



HAL
open science

Bio-augmentation de l'activité nitrifiante des boues activées

Antoine Souef

► **To cite this version:**

Antoine Souef. Bio-augmentation de l'activité nitrifiante des boues activées. Sciences de l'environnement. Thèse de Doctorat, École Doctorale Sciences et Ingénierie: Matériaux - Modélisation - Environnement, Université Paris XII, 2009. Français. NNT: . tel-02593022

HAL Id: tel-02593022

<https://hal.inrae.fr/tel-02593022v1>

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.



École Doctorale Sciences et Ingénierie : Matériaux - Modélisation - Environnement

Thèse

BIO-AUGMENTATION DE L'ACTIVITE NITRIFIANTE DES BOUES ACTIVEES

Par

Antoine SOUEF

Composition du jury :

Rapporteurs : Nicolas Bernet, Directeur de recherche – LBE-INRA Narbonne

Mathieu Spérandio, Professeur - INSA Toulouse

Examineurs : Daniel Thévenot, Professeur émérite - CEREVER

Alain Bermond, Professeur - AgroParisTech

Patrick Dabert, Chargé de recherche - Cemagref Rennes

Sylvie Gillot, Ingénieur de recherche - Cemagref Antony

Directeur de thèse : Alain Héduit, Directeur de recherche - Cemagref Antony

Thèse préparée au Cemagref d'Antony
Unité Hydrosystèmes et bioprocédés
Parc de Tourvoie, BP44 – 92163 Antony Cedex

Remerciements

Cette thèse a été réalisée au sein de l'unité Hydrosystèmes et Bioprocédés (HBAN) du Cemagref d'Antony. J'exprime ma reconnaissance à Messieurs Gérard Sachon et Michel Penel, successivement directeurs régionaux du groupement d'Antony au cours de mon séjour, à M. Philippe Duchène, chef du département milieux aquatiques, ainsi qu'à M. Gildas Le Bozec et Mme Cécile Loumagne, successivement chefs de l'unité HBAN.

Je remercie grandement M. Alain Héduit, directeur de cette thèse, pour ses compétences scientifiques et ses qualités humaines, ainsi que Mme. Sylvie Gillot pour l'encadrement de ce travail, pour son soutien et sa disponibilité. Un grand merci également à Mme Laure Graveleau et M. Patrick Dabert, co-encadrant successifs sur le volet microbiologie, pour leurs conseils avisés et leurs encouragements.

Je remercie sincèrement Messieurs Nicolas Bernet et Mathieu Spérandio d'avoir accepté d'évaluer ce travail en tant que rapporteurs, ainsi que Messieurs Daniel Thévenot et Alain Bermond pour leur participation au jury en tant qu'examineurs.

Je remercie vivement toutes les personnes ayant participé de près ou de loin à la réflexion autour de ce travail : en particulier les participants aux comités de pilotage : Théodore Bouchez, Jean-Philippe Steyer, et Jean-Jacques Pernelle ; ainsi que les membres des différentes équipes EPURE avec qui j'ai parfois pu discuter des problèmes rencontrés, en particulier messieurs Jean-Marc Choubert, Jean-Pierre Canler et Fabrice Béline.

Un très grand merci aux nombreuses personnes qui ont contribué au bon déroulement des analyses expérimentales, tout particulièrement Monsieur Stéphane Bons, grand maître des respiromètres pour avoir enduré de nombreuses et longues journées de prélèvement et d'analyses, et Lauriane Juzan, virtuose des paillasse microbiologie pour la formation et l'assistance ainsi que pour sa patience parfois mise à rude épreuve. Merci également à Nadine Derlet de l'équipe chimie, pour toutes les analyses réalisées, à Virginie Estebanez, doctorante au Cemagref de Rennes pour son aide à la découpe des gels et au clonage, ainsi qu'à Christine Ziebal pour les analyses réalisées à distance. Je remercie également l'ensemble de l'équipe de l'unité GERE à Rennes qui m'a gentiment accueillie pendant une semaine en son sein.

Je remercie sincèrement Monsieur Olivier Pétrimaux pour m'avoir gracieusement fournis les échantillons de solution, ainsi que les exploitants des stations d'épuration échantillonnées pour m'avoir permis d'accéder à leurs sites et pour m'avoir fourni les données d'auto-surveillance.

Je tiens à adresser de vifs remerciements à Sarah Bkouche et Angelica Borges, stagiaires de l'ENSTA qui l'une après l'autre m'ont permis d'avancer dans le traitement du sujet. Merci pour votre travail et surtout pour votre gentillesse.

Enfin, je suis très reconnaissant aux nombreuses personnes de l'unité HBAN qui ont à diverses occasions répondu à certaines questions scientifiques ou autres, ou qui ont partagé les à-côtés du travail (sports, sorties, ...). En particulier Anthony, Audrey, Bastien, Charles, Emmanuelle, Fred, Hélène, Hocine, Jean-Luc, Julien T., Julien GD., Julien L., Lionel, Marie, Marion, Nicolas, Simon, Sophie, Pierrot, Valérie, Vazken, Vivien, Yves, et tous ceux que je ne cite pas mais que je n'oublie pas. Merci à tous pour votre gentillesse et votre disponibilité, merci de contribuer à la très bonne ambiance de l'unité HBAN et du groupement d'Antony.

J'adresse un remerciement spécial aux deux « funkycoolies » avec qui j'ai passé la majeure partie du temps au Cemagref, dans une ambiance que je ne suis pas près d'oublier. Merci Yannick pour le guidage culturel, les coups de pouce en procédés, merci Sébastien pour la motivation sportive et les conseils en microbio ; merci à vous deux pour tous ces bons moments partagés et pour m'avoir transmis La cannette et Le guide de la rédaction.

Un très grand merci à ma famille qui m'a toujours appuyée et soutenue dans mes choix. A mes parents pour l'éducation et l'amour que j'ai reçu, à mes frère et sœur pour partager tout cela et plus. Un grand merci également à mes nombreux amis de partout en France et dans le monde grâce à qui la vie est si souvent belle. « Big up » spécial aux « Troglodites expatriés »... sans oublier celle sans qui jamais je ne serais venu vivre à Paris, merci Audrey et que la vie te sourie.

J'ai pour finir une pensée pour trois poupées qui ont vu le jour ces derniers mois. Chaque annonce d'une naissance chez un couple ami est un moment de grand bonheur, merci à Maelle, Thaïs et Chloé. Aux générations futures.

Résumé

La bio-augmentation des stations d'épuration est parfois envisagée pour faire face à des situations transitoires au cours desquelles la capacité nitrifiante des boues activées est insuffisante pour traiter efficacement la charge reçue par l'installation. Le succès de cette stratégie repose sur l'activité nitrifiante de la biomasse ajoutée ainsi que sur sa capacité d'adaptation et de maintien dans les boues activées en place.

L'objectif de ce travail était d'évaluer la possibilité d'adaptation des micro-organismes d'une solution commerciale nitrifiante dans une station d'épuration municipale à très faible charge. Les populations nitrifiantes composant la solution étudiée ont été comparées à celles des boues activées de treize stations d'épurations, échantillonnées en été et en hiver. Une démarche couplant des outils de la biologie moléculaire et du génie des procédés a été mise en œuvre afin d'analyser et de comparer ces populations selon trois axes : diversité, abondance et activité. Cette comparaison a été complétée par une expérience de bio-augmentation en réacteur fermé.

D'après les profils obtenus en DGGE, les communautés nitrosantes des stations d'épuration à très faible charge sont généralement dominées par une même espèce appartenant au groupe *Nitrosomonas oligotropha*.

Les biomasses nitrosantes et nitratantes ont été chacune estimées entre 0,5 et 3,5 % de la biomasse totale des boues activées par marquage FISH. La solution commerciale comporte une seule espèce nitrosante, du groupe *N. europaea*, qui représente 45 % de sa biomasse.

Les analyses cinétiques, réalisées par suivi direct des vitesses de réaction (analyses chimiques) et/ou par respirométrie, indiquent que *N. europaea* adopte une stratégie de type $-r$ contrairement aux bactéries autochtones des boues activées (stratégie de type $-K$).

Ces résultats expérimentaux laissent supposer une faible capacité d'adaptation de la biomasse nitrifiante de cette solution commerciale aux conditions environnementales des stations d'épuration à très faible charge. En revanche, l'expérience de bio-augmentation a montré sa capacité d'intégration aux floes, et le maintien de son activité lors de son mélange à des boues activées.

MOTS CLEFS : Bio-augmentation, activité nitrifiante, boues activées, communautés nitrosantes, stratégies $-r$ et $-K$, adaptation, DGGE, FISH, respirométrie.

Abstract

Bio-augmentation is sometimes proposed to cope with transient situations in wastewater treatment plants, when the nitrifying capacity of the autochthonous biomass is insufficient to treat the nitrogen load.

The success of such a strategy is conditioned by the nitrifying activity of the added biomass, its adaptation to local conditions and its residence time in the system.

This work aimed at evaluating the adaptation of nitrifying microorganisms from a commercial solution in very low loaded municipal wastewater treatment plants. Nitrifying populations of the studied solution were compared to those of thirteen wastewater treatment plants (activated sludge), observed in summer and in winter. The analysis and the comparison of the biomasses were performed using tools from two disciplines: molecular biology and process engineering. Three points were especially characterised: the diversity, abundance and activity of the biomasses. A bio-augmentation experiment performed in a batch reactor completed the comparison.

DGGE profiles showed that Ammonia Oxidising Bacteria (AOB) communities from low loaded wastewater treatment plants are mostly dominated by the same species related to the *Nitrosomonas oligotropha*.

The abundance of ammonia oxidising bacteria and of nitrite oxidising bacteria, estimated using the FISH technique, was almost similar, ranging from 0.5 to 3.5 % of the total biomass. The AOB species present in the commercial solution is identified as *Nitrosomonas europaea*, and represents 45 % of the solution's total biomass.

Kinetic analyses carried out by chemical analysis and/or by respirometry indicate that *N. europaea* behave as $-r$ strategist, whereas activated sludge's bacteria are $-K$ strategist.

These results suggest a slight adaptation capacity of the commercial solution's nitrifying biomass to environmental conditions prevailing in low loaded municipal wastewater treatment plants. On the other hand, bio-augmentation experiment showed the capacity of the added microorganisms to integrate the activated sludge flocs and to maintain its activity when added to activated sludge.

KEY WORDS: Bio-augmentation, nitrifying activity, activated sludge, AOB community, $-r$ and $-K$ strategist, adaptation, DGGE, FISH, respirometry.

Table des matières

Sigles et Notations	15
Introduction	19
1 Synthèse bibliographique	25
1.1 Traitement de l'azote en boues activées	27
1.1.1 Principe des stations d'épuration à boues activées.....	27
1.1.1.1 Description générale du procédé.....	27
1.1.1.2 Composition des boues activées.....	28
1.1.2 Réactions de transformation de l'azote.....	29
1.1.2.1 Assimilation.....	29
1.1.2.2 Ammonification.....	29
1.1.2.3 Nitrification.....	30
1.1.2.3.1 Nitrosation.....	30
1.1.2.3.2 Nitratisation.....	31
1.1.2.3.3 Bilan de la nitrification.....	31
1.1.2.3.4 Stœchiométrie et consommation d'oxygène.....	32
1.1.2.4 Dénitrification.....	34
1.1.3 Processus de nitrification.....	34
1.1.3.1 Paramètres cinétiques.....	34
1.1.3.1.1 Taux de croissance.....	34
1.1.3.1.2 Taux de mortalité.....	39
1.1.3.1.3 Vitesses de réaction.....	39
1.1.3.2 Maintien de l'activité nitrifiante.....	40
1.1.3.2.1 Croissance nette.....	40
1.1.3.2.2 Âge des boues (SRT).....	40
1.1.3.2.3 Biomasse autotrophe.....	42
1.1.3.2.4 Vitesse de nitrification en régime stabilisé.....	43
1.1.3.3 Conclusions.....	44
1.2 Populations nitrifiantes	45
1.2.1 Stratégies $-r$ et $-K$	45
1.2.2 Bactéries nitrosantes.....	46
1.2.2.1 Phylogénie.....	46
1.2.2.1.1 Groupes et stratégies.....	48
1.2.2.1.2 Concentration en NH_4 et NO_2	49
1.2.2.1.3 Concentration en oxygène.....	49
1.2.2.2 Cas des boues activées.....	51
1.2.2.2.1 Impact des concentrations en ammonium.....	51
1.2.2.2.2 Variations saisonnières.....	53
1.2.2.2.3 Discussion.....	53
1.2.3 Bactéries nitrifiantes.....	54
1.2.3.1 Phylogénie.....	54
1.2.3.2 Paramètres cinétiques publiés.....	55
1.2.3.3 Cas des boues activées.....	56
1.2.4 Conclusions.....	56

1.3 Bio-augmentation	57
1.3.1 Principe	57
1.3.2 Bio-augmentation continue	58
1.3.2.1 Impact sur l'âge des boues spécifique	58
1.3.2.2 Acclimatation de la biomasse.....	59
1.3.2.3 Recensement des expériences existantes.....	59
1.3.3 Bio-augmentation occasionnelle	61
1.3.3.1 Objectifs.....	62
1.3.3.2 Recensement des expériences existantes.....	62
1.3.3.2.1 <i>Solutions commerciales</i>	62
1.3.3.2.2 <i>Boues enrichies</i>	63
1.3.4 Conclusions	64
1.4 Modélisation des processus de nitrification	64
1.4.1 Modèles dynamiques de type ASM	64
1.4.1.1 Description générale	64
1.4.1.2 Description de la nitrification en deux étapes.....	65
1.4.2 Détermination des paramètres des biomasses nitrifiantes	66
1.4.2.1 Tests en réacteurs	67
1.4.2.2 Mesures respirométriques	67
1.4.3 Conclusion	69
1.5 Quantification des populations nitrifiantes	69
1.5.1 Méthodes culturelles.....	70
1.5.2 Méthode immunologique.....	70
1.5.3 Méthodes moléculaires	70
1.5.3.1 L'ARNr-16S et l'ADNr-16S.....	70
1.5.3.2 PCR quantitative ou en temps réel (QPCR).....	71
1.5.3.3 Dot Blot.....	72
1.5.3.4 FISH.....	72
1.5.4 Conclusion	72
1.6 Conclusions et orientation des travaux	73
2 Matériels et méthodes	75
2.1 Echantillons étudiés	77
2.1.1 Boues de stations d'épuration.....	77
2.1.1.1 Origine	77
2.1.1.2 Analyses	77
2.1.1.3 Conditionnement.....	78
2.1.1.4 Caractéristiques des installations échantillonnées	79
2.1.2 Solution commerciale nitrifiante.....	80
2.2 Diversité des communautés nitrifiantes	80
2.2.1 Communautés analysées	80
2.2.2 Techniques d'analyse	80
2.2.2.1 Amplification de l'ADN (PCR).....	81
2.2.2.1.1 <i>Présentation de la technique</i>	81
2.2.2.1.2 <i>Protocole appliqué</i>	82

2.2.2.2	Electrophorèse en gradient de gel dénaturant (DGGE)	83
2.2.2.2.1	<i>Présentation de la technique</i>	83
2.2.2.2.2	<i>Protocole appliqué</i>	84
2.2.3	Identification des espèces	85
2.3	Abondance relative des populations nitrifiantes	86
2.3.1	Principe de la mesure	86
2.3.2	Matériel utilisé	87
2.3.2.1	Sondes	87
2.3.2.2	Fluorophores	89
2.3.3	Protocole de marquage	89
2.3.3.1	Fixation des échantillons	89
2.3.3.2	Dépôt sur lame	90
2.3.3.3	Hybridation et lavage	90
2.3.3.4	Marquage au SYTO9	91
2.3.3.5	Observation et acquisition d'images	91
2.3.3.6	Analyse d'images	92
2.4	Activité nitrifiante	92
2.4.1	Suivi des formes de l'azote	92
2.4.2	Respirométrie	93
2.4.3	Protocoles	94
2.4.3.1	Pour les boues activées	94
2.4.3.1.1	<i>Déroulement de la mesure</i>	94
2.4.3.1.2	<i>Analyse des données chimiques</i>	95
2.4.3.1.3	<i>Analyse des données respirométriques</i>	95
2.4.3.2	Pour la solution commerciale	97
2.4.3.2.1	<i>Adaptations du protocole</i>	97
2.4.3.2.2	<i>Constante d'affinité pour l'ammonium</i>	99
2.4.3.2.3	<i>Constante d'affinité pour l'oxygène</i>	99
2.4.3.2.4	<i>Constante de température</i>	100
2.5	Bio-augmentation de boues activées	100
2.5.1	Augmentation de l'activité nitrifiante	101
2.5.1.1	Protocole	101
2.5.1.2	Analyse des résultats par modélisation	101
2.5.1.2.1	<i>Description du modèle (ASM_N)</i>	102
2.5.1.2.2	<i>Détermination des paramètres</i>	102
2.5.2	Adhésion aux floccs	104
2.5.2.1	Objectifs de l'expérience	104
2.5.2.2	Principe et protocole	104
2.5.2.2.1	<i>Marquage fluorescent</i>	104
2.5.2.2.2	<i>Suivi des activités nitrifiantes</i>	105
3	Résultats et discussion	107
3.1	Diversité des communautés nitrosantes	109
3.1.1	Communauté nitrosante des boues activées	109
3.1.1.1	Profils DGGE	109
3.1.1.2	Identification des espèces des communautés en boues activées	112
3.1.1.3	Conclusions	114

3.1.2 Impact des conditions de fonctionnement du système sur les communautés	114
3.1.2.1 Diversité et charge azotée	114
3.1.2.2 Facteurs favorables à la présence de <i>Nitrosospira</i>	115
3.1.3 Variations saisonnières	116
3.1.4 Population nitrosante de la solution commerciale	118
3.1.4.1 Profils DGGE	118
3.1.4.2 Identification	119
3.1.5 Conclusions	121
3.2 Abondance relative des populations nitrifiantes	123
3.2.1 Mise au point méthodologique de la quantification des bactéries nitrifiantes par marquage FISH	123
3.2.1.1 Marquage des boues activées	125
3.2.1.1.1 <i>Biomasses spécifiques</i>	125
3.2.1.1.2 <i>Biomasse totale</i>	126
3.2.1.2 Acquisition d'images	127
3.2.1.2.1 <i>Ajustement de l'amplification du signal</i>	127
3.2.1.2.2 <i>Protocole d'acquisition</i>	128
3.2.1.3 Segmentation des images	129
3.2.1.3.1 <i>Seuillage « manuel »</i>	129
3.2.1.3.2 <i>Seuillage « semi-automatique »</i>	131
3.2.1.3.3 <i>Protocole appliqué</i>	134
3.2.1.4 Nombre d'images optimal	137
3.2.1.5 Reproductibilité de la méthode	139
3.2.2 Résultats des mesures d'abondance	139
3.2.2.1 Abondance relative des populations nitrifiantes des boues activées	140
3.2.2.2 Variations saisonnières	142
3.2.2.3 Ratios des populations nitrosantes/nitratantes des boues activées (X_{BA}/X_{BN})	144
3.2.2.4 Abondance des populations nitrifiantes de la solution commerciale	144
3.2.3 Conclusions	145
3.3 Activités nitrifiantes	147
3.3.1 Analyse critique des mesures respirométriques	147
3.3.1.1 Observation générale des respirogrammes	147
3.3.1.1.1 <i>Respirogrammes « classiques »</i>	147
3.3.1.1.2 <i>Respirogrammes atypiques</i>	149
3.3.1.1 Reproductibilité des respirogrammes	149
3.3.2 Vitesses de nitrification et respiration	150
3.3.2.1 Cas des boues activées	151
3.3.2.1.1 <i>Vitesses initiales déterminées par mesures chimiques</i>	151
3.3.2.1.2 <i>Respiration</i>	153
3.3.2.1.3 <i>Comparaison de la respiration et des vitesses de réaction</i>	154
3.3.2.1.4 <i>Conclusion</i>	156
3.3.2.2 Ratios des populations et des activités nitrosantes/nitratantes	157
3.3.2.3 Impact des conditions de fonctionnement du système sur l'activité nitrifiante des boues activées	159
3.3.2.4 Cas de la solution commerciale NB	161
3.3.2.4.1 <i>Vitesses déterminées par mesures chimiques</i>	161
3.3.2.4.2 <i>Respiration</i>	162

3.3.2.4.3	<i>Comparaison de la respiration et des vitesses de réaction</i>	163
3.3.2.4.4	<i>Bilan sur plusieurs mesures</i>	163
3.3.3	Ratios Oxygène/substrat consommé (OC/N)	164
3.3.3.1	Résultats pour les boues activées	165
3.3.3.1.1	<i>Ratios OC/N expérimentaux</i>	165
3.3.3.1.2	<i>Répétabilité et dispersion des ratios expérimentaux</i>	166
3.3.3.1.3	<i>Interprétation</i>	167
3.3.3.2	Cas de la solution commerciale diluée	169
3.3.3.3	Conclusion	169
3.3.4	Détermination des paramètres cinétiques des populations nitrifiantes	170
3.3.4.1	Vitesses de réaction spécifiques et taux de croissance	170
3.3.4.2	Analyses respirométriques	173
3.3.4.3	Bilan	176
3.3.5	Conclusion	177
3.4	Bio-augmentation de boues activées	181
3.4.1	Gain d'activité nitrifiante	181
3.4.1.1	Analyse approfondie d'une expérience	181
3.4.1.1.1	<i>Présentation des résultats</i>	181
3.4.1.1.2	<i>Modélisation des respirogrammes</i>	183
3.4.1.2	Bilan tiré de plusieurs expériences	188
3.4.2	Expérience de décantation	190
3.4.2.1	Observations microscopiques	190
3.4.2.2	Analyses respirométriques	191
3.4.3	Conclusions et discussion	193
	Conclusions générales et perspectives	197
	Références bibliographiques	205
	Liste des tableaux	219
	Liste des figures	220
	ANNEXES	223

Sigles et Notations

SIGLES

ADN	Acide Désoxyribonucléique
ADNr-16S	ADN codant pour la sous-unité 16S du ribosome
ARNr	Acide Ribonucléique ribosomal
ARNr-16S	Sous unité 16S de l'Acide Ribonucléique ribosomal
ASM	Activated Sludge Model
BM	Biomasse
Cy3	Cyanine 3
Cy5	Cyanine 5
CFDA/SE	5-(and 6)-carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester
DAPI	4',6' Di Amidino-2-Phényl Indole
DGGE	Denaturing Gradient Gel Electrophoresis
EH	Equivalent habitant
ESF	Eaux de sortie filtrées
FISH	Fluorescent <i>In-Situ</i> Hybridization
FITC	Fluoresceine Iso Thio Cyanate
MCBL	Microscope Confocal à Balayage Laser
PCR	Polymerase Chain Reaction
QPCR	Quantitative Polymerase Chain Reaction
WERF	Water Environment Research Association

NOTATIONS

DEFINITIONS ET UNITES

%FM	Pourcentage de formamide dans le tampon d'hybridation
%X _{BA}	Pourcentage de biomasse nitrosante
b	Taux de mortalité (j ⁻¹)
BM _{spé}	Concentration d'une biomasse spécifique (g _{MVS} /L ou g _{DCO} /L)
BM _{tot}	Concentration de la biomasse totale (g _{MVS} /L ou g _{DCO} /L)
B _{V(N)}	Charge volumétrique azotée (g _{N-NTK} .m ⁻³ _{bassin} .j ⁻¹)
B _{V(N_{nitrifié})}	Charge volumétrique d'azote nitrifié (g _{N-NTK} .m ⁻³ _{bassin} .j ⁻¹)
B _{V (éliminé)}	Charge volumétrique d'azote éliminé (g _{N-NTK} .m ⁻³ _{bassin} .j ⁻¹)
DBO ₅	Demande biologique en oxygène (mg _{O₂} /L)
DCO	Demande chimique en oxygène (mg _{O₂} /L)
f _{AT}	Fraction de boues dans le bassin d'aération (%)
G	Temps de génération (j)
i _{XB}	Fraction d'azote dans la biomasse (g _N /g _{DCO-X})
K _{La}	Coefficient de transfert d'oxygène (h ⁻¹)
K _{NH}	Constante d'affinité pour l'ammonium – bactéries nitrosantes (mg _{N-NH₄} /L)
K _{NO}	Constante d'affinité pour les nitrites – bactéries nitrifiantes (mg _{N-NO₂} /L)
K _O	Constante d'affinité pour l'oxygène (mg _{O₂} /L)
MES	Matière en suspension (concentration en mg/L)
MS	Matière sèche (concentration en mg/L)
MVS	Matière volatile en suspension (concentration en mg/L)
MX	Quantité de biomasse totale dans le système (g _{DCO})
N-NH ₄	Azote ammoniacal (concentration en mg _N /L)
N-N _{min}	Azote minéral soluble (concentration en mg _N /L)
N-NO ₂	Azote sous forme de nitrites (concentration en mg _N /L)
N-NO ₃	Azote sous forme de nitrates (concentration en mg _N /L)

N-N _{Ox}	Azote minéral soluble oxydé (concentration en mg _N /L)
N-NTK	Azote total de Kjeldahl (concentration en mg _N /L)
N _{min} PR	Vitesse d'augmentation de l'azote minéral soluble (mg _N .L ⁻¹ .h ⁻¹)
N _{Ox} PR	Vitesse d'augmentation de l'azote minéral soluble oxydé (mg _N .L ⁻¹ .h ⁻¹)
N _t PR	Vitesse d'augmentation des nitrates (mg _N .L ⁻¹ .h ⁻¹)
O ₂	Oxygène dissous (concentration en mg _{O2} /L)
OC _{BA}	Oxygène consommé par la biomasse X _{BA} (g _{O2})
OC _{total}	Oxygène consommé par la nitrification (g _{O2})
OC/N	ratio de l'oxygène consommé sur le substrat azoté oxydé (g _{O2} /g _N)
OUR	Vitesse de consommation de l'oxygène ou respiration (mg _{O2} .L ⁻¹ .h ⁻¹)
OUR _{total}	Respiration totale du milieu (mg _{O2} .L ⁻¹ .h ⁻¹)
OUR _{max}	Respiration maximale de nitrification (mg _{O2} .L ⁻¹ .h ⁻¹)
OUR _{endo}	Respiration endogène (mg _{O2} .L ⁻¹ .h ⁻¹)
OUR _{nit-endo}	Respiration endogène due à l'activité nitrifiante (mg _{O2} .L ⁻¹ .h ⁻¹)
OUR _{C-endo}	Respiration endogène due aux réactions du carbone (mg _{O2} .L ⁻¹ .h ⁻¹)
OUR _{initial}	Respiration moyenne des 30 premières minutes de mesure (mg _{O2} .L ⁻¹ .h ⁻¹)
OUR _{monod}	Respiration estimée à partir de l'équation de Monod (mg _{O2} .L ⁻¹ .h ⁻¹)
OUR _{BA}	Respiration liée à l'activité de la biomasse X _{BA} (mg _{O2} .L ⁻¹ .h ⁻¹)
pK _a	Constante d'équilibre acido-basique (-)
Q	Débit (m ³ /j)
Q _{MS}	Débit d'extraction des matières sèches (kg _{MS} /j)
SRT	Age des boues (j)
S _{H/Bspé}	Surface segmentée avec le seuil de coupure Haut/Bas pour la biomasse spécifique
S _{H/Btot}	Surface segmentée avec le seuil de coupure Haut/Bas pour la biomasse totale
t	Temps ou durée (h. ou j.)
T°	Température en °C
t _{aération}	Durée journalière d'aération (h)
TSH	Temps de séjour hydraulique (h)
V	Volume (L ou m ³)
X	Concentration en biomasse (mg _{DCO} /L)
X ^e	Concentration en biomasse des eaux de sortie (mg _{DCO} /L)
X ^w	Concentration en biomasse des boues d'extraction (mg _{DCO} /L)
Y _H	Rendement de synthèse des hétérotrophes (g _{DCO} -X _{produit} /g _{DCO} consommé)
Y _A	Rendement de synthèse de la biomasse nitrifiante (g _{DCO} -X _{produit} /g _{N-NO3})

LETTRES GRECQUES DEFINITIONS ET UNITES

λ	Fraction d'azote nitrifiable (%)
μ _{max}	Taux de croissance maximal (j ⁻¹)
μ _{net}	Taux de croissance net (j ⁻¹)
η _{DBO5}	Rendement d'élimination de la DBO ₅ (%)
η _{NTK}	Rendement d'élimination des NTK (%)
φ _{nit}	Quantité d'azote ammoniacal nitrifié par jour (g _{Nnitrifié} .j ⁻¹)
ρ _{BA}	Vitesse de nitrosation (mg _{N-NO3} .L ⁻¹ .h ⁻¹)
ρ _{BAmax}	Vitesse de nitrosation maximale (mg _{N-NOx} .L ⁻¹ .h ⁻¹)
ρ _{BAspé}	Vitesse de nitrosation spécifique (mg _{N-NOx} .g ⁻¹ _{DCO} .h ⁻¹)
σ	Taux d'extraction des boues (%)
θ	Constante de température (-)
ΔOC	Oxygène manquant au ratio OC/N expérimental
ΔOUR _{endo}	Variation supposée de la respiration endogène après ajout d'ammonium

INDICES

A

H

B

S

BA

BN

SA

SN

SIGNIFICATION

Se réfère à la biomasse nitrifiante totale (nitrosante + nitratante)

Se réfère à la biomasse hétérotrophe

Se réfère aux populations des boues activées

Se réfère aux populations de la solution commerciale

Se réfère à la biomasse nitrosante des boues activées

Se réfère à la biomasse nitratante des boues activées

Se réfère à la biomasse nitrosante de la solution commerciale

Se réfère à la biomasse nitratante de la solution commerciale

Introduction

Une concentration d'azote ammoniacal trop élevée constituant le premier facteur de déclassement des cours d'eau de bonne qualité, il convient de garantir la qualité et la fiabilité de son élimination dans les stations d'épuration, y compris lors d'évènements transitoires à caractère non exceptionnel.

Les boues activées en aération prolongée constituent le procédé d'épuration biologique conventionnel le plus répandu permettant d'atteindre cet objectif. La majorité des stations d'épuration municipales fonctionne à très faible charge (inférieure à $0,1 \text{ kg DBO}_5 \cdot \text{kg}_{\text{MVS}}^{-1} \cdot \text{j}^{-1}$), conditions favorables à l'établissement et au maintien d'une population bactérienne nitrifiante.

De nombreux travaux réalisés au Cemagref ont porté sur l'optimisation du traitement de l'azote dont les plus récents intègrent une modélisation dynamique des processus mis en jeu. Ces travaux ont permis d'énoncer les règles de conception et de gestion technique de ces installations, conduisant à un traitement poussé et fiable de l'azote (Choubert 2002 ; Stricker *et al.* 2003 ; Choubert *et al.* 2004 ; Marquot 2006).

L'efficacité de l'élimination de l'azote ammoniacal dans les stations d'épuration peut chuter dans certaines conditions défavorables, en particulier lors d'une baisse subite de la température de l'eau, d'une augmentation brutale et importante de charge à traiter ou si un toxique transite à travers l'installation.

Pour maintenir ou restaurer une bonne qualité du traitement de l'azote, il est possible d'introduire dans la station d'épuration des micro-organismes nitrifiants exogènes afin de modifier la diversité et l'activité de la population autochtone. Cette stratégie est appelée bio-augmentation. La biomasse ajoutée peut être issue d'une autre station d'épuration à boues activée ou provenir de solutions commerciales.

La bio-augmentation est réputée permettre le maintien de la nitrification dans des conditions inadaptées (faible température et/ou faible âge de boues) voire assurer la restauration rapide de l'activité nitrifiante d'une boue activée après l'arrivée d'un toxique (chloration curative par exemple). Depuis plus de dix ans, des essais de bio-augmentation de l'activité nitrifiante des boues activées ont été menés par différentes équipes, avec des niveaux de réussite variables selon les objectifs visés et les stratégies mises en œuvre (Parker et Wanner 2007).

L'objectif du travail réalisé au cours de cette thèse était d'identifier puis d'analyser les paramètres régissant les mécanismes d'installation et de maintien d'une flore nitrifiante dans des boues activées. A plus long terme, il s'agira de fournir aux exploitants de stations d'épuration les éléments techniques nécessaires au choix et à la mise en place de stratégies de bio-augmentation adaptées au problème auquel ils sont confrontés. Le champ d'application du travail réalisé a toutefois été limité aux cas des stations d'épuration municipales à très faible charge, excluant ainsi les systèmes fonctionnant à forte charge azotée et les installations de traitement d'eaux résiduaires industrielles ou d'effluents d'élevage.

Le maintien d'une biomasse dans un milieu dépend en premier lieu de sa faculté à s'adapter aux conditions environnementales du milieu considéré. Les micro-organismes nitrifiants naturellement présents dans les stations d'épuration municipales fonctionnant à très faible charge constituent alors une communauté de référence vis-à-vis de ces critères d'adaptation. Dans un premier temps, un approfondissement des connaissances relatives aux organismes nitrifiants autochtones des boues activées de stations d'épuration a donc été recherché.

Des analyses de diversité, d'abondance et d'activité des populations nitrifiantes ont été conduites sur différents échantillons de boues activées, prélevés dans des stations d'épuration nitrifiantes, à différentes saisons afin d'étudier également la stabilité temporelle de ces communautés.

Les mêmes investigations, conduites sur la biomasse d'une solution nitrifiante commerciale destinée à la bio-augmentation, ont permis sa comparaison avec les populations nitrifiantes autochtones des boues activées et l'initiation d'une réflexion relative à l'adaptabilité potentielle d'une biomasse exogène aux conditions environnementales des bassins d'aération.

- Des outils issus du domaine de la biologie moléculaire ont été mis en œuvre pour déterminer la diversité des communautés nitrifiantes, allant jusqu'à l'identification des principaux organismes présents. Ces analyses ont permis de comparer les populations nitrifiantes issues de différentes stations d'épuration, d'étudier leur stabilité temporelle, puis de les comparer à celles de la solution commerciale
- L'abondance des bactéries nitrifiantes a été estimée à l'aide d'une méthode combinant le marquage spécifique des ARNr-16S (FISH), technique empruntée à la biologie

moléculaire, des analyses d'images et des mesures classiques de concentrations de matières en suspension.

- Enfin, l'activité nitrifiante des échantillons a été mesurée par respirométrie et par suivi de cinétiques chimiques. L'analyse des données respirométriques a en outre permis de déterminer certains paramètres cinétiques des biomasses étudiées.

Afin de compléter ce travail, le comportement de la biomasse exogène dans des boues activées a été étudiée à l'aide d'un marqueur fluorescent et par des mesures de cinétiques en respirométrie analysées par modélisation numérique.

La démarche expérimentale a donc essentiellement fait appel à des outils variés relevant du génie des procédés (respirométrie, modélisation) et de la biologie moléculaire appliquée à l'écologie microbienne. Les informations recueillies ont été analysées, comparées, et recoupées en prenant en compte également les données disponibles sur le fonctionnement des stations d'épuration d'origine des échantillons.

Le travail est présenté sous forme d'un mémoire constitué de trois parties :

- L'étude bibliographique expose les grands principes de fonctionnement d'une station d'épuration à boues activées et les conditions de maintien de la biomasse nitrifiante. Un panorama des connaissances concernant les communautés de bactéries nitrifiantes en lien avec leur milieu est ensuite présenté, suivi d'une revue de l'état de l'art de la bio-augmentation. Enfin, les principes de la modélisation des processus de nitrification sont présentés, ainsi que les méthodes de quantification directe des populations nitrifiantes.
- La seconde partie présente les méthodes mises en œuvre pour étudier la diversité (méthodes moléculaires), la quantité (marquage moléculaire, microcopie et analyse d'images), et l'activité (respirométrie et cinétiques chimiques) des bactéries nitrifiantes. La méthode d'évaluation de la décantation de la biomasse exogène mélangée à des boues activées est également exposée, ainsi que le modèle utilisé pour représenter les boues ainsi bio-augmentées.

- La dernière partie présente l'analyse des résultats obtenus. Les connaissances acquises concernant la diversité, l'abondance et l'activité des différentes populations nitrifiantes étudiées, en lien avec les mécanismes d'installation et de maintien d'une flore nitrifiante dans des boues activées, sont présentées. Les avancées méthodologiques réalisées au cours de ces analyses sont également mises en avant dans cette partie. Des conclusions et perspectives ont finalement été dégagées permettant de discuter les stratégies potentielles de bio-augmentation, et les méthodes permettant de les étudier.

Une conclusion générale et la présentation de perspectives de recherches sur cette thématique clôturent ce mémoire.

1 Synthèse bibliographique

1.1 Traitement de l'azote en boues activées

1.1.1 Principe des stations d'épuration à boues activées

1.1.1.1 Description générale du procédé

Le procédé à boues activées est le plus répandu pour l'épuration des eaux résiduaires urbaines. Il représente environ 60% du parc des stations d'épuration françaises. Le schéma d'ensemble d'une station d'épuration à boues activées est présenté sur la Figure 1.

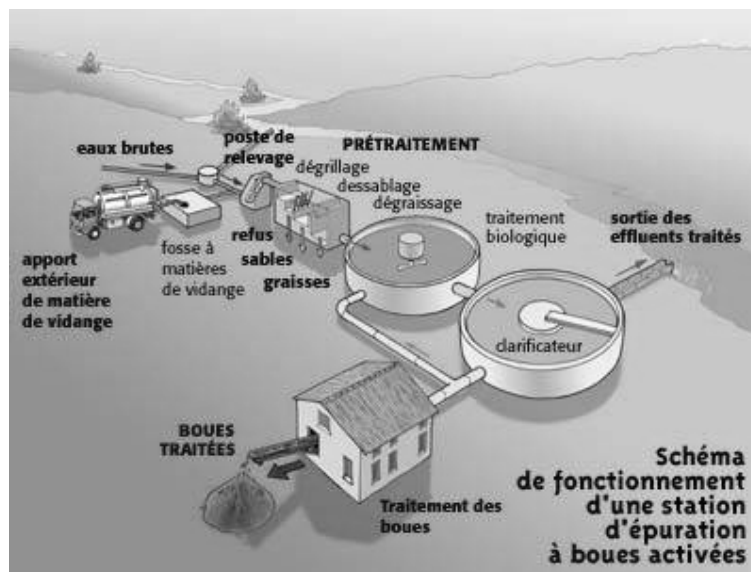


Figure 1 : schéma d'ensemble d'une station d'épuration des eaux par boues activées (source : ADEME)

Les eaux brutes subissent d'abord un prétraitement, au cours duquel les substances volumineuses, les sables, et dans une moindre mesure les graisses sont retenus. Pour les plus grandes tailles de stations d'épuration, un décanteur primaire est souvent placé entre le prétraitement et le bassin d'aération afin de retenir une partie de la charge polluante particulière.

Dans le bassin de traitement biologique les eaux usées sont mises en contact avec les boues activées. La biomasse des boues activées utilise la charge carbonée, azotée et phosphorée des eaux usées comme substrat et comme source d'énergie pour sa croissance. Les polluants sont ainsi dégradés par l'action de la biomasse, lors de l'alternance de phases aérobies et anoxiques qui permettent de contrôler les processus de nitrification et de dénitrification respectivement. La nitrification (oxydation de l'azote ammoniacal en nitrates) a lieu durant les phases aérobies, et la dénitrification (réduction des nitrates en azote gazeux) durant les phases anoxiques.

Certaines stations comprennent un bassin d'anoxie situé en amont du bassin d'aération (Figure 2), avec une circulation des boues issues du bassin d'aération vers le bassin d'anoxie (recirculation des nitrates). Ce schéma consommateur d'énergie sans améliorer réellement l'efficacité du traitement de l'azote est pratiquement abandonné en France pour le traitement des eaux résiduaires urbaines.

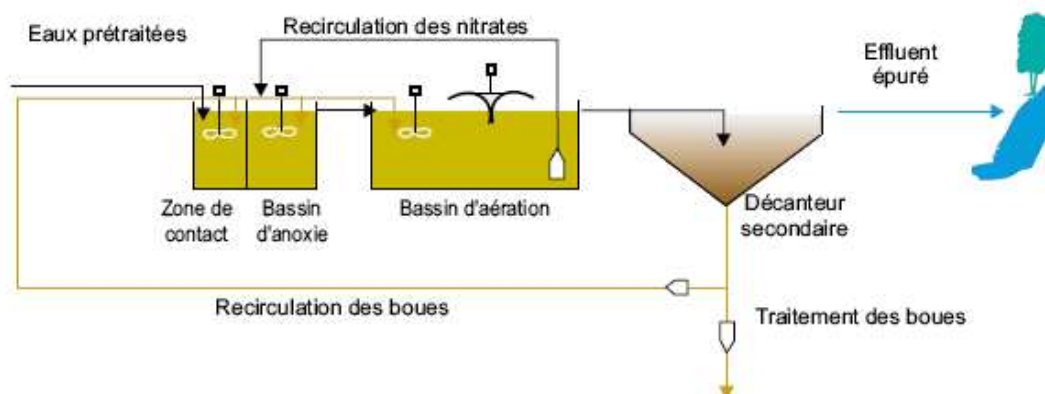


Figure 2 : schéma de la filière boues activées avec bassin d'anoxie en tête (Source : FNDAE 25 (Deronzier *et al.* 2002))

Les eaux traitées sont séparées des boues activées par sédimentation dans le décanteur. L'effluent traité rejoint par surverse le milieu naturel (cours d'eau). Une fraction des boues décantées est réintroduite (recirculée) dans le bassin de traitement biologique pour réensemencer constamment le procédé. La dégradation des polluants se traduit par une production de biomasse. Il est donc nécessaire d'extraire régulièrement une fraction des boues décantées afin de stabiliser la quantité de biomasse dans le système.

1.1.1.2 Composition des boues activées

Les boues activées sont constituées de biomasse vivante et morte, de débris organiques et minéraux agglomérés sous forme de floes, qui ont la capacité de décanter en l'absence d'agitation (Sezgin *et al.* 1980). La composition moléculaire générale de la biomasse est exprimée par la formule $C_5H_7NO_2$.

La quantité de biomasse peut être estimée par les matières volatiles en suspension (MVS) (Ali *et al.* 1985) et/ou par la demande chimique en oxygène (DCO) (Henze *et al.* 1987). La DCO correspond à l'oxygène nécessaire à l'oxydation chimique de la matière. L'équation 1 présente la réaction d'oxydation de la biomasse :



Selon cette équation, un gramme de MVS de biomasse équivaut à 1,42 gramme de DCO. Dans la réalité, le ratio DCO/MVS fluctue autour de cette valeur en fonction de différents

paramètres (notamment de l'adsorption de substrat carboné préalable à la dégradation de la matière organique).

Deux grands types de biomasse sont généralement distingués :

- la **biomasse hétérotrophe**, principale composante des boues, qui est responsable des réactions de transformation de la matière organique en présence d'oxygène ou de nitrates (dénitrification).
- la **biomasse autotrophe**, qui représente entre 0,5 et 10% de la quantité de biomasse totale des boues activées de stations d'épuration municipales en aération prolongée (Stricker 2000 ; Koch *et al.* 2001 ; Choubert 2002 ; Marquot 2006), et qui est notamment **responsable des réactions de nitrification**.

1.1.2 Réactions de transformation de l'azote

L'azote des eaux résiduaires urbaines est essentiellement présent sous forme ammoniacale. Il est éliminé par les transformations biologiques suivantes : assimilation, oxydation (nitrification), réduction en azote gazeux (dénitrification).

Unités utilisées : afin de simplifier l'expression des coefficients et des paramètres liés aux transformations de l'azote, les quantités sont exprimées en masse de N. Ainsi, 14 g_N équivaut à une mole, qu'il s'agisse d'ammoniac NH₄⁺, de nitrate NO₃⁻ ou de nitrite NO₂⁻.

1.1.2.1 Assimilation

La biomasse qui constitue les boues activées contient de l'azote. Selon la formule chimique générale de la biomasse (C₅H₇NO₂), la fraction azotée, notée **i_{XB}**, correspond à **0,0875 mg_N/mg_DCO-X**.

Lors de sa formation, la biomasse a donc besoin d'une source d'azote, préférentiellement sous forme ammoniacale. L'intégration d'azote dans la biomasse est désignée par le terme d'assimilation. En station d'épuration municipale, l'assimilation contribue à l'élimination d'environ 25 % de l'azote des eaux résiduaires urbaines (Deronzier *et al.* 2002).

La majeure partie de l'azote assimilé l'est par la croissance de la biomasse hétérotrophe, qui représente la plus forte proportion de la biomasse totale des boues, et qui présente un rendement cellulaire élevé (**Y_H=0,67 g_DCO-X produit/g_DCO ERU-éliminé**) (Henze *et al.* 1987).

1.1.2.2 Ammonification

L'ammonification est la transformation de l'azote organique en azote ammoniacal. C'est un processus enzymatique qui s'applique aux eaux usées (transformation de l'urée en azote

ammoniacal) mais également à la biomasse des boues activées dont une partie est dégradée et solubilisée par lyse bactérienne. L'azote organique particulaire contenu dans des structures de tailles relativement importantes, est d'abord hydrolysé sous formes solubles avant ammonification.

D'après l'équation 1, la minéralisation de la biomasse produit $0,9 \text{ g}_N/\text{g}_{\text{DCO-biomasse}}$ éliminé, soit $0,12 \text{ g}_N/\text{g}_{\text{MVS}}$ éliminé.

1.1.2.3 Nitrification

La nitrification correspond à l'oxydation biologique de l'azote ammoniacal en nitrates (NO_3^-). Cette réaction s'effectue en deux étapes, la nitrosation et la nitratisation, réalisées par les bactéries chimiolithoautotrophes nitrosantes et nitratantes respectivement.

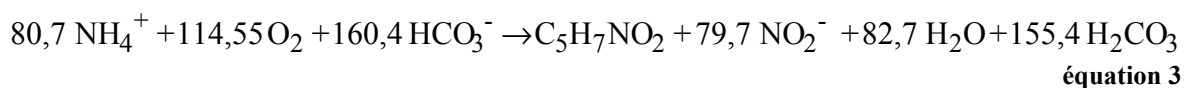
1.1.2.3.1 Nitrosation

L'équation 2 présente la réaction d'oxydation de l'ammoniaque en nitrite, appelée nitrosation ou nitritation



Elle est effectuée par des bactéries appelées nitrosantes, nitritantes, ou encore AOBs (de l'anglais Ammonia Oxidising Bacteria), et notées X_{BA} . L'espèce bactérienne nitrosante la plus étudiée est *Nitrosomonas europaea*, car cette espèce est facilement cultivable. Cependant, d'autres espèces sont fréquemment observées dans les milieux naturels. L'état des lieux des connaissances de la phylogénie et de l'écologie des bactéries nitrosantes sera présenté dans le paragraphe 1.2.2.

L'équation 3 présente la réaction de nitrosation en prenant en compte la synthèse de biomasse notée $\text{C}_5\text{H}_7\text{NO}_2$.



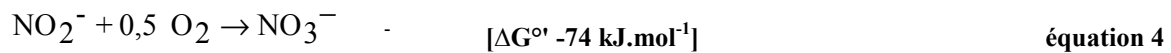
Le rendement de synthèse de la biomasse nitrifiante (également appelé rendement de croissance), équivaut à $Y_{\text{BA}}=0,14 \text{ g}_{\text{DCO-X}}/\text{g}_N\text{-NO}_2\text{-produit}$ soit $Y_{\text{BA}} = 0,10 \text{ g}_{\text{MVS-X}}/\text{g}_N\text{-NO}_2\text{-produit}$.

La nitrosation s'accompagne également d'une diminution d'alcalinité du milieu due à la consommation des carbonates (HCO_3^-). D'après les coefficients stœchiométriques, deux moles de HCO_3^- sont consommés lors de la nitrosation d'une mole de NH_4^+ .

D'un point de vue métabolique, l'azote ammoniacal sous sa forme basique (NH_3) est d'abord oxydé en hydroxylamine (NH_2OH) par l'enzyme AMO (Ammonium Mono Oxygénase). L'hydroxylamine est ensuite transformée successivement en un intermédiaire instable (NOH), immédiatement transformé en oxyde nitrique (NO) et enfin en nitrites (NO_2^-), le tout par l'enzyme HAO (Hydroxylamine Oxydoreductase). Cette oxydation fait intervenir une chaîne complexe de transfert d'électrons impliquant différents intermédiaires enzymatiques, et dont l'accepteur final d'électrons est l'oxygène (Poughon *et al.* 2001).

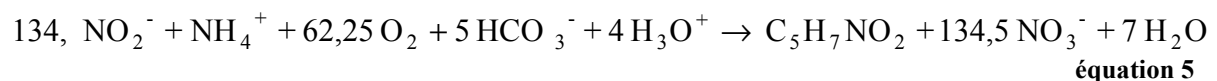
1.1.2.3.2 Nitratisation

L'équation 4 présente la réaction d'oxydation des nitrites en nitrates, appelée nitratisation :



Cette réaction est effectuée par des bactéries nitratantes ou NOB (de l'anglais Nitrite Oxidizing Bacteria) et notées X_{BN} . Le genre bactérien nitratant le plus étudié est *Nitrobacter*, car il est facilement cultivable. Cependant, d'autres genres sont fréquemment trouvés dans les milieux naturels. L'état des lieux des connaissances de la phylogénie et l'écologie des bactéries nitratantes sera présenté dans le paragraphe 1.2.3.

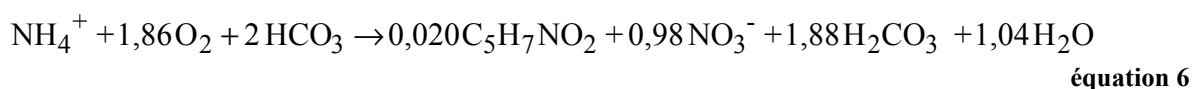
L'équation 5 présente la réaction de nitratisation en prenant en compte la synthèse de biomasse notée $\text{C}_5\text{H}_7\text{NO}_2$.



Le rendement de synthèse de la biomasse nitratante est $Y_{\text{BN}} = 0,085 \text{ g}_{\text{DCO-X}}/\text{g}_{\text{N-NO}_3\text{-produit}}$ soit $Y_{\text{BN}} = 0,06 \text{ g}_{\text{MVS-X}}/\text{g}_{\text{N-NO}_3\text{-produit}}$.

1.1.2.3.3 Bilan de la nitrification

La nitrification résulte de la somme des réactions de nitrosation et de nitratisation. Aucun organisme connu à ce jour n'est capable de réaliser seul la nitrification complète, de l'ammoniac au nitrate. Cependant, dans un souci de simplification, elle est considérée comme une réaction unique (équation 6) lors de l'étude des systèmes de traitement des eaux.



Le terme de "bactéries nitrifiantes" est souvent utilisé pour désigner les biomasses nitrosantes et nitratantes sans distinction.

1.1.2.3.4 Stœchiométrie et consommation d'oxygène

Si l'on se base sur les coefficients des réactions d'oxydation purement chimiques (équations 2 et 4) sans prendre en considération la formation de biomasse, l'oxydation de l'ammonium en nitrites et celle des nitrites en nitrates requièrent respectivement $3,43 \text{ gO}_2/\text{gN-NH}_4$ et $1,14 \text{ gO}_2/\text{gN-NO}_2$ (soit $4,57 \text{ gO}_2/\text{gN}$ pour l'oxydation de l'ammonium en nitrates). Or, les réactions biologiques résultent d'une oxydation du substrat par réduction d'oxygène d'une part, et par la production de biomasse d'autre part, qui s'apparente à une réaction de réduction car le carbone inorganique utilisé accepte une partie des électrons du substrat azoté lors de la synthèse de la biomasse.

L'oxygène consommé pour chaque réaction biologique est alors exprimée en fonction des rendements de croissance selon les équations 7 et 8 :

$$\text{OC}_{\text{BA}} = (3,43 - Y_{\text{BA}}) * \text{N} - \text{NO}_{2\text{formé}} \quad \text{équation 7}$$

$$\text{OC}_{\text{BN}} = (1,14 - Y_{\text{BN}}) * \text{N} - \text{NO}_{3\text{formé}} \quad \text{équation 8}$$

où OC est l'oxygène consommé par la réaction, Y_{BA} et Y_{BN} sont les rendements de croissance de la nitrosation et de la nitratisation respectivement.

Rapportée à la consommation d'ammonium, l'expression de la quantité d'oxygène (équation 9) doit également prendre en compte l'assimilation dans la biomasse formée au cours de la réaction, qui est exprimée par l'équation 10 :

$$\text{NH}_{4\text{consommé}} = \text{NO}_{2\text{formé}} + \text{NH}_{4\text{assimilé}} \quad \text{équation 9}$$

$$\text{NH}_{4\text{assimilé}} = i_{\text{XB}} \cdot (Y_{\text{BA}} \cdot \text{NO}_{2\text{formé}} + Y_{\text{BN}} \cdot \text{NO}_{3\text{formé}}) \quad \text{équation 10}$$

La forme d'azote préférentiellement assimilée est l'ammonium. Les NO_2 n'étant pas assimilés, ils sont entièrement transformés en NO_3 ($\text{NO}_{2\text{formé}} = \text{NO}_{3\text{formé}}$). L'équation 9 devient alors :

$$\text{NH}_{4\text{consommé}} = \text{NO}_{2\text{formé}} \cdot (1 + i_{\text{XB}} \cdot (Y_{\text{BA}} + Y_{\text{BN}})) \quad \text{équation 11}$$

Ainsi, l'oxygène consommé par unité de substrat est exprimé par les équations 12, 13 et 14 pour la nitrosation, la nitratisation et la nitrification totale respectivement (ratios exprimés en gO_2/gN).

$$\frac{OC_{BA}}{N - NH_4} = \frac{3,43 - Y_{BA}}{1 + i_{XB} \cdot (Y_{BA} + Y_{BN})} \quad \text{équation 12}$$

$$\frac{OC_{BN}}{N - NO_2} = 1,14 - Y_{BN} \quad \text{équation 13}$$

$$\frac{OC_{total}}{N - NH_4} = \frac{4,57 - (Y_{BA} + Y_{BN})}{1 + i_{XB} \cdot (Y_{BA} + Y_{BN})} \quad \text{équation 14}$$

Le dénominateur des équations 12 et 14 permet de prendre en considération l'ammonium assimilé par la biomasse formée lors de la réaction. Les nitrites ne sont généralement pas assimilés, ce qui explique l'absence de terme en dénominateur pour l'équation 13.

La Figure 3 présente l'ensemble de la réaction de nitrification en deux étapes avec les proportions qui conduisent à la formation de 1 gramme de nitrates (en g_N).

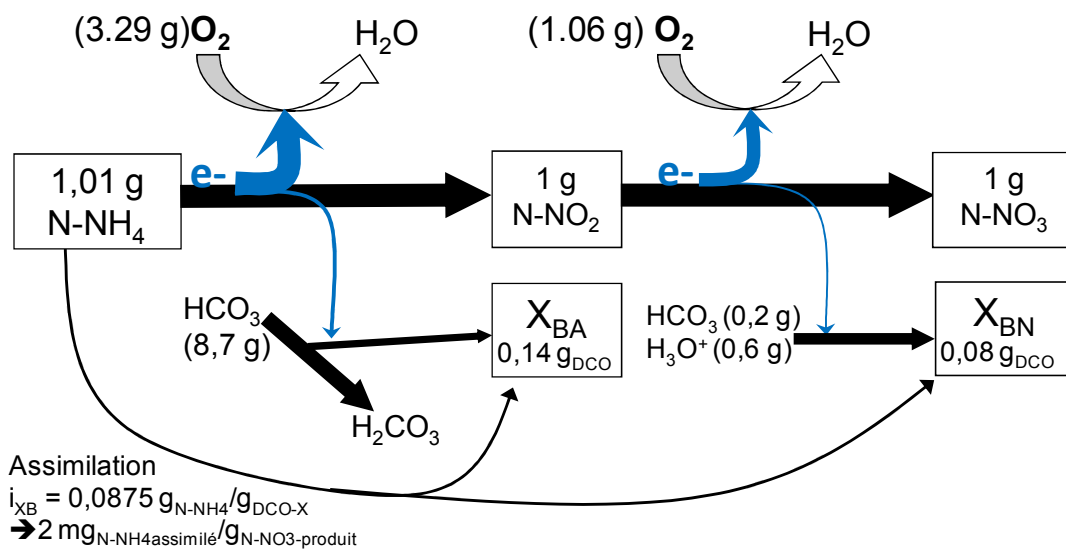


Figure 3 : schéma général des 2 étapes de la nitrification avec les coefficients stœchiométriques correspondant à la production de 1g_N de nitrates.

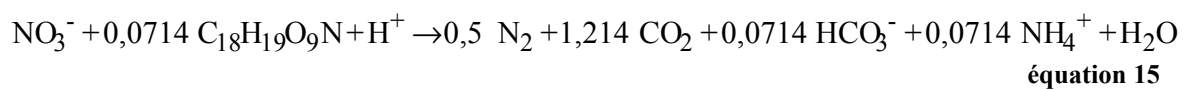
La production d'un gramme de N-NO₃ par nitrification nécessite de mobiliser 1,01 g de N-NH₄ compte tenu de l'assimilation d'ammonium par la biomasse nitrifiante. Elle requiert 4,34 grammes d'oxygène. La consommation d'un gramme de N-NH₄ ne requiert que 4,26 g d'oxygène mais ne produit que 0,99 g de N-NO₃.

La production d'un gramme de N-NO₃ se traduit par la formation de 0,23 g_{DCO} de biomasse nitrifiante. Cette valeur correspond au rendement de synthèse global de la biomasse nitrifiante noté Y_A.

La biomasse produite assimile 0,0875 grammes d'azote par gramme de biomasse (exprimée en DCO). L'ammonium assimilé lors de la formation de 1 $\text{g}_{\text{N-NO}_3}$ équivaut à 2 $\text{mg}_{\text{N-NH}_4}$ ($=0,0875*0,23$).

1.1.2.4 Dénitrification

La dénitrification est la réduction des nitrates en azote gazeux par des bactéries hétérotrophes aérobies facultatives en condition anoxique (c.à.d. en absence d'oxygène mais en présence d'azote oxydé). Les nitrates servent d'accepteurs d'électrons à la chaîne respiratoire. L'équation 15 présente la réaction de dénitrification.



La nitrification consomme deux moles d'ions carbonates par mole d'azote nitrifié, et la dénitrification en produit 1,2 mole par mole de nitrate. Le bilan net des réactions de nitrification et de dénitrification conduit donc à une consommation d'alcalinité. Dans le bassin biologique, cette diminution est compensée par l'alcalinité apportée par les eaux brutes. La consommation d'alcalinité n'est donc généralement pas un facteur limitant en station d'épuration municipale. Cependant, lorsque les eaux sont très douces, et/ou que du chlorure de fer (FeCl_2) est ajouté dans le bassin (pour précipiter le phosphore), des carences d'alcalinité peuvent être observées.

1.1.3 Processus de nitrification

1.1.3.1 Paramètres cinétiques

1.1.3.1.1 Taux de croissance

Le taux de croissance (μ_A) d'une biomasse représente l'accroissement de la population par unité de temps. A partir du temps de génération (G), qui représente le temps de doublement d'une population, le taux de croissance peut être exprimé par l'équation 16 :

$$\mu_A = \frac{1}{G} * \ln(2)$$

équation 16

Le taux de croissance réel d'une biomasse est généralement exprimé par un taux de croissance maximal (μ_{max}) pondéré par des facteurs limitants liés aux conditions environnementales (température, concentration en substrats, pH, toxiques...).

Toutes les bactéries d'une même souche présentent le même taux de croissance maximal ; seules les conditions environnementales modifient leur croissance effective. Dans les boues activées, les populations nitrosantes et nitrifiantes ne sont pas constituées d'une seule espèce, mais un seul jeu de paramètres cinétiques est généralement considéré, qui représente alors la population dominante ou la moyenne des populations.

Température

Les bactéries nitrifiantes sont généralement mésophiles. Grunditz et Dalhammar (2001) ont étudié l'impact de la température sur l'activité d'une souche de *Nitrosomonas* et d'une souche de *Nitrobacter* (Figure 4).

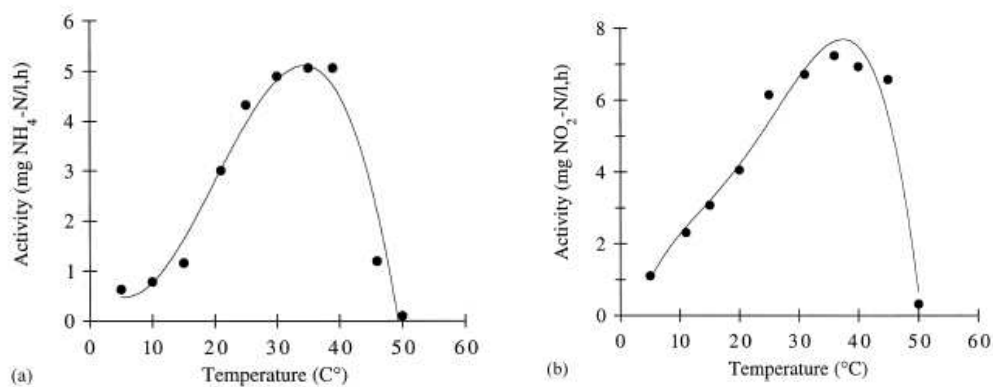


Figure 4 : effet de la température sur l'activité d'une souche de (a) *Nitrosomonas* et de (b) *Nitrobacter* d'après Grunditz et Dalhammar (2001).

Une forte diminution de l'activité est observée au-delà de 40°C pour *Nitrosomonas*, et 45°C pour *Nitrobacter*, ainsi qu'une très faible activité pour des températures inférieures à 10°C. Dans les stations d'épuration municipales en France, les températures n'atteignent jamais des niveaux trop élevés ; mais de basses températures peuvent être observées et il est nécessaire de tenir compte de leur effet sur la flore nitrifiante.

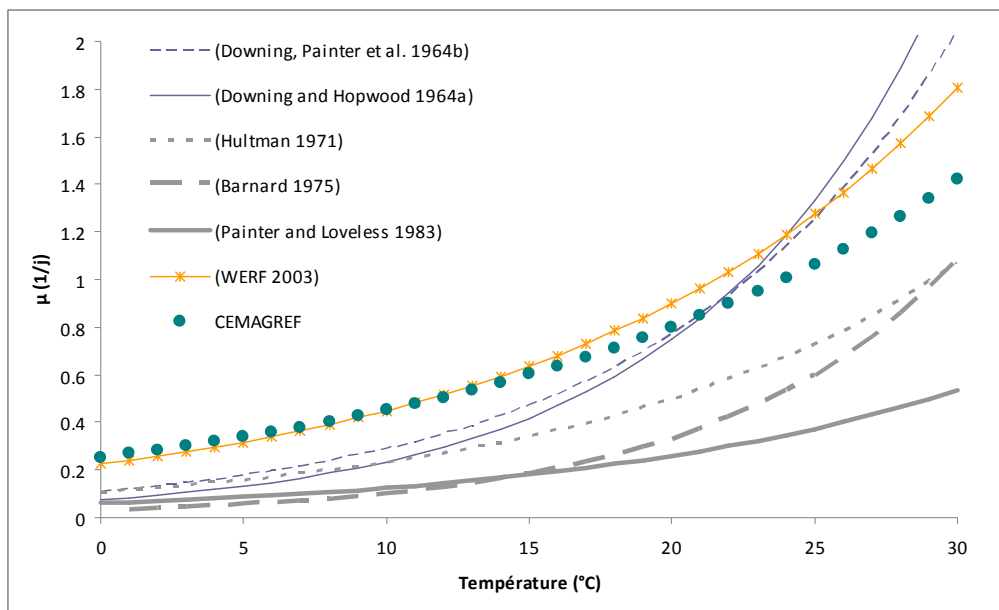
En dessous de 30°C, le taux de croissance maximal suit une loi d'Arrhenius, traduite par l'équation 17.

$$\mu_{A,\max}(T) = \mu_{A,\max}(T_0) \cdot \theta^{T-T_0} \quad \text{équation 17}$$

La constante de température (θ) et la température de référence (T_0) varient selon les auteurs. Le Tableau 1 présente différentes équations de la littérature, et la Figure 5 leur représentation graphique.

Tableau 1 : expressions du taux de croissance des bactéries nitrifiantes en fonction de la température

Référence	Formulation μ_A en j^{-1}	θ ($^{\circ}C^{-1}$)
Downing <i>et al.</i> (1964b)	$\mu_A=0,47.e^{0,098(T-15)}$	1,103
Downing et Hopwood (1964a)	$\mu_A=0,18.e^{0,116(T-15)}$	1,123
Hultman (1971)	$\mu_A=0,50.10^{0,033(T-20)}$	1,079
Barnard (1975)	$\mu_A=0,33.1,127^{(T-20)}$	1,127
Painter et Loveless (1983)	$\mu_A=0,18.e^{0,0729(T-15)}$	1,076
Barker et Dold (1997)	$\mu_A=\mu_{max} \cdot 1,096^{(T-20)}$	1,096
Head et Oleszkiewicz (2003)	$\mu_A=\mu_{max} \cdot e^{0,0844(T-10)}$	1,088
WERF ⁱ (Melcer <i>et al.</i> 2003)	$\mu_A=0,90.1,072^{(T-20)}$	1,072
Cemagref (Choubert <i>et al.</i> 2005 ; Marquot 2006)	$\mu_A=0,80.1,059^{(T-20)}$	1,059

**Figure 5 : comparaison des équations de taux de croissance en fonction de la température**

Les relations (courbes) peuvent différer très sensiblement d'une étude à l'autre. Ces écarts sont imputables à la disparité des types de biomasse analysée (cultures pures de différentes espèces, boues activées provenant de systèmes différents, ...) ainsi qu'à l'utilisation de protocoles expérimentaux variés pour la détermination des taux de croissance.

Le taux de mortalité (b_A) a souvent été négligé dans ces analyses, induisant une sous-estimation du taux de croissance (μ_A), ainsi qu'une surestimation de la constante de température (Melcer *et al.* 2003). Les relations obtenues en prenant en compte la mortalité (Melcer *et al.* 2003, Choubert *et al.* 2005) fournissent des taux de croissance proches dans les gammes de températures usuellement rencontrées (5 – 25 $^{\circ}C$).

ⁱ Water Environment Research Association

Concentration en substrats (O_2 , et NH_4 ou NO_2)

La concentration en substrats influe sur le taux de croissance en fonction de l'affinité des bactéries pour les substrats, selon une loi de Monod, exprimée par l'équation 18 pour la biomasse nitrosante et par l'équation 19 pour la biomasse nitratante.

$$\mu_{BA}(T) = \mu_{BA,max}(T) \cdot \frac{[O_2]}{[O_2] + K_{OAB}} \cdot \frac{[NH_4]}{[NH_4] + K_{NHB}} \quad \text{équation 18}$$

où K_{OAB} est la constante d'affinité de la biomasse nitrosante pour l'oxygène (en mg_{O_2}/L), et K_{NHB} est la constante d'affinité pour l'ammonium (en mg_{N-NH_4}/L).

$$\mu_{BN} = \mu_{BN,max} \cdot \frac{[O_2]}{[O_2] + K_{ONB}} \cdot \frac{[NO_2]}{[NO_2] + K_{NOB}} \quad \text{équation 19}$$

où K_{ONB} est la constante d'affinité de la biomasse nitratante pour l'oxygène (en mg_{O_2}/L), et K_{NOB} est la constante d'affinité pour les nitrites (en mg_{N-NO_2}/L).

Les constantes d'affinité (ou constantes de demi saturation) représentent la concentration du substrat concerné pour laquelle le taux de croissance vaut la moitié du taux de croissance maximal, en absence d'autres limitations. Une forte affinité se traduit donc par une faible constante d'affinité. Les bactéries nitrosantes et nitratantes présentent des affinités et des taux de croissance très variables selon les espèces considérées.

pH

Les couples acido-basiques NH_4^+/NH_3 et HNO_2/NO_2^- ont pour constante d'acidité $pK_a = 9,20$ et $3,4$ respectivement à $25^\circ C$. La proportion de NH_3 peut varier entre $0,75\%$ et 9% de l'azote ammoniacal total ($NH_4^+ + NH_3$) dans la gamme de pH habituellement rencontrée dans les boues activées ($7,2 - 8,5$) à $20^\circ C$ (cf. Figure 6)

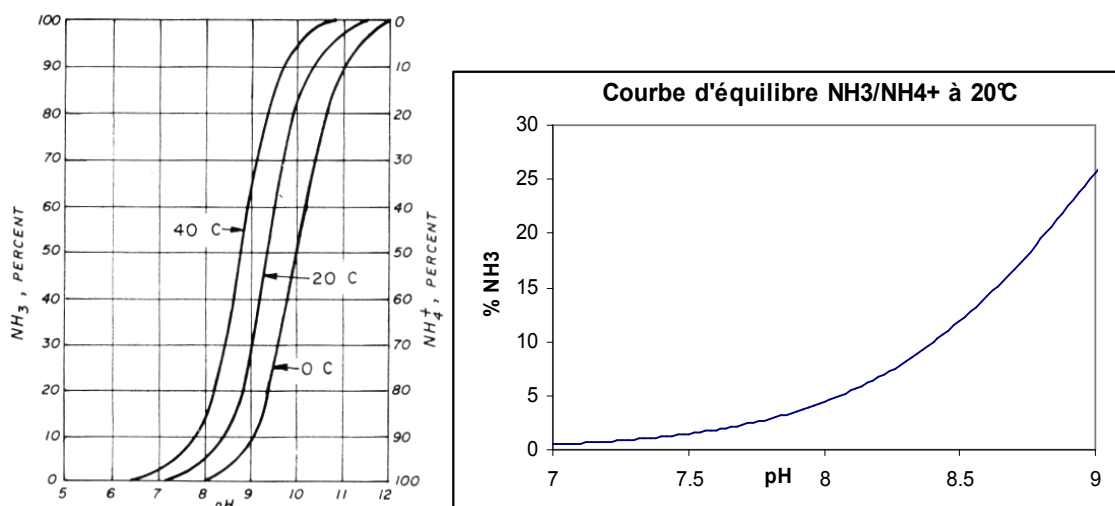


Figure 6 : courbes d'équilibre du couple acido-basique $\text{NH}_3/\text{NH}_4^+$

Les substrats réels des bactéries nitrifiantes et nitrifiantes sont respectivement l'ammoniac (NH_3) et l'acide nitrique (HNO_2) (Poughon *et al.* 2001).

Afin de décrire rigoureusement la réalité, les constantes d'affinités K_{NH} et K_{NO_2} devraient être définies pour l'ammoniac et pour l'acide nitrique, dont les concentrations peuvent être estimées à partir du pH et des mesures d'azote ammoniacal total, et d'azote nitreux total (Jubany 2007).

Pour un pH supérieur à 9, la proportion d'ammoniac (NH_3) devient élevée, et il peut en résulter une inhibition des bactéries nitrifiantes et nitrifiantes.

Lorsque le pH devient inférieur à 6, c'est la proportion d'acide nitreux (HNO_2) qui atteint un niveau potentiellement toxique pour les bactéries nitrifiantes (Choubert 2002).

Substances toxiques

De nombreuses substances peuvent inhiber la croissance des bactéries autotrophes tels que des métaux lourds (Hu *et al.* 2004), des sels (Dinçer et Kargi 2001), ou des composés toxiques des eaux usées industrielles (Grunditz *et al.* 1998).

Une étude menée sur 109 stations d'épuration suédoises a révélé la présence d'inhibiteurs de la nitrification dans l'influent de 60% des stations (Jönsson *et al.* 2000). Cependant, la concentration, l'aspect physique (soluble, volatile, colloïdal) et la composition de l'inhibiteur sont rarement connus, et il en résulte une grande difficulté à prendre en compte cette inhibition pour la modélisation du fonctionnement des stations d'épuration.

1.1.3.1.2 Taux de mortalité

La mortalité résulte de la dégénérescence naturelle des bactéries d'une part, de l'action des bactériophages et de la prédation des protozoaires et autres organismes d'autre part. Le taux de mortalité des bactéries nitrifiantes (b_A) dépend entre autre de la température et des conditions d'oxygénation du milieu.

L'effet de la température sur le taux de mortalité a été exprimé (à partir d'un nombre limité de données expérimentales) par l'équation 20 (Melcer *et al.* 2003)

$$b_A(T) = 0,17 * 1,029^{(T-20)} \quad \text{équation 20}$$

où T est la température en °C.

Le **taux de mortalité (b_A)** a encore été peu étudié, car il a longtemps été considéré comme négligeable (Dold *et al.* 2005). En modélisation, un consensus vers une valeur de $0,17 \text{ j}^{-1}$ à 20°C a été obtenu pour les stations d'épuration à très faibles charges en France (Melcer *et al.* 2003 ; Choubert *et al.* 2008). Cependant, il semble se confirmer que b_A ne prend pas la même valeur en conditions aérobie, anoxique, anaérobie ou en aération alternée. A 20°C (Melcer *et al.* 2003 ; Salem *et al.* 2006) recommande l'utilisation d'un taux de mortalité à 20°C de $0,2 \text{ j}^{-1}$, $0,1 \text{ j}^{-1}$, et $0,06 \text{ j}^{-1}$ en conditions aérobies, anoxiques et anaérobies respectivement.

1.1.3.1.3 Vitesses de réaction

Les réactions de nitrosation et de nitratisation résultent de l'activité des biomasses nitrosantes et nitratantes respectivement.

Les vitesses de ces deux réactions sont définies par les équations 21 et 22 comme le produit de la vitesse spécifique par la concentration en biomasse ($[X_{BA}]$ et $[X_{BN}]$ en $\text{mg}_{\text{DCO}}/\text{L}$). La vitesse spécifique est définie par le taux de croissance net (μ_{BA} et μ_{BN} en j^{-1}) divisé par le rendement de la réaction (Y_{BA} et Y_{BN} en $\text{mg}_{\text{DCO-X}}/\text{mg}_{\text{Nnitrifié}}$).

$$\rho_{BA} = \frac{\mu_{BA} \cdot [X_{BA}]}{Y_{BA}} \quad \text{équation 21}$$

$$\rho_{BN} = \frac{\mu_{BN} \cdot [X_{BN}]}{Y_{BN}} \quad \text{équation 22}$$

où ρ_{BA} et ρ_{BN} sont les vitesses de nitrosation et de nitratisation respectivement, exprimées en $\text{mg}_{\text{Nnitrifié}} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{j}^{-1}$

1.1.3.2 Maintien de l'activité nitrifiante

1.1.3.2.1 Croissance nette

La croissance nette d'une biomasse est définie par la différence entre sa croissance et sa mortalité. L'équation 23 exprime le taux de croissance nette de la biomasse nitrifiante.

$$\mu_{A\text{net}} = \mu_A(T, \text{pH}, [\text{substrats}], [\text{inhibiteurs}]) - b_A(T, [\text{inhibiteurs}]) \quad \text{équation 23}$$

1.1.3.2.2 Âge des boues (SRT)

L'âge des boues est un paramètre de fonctionnement d'une station d'épuration représentant la durée moyenne de séjour des boues dans le système. Il est désigné par le terme SRT (de l'anglais Sludge Retention Time). La Figure 7 présente un schéma d'une station d'épuration pour laquelle nous allons définir l'âge des boues.

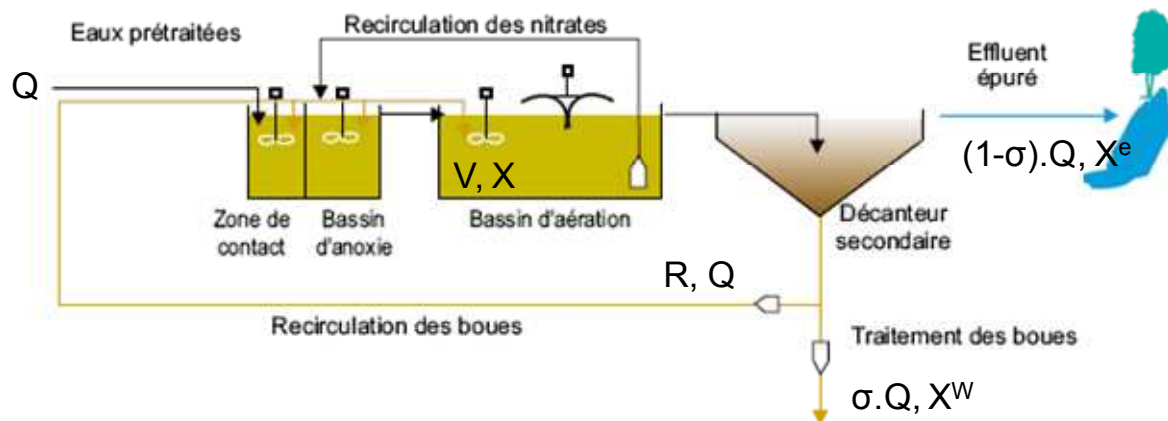


Figure 7: schéma d'une station à boues activées. V est le volume du bassin d'aération, Q est le débit (m^3/j) traversant le système, σ est le taux d'extraction (%), R est le taux de recirculation, X , X^e et X^W sont les concentrations en boues dans le bassin d'aération ($\text{g}_{\text{DCO}}/\text{L}$), dans l'effluent et dans les boues extraites respectivement.

L'âge des boues est calculé en divisant la masse totale de boue contenue dans le système (MX) par le débit d'extraction de boues comme l'exprime l'équation 24

$$\text{SRT} = \frac{MX}{\sigma \cdot Q \cdot X^W + (1 - \sigma) \cdot Q \cdot X^e} \quad \text{en j.} \quad \text{équation 24}$$

X^e peut généralement être négligé lorsque la décantation est efficace.

A partir de la fraction de biomasse contenue dans le bassin d'aération (f_{AT}), l'âge des boues peut s'exprimer selon l'équation 25 :

$$\text{SRT} = \frac{V \cdot X}{f_{\text{AT}} \cdot \sigma \cdot Q \cdot X^W} \quad \text{en j.} \quad \text{équation 25}$$

f_{AT} dépend essentiellement de la configuration du système. Il sera de 80 à 95 % pour un système avec un seul bassin d'aération, et peut atteindre à 50 % pour un système avec bassin d'anaérobiose, bassin d'anoxie et bassin d'aération.

Remarque : L'âge des boues peut également être défini pour une population particulière. Il se différenciera de l'âge des boues général si cette biomasse subit des apports ou des pertes spécifiques, qui n'affectent pas le reste de la biomasse des boues activées (cf. § 1.3.2.1).

A conditions identiques, le maintien de l'activité nitrifiante dépend uniquement du maintien d'une quantité de biomasse nitrifiante active suffisante.

La variation de la quantité de biomasse nitrifiante (dMX_A/dt en $g_{DCO}.j^{-1}$) dans le système est définie par l'équation 26 comme la différence entre la production de biomasse ($\mu_A.V.X_A$) et les pertes dues à la mortalité ($b_A.V.X_A$) et aux extractions de boues ($\sigma.Q.X_A$).

$$dMX_A/dt = (\mu_A - b_A).V.X_A - \sigma.Q.X_A \quad \text{équation 26}$$

Cette équation est vraie pour des conditions aérobies permanentes. Or les bassins biologiques subissent des alternances de phases aérobies permettant la nitrification et de phases anoxiques permettant la dénitrification. Pendant les phases d'anoxie, la croissance de la biomasse autotrophe est interrompue. Ainsi, μ_A doit être remplacé par μ_{Amoy} , qui intègre une pondération du taux de croissance de la biomasse autotrophe par la fraction du temps durant lequel les boues se trouvent en conditions aérobies selon l'équation 27.

$$\mu_{Amoy} = \mu_{A-aérobie} * t_{aérobie} / 24 \quad \text{équation 27}$$

où $\mu_{A-aérobie}$ est le taux de croissance de la biomasse autotrophe en aérobiose, et $t_{aérobie}$ est la durée journalière de présence d'oxygène dans le bassin (en heures). Il convient de distinguer la durée de présence de l'oxygène de la durée d'aération. En effet, la durée de présence d'oxygène découle de la durée d'aération, mais également de la demande en oxygène du milieu et de la concentration en oxygène dissous atteinte lors de l'arrêt de l'aérateur. La durée de présence d'oxygène peut être supérieure à la durée d'aération de 9 % à plus de 50% selon les conditions (Choubert 2002 ; Marquot 2006).

