



HAL
open science

Mesure de l'activité nitrifiante des boues de filtres plantés de roseaux par respirométrie solide

V. Nordmann

► **To cite this version:**

V. Nordmann. Mesure de l'activité nitrifiante des boues de filtres plantés de roseaux par respirométrie solide. Sciences de l'environnement. 2010. hal-02593517

HAL Id: hal-02593517

<https://hal.inrae.fr/hal-02593517>

Submitted on 15 May 2020

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

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

TRAVAIL DE FIN D'ETUDES

Vincent NORDMANN
Ingénieur diplômé de l'Enges

FORMATION D'INGENIEUR
2007/2010
Promotion Somme

Mesure de l'activité nitrifiante des boues de filtres plantés de roseaux par respirométrie solide



CEMAGREF – groupement de Lyon

Maître de stage : Jean-Marc CHOUBERT
Co-encadrement : Ania MORVANNOU

Remerciements

Je voudrai tout d'abord remercier M. Jean Marc Choubert, mon responsable de stage qui m'a confié ce travail et m'a fait partager ses expériences. Sa confiance, ses conseils avisés et son soutien ont été les moteurs de ce stage.

Merci aussi à Ania Morvannou, thésarde au Cemagref de Lyon qui a encadré mon stage. Son aide et sa bonne humeur furent appréciées à leurs justes valeurs.

Merci encore à Pascal Molle, pour ses conseils avisés au cours de ce stage.

Je tiens également à remercier les membres du jury qui ont évalué mon travail

Merci à Julie Vincent, qui m'a régulièrement alimenté en boue de LSPR et m'a aidé à remplir les réacteurs. Ses qualités humaines sont indéniablement plus fortes que l'odeur de ses boues...

Le traitement des eaux usées perdrait de sa saveur, sans le doux fumet qui se dégage des étuves de séchage des boues...merci donc à Julien et Luis pour avoir régulièrement parfumé l'atelier.

Ce travail n'aurait pu être mené à bien sans l'aide de Clément et Olivier pour leurs soutiens techniques. Qu'ils reçoivent ici toute ma reconnaissance pour leur apport dans ce travail.

Enfin je tiens à remercier les autres stagiaires et collègues de bureau qui m'on permis de passer un stage riche en émotions : merci Alexandre, Camille, Claire, Léa, Marine, Maxime Nicolas, Najatte, Patrice, Sofiane, Ugo et Yixiu.

Résumé

Le traitement du carbone et de l'azote des eaux usées par les filtres plantés de roseaux est en forte expansion en France. Actuellement, son optimisation souffre de l'absence de mesure biologique au sein de ses réacteurs. Le stage a consisté à étudier l'activité de dégradation du carbone et de l'azote par respirométrie solide de matrices organiques, de filtres plantés de roseaux et de lits de séchage, pour la compréhension et la modélisation des filières. La méthode a consisté à mesurer la consommation d'oxygène au cours du temps sous conditions contrôlées non-limitantes. Nous avons mesuré les quantités de matières organiques biodégradables sur des échantillons de 1,25L de boues et matières de vidanges de lits de séchage, ainsi que les vitesses de nitrification sur des échantillons de 1,5L de graviers colonisés de FPRv. Les résultats obtenus donnent des consommations d'oxygène de 5500 à 1800 mmolO₂/kgMS pour les boues, de 5700 à 1050 mmolO₂/kgMS pour les matières de vidanges. Les vitesses de nitrification sont comprises entre de 1,1 et 1,5 mgO₂/gMVS/h pour les graviers colonisés. Le travail a également consisté à quantifier et améliorer les limites de l'outil : homogénéisation et tassage mécaniques, répétabilité/incertitudes, facteurs influant la mesure (propreté des tuyaux d'aération, composition et saturation préalable du liquide d'aspersion, influence du bois utilisé structurant). Enfin, les résultats ont été confrontés à des méthodes plus traditionnelles.

Abstract

The treatment of carbon and nitrogen of wastewater by vertical-flow constructed wetlands is more and more used in France. Today, the problem for optimization of the process is a lack of biological measure within its reactors. The subject of the training period is the study of degradation of carbon and nitrogen by solid respirometric method of organics wastes. This organics wastes is taken from vertical-flow constructed wetlands and drying reed beds. The purposes of those studies are to understand and model of this waters treatments process. The respirometric method is the measure of oxygen consumption as a function of time, under non-limiting conditions. We measured the quantities of biodegradable organic matters on representative samples (1.25L of sludge or septage), and the nitrification rate on 1.5L of colonized gravels taken from vertical-flow constructed wetlands. Oxygen uptake decreased from 5500 and 1800 mmolO₂/kgMS for organic matter degradation into a drying reed bed, and between 5700 and 1050 mmolO₂/kgMS for organic matter degradation into a septage. The nitrification rates are between 1.16 and 1.53 mgO₂/gMVS . h for colonized gravels. The work also consisted in quantify and improve the limits of the method : homogenization and mechanics tamp, repeatability / uncertainty, influencing operating conditions (cleanliness of the aeration pipes, composition and preliminary saturation of the liquid of spraying, influence of the wood for structuring used). Finally, the results were confronted with more traditional methods.

Sommaire

Table des abréviations.....	11
Introduction.....	13
1. Contexte général	15
1.1. Qu'est ce qu'un filtre planté de roseaux ?	15
1.2. Nécessité de la modélisation d'un filtre planté de roseaux à écoulement vertical. Etude sur le FPRv d'Evieu	16
1.3. Nécessité d'une meilleure connaissance de la stabilité biologique de boues de lit de séchage. Etude sur le LSPR d'Andancette	17
2. Bibliographie.....	19
2.1. La dégradation de l'azote	19
2.2. Méthodes de mesure d'une activité nitrifiante	19
2.2.1. Calorimétrie (self-heating test)	20
2.2.2. Dosage acido-basique.....	20
2.2.3. Respirométrie liquide	20
2.2.4. Respirométrie solide	21
2.2.5. La respirométrie liquide appliquée à un milieu solide	24
2.3. Conclusions de la bibliographie.....	24
3. Limites de la respirométrie solide observées au niveau de l'existant et investigations menées pour les repousser.....	25
3.1. Limites de la respirométrie solide vis-à-vis de la dégradation du carbone.....	25
3.1.1. Répétabilité des résultats.....	25
3.1.2. Le bois utilisé comme structurant est une source de carbone potentielle pour la biomasse contenue dans les boues.....	26
3.2. Limites de la respirométrie solide vis-à-vis de la vitesse de nitrification sur des graviers colonisés de FPRv	26
3.2.1. Répétabilité de la mesure de nitrification.....	26
3.2.2. La précision de la mesure pour les différents paramètres d'évaluation de la vitesse de nitrification	26
3.2.3. Les réactions parasites dues à la méthode utilisée	27
3.2.3.1. Le bois.....	27
3.2.3.2. Les bactéries des tuyaux et des réacteurs.....	27
3.2.3.3. L'eau utilisée pour la solution d'ammonium injectée	27
3.2.4. Comment s'affranchir du stock d'azote présent initialement dans le mélange graviers/boues.....	28
3.2.5. Quel facteur prendre en compte pour évaluer la vitesse de nitrification ?	28

3.2.6.	Corrélation entre les paramètres mesurés en respirométrie solide et les résultats d'autres méthodes	28
4.	Matériels et méthodes	29
4.1.	Présentation d'une semaine d'expérience type pour l'étude de la dégradation du carbone de boues de LSPR	29
4.1.1.	L'échantillonnage des boues de LSPR	29
4.1.2.	Le remplissage des réacteurs	29
4.2.	Méthodes de tassage des mélanges solides dans un réacteur	29
4.2.1.	Tassage manuel	29
4.2.2.	Tassage mécanique	29
4.3.	L'influence du bois vis à vis de la dégradation du carbone	31
4.4.	Présentation d'une semaine d'expérience type pour l'étude de la vitesse de nitrification .	31
4.4.1.	L'échantillonnage des boues et des graviers colonisés.....	31
4.4.2.	Le remplissage des réacteurs	31
4.4.3.	Injection / obtention du respirogramme	31
4.5.	Calcul de la vitesse de nitrification.....	32
4.5.1.	$\Delta_{O_2 \max}$ et R_{O_2}	32
4.5.2.	Pente.....	32
4.6.	Précision de la mesure en respirométrie solide.....	32
4.7.	Influence du bois lors de la nitrification en milieu solide.....	33
4.7.1.	Injection de solution d'ammonium dans un réacteur vide	33
4.7.2.	Mélange bois / graviers colonisés autoclavé.....	33
4.7.3.	Bois imbibé d'eau usée autoclavée	33
4.8.	Influence des éléments périphériques aux réacteurs (ex : tuyaux)	33
4.9.	Influence de l'eau utilisée lors d'une bâchée pour l'étude de la vitesse de nitrification	34
4.9.1.	Taux d'oxygène dissous de l'eau injectée	34
4.9.2.	Injection et mesures	34
4.10.	Comparaison des sources de consommation d'oxygène aux respirations des matrices étudiées	34
4.11.	Influence du nombre de bâchées sur les paramètres d'évaluation de la vitesse de nitrification	35
4.11.1.	Succession d'aspersions deux fois par jour pendant trois jours	35
4.11.2.	Recirculation du percolat pendant trente minutes.....	35
4.12.	Une autre méthode de mesure de la vitesse de nitrification : la recirculation des gaz sans apport d'air extérieur	36

4.13.	Mesure de la respiration des bactéries nitrifiantes pendant 2h ou 12h.....	36
4.14.	Corrélation entre les résultats de la respirométrie solide et ceux de l'analyse chimique des percolats des réacteurs.....	37
5.	RESULTATS.....	39
	Cette partie apporte des éléments de réponses aux questions suivantes :	39
5.1.	Influence du tassage vis-à-vis des mesures sur la dégradation du carbone	39
5.1.1.	Sur la répétabilité de la mesure de consommation du carbone	39
5.1.2.	Influence du tassage sur l'amplitude de la mesure de consommation du carbone	41
5.2.	Le bois inhibe-t-il ou stimule-t-il l'activité bactérienne lors de la mesure de la minéralisation du carbone ?.....	41
5.3.	Utilisation des pentes du respirogramme pour évaluer la vitesse de nitrification	42
5.4.	Influence de la méthode de tassage sur la mesure de vitesse de nitrification	44
5.4.1.	Pour la répétabilité.....	44
5.4.2.	Impact sur l'amplitude de la mesure.....	46
5.5.	Estimation de la précision de mesure par respirométrie solide	46
5.6.	Influence des bactéries présentes sur le bois lors d'une mesure de nitrification en respirométrie solide	48
5.7.	Influence de l'état des tuyaux	50
5.8.	Influence du type d'eau utilisée pour les bâchées	52
5.9.	Respiration de la matrice étudiée comparée aux consommations liées au protocole (mesure de la vitesse de nitrification).....	54
5.9.1.	Les boues de FPRv	54
5.9.2.	Les graviers colonisés	54
5.10.	Influence du rythme des bâchées	56
5.10.1.	Expérience sur quatre jours.....	56
5.10.2.	Recirculation du percolat pendant 30 minutes.....	57
5.11.	Une autre méthode de mesure de la vitesse de nitrification : la recirculation des gaz sans injection d'air extérieur	59
5.12.	Mesure de la respiration des bactéries nitrifiantes pendant 2h ou 12h.....	60
5.13.	Corrélation entre les résultats de la respirométrie solide et ceux de l'analyse chimique des percolats de respirométrie solide.....	61
5.14.	Résultats sur les boues et graviers	63
5.14.1.	Pour l'étude de la dégradation de la matière organique des boues de LSPR	63
5.14.2.	Pour l'étude de la vitesse de nitrification des graviers de FPRv.....	63
	Conclusion	65
	Bibliographie.....	67

Annexes 71

Table des abréviations

DBO₅ : demande biologique en oxygène mesurée pendant cinq jours

ERU : eaux résiduaires urbaines (eaux usées d'origines urbaines)

FPRh : filtre planté de roseaux à écoulement horizontale

FPRv : filtre planté de roseaux à écoulement verticale

LSPR : lit de séchage planté de roseaux

RSD : relative standard deviation (coefficient de déviation)

Introduction

La filière filtre planté de roseaux à écoulement vertical est une des solutions de référence pour le traitement des eaux résiduaires des petites communautés urbaines de moins de 2000 équivalents-habitants. Sa conception et son fonctionnement sont actuellement principalement basés sur des connaissances empiriques. Dans le but d'optimiser ses performances, le Cemagref de Lyon travaille sur une modélisation numérique de ce procédé.

Afin de pouvoir le modéliser, il est nécessaire d'avoir une connaissance approfondie des mécanismes hydrauliques et biologiques s'y déroulant. C'est dans le but d'approfondir les connaissances du fonctionnement biologique de ce procédé que mon stage de fin d'étude a eu lieu. La respirométrie solide semblait particulièrement adaptée à l'étude de l'activité biologique des graviers colonisés et boues de filtres plantés de roseaux. C'est une technique qui est déjà utilisée et reconnue pour l'étude de matrices liquides (boues activées) dans le domaine du traitement des eaux usées. L'adaptation de la méthode à des matrices solides, telles que les boues et les graviers, est en cours au Cemagref de Lyon.

L'azote sous forme d'ammonium est un des polluants majeurs des eaux résiduaires urbaines. L'étude de la vitesse de nitrification au sein des filtres plantés de roseaux est donc primordiale. Une grande partie de mon stage fut donc consacrée à l'adaptation de la méthode de respirométrie solide, pour l'étude de la vitesse de nitrification (dans la continuité des travaux effectués depuis deux ans au Cemagref de Lyon). L'autre but du stage fut d'évaluer l'évolution de la stabilité biologique des boues de filtres plantés de roseaux et de celles de lits de séchage plantés de roseaux, et de matières de vidange ?.

Ce rapport présente le contexte de l'étude au niveau des différents systèmes de traitements des eaux usées, puis les moyens d'études de la vitesse de nitrification dont on dispose. Ensuite nous avons recensé les limites de la respirométrie solide pour l'étude de la vitesse de nitrification et la mesure de la stabilité des boues. Enfin nous apportons des réponses aux limites soulevées.

1. Contexte général

Avec l'augmentation de la création de réseau d'assainissement collectif pour des petites communautés urbaines (<5000 équivalent habitants (EH)), des systèmes de traitement des eaux résiduaires urbaines (ERU) moins coûteux que les techniques intensives (boues activées, disque biologique ou lits bactériens) se développent. Parmi les solutions de traitement des effluents des petites communautés urbaines, les filtres plantés de roseaux sont de plus en plus utilisés pour les communautés inférieures à 2000 EH. On estime à 400 le nombre de filtres plantés utilisés en 2004, avec une croissance du secteur d'environ 100 stations supplémentaires par an (Boutin *et al*, 2007). Il y a donc environ 1000 communes équipées de cette filière de traitement actuellement.

1.1. Qu'est ce qu'un filtre planté de roseaux ?

Les filtres plantés sont des excavations étanchées du sol, remplies de couches superposées de graviers ou de sable, de différentes granulométries suivant la qualité des eaux usées à traiter. L'influent est réparti sur la surface du filtre et s'écoule en son sein en subissant un traitement physique (filtration) et biologique (biomasse fixée sur support fin). Les eaux épurées s'écoulent vers des drains, puis sont envoyées dans le milieu naturel, ou vers une bêche de relevage pour être de nouveau traitées sur un autre filtre.

On distingue les filtres plantés à écoulement vertical et à écoulement horizontal:

- Les filtres plantés de roseaux à écoulement vertical (FPRv, Figure 1) : En France, les eaux arrivant sur les filtres verticaux d'un premier étage de traitement, ne subissent au préalable qu'un dégrillage. Pour assurer une bonne répartition hydraulique, les filtres sont alimentés par bâchées (6 à 10 /jour). Le milieu réactionnel est insaturé en eau et en oxygène. La plupart du temps, deux étages de filtres sont mis en place pour assurer un traitement fiable (Langergraber *et al*, 2010). Le dimensionnement des filtres verticaux n'est pas basé sur la modélisation théorique du procédé, mais sur une connaissance empirique de son fonctionnement. C'est dans ce type de filtre qu'a lieu la nitrification.

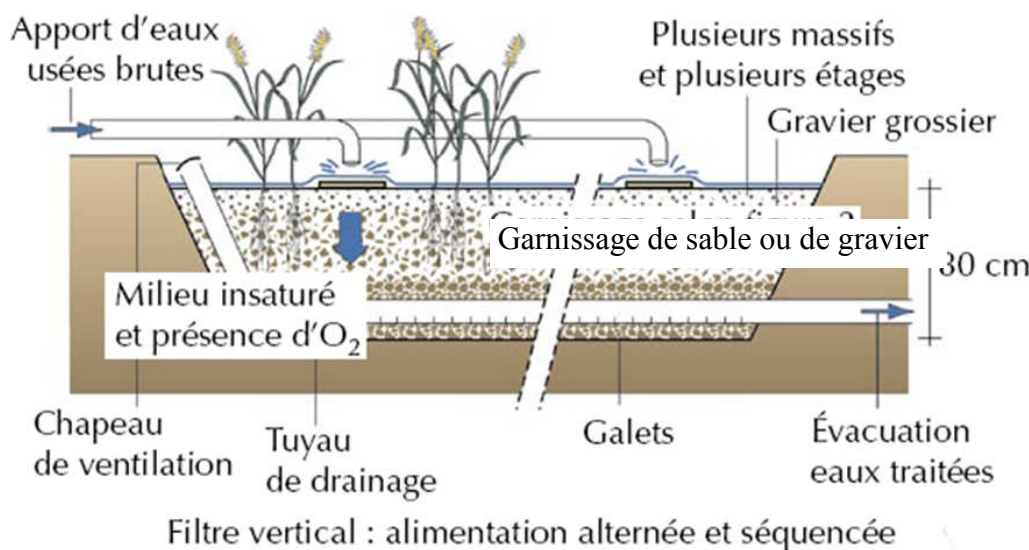


Figure 1 : schéma d'un filtre planté de roseaux à écoulement vertical (source : Boutin *et al*, 2007)

- Les filtres plantés de roseaux à écoulement horizontal (FPRh, Figure 2) : A la différence des FPRv, ici le massif filtrant est totalement saturé en eau. La plupart du temps l'alimentation est continue. Les bases théoriques du dimensionnement ont été élaborées suivant deux principes : Un écoulement piston et un couplage avec des cinétiques de réactions biologiques irréversibles du 1^{er} ordre. Ces modèles permettent de prévoir la concentration en sortie d'un polluant en fonction de celle en entrée. Ce type de filtre est le lieu de la dénitrification pour ce qui est du traitement de l'azote (Molle et al, 2005). On peut y associer un traitement chimique, par exemple pour retenir les phosphates. Un matériau de filtration à base d'apatite peut être utilisé comme catalyseur pour la précipitation des phosphates (Harouiya et al, 2010)

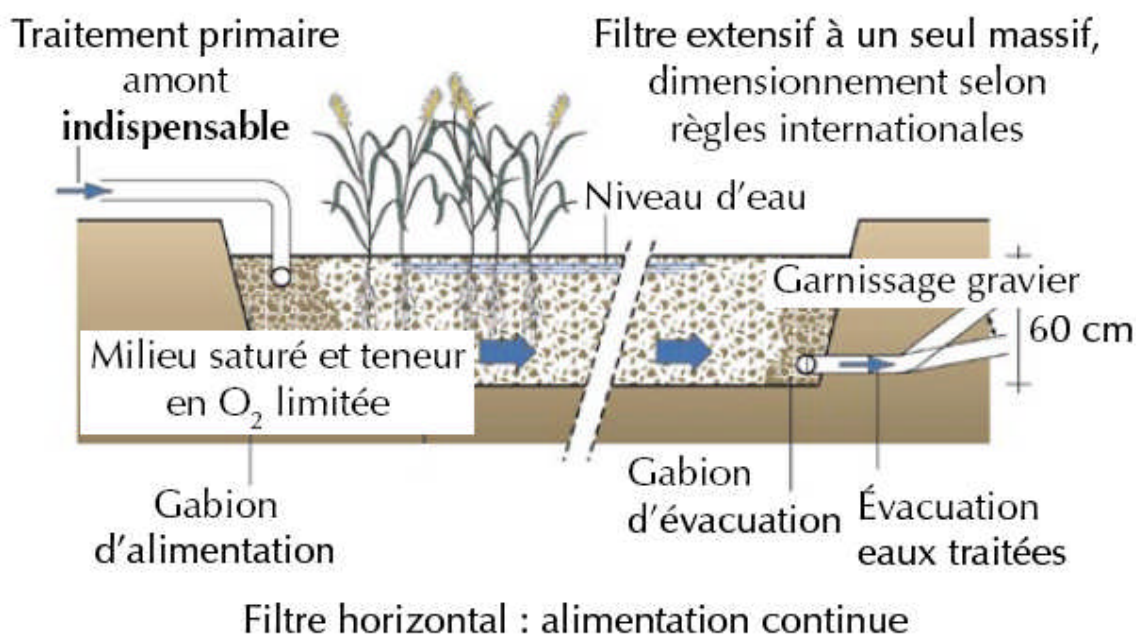


Figure 2 : schéma d'un filtre planté de roseaux à écoulement horizontal (source : Boutin et al, 2007)

Il peut être intéressant de coupler un ou deux étages de FPRv en premier étage avec un FPRh pour la dénitrification.

Une configuration proche de la configuration en FPRv est également utilisée pour la déshydratation des boues de procédés de traitement secondaires. On parle alors de lits de séchage plantés de roseaux (ou LSPR) (Troesch et al, 2009).

1.2. Nécessité de la modélisation d'un filtre planté de roseaux à écoulement vertical. Etude sur le FPRv d'Evieuv

Les stations d'épurations constituées de FPRv peuvent être conçues et exploitées en se basant sur des connaissances empiriques issues de divers retours d'expérience (Cemagref, Satese, Agences de l'eau, Collectivités, Onema...). Les résultats obtenus sont satisfaisants mais les informations sur leur fonctionnement en régime dynamique, et particulièrement sous des conditions pénalisantes de fonctionnement (apports importants dus à la pluie, températures hivernales, rejet ponctuel, par exemple) sont lacunaires. Une modélisation dynamique fiable est nécessaire pour optimiser les performances sous ces conditions. Cette modélisation constitue le sujet de la thèse d'Ania Morvannou au sein de l'équipe Epuration du

Cemagref de Lyon. Elle se base sur des connaissances théoriques en modélisation, hydraulique, filtration, transfert de matière, mais aussi sur des analyses de l'activité biologique de boues et graviers colonisés directement issues de stations existantes. La station pilote retenue est la station d'Evieu dans l'Ain.

La station d'épuration d'Evieu est suivie régulièrement par le Cemagref depuis sa construction en 2004 dans le cadre de plusieurs projets de recherche. Située sur une petite commune de 100 habitants dans l'Ain (01), elle se compose :

- d'un dégrillage grossier (séparation des grosses impuretés) effectué avant le poste de relevage d'entrée ;
- d'un premier étage de 3 filtres plantés de roseaux à écoulement vertical (il y en a 3, ce qui permet un temps de repos de 6 jours, lorsque l'un est alimenté pendant 3 jours). En leur sein, des processus de dégradation aérobie ont lieu, car le filtre est aéré par les drains ouverts sur l'air extérieur. **Ce sont les boues et les graviers issues de ces filtres dont nous cherchons à connaître les vitesses de nitrification, pour ultérieurement alimenter le modèle numérique de FPRv ;**
- d'un second étage de 2 filtres plantés de roseaux à écoulement horizontal, au sein duquel ont lieu les processus de dégradation anaérobie et anoxie. Ce filtre est étudié dans le cadre d'un autre projet de recherche visant à tester les performances des apatites (famille de roches riches en phosphates) dans le traitement du phosphore ;

C'est sur le premier étage que des boues et des graviers ont été prélevés et ont fait l'objet de caractérisation de l'activité nitrifiante par respirométrie solide.

1.3. Nécessité d'une meilleure connaissance de la stabilité biologique de boues de lit de séchage. Etude sur le LSPR d'Andancette

Le Cemagref de Lyon étudie la possibilité d'utiliser des lits de séchage plantés de roseaux (LSPR) pour traiter les matières de vidanges (boues provenant de système d'assainissement non collectifs) et les boues secondaires. Cette étude se fait sur un pilote implanté sur le site de la station de traitement des eaux usées d'Andancette (26). L'intérêt de l'utilisation des LSPR pour les matières de vidange est le faible coût à l'installation et à l'exploitation. Or leur traitement qui se fait habituellement en STEP entraîne des coûts de transports importants.

