

UNIVERSITÉ DE MONTRÉAL

DÉVELOPPEMENT D'UNE MÉTHODE RESPIROMÉTRIQUE VISANT À MESURER
L'ACTIVITÉ BIOLOGIQUE SUR DU CHARBON ACTIF EN POUDRE

KAMEN PAVLOV RAEV

DÉPARTEMENT DES GÉNIES CIVIL, GÉOLOGIQUE ET DES MINES
ÉCOLE POLYTECHNIQUE DE MONTRÉAL

MÉMOIRE PRÉSENTÉ EN VUE DE L'OBTENTION
DU DIPLÔME DE MAÎTRISE ÈS SCIENCES APPLIQUÉES
(GÉNIE CIVIL)
SEPTEMBRE 2010

UNIVERSITÉ DE MONTRÉAL

ÉCOLE POLYTECHNIQUE DE MONTRÉAL

Ce mémoire intitulé :

**DÉVELOPPEMENT D'UNE MÉTHODE RESPIROMÉTRIQUE VISANT À
MESURER L'ACTIVITÉ BIOLOGIQUE SUR DU CHARBON ACTIF EN
POUDRE**

Présenté par : RAEV Kamen Pavlov

en vue de l'obtention du diplôme de : Maîtrise ès sciences appliquées

a été dûment accepté par le jury d'examen constitué de :

M. COMEAU Yves, Ph.D., président

M. BARBEAU Benoit, Ph.D., membre et directeur de recherche

Mme PRÉVOST Michèle, Ph.D., membre

à Maya

REMERCIEMENTS

Premièrement, je tiens à remercier Benoit Barbeau, mon directeur d'étude, pour m'avoir donné ce projet vraiment intéressant. Je le remercie pour ses diverses idées, ses conseils pertinents, sa patience et tranquillité, et surtout pour la possibilité d'avoir travaillé avec lui. Merci aussi aux partenaires de la Chaire pour leur soutien financier qui a permis la réalisation de ce projet.

J'aimerais dire un grand merci aussi au personnel de la Chaire, qui m'aidait tout au long de projet, à Yves et Mireille pour l'échantillonnage, à Jacinthe, Julie, Mélanie et Marcellin pour les analyses laboratoires, à Annie et Romain pour le développement du protocole expérimental.

Je voudrais également remercier Ara, Pierre-Olivier, Sébastien pour toutes leurs connaissances qu'ils ont partagées avec moi. Je voudrais saluer et les compagnons de la maîtrise dont j'ai un grand plaisir à connaître Élise, Clément, Arash, Simon, Natasha, Anne-Sophie, Cindy, Isabelle, Murielle, Amélie.

Je tiens à exprimer mes remerciements à Majdala, Marc-André, Abdellah et Ignacio avec lesquels j'ai eu de nombreuses discussions pertinentes. Merci à Mélanie et spécialement à Denis pour les conseils et les analyses effectuées.

Finalement, un grand merci à ma famille et ma femme Maya. Je n'aurais jamais été ce que je suis aujourd'hui sans leur soutenance dédiée. Je vous aime fort! Merci pour tout.

RÉSUMÉ

Le couplage des procédés membranaires basse pression (microfiltration et ultrafiltration) et du charbon actif en poudre (CAP), appelé procédé hybride, est actuellement en plein développement dans le domaine du traitement de l'eau potable. Alors que les membranes permettent la séparation du charbon et la pollution particulaire de l'eau traitée, le CAP est utilisé pour l'élimination de la matière organique dissoute, sous la forme de carbone organique biodégradable et aussi pour l'enlèvement des traces de composés toxiques (pesticides).

Pour mieux connaître les processus de biodégradation du substrat dans le réacteur hybride, une estimation de la croissance et l'abondance bactérienne est nécessaire. À ce jour, il existe plusieurs méthodes pour caractériser la biomasse sur de charbon actif en grains (CAG), mais aucune méthode pour le cas de CAP. Cependant, la respirométrie, une méthode très couramment utilisée dans le domaine des eaux usées, pourrait être une alternative intéressante : simple et peu coûteuse.

Le présent projet porte sur l'application de la méthode de respirométrie dans le cas de charbon actif en poudre (CAP) utilisé en mode biologique. Les buts principaux étaient de caractériser l'activité bactérienne et quantifier la biomasse hétérotrophe aérobie (Z_{BH}) colonisant la surface du charbon actif en poudre.

Du charbon de trois sources différentes a été testé à l'aide de respiromètre Challenge AER-200, soit du CAP de 25 et 200 μm (CAP-laboratoire) et du CAB (CAG-Ste Rose) colonisés au laboratoire à l'extrait de levure, soit du CAP de 25 μm (CAP-Opaline) provenant du pilote biomembrane Opaline-B de l'usine Ste Rose colonisé de façon naturelle avec de l'eau décantée ozonée.

Les observations microscopiques au BacLighttm de CAP-laboratoire ont montré que le charbon de 25 μm possédait plus de biomasse par champ microscopique que celui de 200 μm ce qui n'était pas démontré par les résultats expérimentaux de respirométrie. De plus, la comparaison entre les valeurs de Z_{BH} pour 3 et 6 g du même diamètre de CAP a montré que la masse de 3 g possédait des concentrations de biomasse supérieures à celles de 6 g ce qui n'était pas en accord avec les attentes. Cependant, le CAP-laboratoire des deux diamètres était plus colonisé que le CAP-Opaline. Quant au CAG-Ste Rose colonisé au laboratoire pendant une semaine avec

d'extrait de levure, il était plus colonisé que le CAP-Opaline mais moins que le CAP colonisé au laboratoire.

Suite aux résultats expérimentaux, il a été constaté que l'augmentation de la masse du CAP par bouteille augmentait le taux d'adsorption d'oxygène par le charbon et diminuait le taux de respiration bactérienne. On a constaté également que l'autoclavage dégazait la solution saline et décrochait une partie de la biomasse de la surface du charbon ce qui augmentait le taux d'adsorption d'oxygène. Suite au développement de la méthode, l'autoclavage et la solution saline furent successivement remplacés par de l'azide de sodium (1g/L) et de l'eau de robinet déchlorée respectivement. L'extrait de levure a été retenu comme la meilleure source de carbone puisqu'elle possédait, au sein d'un seul produit, le carbone, l'azote, le phosphore ainsi que les autres micronutriments nécessaires à la croissance des microorganismes.

Concernant la méthode de régression linéaire utilisée pour quantifier la biomasse colonisant le charbon, on a constaté qu'elle dépendait du temps de latence, le type du substrat et la masse de CA.

Finalement, il a été constaté que le respiromètre Challenge AER-200 ne mesurait que la consommation bactérienne à long terme d'un essai de respirométrie, c'est-à-dire qu'il ne tenait pas compte de l'activité bactérienne à court terme (pendant les premiers quelques heures). Alors, l'utilisation d'une sonde mesurant la concentration d'OD en continu (en court terme) a finalement été privilégiée pour un essai de respirométrie.

ABSTRACT

Integration of low pressure membrane processes (microfiltration and ultrafiltration) and powdered activated carbon (PAC), termed as the hybrid process, is currently under development in the field of drinking water treatment. While membranes allow the separation of PAC and particulate matter from treated water, the PAC is used for the removal of dissolved organic matter in the form of biodegradable organic carbon and also to remove traces of organic compounds (pesticides).

To learn more about the process of biodegradation of substrate in hybrid membrane reactors, an estimate of bacterial activity and abundance is needed. Up to now, there are several methods to characterize the biomass on activated carbon (GAC), but no method applies to the case of PAC. However, respirometry, a method commonly used in the field of wastewater could be an interesting alternative due to its simplicity and low cost.

This project involves the application of respirometry to the case of biological powdered activated carbon (PAC). The main aims were to characterize the biological activity and quantify heterotrophic aerobic biomass (Z_{BH}) colonizing the surface of activated carbon powder.

Activated carbons from three different sources were tested using respirometer Challenge AER-200, PAC 25 and 200 μm (PAC-laboratory) and BAC (GAC-Ste Rose WTP) colonized in the laboratory using yeast extract, or PAC 25 μm (PAC-Opaline) from the biomembrane pilot *Opaline*-B (located at the Ste Rose treatment plant) colonized naturally with settled-ozonated water.

The microscopic observations of BacLighttm PAC-laboratory showed that coal 25 μm had more biomass per microscopic field than 200 μm which was also demonstrated by the experimental results of respirometry. In addition, the comparison between the values of Z_{BH} using 3 or 6 g of the same diameter of PAC have shown that the mass of 6 g had biomass concentrations higher than 3 g, which was consistent with expectations. However, PAC-laboratory of the two diameters were more colonized than the PAC-Opaline. As for the GAC-Ste Rose colonized in the laboratory for one week with yeast extract, it was more colonized than the PAC-Opaline but less than the PAC colonized in the laboratory.