A l'état d'équilibre du système, la variation de biomasse est nulle, et l'équation 26 devient donc :

$$\mu_{Amoy} - b_A = \frac{\sigma \cdot Q}{V} = \frac{1}{SRT} \cdot \frac{X^W \cdot f_{AT}}{X} \quad \text{équation 28}$$

Il existe alors un âge de boues minimum permettant de maintenir la biomasse nitrifiante. Il est défini comme l'inverse de la croissance nette de la biomasse nitrifiante, et qui dépend de la charge azotée reçue par le système, des conditions environnementales (température, pH, toxiques) et de la durée d'aération journalière. L'exploitant d'une station d'épuration peut donc faire varier deux paramètres afin de maintenir la biomasse nitrifiante : la durée journalière d'aération et le taux d'extraction des boues, qui déterminent l'âge des boues aéré. A titre d'exemple, il a été déterminé par modélisation (Choubert 2002) qu'un âge de boues minimum de 14 jours permet une nitrification poussée des eaux résiduaires urbaines pour une durée de présence d'oxygène journalière de 13h40, et une charge de 0,27 kg_{DCO}.kg_{MVS}⁻¹.j⁻¹.

L'âge de boues ne peut toutefois pas être augmenté de façon trop importante, car l'accroissement de la concentration des boues dans le bassin d'aération diminue la charge hydraulique admissible sur le clarificateur. Généralement, la concentration des boues en aération prolongée est de l'ordre de 4 à 5 g_{MES}/L (Duchène et Cotteux 2002).

Ainsi, afin de maintenir un âge de boues suffisant (entre 12 et 20 jours) sans trop concentrer les boues, un volume de bassin minimum est défini en fonction de la charge organique. A titre d'exemple, le volume de bassin d'aération requis est de 1300m³ pour environ 5000 EH (Deronzier *et al.* 2001).

1.1.3.2.3 Biomasse autotrophe

La biomasse autotrophe (nitrifiante) produite au cours d'une journée (μ_A) est liée à la quantité d'azote ammoniacal nitrifié dans la journée (φ_{nit} en g_{Nnitrifié}.j⁻¹) selon l'équation 29 :

$$\mu_A = \frac{Y_A \cdot \varphi_{nit}}{MX_A} \quad \text{équation 29}$$

où Y_A est le rendement de croissance de la biomasse autotrophe (en g_{DCO}/g_N), et MX_A est la quantité de biomasse autotrophe présente dans le système. φ_{nit} dépend de la charge azotée journalière reçue, de l'activité nitrifiante des boues et de la durée d'aération journalière.

Ainsi, en conditions d'équilibre, la quantité de biomasse nitrosante (MX_A) du système peut être déduite de l'équation 28 et de l'équation 29 qui résultent en l'équation 30, et sa concentration (X_A en mg_{DCO}/L) dans les bassins biologiques s'exprime alors selon l'équation 31 (Choubert *et al.* 2008).

$$MX_A = \frac{Y_A \cdot \varphi_{\text{nit}}}{b_A - \frac{1}{\text{SRT}}} \quad \text{équation 30}$$

$$X_A = f_{\text{AT}} \cdot \frac{Y_A}{b_A + \frac{1}{\text{SRT}}} \cdot B_V(N_{\text{nitrifié}}) \quad \text{équation 31}$$

où f_{AT} est la fraction de la biomasse totale du système contenue dans le bassin d'aération (cf. page 40) et $B_V(N_{\text{nitrifié}})$ est la charge volumique journalière d'azote nitrifié (en $\text{g}_{\text{N-NTK}} \cdot \text{m}^{-3}_{\text{bassin}} \cdot \text{j}^{-1}$).

La charge volumique d'azote nitrifié $B_V(N_{\text{nitrifié}})$ est définie (équation 32) par le produit de la charge volumique en entrée ($B_V(N)$ en $\text{g}_{\text{N-NTK}} \cdot \text{m}^{-3}_{\text{bassin}} \cdot \text{j}^{-1}$), et de la fraction d'azote nitrifiable de l'influent (λ).

$$B_V(N_{\text{nitrifié}}) = \lambda \cdot B_V(N) \quad \text{équation 32}$$

La fraction d'azote nitrifiable (λ) permet de prendre en compte la fraction d'azote qui sera assimilée par la biomasse hétérotrophe consommant les substrats organiques (DBO_5). Il dépend donc du ratio DBO_5/NTK , ainsi que de l'efficacité d'élimination de la DBO_5 et du NTK. Il est exprimé par l'équation 33 (Choubert *et al.* 2008) :

$$\lambda = \eta_{\text{TKN}} - 5\% \cdot \eta_{\text{DBO}_5} \cdot \frac{[\text{DBO}_5]_{\text{entrée}}}{[\text{NTK}]_{\text{entrée}}} \quad \text{équation 33}$$

où η_{DBO_5} et η_{TKN} sont les rendements d'élimination de la DBO_5 et des NTK respectivement (exprimés en %). Un effluent classique de station d'épuration municipale présente un ratio DBO_5/TKN de l'ordre de 4.

1.1.3.2.4 Vitesse de nitrification en régime stabilisé

Pour un système en régime stabilisé, la vitesse maximale de nitrification des boues activées est exprimée par l'équation 34 (Choubert *et al.* 2008) :

$$\rho_{A,\text{max}} = \lambda \cdot f_{\text{AT}} \cdot \frac{\mu_{A,\text{max}}}{b_A + \frac{1}{\text{SRT}}} \cdot B_V(N) \quad \text{équation 34}$$

où λ représente la fraction nitrifiable de l'azote entrant dans la station, $\mu_{A,max}$ et b_A sont respectivement les taux de croissance et de mortalité de la biomasse nitrifiante, $B_V(N)$ est la charge volumétrique d'azote en entrée (en $g_{N-NTK} \cdot m^{-3}_{bassin} \cdot j^{-1}$) et f_{AT} est la fraction de boues contenues dans le bassin d'aération.

D'après la structure de l'équation 34, les âges de boues (SRT) ont un impact relativement faible sur la capacité nitrifiante : par exemple avec la valeur standard de b_A ($0,17 j^{-1}$), un âge de boues de 10 jours résultera en une vitesse 1,5 fois plus grande que celle obtenue pour un âge des boues de 100 jours pour des paramètres identiques. Ainsi, pour un âge des boues suffisant au maintien de la biomasse nitrifiante, la capacité des boues dépendra essentiellement de l'effluent traité (charge B_V et ratio DBO_5/NTK).

La Figure 8 présente la relation observée entre la charge ($B_V(N)$) et la vitesse de nitrification dans le bassin d'aération.

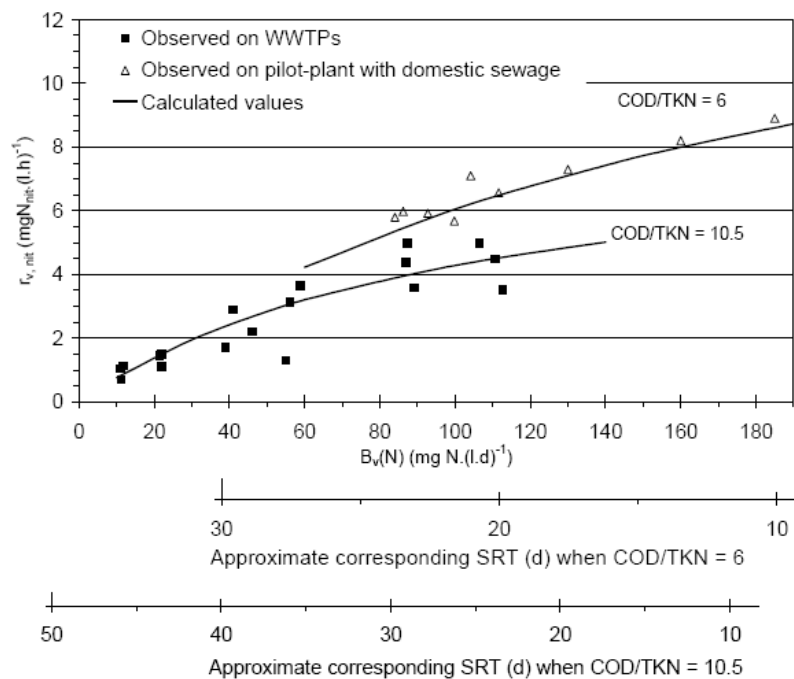


Figure 8 : vitesses de nitrification observées et calculées pour différentes charges et différents types d'influents selon Choubert *et al.* (2008).

La vitesse réelle de nitrification dépendra à chaque instant des concentrations des substrats NH_4 et O_2 selon les équations de type Monod présentées précédemment (équation 18).

1.1.3.3 Conclusions

Les stations d'épuration à très faible charge représentent un procédé très répandu de traitement des eaux résiduaires urbaines, permettant l'élimination des pollutions carbonée et

azotée. Les processus biologiques impliqués dans l'élimination de l'azote sont assez complexes, faisant intervenir 5 réactions différentes (assimilation, ammonification, nitrosation, nitratisation et dénitrification). L'étape clef de cette élimination est la nitrification (nitrosation et nitratisation), qui est réalisée par les populations nitrifiantes des boues activées (respectivement nitrosantes et nitratantes). Ces micro-organismes qui composent la biomasse autotrophe présentent un taux de croissance assez faible, qui impose de maintenir des temps de séjours de la biomasse (âges des boues) élevés. L'âge des boues minimal est défini en fonction des taux de croissance ($\mu_{A,max}$) et de mortalité (b_A) de la biomasse autotrophe.

En outre, lorsque l'âge des boues est suffisamment élevé, la concentration en biomasse autotrophe et la capacité nitrifiante dépendent essentiellement de la charge azotée et de la nature de l'effluent traité (ratio DBO_5/NTK).

1.2 Populations nitrifiantes

Les analyses des communautés nitrifiantes par les méthodes classiques de microbiologie, requérant une étape de culture (isolation, MPN : Most Probable Number,...), ont longtemps conduit à penser que les espèces nitrifiantes dominantes dans les boues activées étaient *Nitrosomonas europaea* pour les AOB et *Nitrobacter winogradskyi* pour les NOB (Hall et Murphy 1980).

Or, la mise en œuvre récente de techniques basées sur la biologie moléculaire, en particulier l'analyse des gènes codant pour les ARN ribosomiques 16S (ARNr-16S), a permis d'étudier les populations *in-situ* sans les biais résultant de la mise en culture (Rittmann *et al.* 1999). Ces techniques ont permis de mettre en évidence que les populations dominantes dans les boues activées ne sont généralement pas celles que l'on identifiait par culture (Rittmann 2002) et que les facteurs environnementaux jouent un rôle important dans la structuration des communautés (Koops et Pommerening-Röser 2001).

1.2.1 Stratégies –r et –K

Un concept d'écologie définit 2 types de populations en compétition pour un substrat : les populations à stratégie –r, et les populations à stratégie –K (MacArthur et Wilson 1967). La stratégie –r correspond à une faible affinité pour le(s) substrat(s) et à un fort taux de croissance. La stratégie –K correspond à une forte affinité pour le(s) substrat(s) et à un faible taux de croissance.

La Figure 9 montre l'évolution des taux de croissance pour les 2 types de populations en fonction de la concentration en substrat. Les milieux à faible concentration en substrat seront

donc favorables aux populations de stratégie $-K$, et les milieux à forte teneur en substrat aux populations de stratégie $-r$.

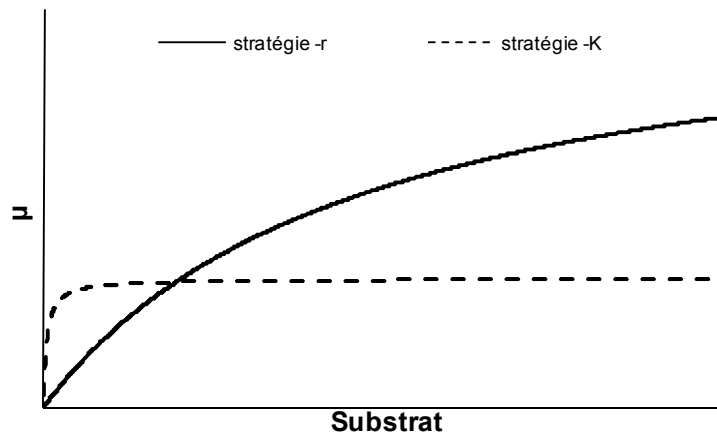


Figure 9 : comparaison des taux de croissance des organismes en fonction de la concentration en substrat et du type de stratégie adoptée.

Selon cette théorie d'écologie des populations, la concentration en substrats est le paramètre clé qui oriente la dynamique des populations. Cette conception peut s'appliquer aux bactéries nitrifiantes, mais la distinction des genres associés à chaque stratégie (r ou K) n'est pas nette, car l'ensemble des espèces présente tout un panel de taux de croissance et de constantes d'affinité différents. Par ailleurs, d'autres paramètres peuvent aussi influencer la structure des communautés nitrifiantes (température, pH, etc.).

1.2.2 Bactéries nitrosantes

Les bactéries nitrosantes sont des organismes chimioautotrophes aérobies, qui tirent leur énergie de l'oxydation de l'ammonium en nitrites par une chaîne respiratoire avec l'oxygène comme accepteur final d'électron (Poughon *et al.* 2001).

1.2.2.1 Phylogénie

Les bactéries nitrosantes sont regroupées en cinq genres dont le nom commence par le préfixe "Nitroso-" : *Nitrosomonas*, *Nitrosococcus*, *Nitrosolobus*, *Nitrosovibrio*, et *Nitrospira*. Les trois derniers genres sont souvent regroupés sous la seule branche de *Nitrospira*.

Les bactéries nitrosantes appartiennent toutes à la sous-classe β des protéobactéries, excepté *Nitrosococcus oceani* et *Nitrosococcus halophilus*, qui appartiennent à la sous-classe γ des protéobactéries (Suwa *et al.* 1997).

La Figure 10 présente l'arbre phylogénétique des grands groupes de bactéries nitrosantes (AOB) et de quelques MOB (Méthane Oxidising Bacteria) qui sont phylogénétiquement proches des AOB.

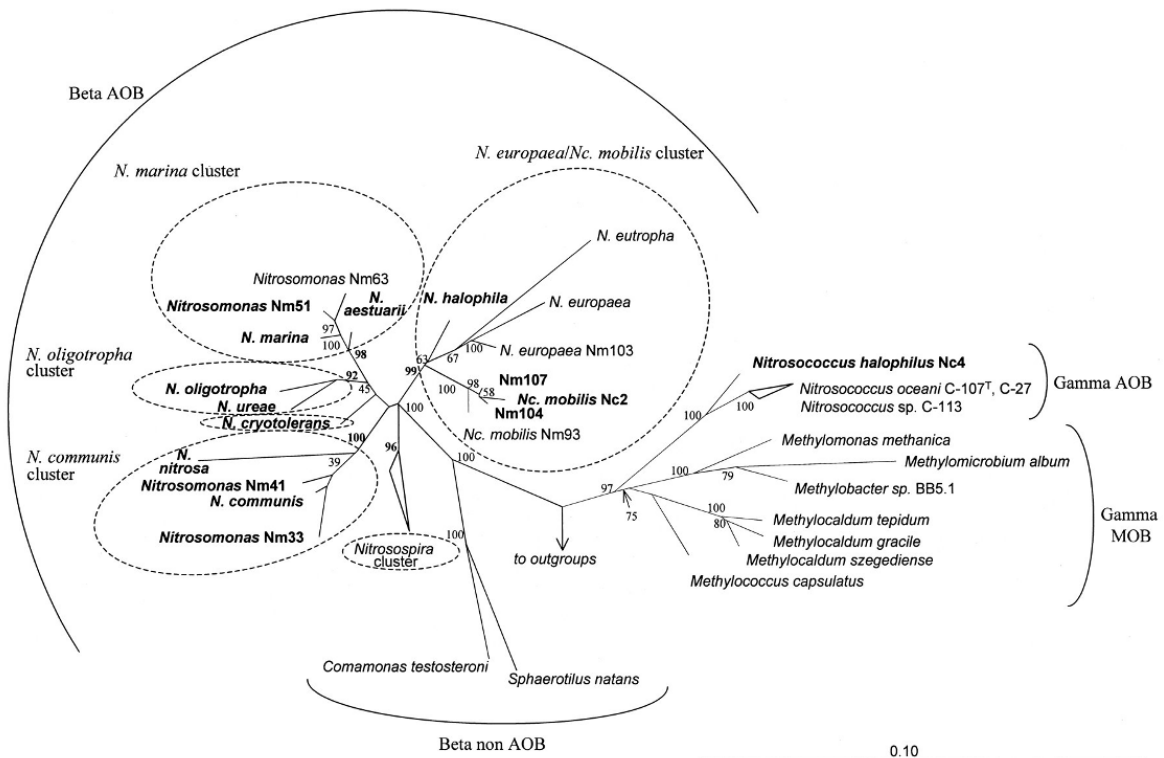


Figure 10 : arbre phylogénétique de l'ensemble des bactéries nitrosantes (AOB) et de quelques autres protéobactéries, basé sur les séquences d'ARNr-16S d'après (Purkhold *et al.* 2000)

Le genre *Nitrosomonas* est partagé en 5 sous-groupes (clusters) : *N. europaea/Nc. mobilis*, *N. marina*, *N. oligotropha* (aussi désigné comme le cluster 6a), *N. cryotolerans* et *N. communis*. L'espèce *Nitrosococcus mobilis*, présente dans certaines boues activées (Juretschko *et al.* 1998), appartient en réalité au genre *Nitrosomonas*, et au groupe de *Nitrosomonas europaea* (cluster 7). L'espèce la plus étudiée (espèce de référence) est *Nitrosomonas europaea*.

Paramètres cinétiques publiés

Le Tableau 2 recense les taux de croissance (μ_{BAmax}), ainsi que les affinités pour l'ammonium (K_{NH_4}) et pour l'oxygène (K_{O_2}) pour différentes espèces nitrosantes appartenant aux groupes *N. europaea/Nc. mobilis*, *N. oligotropha*, ou *Nitrosospira*, collectés dans la littérature

Tableau 2 : recensement bibliographique des paramètres cinétiques des bactéries nitrosantes

Bactérie nitrosante	Origine	Température de mesure	μ_{BAmax} (j^{-1})	K_{NH4} mg_N/L	K_{OAB} mg_{O_2}/L	Référence
<i>Nitrosomonas sp.</i>	Sol	27°C	1,25 – 1,46	14,0 – 30,80	-	Belser et Schmidt 1980
	Sol	25°C	2,82	-	-	Brandt <i>et al.</i> 2001
<i>Nitrosomonas europaea / eutropha</i>	Culture pure	25°C	2,09	-	-	Kindaichi <i>et al.</i> 2006
	Bibliographie	-	0,41 – 2,11	5,60 – 98,00	-	Prosser 1989
	Cours d'eau	-	-	5,80	-	Stehr <i>et al.</i> 1995
<i>Nitrosomonas europaea</i> (ML1)	Isolat de boues	-	0,66 ±0,09	1,62 ±0,97	0,24 ±0,13	Park et Noguera 2007
<i>Nitrosomonas europaea</i>	culture pure	-	-	26,6	-	Taylor et Bottomley 2006
<i>Nitrosococcus mobilis</i>	Milieu marin	25°C	2,22	-	-	Brandt <i>et al.</i> 2001
<i>Nitrosomonas oligotropha</i> (deux souches ≠)	Cours d'eau	-	-	1,05	-	Stehr <i>et al.</i> 1995
		-	-	0,42 – 0,56	-	
Souches proches de <i>N. oligotropha</i>	Station d'épuration municipale	25°C	0,34	1,12	-	Suwa <i>et al.</i> 1994
	Pilote de laboratoire	25°C	0,59	0,24	-	
<i>N. oligotropha</i> (pop° dominante)	Boues activées	15 °C	-	0,07- 0,20	0,18 ±0,04	Manser <i>et al.</i> 2005a
<i>Nitrosomonas oligotropha</i> (NL7)	Isolat de boues	-	0,77 ±0,14	0,48 ±0,35	1,22 ±0,43	Park et Noguera 2007
<i>Nitrospira multiformis</i>	Sol	27°C	1,37	-	-	Brandt <i>et al.</i> 2001
<i>Nitrospira spp.</i>	Culture pure	-	0,8 – 1,06	-	-	Prosser 1989
<i>Nitrospira sp.</i> (AV)	culture pure	-	-	1,96	-	Taylor et Bottomley 2006
<i>Nitrospira sp.</i> (AV2)	Sol	22°C	0,80 – 0,82	-	-	Belser et Schmidt 1980
<i>Nitrospira sp.</i> (5 souches ≠)	Sols	20°C	0,34 – 0,94	-	-	Jiang et Bakken 1999

1.2.2.1.1 Groupes et stratégies

Les taux de croissance (μ_{BAmax}) estimés pour les bactéries du groupe *N. europaea/Nc. mobilis* (0,41 – 2,82 j^{-1}) sont plus élevés que pour le groupe *N. oligotropha* (0,34 – 0,77 j^{-1}) ou *Nitrospira* (0,34 – 1,37 j^{-1}). De même les constantes d'affinité pour l'ammonium montrent que les bactéries du groupe *N. europaea/Nc. Mobilis* ont une plus faible affinité, avec une

constante $K_{\text{NHB}} = 5,6 - 98 \text{ mg}_{\text{N-NH}_4}/\text{L}$ (Prosser 1989 ; Laanbroek *et al.* 1994) que *N. oligotropha* ou *Nitrosospira* qui ont des constantes d'affinité (K_{NHB}) respectivement de 0,24–1,05 (Suwa *et al.* 1994 ; Stehr *et al.* 1995) et 1,96 $\text{mg}_{\text{N-NH}_4}/\text{L}$ (Taylor et Bottomley 2006).

Dans la littérature beaucoup d'études des communautés nitrosantes ont étudié les dominances relatives des deux groupes *Nitrosomonas* et *Nitrosospira* en fonction de différents paramètres sans distinguer les sous-groupes de *Nitrosomonas*. (Schramm *et al.* 2000 ; Kreuzinger *et al.* 2003; Sofia *et al.* 2004 ; Li *et al.* 2007 ; Dytczak *et al.* 2008). Ces études présentent généralement le genre *Nitrosospira* comme étant de stratégie –K et *Nitrosomonas* de stratégie –r. Or, toutes les espèces du genre *Nitrosomonas* ne peuvent pas être associées à la stratégie –r, car les bactéries du cluster *Nitrosomonas oligotropha* présentent une forte affinité pour l'ammonium, qui correspond plutôt à une stratégie de type –K.

En conclusion, il semble que le groupe *N. europaea/Nc. Mobilis* présente une stratégie de type –r (Smith et Oerther 2006 ; Park et Noguera 2007), et *N. oligotropha*, et *Nitrosospira* présentent une stratégie de type –K (Schramm *et al.* 1998 ; Bollmann *et al.* 2002).

1.2.2.1.2 Concentration en NH_4 et NO_2

D'une façon générale, les espèces ayant une faible affinité pour l'ammonium (groupe *N. europaea* en particulier) seront minoritaires dans les milieux à faibles concentrations en raison des différences de limitations par le substrat, et les espèces ayant une forte affinité (*N. oligotropha*, et *Nitrosospira*) risquent d'être défavorisées par les concentrations élevées en raison des différences de taux de croissance maximal.

De plus, les bactéries du groupe *N. oligotropha* semblent être sensibles aux fortes concentrations en nitrite (300 $\text{mg}_{\text{N-NO}_2}/\text{L}$) et en ammonium (700 – 1400 $\text{mg}_{\text{N-NH}_4}/\text{L}$) (Suwa *et al.* 1994 ; Park et Noguera 2007). Cependant, ces concentrations ne peuvent normalement pas être obtenues dans les stations d'épuration municipales car les eaux résiduaires urbaines présentent généralement des concentrations en azote de 75 à 80 $\text{mg}_{\text{N}}/\text{L}$ maximum (Canler *et al.* 2007).

1.2.2.1.3 Concentration en oxygène

Selon la classification –r et –K considérée sus (§ 1.2.2.1.1), l'affinité pour l'oxygène (K_{OAB}) de *N. oligotropha* et *Nitrosospira* devrait être supérieure à celle de *N. europaea*.

La dominance de *N. oligotropha* dans des zones profondes de biofilms bactériens (qui présentent de faibles concentrations en oxygène) a été attribuée à une plus grande affinité

pour l'oxygène de cette lignée comparée aux autres (Gieseke *et al.* 2001). Cette hypothèse est confirmée par la mesure d'une faible constante d'affinité ($K_{OAB} = 0,18 \pm 0,04 \text{ mg}_{\text{N-NH}_4}/\text{L}$) pour des boues contenant une population dominante de *N. oligotropha* (Manser *et al.* 2005a) ; mais une autre mesure réalisée à partir d'isolats (Park et Noguera 2007) a mis en évidence que les bactéries ML1 du groupe *N. europaea* ont une plus grande affinité ($K_{OAB} = 0,24 \text{ mg}_{\text{O}_2}/\text{L}$) que les bactéries NL7 proches de la lignée *N. oligotropha* ($K_{OAB} = 1,22 \text{ mg}_{\text{O}_2}/\text{L}$). Cette étude contradictoire des observations précédentes a cependant été réalisée sur des souches pures isolées à partir de boues enrichies, qui ne sont pas nécessairement représentatives des souches dominantes dans les milieux naturels.

D'autre part, de fortes concentrations en oxygène peuvent avoir un effet inhibiteur sur la croissance des bactéries nitrosantes, comme le montre la Figure 11.

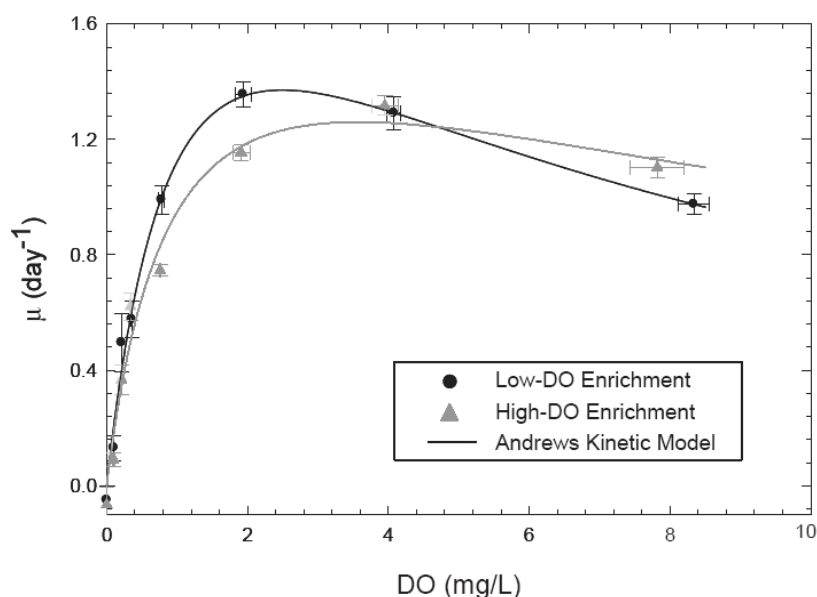


Figure 11: taux de croissance spécifiques en fonction de la concentration en oxygène pour deux espèces distinctes de la lignée *N. europaea* d'un enrichissement de boues à forte et faible concentration en oxygène respectivement, d'après (Park et Noguera 2004).

La Figure 11 permet de comprendre la sélection réalisée par le niveau d'oxygénation entre les deux espèces représentées. Ainsi, des conditions d'oxygénation très élevées ou très faibles peuvent devenir un facteur de sélection des espèces nitrosantes.

En conclusion, les affinités pour l'oxygène des bactéries des lignées *N. europaea* et *N. oligotropha* sont peu différentes et ne permettent pas de soutenir la classification de ces lignées en stratégies $-r$ ou $-K$. De plus, une étude (Park et Noguera 2007) a mesuré des constantes d'affinité en contradiction avec le classement généralement admis (*N. europaea* de

stratégie $-r$ et *N. oligotropha* de stratégie $-K$). Aucune donnée sur l'affinité de *Nitrosospira* n'a été recensée.

Dans les stations d'épuration, les concentrations en oxygène pendant les phases d'aération sont généralement d'au moins de 2 mg/L (Duchène et Cotteux 2002), soit à un niveau pour lequel l'oxygène n'est ni limitant, ni inhibiteur pour les bactéries nitrosantes. Ainsi, le niveau d'oxygénation n'est probablement pas un facteur de sélection majeur des espèces nitrosantes de ces systèmes lorsque la station d'épuration fonctionne normalement (pas de sous-aération chronique)

1.2.2.2 Cas des boues activées

1.2.2.2.1 Impact des concentrations en ammonium

D'après la théorie des stratégies $-r$ et $-K$, le premier facteur déterminant l'espèce dominante d'un milieu est la concentration des substrats. Les substrats de la nitrosation sont l'ammonium, l'oxygène, et les carbonates. Dans les stations d'épuration municipales, les carbonates ne sont généralement pas limitants pour la croissance autotrophe (Wett et Rauch 2003), et l'aération est normalement dimensionnée de façon à pouvoir assurer un niveau d'oxygénation non limitant (>2 mg_{O2}/L). Ainsi, le substrat limitant est l'ammonium, dont la concentration sera le principal facteur de sélection des espèces.

Afin d'illustrer l'effet de ce paramètre, la Figure 12 présente l'évolution du taux de croissance en fonction de la concentration en ammonium pour les groupes *N. europaea*, *N. oligotropha*, et *Nitrosospira*, d'après certains paramètres cinétiques de la littérature présentés dans le Tableau 2 page 48. Il s'agit de la représentation graphique de l'équation de Monod (équation 35).

$$\mu_{BA} = \mu_{BAmax} \frac{[NH_4]}{[NH_4] + K_{NHB}} \quad \text{équation 35}$$

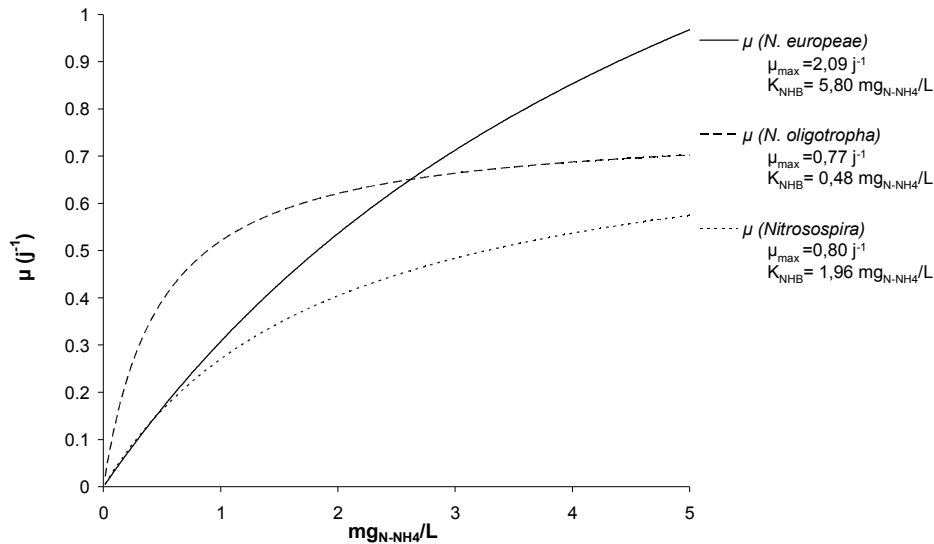


Figure 12 : estimation du taux de croissance de différentes espèces selon les valeurs de paramètres publiés

A partir des paramètres cinétiques utilisés, il apparaît que :

- les bactéries du genre *Nitrosospira* ne peuvent pas dominer si la concentration en ammonium est le seul critère de sélection. En effet, leur taux de croissance est inférieur à celui des autres espèces aux concentrations supérieures à 0,4 mg_{N-NH₄}/L, il est identique à *N. oligotropha* en dessous de ce seuil.
- le groupe *N. oligotropha* est dominant dans les milieux présentant une concentration en ammonium faible (inférieure à environ 2,50 mg_{N-NH₄}/L)
- le groupe *N. europaea/Nc. mobilis* est dominant dans les milieux plus riches.

L'extrapolation des conclusions au milieu réel est délicate à cause des incertitudes sur les paramètres utilisés et à cause également de l'existence de nombreux autres facteurs de sélection. Néanmoins, cette analyse permet d'expliquer l'éventuelle dominance d'une espèce sur les autres.

D'après les observations de la littérature, le genre *Nitrosospira* est typiquement dominant des communautés nitrifiantes des sols (Avrahami et Conrad 2005), ou de certains milieux aquatiques naturels tels que les lacs (Hastings *et al.* 1998). Dans un système épuratoire à filtre planté, il a aussi été trouvé co-dominant avec une espèce de la lignée *N. europaea/Nc Mobilis* (Tietz *et al.* 2007).

Dans les stations d'épurations, des bactéries appartenant à ce genre sont parfois détectées pour des systèmes à faible charge azotée (Ebie *et al.* 2002 ; Siripong et Rittmann 2007), mais généralement en faibles proportions, excepté pour une étude sur un lit bactérien fluidisé, où le genre *Nitrosospira* dominait la population nitrosante (Schramm *et al.* 1998).

La plus grande affinité pour l'ammonium des bactéries du groupe *N. oligotropha* explique leur dominance des milieux oligotrophes (Cébron *et al.* 2004) et des milieux peu riches en substrat azoté tels que les stations d'épuration à faible charge (Ballinger *et al.* 1998 ; Gieseke *et al.* 2001 ; Dionisi *et al.* 2002 ; Harms *et al.* 2003 ; Limpiyakorn *et al.* 2005 ; Limpiyakorn *et al.* 2006), alors que *N. europaea* est plus fréquemment trouvé dans les milieux eutrophes.

Par ailleurs, une analyse réalisée par t-RFLP (terminal restriction fragment length polymorphism) sur 7 stations d'épuration urbaines à faible charge a révélé d'une part la présence de bactéries du genre *Nitrospira* en période hivernale, et d'autre part une présence faible de *N. oligotropha* alors que *N. europaea*/*Nc. mobilis* était clairement détecté (Siripong et Rittmann 2007). Il est possible que la méthode d'analyse soit à l'origine de ces observations en contradiction avec les autres études réalisées, ou que des paramètres non identifiés aient influencés ce résultat.

1.2.2.2 Variations saisonnières

Les variations de température au fil de l'année ne semblent pas modifier les communautés nitrifiantes de façon prononcée (Limpiyakorn *et al.* 2006). Cependant, certaines espèces minoritaires peuvent apparaître de façon plus prononcée en été qu'en hiver et inversement.

En outre, une étude réalisée sur les populations nitrosantes des sols a mis en évidence des variations saisonnières de communautés ; mais ces communautés sont principalement constituées par des espèces du genre *Nitrospira* (Avrahami *et al.* 2003.).

1.2.2.3 Discussion

Les espèces et groupes de bactéries nitrosantes se différencient également pour d'autres caractéristiques que l'affinité pour l'ammonium et pour l'oxygène, comme la possession de l'activité uréase ou la sensibilité aux sels (Koops et Pommerening-Röser 2001). Ces différences pourront éventuellement influencer la composition des communautés nitrosantes des boues activées, mais la pression de sélection des facteurs associés (salinité, présence d'urée) ne semble pas modifier la structure dominante des communautés nitrosantes des boues activées.

Au regard de l'ensemble des travaux publiés sur les communautés des bactéries nitrosantes des stations d'épuration, il apparaît que les populations sont sélectionnées par les conditions du milieu, qui découlent de la conjonction de plusieurs paramètres : le type de procédé, le

type d'effluent (débit, concentration en substrat, en sels, etc.), la température, le niveau et la durée d'aération, etc.

Ainsi, pour les stations d'épuration à boues activées, la population dominante semble déterminée par la concentration en ammonium du système, alors que les autres conditions environnementales favorisent la présence de certaines espèces spécifiques et modifient légèrement la structure de la communauté.

Les bactéries du groupe *N. oligotropha*, de stratégie $-K$, semblent dominer les systèmes à faibles concentrations, alors que le groupe *N. europaea/Nc mobilis*, de stratégie $-r$, domine généralement les systèmes à fortes charges.

1.2.3 Bactéries nitrifiantes

Les bactéries nitrifiantes sont des organismes chimioautotrophes aérobies, qui tirent leur énergie de l'oxydation des nitrites en nitrates par une chaîne respiratoire avec l'oxygène comme accepteur final d'électron (Poughon *et al.* 2001).

1.2.3.1 Phylogénie

Les bactéries nitrifiantes (préfixe "*Nitro-*") appartiennent à quatre genres bactériens distincts : *Nitrobacter* (α -proteobacteria), *Nitrospina* (δ -proteobacteria), *Nitrococcus* (γ -proteobacteria) et *Nitrospira* (domaine Bacteria).

La Figure 13 présente les relations phylogénétiques des bactéries nitrifiantes, ainsi que leurs besoins en sels (paramètres éco physiologiques) et leurs habitats naturels.

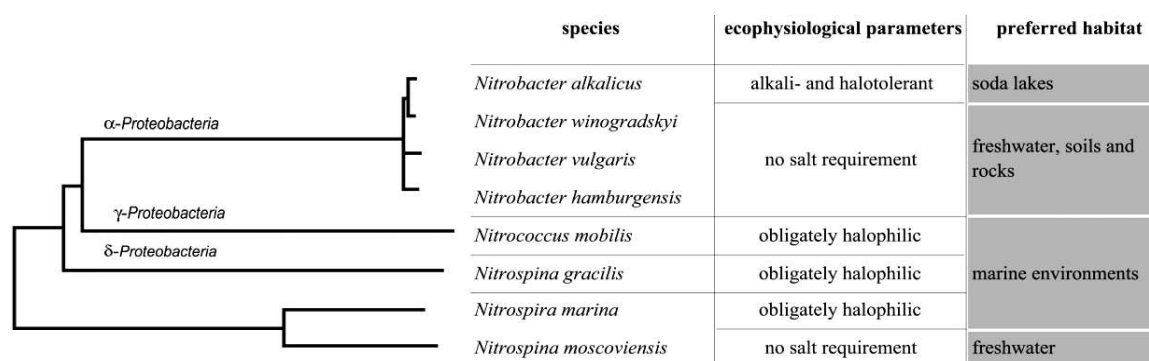


Figure 13: arbre phylogénétique des principales lignées de bactéries nitrifiantes, incluant l'habitat préféré et les paramètres éco physiologiques d'après (Koops et Pommerening-Röser 2001)

Le groupe *Nitrospira* est phylogénétiquement éloigné des trois autres groupes, et il présente des paramètres écophysologiques variables selon les espèces. L'espèce *Nitrobacter winogradskyi* est la plus étudiée en tant que bactérie nitrifiante de référence.

1.2.3.2 Paramètres cinétiques publiés

Il est généralement reconnu que *Nitrobacter* adopte une stratégie de type $-r$ alors que *Nitrospira* suit une stratégie de type $-K$ (Schramm *et al.* 2000 ; Li *et al.* 2006 ; Blackburne *et al.* 2007a).

Quelques valeurs de taux de croissance et de constantes d'affinité issues de la littérature sont présentées dans le Tableau 3.

Tableau 3: paramètres cinétiques des principales bactéries nitrifiantes

Genre, espèce	Milieu	μ_{BNmax} j^{-1}	K_{ONB} (O ₂) mg/L	K_{NOB} mg _{N-NO₂} /L	Référence
<i>Nitrobacter</i>	Divers	0,43 – 1,39	0,87 – 3,58	0,84 – 8,4	Prosser 1989
	culture	2,60 ± 2,05			Ahn <i>et al.</i> 2008
	Sédiments d'estuaires	1,54 (25 °C)		3,74	Helder et De Vries 1983
	Culture enrichie	0,67 (25°C, pH 7,8)	0,43±0,08	1,2±0,05* 1,3±0,08	Blackburne <i>et al.</i> 2007a et 2007b
<i>Nitrospira</i>	Culture enrichie commerciale		0,54±0,14	1,1±0,05 0,9±0,07	Blackburne <i>et al.</i> 2007a
	Boues activées classique et MBR		0,13 ± 0,06	0,11 – 0,50	Manser <i>et al.</i> 2005a
	Enrichissement de boues activées en biofilm	0,50 (25 °C)			Kindaichi <i>et al.</i> 2006
	Isolat d'acier corrodé <i>Nitrospira moscoviensis</i>	2,88 (39 °C)			Ehrich <i>et al.</i> 1995
	Réacteur à biofilm		$\ll K_m$ de <i>Nitrobacter</i>	0,14	Schramm <i>et al.</i> 2000

*Résistance au transfert de masses négligeable de par la petite taille des floes. K_{NO} sous-estimé.

Les deux taux de croissance maximaux reportés pour *Nitrospira* sont très éloignés, car l'un est inférieur et l'autre supérieur à la gamme des valeurs reportées pour *Nitrobacter*. Cependant, la valeur la plus élevée (Ehrich *et al.* 1995) a été mesurée pour un isolat d'acier corrodé dans des conditions optimales de température (39°C), et n'est donc pas représentative du taux de croissance maximal des espèces de *Nitrospira* des boues activées aux températures classiques (10 – 25°C).

D'autre part, les constantes d'affinité reportées pour *Nitrospira* sont toutes inférieures à celles de *Nitrobacter*. Ces différences confirment que les bactéries nitrifiantes du genre *Nitrobacter* sont de stratégie $-r$ alors que celles du genre *Nitrospira* sont de stratégie $-K$.

De plus, l'activité nitrifiante des boues activées est généralement supérieure à l'activité nitrifiante (Li *et al.* 2007), et permet une réduction immédiate des nitrites formés par nitrification dans les boues activées. Les concentrations en nitrites dans les boues activées sont donc généralement négligeables, ce qui donne un avantage compétitif au genre *Nitrospira* de stratégie $-K$.

1.2.3.3 Cas des boues activées

Les méthodes culturales d'analyse favorisent l'isolement des bactéries de stratégie $-r$. Il a ainsi longtemps été considéré que *Nitrobacter* était le genre dominant des bactéries nitrifiantes des boues activées. Néanmoins, la grande majorité des études récentes révèle que le genre prédominant dans les boues activées des systèmes de traitement d'eau usée est *Nitrospira*, quel que soit le type de procédé ou la charge d'ammonium traitée (Burrell *et al.* 1998 ; Juretschko *et al.* 1998 ; Schramm *et al.* 1998 ; Gieseke *et al.* 2001 ; You *et al.* 2003).

1.2.4 Conclusions

Les populations nitrifiantes et nitrifiantes constituent une grande diversité d'espèces, phylogénétiquement homogènes. Les différences de paramètres cinétiques et écophysologiques entre les différents groupes impliquent une sélection naturelle entre ces groupes par les conditions du milieu, qui peut généralement être décrite par le modèle écologique de stratégies $-r$ ou $-K$.

L'avènement des méthodes moléculaires a permis d'identifier les groupes dominants de différents milieux naturels, contredisant souvent les résultats des études précédentes réalisées à partir de méthodes culturales.

Dans les stations d'épuration à boues activées, le groupe dominant des bactéries nitrifiantes dépend des conditions de fonctionnement du système, et en particulier de la concentration en ammonium du milieu : le groupe *Nitrosomonas europaea* (stratégie $-r$) semble dominer dans les milieux riches en substrats, et *Nitrosomonas oligotropha* (stratégie $-K$) dominerait plutôt dans les milieux faiblement chargés. Cette tendance n'est toutefois pas vérifiée par toutes les études, et nécessite d'être approfondie.

En revanche, pour les bactéries nitrifiantes, un large consensus est établi pour désigner le genre *Nitrospira* (de stratégie $-K$) comme groupe dominant de la plupart des stations d'épuration.

1.3 Bio-augmentation

Le terme de bio-augmentation désigne l'ajout de substances biologiques dans un écosystème afin d'y induire certaines propriétés. Cette définition, très générale, inclut des procédures et des domaines d'application variés.

Une présentation générale du principe de bio-augmentation sera d'abord réalisée, avant de détailler les applications à l'activité nitrifiante des stations d'épuration. On distinguera les procédés de bio-augmentation continue, qui permettent d'améliorer le rendement moyen des procédés épuratoires, et les applications ponctuelles de bio-augmentation, destinées à faire face à une situation transitoire.

1.3.1 Principe

La bio-augmentation consiste à accroître la diversité biologique ou l'activité métabolique d'une culture bactérienne par ajout de microorganismes exogènes. La définition générale inclut l'ajout de microorganismes sélectionnés dans des milieux différents du milieu de destination, voire même l'ajout d'organismes génétiquement modifiés (Stephenson et Stephenson 1992) ou de substances biologiques telles que les enzymes.

Les situations désignées par le terme de bio-augmentation diffèrent fortement en fonction des objectifs recherchés, de la nature du matériel biologique introduit, et des mécanismes impliqués. Une analyse large des cas de bio-augmentation a été réalisée (Bouchez 2000a), et est synthétisée schématiquement sur la Figure 14.

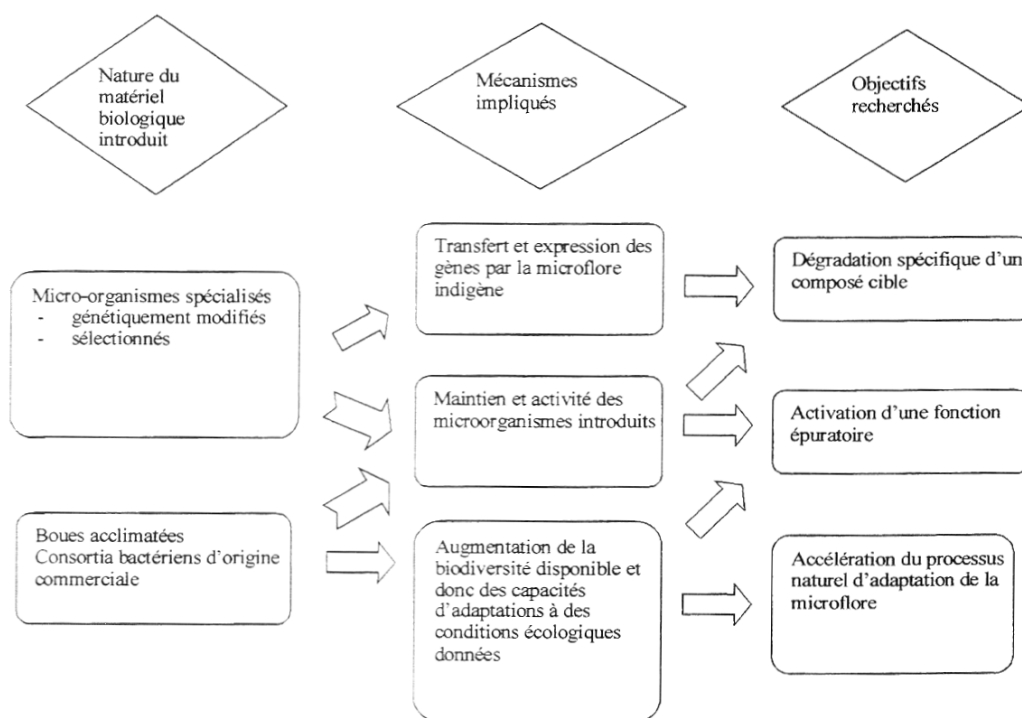


Figure 14: diversité des situations couvertes par le terme « Bio-augmentation » d'après Bouchez (2000a)

Les études réalisées ont montré que la condition essentielle au succès de la bio-augmentation est l'adaptation et le maintien de la biomasse introduite. En effet, un ajout de matériel biologique peu adapté peut avoir des effets non escomptés, parfois même opposés à l'objectif visé. Par exemple, l'ajout de bactéries dénitrifiantes aérobies en vue d'améliorer l'efficacité des procédés d'épuration de l'azote a entraîné une diminution de l'activité nitrifiante due à l'augmentation de la pression prédatrice (Bouchez *et al.* 2000b).

La bio-augmentation de l'activité nitrifiante étudiée au cours de ce travail a pour objectif de renforcer la capacité nitrifiante d'un système épuratoire. Depuis plus de dix ans, des essais de bio-augmentation de l'activité nitrifiante des boues activées ont été menés par différentes équipes, avec des niveaux de réussite variables selon les objectifs visés et les stratégies mises en œuvre (Parker et Wanner 2007).

Deux approches différentes ont été recensées : (1) la bio-augmentation continue qui vise, en conditions d'exploitation normales, à optimiser le fonctionnement d'un système, et (2) la bio-augmentation ponctuelle, qui vise à parer à une situation de crise.

1.3.2 Bio-augmentation continue

L'ajout régulier de biomasse nitrifiante dans le système permet le maintien d'une activité nitrifiante quelles que soient les conditions de fonctionnement du système. Ainsi, la nitrification pourra théoriquement avoir lieu, partiellement ou totalement, même lorsque les paramètres ne permettent pas le maintien naturel d'une flore nitrifiante (faible température et/ou faible âge des boues, présence de toxiques).

1.3.2.1 Impact sur l'âge des boues spécifique

L'ajout d'un type de biomasse augmente la concentration de cette biomasse particulière, et lui donne un avantage compétitif sur les autres. Cet effet peut se traduire par une augmentation de l'âge des boues spécifique à cette biomasse (Rittmann 1996).

Lorsqu'il-y-a bio-augmentation, on considère que l'influent présente une concentration X_A^e non nulle de biomasse autotrophe. On corrige donc l'expression de l'âge des boues de la biomasse autotrophe active, en retranchant à la quantité de biomasse extraite celle ayant été ajoutée. La nouvelle expression de l'âge des boues (équation 36), est appelée âge des boues autotrophes spécifique ($SRT_{X_A,spé}$) et s'écrit :

$$SRT_{X_A,spé} = \frac{V \cdot X_A}{(\sigma \cdot X_A^w - Q \cdot X_A^e)} \quad \text{équation 36}$$

où V est le volume de réacteur, Q est le débit traversier, X_A , X_A^w et X_A^e sont les concentrations en biomasse autotrophe dans le réacteur, les boues d'extraction et l'effluent d'entrée respectivement, et σ est le taux d'extraction des boues (cf. Figure 7, page 40).

L'âge de boues spécifique ($SRT_{X_A,spé}$) est donc supérieur à l'âge de boues apparent, et son augmentation sera d'autant plus importante que la contribution de la bio-augmentation sera forte.

L'âge des boues réel étant ainsi augmenté, il est théoriquement possible de maintenir la nitrification dans un système fonctionnant à un âge de boues apparent plus faible que le minimum nécessaire (cf. § 1.1.3.2.2). Lors de la conception d'une station, la mise en place d'un procédé de bio-augmentation continue autorise donc à réduire le volume du bassin biologique car l'âge de boues minimum apparent peut être diminué grâce à l'apport de biomasse nitrifiante.

Toutefois, ce calcul suppose que les bactéries ajoutées présentent les mêmes propriétés cinétiques que les bactéries autochtones du système. Or, selon leur origine, et notamment leurs conditions de culture (charge, température, etc.), les biomasses nitrifiantes peuvent être très différentes (cf. § 1.2.2). La notion d'âge de boues apparent doit donc être considérée avec précaution. Elle permet cependant de démontrer théoriquement le bénéfice escompté de la bio-augmentation.

1.3.2.2 Acclimatation de la biomasse

Il a été mis en évidence qu'une biomasse nitrifiante cultivée à 20°C est moins active dans un milieu à 10°C que la même biomasse cultivée à 10°C (Head et Oleszkiewicz 2005).

La bio-augmentation est donc plus efficace si la biomasse ajoutée est préalablement acclimatée aux conditions du milieu récepteur.

1.3.2.3 Recensement des expériences existantes

Les procédés de bio-augmentation continue peuvent être classés en deux catégories :

- Les procédés de bio-augmentation externe, pour lesquels la source de biomasse ajoutée est indépendante du système augmenté (réacteur de culture indépendant)
- Les procédés de bio-augmentation *in-situ*, pour lesquels la biomasse enrichie provient du système augmenté (enrichissement des boues de recirculation par exemple)

D'une façon générale, la proximité des conditions de culture avec les conditions du milieu récepteur (charge, type de procédé, composition de l'effluent), favoriseront l'adaptation de la

biomasse. Cependant, afin de produire de la biomasse nitrifiante plus efficacement que dans le milieu récepteur, les conditions de culture doivent être optimisées. Un équilibre doit donc être trouvé entre l'efficacité de la culture et l'adaptabilité de la biomasse produite.

La production de biomasse nitrifiante nécessite un apport en azote ammoniacal, qui peut provenir de l'effluent traité directement, mais il est alors peu chargé. Lorsque les stations d'épuration sont équipées de digesteurs anaérobies pour le traitement des boues, les eaux de retour de la déshydratation des boues digérées (aussi appelé « centrat ») constituent un effluent particulièrement chargé en ammonium, qui peut alors être utilisé pour l'enrichissement.

Deux critères favorisant le succès de la bio-augmentation sont distingués :

- **la forme floculée des bactéries ajoutées**, car la structure des floccs protège les microorganismes de la prédation (Bouchez *et al.* 2000b), et favorise la décantation, donc le maintien de la biomasse dans le système.
- **L'acclimatation de la biomasse à la température du milieu récepteur.**

Sept types de procédés différents permettant une bio-augmentation continue en bactéries nitrifiantes sont recensés en annexe 1 d'après les travaux de Parker et Wanner (2007).

Il n'existe toutefois pas de protocole scientifique clairement déterminé pour évaluer les performances de ces procédés. Les suivis réalisés pour ces différents procédés se basent sur des méthodes différentes et leur comparaison ne peut être que qualitative (Parker et Wanner 2007).

Parmi les sept types de procédés recensés (annexe 1), quatre utilisent du centrat comme source d'ammonium pour enrichir la biomasse nitrifiante. Cette utilisation permet de valoriser avantageusement ce rejet très chargé en azote dont le traitement est souvent problématique (Janus et vanderRoest ; 1997Carrio *et al.* 2003). En revanche, l'application de ces procédés nécessite la présence de digesteur de boues sur les stations d'épuration. Or, la grande majorité de stations d'épuration françaises ne sont pas équipées de digesteur, contrairement à d'autres pays comme par exemple les Pays-Bas où la digestion est une pratique générale, y compris en cas d'aération prolongée (Couturier 2006).

Les trois types de procédés qui n'utilisent pas de centrat ne peuvent s'appliquer qu'à des stations d'épuration comportant une structure d'ouvrage spécifique telle que des filières

parallèles, un lit filtrant à biomasse fixée, ou un bassin de nitrification secondaire (Daigger *et al.* 1993 ; Neethling *et al.* 1998 ; Jobbágy *et al.* 2004).

Ainsi, les procédés de bio-augmentation continue nécessitant la présence d'un digesteur sur la station d'épuration ne sont applicables que sur un nombre réduit de stations d'épuration françaises.

1.3.3 Bio-augmentation occasionnelle

La bio-augmentation peut être envisagée comme un moyen de faire face à des situations problématiques transitoires, comme la perte accidentelle de biomasse nitrifiante (toxique dans les eaux résiduaires, traitement du foisonnement par chloration, très faible température), ou l'augmentation brutale de la charge à traiter (stations touristiques, unité mobile de déshydratation des boues, etc.). Il s'agit dans ces cas de figure d'interventions ponctuelles visant à limiter les problèmes liés à un évènement perturbateur.

Deux types de biomasse nitrifiante peuvent alors être ajoutés :

- Les biomasses contenues dans des **solutions commerciales**, proposées par des entreprises spécialisées dans les produits de bio-augmentation. Ces solutions renferment des cultures concentrées de souches sélectionnées pour leur activité nitrifiante.
- Des **boues activées**, éventuellement enrichies préalablement dans un milieu sélectif.

Il est par ailleurs possible d'augmenter la capacité nitrifiante d'un système en dopant directement l'influent de la station d'épuration avec de l'urée ou de l'ammonium durant une certaine période. En augmentant ainsi la charge azotée en entrée (B_V), on augmente la capacité nitrifiante du système. Cependant, l'application d'une plus forte charge azotée nécessite un ajustement du fonctionnement de l'installation et probablement un ajout de carbone organique de source extérieure afin de permettre une dénitrification suffisante.

Cette stratégie a été appliquée sur certains sites, mais aucune documentation précise ne permet de s'y référer. La modélisation d'un système devrait permettre d'évaluer la faisabilité de ce type de stratégies en fonction des données du système et de l'augmentation d'activité souhaitée.

1.3.3.1 Objectifs

(Re)démarrage de la nitrification, lors de pertes accidentelles de l'activité nitrifiante, ou pour des installations ne nitrifiant pas toute l'année (redémarrage annuel de la nitrification). Dans ces cas, l'objectif sera d'installer une flore nitrifiante active et stable le plus rapidement possible, afin de réduire la période pendant laquelle les niveaux de rejets ne sont pas respectés (période pouvant durer plusieurs mois en l'absence d'ajouts). Il s'agit d'une **stratégie curative**, visant à palier à un dysfonctionnement du système de traitement.

Augmentation de la capacité nitrifiante, en prévision d'une surcharge, (par exemple dans les villes touristiques, où l'arrivée des touristes s'accompagne d'une hausse conséquente de la charge à traiter), la bio-augmentation pourrait être employée pour augmenter la capacité nitrifiante de l'installation avant l'arrivée de la surcharge. Il s'agit d'une **stratégie préventive**, permettant d'anticiper un accroissement de charge à venir.

1.3.3.2 Recensement des expériences existantes

1.3.3.2.1 Solutions commerciales

L'introduction d'une solution commerciale contenant des bactéries nitrifiantes dans un système aux conditions inadaptées à la nitrification (faible température et/ou âge de boues) permet l'installation de la nitrification de façon transitoire. L'activité nitrifiante ne se maintient donc pas après arrêt des ajouts (Abeysinghe *et al.* 2002). De plus, les bactéries ajoutées présentent une plus grande sensibilité à la température ($\theta_{SA}=1,17$) que les bactéries autochtones ($\theta_{BA}=1,10$).

Par contre, dans un pilote de type SBR (Sequencing Batch Reactor) présentant des conditions de température et de fonctionnement favorables au maintien de la biomasse nitrifiante, un ajout de solution commerciale réparti sur une semaine a permis d'augmenter la capacité nitrifiante d'un facteur 2,0 à 4,5 d'après Fouratt *et al.* (2003). Mais les pilotes n'ont été suivis qu'une semaine après augmentation, donc pas assez longtemps pour vérifier le maintien de l'activité et de la flore ajoutée à long terme.

La documentation fournie par un fabricant de solution nitrifiante fait état de deux redémarrages de la nitrification dans des stations d'épuration municipales. La première, traitant 4500 m³/j, (soit environ 20 000 EH) a récupéré la capacité nitrifiante perdue en 6 jours de traitement grâce à 27 kg de solution. L'autre, traitant 11300 m³/j, (soit environ

55 000 EH) redémarre la nitrification chaque année au mois de Mai, en 5 jours, à l'aide de seulement 16 kg de solution, dont une partie est préalablement acclimatée en présence de boues activées durant une semaine dans un réacteur annexe au système.

Les études de bio-augmentation utilisant des bactéries d'origine commerciale sont généralement réalisées par des personnes liées à l'entreprise produisant la solution, et les exemples reportés sont donc uniquement des exemples de réussite (Parker et Wanner 2007). Il est donc difficile de proposer un point de vue objectif sur l'efficacité de ces solutions.

Toutefois, il est probable que les bactéries contenues dans ces solutions soient différentes des bactéries autochtones des boues activées, vu les contraintes de leur production. En effet, la production des solutions commerciales nitrifiantes vise un rendement élevé (production rapide de biomasse) et une activité nitrifiante importante. Les espèces sélectionnées sont donc probablement de stratégie $-r$, et la production est très certainement réalisée à très forte charge en ammonium.

1.3.3.2 *Boues enrichies*

L'utilisation de boues enrichies permet d'introduire une population nitrifiante intégrée dans des floccs, ce qui favorise le maintien des ajouts dans le système. Cependant, l'étape d'enrichissement des boues est problématique pour diverses raisons : elle nécessite une source d'ammonium et d'alcalinité (HCO_3^-), un réacteur de culture doit être conduit et contrôlé (régulation délicate du pH), et la durée de mise en culture risque d'être longue vu le faible taux de croissance des bactéries nitrifiantes.

La culture de boues activées avec un substrat azoté, et sans source de carbone dissous conduit à un enrichissement des boues en bactéries nitrifiantes mais aussi à une perte importante de la biomasse totale (Kim *et al.* 2005). On obtient alors une augmentation de la vitesse de nitrification spécifique (en $\text{mg}_{\text{Nnit}} \cdot \text{g}_{\text{MVS}}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$) mais une diminution de l'activité nitrifiante totale (en $\text{mg}_{\text{Nnit}} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$). L'utilisation de membranes, qui permet de conserver l'intégralité de la biomasse, peut être envisagée pour réaliser un enrichissement plus efficace.

Cependant, le facteur limitant de cette stratégie est la durée de culture nécessaire. Cette stratégie n'est donc pas adaptée pour un (re)démarrage non planifié (perte accidentelle de l'activité nitrifiante). Par contre, elle peut être envisagée dans les cas où l'on peut anticiper une augmentation de charge en azote de l'installation.

1.3.4 Conclusions

La bio-augmentation de l'activité nitrifiante, comme procédé d'enrichissement continu d'un système épuratoire a été écartée du champ d'investigation de ce travail, car l'application de tels procédés en France ne peut être envisagée que pour une minorité de stations de traitement municipales.

La bio-augmentation ponctuelle est envisagée pour faire face à des événements transitoires. L'étude de cette application sur site réel pose un problème d'anticipation, notamment pour le traitement de problèmes accidentels.

1.4 Modélisation des processus de nitrification

1.4.1 Modèles dynamiques de type ASM

Les modèles ASM (Activated Sludge Model) sont des modèles déterministes dont les équations, issues d'un consensus scientifique, permettent de représenter les principaux processus biologiques et chimiques qui se déroulent au sein des systèmes de traitement. Il en existe plusieurs versions : ASM1, ASM2, ASM2d, ASM3 et des modèles dérivés.

Le premier modèle publié (ASM1, par Henze *et al.* (1987)) est le plus fréquemment utilisé, car des paramètres par défaut adaptés ont été proposés. En outre, les utilisateurs peuvent se référer à un plus grand nombre d'applications publiées que pour les autres modèles.

1.4.1.1 Description générale

Les variables du modèle ASM1 sont les concentrations en composants organiques (en $\text{mg}_{\text{DCO}}/\text{L}$) ou azotés (en $\text{mg}_{\text{N}}/\text{L}$), classés en trois catégories : solubles (notés S), particulaires (notés X), et vivants. Les composants « vivants » incluent la biomasse hétérotrophe (X_{BH}) et la biomasse autotrophe (X_{A}) responsable de la nitrification.

Les réactions biologiques sont exprimées par des équations qui conduisent à chaque pas de temps, au calcul des nouvelles valeurs de chaque variable. Ces équations font appel aux paramètres de cinétique bactérienne ou aux caractéristiques techniques du système (notamment l'aération). Le modèle est généralement présenté par une matrice de Petersen. La matrice du modèle ASM1 est reportée en Annexe 2.

Les autres modèles ASM s'inspirent du modèle ASM1 et proposent des améliorations qui permettent de représenter de nouvelles réactions ou de mieux représenter la réalité. Par exemple, les modèles ASM2 et ASM2d (Henze *et al.* 1999) permettent de modéliser les réactions de déphosphatation biologique et physicochimique, et le modèle ASM3 (Gujer *et al.*

1999) prend en compte (entre autre) les phénomènes de stockage de la matière organique et il intègre le concept de respiration endogène au lieu de la mort régénération considérée par les autres modèles ASM.

Les modèles ASM classiques représentent la nitrification par une réaction unique, réalisée par une biomasse unique : la biomasse autotrophe (X_A), qui transforme l'ammonium (S_{NH}) en nitrates (S_{NO}). Cette approximation ne présente pas d'inconvénients pour la modélisation de procédés pour lesquels on n'observe pas d'accumulation des nitrites, comme dans les stations d'épuration en aération prolongée fonctionnant normalement.

1.4.1.2 Description de la nitrification en deux étapes

Pour certains procédés, la nitrification est susceptible de devenir limitante, par exemple lorsque la biomasse est soumise à de fortes concentrations qui peuvent être inhibitrices (Boursier 2003 ; Jubany 2007). Ces procédés doivent alors être modélisés à l'aide d'un modèle représentant la nitrification en deux étapes (Béline *et al.* 2007), qui doit parfois inclure les effets d'inhibition par l'ammonium ou les nitrites (Jubany 2007).

Les modèles représentant les deux étapes de la nitrification sont inspirés des modèles ASM existants (Petersen *et al.* 2001 ; Boursier 2003).

Trois biomasses distinctes sont considérées dans ces modèles : la biomasse hétérotrophe (X_{BH}), la biomasse nitrosante (X_{BA}) et la biomasse nitratante (X_{BN}). Le fractionnement de l'azote correspond au fractionnement classique des modèles ASM, excepté les nitrites qui sont distingués des nitrates. La Figure 15 présente le fractionnement de l'azote pour le modèle « Two step Mantis ».

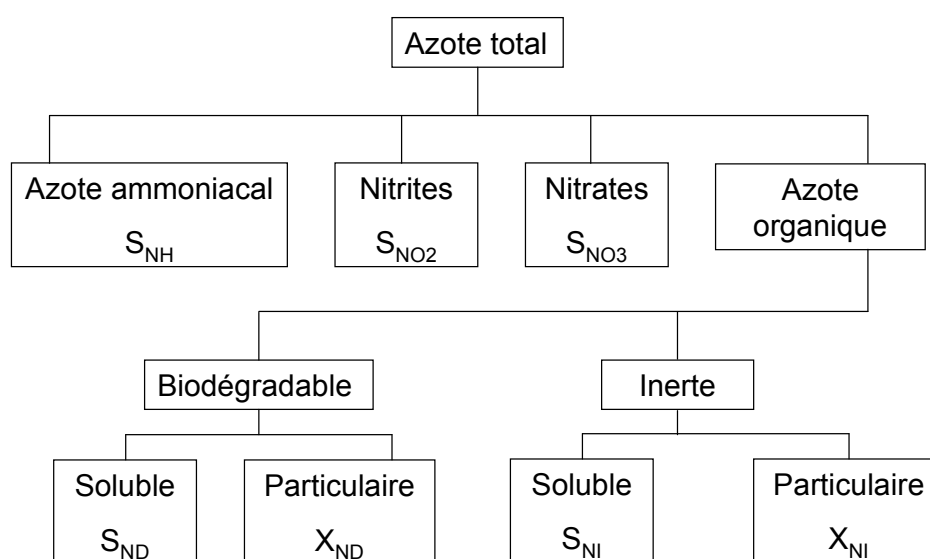


Figure 15 : variables décrivant le fractionnement de l'azote dans le modèle "two step Mantis" d'après (Boursier 2003)

Les notations peuvent varier selon les auteurs, ainsi que certains détails (omission des fractions inertes, inclusion de l'alcalinité, etc.) mais la structure des modèles représentant les deux étapes reste globalement identique en ce qui concerne les réactions de nitrosation et de nitratisation.

Dans les systèmes où la nitrosation est l'étape limitante, le taux de croissance maximal de la biomasse nitrifiante du modèle en une étape et correspond à celui de la biomasse nitrosante dans le modèle à deux étapes (voir la démonstration en annexe 3).

1.4.2 Détermination des paramètres des biomasses nitrifiantes

Les cinétiques des réactions sont généralement représentées par des équations de type Monod, incluant des constantes d'inhibition dans certains cas particuliers (Jubany 2007).

Un jeu de paramètres représentant les caractéristiques cinétiques des différentes biomasses (hétérotrophe, nitrosante et nitratante ou autotrophe) doit être déterminé pour permettre l'utilisation de ces modèles. Le jeu de paramètres initial du modèle ASM1 a été modifié et des jeux sont proposés pour différentes conditions. Par exemple, le Cemagref propose un jeu de paramètres adapté aux stations d'épuration municipales à très faible charge en aération prolongée (Choubert *et al.* 2005 ; Marquot 2006, Spérandio *et al.* 2007).

Pour les modèles incluant les deux étapes de la nitrification, les biomasses nitrosantes et nitratantes présentent chacune leurs propres paramètres cinétiques et stœchiométriques, qui permettent d'exprimer l'influence des différents paramètres (température, concentrations en substrats) sur chacune des deux étapes de la nitrification.

Les paramètres cinétiques de biomasses nitrifiantes uniques (Stricker 2000 ; Choubert 2002 ; Marquot 2006) ou de biomasses nitrosantes et nitratantes respectivement (Boursier 2003), ont été obtenus par le calage des modèles ASM1 et « two step Mantis » respectivement sur les données tirées d'un suivi à long terme d'une station d'épuration ou d'un pilote.

Une quantité de données importante sur une durée assez longue est nécessaire pour permettre le calage d'un modèle complet et la validation de l'ensemble des paramètres du modèle. Cela nécessite donc une importante campagne d'étude d'un site en particulier. De plus, les valeurs théoriques de certains paramètres doivent être admises comme par exemple les rendements de croissance (Y_{BA} et Y_{BN}).

Des protocoles d'essais en laboratoire hors ligne ont par ailleurs été proposés afin de déterminer les paramètres cinétiques d'échantillons de boues.

1.4.2.1 Tests en réacteurs

Trois protocoles sont proposés par la WERF pour déterminer expérimentalement les taux de croissance de la biomasse autotrophe d'un échantillon de boues activées (Melcer *et al.* 2003). Les taux de croissance y sont estimés par suivi de l'évolution de l'activité nitrifiante au cours d'expériences conduites en réacteur. Par ailleurs, la mesure du taux de mortalité est proposée par la conduite d'un réacteur « de dégénérescence » maintenu sans substrat durant 7 à 35 jours (Melcer *et al.* 2003 ; Salem *et al.* 2006).

Ces méthodes requièrent le maintien de la biomasse dans des conditions inhabituelles pendant plusieurs jours (réacteurs continus contrôlés, fortes charges, jeûne), ce qui implique nécessairement une modification des communautés présentes dans l'échantillon d'origine. Les paramètres ainsi déterminés ne correspondent donc pas à la biomasse nitrifiante de l'échantillon d'origine.

1.4.2.2 Mesures respirométriques

Plusieurs auteurs proposent de déterminer certains paramètres stœchiométriques et cinétiques des biomasses nitrosantes et nitratantes à l'aide de méthodes respirométriques (Dochain *et al.* 1995 ; Chandran et Smets 2001 ; Marsili Libelli *et al.* 2001 ; Petersen *et al.* 2001). Ces méthodes consistent à mesurer la respiration bactérienne après ajout de substrat (ammonium et/ou nitrites) aux boues que l'on cherche à caractériser. Des inhibiteurs sélectifs de l'une ou l'autre des deux étapes de la nitrification peuvent également être employés lors de ces mesures (Jubany, 2007).

Le signal obtenu, appelé respirogramme, est analysé afin de déterminer les paramètres recherchés, parfois à l'aide de modèles simplifiés, qui ne considèrent pas de croissance ou de mortalité des bactéries (Gernaey *et al.* 2001 ; Checchi et Marsili-Libelli 2005). Cette hypothèse est justifiée par la faible durée des expériences réalisées et la faible quantité de substrat ajouté.

Ce type de mesures présente l'avantage de pouvoir être automatisées, contrairement à la plupart des protocoles pour lesquels des analyses chimiques sont nécessaires à la détermination de paramètres cinétiques. De plus, l'automatisation de la mesure permet de s'affranchir des erreurs de manipulation liées à l'échantillonnage et l'analyse manuels. Toutefois, les vitesses mesurées concernent la consommation d'oxygène, qu'il faut convertir en vitesses de réaction à l'aide de facteurs de conversion dépendants des rendements de

croissance Y_{BA} et Y_{BN} , dont la détermination induire des erreurs importantes sur les paramètres estimés (Chandran et Smets 2001).

A partir des données respirométriques, les rendements de croissance Y_{BA} et Y_{BN} sont déterminés grâce au ratio entre l'oxygène et le substrat consommés au cours de la mesure (Marsili Libelli *et al.* 2001 ; Jubany *et al.* 2005). Par ailleurs, la mesure respirométrique permet théoriquement de déterminer les constantes d'affinité (K_{NHB} et K_{NOB} pour l'ammonium et les nitrites respectivement), ainsi que les vitesses maximales de nitrosation et de nitratisation, avec une fiabilité qui augmente avec la quantité de données relatives à chaque étape (Checchi et Marsili-Libelli 2005).

Enfin, les vitesses de chacune des deux réactions sont liées aux taux de croissance (μ_{BA} et μ_{BN}) des biomasses nitrosantes et nitratantes suivant les équations 21 et 22 respectivement présentées précédemment (page 39) et rappelées ci-dessous :

$$\rho_A = \frac{\mu_{BA} \cdot [X_{BA}]}{Y_{BA}} \quad \text{(équation 21)}$$

$$\rho_N = \frac{\mu_{BN} \cdot [X_{BN}]}{Y_{BN}} \quad \text{(équation 22)}$$

Ainsi, on pourra déterminer théoriquement les taux de croissance de chaque biomasse à partir d'un essai respirométrique à condition de connaître les concentrations de chacune des biomasses et leurs rendements de croissance (Y_{BA} et Y_{BN}).

Chandran et Smets (2005) ont analysé l'identifiabilité des paramètres d'un modèle de nitrification en deux étapes à partir d'essais respirométriques. Ils ont mis en évidence que la corrélation entre les paramètres déterminés pour la biomasse nitrosante et pour la biomasse nitratante diminue lorsque l'étape de nitratisation est plus limitante (donc que des nitrites s'accumulent). Les paramètres déterminés pour l'une et l'autre biomasse sont alors plus précis. Les modèles de nitrification en deux étapes calés sur les respirogrammes permettent donc de décrire correctement les cinétiques de nitrification seulement si le profil respirométrique contient suffisamment d'information relative à chaque étape indépendamment, c'est-à-dire si le respirogramme permet de distinguer la respiration due à chaque étape de la nitrification.

1.4.3 Conclusion

La modélisation des procédés épuratoires peut être un outil important dans l'étude des stratégies de bio-augmentation, qui permet d'étudier différents cas de figure par la simulation sans devoir les expérimenter sur site. Cependant, afin que les simulations réalisées représentent fidèlement les comportements des différentes populations impliquées (hétérotrophes, nitrifiantes, autochtones ou d'origine externe), il est nécessaire de déterminer les paramètres cinétiques de chaque population considérée.

La méthode respirométrique semble être adaptée à la détermination de ces paramètres. L'analyse des respirogrammes peut être réalisée par la modélisation à l'aide de modèles simplifiés représentant la nitrification en deux étapes.

La fiabilité des paramètres ainsi estimés dépend de la quantité de données obtenues, liée aux substrats introduits lors de l'expérience (nombre de substrats et quantités), et de la possibilité de distinction entre les deux étapes de la nitrification.

1.5 Quantification des populations nitrifiantes

Les procédés épuratoires sont décrits en modélisation par des équations théoriques dans lesquelles la biomasse nitrifiante est généralement considérée comme un ensemble unique représenté par la variable X_{BA} . Une bonne connaissance des données de fonctionnement d'un système permet d'estimer la concentration théorique en biomasse nitrifiante du milieu, par la modélisation du système, ou par l'application de l'équation 32 (page 43) si le système fonctionne en régime stabilisé.

Cependant, les concentrations de biomasse ainsi estimées ont rarement été validées par des mesures directes sur des échantillons prélevés dans les bassins biologiques. La quantification des biomasses nitrifiantes dans les boues activées représente un enjeu majeur, car elle permettrait de valider les résultats de modélisation, voire même le suivi et le contrôle des procédés (Hall *et al.* 2003).

Par ailleurs, les activités nitrosantes et nitratantes maximales mesurées par respirométrie et/ou par le biais d'analyses chimiques peuvent permettre de calculer des taux de croissance bactérienne à condition de connaître les concentrations respectives des populations nitrosantes et nitratantes. Pour des solutions bactériennes issues de cultures pures, la quantité de bactéries dans le milieu peut facilement être déterminée, mais pour des échantillons issus de l'environnement, la quantification des populations est beaucoup plus complexe.

1.5.1 Méthodes culturales

Les premières méthodes de dénombrement des bactéries nitrosantes ou nitratantes utilisées étaient des méthodes culturales, comme l'étalement sur milieu sélectif ou la méthode statistique du nombre le plus probable (MPN pour Most Probable Number). Cependant, ces méthodes requièrent un temps de culture assez long à cause du faible taux de croissance de ces bactéries. De plus, elles conduisent souvent à une sous-estimation de la population ciblée (Konuma *et al.* 2001), due notamment à la faible adaptation de certaines espèces aux conditions de culture. En particulier, ces méthodes conduisaient généralement à un enrichissement des populations de type *N. europaea*, alors que celles-ci sont minoritaires dans les boues activées de station d'épuration à faible charge.

Le développement des outils d'immunologie, puis de la biologie moléculaire a ouvert de nouvelles possibilités pour identifier et quantifier les populations nitrifiantes.

1.5.2 Méthode immunologique

Un kit de détection des bactéries nitrifiantes « immuno latex 'Kenshutsukun' » (Yakult Central Institute for Microbiological Research, Yakult Honsha Co. Ltd.) propose de quantifier les bactéries grâce à leur fixation par des anticorps polyclonaux spécifiques des bactéries nitrosantes et nitratantes, combinés avec des particules de latex, qui provoquent la coagulation des bactéries nitrifiantes. La dilution maximale de l'échantillon pour laquelle une coagulation est observée permet de déterminer la concentration des bactéries nitrifiantes dans l'échantillon (Konuma *et al.* 2001). Les principaux désavantages de cette méthode sont la liaison non spécifique des anticorps avec les impuretés du milieu, et l'absence de distinction entre les bactéries mortes et vivantes (Chung *et al.* 2007).

1.5.3 Méthodes moléculaires

1.5.3.1 L'ARNr-16S et l'ADNr-16S

Les ribosomes sont des complexes ribonucléoprotéiques qui ont pour fonction de synthétiser les protéines en traduisant l'information contenue dans les ARN messagers. Ils sont donc présents en grande quantité dans les cellules vivantes, notamment lorsqu'elles sont actives.

Les ribosomes sont structurés en deux sous-unités, une grande et une petite. Chez les procaryotes, la grande sous-unité est composée des ARNr 23S (2300 nucléotides) et 5S (120 nucléotides) et de trente-et-une protéines. La petite sous-unité est constituée de l'ARNr 16S (1500 nucléotides) et de vingt-et-une protéines.

Les ARNr sont très utiles pour l'étude des parentés entre les espèces, car ils sont présents chez tous les êtres vivants, et leur séquence nucléotidique se modifie très lentement au fil de l'évolution des espèces. L'analyse de leurs séquences a mis en évidence l'existence de régions hautement conservées entre tous les êtres vivants (Woese *et al.* 1975), et de régions variables au sein desquelles des séquences signatures des familles, des genres ou des espèces pouvaient être identifiées. La séquence signature d'un groupe phylogénétique particulier apparait chez la plupart ou tous les membres de ce groupe ; et elle n'est jamais ou rarement présente chez les autres groupes.

L'étude et la comparaison des gènes codant pour ces ARN (désignés par ADNr 16S) permettent alors une identification taxonomique des espèces par analyse phylogénétique.

Grâce à leurs particularités (universalité dans le vivant, alternance de régions conservées et variables), les ARNr 16S et les ADNr 16S sont des cibles privilégiées pour l'étude de populations spécifiques dans des environnements complexes. Ils sont en particulier utilisés dans plusieurs méthodes de quantification présentées ci-dessous.

1.5.3.2 PCR quantitative ou en temps réel (QPCR)

La QPCR permet la quantification du nombre de copies d'une séquence d'ADN cible d'un échantillon après extraction de l'ADN. La méthode consiste à amplifier la séquence cible d'un échantillon jusqu'à atteindre une concentration limite, détectable grâce à un marqueur fluorescent des ADN double brins. Le nombre de copies initial de la séquence est alors déterminé à partir du nombre de cycles (Ct) nécessaire à l'obtention du signal fluorescent défini et par comparaison avec une courbe étalon de cible connue.

La séquence ciblée peut appartenir à l'ADNr 16S, ou à un gène codant pour une protéine spécifique de la population. Par exemple, pour les bactéries nitrosantes, le gène *amoA* qui code pour l'ammonium monooxygénase (AMO) est souvent ciblé (Harms *et al.* 2003 ; Kuo *et al.* 2006 ; LaPara et Ghosh 2006).

Cette méthode présente plusieurs biais : d'une part, le nombre de copies par cellules d'une séquence n'est pas toujours connu, et peut varier entre une et trois copies selon la phase de croissance des bactéries (Ludwig et Schleifer 2000) ; d'autre part, le rendement de l'extraction d'ADN peut varier, ce qui induit une erreur aléatoire sur la mesure (Mumy et Findlay 2004). Enfin, le nombre de copies de la séquence ciblée est doublé à chaque cycle, et une erreur d'un cycle lors de la détermination de Ct résulte en un résultat de mesure deux fois plus grand/petit. Au total, l'incertitude sur le résultat de la QPCR est approximativement de l'ordre de l'unité logarithmique.