Les LSPR fonctionnent sur le même principe que les FPRv à la différence qu'au lieu d'être alimenté par des ERU brutes ils le sont par des boues de bassin d'aération ou des matières de vidange. L'effluent appliqué est donc beaucoup plus chargé en matière organique particulaire.

L'activité (stabilité) biologique de ces matrices, par respirométrie solide, a été l'un des objectifs de mon travail. En effet, celle-ci permet d'évaluer la quantité de matière organique biodégradable. Cette technique a d'abord été mise au point pour l'étude des composts, et j'ai participé à son adaptation pour l'étude des boues de LSPR (Tremier et al, 2005 ; Choubert et al, 2010).

2. Bibliographie

2.1. La dégradation de l'azote

L'azote contenu dans les eaux résiduaires urbaines (ERU) est principalement présent sous forme d'ammonium (NH_4^+) qui est un produit de la dégradation spontanée de l'urée. La forme basique (NH_3) est toxique pour les poissons et les invertébrés aquatiques (la concentration maximale sans effet est estimée entre 0,02 et 0,025mg/L, (FNDAE n°25, 2002). La nitrification de NH_4^+ dans le milieu naturel est consommateur d'oxygène (4,3 g d' O_2 consommé pour 1 g d'ammonium dégradé) ce qui rentre en concurrence avec la respiration des autres organismes vivants. Une trop forte quantité d'ammonium dans le milieu naturel provoque en saison estival la mortalité de la faune aquatique.

La nitrification est la transformation de l'ammonium en nitrites (NO_2^-) puis en nitrates (NO_3^-), elle est consommatrice d'oxygène. Elles se déroulent dans les FPRv. La dénitrification ayant lieu dans les FPRh. Dans notre étude, on cherche donc à évaluer la vitesse de nitrification d'un FPRv d'Evieu afin d'alimenter le model numérique de FPRv.

Si l'on souhaite isoler ces deux étapes pour les étudier séparément, il est fait état de plusieurs méthodes :

- L'utilisation d'inhibiteurs de l'une des deux réactions (Ginestet *et al*, 1998 ; Chandran *et al*, 2000).
- Alimenter avec des ions nitrites en début de réaction pour mesurer l'activité d'oxydation des nitrites, puis faire l'expérience avec de l'ammonium et soustraire l'activité nitratante mesurée précédemment (Souef, 2008).

Cependant, la priorité est d'analyser la nitrification de façon globale. L'équation chimique simplifiée de la nitrification s'écrit :



Il est aussi nécessaire de prendre en compte les mécanismes biologiques en jeu, comme l'assimilation de l'azote par les bactéries. L'équation devient alors (Henze *et al*, 1995) :



On remarque en particulier qu'un des réactifs étant le carbonate HCO_3^- , il faudra en introduire (en quantité stœchiométrique au moins) dans l'effluent synthétique utilisé pour les mesures de vitesse de nitrification en milieu solide. Il faut aussi noter la transformation de 2% de l'azote ammoniacal en azote organique.

2.2. Méthodes de mesure d'une activité nitrifiante

Plusieurs méthodes existent pour mesurer l'activité biologique des boues. Cette activité se traduit principalement par une oxydation des composés carbonés, de l'azote et du phosphore organique et inorganique. Les méthodes consistent donc, soit à mesurer la chaleur produite par ces oxydations, soit à procéder à des analyses chimiques des substrats ou des produits

azotés des réactions, ou encore à mesurer la disparition de l'accepteur d'électrons (O_2). Ces méthodes sont validées et largement utilisées pour mesurer l'activité de substrats liquides (boues activées), mais la littérature n'est pas très fournie en matière de mesure sur des substrats solides (comme les boues et graviers issues de FPRv). De plus dans le cas de la nitrification, le réactif (ammonium) doit être présent sous forme dissoute, donc liquide. Ainsi, en FPRv, il est nécessaire d'en apporter en continu à la matrice à caractériser (boue et graviers colonisés) par du liquide chargé en ammonium, dans un milieu aéré, afin d'avoir un temps de contact suffisant.

2.2.1. Calorimétrie (self-heating test)

Cette méthode consiste généralement à mettre l'échantillon dans une enceinte calorifugée, et à suivre les variations de température à l'intérieur, de façon à suivre la vitesse de production de l'énergie, et donc la vitesse globale des réactions exo/endothermiques.

Les réactions de nitrification et dénitrification sont exothermiques ($\Delta H^\circ = -259 \text{ kJ/molN}$ pour la nitrification, $\Delta H^\circ = -99.4 \text{ kJ/molN}$ pour la dénitrification). Cette méthode a déjà été éprouvée avec des boues activées (Daverio et al, 2003) et a donné des résultats satisfaisants.

Cependant, la calorimétrie ne permet pas de faire la différence entre la respiration des bactéries et d'autres phénomènes exothermiques habituellement présents dans les réacteurs comme des réactions exothermiques chimiques ou biochimiques (Barrena et al, 2006). D'autre part, la précision de la mesure (écart de température de l'ordre de $0,1 \text{ }^\circ\text{C}$ pour la nitrification) rend cette méthode difficilement applicable à des graviers colonisés de FPRv. En effet le milieu n'est pas homogène, l'aspersion ainsi que l'aération peuvent entraîner des variations de température supérieures à $0,1 \text{ }^\circ\text{C}$.

2.2.2. Dosage acido-basique

La nitrification d'un ion ammonium s'accompagne de la production de 2 ions H^+ , donc de l'acidification de la solution. Dans un réacteur liquide où a lieu une réaction de nitrification, on peut procéder à une régulation de pH par ajout d'acide/base. La quantité d'acide/base ajoutée donne alors une estimation de l'activité nitrifiante du milieu étudié (Gernaey et al, 2001, Gapes et al, 2003).

Cependant, dans le cas de boues solides, il nous est impossible de mesurer le pH du milieu réactionnel. On pourrait mesurer le pH des liquides d'aspersion et des percolats, mais le fait que l'eau récupérée dans le percolat soit chargée en divers autres composants fausserait les résultats. De plus, pour prendre en compte la composante temporelle avec cette méthode, il faudrait analyser les percolats en continu, ce qui nécessite un gros effort d'analyse, et des volumes suffisants, qui ne peut être mis en place lors de cette étude.

2.2.3. Respirométrie liquide

La respirométrie est la mesure de la consommation en oxygène d'un échantillon et/ou de sa production de dioxyde de carbone. Elle peut se faire par analyse des gaz d'entrée/sortie du réacteur, et par mesure de la quantité d'oxygène dissous dans le cas des substrats liquides. Cette technique est principalement utilisée pour mesurer la respiration liée à la consommation de carbone organique ou pour mesurer l'activité nitrifiante des milieux liquides, spécialement celles des boues activées de stations d'épuration. Pour différencier les respirations issues de la dégradation des différentes espèces, on peut faire appel à des inhibiteurs (Ginestet et al, 1988, Chandran et al, 2000) afin qu'une seule réaction soit observable. On peut aussi interpréter les courbes en différenciant des phases successives et en émettant des hypothèses sur la cinétique des réactions (Souef, 2008).

On distingue deux principaux types de respirométrie, choisis en fonction de l'intensité de l'activité du milieu étudié :

Respirométrie statique :

La respirométrie statique consiste à mesurer la consommation d'oxygène dans un milieu fermé. Seul l'oxygène présent initialement dans le milieu peut donc être consommé. On mesure la composition de l'air à l'instant initial ainsi qu'à la fin de l'expérience. Par cette technique, on peut par exemple mesurer la DBO_5 d'un échantillon de faible activité biologique.

Avantage :

- Une meilleure précision due à l'absence d'entrées/sorties dans les bilans matières.
- Relative simplicité des installations

Inconvénients :

- Impossibilité de faire des mesures sur des boues à forte activité, du fait de la faible quantité d' O_2 disponible si le volume du réacteur reste raisonnable.

La respirométrie dynamique :

La respirométrie dynamique consiste à mesurer la consommation d'oxygène de la boue en l'alimentant en air de façon continue. On calcule la consommation par différence entre les compositions des gaz d'entrée et de sortie. Ces concentrations sont mesurées à intervalle régulier d'une heure dans le cas de la mesure de l'activité endogène (dégradation lente des matières organiques). Pour améliorer la diffusion de l'air et donc l'accessibilité de l'oxygène pour les micro-organismes, on peut également mettre en place un système de recirculation de l'air.

Avantage :

- Applicable à des échantillons de forte activité car la quantité d'oxygène disponible ne sera pas limitante.
- Amélioration des transferts de matière grâce à la recirculation de l'air.
- Avec le matériel disponible au Cemagref, on peut analyser les gaz en continu

Inconvénient :

- Dispositif expérimental beaucoup plus lourd

2.2.4. Respirométrie solide

La respirométrie en phase solide est beaucoup moins présente dans la littérature car elle est plus récente. Des études de compostage ont cependant conduit à l'élaboration de protocoles de respirométrie solide (Tremier et al, 2005 ; Adani et al, 2004) mais seulement pour mesurer la stabilisation de compost (étude de la quantité de matière organique présente). Le fait d'étudier la nitrification de substrats solides par respirométrie est donc original.

Les études préalables menées au Cemagref de Lyon (de Saléon, 2008 ; Philippe, 2009) et au Cemagref de Rennes (Tremier et al, 2005) nous permettent de commencer avec certains acquis et du matériel déjà présent, et en particulier en ce qui concerne le structurant (favoriser l'aération) et le système d'aspersion. En effet afin de favoriser le passage de l'air dans la matrice extraite du FPRv (gravières colonisés) on utilise des copeaux de bois (de Saléon 2008).

Pour étudier la vitesse de nitrification, il faut injecter une solution d'ammonium et de carbonate (voir figure 3), dont le système d'aspersion a été mis au point l'année dernière (Philippe, 2009). A chaque expérience de nitrification, un litre de solution d'ammonium et de carbonate est injecté en fine gouttelettes sur le mélange de bois et de gravières.

Après l'injection d'ammonium, on peut mesurer un respirogramme qui permet de calculer la ligne de base en début et en fin d'expérience ainsi que le Δ_{O_2} , la pente maximum et pente $n^{\circ}2$, ainsi que le R_{O_2} (voire figure 4 et 5)

Intérêts :

- Bonne modélisation du phénomène d'alimentation dans un FPRv.
- Mesure précise de la respiration des graviers et des boues.
- Pas de limite liée à la charge organique des graviers.

Limites :

- Percolation très rapide
- Matériel assez couteux

Remarque concernant l'analyse des gaz :

On peut mesurer simultanément la consommation en O_2 et la production de CO_2 . Cependant on se passera de l'analyse de la consommation de CO_2 car elle est sujette à des une compétition de réactions physicochimiques (dissolution, équilibre calco-carbonique). La méthode de mesure de la production de CO_2 souffre de sa solubilité dans l'eau (environ 20 fois supérieure à celle de l' O_2) et du fait que cette solubilité dépende du pH, surtout autour de 6,37 (pKa du CO_2 en solution). De plus, l'analyseur de gaz que nous avons à notre disposition est plus précis pour l'oxygène (cellule de mesure paramagnétique selon le principe de la déviation de l' O_2) que pour le CO_2 (cellule de mesure infrarouge).

L'avantage le plus essentiel de la respirométrie est le fait qu'elle permet de suivre en temps réel la consommation d'oxygène, donc l'intensité de la dégradation.

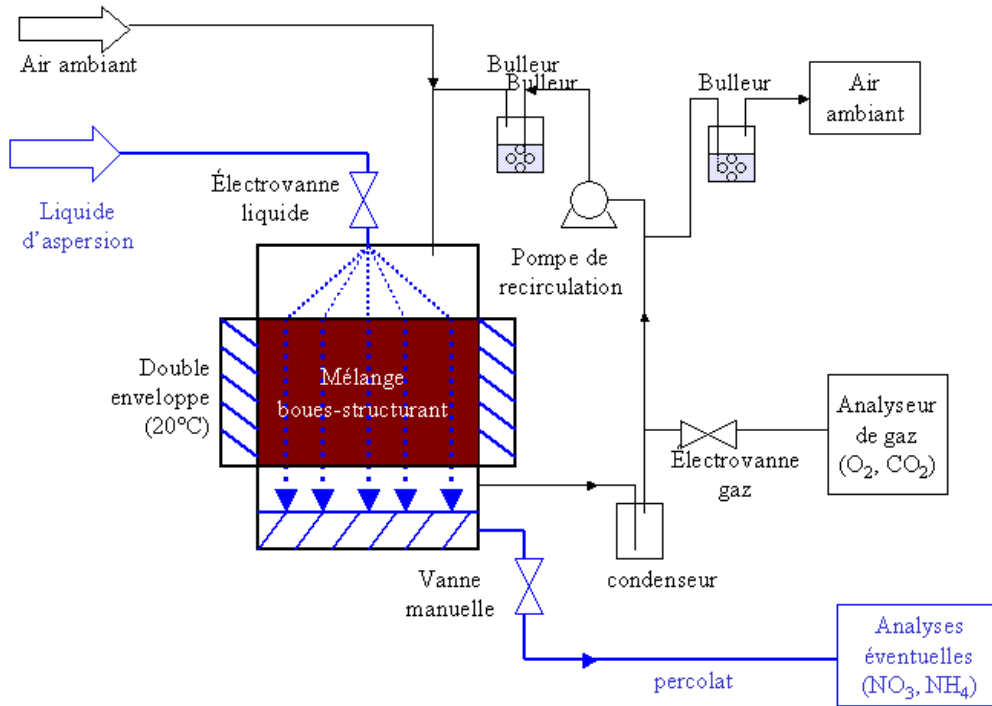


Figure 3 : schéma d'un réacteur et des circuits d'air et de liquide utilisés en respirométrie solide (Philippe, 2009)

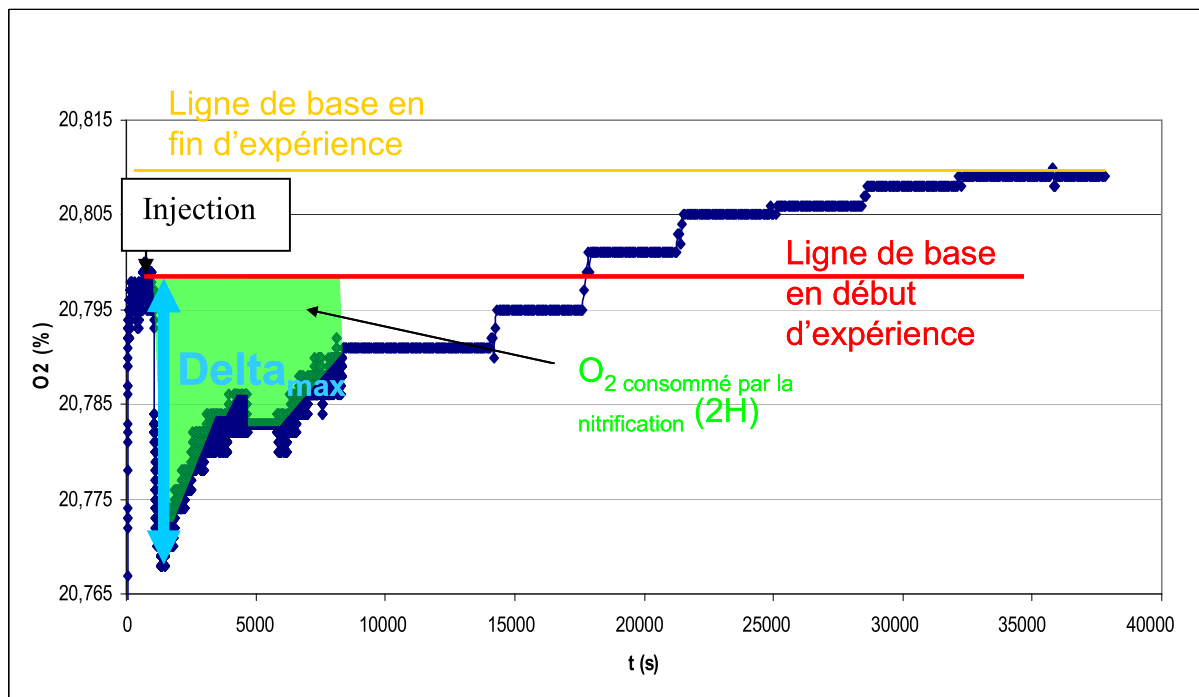


Figure 4 : respirogramme type

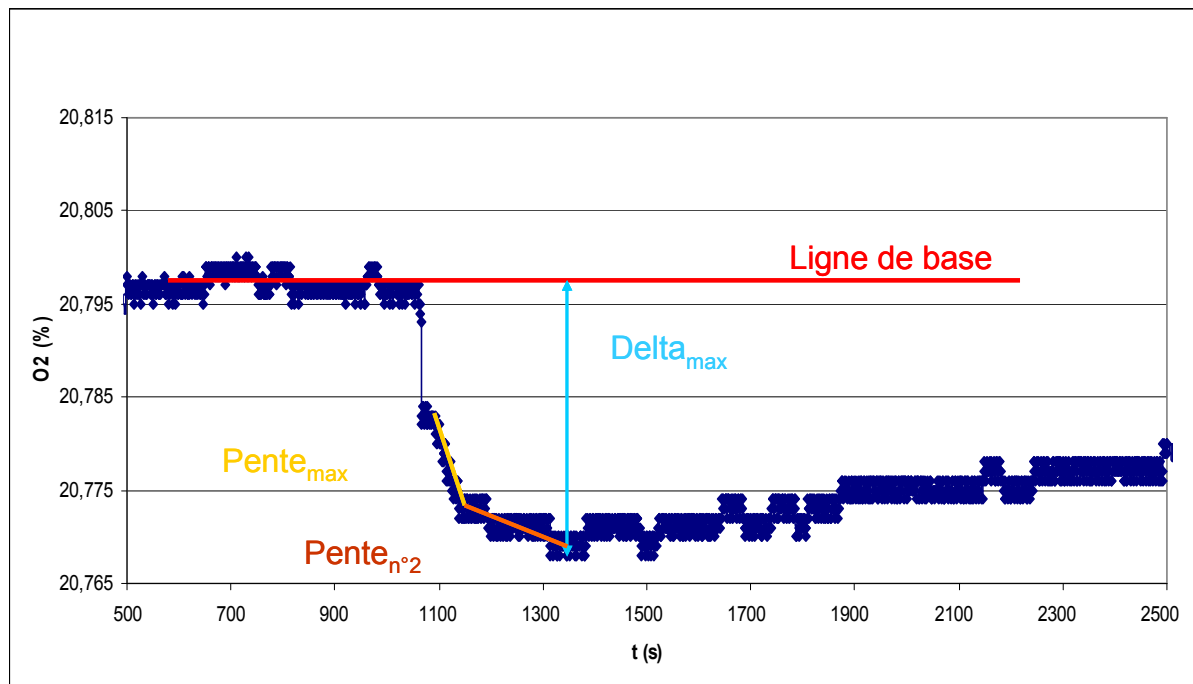


Figure 5 : respirogramme type

2.2.5. La respirométrie liquide appliquée à un milieu solide

Le principe est celui de la mesure de l'oxygène en milieu liquide, en amont et en aval d'une colonne poreuse (Andreottola et al, 2007). On impose un taux d'oxygène par bullage en tête de colonne avant que le fluide ne percole au sein d'une colonne remplie de graviers colonisés. On obtient ainsi un respirogramme représentant les variations d'activités de la biomasse.

Ce principe permet d'augmenter le temps de contact entre le biofilm des graviers et l'effluent. Par contre il ne reproduit pas les cycles d'alimentation par bâchées comme c'est le cas en respirométrie solide, et la colonne est complètement immergée.

Compte-tenu de ces points faibles, cette méthode n'a pas été utilisée au sein du laboratoire.

2.3. Conclusions de la bibliographie

La respirométrie a déjà été utilisée pour mesurer l'activité nitrifiante de boues activées mais seulement en milieu liquide. La respirométrie solide a déjà servi à mesurer la stabilité biologique de substrats solides (dégradation du carbone organique). La littérature ne fait pas état de mesure de nitrification sur substrat solide par respirométrie dynamique solide. Les mesures sur les boues solides ne sont pas courantes.

La respirométrie dynamique est une méthode indispensable, et reconnue comme telle, pour les mesures d'activité biologique. Nous proposons de l'appliquer afin d'évaluer la vitesse de nitrification sur des graviers de FPRv, et la comparer à la méthode classique en milieu liquide (avec mise en suspension préalable du biofilm dans de l'eau). L'outil disponible au démarrage de mon stage était en phase de développement. J'en ai préalablement listé les limites, puis sélectionné les points à améliorer.

3. Limites de la respirométrie solide observées au niveau de l'existant et investigations menées pour les repousser

On distingue plusieurs types de limites vis à vis de la respirométrie solide pour l'analyse des boues et graviers de FPR ou LSPR. C'est le cas par exemple de :

- La répétabilité des résultats.
- La présence de signaux parasites due au protocole de mesure
- La méconnaissance du facteur le plus représentatif pour caractériser la vitesse de nitrification (ex. sur un respirogramme, on peut mesurer le $\Delta O_2 \text{ max}$, la pente, et le R_{O_2}) ;
- Le rôle et la disparité de certaines conditions expérimentales initiales, comme par exemple le stock d'azote, variable d'un échantillon à l'autre qui rend difficile la comparaison
- La relation et la représentativité de la respirométrie solide par rapport à d'autres méthodes, comme par exemple la respirométrie liquide, les bilans matières entrée/sortie en azote

3.1. Limites de la respirométrie solide vis-à-vis de la dégradation du carbone

Depuis plusieurs années la respirométrie solide est utilisée pour caractériser la stabilité des composts, c'est-à-dire la dégradation de leurs matières organiques. L'application aux boues de LSPR ou de FPRv est récente. De ce fait, il faut adapter la méthode de mesure afin de palier les problèmes mis en évidence sur ces substrats.

3.1.1. Répétabilité des résultats

En étudiant des courbes de respiration liées à la dégradation du carbone dans des boues, on se rend compte que la répétabilité de la mesure n'est pas systématique. En effet, deux réacteurs remplis avec les mêmes boues, dans des quantités identiques, n'ont pas la même consommation d'oxygène, ceci en raison des conditions initiales différentes.

Afin d'améliorer la répétabilité nous avons envisagé d'utiliser un nouveau système de tassage des mélanges étudiés dans les réacteurs. D'autre part nous avons mis au point une procédure de mélange mécanique du bois et des graviers colonisés afin que, d'une fois sur l'autre, le mélange soit toujours fait de la même façon.

Jusqu'alors pour tasser le mélange, l'opérateur devait soulever le réacteur plein d'environ 5cm puis le laisser retomber afin que, sous l'effet de son propre poids, le mélange se répartisse de façon homogène dans le réacteur. Cependant cette méthode pose un problème de répétabilité au niveau de plusieurs points :

- L'opérateur évaluait approximativement la hauteur sur laquelle il fallait soulever le réacteur. Or il est fortement probable que deux réacteurs remplis par deux personnes différentes ne seront pas soulevés de la même hauteur et donc ne seront pas tassés de façon identique.
- Selon l'opérateur, le réacteur était plus ou moins accompagné dans sa chute par les poignées. L'étape de tassage n'était donc pas la même.
- Cette méthode a l'avantage d'être plus reproductible car : la hauteur à laquelle il faut lever le poids est matérialisée par une graduation sur le manche de l'outil.
- Le poids n'est pas soumis à la force de l'opérateur lorsqu'il tombe

Le changement de la méthode de tassage nécessite d'étudier l'influence de cette pratique sur l'amplitude de respiration enregistrée.

3.1.2. Le bois utilisé comme structurant est une source de carbone potentielle pour la biomasse contenue dans les boues.

Afin de favoriser le passage de l'air dans les boues et de limiter les zones anoxiques on utilise des copeaux de bois comme structurant (plus adaptés aux boues que les structurant minéraux utilisés pour les composts). Le bois est enrobé par le biofilm à étudier ce qui permet une augmentation de la surface de contact air circulant/bactéries. Afin d'éviter que le bois ne dessèche les boues, il est préalablement imbibé pendant 24 heures dans de l'eau du robinet. Cependant on peut se demander si le bois est vraiment un substrat inerte pour l'étude de la dégradation du carbone organique des boues. En effet, le bois est constitué à environ (Bortoletto et al, 2003) :

- 70% ($\pm 10\%$) de cellulose + hémicellulose
- 30% ($\pm 10\%$) de lignine
- Autres substances organiques en faible quantité: polysaccharides, pentosanes, hexosanes, résines, tannins, colorants, cires, alcaloïdes

Certaines des ces substances sont des substrats lentement biodégradables (en particulier la cellulose), qui pourraient présenter une source de carbone supplémentaire pour les bactéries de la matrice à étudier. D'autres substances (par exemple la lignine ou les phénols) sont des inhibiteurs de l'activité bactérienne. Il est intéressant d'évaluer si le bois a une influence sur l'activité bactérienne lors de la dégradation du carbone organique.