Following the experimental results, it was found that increasing the mass of PAC per bottle increased the rate of adsorption of oxygen by PAC and decreased the rate of bacterial respiration. We also found that autoclaving degas the saline solution and detached a portion of the biomass of the surface of PAC which further increased the rate of adsorption of oxygen. Following the development of the method, autoclaving and saline solution were successively replaced by sodium azide (1g/L) and dechlorinated tap water respectively. The yeast was chosen as the best carbon substrate since it had, within a single product, carbon, nitrogen, phosphorus and other micronutrients required for microorganisms growth.

The linear regression method used to quantify biomass colonizing the coal was found to depend on the lag phase, the type of substrate and the mass of PAC.

Finally, it was found that the Challenge AER-200 respirometer only measured bacterial consumption in the long term (above 6 hr), that is to say, it did not consider the short term bacterial activity (during the first few hours). Therefore, using a probe measuring the concentration of dissolved oxygen (DO) in continuous in the short term (less than 6 hr) has finally been privileged to the use of the Challenge AER-200.

TABLE DES MATIÈRES

DÉDICACE	III
REMERCIEMENTS.....	IV
RÉSUMÉ	V
ABSTRACT	VII
TABLE DES MATIÈRES	IX
LISTE DES TABLEAUX.....	XII
LISTE DES FIGURES	XIII
LISTE DES ANNEXES	XIII
LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS	XVII
CHAPITRE 1. INTRODUCTION.....	1
1.1 Problématique	1
1.2 Mise en contexte du projet.....	2
1.3 Structure du rapport	2
CHAPITRE 2. REVUE DE LITTÉRATURE	3
2.1 Colonisation du charbon actif par le biofilm	3
2.2 Méthode de respirométrie	4
2.2.1 Principe de la méthode de respirométrie.....	4
2.2.2 Historique de l'application de la méthode de respirométrie dans le domaine des eaux usées	7
2.2.2.1 La respirométrie au début	7
2.2.2.2 Développement des respiromètres et la méthode de respirométrie	8
2.2.2.3 La respirométrie et les constantes cinétiques.....	11
2.2.2.4 Influence des bactéries nitrifiantes et les protozoaires	12
2.2.2.5 Développement de la respirométrie pendant les dernières vingtaines d'années..	13
2.3 Mesure de la biomasse sur du CA.....	18
2.3.1 Application de la méthode de respirométrie pour le cas de CA	18
2.3.2 Autres méthodes d'évaluation de la biomasse hétérotrophe sur du CA	20
CHAPITRE 3. OBJECTIFS ET HYPOTHÈSES DE RECHERCHE.....	23
CHAPITRE 4. MATÉRIEL ET MÉTHODES	25
4.1 Colonisation du CAP	25

4.1.1 CAP colonisés au laboratoire.....	25
4.1.1.1 Procédure de colonisation du CAP.....	25
4.1.1.2 Observation du CAP par microscopie en épifluorescence	27
4.1.2 CAP colonisés sur le pilote Opaline-B	27
4.2 Description des méthodes respirométriques	28
4.2.1 Procédures générales	28
4.2.1.1 Récupération du CAP par filtration.....	28
4.2.1.2 Préparation de l'eau d'ensemencement pour les essais respirométriques	29
4.2.1.3 Préparation des témoins.....	30
4.2.1.4 Choix de la concentration et du type de substrat.....	30
4.2.2 Utilisation du respiromètre Challenge AER-200.....	31
4.2.2.1 Principe de fonctionnement.....	31
4.2.2.2 Mode opératoire.....	33
4.2.3 Respiromètre avec mesure de l'oxygène dissous en continu	34
CHAPITRE 5. PRÉSENTATION DES RÉSULTATS	36
5.1 Essais de respirométrie avec du CAP colonisé au laboratoire.....	36
5.1.1 Observation qualitative du degré de colonisation par microscopie en épifluorescence (BacLighttm)	37
5.1.2 Choix de la concentration optimale de substrat	39
5.1.3 Variation du pH lors d'un essai de respirométrie	42
5.1.4 Choix de la masse optimale du CAP.....	43
5.1.5 Choix de la vitesse d'agitation optimale.....	45
5.1.6 Détermination de la concentration de la biomasse hétérotrophe aérobie (Z_{BH}) pour les deux diamètres de CAP.....	47
5.2 Essais de respirométrie avec de CAP du pilote Opaline-B.....	49
5.2.1 Définition des conditions d'incubation pour les échantillons témoins	49
5.2.2 Choix de la masse optimale de CAP-Opaline.....	52
5.2.3 Impacts de la masse sur la détermination de la concentration de biomasse hétérotrophe active.....	53
5.2.4 Impact de la source de carbone.....	55
5.2.5 Essais de respirométrie en bouteille fermée.....	56

5.3 Essais avec du CAG colonisé au laboratoire	59
CHAPITRE 6. DISCUSSION	61
6.1 Choix de témoin.....	61
6.2 Impact de l'agitation pour les essais avec le respiromètre AER-200	61
6.3 Impact de la concentration du substrat.....	63
6.4 Impact du type de substrat	63
6.5 Respiromètre en bouteille fermée vs respiromètre Challenge AER-200.....	64
6.6 Paramètres influençant la méthode de Wentzel et al. (1995).....	65
6.7 Masse optimale du charbon	66
6.8 Comparaison des CAP de 25 et 200 μm	66
6.9 Comparaison entre CAP-laboratoire, CAP-Opaline et CAG-Sainte Rose	68
6.10 Comparaison des résultats de la méthode de régression linéaire avec ceux de la littérature.....	69
CHAPITRE 7. CONCLUSION	73
RÉFÉRENCES	75
ANNEXES	84

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 2-1 Comparaison de différentes méthodes de quantification de la biomasse sur le charbon actif.....	22
Tableau 4-1 Différentes conditions testées lors de l'essai	30
Tableau 5-1 Mesures de l'oxygène dissous et de la consommation d'oxygène pour quatre différentes vitesses d'agitation.....	46
Tableau 6-1 Valeurs de Z_{BH} des essais réalisés avec le respiromètre AER-200 et la sonde d'OD68	
Tableau 9-1 Tests de mesure du pH dans chaque bouteille lors d'un essai de respirométrie.....	86
Tableau 9-2 Z_{BH} du CAP-laboratoire de 25 μm pour deux masses différentes	87
Tableau 9-3 Z_{BH} du CAP-laboratoire de 200 μm pour deux masses différentes	88
Tableau 9-4 Valeurs de Z_{BH} , la pente et l'ordonné à l'origine pour l'essai du 29 janvier 2009 avec du CAP-Opaline	92
Tableau 9-5 Valeurs de Z_{BH} , la pente et l'ordonné à l'origine pour l'essai du 10 février 2009 avec du CAP-Opaline.....	93
Tableau 9-6 Valeurs de Z_{BH} , la pente et l'ordonné à l'origine pour les trois types de substrats testés.....	94
Tableau 9-7 Valeurs de Z_{BH} , la pente et l'ordonné à l'origine pour les essais réalisés avec la sonde d'OD.....	95

LISTE DES FIGURES

Figure 2-1 Surface d'une particule de CA	3
Figure 2-2 Taux d'utilisation d'oxygène en fonction du temps (a); Régression linéaire du TUO en fonction du temps (b)	6
Figure 4-1 Réacteurs d'ensemencement de 25 μm (gauche) et 200 μm (droite).....	26
Figure 4-2 Les deux réacteurs du pilote Opaline-B situé à l'usine Sainte Rose.....	28
Figure 4-3 Respiromètre Challenge AER-200.....	31
Figure 4-4 Cellule mesurant le flux	32
Figure 4-5 Trappe de KOH.....	32
Figure 4-6 Sonde d'oxygène dissous	34
Figure 4-7 Montage de la sonde d'OD	34
Figure 5-1 CAP-laboratoire de 25 μm coloré au BacLight™	37
Figure 5-2 CAP-laboratoire de 25 μm coloré au BacLight™	38
Figure 5-3 CAP-laboratoire de 200 μm coloré au BacLight™	38
Figure 5-4 CAP-laboratoire de 200 μm coloré au BacLight™	39
Figure 5-5 Taux d'utilisation de l'oxygène (TUO) pour le CAP de 25 μm avec des différentes concentrations (en mg C/L) d'extrait de levure en fonction du temps	40
Figure 5-6 Taux d'utilisation de l'oxygène (TUO) pour le CAP de 200 μm avec des différentes concentrations (en mg C/L) d'extrait de levure en fonction du temps	41
Figure 5-7 Consommation d'oxygène en fonction du temps pour l'essai avec une forte dose d'extrait de levure : a) CAP-laboratoire de 25 μm ; b) CAP-laboratoire de 200 μm	41
Figure 5-8 TUO en en fonction du temps pour le : a) CAP-laboratoire de 25 μm ; b) CAP-laboratoire de 200 μm	44
Figure 5-9 TUO en fonction du temps pour le CAP de 25 μm avec des différentes vitesses d'agitation	46
Figure 5-10 Variation de la concentration de la biomasse hétérotrophe aérobie (Z_{BH}) en fonction des dates des essais de : a) 3g de CAP-laboratoire de 25 et 200 μm ; b) 6g de CAP-laboratoire de 25 et 200 μm	48
Figure 5-11 Consommation d'oxygène en fonction du temps pour les différents types de témoins testés dans le cas du CAP-Opaline.....	52
Figure 5-12 Consommation normalisée en fonction du temps pour du CAP-Opaline	52