Remarque : la QPCR peut également s'appliquer à l'ARN, grâce à l'enzyme reverse transcriptase (rt-QPCR), ce qui permet de cibler uniquement les bactéries actives.

1.5.3.3 Dot Blot

La technique de Dot blot consiste à détecter une séquence cible dans un échantillon d'acides nucléiques (ADN ou ARN) déposé sur une membrane, en l'hybridant avec une sonde spécifique marquée. L'hybridation est révélée après lavage par mesure de la radioactivité ou par une réaction enzymatique colorée selon le type de marquage utilisé. La quantification est obtenue par le marquage de différentes dilutions de l'échantillon, et comparaison avec une courbe étalon d'échantillon témoin. Les biais de la méthode proviennent également de l'efficacité de l'extraction des ARN, et des différences de quantité d'ARN par cellule selon les conditions du milieu (Konuma *et al.* 2001).

1.5.3.4 FISH

L'hybridation fluorescente *in-situ* (FISH) est une technique permettant de marquer les bactéries d'un groupe phylogénétique par des sondes oligonucléotidiques fluorescentes ciblant les ARN ribosomiaux 16S (Amann *et al.* 1990), sans dégrader physiquement l'échantillon analysé. Elle est fréquemment utilisée pour déterminer la fraction d'une population spécifique dans une biomasse totale à partir de la comparaison des surfaces marquées par une sonde spécifique et par une sonde généraliste. Comparé aux méthodes basées sur la PCR quantitative, le marquage FISH est moins sensible car les bactéries en très faible proportion ne sont pas détectées. En revanche, l'observation microscopique offre les avantages de la visualisation, qui permet l'élimination des artefacts par l'observation des images (Daims et Wagner 2007). La quantification par marquage FISH peut parfois permettre la mesure de l'abondance exprimée en nombre de cellules, mais sert plus généralement à la détermination du biovolume.

Cette technique a été mise en œuvre au cours de ce travail de thèse, et son utilisation est discutée plus en détail dans la partie 3.2

1.5.4 Conclusion

Différentes méthodes ont été développées pour mesurer expérimentalement les quantités de bactéries nitrifiantes dans différents milieux. Cependant, à l'heure actuelle, aucune n'est suffisamment fiable et pratique pour être utilisée en routine pour le suivi des stations d'épuration. Les niveaux de réussite de chaque méthode dépendent de nombreux facteurs comme la nature de l'échantillon, les cibles utilisées (ARNr 16S, ADNr 16S, gènes

spécifiques, ...), les conditions d'utilisation, etc. Chaque méthode présente des avantages et des inconvénients, dont il est difficile de faire la part. Toutefois, les deux techniques les plus utilisées actuellement sont le marquage FISH et la QPCR.

1.6 Conclusions et orientation des travaux

Les connaissances sur la nitrification en boues activées, très abondantes, permettent de définir des règles de dimensionnement des ouvrages et de gestion du fonctionnement permettant un traitement efficace et stable de l'azote. Une grande partie de ces règles ont été définies sur des observations macroscopiques, sans connaissance poussée des organismes responsables de l'activité nitrifiante.

Le développement des techniques de biologie moléculaire a permis d'acquérir des connaissances plus précises concernant les organismes nitrifiants : espèces présentes selon les conditions, propriétés métaboliques et cinétiques des différents groupes ou espèces, etc. Les études réalisées ont mis en évidence un lien étroit entre les conditions de fonctionnement d'un système (en particulier sa charge et sa concentration en ammonium) et la structure des communautés nitrosantes de ce système.

Par ailleurs, les principaux facteurs de réussite de la bio-augmentation retenus sont l'état floculé des bactéries ou leur intégration aux flocs existants, ainsi que leur acclimatation au milieu récepteur. Le principe de bio-augmentation présente deux types d'application : les procédés de bio-augmentation continue, et les applications ponctuelles sur un procédé donné. Or, les procédés de bio-augmentation continue requièrent des ouvrages spécifiques contraignants qui limitent leur mise en place sur le parc des stations d'épuration françaises. En revanche, l'étude de la bio-augmentation ponctuelle, envisagée comme un moyen de répondre à une situation transitoire délicate peut apporter des informations utiles aux exploitants.

Afin de préciser les conditions d'application de la bio-augmentation ponctuelle d'une station d'épuration à très faible charge avec une solution nitrifiante commerciale, une démarche expérimentale visant à comparer les populations nitrifiantes des ajouts à celles du milieu récepteur a été mise en œuvre. Cette démarche associe des outils de biologie moléculaire à des outils de caractérisation de cinétiques biologiques utilisés en génie des procédés. Les résultats sont analysés en comparant la nature des populations bactériennes nitrifiantes, leur abondance et leur activité.

La comparaison des populations a été complétée par des essais de bio-augmentation au cours desquels l'adaptation et l'intégration de la biomasse d'une solution commerciale dans des boues activées ont été étudiées.

Un modèle simplifié a également été élaboré afin de représenter les différentes populations nitrifiantes des boues bio-augmentées. Certains paramètres de ce modèle ont été déterminés par respirométrie, puis le modèle a été partiellement validé sur les résultats des expériences de bio-augmentation.

2 Matériels et méthodes

2.1 Echantillons étudiés

2.1.1 Boues de stations d'épuration

2.1.1.1 Origine

Des boues activées ont été échantillonnées dans 12 stations d'épuration nitrifiantes différentes, de capacités nominales comprises entre 500 à 55 000 équivalents habitants (EH), ainsi que dans les deux files d'une station d'épuration nitrifiante de 600 000 EH : une de ces files comprend une zone aérobie et une zone anoxique, et l'autre comprend en plus une zone anaérobie afin de réaliser la déphosphatation biologique. Elles sont considérées comme deux stations d'épuration indépendantes.

Dans le Tableau 4 sont rassemblées les caractéristiques des différentes stations d'épuration retenues.

Tableau 4 : liste des stations d'épuration échantillonnées

Station d'épuration	Capacité nominale (EH)	Volumes (m ³)		Bassins biologiques (hors aération)		
		Aération	Total	Anaérobie	Contact	Anoxie
Etr91	10000	1800	1800			
Eta91	55000	5050	5750		X	X
Bou91	7000	1400	1700			X
Boi77	3600	2000	2000			
Sgl77	500	200	200			
Bar77	1200	760	760			
Sma77	800	240	240			
Pre77	50000	3 961	5863	X	X	X
Cou77	3000	735	735			
Evr77	3000	750	750			
Gri77	1900	520	520			
Val94*	300 000	25000	33000		X	X
VaP94*	300 000	32200	60460	X	X	X

* Val94 est répartie en 4 bassins de 33 000 m³, et VaP94 en 2 bassins de 60460 m³.

2.1.1.2 Analyses

La Figure 16 présente schématiquement les analyses réalisées sur les échantillons de boues activées prélevés. L'ensemble des mesures n'a cependant pas été réalisé sur tous les échantillons.

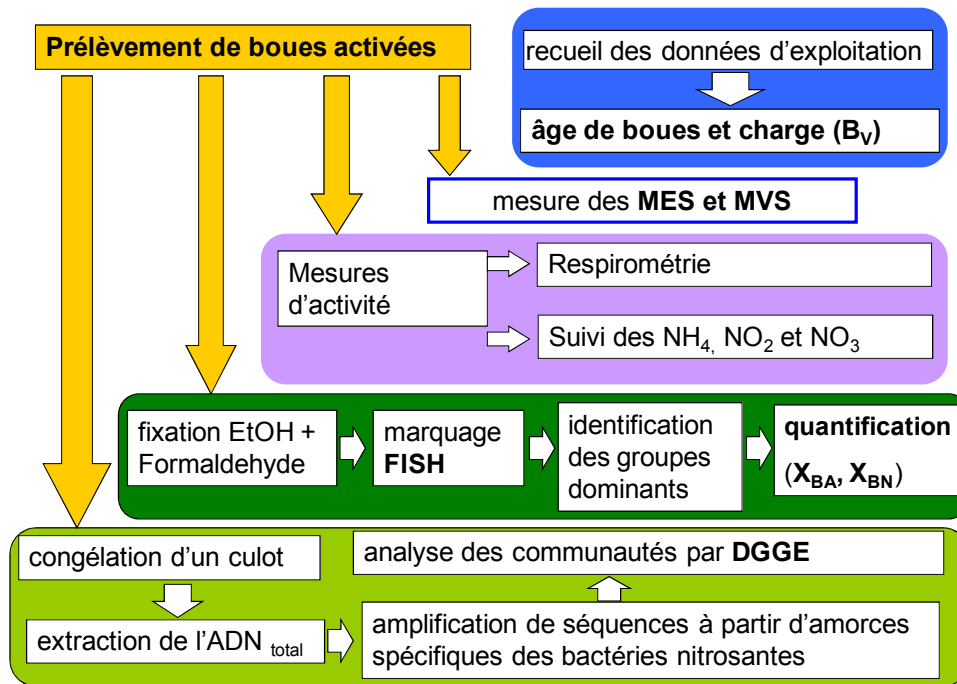


Figure 16 : schéma du plan d'analyses des boues activées de stations d'épuration.

Les dates de prélèvement et les analyses réalisées pour l'ensemble des échantillons sont présentées dans le tableau en annexe 5. La majorité des prélèvements a été réalisée au cours de l'été 2006 et de l'hiver 2006/2007.

2.1.1.3 Conditionnement

Les prélèvements ont été réalisés au cours des périodes de fonctionnement de l'aération afin que la biomasse du bassin soit la plus homogène possible. Au moment du prélèvement, la température des eaux du bassin a été mesurée. Après le prélèvement, les boues activées ont été transportées au laboratoire dans un délai de 1 à 3h. Pour certaines campagnes de prélèvement, 4 stations ont été échantillonnées durant la même journée. L'équipement disponible au laboratoire ne permettant de réaliser que 2 mesures respirométriques simultanément, deux échantillons ont été immédiatement analysés et les 2 autres ont été stockés en chambre froide (4°C) et aérés par diffusion d'air, afin de limiter l'évolution de la biomasse pendant le stockage.

Les volumes nécessaires à chacune des analyses présentées à la Figure 16 sont les suivants :

- 500 mL de boues (échantillon homogénéisé) pour les mesures de MES et MVS effectuées selon la norme NF T90-105-2.
- 50 mL centrifugés, et le culot congelé et conservé à -20°C en vue de l'extraction de l'ADN et de l'analyse les communautés nitrosantes (§ 2.2.2).

- 4,5 mL de boues fixés avec 5 mL d'éthanol et 0,5 mL de formaldéhyde, et conservés à -20 °C pour les analyses FISH (§ 2.3.3).
- 5 L pour les mesures cinétiques par respirométrie et suivi des formes solubles d'azote minéral (cf. § 2.4.3).

2.1.1.4 Caractéristiques des installations échantillonnées

Pour chaque station d'épuration, les données de fonctionnement ont été recueillies auprès des exploitants. A partir de ces données, l'âge de boues moyen (SRT) correspondant à chaque station d'épuration a été calculé selon l'équation 37, avec la moyenne des concentrations en matières sèches ([MS], en g/L) et des débits d'extractions de boues (Q_{MS} en kg_{MS}/j) du mois précédant le prélèvement,

$$SRT = \frac{V * [MS]}{Q_{MS}} \quad \text{équation 37}$$

où V est le volume des bassins biologiques.

Les temps de séjour hydrauliques (TSH) ont également été estimés par l'équation 38, à partir des moyennes des débits entrants au cours du mois précédant le prélèvement.

$$TSH = \frac{V}{Q} \quad \text{équation 38}$$

Les charges éliminées (DCO et NTK) ont été calculées à partir de l'abattement des polluants et du débit traversant la station au cours de la période sur laquelle ont été effectuées les moyennes. Ces abattements sont exprimés par unité de volume de bassin d'aération de chaque station (en $g.m^{-3}_{bassin}.j^{-1}$).

Pour certaines petites stations d'épuration, la fréquence d'analyse des concentrations des effluents est très faible (2 à 6 analyses par an) ; et la pollution azotée (azote Kjeldahl et NH_4) n'est pas toujours analysée. Ainsi, lorsque suffisamment de données étaient disponibles au cours des deux mois précédant le prélèvement, la valeur reportée correspond à la moyenne de ces deux mois. Sinon, les valeurs reportées correspondent aux moyennes des six mois précédant le prélèvement.

Les paramètres de fonctionnement calculés pour les périodes précédant les campagnes de mesures de l'été 2006 (échantillons « E ») et de l'hiver 2006/2007 (échantillons « H ») sont reportés dans le tableau en annexe 6.

2.1.2 Solution commerciale nitrifiante

Une solution commerciale a été utilisée pour la bio-augmentation de l'activité nitrifiante des boues activées. Il s'agit d'un mélange enrichi de bactéries de type *Nitrosomonas* pour les nitrosantes et *Nitrobacter* pour les nitratantes, gracieusement fourni par une société spécialisée dans la bio-augmentation. Cette biomasse est conditionnée sous forme liquide, en concentré 20X par rapport à la concentration nominale d'utilisation. Le fournisseur garantit une activité minimale de $25 \text{ mg}_{\text{Nitrifié}} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ dans les conditions nominales.

Dans la suite de ce mémoire, cette solution sera appelée « Solution NB » (pour « solution Nitrifiante de Bio-augmentation »).

2.2 Diversité des communautés nitrifiantes

A partir des culots de boues congelées, l'ADN a été extrait afin d'analyser la diversité des populations nitrosantes par une technique d'empreintes moléculaires basée sur une identification de chaque bactérie d'après la séquence de son ADNr 16S.

2.2.1 Communautés analysées

Les analyses de populations ont été focalisées sur la communauté nitrosante. Les bactéries nitratantes présentent en effet un moindre intérêt pour les objectifs de la thèse pour plusieurs raisons :

- L'étape limitante de la nitrification en station d'épuration municipale est très généralement la nitrosation, sauf dans des cas particuliers d'inhibition spécifique des bactéries nitratantes.
- La dénitrification peut s'effectuer à partir des nitrates ou des nitrites. Ainsi, même si la nitratisation n'est pas réalisée en phase aérobie, l'élimination de l'azote est quand même potentiellement réalisable à partir des nitrites formés par la nitrosation.

2.2.2 Techniques d'analyse

Les analyses de communautés nitrosantes ont été ciblées sur l'ADNr16S, et en particulier sur la région variable V3.

2.2.2.1 Amplification de l'ADN (PCR)

2.2.2.1.1 Présentation de la technique

L'Amplification en Chaîne par Polymérase ou PCR (de l'anglais Polymerase Chain Reaction), est une technique de réplification *in vitro* de séquences poly nucléotidiques. Elle permet d'obtenir, à partir d'un échantillon complexe et peu abondant, d'importantes quantités d'un fragment d'ADN spécifique de longueur définie.

Il s'agit de réaliser *in vitro* une succession de réactions de réplification d'une matrice double brin d'ADN. Chaque réaction met en œuvre deux amorces oligonucléotidiques ; l'une est complémentaire d'une séquence présente sur un brin, et l'autre d'une autre séquence sur l'autre brin. Les amorces (ou «primers» en anglais) définissent alors, en la bornant, la séquence à amplifier. Les produits de chaque étape de synthèse sont utilisés comme matrices pour les étapes suivantes. L'amplification obtenue est exponentielle.

L'essor de cette technique, imaginée par K. Mullis en 1985, devient considérable à partir de la commercialisation (vers 1988) d'une ADN polymérase résistante aux températures élevées (la *Taq* polymérase), purifiée à partir d'une bactérie thermophile, et qui permet une automatisation de la technique.

La réaction de PCR repose généralement sur une succession de 30 à 35 cycles, chacun composé de trois phases (cf. Figure 17):

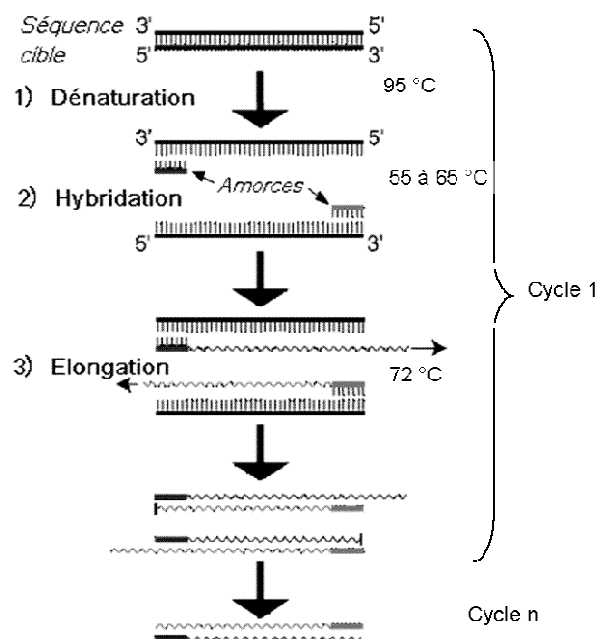


Figure 17 : schéma de principe de la PCR

- 1) **La dénaturation** : montée de la température à 94 ou 95°C afin de séparer les deux brins de l'ADN cible.
- 2) **L'hybridation** : la température est diminuée à une température généralement comprise entre 55 et 62°C. Elle permet l'hybridation des amorces sur l'ADN cible. La valeur de la température est définie comme devant être 5°C inférieure à la celle du T_m des amorces (Température de demi dissociation) qui dépend de leur séquence.
- 3) **L'élongation** : La *Taq* polymérase reconnaît l'extrémité 3' de l'amorce et synthétise le brin complémentaire du brin auquel est fixée l'amorce. La température optimale de l'élongation est de 72°C. La durée de cette étape dépend de l'activité de l'enzyme et de la taille du fragment à amplifier.

A partir du 2^{ème} cycle d'amplification, on obtient des fragments double brins comprenant uniquement la séquence ciblée, délimitée par les séquences des amorces.

L'amplification est exponentielle c'est-à-dire qu'à chaque cycle, la quantité d'ADN amplifié est doublée. Après 35 cycles, on obtient ainsi plus de 34 milliards de fois le nombre de copies initiales.

2.2.2.1.2 Protocole appliqué

L'ADN génomique de la biomasse des boues est extrait à l'aide du kit : « PowerSoil™ DNA Isolation Kit » (MoBio) à partir d'environ 250 mg de culot congelé. Le produit obtenu contient un mélange des ADN génomiques de tous les organismes présents dans les boues.

Une première PCR est réalisée sur l'ADN extrait, avec des amorces spécifiques de l'ensemble de la biomasse nitrosante (présentées dans le Tableau 5) et qui encadrent la région V3 de l'ADNr-16S.

Tableau 5 : amorces spécifiques des bactéries nitrosantes utilisées pour la première amplification

Dénomination	Sens	Position	Séquence	Référence
CTO 654 R	R	654	5'-CTAGCYTTGTAGTTTCAAACGC-3'	(Kowalchuk <i>et al.</i> 1997)
CTO189 fC	F	189	5'-GGAGGAAAGTAGGGGATCG-3'	
CTO 189fA/B	F	189	5'-GGAGRAAAGCAGGGGATCG-3'	

Une seconde PCR est réalisée sur le produit de la première PCR, avec des amorces universelles (présentées dans le Tableau 6), qui ciblent la région V3 de l'ADNr16S.

Tableau 6 : liste des amorces utilisées pour la PCR nichée en vue de l'analyse en DGGE

Nom	Sens	Position <i>E. coli</i>	Séquence	Cible	Référence
341F-GC	F	341	5'-CGCCCGGGGCGCGCCCGGGC GGGGCGGGGCACGGGGGG CCT ACG GGA GGC AGC AG-3'	Bactéries	(Muyzer <i>et al.</i> 1993)
534R	R	534	5'-ATT ACC GCG GCT GCT GG-3'	Bactéries	(Muyzer <i>et al.</i> 1993)

* : marquée en 5' avec du 6-FAM

La séquence amplifiée en seconde PCR est une partie de la séquence amplifiée lors de la première PCR. Cette technique est désignée par le terme de « PCR nichée ».

Un mélange de produits de PCR est ainsi obtenu, composé de fragments de la région V3 des ADN_r16S originaires des bactéries nitrosantes de l'échantillon de boues activées.

Remarque : L'amorce 341F est rallongée par un « GC-Clamp » (séquence riche en bases G et C) afin de permettre l'analyse en DGGE des fragments amplifiés (voir la présentation de la technique ci-dessous).

2.2.2.2 Electrophorèse en gradient de gel dénaturant (DGGE)

2.2.2.2.1 Présentation de la technique

La DGGE est une technique d'électrophorèse permettant la séparation de molécules d'ADN double brins de même taille selon leur température de dissociation. Son principe consiste à déposer un échantillon d'acide nucléique sur un gel d'électrophorèse contenant un agent dénaturant (formamide et urée) dont la concentration forme un gradient. Au fur et à mesure de leur migration, les fragments d'acide nucléique se dénaturent, plus ou moins tôt selon leur séquence.

Les deux brins de chaque fragment d'ADN sont maintenus liés à une extrémité par une séquence « GC-Clamp », composée principalement par des bases G et C. La forte liaison entre les bases G et C (trois ponts hydrogène contre deux pour A-T) empêche la séparation totale des 2 brins.

La structure dénaturée du fragment double brin, maintenue par le GC-Clamp, stoppe la migration au niveau d'une concentration en dénaturant, qui dépend de la taille et de la séquence du fragment. Des fragments de même taille mais de séquences différentes sont ainsi séparés au cours de la migration (cf. Figure 18).

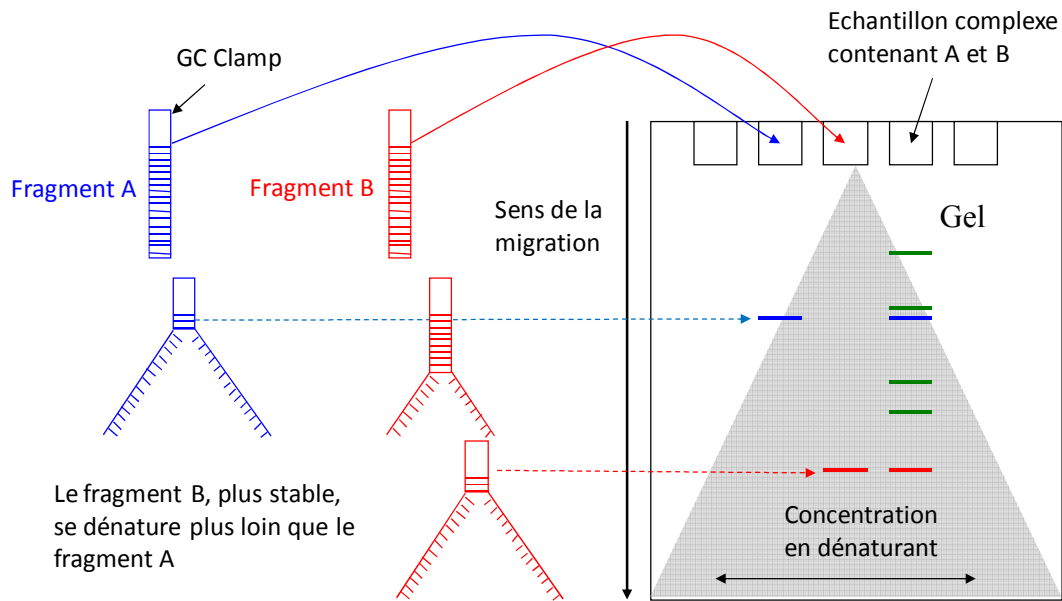


Figure 18 : schéma de principe de la DGGE

La DGGE peut être utilisée pour l'analyse de communautés bactériennes d'un échantillon complexe (Muyzer *et al.* 1993).

A partir d'un échantillon (ADNr-16S amplifié à partir de boues activées par exemple), on obtient des profils avec plusieurs bandes correspondant à différentes espèces (séquences différentes de l'ADNr-16S). Il est alors possible de comparer qualitativement la composition de différents échantillons en observant l'alignement des bandes des différents profils.

La DGGE permet une détection efficace des variations de séquences pour des fragments de taille inférieure à 500 pb environ.

2.2.2.2 Protocole appliqué

Les analyses DGGE sont réalisées à l'aide de l'ensemble système « INGENY PhorU », constitué d'une cassette pouvant contenir deux gels (dimensions 28 x 18 cm x 1,0 mm), un formeur de gradient, et un bac d'électrophorèse.

Deux solutions de gel d'acrylamide (8% d'acryl) sont préparées avec des concentrations d'agents dénaturants (Urée + Formamide) correspondant aux deux limites souhaitées pour le gel (généralement 30 et 60 %).

Le formeur de gradient est composé de deux chambres, amont et aval, dans lesquelles sont introduits 24 mL de chaque solution, et auxquelles sont également ajoutés 50 µL de persulfate d'ammonium ((NH₄)₂S₂O₈) 20% et 5 µL de tétra-méthyl-éthylènediamine (TEMED) qui permettent la polymérisation de l'acrylamide.

La configuration du formeur de gradient (cf. Figure 19) permet l'écoulement de la solution la plus concentrée en dénaturant (placée dans la chambre aval), progressivement mélangée à la solution la moins dénaturante (chambre amont). Il en résulte un gradient linéaire de dénaturant de concentration croissante du haut vers le bas.

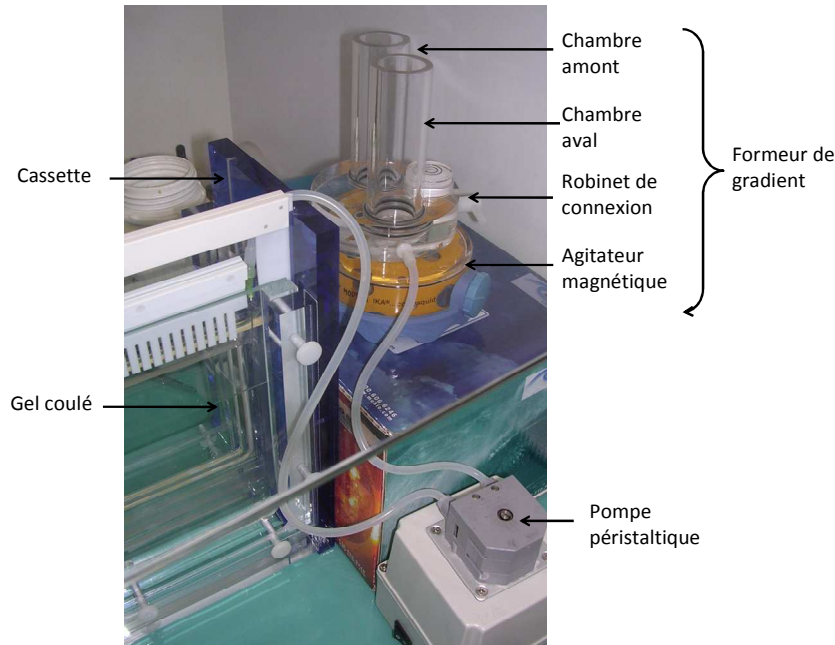


Figure 19 : photographie du dispositif de coulage du gel DGGE.

Après 1h30 de polymérisation du gel de migration, un gel non dénaturant de quelques centimètres de haut est coulé au dessus du premier avec un peigne afin de former les puits dans lesquels seront introduits les échantillons.

La migration est réalisée dans un tampon de migration (Tris Acetate EDTA), sous une tension constante de 120 V (56 mA, 7 W) à 60°C pendant 16 heures.

Après migration, la révélation des bandes est effectuée en immergeant le gel dans du SYBR® Gold (Invitrogen) concentré 1X pendant 30 minutes à l'obscurité, et la visualisation est réalisée sur un transilluminateur UV (Biorad Geldoc XR).

2.2.3 Identification des espèces

La DGGE permet d'observer des profils de communautés bactériennes afin d'en analyser la diversité et de rechercher des homologies ou des différences entre les échantillons. Cependant, pour identifier les espèces formant les bandes observées, il est nécessaire d'isoler les fragments d'ADN correspondant et de les séquencer.

Les fragments d'ADN de séquence identique forment une bande sur le gel DGGE qui peut être découpée à l'aide d'un scalpel et d'un transilluminateur Dark Reader (Clare Chemical Research). L'ADN contenu dans le gel découpé est récupéré en immergeant le gel découpé dans 50 μ L d'eau stérile pendant trois jours ; puis en ré-amplifiant le fragment d'ADN cible avec les amorces 341F et 534R.

Afin de vérifier que le produit de PCR obtenu est pur, c'est-à-dire qu'il ne contient qu'une seule séquence), il est chargé sur un nouveau gel DGGE identique au gel d'origine. S'il est bien pur, on n'obtient qu'une seule bande après la migration. Les produits de PCR purs sont alors envoyés aux laboratoires de la société Eurofins MWG Operon pour être séquencés.

Les séquences obtenues sont comparées à celles de la banque de données des génomes séquencés NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/>).

La comparaison des séquences obtenues avec les principales espèces connues de bactéries nitrosantes a également donné lieu à la construction d'un arbre phylogénétique réalisé à l'aide des outils mis à disposition sur le site www.phylogeny.fr par le LIRMM (Dereeper *et al.* 2008).

2.3 Abondance relative des populations nitrifiantes

L'hybridation *in situ* de sondes fluorescentes (FISH), telle qu'elle est généralement utilisée en écologie microbienne, consiste à hybrider des oligonucléotides de 18 à 20 bases marqués par un fluorophore, à des séquences spécifiques des ARN ribosomiques du groupe ciblé (lignée, genre, espèce, sous-groupes,...). Cette technique permet de détecter les micro-organismes en microscopie à épifluorescence dans leur environnement.

La technique d'hybridation fluorescente *in situ* est préférentiellement utilisée pour la détection de microorganismes, pour l'étude de leur répartition spatiale dans l'échantillon, et/ou pour évaluer une abondance relative des différents groupes ciblés. C'est dans ce dernier objectif que son utilisation a été envisagée au cours de ce travail.

2.3.1 Principe de la mesure

En combinant le marquage d'une biomasse spécifique (par exemple la biomasse nitrosante) et le marquage de la biomasse totale, on peut déterminer le pourcentage d'une population spécifique dans un échantillon complexe par comparaison des surfaces hybridées.

Connaissant le pourcentage de la biomasse spécifique et la concentration de l'échantillon en biomasse totale (mesure des MVS ou de la DCO), on peut estimer une concentration en bactéries nitrosantes exprimée en $\text{mg}_{\text{MVS}}/\text{L}$ ou en $\text{mg}_{\text{DCO}}/\text{L}$. Cette technique nécessite une mise au point spécifique à chaque application envisagée (organismes ciblés, et milieux analysés). Au cours de ce travail, le protocole a été mis au point en vue de quantifier les populations nitrifiantes (nitrosantes et nitratantes) des boues activées de stations d'épuration municipales à très faible charge.

Le protocole général de marquage FISH est présenté ci-dessous, mais la mise au point de la méthode de quantification sera détaillée dans la partie « Résultats et discussion » au paragraphe 3.2.1.

2.3.2 Matériel utilisé

2.3.2.1 Sondes

Chaque sonde est définie par une séquence, qui permet de cibler un groupe bactérien spécifique. Pour chaque sonde, la concentration en formamide du tampon d'hybridation est ajustée en fonction de sa séquence nucléotidique, afin d'établir des conditions de stringence permettant l'hybridation à la cible (réalisée à 46°C), tout en évitant le marquage non spécifique.

Le Tableau 7 présente l'ensemble des sondes FISH utilisées au cours de ce travail. Les séquences et les conditions d'utilisation des sondes proviennent du site internet du département d'écologie microbienne de l'Université de Vienne : <http://www.microbial-ecology.de/probebase/> (Loy *et al.* 2003).

Tableau 7 : liste des sondes FISH utilisées

Sonde	Cible	Séquence	Position*	Fm∇	référence
EUB I, II, III	Domaine "Bacteria"	I : 5'-GCT GCC TCC CGT AGG AGT -3' II : 5'-GCA GCC ACC CGT AGG TGT-3' III : 5'-GCT GCC ACC CGT AGG TGT -3'	338 – 355	0-50	(Amann <i>et al.</i> 1990 ; Daims <i>et al.</i> 1999)
Nmo 218	<i>Nitrosomonas oligotropha</i> -lineage	5'-CGG CCG CTC CAA AAG CAT-3'	218 - 235	35	(Gieseke <i>et al.</i> 2001)
Nso 190	Betaproteobacterial ammonia-oxidizing bacteria	5'-CGA TCC CCT GCT TTT CTC C-3'	189 - 207	50-35 [#]	(Mobarry <i>et al.</i> 1996)
Nso1225	Betaproteobacterial ammonia-oxidizing bacteria	5'-CGC CAT TGT ATT ACG TGT GA-3'	1224 - 1243	50-35	(Mobarry <i>et al.</i> 1996)
NmV	<i>Nitrosococcus mobilis</i> lineage	5'- TCC TCA GAG ACT ACG CGG -3'	174 - 191	35	(Juretschko <i>et al.</i> 1998)
Nse 1472	<i>Nitrosomonas europaea</i> lineage	5'- ACC CCA GTC ATG ACC CCC -3'	1472 - 1489	35	(Juretschko <i>et al.</i> 1998)
NEU	Most halophilic and halotolerant <i>Nitrosomonas spp.</i>	5'- CCC CTC TGC TGC ACT CTA -3'	653 - 670	40	(Wagner <i>et al.</i> 1996)
	Compétiteur ^{iv}	5'- TTC CAT CCC CCT CTG CCG -3'			
Nit 3	<i>Nitrobacter spp.</i>	5'- CCT GTG CTC CAT GCT CCG -3'	1035 - 1052	40	(Wagner <i>et al.</i> 1996)
	Compétiteur ^{iv}	5'- CCT GTG CTC CAG GCT CCG -3'			
Ntspa662	genus <i>Nitrospira</i>	5'- GGA ATT CCG CGC TCC TCT -3'	662 - 679	35	(Daims <i>et al.</i> 2001c)
	Compétiteur	5'-GGA ATT CCG CTC TCC TCT-3'			

* Position de la sonde selon la numérotation de l'ADNr-16S d'E-coli (sauf Bet42a).

∇ Pourcentage de formamide du tampon d'hybridation.

#Concentration en formamide ajustée d'après Biesterfeld, *et al.* (2002) ; Jubany, (2007). Voir également l'annexe 8

Remarques : -Certaines sondes doivent être utilisées avec une sonde « compétiteur » non marquée. Le compétiteur sature les sites de séquence proche des organismes non ciblés afin de limiter le marquage non spécifique.

-Les sondes EUB 338 I, II et III (Amann *et al.* 1990 ; Daims *et al.* 1999) permettent de marquer l'ensemble des bactéries en ciblant une séquence conservée de l'ARNr-16S. Ces trois sondes ont toujours été utilisées simultanément et sont regroupées sous le nom d'EUBmix.

La Figure 20 présente les différents groupes ciblés par les sondes FISH utilisées. Les sondes utilisées pour la quantification sont soulignées.

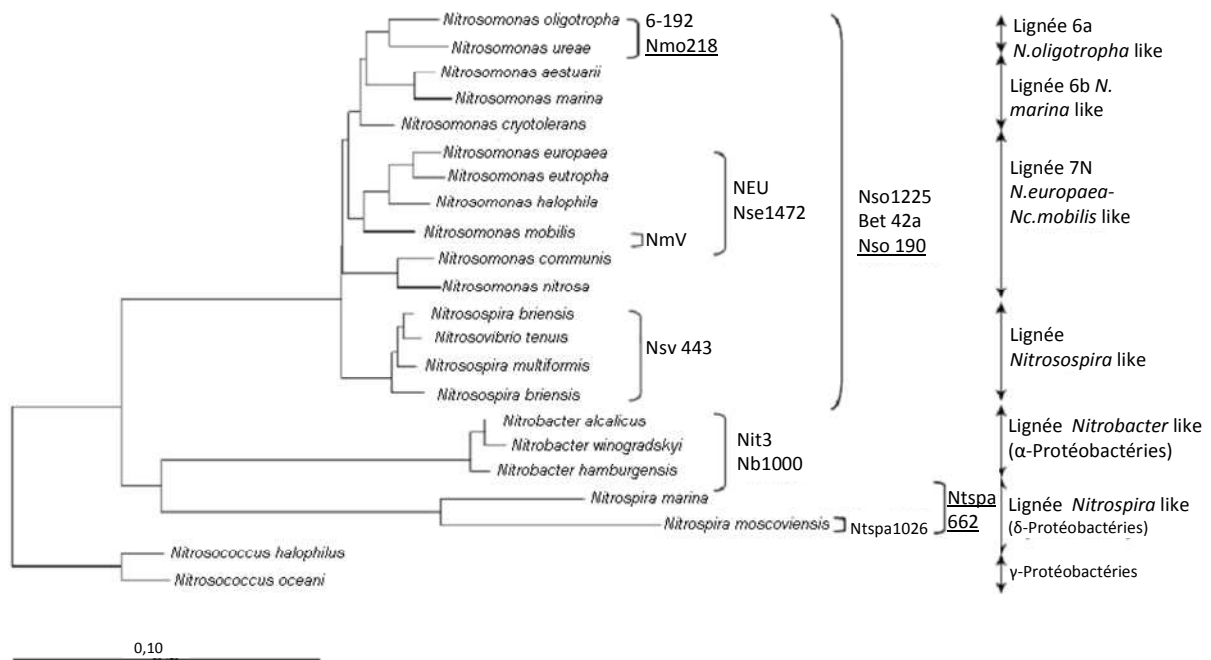


Figure 20 : arbre phylogénétique des bactéries nitrifiantes et cibles des sondes FISH (Olivier 2005).

2.3.2.2 Fluorophores

Les sondes peuvent être marquées avec différents fluorophores, ce qui permet d'utiliser plusieurs sondes simultanément. Par convention le même code de couleurs sera toujours utilisé pour représenter les fluorophores. Le Tableau 8 présente les trois fluorophores utilisés, leurs pics d'excitation et d'émission ainsi que les couleurs utilisées pour les représenter.

Tableau 8 : fluorophores, longueurs d'onde et couleurs associées

Fluorophores	Pic d'excitation (nm)	Pic d'émission (nm)	Couleur de représentation
FITC	492	520	Vert
Cy3	550	570	Rouge
Cy5	650	670	Bleu

2.3.3 Protocole de marquage

Ce protocole est une adaptation des travaux publiés par Amann *et al.* (1990a) et Manz *et al.* (1992).

2.3.3.1 Fixation des échantillons

4,5mL de boues fraîches sont fixés par ajout de 0,5 mL de formaldéhyde et 5 mL d'éthanol 96% et conservés à -20°C selon la méthode testée par (Karner *et al.* 2001 ; Lam et Cowen 2004).

2.3.3.2 Dépôt sur lame

Afin de désagréger les floes et de favoriser l'étalement et l'adhésion de la biomasse aux lames, 2 ml d'échantillon sont broyés avec un Ultraturax® équipé d'une tige de type S 25 N – 8 G (de 8 mm de diamètre) pendant 10 à 20 secondes à la puissance 5.

Les échantillons sont déposés sur des lames de 6 puits revêtus de Téflon. Afin de couvrir le plus largement possible la surface du puits, 20 μ L d'échantillon fixé sont déposés sur chaque puits.

Les échantillons sont séchés à l'étuve à 46°C, puis déshydratés par dépôt successif de gouttes d'éthanol de concentration croissante (50, 80 et 96%), et séchage à l'étuve entre chaque dépôt.

2.3.3.3 Hybridation et lavage

20 μ L de tampon d'hybridation sont déposés de façon à couvrir toute la surface des puits.

2 μ L de solution stock de chaque sonde (à 50 ng. μ L⁻¹) sont ajoutés au tampon d'hybridation, afin d'obtenir une concentration de 5ng/ μ L dans le tampon d'hybridation. La lame ainsi préparée est introduite dans un tube de 50 mL de type Falcon contenant un morceau de papier absorbant.

Le volume restant du tampon d'hybridation est utilisé pour imbiber le papier absorbant, qui est disposé dans le tube afin d'éviter l'évaporation du tampon d'hybridation en saturant l'air contenu dans le tube de la solution en formamide à la concentration adéquate. Le tube est alors fermé et incubé à 46°C pendant 1h30 à 2h.

Un tampon de lavage est préparé en même temps que celui d'hybridation et porté à 48°C au bain marie pendant l'incubation de la lame. La force ionique du tampon de lavage est définie par rapport à la concentration en formamide du tampon d'hybridation en ajustant la concentration en NaCl (cf. Tableau 9).

Après l'incubation, la lame est délicatement rincée avec 2 mL de tampon de lavage. Elle est ensuite immergée dans le tube contenant le tampon de lavage et incubée à 48°C pendant 15 minutes, afin d'éliminer les sondes fluorescentes non hybridées. Le Tableau 9 présente les concentrations de formamide pour le tampon d'hybridation et de NaCl pour le tampon de lavage.

Tableau 9 : table de dosage pour les tampons d'hybridation et de lavage

% Formamide (Fm)	Tampon d'hybridation (2 ml)		Tampon de lavage (50 ml)
	Formamide (μL)	H ₂ O(μL)	NaCl 5M (μL)
35	700	900	700
40	800	800	460
50	1000	600	180
55	1100	500	100

La lame est ensuite brièvement rincée à l'eau distillée puis séchée à l'air comprimé ou à l'étuve. Lors des étapes de lavage et de séchage à l'air comprimé, une attention particulière doit être portée à ne pas décrocher la biomasse fixée à la lame.

2.3.3.4 Marquage au SYTO9

Le SYTO9 est un produit commercialisé avec le kit LIVE/DEAD BacLight viability kit L-13152 (Molecular Probe) et qui se lie avec les molécules d'ADN. Il permet ainsi de marquer l'intégralité de la biomasse de l'échantillon, morte ou vivante.

Les longueurs d'onde d'excitation et d'émission du SYTO9 lié à l'ADN sont respectivement de 485 et 498 nm. Il peut être observé au microscope laser confocal avec les paramètres utilisés pour le fluorophore FITC, dont les longueurs d'onde d'excitation et d'émission sont respectivement 492 et 525 nm.

Après séchage du tampon de lavage, 10 à 15 μL de SYTO9 dilué 200X sont déposés sur chaque puits. La lame est alors laissée 20 minutes à l'obscurité à température ambiante.

Le SYTO9 est alors précautionneusement lavé à l'eau distillée, et la lame séchée à l'air comprimé ou à l'étuve.

2.3.3.5 Observation et acquisition d'images

Une goutte de solution antifading de Citifluor PBS (Interchim, Montluçon, France) est ajoutée entre lame et lamelle.

L'observation est généralement réalisée immédiatement après le marquage. Sinon, les lames hybridées sont conservées sèches à -20°C pour limiter les pertes de fluorescence.

L'observation est réalisée à l'aide d'un microscope confocal à balayage laser (MCBL) : « Carl Zeiss Axiovert 200M », piloté par le logiciel « Zeiss LSM 510 ». Deux objectifs à immersion d'huile sont généralement utilisés, avec des grossissements de 40x10 et 63x10X. Pour la visualisation aux oculaires, une lampe Hbo « ebq 100 » illumine le champ observé, et des filtres sélectionnent les longueurs d'ondes observées.

Pour l'acquisition d'images, un laser d'excitation balaie le champ visuel au niveau d'un plan focal. Les lasers d'excitation pour les marqueurs Cy5 (633nm), Cy3 (543nm), et FITC (488nm) sont respectivement réglés à 50%, 80% et 15% de la puissance de transmission. Les niveaux d'intensité des images sont ajustés par le réglage des paramètres d'amplification du signal : le détecteur de gain et l'amplification d'offset (cf. § 3.2.1.2).

2.3.3.6 Analyse d'images

Les séries d'images de chaque échantillon sont analysées à l'aide du logiciel d'analyse d'image DAIME (Daims *et al.* 2006), proposé gratuitement par le département d'écologie microbienne de l'université de Vienne.

Ce logiciel permet d'analyser simultanément toutes les images d'une même série, et de mesurer le rapport des surfaces marquées par deux fluorophores distincts sur l'ensemble de la série. Trois canaux sont disponibles, ce qui permet de réaliser une mesure sur deux biomasses spécifiques simultanément. La mise au point de l'analyse d'image est également présentée dans la partie 3.2.1.3.

2.4 Activité nitrifiante

Deux méthodes sont utilisées pour déterminer la vitesse maximale de nitrification des échantillons de boues activées et de solution NB. Elles consistent en la mesure directe et indirecte de la vitesse de nitrification des échantillons placés dans un réacteur thermostaté à 20°C, auquel on ajoute un excès d'ammonium et de carbonates, et éventuellement de nitrites. Les substrats étant en excès, la vitesse de nitrification mesurée est la vitesse maximale. La mesure directe est réalisée par des analyses chimiques, et la mesure indirecte par respirométrie. La respirométrie permet en outre d'estimer certains paramètres cinétiques des populations nitrifiantes.

2.4.1 Suivi des formes de l'azote

Des échantillons de 15 à 20 ml sont prélevés dans le réacteur juste après l'injection du substrat, puis toutes les 5 minutes pendant 25 minutes. Dans certains cas, des prélèvements ont été réalisés pendant plusieurs heures à intervalles de 30 minutes.

Le prélèvement est réalisé avec une seringue équipée d'un tuyau en caoutchouc, qui permet de prélever le liquide au milieu du réacteur. Chaque échantillon est d'abord passé dans un filtre papier plissé (Prat Dumas standard), puis à travers un filtre seringue de porosité 0,45µm afin d'éliminer la quasi intégralité de la biomasse. Les échantillons sont stockés à 4°C et analysés

dans la journée par colorimétrie en flux continu à l'aide d'un analyseur TRAACS 800 (Bran et Luebbe®). L'échantillon est réparti sur trois canaux, pour le dosage des NH_4 , des NO_2 et des N_{Ox} ($\text{NO}_2 + \text{NO}_3$) respectivement. Les concentrations en NO_3 sont déduites des mesures de N_{Ox} et de NO_2 .

2.4.2 Respirométrie

La respirométrie consiste à mesurer l'activité respiratoire de l'échantillon comme indicateur de l'activité bactérienne (en l'occurrence nitrifiante). Elle est réalisée dans un réacteur appelé respiromètre.

Le respiromètre est constitué d'un réacteur double enveloppe en verre d'une capacité de 6 L, agité mécaniquement par un agitateur à pales tournant à 300 rpm. Une sonde pH et une sonde oxygène à membrane perméable (oxymètre YSI) sont introduites dans le réacteur.

L'aération est assurée par une pompe à air, à l'aide d'un diffuseur poreux placé sous les pales de l'agitateur. L'aération est asservie à la mesure des oxymètres, afin qu'elle démarre lorsque l'oxygène dissous atteint le seuil bas fixé à $5 \text{ mgO}_2/\text{L}$ et qu'elle s'arrête lorsque le seuil haut est atteint ($7 \text{ mgO}_2/\text{L}$).

Les enregistrements du pH et de l'oxygène dissous sont assurés par un module d'acquisition Yokogawa® réglé à un pas de temps de 5s. Les données sont ensuite recueillies grâce au logiciel DaqStandard.

Les figures 21 et 22 présentent respectivement un schéma et une photographie de l'installation.

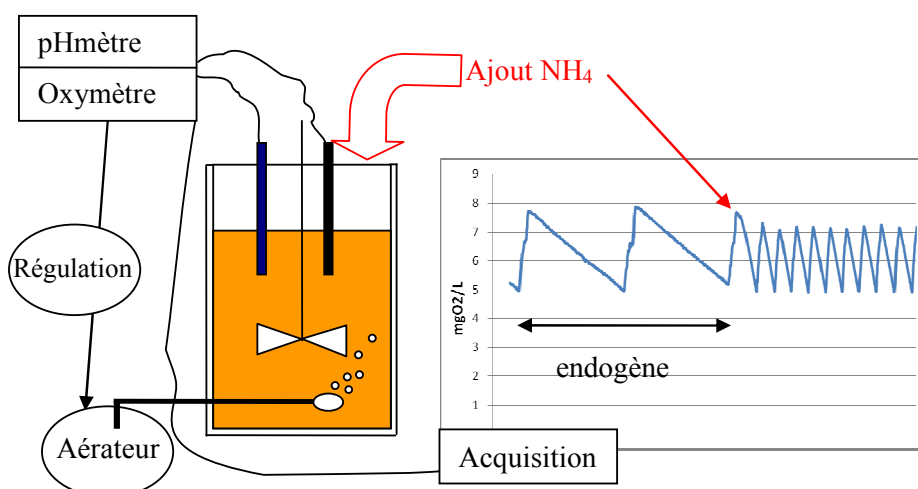


Figure 21 : schéma du respiromètre

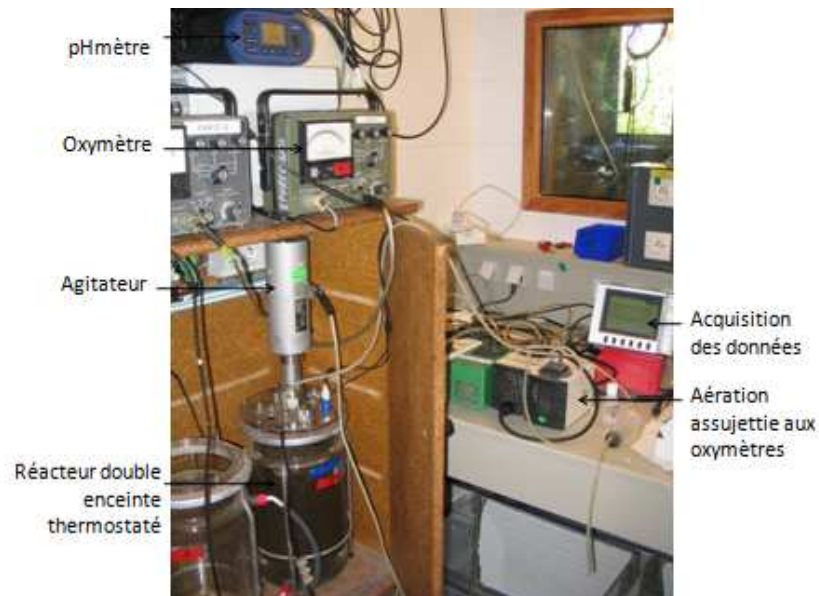


Figure 22 : photographie du respiromètre

La respiration est estimée entre chaque phase d'aération par le calcul des pentes de diminution de l'oxygène dissous dans le milieu lors des périodes non aérées. Elle est notée OUR, de l'anglais Oxygène Uptake Rate.

Le graphe représentant les OUR en fonction du temps est appelé respirogramme.

2.4.3 Protocoles

Les protocoles sont différents selon la nature de l'échantillon analysé (boues activées, solution NB ou boues bio-augmentées) à cause des différences de comportement de ces échantillons. En effet, les boues activées contiennent une forte proportion de biomasse hétérotrophe, alors que la solution NB contient principalement des bactéries autotrophes. De plus, l'affinité pour l'ammonium des bactéries nitrosantes des boues activées est généralement élevée, alors que celle des bactéries de la solution NB *apriori* est plus faible.

2.4.3.1 Pour les boues activées

2.4.3.1.1 Déroulement de la mesure

Quelques heures après leur prélèvement, 5L de boues sont introduits dans le respiromètre. L'échantillon est agité et aéré pendant 15 à 17h, de façon à consommer les substrats qu'il contient et à pouvoir estimer la respiration endogène des boues.

Le substrat utilisé est une solution de bicarbonate d'ammonium à 5 g_{N-NH4}/L contenant du bicarbonate de sodium (>35 g/L afin d'obtenir au moins 2 moles de HCO₃⁻ par mole de NH₄⁺ [coefficients stœchiométriques de la nitrification]).

La solution d'ammonium à 5 gN/L est réalisée par dissolution de 28,22 g de NH_4HCO_3 (0,36 M) et 35 g de Na HCO_3 (0,42M) dans 1L d'eau distillée.

12mL de cette solution sont injectés dans les 5L de réacteur, de façon à obtenir une concentration finale de $12\text{mg}_{\text{N-NH}_4}/\text{L}$. L'injection de substrat est réalisée à la fin d'une phase d'aération, c'est-à-dire quand le niveau d'oxygène est maximal (comme représenté sur la Figure 21 par la flèche rouge) de façon à pouvoir mesurer précisément la première pente de respiration exogène. La respiration atteint rapidement sa vitesse maximale, puis diminue rapidement pour revenir à la respiration endogène.

Suite à l'injection, les prélèvements pour le suivi des formes de l'azote sont effectués (cf. 2.4.1).

Une solution de $5\text{g}_{\text{N-NO}_2}/\text{L}$ de nitrite de sodium (NaNO_2) a également été utilisée, seule ou combinée avec la solution d'ammonium, afin de réaliser des mesures en excès de nitrites, et de dissocier ainsi la nitratisation de la nitrification totale. Le protocole finalement retenu pour distinguer les deux étapes consiste à injecter d'abord la solution de nitrites, à enregistrer la respiration maximale due à la nitratisation, puis à ajouter la solution d'ammonium (environ 30 minutes après) pour enregistrer la respiration combinée des deux étapes de la nitrification.

2.4.3.1.2 Analyse des données chimiques

Les vitesses de production des nitrates, des N_{Ox} , ainsi que la vitesse de disparition de l'ammonium sont estimées par régression linéaire des concentrations mesurées au cours du temps.

La vitesse d'augmentation des N_{Ox} est notée $\text{N}_{\text{Ox}}\text{PR}$ (de l'anglais oxidised Nitrogen Production Rate), et la vitesse d'augmentation des nitrates est notée N_tPR (de l'anglais Nitrate Production Rate).

La vitesse de disparition de l'ammonium est également mesurée et soustraite aux $\text{N}_{\text{Ox}}\text{PR}$ afin de calculer la vitesse d'accumulation d'azote minéral soluble. Cette différence est calculée et notée $\text{N}_{\text{min}}\text{PR}$ ($\text{N}_{\text{min}}\text{PR} = \text{N}_{\text{Ox}}\text{PR} - d\text{NH}_4/\text{dt}$).

2.4.3.1.3 Analyse des données respirométriques

Les données Acquisées par le logiciel DaqStandard sont copiées dans une feuille Excel, pour laquelle une macro écrite sous Visual basic permet un traitement automatisé. Ce programme calcule automatiquement la valeur des pentes négatives entre les deux seuils, et ne retient que les pentes dont le coefficient de détermination est supérieur à 0,98. Le repère de temps associé

à chaque mesure correspond au temps du début de la pente. Une moyenne des valeurs de pH sur la durée de la pente est également calculée.

Les boues activées aérées sans substrat ont une activité respiratoire due à la simple minéralisation de la biomasse. Cette respiration est appelée respiration endogène. Après que l'intégralité du substrat introduit a été transformée en nitrates, la respiration revient au niveau endogène. La respiration endogène est encore enregistrée pendant quelques heures afin d'obtenir suffisamment de données pour une estimation fiable de son évolution.

La Figure 23 présente un exemple de respirogramme et d'estimation de la respiration endogène (OUR_{endo}).

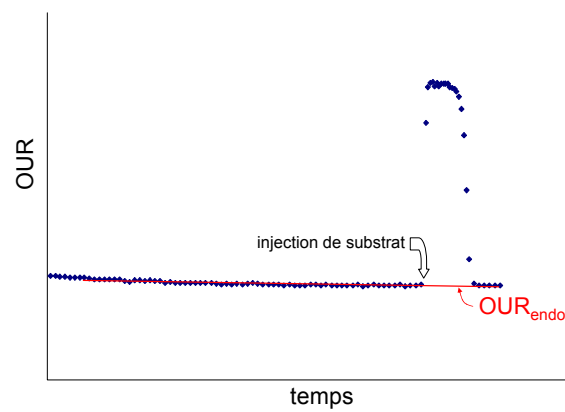


Figure 23: exemple de respirogramme avant soustraction de la respiration endogène

La respiration endogène des boues doit être mesurée, puis soustraite des valeurs de respiration enregistrées lors des expériences afin d'obtenir la respiration exogène qui correspond à la consommation d'oxygène due à l'activité des bactéries nitrifiantes uniquement. L'évolution de la respiration exogène obtenue est représentée sur la Figure 24. L'origine du temps est ramenée au moment de l'injection du substrat.

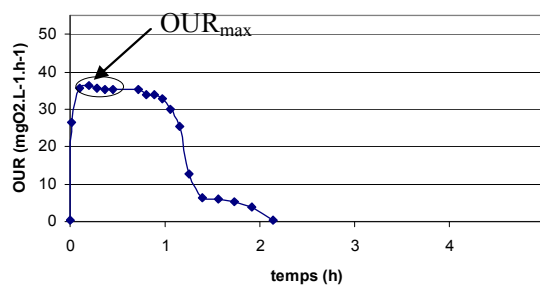


Figure 24: exemple de respirogramme après ajout de $12\text{mg}_{\text{N-NH}_4}/\text{L}$ et soustraction de l' OUR_{endo}

L' OUR_{max} est estimée par la moyenne des 3 à 8 points consécutifs les plus élevés de chaque respirogramme peu après l'injection.

La quantité d'oxygène totale consommé par la nitrification correspond à l'aire sous la courbe respirométrique. La mesure de l'aire sous la courbe est effectuée par la méthode des rectangles : les aires entre deux points consécutifs sont calculées par la moyenne des deux valeurs d'OUR multipliées par l'intervalle de temps (h) entre deux mesures. L'aire totale correspond alors à la somme des aires entre chaque point du respirogramme.

Lorsque le palier de nitratisation est visible en fin d'expérience, on peut estimer la respiration maximale de nitratisation au niveau de ce palier. En considérant que cette respiration est maximale et constante à partir de l'injection, les respirations maximales et les quantités d'oxygène consommé par chacune des deux réactions sont déterminées, comme le présente la Figure 25.

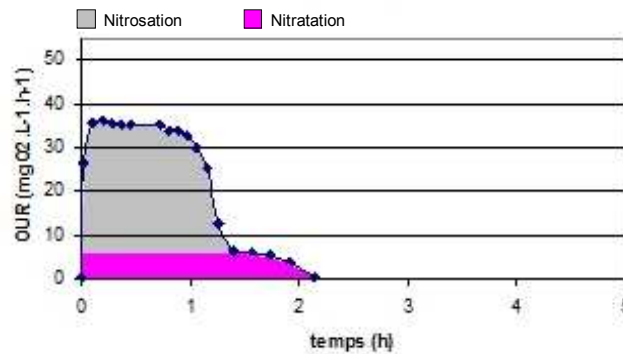


Figure 25 : exemple d'attribution des aires à chaque étape de la nitrification

2.4.3.2 Pour la solution commerciale

2.4.3.2.1 Adaptations du protocole

Les mesures ont été réalisées sur la solution NB diluée par 20 afin de se placer à la concentration nominale d'utilisation. La dilution a été réalisée dans des eaux de sortie d'une des stations d'épuration échantillonnées (Val94 ou Bou91), car elles présentent une composition similaire à celle du système dont elles sont issues. Ainsi, les activités sont mesurées dans des conditions proches de celles d'un bassin d'aération de station d'épuration municipale. Toutefois, afin de ne pas ajouter de biomasse qui pourrait perturber la mesure, les eaux de sortie ont été préalablement filtrées à l'aide d'un kit de filtration membranaire, constitué de membranes de 0,1 μ m de porosité. Les eaux de sortie filtrées (ESF) ont été utilisées pour plusieurs expériences nécessitant une dilution.

Des mesures préliminaires ayant révélé que la biomasse nitrosante contenue dans la solution NB présente une faible affinité pour l'ammonium ($K_{\text{NHS}} = 3$ à 6 $\text{mg}_{\text{N-NH}_4}/\text{L}$). Les mesures de

vitesses de nitrosation ont donc été réalisées à forte concentration en ammonium afin de s'approcher de la vitesse maximale.

En effet, pour une constante d'affinité de $5 \text{ mg}_{\text{N-NH}_4}/\text{L}$ par exemple, l'activité n'est que de 70 % de l'activité maximale si le milieu contient $12 \text{ mg}_{\text{N-NH}_4}/\text{L}$. La Figure 26 présente l'évolution théorique de la vitesse de nitrification en fonction de la concentration en ammonium du milieu.

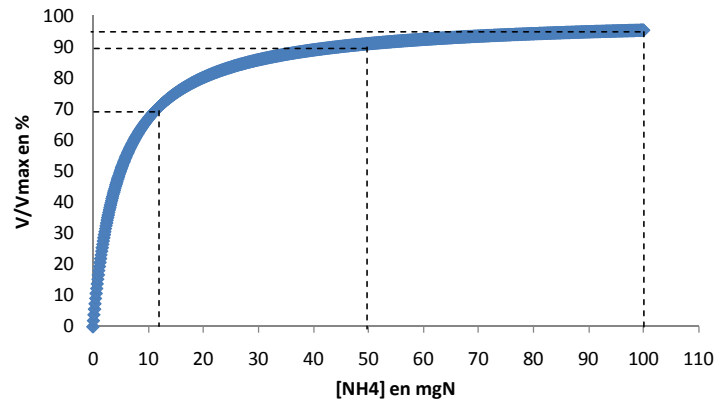


Figure 26 : vitesse de nitrification théorique en fonction de la concentration en ammonium du milieu pour une constante d'affinité K_{NHS} de $5 \text{ mg}_{\text{N-NH}_4}/\text{L}$, en pourcentage de la vitesse maximale

Les mesures ont donc été réalisées en introduisant 50 ou 100 $\text{mg}_{\text{N-NH}_4}/\text{L}$ (90,9% ou 95,2% de l'activité maximale pour $K_{\text{NHS}}=5 \text{ mg}_{\text{N-NH}_4}/\text{L}$).

Les OUR sont calculées à partir des données brutes à l'aide de la même feuille Excel (avec macro) que pour les boues activées.

La respiration endogène n'étant pas mesurable, elle est considérée comme nulle par la suite.

Avant l'injection du substrat, la concentration en oxygène reste constante à une valeur proche de la concentration à saturation. L'agitation de la surface des boues provoque en effet un transfert d'oxygène de l'air vers le milieu liquide, phénomène appelé aération surfacique. Lorsque du substrat est introduit dans le milieu, la concentration en oxygène diminue du fait de l'activité bactérienne. Les valeurs d'OUR mesurées correspondent à la respiration de la biomasse nitrifiante réelle diminuée de l'aération surfacique ($r_{\text{O}_2 \text{ surfacique}}$), comme l'exprime l'équation 39

$$\text{OUR}(\text{mesurée}) = \text{OUR}(\text{réelle}) - r_{\text{O}_2 \text{ surfacique}}$$

équation 39

Remarque : dans le cas de boues activées la respiration étant déterminée par une différence (respiration totale mesurée– respiration endogène mesurée), l'effet de l'aération surfacique, présente pour les 2 mesures s'annule.

2.4.3.2.2 Constante d'affinité pour l'ammonium

A chaque point du respirogramme, la quantité d'oxygène consommée depuis le début de la mesure peut être estimée en mesurant l'aire sous la courbe jusqu'à ce point par la méthode des rectangles (cf. 2.4.3.1.3). A partir de l'oxygène consommé, la quantité d'ammonium consommé est calculée à partir du ratio « Oxygène consommé total/Ammonium introduit » obtenu pour l'ensemble du respirogramme. Ainsi, pour chaque point expérimental d'OUR, la concentration en ammonium du milieu est estimée.

La vitesse de nitrosation (exprimée en OUR) peut être exprimée sous la forme d'une équation de Monod (équation 40).

$$\text{OUR} = \text{OUR}_{\text{max}} * \frac{[\text{NH}_4]}{K_{\text{NHS}} + [\text{NH}_4]} \quad \text{équation 40}$$

où K_{NHS} est la constante d'affinité pour l'ammonium que l'on cherche à déterminer.

Les valeurs de OUR_{max} et K_{NHS} sont alors déduites de l'ajustement de la courbe $\text{OUR}=f(\text{NH}_4)$ à l'équation 40 par la méthode des moindres carrés.

2.4.3.2.3 Constante d'affinité pour l'oxygène

La constante d'affinité pour l'oxygène des bactéries nitrosantes de la solution NB (K_{OSA}) a été mesurée en présence d'un excès d'ammonium (100 $\text{mg}_{\text{N-NH}_4}/\text{L}$).

L'aération est arrêtée et la valeur de concentration en oxygène dissous est enregistrée à intervalles de 5s jusqu'à ce qu'elle soit nulle. Les OUR expérimentales sont calculées pour chaque point de mesure par la pente $-d[\text{O}_2]/dt$ sur une période de une minute (30s avant t, 30s après chaque point).

La solution NB ne présentant pas de respiration endogène, seules les activités nitrosantes et nitratantes consomment de l'oxygène. Par ailleurs, la nitrification consomme beaucoup moins

d'oxygène que la nitrosation. Enfin, les bactéries nitrifiantes sont généralement affectées de façon plus importante par les limitations en oxygène.

Le calcul sera donc effectué en considérant que seule l'activité nitrosante à lieu, et que l'OUR expérimentale est proportionnelle à la vitesse de nitrosation.

La vitesse de nitrosation (en OUR) s'exprime sous forme d'une équation de Monod (équation 41)

$$\text{OUR} = \text{OUR}_{\text{max}} * \frac{[\text{O}_2]}{K_{\text{OSA}} + [\text{O}_2]} = -\frac{d[\text{O}_2]}{dt} \quad \text{équation 41}$$

La valeur de K_{OSA} est alors estimée à partir des données expérimentales suivant le même principe que pour la constante d'affinité pour l'ammonium (2.4.3.2.2).

2.4.3.2.4 Constante de température

Afin d'estimer la constante de température (θ), l'activité nitrosante maximale de la solution NB diluée dans des eaux de sortie filtrées (ESF) a été mesurée en excès de substrats à 10, 15 et 20 °C. L'influence de la température sur l'activité bactérienne est exprimée par une loi d'Arrhenius (équation 42).

$$V_{(T)} = V_{(20^\circ\text{C})} \cdot \theta^{(T-20)} \quad \text{équation 42}$$

où T est la température en °C, et où V_T et $V_{(20^\circ\text{C})}$ représentent les vitesses de nitrosation à la température T et à 20°C respectivement.

A partir des mesures expérimentales (N_{OxPR} et OUR_{max} en fonction de T), θ est estimé selon le même principe que pour K_{NH} et K_{OH} , à l'aide du solveur Excel.

2.5 Bio-augmentation de boues activées

Des analyses ont été conduites sur des boues bio-augmentées avec la solution NB, avec deux objectifs : mesurer l'augmentation de l'activité nitrifiante, et évaluer l'aptitude de la biomasse exogène à s'adsorber aux floccs, et donc à se maintenir dans les boues lors de leur décantation.

2.5.1 Augmentation de l'activité nitrifiante

2.5.1.1 Protocole

1 ou 4 % (Volume/Volume) de solution NB 20X sont introduits dans des boues activées prélevées dans la station d'épuration Bou91. Un réacteur témoin, contenant les mêmes boues est également conduit en parallèle, afin de mesurer l'activité des boues non bio-augmentées.

La respiration endogène est mesurée pendant environ 15h, puis une injection de nitrites est réalisée ($5 \text{ g}_{\text{N-NO}_2}/L_{\text{réacteur}}$) ; suivie par une injection d'ammonium ($20 \text{ g}_{\text{N-NH}_4}/L_{\text{réacteur}}$) 25 minutes après. Suite à la première injection, la respiration de l'activité nitrifiante maximale est mesurée. La respiration de l'activité nitrifiante totale est obtenue après l'ajout d'ammonium. Les valeurs des OUR de chaque étape (nitrosation et nitrification) peuvent ainsi être différenciées.

Un suivi des formes de l'azote est également réalisé pendant toute la période de la réaction avec des prélèvements espacés de 10 minutes pendant la première heure, puis de 60 minutes jusqu'au retour à la respiration endogène.

Les quantités de substrat injecté sont établies en tenant compte de deux contraintes : d'une part la concentration initiale après injection doit être assez élevée pour que les bactéries de la solution commerciale (ayant une faible affinité) aient une activité suffisante pour être détectée ; d'autre part la quantité de substrat injecté ne doit pas être trop importante afin que la durée de l'expérience ne soit pas trop longue (quelques heures maximum). En effet, si l'expérience dure trop longtemps, une croissance non négligeable des bactéries nitrifiantes peut être observée, modifiant la composition des communautés initialement présentes dans les boues activées.

2.5.1.2 Analyse des résultats par modélisation

Les respirogrammes des réacteurs témoin et de bio-augmentation sont modélisés afin de comparer les activités respectives de la biomasse nitrifiante des boues activées et de la solution commerciale. Les paramètres cinétiques des différentes populations sont déterminés par calage sur les données de respirométrie et de suivi des formes de l'azote. Ces paramètres pourront par la suite être utilisés pour modéliser un ajout dans un système à boues activées nitrifiantes pour évaluer l'intérêt de cette stratégie.

Les travaux de modélisation ont été réalisés à l'aide du logiciel WEST 3.7.5 (Hemmis NV).

2.5.1.2.1 Description du modèle (ASM_N)

Le modèle utilisé (ASM_N) est adapté du modèle ASM1. Les réactions relatives à la transformation du carbone ont été éliminées du modèle afin de ne considérer que les réactions de nitrification. Par contre, quatre types de population nitrifiante sont représentés : les populations nitrosantes et nitratantes sont considérées séparément, pour les boues activées et pour la solution commerciale respectivement. Chaque population est impliquée dans deux réactions : croissance et décès, et possède ses propres paramètres cinétiques et stœchiométriques.

La matrice du modèle ASM_N est présentée en Annexe 4, et les notations utilisées pour les paramètres cinétiques et stœchiométriques de ces populations sont présentées dans le Tableau 10.

Tableau 10 : liste des paramètres utilisés dans le modèle ASM_N

Populations	Rendement cellulaire	Taux de croissance	Taux de décès	Constantes d'affinité	
				Oxygène	Substrat (NO ₂ ou NH ₄)
X _{BA}	Y _{BA}	μ _{BA}	b _{BA}	K _{OBA}	K _{NHB}
X _{BN}	Y _{BN}	μ _{BN}	b _{BN}	K _{OBN}	K _{NOB}
X _{SA}	Y _{SA}	μ _{SA}	b _{SA}	K _{OBA}	K _{NHS}
X _{SN}	Y _{SN}	μ _{SN}	b _{SN}	K _{OBN}	K _{NOS}

2.5.1.2.2 Détermination des paramètres

Le modèle ASM_N a été utilisé pour modéliser les respirogrammes obtenus pour les le réacteur de bio-augmentation et pour le réacteur témoin.

Le respiromètre est représenté par un réacteur batch (aucun effluent de sortie) infiniment mélangé. Un module « influent » est également représenté pour permettre l'injection des substrats (Figure 27).

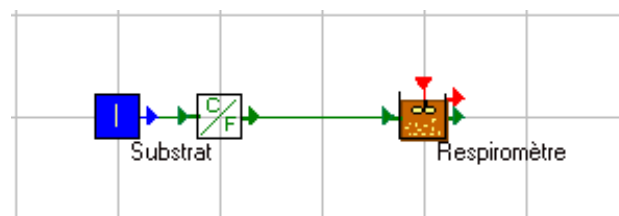


Figure 27 : système représentant le respiromètre en modélisation.

L'injection de substrat est représenté par deux pulses successifs de courte durée (10s), l'un contenant uniquement des nitrites, l'autre uniquement de l'ammonium. La concentration initiale en carbonates est fixée à un niveau élevé afin que ce paramètre ne soit pas limitant.

Initialement, le respiromètre témoin ne contient que les biomasses X_{BA} et X_{BN} , et le respiromètre de bio-augmentation contient les 4 populations.

Les respirations (OUR) des quatre populations considérées sont exprimées par les équations 43, 44, 45 et 46 pour X_{BA} , X_{BN} , X_{SA} et X_{SN} respectivement. L'OUR obtenue résulte de la somme des respirations de ces quatre populations (équation 47)

$$OUR_{BA} = \frac{3.43 - Y_{BA}}{Y_{BA}} * \mu_{BA} * X_{BA} * \frac{[NH_4]}{[NH_4] + K_{NHB}} \quad \text{équation 43}$$

$$OUR_{BN} = \frac{3.43 - Y_{BN}}{Y_{BN}} * \mu_{BN} * X_{BN} * \frac{[NO_2]}{[NO_2] + K_{NOB}} \quad \text{équation 44}$$

$$OUR_{SA} = \frac{3.43 - Y_{SA}}{Y_{SA}} * \mu_{SA} * X_{SA} * \frac{[NH_4]}{[NH_4] + K_{NHS}} \quad \text{équation 45}$$

$$OUR_{SN} = \frac{3.43 - Y_{SN}}{Y_{SN}} * \mu_{SN} * X_{SN} * \frac{[NO_2]}{[NO_2] + K_{NOS}} \quad \text{équation 46}$$

$$OUR = OUR_{BA} + OUR_{BN} + OUR_{SA} + OUR_{SN} \quad \text{équation 47}$$

Le calage réalisé consiste à rechercher le jeu de paramètres et de valeurs initiales permettant de minimiser la fonction objective J exprimée par l'équation 48 :

$$J(p) = \sum_{i=1}^n (OUR_i - OUR(p)_i)^2 \quad \text{équation 48}$$

où OUR et OUR(p) sont des vecteurs de n points d'OUR mesurées et des prédictions d'OUR par le modèle aux temps t_i ($i = 1$ à n) et p est le vecteur des paramètres du modèle. Le calage est réalisé par un algorithme simplex proposé par le logiciel.

Les taux de croissance (μ) ne sont pas individuellement identifiables à partir des vitesses de réaction, et seul le produit $\mu * X$ peut être déterminé. Les taux de croissance ont donc été fixés arbitrairement, et le calage a été réalisé sur les quantités de biomasses (X_{BA} , X_{BN} , X_{SA} et X_{SN})

et les constantes d'affinité (K_{NHB} , K_{NOB} , K_{NHS} et K_{NOS}). Les rendements de croissance sont fixés aux valeurs théoriques ($Y_{\text{BA}} = Y_{\text{SA}} = 0,14$ et $Y_{\text{BN}} = Y_{\text{SN}} = 0,08 \text{ g}_{\text{DCO}}/\text{g}_{\text{N}}$).

Les deux respiromètres contiennent les mêmes boues en quantité égale, et les conditions expérimentales sont initialement identiques. Par conséquent, les populations X_{BA} et X_{BN} sont initialement identiques. Dans un premier temps, les paramètres cinétiques et les quantités des populations autochtones (X_{BA} et X_{BN}) sont calées sur les données du respirogramme du réacteur témoin.

Les paramètres obtenus pour le réacteur témoin sont recopiés dans le réacteur de bio-augmentation, et les paramètres des populations X_{SA} et X_{SN} sont alors calés sur les données du respirogramme de ce réacteur.

2.5.2 Adhésion aux floccs

2.5.2.1 Objectifs de l'expérience

L'expérience décrite ci-dessous a pour objectif de déterminer si la biomasse de la solution NB se fixe dans les boues ou si elle est évacuée avec l'eau épurée. Cette question présente un intérêt majeur dans la mesure où la biomasse d'une station d'épuration à boues activées est maintenue dans le système par la recirculation des boues décantées. Ainsi, si la biomasse de la solution NB reste en suspension lors de son passage dans le décanteur, elle sera évacuée du système avec les eaux traitées.

2.5.2.2 Principe et protocole

L'expérience consiste à suivre le devenir de la biomasse ajoutée lors de la décantation de boues activées bio-augmentées. Deux méthodes de suivi ont été appliquées :

- Le marquage des bactéries par un marqueur fluorescent (suivi direct)
- La mesure de l'activité avant et après décantation (suivi indirect)

2.5.2.2.1 Marquage fluorescent

Un marqueur fluorescent, le 5-(and 6)-carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester (CFDA/SE) permet de marquer efficacement des cellules sans en affecter le métabolisme. La fluorescence reste dans les cellules marquées et leurs cellules filles exclusivement, et ce durant une dizaine de jours (Fuller *et al.* 2000). Le marquage est réalisé à partir d'une solution mère de CFDA/SE de 25 mg/L, diluée dans du Diméthyl sulfoxide (DMSO). 200 μL de cette solution sont introduits dans 50 mL de solution commerciale 20X. Une incubation de 10

minutes à 35°C favorise le marquage des cellules, puis 3 lavages sont réalisés (centrifugation, élimination et remplacement du surnageant par des eaux de sortie filtrées).

La biomasse de la solution commerciale est observée dans les boues bio-augmentées à l'aide d'un microscope à épifluorescence ou d'un microscope confocal à balayage laser (MCBL).

2.5.2.2.2 *Suivi des activités nitrifiantes*

Les activités nitrosante et nitratante ont été mesurées comme décrit dans le paragraphe 2.5.1. Le protocole suivi comprend trois étapes, présentées schématiquement sur la Figure 28.

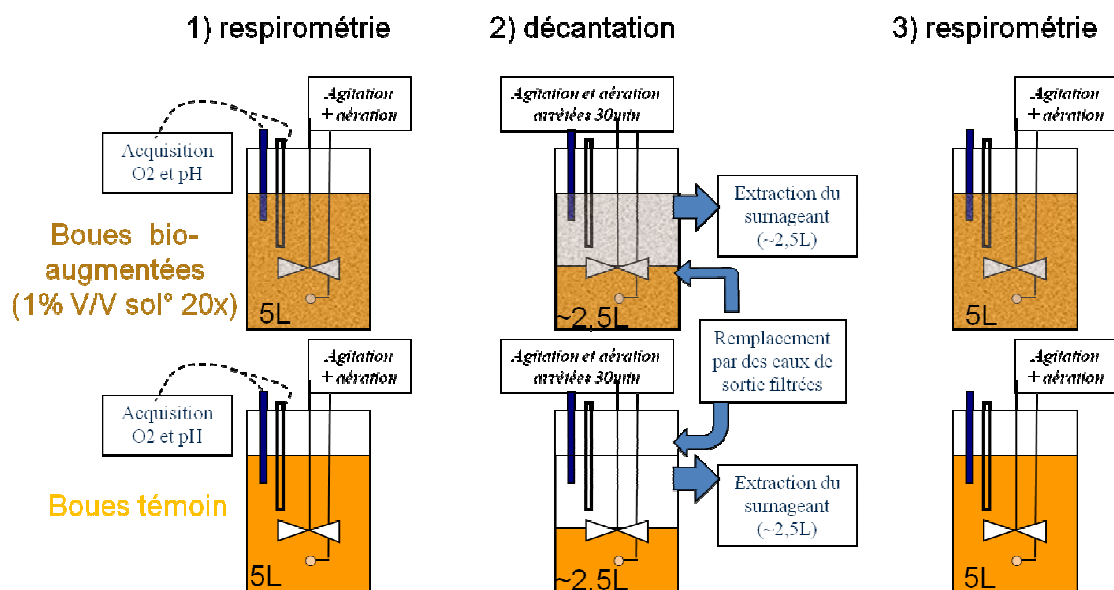


Figure 28 : protocole de suivi du maintien de la biomasse de la solution commerciale dans des boues

1) Une première mesure d'activité est réalisée sur les boues augmentées ainsi que sur le témoin dans un réacteur de 5L.

2) Environ 24h après l'introduction de la solution commerciale, l'agitation et l'aération sont arrêtées, et les boues décantent pendant 30 minutes. Le surnageant est alors extrait du réacteur (environ 2,5 litres), et remplacé par des eaux de sortie de station d'épuration, filtrées à 0,1µm avec un kit de filtration membranaire.

3) Une nouvelle mesure d'activité respiratoire est réalisée.

La différence d'activité entre les boues bio-augmentées et le témoin lors de la première mesure correspond à l'activité ajoutée par la solution commerciale. Et la différence entre la

première et la seconde mesure réalisée sur les boues bio-augmentées traduit les pertes de biomasse nitrifiante dans le surnageant.

Les deux méthodes de suivi (marquage fluorescent et activité) ont été mises en œuvre simultanément. La solution commerciale ajoutée dans le respiromètre pour la mesure d'activité a été préalablement marquée au CFDA/SE, et un échantillon a été prélevé dans le surnageant et dans les boues décantées (étape 2) pour l'observation au MCBL.

3 Résultats et discussion

3.1 Diversité des communautés nitrosantes

La diversité des communautés nitrosantes des boues activées échantillonnées a été analysée par une technique permettant l'observation d'empreintes moléculaires de populations présentes : la migration sur gel en gradient de dénaturant (DGGE) appliquée aux gènes codant pour les ARNr16S. Les populations nitrosantes de la solution commerciale ont également été analysées à l'aide de cette technique, et comparées aux communautés autochtones des boues activées (cf. partie « Matériel et méthodes », § 2.2.2).

3.1.1 Communauté nitrosante des boues activées

Les différences entre les boues activées de différentes origines ainsi que les variations saisonnières des communautés nitrosantes ont été particulièrement étudiées au cours de ce travail. Les informations obtenues ont également été mises en relation avec les données de fonctionnement des stations d'épuration.

