiment nitrifiant mais également à l'ensemble des compartiments de la boucle de recyclage. La dernière partie concerne l'étude de la dégradation de l'urée qui est un élément essentiel à prendre dans le cycle de l'azote pour un système de support vie.

Après avoir mis en place et validé les matériels et les méthodes analytiques utilisés pour ce travail, nous avons mis en place une stratégie de compréhension et de modélisation relativement simple : d'une part, une caractérisation en cultures pures et en phase liquide de façon à déterminer les paramètres principaux des cinétiques et des rendements ; d'autre part, la caractérisation de la culture avec biomasse fixée, comme ceci est le cas dans le procédé final.

Le troisième chapitre reprend la totalité des résultats en culture libre. Ces cultures en phase liquide, réalisées en bioréacteur agité, ont été utilisées pour déterminer les paramètres cinétiques de chacune des deux souches : taux de croissance maximum μ_{\max} (*N. europaea* : 0.054 h^{-1} ; *N. winogradskyi* : 0.024 h^{-1}), taux de létalité b (*N. europaea* : 0.003 h^{-1} ; *N. winogradskyi* : 0.001 h^{-1}) et terme de maintenance m (*N. europaea* : $0.135 \text{ gN-NH}_4^+ \cdot \text{gX}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$; *N. winogradskyi* : $0.467 \text{ gN-NO}_2^- \cdot \text{gX}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$). Ces paramètres ont été introduits dans un modèle de Pirt avec un terme de maintenance pour composer le modèle de nitrification du compartiment : NitriSimR. Ce modèle a été calibré et validé dans différentes cocultures de *N. europaea* et *N. winogradskyi*. NitriSimR représente de façon très satisfaisante l'évolution des concentrations en biomasse en ammonium, en nitrite et en nitrate au cours de ces cultures à biomasse libre. Ces premières expériences ont ainsi permis de valider un modèle de nitrification prédictif pour les cocultures de *N. europaea* et *N. winogradskyi*. Cette modélisation permet de mettre en évidence un paramètre clé qui caractérise l'état de

Conclusions - Perspectives

nitrification de la culture. Ce paramètre est évalué en ligne à partir des variables mesurées sans procéder à des prélèvements. Il s'agit du ratio H^+/O_2 . Même si la mesure de ce « ratio » implique des contraintes techniques importantes (précision des sondes utilisées, influence forte du K_La sur le résultat), il est intéressant pour caractériser la culture. La valeur de ce paramètre est par ailleurs parfaitement modélisée par le modèle NitriSimR. Dans l'objectif d'une utilisation au sein du démonstrateur de MELiSSA, cet indicateur doit permettre une prédiction en ligne de l'état de nitrification et ainsi une adaptation rapide des conditions opératoires pour limiter l'accumulation de nitrite dans le réacteur.

Le quatrième chapitre de ce manuscrit, est consacré aux cultures de *N. europaea* et *N. winogradskyi* en lit fixe, c'est-à-dire à biomasse fixée, qui est le procédé utilisé dans la boucle MELiSSA. Tout d'abord, l'hydrodynamique de la colonne a été étudiée : distribution des temps de séjour T_R , et coefficient de transfert volumétrique de l'oxygène (K_La). Ces paramètres permettent de mettre au point un modèle N-bacs en série représentatif de l'hydrodynamique de la colonne à lit fixe. Le réacteur a ensuite été inoculé avec une coculture de *N. europaea* et *N. winogradskyi*. L'étape de colonisation en batch du lit fixe par la biomasse a été étudiée et suivie sur une quarantaine de jours. Le mode continu a été appliqué au réacteur avec des temps de séjour T_R variant de 50 à 2 h sur toute la durée de l'expérience (plus de 300 jours). Durant cette expérience, différentes charges entrantes en azote ont été appliquées. La charge maximale assimilable par la biomasse est de 1.7 gN/L.j en nitrification totale et jusqu'à 2.5 gN/L.j en nitrification partielle en fin d'expérience. Une partie de l'expérience s'est concentrée sur l'utilisation de l'urée comme unique source d'azote dans le réacteur afin de vérifier sa non-assimilation par *N. europaea* et *N. winogradskyi*. Comme ceci était attendu, les deux souches sont incapables d'assimiler cette source d'azote en autotrophie et l'urée n'a aucun effet sur leur métabolisme. Pour représenter la coculture de *N. europaea* et *N. winogradskyi* dans la colonne à lit fixe, le modèle biologique établi en culture libre a été associé au modèle hydrodynamique de N-bacs en série. Le modèle développé représente très correctement l'évolution des concentrations des différents composés azotés. Le paramètre H^+/O_2 , mis en évidence dans le Chapitre III, est aussi observé mais, comme cela était attendu, il est peu fiable en raison des limites techniques du matériel utilisé. Il faut souligner que le procédé qui a été étudié lors de ce travail de thèse a été maintenu en continu pendant plus de 300 jours ce qui est une performance qui place à un niveau élevé les améliorations à apporter. De nouvelles perspectives de travail s'ouvrent alors pour le futur du compartiment nitrifiant de MELiSSA.

Le dernier chapitre avait pour objectif d'étudier la possibilité de transformer la colonne de nitrification en un module traitant directement l'urée au lieu de l'ammonium. L'urée, qui est un composant des déchets produits par un équipage, est la principale forme de déchet azoté

dans la boucle MELiSSA et, son utilisation et sa transformation ne sont pas encore clairement définies dans MELiSSA. Ce dernier chapitre présente des résultats préliminaires quant à l'insertion de l'urine au niveau du compartiment C3. Pour cela, une souche dégradant l'urée a été sélectionnée et étudiée : *Cupriavidus pinatubonensis*. Sachant, d'après les résultats précédents, que la coculture utilisée, *N. europaea* - *N. winogradskyi*, n'était pas capable d'assimiler l'urée, des cultures de la souche de *Cupriavidus pinatubonensis* ont été menées afin de déterminer son taux de croissance maximum, μ_{max} , et d'étudier la dégradation de l'urée en culture libre dans deux types de milieu. Ensuite, cette troisième bactérie a été inoculée dans la colonne à lit fixe où *N. europaea* et *N. winogradskyi* étaient présentes, afin de créer une triculture capable de transformer l'urée en nitrate. Les résultats préliminaires montrent que les trois souches sont capables de cohabiter et la transformation urée – nitrate est efficace. En revanche, il a été constaté que *C. pinatubonensis* ne produisait pas de biomasse lorsqu'elle est cultivée dans le milieu minéral et qu'elle ne se fixait pas dans le biofilm de la colonne à lit fixe. En d'autres termes, *C. pinatubonensis* ne présente pas de croissance autotrophique dans les conditions actuelles de fonctionnement car il lui manque un donneur d'électrons. Ces premières observations montrent néanmoins que *C. pinatubonensis* est utilisable pour réaliser une « triculture nitrifiante » mais que des modifications sont à prévoir, notamment sur la composition de l'effluent arrivant au niveau du compartiment nitrifiant et sur le protocole d'inoculation de cette souche dans la colonne à lit fixe. Sa capacité à dégrader l'acétate peut en faire un candidat d'autant plus intéressant pour son incorporation dans MELiSSA, puisque c'est un composé à éliminer en sortie du premier compartiment de la boucle. En revanche, l'introduction d'une nouvelle souche dans MELiSSA, implique une étude et une caractérisation cinétique pour développer un modèle de croissance de cette bactérie. Un réajustement du logiciel de simulation NitriSim devra alors être envisagé pour traduire le métabolisme de cette troisième souche au sein du compartiment nitrifiant.

À court terme, une perspective de ce travail de thèse est l'intégration de NitriSim comme outil prédictif pour le contrôle du compartiment nitrifiant de la boucle MELiSSA. Sur le long terme, l'utilisation d'une triculture pour le traitement direct de l'urée est possible si l'effluent d'entrée est modifié et contient une source de carbone hétérotrophe. Il est également possible aussi d'envisager un procédé alternatif à la colonne en lit fixe : une triculture en biomasse libre dans un réacteur à membrane externe. En revanche, ce système devra être adapté sur le long terme pour éviter (ou contrôler) le colmatage de la membrane par le biofilm de la coculture.

De façon plus générale, la mise au point d'un « module », comme la colonne à lit fixe qui a été étudiée ici pour le traitement de l'urine peut aussi trouver ses applications au niveau

Conclusions - Perspectives

terrestre. On peut envisager l'installation de ce type de module dans des habitats permanents ou temporaires se rapprochant d'un fonctionnement autonome en limitant en particulier la quantité d'eau qu'ils utilisent pour le traitement des déchets liquides. Il est possible d'imaginer une boucle de traitement des « eaux jaunes » avant la réutilisation des effluents, au minimum à des fins d'irrigation. Ce système pourrait utiliser un stock d'eau de pluie pour alimenter les sanitaires et permettrait un fonctionnement en boucle fermée. L'installation pourrait être couplée à des cultures de plantes supérieures et proposerait un système similaire à l'aquaponie. L'utilisation à bord de bateaux peut aussi être envisagée pour limiter le rejet des eaux usées dans l'environnement et recycler les « eaux grises ». Ce système en couplage à la production de végétaux pourrait permettre un complément alimentaire lors d'explorations scientifiques dans des environnements glaciaires.

Que l'application soit terrestre ou spatiale, ces procédés requièrent la maîtrise des conditions opératoires et la compréhension des systèmes. L'essentiel de la méthodologie développée dans ce travail a suivi un schéma de type « *comprehensive understanding* » visant au développement d'un modèle complet et prédictif pour la nitrification en réacteur à lit fixe à partir de résultats expérimentaux dont on a recherché la cohérence. L'application de ces résultats pour le compartiment nitrifiant de la boucle MELiSSA permettra d'adapter sa réponse et de vérifier sa justesse sur une échelle plus importante et une durée plus importante, notamment à l'échelle pilote.

Références bibliographiques

- Akse, J.R., Williams, T.W., Hadley, N.M., Dahl, R.W., 2011. Nonhazardous urine pretreatment method for future exploration systems.
- Allison, D.G., Ruiz, B., SanJose, C., Jaspe, A., Gilbert, P., 1998. Extracellular products as mediators of the formation and detachment of *Pseudomonas fluorescens* biofilms. *FEMS Microbiol. Lett.* 167, 179–184. doi:10.1111/j.1574-6968.1998.tb13225.x
- Anthonisen, A.C., Loehr, R.C., Prakasam, T.B.S., Srinath, E.G., 1976. Inhibition of nitrification by ammonia and nitrous acid. *J. Water Pollut. Control Fed.* 835–852.
- Aragao, G., 1996. Production de poly-bêta-hydroxyalcanoates par *Alcaligenes eutrophus*: caractérisation cinétique et contribution à l'optimisation de la mise en œuvre des cultures (Text). Institut National des sciences appliquées de Toulouse, Toulouse.
- Beeftink, H.H., Heijden, R.T.J.M. van der, Heijnen, J.J., 1990. Maintenance requirements: energy supply from simultaneous endogenous respiration and substrate consumption. *FEMS Microbiol. Ecol.* 6, 203–209. doi:10.1111/j.1574-6968.1990.tb03942.x
- Belser, L. w., Schmidt, E., 1980. Growth and Oxidation Kinetics of Three Genera of Ammonia Oxidizing Nitrifiers. *FEMS Microbiol. Lett.* 7, 213–216. doi:10.1111/j.1574-6941.1980.tb01628.x
- Bernhard, A., 2012. The nitrogen cycle: Processes, players, and human impact. *Nat. Educ. Knowl.* 3, 25.
- Bernhard, A.M., Peitz, D., Elsener, M., Wokaun, A., Kröcher, O., 2012. Hydrolysis and thermolysis of urea and its decomposition byproducts biuret, cyanuric acid and melamine over anatase TiO₂. *Appl. Catal. B Environ.* 115–116, 129–137. doi:10.1016/j.apcatb.2011.12.013
- Bertrand, J.-C., Caumette, P., Lebaron, P., Matheron, R., Normand, P., Sime-Ngando, T., 2015. *Environmental Microbiology: Fundamentals and Applications: Microbial Ecology*. Springer.
- Blackburne, R., Vadivelu, V.M., Yuan, Z., Keller, J., 2007. Kinetic characterisation of an enriched *Nitrospira* culture with comparison to *Nitrobacter*. *Water Res.* 41, 3033–3042. doi:10.1016/j.watres.2007.01.043
- Blackburne, R., Yuan, Z., Keller, J., 2008. Partial nitrification to nitrite using low dissolved oxygen concentration as the main selection factor. *Biodegradation* 19, 303–312. doi:10.1007/s10532-007-9136-4
- Bock, E., Koops, H.-P., Harms, H., 1986. Cell biology of nitrifying bacteria., in: *Nitrification*. Prosser J.I., Oxford, pp. 17–38.
- Bock, E., Wagner, M., 2006. Oxidation of Inorganic Nitrogen Compounds as an Energy Source, in: Dr, M.D.P., Falkow, S., Rosenberg, E., Schleifer, K.-H., Stackebrandt, E. (Eds.), *The Prokaryotes*. Springer New York, pp. 457–495.
- Boyd, C.E., 2015. *Water Quality: An Introduction*. Springer.
- Brémond, R., Vuichard, R., 1973. Paramètres de la qualité des eaux. Ministère de la protection de la nature et de l'environnement, Secrétariat permanent pour l'étude des problèmes de l'eau.
- Brenner, D.J., Krieg, N.R., Staley, J.T. (Eds.), 2005. Differentiation of the species of the genus *Nitrosomonas*, in: *Bergey's Manual® of Systematic Bacteriology*. Springer US, Boston, MA.
- Brion, N., Billen, G., 1998. Une réévaluation de la methode d'incorporation de H14C03- pour mesurer la nitrification autotrophe et son application pour estimer des biomasses de bactéries nitrifiantes. *Rev. Sci. Eau* 11, 283–302.
- Brock Thomas D., Madigan Michael T., John M. Martinko, 2005. *Brock's Biology of Microorganisms*, 11th ed. Benjamin-Cummings Publishing Company.
- Brooks, T., Keevil, C. w., 1997. A simple artificial urine for the growth of urinary pathogens. *Lett. Appl. Microbiol.* 24, 203–206. doi:10.1046/j.1472-765X.1997.00378.x
- Cabello, P., Roldán, M.D., Moreno-Vivián, C., 2004. Nitrate reduction and the nitrogen cycle in archaea. *Microbiol. Read. Engl.* 150, 3527–3546. doi:10.1099/mic.0.27303-0
- Calloway, D.H., Pace, N., 1972. Life support requirements of astronauts. Part I. Basic data. *Env. Biol Med* 1, 65–202.