3.2. Limites de la respirométrie solide vis-à-vis de la vitesse de nitrification sur des graviers colonisés de FPRv

3.2.1. Répétabilité de la mesure de nitrification

Après avoir vérifié la répétabilité de la mesure pour la dégradation du carbone, il est important d'améliorer la répétabilité de la mesure vis-à-vis de la vitesse de nitrification. Puisque en observant les courbes d'évaluation de l'activité nitrifiante du gravier colonisé d'un FPRv des années précédentes (Philippe, 2009), on observe que les résultats diffèrent d'un réacteur à l'autre pour les graviers colonisés. En effet, entre deux réacteurs différents mais sur lesquels on a fait la même expérience, on peut observer un RSD de la vitesse de nitrification (évaluée à partir de l' O_2 consommé pendant 23 minutes) de l'ordre de 100%.

Pour évaluer la vitesse de nitrification d'un FPRv il faut pouvoir s'affranchir de la variation de respiration des bactéries en fonction du réacteur. La répétabilité de la mesure en fonction du réacteur semble donc un point essentiel à améliorer pour l'évaluation de la vitesse de nitrification en respirométrie solide.

De la même façon que pour la dégradation du carbone, nous améliorerons la répétabilité de la mesure de la vitesse de nitrification, en changeant les méthodes de tassage et de mélange de graviers et de copeaux de bois.

3.2.2. La précision de la mesure pour les différents paramètres d'évaluation de la vitesse de nitrification

En changeant la méthode de remplissage des réacteurs, on change la précision de la mesure pour les paramètres d'évaluation de la vitesse de nitrification. Il faudra donc évaluer le RSD pour chaque paramètre afin de quantifier une marge d'erreur pour chacun d'eux, en particulier pour le ΔO_2_{max} et le R_{O_2}

3.2.3. Les réactions parasites dues à la méthode utilisée

Lors de l'analyse des boues et des graviers par respirométrie solide, plusieurs paramètres peuvent entraîner une « respiration » qui ne serait pas due au seul substrat étudié. On étudiera l'influence des paramètres suivants :

- Le bois
- Les bactéries des réacteurs et des tuyaux
- L'eau injectée

3.2.3.1. Le bois

Comme on l'a vu précédemment, on mélange le substrat avec des copeaux de bois afin de favoriser un passage uniforme de l'air. Or ce substrat est poreux. Il a donc des chances d'être lui-même naturellement colonisé par des bactéries. De ce fait, il convient de se demander si celles-ci pourrait accroître la consommation d'O₂ sans que les bactéries du biofilm des graviers soit en cause.

Par contre, l'étude de la vitesse de nitrification durant moins de 12h, on émet l'hypothèse que le bois n'inhibait et ne stimulait pas l'activité des bactéries du biofilm des graviers.

3.2.3.2. Les bactéries des tuyaux et des réacteurs

Si l'on observe les tuyaux de recirculation d'air avec attention, on remarque des taches blanches sur la paroi interne (image en annexe n°3). Ces taches peuvent être du calcaire (car il arrive que de l'eau passe dans les tuyaux d'air) ou des colonies de micro-organismes (bactéries ou champignons). L'étude microbiologique de ces taches n'étant pas forcément nécessaire pour évaluer leur impact sur la qualité de la mesure de respirométrie solide, nous nous en sommes passés. Par contre les tuyaux étant anciens (en place depuis 18 mois dont 12 mois de fonctionnement) il a fallu les changer. Ce changement a permis d'évaluer l'impact de l'état des tuyaux sur la respiration des réacteurs vides lors d'une injection.

D'un autre côté les réacteurs de respirométrie solide sont lavés à l'eau claire, mais ils présentent des recoins difficiles d'accès pour le nettoyage (tuyau d'évacuation d'air et tuyau d'évacuation du percolât). Cela entraîne probablement un développement de bactéries dans ces zones. Il faut donc se demander si ces bactéries ont une respiration significative par rapport à celle des matrices étudiées, que ce soit pour l'étude de la dégradation du carbone ou pour l'étude de la vitesse de nitrification

D'autre part, on peut se demander si la « respiration » des réacteurs vides observée après une injection d'ammonium est due à la consommation, par les bactéries du réacteur et des tuyaux, de l'ammonium présent dans la solution injectée ou du stock de nutriment (carbone organique ou azote) du voile bactérien rendu de nouveau disponible par l'humidification des réacteurs.

3.2.3.3. L'eau utilisée pour la solution d'ammonium injectée

La solution injectée pour la mesure de nitrification est préparée à l'aide d'eau du robinet. Deux réactifs y sont ajoutés : chlorure d'ammonium (NH₄Cl) et du carbonate de sodium (NaHCO₃). La nature de cette eau a été suspectée d'influencer les résultats. En effet, lorsque l'eau sort du robinet (ER), la concentration en oxygène n'est pas à saturation : 6,4mg d'O₂/L, pour une concentration de saturation de 8,5mg d'O₂/L (± 0,1mg/L). On doit donc se demander s'il n'y aurait pas une fraction de l'oxygène des réacteurs qui se dissoudrait dans l'eau injectée en fines gouttelettes lors de l'expérience. Pour tester ce point nous proposons d'appliquer de l'eau déminéralisée tamponnée à pH=7 (en raison d'un pH initial plus faible d'environ 5), afin de faire un témoin sans « respiration » ni physico-chimique, ni biologique.

Les paramètres représentant la vitesse de nitrification observée ne sont dus qu'à des fluctuations au sein de l'appareil de mesure.

Enfin la comparaison entre les « respirations » observées suite à l'injection d'eau du robinet avec et sans mise à saturation en oxygène permettra d'évaluer la quantité d'oxygène se dissolvant dans l'eau lors de chaque injection. Dans ce cas, c'est l'eau du robinet non aérée qui joue le rôle de témoin.

3.2.4. Comment s'affranchir du stock d'azote présent initialement dans le mélange graviers/boues

Les boues, provenant d'un filtre en période d'alimentation, présentent un stock d'ammonium et de nitrate. Ce stock peut fausser l'étude de la réponse des bactéries nitrifiantes à une dose connue en ammonium du fait des processus d'adsorption et de relargage des formes de l'azote. Afin de s'affranchir de ce problème, des travaux préliminaires (Philippe, 2009) ont permis de tester l'influence des bâchées successives d'eau claire afin de vider au maximum le stock en azote facilement mobilisable dans les boues. Cependant après l'appauvrissement des boues en azote, on observe une adsorption importante de l'azote pour reconstituer ce stock, au détriment de la nitrification, de la consommation en oxygène, et des bilans massiques entrée/sortie. Les résultats après le « lavage » des boues sont donc déconseillés.

Nous proposons de tester l'injection de bâchées avec une concentration connue en ammonium afin de stabiliser le stock ce qui revient à étudier la stabilité de la réponse à des bâchées successives d'ammonium.

3.2.5. Quel facteur prendre en compte pour évaluer la vitesse de nitrification ?

Comme on l'a vu au paragraphe 2.2.4, la respirométrie solide permet de mesurer différents paramètres lors d'une injection de solution d'ammonium : le $\Delta_{O_2 \max}$, la pente et le R_{O_2} . Durant les précédentes expériences (Philippe, 2009), la respiration n'a été mesurée que pendant 30 minutes à 1 heure. Or on observe que la consommation d'oxygène au bout d'une heure n'est pas la même qu'avant l'injection. Il est donc intéressant de voir au bout de combien de temps la respiration due aux bactéries nitrifiantes laisse la place à celle due aux bactéries impliquées majoritairement dans la dégradation du carbone. Par la suite on pourra étudier le degré de corrélation entre des mesures d'une heure et des mesures prenant en compte le retour à l'état initial afin de voir s'il faut ou non prolonger la durée de l'expérience pour évaluer la vitesse de nitrification en milieu solide.

3.2.6. Corrélation entre les paramètres mesurés en respirométrie solide et les résultats d'autres méthodes

Plusieurs méthodes existent pour évaluer la vitesse de nitrification en station d'épuration, mais en général elles sont plutôt adaptées à des matrices liquides de type boues activées. Il est donc intéressant de connaître la réponse de ces méthodes sur des matrices solides pour savoir si elles sous-évaluent ou non la vitesse de nitrification. D'autre part, certaines méthodes sont plus simples et moins coûteuses à mettre en œuvre que la respirométrie solide. Dans le cas d'une bonne évaluation de la nitrification par une de ces méthodes, il faudrait aussi se demander la pertinence de l'application à plus large échelle de la respirométrie solide sur des boues de filtre planté de roseaux.

On peut comparer la respirométrie solide aux méthodes suivantes :

- Respirométrie liquide sur un biofilm mis en suspension dans de l'eau
- Bilan en azote sur le percolat de la respirométrie solide

4. Matériels et méthodes

4.1. Présentation d'une semaine d'expérience type pour l'étude de la dégradation du carbone de boues de LSPR

Afin d'évaluer la stabilité des graviers colonisés ou des boues de FPRv, ainsi que des boues de LSPR, nous avons réalisé des mesures de respirométrie solide. Nous avons réalisé quatre campagnes de mesures sur les boues de LSPR entre avril et juillet 2010. Chaque campagne de mesure est étalée sur deux semaines. Le lundi de la première semaine, on échantillonne les boues de LSPR, puis on remplit les réacteurs le mardi ; enfin, on applique une période de mesure de 10 jours, soit jusqu'au vendredi de la semaine suivante. Au préalable, la consommation des réacteurs vides est mesurée pendant 48 heures.

4.1.1. L'échantillonnage des boues de LSPR

L'échantillonnage se fait sur des LSPR à Andancette. On récolte des boues en faisant une carotte dans le filtre sur vingt centimètres de profondeur. Il faut prévoir environ deux litres d'échantillon par réacteur.

4.1.2. Le remplissage des réacteurs

Chaque réacteur est rempli avec un mélange de boues et de copeaux de bois préalablement imbibés pendant 24h dans de l'eau du robinet (respectivement 1,25L et 3L). Pour le premier réacteur les volumes de bois et de graviers sont mesurés dans une éprouvette de 1L puis pesés afin de mettre la même masse dans chaque réacteur. Le mélange de boue et de bois est homogénéisé à la main dans un sceau pendant 5 minutes. Puis on remplit les réacteurs avec le mélange en suivant le protocole de tassage (voir annexe n°1). Après avoir mis en marche les pompes d'injection d'air et de recirculation des gaz, chaque réacteur de respirométrie solide est ensuite fermé, de façon étanche (joint à lèvres).

4.2. Méthodes de tassage des mélanges solides dans un réacteur

Afin de permettre une circulation homogène des gaz dans les mélanges de bois/graviers et bois/boues, il faut tasser ces derniers dans les réacteurs de respirométrie solide. Deux méthodes de tassage sont appliquées :

- l'une manuelle qui est pratiquée jusqu'alors (Philippe, 2009)
- l'autre en utilisant un outil de tassage afin d'améliorer la répétabilité du tassage.

4.2.1. Tassage manuel

L'opérateur soulève le réacteur d'environ 5cm (évaluation de la hauteur sans outil de mesure) puis le laisse retomber en accompagnant sa chute (il ne lâche pas les poignées). Cette opération est répétée une seconde fois avant que le mélange soit considéré comme correctement tassé (Philippe, 2009).

4.2.2. Tassage mécanique

L'outil est constitué d'un disque de PVC de 19,5cm de diamètre fixé à une tige graduée en acier de 2,5cm de diamètre (1,07kg). Sur cette tige, il y a une butée sur laquelle un poids de 0,35kg vient taper (Figure 6).

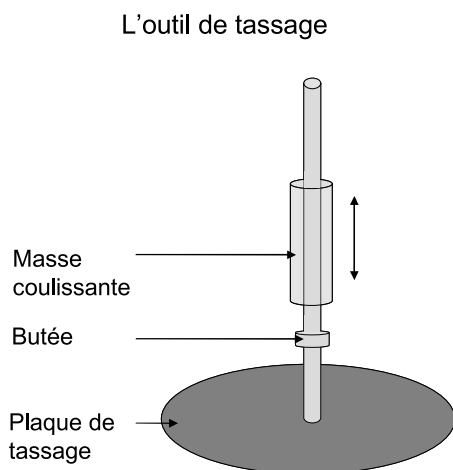


Figure 6 : schéma et photographie de l'outil de tassage mécanique utilisé

Au préalable, il est nécessaire de mélanger le bois et la matrice à caractériser dans les bocal de mélange mécanique,

- Pour les graviers issus des FPRv, verser le contenu d'un bocal dans la cuve du réacteur de respirométrie solide (environ 1,75L) ;
- Pour les boues de FPRv ou de LSPR, verser 1/3 du mélange à analyser (environ 1,4L) dans la cuve du réacteur de respirométrie solide.

Pour remplir un réacteur de graviers :

- Répartir le contenu d'un bocal de manière uniforme dans la cuve en prenant soin de ne pas le tasser. Bien répartir le mélange sur les bords du réacteur afin d'éviter les passages préférentiels des gaz autour du « cylindre » de boues.
- Poser doucement (sans appuyer) le cercle en PVC de l'outil de tassage sur le mélange.
- Soulever le poids jusqu'à ce que son bord inférieur soit 8.5 cm au dessus de la butée (marque n° 1), puis le laisser retomber. Répéter cette opération une seconde fois.
- Verser le second bocal de mélange, le répartir et le tasser de la même façon que précédemment, puis mettre en place l'outil de tassage.

La respirométrie est prête à débuter après mise en place du joint et du couvercle. Quand les boues sont très pâteuses, le fait de tasser chaque couche peut empêcher la bonne circulation des gaz. Dans ce cas là, il ne faut tasser le mélange qu'une fois le réacteur rempli. Pour tasser les boues on laissera retomber deux fois de suite, le poids à partir de la marque n°1.

4.3. L'influence du bois vis à vis de la dégradation du carbone

L'influence du bois a été évaluée en appliquant le protocole Oxitop® en triplicats à une eau résiduaire avec et sans ajouts dosés de bois. Les copeaux de bois ont été préalablement tamisés afin de ne conserver que les particules < 1 mm, puis réduits en poudre. Différentes masses de poudre sèche ont été pesées (5, 1, 0,5 et 0,1 g), puis humidifiées dans 30 mL d'eau du usée. Ces échantillons ont ensuite été ajoutés à 220 mL d'eau usée à 20°C et préalablement aérée. La DBO en fonction du temps a été mesurée pendant 21 jours.

4.4. Présentation d'une semaine d'expérience type pour l'étude de la vitesse de nitrification

Afin d'évaluer la vitesse de nitrification sur des graviers de FPRv et d'améliorer la méthode, quatre campagnes de mesures d'une semaine chacune ont été mises en place de mars à juin 2010. Chaque campagne était organisée suivant le planning suivant :

	lundi	mardi	mercredi	jeudi	vendredi
échantillonnage sur le terrain					
remplissage des réacteurs					
injection de solution d'ammonium					

Figure 7 : planning d'une campagne de mesure pour l'étude de la vitesse de nitrification sur des graviers colonisés et des boues de FPRv

4.4.1. L'échantillonnage des boues et des graviers colonisés

L'échantillonnage (d'environ 2L par réacteur) se fait sur un des FPRv en premier étage à Evieu. D'une part, on récolte des boues de la surface du filtre, sur environ 5cm d'épaisseur. Après avoir enlevé la couche de boue au dessus des graviers colonisés par le biofilm, on récolte ces derniers à une profondeur comprise entre 20cm et 40cm de profondeur.

4.4.2. Le remplissage des réacteurs

Pour la mesure sur des graviers

Chaque réacteur est rempli avec le protocole décrit en annexe n°1 comportant mélange mécanique et tassage. Puis, les pompes d'injection d'air et de recirculation des gaz sont mises en marche, enfin les réacteurs de respirométrie solide sont fermés.

Pour la mesure sur des boues

Le protocole est sensiblement le même sauf pour les proportions de boues et de bois (respectivement 1,25L et 3L).

4.4.3. Injection / obtention du respirogramme

On fait deux bâchées par jour pendant trois jours, sur des graviers de FPRv. Chaque bâchée est une injection d'un litre de solution d'ammonium et de carbonates aux concentrations suivantes :

- $[N-NH_4^+] = 95\text{mg/L}$
- $[HCO_3^-] = 850\text{mg/L}$

On enregistre les concentrations d' O_2 et de CO_2 en sortie d'un réacteur à raison d'un enregistrement par seconde, pendant deux heures. Cinq minutes après le début de l'enregistrement on injecte la solution de chlorure d'ammonium et de carbonate de sodium pendant environ une minute. On obtient alors un respirogramme sur lequel on peut calculer les paramètres permettant d'évaluer la vitesse de nitrification (voir paragraphe 4.5.)

4.5. Calcul de la vitesse de nitrification

Après obtention du respirogramme pour chaque bâchées, les données de l'acquisition sont rapatriées sous EXCEL, puis traitées. L'opérateur détermine :

- La ligne de base en début d'expérience.
- Le $\Delta_{O_2 \max}$ mesuré 5 à 15 minutes après l'injection de la solution d'ammonium.
- La pente maximum de respiration mesurée en début d'expérience.
- La pente n°2.
- L'oxygène consommé pendant le pic de respiration dû à la nitrification (R_{O_2}).

La figure 4 présente un respirogramme type et les paramètres mesurés à partir de celui-ci.

On peut aussi faire un respirogramme mesuré pendant douze heures où la valeur de la ligne de base est prise au niveau du plateau final (figure 4) ce qui entraîne un changement du $\Delta_{O_2 \max}$ et du R_{O_2} .

4.5.1. $\Delta_{O_2 \max}$ et R_{O_2}

On calcule les $\Delta_{O_2 \max}$ et R_{O_2} de la manière suivante :

$$\Delta_{O_2 \max} (\% \text{ d}'O_2) = \text{ligne de base} - \min[O_2]$$

$$R_{O_2} (\text{mg d}'O_2) = M_{O_2} \times \sum d_{O_2 \text{ consommé}} \text{ avec } M_{O_2} = 32000\text{mg/mol}$$

Où :

$$d_{O_2 \text{ consommé}} (\text{mol}) = \frac{Q * dt * (\Delta_{O_2} / 100) * P_{\text{atm}}}{R * T} \text{ dans les unités S.I.}$$

Δ_{O_2} est en %

4.5.2. Pente

Après mesure du respirogramme pour chaque bâchées on calcule la pente maximum de respiration et la deuxième pente de respiration (voir figure 5)

4.6. Précision de la mesure en respirométrie solide

Après avoir fait cinq bâchées d'ammonium et de carbonate sur un mélange de bois et de graviers dans trois réacteurs réparties sur deux jours et demi, on injecte une sixième bâchée dans chaque réacteur. Lors de cette bâchée, on enregistre la respiration dans chaque réacteur afin de calculer le $\Delta_{O_2 \max}$, le R_{O_2} et les pentes sur chaque échantillon de gravier.

Comme tous les échantillons sont sensés être identiques, on peut évaluer la répétabilité de la mesure pour chaque paramètre calculé sur les respirogrammes. Afin de l'évaluer, on calcule le RSD (en %) de chaque paramètre.

$$RSD = \frac{\text{écart type}}{\text{moyenne}} \times 100$$

4.7. Influence du bois lors de la nitrification en milieu solide

4.7.1. Injection de solution d'ammonium dans un réacteur vide

Dans un réacteur de respirométrie solide injecter 1L de solution d'ammonium avec :

- $[N-NH_4^+] = 130\text{mg/L}$
- $[NaHCO_3] = 1105\text{mg de } HCO_3^-/L$

L'analyse de la concentration en oxygène avec un pas de temps d'une seconde selon le protocole préalablement présenté.

4.7.2. Mélange bois / graviers colonisés autoclavé

- Echantillonner des graviers colonisés, sur le filtre planté de roseaux à écoulement verticale, de la même manière que pour remplir deux réacteurs de respirométrie solide.
- Mettre la quantité de bois nécessaire à deux réacteurs à imbiber, dans un seau d'eau de ville pendant, une nuit.
- Autoclaver séparément les graviers colonisés (pour remplir deux réacteurs) et le bois (pour remplir un réacteur) à 130°C pendant 40 minutes
- Remplir un réacteur avec un mélange de bois autoclavé et de graviers autoclavés.
- Remplir un second réacteur avec un mélange de bois non autoclavé et de graviers autoclavé.
- Une fois les réacteurs remplis faire une injection de solution d'ammonium et de carbonate en effectuant un enregistrement de la respiration à la seconde : 1L de solution avec $[N-NH_4^+] = 130\text{mg/L}$ et $[NaHCO_3] = 1105\text{mg de } HCO_3^-/L$.
- Faire une analyse de la concentration en oxygène avec un pas de temps d'une seconde selon le protocole classique.

4.7.3. Bois imbibé d'eau usée autoclavée

- Passer à l'autoclave, selon la procédure classique, 2L d'eaux résiduaires urbaines (ERU) brutes.
- Mesurer 2L de copeaux de bois sec et le mettre dans un seau propre.
- Lorsque l'eau usée autoclavée à fini de refroidir la verser sur le bois en veillant à ce que tout le bois soit recouvert.
- Laisser le bois s'humidifier pendant 24h.
- Remplir un réacteur avec le bois imbibé.
- Une fois les réacteurs remplis faire une injection de solution d'ammonium et de carbonate en effectuant un enregistrement de la respiration à la seconde : 1L de solution avec $[N-NH_4^+] = 130\text{mg/L}$ et $[NaHCO_3] = 1105\text{mg de } HCO_3^-/L$.
- Faire une analyse de la concentration en oxygène avec un pas de temps d'une seconde selon le protocole classique.

4.8. Influence des éléments périphériques aux réacteurs (ex : tuyaux)

La contribution du biofilm développé dans les tuyaux a été évaluée en appliquant le protocole ci-dessous avant et après le changement des tuyaux

- Injecter 1L de solution d'ammonium et carbonate dans un réacteur vide avec $[N-NH_4^+] = 130\text{mg/L}$ et $[NaHCO_3] = 1105\text{mg de } HCO_3^-/L$; et analyser la concentration en oxygène avec un pas de temps d'une seconde selon le protocole classique pour la nitrification.

- Injecter 1L d'eau du robinet dans un réacteur vide, et analyser la concentration en oxygène avec un pas de temps d'une seconde selon le protocole classique pour la nitrification.

4.9. Influence de l'eau utilisée lors d'une bâchée pour l'étude de la vitesse de nitrification

Cette expérience est effectuée après le changement des tuyaux de circulation d'air dans les réacteurs de respirométrie solide. On n'étudiera donc que les paramètres physico-chimiques liés à l'eau et à l'injection d'un liquide dans un réacteur et le paramètre biologique lié à la présence de bactéries dans les recoins des réacteurs.

4.9.1. Taux d'oxygène dissous de l'eau injectée

- Remplir deux flacons de 2L, l'un avec 2L d'eau du robinet et l'autre avec 2L d'eau déminéralisée.
- aérer chaque flacon pendant 12h avec des bulleurs à aquarium dont les sucres ont été préalablement stérilisés à l'eau de Javel.
- laisser dégazer chaque flacon pendant 1h afin de permettre l'évacuation de tout le gaz non dissous.

4.9.2. Injection et mesures

- Mesurer dans une éprouvette de 1L quatre types d'eau :
 - o Eau du robinet (ER) non aérée : remplir directement l'éprouvette sous le robinet.
 - o Eau du robinet (ER) aérée : suivre le protocole précédent pour l'aération.
 - o Eau déminéralisée (ED) non aérée : remplir l'éprouvette sous le robinet de la bombonne d'eau déminéralisée.
 - o Eau déminéralisée (ED) aérée : suivre le protocole précédent pour l'aération.
- Pour chaque type d'eau remplir aussi deux béciers de 500mL afin de mesurer :
 - o Le pH (appareil utilisé : WTW Cond 315i).
 - o L'O₂ (appareil utilisé sonde optique WTW type HQ30d).
- Pour chaque type d'eau faire une injection de 1L dans un réacteur de respirométrie solide en faisant un enregistrement de la concentration d'O₂ de la même façon que pour une étude de vitesse de nitrification sur boue.

4.10. Comparaison des sources de consommation d'oxygène aux respirations des matrices étudiées

En réutilisant les résultats obtenus grâce aux expériences précédentes, on peut calculer l'importance de la respiration liée à la matrice étudié par rapport à la « respiration » liée au protocole de manipulation lors d'une mesure de vitesse de nitrification. On peut aussi calculer l'importance relative de chaque paramètre de manipulation vis à vis de la « respiration » liée au protocole.