3.1.1.1 Profils DGGE

Six gels différents ont été réalisés, avec différents gradients de dénaturant compris entre 30 et 60 %, et avec différentes combinaisons d'échantillons. L'utilisation des différents gradients permet d'affiner l'analyse de certaines zones des profils totaux. Ainsi, un gel réalisé avec un gradient de 35% à 45% permet d'observer précisément la séparation des bandes dans la partie haute des profils obtenus pour un gradient de 30 à 60 %, mais la zone basse n'est alors plus visible.

La Figure 29 présente l'image de l'un des gels DGGE obtenu avec un gradient de 30 à 60% de dénaturant. Dix-sept bandes caractéristiques sont repérées et notées de A à Q. D'autres bandes ont parfois été observées (par exemple sur la Figure 29, au dessus de la bande F du profil de Sgl77-E), mais elles ne sont pas prises en compte car elles n'apparaissent que sur un gel.

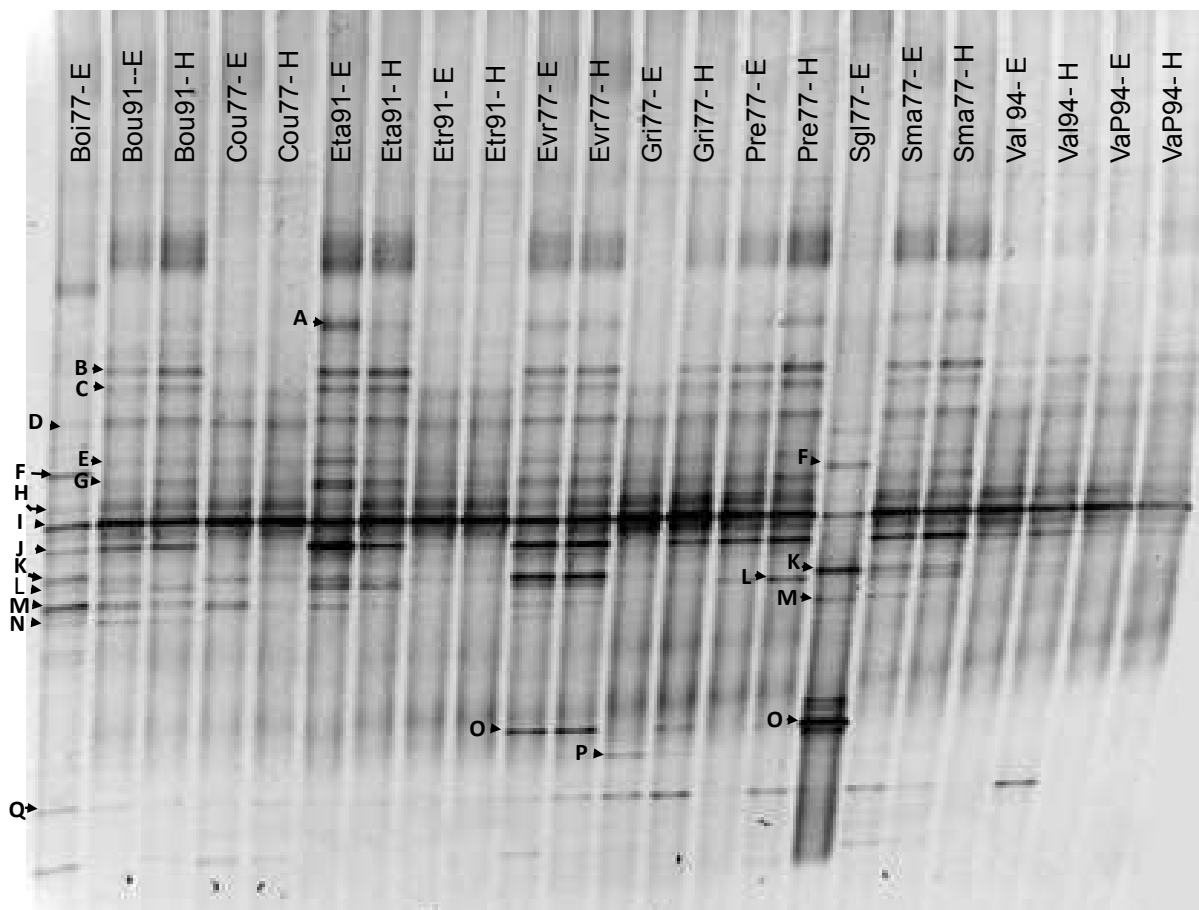


Figure 29 : gel DGGE des populations nitrosantes des échantillons de boues activées. Le gradient de dénaturant est vertical de 30 à 60% du haut vers le bas.

Pour l'interprétation des données, l'intensité des bandes de chaque profil est estimée par quatre niveaux de valeurs notés :

- « - » bande à peine visible (exemple : Boi77-E, bande D)
- « + » bande visible de faible intensité (exemple : Boi77-E, bande K)
- « ++ » bande d'intensité moyenne à forte (exemple : Eta91-E, bande A)
- « +++ » bande très prononcée (exemple : bande I)

Puis une intensité moyenne est déterminée pour chaque bande de chaque échantillon par comparaison des profils obtenus sur les différents gels.

L'ensemble des profils ainsi analysés pour les échantillons d'été 2006 et d'hiver 2006/2007 sont présentés dans le Tableau 11. Les résultats de l'hiver 2007/2008 seront présentés ultérieurement car ils apportent des points de discussion intéressants sur les variations saisonnières, mais présentent peu d'intérêt dans cette partie.

La colonne de droite indique le nombre de bandes présentes dans chaque échantillon, et l'occurrence indique le nombre d'échantillons dans lesquels chaque bande est visible.

Tableau 11 : profils DGGE, intensité des bandes pour les échantillons été E et hiver H. Les bandes foncées ont une occurrence supérieure à 20, les bandes grisées entre 14 et 20, les bandes blanches moins de 10.

Nom Bande	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O	P	Q	Bandes / profil
ÉTÉ 2006																		
Etr91-E			-	+	-		-	+	+++	-	-						-	9
Eta91-E	++	++	+	++	+		++	++	+++	+++	++	++	+				-	13
Bou91-E		+	+	+	-		-	+	+++	++	+	+	++	+		-	+	14
Boi77-E				-		+++	-	-	+++	++	++	-	+++	-		+	+	12
Sgl77-E						++			+	+	++		-		+++		-	7
Bar77-E								-	+++	+	-		-					5
Sma77-E	+	++	+	++	-		-	++	+++	++	+	-	-			-	+	14
Pre77-E		++	+	++	+		+	++	+++	++		+	-					10
Cou77-E			-	+	-		+	++	+++	-	+	-	+					11
Evr77-E	+	++	+	++	-		+	++	+++	+++	+++	++	-	-	++	-	+	16
Gris77-E		-	-	++	-		-	++	+++	-		+				+	+	11
Val94-E		+	+	+	+		+	++	+++	++								8
VaP94-E		+	-	+	-		-	++	++	+								8
HIVER 2006/2007																		
Etr91-H			-	+	-		-	+	+++	-								6
Eta91-H	-	++	+	++	-		+	++	+++	++	+	++	-					12
Bou91-H		++	+	++	-		-	+	+++	++	-	+	+	-			-	13
Sma77-H	+	++	+	++	-		-	++	+++	+++	+	+	-				-	13
Pre77-H	-	++	+	++	-		+	++	+++	+++		+					+	11
Cou77-H			-	+	+		-	++	+++	-	-	-	-				-	11
Evr77-H	+	++	+	++	-		+	++	+++	+++	+++	++	-		++	-	++	15
Gris77-H		+	+	++	-		+	++	+++	++		+			+	-	++	12
Val94-H		+	+	+	+		+	++	+++	++							+	9
VaP94-H		+	-	+	-		-	++	+++	+								8
Occurrence (23 Maxi)	7	16	20	21	20	2	21	22	23	23	14	15	14	4	4	7	16	

Légende : - bande à peine visible ; + bande visible de faible intensité ; ++ bande d'intensité moyenne à forte ; +++ bande très prononcée

Les résultats les plus marquants sont :

1) La bande I est présente dans les vingt-trois profils, et est dominante partout sauf pour Sgl77-E. Les bandes D, G, H et J sont présentes dans plus de vingt échantillons, aussi bien en été qu'en hiver.

Ces bandes constituent donc un profil de base, représentatif d'une communauté nitrosante « typique » des boues activées des stations d'épuration municipales en aération prolongée.

2) La station d'épuration Boi77, échantillonnée seulement en été 2006, présente un profil de populations nitrosantes légèrement différent de la plupart des autres échantillons : la bande I est, comme pour les autres, présente en forte proportion, mais deux autres bandes sont aussi

intenses qu'elle : les bandes F et M. Or, la bande F n'est retrouvée que dans l'échantillon Sgl77-E, et M est généralement présente en très faible proportion dans les autres profils.

3) La station d'épuration Sgl77 présente une communauté nitrosante très différente des autres stations d'épuration : la bande I n'y est représentée qu'en faible proportion (+), alors que la bande O est très largement dominante. Par ailleurs, la bande F y est observée, comme pour l'échantillon de Boi77-E.

3.1.1.2 Identification des espèces des communautés en boues activées

Les bandes les plus visibles d'un gel (F, I, J, K, L, M, O et Q) ont été découpées, les fragments d'ADN qu'elles contenaient ont été extraits du gel et à nouveau amplifiés en vue d'un séquençage (cf. § 2.2.3 de la partie « Matériel et méthodes »).

Dans un premier temps, les séquences obtenues ont été comparées à l'ensemble des séquences référencées dans la base de données Genbank du NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), à l'aide de l'outil BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) du même site.

En raison de la faible longueur des séquences analysées (150 à 160 bases), 100% d'homologie a souvent été trouvé avec plusieurs séquences de la base de référence. A chaque fois, les séquences homologues proviennent de bactéries nitrosantes issues de la même lignée.

Dans un second temps, l'ensemble des séquences obtenues a été comparé aux séquences d'ADNr-16S de bactéries nitrosantes connues et un arbre phylogénétique a été réalisé à l'aide des outils disponibles sur le site www.phylogeny.fr (Dereeper *et al.* 2008). L'arbre phylogénétique obtenu est présenté sur la Figure 30.

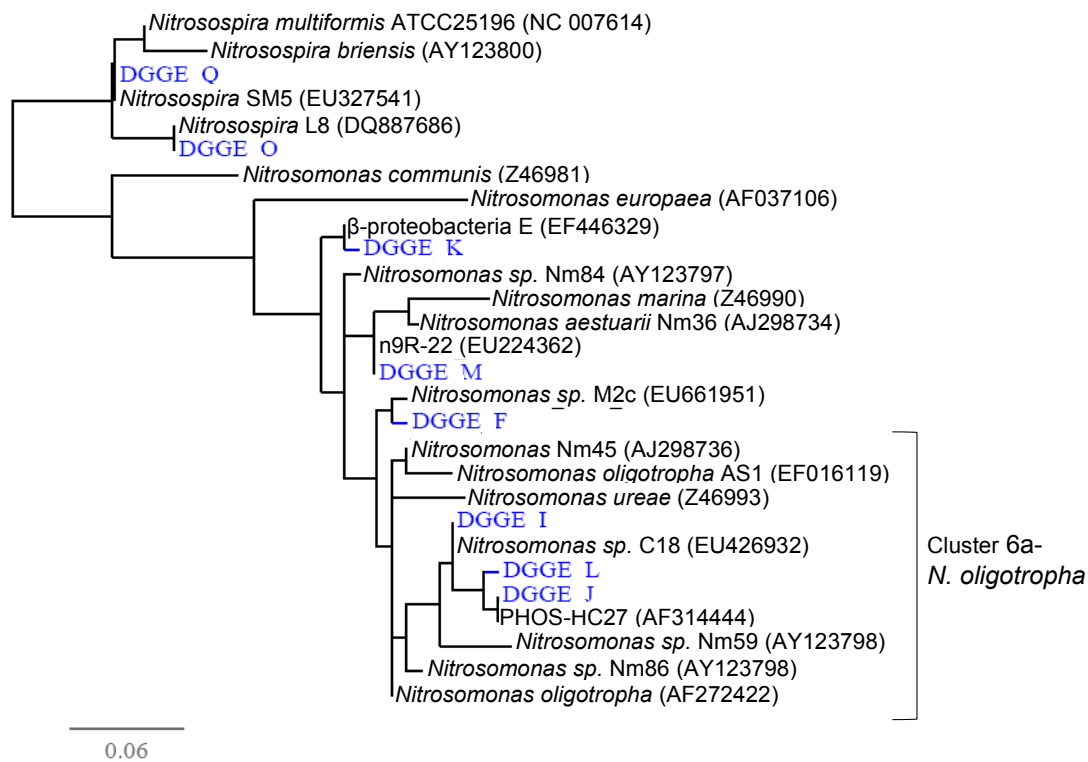


Figure 30 : arbre phylogénétique indiquant le positionnement des séquences des bandes DGGE. L'échelle en bas à gauche correspond à 6% d'homologie de séquence.

La moitié des bandes séquencées (4/8) provient de bactéries du groupe *N. oligotropha* ; dont la bande I qui est la bande majeure de tous les profils excepté Sgl77.

Les bandes I (bande dominante), J et L correspondent à des espèces appartenant à la lignée *Nitrosomonas oligotropha/Nitrosomonas ureae* (cluster 6a).

L'espèce correspondant à la bande F appartient aussi au cluster *Nitrosomonas oligotropha*, mais pas au cluster 6a.

Les bandes O et Q correspondent toutes deux à des espèces du genre *Nitrospira*. La bande O, qui présente une séquence homologue à *Nitrospira* L8 (DQ887686), est la bande majoritaire des profils de la station d'épuration Sgl77.

Aucune des bandes séquencées n'appartient au groupe *Nitrosomonas europaea/Nc. mobilis*. Il n'est pas exclu que des représentants de cette espèce soient présents dans les échantillons, mais leurs proportions seraient alors en dessous du seuil de détection de la technique mise en œuvre. Dans les études récentes réalisées sur des stations d'épuration municipales avec des méthodes basées sur les empreintes moléculaires des communautés nitrosantes, le groupe *N. europaea/Nc. mobilis* est détecté occasionnellement et généralement en faibles proportions (Ebie *et al.* 2002 ; Egli *et al.* 2003 ; Limpiyakorn *et al.* 2006).

3.1.1.3 Conclusions

Les communautés nitrosantes des stations d'épuration à faible charge sont généralement dominées par la même espèce (Bande I) qui appartient à la **lignée 6a-Nitrosomonas oligotropha**. Certains auteurs ont également observé la dominance de ce groupe dans les stations d'épuration municipales (Limpiyakorn *et al.* 2005 ; LaPara et Ghosh 2006). Une espèce dominante différente (du genre *Nitrospira*) a cependant été observée sur la station Sgl77.

D'autres espèces sont également représentées en proportions variables selon les profils, mais aucune des bandes séquencées ne correspond cependant au groupe *Nitrosomonas europaea*.

3.1.2 Impact des conditions de fonctionnement du système sur les communautés

3.1.2.1 Diversité et charge azotée

L'abattement spécifique B_V (ou charge éliminée par m^3 de bassin d'aération) a été estimé pour chaque station échantillonnée pour la période précédant le prélèvement (valeurs reportées en annexe 6). La Figure 31 présente les profils DGGE des 23 échantillons de boues activées ordonnés selon l'abattement spécifique estimé. Pour une meilleure lisibilité, chaque profil DGGE est schématisé par une ligne horizontale où les bandes majoritaires sont représentées par des cercles de surface variable en fonction de l'importance de la bande.

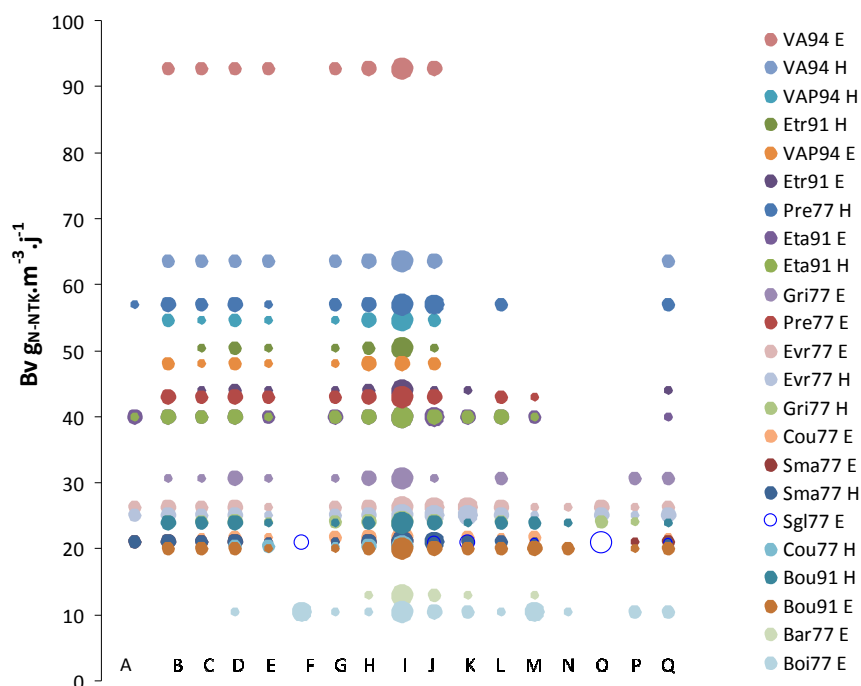


Figure 31 : profils DGGE classés selon l'abattement spécifique de la station d'épuration

Les stations d'épuration qui présentent les abattements spécifiques les plus importants ($>45 \text{ g}_{\text{N-NTK}} \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{j}^{-1}$) présentent les profils avec la diversité apparente la plus restreinte. Il semble donc que **les charges importantes en azote favorisent l'enrichissement d'un nombre réduit d'espèces nitrosantes**. Les autres espèces sont alors absentes ou trop minoritaires pour être détectées par la technique mise en œuvre.

Par ailleurs, la bande F, provenant d'une espèce du cluster *N. oligotropha*, n'est présente que pour les échantillons des stations d'épuration Sgl77 et Boi77, qui traitent une charge très faible ($10 \text{ g}_{\text{N-NTK}} \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{j}^{-1}$). Ainsi, l'espèce correspondant à la bande F semble être favorisée par des environnements relativement pauvres en substrats.

3.1.2.2 Facteurs favorables à la présence de *Nitrosospira*

L'espèce correspondante à la bande Q et appartenant au genre *Nitrosospira* est observée dans 70 % des échantillons. En revanche, l'autre bande affiliée au genre *Nitrosospira* (bande O) n'est présente que pour les stations d'épuration éliminant entre 20 et $30 \text{ g}_{\text{N-NTK}} \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{bassin} \cdot \text{j}^{-1}$ (30% des échantillons) et est dominante pour la station d'épuration Sgl77.

La station d'épuration Sgl77 reçoit un effluent dilué par des infiltrations d'eaux souterraines qui induisent certaines particularités de fonctionnement. Cela se traduit par de faibles concentrations de polluants dans l'effluent d'entrée ($103 \text{ mg}_{\text{DCO}}/\text{L}$ et $9 \text{ mg}_{\text{N-NTK}}/\text{L}$) malgré des charges volumiques moyennes ($201 \text{ g}_{\text{DCO}} \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{bassin} \cdot \text{j}^{-1}$ et $21 \text{ g}_{\text{N-NTK}} \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{bassin} \cdot \text{j}^{-1}$). Le temps de séjour hydraulique y est particulièrement faible (TSH = 8 heures) pour un âge de boues élevé (82 jours). Enfin, la température y est assez faible même en été ($14 \text{ }^\circ\text{C}$). Ces données sont reportées en annexe 6 avec celles des autres stations échantillonnées.

Les bactéries du genre *Nitrosospira* ne sont rencontrées que sporadiquement dans les stations d'épuration à boues activées (Purkhold *et al.* 2000) ou dans les réacteurs à biofilm (Park *et al.* 2008), pour lesquels leur présence semble corrélée à de faibles concentrations en oxygène lors des phases d'aération. Cependant, les niveaux d'oxygénation des bassins échantillonnés ne sont pas connus, et il est donc impossible de vérifier cette corrélation.

Par ailleurs, d'après les expériences de Ballinger *et al.* (2002), les bactéries du groupe *Nitrosospira* seraient défavorisées par l'augmentation du ratio Carbone/Azote de l'effluent d'entrée. Or, excepté pour Sgl77, les échantillons dans lesquels la bande O est observée

(Gri77-H, Evr77-H et Evr77-E) proviennent de systèmes dont l'effluent d'entrée présente un ratio DCO/NTK faible (respectivement 8,0 ; 6,9 et 6,5 g_{DCO}/g_{NTK}) comparé aux autres échantillons (10,1 g_{DCO}/g_{NTK} en moyenne).

Dans le cas de Sgl77, le ratio DCO/NTK élevé (11,5 g_{DCO}/g_{NTK}) pourrait expliquer l'enrichissement sélectif de l'espèce correspondant à la bande O. Cependant, cette station présente plusieurs particularités de fonctionnement, parmi lesquelles il est difficile de déterminer laquelle a le plus d'influence sur la communauté nitrosante. Ainsi, la prédominance de l'espèce du groupe *Nitrosospira* correspondant à la bande O dans la station d'épuration Sgl77 pourrait être due à une faible oxygénation du bassin d'aération (non vérifié), à la faible concentration de l'effluent traité et/ou à des caractéristiques de fonctionnement induites par la dilution de l'effluent (TSH, température,...).

Les conditions de fonctionnement des stations d'épuration influencent donc la structure des communautés nitrosantes. En particulier, **les fortes charges en azote favorisent l'enrichissement de quelques groupes de *Nitrosomonas oligotropha***, et de faibles ratios DCO/NTK en entrée semblent favoriser la présence du groupe *Nitrosospira*. Une espèce de ce groupe est dominante dans la station Sgl77 où ce ratio est élevé mais qui reçoit un effluent dilué par des infiltrations d'eaux souterraines.

3.1.3 Variations saisonnières

Les faibles températures ont un impact négatif largement reconnu sur l'activité de la biomasse nitrifiante. Cependant, la diversité des communautés nitrifiantes à faibles températures est peu étudiée dans les stations d'épuration.

Les profils DGGE obtenus pour un même site sont peu différents entre l'été 2006 et l'hiver 2006/2007. Les bandes K, M, N et P sont plus prononcées pour les profils des échantillons d'été que pour les échantillons d'hiver, notamment pour les échantillons Bou91, Eta91, et Cou77 (cf. Figure 29).

La bande H présente aussi de légères différences d'intensité entre les échantillons estivaux et hivernaux provenant d'une même station d'épuration : elle est plus prononcée en été pour les profils de Sma77, Etr91, Bou91 et Eta91, et en hiver pour les profils de Pre77, Val94, Evr77, Gri77 et Sgl77.

On observe donc quelques différences entre l'été 2006 et l'hiver 2006/2007. Cependant, ces différences sont faibles, et concernent principalement des bandes minoritaires.

Plusieurs études ont observé la persistance des espèces nitrosantes dominantes à différentes saisons pour des stations d'épuration à boues activées (Limpiyakorn *et al.* 2005) ou à filtres plantés (Sundberg *et al.* 2007 ; Tietz *et al.* 2007).

Des résultats différents sont observés pour les trois échantillons prélevés au cours de l'hiver 2007/2008 (Etr91, Sma77 et Sgl77). Ces échantillons présentent seulement deux à cinq bandes DGGE, y compris pour l'échantillon de Sma77 qui présentait un profil riche pour les autres périodes d'échantillonnage (treize et quatorze bandes en été 2006 et hiver 2006/2007 respectivement), comme le montre le Tableau 12.

Tableau 12 : profils DGGE de Etr91, Sma77 et Sgl77 en été 2006, hiver 2006/2007 et Hivers 2007/2008.

Bande	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	O	P	Q	Bandes / profil	T°C
Etr91-E	-	+	-			-	+	+++	-	-					-	9	21,5
Etr91-H	-	+	-			-	+	+++	-							6	14
Etr91-H08							-	+++								2	12,5
Sma77-E	++	+	++	-		-	++	+++	++	+	-	-		-	+	14	16,4
Sma77-H	++	+	++	-		-	++	+++	+++	+	+	-			-	13	13
Sma77-H08						-	-	++	++	++						5	11,7
Sgl77-E					++			+	+	++		-	+++		-	7	14
Sgl77-H08					-			-		-			+++			4	11,1

Légende : - bande à peine visible ; + bande visible de faible intensité ; ++ bande d'intensité moyenne à forte ; +++ bande très prononcée

Les profils DGGE de l'hiver 2007/2008 présentent donc une diversité apparente plus faible que celle observée pour les saisons précédemment échantillonnées. Cependant, les populations nitrifiantes dominantes des profils estivaux persistent en hiver et la structure dominante des profils reste donc relativement stable.

Cette différence de comportement des communautés entre les deux hivers peut être due à une diminution de la diversité réelle suite aux basses températures de l'hiver 2007/2008 (plus froid que l'hiver précédent). Il est également possible que la diversité réelle soit maintenue, mais que les espèces minoritaires ne soient pas détectées en raison d'un enrichissement sélectif des espèces dominantes (I, J, K et O).

Limpiyakorn *et al.* (2005) ont également reporté une absence de variations saisonnières des communautés nitrosantes dans des stations d'épuration à boues activées. Cependant, les gammes de températures de cette étude réalisée au Japon (14 à 22°C en hiver, et 27 à 31 °C en

été) étaient plus élevées que celles des stations d'épuration franciliennes (11 à 17 °C en hiver et 14 à 22 °C en été pour cette étude).

Ainsi, les communautés nitrosantes des stations d'épuration municipales **conservent leur structure dominante sur de longues périodes**. La diversité de ces communautés pourrait toutefois être diminuée lors des périodes de basses températures.

3.1.4 Population nitrosante de la solution commerciale

L'échantillon de solution NB a été analysé suivant le même protocole : analyse DGGE, découpage des bandes, séquençage du fragment d'ADN et identification du microorganisme correspondant.

3.1.4.1 Profils DGGE

Le produit de PCR issu de cet échantillon a été déposé en parallèle des échantillons de boues activées sur le même gel DGGE, afin de comparer le profil des populations nitrosantes contenues dans cette solution avec les populations autochtones des boues activées.

La Figure 32 présente (a) un profil DGGE obtenu pour la solution NB, comparé aux profils des échantillons Boi77-E, Sgl77-E, Evr77-E et Evr77-EH ; et (b) le profil DGGE (issu d'un autre gel) de la Solution NB obtenu à partir de la même solution, comparé à celui d'une souche pure du groupe *N. europaea* (ATCC 19718D) et de ceux des boues de Evr77-E et Boi77-E.

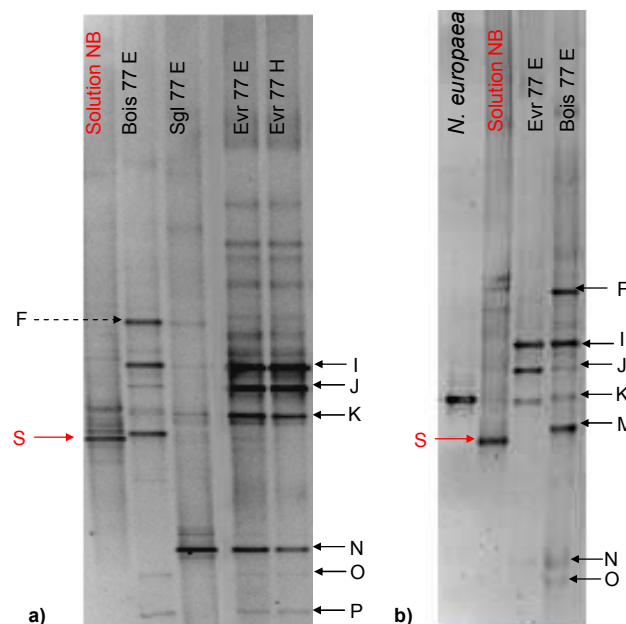


Figure 32 : comparaison du profil DGGE de la solution NB, de profils de boues activées et d'une souche pure de *N. europaea* ATCC 19718D. a) et b) correspondent à deux gels (de gradients 30-60% de dénaturants) réalisés à quelques mois d'intervalle pour différents produits de PCR (avec les mêmes amorces) pour la solution NB.

L'amplification de la solution NB donne toujours une même bande dominante (S) et un certain nombre de bandes parasites qui varient d'un gel à un autre. La bande dominante (S) ne comigre pas avec la souche de *N. europaea* analysée simultanément, ni avec aucune des bandes dominantes des échantillons de boues activées.

3.1.4.2 Identification

La bande majeure « S » ainsi que deux bandes mineures du profil (b) de la solution NB (Figure 32), ont été découpées et ré-amplifiées avec les amorces 341F-GC/534R. Une partie des produits de PCR obtenus a été amplifiée avec les amorces 341F/534R, sans GC-clamp afin de permettre leur séquençage. Une autre partie a été chargée sur un gel DGGE afin de vérifier que les fragments obtenus correspondent à la bande initialement découpée, par comparaison de la position de la bande obtenue avec un profil de référence.

Les amplicons des deux bandes mineures du profil de la solution NB sont identiques à la bande principale du profil d'origine et à son amplicon. Par ailleurs, les résultats du séquençage confirment que les amplicons des bandes mineures ont une séquence identique à celle de la bande principale. La solution NB ne contient donc apparemment qu'une seule espèce de bactéries nitrosantes et les bandes mineures correspondent à des artefacts de migration ou de PCR.

Les artefacts de PCR correspondent le plus souvent à des anomalies d'amplification dues à des répétitions de séquences inversées, résultant par exemple du repliement de l'amorce sur elle même (favorisée par la queue GC). Ce type de problème apparaît plus généralement lorsque les amorces sont en trop large excès et que le nombre de cycles d'amplification est trop important.

La séquence du produit de PCR obtenu permet de situer l'espèce de la solution NB dans l'arbre phylogénétique des bactéries nitrosantes représenté sur la Figure 33.

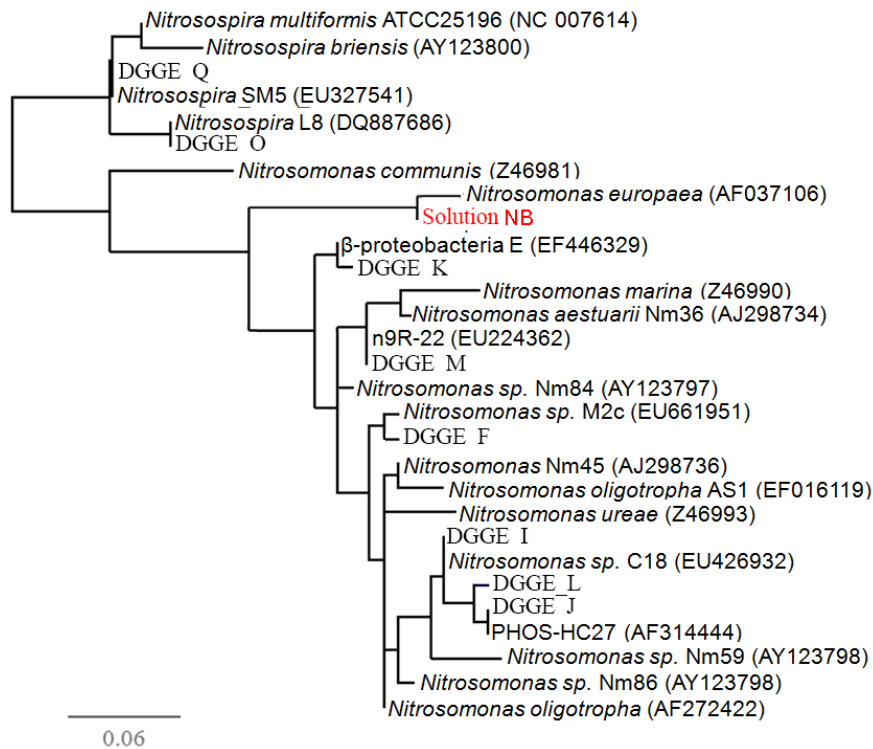


Figure 33: arbre phylogénétique des bactéries nitrosantes, incluant les bandes DGGE et la solution NB. L'échelle en bas à gauche correspond à 6% d'homologie.

Il s'agit d'une espèce du groupe *Nitrosomonas europaea*, mais d'une souche différente de celle testée Figure 32 (*N. europaea* [ATCC 19718D]).

Ce groupe est reconnu comme étant de stratégie $-r$ (Park et Noguera 2007), c'est-à-dire présentant un taux de croissance élevé mais une faible affinité pour le substrat. En effet, lors de sa production, une activité nitrifiante maximale (donc un taux de croissance maximal) à moindre coût est probablement visée. L'espèce nitrosante enrichie est donc sélectionnée pour sa croissance rapide et son activité importante, et non pour son affinité pour le substrat.

Les bandes DGGE des profils de boues activées, ainsi que les clones obtenus à partir des échantillons de deux boues activées n'ont pas permis de mettre en évidence la présence de bactéries appartenant au groupe *N. europaea* dans les boues activées des stations d'épuration municipales. Cette espèce ne semble donc pas s'enrichir naturellement dans les procédés.

Il est donc probable que les bactéries de la solution NB ne s'adaptent pas aux conditions d'une station d'épuration municipale nitrifiante.

3.1.5 Conclusions

La plupart des stations d'épuration nitrifiantes présentent une communauté nitrifiante constituée d'une espèce fortement majoritaire et complétée d'autres espèces présentes en proportions variables. **L'espèce majoritaire (bande I) appartient au cluster *Nitrosomonas oligotropha*** de même que trois autres espèces identifiées à partir des bandes DGGE-J, L et F. Une seule station d'épuration (Sgl77) présente une espèce majoritaire différente, appartenant au genre *Nitrospira*. Cette station d'épuration est alimentée par un effluent dilué qui induit plusieurs particularités de fonctionnement (faible TSH, faibles températures et concentrations de l'effluent d'entrée).

Deux espèces du genre *Nitrospira* (bandes O et Q) ont également été identifiées dans 17% et 70 % respectivement des 23 échantillons de l'été 2006 et de l'hiver 2006/2007.

Parmi, les paramètres de fonctionnement des stations d'épuration qui pourraient influencer la composition des communautés nitrosantes, la charge volumique azotée (B_V) semble favoriser l'enrichissement de l'espèce dominante lorsqu'elle est élevée, et le ratio DCO/NTK de l'effluent d'entrée semble favoriser la présence de *Nitrospira* lorsqu'il est faible.

Peu de différences de communautés sont observées entre l'été 2006 et l'hiver 2006/2007, mais lors d'un hiver plus rigoureux (2007/2008), la diversité apparente semble réduite. Dans tous les cas, **la même espèce est présente et majoritaire tout au long de l'année.**

La **solution de bio-augmentation** analysée (solution NB) contient une espèce nitrosante du groupe *Nitrosomonas europaea*, alors qu'**aucun membre de ce groupe n'a été détecté dans les échantillons de boues activées.** Ce groupe est en effet peu abondant dans les milieux relativement pauvres que sont les stations d'épuration municipales à faible charge et il est généralement reconnu comme étant de stratégie $-r$, peu adaptée à ces milieux.

3.2 Abondance relative des populations nitrifiantes

L'hybridation fluorescente *in-situ* (FISH) est une technique permettant de marquer les bactéries d'un groupe phylogénétique par des sondes oligonucléotidiques fluorescentes ciblant la sous-unité 16S des ARN ribosomiaux (Amann *et al.* 1990), sans dégrader physiquement l'échantillon analysé. Cette technique présente des atouts très intéressants qui expliquent son large succès dans la recherche en écologie microbienne.

D'une part, elle permet de cibler un large spectre d'organismes bactériens cultivables ou non, de façon plus ou moins spécifique selon la sonde choisie. Le marquage FISH peut donc être utilisé pour étudier la diversité bactérienne des échantillons environnementaux. Cependant, son seuil de détection est plus élevé que celui des techniques basées sur l'amplification génétique car des cellules très isolées seront difficilement détectées dans un échantillon riche en biomasse. Sa résolution est également plus faible que celle des techniques de typage moléculaire (SSCP, DGGE, tRFLP,...), car les sondes FISH ciblent généralement des groupes phylogénétiques, et ne permettent pas de distinguer les différentes souches et espèces de ces groupes.

En revanche, la seule dégradation de l'échantillon est la perméabilisation des membranes bactériennes afin de permettre la diffusion des sondes à l'intérieur des cellules. La structure globale des bactéries et leur organisation spatiale n'est donc pas modifiée, et les organismes marqués sont alors observés dans leur configuration naturelle. La localisation et la répartition des bactéries ciblées peuvent donc être étudiées *in-situ*, ce qui est particulièrement utile dans les milieux qui présentent des gradients comme par exemple dans les biofilms (Gieseke *et al.* 2001).

D'autre part, plusieurs sondes peuvent être utilisées simultanément, ce qui permet d'observer les interactions spatiales entre différents groupes (comme par exemple les nitrosantes et les nitratantes).

Enfin, elle peut être utilisée quantitativement pour déterminer la fraction d'une biomasse spécifique dans une population totale à partir de la comparaison des surfaces marquées.

3.2.1 Mise au point méthodologique de la quantification des bactéries nitrifiantes par marquage FISH

La technique de marquage FISH a été utilisée pour l'analyse de l'abondance des populations nitrosantes et nitratantes des échantillons de boues activées et de solution NB. L'utilisation

quantitative de cette technique a donc été étudiée et une procédure de quantification basée sur ce marquage a été établie et appliquée à 24 échantillons de boues activées.

En combinant les vitesses maximales de nitrosation et de nitratisation des échantillons analysés avec les concentrations de bactéries nitrosantes et nitratantes estimées à l'aide du marquage FISH, il est théoriquement possible de déterminer le taux de croissance de chacune des biomasses (cf. § 3.3.4.1).

Le regroupement des bactéries nitrifiantes sous forme d'amas denses ne permet pas l'énumération directe des bactéries. Les essais de dispersion de ces amas par sonication ou par broyage mécanique n'ont pas permis de résoudre ce problème de façon satisfaisante (Daims et Wagner 2007).

Les applications du marquage FISH à la quantification d'une biomasse spécifique consistent généralement à mesurer le rapport entre la surface marquée par une sonde spécifique et la surface couverte par la biomasse totale (Biesterfeld *et al.* 2001 ; Bouchez *et al.* 2001 ; Daims *et al.* 2001a ; Ebie *et al.* 2002 ; Hall *et al.* 2003 ; Jubany 2007). La mesure est habituellement réalisée par l'acquisition des images de l'échantillon marqué avec un microscope confocal à balayage laser (MCBL) et par le traitement des images de façon semi-automatique (Daims *et al.* 2001a).

Les résultats obtenus sont donc des ratios de surfaces, qui correspondent à la fraction de la population ciblée. Pour des boues activées, cette fraction peut être ramenée à une concentration volumique en la multipliant par la concentration des boues en biomasse totale.

Dans certains cas, le biovolume de la biomasse nitrifiante est estimé moyennant l'énumération des amas marqués et la mesure des diamètres de ces amas, présumés de forme sphérique (Coskuner *et al.* 2005 ; Hallin *et al.* 2005 ; Manser *et al.* 2005b ; Milner *et al.* 2008) . Le biovolume est parfois ramené à un nombre de cellules en estimant le volume de chaque cellule (Daims *et al.* 2001a ; Coskuner *et al.* 2005 ; Hallin *et al.* 2005 ; Milner *et al.* 2008), mais d'autres unités peuvent être employées comme par exemple des $\mu\text{m}^3_{\text{pop}}.\text{mm}^{-2}_{\text{floc}}$ (Manser *et al.* 2005b).

La détermination du rapport des surfaces est toutefois la méthode la plus simple et par conséquent la plus souvent utilisée pour l'analyse des populations nitrifiantes des systèmes

d'épuration (boues activées, biofilms, MBR,...). En revanche, la corrélation entre la fraction surfacique mesurée et l'activité spécifique des échantillons n'est pas souvent établie.

Cette méthode a été développée et utilisée pour l'analyse de l'ensemble des échantillons prélevés. Les résultats de la quantification ont alors pu être rapportés aux activités des boues mesurées lors des prélèvements (cf. § 3.3.4.1).

La mise au point de la méthode de détermination des fractions de biomasses a nécessité d'effectuer

- le choix des sondes utilisées et leurs conditions d'utilisation
- le réglage des paramètres d'acquisition des images et le nombre d'images analysées
- les paramètres d'analyse des images obtenues

Chaque étape de la méthode (marquage, acquisition et traitement des images) a été optimisée afin de l'adapter au mieux aux échantillons à analyser et aux objectifs de l'étude.

3.2.1.1 Marquage des boues activées

3.2.1.1.1 Biomasses spécifiques

Différentes sondes ont été testées sur les échantillons de boues activées et de solution NB. Les groupes ciblés par chaque sonde testée peuvent être observés sur la Figure 20 page 89.

La première étape de mise au point méthodologique a consisté à déterminer les sondes permettant de marquer les biomasses nitrosantes et nitrifiantes des boues activées et de la solution NB. Les tests réalisés, détaillés en annexe 8, ont montré que :

- La **sonde Nmo218** permet un marquage efficace des bactéries nitrosantes du groupe *Nitrosomonas oligotropha*, majoritaire dans les boues analysées.
- La **sonde Nso190**, ciblant normalement l'ensemble des bactéries nitrosantes, doit être utilisée dans un tampon à 35% de formamide (% FM) pour l'analyse des boues activées de stations d'épuration. A la concentration initialement recommandée par Mobarry *et al.* (1996) (55% FM), cette sonde permet de marquer la biomasse des solutions fortement enrichies en bactéries nitrifiantes (dont **la solution NB**), appartenant généralement au groupe *Nitrosomonas europaea*, mais ne donne pas de réponse sur les échantillons issus de systèmes à très faible charge.
- Le marquage par Nso190 cible certaines bactéries non marquées par Nmo218 (n'appartenant pas au groupe *N. oligotropha*), mais il ne recouvre que partiellement

le marquage par Nmo218. **Le marquage élargi de la biomasse nitrosante nécessite donc l'utilisation simultanée des deux sondes Nmo218 et Nso190.**

- La biomasse nitratante des échantillons de boues activées est efficacement marquée par la sonde Ntspa662 ciblant le genre Nitrospira.
- La **solution NB** a été marquée avec la **sonde NIT3** pour la biomasse nitratante, révélant des bactéries du genre Nitrobacter, différentes de la biomasse nitratante des boues activées, et par les sondes Nso190, NEU et Nse1472 qui ciblent plus ou moins spécifiquement l'espèce Nitrosomonas europaea.
- Dans un tampon à 35% de formamide, la solution NB est marquée de façon non spécifique par le fluorophore Cy3, quel que soit la sonde à laquelle il est associé. L'application du marquage FISH pour quantifier les populations des boues bio-augmentées n'a donc pas pu être effectué.

Les échantillons de boues ont donc été hybridés avec les sondes Nmo218 et Nso190 marquées en Cy5, et la sonde Ntspa662 marquée en Cy3 dans un tampon à 35 % FM.

D'autre part, la solution NB seule a été marquée par la sonde Nso190 dans un tampon à 40 % FM et par la sonde NIT3 dans un tampon à 40% FM.

3.2.1.1.2 Biomasse totale

Le marquage de la biomasse totale doit permettre d'évaluer la surface couverte par la matrice des boues déposées dans le puits. Cette surface représente la quantité de biomasse totale des boues et sert de référence pour déterminer la fraction de biomasse spécifique et faire le lien avec la concentration mesurée en MVS lors du prélèvement.

L'EUBmix désigne le mélange des sondes EUB 338 I, II et III (Amann *et al.* 1990 ; Daims *et al.* 1999), qui permettent de marquer l'ensemble du domaine bacteria. Cependant, en ciblant l'ARNr-16S, ces sondes ne permettent de marquer que les bactéries actives. Or, les boues sont aussi constituées de bactéries mortes, et d'organismes non bactériens (archées, levures, protozoaires, organismes pluricellulaires, etc.).

En revanche, un composé marquant l'ADN tel que le SYTO9 permet d'observer l'ensemble de la biomasse morte et vivante d'un échantillon.

Une comparaison du marquage par le SYTO9 et par les sondes de l'EUBmix marquées avec le fluorophore FITC a été réalisée pour un même échantillon. Sur l'ensemble des images, le marquage obtenu avec le SYTO9 permet d'observer une intensité de marquage équivalente à

celle obtenue pour l'EUBmix en FITC. Les deux marqueurs peuvent donc être utilisés indistinctement pour le marquage de la biomasse totale des boues, mais le SYTO9 marque la matrice des boues de façon plus large. Le marquage de la biomasse totale en vue de quantifier les populations nitrosantes et nitratantes des boues activées a donc été réalisée avec le SYTO9.

3.2.1.2 Acquisition d'images

Les échantillons marqués sont observés au microscope confocal à balayage laser (MCBL), qui permet d'acquérir des images du marquage par plans focaux. Le champ d'acquisition de chaque image est balayé successivement par les trois lasers à 488, 543 et 633 nm, permettant d'observer les marquages au Syto9 (biomasse totales), Cy3 (biomasse nitratantes) et Cy5 (biomasse nitrosante) respectivement, pour des spectres d'émissions à 568, 525 et 666 nm. L'image résultante est constituée par la superposition des images obtenues via ces trois canaux. Les réglages des paramètres d'acquisition ont été effectués canal par canal.

3.2.1.2.1 Ajustement de l'amplification du signal

La majorité des travaux présentant des analyses quantitatives de populations par marquage FISH ne détaillent pas la méthode de segmentation utilisée (Egli *et al.* 2003 ; Nogueira *et al.* 2005 ; Kim et Kim 2006 ; Matsumoto *et al.* 2007 ; Park *et al.* 2008). Or, la mesure des fractions de biomasse est généralement sensible aux étapes d'acquisition et d'analyse des images de la biomasse marquée.

La méthode de segmentation doit permettre d'éliminer le bruit de fond et de conserver les pixels correspondants à la biomasse marquée. La segmentation automatisée des images est généralement basée sur la fixation d'un seuil d'intensité limite en dessous duquel la fluorescence est assimilée au bruit de fond et considérée nulle. L'intensité des pixels formant les images dépend en premier lieu de leurs paramètres d'acquisition. Ainsi, un protocole a été établi afin de reproduire à chaque fois les mêmes conditions d'acquisition des images, permettant une analyse reproductible.

Dans toutes les mesures effectuées, l'intensité des lasers n'est jamais modifiée (réglage paramétré pour ces fluorophores), et seuls les paramètres d'amplification du signal sont ajustés. Les réglages sont réalisés en visualisant l'image en mode indicateur de niveau (« range indicator ») : les pixels ayant un niveau de gris inférieur à zéro apparaissent en bleu, et les pixels surexposés (niveau de gris de 255) en rouge.

Dans un premier temps, l'objectif du microscope est placé sur un champ où de la biomasse est marquée pour les trois fluorophores (SYTO9 en vert, Cy3 en rouge, Cy5 en bleu). Pour chaque laser, le gain du détecteur ("detector gain") est réglé de façon à n'observer que quelques pixels saturés (rouges) ; puis la compensation d'amplificateur ("amplifier offset") est ajustée de façon à ce que le fond ne soit pas sous-exposé c'est-à-dire que l'on ne voit pas trop de bleu en mode indicateur de niveau.

Le nombre de pixels saturés (affichés en rouges) doit être minimal (quelques points seulement), Les fonds des images doit être bleu tachetés de noir, car l'amplification ainsi ajustée permet d'obtenir un signal non-nul dès qu'un objet présente une faible fluorescence. On obtient ainsi une gamme d'intensité la plus dynamique possible de 0 à 255 niveaux de gris, avec un minimum de saturation et de sous exposition.

3.2.1.2.2 Protocole d'acquisition

Des objets de taille et de formes variables, qui ne correspondent pas à la biomasse marquée sont fréquemment observés sur les images acquises pour les différents fluorophores. Les boues présentent en effet une auto-fluorescence importante, due à la présence de débris variés, de fibres, d'algues, ou de certaines bactéries méthanogènes. Il est également probable que certains de ces objets soient constitués de sondes FISH cristallisées. La Figure 34 présente un exemple d'image contenant des objets de grandes tailles qui saturent le signal pour les longueurs d'onde correspondant aux trois fluorophores.

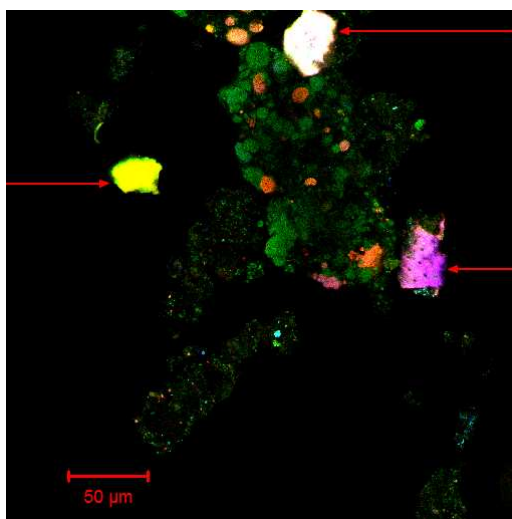


Figure 34 : exemple d'objets fortement fluorescents observés dans un échantillon de boues

Les objets auto-fluorescents de la taille de ceux de la Figure 34 ne sont pas très abondants dans les boues activées, mais un grand nombre d'objets de plus petite taille (jusqu'à 1µm de

dimension) et de fluorescence moins intense sont fréquemment observés sur l'ensemble des champs des échantillons.

Pour le réglage des paramètres d'amplification du signal, l'objectif est placé sur un champ qui ne présente pas d'objets fortement auto-fluorescents afin d'ajuster l'amplification du signal à l'intensité de la biomasse marquée uniquement. La présence d'auto-fluorescence due aux petits objets ne peut cependant pas être évitée.

Les paramètres d'amplification ne sont réglés qu'une fois pour chaque échantillon. Le réglage obtenu est alors utilisé pour acquérir toutes les images de l'échantillon nécessaires à la mesure. Le puits de chaque échantillon est balayé en observant seulement la biomasse totale lors des changements de champs, afin de ne pas influencer le choix des champs d'acquisition par l'observation de la présence de bactéries nitrosantes ou nitratantes marquées.

3.2.1.3 Segmentation des images

Les images des trois canaux, correspondant à la biomasse totale, la biomasse nitrosante et la biomasse nitratante sont séparées et traitées séparément par le logiciel DAIME. L'intégralité de la série d'images d'un échantillon est alors traitée simultanément et identiquement.

La segmentation des images nécessite de fixer un seuil de coupure en dessous duquel l'intensité sera considérée comme nulle. Deux méthodes de détermination de ce seuil peuvent être utilisées : la fixation à partir de l'observation de quelques profils d'intensité choisis parmi l'ensemble des images (seuillage « manuel »), ou le choix de l'intensité maximale d'un témoin non marqué du même échantillon (seuillage « semi-automatique »).

3.2.1.3.1 Seuillage « manuel »

Les profils d'intensité représentent l'amplitude des pixels situés sur un axe défini manuellement, comme le présente la Figure 35.

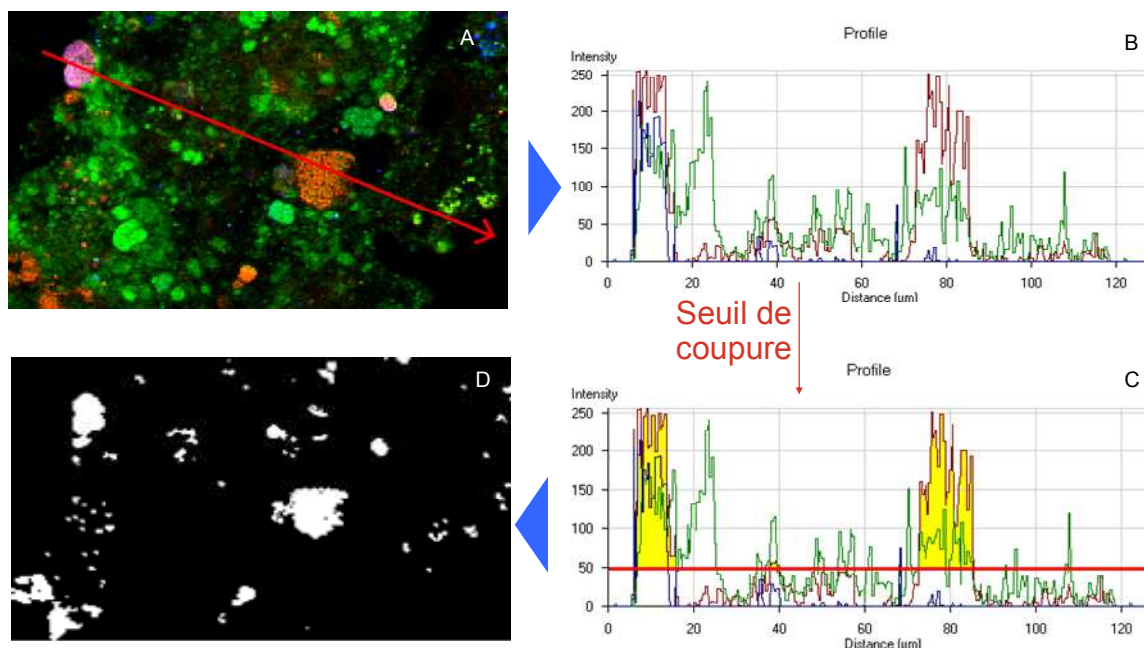


Figure 35: A) boues marquées avec SYTO9 (en vert), Nmo218 (Cy3 en rouge) et Nso190 (Cy5 en bleu). B) profil des niveaux d'intensités pour les trois lasers le long de la flèche rouge de l'image A. L'axe horizontal correspond à la distance par rapport au début de la flèche. C) représentation du seuil de coupure pour Cy3 ; les parties coloriées en jaune seront conservées. D) image segmentée pour le fluorophore Cy3.

Afin de déterminer un seuil applicable à l'ensemble des images d'un échantillon, trois ou quatre profils représentatifs sont sélectionnés.

A partir de l'observation de ces profils, un seuil minimal permettant d'éliminer le bruit de fond de l'image est fixé pour chaque fluorophore. Le seuil de coupure est donc déterminé « manuellement », et il est soumis à de nombreux biais liés au choix des images, au tracé du profil (position de la flèche sur l'image) et à la lecture des profils.

Le seuil peut être fixé à un niveau plus ou moins élevé selon le profil observé, et selon le choix de l'opérateur entre l'élimination du bruit de fond ou la conservation des ensembles marqués.

Afin d'évaluer l'erreur réalisée, l'impact du seuil de coupure pour une même segmentation de la biomasse totale a été étudié pour une série de 40 images de boues (de Val94) marquées avec Nmo218 en Cy3 et Nso190 en Cy5. L'observation des profils de cette série d'images permettait de fixer un seuil compris entre 50 et 100 niveaux de gris.

La Figure 36 présente les fractions obtenues pour chaque sonde séparément ainsi que pour le marquage des deux sondes réunies.

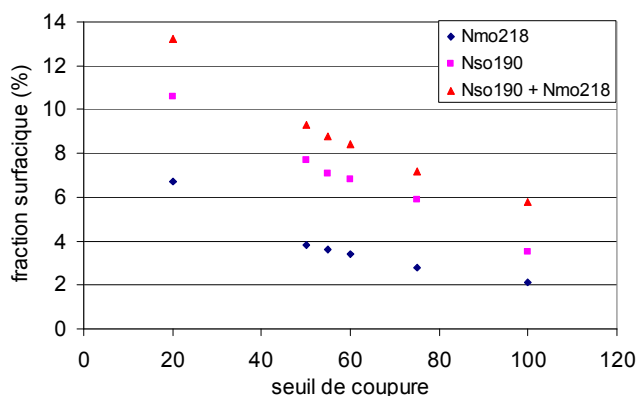


Figure 36 : impact du seuil de coupure sur la fraction surfacique mesurée pour des boues de Val94 marquées avec Nso190 et Nmo218.

Entre la segmentation avec un seuil de 50 et celle avec un seuil de 100, la fraction surfacique mesurée diminue de 45, 55 et 38 % respectivement pour les sondes Nmo218, Nso190 et pour la somme des deux sondes.

Lorsque la population estimée représente une forte proportion de la biomasse totale, le choix des seuils de coupures (spécifique et général) a un impact négligeable sur la valeur mesurée car les variations sont de quelques pourcents sur un résultat de plusieurs dizaines de pourcents (Bouchez *et al.* 2001). Ainsi, dans de nombreuses études, la segmentation des images est réalisée en fixant « manuellement » les seuils de coupure (Bouchez *et al.* 2001 ; Persson *et al.* 2002 ; Paungfoo *et al.* 2003). Cependant, pour des populations en faibles proportions, l'incertitude sur la mesure est généralement supérieure à la fraction mesurée, comme par exemple pour Biesterfeld *et al.* (2001), sur des populations inférieures à 6 % dans un biofilm.

Dans les boues activées de stations d'épuration municipales à très faible charge, la proportion de biomasse autotrophe représente entre 0,5 et 10 % de la biomasse totale (Choubert 2002). Ainsi, vu les proportions attendues, cette méthode ne semble pas assez précise pour estimer les populations nitrosantes et nitrifiantes avec précision.

3.2.1.3.2 Seuillage « semi-automatique »

Une méthode de détermination semi-automatique du seuil de coupure a également été proposée (Jubany 2007) à partir de la mesure de l'auto-fluorescence maximale des boues sur un puits témoin non marqué. Le principe consiste à réaliser un puits avec l'échantillon et le tampon d'hybridation mais sans y introduire de sonde (puits témoin), simultanément au puits avec les sondes dans lequel la quantification sera réalisée. Des images du puits témoin sont

acquises sans modifier les réglages effectués pour le puits marqué. L'intensité des images du puits témoin représente ainsi l'intensité d'auto-fluorescence de l'échantillon.

Le seuil de coupure est alors fixé de façon à éliminer la quasi totalité des pixels de l'image témoin représentatifs de l'auto-fluorescence de l'échantillon (élimination de 99% des pixels des images du témoin par exemple).

La subjectivité de l'opérateur n'intervient pas dans le choix du seuil de coupure appliqué, ce qui permet d'augmenter la reproductibilité de la méthode.

L'application de cette méthode pour l'analyse de l'ensemble de nos échantillons de boues activées a été envisagée, mais la forte auto-fluorescence des boues activées a rendu son application rigoureuse impossible.

La Figure 37 présente un exemple de détermination et d'application du seuillage automatique réalisé pour le marquage des bactéries nitrosantes des boues de Val94.

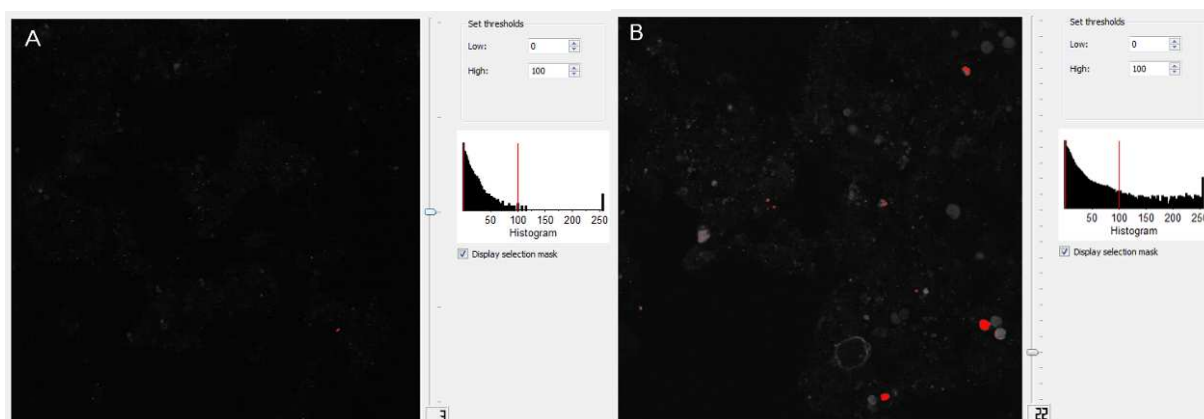


Figure 37: exemple d'application du seuillage « semi-automatique » sur un échantillon de Val94 marqué en Cy5 par les sondes Nmo218 + Nso190. A) Image du témoin sans sonde, le seuil de coupure est fixé à 100. B) application du seuil de coupure de 100 à une image marquée. Sur l'image, seuls les pixels rouges seront retenus par la segmentation.

La segmentation ainsi obtenue permet d'éliminer la plupart des objets auto-fluorescents tels que ceux visibles au milieu de l'image B de la Figure 37, mais des amas de bactéries nitrosantes marquées sont également éliminés à cause de la trop faible intensité de leur marquage (dans le coin en haut à droite de l'image B par exemple).

La détermination du seuil de coupure à partir du témoin non marqué permet donc d'éliminer efficacement les objets de fluorescence artefactuelle, mais elle élimine également une partie de la biomasse marquée. La surface mesurée sous-estime alors la quantité de biomasse nitrosante.

Afin de retenir la surface correspondante à l'ensemble de la biomasse marquée, un seuil plus faible doit être utilisé. Or, l'intensité de beaucoup d'objets auto-fluorescents est équivalente ou supérieure à l'intensité des amas faiblement marqués. Ainsi, un seuil de coupure inférieur retiendra également une proportion importante de pixels représentant des artefacts, et conduira à surestimer la surface hybridée.

La détermination automatisée du seuil de coupure à partir d'images témoin ne peut donc être réalisée que pour des échantillons dont l'auto-fluorescence est assez faible, comme par exemple des boues enrichies en laboratoire (Jubany 2007). En effet, la biomasse issue d'un pilote reçoit généralement un effluent de composition contrôlée, ce qui limite la présence de débris dans les flocs, et évite la prolifération de biomasse indésirable qui provoquent l'auto-fluorescence des boues (algues, archéobactéries, prédateurs multicellulaires, etc.).

Par exemple, la solution NB, produite par enrichissement de souches bactériennes sélectionnées, présente une auto-fluorescence très faible comme le montre la Figure 38.

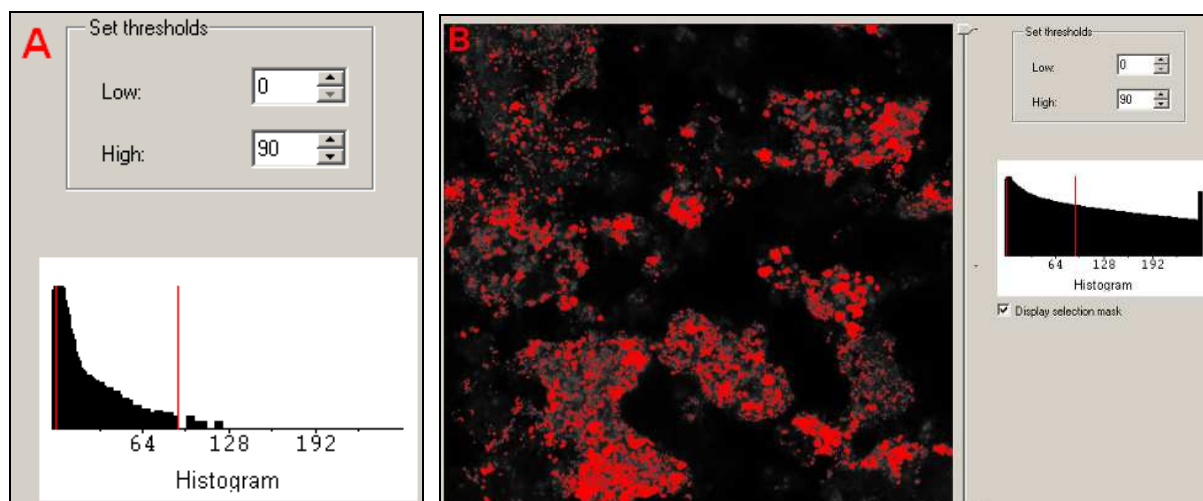


Figure 38 : A) histogramme d'un témoin sans sondes de la solution NB pour le canal Cy5 ; B) segmentation pour la solution NB marquée avec la sonde Nso190 en Cy5.

Le témoin sans sonde présente une intensité de fluorescence maximale de 90 (pour 99% des pixels). En revanche, avec les mêmes réglages, la solution marquée avec Nso190 présente une forte intensité de fluorescence, dont de nombreux pixels saturés.

La quantification des proportions de biomasse nitrosantes et nitratantes a ainsi pu être réalisée par cette méthode pour l'échantillon de solution NB, marquée avec Nso190 et NIT3. En revanche, **son application aux échantillons de boues de stations d'épuration n'a pas été possible**, et un protocole moins systématique a du être appliqué.

3.2.1.3.3 Protocole appliqué

Il a été envisagé de déterminer deux seuils de coupures en s'inspirant des deux méthodes présentées (seuillage manuel et semi-automatique), afin de minimiser l'incertitude résultant des choix réalisés.

Pour les biomasses spécifiques (nitrosantes et nitratantes)

Un premier seuil a été fixé dans une gamme de 90 à 190 niveaux de gris à l'aide des images témoin, selon une procédure inspirée du seuillage semi-automatique (cf. 3.2.1.3.2). Seuls les objets très fluorescents sont alors conservés par la segmentation de l'image témoin.

Ce premier seuil était toutefois élevé, et conduisait à sous-estimer la quantité de biomasse réellement marquée (cf. Figure 37). Un second seuil a donc également été fixé à un niveau inférieur (dans la gamme de 45 à 120), et déterminé par l'observation de plusieurs profils d'intensité (Seuillage manuel, cf. § 3.2.1.3.1).

Chaque série d'image a donc été segmentée deux fois : une fois avec un seuil haut déterminé semi-automatiquement mais qui sous-estime la surface marquée, et une fois avec un seuil bas déterminé manuellement, qui n'élimine pas tous les artefacts d'auto-fluorescence des boues. Les surfaces obtenues avec les seuils hauts et bas des biomasses spécifiques sont notés respectivement $S_{Hspé}$ et $S_{Bspé}$.

Les artefacts les plus grossiers peuvent par ailleurs être éliminés manuellement avant la segmentation. Une révision de chaque image a donc été réalisée systématiquement pour les deux segmentations des deux biomasses ciblées (nitrosante et nitratante) afin d'éliminer manuellement les gros artefacts. Dans la majorité des cas, il est aisé de distinguer la biomasse marquée des artefacts auto-fluorescents, mais certains objets peuvent être considérés différemment selon les opérateurs (amas de forme atypique ou artefact). Ainsi, cette révision induit un nouveau biais opérationnel par le choix subjectif des objets éliminés de la quantification, mais elle est indispensable à cause de la grande quantité d'objets auto-fluorescents présents dans les échantillons.

Pour la biomasse totale :

Les images segmentées de la biomasse totale doivent représenter la totalité de l'espace occupé par les boues dans le puits. Or, les intensités de marquages ne sont pas homogènes sur

l'ensemble de la surface des floes. Le choix de seuils élevés tels que ceux qui sont utilisés pour les biomasses spécifiques reviendrait à sous-estimer fortement la surface de la biomasse totale.

Deux seuils de coupure pour la biomasse totale ont donc été choisis manuellement à des niveaux assez bas (entre 20 et 55) afin de conserver la majeure partie de la biomasse visible lors de la segmentation. Le premier seuil est fixé en observant les images où le marquage obtenu est le plus faible, et il est ajusté de façon à n'éliminer que les pixels des zones où aucun floe n'était visible (bruit de fond). La segmentation des images fortement marquées avec ce seuil résulte en une surestimation de la surface occupée par la biomasse. Un second seuil plus élevé est alors choisi sur une image où les boues sont marquées intensément, et le seuil est fixé de façon à observer un début d'apparition de lacunes au sein des surfaces retenues par la segmentation. Ce seuil haut sous-estime donc la surface occupée par les boues pour les images de plus faibles intensités. Les surfaces obtenues avec les seuils haut et bas sont notés respectivement S_{Htot} et S_{Btot} .

La moyenne des mesures avec les deux seuils donne une valeur approximative de la réalité.

La Figure 39 montre un exemple de la segmentation obtenue pour une même image avec ces deux seuils.

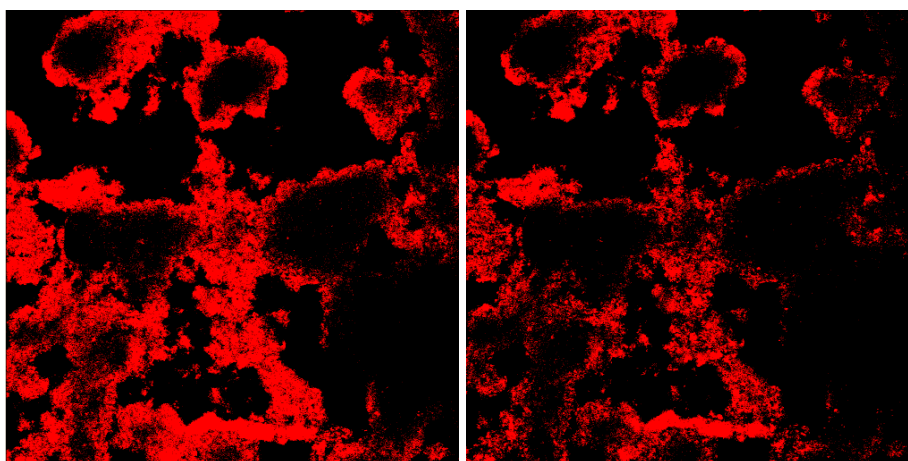


Figure 39 : images de segmentation de la biomasse totale (syto9) ; à gauche avec le seuil bas (= 25), à droite le seuil haut (= 45)

La fraction estimée de chaque population spécifique (nitrosante et nitratante) dépend donc de quatre mesures, (2 seuils pour la biomasse spécifique par 2 seuils pour la biomasse totale).

Fractions obtenues avec les différents seuils

La Figure 40 reporte quatre exemples de fractions mesurées pour les différents seuils employés.

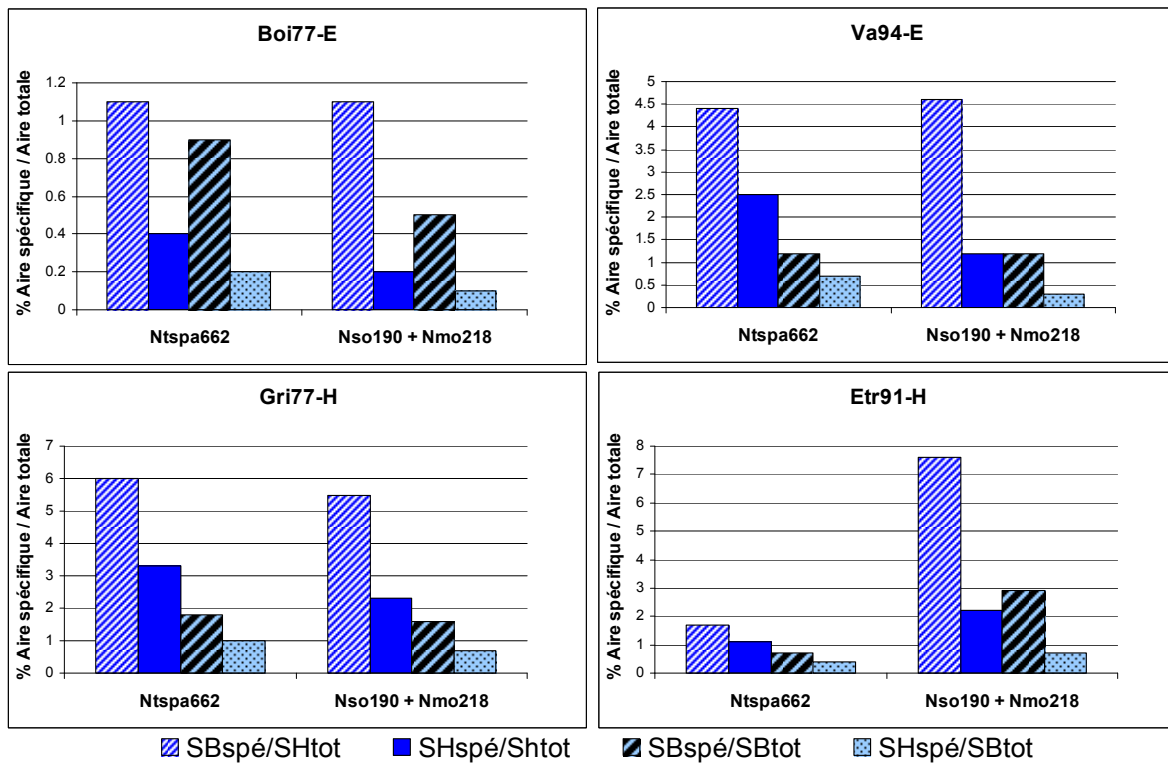


Figure 40 : quatre exemples de fractions surfaciques mesurées avec les différents seuils de coupures établis selon le protocole défini.

Pour une même segmentation de la biomasse totale, les fractions mesurées avec les deux seuils de la biomasse spécifique peuvent varier d'un facteur 4 ; de même que les fractions obtenues pour une même segmentation spécifique avec les deux seuils de la population totale. Ainsi, la plus faible fraction ($S_{Hspé}/S_{Btot}$) peut être jusqu'à 16 fois inférieure à la plus forte fraction ($S_{Bspé}/S_{Htot}$) mesurée sur la même série d'images.

La fraction estimée correspond à la moyenne des quatre mesures (équation 49). Les valeurs maximales et minimales obtenues respectivement pour les couples de seuils $S_{Bspé}/S_{Htot}$ et $S_{Hspé}/S_{Btot}$ représentent l'intervalle de confiance.

$$\%BM_{spécifique} = \frac{1}{4} * \left(\frac{S_{Hspé}}{S_{Htot}} + \frac{S_{Hspé}}{S_{Btot}} + \frac{S_{Bspé}}{S_{Htot}} + \frac{S_{Bspé}}{S_{Btot}} \right) \quad \text{équation 49}$$

3.2.1.4 Nombre d'images optimal

L'analyse d'un grand nombre d'images assure la représentativité de la mesure par rapport à la concentration moyenne à échelle macroscopique. Cependant, la durée de la procédure augmente avec le nombre d'images analysées. Ainsi, ce nombre doit être optimisé afin d'obtenir un résultat suffisamment représentatif pour une durée d'analyse raisonnable.

Les images ont été acquises avec un grossissement de 400X et représentent une surface de $0,11 \text{ mm}^2$ ($325,8 \times 325,8 \text{ }\mu\text{m}$). Ce grossissement ne permet pas de distinguer nettement les cellules au sein des amas, mais un plus fort grossissement demanderait plus d'images, donc plus de temps pour analyser une même superficie.

La représentativité d'une surface donnée dépend essentiellement de l'homogénéité de répartition de la biomasse ciblée dans l'échantillon. Plus la biomasse est répartie de façon homogène, plus petit sera l'échantillon nécessaire à sa représentation. Il est cependant impossible de connaître la valeur réelle de la fraction mesurée.

Afin d'analyser la justesse de la mesure en fonction du nombre d'images, la totalité d'un puits marqué a été photographié. La fraction obtenue avec la totalité des images a été considérée comme la valeur de référence, à laquelle ont été comparées les fractions mesurées avec différentes portions de la série d'image.

L'impact du nombre d'images sur la fraction surfacique mesurée a été étudié pour l'échantillon Val94 marqué avec les sondes Nmo218, Nso190, ainsi que pour le cumul de ces deux sondes (noté AOB). La surface couverte par les boues dans le puits analysé permettait l'acquisition d'une série de 40 images différentes.

Les fractions surfaciques pour chacune des deux sondes et pour le cumul des deux ont été mesurées pour des jeux d'images de nombre croissants de 5 en 5, toutes segmentées de façon identique.

La Figure 41 présente l'évolution de l'erreur mesurée par rapport à la fraction surfacique obtenue pour les 40 images (valeur de référence).

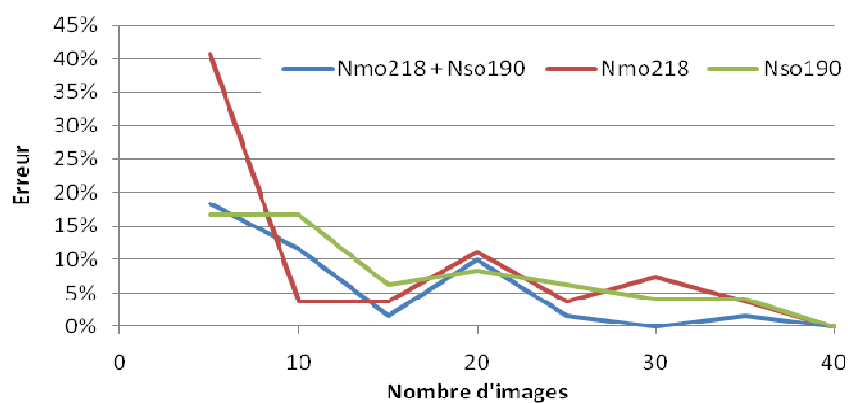


Figure 41 : évolution de l'erreur sur la fraction surfacique mesurée en fonction du nombre d'images

Pour la série de 20 images, l'erreur calculée présente un pic qui dépasse les 10% pour Nmo218. Le pic observé pour 20 images est dû à la présence d'une accumulation de bactéries marquées avec Nmo218 parmi les 5 images ajoutées à la série de 15. Cette observation reflète la répartition peu homogène à l'échelle microscopique de la biomasse nitrifiante dans les boues activées. Il n'est en effet pas rare d'observer sur un même puits des images sans biomasse marquée avec les sondes spécifiques, et des images contenant une forte accumulation d'amas nitrifiants, et/ou des amas de grande dimension.

Remarque : La biomasse nitrifiante est constituée d'amas plus petits que la biomasse nitrosante, et répartis de façon plus homogène dans les floes. La précision de la mesure réalisée pour un même nombre d'images est donc supérieure pour la biomasse nitrifiante.

D'après les analyses réalisées, il semble qu'au moins **25 images** (soit 2,65 mm²) soient nécessaires pour une estimation correcte (avec moins de 10 % d'erreur) de la fraction de bactéries nitrosantes d'un échantillon de boues activées. L'acquisition de 25 images dure entre 40 et 60 minutes, et l'analyse des images dure environ 90 minutes (fixation des seuils, segmentation des trois séries, révision des images). Ainsi, chaque échantillon, analysé par **l'acquisition et le traitement de 25 images, nécessite entre 130 et 150 minutes** d'analyse après l'hybridation.

Dans la littérature, le nombre d'images généralement analysé est plus faible que 25. Par exemple, 20 images suffisent à analyser la population nitrosante dans un lit bactérien (Biesterfeld *et al.* 2001). Dans un échantillon contenant 70% de biomasse nitrosante, 12 images suffisent à obtenir une mesure assez précise de la proportion des populations (Bouchez *et al.* 2001). Mais ces études d'intéressaient à des populations plus abondantes et plus

homogènes que les populations nitrifiantes des boues activées de stations d'épuration municipales à très faible charge.

La durée de la procédure est donc un des principaux inconvénients de cette méthode, surtout pour l'analyse d'un grand nombre d'échantillons. En comparaison, la QPCR (cf. § 1.5.3.2) permet d'analyser une dizaine d'échantillons en quelques heures et de façon automatisée.

Le marquage FISH peut également être analysé par d'autres méthodes moins longues : une méthode d'analyse (Manser *et al.* 2005b) permet de mesurer les populations nitrifiantes d'un échantillon de boues activées en 5 à 15 minutes. Elle consiste à mesurer directement au microscope les diamètres des amas de bactéries nitrifiantes (considérés de formes sphériques), à l'aide d'une grille, puis de calculer le biovolume des amas de 10 à 15 champs et de le rapporter à la surface couverte par les floes des champs analysés.

3.2.1.5 Reproductibilité de la méthode

La mesure des fractions de biomasse nitrosante et nitratante avec le protocole établi a été réalisé sur deux échantillons à deux moments différents de la série d'analyses. La comparaison des résultats obtenus permet de constater si la méthode est reproductible.

Les résultats obtenus varient de 8,3 et 5,1 % pour la fraction nitrosante des deux échantillons respectivement. **La mesure semble donc présenter une variabilité de moins de 10% pour la biomasse nitrosante ciblée avec les sondes Nmo218 et Nso190 et marquées en Cy5.**

En revanche, pour **la fraction de biomasse nitratante, les variations observées pour les deux échantillons étaient de 57,8 et 27,4 % respectivement.** Cette forte variation est probablement due à la présence d'une plus forte auto-fluorescence des boues pour les longueurs d'ondes d'excitation et d'émission du fluorophore Cy3. De plus, les amas de bactéries nitratantes sont de plus petite taille et de formes plus variables que les amas de bactéries nitrosantes. Ainsi, lors du traitement des images, l'opérateur doit éliminer un plus grand nombre d'objets auto-fluorescents, tout en conservant la biomasse marquée constituée par un grand nombre de petits amas. La subjectivité de l'opérateur a donc un impact important sur le résultat final, ce qui se traduit par une faible reproductibilité de la mesure.