- C. P. Leslie Grady Jr, Daigger, G.T., Love, N.G., Filipe, C.D.M., 2011. *Biological Wastewater Treatment*, Third Edition. CRC Press.
- Capodaglio, A.G., Hlavínek, P., Raboni, M., Capodaglio, A.G., Hlavínek, P., Raboni, M., 2015. Physico-chemical technologies for nitrogen removal from wastewaters: a review. *Rev. Ambiente Amp Água* 10, 481–498. doi:10.4136/ambi-agua.1618
- Carter, L., Pruitt, J., Brown, C.A., Schaezler, R., Bankers, L., 2015. Status of ISS Water management and recovery. Presented at the 45th International Conference on Environmental Systems, Bellevue Washington USA.
- Cébron A., 2004. Nitrification, bactéries nitrifiantes et émissions de N₂O: la seine en aval de Paris (Thèse de doctorat).
- Chain, P., Lamerdin, J., Larimer, F., Regala, W., Lao, V., Land, M., Hauser, L., Hooper, A., Klotz, M., Norton, J., Sayavedra-Soto, L., Arciero, D., Hommes, N., Whittaker, M., Arp, D., 2003. Complete Genome Sequence of the Ammonia-Oxidizing Bacterium and Obligate Chemolithoautotroph *Nitrosomonas europaea*. *J. Bacteriol.* 185, 2759–2773. doi:10.1128/JB.185.9.2759-2773.2003
- Chandran, K., Love, N.G., 2008. Physiological State, Growth Mode, and Oxidative Stress Play a Role in Cd(II)-Mediated Inhibition of *Nitrosomonas europaea* 19718. *Appl. Environ. Microbiol.* 74, 2447–2453. doi:10.1128/AEM.01940-07
- Chang, Y., Wu, Z., Bian, L., Feng, D., Leung, D.Y.C., 2013. Cultivation of *Spirulina platensis* for biomass production and nutrient removal from synthetic human urine. *Appl. Energy*, Special Issue on Advances in sustainable biofuel production and use - XIX International Symposium on Alcohol Fuels - ISAF 102, 427–431. doi:10.1016/j.apenergy.2012.07.024
- Ciba-Geigy, A.G., 1977. *Wissenschaftliche Tabellen Geigy*. Ciba-Geigy Limited.
- Costa, E., Pérez, J., Kreft, J.-U., 2006. Why is metabolic labour divided in nitrification? *Trends Microbiol.* 14, 213–219. doi:10.1016/j.tim.2006.03.006
- Cruvellier, N., Poughon, L., Creuly, C., Dussap, C.-G., Lasseur, C., 2016. Growth modelling of *Nitrosomonas europaea* ATCC® 19718 and *Nitrobacter winogradskyi* ATCC® 25391: A new online indicator of the partial nitrification. *Bioresour. Technol.* 220, 369–377. doi:10.1016/j.biortech.2016.08.090
- Davey, M.E., O’toole, G.A., 2000. Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* MMBR 64, 847–867.
- Davies, D.G., Parsek, M.R., Pearson, J.P., Iglewski, B.H., Costerton, J.W., Greenberg, E.P., 1998. The involvement of cell-to-cell signals in the development of a bacterial biofilm. *Science* 280, 295–298.
- Davies, J., 1994. Inactivation of antibiotics and the dissemination of resistance genes. *Science* 264, 375–382.
- de Gooijer, C.D., Wijffels, R.H., Tramper, J., 1991. Growth and substrate consumption of *Nitrobacter agilis* cells immobilized in carrageenan: Part 1. Dynamic modeling. *Biotechnol. Bioeng.* 38, 224–231. doi:10.1002/bit.260380303
- de la Torre, J.R., Walker, C.B., Ingalls, A.E., Könneke, M., Stahl, D.A., 2008. Cultivation of a thermophilic ammonia oxidizing archaeon synthesizing crenarchaeol. *Environ. Microbiol.* 10, 810–818. doi:10.1111/j.1462-2920.2007.01506.x
- Deronzier, G., Schérite, S., Racault, Y., Canler, J.-P., Liénard, A., Héduit, A., Duchène, P., 2001. Traitement de l’azote dans les stations d’épuration biologique des petites collectivités. *Collect. Doc. Tech.*
- Diamant, B.L., Humphries, W.R., 1990. Past and present environmental control and life support systems on manned spacecraft.
- Drozd, J.W., 1980. Respiration in ammonia-oxidizing chemoautotrophic bacteria, in: *The Diversity of Bacterial Respiratory Systems*. CRC Press, pp. 87–111.
- Dua, R.D., Bhandari, B., Nicholas, D.J.D., 1979. Stable isotope studies on the oxidation of ammonia to hydroxylamine by *Nitrosomonas europaea*. *FEBS Lett.* 106, 401–404. doi:10.1016/0014-5793(79)80541-4
- Eckart, P., 1996. *Spaceflight Life Support and Biospherics*, 1 edition. ed. Springer, Torrance, Calif. : Dordrecht ; Boston.

- Ek, M., Bergström, R., Bjurhem, J.-E., Björlenius, B., Hellström, D., 2006. Concentration of nutrients from urine and reject water from anaerobically digested sludge. *Water Sci. Technol.* 54, 437–444. doi:10.2166/wst.2006.924
- Flemming, H.-C., 1993. Biofilms and Environmental Protection. *Water Sci. Technol.* 27, 1–10.
- Friedebold, J., Bowien, B., 1993. Physiological and biochemical characterization of the soluble formate dehydrogenase, a molybdoenzyme from *Alcaligenes eutrophus*. *J. Bacteriol.* 175, 4719–4728.
- Friedrich, C.G., Bowien, B., Friedrich, B., 1979. Formate and oxalate metabolism in *Alcaligenes eutrophus*. *Microbiology* 115, 185–192.
- Garrido, J.M., van Benthum, W. a. J., van Loosdrecht, M.C.M., Heijnen, J.J., 1997. Influence of dissolved oxygen concentration on nitrite accumulation in a biofilm airlift suspension reactor. *Biotechnol. Bioeng.* 53, 168–178. doi:10.1002/(SICI)1097-0290(19970120)53:2<168::AID-BIT6>3.0.CO;2-M
- Gaudin, P., 1998. Contribution à la synthèse de poly-béta-hydroxybutyrate (PHB) à la croissance de *Ralstonia eutropha*. [s.n.], S.I.
- Gay, G., Corman, A., 1984. Comparative study of the growth of two strains of *Nitrobacter* in batch and continuous culture. *Microb. Ecol.* 10, 99–105. doi:10.1007/BF02011417
- Gilbert, P., Das, J., Foley, I., 1997. Biofilm susceptibility to antimicrobials. *Adv. Dent. Res.* 11, 160–167.
- Gould, G.W., Lees, H., 1960. The Isolation and Culture of the Nitrifying Organisms: Part I. *Nitrobacter*. *Can. J. Microbiol.* 6, 299–307. doi:10.1139/m60-034
- Grøndahl, F., Sidenmark, J., Thomsen, A., 2009. Survey of waste water disposal practices at Antarctic research stations. *Polar Res.* 28, 298–306. doi:10.1111/j.1751-8369.2008.00056.x
- Grousseau, E., 2012. Potentialités de production de Poly-Hydroxy-Alcanoates chez *Cupriavidus necator* sur substrats de type acides gras volatils : études cinétiques et métaboliques. Université de Toulouse.
- Grunditz C., Dalhammar G., 2001. Development of nitrification inhibition assays using pure cultures of *Nitrosomonas* and *Nitrobacter*. *Water Res.* 35, 433–440. doi:10.1016/S0043-1354(00)00312-2
- Grunwald, S., Mottet, A., Grousseau, E., Plassmeier, J.K., Popović, M.K., Uribe Larrea, J.-L., Gorret, N., Guillouet, S.E., Sinskey, A., 2015. Kinetic and stoichiometric characterization of organoautotrophic growth of *Ralstonia eutropha* on formic acid in fed-batch and continuous cultures. *Microb. Biotechnol.* 8, 155–163. doi:10.1111/1751-7915.12149
- Guerrero, M.A., Jones, R.D., 1997. Photoinhibition of marine nitrifying bacteria. I. Wavelength-dependent response. *Oceanogr. Lit. Rev.* 4, 380.
- Hauduc, H., Gillot, S., Rieger, L., Ohtsuki, T., Shaw, A., Takács, I., Winkler, S., 2009. Activated sludge modelling in practice: an international survey. *Water Sci. Technol. J. Int. Assoc. Water Pollut. Res.* 60, 1943–1951. doi:10.2166/wst.2009.223
- Helder, W., De Vries, R.T.P., 1983. Estuarine nitrite maxima and nitrifying bacteria (Ems-Dollard estuary). *Neth. J. Sea Res.* 17, 1–18. doi:10.1016/0077-7579(83)90002-9
- Henze, M. (Ed.), 2007. Activated sludge models ASM1, ASM2, ASM2d and ASM3, Reprinted. ed, Scientific and technical report / IWA. IWA Publ, London.
- Hooper, A.B., 1984. Ammonia oxidation and energy transduction in the nitrifying bacteria, in: *Microbial Chemoautotrophy*. Ohio State University Press, Columbus, pp. 133–167.
- Hooper, A.B., Terry, K.R., 1974. Photoinactivation of Ammonia Oxidation in *Nitrosomonas*. *J. Bacteriol.* 119, 899–906.
- Hu, Z., Chandran, K., Grasso, D., Smets, B.F., 2004. Comparison of nitrification inhibition by metals in batch and continuous flow reactors. *Water Res.* 38, 3949–3959. doi:10.1016/j.watres.2004.06.025
- Hunik, J.H., Bos, C.G., van den Hoogen, M.P., De Gooijer, C.D., Tramper, J., 1994. Co-immobilized *Nitrosomonas europaea* and *Nitrobacter agilis* cells: validation of a

- dynamic model for simultaneous substrate conversion and growth in κ -carrageenan gel beads. *Biotechnol. Bioeng.* 43, 1153–1163.
- Hunik, J.H., Meijer, H.J.G., Tramper, J., 1993. Kinetics of *Nitrobacter agilis* at extreme substrate, product and salt concentrations. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 40, 442–448. doi:10.1007/BF00170408
- Hunik, J.H., Meijer, H.J.G., Tramper, J., 1992. Kinetics of *Nitrosomonas europaea* at extreme substrate, product and salt concentrations. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 37, 802–807. doi:10.1007/BF00174849
- Huygens, D., Rütting, T., Boeckx, P., Van Cleemput, O., Godoy, R., Müller, C., 2007. Soil nitrogen conservation mechanisms in a pristine south Chilean *Nothofagus* forest ecosystem. *Soil Biol. Biochem.* 39, 2448–2458. doi:10.1016/j.soilbio.2007.04.013
- HYDRATEC, 2010. PHASES 2 ET 3: PROPOSITION DE SCENARIOS « STATION D'EPURATION » (No. R – N° 25 415 / GLI – B).
- Jefferson, K.K., 2004. What drives bacteria to produce a biofilm? *FEMS Microbiol. Lett.* 236, 163–173. doi:10.1111/j.1574-6968.2004.tb09643.x
- Jetten, M.S.M., Niftrik, L. van, Strous, M., Kartal, B., Keltjens, J.T., Camp, H.J.M.O. den, 2009. Biochemistry and molecular biology of anammox bacteria. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 44, 65–84. doi:10.1080/10409230902722783
- Jones, K.M., Kobayashi, H., Davies, B.W., Taga, M.E., Walker, G.C., 2007. How rhizobial symbionts invade plants: the *Sinorhizobium*–*Medicago* model. *Nat. Rev. Microbiol.* 5, 619–633. doi:10.1038/nrmicro1705
- Jorgensen, T.C., Weatherley, L.R., 2003. Ammonia removal from wastewater by ion exchange in the presence of organic contaminants. *Water Res.* 37, 1723–1728. doi:10.1016/S0043-1354(02)00571-7
- Kartal, B., Maalcke, W.J., de Almeida, N.M., Cirpus, I., Gloerich, J., Geerts, W., Op den Camp, H.J.M., Harhangi, H.R., Janssen-Megens, E.M., Francoijs, K.-J., Stunnenberg, H.G., Keltjens, J.T., Jetten, M.S.M., Strous, M., 2011. Molecular mechanism of anaerobic ammonium oxidation. *Nature* 479, 127–130. doi:10.1038/nature10453
- Keen, G.A., Prosser, J.I., 1987. Steady state and transient growth of autotrophic nitrifying bacteria. *Arch. Microbiol.* 147, 73–79. doi:10.1007/BF00492908
- Keeney, D.R., Nelson, D.W., 1982. Nitrogen—Inorganic Forms, in: *Methods of Soil Analysis. Part 2. Chemical and Microbiological Properties, Agronomy Monograph.* American Society of Agronomy, Soil Science Society of America, Madison, WI, pp. 643–698.
- Kim, J.H., Kim, B.G., Choi, C.Y., 1992. Effect of propionic acid on poly (β -hydroxybutyric-co- β -hydroxyvaleric) acid production by *Alcaligenes eutrophus*. *Biotechnol. Lett.* 14, 903–906.
- Kleiner, D., 1985. Bacterial ammonium transport. *FEMS Microbiol. Rev.* 1, 87–100. doi:10.1111/j.1574-6968.1985.tb01185.x
- Knorst, M.T., Neubert, R., Wohlrab, W., 1997. Analytical methods for measuring urea in pharmaceutical formulations. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 15, 1627–1632. doi:10.1016/S0731-7085(96)01978-4
- Könneke, M., Bernhard, A.E., de la Torre, J.R., Walker, C.B., Waterbury, J.B., Stahl, D.A., 2005. Isolation of an autotrophic ammonia-oxidizing marine archaeon. *Nature* 437, 543–546. doi:10.1038/nature03911
- Koops, H.-P., Pommerening-Röser, A., 2005. The Lithoautotrophic Ammonia-Oxidizing Bacteria, in: *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria.* Springer, pp. 141–147.
- Kuenen, J.G., 2008. Anammox bacteria: from discovery to application. *Nat. Rev. Microbiol.* 6, 320–326. doi:10.1038/nrmicro1857
- Kurmazenko, E., Morukov, B., Demin, E., Kamaletdinova, G., Khabarovskiy, N., 2012. Life Support System Virtual Simulators for Mars-500 Ground-Based Experiment. INTECH Open Access Publisher.
- Laudelout, H., Lambert, R., Pham, M.L., 1976. Influence du pH et de la pression partielle d'oxygene sur la nitrification. *Ann Microbiol Inst Pasteur* 127, 367–382.