Figure 5-13 Courbes de TUO en fonction de temps : a) essai de 29 janvier 2009; b) essai de 10 février 2009.....	53
Figure 5-14 Z_{BH} normalisée en fonction de la masse sèche de CAP déterminée par la méthode de régression linéaire lors de choix de la masse optimale de CAP-Opaline pour : a) l'essai de 29 janvier 2009; b) l'essai de 10 février 2009	54
Figure 5-15 TUO en fonction du temps pour les trois types de substrat : extrait de levure, acétate et glucose	55
Figure 5-16 Z_{BH} normalisée en fonction du temps pour les trois types de substrat : extrait de levure, acétate et glucose	56
Figure 5-17 Consommation d'oxygène (a) et TUO (b) en fonction du temps pour tous les essais avec la sonde d'OD.....	57
Figure 5-18 Consommation d'oxygène des témoins en fonction du temps pour tous les essais avec la sonde d'OD.....	58
Figure 5-19 Z_{BH} normalisée en fonction de la masse sèche de CAP par bouteille pour les essais avec la sonde d'OD.....	59
Figure 5-20 TUO en fonction du temps du CAG provenant de l'usine Ste Rose et colonisé au laboratoire à l'extrait de levure	60
Figure 9-1 TUO en fonction de temps pour 3 g (masse humide) de CAP-laboratoire de : a) 25 μm ; b) 200 μm avec des différentes doses d'extrait de levure – première série d'essais.....	85
Figure 9-2 TUO en fonction de temps pour 3 g (masse humide) de CAP-laboratoire de : a) 25 μm ; b) 200 μm avec des différentes doses d'extrait de levure – deuxième série d'essais.....	85
Figure 9-3 TUO en fonction de temps pour 3 g (masse humide) de CAP-laboratoire de : a) 25 μm ; b) 200 μm avec des différentes doses d'extrait de levure – troisième série d'essais	85
Figure 9-4 Consommation d'oxygène en fonction de temps pour le CAP de : a) 25 μm ; b) 200 μm avec des différentes doses d'extrait de levure en mg C/L – première série d'essais.....	86
Figure 9-5 : Consommation d'oxygène en fonction de temps pour le CAP de : a) 25 μm ; b) 200 μm avec des différentes doses d'extrait de levure en mg C/L – deuxième série d'essais	86
Figure 9-6 Consommation d'oxygène en fonction de temps pour le CAP de : a) 25 μm ; b) 200 μm avec des différentes doses d'extrait de levure en mg C/L – troisième série d'essais	87

Figure 9-7 Consommation d'oxygène en fonction de temps pour le CAP de : a) 25 μm ; b) 200 μm avec des différentes doses d'extrait de levure en mg C/L – quatrième série d'essais.....	87
Figure 9-8 TUO en fonction de temps pour les essais de : a) le 16 juin 2009 – 25 μm ; b) le 17 juin 2009 – 200 μm	91
Figure 9-9 TUO en fonction de temps pour les essais de : a) le 22 juin 2009 – 25 μm ; b) le 23 juin 2009 – 200 μm	91
Figure 9-10 : TUO en fonction de temps pour les essais de : a) le 26 juin 2009 – 25 μm ; b) le 29 juin 2009 – 200 μm	92
Figure 9-11 TUO en fonction de temps pour les essais du 21 juillet 2009: a) 25 μm ; b) 200 μm	92
Figure 9-12 TUO en fonction de temps pour les essais du 23 juillet 2009: a) 25 μm ; b) 200 μm	93

LISTE DES ANNEXES

Annexe I : Coloration au BacLight.....	84
Annexe II : Choix de la concentration optimale pour les deux diamètres de CAP-laboratoire.....	85
Annexe III : Variation du pH lors d'un essai de respirométrie.....	88
Annexe IV : Concentrations des la biomasse hétérotrophe aérobie des deux diamètres de CAP-laboratoire déterminées à l'aide de la méthode de régression linéaire	89
Annexe V : Z_{BH} normalisée des essais avec du CAP-Opaline du 29 janvier au 10 février 2009 ..	94
Annexe VI : Z_{BH} normalisée de l'essai avec trois sources de substrat	96
Annexe VII : Z_{BH} normalisée des essais avec du CAP-Opaline avec la sonde d'OD	97

LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS

ASM	Activated Sludge Model
ATP	Adénosine Triphosphate
BH	Biomasse Hétérotrophe
BHAA	Bactéries Hétérotrophes Aérobie et Anaérobies
CA	Charbon Actif
CAG	Charbon Actif en Grains
CAGB	Carbone Actif en Grains Biologique
CAP	Charbon Actif en Poudre
CDT	Comptes directs totaux
CREDEAU	Centre de Recherche, validation et Développement des technologies et procédés de traitement des eaux
DBO	Demande Biochimique en Oxygène
DCO	Demande Chimique en Oxygène
DCOb	Demande Chimique en Oxygène biodégradable
DCOfb	Demande Chimique en Oxygène facilement biodégradable
DCOl _b	Demande Chimique en Oxygène lentement biodégradable
DCOr _b	Demande Chimique en Oxygène rapidement biodégradable
DCOi	Demande Chimique en Oxygène inorganique
DMP	Dinitrophenylhydrazine
ERD	Eau de Robinet Déchlorée
INT	p-Iodonitrotetrazolium Violet, 2-(4-Iodophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-phenyl-2H- tetrazolium chloride
MVES	Matière Volatile En Suspension
OD	Oxygène Dissous
PNP	p-Nitrophénole
RPB	Respiration Potentielle de la Biomasse
S	Substrat
TTO	Taux de Transfert d'Oxygène
TUO	Taux d'Utilisation d'Oxygène

TU_{\max}	Taux d'Utilisation d'Oxygène maximal
X	Biomasse
ΔOD	Consommation d'Oxygène Dissous

CHAPITRE 1. INTRODUCTION

1.1 Problématique

L'utilisation du charbon actif en poudre (CAP) en mode biologique a récemment émergé comme une solution de traitement potentiel pour le traitement des eaux potables. Il s'agit d'un procédé en développement qui consiste à coupler des membranes à basse pression et du CAP. Les membranes d'ultra ou microfiltration servent alors à séparer le CAP de l'eau traitée en plus d'assurer la réduction des autres matières en suspension. Le couplage du CAP et des membranes est typiquement appelé procédé membranaire hybride.

Pour mieux contrôler la biodégradation dans un procédé hybride, une estimation de l'activité bactérienne est nécessaire. À ce jour, il existe de nombreuses méthodes pour quantifier la biomasse hétérotrophe aérobie sur la surface du CAG - comptes microscopiques directs totaux en épifluorescence (CDT), bactéries hétérotrophes aérobies et anaérobies (BHAA), adénosine triphosphate (ATP), extraction des phospholipides, glucose radioactif, réduction de l'INT, etc. Par contre, aucune méthode n'a encore été proposée pour le cas de CAP en mode biologique utilisé dans un procédé hybride. Or, la respirométrie, une méthode couramment utilisée dans le domaine des eaux usées, nous apparaît comme une alternative intéressante – simple et peu coûteuse. En effet, les méthodes citées pour le cas du CAG ne sont, pour la plupart, pas applicables pour le cas de CAP pour les raisons suivantes : (i) les méthodes de CDT et BHAA exigent un détachement de la biomasse de la surface du charbon, ce qui représente un processus difficile à mettre en œuvre; (ii) la méthode d'ATP est limitée par une forte adsorption de l'ATP sur la surface du CAP; (iii) la méthode des phospholipides mesure les phospholipides de tous les organismes dans l'échantillon – bactéries aérobies et anaérobies, des organismes supérieurs (protozoaires); (iv) la méthode de glucose radioactif exige des manipulations avec des composés radioactifs ce qui cause plusieurs problèmes tels que l'élimination des déchets, l'approvisionnement en matériel radioactif, le coût de celui-ci et les mesures de sécurité liées à son utilisation; (v) la méthode de l'INT dépend de l'état physiologique de la biomasse ce qui donne des résultats hétérogènes quand la biomasse est en croissance exponentielle. La respirométrie ne nécessite pas de décrochage de la biomasse, est peu influencée par la respiration des organismes supérieures, ne nécessite pas de matériel radioactif. Le présent projet est donc

plutôt orienté vers le développement d'une méthode de mesure de l'activité hétérotrophe sur du CAP biologique.