3.2.2 Résultats des mesures d'abondance

Les fractions de biomasses nitrosantes et nitratantes de l'ensemble des échantillons prélevés au cours des différentes campagnes de mesures ont été analysées suivant le protocole établi, à

l'exception des échantillons Etr91-H08, et Sma7-H. Treize échantillons d'été et onze échantillons d'hiver ont donc été analysés (cf. annexe 5).

3.2.2.1 Abondance relative des populations nitrifiantes des boues activées

L'ensemble des fractions mesurées ainsi que leurs concentrations en MVS sont reportés annexe 7.

Les fractions de biomasse nitrosante sont estimées entre 0,5 % et 3,4 % de la biomasse totale (vivante et morte), et les fractions de biomasse nitratante entre 0,5 % et 3,0 %. Ces valeurs correspondent assez bien à la gamme habituellement reportée pour des stations d'épuration municipales. Par exemple, le calage de différents modèles sur des stations de type municipale à faible charge fournit des proportions de bactéries autotrophes (nitrosantes et nitratantes confondues) comprises entre 2 et 5% de la biomasse totale vivante (X_{BH}) (Stricker 2000 ; Koch *et al.* 2001 ; Choubert 2002 ; Marquot 2006). Par ailleurs, les analyses réalisées par des méthodes moléculaires fournissent une gamme de fractions extrêmement large, allant de 0,0033 % (Dionisi *et al.* 2002) à 15 % (Wagner *et al.* 1995).

La gamme des fractions mesurées étant très faible, les petites différences de mesures prennent une importance relative significative. Par exemple, une variation de 0,25 % de la fraction de biomasse représente un dixième de la gamme si celle-ci est comprise entre 0,5 et 3 %.

La concentration des biomasses nitrosantes et nitratantes a été estimée à partir de la fraction estimée et de la mesure des matières volatiles en suspension (MVS) selon l'équation 50.

$$BM_{\text{spé}} = \%BM_{\text{spé}} * BM_{\text{tot}}/100 \quad \text{équation 50}$$

où $BM_{\text{spé}}$ est la concentration en biomasse spécifique ; $\%p_{BM_{\text{spé}}}$ est le pourcentage de biomasse spécifique ; et BM_{tot} est la concentration en biomasse totale, mesurée en g_{MVS}/L lors du prélèvement selon le protocole standard.

Ainsi, les concentrations en biomasses nitrosantes et nitratantes des boues prélevées sont calculées selon les équations 51 et 52.

$$[X_{BA}]_{MVS} = \%X_{BA} * [MVS] \quad \text{équation 51}$$

$$[X_{BN}]_{MVS} = \%X_{BN} * [MVS] \quad \text{équation 52}$$

Les valeurs de MVS de l'ensemble des échantillons analysés sont présentées sur la Figure 42.

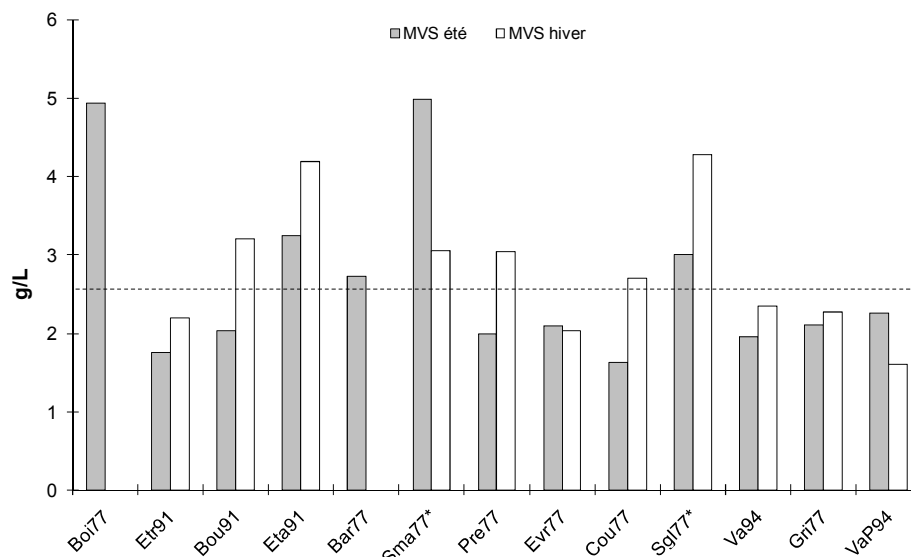


Figure 42 : concentrations de biomasse totale mesurées en mgMVS/L pour l'ensemble des échantillons.
* : Les échantillons d'hiver de Sgl77 et Sma77 correspondent à l'hiver 2007/2008.

Les concentrations en MVS sont comprises entre 1,6 et 5 g/L. La moyenne des concentrations est de 2,6 g/L (indiquée par le trait en pointillés).

Les concentrations des biomasses spécifiques calculées à partir des concentrations en MVS et des fractions surfaciques sont représentées sur les figures 43 et 44.

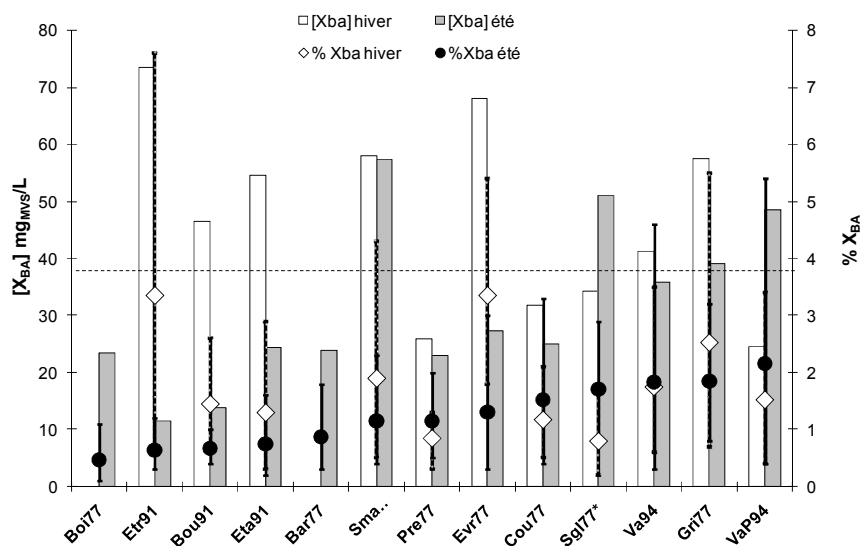


Figure 43 : fractions et concentrations de la biomasse nitrosante.
* : Les échantillons d'hiver de Sgl77 et Sma77 correspondent à l'hiver 2007/2008.

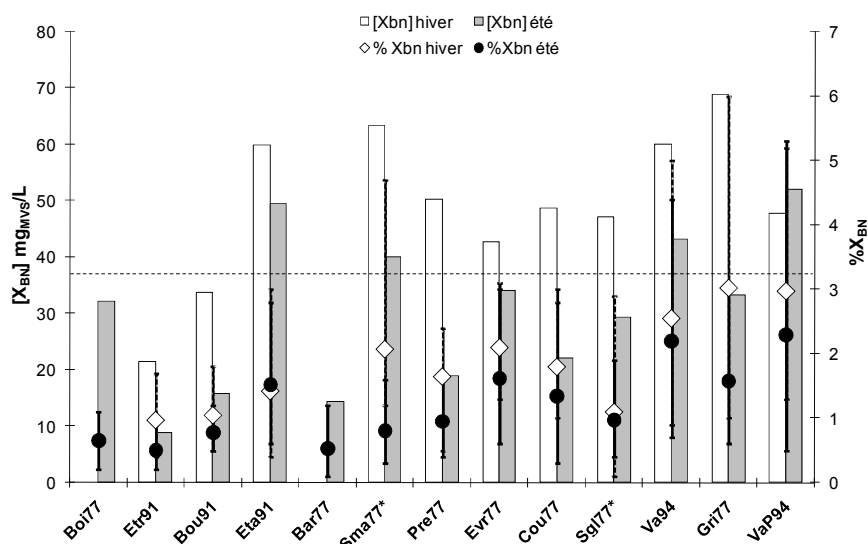


Figure 44 : fractions et concentrations de la biomasse nitratante

* : Les échantillons d'hiver de Sgl77 et Sma77 correspondent à l'hiver 2007/2008.

Remarque : Les échantillons des figures 42, 43 et 44 sont classés dans le même ordre, selon le % X_{BA} en été croissant.

Les concentrations des biomasses spécifiques sont comprises entre 11,4 et 73,5 mg_{MVS}/L pour la biomasse nitrosante, et entre 8,8 et 68,9 mg_{MVS}/L pour la biomasse nitratante. Leurs moyennes (représentées par les traits en pointillés) sont identiques et égales à 38 mg_{MVS}/L .

Les plus fortes concentrations en biomasse spécifique observées résultent soit d'une concentration élevée en MVS (par exemple Bou91-H, Eta91-H, Sma77 E et H08) soit d'une fraction de biomasse spécifique relativement importante (par exemple Etr91-H, Evr77-H et Gri77-H pour les X_{BA} , Val94-H, Gri77-H et VaP94-H pour les X_{BN}).

3.2.2.2 Variations saisonnières

Les échantillons dont la concentration estimée est supérieure à la moyenne sont en majorité des échantillons hivernaux (7/11 pour les X_{BA} et 9/13 pour X_{BN}). D'ailleurs, les moyennes des concentrations estivales et hivernales sont respectivement de 30,9 et 46,9 mg_{MVS}/L pour les X_{BA} , et de 29,0 et 49,4 pour les X_{BN} . Il semble donc que les populations nitrifiantes soient plus abondantes en période hivernale qu'en période estivale.

Il a été reporté par Marquot (2006) que la biomasse autotrophe présente un taux de décès (b_A) plus faible à 10°C (0,13 j^{-1}) qu'à 20°C (0,17 j^{-1}), ce qui compense la diminution du taux de croissance et conduit à une augmentation de la biomasse autotrophe du système pour une

même charge nitrifiée. Ainsi en période hivernale, la perte d'activité nitrifiante des bactéries est partiellement compensée par une augmentation de la quantité de biomasse autotrophe.

Il semble donc que la biomasse nitrosante soit généralement plus abondante en hiver qu'en été.

La Figure 45 présente les différences de populations nitrosantes et nitratantes mesurées en fonction des différences de température dans les bassins au moment du prélèvement. Chaque point représente une station d'épuration échantillonnée en été et en hiver.

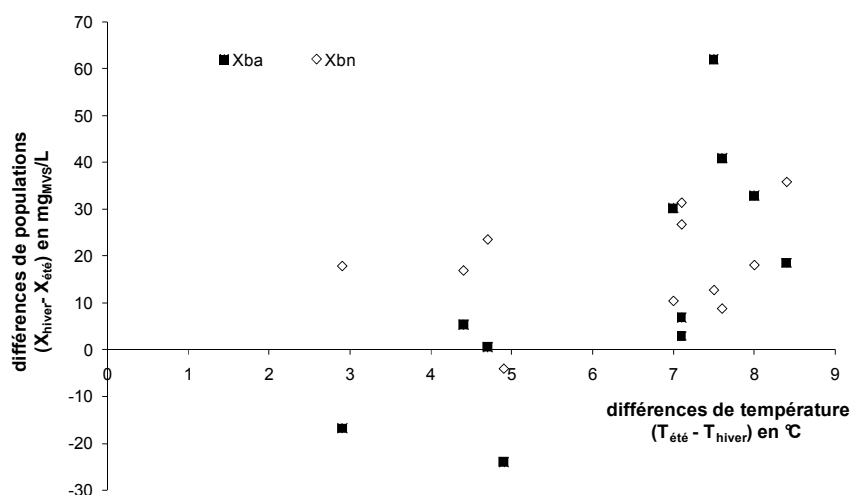


Figure 45 : variations des concentrations en X_{BA} et X_{BN} en fonction des différences de température entre l'été et l'hiver

Les différences de populations nitrosantes (X_{BA}) les plus importantes sont observées pour des températures ayant varié de plus de 7°C ; et les deux échantillons pour lesquels la population mesurée est plus abondante en été qu'en hiver (Sgl77 et VaP94, points négatifs sur la Figure 45) correspondent à des variations de température inférieures à 5°C .

Cependant, la corrélation entre la variation de température et les variations de biomasses nitrifiantes ne peut être clairement établie ni pour les X_{BA} , ni pour les X_{BN} . En effet, l'incertitude est élevée car chaque point résulte de deux estimations de biomasses, et de deux mesures de température, et que ces mesures correspondent à l'état des boues activées au moment du prélèvement, qui n'est pas forcément représentatif de l'état d'équilibre moyen du système.

3.2.2.3 Ratios des populations nitrosantes/nitratantes des boues activées (X_{BA}/X_{BN})

Les ratios X_{BA}/X_{BN} sont compris entre 0,5 et 1,6 excepté pour Etr91-H dont le ratio obtenu est de 3,4. La moyenne des ratios des 24 échantillons analysés est de 1,10. Les deux populations sont donc présentes dans des proportions équivalentes.

Dans la littérature, des résultats fortement contradictoires sur ce ratio ont été rapportés : certaines études révèlent une dominance des bactéries nitrosantes entre 2,2 et 6,3 (You *et al.* 2003 ; Li *et al.* 2007), et expliquent cette dominance par les différences de rendement de chacune de ces biomasses. En effet, l'oxydation de l'ammonium génère 66 à 84 kcal/mol_{NH₄}, alors que l'oxydation des nitrites ne génère que 17,5 kcal/mol_{NO₂}. Ainsi, pour une même charge d'azote ammoniacal nitrifiée, les bactéries nitrosantes disposent de beaucoup plus d'énergie pour leur croissance et leur maintenance que les bactéries nitratantes.

Néanmoins, plusieurs études ont reportés des quantités de bactéries nitratantes 30 à 190 fois supérieures aux bactéries nitrosantes (Schramm *et al.* 2000 ; Gieseke *et al.* 2001 ; Dionisi *et al.* 2002). Cette grande disparité de résultats provient de l'emploi de méthodes différentes (PCR, FISH, méthodes culturales) et du ciblage d'organismes différents (différentes sondes FISH ou amorces PCR).

Les ratios obtenus ici seront comparés aux vitesses de nitrosation et de nitration mesurées dans le chapitre suivant, au paragraphe 3.3.2.2.

3.2.2.4 Abondance des populations nitrifiantes de la solution commerciale

La mesure des fractions de biomasses nitrosantes et nitratantes de la solution NB a été réalisée par une hybridation dans un tampon à 40 % FM, avec les sondes Nso190 et NIT3.

D'après les mesures réalisées, les biomasses nitrosantes et nitratantes de la solution NB représentent respectivement $44,9 \pm 6,0$ %, et $23,7 \pm 3,4$ % de la biomasse totale. Par déduction, 31,4 % de la surface observée de biomasse totale n'étaient pas hybridés par les sondes utilisées. Or, la solution NB est constituée de bactéries sélectionnées, dont la diversité se résume à une espèce nitrosante unique et une espèce nitratante unique. Ainsi, les 37,8 % de biomasse non marqués correspondent à priori à de la biomasse morte, ou à de la biomasse hétérotrophe.

La quantité de biomasse totale de la solution NB a été estimée par des mesures de DCO (571 mg/L) et de MVS (426 mg/L). Les concentrations des biomasses nitrosantes ($[X_{SA}] = 256 \text{ mg}_{\text{DCO}}/\text{L}$ ou $190 \text{ mg}_{\text{MVS}}/\text{L}$) et nitratantes ($[X_{SN}] = 135 \text{ mg}_{\text{DCO}}/\text{L}$ ou $100 \text{ mg}_{\text{MVS}}/\text{L}$) de la solution ont donc été calculées à partir de la fraction estimée et de ces mesures.

3.2.3 Conclusions

La technique de marquage FISH a été utilisée afin d'estimer les concentrations des biomasses nitrosantes et nitratantes, par la détermination de leurs fractions relatives à la biomasse totale. Un protocole de marquage, d'acquisition et d'analyse d'images a été établi dans l'objectif d'estimer de façon reproductible les fractions des biomasses nitrosantes et nitratantes dans les échantillons de boues activées de stations d'épuration municipales. La mise au point du protocole fait ressortir les points suivants :

- Afin de cibler l'ensemble des biomasses nitrosantes et nitratantes, les sondes Nso190 et Nmo218 ont été employées conjointement avec le fluorophore Cy5 pour la biomasse nitrosante, et la sonde Ntspa662 marquée en Cy3 a été ajoutée pour le marquage de la biomasse nitratante. Le marquage a été réalisé dans un tampon à 35% de formamide.
- La biomasse totale peut être marquée par un mélange de sondes EUB marquées en FITC, ou par des marqueurs de l'ADN tel que le Syto9. Ce marqueur a été retenu pour les analyses réalisées.
- La segmentation des images est réalisée par seuillage des intensités : les pixels d'intensité supérieure au seuil sont conservés, les autres sont assimilés au bruit de fond et éliminés. La détermination des seuils de coupure a un impact important sur la surface retenue et la fraction mesurée peut varier d'un facteur 2 à 4 pour de faibles fractions.
- La fixation des seuils de coupure ne peut être réalisée selon des critères objectifs que dans des cas particuliers où l'auto-fluorescence de l'échantillon est faible. Sinon, elle conduit à une sous-estimation importante de la fraction mesurée.
- Face aux difficultés de détermination répétable et objective des seuils de coupure, les images de chacun des trois canaux (biomasse totale, biomasse nitrosante et biomasse nitratante) ont été segmentées par deux seuils de coupure différents, résultant respectivement en une surestimation et une sous-estimation de la surface marquée. Chaque fraction mesurée est la moyenne de 4 fractions mesurées (2 seuils de populations spécifiques fois deux seuils de population totale).

- Les artefacts auto-fluorescents de plus grande taille ont été éliminés manuellement lors de la segmentation.

L'ensemble des échantillons a alors été analysé selon le protocole établi. Les fractions de biomasses ont été converties en abondances volumiques en les multipliant par les concentrations des matières volatiles en suspension (MVS). Les principales conclusions de ces mesures sont les suivantes :

- La biomasse nitrosante des boues activées représente 0,5 % à 3,4 % de la biomasse totale, et la biomasse nitratante 0,5 % à 3,0 %.
- Les concentrations sont comprises entre 11,4 et 73,5 mg_{MVS}/L pour la biomasse nitrosante, et entre 8,8 et 68,9 mg_{MVS}/L pour la biomasse nitratante.
- Les biomasses nitrosantes et nitratantes sont généralement plus abondantes en hiver qu'en été sur un même site.
- Les proportions de biomasses nitrosantes et nitratantes sont équivalentes pour la majorité des mesures (ratio $X_{BA}/X_{BN} \approx 1$).
- Dans la solution NB, la biomasse nitrosante (composée de *Nitrosomonas europaea*) représente $44,9 \pm 6,0$ % de la biomasse totale, et la biomasse nitratante (*Nitrobacter*) $23,7 \pm 3,4$ %.

Les résultats de ces mesures seront ultérieurement comparés aux activités nitrosantes et nitratantes mesurées ainsi qu'aux données de fonctionnement des stations d'épuration échantillonnées (partie 3.3.4.1).

3.3 Activités nitrifiantes

Les vitesses de nitrification de 31 échantillons de boues activées prélevés sur des stations d'épuration municipales à faibles charges (cf. annexe 5) ont été mesurées en présence d'un excès de substrat par le suivi des formes solubles d'azote minéral et par respirométrie. Les échantillons de la solution NB ont également été analysés selon les mêmes méthodes, avec une adaptation du protocole (cf. § 3.4.3.2).

Le suivi des formes solubles d'azote minéral (NH_4 , NO_2 et NO_3) permet de mesurer les vitesses de nitrosation (notées ρ_{BA}) et de nitratisation (notées ρ_{BN}) par mesure directe. La respirométrie vise à estimer indirectement plusieurs paramètres cinétiques des biomasses nitrifiantes à partir de la mesure de la respiration bactérienne de l'échantillon à caractériser. L'objectif de ces mesures était d'obtenir un jeu de paramètres expérimentaux représentant les populations nitrosantes (μ_{BA} , K_{NHB} , et Y_{BA}) et nitratantes (μ_{BN} , K_{NOB} , et Y_{BN}) des stations d'épuration municipales à très faible charge ainsi que celles de la solution NB.

La détermination des taux de croissance maximaux (μ_{BAmax} et μ_{BNmax}) à partir des vitesses de réaction nécessite de connaître les concentrations de chaque biomasse. Les résultats des mesures d'abondance réalisées par marquage FISH (cf. § 4.2.3) ont donc été utilisés dans ce but.

Les mesures chimiques des formes de l'azote ayant été réalisées en parallèle aux mesures de respiration, les respirogrammes obtenus sont d'abord décrits, puis les vitesses de nitrosation et de nitratisation sont analysées.

3.3.1 Analyse critique des mesures respirométriques

3.3.1.1 Observation générale des respirogrammes

Des mesures respirométriques ont été réalisées sur 31 échantillons de boues activées (cf. annexe 5), ainsi que sur la solution commerciale NB.

3.3.1.1.1 Respirogrammes « classiques »

La Figure 46 présente un exemple de respirogramme dit « classique », dont l'allure correspond à celle de la majorité des respirogrammes obtenus.

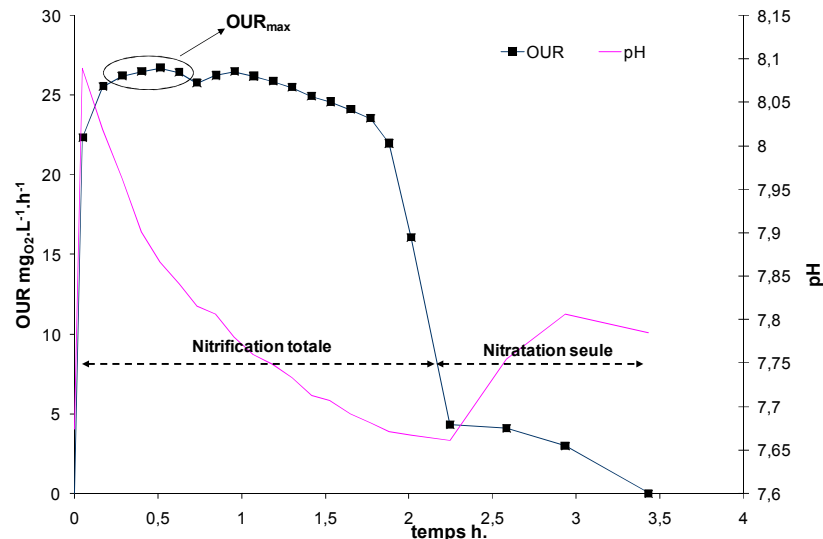


Figure 46 : exemple de respirogramme (Gri77-H), indication des points utilisés pour la mesure de l'OUR_{max}

Deux phases peuvent généralement être distinguées : la phase de nitrification totale, en présence d'ammonium, puis la phase de nitratation seule, lorsque le milieu ne contient plus que des nitrites. Sur le respirogramme de la Figure 46, la phase de nitrification totale a lieu de 0 à 2,2 heures. La phase de nitratation seule commence à partir 2,2 heures. Cette seconde partie du respirogramme est désignée par « palier de nitratation ».

Le palier de nitratation n'apparaît que si des nitrites en quantité suffisante sont présents à la fin de la phase de nitrification totale (fin de la nitrosation). Pour 7 des 21 premiers respirogrammes réalisés sur des boues activées (échantillons été (E) et hiver (H)), le palier de nitratation n'a pas été observé, car les nitrites ont été consommés au fur et à mesure de leur formation. Le protocole a donc été adapté et des nitrites ont été injectés avant ou simultanément à l'injection d'ammonium afin d'augmenter leur quantité totale et d'allonger la durée de leur consommation.

Remarque : Le pH n'était pas régulé, mais son évolution était enregistrée en même temps que la concentration en oxygène (cf. Figure 46). La solution de substrat présentait un pH élevé (>8,4) responsable d'une augmentation du pH au moment de l'injection mais de faible amplitude (0,4 unités pH environ). La réaction de nitrification totale provoque la diminution du pH pendant la première période car elle consomme des ions carbonates (basiques). En revanche, le pH augmente pendant la phase de nitratation car le bilan d'alcalinité de cette réaction isolée est positif.

3.3.1.1.2 Respirogrammes atypiques

Certains respirogrammes obtenus présentait des allures atypiques, dont la Figure 47 présente quelques exemples.

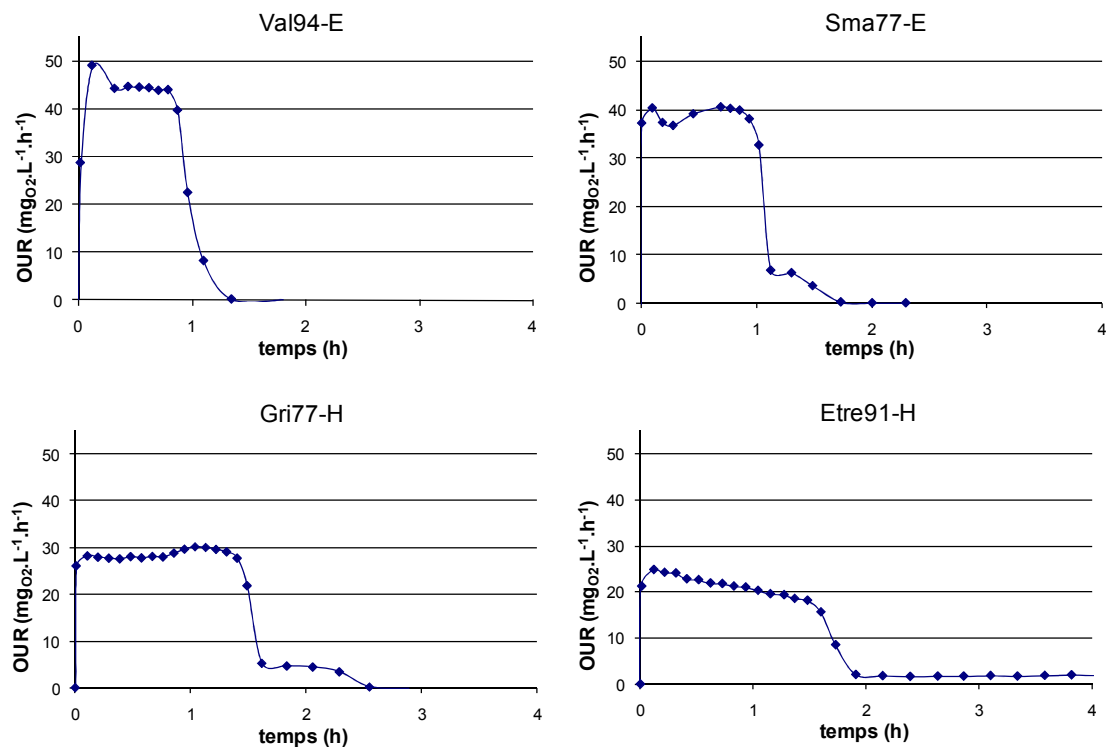


Figure 47: quatre exemples de respirogrammes « atypiques ».

Certains respirogrammes présentent une bosse en début de mesure (Val94-E et Sma77-E), d'autres en fin de phase de nitrification (Gri77-H et Sma77-E). Par ailleurs, le respirogramme d'Etre91-H ne présente pas de plateau, mais une diminution progressive de la respiration pendant toute la phase de nitrification totale. De plus, le palier de nitratisation de ce respirogramme est très bas ($1,8 \text{ mgO}_2 \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$) comparé à la majorité des paliers observés, ce qui traduit une faible activité nitratante.

Ces variations atypiques de la respiration exogène sont difficilement explicables à partir des seules données de respirométrie. Elles peuvent résulter de la présence d'un inhibiteur dans les boues, agissant sur l'une et/ou l'autre des deux réactions (nitrosation et nitratisation), et dont l'effet varie avec l'évolution du milieu (pH ou concentrations des substrats et produits).

3.3.1.1 Reproductibilité des respirogrammes

Afin de vérifier la reproductibilité des profils respirométriques, la même boue a été introduite dans deux respiromètres en parallèle, et des ajouts similaires ont été effectués simultanément. La Figure 48 présente les profils d'OUR enregistrées, et les respirogrammes obtenus, pour un ajout de $10 \text{ mg}_{\text{N-NH}_4} / \text{L}$ après déduction de la respiration endogène.

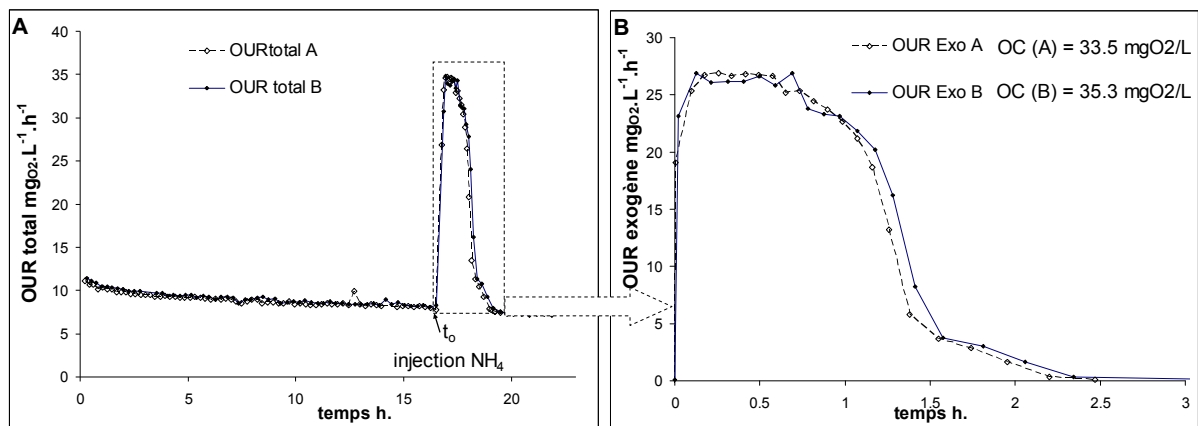


Figure 48: reproductibilité des expériences respirométriques, OUR_{total} (A) et exogène (B). La figure B correspond au cadre en pointillés de la figure A, après soustraction de la respiration endogène, et repositionnement de l'origine des temps. L'oxygène consommé (OC) correspond à l'aire sous la courbe.

Les courbes des respirations endogènes des deux réacteurs sont superposables ; les respirogrammes de respiration exogènes sont globalement similaires. Des ajouts différenciés de 5, 10, 15 et 20 mg_{N-NH4}/L_{réacteur} ont été réalisés dans les deux respiromètres simultanément. Pour chaque respirogramme obtenu, l'oxygène total consommé (OC = aire sous la courbe) et les OUR_{max} (moyennes des points du premier plateau) ont été calculés. Le Tableau 13 présente les résultats obtenus pour chaque injection dans les 2 respiromètres, ainsi que l'écart entre les mesures.

Tableau 13 : résultats principaux des tests de reproductibilité de la respirométrie. Les écarts entre A et B sont exprimés en pourcentage de la moyenne.

NH4 ajouté	Réacteur A		Réacteur B		Ecart A-B	
	OC	OUR _{max}	OC	OUR _{max}	OC	OUR _{max}
5	17,0	21,83	16,6	22,11	2,1%	1,3%
10	33,5	26,75	35,3	26,40	5,2%	1,3%
15	53,8	23,90	52,0	25,09	3,4%	1,1%
20	71,7	25,30	72,5	25,42	1,0%	0,5%

Les écarts observés pour l'oxygène consommé OC sont faibles ($\leq 5,2$ % de la valeur moyenne). Pour la mesure de l'OUR_{max}, l'écart maximal observé est encore plus faible : 1,3% de la valeur moyenne. La méthode est donc considérée comme répétable.

3.3.2 Vitesses de nitrification et respiration

La capacité nitrifiante des boues activées échantillonnées a été évaluée par la mesure des vitesses de nitrosation et de nitratisation par suivi des formes de l'azote et respirométrie en excès d'ammonium.

La respirométrie consiste à utiliser la respiration des boues activées comme indicateur de leur activité bactérienne. Le principal avantage de cette technique est de permettre l'analyse des

cinétiques biologiques en suivant uniquement l'évolution de la concentration en oxygène du milieu. Cependant, la conversion des vitesses de consommation d'oxygène en vitesses de réaction nécessite de bien connaître le rapport entre la respiration mesurée et les cinétiques biologiques des réactions ayant effectivement lieu dans le milieu analysé. Dans le cas de la respirométrie appliquée aux boues activées, les réactions sont de deux types : les réactions liées à l'auto-oxydation des boues appelées réactions endogènes, et les réactions liées à la consommation du substrat introduit, appelées réactions exogènes.

Les relations théoriques entre la respiration des populations nitrifiantes et les vitesses de nitrosation et de nitratisation sont déduites des équations stœchiométriques théoriques présentées dans la partie « Synthèse bibliographique » (§ 1.1.2.3.3 page 31). De nombreuses études utilisent ces relations théoriques pour l'analyse des résultats de respirométrie (Vanrolleghem *et al.* 1995, Chandran et Smets 2000 ; Marsili Libelli *et al.* 2001 ; Petersen *et al.* 2001), mais peu d'entre elles ont comparé les données respirométriques à des mesures directes de l'évolution des substrats et/ou des produits (Chandran *et al.* 2008).

L'objectif des mesures réalisées était d'étudier les réactions de nitrosation (ρ_{BA}) et nitratisation (ρ_{BN}) par la mesure de la respiration exogène. Cependant, les réactions endogènes ayant lieu simultanément devront être prises en compte dans l'interprétation des résultats.

Les vitesses réelles de nitrosation et de nitratisation ont été mesurées par le suivi de la vitesse de production des N_{Ox} et des NO_3 respectivement, généralement complété par le suivi de la consommation d'ammonium. Les respirations mesurées simultanément ont alors été comparées aux vitesses de ces deux réactions obtenues pour l'ensemble des échantillons analysés.

3.3.2.1 Cas des boues activées

3.3.2.1.1 Vitesses initiales déterminées par mesures chimiques

Vitesses de nitrosation ($N_{Ox}PR$) et de nitratisation (N_tPR)

Les vitesses de nitrosation et de nitratisation ont été déterminées par le suivi des formes d'azote minéral au cours du temps pour 28 échantillons de boues activées (cf. annexe 5).

Six prélèvements ont été réalisés au début de chaque mesure respirométrique (pendant 25 minutes), permettant d'estimer les vitesses initiales de nitrosation et de nitratisation (cf. § 2.4.1). La Figure 49 présente un exemple de suivi réalisé.

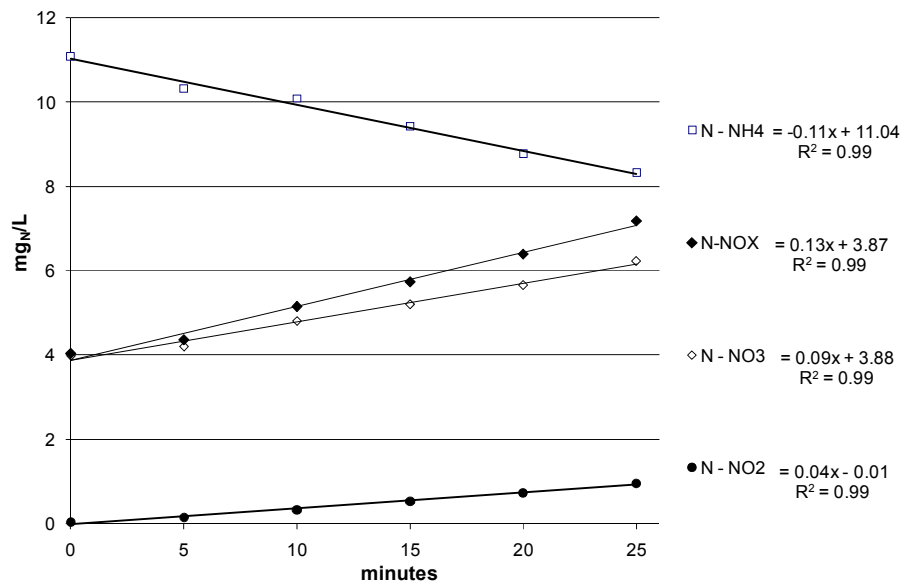


Figure 49 : exemple d'évolution des formes d'azote minéral au début d'une mesure respirométrique (Boues de Eta91 été), et vitesses d'augmentation de chaque.

L'évolution des concentrations mesurées est linéaire avec des coefficients de corrélation généralement supérieurs à 0,99.

La vitesse de nitrosation expérimentale est déterminée à partir des mesures N_{Ox} ($NO_2 + NO_3$). Elle est notée N_{OxPR} . De la même façon, la vitesse de nitratisation expérimentale est déterminée à partir des mesures de nitrates, et est notée N_tPR .

L'ensemble des résultats obtenus pour les boues activées est reporté en annexe 7.

Les vitesses de nitrosation mesurées sont comprises entre 3,7 et 12,5 $mg_{NOx} \cdot L^{-1} \cdot h^{-1}$, et les vitesses de nitratisation entre 2,7 et 13,0 $mg_{NO_3} \cdot L^{-1} \cdot h^{-1}$. En divisant par la concentration en MVS des échantillons, on obtient des vitesses spécifiques comprises entre 1,4 et 6,4 $mg_{NOx} \cdot g_{MVS}^{-1} \cdot h^{-1}$ pour la nitrosation, et entre 0,9 et 5,4 $mg_{NO_3} \cdot g_{MVS}^{-1} \cdot h^{-1}$ pour la nitratisation.

Les vitesses de nitrosation correspondent aux vitesses maximales de chaque échantillon car les mesures ont été réalisées en présence d'un excès d'ammonium. En revanche, pour la nitratisation, seules les vitesses mesurées avec une injection de nitrites en plus de l'ammonium correspondent de façon certaine à la vitesse maximale de nitratisation de l'échantillon. Les ratios entre ces deux vitesses seront discutés dans le paragraphe 3.3.2.2.

Augmentation des formes d'azote minéral (N_{minPR})

Dans les boues activées, les vitesses de nitrosation mesurées (N_{OxPR}) en absence de substrat carboné sont systématiquement supérieures aux vitesses de diminution de l'ammonium, ce qui traduit une augmentation des formes solubles d'azote minéral (N_{min}).

Cette augmentation pourrait être attribuée à un relargage sous forme ammoniacale de l'azote contenu dans la biomasse des boues activées ($i_{XB} = 0,0875 \text{ g}_N/\text{g}_{\text{DCO}}$) lors de son hydrolyse (auto-oxydation des boues).

Selon le concept de mort régénération (utilisé entre autres par les modèles ASM1 et ASM2), l'azote organique de la biomasse morte est relargué sous forme particulaire, qui est alors solubilisé, puis ammonifié (transformé en ammonium). L'ammonium ainsi relargué est en partie assimilé par la biomasse (majoritairement hétérotrophe en phase endogène), lors de la consommation de la matière organique soluble biodégradable. Le reste est nitrifié par la biomasse autotrophe. La Figure 50 présente de façon schématique les réactions de transformation des différentes formes de l'azote des boues activées (selon le concept de mort régénération).

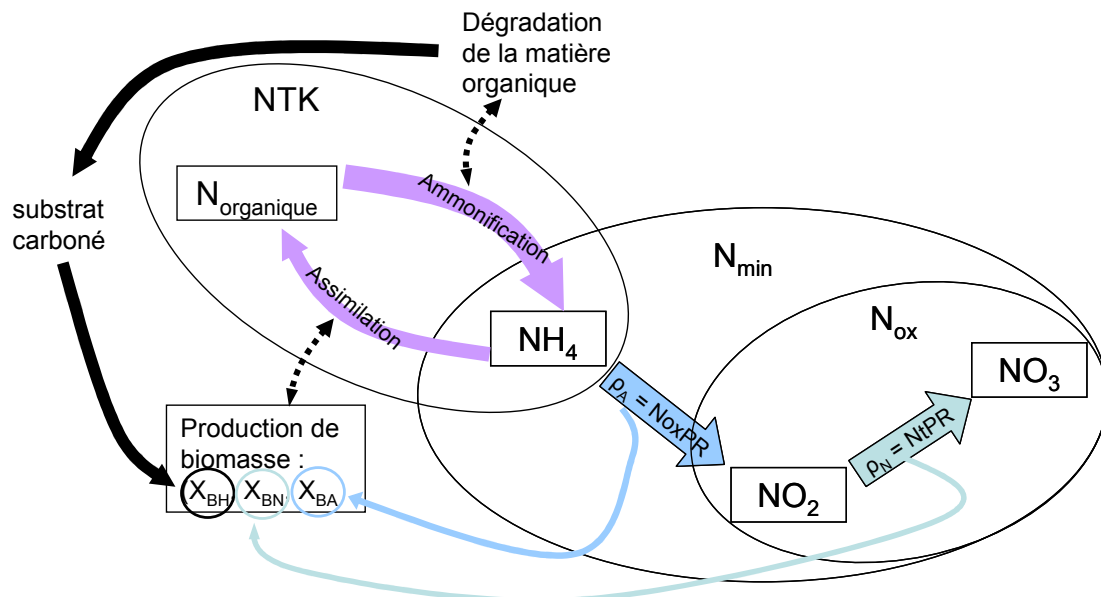


Figure 50 : schéma général des flux de transformation de l'azote dans les boues activées selon le concept de mort-régénération. Les flèches pleines représentent les flux de matière, et les flèches en pointillés indiquent les réactions simultanées.

La vitesse d'augmentation de l'azote minéral (qui sera notée $N_{\min}PR$) résulte de la différence entre l'ammonification et l'assimilation. Elle est mesurée par la différence entre la vitesse de nitrosation ($N_{Ox}PR$) et la vitesse de diminution de l'ammonium.

3.3.2.1.2 Respiration

A partir des respirogrammes dont un exemple est présenté sur la Figure 46 (p. 148) la respiration maximale (OUR_{\max}) est déterminée par la moyenne des points consécutifs les plus élevés au début de la phase de nitrification.

La moyenne des OUR obtenues au cours des 30 premières minutes de réaction (notée $OUR_{initial}$) a également été déterminée. Elle est comparée aux vitesses de réaction mesurées par analyses chimiques (cf. § 3.3.2.1.1).

Les OUR_{max} et les $OUR_{initial}$ obtenues pour les échantillons de boues activées sont reportées en annexe 7.

Les OUR_{max} mesurées sont comprises entre 9,3 et 50,5 $mg_{O_2} \cdot L^{-1} \cdot h^{-1}$, et les $OUR_{initial}$ représentent en 86 à 106 % de la valeur d' OUR_{max} (95 % en moyenne).

3.3.2.1.3 Comparaison de la respiration et des vitesses de réaction

D'après les équations stœchiométriques théoriques (cf. § 1.1.2.3.4), la respiration exogène mesurée par respirométrie correspond à la somme des respirations des activités nitrosantes (ρ_{BA}) et nitratantes (ρ_{BN}) selon l'équation 53 :

$$OUR = (3,43 - Y_{BA}) * \rho_{BA} + (1,14 - Y_{BN}) * \rho_{BN} \quad \text{équation 53}$$

où Y_{BA} et Y_{BN} sont les rendements de croissance des bactéries nitrosantes et nitratantes, dont les valeurs théoriques respectives sont de 0,14 et 0,08 g_{DCO}/g_N . Ainsi, la respiration mesurée au cours des 25 premières minutes du respirogramme peut théoriquement être recalculée à partir des vitesses de nitrosation ($\rho_{BA} = N_{OX}PR$) et de nitratation ($\rho_{BN} = N_tPR$) suivant l'équation 54

$$OUR_{initial} (\text{formesN}) = 3,29 N_{OX}PR + 1,06 N_tPR \quad \text{équation 54}$$

Ce calcul a été fait à partir des données des analyses chimiques (annexe 7), mais il ne permet pas de retrouver les valeurs d' $OUR_{initial}$ obtenues. Les $OUR_{initial}(\text{formes N})$ obtenues sont supérieures aux valeurs expérimentales de 23 % en moyenne, et de plus de 100% pour certains échantillons.

L'OUR expérimentale (exogène) correspond à l'OUR totale mesurée, diminuée de l'OUR endogène. Or, l'ammonium relargué dans le milieu lors de l'auto-oxydation des boues (cf. 3.3.2.1.1) est nitrifié au fur et à mesure de sa libération. La respiration endogène mesurée inclut donc une activité nitrifiante dont la consommation d'oxygène associée est notée $OUR_{nit-endo}$.

Lors de la soustraction de la respiration endogène des données respirométriques, $OUR_{nit-endo}$ est également soustraite. L'OUR exogène obtenu sous-estime donc la respiration réelle de l'activité nitrifiante comme schématisé sur la Figure 51.

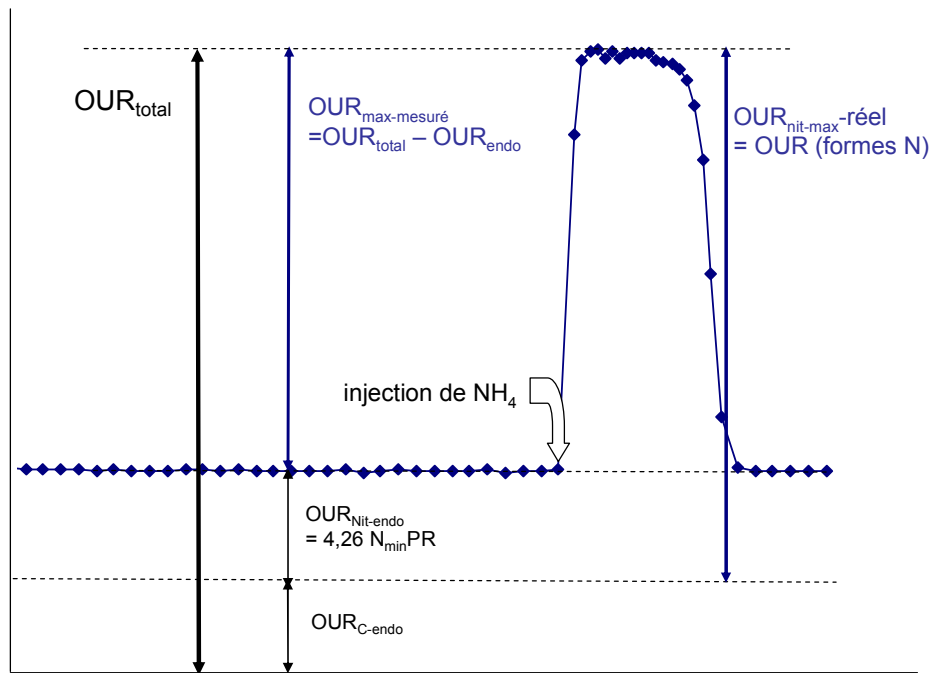


Figure 51 : représentation de l'écart de mesure entre l' OUR_{max} de l'activité nitrifiante réelle et mesurée. OUR_{C-endo} représente la respiration endogène liée aux transformations du substrat carboné.

La vitesse de relargage d'ammonium par l'auto-oxydation des boues est déterminée par l'augmentation de l'azote minéral $N_{min}PR$ (cf. § 3.3.2.1.1). D'après les coefficients stœchiométriques théoriques, la respiration associée est équivalente à $4,26 * N_{min}PR$ (nitrification totale de l'ammonium relargué).

L' OUR initiale mesurée sur les 25 premières minutes du respirogramme peut donc être recalculée à partir des vitesses mesurées par voie chimique selon l'équation 55.

$$OUR_{initial}(\text{formes N}) = 3,29 * N_{ox} PR + 1,06 * N_t PR - 4,26 * N_{min} PR \quad \text{équation 55}$$

La Figure 52 présente la corrélation obtenue entre l' $OUR_{initial}$ (respirométrie), moyenne des OUR sur les 30 premières minutes de mesure, et l' $OUR_{initial}$ (formes N) recalculée à partir des mesures des formes de l'azote selon l'équation 55.

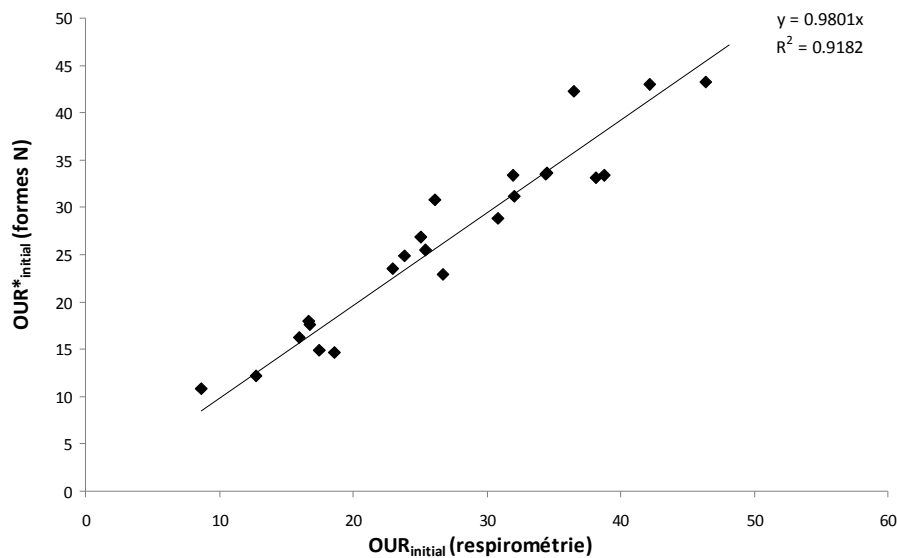


Figure 52 : comparaison des $OUR_{initial}$ calculées à partir des N_{Ox-PR} et N_t-PR mesurées, comparées aux $OUR_{initial}$ directement mesurées sur les respirogrammes.

Le suivi de l'évolution des formes de l'azote fournit des valeurs de respiration calculées à l'aide de l'équation 55 similaires à celles déterminées par respirométrie.

La consommation d'oxygène liée à la nitratisation ($1,06 \cdot N_t-PR$) représente entre 9 et 30 % de la respiration exogène ($3,29 \cdot N_{Ox-PR} + 1,06 \cdot N_t-PR$) et **le terme correctif ($-4,26 \cdot N_{min-PR}$) représente 6 à 45 % de la respiration exogène.**

Dans certains cas, le terme correctif ($-4,26 N_{min-PR}$) est supérieur à la respiration endogène mesurée avant l'injection de substrat (cf. annexe 7). Cependant, les mesures de N_{min-PR} sont d'une part imprécises, et d'autre part, rien ne permet d'affirmer que la vitesse de relargage de l'azote ammoniacal est constante avant et après l'injection de substrat.

Selon le concept de mort-régénération, la production de nitrates en phase de respiration endogène déterminée à l'aide du modèle ASM1 (cf. annexe 10) est de l'ordre de $0,064 \text{ g}_{N-NO_3}/\text{g}_{O_2\text{-endogène}}$. Les vitesses de relargage estimées à partir des OUR_{endo} (cf. annexe 7) et de ce ratio sont 1,1 à 8 fois inférieures aux valeurs expérimentales de N_{min-PR} , et aucun lien de proportionnalité n'a été observé entre ces deux mesures. Il conviendrait donc de préciser les processus impliqués dans l'auto-oxydation des boues (mortalité, hydrolyse, ammonification, etc.) en absence et en présence de substrats.

3.3.2.1.4 Conclusion

Les vitesses de nitrosation ($3,7$ à $12,5 \text{ mg}_{NO_x} \cdot L^{-1} \cdot h^{-1}$) et de nitratisation ($2,7$ à $13,0 \text{ mg}_{NO_3} \cdot L^{-1} \cdot h^{-1}$) ont été mesurées par suivi des formes de l'azote après l'injection d'un excès

d'ammonium. Ces analyses ont également permis d'observer une accumulation des formes d'azote minéral ($\text{NH}_4 + \text{NO}_2 + \text{NO}_3$) dans le milieu, attribué au relargage de l'azote contenu dans la biomasse des boues au cours de leur auto-oxydation.

La comparaison des mesures de vitesses de réaction par analyses chimiques avec les mesures respirométriques a mis en évidence des incohérences, probablement liées à un relargage d'ammonium au cours de la mesure.

L'introduction d'un terme correctif prenant en compte l'accumulation d'azote minéral permet de réconcilier les valeurs de consommation d'oxygène déterminées par respirométrie et celles issues d'analyses chimiques. Des mesures complémentaires sont toutefois nécessaires pour préciser les phénomènes liés à l'auto-oxydation des boues.

3.3.2.2 Ratios des populations et des activités nitrosantes/nitratantes

Dans les stations d'épuration, il est généralement admis que la nitrosation est l'étape limitante de la réaction globale de nitrification, et que les nitrites ne s'accumulent pas (c'est-à-dire que $\rho_{\text{BAmax}}/\rho_{\text{BNmax}} < 1$). Cependant, dans les conditions réelles de fonctionnement, les vitesses de ces réactions ne sont pas maximales car les concentrations en substrats sont faibles dans le milieu.

En revanche, les mesures réalisées ici visaient à déterminer la vitesse de nitrosation (ρ_{BA}) et de nitratation (ρ_{BN}) en présence d'un excès d'ammonium (et de nitrites pour certains échantillons). Les vitesses de nitrosation mesurées sont donc maximales, et les vitesses de nitratation correspondent à la vitesse maximale lorsque les concentrations en nitrites dans le milieu sont élevées, ce qui n'est généralement pas le cas après l'injection d'ammonium uniquement.

Les ratios des vitesses de nitrosation et de nitratation ($\rho_{\text{BA}}/\rho_{\text{BN}}$) ont été calculés à partir des valeurs reportées en annexe 7 ($\rho_{\text{BA}}/\rho_{\text{BN}} = \text{N}_{\text{OxPR}}/\text{N}_{\text{tPR}}$). Le Tableau 14 présente les ratios des abondances de populations nitrosantes et nitratantes ($X_{\text{BA}}/X_{\text{BN}}$) obtenus par marquage FISH, et les ratios des activités mesurées par analyses chimiques en présence d'un excès d'ammonium.

Tableau 14 ratios des populations nitrosantes et nitratantes (X_{BA}/X_{BN}), ratios des vitesses de nitrosation et de nitration (ρ_{BA}/ρ_{BN}), et présence d'un palier de nitration.

	X_{BA}/X_{BN}	ρ_{BA}/ρ_{BN}	Palier de nitration	X_{BA}/X_{BN}	ρ_{BA}/ρ_{BN}	Palier de nitration
	(FISH)	(N_{OxPR}/N_tPR)		(FISH)	(N_{OxPR}/N_tPR)	
	Eté			Hiver		
Etr91	1,30	1,47		3,44	3,33	X
Eta91	0,49	1,41	X	0,91	1,10	
Bou91	1,15	1,08		1,38	1,75	X
Boi77	0,73	1,06				
Sgl77	1,03	1,02		0,73*	0,75*	
Bar77	1,67	1,29	X			
Sma77	1,44	1,30	X	0,92*	0,82*	
Pre77	1,21	1,25		0,52	2,08	X
Cou77	1,13	1,12		0,65	2,08	X
Evr77	0,80	1,11		1,60	/	X
Gris77	0,85	1,32	X	0,83	1,85	X
Va194	1,21	1,49		0,69	1,30	X
VaP94	0,93	1,41		0,51	1,45	X

* Les échantillons d'hiver de Sgl77 et Sma77 correspondent à l'hiver 2007/2008, et leurs mesures ont été réalisées avec une injection simultanée d'ammonium et de nitrites

Afin de comparer plus facilement les ratios des abondances de population et ceux des vitesses de réaction, ils ont été représentés sur un même axe pour chaque station d'épuration (Figure 53). Les points dont les ratios présentent une différence supérieure à 0,5 ont été entourés.

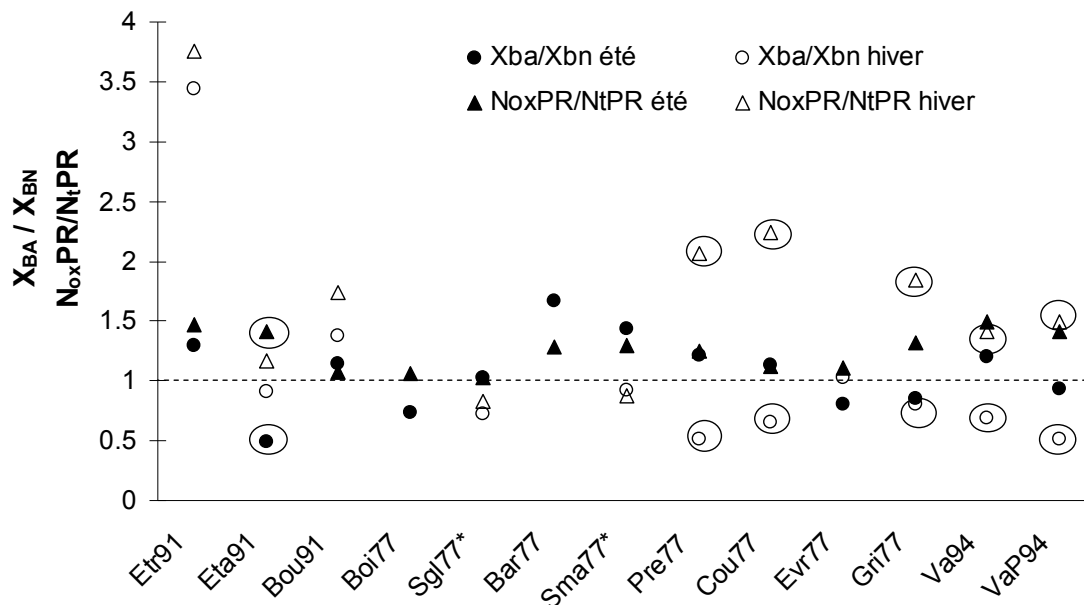


Figure 53 : ratios X_{BA}/X_{BN} et ratios ρ_{BA}/ρ_{BN} en été et en hiver pour les treize bassins échantillonnés.

Pour la majorité des échantillons, les ratios des abondances de populations (échantillons de 20 μ L) sont similaires aux ratios des vitesses (mesurées sur 5L).

Ainsi, malgré l'incertitude sur la quantification des biomasses, la proportion relative des biomasses nitrosantes et nitratantes (X_{BA}/X_{BN}) obtenues par marquage FISH est proche de la proportion de leurs vitesses de réaction respectives (ρ_{BA}/ρ_{BN}) en présence d'un excès d'ammonium. Les mesures réalisées avec un excès de nitrites et d'ammonium (Sgl77-H08 et Sma77-H08) fournissent des résultats similaires.

Les échantillons pour lesquels le ratio des activités est fortement supérieur au ratio des biomasses (points entourés sur la Figure 53) présentent tous des respirogrammes avec un palier de nitratisation. La présence d'un palier de nitratisation indique que des nitrites se sont accumulés au cours de la mesure. Cette accumulation est probablement due à une limitation de l'activité des bactéries nitratantes. En effet, leurs populations nitratantes sont abondantes comparées aux populations nitrosantes (ratios $X_{BA}/X_{BN} < 0,83$), mais les vitesses de nitratisation mesurées sont plus faibles que celles de nitrosation ($\rho_{BA}/\rho_{BN} \geq 1,30$). Les causes de cette limitation spécifique à certains échantillons n'ont toutefois pas été identifiées.

L'échantillon Etr91-H se démarque des autres (Figure 53) car il présente un ratio exceptionnellement élevé dans les deux cas ($X_{BA}/X_{BN} = 3,44$, et $\rho_{BA}/\rho_{BN} = 3,76$). Le respirogramme de cet échantillon présentait par ailleurs une allure atypique (cf. Figure 47 page 149), sur lequel on pouvait observer un palier de nitratisation particulièrement faible (à $1,8 \text{ mg}_{\text{O}_2} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ environ). La biomasse nitratante de cet échantillon était donc peu abondante d'après les résultats concordants des 3 techniques de mesure : abondance (FISH), suivi des formes de l'azote et respirométrie.

3.3.2.3 Impact des conditions de fonctionnement du système sur l'activité nitrifiante des boues activées

Pour une installation correctement aérée et ayant un bon rendement de nitrification, la capacité nitrifiante des boues activées dépend de la charge volumique journalière en azote ($B_V(N)$), du ratio DBO_5/NTK de l'effluent d'entrée, ainsi que de l'âge de boues (SRT) dans une moindre mesure. La relation entre ces paramètres de fonctionnement et la vitesse de nitrification des boues activées est présentée dans la partie « Synthèse bibliographique » (équation 34 p. 43).

La nitrosation étant l'étape limitante de la nitrification, la vitesse maximale de nitrification correspond à la vitesse maximale de nitrosation (cf. Annexe 3) mesurée par les $\text{N}_{\text{Ox}}\text{PR}$ comme présenté au paragraphe 3.3.2.1.1.

Toutefois, les concentrations des boues échantillonnées ne correspondaient pas toujours aux concentrations moyennes dans le bassin d'aération au cours de la période précédant le prélèvement, car la concentration en boues du bassin fluctue en fonction des extractions de boues.

Ainsi, les vitesses de nitrosation mesurées ont été rapportées à la vitesse maximale correspondante à la concentration moyenne des boues activées dans le bassin d'aération selon l'équation 56 :

$$\rho_{BA \max} (\text{bassin d'aération}) = \frac{N_{Ox} PR}{[MES]} \cdot [MS] \quad \text{équation 56}$$

où [MES] est la concentration des matières en suspension mesurées au laboratoire lors de l'analyse respirométrique (en g/L) et [MS] est la concentration moyenne en matières sèches des boues activées du bassin d'aération au cours du mois précédant le prélèvement (en g/L) d'après les données fournies par les exploitants (annexe 6).

Les vitesses maximales moyennes obtenues pour les échantillons de boues activées sont représentées sur la Figure 54 en fonction de la charge moyenne (sur deux à six mois) d'azote nitrifié par unité de volume de bassin d'aération (B_v (éliminé)).

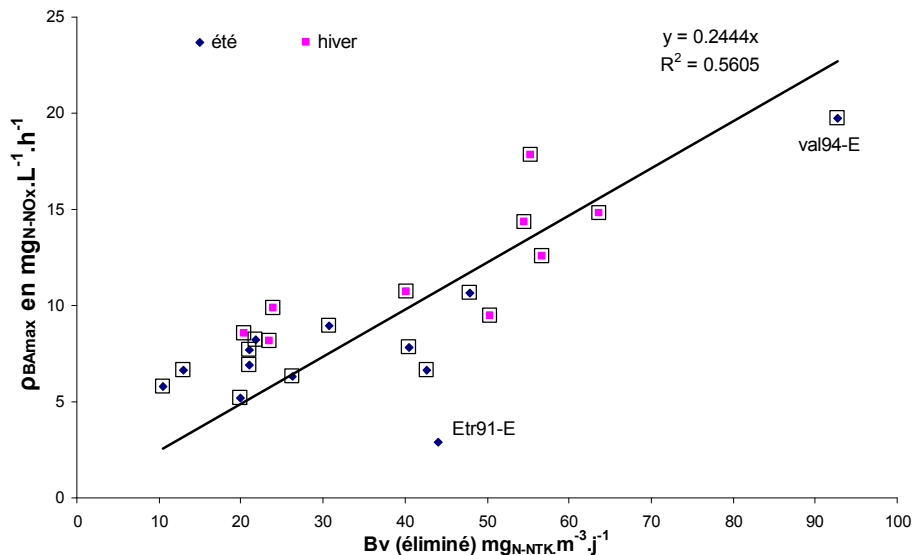


Figure 54 : vitesses de nitrosation maximales ($\rho_{BA \max}$) estimées pour les concentrations en boues du bassin d'aération en fonction des charges moyennes d'azote éliminées au cours des 6 mois précédant le prélèvement (B_v).

Conformément aux données bibliographiques (Choubert *et al.* 2005), la vitesse de nitrosation des boues activées augmente avec la charge azotée traitée par le système.

Seul le point Etr91-E s'écarte de cette tendance. Or, la concentration en ammonium en sortie de cette station d'épuration est supérieure de $3 \text{ mg}_{\text{N-NH}_4}/\text{L}$ (cf. annexe 6) cours du mois précédant le prélèvement, attestant d'une nitrification partielle dont l'origine n'est pas connue.

Une droite de régression a été tracée pour l'ensemble des points obtenus (excepté Etr91-E). Le coefficient de corrélation est relativement faible ($r^2 = 0,56$). Notons néanmoins que d'une part les valeurs des charges éliminées et de concentrations en matières sèches sont peu précises car les données disponibles sont peu abondantes (donc peu représentatives) pour certaines stations échantillonnées ; et d'autre part que la relation liant B_V à la capacité nitrifiante fait également intervenir d'autres facteurs (âge des boues, DBO_5/NTK , température, ...) qui ne sont pas pris en compte dans la relation établie sur ce graphique (Figure 54).

3.3.2.4 Cas de la solution commerciale NB

Les bactéries nitrosantes contenues dans la solution NB sont supposées être de stratégie de type $-r$, donc avoir une faible affinité pour les substrats. Pour cette raison, les mesures d'activité ont été réalisées à fortes concentrations en ammonium.

3.3.2.4.1 Vitesses déterminées par mesures chimiques

Les vitesses de réaction ont été déterminées simultanément par respirométrie et par suivi des formes d'azote oxydé (NO_2 et NO_3) avec un échantillon de la solution NB diluée à concentration nominale dans des eaux de sortie filtrées (ESF) à 20°C , avec une injection de $100 \text{ mg}_{\text{N-NH}_4}/\text{L}_{\text{réacteur}}$ (cf. § 2.4.3.2.1 dans la partie « Matériel et méthodes »). Des analyses chimiques ont été poursuivies pendant toute la durée de la respirométrie (12 heures). La Figure 55 présente l'évolution des formes d'azote oxydé observée au cours de cette mesure.

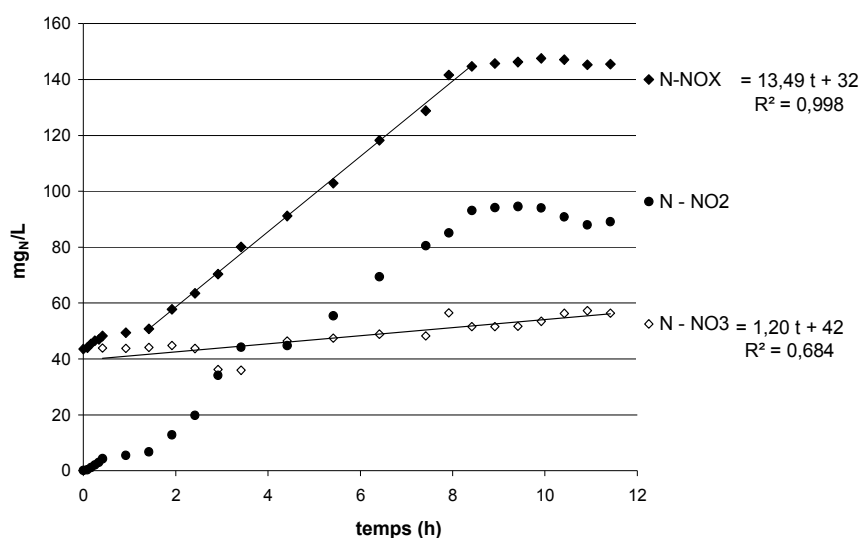


Figure 55 : évolution des formes solubles d'azote minéral au cours de la respirométrie avec la solution NB

Un temps de latence est observé en début de mesure avant l'augmentation des NO_x (nitrosation) : la vitesse maximale a été estimée à $13,5 \text{ mg}_{\text{N-NO}_x} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ entre 1h30' et 8 h après l'injection de substrat.

L'augmentation de la concentration en nitrates (N-NO_3) est fortement bruitée et très lente (malgré une concentration en nitrites élevée). La vitesse de nitratisation est cependant estimée par une corrélation linéaire sur l'ensemble des points à $1,2 \text{ mg}_{\text{N-NO}_3} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$.

3.3.2.4.2 Respiration

La Figure 56 présente le respirogramme obtenu après ajout de substrat.

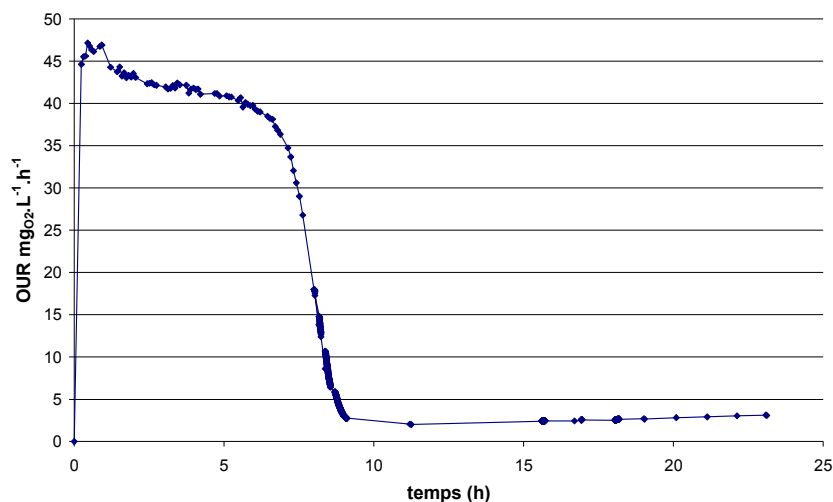


Figure 56 : respirogramme de la solution NB 1X avec $100 \text{ mg}_{\text{N-NH}_4}/\text{L}$ à 20°C

Aucune respiration endogène n'est mesurée avant l'injection du substrat. La concentration en oxygène dissous dans le réacteur est constante et égale à environ $7 \text{ mg}_{\text{O}_2}/\text{L}$. La respiration augmente instantanément lors de l'injection du substrat, pour atteindre $46,0 \text{ mg}_{\text{O}_2} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$. La respiration diminue ensuite lentement au fur et à mesure que le substrat est consommé. À partir de 6h30 environ, la respiration diminue plus rapidement pour atteindre le palier de nitratisation ($2,1 \text{ mg}_{\text{O}_2} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$) environ 9h après l'injection du substrat. Ce palier dure au moins une dizaine d'heures supplémentaires, et la respiration augmente progressivement ($\text{OUR} = 2,9 \text{ mg}_{\text{O}_2} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ à 23h). Cette augmentation est certainement due à la croissance des bactéries nitrifiantes. Les données de la fin de ce palier n'ont cependant pas été enregistrées car elles étaient peu utiles à l'analyse et que sa durée approximativement estimée était excessive (> 3 jours).

La respiration de l'activité nitrosante a été estimée ($43,9 \text{ mg}_{\text{O}_2} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$) en substituant la consommation d'oxygène liée à la nitratisation ($2,1 \text{ mg}_{\text{O}_2} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$) à la valeur de respiration maximale ($46,0 \text{ mg}_{\text{O}_2} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$).

Remarques : -Les résultats d'OUR nt été augmentés par l'estimation de l'aération surfacique, dont le coefficient de transfert ($K_{La} = 0,17 \text{ h}^{-1}$) a été mesuré par la méthode de désorption au peroxyde d'hydrogène (Capela *et al.* 2004).

-Un peu avant d'atteindre le palier de nitratisation (entre 8,30 et 9h), les OUR ont été calculées à chaque pas de temps d'acquisition (5s) par la régression linéaire des données d'oxygène dissous sur les 3 minutes suivant le point de mesure. Ainsi, une valeur d'OUR est obtenue à chaque pas de temps et l'évolution de la respiration au cours de cette phase de transition est décrite par un grand nombre de points rapprochés. Le détail de cette évolution permettra d'évaluer plus précisément la constante d'affinité pour l'ammonium (§ 3.3.4.2).

3.3.2.4.3 Comparaison de la respiration et des vitesses de réaction

A partir des vitesses mesurées par analyses chimiques, l'OUR_{max} mesuré a été recalculée suivant la même équation que pour les boues activées (équation 55 avec $N_{\min PR} = 0$), et la valeur obtenue ($45,7 \text{ mgO}_2 \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$) correspond à 1% près à la mesure de l'OUR_{max} ($46,0 \text{ mgO}_2 \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$).

Par ailleurs, le ratio entre la vitesse de nitrosation et la respiration correspondante ($\text{OUR}_{SA\max} / \text{N}_{\text{OxPR}} = 3,26 \text{ gO}_2 / \text{g}_{\text{N-Nox formé}}$) est très proche de la valeur théorique ($3,29 \text{ gO}_2 / \text{g}_{\text{N-NO}_3\text{formé}}$). En revanche, pour la nitratisation, le ratio entre la respiration et la mesure chimique ($\text{OUR}_{SN} / \text{N}_t\text{PR} = 1,73 \text{ gO}_2 / \text{g}_{\text{N-NO}_3}$) est supérieur de 63 % au ratio théorique ($1,06 \text{ gO}_2 / \text{g}_{\text{N-NO}_3}$).

Cet écart est probablement dû à l'erreur liée à la détermination de la vitesse de nitratisation par analyses chimiques, la variation des concentrations en nitrates étant très faible.

3.3.2.4.4 Bilan sur plusieurs mesures

D'après le fournisseur de la solution NB, la durée du stockage ne doit pas dépasser 8 mois à 4°C, et les analyses ont été échelonnées sur environ deux ans. Les mesures présentées précédemment ont été répétées à différentes périodes sur trois échantillons distincts de solution NB (échantillons A, B et C).

La durée de stockage de ces échantillons avant mesure a varié de 1 jour à 6 mois. Les eaux de sortie filtrées (ESF) servant à la dilution provenaient des stations d'épuration de Val94 ou de Bou91.

Les résultats des vitesses de consommation d'oxygène pour la nitrosation (OUR_{SAmax}) et de vitesses de nitrosation ($N_{Ox}PR$) estimés expérimentalement sont présentés dans le Tableau 15. Les mesures présentées précédemment correspondent à l'échantillon C.

Tableau 15 : OUR_{SAmax} et $N_{Ox}PR$ mesurées sur différents échantillons de solution NB 1X

Echantillon	A	B	C	Unités
Stockage solution*	6 mois	1 jour	3 semaines	
Origine ESF	Val94	Val 94	Bou91	
OUR_{SAmax}	63,2	55,4	43,9	$mg_{O_2} L^{-1}.h^{-1}$
$N_{Ox}PR$	19,5	17,7	13,5	$mg_{NOx}.L^{-1}.h^{-1}$
$OUR_{SAmax}/N_{Ox}PR$	3,24	3,12	3,26	$g_{O_2}/g_{N-NO_3formé}$

* durée entre la réception de l'échantillon et la mesure.

Aucune vitesse de nitratisation n'a été reportée dans le Tableau 15, car elles n'ont pas pu être déterminées pour les échantillons A et B. En effet, les suivis réalisés pendant ces mesures présentaient une augmentation des nitrates trop lente pour permettre sa détection. Par ailleurs, les paliers de nitratisation des respirogrammes étaient très bas ($<1 mg_{O_2}.L^{-1}.h^{-1}$).

Ainsi, quel que soit l'échantillon analysé, **la biomasse nitratante de la solution NB est très peu active.**

Selon les échantillons et les milieux de mesure, les vitesses de nitrosation de la solution NB mesurées varient entre 13,5 et 19,5 $mg_{NOx}.L^{-1}.h^{-1}$. Les différences des vitesses de nitrosation mesurées pour les différents échantillons sont très importantes (de 30 à 40%). En revanche, les ratios $OUR_{SAmax}/N_{Ox}PR$ sont à peu près identiques pour les trois échantillons. La durée de stockage des échantillons ne semble pas être responsable de ces différences car l'ordre des vitesses maximales des trois échantillons ne correspond pas à l'ordre des durées de stockage. Les différences observées peuvent avoir pour origine les échantillons eux même (conditions de fabrication et de transport inconnues) ou la composition des ESF. En effet, la qualité des ESF employées pour la dilution a potentiellement un impact sur l'activité de la biomasse de la solution NB, notamment en cas de présence de toxiques.

3.3.3 Ratios Oxygène/substrat consommé (OC/N)

La consommation totale d'oxygène au cours de la respirométrie correspond théoriquement à l'aire sous la courbe de respiration exogène. Les ratios suivant ont été déterminés à partir des données des respirogrammes :

- $OC_{total}/N-NH_4$: oxygène total consommé / quantité d'ammonium injecté.
- $OC_{BA}/N-NH_4$: oxygène consommé pour la nitrosation / quantité d'ammonium injecté.

- $OC_{BN}/N-NO_2$: oxygène consommé pour la nitratisation / (quantité de nitrites injectés + quantité d'ammonium transformé en nitrites [en estimant l'assimilation dans la biomasse nitrifiante formée])

Le ratio $OC_{total}/N-NH_4$ a été mesuré pour tous les respirogrammes, et les deux autres ratios n'ont été estimés que pour les respirogrammes présentant un palier de nitratisation. Les aires ont été calculées par la méthode des rectangles comme il a été présenté au paragraphe 2.4.3.1.3.

Les ratios ainsi calculés traduisent la stœchiométrie des réactions, et reflètent donc la quantité d'oxygène nécessaire à l'oxydation du substrat introduit. Quelles que soient les vitesses de réaction, ces ratios sont théoriquement constants.

Calculés selon les équations stœchiométriques des réactions de nitrification (cf. § 1.1.2.3 dans la partie « Synthèse bibliographique »), les consommations théoriques d'oxygène sont de 3,24 g_{O_2}/g_{N-NH_4} pour la nitrosation, 1,06 g_{O_2}/g_{N-NO_2} pour la nitratisation, et 4,26 g_{O_2}/g_{N-NH_4} pour la nitrification totale.

3.3.3.1 Résultats pour les boues activées

3.3.3.1.1 Ratios OC/N expérimentaux

Le Tableau 16 présente les ratios théoriques et expérimentaux déterminés pour les 30 respirogrammes réalisés sur des boues activées.

Tableau 16 : ratios OC/N expérimentaux de 30 respirogrammes, exprimés en g_{O_2}/g_N

	$OC_{total}/N-NH_4$	% ratio théorique	$OC_{BA}/N-NH_4$	% ratio théorique	$OC_{BN}/N-NO_2$	% ratio théorique
Théorique	4,26		3,24		1,06	
ETE 2006						
Etr91-E	3,53	83%	/	/	/	/
Eta91-E	3,57	84%	2,83	90%	0,76	71%
Bou91-E	3,03	71%	/	/	/	/
Sgl77-E	3,89	91%	/	/	/	/
Bar77-E	3,69	87%	/	/	/	/
Sma77-E	3,51	82%	2,60	83%	0,84	78%
Pre77-E	3,77	89%	/	/	/	/
Cou77-E	3,99	94%	/	/	/	/
Evr77-E	3,74	88%	/	/	/	/
Gri77-E	4,39	103%	3,27	104%	1,03	95%
Val94-E	3,47	81%	/	/	/	/
VaP94-E	3,75	88%	/	/	/	/

	OC _{total} /N-NH ₄	% ratio théorique	OC _{BA} /N-NH ₄	% ratio théorique	OC _{BN} /N-NO ₂	% ratio théorique
2007						
Etr91-H	3,29	77%	/	/	/	/
Eta91-H	3,25	76%	/	/	/	/
Bou91-H	3,57	84%	2,67	85%	0,93	86%
Pre77-H	3,51	82%	2,67	85%	0,88	82%
<i>Cou77-H</i>	4,25	100%	3,29	105%	0,97	90%
Evr77-H	3,65	86%	2,85	88%	0,84	79%
Gris77-H	3,75	88%	2,86	91%	0,89	82%
<i>Val94-H</i>	4,04	95%	3,14	100%	0,92	85%
VaP94-H	3,71	87%	2,81	89%	0,94	87%
Bou91-témoin1	3,61	85%	2,72	87%	0,89	83%
Bou91-témoin2	3,83	90%	2,77	88%	1,06	98%
2008						
Sgl77-H08	3,81	89%				
Sma77-H08	3,47	81%				
<i>Etr77-H08</i>	4,17	98%	3,15	100%	1,04	96%
Bou91-témoin 3	3,60	84%	2,62	84%	0,97	90%
Bou91-P	3,78	89%	2,86	91%	0,90	83%
Cou77-P	3,97	93%	3,16	101%	0,95	88%
Etr91-P	3,60	84%	/	/	/	/
moyenne	3,73	88%	2,89	92%	0,92	86%

Les ratios obtenus sont compris entre 3,03 et 4,39 gO₂/gN-NH₄ pour la nitrification totale, entre 2,60 et 3,29 gO₂/gN-NH₄ pour la nitrosation et entre 0,76 et 1,06 gO₂/gN-NO₂ pour la nitratisation. La plupart des valeurs sont inférieures d'au moins 5 % au ratio théorique, et cet écart atteint 29 % pour les ratios les plus éloignés (OC_{total}/N-NH₄ de Bou91-E et OC_{BN}/N-NO₂ de Eta91-H). Ainsi, **la consommation d'oxygène au cours des mesures réalisées est presque toujours inférieure à la consommation attendue d'après le ratio théorique (4,26 gO₂/gN-NH₄)**. De plus, les ratios mesurés diffèrent d'un échantillon à l'autre.