Les calculs ci-dessous ont été appliqués pour établir l'influence respective de l'eau injectée, de l'état des tuyaux d'air et des réacteurs de respirométrie solide, par rapport aux consommations d'oxygène des matrices étudiées. Les calculs ont été menés pour les 2 paramètres $\Delta O_{2 \max}$ et R_{O_2} .

- « Respiration » des éléments périphériques du réacteur = ER non aéré dans R_{vide} avant le changement des tuyaux - ER non aéré dans R_{vide} après le changement des tuyaux

- Respiration des bactéries du réacteur = respiration ER aérée – respiration ED non aérée
- Dissolution de l’oxygène dans l’eau non saturée = « respiration » ER non aérée – « respiration » ER aérée
- Respiration totale = moyenne sur une semaine de manip pour les mélanges de matrice (boue ou graviers colonisés) non autoclavée avec du bois non autoclavé
- Respiration due au protocole de manipulation = (« respiration » des éléments périphériques du réacteur) + (respiration des bactéries du réacteur) + (dissolution de l’oxygène dans l’eau non saturée)
- Respiration de la matrice = (Respiration totale) – (Respiration due au protocole de manipulation)

4.11. Influence du nombre de bâchées sur les paramètres d’évaluation de la vitesse de nitrification

Cette expérimentation a pour objectif d’augmenter l’amplitude du signal de respiration, ceci en maximisant l’apport en eau. Il s’agit donc d’étudier l’influence du rythme des apports sur les résultats de nitrification. Deux protocoles ont été étudiés :

- succession d’aspersion (2 par jour, 3 jours consécutifs).
- aspersion en continu pendant environ 30 minutes.

4.11.1. Succession d’aspersions deux fois par jour pendant trois jours

Durant une semaine d’expériences, après remplissage des réacteurs (une journée), les graviers sont aspergés d’une solution d’ammonium ($[N-NH_4^+] = 95\text{mg/L}$) et de carbonate ($[HCO_3^-] = 850\text{mg/L}$) deux fois par jour, pendant trois jours. Les concentrations des solutions sont les mêmes ($\pm 2\text{mg/L}$) pendant toute l’expérience. A chaque fois le volume d’aspersion varie, il est compris entre 900mL et 1L.

Pour chaque bâchée la concentration en O_2 est enregistrée toute les secondes au niveau de l’air sortant d’un réacteur pendant deux heures. Puis après traitement des donnée on cherche le nombre de bâchées permettant d’atteindre un palier pour le $\Delta O_{2\text{ max}}$ et pour le R_{O_2} .

4.11.2. Recirculation du percolat pendant trente minutes

Quatre minutes après l’injection de 1L de solution, dans un réacteur remplis de graviers et de bois, on récupère le percolat afin de l’injecter de nouveau (temps d’injection : une minute). On effectue cette opération cinq fois de suite afin que les graviers reçoivent en tout six bâchées en trente minutes.

Au cours de cette expérience, on enregistre la concentration en O_2 dans l’air sortant d’un réacteur toutes les secondes pendant deux heures. Puis après traitement des données on cherche le nombre de bâchées permettant d’atteindre un palier pour le $\Delta O_{2\text{ max}}$ et pour le R_{O_2} . On compare aussi le palier atteint avec celui de l’expérience sur quatre jours.

4.12. Une autre méthode de mesure de la vitesse de nitrification : la recirculation des gaz sans apport d'air extérieur

Cette expérimentation a pour objectif d'augmenter l'amplitude du signal de respiration, ceci en supprimant l'apport en air extérieur.

Le réacteur est rempli de la même façon que pour une mesure de vitesse de nitrification sur des graviers, mais l'organisation et l'agencement des tuyaux de circulation d'air sont modifiés. La nourrice, apportant l'air extérieur au réacteur (1L/min en temps normal), est débranchée, et est remplacée par un tuyau captant l'air à la sortie de l'analyseur pour le renvoyer dans le réacteur. Pour plus de précision voir la figure 8.

Après 1h30 d'analyse de l'air recirculé, on injecte un litre de solution d'ammonium et de carbonate, et l'on continue d'enregistrer la concentration en oxygène dans l'air recirculé.

La solution injectée a les concentrations suivantes :

- $[N-NH_4^+] = 95\text{mg/L}$
- $[HCO_3^-] = 850\text{mg/L}$

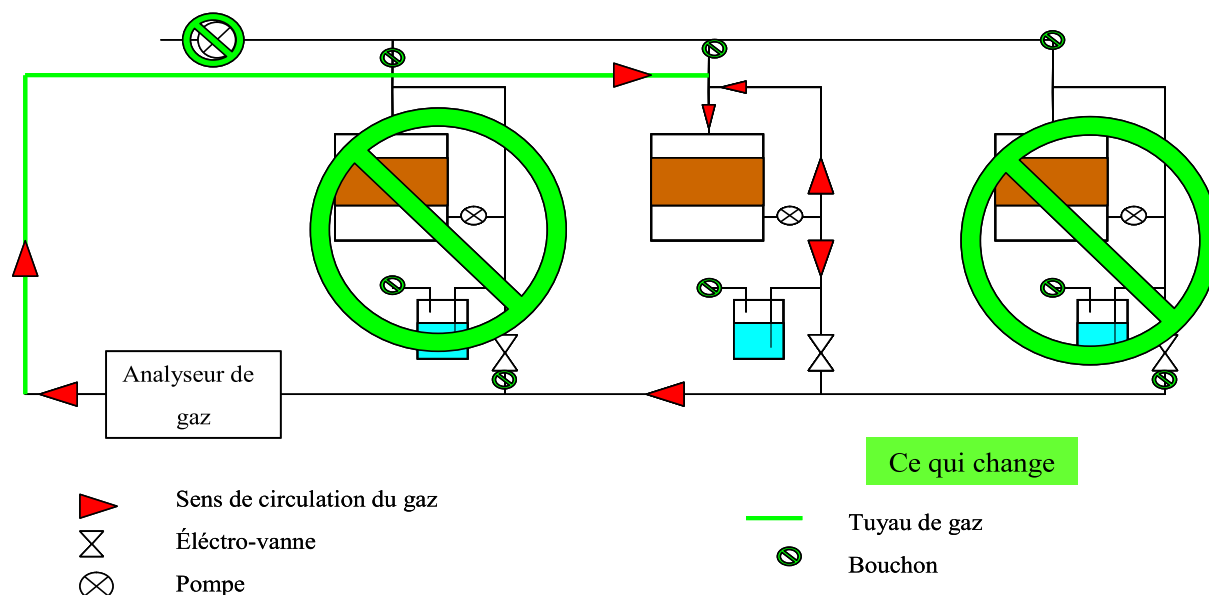


Figure 8 : schéma du montage pour une recirculation de l'air sans apport d'air extérieur

4.13. Mesure de la respiration des bactéries nitrifiantes pendant 2h ou 12h

Dans un réacteur, on effectue sur des graviers six injections d'ammonium à raison de deux bâchées par jours à 9h30 et 14h00. Après chaque bâchée, on enregistre toute les secondes la concentration en oxygène dans l'air sortant pendant deux heures. Puis toutes les minutes. Nous obtenons alors des respirogrammes courts (de 2h) et des respirogrammes longs (de 12h) mesurés pendant la nuit.

En prenant comme ligne de base la respiration en début d'expérience, on calcule un R_{O_2} pendant deux heures, ou pendant quatre à cinq heures (jusqu'à ce que la ligne de base coupe le respirogramme). Avec la ligne de base au minimum de respiration en fin d'injection, on calcule un R_{O_2} pendant douze heures.

On observe l'évolution du R_{O_2} en fonction du temps de mesure et du choix de la valeur de la ligne de base.

4.14. Corrélation entre les résultats de la respirométrie solide et ceux de l'analyse chimique des percolats des réacteurs

Lors de chaque injection d'ammonium et carbonate, on connaît les concentrations injectées (par calcul) et on analyse les concentrations en NH_4^+ et NO_3^- dans les percolats récupérés à la base des réacteurs. On étudie la corrélation entre les mesures de respirométrie solide et la production de NO_3^- au cours de six bâchées réparties sur trois jours.

En moyenne les concentrations injectées sont les suivantes :

- $[\text{N-NH}_4^+] = 95\text{mg/L}$
- $[\text{HCO}_3^-] = 850\text{mg/L}$
- $[\text{N-NO}_3^-] = 1,35\text{mg/L}$ (concentration de l'eau du robinet)

5. RESULTATS

Cette partie apporte des éléments de réponses aux questions suivantes :

- 1) Influence du tassage vis-à-vis des mesures sur la dégradation du carbone
- 2) Le bois inhibe-t-il ou stimule-t-il l'activité bactérienne lors de la mesure de la minéralisation du carbone ?
- 3) Pertinence de l'utilisation des pentes du respirogramme pour évaluer la vitesse de nitrification
- 4) Influence de la méthode de tassage sur la mesure de vitesse de nitrification
- 5) Précision de la mesure de respirométrie solide
- 6) Influence des bactéries présentes sur le bois (nitrification) en respirométrie solide
- 7) Perturbation induite lors d'un mauvais état des tuyaux
- 8) Influence du type d'eau utilisée pour les bâchées
- 9) Comparaison de la respiration des bactéries de la matrice étudiée aux sources de consommations protocolaires (nitrification)
- 10) Influence du nombre de bâchées sur les paramètres d'évaluation de la vitesse de nitrification
- 11) Mesure de la vitesse de nitrification avec recirculation et sans apport en air extérieur
- 12) Influence de la durée de la respiration 2h ou 12h sur les calculs respirométriques
- 13) Corrélation entre les résultats de la respirométrie solide et ceux de l'analyse des percolats des réacteurs

5.1. Influence du tassage vis-à-vis des mesures sur la dégradation du carbone

5.1.1. Sur la répétabilité de la mesure de consommation du carbone

Rappel du protocole

Afin d'étudier l'influence du tassage sur la répétabilité de la mesure d'O₂ consommé pour la dégradation de la matière organique, nous avons effectué des mesures de dégradation du carbone pendant deux jours sur des graviers colonisés. Quatre réacteurs ont été remplis en même temps, avec un mélange des graviers/bois provenant du même filtre. Seule la méthode de tassage varie :

- Témoin (duplicats) : deux réacteurs où le mélange bois/graviers est tassé à la main
- Test (duplicats) : deux réacteurs où le mélange bois/graviers est tassé mécaniquement

Après avoir calculé l'oxygène consommé depuis le début de l'expérience (R_{O2}), on mesure l'écart à la moyenne entre les deux réacteurs à un temps donné (Figure 9). Les résultats obtenus à t=37 h sont ensuite présentés dans le Tableau 1.

Résultats

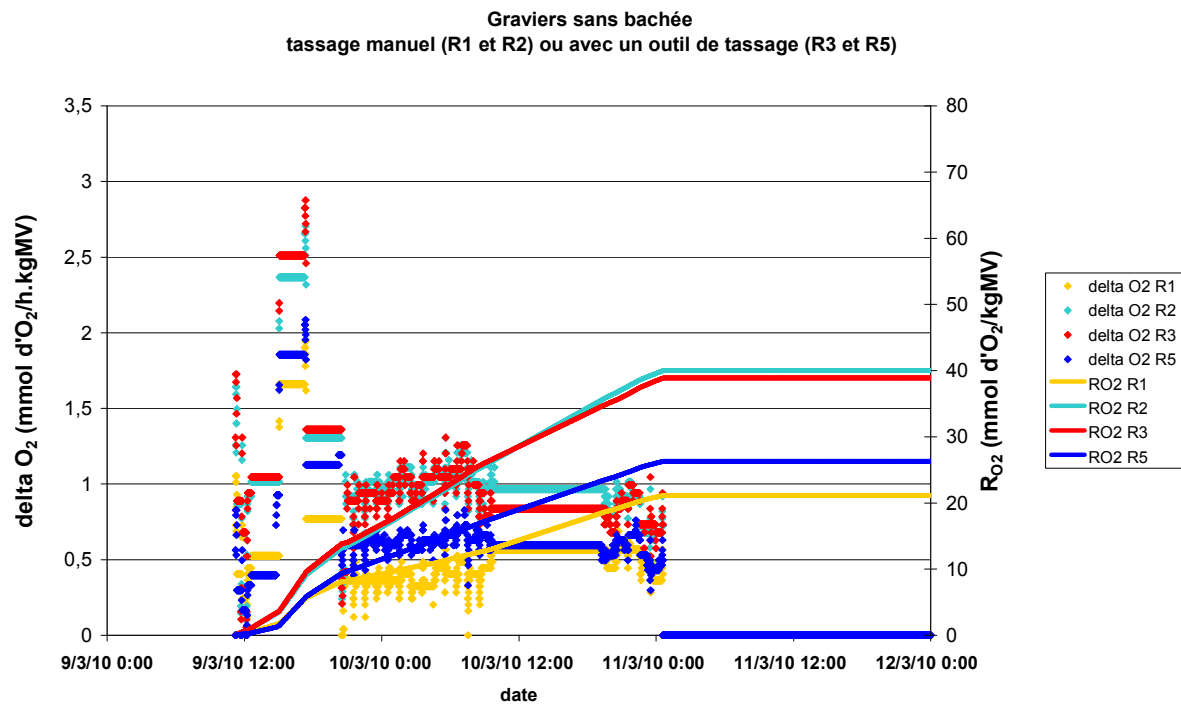


Figure 9 : mesure du R_{O_2} sur des graviers colonisés pendant 2 jours avec tassage à la main (R1 et R2) et tassage mécanique (R3 et R5).

Tableau 1 : écart à la moyenne pour le R_{O_2} dû à la dégradation du carbone en fonction du type de tassage

		t = 37h
tassage à la main	RO2 R1 (mmol d'O ₂ /kgMV)	20,97
	RO2 R2 (mmol d'O ₂ /kgMV)	39,74
	moyenne RO2 R1-R2	30,35
	écart à la moyenne R1-R2 (%)	30,90
tassage avec l'outil de tassage	RO2 R3 (mmol d'O ₂ /kgMV)	38,62
	RO2 R5 (mmol d'O ₂ /kgMV)	26,11
	moyenne RO2 R3-R5	32,37
	écart à la moyenne R3-R5 (%)	19,32

Tableau 2 : écart à la moyenne pour le R_{O_2} dû à la dégradation du carbone sur des boues de LSPR tassés avec l'outil de tassage. Les boues viennent de boues activées (BA) ou de matières de vidange (MV)

	lit taille réelle BA	pilote BA	pilote MV
R_{O_2} moyen au bout de 10j (mmol O ₂ /kgMV)	2314	2262	2538
RSD (%)	7.28	7.73	10.17

Analyse des résultats

Malgré le fait que ces mesures aient été faites pendant peu de temps, on remarque (Tableau 1) un écart à la moyenne plus faible pour des graviers tassés mécaniquement que pour les graviers tassés à la main (l'écart à la moyenne respectivement 19% et 31%). On peut donc penser que le tassage avec l'outil améliore la répétabilité de la mesure pour la consommation d'O₂ liée à la dégradation de la matière organique.

D'autre part, les graviers étudiés durant cette expérience provenait d'un FPRv qui percolait assez mal et qui n'était pas en cycle d'alimentation lorsque le prélèvement a été fait. Le biofilm entourant les graviers n'était donc peut-être pas assez humide. Enfin lors de ce prélèvement, le FPRv était recouvert de neige, l'activité bactérienne était donc, peut-être, fortement liée à la profondeur. Si la prise d'essais n'a pas été parfaitement homogénéisée avant de remplir les réacteurs, cela peut expliquer les différences de respiration que l'on observe entre des réacteurs tassés de la même manière.

En revanche les mois suivants une autre expérience a été faite pour la consommation de la matière organique sur de gravier de FPRv tassés avec l'outil, mais cette fois les graviers provenaient d'un filtre qui percolait bien et qui était en phase d'alimentation. Dans ce cas, l'écart à la moyenne est beaucoup plus faible, puisqu'au cours des quatre jours d'enregistrement il n'a jamais dépassé 4%. Durant la première série d'expérience, deux réacteurs étaient alimentés en ammonium (six bâchées), or on observe entre ces derniers un écart à la moyenne de l'ordre de 11%. Il est donc possible que l'humidité du substrat améliore la répétabilité pour la mesure de la respiration liée à la consommation de matière organique.

Enfin lors de la deuxième manipulation sur les boues de LSPR, l'outil était mieux pris en main et il n'y a pas eu de pannes d'aération dans les réacteurs, on observe un R_{O_2} moyen calculé au bout de 231h (10 jours) de mesures (tableau 2). Dans ce cas, on remarque que le tassage avec l'outil permet d'avoir un RSD variant entre 7,28% et 10,17%. Dans ce cas, le tassage avec l'outil permet donc une nette amélioration de la répétabilité.

5.1.2. Influence du tassage sur l'amplitude de la mesure de consommation du carbone

Le paragraphe 5.1.1 a mis en évidence la nécessité d'évaluer la différence de respiration des boues en fonction du tassage.

Les résultats sont également présentés dans le Tableau 1.

Au bout de deux jours de mesure sur les graviers (tableau 1), on a un R_{O_2} légèrement plus important pour les graviers tassés avec l'outil de tassage que pour ceux tassés à la main (respectivement 30,35 et 32,37 mmol d' O_2 /kgMV). Cependant, au vu des erreurs calculées sur ces mesures (7% à 20%), on peut dire que la respiration est sensiblement la même avec ces deux types de tassage.

Encore une fois, l'humidité semblant jouer fortement sur l'activité des bactéries, il sera intéressant, dans une prochaine étude, d'étudier l'influence de l'humidité sur l'importance de la respiration lors de la dégradation de la matière organique.

5.2. Le bois inhibe-t-il ou stimule-t-il l'activité bactérienne lors de la mesure de la minéralisation du carbone ?

Cette expérience a pour but d'évaluer l'impact du bois sur la respiration des bactéries des ERU pendant une expérience longue. Cela permet de savoir si le bois favorise l'activité bactérienne ou au contraire s'il l'inhibe.

Rappel du protocole

Différentes doses de poudre de bois sont placés dans de l'ERU brute et l'on étudie la DBO_{21} mesurée grâce à des Oxitop®. Les doses de bois sont les suivantes :

- 0g (témoin),
- 0,1 ; 0,5 et 1,0 g MS dans 250 mL de liquide.

Résultats

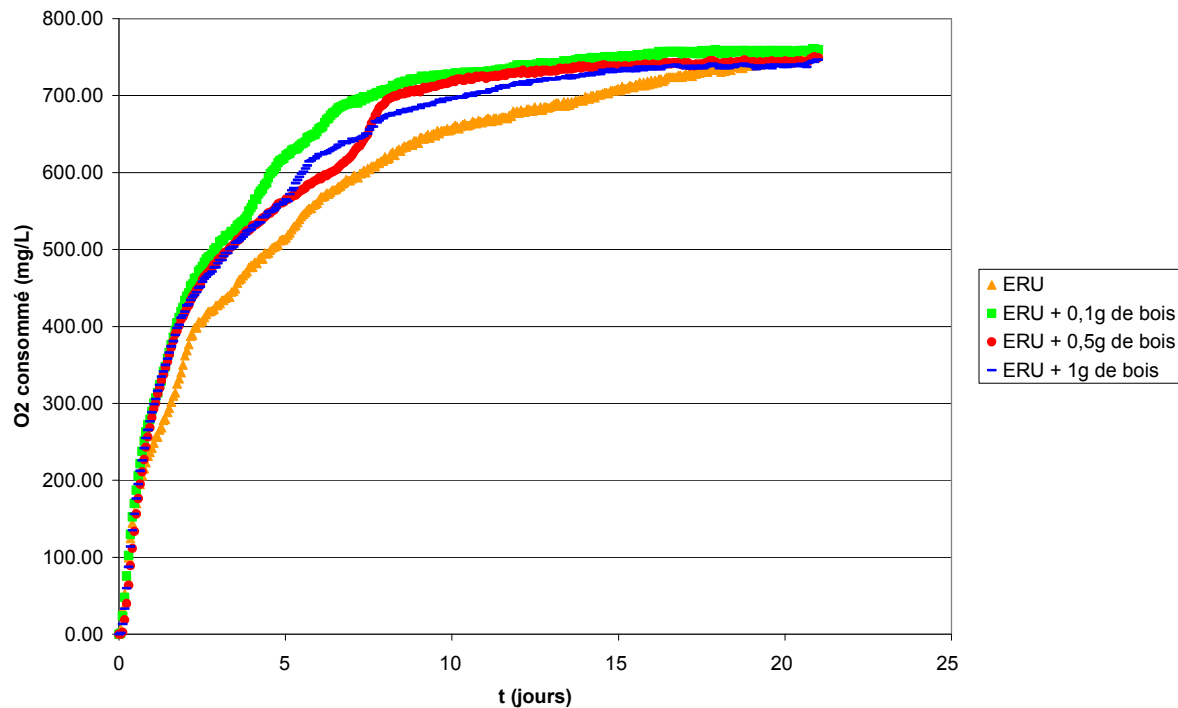


Figure 10 : DBO₂₁ sur 250mL d'ERU brutes avec différentes doses de bois. Chaque courbe correspond à une moyenne sur des tests réalisés en triplicats

Analyse critique des résultats

On remarque que le maximum de consommation d'O₂ est le même qu'il y ait ou non du bois. Si les pentes sont identiques le premier jour, en revanche on peut dire que la présence de bois entraîne une respiration des ERU très légèrement plus importante du 2^e au 10^e jours. Compte-tenu de l'incertitude de 20% sur une mesure de DBO₅, on peut admettre que les courbes, avec ou sans bois, sont semblables. Si le bois apporte de la matière organique biodégradable aux bactéries, cette quantité est négligeable par rapport à la marge d'erreur d'une mesure de DBO.

5.3. Utilisation des pentes du respirogramme pour évaluer la vitesse de nitrification

Le but de cette étude est de vérifier la pertinence de l'étude des pentes des respirogrammes, pour évaluer l'activité nitrifiante des graviers de FPRv.

Rappel du protocole

On applique six bâchées réparties sur trois jours, dont on détermine les respirogrammes. On étudie l'évolution des pentes maximales et pentes n^o2 au cours de ces bâchées.

Résultats

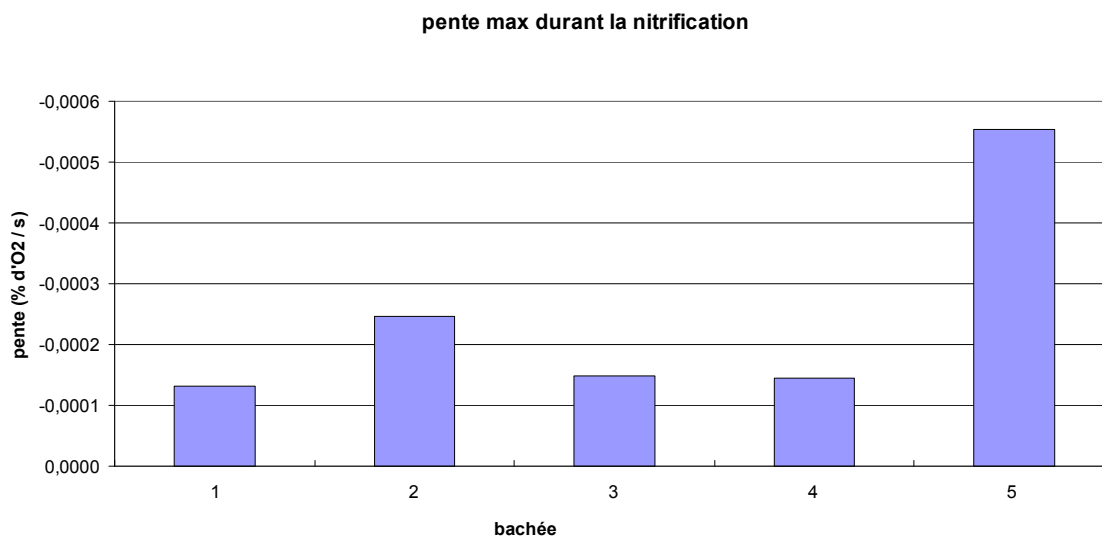


Figure 11 : penne maximale de respiration après l'injection d'ammonium ($[N-NH_4^+] = 95\text{mg/L}$ et $[HCO_3^-] = 850\text{mg/L}$), en fonction du nombre de bachees

Tableau 3 : penne liees à la respiration du biofilm après injection d'ammonium ($[N-NH_4^+] = 95\text{mg/L}$ et $[HCO_3^-] = 850\text{mg/L}$)

Bachée sur des graviers colonisés	penne max (% d'O ₂ / s)	penne n°2 (% d'O ₂ / s)
1	-1,31E-04	il n'y en a pas
2	-2,46E-04	-5,52E-05
3	-1,49E-04	il n'y en a pas
4	-1,45E-04	-1,53E-05
5	-5,54E-04	-7,17E-05
6	pas d'enregistrement valable	
moyenne	-0,00025	-0,00005
RSD (%)	-73,00	-61,25

Analyse des résultats

On remarque une forte variation de la penne en fonction du nombre de bachee sans voire d'évolution (augmentation ou décroissance) clairement apparaître au cours du temps. D'après la figure 11, on note que la penne maximum de la cinquième bachee est trois fois plus forte que la moyenne de celles des autres bachees. D'autre part, sur le tableau 3, on remarque que la penne n°2 n'a pas toujours lieu. On observe aussi un RSD assez élevé (61 à 73%) ce qui signifie que cette donnée n'est pas déterminée de façon très fiable.