1.2 Mise en contexte du projet

Pour déterminer si le CAP du procédé membranaire hybride fonctionne bel et bien en mode biologique, la méthode de respirométrie utilisée dans le domaine des eaux usées a été adaptée pour le cas de CAP. De plus, la respirométrie a été comparée pour estimer la concentration de la biomasse hétérotrophe aérobie colonisant la surface du CAP provenant soit d'un pilote situé au laboratoire du CREDEAU (Polytechnique), soit du pilote biomembrane Opaline situé à l'usine Ste Rose (Laval, QC).

1.3 Structure du rapport

La première partie de ce rapport présente une brève introduction. La deuxième partie présente la revue de littérature qui consiste en trois sections. La première section explique la formation et la nature du biofilm formé sur la surface du CA. La deuxième section introduit le principe de la méthode de respirométrie, la méthodologie d'estimation de la biomasse par la méthode de Wentzel et al. (1995) ainsi qu'une revue historique du développement de la méthode de respirométrie dans le domaine des eaux usées. La dernière section de la revue de la littérature décrit l'application de la méthode de respirométrie dans le cas de CAG et fait une synthèse et une critique des autres méthodes applicables pour le cas de CAG. Le troisième chapitre du rapport présente les objectifs et les hypothèses de recherche. La méthodologie, les appareils et les produits chimiques utilisés au cours du projet sont introduits dans le quatrième chapitre. Les résultats sont présentés dans le cinquième chapitre du rapport. Les parties discussion et conclusions sont finalement présentées dans les sixième et septième sections du rapport, respectivement.

CHAPITRE 2. REVUE DE LITTÉRATURE

Cette revue de littérature a pour but d'évaluer la possibilité d'application de la méthode de respirométrie utilisée pour quantifier la biomasse vivante surtout dans le domaine des eaux usées pour le cas de CAP utilisé en mode biologique dans le domaine de purification des eaux potables. Dans un premier temps, la formation du biofilm sur la surface de charbon actif (CA) est explicitée. Ensuite, le principe de la méthode de respirométrie et son évolution historique dans le domaine des eaux usées sont présentés. Finalement, l'application de la méthode pour le cas du CA est présentée et discutée par rapport aux autres méthodes existantes pour quantifier l'activité biologique sur du CA.

2.1 Colonisation du charbon actif par le biofilm

Si on ajoute du charbon actif en grains (CAG) ou CAP dans une eau naturelle bien aérée en présence de substrat, après une certaine période de temps on verra au microscope à l'aide d'une méthode appropriée que la surface des particules est couverte avec un biofilm (figure 2-1) puisque le CA est un excellent support pour la croissance bactérienne. La biodégradation de

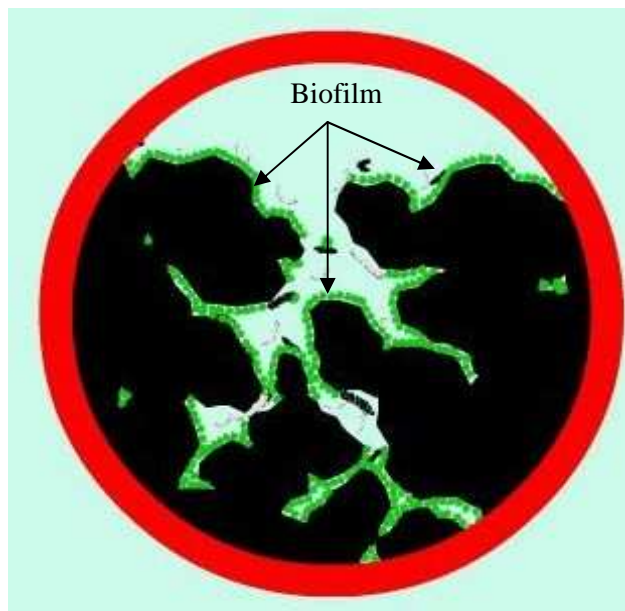


Figure 2-1. Surface d'une particule de CA

<http://www.dynavive.eu/TrtClassiques/Purification/Anim/AnimPURI.html>

composés présents dans la phase liquide est possible grâce à la formation de ce biofilm. Dans la pratique du traitement des eaux, on tire avantage du développement de ces biofilms sur la surface du CA qui se développent dans les nombreuses microfissures à la surface des particules de charbon et se nourrissent de la matière organique dissoute, de minéraux et d'autres micro-organismes présents dans la phase liquide. De plus, il a été abondamment démontré que l'activité biologique régénère biologiquement la capacité des particules de charbon d'adsorber la matière organique naturelle (de Jonge et al. 1996a; Orshansky et Narkis, 1997; Ivancev-Tumbas et al. 1998; Silva et al.

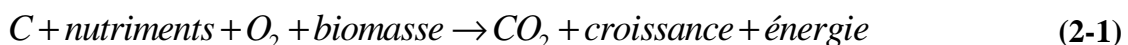
2004; Syamsiah et Hadi, 2004; Lee et Lim, 2005; Aktas et Çeçen, 2007).

À ce jour, le CA en mode biologique s'utilise surtout dans les filtres de charbon actif en grains opérés en mode biologique. Le charbon actif en poudre en mode biologique a été très peu étudié (Dallaire, 2009). La biocolonisation du charbon actif dans un filtre biologique est un processus relativement long et qui peut se prolonger jusqu'à 6 mois dépendamment des conditions du milieu (Seredynska-Sobecka et al. 2006). Le rôle du charbon actif dans les filtres biologiques est d'éliminer par adsorption (si une activité résiduelle d'adsorption est présente) la fraction du polluant non biodégradable et par biodégradation la matière organique et l'azote ammoniacal qui n'ont pas pu être éliminés par les premières étapes de traitement (Servais et al. 1991, 1992; Zhang & Huck, 1996, Stephenson et al. 2002). La biodégradation de matière organique et la nitrification s'accompagnent toutes deux de consommation d'oxygène, ce qui supporte le concept qu'on puisse utiliser la respirométrie pour évaluer les activités bactériennes hétérotrophe (carbone) et autotrophe (azote ammoniacal) présentes sur du CA.

2.2 Méthode de respirométrie

2.2.1 Principe de la méthode de respirométrie

Le principe de la respirométrie s'appuie sur l'équation (2-1) décrivant la réaction biochimique liée à l'activité respiratoire aérobie de la biomasse. Il est important de noter qu'on pose alors l'hypothèse que la biomasse anaérobie présente dans le biofilm participe peu à la performance globale de biodégradation. Cependant, l'influence de la biomasse nitrifiante doit être éliminée par l'ajout d'inhibiteur de nitrification.



Si dans un milieu aqueux on ajoute un substrat carboné en présence de bactéries aérobies, ces dernières vont consommer le substrat en utilisant l'oxygène présent nécessaire pour le processus de biodégradation du substrat, tel que décrit à l'équation (2-1). Donc, la quantité d'oxygène consommé sera fonction, entre autres choses, de la concentration de biomasse hétérotrophe active présente dans l'échantillon. Alors, à partir des données de la consommation d'oxygène en fonctions du temps, la concentration de la biomasse hétérotrophe aérobie peut être déterminée.

Pour un essai de respirométrie (en absence de bactéries nitrifiantes), le taux de croissance de la biomasse hétérotrophe aérobie dépendra des concentrations de deux fractions de la DCO, soit DCO_{rb} (demande chimique en oxygène rapidement biodégradable) et DCO_{lb} (demande chimique en oxygène lentement biodégradable) (Wentzel et al. 1995) :

$$\frac{dZ_{BH}}{dt} = \text{croissance}(DCO_{rb}) + \text{croissance}(DCO_{lb}) - \text{mort bactérienne}$$

Ou bien :

$$\frac{dZ_{BH}}{dt} = \mu_H \times \frac{S_{rb}}{K_{SH} + S_{rb}} \times Z_{BH} + K_{MP} \times \frac{S_{sb} / Z_{BH}}{K_{SP} + S_{sb} / Z_{BH}} \times Z_{BH} - b_H \times Z_{BH} \quad (2-2)$$

Où : Z_{BH} – concentration de la biomasse hétérotrophe aérobie, (mg DCO/L);

Croissance (DCO_{rb}) – croissance de la biomasse grâce à la présence de DCO_{rb};

Croissance (DCO_{lb}) – croissance de la biomasse grâce à la présence de DCO_{lb};

S_{rb} – concentration de DCO_{rb}, (mg DCO/L);

K_{SH} – constante de demi-saturation de DCO_{rb}, soit 5 mg DCO/L;

S_{sb} - concentration de DCO_{lb}, (mg DCO/L);

K_{SP} – constant de demi-saturation de DCO_{lb}, soit 0,027 mg DCO/mg DCO;

K_{MP} – taux de croissance hétérotrophe spécifique maximal de DCO_{lb}, (d⁻¹).