Cependant, pour 4 échantillons (indiqués en italique dans le Tableau 16), les ratios obtenus correspondent aux valeurs théoriques à 5% près.

3.3.3.1.2 Répétabilité et dispersion des ratios expérimentaux

Trois échantillons de boues activées prélevés au printemps 2008 (Bou91-P, Cou77-P et Etr91-P) ont été analysés par des mesures successives avec différentes quantités de substrat. Les consommations d'oxygène (OC) sont mesurées pour chaque injection afin d'étudier la corrélation entre l'oxygène consommé et le substrat ajouté pour chaque échantillon.

La Figure 57 présente les résultats obtenus.

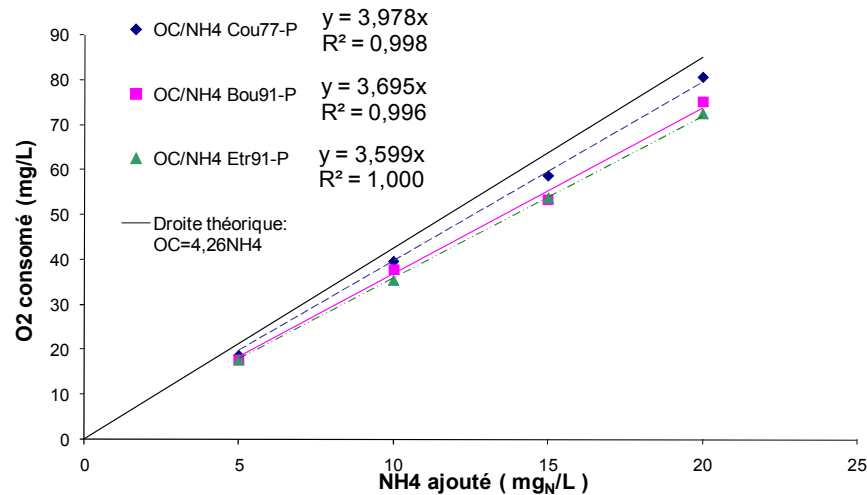


Figure 57: oxygène total consommé par les boues de Cou77-P, Bou91_P et Etr91_P) pour différentes quantités d'ammonium

Les pentes obtenues sont différentes les unes des autres et toutes sont inférieures à la valeur théorique.

Chaque échantillon de boues activées présente donc un ratio $OC_{total}/N-NH_4$ unique, répétable, et généralement inférieur au ratio théorique de 4,26 gO_2/gN .

3.3.3.1.3 Interprétation

La relation entre l'oxygène et le substrat consommé est exprimée en fonction des rendements de croissance des biomasses nitrosantes et nitrifiantes (Y_{BA} et Y_{BN} respectivement) par les équations 57, 58, et 59 (présentées en « Synthèse bibliographique » §.1.1.2.3.3 page 33).

$$\frac{OC_{nitrosation}}{N - NH_4} = \frac{3,43 - Y_{BA}}{1 + i_{XB} \cdot (Y_{BA} + Y_{BN})} \quad \text{équation 57}$$

$$\frac{OC_{nitratation}}{N - NO_2} = 1,14 - Y_{BN} \quad \text{équation 58}$$

$$\frac{OC_{nitrification}}{N - NH_4} = \frac{4,57 - (Y_{BA} + Y_{BN})}{1 + i_{XB} \cdot (Y_{BA} + Y_{BN})} \quad \text{équation 59}$$

Les rendements de croissance peuvent être estimés à partir de deux de ces équations et de la connaissance de deux des ratios. Généralement, les ratios $OC_{BN}/N-NO_2$ et $OC_{total}/N-NH_4$ sont utilisés car ces deux ratios peuvent être déterminés directement par une mesure respirométrique avec seulement des nitrites ou seulement de l'ammonium.

Les rendements Y_{BA} et Y_{BN} sont alors calculés d'après les équations 60 et 61, établies à partir des équations 58 et 59 :

$$Y_{BN} = 1,14 - \frac{OC_{BN}}{N - NO_2} \quad \text{équation 60}$$

$$Y_{BA} = \frac{4,57 - \frac{OC_{total}}{N - NH_4}}{1 + i_{XB} \cdot \frac{OC_{total}}{N - NH_4}} \quad \text{équation 61}$$

où i_{XB} est la fraction azotée de la biomasse ($0,0875 \text{ g}_N/\text{g}_{DCO}$)

D'après les moyennes des ratios du Tableau 16, les rendements de croissance expérimentaux moyens sont $Y_{BA} = 0,40 \text{ g}_{DCO-XBA}/\text{g}_{Nnit}$ pour la nitrosation et $Y_{BN} = 0,22 \text{ g}_{DCO-XBN}/\text{g}_{Nnit}$ pour la nitratisation, soit 2,86 et 2,75 fois les rendements de croissance théoriques ($Y_{BA}=0,14 \text{ g}_{DCO-XBA}/\text{g}_{Nnit}$ et $Y_{BN}=0,08 \text{ g}_{DCO-XBN}/\text{g}_{Nnit}$). Ainsi, des écarts à la théorie peu importants de la consommation d'oxygène (8 % pour $OC_{BN}/N-NO_2$ et 12 % pour $OC_{total}/N-NH_4$) induisent **des rendements de croissance expérimentaux très éloignés des rendements théoriques** (> 250% d'écart).

Or, au moins deux études ont précédemment retrouvés les ratios théoriques pour des boues de stations d'épuration municipales et industrielles (Marsili Libelli *et al.* 2001) ou pour des boues enrichies en bactéries nitrifiantes (Jubany 2007). Marsili *et al.* (2001) notent toutefois que les rendements de croissance (Y_{BA}) mesurés à partir des ratios expérimentaux OC/N varient selon les échantillons, et qu'ils sont généralement supérieurs à la valeur théorique (donc les ratios $OC_{total}/N-NH_4$ sont inférieurs à la valeur théorique).

Les rendements de croissance obtenus étant peu réalistes, différentes hypothèses ont été analysées pour expliciter les incohérences de ces mesures avec les valeurs théoriques (cf. Annexe 11). Ces hypothèses sont orientées selon deux pistes : une surestimation de l'ammonium nitrifié (par stripage, ou adsorption aux floes), et une réduction de l'oxygène consommé (métabolisme alternatif des bactéries nitrifiantes, présence d'archéobactéries ou variations de la respiration endogène).

De l'ensemble de ces hypothèses, seule la variation de la respiration endogène n'a pu être réfutée. Cette hypothèse rejoint par ailleurs l'hypothèse exprimée pour réconcilier les mesures

respirométriques et les mesures des vitesses de réaction par suivi des formes de l'azote (cf. § 3.3.2.1.3).

3.3.3.2 Cas de la solution commerciale diluée

Les ratios OC/N de la solution NB ont été calculés pour la nitrosation ($OC_{SA}/N-NH_4$) à partir des différents respirogrammes obtenus avec 100 mg_N/L d'ammonium sur les échantillons A, B et C de la solution NB diluée (cf. Tableau 15). Pour cela, les vitesses de consommation d'oxygène liée à la nitrification (OUR_{SNmax}) estimées au premier point du palier de nitrification (cf. § 3.3.2.4.3 page 162) ont été soustraites des valeurs d' OUR_{total} mesurées afin d'obtenir un respirogramme représentant l'activité nitrosante uniquement.

Par ailleurs, le ratio OC/N de la nitrification ($OC_{SN}/N-NO_2$) a été déterminé par une mesure respirométrique réalisée avec des nitrites comme uniques substrats (20mg_{N-NO2}/L).

Le Tableau 17 récapitule les ratios OC/N obtenus pour les différents échantillons de solution NB, ainsi que les ratios entre les respirations maximales et les vitesses maximales de nitrosation ($OUR_{max}/N_{Ox}PR$) dont la mesure est présentée au § 3.3.2.4.4.

Tableau 17 : ratios expérimentaux de consommation d'oxygène de la solution NB. Pour la nitrosation.

Echantillon	A	B	C	Théoriques	Unités
Stockage solution *	6 mois	1 jour	3 semaines		
Origine ESF	Val94	Val 94	Bou91		
$OC_{SA}N-NH_4$	3,18	3,20	3,13	3,23	gO ₂ /g _{N-NH4} consommé
$OUR_{SA, max}/N_{Ox}PR$	3,24	3,12	3,26 ^Δ	3,29	gO ₂ /g _{N-NO2} formé
$OC_{SN}/N-NO_2^{\#}$	/	1,12	1,18	1,06	gO ₂ /g _{N-O2} consommé
OUR_{SN}/N_tPR	/	/	1,73 ^Δ	1,06	gO ₂ /g _{N-NO3} formé

* : durée entre la réception de l'échantillon et la mesure.

Δ : cf. § 3.3.2.4.3 page 163.

: Mesures respirométriques sur nitrites uniquement.

Les ratios obtenus expérimentalement sont proches des valeurs théoriques. Les ratios pour la nitrosation sont légèrement inférieurs à leur valeur théorique, et les ratios de la nitrification légèrement supérieurs. Ces écarts restent très faibles (excepté OUR_{SN}/N_tPR en raison d'une forte incertitude sur N_tPR), et **les ratios théoriques sont donc confirmés par ces mesures.**

3.3.3.3 Conclusion

Des écarts importants ont été observés entre les ratios OC/N (oxygène consommé / substrats introduits) théoriques et expérimentaux pour la majorité des échantillons de boues activées.

Les ratios expérimentaux sont presque tous inférieurs aux valeurs théoriques (jusqu'à 29 % d'écart), et ils sont également variables d'un échantillon à l'autre.

Différentes hypothèses ont été étudiées afin d'expliquer ces différences mais la plupart ont été réfutées. **L'hypothèse la plus probable est une variation de l'activité endogène** (liée à la forte concentration en biomasse hétérotrophe) en présence d'un excès d'ammonium.

Le rôle de la biomasse hétérotrophe dans la diminution des ratios OC/N mesurés semble être confirmé par les mesures réalisées sur la solution NB diluée, qui ne contient pas de biomasse hétérotrophe, et dont les ratios expérimentaux correspondent aux ratios théoriques.

3.3.4 Détermination des paramètres cinétiques des populations nitrifiantes

La modélisation d'un système de boues activées bio-augmentées nécessite d'utiliser un modèle incluant les différentes populations présentes (biomasses hétérotrophes et autotrophes, autochtones et ajoutées). Quatre populations nitrifiantes doivent être considérées dans ce modèle afin d'isoler le comportement des populations nitrosantes et nitratantes des boues activées et de la solution introduite respectivement. Un modèle simplifié (ASM_N) a été construit au cours de ce travail (cf. § 2.5.1.2.1). La détermination des paramètres cinétiques de ces différentes populations a été envisagée à partir des analyses réalisées sur les boues activées et sur la solution NB (vitesses maximales et mesures d'abondance, respirométrie).

3.3.4.1 Vitesses de réaction spécifiques et taux de croissance

Considérations théoriques

Les vitesses maximales de nitrosation (ρ_{BAmax}) et de nitration (ρ_{BNmax}) sont exprimées en fonction des taux de croissance maximaux (μ_{BAmax} et μ_{BNmax}) par les équations 62 et 63

$$\rho_{BAmax} = \frac{\mu_{BAmax}}{Y_{BA}} * [X_{BA}] \quad \text{équation 62}$$

$$\rho_{BNmax} = \frac{\mu_{BNmax}}{Y_{BN}} * [X_{BN}] \quad \text{équation 63}$$

où $[X_{BA}]$ et $[X_{BN}]$ sont les concentration en biomasse nitrosante et nitratante respectivement.

Remarque : Les équations correspondantes pour la solution NB sont obtenues en remplaçant « B » par « S »

D'après ces équations, les taux de croissance maximaux (μ_{BAmax} et μ_{BNmax}) peuvent être déterminés à partir des vitesses maximales de nitrosation (ρ_{BAmax}) et de nitratisation (ρ_{BNmax}) et des concentrations en biomasse nitrosante ($[X_{BA}]$) et nitratante ($[X_{BN}]$) respectivement, en admettant les rendements de croissance théoriques : $Y_{BA}=0,14 \text{ g}_{DCO}/\text{g}_N$ ($0,10 \text{ g}_{MVS}/\text{g}_N$) et $Y_{BN}=0,08 \text{ g}_{DCO}/\text{g}_N$ ($0,06 \text{ g}_{MVS}/\text{g}_N$). Pour une population donnée, le taux de croissance maximal est théoriquement constant et proportionnel à la vitesse maximale spécifique (vitesse maximale rapportée à la concentration de biomasse).

Application aux données expérimentales

Les proportions des biomasses nitrosantes et nitratantes des boues activées et de la solution NB ont été estimées par marquage FISH (mesure des fractions de populations) et rapportées aux concentrations en MVS (cf. § 3.2.2.1 pour les boues activées et 3.2.2.4 pour la solution NB).

Les vitesses de nitrosation et de nitratisation ont été mesurées par le suivi de la production d'azote oxydé et de nitrates en présence d'un excès d'ammonium (cf. § 3.3.2.1.1 pour les boues activées et 3.3.2.4.1 pour la solution NB).

Les vitesses maximales de nitrosation mesurées **pour les boues activées** ont été rapportées aux concentrations des biomasses correspondantes ($[X_{BA}]$ en mg_{MVS}/L) pour les 24 échantillons pour lesquels ces deux mesures ont été réalisées (cf. annexe 5). Aucune corrélation n'est observée entre ces deux mesures, de même que pour les vitesses de nitratisation et l'abondance de population nitratante. De plus, pour la biomasse nitratante, les vitesses mesurées (N_{iPR}) ne correspondent pas aux vitesses maximales car les nitrites n'étaient pas en excès et que des limitations semblent avoir eut lieu (cf. 3.3.2.2).

L'absence de corrélation provient de la faible précision des mesures d'abondances de population pour une gamme restreinte de variation des vitesses de réaction (du simple au triple).

L'activité spécifique des biomasses nitrosantes a été estimée pour l'ensemble des échantillons de boues activées. Les valeurs sont comprises entre 2,9 et 10,3 $\text{g}_{N-Nox} \cdot \text{g}^{-1}_{X_{BA-MVS}} \cdot \text{j}^{-1}$, et la moyenne est $\rho_{BAmax-spe} = 6,0 \pm 2,2 \text{ g}_{N-Nox} \cdot \text{g}^{-1}_{X_{BA-MVS}} \cdot \text{j}^{-1}$ (à 20°C). Le taux de croissance maximal moyen est alors ($\mu_{BAmax} = 0,59 \pm 0,22 \text{ j}^{-1}$ à 20°C) d'après l'équation 62 appliquée à la vitesse de nitrosation spécifique moyenne. Ce taux de croissance maximal de la biomasse nitrosantes est compris dans la gamme (0,34 à 0,77 j^{-1}) des valeurs reportées pour les bactéries

du groupe *Nitrosomonas oligotropha* (Suwa *et al.* 1994 ; Park et Noguera 2007) dans le Tableau 2 (« Synthèse bibliographique » page 48). En revanche, il est assez éloigné de la valeur standard proposée par le Cemagrefⁱⁱ pour la modélisation (0,8 j⁻¹).

Pour la solution NB, différentes vitesses de nitrosation spécifiques ont été obtenues selon les échantillons analysés ($\rho_{SAmax-spé} = 103, 93$ et $71 \text{ mg}_{NOx} \cdot \text{g}_{MVS-XSA}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ pour les échantillons A, B et respectivement). Les taux de croissance estimés à partir de ces valeurs sont de **(A) 0,24, (B) 0,22 et (C) 0,17 j⁻¹**. Ils sont environ 2 à 4 fois plus faibles que le taux de croissance maximal obtenu pour les populations nitrosantes des boues activées ($\mu_{BAmax} = 0,59 \text{ j}^{-1}$). Or, les bactéries de la solution NB (*Nitrosomonas europaea*) sont supposées être de stratégie -r, c'est-à-dire avoir une faible affinité pour le substrat et un fort taux de croissance maximal.

Les valeurs reportées dans la littérature pour le groupe *N. europaea* (0,41 à 2,82 j⁻¹ d'après le Tableau 2 page 48) **sont 1,5 à 15 fois supérieures** aux valeurs mesurées.

Par ailleurs, le taux de croissance obtenu pour la biomasse nitratante est presque nul ($\mu_{SNmax} = 0,016 \text{ j}^{-1}$) en raison de la très faible activité nitratante mesurée.

Il semble donc que les valeurs ainsi déterminées soient erronées. La plupart des taux de croissance reportés dans la littérature ont été mesurés par la régression non linéaire sur plusieurs jours de la formation des produits de réaction (Jiang et Bakken 1999 ; Suwa *et al.* 1997 ; Brandt *et al.* 2001), par le suivi de l'augmentation des quantités de biomasse (pour des cultures pures (Park et Noguera 2007) ou par d'autres méthodes basées sur la culture des populations analysées pendant plusieurs jours (Melcer *et al.* 2003). Les taux de croissance mesurés sont alors représentatifs de la vitesse de croissance réelle de la biomasse nitrosante définie par l'inverse du temps de génération multiplié par $\ln(2)$ (cf. équation 16 page 34). Cependant, ces méthodes sont relativement lourdes à mettre en œuvre, et de plus les populations développées au cours de ces mesures ne correspondent pas exactement aux populations dominantes de l'échantillon car les conditions de culture modifient la composition des communautés nitrifiantes.

Chandran *et al.* (2005) ont mesuré des taux de croissance du même ordre de grandeur (0,24 j⁻¹) que les valeurs obtenues pour la solution NB par une méthode similaire pour la biomasse nitrosante d'un consortium enrichi en bactéries nitrifiantes. Dans cette étude, les vitesses de réaction sont mesurées par respirométrie, la biomasse totale en DCO, et les

ⁱⁱ Choubert, *et al.* (2005); Marquot (2006)

proportions des biomasses nitrosantes et nitratantes du consortium sont supposées proportionnelles à leurs rendements de croissance respectifs en raison de leur mode de culture (Chandran et Smets 2005).

Ainsi, il semble que la relation entre la vitesse spécifique ($\rho_{SAspé}$ exprimé en $mg_{NOx} \cdot g_{DCO-XSA}^{-1} \cdot h^{-1}$) et le taux de croissance réel des bactéries nitrifiantes ne correspondent pas à la relation théorique généralement admise (équation 62).

Le rendement de synthèse appliqué dans cette équation ($Y_{SA} = 0,14 \text{ g}_{DCO}/\text{g}_N$) a été validé par la mesure des ratios OC/N sur la solution NB diluée (cf. § 3.3.3.2). D'autre part, la fraction de biomasse nitrosante ($\%X_{SA} = 44,9 \%$) est d'un ordre de grandeur cohérent avec la réalité, car la solution NB est principalement composée de biomasse autotrophe, obtenue par l'enrichissement de souches pures nitrosantes et nitratantes uniquement. Pour un taux de croissance (réaliste) de $0,8 \text{ j}^{-1}$, la proportion de biomasse nitrosante de l'échantillon devrait être de 9,5 à 13,5 % de la biomasse totale d'après les vitesses et les concentrations de biomasse totale mesurées. Un tel pourcentage semble peu réaliste pour une telle solution.

Le problème semble donc provenir de la relation théorique de proportionnalité entre la concentration en biomasse nitrosante (X_{SA}), directement mesurée en mg_{MVS}/L ou en mg_{DCO}/L et la vitesse de nitrosation.

Les concentrations en biomasse nitrosante (X_{BA} ou X_{SA} exprimées en DCO) obtenues selon l'équation théoriques (équation 62) à partir vitesses de nitrosation (en $mg_{N-NOx} \cdot L^{-1} \cdot h^{-1}$) sont beaucoup plus faibles que les concentrations en biomasse nitrosante directement mesurées en DCO ou en MVS dans les échantillons.

Pour les échantillons de boues activées, le taux de croissance moyen obtenu était de l'ordre de grandeur des valeurs de la littérature, mais ces résultats apparemment cohérents peuvent résulter d'une sous-estimation des fractions de biomasse nitrosantes réelles.

3.3.4.2 Analyses respirométriques

Les mesures respirométriques ont été réalisées dans l'objectif de déterminer les paramètres cinétiques des populations nitrifiantes des quatre populations du modèle ASM_N : X_{BA} (nitrosantes des boues activées), X_{BN} (nitratantes des boues activées), X_{SA} (nitrosantes de la solution NB), et X_{SN} (nitratantes de la solution NB).

D'après les résultats présentés précédemment (§ 3.3.2.1.3 et § 3.3.3.1.3), il apparaît que les respirogrammes des boues activées obtenus ne représentent pas fidèlement les activités biologiques réelles de la nitrification.

Deux problèmes importants ont été rencontrés :

- D'une part, les respirations exogènes mesurées sous-estiment la respiration liée à l'activité nitrifiante, probablement à cause du relargage d'ammonium induit par l'auto-oxydation des boues (cf. § 3.3.2.1.3).
- D'autre part, les consommations totales d'oxygène obtenues pour les respirogrammes complets ne correspondent pas aux consommations attendues (ratios OC/N incohérents, cf. Tableau 16). Ces écarts pourraient être dus à des variations de l'activité endogène lors de l'injection du substrat (cf. § 3.3.3.1).

A cause des écarts de ratios OC/N, les rendements de croissance réels (Y_{BA} et Y_{BN}) ne peuvent pas être estimés. Or, ces paramètres ont un impact important sur la détermination des autres paramètres cinétiques à partir de mesures respirométriques (Chandran et Smets 2001).

De plus, la sous-estimation de la respiration de nitrification réelle induira une mauvaise estimation des vitesses maximales de nitrosation et de nitratisation qui se répercutera sur les valeurs des constantes d'affinité.

Ainsi, les respirogrammes obtenus ne permettent pas la détermination des paramètres des populations nitrifiantes des boues activées.

En revanche, **pour la solution NB**, l'absence de biomasse hétérotrophe se traduit par une respiration endogène quasiment nulle, et les problèmes rencontrés pour les boues activées n'apparaissent pas pour ces mesures. Les paramètres cinétiques ont donc été déterminés pour la biomasse nitrosante (X_{SA}). En revanche, l'activité nitratante était trop faible pour estimer ses paramètres cinétiques.

Constantes d'affinité :

Les constantes d'affinité pour l'ammonium ont été déterminées pour les trois échantillons de solution NB comme indiqué dans la partie « Matériel et méthodes » (§ 2.4.3.2.2), et la constante d'affinité pour l'oxygène a été estimée à deux reprises pour l'échantillon C selon la méthode présentée au § 2.4.3.2.3. Les résultats obtenus sont présentés dans le Tableau 18 :

Tableau 18 : mesures de K_{NHS} et de K_{OAS}

Echantillon	K_{NHS} ($\text{mg}_{\text{N-NH}_4}/\text{L}$)	K_{OAS} ($\text{mg}_{\text{O}_2}/\text{L}$)
A	3,37	/
B	4,31	/
C	3,35	0,60
C		0,53
Moyennes	3,67	0,56

Constante de température

La constante de température a été déterminée à partir de mesures réalisées à différentes températures et d'après l'équation d'Arrhenius comme indiqué dans la partie « Matériel et méthodes » (§ 2.4.3.2.4).

La Figure 58 présente les respirogrammes obtenus pour les différentes mesures ainsi que les évolutions des formes d'azote oxydé (N_{Ox}) et les vitesses de nitrosation obtenues (N_{OxPR}). Les températures indiquées correspondent à la température moyenne au cours de la mesure.

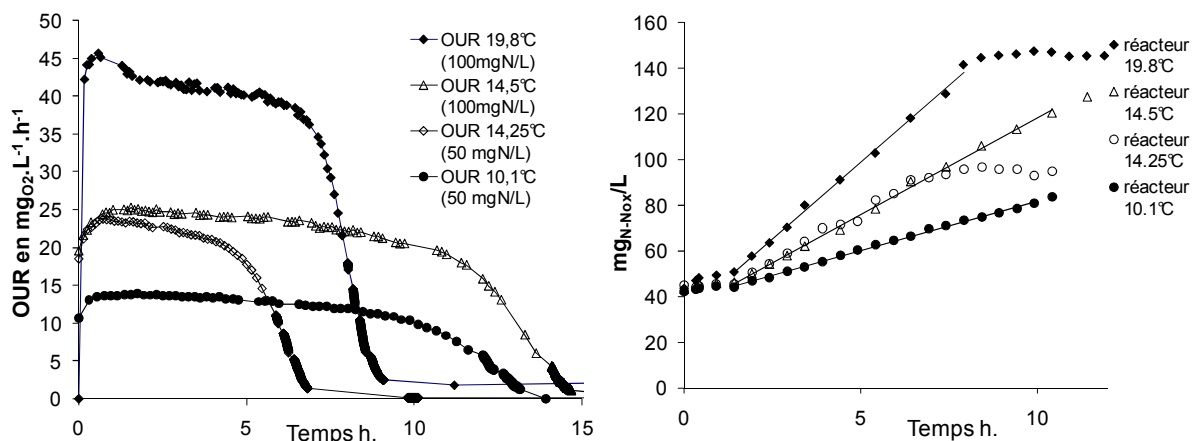


Figure 58 : respirogrammes et évolution des N_{Ox} obtenus pour la solution NB à différentes températures.

La constante de température de la biomasse nitrosante (θ) de la solution NB a été déterminée à partir des mesures des OUR_{max} et des N_{OxPR} réalisées à différentes températures. Les deux résultats obtenus sont: $\theta_{\text{OUR}}=1,120$ et $\theta_{\text{N}_{\text{OxPR}}}=1,101$. L'écart entre les deux constantes vient du fait que l' OUR_{max} est estimé au cours de premières heures suivant l'injection, alors que les N_{OxPR} sont estimés entre 2 et 9 heures après. L' OUR_{max} estime donc la vitesse maximale à la concentration d'ajout, et les N_{OxPR} correspondent à la vitesse moyenne au cours de la mesure, dont les écarts entre les différentes températures sont plus faibles que pour la vitesse maximale ($\theta_{\text{N}_{\text{OxPR}}}<\theta_{\text{OUR}}$). La valeur obtenue pour les OUR (θ_{OUR}) sera retenue car elle est plus proche de la constante pour les vitesses maximales.

3.3.4.3 Bilan

Le Tableau 19 présente l'ensemble des vitesses, des ratios OC/N et des paramètres mesurés pour les échantillons de boues activées et de solution NB diluée dans des ESF, ainsi que les valeurs théoriques et standard utilisés en modélisation pour des stations d'épuration municipales.

Tableau 19 : récapitulatif des paramètres mesurés de la solution NB (1X), comparés aux paramètres des boues activées

Paramètres	Symboles ^Δ	Sol° NB	Boues actives	Théorie ou standard	Unités
Vitesse de nitrosation maximale	ρ_{BAmax}	13,5 – 19,5	3,3 – 12,2	$\mu_{BA} \cdot X_{BA} / Y_{BA}$	$mg_{N-NO_2} \cdot L^{-1} \cdot h^{-1}$
Vitesse de nitratisation	ρ_{BN}	1,8	2,4 – 11,9	$\mu_{BA} \cdot X_{BN} / Y_{BN}$	$mg_{N-NO_3} \cdot L^{-1} \cdot h^{-1}$
Taux de croissance maximal (nitrosation)	μ_{BAmax}	0,17 – 0,24	0,59	0,8 *	j^{-1}
Constante d'affinité pour l'ammonium	K_{NHB}	3,67	/	0,10 *	mg_{N-NH_4} / L
Constante d'affinité pour l'oxygène	K_{OBA}	0,56	/	0,20 *	mg_{O_2} / L
Constante de température	θ	1,120	/	1,059 *	/
$OC_{BA} / N-NH_4$		3,17	2,60 – 3,27	3,24	g_{O_2} / g_{N-NH_4}
$OC_{BN} / N-NO_2$		1,12	0,76 – 1,06	1,08	g_{O_2} / g_{N-NO_2}

Δ : Les symboles correspondant à la solution NB sont obtenus en remplaçant « B » par « S »

** Paramètres standard pour la modélisation proposés par le Cemagref d'après Choubert, et al. (2005) et Marquot 2006*

L'activité nitratante de la solution NB est faible ($1,8 \text{ mg}_{N-NO_3} \cdot L^{-1} \cdot h^{-1}$). Lors d'un ajout en boues activées, seule l'activité nitrosante sera augmentée ce qui pourrait entraîner une accumulation de nitrites si la vitesse de nitratisation dans les boues n'est pas suffisante. Rappelons cependant que l'étape limitante de la nitrification en station d'épuration municipale est généralement la nitrosation.

Les constantes d'affinité pour l'oxygène et pour l'ammonium sont plus élevées pour les bactéries nitrosantes de la solution NB ($K_{NHS} = 3,67 \text{ mg}_{N-NH_4} / L$ et $K_{OSA} = 0,56 \text{ mg}_{O_2} / L$) que pour des boues activées ($K_{NHB} = 0,10 \text{ mg}_{N-NH_4} / L$ et $K_{OBA} = 0,20 \text{ mg}_{O_2} / L$), reflétant une plus faible affinité des populations X_{SA} pour ces substrats que celle des populations X_{BA} . Cette observation semble indiquer que la solution NB contient une population nitrosante de stratégie -r (faible affinité et fort taux de croissance). Or le taux de croissance obtenu est faible ($\leq 0,24 \text{ j}^{-1}$) et contredit la définition de cette population comme stratégie -r. Cependant, cette

mesure semble être sous-estimée en raison d'une divergence entre les concentrations de biomasse de l'équation théorique et les mesures directes des concentrations de biomasse en DCO.

D'après les différences de constantes d'affinité entre les populations nitrosantes des boues activées et celles de la solution NB présentées dans le Tableau 19, il apparaît que les concentrations du milieu en ammonium et en oxygène pourront être des facteurs de sélection entre ces deux populations pour des boues bio-augmentées (boues + solution NB). Cependant, les différences d'affinité entre les populations autochtones et celles de la solution étant beaucoup plus importantes pour l'ammonium que pour l'oxygène, les concentrations en ammonium seront plus discriminantes que le niveau d'oxygénation.

La constante de température mesurée pour la solution NB ($\theta=1,120$) est supérieure à la valeur standard de la modélisation ($\theta=1,059$). La population nitrosante de la solution NB est donc plus sensible aux baisses de température que les populations nitrosantes des boues activées.

Toutefois, cette comparaison est délicate car la constante de température standard de la modélisation correspond aux variations de l'activité d'une biomasse d'un même système acclimatée à différentes températures, et ne s'applique pas à une variation brutale de la température. Or, la biomasse de la solution NB n'a été acclimatée à la température de mesure que 15 à 17 heures avant l'injection.

Néanmoins, lors d'un ajout en station d'épuration, la biomasse de la solution commerciale n'aura certainement pas été préalablement acclimatée en température. La constante de température mesurée est donc représentative des différences d'activités attendues lors d'ajouts de solution NB dans des milieux à différentes températures.

3.3.5 Conclusion

Les vitesses de nitrification ont été analysées par un suivi direct (analyses chimiques des formes solubles d'azote minéral) et par respirométrie. Les observations suivantes ont été réalisées :

- Les vitesses maximales de nitrosation (ρ_{BAmax}) sont comprises entre 3,7 et 12,5 $\text{mg}_{\text{N-NOx}} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$, et les vitesses de nitratisation (ρ_{BN}) mesurées sont comprises entre 2,7 et 12,9 $\text{mg}_{\text{N-NO}_3} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$.
- La comparaison des mesures de respiration et des mesures directes d'activité nitrosante et nitratante a mis en évidence que les mesures respirométriques sous –

estiment la respiration réellement liée à la nitrification. La cause de cette incohérence est probablement l'activité nitrifiante liée au relargage d'ammonium durant la phase de respiration endogène. Les mesures d'OUR ont en effet pu être recalculées à partir des données du suivi chimique en incluant un terme correctif calculé par l'augmentation des formes solubles d'azote minéral ($N_{\min PR}$).

- Le ratio des vitesses de nitrosation et de nitratisation (ρ_{BA}/ρ_{BN}) obtenu est équivalent au ratio des biomasses nitrosantes et nitratantes (X_{BA}/X_{BN}) estimé par marquage FISH pour une majorité d'échantillons.
- La comparaison des vitesses de nitrosation avec les données d'exploitation des stations d'épuration échantillonnées confirme la corrélation entre la charge volumique azotée et la vitesse de nitrification des boues activées.
- Les différents échantillons de solution NB dilués dans des eaux de sortie filtrées présentent des vitesses de nitrosation de 13,5 à 19,5 $\text{mg}_{\text{N-NO}_x} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ et des vitesses de nitratisation inférieures à 1,2 $\text{mg}_{\text{N-NO}_3} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$.
- Les respirogrammes obtenus pour la solution NB diluée dans des ESF ne présentent pas de respiration endogène, et les OUR mesurés correspondent aux vitesses mesurées par analyses chimiques. Cette observation confirme l'hypothèse d'un effet de la respiration endogène sur la mesure respirométrique dans le cas des boues activées.

Par ailleurs, la consommation d'oxygène total nécessaire à l'oxydation du substrat introduit a été mesurée par l'aire sous la courbe respirométrique. Rapportées à la quantité de substrats introduits elles ont été exprimées en ratios OC/N. Il a été observé que :

- Des écarts importants de ratios OC/N sont mesurés entre les différents échantillons de boues activées, les ratios expérimentaux étant quasi systématiquement inférieurs de 5 à 29% au ratio théorique (4,26 $\text{g}_{\text{O}_2}/\text{g}_{\text{N}}$).
- Ces écarts semblent être dus à des variations de l'activité endogène lors de l'ajout du substrat.
- Les ratios OC/N des respirogrammes obtenus pour la solution NB diluée dans des ESF correspondent aux ratios théoriques. Cette observation semble également confirmer que les faibles ratios OC/N obtenus pour les boues sont liés à l'activité endogène.

En raison des écarts expérimentaux de consommation d'oxygène observés en boues activées, les paramètres stœchiométriques (Y_{BA} et Y_{BN}) et cinétiques (K_{NHB} et K_{NOB}) des populations

des boues activées n'ont pas pu être déterminés à partir des respirogrammes comme il avait été envisagé.

Pour la solution NB, les constantes d'affinité pour l'ammonium et pour l'oxygène ont été déterminés à partir de données respirométriques ($K_{NHS} = 3,67 \text{ mg}_{N-NH_4}/L$ et $K_{OSA} = 0,56 \text{ mg}_{O_2}/L$), ainsi que la constante de température ($\theta = 1,120$).

Toutefois, le couplage des vitesses expérimentales de nitrosation avec les concentrations en biomasse nitrosante estimées pour la solution NB a conduit à remettre en cause la relation de proportionnalité théorique liant la vitesse de réaction à la concentration en biomasse exprimée en DCO, en fonction du taux de croissance (μ_{SA}) et du rendement de synthèse (Y_{SA}).

D'après les paramètres cinétiques obtenus, il apparaît que la solution NB contient une population nitratante presque inactive, et une population nitrosante qui s'apparente à une stratégie-r (d'après les constantes d'affinité élevée), et qui est plus sensible aux faibles températures que les populations autochtones.

Par ailleurs, rappelons que l'étude de l'activité endogène en lien avec la respiration associée devra être poursuivie afin d'établir les liens entre la respiration endogène et la vitesse de relargage d'ammonium, et afin d'observer d'éventuelles différences de comportement en présence ou en absence d'ammonium.

3.4 Bio-augmentation de boues activées

Le comportement des populations de la solution NB placée dans des boues activées nitrifiantes a été étudié par respirométrie (complémenté d'un suivi des formes solubles d'azote minéral). De tels essais de bio-augmentation ont été conduits à différentes reprises et analysés à l'aide du modèle ASM_N (cf. § 2.5.1.2.1 de la partie « Matériel et méthodes ») Par ailleurs, des expériences de décantation ont également été réalisées à partir des boues bio-augmentées afin d'étudier le maintien ou non de la biomasse ajoutée dans les boues lors de leur décantation.

3.4.1 Gain d'activité nitrifiante

Afin de déterminer dans quelle mesure l'ajout de solution NB permet d'augmenter l'activité nitrifiante des boues activées, trois séries d'expériences de bio-augmentation ont été réalisées (cf. annexe 5). Le protocole suivi est décrit dans la partie « Matériel et méthodes » (§ 2.5.1.1)

Deux respiromètres ont été utilisés en parallèle. L'un contenait des boues activées (réacteur témoin), et l'autre contenait les mêmes boues augmentées avec la solution NB (réacteur de bio-augmentation). Les proportions d'ajouts préconisés par le fabricant sont définies en fonction de la charge en entrée du système traité par bio-augmentation. Ces proportions représentent de très faibles quantités relativement aux volumes traités. Par exemple environ 11 litres de solution 20X seraient employés pour une station d'épuration recevant un débit de $1000 \text{ m}^3/\text{j}$ à $50 \text{ mg}_{\text{N-NH}_4}/\text{L}$. Pour un temps de séjour hydraulique (TSH) en fonctionnement normal de 16 heures (équivalent du TSH de VaP94-H) cela revient à une dilution par $1,5 \cdot 10^{-5}$ de la solution 20X (11L pour 667 m^3 de bassin).

Des proportions plus importantes ont dû être utilisées pour les analyses réalisées, car les boues activées utilisées provenaient d'une station d'épuration nitrifiante (Bou91), et que l'augmentation de l'activité n'aurait pas pu être détectée avec des ajouts aussi faibles. Les essais de bio-augmentation ont donc été réalisés pour des ajouts de 1 % ou 4% (Vol/Vol) de solution NB concentrée 20X.

3.4.1.1 Analyse approfondie d'une expérience

3.4.1.1.1 Présentation des résultats

La Figure 59 présente les respirogrammes et les évolutions des concentrations des N_{Ox} ($\text{NO}_2 + \text{NO}_3$) obtenus lors de l'expérience réalisée en Mai 2008 (cf. annexe 5).

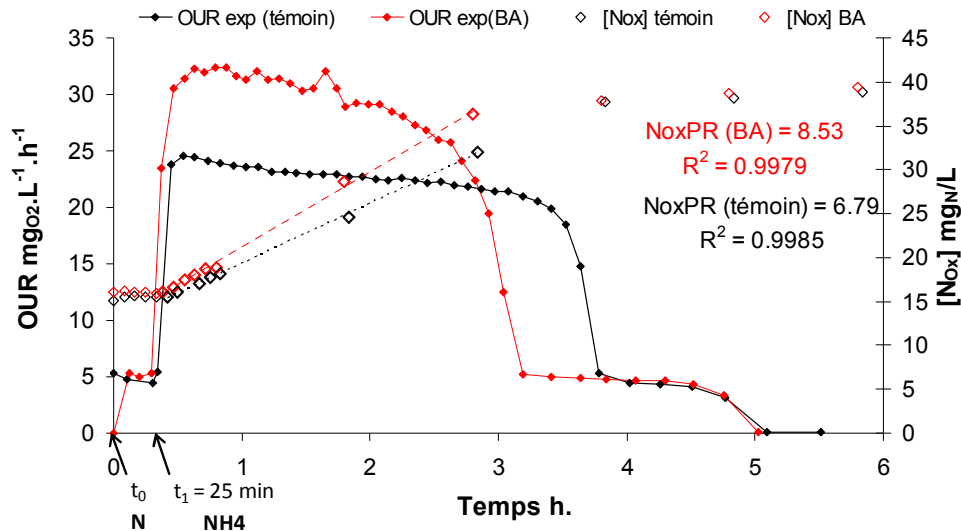


Figure 59 : respirogrammes et évolution des concentrations en NO_x dans les respiromètres témoins et de bio-augmentation.

Après l'injection des nitrites, la respiration maximale de nitratation est atteinte ($\text{OUR}_{\text{SN}} = 5,0$ et $5,4 \text{ mgO}_2 \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ pour le réacteur témoin et le réacteur de bio-augmentation respectivement). La différence entre les deux est faible ($\approx 0,4 \text{ mgO}_2 \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$), reflétant la faible activité nitratante dans la solution NB déjà observée lors des analyses de la solution diluée (cf. § 3.3.2.4).

Suite à l'injection d'ammonium (au temps t_1), l'OUR maximale est atteinte rapidement dans le réacteur témoin ($\text{OUR}_{\text{max}} (\text{témoin}) = 24,1 \text{ mgO}_2 \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$), et seulement 30 minutes après l'injection dans le réacteur de bio-augmentation ($\text{OUR}_{\text{max}} (\text{BA}) = 32,0 \text{ mgO}_2 \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$). L'OUR_{max} (BA) mesurée ne correspond pas au maximum réellement atteignable car la concentration en ammonium ($[\text{NH}_4] = 20 \text{ mgN/L}$) est limitante pour la population nitrosante de la solution NB qui présente une faible affinité pour ce substrat ($K_{\text{NHS}} = 3,7 \text{ mgN-NH}_4/\text{L}$, cf. Tableau 18 p. 175).

Une légère diminution de la respiration est observée dans le réacteur témoin durant 3,5 heures, puis la concentration en ammonium devenant limitante, elle diminue brutalement pour retrouver le palier de nitratation à 3,8 heures. Dans le réacteur de bio-augmentation, la respiration diminue assez rapidement après avoir atteint son maximum, car la limitation par le substrat augmente au fur et à mesure de sa consommation. La totalité de l'ammonium est consommée au bout de 3,20 heures, et l'OUR se maintient alors au niveau du palier de nitratation. La consommation des nitrites s'achève simultanément pour les deux réacteurs à $t_{\text{fin}} = 5,1 \text{ h}$.

La fréquence de mesure des analyses chimiques n'est pas assez importante pour observer les évolutions des vitesses de réaction au cours du temps. Les mesures de vitesses de nitrosation (N_{OxPR}) sont réalisées par régression linéaire des mesures sur toute la durée de phase de nitrification, donc pour des concentrations en ammonium variables. Ces mesures ne sont donc pas comparables aux mesures d' OUR_{max} qui sont réalisées en début de courbe, pour des concentrations en ammonium d'environ 20 mg_{N-NH_4}/L .

3.4.1.1.2 Modélisation des respirogrammes

Le modèle ASM_N, présenté dans la partie « Matériel et méthodes » (§ 2.5.1.2.1) permet de modéliser un système contenant deux populations nitrosantes (X_{BA} et X_{SA}) et deux populations nitrifiantes (X_{BN} et X_{SN}). Il permet ainsi de différencier les populations des boues activées et celles de la solution NB. A partir de ce modèle, les processus biologiques en place dans les respiromètres témoin et de bio-augmentation ont été modélisés. La procédure de calage utilisée est décrite dans la partie « Matériel et méthodes » (§ 2.5.1.2.2).

Valeurs initiales :

Les ratios oxygène / substrat consommés (OC/N) obtenus se sont avérés plus faibles que la valeur théorique, comme pour toutes les mesures respirométriques réalisées en boues activées (cf. § 3.3.3.1). Ainsi, les respirogrammes expérimentaux ne pourront pas être reproduits avec les quantités de substrat réellement ajoutés à partir des rendements de croissance théoriques ($Y_{BA} = Y_{SA} = 0.14 \text{ g}_{DCO}/\text{g}_N$ et $Y_{BN} = Y_{SN} = 0.08 \text{ g}_{DCO}/\text{g}_N$). Or, ces rendements théoriques ont été vérifiés par les ratios OC/N de la solution NB diluée (cf. § 3.3.3.2). Ainsi, les rendements de croissance théoriques ont été utilisés pour la modélisation et la quantité de substrats introduit dans les respiromètres modélisés a alors été modifiée en conséquence. L'adaptation est effectuée uniquement sur l'ammonium, dont la quantité injectée est transformée selon l'équation 64, et les ajouts de nitrites simulés correspondent à la valeur réellement introduite.

$$NH4_{simulation} = NH4_{injecté} - \frac{(4,26 * NH4_{injecté} + 1,06 * NO2_{injecté}) - OC_{total}}{4,26} \quad \text{équation 64}$$

où OC_{total} correspond à l'aire sous la courbe expérimentale.

Les autres paramètres ont été initialement fixés aux valeurs expérimentales lorsque celles-ci ont pu être obtenues (§ 3.3.4), ou à des valeurs issues de la littérature pour des populations similaires.

Les constantes d'affinité pour l'oxygène ne sont pas calées car les mesures ont été réalisées en fort excès d'oxygène ($[O_2] > 5 \text{ mg}_{O_2}/L$). Elles sont fixées à $0,1 \text{ mg}_{O_2}/L$ pour les quatre populations.

Les valeurs utilisées sont reportées avec les résultats de calages dans le Tableau 21.

Résultats :

La Figure 60 présente les respirations respectives correspondant à chaque population des deux réacteurs obtenues par la modélisation.

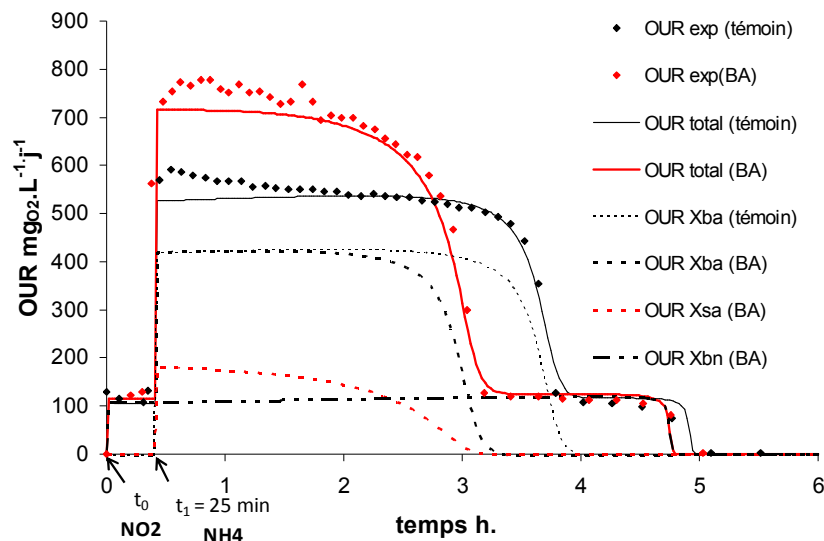


Figure 60 : OUR_{total} et respiration des différentes populations dans les respiromètres témoin et de bio-augmentation (BA) modélisés avec le modèle ASM_N.

Le plateau du respirogramme expérimental témoin présente une diminution progressive qui n'est pas reproduite par la modélisation (Figure 60) car la cause de cette diminution n'a pas été identifiée, donc pas incluse dans le modèle. Tant que de l'ammonium est présent dans le milieu, la respiration simulée se maintient au niveau du plateau de respiration maximale et une légère augmentation est même observée, reflétant la croissance de la biomasse nitrosante. Les populations X_{BA} et X_{BN} étant identiques dans les deux réacteurs, leurs respirations maximales sont également identiques au temps initial, mais la diminution de l'ammonium étant plus rapide dans le réacteur BA, la respiration des X_{BA} diminue 45 minutes plus tôt que dans le réacteur témoin (cf. Figure 60).

L'allure de la courbe expérimentale du réacteur de bio-augmentation semble indiquer qu'un temps de latence est nécessaire à la population X_{SA} avant qu'elle n'atteigne sa vitesse maximale de nitrosation. Pour modéliser cet effet, un facteur d'accélération de la vitesse de

nitrosation pourrait être inclus dans le modèle, avec un terme exponentiel pour représenter le temps de latence, telle que proposée par Vanrolleghem *et al.* (2004).

Cette amélioration du modèle permettrait de reproduire plus fidèlement le respirogramme expérimental, mais elle ne présente pas un intérêt majeur pour la simulation d'une application de la solution NB sur site, car le régime auquel serait soumise la biomasse serait alors continu.

La Figure 61 présente les évolutions expérimentales et modélisées des concentrations des formes solubles d'azote minéral expérimentales et modélisées.

Remarque : les nitrates n'ayant aucun effet sur les cinétiques de réaction, la concentration initiale en nitrates a été fixée manuellement à la valeur de la première mesure expérimentale afin de faire correspondre les points initiaux.

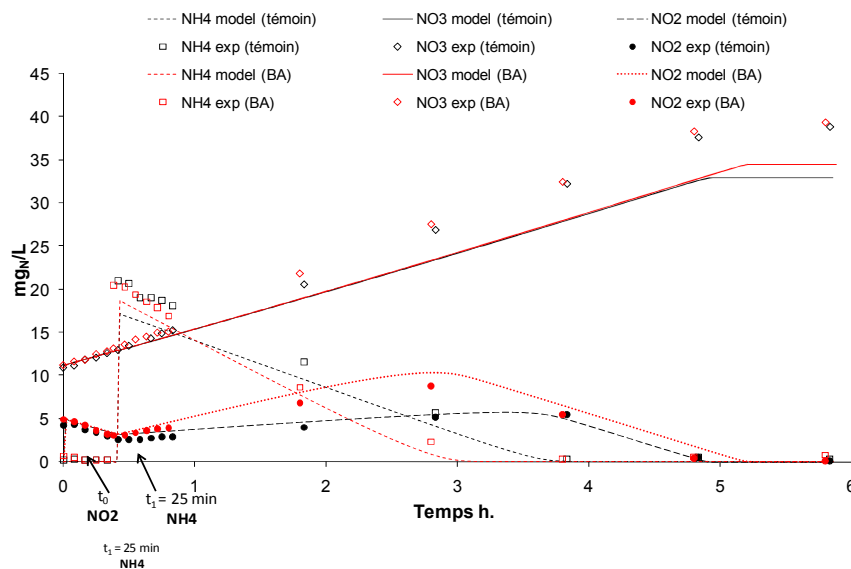


Figure 61: évolution des formes d'azote minéral, mesurées et modélisées, au cours des mesures respirométriques témoin et de bio-augmentation (BA)

Les paramètres ont été calés sur les données d'OUR ; et la comparaison avec le suivi des formes solubles d'azote minéral (Figure 61) permet de valider le calage réalisé. Les deux principaux écarts observés entre la simulation et les données expérimentales sont les suivants :

- les concentrations de NH₄ mesurées sont supérieures aux valeurs simulées au moment de l'injection (t_1), car la quantité d'ammonium injecté en simulation a été diminuée par rapport à l'injection réelle.
- la production de nitrates simulée est inférieure à celle mesurée, en raison d'une part de la plus faible quantité d'ammonium ajoutée en simulation, et d'autre part de la sous-estimation de l'OUR exogène observé pour les échantillons de boues activées (cf. § 3.3.2.1.3).

Globalement la corrélation entre la modélisation et les données expérimentales est satisfaisante.

Le Tableau 20 récapitule la répartition des activités respiratoires, et les activités nitrosantes et nitrifiantes mesurées et modélisées.

Tableau 20 : activités et respirations des différentes populations pour les respiromètres témoin et BA

	Modélisation	Expérimental	Unité
OUR _{max} (témoin)	21,9	24,1	mg _{O2} .L ⁻¹ .h ⁻¹
OUR _{max} (BA)	30,6	32,0	mg _{O2} .L ⁻¹ .h ⁻¹
OUR _{BA-max}	17,44 (57%)*	-	mg _{O2} .L ⁻¹ .h ⁻¹
OUR _{BN-max}	4,69 (15%)*	5,0	mg _{O2} .L ⁻¹ .h ⁻¹
OUR _{SA-max}	8,09 (26%)*	-	mg _{O2} .L ⁻¹ .h ⁻¹
OUR _{SN-max}	0,39 (1%)*	0,36	mg _{O2} .L ⁻¹ .h ⁻¹
N _{Ox} PR (témoin)	5,35	6,79	mg _N .L ⁻¹ .h ⁻¹
N _{Ox} PR (BA)	7,65	8,53	mg _N .L ⁻¹ .h ⁻¹
N _t PR (témoin)	4,43	5,32	mg _N .L ⁻¹ .h ⁻¹
N _t PR (BA)	4,81	5,93	mg _N .L ⁻¹ .h ⁻¹

*pourcentage de l'OUR_{max} (réacteur BA)

La sous-estimation des N_{Ox}PR et N_tPR est de 10 à 21 %. La respiration des X_{SA} atteint initialement 8,09 mg_{O2}.L⁻¹.h⁻¹ (194 mg_{O2}.L⁻¹.j⁻¹), ce qui représente 26 % de l'OUR_{max} atteinte par les boues bio-augmentées (dans un milieu à 20 mg_{N-NH4}/L). La respiration des X_{SA} diminue cependant plus rapidement que celle des X_{BA} (cf. Figure 60) en raison de sa plus faible affinité pour l'ammonium, dont la concentration décroît à mesure de sa consommation par ces deux populations.

L'accumulation des nitrites est plus importante dans le réacteur de bio-augmentation que dans le témoin (Figure 61), car les vitesses de nitrification (consommation des nitrites) sont presque identiques alors que la vitesse de nitrosation (production de nitrites) est augmentée dans le réacteur BA.

Le Tableau 21 récapitule les variables et les paramètres initiaux ainsi que les valeurs obtenues après calage.

Tableau 21: concentrations des biomasses et valeurs des paramètres cinétiques et stœchiométriques utilisés pour la modélisation des respiromètres témoins et de bio-augmentation.

Paramètre-Variable	Valeur initiale	Valeur calée	Unité
$[X_{BA}]$	-	31,6	mg _{DCO} /L
$[X_{BN}]$	-	17,2	mg _{DCO} /L
$[X_{SA}]$	-	4,01	mg _{DCO} /L
$[X_{SN}]$	-	0,71	mg _{DCO} /L
μ_{BA}	0,59*	-	j ⁻¹
μ_{BN}	0,50 ^Δ	-	j ⁻¹
μ_{SA}	2,09 ^Δ	-	j ⁻¹
μ_{SN}	1,00 [§]	-	-
K_{NHB}	0,10 [#]	0,35	g _{N-NH3} /m ³
K_{NOB}	0,10 [#]	0,03	g _{N-NO2} /m ³
K_{NHS}	3,67*	3,32	g _{N-NH3} /m ³
K_{NOS}	0,41 [§]	0,41	g _{N-NO2} /m ³
$Y_{BA} - Y_{SA}$	0,14	-	g _{DCO} /g _N
$Y_{BN} - Y_{SN}$	0,08	-	g _{DCO} /g _N

* : Valeur expérimentale, cf. § 4.3.4

: Valeur standard de modélisation (Choubert et al. 2005, Marquot 2006)

Δ : Kindaichi et al. (2006)

§ : Prosser (1989)

Les boues activées utilisées pour cette expérience présentaient une concentration en boues de 4162 mg_{DCO}/L. Les populations nitrosantes et nitrifiantes des boues activées (X_{BA} et X_{BN}) obtenues par calage représentent donc 0,8 et 0,4 % de la biomasse totale respectivement. Ces fractions sont très faibles, mais correspondent aux fractions mesurées par marquage FISH ($[X_{BA}] = 0,5 - 3,4 \%$ et $[X_{BN}] = 0,5 - 3,0 \%$, cf. § 3.2.2.1). Les populations de la solution NB obtenues ne sont pas représentatives, car le taux de croissance a été fixé estimées par modélisation correspondent à $[X_{SA}] = 19,8$ mg_{DCO}/L et $[X_{SN}] = 3,6$ mg_{DCO}/L, soit 7,7 et 2,6 % respectivement de la valeur estimée par la mesure de DCO et par marquage FISH ($[X_{SA}] = 256$ mg_{DCO}/L et $[X_{SN}] = 135$ mg_{DCO}/L, cf. § 3.2.2.4).

La constante d'affinité pour l'ammonium de la population nitrosante des boues activées ($K_{NHB} = 0,35$ mg_{N-NH4}/L) est supérieure à la valeur standard de la modélisation (valeur initiale). En revanche, elle est de l'ordre de grandeur des valeurs reportées dans la littérature pour le genre *Nitrosomonas oligotropha* : 0,07 – 1,05 (cf. Tableau 2 page 48 dans la partie « Synthèse bibliographique »). Les points de la fin de la nitrosation totale sont correctement reproduits, mais l'incertitude sur la valeur réelle de la vitesse de nitrosation (sous-estimée en raison de la nitrification endogène) ne permet pas de valider cette valeur.

La constante d'affinité pour les nitrites de la population nitratante des boues activées ($K_{NOB} = 0,03 \text{ mg}_{N-NO_2}/L$) semble être sous-estimée. En effet, la fin de la nitratisation expérimentale est plus lente que celle simulée. Cependant, cet écart n'est observé que sur les deux points finaux des respirogrammes, et la sous-estimation de ce paramètre aurait un impact très modéré sur la vitesse simulée de nitratisation des boues. Celle-ci est maximale lorsque la concentration en nitrites s'élève légèrement, mais elle est généralement limitée par la vitesse de nitrosation (production de nitrites) lors du fonctionnement normal d'une station d'épuration à très faible charge. Les valeurs reportées dans la littérature pour cette constante sont également plus élevées ($> 0,11 \text{ mg}_{O_2}/L$, cf. Tableau 3 page 55 dans la partie « Synthèse bibliographique »).

La constante d'affinité pour l'ammonium de la population nitrosante de la solution NB ($K_{NHS} = 3,32 \text{ mg}_{N-NH_4}/L$) est similaire à la valeur mesurée directement pour le même échantillon (C) de solution NB diluée dans des eaux de sortie filtrées ($K_{NHS} = 3,35 \text{ mg}_{N-NH_4}/L$; cf. Tableau 18 p. 175). En revanche, la constante d'affinité pour les nitrites de la population nitratante de la solution NB n'a pas été modifiée de sa valeur initiale ($K_{NOS} = 0,41 \text{ mg}_{N-NO_2}/L$), mais ce paramètre n'est pas identifiable car la vitesse de nitratisation de cette population est trop faible, et que ses variations ne sont pas détectables.

3.4.1.2 Bilan tiré de plusieurs expériences

L'expérience précédente a été répétée trois fois à des périodes différentes, et avec les échantillons B et C, de la solution NB. Différentes proportions de solution NB ont été ajoutées aux boues activées selon les expériences (1% ou 4% volumique). Le Tableau 22 présente les résultats obtenus pour ces trois expériences. Les $N_{Ox}PR$ sont mesurées au cours de la première heure de réaction uniquement.

Tableau 22 : récapitulatif des résultats de mesures sur les boues témoin et bio-augmentées. Le gain correspond à la différence entre la valeur du réacteur de bio-augmentation et du témoin.

Exp.	solution NB		OUR _{max} (mg _{O₂} .L ⁻¹ .h ⁻¹)			N _{Ox} PR (mg _N .L ⁻¹ .h ⁻¹)		
	Echt.	Vol. ^Δ	Témoin	Bio-augmenté	Gain (par % de Solution)	Témoin	Bio-augmenté	Gain (par % de Solution)
1	B	4%	16,7	53,3	9,2* (36,6)	5,1	13,1	4,0* (8,0)
2	B	1%	15,2	24,1	8,9	4,4	9,0	4,6
			Moyenne (B)			Moyenne (B)		
					9,1			4,3
3	C	1%	24,1	32,0	8,1	6,4	8,9	2,5

Δ : pourcentage volumique de solution NB 20X

** : Le gain obtenu pour les 4 % de solution ajoutés (indiqué entre parenthèse) est divisé par 4 pour obtenir le gain de 1%*

Le gain de vitesse mesuré correspond à l'activité de la population nitrosante de la solution NB dans les conditions de mesure (20°C, 20 mg_{N-NH4}/L initial).

Le gain de l'OUR correspond aux mesures des OUR_{max} obtenues peu après l'injection (20 mg_{N-NH4}/L). Afin de contrôler la perte éventuelle d'activité nitrosante de la biomasse lors de son ajout en boues, le gain d'activité du réacteur de bio-augmentation a été comparé à l'activité mesurée pour la solution NB seule diluée dans des eaux de sortie filtrées (ESF).

L'OUR_{max} équivalent dans les conditions des mesures réalisées en dilution dans des ESF (§ 3.3.2.4), a été calculé à partir des facteurs de dilution et des différences de concentrations en ammonium du milieu, la constante d'affinité étant K_{NHS}=3,67 mg_{N-NH4}/L (cf. Tableau 18 p. 175). L'équation 65 détaille le calcul réalisé.

$$\begin{aligned} \text{OUR}_{(\text{éq. ESF})} &= \text{OUR}_{(1\% \text{-boues})} * \frac{\text{dil}^{\circ}_{\text{Boues}1\%}}{\text{dil}^{\circ}_{\text{ESF}}} * \frac{[\text{NH}_4]_{\text{boues}} + K_{\text{NHS}}}{[\text{NH}_4]_{\text{boues}}} * \frac{[\text{NH}_4]_{\text{ESF}}}{[\text{NH}_4]_{\text{ESF}} + K_{\text{NHS}}} \\ \text{OUR}_{(\text{éq.ESF})} &= \text{OUR}_{1\% \text{-boues}} * \frac{100}{20} * \frac{20 + 3,67}{20} * \frac{100}{100 + 3,67} \\ \text{OUR}_{(\text{éq. ESF})} &= \text{OUR}_{1\% \text{-boues}} * 5,71 \end{aligned}$$

équation 65

Les mesures directes de N_{Ox}PR obtenues avec les points de la première heure après injection sont également converties selon le même facteur.

Les vitesses ainsi converties sont reportées dans le Tableau 23 et comparées aux valeurs mesurées en dilution dans des ESF (mesures présentées Tableau 15 page 164).

Tableau 23 : comparaison des activités (OUR et N_{Ox}PR) maximales de la solution NB en boues et en solution dans des ESF

Exp	Solution NB			OUR (mg _{O2} .L ⁻¹ .h ⁻¹)			N _{Ox} PR (mg _N .L ⁻¹ .h ⁻¹)		
				Bio-augmentation		ESF	Bio-augmentation		ESF
	Echt°	% Sol°	Stockage*	1 % boues	éq. ESF	OUR _{SA}	1 % boues	éq. ESF	N _{Ox} PR
1	B	4%	19 jours	9,2	52,5	54,5 ^Δ	4,0	22,8	21,4 ^Δ
2	B	1%	4 mois	8,9	50,8	54,5 ^Δ	4,6	26,3	21,4 ^Δ
3	C	1%	9 semaines	8,1	46,2	44,2 [#]	2,5	14,3	13,5 [#]

* : durée entre la réception de l'échantillon et l'expérience de bio-augmentation

Δ : Mesuré 1 jour après réception de l'échantillon

: Mesuré trois semaine après réception de l'échantillon

Les activités mesurées en boues activées sont équivalentes à celles de la solution diluée dans les ESF. Il n'y a donc pas de pertes d'activité lorsque les populations de la solution NB sont mélangées aux boues activées.

Or, les boues contiennent des organismes supérieurs comme les protozoaires, qui se nourrissent entre autre des micro-organismes en suspension dans le milieu, ainsi que de bactériophages qui participent à la mortalité des bactéries. Cette pression prédatrice peut être un facteur limitant du succès de la bio-augmentation (Bouchez *et al.* 2000b).

Dans le cas étudié, il apparaît que la population nitrosante de la solution NB n'est pas affectée par la pression prédatrice dans les conditions de la mesure. D'après les observations microscopiques réalisées en marquage FISH (cf. annexe 8), les bactéries de la solution NB ne sont pas isolées, mais regroupées en petits amas, ce qui leur confère probablement une certaine résistance à la pression prédatrice.

3.4.2 Expérience de décantation

La biomasse de la solution NB n'est pas groupée en flocons de grande taille, similaires aux boues de station d'épuration. Introduite en station d'épuration à boues activées, elle ne se maintiendra dans le système que si elle décante avec les boues lors du passage dans le décanteur ; sinon elle sera lessivée avec les eaux de sortie.

Diluée dans des eaux de sorties filtrées, la solution NB se présente comme une solution trouble rose-brun, dont la biomasse décante naturellement à très faible vitesse. Par contre, il est aussi possible que la biomasse de la solution NB décante plus rapidement avec les boues activées, en s'incluant par exemple dans la structure des flocons.

Une expérience de décantation a été réalisée, à la suite des expériences de bio-augmentation présentées précédemment (expériences 1 et 3 du Tableau 22), selon le protocole décrit dans la partie « Matériel et méthodes » (§ 2.5.2). L'objectif de cette expérience est d'estimer en quelles proportions et de quelle manière la biomasse de la solution NB, ajoutée à des boues activées, se maintient dans ces boues lors de leur décantation.

3.4.2.1 Observations microscopiques

La biomasse de la solution NB ajoutée dans les boues a été préalablement marquée avec du CFDA/SE (cf. § 2.5.2.2.1). Ce marquage permet de distinguer les populations de la solution NB dans la biomasse totale des boues activées, observées avec un microscope confocal à balayage laser (également possible avec un microscope à épifluorescence). Des échantillons de boues activées bio-augmentées avec la solution marquée sont prélevés après décantation de ces boues pour observation microscopique. Des échantillons de surnageant ont également été prélevés et observés.

La Figure 62 présente des images des boues décantées observées au microscope confocal à balayage laser (MCBL).

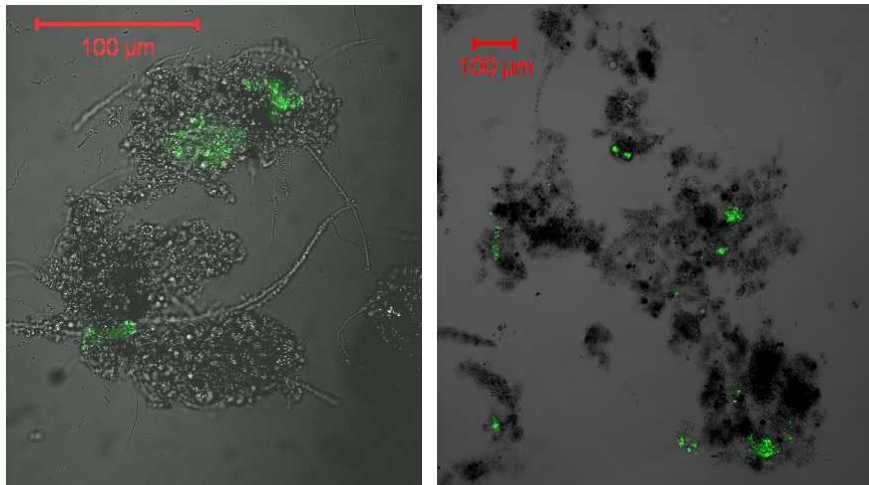


Figure 62 : photographies microscopiques des boues décantées après ajout de solution NB marquée au CFDA/SE avec deux grossissements différents.

La biomasse de la solution NB, visible en vert sur la Figure 62, est intégrée dans les floccs des boues activées. Aucun amas marqué n'a été observé à l'extérieur des floccs, ce qui signifie que la biomasse de la solution NB ne reste pas en suspension dans le milieu.

Dans le surnageant, les amas fluorescents sont difficiles à détecter en raison de leur très faible nombre. En comparaison avec la proportion d'amas fluorescents observée dans les boues décantées, la concentration du surnageant en biomasse marquée peut être considérée comme nulle.

Il semble donc que la biomasse de la solution NB ait des propriétés d'adhésion qui lui permettent de s'intégrer à la structure des floccs.

3.4.2.2 Analyses respirométriques

Dans un premier temps, l'activité des boues augmentées a été mesurée par comparaison avec un réacteur témoin. Puis une étape de décantation et d'extraction du surnageant a été réalisée. Le volume extrait a été remplacé par des eaux de sortie de la station d'épuration d'origine des boues (filtrées à 0,1 μm) avant la seconde mesure respirométrique (cf. § 2.5.2.2.2). Ainsi, par comparaison de l'activité du réacteur de bio-augmentation avant et après décantation, la proportion de solution NB éliminée avec le surnageant peut être estimée.

La Figure 63 présente les respirogrammes obtenus pour ces deux expériences.

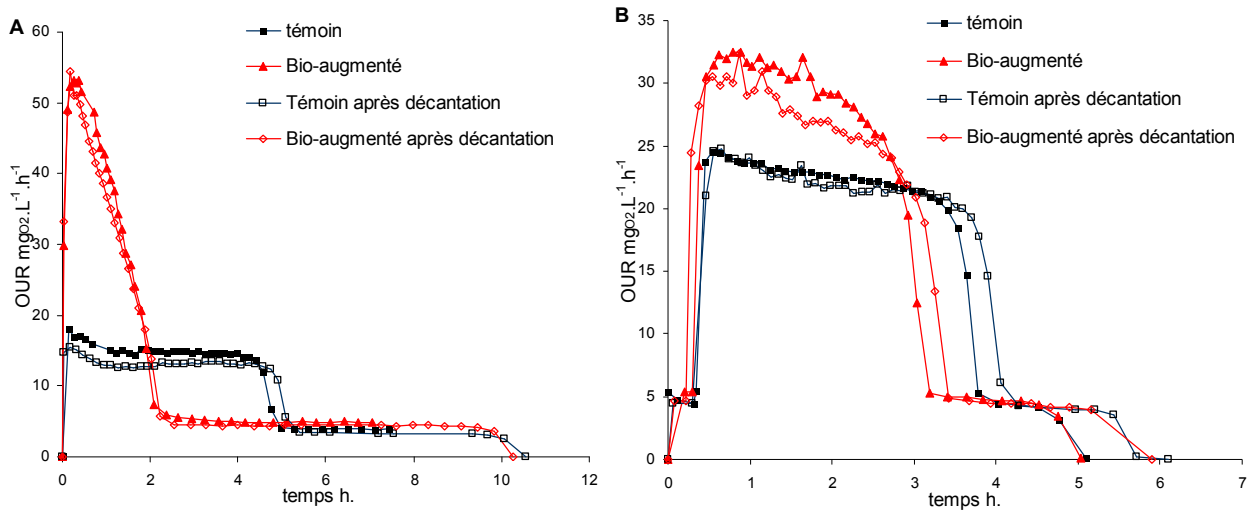


Figure 63: respirogrammes comparés des réacteurs témoins et de bio-augmentation, avant et après décantation pour A) 4% de solution NB, NH₄= 20mgN/L et NO₂ = 20mgN/L, B) 1% de solution NB, NH₄= 20mgN/L et NO₂ = 5mgN/L et injection de NO₂ 25 minutes avant l'injection de NH₄.

L'augmentation de l'activité nitrosante pour l'expérience réalisée avec 4% est importante : 53,3 mgO₂.L⁻¹.h⁻¹ en début de respirogramme au lieu de 16,7 mgO₂.L⁻¹.h⁻¹ pour le témoin, soit 35,18 mgO₂.L⁻¹.h⁻¹ d'augmentation. Par contre la diminution de la respiration est immédiate (Figure 63) et rapide car l'ammonium est consommé très rapidement (activité nulle 2h après l'injection).

Le Tableau 24 présente les valeurs d'OUR_{max} pour la nitrosation obtenues lors de ces expériences.

Tableau 24: comparaison des OUR_{max} de nitrosation lors des expériences de décantation.

% solution NB		OUR _{max} (mgO ₂ .L ⁻¹ .h ⁻¹)		
		Témoin	Bio-augmenté	Gain (par % de sol° NB)
4%	Avant décantation	16,7	53,3	9,2
	Après décantation	14,9	52,1	9,3
	Variation	-1,8 (-10%)*	-1,2 (-2%)*	0,1 (1%)*
1%	Avant décantation	24,1	32,0	8,1
	Après décantation	24,2	30,3	6,2
	Variation	0,1 (<1%)*	-1,7 (5%)*	-1,9 (-23%)*

* : pourcentage de variation avant-après décantation

Pour l'expérience réalisée avec 4 % d'augmentation, aucune perte n'a été observée après décantation. Par contre, pour l'expérience réalisée avec 1 % d'augmentation, les pertes par décantation sont faibles (< 2 mgO₂. L⁻¹.h⁻¹), mais résultent en un pourcentage de variation assez important (23 %), car cette différence est rapportée à une faible augmentation de la respiration (8,1 mgO₂. L⁻¹.h⁻¹). Cette différence peut être considérée comme négligeable car les

écarts entre les mesures avant et après décantation sont faibles et peuvent être induits par d'autres facteurs que de la perte dans le surnageant ; comme par exemple des pertes de biomasse décantée lors de l'extraction du surnageant (erreurs de manipulation).

Ces résultats confirment donc que la biomasse active de la solution NB est piégée dans la phase décantée des boues activées. Lors d'une application sur site, elle ne devrait donc pas être éliminée avec les eaux de sorties lors de son passage dans le décanteur.

3.4.3 Conclusions et discussion

L'ajout de solution NB dans des boues activées nitrifiantes entraîne une augmentation de la vitesse de nitrosation dépendante de la proportion d'ajout et de la concentration en ammonium dans le milieu. En revanche, la vitesse de nitrification n'est pratiquement pas augmentée.

L'allure des respirogrammes est modifiée lorsque les boues contiennent une fraction de solution NB : l' OUR_{max} est plus élevée et diminue progressivement. Les différentes allures de respirogrammes sont correctement reproduites par le modèle ASM_N. Ce modèle permet d'estimer les proportions théoriques de chaque population, mais les vitesses de réaction obtenues sont inférieures aux vitesses mesurées par analyses chimiques à cause du biais observé précédemment pour la respirométrie en boues activées (§ 3.3.2.1.3). En revanche, les constantes d'affinité des populations nitrosantes obtenues par calage semblent correctes.

Les vitesses de nitrosation de la solution NB obtenues en boues activées ou par dilution dans des eaux de sorties filtrées sont similaires, ce qui indique **le maintien de l'activité lors du mélange avec des boues activées**.

Par ailleurs, les tests de décantation réalisés ont montré que la biomasse de la solution NB ajoutée à des boues activées **se retrouve en quasi-totalité dans les boues décantées**, d'après les résultats concordants de l'observation microscopique des bactéries marquées et des mesures respirométriques.

Les amas de bactéries constituant la biomasse de la solution NB adhèrent aux floccs des boues activées, ce qui est favorable à leur maintien dans la station d'épuration, et leur confère également une protection contre les prédateurs (protozoaires et autres macro-organismes).

Cependant, d'après les paramètres cinétiques de la biomasse nitrosante de la solution NB (X_{SA}), les conditions normales de fonctionnement des stations d'épuration municipales à faibles charges seront plutôt favorables aux populations autochtones des boues activées, principalement en raison de la faible affinité pour l'ammonium des bactéries X_{SA} . En effet,

lorsqu'une station d'épuration fonctionne correctement, la concentration en ammonium dans le bassin d'aération est faible ($< 2 \text{ mgN-NH}_4/\text{L}$), et donc favorable aux bactéries nitrosantes de type $-K$ comme *Nitrosomonas oligotropha* concurrentes pour le substrat.

L'utilisation des solutions commerciales de bio-augmentation est généralement envisagée en cas de problèmes de nitrification, donc pour des systèmes dont la concentration en ammonium est plus élevée que lors de son fonctionnement normal. Ainsi, la population X_{SA} ajoutée dans une station d'épuration nitrifiant partiellement sera initialement très active, mais sa vitesse de nitrosation et de croissance diminuera à mesure que les performances de nitrification s'amélioreront. Les populations autochtones prendront alors probablement le relais.

Dans le cas d'un traitement appliqué en vue d'une augmentation de la charge à traiter d'une installation fonctionnant normalement (station touristique, unité mobile de déshydratation des boues, etc.), l'ajout de la solution ne devra pas être effectué longtemps avant l'arrivée de la surcharge. En effet, la population X_{SA} introduite ne se maintiendrait probablement pas dans le système contenant trop peu d'ammonium, car elle est peu adaptée à ces conditions, en comparaison des populations autochtones.

En revanche, lors de l'augmentation de la charge et de la concentration, l'activité nitrosante de cette population (X_{SA}) pourra suppléer à l'activité des populations autochtones, le temps que celles-ci se développent. Cependant, la compétition pour l'ammonium avec les populations autochtones retardera probablement l'installation d'une nouvelle population de type autochtone en quantité suffisante pour nitrifier la charge reçue. Cette stratégie semble donc risquée *apriori* pour maintenir le respect des niveaux de rejet. Dans ce cas de figure, une autre stratégie peut également être envisagée, consistant à augmenter artificiellement la population autochtone par des injections contrôlées d'ammonium préalablement à l'arrivée de la surcharge. Mais cette stratégie est également délicate car le substrat carboné nécessaire à la dénitrification pourrait alors venir à manquer.

Dans un système discontinu de type SBR (Sequencing Batch Reactor), les concentrations en ammonium du milieu subissent des variations importantes à chaque cycle, évoluant progressivement de la concentration d'entrée à la concentration de sortie. Yuan *et al.* (2008) ont montré par la simulation que ces variations de concentrations favorisent les bactéries de stratégies $-r$ par rapport aux bactéries de stratégies- K . Ainsi, l'utilisation de solutions commerciales pour ensemercer les boues d'un SBR devrait s'avérer plus efficace que pour les systèmes classiques.

Ces tendances envisagées *a priori* devront être confirmées par la modélisation de scénarios de bio-augmentation, qui permettra également d'évaluer les quantités utiles, les conditions adéquates (gestion de l'aération, rétention éventuelle de l'effluent en bassin d'orage, etc.), et l'effet attendu de la bio-augmentation ponctuelle d'un système nitrifiant. Cette modélisation pourra être réalisée avec un modèle incluant toutes les populations des boues bio-augmentées, c.à.d. la biomasse hétérotrophe et les quatre populations autotrophes du modèle ASM_N.

Conclusions générales et perspectives

Dans les stations d'épuration municipales nitrifiantes, des évènements ponctuels peuvent parfois provoquer une diminution momentanée du rendement épuratoire, et affecter particulièrement l'activité nitrifiante (baisse subite de la température, augmentation brutale de la charge à traiter, transit d'un toxique, etc.). Or, cette étape transitoire peut perdurer si les conditions ne sont pas favorables au développement de la biomasse nitrifiante.

La bio-augmentation a été étudiée dans ce cadre, en tant que stratégie visant à assurer une restauration rapide de l'activité nitrifiante. Ce travail a été plus particulièrement focalisé sur la capacité d'adaptation d'une population nitrifiante exogène dans une station d'épuration municipale à très faible charge.

Différents outils issus des domaines de la biologie moléculaire et du génie des procédés ont été mis en œuvre afin d'étudier les populations nitrifiantes des stations d'épuration municipales à très faibles charges et de les comparer à une population issue d'une solution nitrifiante commerciale destinée à la bio-augmentation (appelée solution NB).

13 stations d'épuration municipales nitrifiantes de différentes tailles ont été échantillonnées à différentes périodes échelonnées sur 20 mois. Les populations nitrifiantes de ces échantillons ont été analysées selon plusieurs approches permettant de caractériser leur diversité, leur abondance et leur activité, de même que celles des populations de la solution NB. L'étude d'un large spectre d'échantillons provenant de systèmes du même type a permis de tirer des conclusions générales pouvant être étendues à la majorité des stations d'épuration municipales à très faible charge.

Principaux résultats

Les échantillons ont été analysés suivant trois axes : diversité des communautés nitrosantes, abondance des biomasses nitrosantes et nitratantes et activité nitrifiante de ces populations.

Diversité

Les communautés nitrosantes ont été analysées par la méthode de typage moléculaire DGGE permettant d'observer leurs profils sur la base des variations de séquence de l'ADNr-16S.

De ces analyses, il est ressorti que les communautés nitrosantes des boues activées de stations d'épuration municipales à très faibles charges sont largement dominées par une espèce du groupe *6a-Nitrosomonas oligotropha*, excepté dans le cas d'une seule station parmi les 13

étudiées recevant des effluents très dilués, dont la communauté nitrosante est dominée par une espèce du type *Nitrosospira*.

Par ailleurs, la composition des communautés nitrosantes d'une même station d'épuration reste stable tout au long de l'année, perdant un peu en diversité apparente lors des périodes les plus froides. La diversité apparente semble également être liée à la charge azotée reçue par l'installation car les stations d'épuration recevant les plus fortes charges volumiques azotées (B_V) présentent les profils les moins diversifiés.

Enfin, l'analyse de la **solution NB** a montré que la seule espèce nitrosante entrant dans sa composition appartient au groupe *7-Nitrosomonas europaea*, dont aucun représentant n'a été identifié sur l'ensemble des échantillons de boues activées analysés.

Abondance

Les fractions de biomasses nitrosantes et nitratantes ramenées à la biomasse totale des échantillons ont été estimées par la technique de marquage FISH couplée à l'analyse d'images. Rapportées aux mesures des MVS de chaque échantillon, ces fractions ont permis d'estimer les concentrations des populations ciblées. Cependant, les faibles proportions de ces biomasses dans les boues activées de stations d'épuration municipales et la forte auto-fluorescence naturelle des boues induisent une très forte incertitude sur les résultats obtenus.