- Ledger, T., Zúñiga, A., Kraiser, T., Dasencich, P., Donoso, R., Pérez-Pantoja, D., González, B., 2011. Aromatic compounds degradation plays a role in colonization of *Arabidopsis thaliana* and *Acacia caven* by *Cupriavidus pinatubonensis* JMP134. *Antonie Van Leeuwenhoek* 101, 713–723. doi:10.1007/s10482-011-9685-8
- Lee, S., Maken, S., Jang, J.-H., Park, K., Park, J.-W., 2006. Development of physicochemical nitrogen removal process for high strength industrial wastewater. *Water Res.* 40, 975–980. doi:10.1016/j.watres.2006.01.018
- Leenen, E.J.T.M., Boogert, A.A., van Lammeren, A.A.M., Tramper, J., Wijffels, R.H., 1997. Dynamics of artificially immobilized *Nitrosomonas europaea*: Effect of biomass decay. *Biotechnol. Bioeng.* 55, 630–641. doi:10.1002/(SICI)1097-0290(19970820)55:4<630::AID-BIT5>3.0.CO;2-I
- Li, J., Bishop, P.L., 2004. Time course observations of nitrifying biofilm development using microelectrodes. *J. Environ. Eng. Sci.* 3, 523–528. doi:10.1139/s04-027
- Lytle, D.A., White, C., Williams, D., Koch, L., Nauman, E., 2013. Innovative Biological Water Treatment for the Removal of Elevated Ammonia. *J. - Am. Water Works Assoc.* E524–E539. doi:10.5942/jawwa.2013.105.0109
- Ma, S., Zhang, D., Zhang, W., Wang, Y., 2014. Ammonia stimulates growth and nitrite-oxidizing activity of *Nitrobacter winogradskyi*. *Biotechnol. Biotechnol. Equip.* 28, 27–32. doi:10.1080/13102818.2014.901679
- Madigan, M.T., Martinko, J.M., Stahl, D., Clark, D.P., 2010. *Brock Biology of Microorganisms*, 13 edition. ed. Benjamin Cummings, San Francisco.
- Madoni, P., Davoli, D., Guglielmi, L., 1999. Response of sOUR and AUR to heavy metal contamination in activated sludge. *Water Res.* 33, 2459–2464. doi:10.1016/S0043-1354(98)00455-2
- Mayer, J., Huhn, T., Habeck, M., Denger, K., Hollemeyer, K., Cook, A.M., 2010. 2,3-Dihydroxypropane-1-sulfonate degraded by *Cupriavidus pinatubonensis* JMP134: purification of dihydroxypropanesulfonate 3-dehydrogenase. *Microbiology* 156, 1556–1564. doi:10.1099/mic.0.037580-0
- Mekarnia, D., Frenot, Y., 2012. The French-Italian Concordia Station. *Proc. Int. Astron. Union* 8, 178–185. doi:10.1017/S1743921312016845
- Mével, G., Prieur, D., 2000. Heterotrophic nitrification by a thermophilic *Bacillus* species as influenced by different culture conditions. *Can. J. Microbiol.* 46, 465–473.
- Montràs, A., 2009. Mathematical modelling and molecular analysis of a nitrifying packed bed biofilm reactor. *Universitat Autònoma de Barcelona* ,
- Montras, A., Pycke, B., Boon, N., Godia, F., Mergeay, M., Hendrickx, L., Perez, J., 2008. Distribution of *Nitrosomonas europaea* and *Nitrobacter winogradskyi* in an autotrophic nitrifying biofilm reactor as depicted by molecular analyses and mathematical modelling. *WATER Res.* 42, 1700–1714.
- Moyano, R., Peiro, E., 2015. MELISSA Pilot Plant: General Description of the facilities (Technical Notes No. TN-08-0001).
- Nelson, M., Pechurkin, N.S., Allen, J.P., Somova, L.A., Gitelson, J.I., 2010. Closed Ecological Systems, Space Life Support and Biospherics, in: Wang, L.K., Ivanov, V., Tay, J.-H. (Eds.), *Environmental Biotechnology, Handbook of Environmental Engineering*. Humana Press, pp. 517–565.
- Niftrik, L.A. van, Fuerst, J.A., Damsté, J.S.S., Kuenen, J.G., Jetten, M.S.M., Strous, M., 2004. The anammoxosome: an intracytoplasmic compartment in anammox bacteria. *FEMS Microbiol. Lett.* 233, 7–13. doi:10.1016/j.femsle.2004.01.044
- Niftrik, L. van, Jetten, M.S.M., 2012. Anaerobic Ammonium-Oxidizing Bacteria: Unique Microorganisms with Exceptional Properties. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 76, 585–596. doi:10.1128/MMBR.05025-11
- Note Technique TN2, n.d. Centre de Recherche de MAISONS-LAFFITTE (No. 310882).
- Okabe, S., Satoh, H., Watanabe, Y., 1999. In Situ Analysis of Nitrifying Biofilms as Determined by In Situ Hybridization and the Use of Microelectrodes. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 3182–3191.

- Olson, R.J., 1981. Differential photoinhibition of marine nitrifying bacteria: a possible mechanism for the formation of the primary nitrite maximum. *J Mar Res* 39, 227–238.
- O'Toole, G., Kaplan, H.B., Kolter, R., 2000. Biofilm Formation as Microbial Development. *Annu. Rev. Microbiol.* 54, 49–79. doi:10.1146/annurev.micro.54.1.49
- Patton, C.J., Crouch, S.R., 1977. Spectrophotometric and kinetics investigation of the Berthelot reaction for the determination of ammonia. *Anal. Chem.* 49, 464–469. doi:10.1021/ac50011a034
- Paul, E., Carrere, H., Lafforgue, C., 2003. Combinaisons de traitements physico-chimiques et biologiques pour une production de boues réduite. *Revue bibliographique. Déchets Sci. Tech.* doi:10.4267/dechets-sciences-techniques.2218
- Pepper, I.L., Gerba, C.P., Gentry, T.J., 2014. *Environmental Microbiology*. Elsevier.
- Pérez, J., Buchanan, A., Mellbye, B., Ferrell, R., Chang, J.H., Chaplen, F., Bottomley, P.J., Arp, D.J., Sayavedra-Soto, L.A., 2015. Interactions of *Nitrosomonas europaea* and *Nitrobacter winogradskyi* grown in co-culture. *Arch. Microbiol.* 197, 79–89. doi:10.1007/s00203-014-1056-1
- Pérez, J., Costa, E., Kreft, J.-U., 2009. Conditions for partial nitrification in biofilm reactors and a kinetic explanation. *Biotechnol. Bioeng.* 103, 282–295. doi:10.1002/bit.22249
- Pérez, J., Montesinos, J.L., Godia, F., 1999. Test with bench scale packed-bed reactors (No. Technical Note 43.410).
- Pérez, J., Poughon, L., Dussap, C.-G., Montesinos, J.L., Godia, F., 2005. Dynamics and steady state operation of a nitrifying fixed bed biofilm reactor: mathematical model based description. *Process Biochem.* 40, 2359–2369. doi:10.1016/j.procbio.2004.09.022
- Pérez-Pantoja, D., Iglesia, R.D. la, Pieper, D.H., González, B., 2008. Metabolic reconstruction of aromatic compounds degradation from the genome of the amazing pollutant-degrading bacterium *Cupriavidus necator* JMP134. *FEMS Microbiol. Rev.* 32, 736–794. doi:10.1111/j.1574-6976.2008.00122.x
- Platero, R., James, E.K., Rios, C., Iriarte, A., Sandes, L., Zabaleta, M., Battistoni, F., Fabiano, E., 2016. Novel *Cupriavidus* strains isolated from root nodules of native Uruguayan *Mimosa* species. *Appl. Environ. Microbiol.* AEM.04142-15. doi:10.1128/AEM.04142-15
- Poughon, L., 1999. NitriSim Validation (No. Technical Note 39.2).
- Poughon, L., 1998. L'écosystème artificiel MELiSSA : modélisation et simulation de la boucle en régime permanent et modèle dynamique du compartiment de nitrification = The artificial ecosystem MELiSSA : modelling and simulation of the loop in steady-state and dynamic model of the nitrifying compartment [WWW Document]. URL <http://cat.inist.fr/?aModele=afficheN&cpsid=192316> (accessed 9.7.16).
- Poughon, L., Duchez, D., Cornet, J.F., Dussap, C.G., 2003. kLa determination: comparative study for a gas mass balance method. *Bioprocess Biosyst. Eng.* 25, 341–348. doi:10.1007/s00449-003-0321-5
- Poughon, L., Duchez, D., Cornet, J.F., Dussap, C.G., 2002. Residence Time Distribution analysis of fixed bed columns (No. Technical Note 63.1).
- Poughon, L., Dussap, C.-G., Gros, J.-B., 2001. Energy model and metabolic flux analysis for autotrophic nitrifiers. *Biotechnol. Bioeng.* 72, 416–433.
- Poughon, L., Dussap, C.G., Gros, J.B., 1999. Dynamic model of a nitrifying fixed bed column: Simulation of the biomass distribution of *Nitrosomonas* and *Nitrobacter* and of transient behaviour of the column. *Bioprocess Eng.* 20, 209–221. doi:10.1007/PL00009045
- Prosser, J.I., 2005. NITROGEN IN SOILS | Nitrification A2 - Hillel, Daniel, in: *Encyclopedia of Soils in the Environment*. Elsevier, Oxford, pp. 31–39.
- Prosser, J.I., 1989. Autotrophic Nitrification, in: *Advances in Microbial Physiology* APL. Academic Press.
- Putnam, D.F., 1971. Composition and concentrative properties of human urine.

- Radniecki, T.S., Semprini, L., Dolan, M.E., 2009. Expression of *merA*, *amoA* and *hao* in continuously cultured *Nitrosomonas europaea* cells exposed to zinc chloride additions. *Biotechnol. Bioeng.* 102, 546–553. doi:10.1002/bit.22069
- Rene, E.R., Kim, S.J., Park, H.S., 2008. Effect of COD/N ratio and salinity on the performance of sequencing batch reactors. *Bioresour. Technol.* 99, 839–846. doi:10.1016/j.biortech.2007.01.037
- Sato, Y., Nishihara, H., Yoshida, M., Watanabe, M., Rondal, J.D., Concepcion, R.N., Ohta, H., 2006. *Cupriavidus pinatubonensis* sp. nov. and *Cupriavidus laharis* sp. nov., novel hydrogen-oxidizing, facultatively chemolithotrophic bacteria isolated from volcanic mudflow deposits from Mt. Pinatubo in the Philippines. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 56, 973–978. doi:10.1099/ijs.0.63922-0
- Schmidt, I., Look, C., Bock, E., Jetten, M.S.M., 2004. Ammonium and hydroxylamine uptake and accumulation in *Nitrosomonas*. *Microbiol. Read. Engl.* 150, 1405–1412. doi:10.1099/mic.0.26719-0
- Schramm, A., Larsen, L.H., Revsbech, N.P., Ramsing, N.B., Amann, R., Schleifer, K.H., 1996. Structure and function of a nitrifying biofilm as determined by in situ hybridization and the use of microelectrodes. *Appl. Environ. Microbiol.* 62, 4641–4647.
- Sgouridis, F., Heppell, C.M., Wharton, G., Lansdown, K., Trimmer, M., 2011. Denitrification and dissimilatory nitrate reduction to ammonium (DNRA) in a temperate re-connected floodplain. *Water Res.* 45, 4909–4922. doi:10.1016/j.watres.2011.06.037
- Simon, J., 2002. Enzymology and bioenergetics of respiratory nitrite ammonification. *FEMS Microbiol. Rev.* 26, 285–309. doi:10.1111/j.1574-6976.2002.tb00616.x
- Sin, G., Kaelin, D., Kampschreur, M.J., Takács, I., Wett, B., Germaey, K.V., Rieger, L., Siegrist, H., van Loosdrecht, M.C.M., 2008. Modelling nitrite in wastewater treatment systems: a discussion of different modelling concepts. *Water Sci. Technol.* 58, 1155. doi:10.2166/wst.2008.485
- Skinner, F.A., Walker, N., 1961. Growth of *Nitrosomonas europaea* in batch and continuous culture. *Arch. Für Mikrobiol.* 38, 339–349. doi:10.1007/BF00408008
- Sparacino-Watkins, C., Stolz, J.F., Basu, P., 2013. Nitrate and periplasmic nitrate reductases. *Chem. Soc. Rev.* 43, 676–706. doi:10.1039/C3CS60249D
- Sperling, M.V., 2007. *Wastewater Characteristics, Treatment and Disposal: Biological Wastewater Treatment Series Volume 1*. IWA Publishing, London; New York; Belo Horizonte, Brazil?
- Spieck, E., Bock, E., 2005. The lithoautotrophic Nitrite-Oxidizing Bacteria, in: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Springer, pp. 149–153.
- Spieck, E., Müller, S., Engel, A., Mandelkow, E., Patel, H., Bock, E., 1996. Two-dimensional structure of membrane-bound nitrite oxidoreductase from *Nitrobacter hamburgensis*. *J. Struct. Biol.* 117, 117–123.
- Starkenbourg, S.R., Chain, P.S.G., Sayavedra-Soto, L.A., Hauser, L., Land, M.L., Larimer, F.W., Malfatti, S.A., Klotz, M.G., Bottomley, P.J., Arp, D.J., Hickey, W.J., 2006. Genome Sequence of the Chemolithoautotrophic Nitrite-Oxidizing Bacterium *Nitrobacter winogradskyi* Nb-255. *Appl. Environ. Microbiol.* 72, 2050–2063. doi:10.1128/AEM.72.3.2050-2063.2006
- Stein, L.Y., 2011. Heterotrophic Nitrification and Nitrifier Denitrification, in: Klotz, M.G., Ward, B.B., Arp, D.J. (Eds.), *Nitrification*. American Society of Microbiology, pp. 95–114.
- Stein, L.Y., Arp, D.J., 1998. Loss of Ammonia Monooxygenase Activity in *Nitrosomonas europaea* upon Exposure to Nitrite. *Appl. Environ. Microbiol.* 64, 4098–4102.
- Stewart, P.S., 2003. Diffusion in Biofilms. *J. Bacteriol.* 185, 1485–1491. doi:10.1128/JB.185.5.1485-1491.2003
- Stoodley, P., Sauer, K., Davies, D.G., Costerton, J.W., 2002. Biofilms as complex differentiated communities. *Annu. Rev. Microbiol.* 56, 187–209. doi:10.1146/annurev.micro.56.012302.160705