On peut supposer que pendant les premières quelques heures de l'essai, où la concentration de DCO_{rb} n'est pas encore épuisée et le TUO monte de façon exponentielle, $S_{rb} \gg K_{SH}$ et $S_{lb}/Z_{BH} \gg K_{SP}$. Alors, on aura, selon Wentzel et al. (1995) :

$$\frac{dZ_{BH}}{dt} = (\mu_H + K_{MP} - b_H) \times Z_{BH} \quad (2-3)$$

Où $(\mu_H + K_{MP} - b_H)$ représente le taux spécifique de croissance net, (d⁻¹).

Après l'intégration de l'équation précédente, on obtient:

$$Z_{BH(t)} = Z_{BH(0)} \times e^{(\mu_H + K_{MP} - b_H) \times t / 24} \quad (2-4)$$

Alors, pour le TUO(t) qui est fonction de la concentration de la biomasse hétérotrophe aérobie au temps t ($Z_{BH(t)}$) et, le taux spécifique de croissance net, on conclut que : (Wentzel et al. 1995) :

$$OUR_{(t)} = \frac{1-Y}{Y} \times (\mu_H + K_{MP}) \times Z_{BH(t)} / 24 \quad (2-5)$$

Où Y est le rendement hétérotrophe exprimé en mg DCO/mg DCO.

En remplaçant le $Z_{BH(t)}$ de l'équation (2-4) dans l'équation (2-5), on obtient :

$$\ln OUR_{(t)} = \ln \left[\underbrace{\frac{1-Y}{Y} \times (\mu_H + K_{MP}) \times Z_{BH(t)} / 24}_A \right] + \underbrace{(\mu_H + K_{MP}) \times t / 24}_B \quad (2-6)$$

L'équation (2-6) représente une équation de droite (figure 2-2b) avec une ordonnée à l'origine A et pente B. Cette droite est observée après la transformation des valeurs du TUO (figure 2-2a) en $\ln TUO$ en fonction du temps (figure 2-2b).

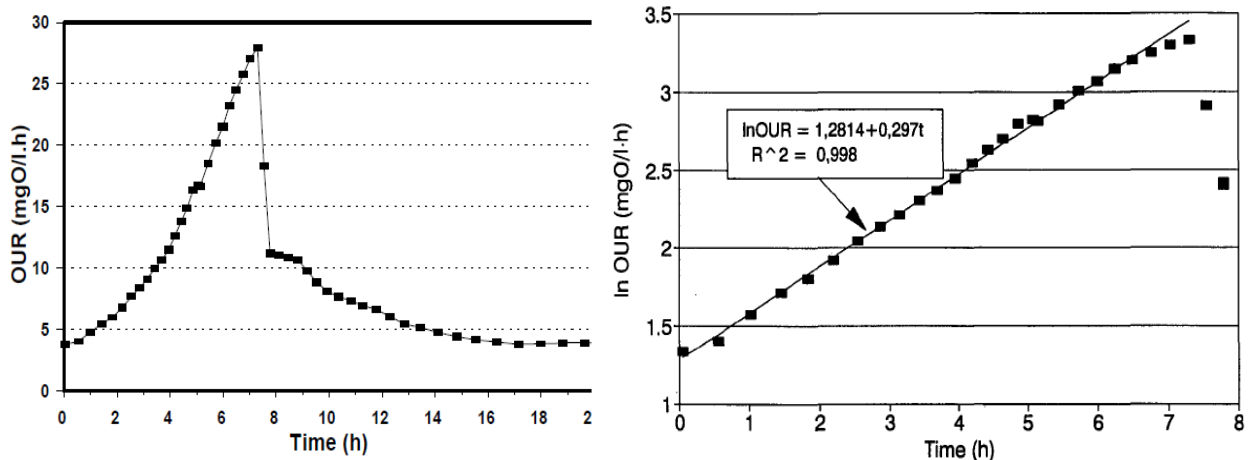


Figure 2-2. Taux d'utilisation d'oxygène en fonction du temps (a); Régression linéaire du TUO en fonction du temps (b), (Wentzel et al. 1995).

La pente et l'ordonnée à l'origine du graphique sur la figure 2-2b sont par la suite utilisées dans l'équation (2-7) (de l'équation (2-6) en isolant Z_{BH}) pour calculer la quantité de la biomasse hétérotrophe initialement présente dans l'échantillon.

$$Z_{BH} \left[\frac{\text{mg DCO}}{L} \right] = \frac{e^{(\text{ordonnée à l'origine})} \times 24}{\frac{1-Y}{Y} \times (\text{pente} \times 24 + b_H)} \quad (2-7)$$

La valeur utilisée du taux de mortalité de la biomasse hétérotrophe (b_H) est celle citée par Wentzel et al. (1995), soit $0,62 \text{ d}^{-1}$. La valeur du rendement de la biomasse hétérotrophe (Y_{BH}) habituellement utilisé en eaux usées est de $0,66 \text{ mg DCO/mg DCO}$ (Wentzel et al. 1995) mais ne s'appliquerait pas aux bactéries provenant des biofiltres en eau potable (Dallaire, 2009). Alors, les valeurs de $0,6 \text{ mg DCO/mg DCO}$ pour l'extrait de levure (Hurst, 1992) et $0,56 \text{ mg DCO/mg DCO}$ pour le glucose et l'acétate (Metcalf and Eddy, 2003) seraient plus appropriées et ont donc été utilisées dans le cadre de ce projet.

2.2.2 Historique de l'application de la méthode de respirométrie dans le domaine des eaux usées

2.2.2.1 La respirométrie au début

La *manométrie* est une des premières techniques de respirométrie utilisées pendant les années 1900, laquelle était utilisée pour mesurer la respiration des cultures bactériennes (Mahendraker et Viraraghavan, 1995). En effet, il s'agit d'une mesure du changement de la pression d'un gaz dans un volume fermé. Néanmoins, à cette époque, la faible sensibilité de la méthode de manométrie ne favorise pas son application dans le domaine des eaux usées (Arthur, 1985). Cependant, la sensibilité des appareils augmente au cours des années et la méthode commence à être utilisée surtout dans le domaine des eaux usées où, pour la première fois, elle est appliquée par Warburg en 1921 (respiromètre de Warburg) et Sierp en 1928 (Jenkins, 1960). En effet, la méthode est préférée à la DBO_5 puisque, contrairement à cette dernière, elle donne plusieurs valeurs de la consommation d'oxygène en fonction de temps (Mahendraker et Viraraghavan, 1995).

Un peu plus tard, Wooldridge et Standfast (1936) constatent à l'aide du modèle amélioré de manomètre différentiel de Barcraft que le CO_2 résultant de la respiration bactérienne est le seul

gaz qui est produit en conditions aérobies. De plus, les auteurs observent que la durée d'un essai de respirométrie est beaucoup plus courte que celle de la DBO₅. Selon eux, cela se doit à la méthodologie de l'essai. En réalité, l'apport d'oxygène en continu dans le cas de la respirométrie diminue la durée d'un essai par rapport à des essais de DBO₅ où la concentration de l'OD diminue avec le temps, ce qui prolonge la durée (Mahendraker et Viraraghavan, 1995).

2.2.2.2 Développement des respiromètres et la méthode de respirométrie

Plusieurs problèmes fondamentaux dans le domaine de la respirométrie sont cités pour la période avant 1960. Ainsi, les petits volumes des réacteurs diminuent le volume de l'échantillon qui peut être testé, les problèmes d'apport en oxygène et le défi de détecter des petits changements de volume et pression lors des essais sont significatifs. Les travaux qui suivent cette période (Arthur, 1964, 1968, 1979a, b; Abson et al., 1967; Young et al., 1965; Mytelka et Brenner, 1970) ont pour but de résoudre ces problèmes.

Avec le temps, les respiromètres deviennent semi – automatiques, avec un apport d'oxygène en continu et des volumes de réacteurs beaucoup plus grands (quelques litres). À cette époque, les respiromètres les plus souvent utilisés sont : (i) le respiromètre « on-line » d'Arthur, (ii) le respiromètre de Simcar et (iii) le respiromètre électronique (Mahendraker et Viraraghavan, 1995).

Arthur (1964) est le premier qui développe la respirométrie pour des analyses de routine des eaux usées et la mesure de la DBO₅. Il utilise un respiromètre automatique afin de mesurer la DBO des eaux usées contenant une culture pure de *Pseudomonas fluorescens*. Lors de ses essais, une pause bien définie dans la courbe après avoir atteint le taux d'absorption maximale est observée, ce qui indique la fin d'étape exogène de la courbe de croissance décrite par Monod (1949). Abson et al. (1967) construisent le respiromètre automatique de Simcar. À l'aide de cet appareil, il est comparé pour la première fois l'impact d'un mélange de différents substrats comme l'acétate, le glucose et le phénol. Les auteurs constatent que la courbe du TUO est séparée en plusieurs courbes correspondant aux substrats utilisés. De plus, chaque courbe possède un pic correspondant au moment où le substrat est épuisé. Il est à noter que le même phénomène était observé lors de l'essai avec trois types de substrat – acétate, extrait de levure, glucose (section 5.2.4).