Selon ces estimations, **la biomasse nitrosante des boues activées représente 0,5 à 3,0 %** de la biomasse totale, et **la biomasse nitratante 0,5 % à 3,4 %**. Ramenées aux concentrations en MVS (comprises entre 1,5 et 5 g/L), ces populations représentent entre 10 et 75 $\text{mg}_{\text{MVS}}/\text{L}$ pour la biomasse nitrosante, et entre 9 et 70 $\text{mg}_{\text{MVS}}/\text{L}$ pour la biomasse nitratante. Par ailleurs, les proportions relatives de ces deux biomasses sont similaires (ratio nitrosante/nitratante ≈ 1). **La solution NB contient 45 ± 6 % de biomasse nitrosante, et 24 ± 3 % de biomasse nitratante** (*Nitrobacter*), soit 190 ± 26 $\text{mg}_{\text{MVS}}/\text{L}$ et 100 ± 15 $\text{mg}_{\text{MVS}}/\text{L}$.

Activité

Les mesures d'activité nitrifiante ont été réalisées par respirométrie et par suivi direct de l'évolution des formes solubles d'azote minéral (mesures chimiques). Les vitesses maximales de nitrosation sont comprises entre 3,7 et 12,5 $\text{mg}_{\text{N-NOx}} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$, et les vitesses de nitratation mesurées entre 2,7 et 12,9 $\text{mg}_{\text{N-NO}_3} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$.

Des incohérences ont été observées pour les mesures respirométriques de l'activité nitrifiante des boues activées : d'une part, l'OUR exogène mesurée sous-estime la respiration liée à l'activité nitrifiante, et d'autre part, la consommation totale d'oxygène estimée au cours de la mesure ne correspond pas à la quantité de substrat ajoutée. Ces deux problèmes semblent être dus à un impact de l'activité endogène liée à l'auto-oxydation des boues.

Néanmoins, les vitesses maximales de nitrosation mesurées en présence d'un excès d'ammonium par voie chimique ont permis de confirmer la relation établie entre la charge volumique azotée des stations d'épuration et les vitesses de nitrification *in-situ* (Choubert *et al.* 2005).

L'analyse de la solution NB a mis en évidence une très faible activité nitratante ($< 2 \text{ mg}_{\text{N-NO}_3} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$), et une activité nitrosante comprise entre **13,5 et 19,5 $\text{mg}_{\text{N-NO}_x} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$** selon les échantillons. L'absence d'activité endogène a permis l'utilisation de la respirométrie pour l'estimation des paramètres cinétiques de la population nitrosante. Cette population présente une faible affinité pour l'ammonium ($K_{\text{NHS}} = 3,67 \text{ mg}_{\text{N-NH}_4}/\text{L}$), et pour l'oxygène ($K_{\text{OSA}} = 0,56 \text{ mg}_{\text{O}_2}/\text{L}$), ainsi qu'une constante de température ($\theta = 1,120$) plus élevée que celle des populations des boues activées ($\theta = 1,059$ selon Choubert *et al.* (2005) et Marquot, (2006)).

Par ailleurs, le couplage des vitesses expérimentales de nitrosation avec la concentration estimée de la biomasse nitrosante de cette solution conduit à déterminer un très faible taux de croissance maximal ($\mu_{\text{SAmax}} = 0,17 - 0,24 \text{ j}^{-1}$) 1,5 à 15 fois inférieur aux valeurs habituellement rapportées pour ces populations (*Nitrosomonas europaea*). Ce résultat remet en cause la pertinence de la méthode utilisée pour évaluer les concentrations des biomasses nitrifiantes en termes de DCO. Cette évaluation repose en effet sur des résultats expérimentaux (X_{BA} et ρ_{BA}) et sur une relation théorique reliant ces données au taux de croissance (μ_{BA}) et au rendement de synthèse (Y_{BA}).

Bio-augmentation

La bio-augmentation a été étudiée à l'aide d'un marqueur fluorescent et par des mesures de cinétiques par respirométrie. Le marquage fluorescent au CFDA/SE a permis d'observer la localisation de la biomasse marquée sans en affecter l'activité.

Aucunes pertes d'activité nitrosante n'a été observée lors de l'introduction de la solution NB dans des boues activées. Les allures de respirogrammes et les évolutions des formes solubles d'azote minéral ont été reproduites avec succès à l'aide du modèle ASM_N, intégrant 2 populations nitrosantes et 2 populations nitrifiantes. Cependant, des imprécisions demeurent en raison des biais induits par l'activité endogène des boues.

Par ailleurs, la propriété d'adhésion de la biomasse de la solution NB aux floes a été mise en évidence grâce au marquage fluorescent. L'intégration de cette biomasse aux floes lui permet de décanter avec les boues évitant ainsi un lessivage rapide avec les eaux de sortie des ouvrages.

Discussion

L'analyse globale de l'ensemble de ces résultats permet de tirer les conclusions suivantes concernant l'application de la technique de bio-augmentation aux stations d'épuration municipales à très faible charge :

L'activité nitrifiante de la solution commerciale étudiée ne diminue pas lorsqu'elle est introduite dans des boues activées, et de plus les bactéries s'intégrant à la structure des floes bénéficient d'une bonne résistance à la prédation, et ne sont pas lessivées avec l'effluent traité. Ces propriétés assurent un maintien à court terme de la biomasse exogène issue de cette solution dans un système à boues activées, mais son maintien à long terme dépendra également de la dynamique des populations en fonction des conditions de fonctionnement du système (charge, âge de boues, température, etc.).

Or, les populations nitrosantes contenues dans la solution étudiée appartiennent à un groupe phylogénétique qui semble être absent des stations d'épuration municipale à très faible charges. L'absence de représentants de ce groupe suggère que les conditions prédominantes dans ce type de systèmes ne sont pas favorables à son maintien. D'autre part, la comparaison des paramètres cinétiques déterminés pour la population nitrosante de la solution NB (constante de température, constantes d'affinité pour l'ammonium et pour l'oxygène) avec ceux établis pour les stations d'épuration municipales à très faible charge révèle que les conditions normales de fonctionnement de ces systèmes (notamment les faibles concentrations en NH_4) seront défavorables à cette population par rapport aux populations autochtones des boues activées.

Ainsi, l'ajout de solution commerciale dans une station d'épuration municipale à très faible charge soumise à des problèmes de nitrification devrait permettre d'augmenter temporairement l'activité nitrifiante du système, mais le maintien de la population introduite dans les conditions normales de fonctionnement semble peu probable. Les populations nitrifiantes autochtones étant en compétition pour le substrat avec les populations ajoutées, il conviendra de maîtriser leur développement afin d'assurer le maintien des niveaux de rejets pendant toute la période transitoire. L'étude des stratégies permettant d'atteindre cet objectif requerra une analyse de scénarios par modélisation.

Perspectives

Les résultats obtenus au cours de ce travail ont soulevé diverses questions qui nécessitent d'être approfondies afin d'améliorer la compréhension et l'analyse des populations nitrifiantes et de leur activité :

- D'une part, il semble important d'établir les liens précis entre les concentrations des populations nitrosantes et nitratantes et leurs activités respectives mesurées à échelle macroscopique. Dans un premier temps cette relation pourra être étudiée pour une culture enrichie en biomasse nitrifiante dont la concentration en biomasse peut être estimée par la mesure des MVS et/ou de la DCO (les fractions nitrosantes/nitratantes étant par exemple estimées par marquage FISH). Ensuite, les méthodes de quantification directes des populations nitrifiantes (FISH et MVS, QPCR, Dot Blot, etc.) pourront être comparées entre elles, ainsi qu'aux vitesses de réaction pour différents échantillons (boues activées et cultures enrichies).
- D'autre part, une analyse approfondie de l'activité endogène des boues devra être réalisée afin d'estimer son impact sur les mesures respirométriques de l'activité nitrifiante suivant deux axes : l'évaluation du relargage d'ammonium par l'auto-oxydation des boues à partir de données respirométriques, et l'étude des variations potentielles de l'activité endogène lors d'un ajout d'ammonium dans le milieu.

Par ailleurs, la poursuite de l'étude de la bio-augmentation pourra être effectuée selon les axes suivants :

- La détermination d'un jeu de paramètres complet pour les populations d'une solution nitrifiante de bio-augmentation comparable à celui des populations des boues activées. Les taux de croissance des populations nitrifiantes devront notamment être déterminés, à partir des mesures d'activité si possible, ou par le suivi de la croissance dans un milieu

contrôlé pendant plusieurs jours (en appliquant par exemple les protocoles proposés par la WERF (Melcer *et al.* 2003)).

- L'évaluation de différents scénarios de bio-augmentation par la simulation avec un modèle complet, incluant les différentes populations nitrifiantes (autochtones et exogènes) ainsi que l'ensemble des réactions de transformation du substrat carboné.

Cette analyse pourra en outre être élargie à différentes solutions commerciales nitrifiantes disponibles sur le marché, ainsi qu'à différents systèmes de traitements pour leur application.

La production d'une solution concentrée contenant de l'espèce dominante des boues activées de stations d'épuration municipales à faible charge (*6a-Nitrosomonas oligotropha*) pourra également être expérimentée en laboratoire, afin de proposer une biomasse parfaitement adaptée au milieu récepteur comme matériel de bio-augmentation.

Références bibliographiques

- Abeysinghe, D. H., De Silva, D. G. V., Stahl, D. A., and Rittmann, B. E. (2002). "The effectiveness of bioaugmentation in nitrifying systems stressed by a washout condition and cold temperature." *Water Environment Research*, **74**(2), 187-199.
- Adair, K. L., and Schwartz, E. (2008). "Evidence that ammonia-oxidizing Archaea are more abundant than ammonia-oxidizing bacteria in semiarid soils of northern Arizona, USA." *Microbial Ecology*, **56**(3), 420-426.
- Ahn, J. H., Yu, R., and Chandran, K. (2008). "Distinctive microbial ecology and biokinetics of autotrophic ammonia and nitrite oxidation in a partial nitrification bioreactor." *Biotechnology and Bioengineering*, **100**(6), 1078-1087.
- Ali, I., Khararjian, H., and Ahmed, M. (1985). "Viability of microbial mass in compartmentalised single activated sludge process." *Water Research*, **19**(7), 927-932.
- Amann, R. L., Krumholz, L., and Stahl, D. A. (1990). "Fluorescent-oligonucleotide probing of whole cells for determinative, phylogenetic, and environmental studies in microbiology." *Journal of Bacteriology*, **172**(2), 762-770.
- Anisimova, M., and Gascuel, O. (2006). "Approximate likelihood-ratio test for branches: A fast, accurate, and powerful alternative." *Systematic Biology*, **55**(4), 539-552.
- Avrahami, S., and Conrad, R. (2005). "Cold-temperate climate: a factor for selection of ammonia oxidizers in upland soil?" *Canadian Journal of Microbiology*, **51**(8), 709-714.
- Ballinger, S. J., Head, I. M., Curtis, T. P., and Godley, A. R. (1998). "Molecular microbial ecology of nitrification in an activated sludge process treating refinery wastewater." *Water Science and Technology*, **37**(4-5), 105-108.
- Ballinger, S. J., Head, I. M., Curtis, T. P., and Godley, A. R. (2002). "The effect of C/N ratio on ammonia oxidising bacteria community structure in a laboratory nitrification-denitrification reactor." *Water Science and Technology*, **37**(4-5) 543-550.
- Barker, P. S., and Dold, P. L. (1997). "General model for biological nutrient removal activated-sludge systems: model presentation." *Water Environment Research*, **69**(5), 969-984.
- Barnard, J. L. (1975). "Biological nutrient removal without the addition of chemicals." *Water Research*, **9**(5-6), 485-490.
- Béline, F., Bousier, H., Guiziou, F., and Paul, E. (2007). "Modelling of biological nitrogen removal during treatment of piggery wastewater." *Water Science and Technology*, **55**(10) 11-19.
- Belser, L. W., and Schmidt, E. L. (1980). "Growth and oxidation kinetics of three genera of ammonia oxidizing nitrifiers." *FEMS Microbiology Letters*, **7**(3), 213-216.
- Biesterfeld, S., Figueroa, L., Hernandez, M., and Russell, P. (2001). "Quantification of nitrifying bacterial populations in a full-scale nitrifying trickling filter using fluorescent *in situ* hybridization." *Water Environment Research*, **73**(3), 329-338.
- Blackburne, R., Vadivelu, V. M., Yuan, Z., and Keller, J. (2007a). "Kinetic characterisation of an enriched *Nitrospira* culture with comparison to *Nitrobacter*." *Water Research*, **41**(14), 3033-3042.
- Blackburne, R., Vadivelu, V. M., Yuan, Z., and Keller, J. (2007b). "Determination of growth rate and yield of nitrifying bacteria by measuring carbon dioxide uptake rate." *Water environment research : a research publication of the Water Environment Federation*, **79**(12), 2437-2445.
- Bollmann, A., Bär-Gilissen, M. J., and Laanbroek, H. J. (2002). "Growth at low ammonium concentrations and starvation response as potential factors involved in niche differentiation among ammonia-oxidizing bacteria." *Applied and Environmental Microbiology*, **68**(10), 4751-4757.

- Bouchez, T. (2000a). "Etude de l'inoculation d'une bactérie dans des boues activées.," *Thèse de doctorat, Institut national Agronomique Paris Grignon*, 215 p. + annexes.
- Bouchez, T., Patureau, D., Dabert, P., Juretschko, S., Dore, J., Delgenes, P., Moletta, R., and Wagner, M. (2000b). "Ecological study of a bioaugmentation failure." *Environmental Microbiology*, **2**(2), 179-190.
- Bouchez, T., Dabert, P., Wagner, M., Godon, J. J., and Moletta, R. (2001). "Quantification of bacterial populations in complex ecosystems using fluorescent *in situ* hybridization, confocal laser scanning microscopy and image analysis." *Genetics Selection Evolution*, **33**(SUPPL. 1), S307-S318.
- Boursier, H. (2003). "Etude et modélisation des procédés biologiques au cours du traitement aérobie du lisier de porc en vue d'une optimisation du procédé," *Thèse de doctorat, INSA Toulouse*, 173 p. + annexes.
- Brandt, K. K., Hesselsøe, M., Roslev, P., Henriksen, K., and Sørensen, J. (2001). "Toxic Effects of Linear Alkylbenzene Sulfonate on Metabolic Activity, Growth Rate, and Microcolony Formation of *Nitrosomonas* and *Nitrospira* Strains." *Applied and Environmental Microbiology*, **67**(6), 2489-2498.
- Burrell, P. C., Keller, J., and Blackall, L. L. (1998). "Microbiology of a nitrite-oxidizing bioreactor." *Applied and Environmental Microbiology*, **64**(5), 1878-1883.
- Canler, J. P., Perret, J. M., and Choubert, J. M. (2007). "Le traitement du carbone et de l'azote pour des stations d'épuration de type boue activée confrontées à des fortes variations de charge et à des basses températures. Cas des stations touristiques hivernales de montagne", *Document technique FNDAE* 34.
- Capela, S., Gillot, S., and Héduit, A. (2004). "Comparison of oxygen-transfer measurement methods under process conditions." *Water Environment Research*, **76**(2), 183-188.
- Carrio, L., Sexton, J., Lopez, A., Gopalakrishnam, K., and Sapienza, V. (2003) "Ammonia-Nitrogen removal from centrate. 10 Years of testing and operating experience in New York City." *WEFTEC conference, Los Angeles*.
- Casciotti, K. L., and Ward, B. B. (2001). "Dissimilatory Nitrite Reductase Genes from Autotrophic Ammonia-Oxidizing Bacteria." *Applied and Environmental Microbiology*, **67**(5), 2213-2221.
- Castresana, J. (2000). "Selection of conserved blocks from multiple alignments for their use in phylogenetic analysis." *Molecular Biology and Evolution*, **17**(4), 540-552.
- Cébron, A., Coci, M., Garnier, J., and Laanbroek, H. J. (2004). "Denaturing gradient gel electrophoretic analysis of ammonia-oxidizing bacterial community structure in the lower seine river: Impact of paris wastewater effluents." *Applied and Environmental Microbiology*, **70**(11), 6726-6737.
- Chandran, K., and Smets, B. F. (2000). "Applicability of two-step models in estimating nitrification kinetics from batch respirograms under different relative dynamics of ammonia nitrite oxidation." *Biotechnology and Bioengineering*, **70**(1), 54-64.
- Chandran, K., and Smets, B. F. (2001). "Estimating biomass yield coefficients for autotrophic ammonia and nitrite oxidation from batch respirograms." *Water Research*, **35**(13), 3153-3156.
- Chandran, K., and Smets, B. F. (2005). "Optimizing experimental design to estimate ammonia and nitrite oxidation biokinetic parameters from batch respirograms." *Water Research*, **39**(20), 4969-4978.
- Chandran, K., Hu, Z., and Smets, B. F. (2008). "A critical comparison of extant batch respirometric and substrate depletion assays for estimation of nitrification biokinetics." *Biotechnology and Bioengineering*, **101**(1), 62-72.
- Checchi, N., and Marsili-Libelli, S. (2005). "Reliability of parameter estimation in respirometric models." *Water Research*, **39**(15), 3686-3696.

- Chevenet, F., Brun, C., Bañuls, A. L., Jacq, B., and Christen, R. (2006). "TreeDyn: Towards dynamic graphics and annotations for analyses of trees." *BMC Bioinformatics*, **7**.
- Choubert, J. M. (2002). "Analyse et optimisation du traitement de l'azote par les boues activées à basse température," *Thèse de doctorat, Université Louis Pasteur, Strasbourg I*.
- Choubert, J. M., Racault, Y., Grasmick, A., Canler, J. P., Stricker, A. E., Beck, C., and Hédut, A. (2004) "Nitrogen removal by activated sludge under variable load and low temperature." *International conference on wastewater treatment for nutrient removal and reuse, Bangkok*.
- Choubert, J. M., Racault, Y., Grasmick, A., Beck, C., and Hédut, A. (2005). "Maximum nitrification rate in activated sludge processes at low temperature: key parameters, optimal value." *E-Water official publication of the EWA* **13**(9).
- Choubert, J. M., Marquot, A., Stricker, A. E., Gillot, S., Racault, Y., and Hédut, A. (2008). "Maximum growth and decay rates of autotrophic biomass to simulate nitrogen removal at 10°C with municipal activated sludge plants." *Water SA*, **34**(1), 71-76.
- Chung, J., Bae, W., Lee, Y. W., and Rittmann, B. E. (2007). "Shortcut biological nitrogen removal in hybrid biofilm/suspended growth reactors." *Process Biochemistry*, **42**(3), 320-328.
- Coskuner, G., Ballinger, S. J., Davenport, R. J., Pickering, R. L., Solera, R., Head, I. M., and Curtis, T. P. (2005). "Agreement between Theory and Measurement in Quantification of Ammonia-Oxidizing Bacteria." *Appl. Environ. Microbiol.*, **71**(10), 6325-6334.
- Couturier, C. (2006). "La méthanisation des boues urbaines." *Journées techniques ADEME*.
- Daigger, G. T., Norton, L. E., Watson, R. S., Crawford, D., and Sieger, R. B. (1993). "Process and kinetic analysis of nitrification in coupled trickling filter/activated sludge processes." *Water Environment Research*, **65**(6), 750-758.
- Daims, H., Brühl, A., Amann, R., Schleifer, K. H., and Wagner, M. (1999). "The domain-specific probe EUB338 is insufficient for the detection of all bacteria: Development and evaluation of a more comprehensive probe set." *Systematic and Applied Microbiology*, **22**(3), 434-444.
- Daims, H., Ramsing, N. B., Schleifer, K. H., and Wagner, M. (2001a). "Cultivation-Independent, Semiautomatic Determination of Absolute Bacterial Cell Numbers in Environmental Samples by Fluorescence *in Situ* Hybridization." *Applied and Environmental Microbiology*, **67**(12), 5810-5818.
- Daims, H., Purkhold, U., Bjerrum, L., Arnold, E., Wilderer, P. A., and Wagner, M. (2001b). "Nitrification in sequencing biofilm batch reactors: Lessons from molecular approaches." *Water Science and Technology*, **43**(3), 9-18.
- Daims, H., Nielsen, J. L., Nielsen, P. H., Schleifer, K. H., and Wagner, M. (2001c). "In Situ Characterization of *Nitrospira*-Like Nitrite-Oxidizing Bacteria Active in Wastewater Treatment Plants." *Applied and Environmental Microbiology*, **67**(3-12), 5273-5284.
- Daims, H., Lückner, S., and Wagner, M. (2006). "daime, a novel image analysis program for microbial ecology and biofilm research." *Environmental Microbiology*, **8**(2), 200-213.
- Daims, H., and Wagner, M. (2007). "Quantification of uncultured microorganisms by fluorescence microscopy and digital image analysis." *Applied Microbiology and Biotechnology*, **75**(2), 237-248.
- Dereeper, A., Guignon, V., Blanc, G., Audic, S., Buffet, S., Chevenet, F., Dufayard, J. F., Guindon, S., Lefort, V., Lescot, M., Claverie, J. M., and Gascuel, O. (2008). "Phylogeny.fr: robust phylogenetic analysis for the non-specialist." *Nucleic Acids Res*, Jul 1(**36** (Web Server issue):W465-9 Epub).

- Deronzier, G., Schétrite, S., Racault, Y., Canler J. P., Liénard, A., Héduit, A., and Duchène, P. (2002). "Traitement de l'azote dans les stations d'épuration biologique des petites collectivités", *Document technique FNDAE* **25**.
- Dinçer, A. R., and Kargi, F. (2001). "Salt inhibition kinetics in nitrification of synthetic saline wastewater." *Enzyme and Microbial Technology*, **28**(7-8), 661-665.
- Dionisi, H. M., Layton, A. C., Harms, G., Gregory, I. R., Robinson, K. G., and Sayler, G. S. (2002). "Quantification of *Nitrosomonas oligotropha*-like ammonia-oxidizing bacteria and *nitrospira* spp. from full-scale wastewater treatment plants by competitive PCR." *Applied and Environmental Microbiology*, **68**(1), 245-253.
- Dochain D., Vanrolleghem, P. A., and Van Daele, M. (1995). "Structural identifiability of biokinetic models of activated sludge respiration." *Water Research*, **29**(11), 2571-2578.
- Dold, P. L., Jones, R. M., and Bye, C. M. (2005). "Importance and measurement of decay rate when assessing nitrification kinetics." *Water Science and Technology*, **52**(10-11), 469-477.
- Downing, A. L., and Hopwood, A. P. (1964a). "Some observation on the kinetics of nitrifying activated sludge plants." *Schweizerische Aeitschrift fur Hyddrologie*, **26**, 271.
- Downing, A. L., Painter, H. A., and Knowles, G. (1964b). "Nitrification in activated sludge process." *J. Inst. Sew.Purif*, **64**, 130-158.
- Duchène, P., and Cotteux, E. (2002). "Insufflation d'air fines bulles, Application aux stations d'épuration en boues activées des petites collectivités", *Document technique FNDAE* **26**.
- Dytczak, M. A., Londry, K. L., and Oleszkiewicz, J. A. (2008). "Activated sludge operational regime has significant impact on the type of nitrifying community and its nitrification rates." *Water Research*, **42**(8-9), 2320-2328.
- Ebie, Y., Matsumura, M., Noda, N., Tsuneda, S., Hirata, A., and Inamori, Y. (2002). "Community analysis of nitrifying bacteria in an advanced and compact Gappei-Johkasou by FISH and PCR-DGGE." *Water Science and Technology*, **46**, 105-111.
- Egli, K., Langer, C., Siegrist, H. R., Zehnder, A. J. B., Wagner, M., and van der Meer, J. R. (2003). "Community analysis of ammonia and nitrite oxidizers during start-up of nitrification reactors." *Applied and Environmental Microbiology*, **69**(6), 3213-3222.
- Ehrich, S., Behrens, D., Lebedeva, E., Ludwig, W., and Bock, E. (1995). "A new obligately chemolithoautotrophic, nitrite-oxidizing bacterium, *Nitrospira moscoviensis* sp. nov. and its phylogenetic relationship." *Archives of Microbiology*, **164**(1), 16-23.
- Fouratt, M. A., Rhodes, J. S., Smithers, C. M., Love, N. G., and Stevens, A. M. (2003). "Application of temperature gradient gel electrophoresis to the characterization of a nitrifying bioaugmentation product." *Fems Microbiology Ecology*, **43**(2), 277-286.
- Francis, C. A., Roberts, K. J., Beman, J. M., Santoro, A. E., and Oakley, B. B. (2005). "Ubiquity and diversity of ammonia-oxidizing archaea in water columns and sediments of the ocean." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **102**(41), 14683-14688.
- Francis, C. A., Beman, J. M., and Kuypers, M. M. M. (2007). "New processes and players in the nitrogen cycle: The microbial ecology of anaerobic and archaeal ammonia oxidation." *ISME Journal*, **1**(1), 19-27.
- Fuller, M. E., Streger, S. H., Rothmel, R. K., Mailloux, B. J., Hall, J. A., Onstott, T. C., Fredrickson, J. K., Balkwill, D. L., and Deflaun, M. F. (2000). "Development of a vital fluorescent staining method for monitoring bacterial transport in subsurface environments." *Applied and Environmental Microbiology*, **66**(10), 4486-4496.

- Gernaey, A. K., Petersen, B., Ottoy, J. P., and Vanrolleghem, P. (2001). "Activated sludge monitoring with combined respirometric-titrimetric measurements." *Water Research*, **35**(5), 1280-1294.
- Gieseke, A., Purkhold, U., Wagner, M., Amann, R., and Schramm, A. (2001). "Community Structure and Activity Dynamics of Nitrifying Bacteria in a Phosphate-Removing Biofilm." *Applied and Environmental Microbiology*, **67**(3), 1351-1362.
- Grunditz, C., Gumaelius, L., and Dalhammar, G. (1998). "Comparison of inhibition assays using nitrogen removing bacteria: Application to industrial wastewater." *Water Research*, **32**(10), 2995-3000.
- Grunditz, C., and Dalhammar, G. (2001). "Development of nitrification inhibition assays using pure cultures of *Nitrosomonas* and *Nitrobacter*." *Water Research*, **35**(2), 433-440.
- Gujer, W., Henze, M., Mino, T., and Van Loosdrecht, M. (1999). "Activated Sludge Model No. 3." *Water Science and Technology*, **39**(1), 183-193.
- Hall, E. R., and Murphy, K. L. (1980). "Estimation of nitrifying biomass and kinetics in wastewater." *Water Research*, **14**(4), 297-304.
- Hall, S. J., Keller, J., and Blackall, L. L. (2003). "Microbial quantification in activated sludge: The hits and misses." *Water Science and Technology*, **48**(3), 121-126.
- Hallin, S., Lydmark, P., Kokalj, S., Hermansson, M., Sorensson, F., Jarvis, A., and Lindgren, P. E. (2005). "Community survey of ammonia-oxidizing bacteria in full-scale activated sludge processes with different solids retention time." *Journal of Applied Microbiology*, **99**(3), 629-640.
- Harms, G., Layton, A. C., Dionisi, H. M., Gregory, I. R., Garrett, V. M., Hawkins, S. A., Robinson, K. G., and Sayler, G. S. (2003). "Real-time PCR quantification of nitrifying bacteria in a municipal wastewater treatment plant." *Environmental Science and Technology*, **37**(2), 343-351.
- Hastings, R. C., Saunders, J. R., Hall, G. H., Pickup, R. W., and McCarthy, A. J. (1998). "Application of molecular biological techniques to a seasonal study of ammonia oxidation in a eutrophic freshwater lake." *Applied and Environmental Microbiology*, **64**(10), 3674-3682.
- Head, M. A., and Oleszkiewicz, J. A. (2003). "Bioaugmentation for nitrification at cold temperatures." *Water Research*, **38**(3), 523-530.
- Head, M. A., and Oleszkiewicz, J. A. (2005). "Bioaugmentation with nitrifying bacteria acclimated to different temperatures." *Journal of Environmental Engineering-Asce*, **131**(7), 1046-1051.
- Helder, W., and De Vries, R. T. O. (1983). "Estuarine nitrite maxima and nitrifying bacteria (Ems-Dollard estuary)." *Netherlands Journal of Sea Research*, **17**(1), 1-18.
- Henze, M., Grady C.P.L., Jr., Gujer, W., Marais, G. V. R., and Matsuo, T. (1987). "Activated Sludge Model No.1", *IAWPRC Scientific and Technical Report, No.1*, **1**.
- Henze, M., Gujer, W., Mino, T., Matsuo, T., Wentzel, M. C., Marais, G. V. R., and Van Loosdrecht, M. C. M. (1999). "Activated Sludge Model No.2d, ASM2d." *Water Science and Technology*, **39**(1) 165-182.
- Hu, Z., Chandran, K., Grasso, D., and Smets, B. F. (2004). "Comparison of nitrification inhibition by metals in batch and continuous flow reactors." *Water Research*, **38**(18), 3949-3959.
- Hu, Z. R., Wentzel, M. C., and Ekama, G. A. (2007). "A general kinetic model for biological nutrient removal activated sludge systems: Model development." *Biotechnology and Bioengineering*, **98**(6), 1242-1258.
- Hultman, B. (1971). "Kinetics of biological nitrogen removal." *Inst. Vattenforsorjningsoch Avloppsteknik samt Vattenkemi, Stockholm, KTH Pub* **71**(5).

- Janus, H. M., and vanderRoest, H. F. (1997). "Don't reject the idea of treating reject water." *Water Science and Technology*, **35**(10), 27-34.
- Jiang, Q. Q., and Bakken, L. R. (1999). "Comparison of *Nitrosospira* strains isolated from terrestrial environments." *FEMS Microbiology Ecology*, **30**(2), 171-186.
- Jobbágy, A., Tardy, G. M., and Literáthy, B. (2004). "Enhanced nitrogen removal in the combined activated sludge-biofilter system of the Southpest Wastewater Treatment Plant." *Water Science and Technology*, **50**(7), 1-8.
- Jönsson, K., Grunditz, C., Dalhammar, G., and La Cour Jansen, J. (2000). "Occurrence of nitrification inhibition in Swedish municipal wastewaters." *Water Research*, **34**(9), 2455-2462.
- Jubany, I., Baeza, J. A., Carrera, J., and Lafuente, J. (2005). "Respirometric calibration and validation of a biological nitrite oxidation model including biomass growth and substrate inhibition." *Water Research*, **39**(18), 4574-4584.
- Jubany, I. (2007). "Operation, Modeling and Automatic control of complete and partial nitrification of highly concentrated ammonium wastewater," *Thèse de doctorat, Escola Tècnica Superior d'Enginyeria, Barcelona*. 259 p. + annexes.
- Juretschko, S., Timmermann, G., Schmid, M., Schleifer, K. H., Pommerening-Roser, A., Koops, H. P., and Wagner, M. (1998). "Combined molecular and conventional analyses of nitrifying bacterium diversity in activated sludge: *Nitrosococcus mobilis* and *Nitrospira*-like bacteria as dominant populations." *Applied and Environmental Microbiology*, **64**(8), 3042-3051.
- Karner, M. B., Delong, E. F., and Karl, D. M. (2001). "Archaeal dominance in the mesopelagic zone of the Pacific Ocean." *Nature*, **409**(6819), 507-510.
- Kim, W. K., Cui, R., and Jahng, D. (2005). "Enrichment of ammonia-oxidizing bacteria for efficient nitrification of wastewater." *Journal of Microbiology and Biotechnology*, **15**(4), 772-779.
- Kim, D. J., and Kim, S. H. (2006). "Effect of nitrite concentration on the distribution and competition of nitrite-oxidizing bacteria in nitrification reactor systems and their kinetic characteristics." *Water Research*, **40**(5), 887-894.
- Kindaichi, T., Kawano, Y., Ito, T., Satoh, H., and Okabe, S. (2006). "Population dynamics and *in situ* kinetics of nitrifying bacteria in autotrophic nitrifying biofilms as determined by real-time quantitative PCR." *Biotechnology and Bioengineering*, **94**(6), 1111-1121.
- Koch, G., Kühni, M., and Siegrist, H. (2001). "Calibration and validation of an ASM3-based steady-state model for activated sludge systems-part I: Prediction of nitrogen removal and sludge production." *Water Research*, **35**(9), 2235-2245.
- Könneke, M., Bernhard, A. E., De La Torre, J. R., Walker, C. B., Waterbury, J. B., and Stahl, D. A. (2005). "Isolation of an autotrophic ammonia-oxidizing marine archaeon." *Nature*, **437**(7058), 543-546.
- Konuma, S., Satoh, H., Mino, T., and Matsuo, T. (2001). "Comparison of enumeration methods for ammonia-oxidizing bacteria." *Water Science and Technology*, **43**(1) 107-114.
- Koops, H. P., and Pommerening-Röser, A. (2001). "Distribution and ecophysiology of the nitrifying bacteria emphasizing cultured species." *FEMS Microbiology Ecology*, **37**(1), 1-9.
- Kowalchuk, G. A., Stephen, J. R., De Boer, W., Prosser, J. I., Embley, T. M., and Woldendorp, J. W. (1997). "Analysis of ammonia-oxidizing bacteria of the ? subdivision of the class Proteobacteria in coastal sand dunes by denaturing gradient gel electrophoresis and sequencing of PCR-amplified 16S ribosomal DNA fragments." *Applied and Environmental Microbiology*, **63**(4), 1489-1497.

- Kreuzinger, N., Farnleitner, A., Wandl, G., Hornek, R., and Mach, R. (2003). "Molecular biological methods (DGGE) as a tool to investigate nitrification inhibition in wastewater treatment." *Water Science and Technology*, **47**(11), 165-172.
- Kuo, D. H. W., Robinson, K. G., Layton, A. C., Meyers, A. J., and Sayler, G. S. (2006). "Real-time PCR quantification of ammonia-oxidizing bacteria (AOB): Solids retention time (SRT) impacts during activated sludge treatment of industrial wastewater." *Environmental Engineering Science*, **23**(3), 507-520.
- Laanbroek, H. J., Bodelier, P. L. E., and Gerards, S. (1994). "Oxygen consumption kinetics of *Nitrosomonas europaea* and *Nitrobacter hamburgensis* grown in mixed continuous cultures at different oxygen concentrations." *Archives of Microbiology*, **161**(2), 156-162.
- Lam, P., and Cowen, J. P. (2004). "Processing Deep-Sea Particle-Rich Water Samples for Fluorescence *in Situ* Hybridization: Consideration of Storage Effects, Preservation, and Sonication." *Applied and Environmental Microbiology*, **70**(1), 25-33.
- LaPara, T. M., and Ghosh, S. (2006). "Population dynamics of the ammonia-oxidizing bacteria in a full-scale municipal wastewater treatment facility." *Environmental Engineering Science*, **23**(2), 309-319.
- Li, B., Irvin, S., and Baker, K. (2006). "The variation of nitrifying bacterial population with DO and HRT in a sequencing batch reactor (SBR)." *IWA conference, Beijing*.
- Li, B., Irvin, S., and Baker, K. (2007). "The variation of nitrifying bacterial population sizes in a sequencing batch reactor (SBR) treating low, mid, high concentrated synthetic wastewater." *Journal of Environmental Engineering and Science*, **6**(6), 651-663.
- Limpiyakorn, T., Kurisu, F., and Yagi, O. (2006). "Quantification of ammonia-oxidizing bacteria populations in full-scale sewage activated sludge systems and assessment of system variables affecting their performance." *Water Science and Technology*, **54**(1), 91-99.
- Limpiyakorn, T., Shinohara, Y., Kurisu, F., and Yagi, O. (2005). "Communities of ammonia-oxidizing bacteria in activated sludge of various sewage treatment plants in Tokyo." *Fems Microbiology Ecology*, **54**(2), 205-217.
- Loy, A., Horn, M., and Wagner, M. (2003). "ProbeBase: An online resource for rRNA-targeted oligonucleotide probes." *Nucleic Acids Research*, **31**(1), 514-516.
- Ludwig, W., and Schleifer, K. H. (2000). "How quantitative is quantitative PCR with respect to cell counts?" *Systematic and Applied Microbiology*, **23**(4), 556-562.
- MacArthur, R. and Wilson, E. O. (1967). "The Theory of Island Biogeography", *Princeton University Press* (2001 reprint)
- Manser, R., Gujer, W., and Siegrist, H. (2005a). "Consequences of mass transfer effects on the kinetics of nitrifiers." *Water Research*, **39**(19), 4633-4642.
- Manser, R., Mucche, K., Gujer, W., and Siegrist, H. (2005b). "A rapid method to quantify nitrifiers in activated sludge." *Water Research*, **39**(8), 1585-1593.
- Marquot, A. (2006). "Modelling nitrogen removal by activated sludge on full-scale plants: Calibration and evaluation of ASM1." *Thèse de doctorat, Université de Pau et des pays de l'Adour*, 254 p. + annexes.
- Marsili Libelli, S., Ratini, P., Spagni, A., and Bortone, G. (2001). "Implementation, study and calibration of a modified ASM2d for the simulation of SBR processes." *Water Science and Technology*, **43**(3), 69-76.
- Matsumoto, S., Terada, A., Aoi, Y., Tsuneda, S., Alpkvist, E., Picioreanu, C., and van Loosdrecht, M. C. M. (2007). "Experimental and simulation analysis of community structure of nitrifying bacteria in a membrane-aerated biofilm." *Water Science and Technology*, **55**(8-9) 283-290.

- Melcer, H., Dold, P. L., Jones, R. M., Bye, C. M., Takacs, I., Stensel, H. D., Wilson, A. W., Sun, P., and Bury, S. (2003). "Methods for Wastewater Characterization in Activated Sludge Modeling". *WERF*.
- Milner, M. G., Curtis, T. P., and Davenport, R. J. (2008). "Presence and activity of ammonia-oxidising bacteria detected amongst the overall bacterial diversity along a physico-chemical gradient of a nitrifying wastewater treatment plant." *Water Research*, **42**(12), 2863-2872.
- Mobarry, B. K., Wagner, M., Urbain, V., Rittmann, B. E., and Stahl, D. A. (1996). "Phylogenetic probes for analyzing abundance and spatial organization of nitrifying bacteria (vol 62, pg 2157, 1996)." *Applied and Environmental Microbiology*, **63**(2), 815-815.
- MuBmann, M., Brito, I., Müller, A., Daims, H., Wagner, M., and Head, I. M. "Minor relevance of ammonia oxidising Achaeta for nitrification of wastewaters." *ISME 12th conference, Cairns, Australia*.
- Mumy, K. L., and Findlay, R. H. (2004). "Convenient determination of DNA extraction efficiency using an external DNA recovery standard and quantitative-competitive PCR." *Journal of Microbiological Methods*, **57**(2), 259-268.
- Muyzer, G., De Waal, E. C., and Uitterlinden, A. G. (1993). "Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA." *Applied and Environmental Microbiology*, **59**(3), 695-700.
- Neethling, J. B., Spani, C., Danzer, J., and Willey, B. (1998). "Achieving nitrification in pure oxygen activated sludge by seeding." *Water Science and Technology*, **37**(4-5), 573-577.
- Nielsen, P. H. (1996). "Adsorption of ammonium to activated sludge." *Water Research*, **30**(3), 762-764.
- Nogueira, R., Elenter, D., Brito, A., Melo, L. F., Wagner, M., and Morgenroth, E. (2005). "Evaluating heterotrophic growth in a nitrifying biofilm reactor using fluorescence *in situ* hybridization and mathematical modeling." *Water Science and Technology*, **55**(7) 135-141.
- Olivier, F. (2005). "Expression de l'activité des bactéries nitrosantes issues de stations d'épuration en milieu Seine. Etude en réacteurs," *Thèse de doctorat, université paris XI Orsay*.
- Painter, H. A., and Loveless, J. E. (1983). "Effect of temperature and pH value on the growth-rate constants of nitrifying bacteria in the activated-sludge process." *Water Research*, **17**(3), 237-248.
- Park, H. D., and Noguera, D. R. (2004). "Evaluating the effect of dissolved oxygen on ammonia-oxidizing bacterial communities in activated sludge." *Water Research*, **38**(14-15), 3275-3286.
- Park, H. D., Wells, G. F., Bae, H., Griddle, C. S., and Francis, C. A. (2006). "Occurrence of ammonia-oxidizing Achaeta in wastewater treatment plant bioreactors." *Applied and Environmental Microbiology*, **72**(8), 5643-5647.
- Park, H. D., and Noguera, D. R. (2007). "Characterization of two ammonia-oxidizing bacteria isolated from reactors operated with low dissolved oxygen concentrations." *Journal of Applied Microbiology*, **102**(5), 1401-1417.
- Park, J. J., Byun, I. G., Yu, J. C., Park, S. R., Ju, D. J., Hur, S. H., and Park, T. J. (2008). "Analysis of nitrifying bacterial communities in aerobic biofilm reactors with different DO conditions using molecular techniques." *Water Science and Technology*, **57**(12) 1889-1899.

- Parker, D., and Wanner, J. (2007), "review of methods for improving nitrification through bioaugmentation." *WEFTEC conference, Dallas, Texas*.
- Paungfoo, C., Prasertsan, P., Intrasungkha, N., Blackall, L. L., and Bhamidimarri, R. (2003). "Enrichment of nitrifying microbial communities from shrimp farms and commercial inocula." *Water Science and Technology*, **48**(8) 143-150.
- Persson, F., Wik, T., So?rensson, F., and Hermansson, M. (2002). "Distribution and activity of ammonia oxidizing bacteria in a large full-scale trickling filter." *Water Research*, **36**(6), 1439-1448.
- Petersen, B., Gernaey, K., and Vanrolleghem, P. A. (2001). "Practical identifiability of model parameters by combined respirometric-titrimetric measurements." *Water Science and Technology*, **43**(7), 347-355.
- Plaza, E., Trela, J., and Hultman, B. (2001). "Impact of seeding with nitrifying bacteria on nitrification process efficiency." *Water Science and Technology*, **43**(1), 155-163.
- Poughon, L., Dussap, C. G., and Gros, J. B. (2001). "Energy model and metabolic flux analysis for autotrophic nitrifiers." *Biotechnology and Bioengineering*, **72**(4), 416-433.
- Prosser, J. I. (1989). "Autotrophic nitrification in bacteria." *Advances in microbial physiology*, **30**, 125-181.
- Purkhold, U., Pommerening-Röser, A., Juretschko, S., Schmid, M. C., Koops, H. P., and Wagner, M. (2000). "Phylogeny of all recognized species of ammonia oxidizers based on comparative 16S rRNA and *amoA* sequence analysis: Implications for molecular diversity surveys." *Applied and Environmental Microbiology*, **66**(12), 5368-5382.
- Rittmann, B. E. (1996). "How input active biomass affects sludge age and process stability." *Journal of Environmental Engineering-Asce*, **122**(1), 4-8.
- Rittmann, B. E., Lapidou, C. S., Flax, J., Stahl, D. A., Urbain, V., Harduin, H., Van Der Waarde, J. J., Geurkink, B., Henssen, M. J. C., Brouwer, H., Klapwijk, A., and Wetterauw, M. (1999). "Molecular and modeling analyses of the structure and function of nitrifying activated sludge." *Water Science and Technology*, **39**(1), 51-59.
- Rittmann, B. E. (2002). "The role of molecular methods in evaluating biological treatment processes." *Water Environment Research*, **74**(5), 421-427.
- Rosén, B., and Huijbregsen, C. (2003). "The ScanDeNi® process could turn an existing under-performing activated sludge plant into an asset." *Water Science and Technology*, **47**(11), 31-36.
- Roustan, M. (2003). Transferts gaz/liquide dans les procédés de traitement des eaux et des effluents gazeux, *Tec et Doc*.
- Salem, S., van Loosdrecht, M. C. M., Berends, D. H. J. G., van der Roest, H. F., and van der Kuij, R. J. (2004). "Full-scale application of the BABE® technology." *Water Science and Technology*, **50**(7), 87-96.
- Salem, S., Moussa, M. S., and van Loosdrecht, M. C. M. (2006). "Determination of the decay rate of nitrifying bacteria." *Biotechnology and Bioengineering*, **94**(2), 252-262.
- Santoro, A. E., Francis, C. A., De Sieyes, N. R., and Boehm, A. B. (2008). "Shifts in the relative abundance of ammonia-oxidizing bacteria and archaea across physicochemical gradients in a subterranean estuary." *Environmental Microbiology*, **10**(4), 1068-1079.
- Schramm, A., De Beer, D., Wagner, M., and Amann, R. (1998). "Identification and activities *in situ* of *Nitrosospira* and *Nitrospira spp.* as dominant populations in a nitrifying fluidized bed reactor." *Applied and Environmental Microbiology*, **64**(9), 3480-3485.
- Schramm, A., De Beer, D., Gieseke, A., and Amann, R. (2000). "Microenvironments and distribution of nitrifying bacteria in a membrane-bound biofilm." *Environmental Microbiology*, **2**(6), 680-686.

- Schwitalla, P., Mennerich, A., Austermann-Haun, U., Müller, A., Dorninger, C., Daims, H., Holm, N. C., and Röhner-Holm, S. G. E. (2008). "NH₄⁺ ad-/desorption in sequencing batch reactors: Simulation, laboratory and full-scale studies." *Water Science and Technology*, **58**(2) 345-350.
- Sezgin, M., Jenkins, D., and Palm, J. C. (1980). "Floc size, filament length and settling properties of prototype activated sludge plants." *Progress in water technology*, **12**(3), 171-182.
- Siripong, S., and Rittmann, B. E. (2007). "Diversity study of nitrifying bacteria in full-scale municipal wastewater treatment plants." *Water Research*, **41**(5), 1110-1120.
- Smith, R. C., and Oerther, D. B. (2006). "Microbial community development in a laboratory-scale nitrifying activated sludge system with input from a side-stream bioreactor treating digester supernatant." *Water Science and Technology*, **54**(1) 209-216.
- Sofia, A., Liu, W. T., Ong, S. L., and Ng, W. J. (2004). "In-situ characterization of microbial community in an A/O submerged membrane bioreactor with nitrogen removal." *Water Science and Technology*, **50**(8), 41-48.
- Spérandio, M., Heran, M., and Gillot, S. (2007). "Modélisation dynamique des procédés biologiques de traitement des eaux." *Techniques de l'ingénieur*, **W 6 500**.
- Stehr, G., Bottcher, B., Dittberner, P., Rath, G., and Koops, H. P. (1995). "The ammonia-oxidizing nitrifying population of the River Elbe estuary." *FEMS Microbiology Ecology*, **17**(3), 177-186.
- Stephenson, D., and Stephenson, T. (1992). "Bioaugmentation for enhancing biological wastewater treatment." *Biotechnology Advances*, **10**(4), 549-559.
- Stricker, A. E. (2000). "Application de la modélisation à l'étude du traitement de l'azote par boues activées en aération prolongée : comparaison des performances en temps sec et en temps de pluie," *Thèse de Doctorat, Université Strasbourg I*.
- Stricker, A. E., Lessard, P., Heduit, A., and Chatellier, P. (2003). "Observed and simulated effect of rain events on the behaviour of an activated sludge plant removing nitrogen." *Journal of environmental engineering and science*, **2**(6), 429-440.
- Sundberg, C., K. Stendahl, J. S., Tonderski, K., and Lindgren, P. E. (2007). "Overland flow systems for treatment of landfill leachates-Potential nitrification and structure of the ammonia-oxidising bacterial community during a growing season." *Soil Biology and Biochemistry*, **39**(1), 127-138.
- Suwa, Y., Imamura, Y., Suzuki, T., Tashiro, T., and Urushigawa, Y. (1994). "Ammonia-oxidizing bacteria with different sensitivities to (NH₄)₂SO₄ in activated sludges." *Water Research*, **28**(7), 1523-1532.
- Suwa, Y., Sumino, T., and Noto, K. (1997). "Phylogenetic relationships of activated sludge isolates of ammonia oxidizers with different sensitivities to ammonium sulfate." *Journal of General and Applied Microbiology*, **43**(6), 373-379.
- Talleg, G., Garnier, J., Billen, G., and Gossiaux, M. (2006). "Nitrous oxide emissions from secondary activated sludge in nitrifying conditions of urban wastewater treatment plants: Effect of oxygenation level." *Water Research*, **40**(15), 2972-2980.
- Taylor, A. E., and Bottomley, P. J. (2006). "Nitrite production by *Nitrosomonas europaea* and *Nitrosospira* sp. AV in soils at different solution concentrations of ammonium." *Soil Biology and Biochemistry*, **38**(4), 828-836.
- Tietz, A., Hornek, R., Langergraber, G., Kreuzinger, N., and Haberi, R. (2007). "Diversity of ammonia oxidising bacteria in a vertical flow constructed wetland." *Water Science and Technology*, **56**(3) 241-247.
- Unger, M.T and Sutton R.(2003) "EAST Process Increases Capacity and Performance at the sanitary District of Hammond." *WEFTEC conference, Alexandria, Virginia*.

- Vanrolleghem, P. A., Van Daele, M., and Dochain, D. (1995). "Practical identifiability of a biokinetic model of activated sludge respiration." *Water Research*, **29**(11), 2561-2570.
- Vanrolleghem, P. A., Sin, G., and Gernaey, K. V. (2004). "Transient Response of Aerobic and Anoxic Activated Sludge Activities to Sudden Substrate Concentration Changes." *Biotechnology and Bioengineering*, **86**(3), 277-290.
- Wagner, M., Rath, G., Amann, R., Koops, H. P., and Schleifer, K. H. (1995). "In-Situ Identification of Ammonia-Oxidizing Bacteria." *Systematic and Applied Microbiology*, **18**(2), 251-264.
- Wagner, M., Rath, G., Koops, H. P., Flood, J., and Amann, R. (1996). "In situ analysis of nitrifying bacteria in sewage treatment plants." *Water Science and Technology*, **34**(1-2), 237-244.
- Wett, B., and Rauch, W. (2003). "The role of inorganic carbon limitation in biological nitrogen removal of extremely ammonia concentrated wastewater." *Water Research*, **37**(5), 1100-1110.
- Woese, C. R., Fox, G. E., and Zablen, L. (1975). "Conservation of primary structure in 16S ribosomal RNA." *Nature*, **254**(5495), 83-85.
- You, S. J., Hsu, C. L., Chuang, S. H., and Ouyang, C. F. (2003). "Nitrification efficiency and nitrifying bacteria abundance in combined AS-RBC and A2O systems." *Water Research*, **37**(10), 2281-2290.
- Yuan, Z., Oehmen, A., Peng, Y., Ma, Y., and Keller, J. (2008). "Sludge population optimisation in biological nutrient removal wastewater treatment systems through on-line process control: A review." *Re-views in Environmental Science and Biotechnology*, **7**(3), 243-254.

Liste des tableaux

<i>Tableau 1 : expressions du taux de croissance des bactéries nitrifiantes en fonction de la température</i>	36
<i>Tableau 2 : recensement bibliographique des paramètres cinétiques des bactéries nitrosantes</i>	48
<i>Tableau 3: paramètres cinétiques des principales bactéries nitrifiantes</i>	55
<i>Tableau 4 : liste des stations d'épuration échantillonnées</i>	77
<i>Tableau 5 : amorces spécifiques des bactéries nitrosantes utilisées pour la première amplification</i>	82
<i>Tableau 6 : liste des amorces utilisées pour la PCR nichée en vue de l'analyse en DGGE</i>	83
<i>Tableau 7 : liste des sondes FISH utilisées</i>	88
<i>Tableau 8 : fluorophores, longueurs d'onde et couleurs associées</i>	89
<i>Tableau 9 : table de dosage pour les tampons d'hybridation et de lavage</i>	91
<i>Tableau 10 : liste des paramètres utilisés dans le modèle ASM_N</i>	102
<i>Tableau 11 : profils DGGE, intensité des bandes pour les échantillons été E et hiver H. Les bandes foncées ont une occurrence supérieure à 20, les bandes grisées entre 14 et 20, les bandes blanches moins de 10.</i>	111
<i>Tableau 12 : profils DGGE de Etr91, Sma77 et Sgl77 en été 2006, hiver 2006/2007 et Hivers 2007/2008.</i> ...	117
<i>Tableau 13 : résultats principaux des tests de reproductibilité de la respirométrie. Les écarts entre A et B sont exprimés en pourcentage de la moyenne.</i>	150
<i>Tableau 14 ratios des populations nitrosantes et nitrifiantes (X_{BA}/X_{BN}), ratios des vitesses de nitrosation et de nitrification (ρ_{BA}/ρ_{BN}), et présence d'un palier de nitrification.</i>	158
<i>Tableau 15 : $OUR_{SAm_{max}}$ et N_{OxPR} mesurées sur différents échantillons de solution NB 1X</i>	164
<i>Tableau 16 : ratios OC/N expérimentaux de 30 respirogrammes, exprimés en g_{O_2}/g_N</i>	165
<i>Tableau 17 : ratios expérimentaux de consommation d'oxygène de la solution NB. Pour la nitrosation.</i>	169
<i>Tableau 18 : mesures de K_{NHS} et de K_{OAS}</i>	175
<i>Tableau 19 : récapitulatif des paramètres mesurés de la solution NB (1X), comparés aux paramètres des boues activées</i>	176
<i>Tableau 20 : activités et respirations des différentes populations pour les respiromètres témoin et BA</i>	186
<i>Tableau 21: concentrations des biomasses et valeurs des paramètres cinétiques et stœchiométriques utilisés pour la modélisation des respiromètres témoins et de bio-augmentation.</i>	187
<i>Tableau 22 : récapitulatif des résultats de mesures sur les boues témoin et bio-augmentées. Le gain correspond à la différence entre la valeur du réacteur de bio-augmentation et du témoin.</i>	188
<i>Tableau 23 : comparaison des activités (OUR et N_{OxPR}) maximales de la solution NB en boues et en solution dans des ESF</i>	189
<i>Tableau 24: comparaison des OUR_{max} de nitrosation lors des expériences de décantation.</i>	192

Liste des figures

<i>Figure 1 : schéma d'ensemble d'une station d'épuration des eaux par boues activées (source : ADEME)</i>	27
<i>Figure 2 : schéma de la filière boues activées avec bassin d'anoxie en tête (Source : FNDAE 25 (Deronzier et al. 2002)).....</i>	28
<i>Figure 3 : schéma général des 2 étapes de la nitrification avec les coefficients stœchiométriques correspondant à la production de 1g_N de nitrates.....</i>	33
<i>Figure 4 : effet de la température sur l'activité d'une souche de (a) Nitrosomonas et de (b) Nitrobacter d'après Grunditz et Dalhammar (2001).....</i>	35
<i>Figure 5 : comparaison des équations de taux de croissance en fonction de la température</i>	36
<i>Figure 6 : courbes d'équilibre du couple acido-basique NH₃/NH₄⁺.....</i>	38
<i>Figure 7: schéma d'une station à boues activées. V est le volume du bassin d'aération, Q est le débit (m³/j) traversant le système, σ est le taux d'extraction (%), R est le taux de recirculation, X, X^e et X^w sont les concentrations en boues dans le bassin d'aération (g_{DCO}/L), dans l'effluent et dans les boues extraites respectivement.....</i>	40
<i>Figure 8 : vitesses de nitrification observées et calculées pour différentes charges et différents types d'influents selon Choubert et al. (2008).....</i>	44
<i>Figure 9 : comparaison des taux de croissance des organismes en fonction de la concentration en substrat et du type de stratégie adoptée.....</i>	46
<i>Figure 10 : arbre phylogénétique de l'ensemble des bactéries nitrosantes (AOB) et de quelques autres protéobactéries, basé sur les séquences d'ARNr-16S d'après (Purkhold et al. 2000).....</i>	47
<i>Figure 11: taux de croissance spécifiques en fonction de la concentration en oxygène pour deux espèces distinctes de la lignée N. europaea d'un enrichissement de boues à forte et faible concentration en oxygène respectivement, d'après (Park et Noguera 2004).....</i>	50
<i>Figure 12 : estimation du taux de croissance de différentes espèces selon les valeurs de paramètres publiés.....</i>	52
<i>Figure 13: arbre phylogénétique des principales lignées de bactéries nitrifiantes, incluant l'habitat préféré et les paramètres éco physiologiques d'après (Koops et Pommerening-Röser 2001)</i>	54
<i>Figure 14: diversité des situations couvertes par le terme « Bio-augmentation » d'après Bouchez (2000a)....</i>	57
<i>Figure 15 : variables décrivant le fractionnement de l'azote dans le modèle "two step Mantis" d'après (Boursier 2003).....</i>	65
<i>Figure 16 : schéma du plan d'analyses des boues activées de stations d'épuration.....</i>	78
<i>Figure 17 : schéma de principe de la PCR.....</i>	81
<i>Figure 18 : schéma de principe de la DGGE.....</i>	84
<i>Figure 19 : photographie du dispositif de coulage du gel DGGE.....</i>	85
<i>Figure 20 : arbre phylogénétique des bactéries nitrifiantes et cibles des sondes FISH (Olivier 2005).....</i>	89
<i>Figure 21 : schéma du respiromètre.....</i>	93
<i>Figure 22 : photographie du respiromètre.....</i>	94
<i>Figure 23: exemple de respirogramme avant soustraction de la respiration endogène.....</i>	96
<i>Figure 24: exemple de respirogramme après ajout de 12mg_{N-NH4}/L et soustraction de l'OUR_{endo}.....</i>	96
<i>Figure 25 : exemple d'attribution des aires à chaque étape de la nitrification.....</i>	97
<i>Figure 26 : vitesse de nitrification théorique en fonction de la concentration en ammonium du milieu pour une constante d'affinité K_{NHS} de 5 mg_{N-NH4}/L, en pourcentage de la vitesse maximale.....</i>	98
<i>Figure 27 : système représentant le respiromètre en modélisation.....</i>	102
<i>Figure 28 : protocole de suivi du maintien de la biomasse de la solution commerciale dans des boues.....</i>	105

<i>Figure 29 : gel DGGE des populations nitrosantes des échantillons de boues activées. Le gradient de dénaturant est vertical de 30 à 60% du haut vers le bas.</i>	110
<i>Figure 30 : arbre phylogénétique indiquant le positionnement des séquences des bandes DGGE. L'échelle en bas à gauche correspond à 6% d'homologie de séquence.</i>	113
<i>Figure 31 : profils DGGE classés selon l'abattement spécifique de la station d'épuration</i>	114
<i>Figure 32 : comparaison du profil DGGE de la solution NB, de profils de boues activées et d'une souche pure de N. europaea ATCC 19718D. a) et b) correspondent à deux gels (de gradients 30-60% de dénaturants) réalisés à quelques mois d'intervalle avec différents produits de PCR (avec les mêmes amorces) pour la solution NB.</i>	118
<i>Figure 33: arbre phylogénétique des bactéries nitrosantes, incluant les bandes DGGE et la solution NB. L'échelle en bas à gauche correspond à 6% d'homologie.</i>	120
<i>Figure 34 : exemple d'objets fortement fluorescents observés dans un échantillon de boues</i>	128
<i>Figure 35: A) boues marquées avec SYTO9 (en vert), Nmo218 (Cy3 en rouge) et Nso190 (Cy5 en bleu). B) profil des niveaux d'intensités pour les trois lasers le long de la flèche rouge de l'image A. L'axe horizontal correspond à la distance par rapport au début de la flèche. C) représentation du seuil de coupure pour Cy3 ; les parties colorées en jaune seront conservées. D) image segmentée pour le fluorophore Cy3.</i>	130
<i>Figure 36 : impact du seuil de coupure sur la fraction surfacique mesurée pour des boues de Val94 marquées avec Nso190 et Nmo218.</i>	131
<i>Figure 37: exemple d'application du seuillage « semi-automatique » sur un échantillon de Val94 marqué en Cy5 par les sondes Nmo218 + Nso190. A) Image du témoin sans sonde, le seuil de coupure est fixé à 100. B) application du seuil de coupure de 100 à une image marquée. Sur l'image, seuls les pixels rouges seront retenus par la segmentation.</i>	132
<i>Figure 38 : A) histogramme d'un témoin sans sondes de la solution NB pour le canal Cy5 ; B) segmentation pour la solution NB marquée avec la sonde Nso190 en Cy5.</i>	133
<i>Figure 39 : images de segmentation de la biomasse totale (syto9) ; à gauche avec le seuil bas (= 25), à droite le seuil haut (= 45).</i>	135
<i>Figure 40 : quatre exemples de fractions surfaciques mesurées avec les différents seuils de coupures établis selon le protocole défini.</i>	136
<i>Figure 41 : évolution de l'erreur sur la fraction surfacique mesurée en fonction du nombre d'images</i>	138
<i>Figure 42 : concentrations de biomasse totale mesurées en mgMVS/L pour l'ensemble des échantillons.</i> ...	141
<i>Figure 43 : fractions et concentrations de la biomasse nitrosante.</i>	141
<i>Figure 44 : fractions et concentrations de la biomasse nitratante</i>	142
<i>Figure 45 : variations des concentrations en X_{BA} et X_{BN} en fonction des différences de température entre l'été et l'hiver</i>	143
<i>Figure 46 : exemple de respirogramme (Gri77-H), indication des points utilisés pour la mesure de l'OUR_{max}</i>	148
<i>Figure 47: quatre exemples de respirogrammes « atypiques ».</i>	149
<i>Figure 48: reproductibilité des expériences respirométriques, OUR_{total} (A) et exogène (B). La figure B correspond au cadre en pointillés de la figure A, après soustraction de la respiration endogène, et repositionnement de l'origine des temps. L'oxygène consommé (OC) correspond à l'aire sous la courbe.</i> ...	150
<i>Figure 49 : exemple d'évolution des formes d'azote minéral au début d'une mesure respirométrique (Boues de Eta91 été), et vitesses d'augmentation de chaque.</i>	152
<i>Figure 50 : schéma général des flux de transformation de l'azote dans les boues activées selon le concept de mort-régénération. Les flèches pleines représentent les flux de matière, et les flèches en pointillés indiquent les réactions simultanées.</i>	153
<i>Figure 51 : représentation de l'écart de mesure entre l'OUR_{max} de l'activité nitrifiante réelle et mesurée. OUR_{C-endo} représente la respiration endogène liée aux transformations du substrat carboné.</i>	155

<i>Figure 52 : comparaison des $OUR_{initial}$ calculées à partir des $N_{Ox}PR$ et N_tPR mesurées, comparées aux $OUR_{initial}$ directement mesurées sur les respirogrammes.</i>	156
<i>Figure 53 : ratios X_{BA}/X_{BN} et ratios ρ_{BA}/ρ_{BN} en été et en hiver pour les treize bassins échantillonnés.</i>	158
<i>Figure 54 : vitesses de nitrosation maximales (ρ_{BAmax}) estimées pour les concentrations en boues du bassin d'aération en fonction des charges moyennes d'azote éliminées au cours des 6 mois précédant le prélèvement (B).</i>	160
<i>Figure 55 : évolution des formes solubles d'azote minéral au cours de la respirométrie avec la solution NB 161</i>	
<i>Figure 56 : respirogramme de la solution NB 1X avec $100 \text{ mg}_{N-NH_4}/L$ à $20^\circ C$.....</i>	162
<i>Figure 57: oxygène total consommé par les boues de Cou77-P, Bou91_P et Etr91_P) pour différentes quantités d'ammonium.....</i>	167
<i>Figure 58 : respirogrammes et évolution des N_{Ox} obtenus pour la solution NB à différentes températures. .</i>	175
<i>Figure 59 : respirogrammes et évolution des concentrations en N_{Ox} dans les respiromètres témoins et de bio-augmentation.....</i>	182
<i>Figure 60 : OUR_{total} et respiration des différentes populations dans les respiromètres témoin et de bio-augmentation (BA) modélisés avec le modèle ASM_N.....</i>	184
<i>Figure 61: évolution des formes d'azote minéral, mesurées et modélisées, au cours des mesures respirométriques témoin et de bio-augmentation (BA).....</i>	185
<i>Figure 62 : photographies microscopiques des boues décantées après ajout de solution NB marquée au CFDA/SE avec deux grossissements différents.....</i>	191
<i>Figure 63: respirogrammes comparés des réacteurs témoins et de bio-augmentation, avant et après décantation pour A) 4% de solution NB, $NH_4 = 20 \text{ mgN/L}$ et $NO_2 = 20 \text{ mgN/L}$, B) 1% de solution NB, $NH_4 = 20 \text{ mgN/L}$ et $NO_2 = 5 \text{ mgN/L}$ et injection de NO_2 25 minutes avant l'injection de NH_4</i>	192

ANNEXES

Liste des annexes

ANNEXE 1 : Recensement des procédés de bio-augmentation continue	227
ANNEXE 2 : Matrice du modèle ASM1	229
ANNEXE 3 : Taux de croissance des modèles de nitrification en une étape et deux étapes	230
ANNEXE 4 : Matrice du modèle ASM_N	231
ANNEXE 5 : Liste des échantillons et des analyses réalisées	233
ANNEXE 6 : données de fonctionnement des stations d'épuration étudiées	234
ANNEXE 7 : Résultats des mesures des 28 échantillons de boues activées	237
ANNEXE 8 : Etude du marquage FISH des populations nitrifiantes des boues activées	239
ANNEXE 9 : Respirogrammes	249
ANNEXE 10 : Analyse de l'activité endogène des boues aérées sans substrat selon le modèle ASM1	255
ANNEXE 11 : Analyse des hypothèses permettant d'expliquer les incohérences entre les ratios OC/N mesurés et théoriques.	257

ANNEXE 1

Recensement des procédés de bio-augmentation continue

Sept types de procédés de bio-augmentation continue recensés sont présentés dans le Tableau 1, avec des indications sur les deux principaux critères de succès de cette stratégie (La condition floculée de la biomasse et son acclimatation au milieu récepteur), ainsi que quelques données sur leurs applications existantes.

Tableau 1 : comparaison des procédés de bio-augmentation continue d'après Parker et Wanner (2007)

Procédé de bio-augmentation	Bactéries floculées	Acclimatation au milieu récepteur (en T°)	Utilisation de centrat*	Applications	Référence
Bio-augmentation externe					
Enrichissement de biomasse dispersée	N	N	O	Pilote : perte importante d'activité en milieu récepteur	Smith et Oerther 2006
Enrichissement de biomasse floculée	O	N	O	Pilote : augmentation d'activité nitrifiante	Plaza <i>et al.</i> 2001
Lit Filtrant	O	N	N	site réel : nitrification à faible âge de boues	Daigger <i>et al.</i> 1993
Filières parallèles	O	O	N	Site réel : nitrification sur procédé à oxygène pur	Neethling <i>et al.</i> 1998
Réacteur en aval	O	O	N	Site réel : nitrification partielle à faible SRT	Jobbágy <i>et al.</i> 2004
Bio-augmentation <i>in-situ</i>					
BAR, ScanDeNi	O	O	O	Site réel : nitrification à faible SRT. Comparaison à un témoin	Parker et Wanner 2007
BABE®	O	N	O	Site réel : nitrification améliorée comparé à un témoin	Salem <i>et al.</i> 2004

*Centrat : eaux de retour de la déshydratation des boues digérées

Cinq de ces procédés correspondent à une bio-augmentation externe :

- Le procédé le plus simple consiste à enrichir de la biomasse nitrifiante dispersée dans un réacteur spécifique alimenté avec un effluent chargé en ammonium (typiquement le centrat de digesteur), et d'ensemencer la filière principale avec cette biomasse. Cependant, la biomasse produite est peu adaptée au milieu récepteur, et elle est

particulièrement sensible à la prédation en raison de sa forme dispersée, ce qui limite fortement les effets de la bio-augmentation.

- Un procédé similaire enrichissant une biomasse nitrifiante floculée (boues activées) permet d'ensemencer la filière principale avec une population protégée au sein des flocs, mais non acclimatée aux conditions du milieu récepteur.
- Dans le procédé à lit filtrant, 50 % de la nitrification de l'effluent est réalisé dans un filtre à biomasse fixée, dont la biomasse nitrifiante en excès ensemence un système à boues activées classique situé en aval du filtre, et qui nitrifie à faible âge de boues (2 à 4 jours typiquement).
- Dans un système comprenant deux filières parallèles, l'une d'entre elles peut nitrifier à faible âge de boues si elle est partiellement ensemencée par l'autre filière conduite à âge de boues élevé.
- Pour des systèmes comprenant deux étapes, la première traitant le carbone en amont et la seconde traitant l'azote en aval (nitrification secondaire ou tertiaire), l'ensemencement du procédé amont avec la biomasse nitrifiante du procédé aval permet une amélioration globale du traitement de l'azote, et une réduction des besoins en méthanol pour la dénitrification secondaire/tertiaire.

Les deux derniers procédés recensés dans le tableau 1 sont des procédés d'enrichissement dits *in-situ* :

- Les procédés du type BAR (Bio-Augmentation dans la zone de Régénération) consistent à enrichir l'ensemble des boues de recirculation en les mettant en contact avec le centrat dans un réacteur aéré avant leur réintroduction en tête de station. Certaines variantes de ce procédé ont été élaborées par différentes équipes comme par exemple le procédé ScanDeNi (Rosen et Huijbreesen, 2003), ou le procédé EAST (Unger et Sutton, 2003)
- Le procédé BABE[®] (Bio-Augmentation Batch Enhanced) est une variante des procédés BAR pour lequel seule une fraction ($\approx 0,5$ %) des boues de recirculation est enrichie, ce qui permet de tirer profit des températures élevées du centrat (environ 30°C) pour obtenir une croissance rapide des bactéries nitrifiantes. Cependant, la biomasse nitrifiante ainsi produite n'est alors pas acclimatée à la température des bassins de traitement.

ANNEXE 2

Matrice du modèle ASM1

REACTION	COMPOSANTS										CINETIQUE	
	SOLUBLES					PARTICULAIRES						
	S_s	S_o	S_{NO}	S_{NH}	S_{ALK}	X_s	X_H	X_A	X_P	S_{ND}		X_{ND}
Croissance aérobie des X_H	$-\frac{1}{Y_H}$	$-\frac{1-Y_H}{Y_H}$		$-i_{XB}$	$-\frac{i_{XB}}{14}$		1					$\mu_H \left(\frac{S_s}{K_S + S_s} \right) \left(\frac{S_o}{K_{OH} + S_o} \right) X_H$
Croissance anaérobie des X_H	$-\frac{1}{Y_H}$		$-\frac{1-Y_H}{2.86Y_H}$	$-i_{XB}$	$\frac{1-Y_H}{14 \cdot 2.86Y_H} - \frac{i_{XB}}{14}$		1					$\mu_H \left(\frac{S_s}{K_S + S_s} \right) \left(\frac{K_{OH}}{K_{OH} + S_o} \right) \left(\frac{S_{NO}}{K_{NO} + S_{NO}} \right) \eta_g X_H$
Croissance aérobie des X_A		$-\frac{4.57-Y_A}{Y_A}$	$\frac{1}{Y_A}$	$-i_{XB} - \frac{1}{Y_A}$	$-\frac{i_{XB}}{14} - \frac{1}{7Y_A}$			1				$\mu_A \left(\frac{S_{NH}}{K_{NH} + S_{NH}} \right) \left(\frac{S_o}{K_{OA} + S_o} \right) X_A$
Décès des X_H						$1 - f_p$	-1		f_p		$i_{XB} - f_p i_{XP}$	$b_H \cdot X_H$
Décès des X_A						$1 - f_p$		-1	f_p		$i_{XB} - f_p i_{XP}$	$b_A X_A$
Ammonification				1	$\frac{1}{14}$					-1		$k_a S_{ND} X_H$
Hydrolyse de la matière organique	1					-1						$k_H \frac{X_s/X_H}{K_X + (X_s/X_H)} \left[\left(\frac{S_o}{K_{OH} + S_o} \right) + \eta_h \left(\frac{K_{OH}}{K_{OH} + S_o} \right) \left(\frac{S_{NO}}{K_{NO} + S_{NO}} \right) \right] X_H$
Hydrolyse de l'azote organique										1	-1	$k_H \frac{X_s/X_H}{K_X + (X_s/X_H)} \left[\left(\frac{S_o}{K_{OH} + S_o} \right) + \eta_h \left(\frac{K_{OH}}{K_{OH} + S_o} \right) \left(\frac{S_{NO}}{K_{NO} + S_{NO}} \right) \right] X_H \cdot \frac{X_{ND}}{X_s}$

ANNEXE 3

Taux de croissance des modèles de nitrification en une étape et deux étapes.

Les paramètres du modèle en une étape sont notés avec un « A » en indice (pour la biomasse nitrifiante), et ceux du modèle en deux étapes avec « BA » (pour la biomasse nitrosante).

Partant de l'hypothèse que la réaction limitante de la nitrification en station d'épuration municipale est la nitrosation, l'utilisation des paramètres de la population nitrosante du modèle en deux étapes doit permettre d'obtenir la même vitesse de réaction que les paramètres du modèle en une étape.

Les vitesses de nitrification des deux modèles s'expriment par les équations 1 et 2 :

$$\rho_A = \frac{\mu_{A,\max}}{Y_A} \cdot [X_A] \quad \text{équation 1}$$

$$\rho_{BA} = \frac{\mu_{BA,\max}}{Y_{BA}} \cdot [X_{BA}] \quad \text{équation 2}$$

A partir des données de fonctionnement, la quantité de biomasse nitrifiante (nitrosante) en régime stabilisé est exprimée par l'équation 3 (équation 4) :

$$[X_A] = f_{AT} \cdot \frac{Y_A}{b_A + \frac{1}{SRT}} \cdot B_V(N_{\text{nitrifié}}) \quad \text{équation 3}$$

$$[X_{BA}] = f_{AT} \cdot \frac{Y_{BA}}{b_{BA} + \frac{1}{SRT}} \cdot B_V(N_{\text{nitrifié}}) \quad \text{équation 4}$$

Ainsi, pour un même système, on obtient la relation théorique entre les concentrations des deux populations :

$$[X_{BA}] = \frac{Y_{BA}}{Y_A} \cdot [X_A] \quad \text{équation 5}$$

Et la vitesse de nitrification (nitrosation) du modèle en deux étapes (équation 2) s'écrit alors :

$$\rho_{BA} = \frac{\mu_{BA,\max}}{Y_{BA}} \cdot \frac{Y_{BA}}{Y_A} \cdot [X_A] = \frac{\mu_{BA,\max}}{Y_A} \cdot [X_A] \quad \text{équation 6}$$

Par conséquent, les vitesses de réaction étant égales ($\rho_A = \rho_{BA}$), **les taux de croissance des deux populations sont identiques : $\mu_{A,\max} = \mu_{BA,\max}$** (d'après les équations 1 et 6).

ANNEXE 4

Matrice du modèle ASM_N

REACTION	COMPOSANTS									CINETIQUE
	SOLUBLES					PARTICULAIRES				
	S_O	S_{NO2}	S_{NO3}	S_{NH}	S_{ALK}	X_{BA}	X_{BN}	X_{SA}	X_{SN}	
Croissance des X_{BA}	$-\frac{3.43 - Y_{BA}}{Y_{BA}}$	$\frac{1}{Y_{BA}}$		$-i_{XB} - \frac{1}{Y_{BA}}$	$-\frac{i_{XB}}{14} - \frac{1}{7Y_{BA}}$	1				$\mu_{BA} \left(\frac{S_{NH}}{K_{NHB} + S_{NH}} \right) \left(\frac{S_O}{K_{OBA} + S_O} \right) X_{BA}$
Décès des X_{BA}						-1				$b_{BA} X_{BA}$
Croissance des X_{BN}	$-\frac{1.14 - Y_{BN}}{Y_{BN}}$	$-\frac{1}{Y_{BN}}$	$\frac{1}{Y_{BN}}$	$-i_{XB}$	$-\frac{i_{XB}}{14} - \frac{1}{7Y_{BN}}$		1			$\mu_{BN} \left(\frac{S_{NO2}}{K_{NOB} + S_{NO2}} \right) \left(\frac{S_O}{K_{OBN} + S_O} \right) X_{BN}$
décès des X_{BN}							-1			$b_{BN} X_{BN}$
Croissance des X_{SA}	$-\frac{3.43 - Y_{SA}}{Y_{SA}}$	$\frac{1}{Y_{SA}}$		$-i_{XB} - \frac{1}{Y_{SA}}$	$-\frac{i_{XB}}{14} - \frac{1}{7Y_{SA}}$			1		$\mu_{SA} \left(\frac{S_{NH}}{K_{NHS} + S_{NH}} \right) \left(\frac{S_O}{K_{OSA} + S_O} \right) X_{SA}$
décès des X_{SA}								-1		$b_{SA} X_{SA}$
Croissance des X_{SN}	$-\frac{1.14 - Y_{SN}}{Y_{SN}}$	$-\frac{1}{Y_{SN}}$	$\frac{1}{Y_{SN}}$	$-i_{XB}$	$-\frac{i_{XB}}{14} - \frac{1}{7Y_{SN}}$				1	$\mu_{SN} \left(\frac{S_{NO2}}{K_{NOS} + S_{NO2}} \right) \left(\frac{S_O}{K_{OSN} + S_O} \right) X_{SN}$
décès des X_{SN}									-1	$b_{SN} X_{SN}$

ANNEXE 5

Liste des échantillons et des analyses réalisées

Echantillon	Date de prélèvement	DGGE	FISH	Suivi N		Respirométrie*	
				N _{Ox}	NH ₄	Inj°. NH ₄ mg _N /L	Inj°. NH ₄ +NO ₂ mg _N /L
2006							
Etr91-E	06/09/2006	x	x	x	x	12	
Eta91-E	06/09/2006	x	x	x	x	12	
Bou91-E	06/09/2006	x	x	x	x	12	
Boi77-E	13/09/2006	x	x	x	x	-	
Sgl77-E	13/09/2006	x	x	x	x	12	
Bar77-E	13/09/2006	x	x	x	x	12	
Sma77-E	13/09/2006	x	x	x	x	12	
Pre77-E	26/09/2006	x	x	x	x	12	
Cou77-E	26/09/2006	x	x	x	x	12	
Evr77-E	26/09/2006	x	x	x	x	12	
Gris77-E	26/09/2006	x	x	x	x	12	
Val94-E	04/10/2006	x	x	x		12	
VaP94-E	04/10/2006	x	x	x		12	
2007							
Etr91-H	07/03/2007	x	x	x	x	12	
Eta91-H	07/03/2007	x	x	x	x	12	
Bou91-H	07/03/2007	x	x	x	x	12	
Gris77-H	14/03/2007	x	x	x	x	12	
Cou77-H	14/03/2007	x	x	x	x	12	
Evr77-H	27/03/2007	x	x	-		12	
Pre77-H	27/03/2007	x	x	x		12	
Val94-H	27/03/2007	x	x	x		12	
VaP94-H	27/03/2007	x	x	x		12	
Sma77-H	29/03/2007	x					
<i>Bou91 –témoin1</i>	<i>12/06/2007</i>			x	x		<i>20 (NH₄) + 20 (NO₂)</i>
<i>Bou91-BA1 4%</i>	<i>12/06/2007</i>			x	x		<i>20 (NH₄) + 20 (NO₂)</i>
<i>Bou91-témoin2</i>	<i>26/09/2007</i>			x	x		<i>20 (NH₄) + 10 (NO₂)</i>
<i>Bou91-BA2 1%</i>	<i>26/09/2007</i>			x	x		<i>20 (NH₄) + 10 (NO₂)</i>
2008							
Sgl77-H08	21/01/2008	x	x	x	x		10 (NH ₄) + 3 (NO ₂)
Sma77-H08	21/01/2008	x	x	x	x		10 (NH ₄) + 3 (NO ₂)
Etr91-H08	04/02/2008	x	-	x	x	12	
<i>Bou91 -témoin3</i>	<i>21/05/2008</i>			x	x		<i>20 (NH₄) + 5 (NO₂)</i>
<i>Bou91-BA 1%</i>	<i>21/05/2008</i>			x	x		<i>20 (NH₄) + 5 (NO₂)</i>
Etr91-P	07/04/2008					5 à 20	5 à 20 (NH ₄) + 5 (NO ₂)
Bou91-P	02/06/2008					5 à 20	5 à 20 (NH ₄) + 5 (NO ₂)
Cou77-P	02/06/2008					5 à 20	5 à 20 (NH ₄) + 5 (NO ₂)

*Les quantités de substrats injectés dans les respiromètres sont indiquées.

Les expériences indiquées en italique correspondent aux expériences de bio-augmentation

Le symbole « - » désigne une analyse réalisée mais dont le résultat s'est avéré inexploitable.