- Stoodley, P., Wilson, S., Hall-Stoodley, L., Boyle, J.D., Lappin-Scott, H.M., Costerton, J.W., 2001. Growth and Detachment of Cell Clusters from Mature Mixed-Species Biofilms. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 5608–5613. doi:10.1128/AEM.67.12.5608-5613.2001
- Sudarno, U., Winter, J., Gallert, C., 2011. Effect of varying salinity, temperature, ammonia and nitrous acid concentrations on nitrification of saline wastewater in fixed-bed reactors. *Bioresour. Technol.* 102, 5665–5673. doi:10.1016/j.biortech.2011.02.078
- Sundermeyer-Klinger, H., Meyer, W., Warninghoff, B., Bock, E., 1984. Membrane-bound nitrite oxidoreductase of *Nitrobacter*: evidence for a nitrate reductase system. *Arch. Microbiol.* 140, 153–158. doi:10.1007/BF00454918
- Sutherland, I.W., 2001. The biofilm matrix – an immobilized but dynamic microbial environment. *Trends Microbiol.* 9, 222–227. doi:10.1016/S0966-842X(01)02012-1
- Tabb, D., Carter, L., 2015. Water Recovery System Design to Accommodate Dormant Periods for Manned Missions. 45th International Conference on Environmental Systems.
- Tafforin, C., 2009. Life at the Franco-Italian Concordia station in Antarctica for a voyage to Mars: ethological study and anthropological perspectives. *Antrocom* 5, 67–72.
- Tako, Y., Arai, R., Tsuga, S., Komatsubara, O., Masuda, T., Nozoe, S., Nitta, K., 2011. CEEF: CLOSED ECOLOGY EXPERIMENT FACILITIES. *Gravitational Space Res.* 23.
- Tappe, W., Laverman, A., Bohland, M., Braster, M., Rittershaus, S., Groeneweg, J., van Verseveld, H.W., 1999. Maintenance Energy Demand and Starvation Recovery Dynamics of *Nitrosomonas europaea* and *Nitrobacter winogradskyi* Cultivated in a Retentostat with Complete Biomass Retention. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 2471–2477.
- Tokutomi, T., 2004. Operation of a nitrite-type airlift reactor at low DO concentration. *Water Sci. Technol. J. Int. Assoc. Water Pollut. Res.* 49, 81–88.
- Tsai, Y.-L., Tuovinen, O.H., 1985. Oxygen uptake activity by *Nitrobacter* spp. in the presence of metal ions and sulfooxyanions. *FEMS Microbiol. Lett.* 28, 11–14. doi:10.1111/j.1574-6968.1985.tb00754.x
- Uygun, A., 2006. Specific nutrient removal rates in saline wastewater treatment using sequencing batch reactor. *Process Biochem.* 41, 61–66. doi:10.1016/j.procbio.2005.03.068
- Vadivelu, V.M., Keller, J., Yuan, Z., 2007. Effect of free ammonia on the respiration and growth processes of an enriched *Nitrobacter* culture. *Water Res.* 41, 826–834. doi:10.1016/j.watres.2006.11.030
- Vadivelu, V.M., Keller, J., Yuan, Z., 2006. Effect of free ammonia and free nitrous acid concentration on the anabolic and catabolic processes of an enriched *Nitrosomonas* culture. *Biotechnol. Bioeng.* 95, 830–839. doi:10.1002/bit.21018
- Vadivelu, Keller, J., Yuan, Z., 2006a. Stoichiometric and kinetic characterisation of *Nitrosomonas* sp. in mixed culture by decoupling the growth and energy generation processes. *J. Biotechnol.* 126, 342–356. doi:10.1016/j.jbiotec.2006.04.017
- Vadivelu, Yuan, Z., Fux, C., Keller, J., 2006b. Stoichiometric and kinetic characterisation of *Nitrobacter* in mixed culture by decoupling the growth and energy generation processes. *Biotechnol. Bioeng.* 94, 1176–1188.
- Veolia, 2008. Biostyr® Filtre Biologique pour eaux usées.
- Verseux, C., Baqué, M., Lehto, K., Vera, J.-P.P. de, Rothschild, L.J., Billi, D., 2016. Sustainable life support on Mars – the potential roles of cyanobacteria. *Int. J. Astrobiol.* 15, 65–92. doi:10.1017/S147355041500021X
- Villermaux, J., 1994. Réacteurs chimiques Principes. *Tech. Ing. Réact. Chim. base documentaire: TIB330DUO.*
- Wang, J., Yu, J., 2000. Kinetic analysis on inhibited growth and poly (3-hydroxybutyrate) formation of *Alcaligenes eutrophus* on acetate under nutrient-rich conditions. *Process Biochem.* 36, 201–207.
- Wang, Y.-Y., Hsu, P.-K., Tsay, Y.-F., 2012. Uptake, allocation and signaling of nitrate. *Trends Plant Sci.* 17, 458–467. doi:10.1016/j.tplants.2012.04.006

- Wanner, O., Morgenroth, E., 2004. Biofilm modeling with AQUASIM. *Water Sci. Technol.* 49, 137–144.
- Warakomski, A., van Kempen, R., Kos, P., 2007. Microbiology and Biochemistry of the Nitrogen Cycle Process Applications: SHARON®, ANAMMOX, and, InNitri®. *Proc. Water Environ. Fed.* 2007, 495–520. doi:10.2175/193864707787976911
- Watson, S.W., Bock, E., Harms, H., Koops, H.P., Hooper, A.B., 1989. Nitrifying bacteria, in: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. pp. 1808–1834.
- Wei, X., Sayavedra-Soto, L.A., Arp, D.J., 2004. The transcription of the *cbb* operon in *Nitrosomonas europaea*. *Microbiology* 150, 1869–1879. doi:10.1099/mic.0.26785-0
- Weidinger, K., Neuhäuser, B., Gilch, S., Ludewig, U., Meyer, O., Schmidt, I., 2007. Functional and physiological evidence for a Rhesus-type ammonia transporter in *Nitrosomonas europaea*. *FEMS Microbiol. Lett.* 273, 260–267. doi:10.1111/j.1574-6968.2007.00805.x
- Wen, Y., Wei, C.H., 2013. Heterotrophic nitrification and aerobic denitrification bacterium isolated from anaerobic/anoxic/oxic treatment system. *Afr. J. Biotechnol.* 10, 6985–6990. doi:10.4314/ajb.v10i36.
- Whittaker, M., Bergmann, D., Arciero, D., Hooper, A.B., 2000. Electron transfer during the oxidation of ammonia by the chemolithotrophic bacterium *Nitrosomonas europaea*. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Bioenerg.* 1459, 346–355. doi:10.1016/S0005-2728(00)00171-7
- Wieland, P.O., 1998. *Living Together in Space: The Design and Operation of the Life Support Systems on the International Space Station. Volume 1.*
- Wiesmann, U., Choi, I.S., Dombrowski, E.-M., 2007. *Fundamentals of Biological Wastewater Treatment.* John Wiley & Sons.
- Winogradsky, S., 1892. Contributions a la morphologie des organismes de la nitrification. *Arch. Sci. Biol. St Petersburg* 1, 86–137.
- Winogradsky, S., 1890. Recherches sur les organismes de la nitrification. *Ann Inst Pasteur* 4, 11–12.
- Withers, H., Swift, S., Williams, P., 2001. Quorum sensing as an integral component of gene regulatory networks in Gram-negative bacteria. *Curr. Opin. Microbiol.* 4, 186–193. doi:10.1016/S1369-5274(00)00187-9
- Zhang, J., Wu, P., Hao, B., Yu, Z., 2011. Heterotrophic nitrification and aerobic denitrification by the bacterium *Pseudomonas stutzeri* YZN-001. *Bioresour. Technol.* 102, 9866–9869. doi:10.1016/j.biortech.2011.07.118
- Zhao, Y., Bian, S.-M., Zhou, H.-N., Huang, J.-F., 2006. Diversity of Nitrogenase Systems in Diazotrophs. *J. Integr. Plant Biol.* 48, 745–755. doi:10.1111/j.1744-7909.2006.00271.x

Annexe 1



Growth modelling of *Nitrosomonas europaea* ATCC® 19718 and *Nitrobacter winogradskyi* ATCC® 25391: A new online indicator of the partial nitrification



Nelly Cruvellier^a, Laurent Poughon^{a,*}, Catherine Creuly^a, C-Gilles Dussap^a, Christophe Lasseur^b

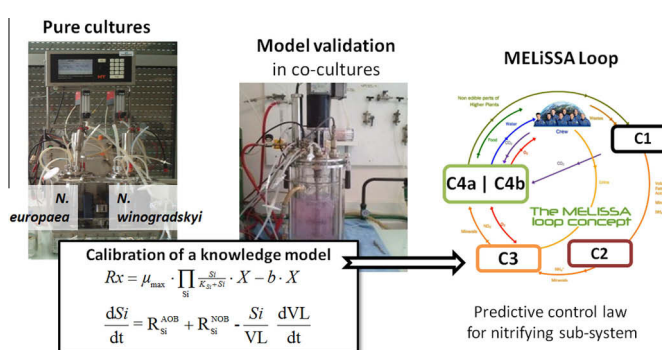
^a Université Clermont Auvergne, Institut Pascal, UMR CNRS 6602, TSA 60026, CS 60026, F-63178 Aubière cedex, France

^b ESTEC, European Space Agency, Noordwijk, The Netherlands

HIGHLIGHTS

- Pirt model with lethality used for a coculture of two nitrifying bacteria.
- Kinetic characterization of nitrifying bacteria in pure cultures.
- On-line base addition and dissolved oxygen as indicators of partial nitrification.
- Structured and complete predictive model of nitrification.

GRAPHICAL ABSTRACT



ARTICLE INFO

Article history:

Received 4 July 2016

Received in revised form 23 August 2016

Accepted 24 August 2016

Available online 26 August 2016

Keywords:

Nitrosomonas europaea ATCC® 19718

Nitrobacter winogradskyi ATCC® 25931

Life support systems

Modelling growth kinetics

Fed-batch cultures

ABSTRACT

The aim of the present work was to study the growth of two nitrifying bacteria. For modelling the nitrifying subsystem of the MELiSSA loop, *Nitrosomonas europaea* ATCC® 19718 and *Nitrobacter winogradskyi* ATCC® 25931 were grown separately and in cocultures. The kinetic parameters of a stoichiometric mass balanced Pirt model were identified: $\mu_{max} = 0.054 \text{ h}^{-1}$, decay rate $b = 0.003 \text{ h}^{-1}$ and maintenance rate $m = 0.135 \text{ gN-NH}_4^+ \text{ gX}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ for *Nitrosomonas europaea*; $\mu_{max} = 0.024 \text{ h}^{-1}$, $b = 0.001 \text{ h}^{-1}$ and $m = 0.467 \text{ gN-NO}_2^- \text{ gX}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ for *Nitrobacter winogradskyi*. A predictive structured model of nitrification in co-culture was developed. The online evolution of the addition of KOH is correlated to the nitritation; the dissolved oxygen concentration is correlated to both nitritation and nitrification. The model suitably represents these two variables so that transient partial nitrification is assessed. This is a clue for avoiding partial nitrification by predictive functional control.

© 2016 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

For long-term space missions, the resupply of water, food and oxygen by closed Life-Support Systems (LSS) is required to maintain astronauts alive. The MELiSSA system (Micro-Ecological Life Support System Alternative) is a closed bioregenerative LSS

developed by European Space Agency (ESA) (Gòdia et al., 2002). MELiSSA is a closed ecological life support system, which consists of five biological compartments. It is designed on the basis of a lake ecosystem including the recycling of nitrogen by an N-cycle (Hendrickx et al., 2006). To meet the requirements of Biological Life-Support Systems (BLSS), each subsystem of the MELiSSA loop must be controlled by a rationale approach. Such an objective is achievable with the development of mechanistic and predictive models.