Bridie (1969) construit le respiromètre électronique pour tester la biodégradabilité des eaux usées contenant du phénol et aussi pour des analyses routines de la DBO₅. Avec le respiromètre électronique, il démontre (pour un essai de 2 jours) 72 % de dégradation du phénol présent dans les eaux usées testées avec une concentration initiale de phénol de 25 mg/L à 30 °C. (Mahendraker et Viraraghavan, 1995).

Le respiromètre électronique développé par Young et Baumann (1976a,b) permet de déterminer la quantité d'oxygène consommé dans l'échantillon avant le début de l'essai en incluant un processus de ré-oxygénation par électrolyse produisant la même quantité d'oxygène que celle qui est consommée par la culture bactérienne dans l'échantillon. Le principe de l'appareil est simple: les bactéries consomment de l'oxygène ce qui diminue la pression au-dessus du liquide et provoque un signal qui déclenche le processus d'électrolyse produisant une quantité d'oxygène égale à celle qui est consommée. Cependant, les auteurs constatent que l'agitation influence le TUO. Ils suggèrent une augmentation de la vitesse d'agitation afin d'augmenter le taux de transfert d'oxygène dans l'échantillon.

Le respiromètre de Tebbutt et Berkun (1976) est le premier capable d'accepter plus d'un seul échantillon (dans ce cas six). De plus, l'appareil permet une visualisation des résultats de la consommation d'oxygène en temps réel ce qui marque une nouvelle étape dans le domaine de la respirométrie. De plus, Tebbutt et Berkun sont les premiers qui commencent à tenir compte de la concentration de CO₂ dans l'échantillon comme un facteur majeur influençant le taux d'utilisation d'oxygène TUO (Mahendraker et Viraraghavan, 1995).

La méthode de respirométrie d'Arthur et al. (1979 b) est utilisée pour la première fois en 1979 afin de déterminer en échelle réelle les paramètres de conception nécessaires pour le traitement d'eaux usées domestiques et celles provenant d'une conserverie (Eden, Wisconsin). La durée des essais varie de 6 heures à presque deux jours, dépendamment de la source des eaux usées. Les résultats du TUO sont ensuite utilisés lors de la conception du réacteur aérobique et les ventilateurs de la station d'épuration.

Après l'application avec succès des résultats des essais respirométriques d'Arthur et al. (1979a,b), la méthode commence à être utilisée à échelle réelle. De plus, elle devient une technique simple et rapide pour caractériser la biodégradabilité des différents composés

organiques contenues dans les eaux usées de différentes sources (Madden et Tittlebaum, 1984, Therien et al., 1984). Cependant, il est important de noter que la respirométrie est principalement utilisée pour caractériser la biodégradabilité des substrats et non pour mesurer la biomasse initiale présente dans les échantillons, bien qu'on puisse le faire, tel que décrit à la section précédente (2.2.1).

Huang et al. (1985) détermine que l'activité bactérienne peut être présentée par le taux de consommation d'oxygène pour le cas des solutions aqueuses et de composés purs. De plus, selon eux, l'activité bactérienne déterminée par la méthode respirométrique est supérieure à celle trouvée avec d'autres méthodes comme le compte direct total, car une certaine partie de l'activité respiratoire est apportée par les cellules non viables encore actives. De plus, les auteurs constatent que le taux de respiration des bactéries non viables encore actives augmente avec l'augmentation du temps de rétention. Cependant, ils notent que la perte de la capacité de multiplication n'est pas nécessairement associée à une perte de l'activité biochimique, voici pourquoi la viabilité déterminée par l'activité respiratoire représenterait de façon plus réaliste l'activité des microorganismes (Mahendraker et Viraraghavan, 1995).

Ros et al. (1988b) qui déterminent la DBO des solutions aqueuses et des eaux usées à l'aide d'un respiromètre ouvert constatent que les résultats de la méthode respirométrique sont semblables à ceux de la méthode standard de DBO. Par contre, ils mettent en évidence l'inapplicabilité de la méthode de respirométrie dans les cas où la concentration de DBO est inférieure de 30 mg/L. Les auteurs constatent que le TUO de l'affluent d'un bassin complètement mélangé est dix fois supérieur que celui de l'effluent. En effet, le TUO de l'affluent est dû à la respiration exogène, tandis que le TUO de l'effluent est dû à la consommation du substrat stocké dans les cellules, c'est-à-dire la respiration endogène. Edwards et Sherrard (1982) observent la variation de la respiration endogène des boues à la sortie du bassin d'aération avec les changements de la charge organique de l'affluent. Ils constatent qu'avec le temps, le taux de la respiration endogène diminue et devient constant dans l'effluent du bassin d'aération. Selon eux, le taux de consommation d'oxygène spécifique ($\text{mg O}_2/\text{g MVES}\cdot\text{h}$) est un paramètre qui ne peut pas être utilisé pour la caractérisation de l'activité microbienne dans le cas des stations à boues activées à cause de ses fluctuations (Mahendraker et Viraraghavan, 1995).

Patoczka et al. (1989) constatent qu'il existe parfois des difficultés lors de l'interprétation des résultats de respirométrie ce qui se doit à la présence des composés biodégradables dans l'eau (phénol par exemple) qui présents dans une concentration non toxique stimulent la consommation d'oxygène sans l'enlèvement du substrat (Mahendraker et Viraraghavan, 1995).

2.2.2.3 La respirométrie et les constantes cinétiques

Au cours du temps, avec le développement de la méthode de respirométrie et l'augmentation de son degré de précision, les chercheurs commencent à déterminer des paramètres cinétiques (μ , μ_{\max} , K_s , K_i) décrivant le processus de biodégradation à l'aide de la méthode respirométrique. Certaines méthodologies sont développées pour cet objectif – celles de Gaudy et al. (1988a); Brown et al. (1990); Ros et al. (1988a); Cech et al. (1985). Brown et al. (1990) développe un protocole afin de déterminer les constantes biocinétiques de la biodégradation de certains composés organiques – phénol, m – crésol, 4-CP, 2,4 DMP, etc. Dans ce but, ils utilisent un inoculum à partir des eaux usées, et un flux contenant une variété de composés synthétiques afin de maintenir une diversité des microorganismes. Les auteurs considèrent que l'influence de la respiration endogène et la mortalité bactérienne est non significatif et que la concentration de biomasse dans le réacteur peut être considérée comme augmentant à un taux de premier ordre. Lors des essais, l'effet dans l'utilisation du substrat par les microorganismes est suivi par le TUO jusqu'au moment où il réalise un pic qui représente l'épuisement du substrat tel que décrit par la cinétique de Monod. Pour des mesures plus précises, le ratio entre le substrat initial et la biomasse présente dans l'échantillon doit être assez grand afin de permettre aux cellules de changer son état physiologique jusqu'à ce qu'il corresponde à leur taux de croissance maximal. Les auteurs constatent qu'on peut tirer le même profit du graphique du TUO en fonction du TUO cumulatif que de celui de la concentration de la biomasse en fonction du temps, ce qui permet aux auteurs la détermination des constantes cinétiques μ , K_s et K_I (Mahendraker et Viraraghavan, 1995).

Ros et al. (1988a) propose une méthodologie pour le design du bassin d'aération basée sur les mesures de TUO. Ils soulignent l'importance de la méthode respirométrique et formulent les règles suivantes qui doivent être respectés lors d'un essai de respirométrie (Mahendraker et Viraraghavan, 1995): (i) les bactéries dans l'échantillon doivent être capables de consommer le substrat, si non la biomasse doit être enrichie avant le début de l'essai; (ii) l'élimination de

substrat doit commencer immédiatement après l'étape d'ensemencement; (iii) un échantillon de respirométrie doit être libre de protozoaires et bactéries nitrifiantes, c'est-à-dire qu'il devrait y avoir juste la biomasse hétérotrophe et le substrat qui contribuent à la consommation d'oxygène; (iv) les valeurs initiales de C pour le substrat et la biomasse doivent être déterminées précisément.

Cech et al. (1985) réalisent des essais de respirométrie avec un respiromètre qui nécessite une ré-oxygénation de réacteur quand la concentration d'OD diminue de 6-8 mg/L à 2 mg/L. Malgré les inconvénients, ils déterminent avec succès les taux de consommation endogène et exogène utilisés pour le calcul des paramètres biocinétiques de la biomasse (Mahendraker et Viraraghavan, 1995).