Cela amène à penser que ces paramètres ne sont pas très représentatifs de la vitesse de nitrification en respirométrie solide, c'est pourquoi on ne les étudiera plus par la suite : on ne n'étudiera que sur le $\Delta O_2 \text{ max}$ et le R_{O_2} . Le choix parmi ces deux derniers paramètres demande une étude plus fine. On ne se prononcera quand au choix du paramètre le plus approprié pour la vitesse de nitrification, qu'à la fin de la partie Résultats de ce rapport.

5.4. Influence de la méthode de tassage sur la mesure de vitesse de nitrification

5.4.1. Pour la répétabilité

Afin d'évaluer l'amélioration de la répétabilité, suite au changement de la méthode de tassage, on compare le RSD sur des résultats de mesure de vitesses de nitrification (ΔO_2_{max} et R_{O_2}). L'étude est faite au moment de la sixième bûchée d'ammonium sur deux réacteurs pour chaque type de tassage.

Rappel du protocole

- **Témoin** : 2 réacteurs de respirométrie solide tassés à la main (Philippe, 2009)
- **Test** effectué : 2 réacteurs de respirométrie solide tassés avec l'outil de tassage

Chaque réacteur a reçu six bûchées réparties sur trois jours, d'une solution d'ammonium et de carbonates (dans de l'eau du robinet). En revanche, les concentrations introduites n'ont pas été les mêmes :

- Témoin : $[N-NH_4] = 60\text{mg/L}$ et $[HCO_3^-] = 510\text{mg/L}$ (Philippe, 2009)
- Test : $[N-NH_4] = 80\text{mg/L}$ et $[HCO_3^-] = 680\text{mg/L}$

Après avoir enregistré le pic de respiration lors de l'injection de la sixième bûchée d'ammonium, on calcule le ΔO_2_{max} et R_{O_2} sur les mesures afin de comparer le RSD entre les tests et entre les témoins. A noter que le R_{O_2} du test est calculé pendant 26 minutes pour être comparé aux valeurs du Témoin (Philippe, 2009).

Résultats

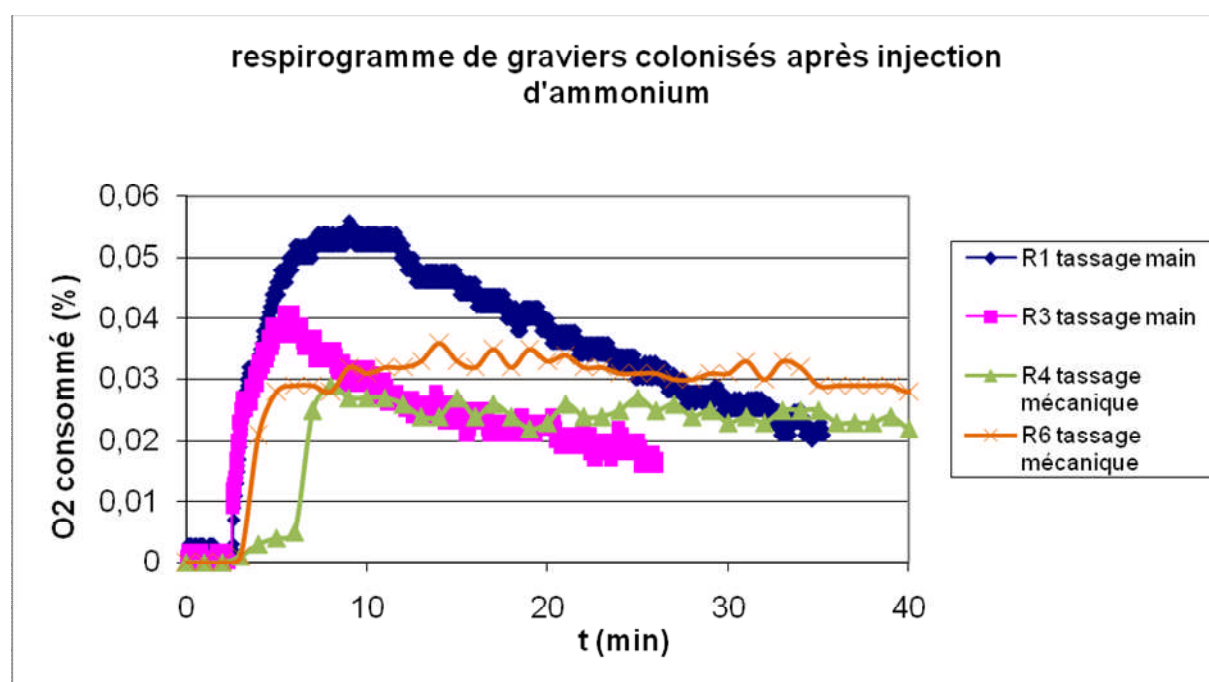


Figure 12 : mesure de l' O_2 consommé après injection de 1L d'une solution d'ammonium avec $[N-NH_4^+] = 60\text{mg/L}$ sur des graviers tassés à la main ou avec l'outil de tassage

Tableau 4 : RSD calculé sur le delta et sur le R_{O2} pour un tassage manuel et pour un tassage avec un outil de tassage

	respirométrie	
graviers colonisés tassage à la main	delta max	O2 consommé par la nitrification (mg d'O2)
R1	5,60E-02	11,95
R3	4,10E-02	1,92
moyenne	4,85E-02	6,94
RSD (%)	21,87	102,24
graviers colonisés tassage avec l'outil	delta max	O2 consommé par la nitrification (mg d'O2)
R4	2,90E-02	5,64
R6	3,60E-02	6,66
moyenne	3,25E-02	6,15
RSD (%)	15,23	11,74

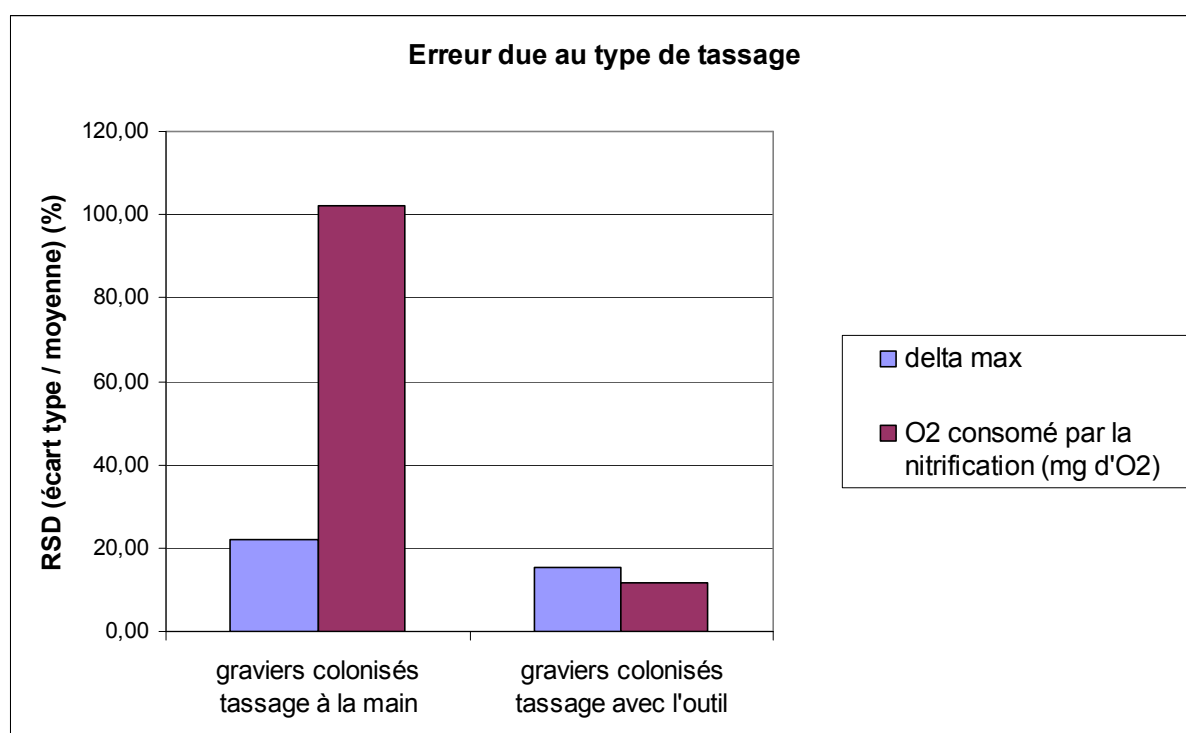


Figure 13 : Impact du type de tassage (à la main ou en utilisant un outil de tassage) sur le RSD mesuré entre deux réacteurs lors d'une mesure de vitesse de nitrification en milieu solide après six injection d'ammonium

Analyse des résultats

En observant les courbes (Figures 12) on remarque que, suite à la mise en place du tassage mécanique, les valeurs obtenues sont plus semblables d'un réacteur à l'autre.

L'enregistrement au pas de temps de la seconde n'ayant pas fonctionné pour les mélanges tassés mécaniquement, nous avons exploité les données enregistrées au pas de temps de la minute, supposant que le pas de temps pour l'enregistrement n'influence pas les résultats.

Le tassage mécanique a permis de diminuer le RSD de 22% à 15% pour le $\Delta O_2 \text{ max}$ et de 102% à 12% pour le R_{O_2} (cf. Tableau 4). La répétabilité a été fortement améliorée par ce tassage. Dans cette comparaison, les graviers étudiés en 2010 et en 2009 ne provenaient pas

du même filtre, et n'ont pas subi les mêmes évènements climatiques avant échantillonnage. Néanmoins, le tassage mécanique semble améliorer la répétabilité pour la mesure de vitesse de nitrification en milieu solide.

5.4.2. Impact sur l'amplitude de la mesure

En comparant les courbes (figure 12), le pic de respiration est écrêté. Par contre, cette comparaison ne donne pas d'information sur une plus grande respiration des graviers colonisés, vu que les mesures 2009 ont été faites seulement pendant une trentaine de minutes. Les valeurs du tableau 4 mettent en évidence une diminution d'environ 30% du $\Delta_{O_2 \max}$ et de 10% pour le R_{O_2} avec le tassage mécanique.

Il semblerait que l'utilisation de l'outil de tassage entraîne des valeurs plus faibles de la vitesse de nitrification, bien que pour le R_{O_2} cela ne soit complètement démontré. Il faudrait pour cela étudier la variation du R_{O_2} sur un pic de respirations complet. D'un autre côté, l'amélioration de la répétabilité prime sur la vitesse de nitrification observée, car l'importance de cette valeur est surtout relative : elle permet de comparer deux types de gravier.

5.5. Estimation de la précision de mesure par respirométrie solide

Afin de pouvoir évaluer la pertinence des mesures de vitesse de nitrification par respirométrie solide, on évalue la différence de résultats obtenus sur trois réacteurs respirométriques préparés de la même manière (échantillon, taux de structurant, homogénéisation, tassage et température identiques).

Rappel du protocole

- Mélange tassé mécaniquement.
- Mesure des respirogrammes au bout de la sixième bâchée.
- $[N-NH_4^+] = 95\text{mg/L}$ et $[HCO_3^-] = 850\text{mg/L}$.
- Calcule des $\Delta_{O_2 \max}$ et R_{O_2} en prenant en compte la ligne de base liée à la mesure de nuit et celle en début d'expérience.

Résultats

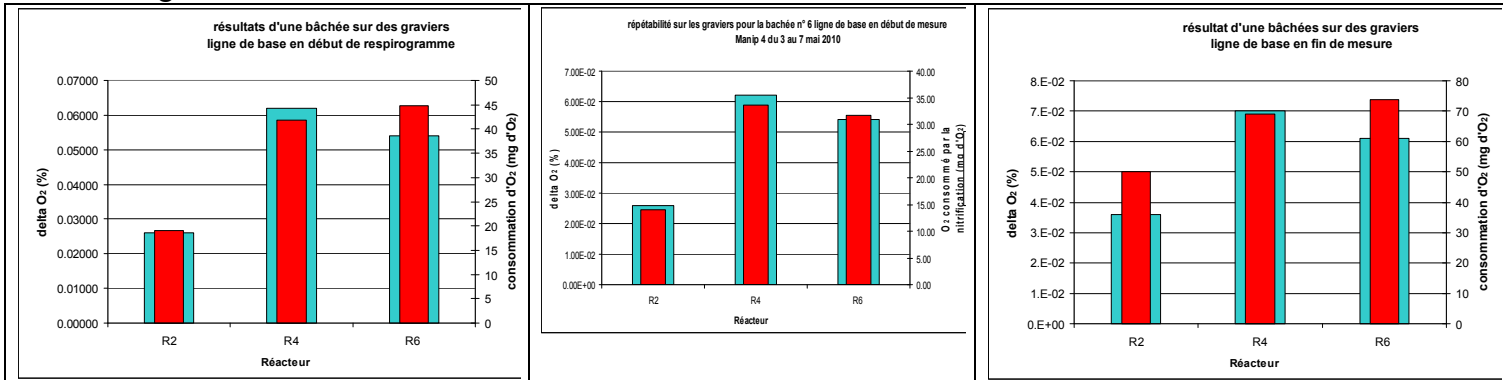
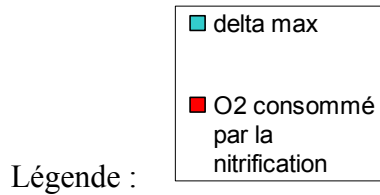


Figure 14 : $\Delta O_2 \text{ max}$ et R_{O_2} mesurés sur trois réacteurs au cours de la sixième bâchée d'ammonium. La ligne de base est prise en début d'expérience et le R_{O_2} est calculé jusqu'à ce que la ligne de base coupe le respirogramme (environ 5h).

Figure 15 : $\Delta O_2 \text{ max}$ et R_{O_2} mesurés sur trois réacteurs au cours de la sixième bâchée d'ammonium. La ligne de base est prise en début d'expérience et le R_{O_2} est calculé pendant 2h.

Figure 16 : $\Delta O_2 \text{ max}$ et R_{O_2} mesurés sur trois réacteurs au cours de la sixième bâchée d'ammonium. La ligne de base est prise en fin d'expérience

Tableau 5 : amplitude et précision de la mesure en fonction du point que l'on considère comme ligne de base.

	ligne de base en début de mesure		
	delta O ₂	R _{O₂}	
moyenne	4.73E-02	26.45	R _{O₂} pendant 2h
RSD (%)	39.94	40.68	
moyenne	4.73E-02	35.20	R _{O₂} pendant 5h
RSD (%)	39.94	40.01	
	ligne de base en fin de mesure		
	delta O ₂	R _{O₂}	
moyenne	5.57E-02	64.20	mesure pendant 11h
RSD (%)	31.65	19.60	

Analyse des résultats

On remarque dans le tableau 5 que le RSD du ΔO_2 est toujours assez élevé (entre 32 et 40%), quelque soit la méthode de mesure de la ligne de base. Par contre pour la mesure du R_{O_2} , le choix de la ligne de base modifie la précision de la mesure du simple au double. En effet, on passe d'un RSD de 41% si la ligne de base est prise en début d'expérience à un RSD de 20% avec un RSD en fin d'expérience.

Pour la suite des analyses, nous avons affiché des barres d'erreur pour le R_{O_2} à 20% lorsque le pic de respiration était complet et 41% s'il ne l'était pas. De la même façon, pour le ΔO_2 , les barres d'erreurs seront calculées respectivement à 32% et 40%.

5.6. Influence des bactéries présentes sur le bois lors d'une mesure de nitrification en respirométrie solide

Investigation

Cette expérience permet de faire la différence entre la « respiration » due aux bactéries du bois et celle due au comportement physico-chimique du mélange boue/graviers/bois dans un réacteur durant un épisode de nitrification. Elle permet aussi de comparer la respiration des bactéries du bois avec celle des bactéries des boues et celle des bactéries des graviers. L'étude du bois imbibé d'eau usée autoclavée permet de maximiser la croissance des bactéries présentes initialement sur le bois avant l'injection.

D'autre part, nous souhaitons dissocier la disparition d'oxygène induite par la réaction physico-chimique-biologique dans un réacteur vide, de celle d'un réacteur rempli avec une substance considérée (ou supposée) comme inerte (bois autoclavé et graviers colonisés autoclavés) lors d'une injection d'une solution d'ammonium et de carbonates. Pour cela il semble intéressant d'étudier la réaction du réacteur vide lors de cette injection et de comparer les respirations entre le réacteur vide et le réacteur rempli du mélange bois autoclavé / graviers autoclavés.

Rappel des essais menés

- Réacteur vide (**témoin 1**)
- Bois autoclavé mélangé à des graviers autoclavés (**témoin 2**)
- Bois non autoclavé mélangé à des graviers autoclavés
- Bois non autoclavé imbibé pendant 24h d'eau usée autoclavée
- Moyenne sur une semaine de manipulation pour les mélanges de boue non autoclavée (boue « vivante ») avec du bois non autoclavé (**Point de comparaison 1**)
- Moyenne sur une semaine de manipulation pour les mélanges de graviers colonisés non autoclavés (graviers « vivants ») avec du bois non autoclavé (**Point de comparaison 2**)

Résultats

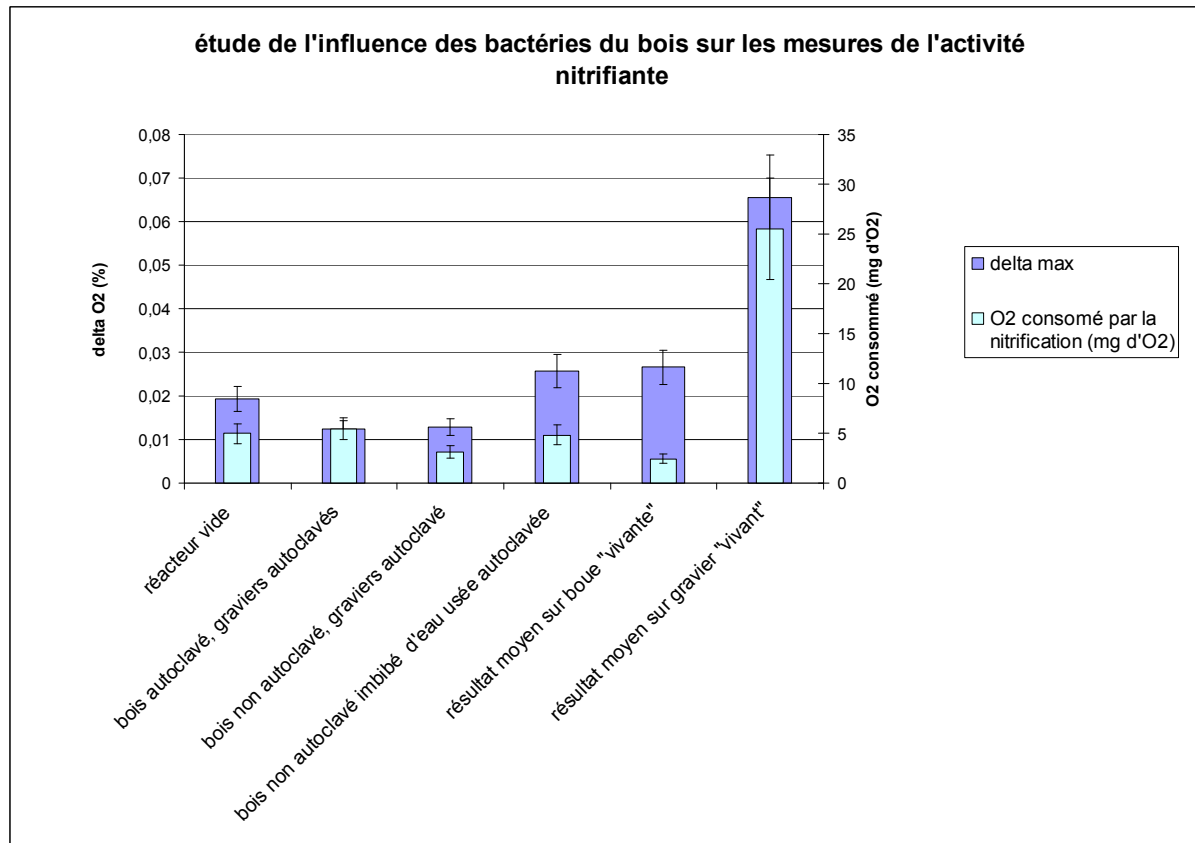


Figure 17 : comparaison des paramètres d'évaluation de la vitesse de nitrification en fonction du remplissage des réacteurs : vide ou plein, avec du bois autoclavé ou non, en comparaison avec les résultats moyens obtenus dans les conditions normales de remplissage des réacteurs.

Analyse des résultats

Vis à vis de la respiration des bactéries présentes sur le bois on peut considérer le mélange bois autoclavé / graviers autoclavés comme un témoin en comparaison avec le mélange bois non autoclavé / graviers autoclavés (figure 17). Cette comparaison permet d'évaluer si le bois apporte des bactéries. Les valeurs de la Figure 17 montrent que les consommations d'oxygène sont identiques. On en déduit donc que le bois n'apporte pas de bactéries modifiant la vitesse de nitrification. Cependant, lorsque le bois est imbibé d'eau usée autoclavée, on obtient un $\Delta O_2 \text{ max}$ plus élevé par rapport au cas du témoin 2, indiquant la présence de bactéries sur le bois. Cependant, il faut garder à l'esprit que lors d'une expérience « classique », le bois est imbibé d'eau du robinet et est enrobé de boues.

En comparant la respiration du mélange bois / graviers autoclavés avec celles obtenus avec des mélanges graviers/bois sans étape de stérilisation (graviers colonisés ou boues avec du bois non autoclavé), on observe les ratios suivants :

Pour les boues	Pour les graviers colonisés
<ul style="list-style-type: none"> ○ $\Delta O_2 \text{ max (boues)} = 2 \times \Delta O_2 \text{ max (témoin)}$ ○ $O_2 \text{ consommé par la nitrification (boues)} \sim O_2 \text{ consommé par la nitrification (témoin)}$ 	<ul style="list-style-type: none"> ○ $\Delta O_2 \text{ max (graviers)} = 5,5 \times \Delta O_2 \text{ max (témoin)}$ ○ $O_2 \text{ consommé par la nitrification (boues)} = 5 \times O_2 \text{ consommé par la nitrification (témoin)}$

En complément, on observe que le mélange témoin, comme le mélange de bois non autoclavé avec des graviers autoclavés, respire autant qu'un réacteur de respirométrie vide. Il y a donc un ou plusieurs phénomènes physico-chimiques ou biologiques qui entraînent une baisse de la pression partielle en O₂ dans les réacteurs de respirométrie solide, lors d'injection d'eau du robinet additionnée d'ammonium et de carbonates. C'est pour évaluer l'origine et l'importance de cette « respiration » que les expériences suivantes (sur les tuyaux, l'eau d'injection et les réacteurs) ont été menées.

5.7. Influence de l'état des tuyaux

Investigation

Cette expérience permet de savoir si le voile bactérien, qui se développe dans les tuyaux, serait responsable d'une respiration importante lors d'une mesure de vitesse de nitrification. On verra aussi si les bactéries des tuyaux respirent à cause de l'humidification du voile bactérien grâce à la libération du stock de matière organique, ou du fait de l'ammonium apporté par la bûchée.