* Corresponding author.

E-mail address: laurent.poughon@univ-bpclermont.fr (L. Poughon).

Nomenclature

ATCC [®]	American Type Culture Collection Company	μ	specific growth rate (h^{-1})
μ_{\max}	maximal growth rate (h^{-1})	X	biomass concentration ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)
b	decay term (h^{-1})	$Y_{S/\text{Smaint}}$	mass yield of the substrate S for the maintenance reaction ($\text{gS}\cdot\text{gS}^{-1}$)
m	maintenance coefficient ($\text{g}_{\text{Substrate}}\cdot\text{gX}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$)	lim	limitation term for the reaction
<i>N. europaea</i>	<i>Nitrosomonas europaea</i>	$Y_{S/X}$	mass yield of the compound S ($\text{gS}\cdot\text{gX}^{-1}$)
<i>N. winogradskyi</i>	<i>Nitrobacter winogradskyi</i>	$Y_{S/X}^{\text{observed}}$	mass yield of the compound S, determined experimentally ($\text{gS}\cdot\text{gX}^{-1}$)
LSS	Life-Support System	$Y_{S/X}^{\text{true}}$	mass yield of the compound S calculated by stoichiometry ($\text{gS}\cdot\text{gX}^{-1}$)
MELiSSA	Micro Ecological Life Support System Alternative	μ_{obs}	observed specific growth rate (h^{-1})
ESA	European Space Agency	R_i^{AOB}	production rate of a compound i ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$)
FA	free ammonia	K_{La}	overall mass transfer oxygen (h^{-1})
FNA	free nitrous acid		
BLSS	Biological Life Support System		
AOB	ammonia-oxidizing bacteria		
NOB	nitrite-oxidizing bacteria		

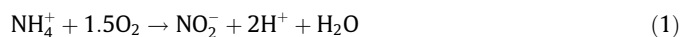
This study focuses on the nitrification step of the N-cycle. The function of this step is to produce nitrate by oxidation of the ammonium produced by the liquefaction of solid and liquid wastes. Nitrate is further used in photosynthetic compartments, such as microalgae and higher plants chambers, in charge of recycling water and producing oxygen and edible biomass. As much as possible, the microbial space safety requirements necessitate operating axenic cultures. In MELiSSA, a fixed-bed nitrifying column is used as the central element of the N-cycle. Biomass grows on polystyrene beads as a biofilm (Pérez et al., 2005).

The aim of a BLSS is to successfully fulfil the life support objectives, i.e. air regeneration, water recovery, food generation, etc. Only suitable control and management of the subsystems of the BLSS can achieve this, using predictive models. Such an approach supports a certain degree of knowledge and understanding for anticipating the optimal set-points values for the action variables, such as concentrations and flow rates. For the nitrification process in MELiSSA, such a model requires to establish: (i) a bioreactor model including hydrodynamics and physical phenomena, (ii) a reliable kinetic model for the co-culture. Characterization and modelling of nitrifier community have been done on wastewater sludge and non axenic conditions (Grady and Lim, 1980; Henze, 2007; Poughon et al., 2001; Vadivelu et al., 2006a, 2006b). In wastewater treatment processes, bacterial consortium are used to improve the biological reactions and the nitrification process (Wittebolle et al., 2009), but because of their low maximal growth rate, the pure cultures of nitrifying bacteria are not easy to achieve. Literature review shows scattered values for maximal growth rates ranging from 0.017 h^{-1} (Keen and Prosser, 1987) to 0.088 h^{-1} (Skinner and Walker, 1961) for ammonia oxidisers (*Nitrosomonas* sp.) and ranging from 0.02 h^{-1} (Vadivelu et al., 2006b) to 0.051 h^{-1} (Brion and Billen, 1998) for nitrite oxidisers (*Nitrobacter* sp.). However these values cannot be used for a reliable predictive functional control of a nitrification process of BLSS.

For developing MELiSSA, pure strains of *Nitrosomonas europaea* ATCC[®] 19718 and *Nitrobacter winogradskyi* ATCC[®] 25391 were used, instead of microbial consortium adapted from wastewater sludge (Lasseur et al., 1993). One key point is to avoid nitrite over-all production in the system, nitrite being toxic for man and higher plants compartments. Therefore one primary objective of the control of the nitrification process is to adapt the ammonium load and output concentration avoiding nitrite accumulation. This objective requires a thorough characterization of the bacteria growth and kinetics, which will be the basis of the predictive control of the nitrification in MELiSSA.

In order to develop a knowledge model for nitrate and biomass production, the two bacteria were cultivated in pure culture and in

co-culture as a mixed culture: *Nitrosomonas europaea* ATCC[®] 19718 oxidizes ammonium into nitrite (Eq. (1)); *Nitrobacter winogradskyi* ATCC[®] 25391 produces nitrate from nitrite (Eq. (2)). The stoichiometry of the 2 reactions is given by (Montras et al., 2008):



The mechanism of oxidation is determined. *Nitrosomonas europaea* oxidizes ammonium into hydroxylamine with ammonium monooxygenase. Hydroxylamine oxydoreductase catalyses the oxidation of hydroxylamine into nitrite (Madigan et al., 2010). The oxidation of nitrite into nitrate is done by *Nitrobacter winogradskyi* (Tsien et al., 1968). For both strains, dioxygen is the final acceptor of the electron transfer chain. Blackburne et al. (2007) have observed that *Nitrobacter winogradskyi* tolerate higher free ammonia (NH_3) concentrations than *Nitrospira* (respectively 50 and $0.08 \text{ mg N-NH}_3\cdot\text{L}^{-1}$) and higher free nitrous acid (HNO_2) concentrations. *Nitrospira* is totally inhibited at $0.06 \text{ mg N-HNO}_2\cdot\text{L}^{-1}$ while *Nitrobacter* is still fully active. This justifies the choice of *Nitrobacter winogradskyi* for mixed cultures with *Nitrosomonas europaea* considering that the concentrations of NH_3 and HNO_2 may be temporarily high because of transient accumulations due to excess NH_3 load in the MELiSSA nitrifying process. It is also mandatory to assess nitrite exchange metabolism between the two microorganisms in order to properly develop a knowledge model of the global nitrification process.

In this work, pure cultures of *Nitrosomonas europaea* ATCC[®] 19718 and *Nitrobacter winogradskyi* ATCC[®] 25391 and mixed cultures were grown in stirred and aerated bioreactors, instead of a fixed bed reactor, that will be used in the final process. The reason is that the hydrodynamic is simpler to understand in a stirred tank reactor. The kinetic parameters of the strains (μ_{\max} , decay and maintenance rate) were identified as a first step for achieving modelling of the process. The model for the coculture in bioreactor was developed and validated in limiting and non-limiting conditions. From model and experiments, easy-to-use online indicators for partial nitrification are highlighted as potential tools for controlling and monitoring the nitrification process.

2. Material and methods

2.1. Strains and culture media

Nitrosomonas europaea ATCC[®] 19718 (Institut Pasteur, Paris, France) was axenically grown in autotrophy in the ATCC[®] medium 2265: $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 3.2738 g/L ; $\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.1786 g/L ; CaCl_2 ,

26.7 mg/L; CuSO₄, 0.1 mg/L; FeSO₄ (30 nM in 50 mM EDTA at pH7), 0.3310 g/L; KH₂PO₄, 5.8306 g/L; NaH₂PO₄, 0.4233 g/L; Na₂CO₃ anhydrous, 0.3968 g/L. *Nitrobacter winogradskyi* ATCC[®] 25391 (Institut Pasteur, Paris, France) was axenically grown in autotrophy in the ATCC[®] medium 480: CaCl₂, 10 mg/L; MgSO₄·7H₂O, 0.1 g/L; EDTA, 1.4 mg/L; FeSO₄·7H₂O, 5 mg/L; H₂SO₄ (concentrated), 0.05 mg/L; Na₂MoO₄·2H₂O, 0.05 mg/L; MnCl₂·4H₂O, 0.1 mg/L; CoCl₂·6H₂O, 0.01 mg/L; ZnSO₄·7H₂O, 0.05 mg/L; CuSO₄·5H₂O, 0.01 mg/L; NaNO₂, 0.207 g/L; K₂HPO₄, 1.37 mg/L.

The final pH of both media was adjusted at pH 8 with NaOH.

2.2. Nominal maintenance of cultures

Cultures of *N. europaea* were performed in 500 mL Erlenmeyer flasks incubated in dark conditions in a static oven at 28 °C. Cultures of *N. winogradskyi* were performed in 500 mL Erlenmeyer flasks incubated in dark and at 28 °C with 100 rpm shaking.

For *N. europaea* ATCC[®] 19718, a subculture at 10% was performed when the ammonia ions were depleted and/or the nitrites concentration reached the toxicity threshold of 0.276 gN-NO₂⁻/L (Stein and Arp, 1998).

For *N. winogradskyi* ATCC[®] 25391, after exhaustion of NO₂⁻ contained in the medium, 3.5 mL of a sodium nitrite solution (2%) per 100 mL of liquid culture (i.e. 0.21 gN-NO₂⁻/L of NO₂⁻) was added. Then, a subculture at 10% was performed every three weeks to avoid the nitrate concentration to reach the toxicity threshold of 3.84 gN-NO₃⁻·L⁻¹ (Bock et al., 1989).

2.3. Bioreactors cultures

The multiple batch reactor system was a self-contained Multi-fors (Infors-HT) system. The system was composed of four distinct continuously stirred bioreactors, each one with an operating volume of 500 mL, which operated in parallel. Each bioreactor had three peristaltic pumps that allowed for liquid additives to be introduced to the batch reactor system. The control of the pH was set at 7.9 and controlled with a 1 M K₂CO₃ solution; the temperature at 28 °C, the stirring at 250 rpm and the aeration at 0.3 L/min were managed by Iris software (Infors-HT). The data acquisition of the pH, pO₂, volume of base added was performed. The pure cultures of *N. europaea* and *N. winogradskyi* were run in fed-batch mode: additions of 1.55 gN-NH₄⁺/L or 0.3 gN-NO₂⁻/L were done during the experiments. *Nitrosomonas europaea* inoculum were obtained from a *N. europaea* ATCC[®] 19718 culture aliquoted in four different Erlenmeyer flasks 48 h before the inoculation in the bioreactors. *Nitrobacter winogradskyi* inoculums were obtained from a *N. winogradskyi* ATCC[®] 25391 culture aliquoted in four different Erlenmeyer flasks just before the inoculation in the bioreactors.

The bench scale four-liter batch reactor was a self-contained system BIostat MD (B. Braun Biotech International). The system was composed of a four-liter jacketed and continuously stirred reactor and of an operational control console. The bioreactor had three peristaltic pumps that allowed for liquid additives. The temperature, set at 28 °C, was controlled by circulating water through the reactor jacket. The conditions for the culture were pH at 7.9, stirring at 400 rpm and aeration at 0.75 L/min with a K_{1a} of 40 h⁻¹ for the coculture A and 10–14 h⁻¹ for the coculture B. The pH was controlled with a K₂CO₃ solution at 138.2 g/L for the coculture A and a KOH solution at 112.2 g/L for the coculture B. Online parameters as the pH, pO₂, volume of base added were acquired using MFCS software (B. Braun Biotech International). The inoculum for the coculture is composed of two cultures of *N. europaea* and *N. winogradskyi* equal in bacteria concentration based on the optical density measure (Farges et al., 2012).

2.4. Bacterial growth

Biomass concentration was assessed by light scattering at 600 nm with a Thermo Fisher Scientific BioMate 3S UV-visible spectrophotometer. The blank was done on the culture media. Dry matter measurements of biomass concentration have shown that optical density was proportional to biomass concentration for *Nitrosomonas europaea* and *Nitrobacter winogradskyi* (proportionality constant 0.45 g·L⁻¹·OD⁻¹).

2.5. N-compounds analysis

Ammonium, nitrite and nitrate concentrations were assessed by Metrohm high-performance liquid chromatography. For the follow-up of the ammonium ions, an 882 Compact IC plus-Cation, equipped with a negative resin column Metrosep C 4250 was used. The mobile phase consisting of nitric acid (65% at 117.5 μL/L) and 0.086 g/L of dipicolinic acid in ultrapure water was degassed before use. Then, it was pumped at 0.9 mL/min. The time of the analysis was fixed to 25 min.

Nitrite and nitrate concentrations were monitored using an 882 Compact IC plus-Anion, equipped with a column with a positive resin Metrosep A Supp 5. The mobile phase consisted of 0.084 g/L of sodium bicarbonate and 0.339 g/L of sodium carbonate in ultrapure water and was degassed before use. Then, it was pumped at 0.7 mL/min. The time of the analysis was fixed to 35 min.

For some experiments, N-NH₃ was also measured by the Patton and Crouch procedure (Patton and Crouch, 1977) with phenol and bleach. 50 μL of sample was mixed with 500 μL of bleach, 500 μL of phenol and 3 mL of distilled water. After incubating for one hour at room temperature, the absorbance at 570 nm was measured. The calibration was performed with a solution of (NH₄)₂SO₄ (0–0.062 gN-NH₄⁺/L).

N-NO₂ was measured using the Griess reaction (Keeney and Nelson, 1982): 1 mL of sample was mixed with 200 μL of Griess reagent and the absorbance at 540 nm was measured. The calibration was performed with a solution of NaNO₂ (0–0.03 gN-NO₂⁻/L).