Spanjers et Vanrolleghem (1995) développent à l'aide de la méthode de respirométrie une procédure pour déterminer les paramètres biocinétiques des processus autotrophes et hétérotrophes pour un faible ratio S/X. Selon les résultats, pour un mélange donné d'eau usée/boue activée, le ratio S/X joue un rôle important lors de la détermination des paramètres biocinétiques. Alors qu'un faible ratio ne permet pas la détermination de certains paramètres, un fort ratio inhibe la nitrification. Selon les auteurs, la méthode de respirométrie représente un outil commode pour la caractérisation des eaux usées et boues activées de différentes origines. Dans le même axe, Spanjers et al. (1996) approfondirent le sujet en classifiant différentes stratégies de contrôle respirométrique des systèmes des boues activées.

2.2.2.4 Influence des bactéries nitrifiantes et les protozoaires

Il est normal que lors d'un essai de respirométrie la consommation d'oxygène soit due à deux types de micro-organismes soit les hétérotrophes et les autotrophes. Ainsi, la consommation est la somme de la respiration carbonée (hétérotrophes) et la nitrification (autotrophes). Dépendamment du cas, on peut bloquer l'activité des nitrifiantes afin de mesurer juste les hétérotrophes. Pour ce besoin, différents inhibiteurs peuvent être utilisés. Par contre, un inhibiteur peut bloquer (en terme de consommation d'oxygène) pas juste les nitrifiante, mais aussi une certaine partie des hétérotrophes ce qui est apporté de King et Duka (1986) qui utilisent l'allyle-thio-urée à une concentration de 1000 mg/L. Young et Baumann (1976 b) utilisent plutôt le 2-chloro-6-trichlorométhyle pyridine pour des essais respirométriques de DBO. Selon ces

résultats, ce type d'inhibiteur ne bloque que les nitrifiantes. Cependant, il est à noter que le même inhibiteur de nitrification était utilisé dans le cadre de ce projet.

Les protozoaires représentent un autre grand problème dans le domaine de la respirométrie surtout pour des eaux usées provenant des stations d'épuration. Ils consomment de l'oxygène et en même temps se nourrissent avec la biomasse présente ce qui biaise les résultats expérimentaux (Mahendraker et Viraraghavan, 1995). Wiggins et al. (1987) constatent une diminution de la période d'acclimatation de la biomasse en utilisant de cycloheximide et nystatine comme inhibiteur de protozoaires. Selon ces résultats, les échantillons avec de protozoaires consomment de 5 % plus d'oxygène, tandis que ceux avec inhibiteur 30 % de moins par rapport à un essai standard de DBO₅.

2.2.2.5 Développement de la respirométrie pendant les dernières vingtaines d'années

En 1991, Young et al. construisent le premier respiromètre anaérobie qui peut être connecté à un ordinateur. Le principe de l'appareil est simple : il mesure la production de gaz résultant des processus anaérobies dans un volume fermé. Les données des essais peuvent être ensuite utilisées dans le but de comprendre les mécanismes des réactions anaérobies (Mahendraker et Viraraghavan, 1995).

Ros (1993) résume l'application de la méthode dans le domaine de traitement des eaux usées et les différentes méthodologies respirométriques utilisées lors de la conception des stations à boues activées. Il utilise la méthode des seuils et celle de la respirométrie afin de comparer les TUO de deux types d'eaux usées provenant de deux différents types d'industrie, soit l'industrie de synthèse organique et l'industrie chimique. Finalement, il recommande l'utilisation de la méthode de respirométrie puisqu'elle est simple et donne des résultats fiables (Mahendraker et Viraraghavan, 1995).

Arthur et Arthur (1994) travaillent au développement de la méthode de respirométrie de 1964 à 1994. Leurs travaux sont concentrés sur l'application de la méthode pour des analyses de DBO₅ et la relation toxicité-traitabilité des eaux usées. Ensuite les auteurs comparent en détails des résultats de l'application de la méthode pour différents sites d'échantillonnage. À la fin, ils font des prévisions pour le développement futur de la méthode en termes de l'évolution des appareils

et leur plus large application pour le contrôle des processus de traitement des eaux usées (Mahendrakar et Viraraghavan, 1995).

Orhon et al. (1996) utilisent la méthode de respirométrie, afin d'examiner l'effet du rendement hétérotrophe sur l'évaluation du facteur de correction pour la croissance anoxique pour un certain nombre d'eaux usées domestiques et industrielles. Les auteurs se servent de la cinétique de croissance hétérotrophe aérobie avec un facteur de correction pour des conditions anoxiques lors de la modélisation des réacteurs anoxiques utilisés pour la dénitrification des boues. Ils calculent le facteur de correction à partir des mesures de respirométrie en posant l'hypothèse que le rendement reste le même dans des conditions aérobies et anoxiques.

Cokgor et al. (1998) utilisent la méthode de respirométrie, afin d'évaluer le carbone organique dissous facilement biodégradable (DCOb) dans des eaux usées de différentes industries, ainsi que des eaux usées domestiques. Ils déterminent que le taux de DCOb de DCO total dépend de la source des eaux usées. Les résultats montrent que la portion de DCOb dans les eaux usées domestiques oscille autour de 13 % de la teneur de DCO, alors que dans les eaux usées d'origine industrielle (transformation de viande), elle peut aller jusqu'à 44 %. Les résultats expérimentaux indiquent que la fraction facilement biodégradable, la fraction lentement biodégradables et la fraction des inertes de la DCO par rapport à la DCO totale sont utiles pour la caractérisation de déchets solides industriels.

Guwy et al. (1998) mesurent l'évolution de l'oxygène résultant du processus de catalase de peroxyde d'hydrogène par la biomasse de cinq différents types de boues activées. Ils déterminent qu'il existe une bonne corrélation entre l'activité de la biomasse déterminée par la méthode de catalase et celle déterminée à l'aide de la méthode respirométrique pour les mêmes types de boues. Selon les auteurs, cette méthode devrait offrir une alternative simple et robuste à des mesures de TUO dans les usines de boues activées.

Vanrolleghem et al. (1999), Benes et al. (2002) utilisent la respirométrie pour l'étalonnage du modèle mathématique ASM1. Vanrolleghem et al. (1999) résument la popularité de la méthode respirométrique en présentant son impact historique et sa sensibilité. Ils donnent des exemples provenant d'applications pour illustrer les différentes méthodes existantes utilisées pour l'évaluation de la quasi-totalité ASM1. Les auteurs clarifient la différence entre les méthodes

directes (Spanjers et al., 1999) qui utilisent des calculs explicites et des méthodes d'optimisation qui nécessitent des algorithmes d'optimisation numérique. Selon les auteurs, la dernière approche est particulièrement utile pour extraire des multiples paramètres d'un simple essai de respirométrie. Enfin, il est souligné l'importance de la méthode de respirométrie lors de la mise en application des résultats expérimentaux du laboratoire vers l'échelle réelle.

Strotmann et al. (1999) utilisent la méthode de respirométrie pour la détermination du coefficient de rendement hétérotrophe des bactéries de boues activées. Selon les auteurs, le coefficient de rendement hétérotrophe est un paramètre important lors de la caractérisation de la cinétique de dégradation des eaux usées et des différents produits chimiques. Ils réalisent plusieurs essais de respirométrie avec des composés facilement biodégradables comme le glucose et l'acétate et par la suite transforment les résultats afin d'étudier la dégradation et la cinétique de respiration des micro-organismes pour des eaux usées municipales avec de différents ratios S/X. Selon les résultats, le coefficient de rendement hétérotrophe des bactéries de boues activées peut être déterminé à l'aide de la méthode de respirométrie. De plus, ils prouvent que le coefficient de rendement hétérotrophe est indépendant du ratio F/M sur une plus large gamme.

Mathieu et Etienne (2000) proposent une nouvelle méthode de respirométrie pour la détermination de la fraction facilement biodégradable (DCOb) et la fraction lentement biodégradable (DCOl_b) de DCO totale, ainsi que la biomasse active hétérotrophe présente dans des eaux usées et nécessaires à la modélisation et l'amélioration des procédés de traitement biologiques. La méthode présentée se base sur la combinaison des deux types d'essais soit à hauts et bas ratios S_0/X_0 . Alors que les faibles ratios sont réalisés par l'aération des eaux usées sans ajout des boues activées, les hauts ratios sont le résultat du même processus en présence des boues activées comprises. Selon les résultats concernant des stations d'épuration étudiées en France, la concentration de la biomasse hétérotrophe mesurée représente environ 23 % de la DCO totale ce qui est élevé par rapport aux données classiques. Alors que la DCOb varie entre 6 et 14 % de la DCO totale, la fraction hydrolysable est dans la gamme de 41 ± 66 %. Selon les auteurs, les résultats de la méthode proposée sont cohérents avec ceux de la méthode classique. Sur le même axe, Sperandio et al. (2001) développent une nouvelle méthode de respirométrie, afin de fractionner la DCO pour le cas des eaux usées collectées sur différentes stations d'épuration françaises. De la même façon, il est observé une grande variation surtout pour la

fraction DCO_b (soit de 1 à 16 % de la DCO totale) qui selon les auteurs se doit à des processus de biodégradation dans les égouts, ce qui change la composition des eaux usées avant leur entrée dans les stations d'épuration. Des résultats expérimentaux d'une des villes étudiées soutiennent l'hypothèse - les caractéristiques en terme de DCO des eaux usées collectées directement dans l'égout sont très différentes de celui des eaux usées qui atteint la station d'épuration. Les analyses montrent que la fraction DCO_b diminue de 75 mg/L à 15 mg/L.