Rappel du protocole

- Injection de 1L de solution d'ammonium et carbonates dans un réacteur vide avec des tuyaux anciens (**témoin**)
- Injection de 1L d'eau du robinet dans un réacteur vide avec des tuyaux anciens (**libération du stock de carbone organique et d'azote**)
- Injection de 1L d'eau du robinet dans un réacteur vide avec des tuyaux neufs (**évaluation de la respiration des bactéries des tuyaux**)
- Moyenne sur une semaine de manipulation pour les mélanges de boue non autoclavée (boue « vivante ») avec du bois non autoclavé (**point de comparaison 1**)
- Moyenne sur une semaine de manipulation pour les mélanges de graviers colonisés non autoclavés (graviers « vivants ») avec du bois non autoclavé (**point de comparaison 2**)

Résultats

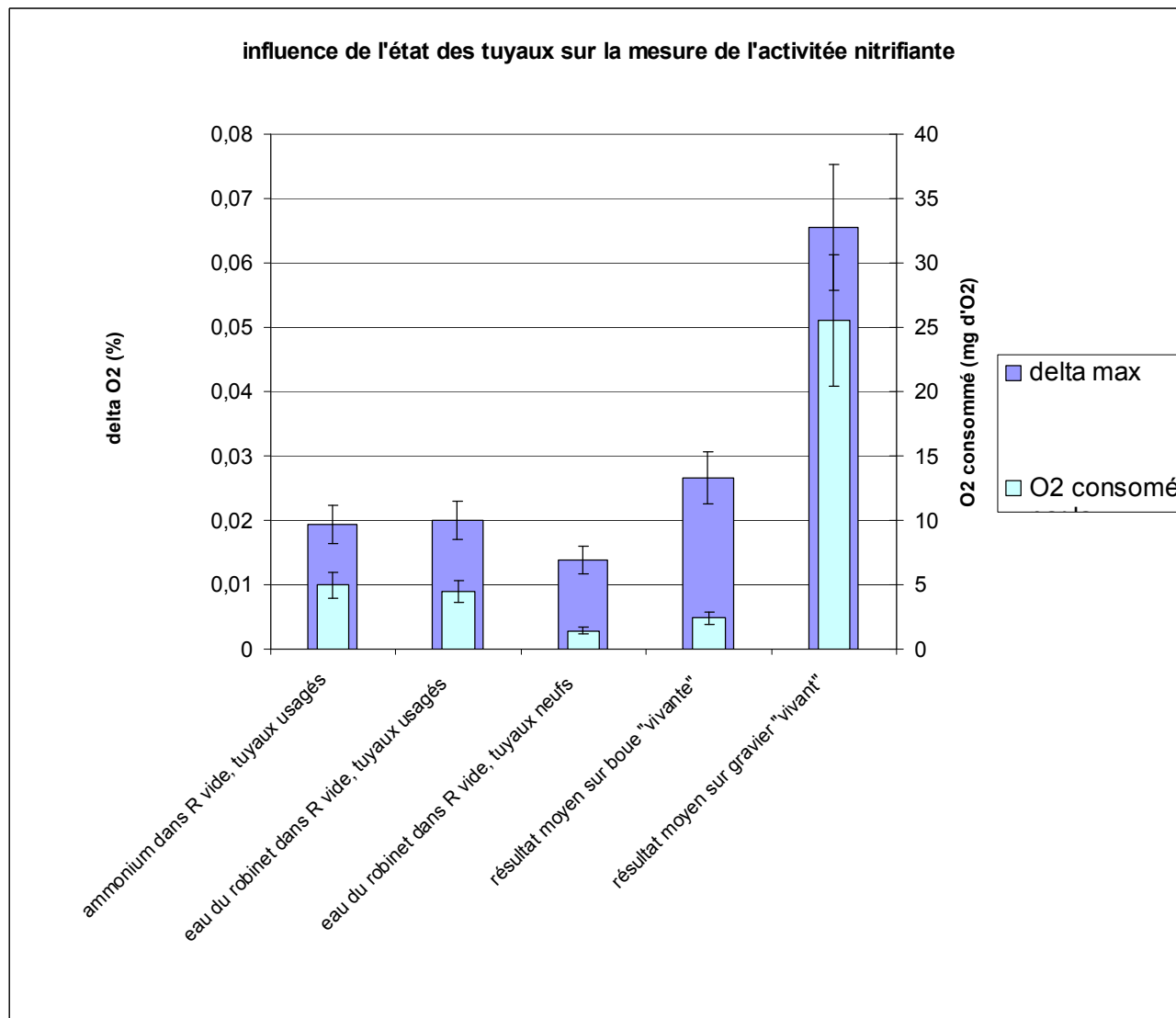


Figure 18 : paramètres représentant la vitesse de nitrification en fonction de l'état des tuyaux et du type de solution injectée

Analyse des résultats

Lors d'une injection de liquide dans un réacteur vide, les signaux respirométriques sont identiques avec de l'eau du robinet et une solution d'ammonium. Le pic de respiration observé n'est que très faiblement dû à l'ammonium injecté. La respiration observée peut donc être due à :

- la consommation du stock de carbone ou d'azote présent dans le biofilm par les bactéries du biofilm. Ce stock étant rendu assimilable par les bactéries grâce à l'humidité liée à l'injection
- une réaction physico-chimique due à l'injection d'un liquide dans le réacteur (cette hypothèse sera développée dans un paragraphe ultérieur)

Pour la suite des expériences sur la consommation de l'oxygène dans les tuyaux ou dans les réacteurs, on se basera donc sur des injections d'eau du robinet plutôt que de solution d'ammonium. Après avoir changé les tuyaux on observe :

- diminution du $\Delta O_2 \text{ max}$: 30% (peu significatif)

- diminution de l'O₂ consommée : 68% (fortement significatif)

Il est très probable qu'une consommation d'oxygène non négligeable ait lieu dans les tuyaux de circulation d'air (entre la sortie d'air des réacteurs et les pots servant de piège à eau, sur la boucle de recirculation). Pour améliorer la méthode, nous recommandons de nettoyer ces tuyaux avant le démarrage de chaque essai (élimination du voile bactérien). Pour cette opération prévoir 1h de maintenance, et s'assurer de l'étanchéité. D'autre part, il faut aussi prévoir de changer tout le circuit de circulation d'air tout les 12 mois de fonctionnement.

5.8. Influence du type d'eau utilisée pour les bâchées

Investigation

Cette expérience permet d'étudier l'influence de la saturation en O₂ de l'eau injectée, sur une mesure de vitesse de nitrification. En effet l'eau du robinet (ER), initialement utilisée pour faire les solutions d'ammonium, est insaturée en O₂

Rappel du protocole

- Injection de 1L d'eau déminéralisée (ED) non aérée (**témoin 1**)
- Injection de 1L d'eau du robinet (ER) non aérée (**témoin 2**)
- Injection de 1L d'eau du robinet (ER) aérée (**dissolution de l'oxygène dans l'eau du robinet**)
- Injection de 1L d'eau déminéralisée (ED) aérée (**respiration des bactéries des réacteurs en consommant leur stock de matière organique et consommation de nutriments de l'eau du robinet**)
- Moyenne sur une semaine de manipulation pour les mélanges de boue non autoclavée (boue « vivante ») avec du bois non autoclavé (**point de comparaison 1**)
- Moyenne sur une semaine de manipulation pour les mélanges de graviers colonisés non autoclavés (gravier « vivant ») avec du bois non autoclavé (**point de comparaison 2**)

Mesure du pH et de l'oxygène (matériel de terrain).

Résultats

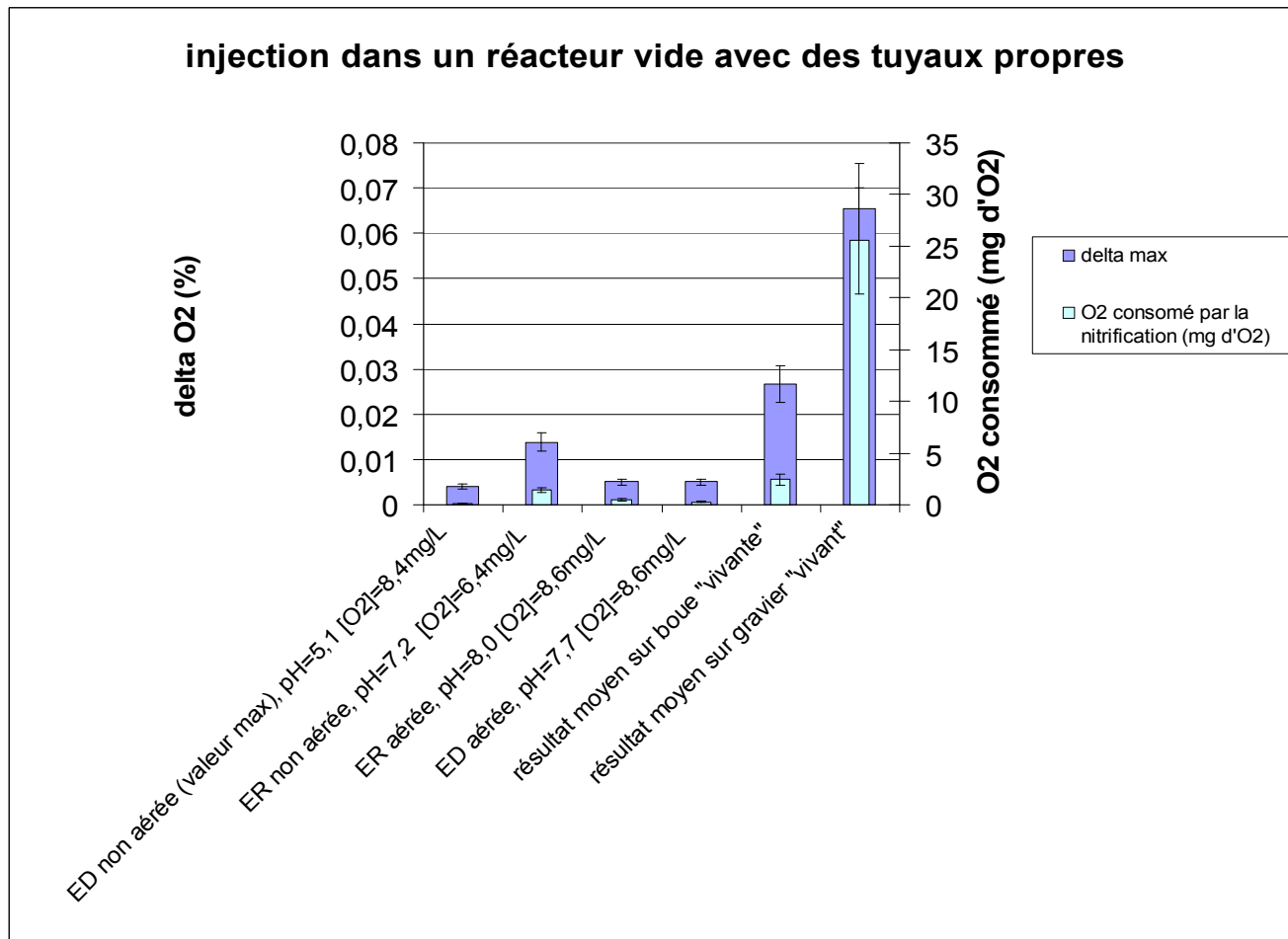


Figure 19 : signaux respirométriques lors d'injections de différents types d'eau dans un réacteur dont les tuyaux d'air sont neufs

Analyse des résultats

Effets du pH : on remarque que l'eau déminéralisée non aérée (pH = 5,1) a un pH plus acide que l'eau déminéralisée aérée (pH = 7,7). Les résultats respirométriques sont équivalents.

Effet de la teneur en oxygène dissous : l'eau du robinet a une concentration en O₂ de 6,4mg/L. Par comparaison, les autres essais ont été menés avec des concentrations en O₂ compris entre 8,4 et 8,6mg/L. On observe une consommation d'oxygène plus importante lorsqu'on injecte une eau du robinet non aérée par rapport à celle observée après l'injection d'eau du robinet aérée (augmentation du ΔO_2_{max} de 0,009% d'O₂ et du R_{O₂} de 0,95mg d'O₂). Il semble y avoir une dissolution de l'oxygène des réacteurs dans l'eau lors de l'injection. En comparaison à la respiration observée lors de bâchées d'ammonium sur des graviers, le ΔO_2_{max} lié à la saturation de l'eau représente respectivement 14% et 35% du signal pour des graviers colonisés et des boues. Pour l'oxygène consommé pendant le pic, on atteint respectivement 4% et 40% du signal pour les graviers colonisés et les boues. Nous en concluons qu'il serait préférable de mesurer la vitesse de nitrification en milieu solide avec une eau du robinet préalablement aérée pour préparer la solution d'ammonium à injecter.

Les résultats de la figure 19 démontrent que la différence entre la respiration après une injection d'eau déminéralisée aérée ou après une injection d'eau du robinet aérée est trop faible pour être significative, que ça soit pour le ΔO_2_{max} ou pour le R_{O₂}. On peut donc conclure

que la présence de nutriment dans l'eau du robinet est trop faible pour avoir un impact sur la respiration des bactéries des réacteurs.

Effet des bactéries des réacteurs : Pour ce qui est de la respiration des bactéries des réacteurs, celle-ci est très faible puisque le $\Delta_{O_2 \max}$ ne varie que de 0,001% (non représentatif) et que l' O_2 consommée pendant le pic de respiration passe de 0,08 à 0,26mg d' O_2 soit une consommation d' O_2 de 0,18mg ce qui est très faible (0,7%) en comparaison avec la consommation d'oxygène par la nitrification sur des graviers. Nous avons démontré que les bactéries présentes dans les réacteurs de respirométrie solide respirent peu par rapport à la respiration observée sur les graviers colonisés.

Effet de l'injection sur des boues de FPRv : lors de l'injection d'une solution d'ammonium dans un réacteur vide (avant changement des tuyaux et avec une eau non saturée en O_2), on observait une respiration presque aussi importante que lors de l'injection sur des boues de FPRv (dans les mêmes conditions opératoires) pour le R_{O_2} comme pour le $\Delta_{O_2 \max}$. On ne peut donc pas évaluer la vitesse de nitrification sur ces boues en respirométrie solide dans ces conditions opératoires.

5.9. Respiration de la matrice étudiée comparée aux consommations liées au protocole (mesure de la vitesse de nitrification)

On a vu dans les parties précédentes que l'entretien des réacteurs et la nature de l'eau injectée dans ces derniers, entraînent un artéfact de mesure, lors de l'évaluation de la vitesse de nitrification sur des boues ou sur des graviers colonisés. Les principaux puits (hors matrice étudiée) sont :

- La propreté des éléments périphériques aux réacteurs, et en particulier celle des tuyaux d'air (tuyaux non changés depuis un an et demi)
- La saturation en oxygène de l'eau utilisée pour la solution d'ammonium et de carbonates injectée : l'eau du robinet n'est pas saturée en oxygène
- La propreté des réacteurs nettoyés avant le démarrage de chaque essai, mais non stérilisés

Le présent paragraphe évalue la part de chaque compartiment, en comparaison avec les signaux enregistrés sur les matrices graviers colonisé et boues de FPRv.

5.9.1. Les boues de FPRv

Le paragraphe 5.8 a démontré que la mesure de vitesse de nitrification sur des boues de FPRv était limitée. Il faudrait appliquer le protocole corrigé (cf. Annexe n°1) et vérifier à nouveau la représentativité de la mesure de nitrification en respirométrie solide

5.9.2. Les graviers colonisés

La Figure 21 présente, pour le R_{O_2} et le $\Delta_{O_2 \max}$, les proportions d'erreurs, résultats des différentes étapes inhérentes au protocole de manipulation pour les graviers colonisés.

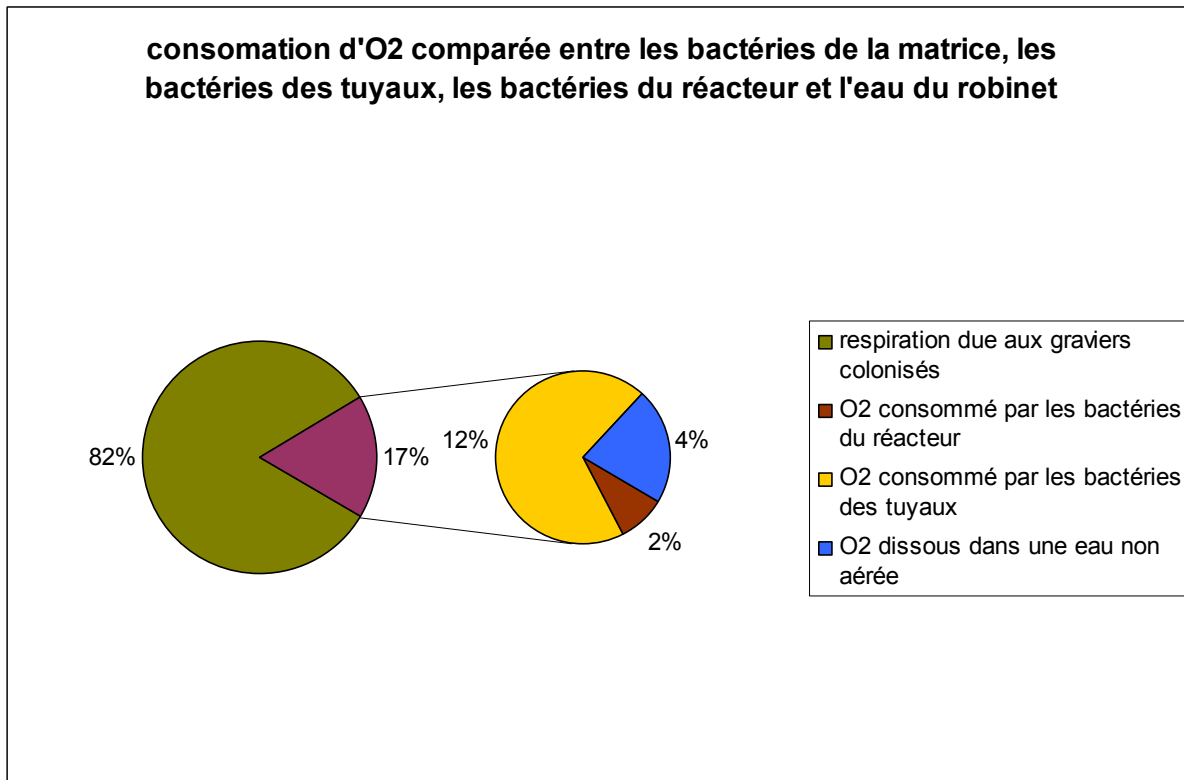


Figure 20 : importance du bruit de fond dû au protocole de manipulation, pour le R_{O₂}, lors d'une mesure de vitesse de nitrification sur des graviers colonisés.

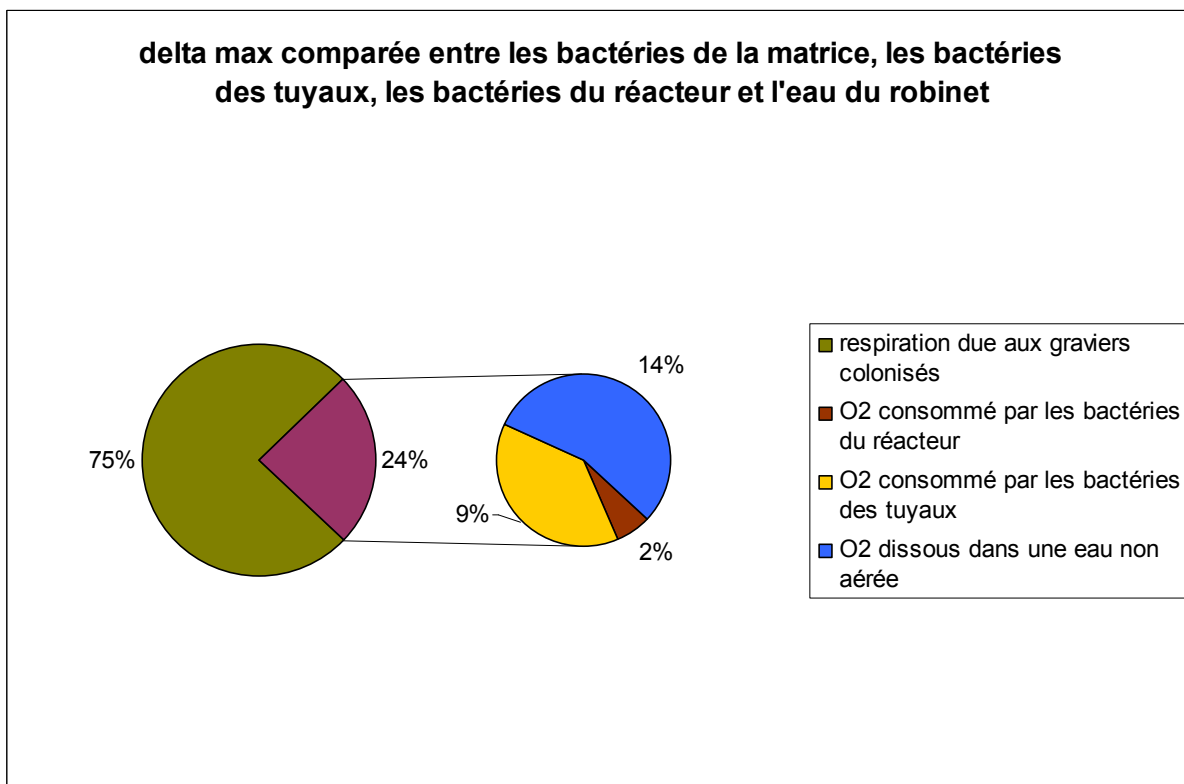


Figure 21 : importance du bruit de fond dû au protocole de manipulation, pour le Δ_{O₂ max}, lors d'une mesure de vitesse de nitrification sur des graviers colonisés.

La respiration des graviers colonisés représente les $\frac{3}{4}$ du signal enregistré. Le bruit de fond (d'origine protocolaire !) est de 17% pour le R_{O_2} et de 24% pour le $\Delta_{O_2 \max}$. Les bactéries des réacteurs (propres mais non stérilisés) représenteraient 2% de la respiration totale. L'eau d'injection, ou les bactéries des tuyaux, contribuent à hauteur de 4 et 12% pour R_{O_2} ; et 14 et 9% pour $\Delta_{O_2 \max}$.

Pour les prochaines expériences il sera donc important de :

- Continuer à laver les réacteurs à l'eau claire
- Changer ou nettoyer à l'eau de Javel, les tuyaux d'air entre la sortie des réacteurs et les pots récupérateurs d'eau, à la fin de chaque série d'expériences
- Amener l'eau d'injection à l'équilibre vis à vis de l'oxygène (voir protocole corrigé : Annexe n°1) avant injection

En suivant ces recommandations, on devrait réduire le bruit de fond pendant les mesures de vitesses de nitrification en milieu solide. Cependant il faudra quand même le vérifier avec un jeu de mesures de vitesse de nitrification sur des graviers et de mesures de vitesse de nitrification dans des réacteurs vides, effectuées selon le protocole « corrigé ».

5.10. Influence du rythme des bâchées

L'objectif de ces expériences est de savoir au bout de combien de bâchées d'ammonium les stocks des graviers sont saturés en azote. Pour cela on recherche un palier pour le $\Delta_{O_2 \max}$ et pour le R_{O_2} . On cherche d'abord à saturer le stock en azote des graviers pendant une semaine en faisant des bâchées isolées (cf. protocole 4.11.1). Puis on étudie la possibilité d'une saturation du stock par recirculation du même percolat pendant 30 minutes afin de diminuer la durée de l'expérience (cf. protocole 4.11.2).

5.10.1. Expérience sur quatre jours

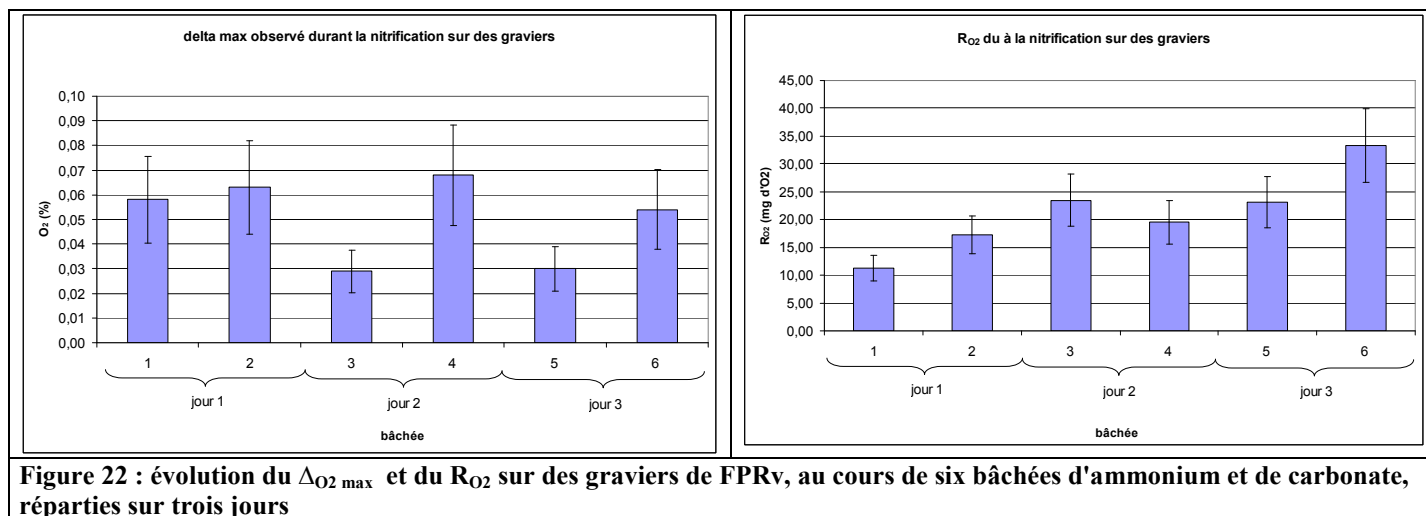
Rappel du protocole

On injecte un litre de solution, deux fois par jour pendant trois jours. A chaque injection on mesure un respirogramme puis on calcule le $\Delta_{O_2 \max}$ et le R_{O_2} .