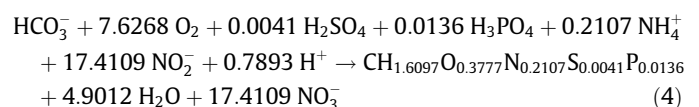
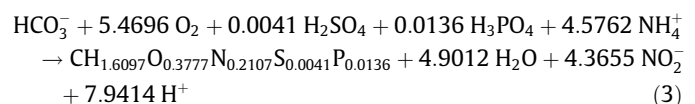
2.6. Growth model

For both strains, the models were decomposed in two parts:

- The representation of the conversion yields by stoichiometric equations describing the principle of elements conservation.
- The kinetic part, including the expression of the kinetic rates as function of concentrations.

In nitrification, oxidation of nitrogen sources provides the metabolic energy (Poughon et al., 2001). This is reported as maintenance metabolism. The stoichiometric equations for the maintenance metabolism of *N. europaea* and *N. winogradskyi* were respectively given by Eq. (1) and Eq. (2).

The growth stoichiometric equations were respectively given by Eq. (3) and Eq. (4) for *N. europaea* and *N. winogradskyi*, (Poughon et al., 2001):



Several kinetic models for the growth of nitrifiers have been studied. Most of them are based on a Pirt model (Pirt, 1982),

including a term relative to exogenous maintenance. This model, with a decay term, is expressed as:

$$\mu_{obs} = \mu - b, \text{ with } \mu = \mu_{max} \cdot \lim_G \quad (5)$$

$$q_{obs} = Y_{S/S_{maint}} \cdot \lim \cdot m + Y_{S/X} \cdot \mu \quad (6)$$

where μ_{obs} and q_{obs} are respectively the specific observed growth rate (h^{-1}) and the specific observed substrate consumption rate ($gS \cdot gX^{-1} \cdot h^{-1}$); μ is the specific growth rate (h^{-1}); b is the decay rate (h^{-1}); $Y_{S/X}$ is the true growth yield ($gS \cdot gX^{-1}$); $Y_{S/S_{maint}}$ is the maintenance yield ($gS/g_{maintenance}$ substrate); m the maintenance coefficient ($g_{S_{maint}} \cdot gX^{-1} \cdot h^{-1}$); \lim_G is the substrate limitation for the growth (usually taken as a Monod limiting term); \lim is the substrate limitation for the maintenance reaction.

Some variants from the classical Pirt model were reported. The model proposed by Beeftink et al. (1990) was used by Hunik et al. (1994) and (Leenen et al. (1997)). The model with a second maintenance term as a function of the specific growth rate has been used by Vadivelu et al. (2006a,b). For the current work, the model of Pirt with decay was used. The theoretical yields for the maintenance and the growth reactions were calculated from the stoichiometric equations Eqs. (1)–(4), (Table 1). Vadivelu et al. (2006b) have observed a good agreement for the theoretical yield $Y_{HNO_2/X}$ calculated with stoichiometry by Poughon et al. (2001).

Whatever was the model used, the parameters were always identified by the same approaches.

The maximum growth rate μ_{max} was identified from the exponential (non limited) growth phase in batch culture. In such conditions, μ_{max} is calculated from the slope of the biomass curve in logarithmic scale as $\ln X = \mu_{obs} \cdot t$, with $\mu_{obs} = \mu_{max} - b$.

The decay rate b is identified from biomass lethality curves at substrate exhaustion conditions. In such conditions $\mu_{obs} = -b$. The decay rates reported in literature are low: $0.001 h^{-1}$ (Brion and Billen, 1998); $0.011 h^{-1}$ (Vadivelu et al., 2006a) for *Nitrosomonas* sp. and $0.001 h^{-1}$ (Brion and Billen, 1998); $0.003 h^{-1}$ (Vadivelu et al., 2006b) for *Nitrobacter* sp. It has been observed that the decay rate was different according to the exhausted substrate. For *N. europaea*, Leenen et al. (1997) have calculated a decay rate $0.0038 h^{-1}$ when exhausted substrate was O_2 , and $0.018 h^{-1}$ when exhausted substrate was NH_3 .

The maintenance parameter m , was identified from the $q_{obs} = f(\mu_{obs})$ curves. The linearization of the Pirt model with a decay rate leads to the following expression:

$$\text{if } \lim_G = \lim = \mu / \mu_{max}, \quad (7)$$

$$q_{obs} = \left(\frac{Y_{S/S_{maint}} \cdot m + Y_{S/X} \cdot \mu_{max}}{\mu_{max}} \right) \mu_{obs} + b \cdot \left(\frac{Y_{S/S_{maint}} \cdot m + Y_{S/X} \cdot \mu_{max}}{\mu_{max}} \right)$$

$$\text{if } \lim = 1 \text{ and } \lim \neq \lim_G, \quad (8)$$

$$q_{obs} = Y_{S/S_{maint}} m + Y_{S/X} \cdot (\mu_{obs} + b)$$

From the above equations the principle of the calculation of the maintenance parameter may appear obvious, but in practice it is highly dependent on the value of the true yields and on the accu-

racy of the estimations of μ_{max} and b . Moreover the maintenance process itself, defined as the energy consumed for various cell survival activities other than formation of new biomass, covers so many cellular processes that maintenance energy may depend on culture conditions, species and stress conditions. Maintenance is also linked to thermodynamic efficiency of the energy generating reactions (Poughon et al., 2001). As for maximal growth rate, the values for the maintenance parameter that are reported in literature are scattered: $0.120\text{--}0.346 gN-NH_3 \cdot gBiomass^{-1} \cdot h^{-1}$ (Hunik et al., 1994; Keen and Prosser, 1987) for *Nitrosomonas* sp.; $0.071\text{--}0.208 gN-HNO_2 \cdot gBiomass^{-1} \cdot h^{-1}$ (Hunik et al., 1994; Keen and Prosser, 1987) for *Nitrobacter* sp.

The last point to consider in the growth models is the expression of the limiting terms. For the growth, the limitation is often expressed as a Monod expression defined as $\lim_G = \prod_{S_i} \frac{S_i}{K_{S_i} + S_i}$ where S_i is the concentration one of i limiting substrate and K_{S_i} , its “half velocity” constant. This expression may be inadequate at very low substrate concentrations, especially when substrate is used by several species in mixed culture. The Monod model leads to consume substrate up to its complete exhaustion, without taking into account a threshold in concentration for the growth. Such a threshold at low substrate concentration was achieved by using sigmoid shape expression as outlined by Monod itself (Monod, 1942). For the coculture of *N. europaea* and *N. winogradskyi*, where NH_3 is the N source for both species, a NH_3 growth threshold shall be considered in order to maintain a growth of *N. winogradskyi*. It is noticed that this question of the NH_3 as N source for the growth of *N. winogradskyi* is usually skipped in most of the models of nitrifiers. For *N. europaea*, instead of the classical Monod, a sigmoid limiting term is then added for NH_3 for completing the Monod term such as:

$$\frac{(S_{NH_3})^n}{(K_{S_{NH_3}})^n + (S_{NH_3})^n} \quad (9)$$

This term, with $n = 3$, was selected as it maintains the Monod shape for $S > K_s$ with a sigmoid shape when $S < K_s$.

When it is taken into account, the maintenance substrate limitation is often considered identical to the growth limitation. This assumption is acceptable for the Nitrite-Oxidising Bacteria (NOB), where O_2 and HNO_2 are involved in the same reactions in growth and maintenance. But for the Ammonia-Oxidising Bacteria (AOB), NH_3 is involved in energy reaction and also in growth reaction as N source. Thus for AOB the same limiting term by NH_3 for growth and maintenance has been used. As seen with Eq. (7) or Eq. (8), the difference of limitation between growth and maintenance may leads to different results in the calculation of the maintenance parameter.

2.7. Bioreactor model

Pure and mixed cultures are performed in fed-batch reactor. A perfectly model for perfectly mixed reactor was developed

Table 1

True yields calculated from a metabolic and thermodynamic approach for *Nitrosomonas europaea* and *Nitrobacter winogradskyi* (Poughon et al., 2001).

	<i>Nitrosomonas europaea</i>		<i>Nitrobacter winogradskyi</i>	
	$Y_{S/X}$ (gS/gX) for growth	Y_{S/NH_4^+} (gS/gN – NH_4^+) for maintenance	$Y_{S/X}$ (gS/gX) for growth	$Y_{S/N-NO_2^-}$ (gS/gN – NO_2^-) for maintenance
N- NH_4^+	–2.7667	–1	–0.1274	–
N- NO_2^-	2.6394	1	–10.5266	–1
N- NO_3^-	0	–	10.5266	1
O_2	–7.5586	–3.4286	–0.3294	–1.1429
HCO_3^-	–2.6351	–	–0.0432	–
H^+	0.3429	0.1429	–0.0341	–

* Calculated considering ionic fms of the compound used in reactions.

describing the evolution of biomasses, substrates and products concentrations. The model was completed with an equation describing the addition of base to maintain the pH to its set point value, Eq. (13). The variation of reactor liquid volume due to base addition is also taken into account, Eq. (14).

$$\frac{dS_i}{dt} = R_{S_i}^{AOB} + R_{S_i}^{NOB} - \frac{S_i}{VL} \frac{dVL}{dt} \quad (10)$$

$$\frac{dO_2}{dt} = R_{O_2}^{AOB} + R_{O_2}^{NOB} + K_L a (O_2^* - O_2) - \frac{O_2}{VL} \frac{dVL}{dt} \quad (11)$$

$$\frac{dCO_2}{dt} = R_{CO_2}^{AOB} + R_{CO_2}^{NOB} + K_L a (CO_2^* - CO_2) - \frac{CO_2}{VL} \frac{dVL}{dt} \quad (12)$$

$$\frac{dV_{base}}{dt} = (R_{H^+}^{AOB} + R_{H^+}^{NOB}) \cdot \frac{VL}{N_{base}} \quad (13)$$

$$\frac{dV_L}{dt} = \frac{dV_{base}}{dt} \quad (14)$$

In Eq. (10), S_i represents the biomass concentration X or a nitrogen compound concentration. According to the growth model previously detailed, $R_x = (\mu - b) \cdot X$, and $R_{S_i} = Y_{S_i/S_{maint}} \cdot \lim.m + Y_{S_i/X} \cdot \mu$. This model is designed for a co-culture. For the pure culture of *Nitrosomonas europaea* or *Nitrobacter winogradskyi*, it is necessary to keep only the reactions terms corresponding to the strain in culture. In the case of O_2 dissolved gas, the concentration in the reactor is described by Eq. (11), where $K_L a$ is the overall mass transfer oxygen in h^{-1} and O_2^* is the dissolved gas concentration in thermodynamic equilibrium with the gas phase. The concentration of the CO_2 in the bioreactor is described by Eq. (12).

The model was developed and solved using Matlab(TM) R2010a.

3. Results and discussion

3.1. *Nitrosomonas europaea* pure cultures

Evolution of the biomass concentration in the bioreactor 3 is given in Fig. 1. As ammonium is the *Nitrosomonas europaea* substrate, its consumption is correlated to the growth phase. There were three phases of ammonia consumption: (i) the ammonia initially contained in the culture medium (phase 1) and (ii) two additions of ammonia (phase 2 and 3) represented by arrows (Fig. 1). The specific growth rate μ_{obs} was calculated by linear regression of $\ln(X) = f(t)$ in each growth phase (Table 2). It decreased in time and was the highest during the phase 1: $0.051 h^{-1}$. The decrease of the μ_{obs} could be due to a substrate limitation, the increasing salinity due to the addition of base or a high product concentration inhibiting the growth. In this case there was no lack of substrate, as ammonia was injected in pulses into the reactors. However, the nitrite concentrations did reach the toxicity threshold of $0.276 gN-NO_2^-/L^{-1}$ (Stein and Arp, 1998) during the second and the third phases of growth; at the end of the culture, the nitrite concentration reached 4.44; 4.71 and $4.38 gN-NO_2^-/L^{-1}$ respectively for reactor 1, 3, and 4. In conclusion, the first phase of this experiment only corresponds to an exponential growth phase and was used to obtain the maximal growth rate μ_{max} . At the end of each growth phase, the cultures were running in substrate limitation in order to determine the decay term b . The linear regression provided a decay term $b = 0.003 h^{-1}$ for *Nitrosomonas europaea* (Table 2). From the average μ_{obs} previously determined, a $\mu_{max} = 0.054 h^{-1}$ for *Nitrosomonas europaea* pure cultures has been calculated. The follow-up of the ammonia and nitrite has been used to calculate the observed specific substrate rate q_{obs} ($gS \cdot gX^{-1} \cdot h^{-1}$). As shown in the description of the growth model,

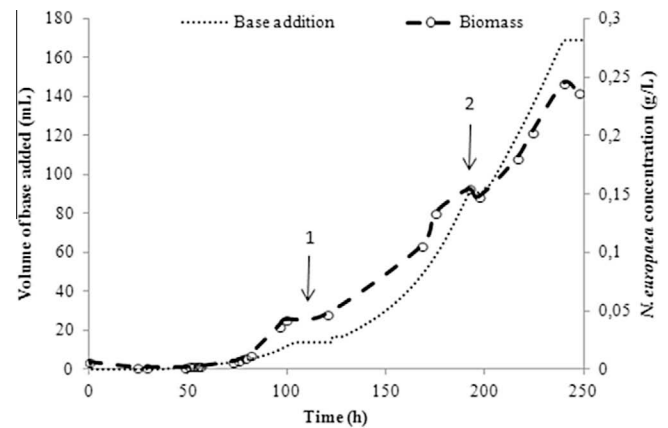


Fig. 1. Evolution of biomass concentration (g/L) and the addition of base during the *Nitrosomonas europaea* cultures in the reactor 3. Arrows indicate the ammonia additions: 1.54 and 1.31 $gN-NH_4^+/L$ for additions 1 and 2 respectively.

Table 2

Experimental values determined during the pure cultures of *Nitrosomonas europaea* and *Nitrobacter winogradskyi*.