ANNEXE 6

Données de fonctionnement des stations d'épuration échantillonnées

Echantillon	T (°C)	SRT (j)	TSH (h)	Effluent d'entrée						Effluent de sortie				Charges éliminées		
				[DBO ₅] mg/L	[DCO] mg/L	[NTK] mg/L	[NH ₄] mg/L	DCO/ NTK	DBO ₅ /NTK	[DBO ₅] mg/L	[DCO] mg/L	[NTK] mg/L	[NH ₄] mg/L	DCO g.m ⁻³ .j ⁻¹	NTK g _N .m ⁻³ .j ⁻¹	
Etr91	E	21,5	12	46	388	984	92	54	10.7	4.2	3	33	4,3	3,0	498	44
	H	14	11	42	564	1038	95	62	10.9	5.9	3	44	3,3	1,5	545	50
Eta91	E	21,8	33	53	350	859	71	46	12.1	4.9	3	30	2,1	0,7	486	40
	H	14,8	30	48	505	887	70	46	12.7	7.2	3	31	2,1	0,6	508	40
Bou91	E	20,8	17	92	219	576	72	60	8.0	3.0	3	30	2,3	0,9	115	20
	H	12,8	34	95	297	521	81	63	6.4	3.7	3	30	3,4	2,0	149	24
Boi77	E	17,3	50	76	176	411	35	20	11.8	5.0	7	10	2,0	0,1	127	10
	H															
Sgl77	E	14	82	8	97	103	9	2	11.5	10.9	14	32	1,5	0,5	201	21
	H															
Bar77	E	16,2	>100	72	239	376	40	36	9.4	6.0	5	25	1,7	0,5	118	13
	H															
Sma77	E	16,4	35	83	317	785	77		10.2	4.1	5	48	3,9		212	21
	H															
Pre77	E	21	15	43	335	838	71	51	11.7	4.7	4	36	2,8	1,0	528	43
	H	13,9	20	36	290	709	69	41	10.2	4.2	3	33	2,8	0,8	775	57
Cou77	E	19,5	28	43	228	604	49	22	12.5	4.7	3	37	4,2	1,1	231	22
	H	12,4	41	37	170	418	35	-	11.9	4.8	4	35	1,3	0,4	189	20
Evr77	E	20	28	51	205	491	75	26	6.5	2.7	3	31	2,4	1,1	232	26
	H	12,4	32	34	54	117	17	12	6.9	4.5	3	30	2,0	0,5	148	25
Gri77*	E	20,2	23	71	250	720	87	66	8.3	2.9	(9) - 3*	(53) - 30*	(6,3) - 2*	(4) - 0,5*	360	31
	H	11,8	15	38	315	716	90	71,7	8.0	3.5	3	30	2,0	0,5	177	24
Val94	E	21,5	17	22	154	367	56	47	6.5	2.7		38	2,2	0,2	565	93
	H	17,1	22	29		319	47	41	6.8	2.9		40	2,1	0,2	382	64
VaP 94	E	21,3	23	18	178	413	53	42	7.8	3.3		26	1,6	0,1	360	48
	H	16,4	18	16		364	50	42	7.3	2.7		26	1,7	0,1	495	55

* Remarque : La station d'épuration Gri77 a été démarrée en mai 2006, soit 5 mois avant le premier prélèvement. Les concentrations d'azote en sortie ont été mesurées le 4 juillet et le 10 octobre uniquement. Le 4 juillet, elles sont élevées (valeurs indiquées entre parenthèse), mais la biomasse nitrifiante du système n'était probablement pas encore suffisamment développée, alors que le 10 octobre (20 jours après le prélèvement), les concentrations sont du même ordre de grandeur (valeurs indiquées en italique) que celles des autres stations d'épuration. Etant donné les périodes séparant ces mesures et la date du prélèvement, il semble assez probable qu'au moment du prélèvement, la biomasse nitrosante était déjà développée à son niveau optimal, et que le niveau de traitement était équivalent à la mesure du 10 octobre.

ANNEXE 7

Résultats des mesures des 28 échantillons de boues activées

				FISH		Formes N			Respirométrie		
	T° _{bassin} °C	MES	MVS	% X _{BA}	% X _{BN}	ρ _{BA} (N _{ox} PR) mg _N ,L ⁻¹ ,h ⁻¹	ρ _{BN} (N _i PR) mg _N ,L ⁻¹ ,h ⁻¹	N _{min} PR mg _N ,L ⁻¹ ,h ⁻¹	OUR _{endo} mgO ₂ ,L ⁻¹ ,h ⁻¹	OUR _{max} mgO ₂ ,L ⁻¹ ,h ⁻¹	OUR _{initial} mgO ₂ ,L ⁻¹ ,h ⁻¹
2006											
Etr91-E	21,5	2,65	2,73	0,65	0,50	3,7	2,7	<0	6,1	12,7	12,8
Eta91-E	21,8	5,68	4,94	0,75	1,53	7,7	5,9	1,2	7,6	28,7	25,1
Bou91-E	20,8	3,17	2,04	0,68	0,68	4,6	4,3	2,1	5,9	9,3	8,6
Boi77-E	17,3	4,54	1,64	0,48	0,65	9,4	8,9	0,9	/	/	/
Sgl77-E	14	4,05	3,25	1,70	1,65	7,1	6,9	1,9	7,3	30,0	26,7
Bar77-E	16,2	7,11	1,75	0,88	0,53	4,9	3,8	1,3	3,9	17,8	17,5
Sma77-E	16,4	2,61	2,09	1,15	0,80	11,1	8,6	3,0	11,2	39,2	38,1
Pre77-E	21	2,38	2,11	1,15	0,95	4,8	4,2	0,5	4,9	18,0	16,6
Cou77-E	19,5	3,36	1,99	1,53	1,35	4,3	4,2	1,0	8,3	19,3	18,6
Evr77-E	20	3,84	3,00	1,30	1,63	5,1	4,8	/	4,7	19,2	16,9
Gris77-E	20,2	2,32	4,99	1,85	1,85	8,1	6,8	2,0	6,2	26,5	25,5
Val94-E	21,5	3,13	1,96	1,83	1,83	12,5	8,7	/	7,2	49,0	42,1
VaP94-E	21,3	2,65	2,26	2,15	2,30	8,7	6,7	/	5,7	41,3	38,8
2007											
Etr91-H	14	3,10	3,21	3,35	0,98	9,0	2,8	2,2	11,8	24,4	23,0
Eta91-H	14,8	5,84	2,70	1,30	1,43	8,0	7,3	0,8	10,3	29,4	26,1
Bou91-H	12,8	4,57	4,20	1,45	1,05	9,4	5,4	0,7	11,1	35,8	34,4
Pre77-H	11,8	4,26	2,19	0,85	1,65	11,1	5,3	/	14,6	28,0	38,8
Cou77-H	12,4	3,92	2,03	1,18	1,80	9,3	3,7	/	11,4	44,7	42,8
Evr77-H	12,4	3,09	2,28	2,15	2,10	/	/	/	7,9	26,3	25,3
Gris77-H	13,9	3,96	3,04	1,30	1,63	7,0	3,8	/	9,6	39,6	27,6
Val94-H	17,1	2,82	2,35	1,75	2,55	11,6	8,9	1,0	11,5	50,5	46,4
VaP94-H	16,4	2,15	1,61	1,53	2,98	9,5	6,6	2,2	6,5	32,3	30,9
Bou91* (témoin1)	/	3,90	2,69	/	/	4,2	4,9	0,4	3,4	16,7	16,73
Bou91* (témoin2)	/	2,56	1,55	/	/	4,8	4,9	1,1	4,4	15,1	16,02
2008											
Sgl77-H08*	11,1	3,04	4,28	0,8	1,1	9,8	13,0	0,9	12,7	39,4	36,5
Sma77-H08*	11,7	6,32	3,05	1,9	2,08	7,7	9,4	0,5	16,5	33,1	32,0
Etr77-H08	12,5	3,93	2,21	1,18	/	12,2	7,5	3,4	7,8	36,7	34,5
Bou91* (témoin3)	/	4,46	3,11	/	/	6,8	5,3	0,7	6,2	24,0	23,8

* Mesures réalisés avec une injection simultanée d'ammonium et de nitrites

« / »: Mesures non effectuées ou incomplètes ou résultats inexploitable

ANNEXE 8 : Etude du marquage FISH des populations nitrifiantes des boues activées

Population nitrosante des boues activées

Différentes sondes, plus ou moins spécifiques ont été testées pour marquer les bactéries nitrosantes des boues activées.

Les sondes NmV, Nse1472 et NEU, ciblent respectivement les lignées *Nitrosomonas europaea*, *Nitrosococcus mobilis*, et le sous-groupe 7 du genre *Nitrosomonas* qui regroupe ces deux lignées. Les essais d'hybridation réalisés sur différents échantillons de boues activées (Bou91-E, Eta91-E et Val94-E) avec chacune de ces 3 sondes n'ont donné que des résultats négatifs.

Seules les sondes Nmo218 et Nso190 ont donc été retenues pour le marquage de la biomasse nitrosante des échantillons. Toutefois, l'utilisation de la sonde Nso190 a soulevé deux problèmes : la stringence du tampon d'hybridation publié a dû être modifiée, et le marquage obtenu ne semble pas marquer le groupe *Nitrosomonas oligotropha* de façon exhaustive, alors qu'elle cible normalement toutes les bactéries nitrosantes.

Sonde Nmo218

La sonde Nmo218 cible spécifiquement le sous-groupe 6a-*N. oligotropha*. L'hybridation des boues activées avec cette sonde a naturellement résulté en un marquage relativement abondant. La figure 1 présente des images obtenues avec cette sonde.

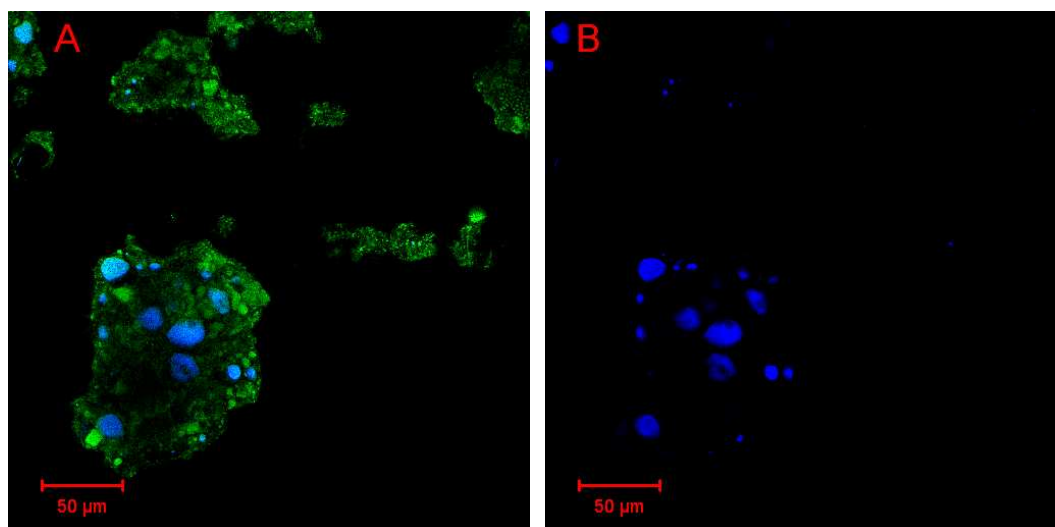


Figure 1 : A) Boues de Val94 marquées par l'EUBmix (FITC en vert) et par Nmo218 (Cy5 en bleu). B) la même image sans le marquage par EUBmix.

Des amas bactériens denses, de taille variable entre 5 et 30 μm de diamètre, sont marqués par la sonde Nmo218 (en bleu). La configuration spatiale observée sur la figure 1 est caractéristique des bactéries nitrosantes. Elle leur confère une bonne résistance aux inhibiteurs, à la dessiccation ou à la prédation ainsi qu'aux conditions extrêmes de température et de pH (Prosser 1989; Stehr *et al.* 1995).

Sonde Nso190

La sonde Nso190 cible la grande majorité des bêta-protéobactéries nitrosantes. Dans leurs travaux, (Mobarry *et al.* 1996) indiquent qu'elle doit être employée dans un tampon à 55% de formamide (noté 55% FM)

La biomasse de la solution NB a pu être marquée dans un tampon à 55% FM, de même qu'un échantillon de boues très fortement nitrifiantes issues d'un réacteur d'enrichissement (non présenté). Cependant, **aucun marquage n'a été observé sur les échantillons de boues activées** de stations d'épuration municipales.

La concentration en formamide du tampon utilisé pour la sonde Nso190 a été modifiée en accord avec plusieurs études de la littérature, dans lesquelles les conditions de stringence sont optimisées en diminuant la concentration de formamide du tampon d'hybridation à 25% FM (Konuma *et al.* 2001) ou à 35% FM (Biesterfeld *et al.* 2001; Jubany 2007). Diminuer le pourcentage de formamide abaisse la stringence du tampon, et augmente donc le risque d'hybridation non spécifique. Cependant, d'après les études réalisées par ces différentes équipes, un tampon à 35% FM permet de conserver une spécificité de marquage convenable.

La figure 2 présente des images obtenues sur des boues de la station d'épuration Val94 avec la sonde Nso190 utilisée dans un tampon à 35% FM.

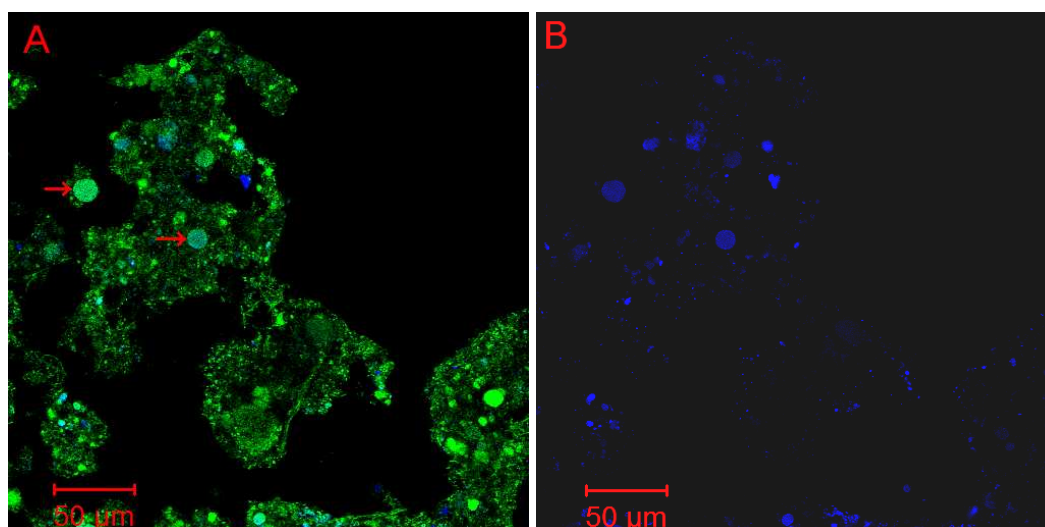


Figure 2: A) Boues de Val94, marquées avec l'EUBmix (FITC, en vert), et avec Nso190 (Cy5 en bleu) dans un tampon à 35% FM. B) la même image sans le marquage par EUBmix.

Quelques ensembles de bactéries sont positifs à ce marquage (deux exemples sont indiqués par les flèches rouges sur la figure 2A), regroupés sous forme d'amas denses comme pour le marquage avec Nmo218.

Cependant, malgré les nouvelles conditions d'hybridation, la sonde Nso190 ne donne qu'un signal faible, souvent en limite de détection, voire inférieur à certaines zones de bruit de fond. Malgré cette faible qualité du marquage obtenu, cette sonde sera utilisée avec la sonde Nmo218 car elle cible un spectre plus large de bactéries nitrosantes.

Marquage simultanée par Nmo218 et Nso190

Après l'ajustement réalisé pour la sonde Nso190, la stringence du tampon d'hybridation pour les deux sondes Nso190 et Nmo218 sont identiques (35% FM). Elles peuvent donc être utilisées simultanément pour le marquage des échantillons de boues activées.

La figure 3 présente des images de boues activées marquées avec les sondes Nmo218 (en rouge) et Nso190 (en bleu).

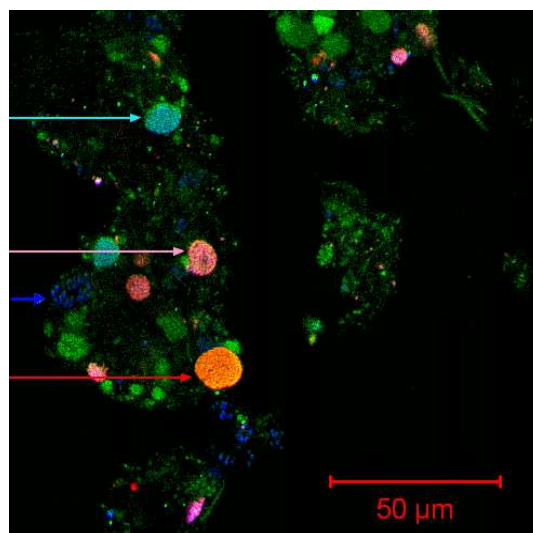


Figure 3 : Image de boues de Val94 marquées avec les sondes EUBmix (FITC en vert), Nso190 (Cy5 en bleu), Nmo218 (Cy3 en rouge).

L'analyse des résultats obtenus sur la figure 3 révèle un problème de marquage avec la sonde Nso190. Théoriquement, la sonde Nso190 cible un spectre large de bactéries nitrosantes incluant l'ensemble des bactéries ciblées par Nmo218 (le sous-groupe 6a-*N. oligotropha*).

Le marquage réalisé devrait donc permettre d'observer des amas roses (comme ceux indiqués par une flèche rose sur la figure 3) résultant de l'hybridation simultanée par les deux sondes spécifiques, et d'autres amas marqués uniquement par la sonde Nso190 (en bleu), comme celui indiqué par la flèche bleu ciel sur la figure 3. Les amas bleus sont formés de bactéries nitrosantes n'appartenant pas au sous-groupe 6a-*N. oligotropha*. Ils étaient peu abondants dans les essais de marquage ainsi réalisés.

Cependant, certains amas rouges sont également visibles (indiqués par la flèche rouge sur la figure 3) révélant une hybridation par la seule sonde Nmo218. Il apparaît donc que Nso190 ne marque pas toutes les bactéries nitrosantes du groupe 6a-*N. oligotropha*. Une autre étude publiée a également constaté un marquage non exhaustif des bactéries nitrosantes par la sonde Nso190 dans un milieu contenant des espèces du groupe *N. oligotropha* (Hallin *et al.* 2005).

D'autres parties apparaissent en bleu (comme indiqué par la flèche bleu foncé), qui ne sont pas marqués par l'EUBmix (vert), et qui ne sont pas regroupés en amas comme les autres amas de bactéries nitrosantes. Il semble donc que ces objets correspondent à une fluorescence artificielle.

Remarque : Lors du marquage des boues par Nso190 et Nmo218 simultanément avec deux fluorophores différents, les amas de bactéries nitrosantes sont marqués par l'une et/ou l'autre

sonde de façon homogène, ce qui prouve qu'ils sont entièrement constitués par des organismes identiques. Chaque amas semble donc résulter de la multiplication de proche en proche à partir d'une seule bactérie initiale, et non pas de l'agrégation de bactéries de différentes origines.

Population nitratante des boues activées

Les sondes NIT3 et Ntspa662 ciblant respectivement les groupes *Nitrobacter* et *Nitrospira* ont été testées sur plusieurs échantillons de boues activées.

Aucun marquage n'a pu être observé avec la sonde NIT3, sur les échantillons testés (Bou91-E, Eta91-E et Val94-E). Ce résultat négatif révèle l'absence ou la très faible proportion de bactéries du genre *Nitrobacter* dans les boues activées. Ce résultat confirme les observations réalisées par plusieurs études précédentes (Juretschko *et al.* 1998; Daims *et al.* 2001b).

En revanche, l'hybridation avec la sonde Ntspa662 donne des résultats positifs sur tous les échantillons. De plus, elle cible théoriquement l'ensemble du genre *Nitrospira*, contrairement à d'autres sondes existantes qui ciblent des sous-groupes de ce genre bactérien. Ainsi, pour l'analyse quantitative des populations nitratantes des échantillons, seule la sonde Ntspa662 a été utilisée pour cibler la biomasse nitratante.

La figure 4 présente les images obtenues suite au marquage de boues activées de Val94 avec les sondes Ntspa662 (en rouge) et Nmo218 (en bleu).

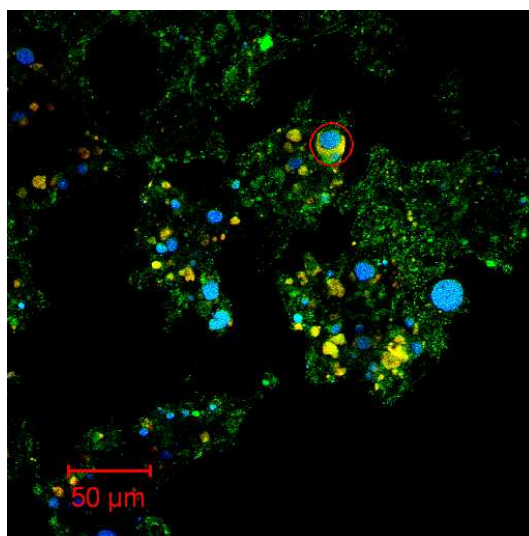


Figure 4 : Boues de Val94 marquées avec EUBmix (fluorophore FITC en vert), Nmo218 (Cy5 en bleu) et Ntspa662 (Cy3 en rouge).

De nombreuses bactéries sont marquées par la sonde Ntspa662 en rouge (qui apparaît en jaune par superposition avec le vert du FITC), regroupées en amas de petites tailles (5 à 10 μm de diamètre environ).

Dans certains cas, les amas de bactéries nitrosantes sont entourés de près par des colonies de bactéries nitratantes ; comme indiqué par le cercle rouge sur la figure 4 ou comme l'exemple de la figure 5 avec un fort grossissement.

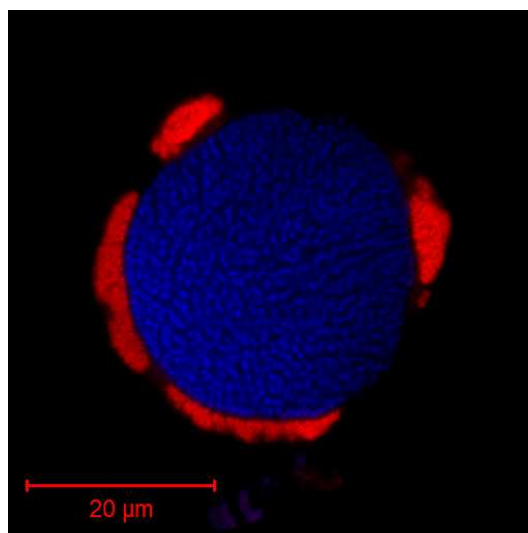


Figure 5 : Exemple de configuration spatiale de bactéries nitratantes (en rouge, marquées avec Ntspa662) autour d'un amas de bactéries nitrosantes (en bleu, marquées avec Nmo218)

La proximité des colonies de bactéries nitratantes observée sur la figure 5 reflète l'interaction entre les deux groupes au sein du cycle de l'azote. Autour des amas de bactéries nitrosantes, la concentration en nitrites est localement plus élevée, favorisant ainsi la croissance des colonies de bactéries nitratantes. Toutefois, cette structure n'est observée qu'autour d'amas de bactéries nitrosantes de taille importante ($>10 \mu\text{m}$ de diamètre).

Solution commerciale NB

Réponse aux différentes sondes

La sonde NEU cible le groupe 7-*N. europaea*/*Nc. mobilis*, et dans ce groupe, la sonde Nse1472 cible le sous-groupe *N. europaea*. La biomasse nitrosante de la solution NB a pu être marquée par les sondes Nso190, NEU et Nse1472, mais le marquage était négatif avec la sonde NmV, qui cible le sous-groupe *Nc. mobilis* du groupe 7, ainsi qu'avec la sonde

Nmo218 (*N. oligotropha*). Les bactéries nitrosantes de la solution NB appartiennent donc au sous groupe *N. europaea* du groupe 7- *N. europaea*/*Nc. mobilis* du genre *Nitrosomonas*.

La biomasse nitratante a quant à elle été efficacement marquée par la sonde NIT3 (cf. figure 6A), alors que la sonde Ntspa662 n'a rien marqué sur l'échantillon de solution NB. Les bactéries nitratantes composant cette solution appartiennent donc au genre *Nitrobacter*, contrairement à celles des boues activées qui appartiennent au genre *Nitrospira*.

La sonde Nso190 a pu être utilisée avec succès dans un tampon d'hybridation à 55 % FM. Cependant, afin de l'utiliser simultanément à NIT3, les hybridations avec Nso190 ont été réalisées à 40 % FM.

La figure 6 présente deux exemples de marquages obtenus sur la solution NB dans différentes conditions.

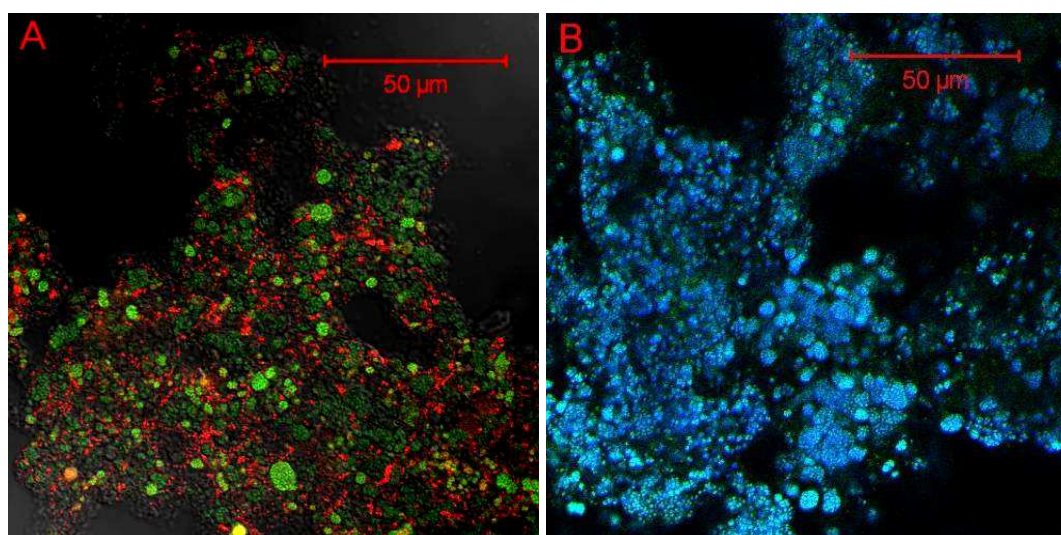


Figure 6 : Solution NB marquée par A) Nso190 (FITC en vert) et NIT3 (Cy3 en rouge) dans un tampon d'hybridation à 40 % FM, et B) EUBmix (FITC en vert) et Nso190 (Cy5 en bleu) dans un tampon d'hybridation à 35 % FM

Dans un tampon d'hybridation à 40 % FM, (figure 6A) la sonde Nso190 marque une large proportion de la biomasse totale, qui semble correspondre aux bactéries nitrosantes de la solution, car la biomasse marquée est complémentaire de la biomasse nitratante marquée par NIT3 (en rouge), et car certains amas de quelques micromètres de diamètre apparaissent avec une plus forte intensité de fluorescence.

L'hybridation réalisée à 35 % (figure 6B) permet également d'observer un large marquage de la biomasse totale.

Marquages non spécifiques

D'autres essais d'hybridation dans un tampon à 35% FM ont présentés des problèmes d'hybridation non spécifique pour la solution NB. En effet, la matrice de la solution NB (c'est-à-dire les bactéries et leurs exo-polymères qui leurs confèrent leur pouvoir d'adhésion) était marquée par le fluorophore Cy3 lors de l'hybridation à 35 % FM (figure 7).

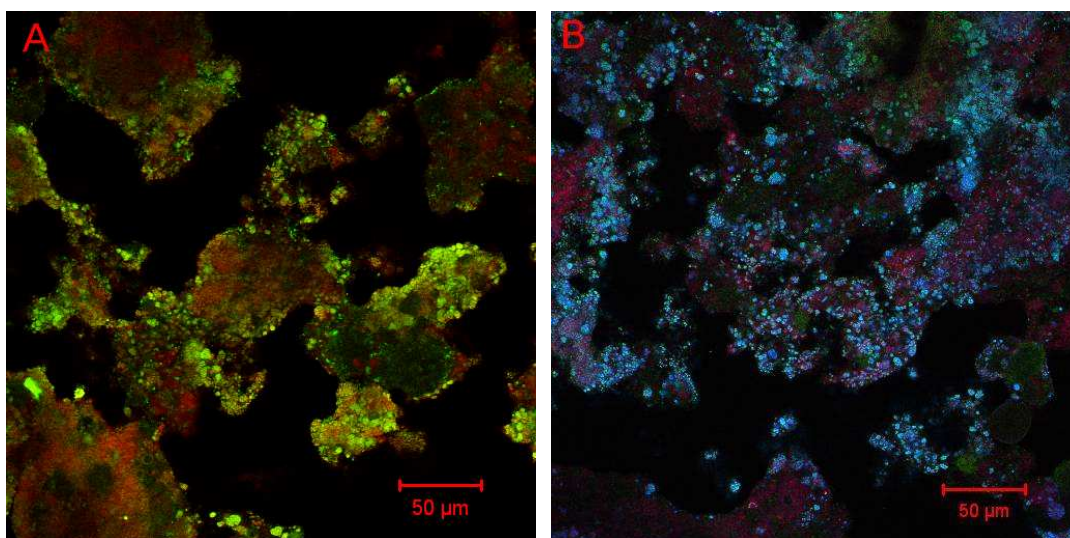


Figure 7 : Solution NB marquée dans un tampon d'hybridation à 35% FM par A) EUBmix (FITC en vert) et Nso190 (Cy3 en rouge) et B) EUBmix (FITC en vert), Nso190 (Cy3 en bleu) et ntspa662 (Cy3 en rouge)

Ce phénomène de marquage non spécifique de la matrice de la solution NB a été observé avec la sonde Nso190 (figure 7A), mais aussi avec d'autres sondes ne ciblant pas les espèces bactériennes de la solution NB : Ntspa662 (figure 7B), NmV ou Nmo218, y compris lorsque la solution BA était utilisée en bio-augmentation de boues activées présenté sur la figure 8.

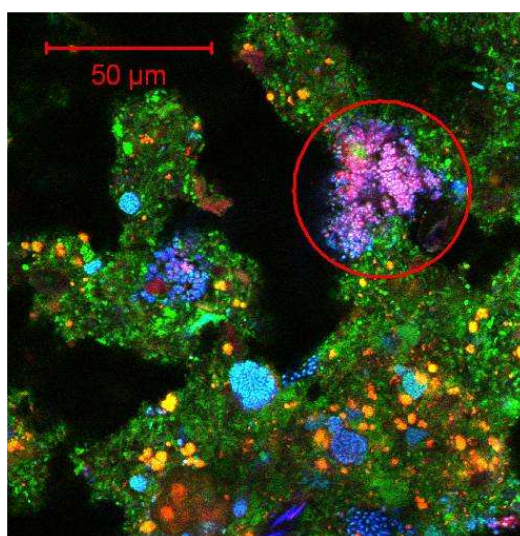


Figure 8 : Boues de la STEP Bou91 bio-augmentées, marquées par EUBmix (FITC en vert), Nmo218+Nso190 (Cy5 en bleu) et Ntspa662 (Cy3 en rouge).

La biomasse de la solution NB se distingue de l'ensemble par des gros amas fluorescents (un exemple est indiqué par un cercle rouge) où l'on ne distingue pas la forme spécifique des amas bactéries nitrosantes. Cet ensemble est marqué par toutes les sondes utilisées, y compris la sonde Ntspa662 (en rouge), ne ciblant pourtant pas les espèces nitrifiantes de la solution NB (*Nitrobacter*).

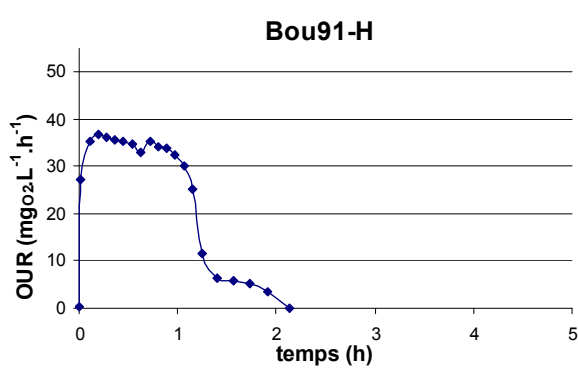
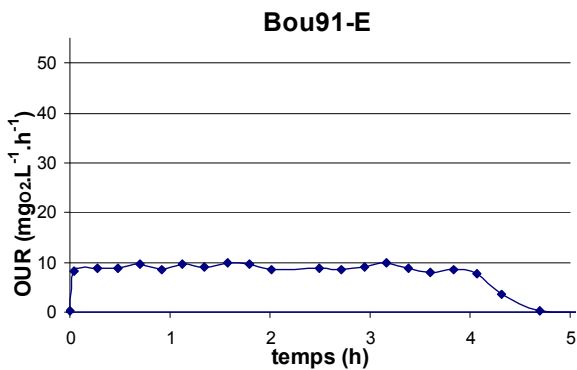
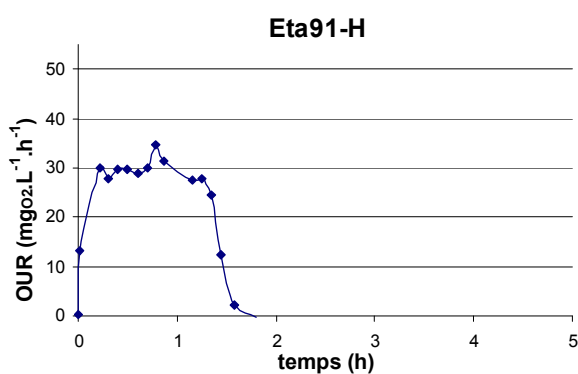
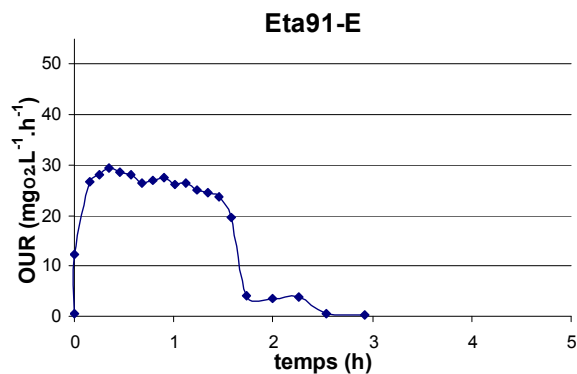
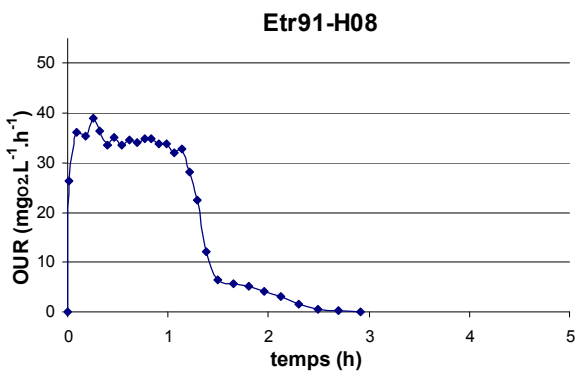
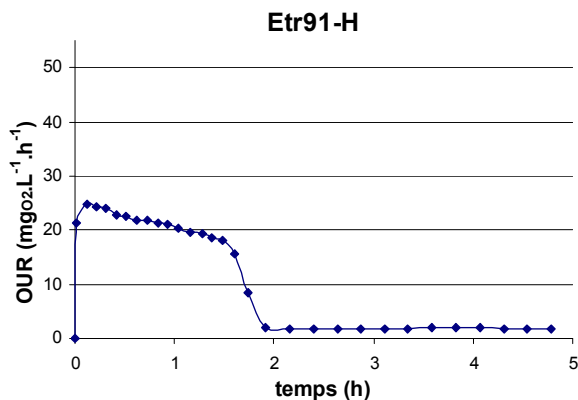
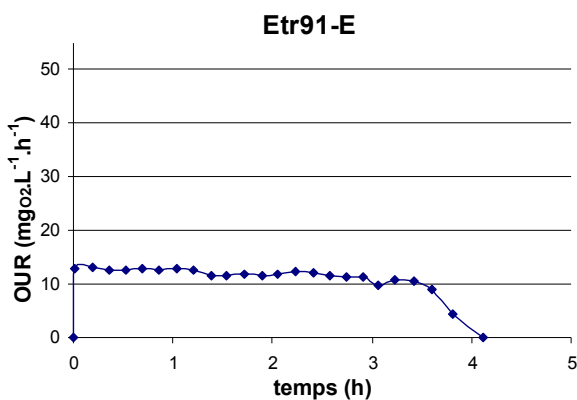
La matrice de la solution NB semble donc présenter une grande affinité pour le fluorophore Cy3 qui résulte en un marquage non spécifique de la solution NB dans un tampon d'hybridation à 35 %.

Par ailleurs, la biomasse nitrosante de la solution NB ne constitue pas des amas sphériques comme la biomasse nitrosante autochtone des boues (marquées en bleu sur la figure 8). Ainsi, lors du traitement des images réalisé pour la mesure des fractions de biomasse, il sera difficile de faire la différence entre des objets auto-fluorescents et les bactéries de la solution NB, car ces objets sont éliminés manuellement sur la base de l'observation de la conformation.

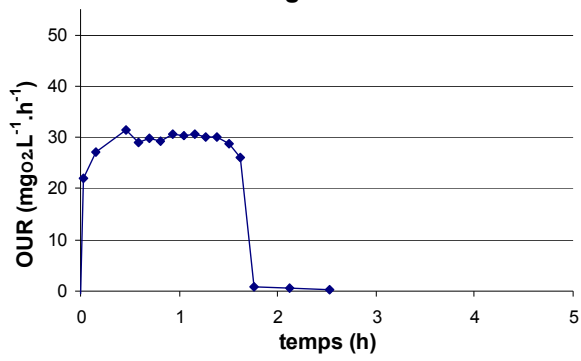
La méthode de quantification développée n'a donc pas été appliquée aux échantillons de boues bio-augmentées.

ANNEXE 9

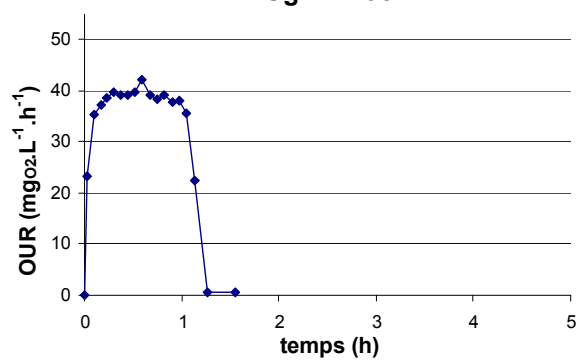
Respirogrammes



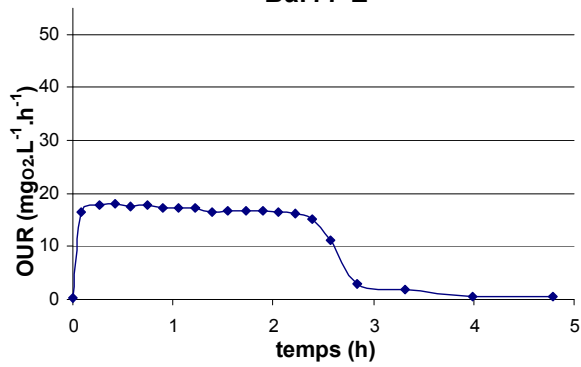
Sgl77-E



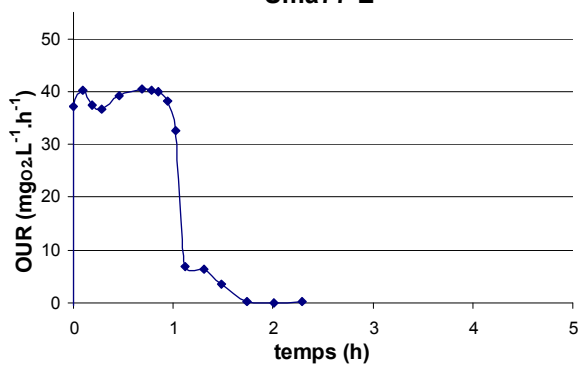
Sgl77-H08



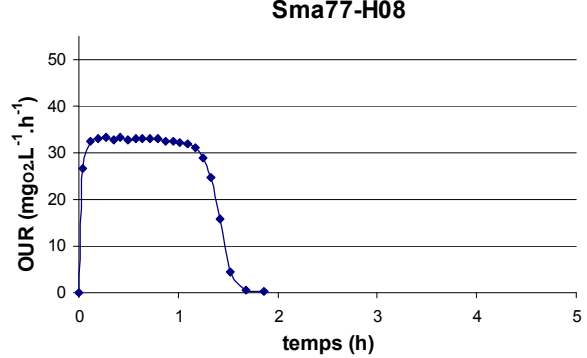
Bar77-E



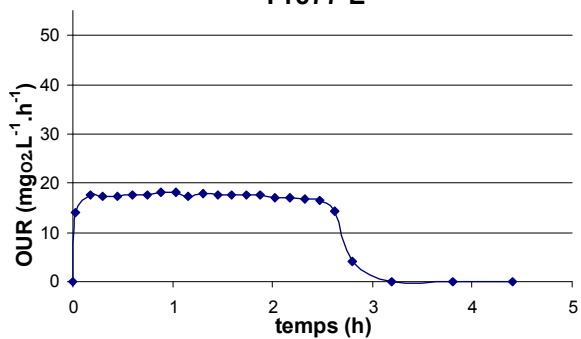
Sma77-E



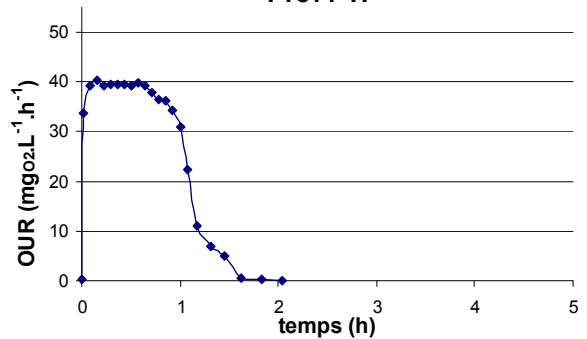
Sma77-H08

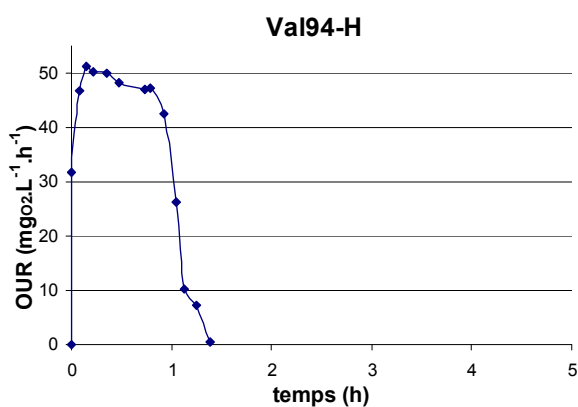
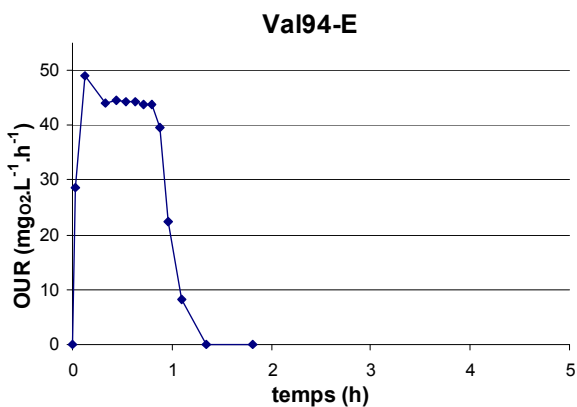
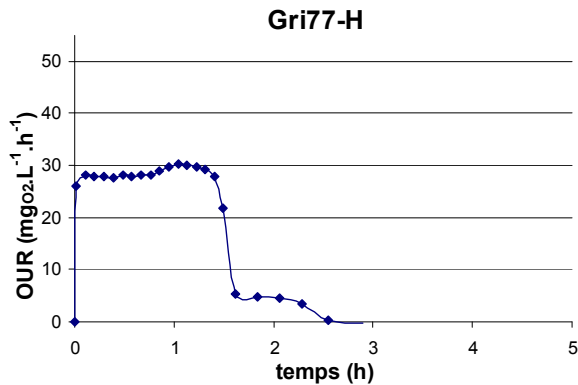
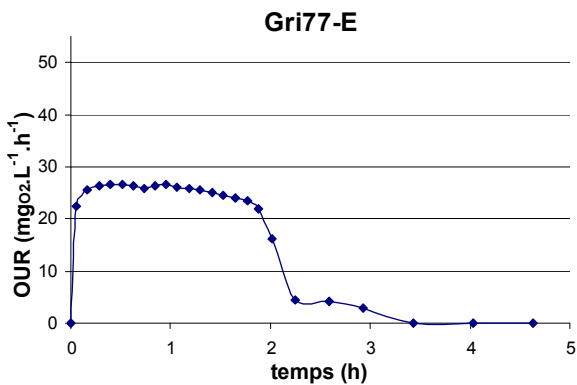
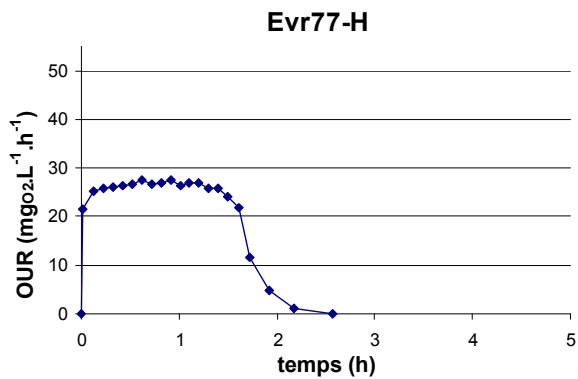
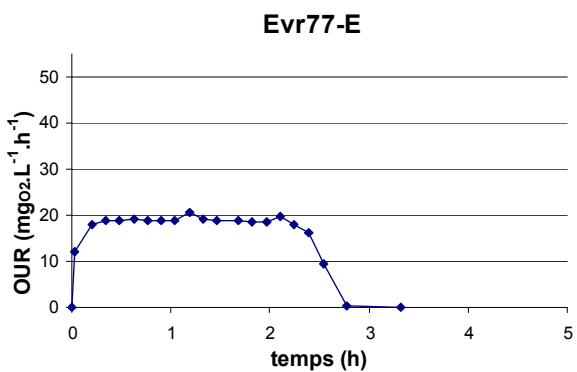
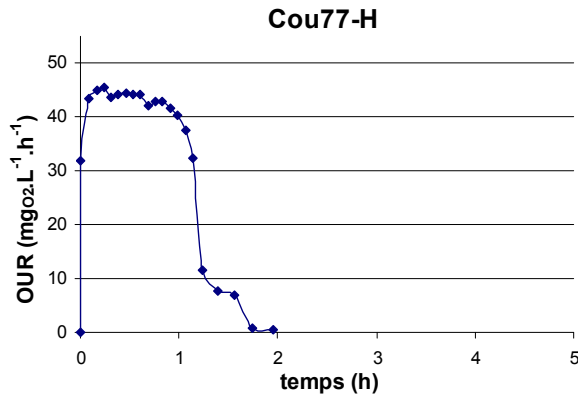
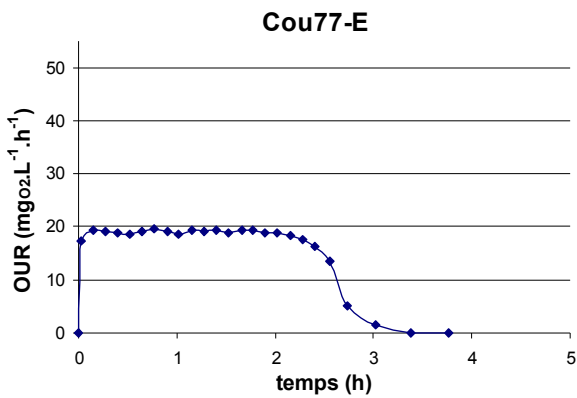


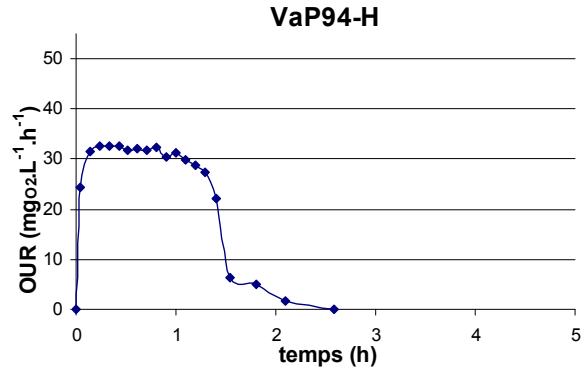
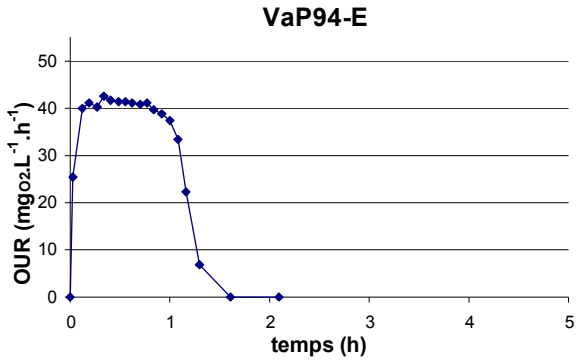
Pre77-E

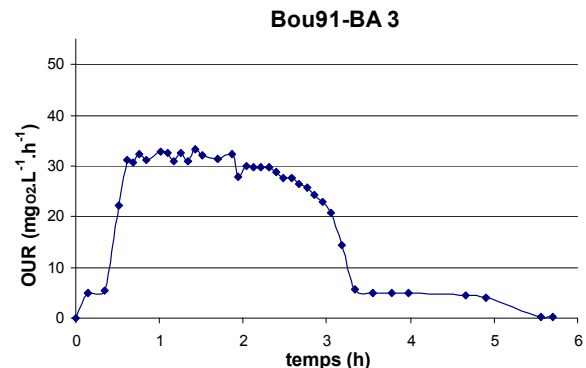
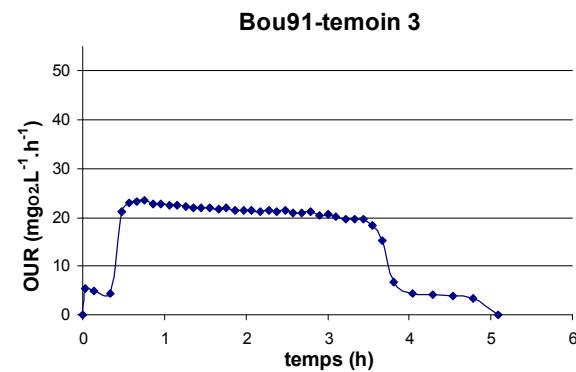
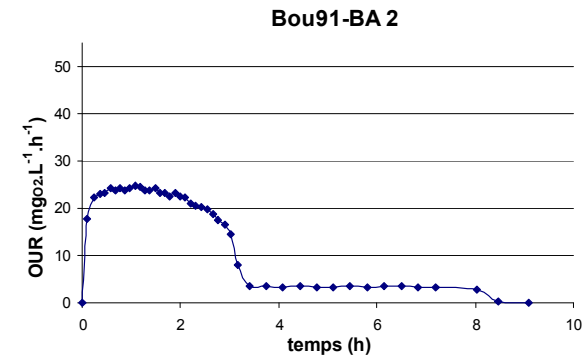
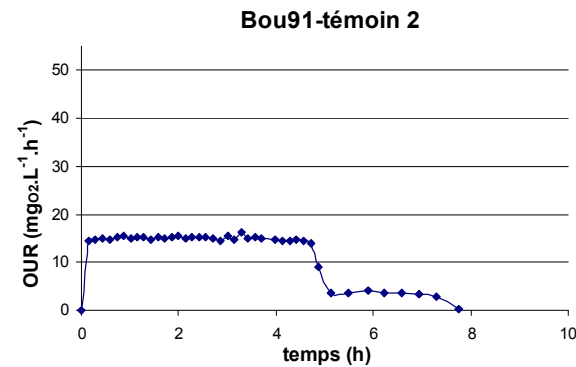
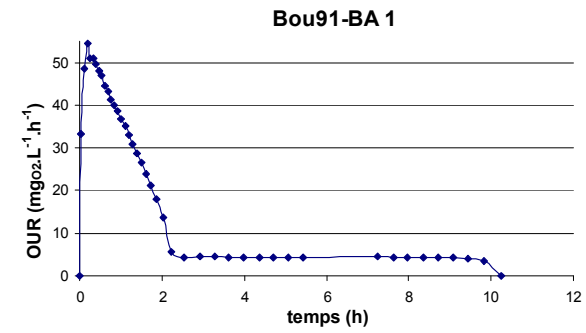
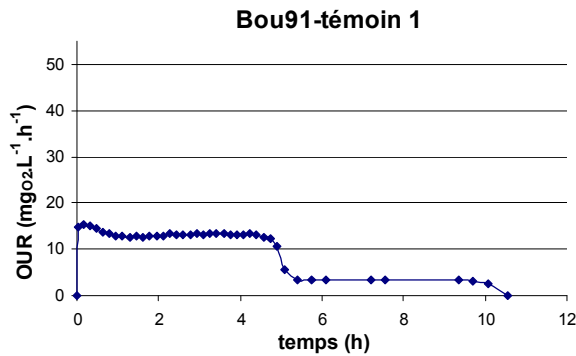


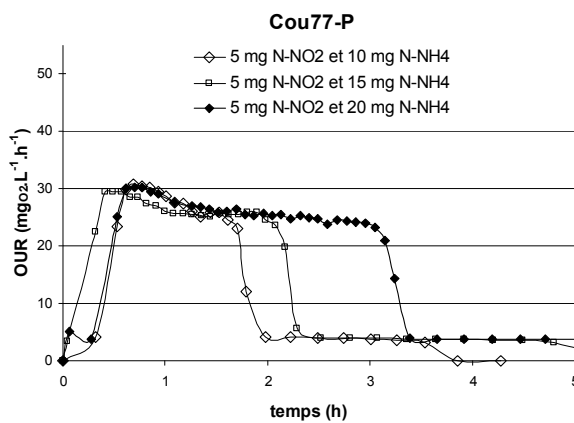
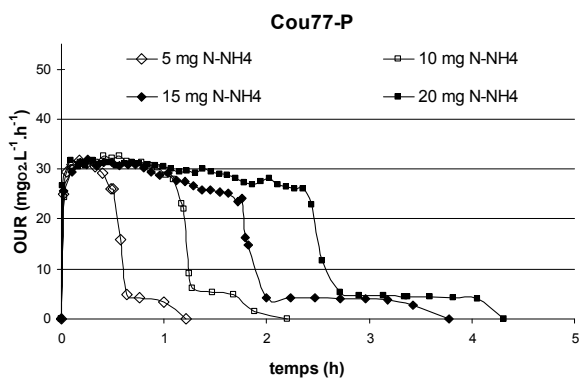
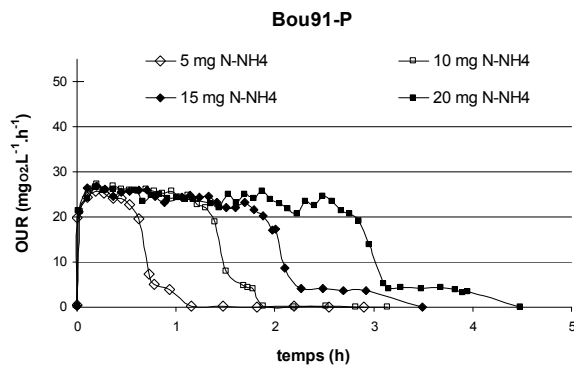
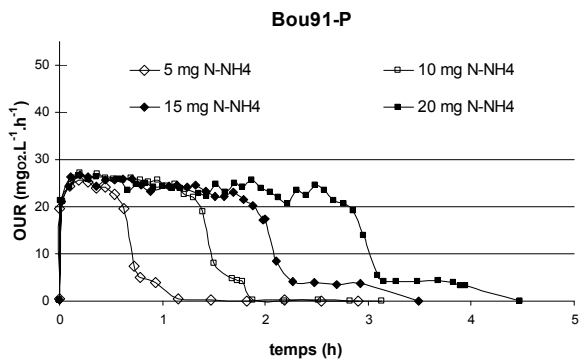
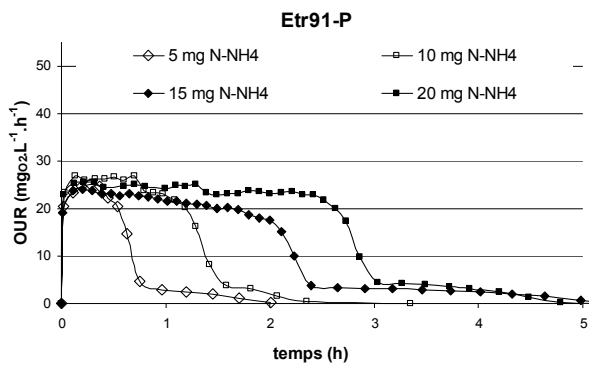
Pre77-H











ANNEXE 10

Analyse de l'activité endogène des boues aérées sans substrat selon le modèle ASM1

En absence de substrat, les boues activées aérées présentent une activité appelée endogène, qui vient de l'activité d'auto-oxydation des boues. Le modèle ASM1 représente ce phénomène selon le concept de « mort-régénération ». Une fraction f_P de la biomasse active qui meurt de vient de la matière inerte (X_P), alors que la fraction $(1-f_P)$ se retrouve sous forme de substrat particulaire X_S (et X_{ND} pour la fraction azotée). Après hydrolyse (en S_S), ce substrat, pourra de nouveau être consommé pour la croissance de la biomasse. La fraction azotée X_{ND} est également hydrolysée (en S_{ND}), puis ammonifiée (en S_{NH} , c.à.d. NH_4) avant d'être nitrifiée.

La figure 1 présente les réactions impliquées dans l'activité endogène des boues activées selon le modèle ASM1. Dans ce modèle, les biomasses nitrosantes et nitratantes ne sont pas différenciées, et sont regroupées sous le terme X_{BA} .

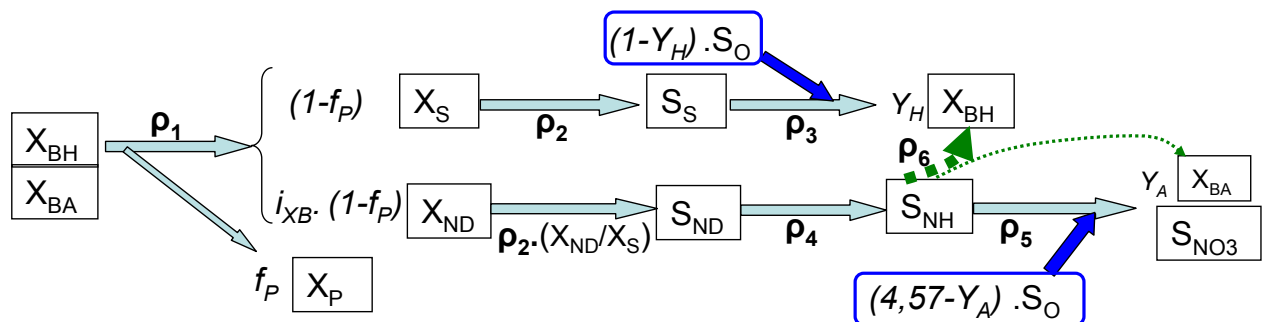


Figure 1: schéma des réactions de dégradation de la matière organique et azotée produisant la respiration endogène. Les flèches en pointillé représentent l'assimilation.

Le décès et la dégradation de la biomasse active ($X = X_{BH} + X_{BA}$) aboutit donc la production de matière particulaire inerte (X_P), de nouvelle biomasse hétérotrophe (X_{BH}), de nitrates (NO_3) et de biomasse autotrophe (X_{BA}).

La consommation du substrat carboné (S_S) et azoté (S_{NH}) relargué se traduit par une consommation d'oxygène (S_O) qui constitue la respiration endogène.

- **Bilan matière (stœchiométrie)**

f_P représente la fraction inerte de la biomasse, et sa valeur par défaut est 0,08 (Choubert *et al.* 2005 ; Marquot 2006) ; i_{XB} représente la teneur en azote de la biomasse et vaut 0,0875

g_N/g_{DCO} ; Y_H représente le rendement de conversion hétérotrophe et vaut $0,67 g_{DCO-XBH}/g_{DCO}$; et Y_A représente le rendement de conversion autotrophe et vaut $0,23 g_{DCO-XBA}/g_N$.

Le tableau 1 présente les coefficients stœchiométriques de l'ensemble des réactions endogènes présentées sur la figure 1.

Tableau 1 : Bilan matière (en gDCO) du système de réactions endogènes pour le décès de $1g_{DCO}$ de biomasse active ($X = XBH + XBA$)

Produit	Production (g_{DCO} ou g_N/g_{X-DCO})	Valeur standard.	O2 consommé (g_{O2}/g_{X-DCO})	Valeur standard
X_p	f_p	0,08	0	0
X_{BH}	$Y_H * (1-f_p)$	0,616	$(1-Y_H) * (1-f_p)$	0,304
X_{BA}	$Y_A * i_{XB} * (1-f_p) * (1-Y_H)$	0,006	$(4,57-Y_A) * i_{XB} * (1-f_p) * (1-Y_H)$	0,115
NO_3	$i_{XB} * (1-f_p) * (1-Y_H)$	0,027		
O2 total				0,419

La nitrification de l'ammonium relargué contribue à 27 % de la respiration endogène. Ainsi, lorsque la concentration en biomasse est importante, cette activité nitrifiante endogène et la respiration qui en résulte sont élevées, et doivent être prises en compte pour l'analyse des respirogrammes.

Selon ce modèle, l'ammonium produit par l'auto-oxydation de la biomasse est réparti à 67 % pour l'assimilation et seuls 33 % sont nitrifiés. D'autre part, lorsque la respiration endogène consomme $0,419 g_{O2}$, il est simultanément produit $0,027 g_{N-NO3}$ par nitrification endogène ; soit une proportion de **$0,064 g_{N-NO3}/g_{O2-endogène}$**

ANNEXE 11

Analyse des hypothèses permettant d'expliquer les incohérences entre les ratios OC/N mesurés et théoriques.

- **Causes potentielles de surestimation de l'ammonium concerné par la nitrification**

En premier lieu, il est envisagé qu'un phénomène indésirable ait conduit à l'élimination d'une partie de l'ammonium introduit. La quantité de substrat concerné par la nitrification serait alors réduite, conduisant à une moindre consommation d'oxygène. Deux hypothèses ont été proposées : le stripage de l'ammoniac, et l'adsorption sur les floes.

Stripage de l'ammoniac

Equilibre $\text{NH}_4^+/\text{NH}_3$

L'ammonium sous forme ionique (NH_4^+) est en équilibre permanent avec sa forme basique : l'ammoniac (NH_3) ($\text{pKa}[\text{NH}_4^+/\text{NH}_3] = 9,4$ à 20°C). La concentration en ammoniac du milieu peut être estimée à partir de la mesure du pH, suivant l'équation 1 :

$$[\text{NH}_3] = \frac{[\text{NH}_{4\text{tot}}]}{1 + 10^{\text{pKa}-\text{pH}}} \quad \text{équation 1}$$

où $[\text{NH}_{4\text{tot}}]$ est la concentration totale en azote ammoniacal ($\text{NH}_4^+ + \text{NH}_3$).

Evaluation du stripage de l'ammoniac (NH_3)

L'ammoniac est un gaz dissous susceptible d'être partiellement strippé (transféré vers la phase gazeuse) lors des phases d'aération.

L'équilibre entre les concentrations dans les phases liquides ($[\text{NH}_3]_l$) et gazeuses ($[\text{NH}_3]_g$) est exprimé par l'équation 2

$$[\text{NH}_3]_l = [\text{NH}_3]_g \cdot \alpha_{\text{NH}_3\text{-eau}} \quad \text{équation 2}$$

où le coefficient $\alpha_{\text{NH}_3\text{-eau}}$ est de 1703 à 20°C (Roustan 2003).

La solubilité de l'ammoniac étant élevée, la concentration en NH_3 dans la phase gazeuse à l'équilibre entre les phases liquide et gazeuse est très faible (pour $[\text{NH}_3]_l = 1 \text{ mg/l}$, $[\text{NH}_3]_g =$

$6 \cdot 10^{-4}$ mg/l) La quantité d'ammoniac strippé est donc limitée par la concentration d'équilibre dans la phase gazeuse et par le débit de gaz.

L'aération du respiromètre fonctionne par intermittence, assurant la remontée du niveau d'oxygène dissous de 5 à 7 mgO₂/L (soit 1 à 2 minutes entre chaque point expérimental d'OUR). Lors de ces phases d'aération, la quantité maximale d'ammoniac strippée est exprimée par l'équation 3 :

$$\text{NH}_{3\text{strippé,max}} = [\text{NH}_3]_{\text{gaz,max}} \cdot Q_{\text{air}} \cdot t_{\text{aeration}} \quad \text{équation 3}$$

où $[\text{NH}_3]_{\text{gaz,max}}$ est la concentration maximale d'ammoniac dans l'air à l'équilibre avec la phase liquide, Q_{air} est le débit d'air insufflé dans le respiromètre et t_{aeration} est la durée de la phase d'aération.

Dans les conditions opératoires des mesures respirométriques ($Q_{\text{air}}^3 = 12$ l/min, $t_{\text{aeration}} = 2$ minutes), la quantité maximale d'ammoniac strippé au cours d'une mesure complète (en comptant un cycle d'aération pour chaque point du respirogramme) a été calculé pour plusieurs respirogrammes à partir des données de pH. Les valeurs obtenues sont toutes inférieures à 1% de la quantité d'ammonium introduit. La quantité totale strippée au cours des mesures respirométriques est donc négligeable.

Adsorption sur les floes

Les floes des boues activées présentent une surface chargée négativement, qui est susceptible d'adsorber les ions positifs du milieu, en particulier les ions NH_4^+ . Pendant la phase endogène qui dure 15 heures environ, les boues dessorbent *apriori* tout l'ammonium initialement adsorbé, et leur capacité d'adsorption est alors maximale lorsque l'ammonium est introduit. Ainsi, après injection, une partie de l'ammonium introduit a pu être adsorbée par les boues activées. La quantité d'ammonium disponible pour la nitrification serait alors réduite.

D'après Nielsen (1996) et Schwitalla *et al.* (2008), les boues activées sont capables d'adsorber entre 0,1 et 0,25 mg_{N-NH4}/g_{MES}; et la capacité d'adsorption est très variable d'un échantillon de boues à l'autre (Schwitalla *et al.* 2008).

³Le débit d'air (Q_{air}) est estimé d'après les données techniques des suppresseurs.

A partir des concentrations en MES des échantillons (mesurées lors du remplissage des respiromètres) l'ammonium potentiellement adsorbé a été calculé en considérant une capacité maximale de $0,25 \text{ mg}_{\text{N-NH}_4}/\text{g}_{\text{MES}}$. D'après cette estimation, les boues activées des échantillons pourraient adsorber entre $0,54$ et $1,75 \text{ mg}_{\text{N-NH}_4}/\text{L}$, soit 5 à 15 % des $12 \text{ mg}_{\text{N-NH}_4}/\text{L}$ introduits.

Les capacités d'adsorption potentielle sont du même ordre de grandeur que les écarts de ratios OC/N mesurés. Ce phénomène pourrait donc être responsable des faibles ratios déterminés expérimentalement.

Cependant, l'étude au cas par cas révèle que pour 20 échantillons, la capacité maximale d'adsorption obtenue est très inférieure à la quantité d'ammonium manquante pour que le ratio OC/N corresponde à la théorie.

L'adsorption d'ammonium sur les floes ne permet donc pas d'expliquer les écarts de ratios pour tous les résultats obtenus.

- **Causes potentielles de faibles consommations d'oxygène**

Les faibles ratios mesurés peuvent également résulter d'une consommation d'oxygène réellement plus faible au cours de la mesure, en raison du métabolisme des bactéries nitrifiantes, ou d'une diminution de la respiration endogène.

Métabolisme alternatif des bactéries nitrifiantes

Les ratios OC/N théoriques sont déterminés pour les réactions de nitrosation et de nitratisation décrites par les équations stœchiométriques équilibrées pour une composition de biomasse $\text{C}_5\text{H}_7\text{NO}_2$ (cf. § 1.1.2.3 dans la partie « Synthèse bibliographique »).

Or le métabolisme réel des bactéries est beaucoup plus complexe que ne le décrit la réaction stœchiométrique de la réaction biologique. Poughon *et al.* (2001) ont analysé en détail les voies métaboliques d'un organisme modèle nitrosant (*Nitrosomonas europaea*) et nitrifiant (*Nitrobacter*), prenant en compte les aspects thermodynamiques de chaque réaction intermédiaire, ainsi que la répartition des électrons entre les différents métabolites. Les coefficients stœchiométriques théoriques sont vérifiés pour une croissance totalement autotrophe (n'assimilant que du carbone inorganique).

A partir des voies métaboliques « classiques », différentes variations peuvent être envisagées :

- Le carbone assimilé (normalement inorganique) peut être en partie du carbone organique, ce qui limiterait les besoins énergétiques élevés utilisés pour la fixation du carbone inorganique. Cependant, le carbone organique est peu abondant dans les

boues activées des respiromètres après 15 heures d'aération sans apport de substrats (phase endogène).

- D'autre part, l'énergie des bactéries est utilisée en partie pour sa croissance, et en partie pour son énergie de maintenance. Or, l'énergie de maintenance dépend des conditions du milieu. Geets *et al.* (2006) ont montré que l'énergie de maintenance des bactéries nitrosantes est plus faible dans les milieux présentant des carences en substrats (ammonium et/ou oxygène) par rapport aux milieux où les substrats sont abondants. Cependant, la mesure a été réalisée dans un milieu riche en substrats azotés, ce qui devrait donc résulter en une énergie de maintenance maximale.
- Les oxydes nitreux (N_2O , NO), produits intermédiaires des réactions de nitrification peuvent éventuellement « sortir » du métabolisme bactérien et être émis sous forme de gaz (Tallec *et al.* 2006). Par ailleurs, les bactéries nitrosantes peuvent parfois utiliser les nitrites comme accepteur final d'électrons à la place de l'oxygène (Casciotti et Ward 2001), mais ces mécanismes ont généralement lieu pour de faibles niveaux en oxygène, alors que les mesures respirométriques ont été réalisées à des concentrations élevées en oxygène ($[O_2] > 5 \text{ mg/L}$). Ces réactions alternatives d'utilisation de l'azote peuvent avoir lieu dans des zones d'anoxie locales (au cœur des floes), mais dans des proportions marginales qui ne sauraient expliquer les manques d'oxygène consommé observés.

Ainsi, les faibles ratios OC/N obtenus pour les échantillons de boues activées ne semblent pas être dues à une différence du métabolisme des bactéries nitrifiantes.

Présence d'archéobactéries nitrosantes

Des organismes nitrosants de l'ordre des Archées ont récemment été identifiés (Könneke *et al.* 2005). Ils sont désignés par le terme AOA (de l'anglais Ammonia Oxidising Archaea).

Présents dans différents milieux écologiques tels que les sols (Adair et Schwartz 2008), les rivières, les estuaires ou les milieux marins (Francis *et al.* 2005), les AOA peuvent être responsables d'une part importante de l'activité nitrifiante naturelle (Francis *et al.* 2007), et ils représentent parfois la population nitrosante dominante (Santoro *et al.* 2008). Le métabolisme des AOA pourrait être différent de celui des bactéries nitrosantes, et la nitrification serait alors éventuellement réalisée avec moins d'oxygène.

Park *et al.* (2006) a mis en évidence la présence d'AOA dans plusieurs stations d'épuration municipales ; mais une autre étude a montré que l'importance de la nitrification par les AOA dans les stations d'épuration est faible (MuBmann *et al.* 2008). Cette hypothèse a donc également été écartée.

Variations de la respiration endogène

Lors de l'analyse des données respirométriques, la respiration endogène est soustraite des valeurs d' OUR_{total} afin d'obtenir la respiration exogène correspondant uniquement à la nitrification (cf. 2.4.3.1.3). Il a été montré précédemment que cette soustraction était probablement responsable de la sous-estimation de la vitesse de nitrification réelle. Cependant, l'aire mesurée sous le respirogramme exogène correspond théoriquement à la nitrification de l'ammonium introduit uniquement si l'évolution de la respiration endogène est continue.

Or la respiration endogène est peut-être modifiée par l'introduction du substrat dans le réacteur. Si l'ajout d'ammonium dans le milieu se traduit par une diminution de l'OUR endogène totale, cela se provoquera une sous-estimation de l'OUR exogène, et donc une consommation d'oxygène total (OC_{total}) mesurée inférieure à la consommation réelle, comme le présente la figure 1.

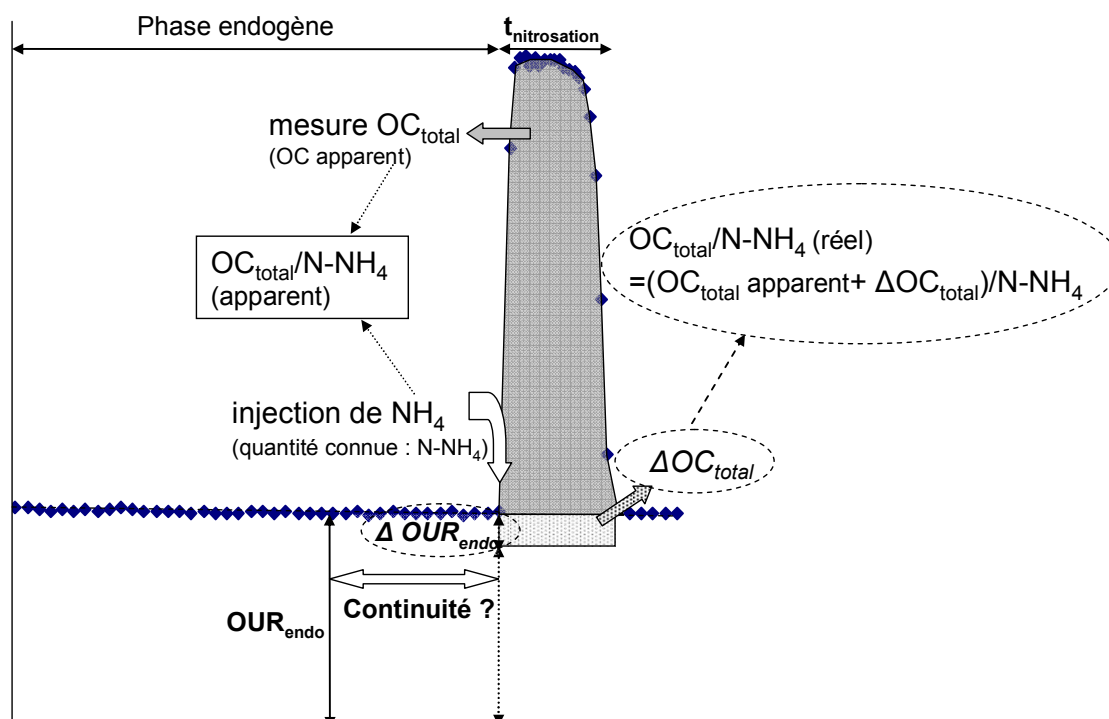


Figure 1 : représentation de l'influence de la respiration endogène sur la mesure du ratio $OC_{total}/N-NH_4$

Lors de sa croissance, la biomasse assimile de l'azote, préférentiellement sous forme d'ammonium. Cependant, en milieu carencé en ammonium (comme pendant la phase endogène), les bactéries peuvent varier leurs sources d'azote assimilé en utilisant des nitrates au lieu de l'ammonium (Hu *et al.* 2007). Cette diversification des sources azotées peut éventuellement influencer le métabolisme bactérien, modifiant alors l'activité endogène et la respiration associée. Une modification de la vitesse de relargage d'ammonium par l'auto-oxydation des boues est également envisageable selon cette hypothèse.

Analyse des données expérimentales

Partant de l'hypothèse que les écarts des ratios OC/N expérimentaux (Tableau 16 p. 165) sont dus à une diminution de la respiration endogène lors de l'injection, la valeur de cette diminution ($\Delta\text{OUR}_{\text{endo}}$ sur la figure 1) a été estimée à partir des ratios expérimentaux et de la durée de la nitrosation ($t_{\text{nitrosation}}$ = durée de la phase de nitrification totale) selon l'équation 4.

$$\Delta\text{OUR}_{\text{endo}} = \frac{\Delta\text{OC}_{\text{total}}}{t_{\text{nitrosation}}} = \frac{4,26 - \left(\text{OC}_{\text{total}} / \text{N} - \text{NH}_4 \right)_{\text{expérimental}}}{t_{\text{nitrosation}}} \quad \text{équation 4}$$

La diminution de l'OUR endogène ainsi estimée ($\Delta\text{OUR}_{\text{endo}}$), a alors été comparée à la valeur de l'OUR_{endo} précédant l'injection d'ammonium (valeurs en annexe 7) pour l'ensemble des respirogrammes. La figure 2 représente la relation obtenue :

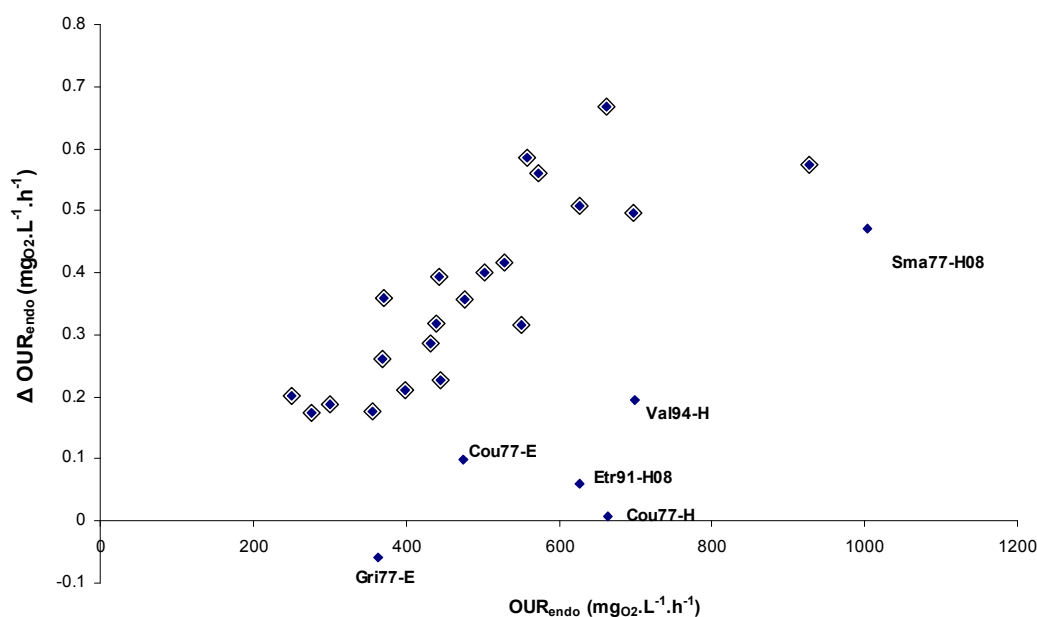


Figure 2: $\Delta\text{OUR}_{\text{endo}}$ estimées en fonction de la respiration endogène avant l'injection.

Une corrélation est observée entre ces deux estimations pour la majorité des échantillons (points entourés sur la figure 2). Cette corrélation peut effectivement résulter d'une diminution de l' OUR_{endo} mais elle peut également être due à d'autres phénomènes liés à des variations de l'activité endogène, de la respiration et/ou de la consommation d'ammonium (variations de l'assimilation ou du relargage d'ammonium par exemple).

Les points fortement éloignés de la tendance (points non entourés, dont le nom est indiqué) correspondent aux échantillons dont le ratio OC/N expérimental est proche du ratio théorique (excepté Sma77-H08). La différence de ces échantillons peut être due à divers facteurs liés à la composition de la biomasse hétérotrophe ou du milieu.

Remarque : Le ratio $\text{OC}_{\text{total}}/\text{N-NH}_4$ de Gri77-E était supérieur à la valeur théorique et le $\Delta\text{OUR}_{\text{endo}}$ calculé pour cet échantillon est donc négatif (cf. figure 2).

Une corrélation est observée pour la majorité des échantillons entre l'écart du ratio $\text{OC}_{\text{total}}/\text{N-NH}_4$ expérimental au ratio théorique, la durée de présence d'ammonium, et la respiration endogène. Une variation de la respiration endogène est donc supposée, mais des analyses complémentaires seraient nécessaires afin d'identifier précisément l'effet de la présence d'ammonium sur l'activité endogène.

Une variation de l'activité endogène suite à l'injection d'ammonium est donc la plus probable des hypothèses analysées dans cette annexe.