Concentrations des solutions injectées :

- $[N-NH_4^+] = 95\text{mg/L}$
- $[HCO_3^-] = 850\text{mg/L}$

Résultats



Analyse des résultats

Vis à vis des $\Delta O_2 \text{ max}$ (figure 22), on n'observe pas d'évolution ni de palier particulier pendant les trois jours d'injection. Par contre, chaque jour la bâchée de l'après midi entraîne un $\Delta O_2 \text{ max}$ plus important que celle du matin. On peut, peut-être, expliquer ce phénomène par l'humidité des boues. En effet, la première injection de la journée a lieu entre 9h30 et 10h00, et la deuxième entre 13h30 et 14h30. Lors de la deuxième injection les boues étaient donc plus humides que lors de la première.

Pour le R_{O_2} (figure 22), on remarque un plateau entre la troisième et la cinquième bâchée. Les résultats des deux premières bâchées sont nettement inférieurs à la moyenne du R_{O_2} calculé sur les 6 bâchées ($R_{O_2 \text{ 2h}} = 21,3 \text{ mg d'O}_2$), et le résultat de la sixième bâchée est nettement supérieur à cette dernière. D'autre part le résultat moyen des bâchées trois à cinq ($R_{O_2 \text{ 2h}} = 22,1$) et très proche de la moyenne sur les six bâchées. On peut peut-être expliquer les faibles R_{O_2} des deux premières bâchées par le fait qu'elles servent à stabiliser le stock d'azote à la concentration imposée par la solution.

Pour calculer le R_{O_2} , il n'est donc pas nécessaire de mesurer l'oxygène en sortie de réacteur à chaque bâchée, mais seulement sur deux ou trois bâchées pendant les bâchées trois à cinq.

5.10.2. Recirculation du percolat pendant 30 minutes

Rappel du protocole

On injecte un litre de solution d'ammonium et de carbonate sur des graviers dans un réacteur de respirométrie solide. Cinq minutes après la première injection, on récupère le percolat et on le réinjecte. Cette opération est répétée de manière à avoir six injections de percolat. Pendant ces injections on enregistre la concentration d'oxygène dans l'air sortant du réacteur.

Résultats

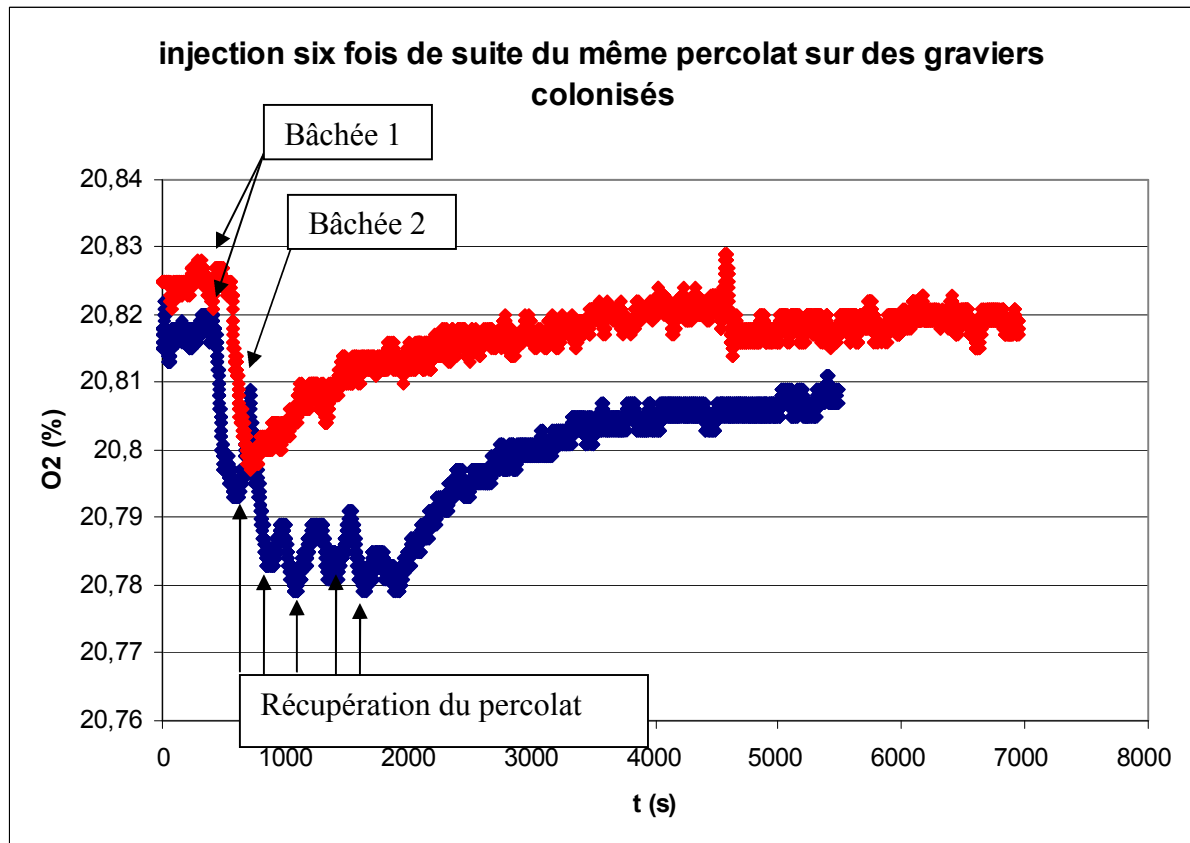


Figure 23 : comparaison de deux types de respirogrammes : après une seule bâchée, en rouge ; pendant six bâchées successives, en bleu

Analyse des résultats

Sur le respirogramme lié aux six bâchées successives, on ne peut pas calculer le R_{O_2} lié à une bâchée, par contre, on peut évaluer l'évolution du $\Delta_{O_2 \max}$ pour chaque injection de percolat. Dans un premier temps, on remarque que le $\Delta_{O_2 \max}$ est le même lors de la première bâchée pour une injection unique ou pour une recirculation du percolat. On peut donc supposer que le fait d'attendre cinq minutes avant de récupérer le percolat, suffit à atteindre le maximum de consommation d' O_2 par les bactéries du biofilm.

D'autre part, on observe, pour la recirculation du percolat, que le $\Delta_{O_2 \max}$ augmente jusqu'à la troisième bâchée puis se stabilise jusqu'à la dernière. En admettant que, dans ce cas, on peut faire un lien entre la stabilité du $\Delta_{O_2 \max}$ et celle du R_{O_2} , on peut dire que la consommation d'oxygène des graviers colonisés se stabilisent, vis à vis de leur réponse à l'azote, au bout de trois bâchées de solution d'ammonium quelque soit le temps écoulé entre ces bâchées.

Pour le calcul de R_{O_2} et $\Delta_{O_2 \max}$, il serait envisageable de procéder de la sorte :

- Application de deux bâchées successives sans analyse de gaz, puis attendre cinq heures pour que la respiration des bactéries retrouve son état initial.
- Au bout de cinq heures, application d'une injection d'ammonium et de carbonate avec un enregistrement de la concentration en O_2 pour tracer un respirogramme.

5.11. Une autre méthode de mesure de la vitesse de nitrification : la recirculation des gaz sans injection d'air extérieur

Afin d'amplifier la diminution de la concentration en oxygène lors de la nitrification, nous avons supprimé l'arrivée continue d'air dans un des réacteurs et avons suivi la diminution de la concentration en O₂ dans l'air recirculée. Cela implique un changement du réseau de tuyaux d'air comme détaillé au paragraphe 4.12.

Rappel du protocole

On remplit le réacteur comme pour une mesure de vitesse de nitrification classique, mais on renvoie l'air sortant de l'analyseur de gaz vers la boucle de recirculation d'air. La nourrice d'air est débranchée.

Les 90 premières minutes correspondent à la respiration du biofilm avant injection d'ammonium. Après on mesure le cumule de la respiration due à la dégradation de la matière organique et de celle due à la nitrification.

Résultats

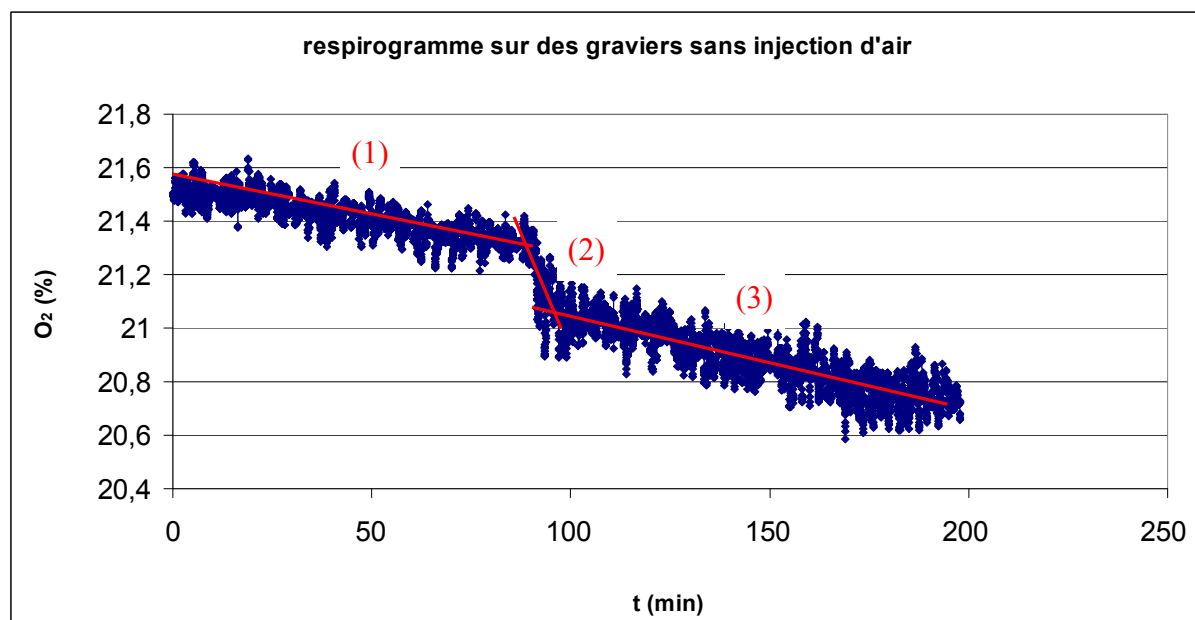


Figure 24 : évolution de la concentration d'O₂ dans l'enceinte d'un réacteur de respirométrie solide sans apport d'air extérieur : (1) sans injection de NH₄+carbonates ; (2) à t= 90 min injection d'ammonium et de carbonates ; (3) 10 minutes après l'injection.

Tableau 6 : pentes de respiration des graviers, avant et après injection, et de l'oxygène consommé par la nitrification

	pente (% d'O ₂ /s)	pente (mg d'O ₂ /h)	O ₂ consommé par la nitrification (mg d'O ₂ /h)	O ₂ consommé par phase (mg)
pente avant l'injection (1)	-4,2E-05	-21,06	0,00	0,00
pente pendant les 10 min suivant l'injection (2)	-3,9E-04	-192,01	170,95	27,35
pente 20 min après l'injection (3)	-6,5E-05	-32,06	10,99	11,87

Analyse des résultats

La figure 24 met en évidence que l'amplitude de respiration est dix fois plus importantes (0,6%) que pour une mesure de vitesse de nitrification avec injection d'air extérieur (0,05%). L'objectif qui consiste à augmenter le signal est donc atteint. Par contre l'imprécision de la

mesure est aussi plus importante car on observe une forte oscillation de la concentration en O₂ (0,2 à 0,3%) tandis qu'avec une injection d'air extérieur, l'oscillation est de l'ordre de 0,005%.

Il n'est donc pas sûr que cette méthode soit plus précise que la méthode habituelle, par contre, elle permettra peut-être de mettre en place un matériel de mesure de la concentration en O₂ qui soit moins précis (et donc beaucoup moins cher) que l'analyseur de gaz paramagnétique. Le fait d'utiliser un analyseur moins précis permettrait d'équiper chaque réacteur séparément, et donc, de faire six analyses en même temps. Cela permettrait d'améliorer le poids statistique de la mesure.

5.12. Mesure de la respiration des bactéries nitrifiantes pendant 2h ou 12h

Afin de faire un maximum de mesures de respirométrie solide, il est intéressant de mesurer la respiration des bactéries suite à l'injection d'ammonium pendant le temps le plus court possible. C'est ce qui a été réalisé en 2009 (Philippe, 2009). En 2010, j'avais pour objectif de d'évaluer l'impact de cette pratique. C'est pour cela que l'on cherche à vérifier la pertinence d'une mesure courte (2h), qui ne permet pas le retour à la respiration initiale, par rapport à une mesure plus longue (12h), qui suppose que les bactéries nitrifiantes ont consommé tout l'ammonium possible.

Rappel du protocole

Suite à l'injection d'ammonium sur des graviers, on mesure la respiration dans un respiromètre solide pendant douze heures. Puis, en prenant la respiration initiale comme ligne de base, on calcule le :

- R_{O2} pendant 2h.
- R_{O2} calculé jusqu'à ce que la respiration enregistrée revienne à l'état initial (quatre à cinq heures).

En prenant la ligne de base en fin d'expérience, on calcule un R_{O2} complet.

Résultats

Tableau 7 : évolution du R_{O2} suite à la sixième injection d'ammonium entre une mesure de la respiration pendant 2h et pendant 5h. Dans les deux cas la ligne de base est prise avant l'injection d'ammonium.

	O2 consommé pendant 2h (mg d'O2)	O2 consommé pendant 5h (mg d'O2)	pourcentage d'erreur si l'on n'étudie la nitrification que pendant 2h (en %)
R6B2	17,27	23,57	26,71
R6B4	19,54	27,53	29,03
R6B6	33,27	44,11	24,56
		erreur moyenne (%)	26,8
		écart type/moyenne (%)	8,4

Tableau 8 : évolution du R_{O2} suite à la sixième injection d'ammonium entre une mesure de la respiration pendant 2h (ligne de base avant l'injection d'ammonium) et pendant 12h (ligne de base en fin d'expérience)

	O2 consommé pendant 2h (mg d'O2)	O2 consommé pendant 12h (mg d'O2)	pourcentage d'erreur si l'on n'étudie la nitrification que pendant 2h (en %)
R6B2	17,27	41,42	58,30
R6B4	19,54	74,39	73,74
R6B6	33,27	73,19	54,54
		erreur moyenne (%)	62,2
		écart type/moyenne (%)	16,4

Analyse des résultats

On remarque dans les tableaux 7 et 8 une augmentation du R_{O_2} quand on le mesure pendant 5h (contre 2h). en se référant au tableau 5 on remarque que la mesure est plus stable (RSD = 20%) en prenant la ligne de base en fin d'expérience qu'avec une ligne de base en début d'expérience (RSD = 40%).

D'autre part, l'augmentation du R_{O_2} entre deux et cinq heures, est proche de 27 avec un RSD de (8,4%). Il ne semble donc pas nécessaire de mesurer la respiration pendant cinq heures pour avoir un R_{O_2} à partir d'une ligne de base en début d'expérience, puisqu'il suffit de mesurer un R_{O_2} pendant deux heures et de l'augmenter de 27%.

Par contre pour avoir une mesure plus stable, il est vivement recommandé de mesurer la respiration pendant douze heures et prendre la ligne de base à la fin de l'expérience. L'écart avec la mesure à 2 et 5h est d'environ 62%.

5.13. Corrélation entre les résultats de la respirométrie solide et ceux de l'analyse chimique des percolats de respirométrie solide

Le travail de mon stage a également consisté à corréler des résultats de respirométrie solide ($\Delta_{O_2 \max}$ et R_{O_2}) à ceux beaucoup plus simples que l'on peut tirer des analyses chimiques des percolats issus des réacteurs.

Rappel du protocole

Un réacteur est rempli de graviers et de bois puis alimenté par six bâchées pendant trois jours. En plus de mesurer un respirogramme par bâchée, on fait un bilan de production de NO_3^- sur le percolat.

Résultats

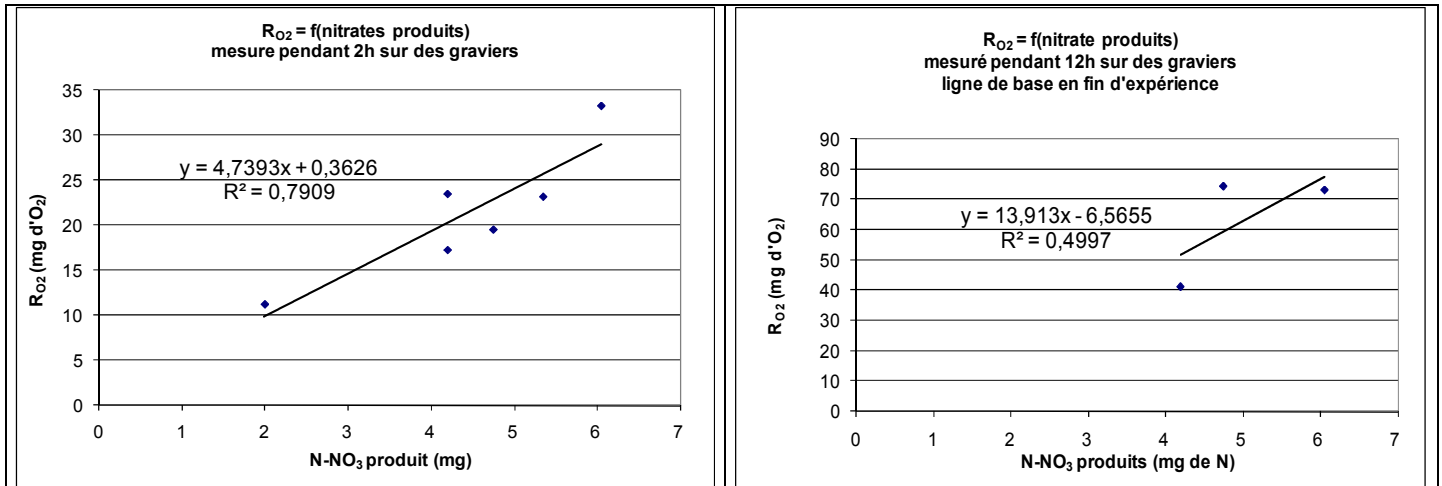


Figure 25 : relation entre le R_{O₂} mesuré pendant 2h et 12h dans un réacteur de respirométrie solide et le bilan entré-sortie de production de nitrate lors d'une bâchée d'ammonium (l'eau injectée contient seulement 1,35 mgN/L)

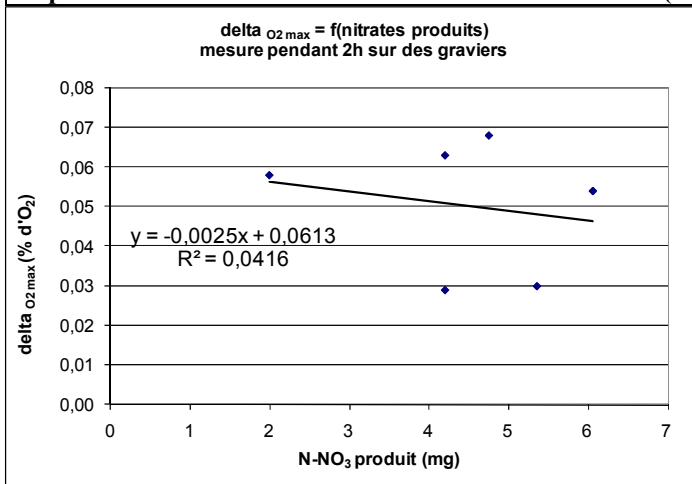


Figure 26 : relation entre le $\Delta_{O_2 \max}$ dans un réacteur de respirométrie solide et le bilan entré-sortie de production de nitrate lors d'une bâchée d'ammonium (l'eau injectée contient seulement 1,35 mgN/L)

Analyse des résultats

On observe une très mauvaise corrélation entre le $\Delta_{O_2 \max}$ et la production de nitrates suite à une bâchée d'ammonium (figure 26). Cela signifie peut être que ce paramètre ne représente pas bien la nitrification sur des graviers. Il représente la vitesse maximum de nitrification, mais le lien entre cette vitesse et la vitesse moyenne de nitrification n'est pas forcément évident.

D'autre part on remarque sur la figure 25, que la corrélation entre le R_{O₂} mesuré pendant deux heures et les nitrates produits a un $R^2 = 0,8$, tandis que, avec le R_{O₂} mesuré pendant douze heures, on a $R^2 = 0,5$, ce qui est peut être dû au faible nombre de mesures ($n = 3$). On peut donc penser que le R_{O₂} est un bon moyen d'évaluer la vitesse de nitrification moyenne sur des graviers en respirométrie solide.

Par contre on sait que les bactéries consomment en moyenne 4,3g d'O₂/g de N-NO₃ produit. Or dans la figure 25, ce chiffre est plus important puisqu'il va de 4,7 à 13,9g d'O₂/g de N-NO₃ respectivement en 2h et 12h. Cela signifie donc que l'analyse chimique des nitrates produits sous-estime fortement la nitrification. Il n'est donc pas possible de remplacer la respirométrie solide par une analyse chimique. Peut être est-ce dû au fait que les boues stockent les nitrates produits ou les dénitrifient.

5.14. Résultats sur les boues et graviers

Ce paragraphe présente les résultats généraux retenus, pour l'évaluation de la dégradation de la matière organique des boues de LSPR, et pour la vitesse de nitrification sur des graviers de FPRv.

5.14.1. Pour l'étude de la dégradation de la matière organique des boues de LSPR

Ce paragraphe présente l'évolution des résultats de respirométrie solide des différents types de boues provenant de LSPR. Il permet donc d'évaluer l'évolution de la dégradation de la matière organique en fonction du temps de séchage après la dernière alimentation du LSPR (dernière alimentation le 10/04/2010).

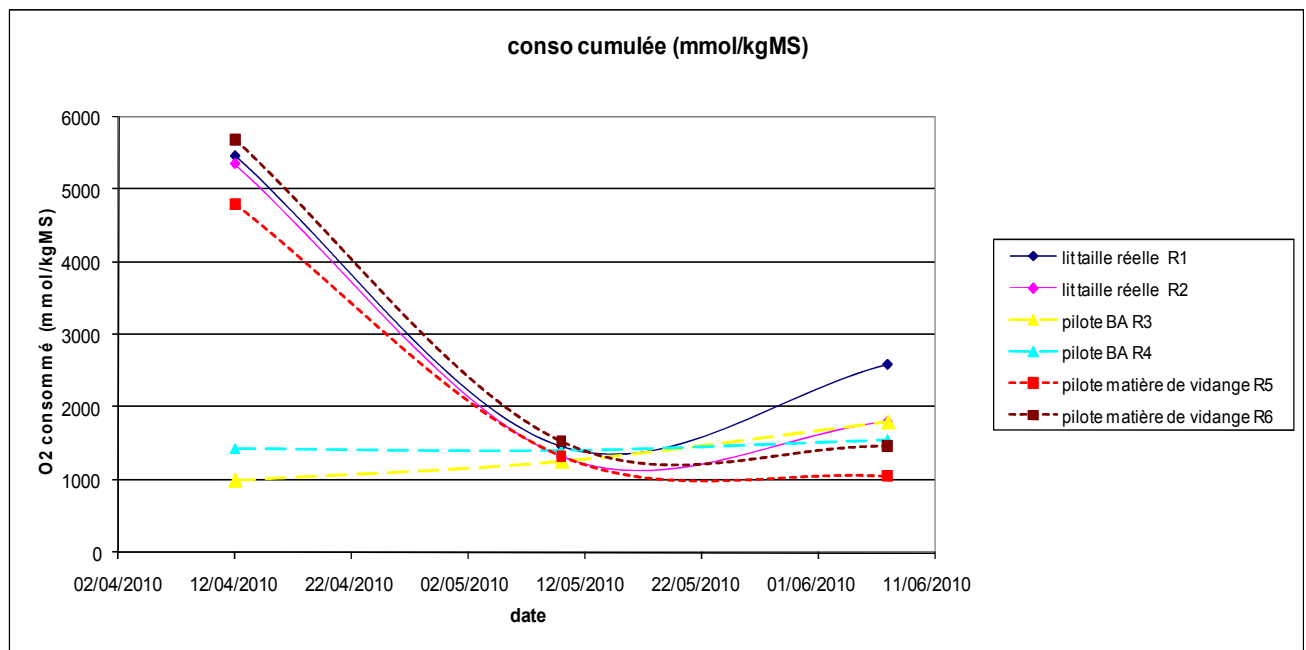


Figure 27 : évolution de la respiration de boues de LSPR en fonction du temps de séchage avant la mesure (dernière alimentation du LSPR le 10/04/2010). Les LSPR sont alimentés par des boues activées (BA) ou des matières de vidange (MV).