	<i>Nitrosomonas europaea</i>	<i>Nitrobacter winogradskyi</i>
μ_{obs}	$0.051 \pm 0.009 h^{-1}$	$0.023 \pm 0.008 h^{-1}$
b	$0.003 \pm 0.0008 h^{-1}$	$0.001 \pm 0.001 h^{-1}$
μ_{max}	$0.054 \pm 0.009 h^{-1}$	$0.024 \pm 0.008 h^{-1}$
$y_{observed}^{S/X}$	$-3.21 \pm 0.33 gN-NH_4^+ \cdot gX^{-1}$	$32.31 \pm 10.26 gN-NO_3^- \cdot gX^{-1}$
q_{obs}	$-0.282 \pm 0.16 gN-NH_4^+ \cdot gX^{-1} \cdot h^{-1}$	$0.732 \pm 0.16 gN-NO_3^- \cdot gX^{-1} \cdot h^{-1}$
m	$0.135 \pm 0.041 gN-NH_4^+ \cdot gX^{-1} \cdot h^{-1}$	$0.467 \pm 0.102 gN-NO_2^- \cdot gX^{-1} \cdot h^{-1}$

the substrate consumption rate allowed calculating the maintenance term m during the *Nitrosomonas europaea* growth with Eq. (8). The experimental and calculated data obtained during these experiments were reported in Table 2. The maximal growth rate and maintenance rate obtained are close to the values reported by Hunik et al. (1994) for *N. europaea* ATCC[®] 19718: $\mu_{max} = 0.057 h^{-1}$, $m = 0.120 gN-NH_3 \cdot gBiomass^{-1} \cdot h^{-1}$.

During the *Nitrosomonas europaea* growth, there was an acidification of the media due to the protons release in the reactor while the ammonia was oxidized. When the bacteria grew, they consumed ammonia and produced nitrite and protons. To keep the pH at the desired value (7.9), there was an addition of a known concentration base. The on-line acquisition of the volume of base added is thus directly linked to the ammonia oxidation. This measurement was an easy way to know when the growth started. Indeed, the increase of the optical density was correlated to the addition of base in the third reactor for example, like shown on Fig. 1. It was an on-line indication of the *Nitrosomonas europaea* growth in the reactor, which could provide valuable information about the growth and ammonia oxidation monitoring.

3.2. *Nitrobacter winogradskyi* pure cultures

Evolution of the biomass concentration for the bioreactor 3 is given in Fig. 2. The optical density increased right from the inoculation except for the second reactor. The same trend was observed in each reactor: the biomass concentration, increased shortly after the addition of nitrite (arrows on Fig. 2); the growth phases were short in time: around 30 h. At the end of the cultures significant increase of *Nitrobacter* concentrations were reached: 0.08 g/L and almost 10 times the inoculum concentration. However this concentration was three times less than the concentrations reached at the end of the *Nitrosomonas* cultures (0.25 g/L). These values at the end of the culture were due (i) to low additions of nitrite

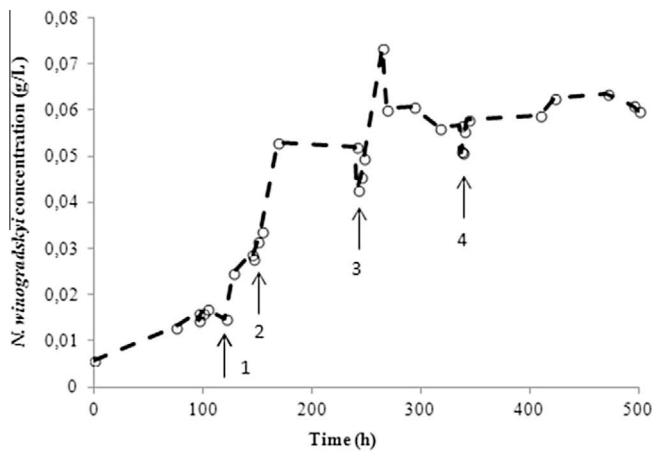


Fig. 2. Evolution of biomass concentration (g/L) during the *Nitrobacter winogradskyi* cultures. Arrows indicate the nitrite additions: 0.144, 0.27, 0.253 and 0.153 gN-NO₂⁻/L for additions 1–4 respectively.

(up to 0.3 gN-NO₂⁻/L for each addition), which was necessary to prevent nitrite inhibition during the cultures; (ii) to a low biomass yield for *Nitrobacter* growth (Table 1). Nitrite oxidation phases were faster than the ammonia ones during the *Nitrosomonas* cultures so that, the growth phases for *Nitrobacter* (Fig. 2) were less visible than those of *Nitrosomonas* (Fig. 1). With this follow-up of the biomass, the μ_{obs} was calculated by linear regression for each phase and each reactor. The results for the last three phases only were used to determine parameters because they were the exponential growth phases. The specific growth rate μ_{obs} is maximal for these phases, and a maximum of 0.024 h⁻¹ was calculated (Table 2). The first two phases seemed to be adaptation phases and not exponential growth phases. It was the opposite with *Nitrosomonas europaea* for which only the first growth phase was exponential. The ATCC[®] medium 480 is a non-limiting growth medium for *Nitrobacter*. Even if the growth was maintained by nitrite feed-batch additions, the maximal specific growth rate was measured in the last phases: it seemed no limitation was observed during the *Nitrobacter* pure cultures.

A decay rate of 0.001 h⁻¹ was calculated by linear regression of the biomass curves, in nitrite exhaustion phases. The μ_{max} calculated with these experimental results is 0.025 h⁻¹, in agreement with the lowest values found in the literature.

There were four additions of nitrite during the *Nitrobacter winogradskyi* cultures. The nitrate concentration gradually increased in the four bioreactors until 1.02 gN-NO₃⁻·L⁻¹, which is below the inhibition threshold of 3.84 gN-NO₃⁻·L⁻¹ for nitrate on *Nitrobacter* growth (Cébron A., 2004). The follow-up of the nitrite and nitrate in the reactors allowed the calculation of the maintenance term *m*. For the *Nitrobacter winogradskyi*, the maintenance *m* was 0.467 gN-NO₂⁻·gX⁻¹·h⁻¹ with the theoretical yields provided in Table 1.

3.3. *Nitrosomonas* and *Nitrobacter* mixed culture

After the pure cultures of *Nitrosomonas europaea* and *Nitrobacter winogradskyi*, it was necessary to validate the model with a co-culture of both bacteria. Two mixed cultures have been done: the coculture A to validate the growth model previously calibrated and the coculture B which was running with a carbon limitation.

For the mixed cultures A and B, we worked with a four-liter batch bioreactor. A mix of *Nitrosomonas europaea* and *Nitrobacter winogradskyi* was added in the bioreactor.

For the coculture A, the biomass, ammonia and nitrates concentrations were monitored during the culture, Fig. 3a. In 290 h,

the biomass concentration reached around 0.3 g·L⁻¹ and there was a correlation between the biomass, the production of nitrates and the consumption of ammonia. Three phases of ammonia consumption were done during this culture and more than 1 gN-NO₃⁻·L⁻¹ was reached at the end of the culture. In *N. europaea* pure cultures, the addition of base was correlated to the ammonia consumption. In the 500 mL bioreactors, we were unable to see dissolved oxygen decreasing which was directly dependant of the ammonia oxidation (Eq. (1)). In the mixed culture of *Nitrosomonas europaea* and *Nitrobacter winogradskyi*, we measured the base addition but also the dissolved oxygen concentration (Fig. 3b). We expected a decrease in oxygen concentration while bacteria were growing and ammonia oxidized. In the experimental curves (Fig. 3b) this statement was checked: decreased of dissolved oxygen concentration was linked to the ammonia consumption and so, to the base addition.

For each decrease of dissolved oxygen concentration, two phases were observed: first the base addition ceased, which means ammonia exhaustion, and the oxygen inched up and then levelled off around 90%, represented by arrows 1 on Fig. 3b. The second phase was the nitrite oxidation, represented by arrows 2, where the dissolved oxygen reached 100% after the complete nitrite oxidation. This gap in the dissolved oxygen curve is useful to check partial nitrification in the mixed culture.

The model previously calibrated for *N. europaea* and *N. winogradskyi* was applied to the co-culture. The comparison between the experimental and the simulated results for the

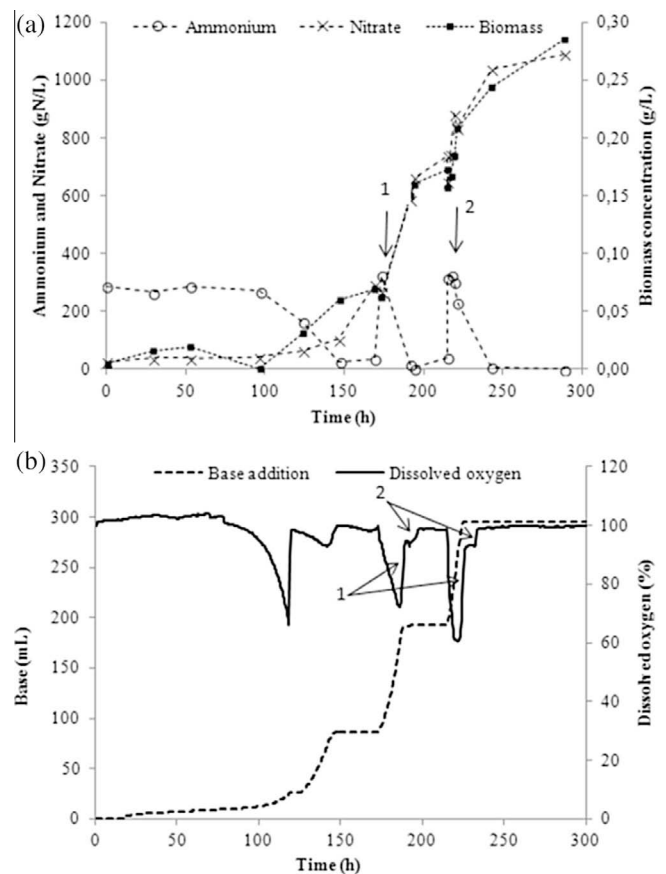


Fig. 3. (a) Evolution of the biomass, ammonia and nitrate concentrations during the coculture A. Arrows represent the addition of ammonia at 0.3 gN-NH₄⁺/L; (b) Evolution of the base addition and dissolved oxygen during the coculture A. Arrows 2 represent the end of the nitrite oxidation by *Nitrobacter winogradskyi* which occurred after the entire ammonia oxidation by *Nitrosomonas europaea* represented by Arrows 1.

biomass concentration, the dissolved oxygen and the base addition were reported in Fig. 4. The model provides a good fitting of the experimental results. It was able to simulate the addition of base in the reactor and also the evolution of the dissolved oxygen (Fig. 4b and Fig. 4c). The two phases of the oxygen recovery were represented by the model as the on-line follow-up of the dissolved oxygen highlighted in coculture A, Fig. 3b. The model was able to predict the nitrification done by *Nitrosomonas europaea* and the nitrification achieved by *Nitrobacter winogradskyi* and, not correlated to a base addition. The follow-up of the nitrification by measurement of the base volume addition and the differentiation of the two oxidation steps of the nitrification in the dissolved oxygen curve have not been studied up to now. The model was perfectly able to represent the growth of *Nitrosomonas* and *Nitrobacter* in a coculture, and also the nitrification done by these two bacteria. The coculture A validated the nitrification model developed from the pure cultures of *N. europaea* and *N. winogradskyi*.

The coculture B was running in carbon limitation. During this experiment, the carbon was only provided by the air diffused in the bioreactor for the aeration. In the coculture A, the carbon sources were the air but also the carbonates coming from the base solution which was a K_2CO_3 solution. This second coculture was

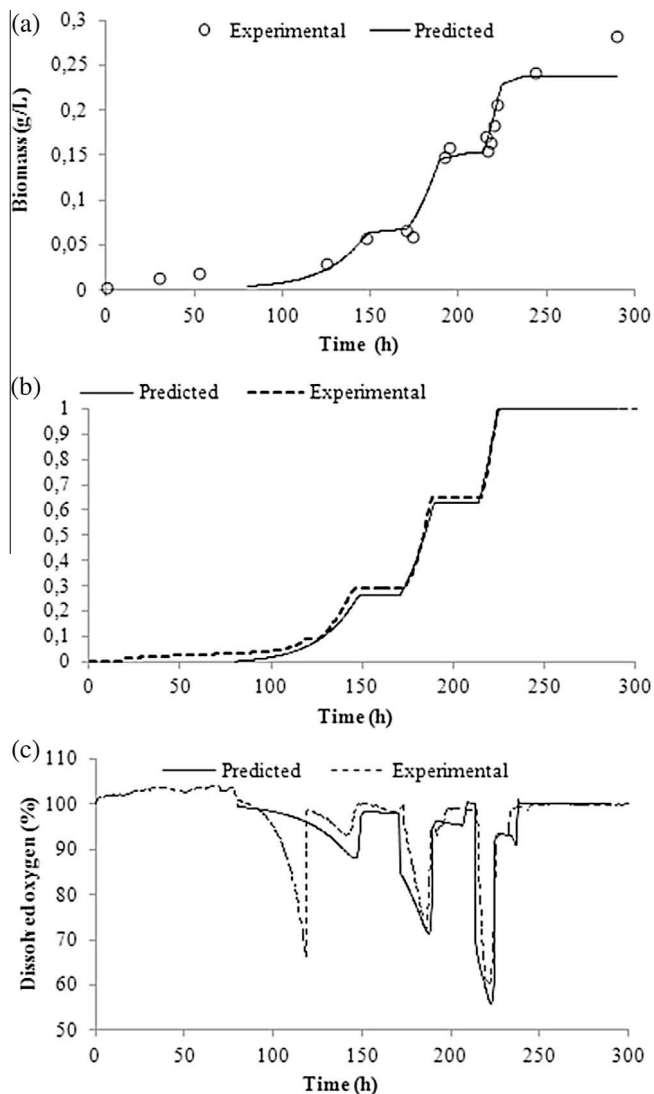


Fig. 4. Comparison between the predicted and experimental data during the coculture A; (a) Biomass concentration; (b) Base addition in the bioreactor; (c) Dissolved oxygen evolution.

used to check the predictability of the model in carbon limiting conditions. The experimental and predicted results were reported in Fig. 5. The experimental data were closed to the predicted ones by the model. The partial nitrification was also highlighted by the model as there were gaps in the dissolved oxygen curves representing the nitrite oxidation in Fig. 5b.

The complete mass balance model (stoichiometry, kinetic and bioreactor), with the kinetic parameters identified on pure cultures, was then able to successfully describe and predict the nitrification in cell-suspended bioreactor. It fulfilled the requirement of a model used in BLSS (mechanistic and predictive models) and can be used for developing a predictive control system. There was a good fitting between predicted and experimental online measurement such as the base addition and dissolved oxygen. In future control model, these two measurements can be used to quickly identify possible deviations between the model and experiment.

3.4. Partial nitrification evidence and nitrification prediction by the model

In MELISSA, the model developed is used as a predictive tool, as it helps to anticipate nitrite peaks which may be critical for other compartments of the loop. Partial nitrification is directly observed from the nitrite concentration predicted by the model (Fig. 5a). An indirect method using only the online variables was also used. In Fig. 6a, the predicted values of the base addition and of the oxygen gas fraction at the output of the reactor are used. The rate of the base addition is calculated on a moving time window of 30 min. Knowing the base solution normality, the H^+ production rate, due to NH_3 oxidation only, was calculated. The oxygen consumption rate is calculated from the gas mass balance. Two curves were then obtained: the H^+/O_2 ratio, calculated from the H^+ and O_2 rates, and the O_2 consumption rate. The state of nitrification was quickly determined from these two curves: for state 1, NH_3 is not completely oxidized into nitrate as the H^+/O_2 of 1.2 is higher than the

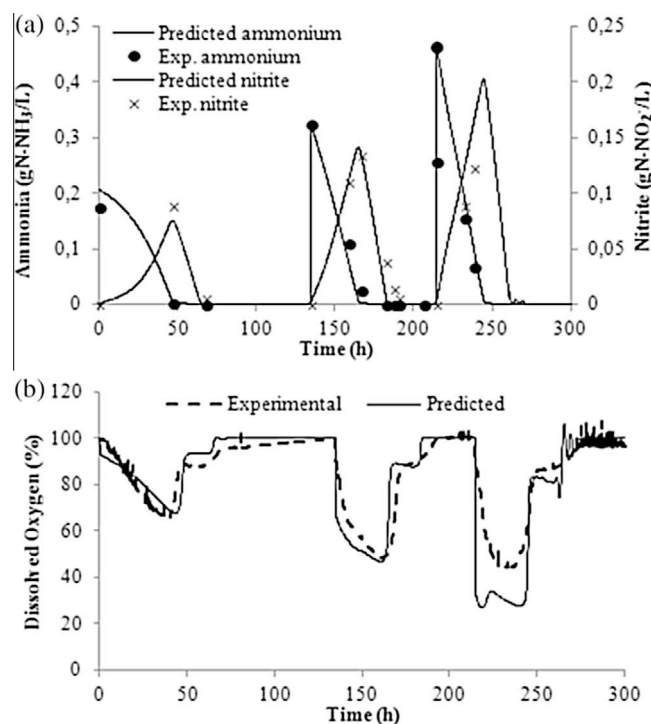


Fig. 5. Evolution of the predicted and experimental ammonium and nitrite concentrations (a) and the predicted and experimental dissolved oxygen (b) during the coculture B of *Nitrosomonas europaea* and *Nitrobacter winogradskyi*.

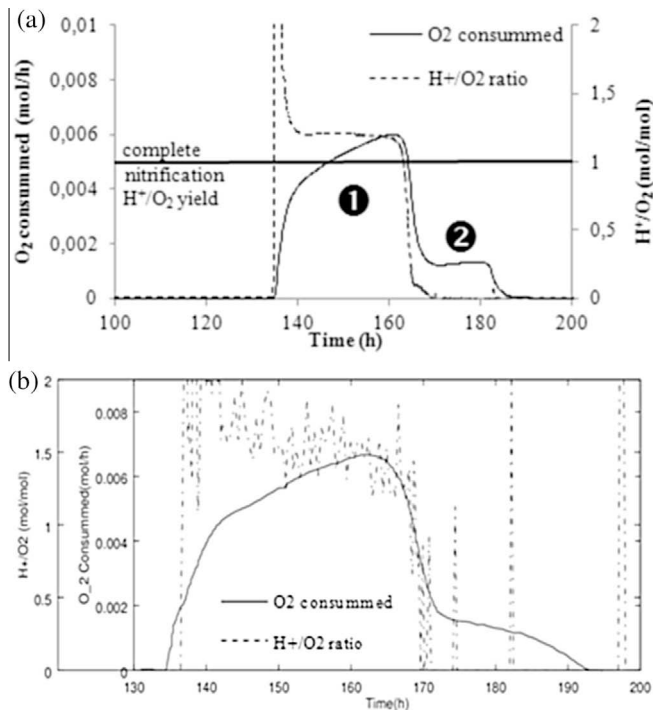


Fig. 6. Experimental evidence of partial nitrification during the coculture B interpreting online variables. (a) Predicted data during the coculture B: consumption of oxygen during the nitrification and theoretical yield H^+/O_2 during the nitrification. Phase 1 indicates incomplete nitrification and nitrite accumulation; phase 2 indicates nitrite oxidation during the nitrification; (b) Observation of the experimental oxygen consumption and H^+/O_2 ratio during the coculture B.

H^+/O_2 yield of complete nitrification (≈ 1 mol H^+ /mole O_2); in state 2, it remains an O_2 consumption without H^+ production, indicating only nitrite oxidation. It is possible to obtain the same results with experimental online data (Fig. 6b). As only dissolved oxygen is monitored, the oxygen consumption from gas balance cannot be calculated, and instead of oxygen consumption the $(100 - \%DO)$ is used, but the same trend of curve is obtained. It is possible to calculate a H^+/O_2 from the ratio $R = \text{rate of base addition}/(100 - \%DO)$, as:

$$\frac{H^+}{O_2} = R \cdot \frac{\text{base normality}}{10 \cdot VL \cdot K_L a \cdot O_2} \quad (15)$$

The estimation of the H^+/O_2 ratio from the dissolved oxygen value is not precise enough: around 1.2 by the model and 1.3–1.9 for the experimental data, for $K_L a$ respectively of 14–10 h^{-1} . Calculation from the gas balance could be better unless the measure of oxygen partial pressure was sensible enough.

4. Conclusions

Kinetic parameters of a Pirt model for *Nitrosomonas europaea* and *Nitrobacter winogradskyi* have been identified. Good prediction by the model has been obtained for a co-culture of the two strains. Two online measurements were identified as evidence of the partial nitrification: the addition of base and the oxygen consumption rate. These measurements were accurately predicted by the model and allowed precise control of the partial nitrification. This was a critical issue in the MELISSA process which will run in a closed loop. The monitoring of these on-line parameters led to the use of this model as a predictive control tool.

Supplementary results associated with this article for the pure cultures of *Nitrosomonas europaea* and *Nitrobacter winogradskyi* can be found in the online version.

Acknowledgement

This work was supported by the MELISSA project of European Space Agency (ESA).

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2016.08.090>.

References

- Beefink, H.H., van der Heijden, R.T.J.M., Heijnen, J.J., 1990. Maintenance requirements: energy supply from simultaneous endogenous respiration and substrate consumption. *FEMS Microbiol. Ecol.* 6, 203–209.
- Blackburne, R., Vadivelu, V.M., Yuan, Z., Keller, J., 2007. Kinetic characterisation of an enriched *Nitrosopira* culture with comparison to *Nitrobacter*. *Water Res.* 41, 3033–3042.
- Bock, E., Koops, H.P., Harms, H., 1989. Nitrifying Bacteria, *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Williams & Wilkins.
- Briou, N., Billen, G., 1998. Une réévaluation de la méthode d'incorporation de H14C03- pour mesurer la nitrification autotrophe et son application pour estimer des biomasses de bactéries nitrifiantes. *Rev. Sci. Eau* 11, 283–302.
- Cébron A., 2004. Nitrification, bactéries nitrifiantes et émissions de N_2O : la seine en aval de Paris (Thèse de doctorat).
- Farges, B., Poughon, L., Roriz, D., Creuly, C., Dussap, C.-G., Lasseur, C., 2012. Axenic Cultures of *Nitrosomonas europaea* and *Nitrobacter winogradskyi* in autotrophic conditions: a new protocol for kinetic studies. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 167, 1076–1091.
- Gòdia, F., Albiol, J., Montesinos, J.L., Pérez, J., Creus, N., Cabello, F., Mengual, X., Montras, A., Lasseur, C., 2002. MELISSA: a loop of interconnected bioreactors to develop life support in Space. *J. Biotechnol.* 99, 319–330, Highlights from ECB10 – Novel Bioactive Substances and Bioremediation Technologies.
- Grady, C.P.L., Lim, H.C., 1980. *Biological Wastewater Treatment: Theory and Applications*. M. Dekker Inc., New-York.
- Hendrickx, L., De Wever, H., Hermans, V., Mastrole, F., Morin, N., Wilmotte, A., Janssen, P., Mergeay, M., 2006. Microbial ecology of the closed artificial ecosystem MELISSA (Micro-Ecological Life Support System Alternative): reinventing and compartmentalizing the Earth's food and oxygen regeneration system for long-haul space exploration missions. *Res. Microbiol. Space Microbiol.* 157, 77–86.
- Henze, M. (Ed.), 2007. *Activated sludge models ASM1, ASM2, ASM2d and ASM3*, Reprinted, ed. Scientific and technical report/IWA. Scientific and technical report/IWA. IWA Publ, London.
- Hunik, J.H., Bos, C.G., van den Hoogen, M.P., De Gooijer, C.D., Tramper, J., 1994. Co-immobilized *Nitrosomonas europaea* and *Nitrobacter agilis* cells: validation of a dynamic model for simultaneous substrate conversion and growth in κ -carrageenan gel beads. *Biotechnol. Bioeng.* 43, 1153–1163.
- Keen, G.A., Prosser, J.I., 1987. Steady state and transient growth of autotrophic nitrifying bacteria. *Arch. Microbiol.* 147, 73–79.
- Keeney, D.R., Nelson, D.W., 1982. Nitrogen—inorganic forms. In: *Methods of Soil Analysis. Part 2. Chemical and Microbiological Properties*, Agronomy Monograph. American Society of Agronomy, Soil Science Society of America, Madison, WI, pp. 643–698.
- Lasseur, C., Tamponnet, C., Savage, C., 1993. MELISSA: current status and future development program. *SAE Technical Paper*.
- Leenen, E.J.T.M., Boogert, A.A., van Lammeren, A.A.M., Tramper, J., Wijffels, R.H., 1997. Dynamics of artificially immobilized *Nitrosomonas europaea*: effect of biomass decay. *Biotechnol. Bioeng.* 55, 630–641.
- Madigan, M.T., Martinko, J.M., Stahl, D., Clark, D.P., 2010. *Brock Biology of Microorganisms*, 13th ed. Benjamin Cummings, San Francisco.
- Monod, J., 1942. Recherches sur la croissance des cultures bactériennes.
- Montras, A., Pycke, B., Boon, N., Godia, F., Mergeay, M., Hendrickx, L., Pérez, J., 2008. Distribution of *Nitrosomonas europaea* and *Nitrobacter winogradskyi* in an autotrophic nitrifying biofilm reactor as depicted by molecular analyses and mathematical modelling. *Water Res.* 42, 1700–1714.
- Patton, C.J., Crouch, S.R., 1977. Spectrophotometric and kinetics investigation of the Berthelot reaction for the determination of ammonia. *Anal. Chem.* 49, 464–469.
- Pérez, J., Poughon, L., Dussap, C.-G., Montesinos, J.L., Gòdia, F., 2005. Dynamics and steady state operation of a nitrifying fixed bed biofilm reactor: mathematical model based description. *Process Biochem.* 40, 2359–2369.
- Pirt, S.J., 1982. Maintenance energy: a general model for energy-limited and energy-sufficient growth. *Arch. Microbiol.* 133, 300–302.
- Poughon, L., Dussap, C.-G., Gros, J.-B., 2001. Energy model and metabolic flux analysis for autotrophic nitrifiers. *Biotechnol. Bioeng.* 72, 416–433.
- Skinner, F.A., Walker, N., 1961. Growth of *Nitrosomonas europaea* in batch and continuous culture. *Arch. Für Mikrobiol.* 38, 339–349.
- Stein, L.Y., Arp, D.J., 1998. Loss of ammonia monooxygenase activity in *Nitrosomonas europaea* upon exposure to nitrite. *Appl. Environ. Microbiol.* 64, 4098–4102.

- Tsien, H.-C., Lambert, R., Laudelout, H., 1968. Fine structure and the localization of the nitrite oxidizing system in *Nitrobacter winogradskyi*. *Antonie Van Leeuwenhoek* 34, 483–494.
- Vadivelu, V.M., Keller, J., Yuan, Z., 2006a. Stoichiometric and kinetic characterisation of *Nitrosomonas* sp. in mixed culture by decoupling the growth and energy generation processes. *J. Biotechnol.* 126, 342–356.
- Vadivelu, V.M., Yuan, Z., Fux, C., Keller, J., 2006b. Stoichiometric and kinetic characterisation of *Nitrobacter* in mixed culture by decoupling the growth and energy generation processes. *Biotechnol. Bioeng.* 94, 1176–1188.
- Wittebolle, L., Verstraete, W., Boon, N., 2009. The inoculum effect on the ammonia-oxidizing bacterial communities in parallel sequential batch reactors. *Water Res.* 43, 4149–4158.