On observe sur la figure 27 que la respiration des boues est stable au bout d'un mois de séchage. On peut donc penser que les bactéries des boues ont dégradé la majorité de la matière organique en un mois. En effet, en un mois, la respiration des boues de BA est passée de 5500 à 1800 mmolO₂/kgMS, et celle des boues de matière de vidange est passée de 5700 à 1050 mmolO₂/kgMS. Par la suite la respiration semble s'être stabilisée.

5.14.2. Pour l'étude de la vitesse de nitrification des graviers de FPRv

Pour calculer la vitesse de nitrification sur des graviers colonisés de FPRv, on se base sur deux paramètres : le ΔO_2 et le R_{O_2} calculé pendant deux heures. Les valeurs du tableau sont des moyennes, calculées en tenant compte des expériences précédentes :

- ΔO_2 : moyenne sur les ΔO_2 des bûchées 2, 4 et 6
- R_{O_2} : moyenne sur les R_{O_2} des bûchées 3,4 et 5

Tableau 9 : valeurs moyennes représentatives de la vitesse de nitrification sur des graviers de FPRv.

respirométrie en phase solide		
mesurée à partir de	gravier	
	delta max	O2 consommé par la nitrification pendant 2h
vitesse de nitrification [gO ₂ /(h.g de MVS)]	1,3E-03	3,2E-04

Le tableau 9 montre que, sur un échantillon de 1,5L de graviers de FPRv, on a une vitesse de nitrification maximum de 1,3 mgO₂/(h . g de MVS) et une vitesse de nitrification moyenne de 0,32 mgO₂/(h . g de MVS). Ces paramètres pourront être utilisés pour alimenter le modèle numérique de FPRv.

Conclusion

Ce stage m'a permis d'intégrer une équipe de recherche sur le traitement des eaux usées, au sein du Cemagref de Lyon, ce qui s'inscrit parfaitement dans le cadre de mes études que je souhaite poursuivre par une thèse.

Le travail sur les boues de LSPR, m'a permis d'améliorer la répétabilité de la mesure de consommation d'O₂ pour la dégradation de la matière organique en milieu solide. En effet, la mise au point d'un tassage mécanique m'a permis de faire diminuer le RSD de la mesure de 32% à 7%. Par ailleurs, cette étude alimentera une étude sur la caractérisation de différentes boues de LSPR, et l'utilisation de LSPR pour le traitement des matières de vidanges.

Le travail sur la méthode de la mesure de la vitesse de nitrification sur des graviers de FPRv, m'a permis de l'améliorer sur plusieurs points. En créant un protocole de tassage mécanique et de mélange automatique, j'ai amélioré la répétabilité des mesures de Δ_{O_2} et de R_{O₂}. En effet le RSD est passé respectivement de 22% et 102% à 15% et 12%. D'autre part, l'étude du R_{O₂} calculé pour différente durée a permis de mettre en évidence qu'une mesure pendant 2h était suffisante dès lors que les graviers ont déjà été alimentés par 3 bâchées successives. Néanmoins, la mesure pendant 12h reste la plus précise.

Ensuite, l'étude des paramètres indépendants de la nature des graviers, a permis de mettre en évidence une respiration propre aux réacteurs, aux tuyaux et à l'eau des bâchées pour un total de 17% et 24% de la respiration causée par les graviers de FPRv colonisés pour le R_{O₂} et le Δ_{O_2} respectivement. Cette étude m'a permis de mettre en évidence le fait qu'il faut changer régulièrement les tuyaux d'air en sortie de réacteurs ; et qu'il est indispensable de saturer l'eau injectée en oxygène avant injection.

Finalement, et après amélioration de la méthode, on peut calculer une consommation maximale et moyenne d'O₂ liée à la nitrification de respectivement 1,3 et 0,32 mgO₂/(h . g de MVS). Ces valeurs pourront être utilisées pour alimenter le model numérique de modélisation du fonctionnement d'un FPRv.

Bibliographie

- F. Adani, Lozzi *Determination of biological stability by oxygen uptake on municipal solid waste and derived products* 2001 *Compost Science and Utilization* 9 (2), pp. 163-178
- F. Adani,* R. Confalonieri, and F. Tambone *Dynamic Respiration Index as a Descriptor of the Biological Stability of Organic Wastes* J. Environ. Qual. 33:1866–1876 (2004).
- R. B. Gómez, F. Vázquez Lima and A. S. Ferrer *The use of respiration indices in the composting process: a review* Waste Manag Res 2006; 24; 37
- R. Barrena, G. d'Imporzano, S. Ponsa, T. Gea, A. Artola, F. Vazquez, A. Sanchez, F. Adani *In search of a reliable technique for the determination of the biological stability of the organic matter in the mechanical–biological treated waste* Journal of Hazardous Materials 162 (2009) 1065–1072
- J.-C. Boeglin. *Traitements biologiques des eaux résiduaires* Techniques de l'ingénieur, réf J 3 942
- C. Boutin, A. Lienard, P. Molle *Les filtres plantés de roseaux, le lagunage naturel et leurs associations : Comment ? Pourquoi ?*
http://www.cemagref.fr/Informations/Actualites/une/08/epurationroseaux/boutinweb_11997884871.pdf 2007
- H. Brix, H.-H. Schierup, C. A. Arias *Twenty years experience with constructed wetland systems in denmark what did we learn?* 10th International Conference on Wetland Systems for Water Pollution Control
- K. Chandran, Z. Hu, B. F. Smets *A Critical Comparison of Extant Batch Respirometric and Substrate Depletion Assays for Estimation of Nitrification Biokinetics* Biotechnology and Bioengineering, Vol. 101, No. 1, September 1, 2008
- K. Chandran, B. F. Smets, 2000 *Single-Step Nitrification Models Erroneously Describe Batch Ammonia Oxidation Profiles when Nitrite Oxidation Becomes Rate Limiting* Biotechnology and Bioengineering, Volume 68 Issue 4 (p 396-406)
- S. Chiban *Validation d'un outil de caractérisation de l'activité biologique des filtres plantes de roseaux (Respirométrie solide) en vue de leur modélisation.* Rapport de stage au Cemagref, 2008
- J-M Choubert *Rapport RESOFIX 2008.*
- J.-M. Choubert *analyse et optimisation du traitement de l'azote par les boues activées a basse température* Thèse présentée et soutenue publiquement le 20 septembre 2002
- J.-M. Choubert, C. Druilhe, F. Béline, S. Gillot, *Principales techniques de fractionnement de la matière organique des déchets liquides utilisables en modélisation des bioprocédés* Techniques de l'ingénieur IN98, 4-2010, 15 p. (2010)
- E. Daverio, F. Aulenta, J. Lighthart, C. Bassani, A. Rozzi *Application of calorimetric measurements for biokinetic characterisation of nitrifying population in activated sludge* Water Research 37 (2003) 2723–2731
- G. Deronzier, S. Schérite, Y. Racault, J.-P. Canler, A. Liénard, A. Héduit, P. Duchène *Traitement de l'azote dans les stations d'épuration biologique des petites collectivités* FNDAE n°25

- J. D. Parras. *Operation and model description of advanced biological nitrogen removal treatments of highly ammonium loaded wastewaters* Thèse produite en 2007 à l'université de Barcelone
- C. Fux *Le procédé ANNAMOX pour l'élimination de l'azote dans les stations d'épuration* EAWAG news 56
- C. Fux, M. Boehler, P. Huber, I. Brunner, H. Siegrist *Biological treatment of ammonium-rich wastewater by partial nitrification and subsequent anaerobic ammonium oxidation (anammox) in a pilot plant* Journal of Biotechnology 99 (2002) 295–306
- D. Gapes, S. Pratt, Z. Yuan, J. Keller *Online titrimetric and off-gas analysis for examining nitrification processes in wastewater treatment* Water Research 37 (2003) 2678–2690
- A. Gernaey, B. Petersen, J.-P. Ottoy and P. Vanrolleghem *activated sludge monitoring with combined respirometric titrimetric measurements* Wat. Res. Vol. 35, No. 5, pp. 1280–1294, 2001
- F. Gillon *modélisation et optimisation par plans d'expériences d'un moteur à commutations électroniques* thèse, Ingénieur EUDIL, 2004
- P. Ginestet, J.-M. Audic, V. Urbain, and J.-C. Block *Estimation of Nitrifying Bacterial Activities by Measuring Oxygen Uptake in the Presence of the Metabolic Inhibitors Allylthiourea and Azide* applied and environmental microbiology, June 1998, p. 2266–2268
- N. Harouiya, C. Boutin, A. Lienard, P. Molle *Phosphorus removal by apatite in horizontal flow constructed wetlands for small communities. Pilot and full-scale evidence* Water Science and Technology (article en presse 2010)
- R. W. Howart *Human acceleration of the nitrogen cycle: drivers, consequences, and steps toward solutions* Water Science and Technology Vol 49 No 5–6 pp 7–13 (2004)
- G. Koch, M. Ku Hni and H. Siegrist *Calibration and validation of an ASM3-based steady-state model for activated sludge systems part I : prediction of nitrogen removal and sludge production* Wat. Res. Vol. 35, No. 9, pp. 2235–2245, 2001
- E. M. Contreras; F. Ruiz; and N. C. Bertola *Kinetic Modeling of Inhibition of Ammonia Oxidation by Nitrite under Low Dissolved Oxygen Conditions* Journal Of Environmental Engineering © Asce / March 2008
- P. Molle, S. Prost-Boucle, A. Lienard *Potential for total nitrogen removal by combining vertical flow and horizontal flow constructed wetlands: A full-scale experiment study* Ecological Engineering Volume 34, Issue 1, 4 August 2008, Pages 23-29
- P. Molle, S. Prost-Boucle, Z. Dong, A. Lienard *potential of total nitrogen removal by combining vertical flow and horizontal flow constructed wetlands : a full scale experiment study*. 10th international conference on wetlands systems for water pollution control, September 23-29, 2006 - Lisbon - Portugal
- B.-J. Ni, F. Fang, W.-M. Xie, H.-Q. Yu *Growth, maintenance and product formation of autotrophs in activated sludge: Taking the nitrite-oxidizing bacteria as an example* water research 42 (2008)4261–4270
- F. Olivier *Expression de l'activité des bactéries nitrosantes issues de stations d'épuration en milieu Seine Etude en réacteurs* thèse présentée en 2005 à L'université Paris Xi Orsay
- M. Pillet *Construire facilement des plans de résolution IV à partir des tables de TAGUCHI* Revue de statistique appliquée, Tome 46, n°4, 1998, p.85-100

M.N. Pons, H. Spanjers, D. Baetens, O. Nowak, S. Gillot, J. Nouwen, N. Schuttinga
Wastewater Characteristics in Europe – A Survey Official Publication of the European Water Association (EWA) 2005

A. de Saléon *Evaluation, Amélioration et Alimentation d'un outil de caractérisation de l'activité biologique des filtres plantés de roseaux (Respirométrie solide) en vue de leur modélisation* Rapport de stage au Cemagref, 2008-2009

M. Spérandio, M. Heran, S. Gillot. *Modélisation dynamique des procédés biologiques de traitement des eaux* Techniques de l'ingénieur, réf W 6 500

A. Souef *Bioaugmentation de l'activité nitrifiante des boues activées* Thèse préparée au Cemagref d'Antony avec l'université ParsiXII, 2008

S. Teissier *bilan des transformations de l'azote en rivière. développements méthodologiques de la mesure des flux d'interface et applications (sediments, biofilms epilithiques de la garonne)* Thèse soutenue le 15 Mai 2001 à l'université Toulouse III.

A. Tremier, A. de Guardia, C. Massiani, E. Paul, J.L. Martel *A respirometric method for characterising the organic composition and biodegradation kinetics and the temperature influence on the biodegradation kinetics, for a mixture of sludge and bulking agent to be co-composted* Bioresource Technology 96 (2005) 169–180

S. Troesch, A. Liénard, P. Molle, G. Merlin, and D. Esser, *Treatment of septage in sludge drying reed beds: A case study on pilot-scale beds* Water Science and Technology 60(3) (2009) 643-653

S. Troesch, *Traitement et valorisation des boues et des matières de vidange par lits de séchage plantés de roseaux* 272 pages, Université de Savoie(2009)

B. Wett, W. Rauch *The role of inorganic carbon limitation in biological nitrogen removal of extremely ammonia concentrated wastewater* Water Research 37 (2003) 1100– 1110

Annexes

1. Protocole de mesure de l'activité nitrifiante de boues solides par respirométrie	73
1.1. Introduction.....	73
1.2. La veille de l'arrivée des échantillons (ou quelques jours avant).....	73
1.3. Préparation des réacteurs	73
1.3.1. Protocole de mélange des graviers et du structurant.....	73
1.3.2. Protocole de tassage du mélange dans les réacteurs	74
1.4. Enregistrement d'un respirogramme lié à la nitrification des graviers.....	74
1.4.1. Préparation des solutions d'ammonium et de carbonate	74
1.4.2. Aspersion des graviers par une bâchée et enregistrement du respirogramme	74
1.5. Nettoyage des réacteurs	75
1.6. Traitement des données	75
2. Protocole de mesure de la respiration de boues de FPRv ou de LSPR.....	76
3. Etat des tuyaux de circulation d'air au bout de 18 mois.....	77
4. Comparaison respirométrie solide et respirométrie liquide pour la mesure de vitesse de nitrification	78

1. Protocole de mesure de l'activité nitrifiante de boues solides par respirométrie

1.1. Introduction

Ce protocole permettra à un agent de mesurer l'activité nitrifiante des graviers d'un FPRv solides à l'aide du matériel de respirométrie solide situé dans le bâtiment Ardèche. Cette expérience vise à mesurer la respiration de boues liée à leur activité nitrifiante (consommation d'oxygène accompagnée de production de CO₂) quand elles sont soumises à une aspersion par un liquide contenant du NH₄⁺.

1.2. La veille de l'arrivée des échantillons (ou quelques jours avant)

Pour faire un suivi respirométrique dans de bonnes conditions, il faut avoir un « blanc » adaptée. Pour cela, il faut étalonner l'analyseur de gaz, vérifier que les pièges à eau sont vides et que les humidificateurs d'eau (bulleurs) sont pleins (remplis à 1/3 environ), puis lancer les cycles d'acquisition réacteurs vides et propres. En effet, la composition de l'air de référence est différente de celle de l'air qui a traversé les réacteurs. Il faut pouvoir en tenir compte pendant le traitement ultérieur des données.

Il faut également humidifier le structurant (s'il s'agit de bois) afin qu'il n'absorbe plus d'eau, ce qui nuirait aux bilans matières effectués plus tard. Pour cela, plonger suffisamment de bois (2L par réacteur au moins) dans un seau plein d'eau, et recouvrir d'un poids (pot rempli d'eau) pour le maintenir immergé.

Le circuit liquide doit être vidé pour éviter le développement d'algues ou de microorganismes. De la même façon il faut nettoyer et stériliser les tuyaux d'air entre la sortie des réacteurs et les pièges à eau (voir chapitre « nettoyage des pièges à eau »).

1.3. Préparation des réacteurs

1.3.1. Protocole de mélange des graviers et du structurant

Le jour du prélèvement des échantillons en stations, les réacteurs sont remplis avec un mélange de graviers et de structurant (copaux de bois).

- Mesurer 1L de bois humidifié et 0,75L de graviers colonisés dans une éprouvette graduée.
- Peser séparément le bois et les graviers.
- Dans un bocal en verre de 2,2L (bocal numéroté de 1 à 6 avec un couvercle en aluminium) mettre 1,75L de préparation à mélanger. Soit 1L de bois humidifié et 0,75L de boue.
- Remplir les 5 autres bocaux avec les mêmes quantités de boue et de bois, évaluées grâce au poids et non grâce au volume. Noter ces poids sur la feuille de préparation de chaque respiromètre.
- Rincer le bouchon pour s'assurer qu'aucun gravier ne s'est coincé dans le joint orange, ce qui l'endommagerait et diminuerait l'étanchéité du bocal.
- Fixer les bocaux dans le mélangeur à poudre en utilisant des cales en polystyrène expansé. Veiller à visser fortement la visse de blocage afin d'assurer une bonne étanchéité du bocal (même si le bocal tient dans la machine le joint n'est pas forcément assez écrasé).

- Afin de faciliter le remplissage du mélangeur à poudre, il est préférable de fixer les bocal alternativement de part et d'autre de l'axe de rotation.
- Régler la vitesse de rotation à approximativement 60 tours/min en ajustant la molette au niveau du numéro 1.
- Mettre en rotation pendant 2 minutes.
- Verser le contenu de chaque bocal dans son réacteur respectif, sur la grille recouverte de géotextile. Recommencer l'opération une deuxième fois pour qu'il y ait environ 3L de mélange dans chaque respiromètre.
- Tasser le contenu des réacteurs en suivant le protocole de tassage avec l'outil.

1.3.2. Protocole de tassage du mélange dans les réacteurs

Après avoir mélangé le bois et les graviers colonisés dans les bocaux de mélange mécanique, il faut :

- Verser le contenu d'un bocal dans la cuve du réacteur de respirométrie solide (environ 1,75L).
- Répartir le mélange de manière uniforme dans la cuve en prenant soin de ne pas le tasser. Bien répartir le mélange sur les bords du réacteur afin d'éviter les passages préférentiels des gazes autour du « cylindre » de boues.
- Poser doucement le cercle en PVC de l'outil de tassage sur le mélange. Attention cette étape ne doit pas trop tasser les boues, il ne faut pas appuyer sur l'outil mais juste le poser.
- Soulever le poids jusqu'à ce que son bord inférieur soit au niveau de la marque n° 1 (8.5 cm au dessus de la butée), puis le laisser retomber. Répéter cette opération une seconde fois.
- Verser le second bocal de mélange, le répartir et le tasser de la même façon que précédemment.
- Refermer hermétiquement le réacteur (en humidifiant le joint pour assurer une meilleure étanchéité).

Le mélange et correctement tassé, la respirométrie est prête à débiter après mise en place du joint et du couvercle.

1.4. Enregistrement d'un respirogramme lié à la nitrification des graviers

Le biofilm présent sur les graviers contient déjà de l'azote et des matières organiques rapidement biodégradables non dégradés à cause de problèmes de transfert de matière. Pour minimiser les perturbations liées au stock, nous avons choisi de saturer le biofilm en azote en aspergeant les graviers de 6 bâchées d'1L de solution d'ammonium et de carbonate en 3 jours.

1.4.1. Préparation des solutions d'ammonium et de carbonate

- La veille de chaque bâchée faire buller un sceau d'eau du robinet pendant une nuit.
- Au matin, laisser dégazer l'eau pendant 30 minutes afin qu'elle soit à l'équilibre en O_2
- Utiliser cette eau pour préparer les solutions d'ammonium et de carbonate.
- Chaque solution doit faire 1L et contenir 8,5g de HCO_3^- par gramme de NH_4^+ .

1.4.2. Aspergion des graviers par une bâchée et enregistrement du respirogramme

- Faire tremper l'extrémité du circuit liquide dans une éprouvette de 1L.

- Ajuster le niveau de l'éprouvette d'alimentation à 1L (Attention au volume occupé par le tuyau qui trempe).
- Envoyer l'air du réacteur N vers l'analyseur : mettre le bouton « EVG N » sur « MARCHE » et tous les autres boutons « EVG » ainsi que « EVR » sur « Arrêt ».
- 4 minutes après : enclencher l'acquisition à la seconde (bouton « ENR T » sur « MARCHE »).
- 10 minutes après : Asperger les graviers en allumant l'alimentation de la pompe. Cette méthode n'est pas précise quand à la corrélation entre le volume voulu et le liquide réellement injecté (précision de 50mL) mais la lecture du niveau d'eau sur l'éprouvette donne une approximation à 10mL près.
- Attendre 2h au moins pour arrêter l'acquisition à la seconde, et s'assurer que des mesure ultérieures (à la minute ou à la seconde) seront effectuées pour avoir une bonne estimation de la trainée de respiration, car la stabilisation de la consommation d'oxygène est lente.
- Au bout d'une heure de mesure prélever le percolât. Mesurer le volume et, si besoin, filtrer l'échantillon pour les analyses chimiques.

1.5. Nettoyage des réacteurs

En fin de semaine de manipulation, il faut vider les réacteurs et les nettoyer à l'eau du robinet (il n'est pas nécessaire d'utiliser des produits stérilisants de type eau de Javel).

Il faut aussi enlever les tuyaux d'air entre la sortie des réacteurs et les pièges à eau pour les nettoyer et les stériliser :

- Après avoir retiré les tuyaux les faire tremper 1h dans une solution d'eau savonneuse.
- Passer un petit goupillon dans chaque tuyau.
- Rincer les tuyaux à l'eau du robinet
- Faire tremper les tuyaux 24h dans une solution d'eau de Javel.
- Rincer les tuyaux à l'eau du robinet
- Laisser sécher les tuyaux 24h
- Remettre les tuyaux sur les réacteurs en les attachant avec des colliers de serrage en plastique.

1.6. Traitement des données

Les données sont traitées avec Excel. Pour cela, il faut enregistrer chaque fichier enregistré au format « .dat » dans la carte d'acquisition de l'analyseur au format « .csv » lisible par Excel.

2. Protocole de mesure de la respiration de boues de FPRv ou de LSPR

Le principe est le même que pour la mesure de l'activité nitrifiante des graviers de FPRv, mais l'expérience dure dix jours (au lieu de deux heures) et ne nécessite pas de bûchée d'ammonium. Cette mesure permet d'évaluer la stabilité biologique des boues.

Chaque réacteur est rempli d'un mélange de 1,25L de boue pour 3L de copeaux de bois (mélangé comme précédemment mais en trois bocaux plutôt qu'en deux pour un réacteur).

Le remplissage et tassage des réacteurs est le même que précédemment mais est fait en trois couches plutôt qu'en deux.

L'enregistrement des données est fait à la minute et non à la seconde, mais pendant 10 jours.

3. Etat des tuyaux de circulation d'air au bout de 18 mois



Figure 28 : tuyaux de recirculation d'air en sortie de réacteur de respirométrie solide, la paroi interne est recouverte de tache blanche ou de moisissure (taches sombres)

4. Comparaison respirométrie solide et respirométrie liquide pour la mesure de vitesse de nitrification

On compare les vitesses de nitrification mesurées avec la respirométrie solide sur des graviers de FPRv et la respirométrie liquide sur ces mêmes graviers. Pour la respirométrie liquide, la même quantité de graviers que pour la respirométrie solide, est mélangé à 8L d'eau afin de mettre le biofilm en suspension.

Pour pouvoir comparer les vitesses mesurées, on prendra la même unité : mgN/(g de boue . h)

Tableau 10 : mesure de vitesse de nitrification de deux manière différentes : sur du biofilm de gravier mis en suspension (respirométrie liquide) ; et sur les graviers directement (respirométrie solide)

respirométrie en phase liquide			
	gravier		
mesurée à partir de	N-NH4 (mg/L)	N-NO3 (mg/L)	N-Nox (mgN/L)
Pente [mgN/(g de boue.h)]	-3,6E-03	2,3E-03	3,7E-03
	boue		
mesurée à partir de	N-NH4 (mg/L)	N-NO3 (mg/L)	N-Nox (mgN/L)
Pente [mgN/(g de boue.h)]	-4,3E-03	2,0E-03	2,8E-03
respirométrie en phase solide			
	gravier		
mesurée à partir de	delta max	O2 consommé par la nitrification pendant 2h	
vitesse de nitrification [mgN/(g de boue.h)]	4,1E-03	1,1E-03	