Ziglio et al. (2001) développent une nouvelle technique de respirométrie pour la caractérisation de la fraction rapidement biodégradable DCO_{rb}. Selon les auteurs, la méthode est rapide (environ 30 min) et facile à appliquer par rapport des techniques conventionnelles qui nécessitent quelques heures. Avant l'application de la méthode, il faut qu'une courbe de calibration soit tracée. Pour y arriver, une biomasse bien aérée est mélangée avec une quantité connue d'acétate de sodium et ensuite le TUO est mesuré. La méthode consiste les étapes suivantes : (i) – mesure de la consommation d'oxygène ΔDO ; (ii) – multiplication de ΔDO par le volume de liqueur mixte cellulaire utilisé dans le test; (iii) – calculer la fraction de DCO_{rb} en fraction équivalente en acétate à l'aide de la courbe d'étalonnage; (iv) - estimation de la concentration de COD_{rb} en multipliant le volume de l'échantillon testé des eaux usées dans le réacteur.

Le travail d'Andreottola et al. (2002) est basé sur l'application d'une méthode directe pour mesurer la biomasse viable à l'aide des techniques de cytométrie en flux et la comparaison avec la fraction active obtenue à partir d'essais de respirométrie. Leurs courbes de TUO obtenues dans les tests aérobies sont proposées par certains auteurs (Kappeler et Gujer, 1992, Wentzel et al., 1998) comme une méthode indirecte pour estimer la fraction active.

Le même modèle de respiromètre utilisé lors de nos essais, soit *Challenge AER-200*, est utilisé par Moon et Young (2005) afin de déterminer les facteurs qui influencent le taux de transfert d'oxygène sur la frontière gaz/liquide. Ils déterminent que les résultats d'un essai de respirométrie sont satisfaisants si le taux de transfert d'oxygène (TTO) sur la limite gaz/liquide est supérieur au taux de respiration bactérienne de la biomasse dans l'échantillon. Plusieurs conditions sont testées dans le cadre de cette étude afin d'atteindre le TUO maximal. Les auteurs expliquent que pour un essai de respirométrie, le TUO_{max} est égal au TTO s'il y a des facteurs qui nuisent au transfert. Les résultats montrent qu'il existe certains facteurs qui influencent le TTO sur la limite gaz/liquide. Ce sont l'intensité de brassage, la longueur des barreaux

magnétiques, le volume de l'échantillon et la concentration d'oxygène dans la partie gazeuse (headspace) au-dessus du liquide. Les résultats montrent que le TUO_{max} augmente avec l'augmentation de la vitesse d'agitation et la longueur des barreaux magnétiques, et diminue avec l'augmentation du volume de l'échantillon. Selon les auteurs, leur modèle devrait être valable pour estimer les taux maximums de transfert d'oxygène pour pratiquement tous les respiromètres du type « headspace-gas ». Cependant, il est à noter que les mêmes conclusions étaient faites dans le cadre de notre projet (voir section 5).

Daebel et al. (2007) réalisent une série des essais respirométriques avec des boues activées ordinaires et des boues provenant d'un réacteur à membranes submergées. Le but des analyses est de déterminer la variabilité temporelle de la constante de demi-saturation des bactéries autotrophes ($K_{O,AUT}$) qui représente un paramètre du modèle ASM. Les valeurs sont estimées pour deux types de micro-organismes soit ammonium oxydant et nitrites oxydants. Les auteurs constatent que $K_{O,AUT}$ représente un paramètre variable dans le temps et qui doit être considéré en conséquence. Munz et al. (2008) utilisent la méthode de respirométrie et le modèle ASM afin de caractériser des eaux usées de tanneries et une biomasse à l'âge de boues élevé provenant d'un bioréacteur à membranes submergées. Pour cet objectif, la DCO_b est fractionnée en quatre composantes soit, une fraction facilement biodégradable (DCOfb), soit une autre rapidement hydrolysable (DCOrb), soit lentement hydrolysable (DCOl_b) ou inorganique (DCOi). Selon les auteurs, la respirométrie est un outil flexible pour la caractérisation des eaux usées et la modélisation des boues activées. Par contre, lorsque des eaux usées industrielles sont concernées, il est important d'adopter des procédures appropriées pour les essais de respirométrie et le traitement des données. Les résultats respirométriques au niveau de DCO organique biodégradable montrent que dans le cas des eaux usées de tanneries au moins trois fractions, présentant une cinétique de biodégradation spécifique et les caractéristiques dimensionnelles, doivent être prises en compte.

Marsili-Libelli et al. (2008) développent le « single-stage respirometer » qui peut être utilisé pour des analyses de laboratoire des eaux usées ou directement sur site. Son fonctionnement est contrôlé par un logiciel en temps réel qui dirige les différentes procédures de mesure et l'estimation des caractéristiques des eaux usées. La mise en œuvre de laboratoire de l'instrument

est testée avec de substrat facilement biodégradable, ce qui donne des reprogrammes cohérentes et précises.

Avec le temps, la respirométrie est devenue un moyen très utile et peu coûteux pour évaluer la biodégradabilité des eaux usées de différente origine. Les données du TUO acquis lors des essais peuvent être ensuite utilisées pour la détermination des paramètres cinétiques nécessaires lors de la conception des stations d'épuration des eaux usées. Aujourd'hui, il existe plusieurs possibilités d'application de la respirométrie dans le domaine des eaux usées : analyses respirométriques des cultures aqueuses; analyses cinétiques des organismes anaérobies; prévision de la qualité de l'effluent; évaluation de l'impact de nouvelles eaux usées dans une station d'épuration existante; mesure de la DBO; simulation des différents procédés; détermination de la biodégradabilité des eaux usées contaminées avec divers contaminants; on-line contrôle des bassins de boues activées; détermination de la concentration critique du substrat ainsi que l'effet inhibitif de différents composés chimiques présents dans les eaux à traiter, etc. Cependant, la méthode de respirométrie peut être utilisée dans beaucoup plus de domaines. Un de ces domaines est celui de la purification des eaux ce qui sera un défi pendant les années suivantes.

2.3 Mesures de la biomasse sur du CA

2.3.1 Application de la méthode de respirométrie pour le cas de CA

La méthode respirométrique est également utilisée pour la surveillance de la biorégénération de charbon actif en grains biologique (CAGB) (Orshansky et Narkis, 1997; Ivancev-Tumbas et al., 1998). Ivancev-Tumbas et al. (1998) utilisent le respiromètre de Warburg pour évaluer l'activité microbienne sur des échantillons de charbon actif prélevés périodiquement des colonnes expérimentales au cours d'une expérience de biorégénération de CAGB alimenté avec du phénol. Lors de leur étude, les auteurs utilisent un modèle de traitement des eaux usées en accordant une attention particulière à l'exploitation à la biorégénération aérobie et la réutilisation du carbone biorégénéré dans une nouvelle phase de l'expérience. Les résultats montrent que le processus de biorégénération est beaucoup plus rapide pour un CAGB frais que pour celui utilisé plusieurs fois.

Urfer et Huck (2001) développent la méthode appelée *respiration potentielle de la biomasse* (RPB) dans le but de créer une procédure simple et rapide pour évaluer l'activité bactérienne

dans un filtre à charbon actif en grains. La méthode se base sur la mesure de la consommation de l'oxygène dissous nécessaire lors du procédé de biodégradation de la matière organique dans un échantillon contenant du charbon actif en grains biologique (CAGB). La méthode de RPB est semblable à celle de la demande biochimique en oxygène (DBO) couramment utilisée dans le domaine des eaux usées pour la détermination de l'activité bactérienne de la biomasse donnée dans un volume fermé. Néanmoins, les auteurs de cette étude sont les premiers à utiliser une approche de la méthode de respirométrie dans le domaine de la purification des eaux. La méthode est appliquée avec succès par Liang et al. (2003) dans le but de développer une approche systématique pour quantifier l'adsorption et la capacité de biodégradation sur charbon actif biologique (CAB). La procédure de la méthode de RPB consiste dans les étapes suivantes : (1) – prélever des échantillons de différentes profondeurs du filtre; (2) – peser les échantillons humides; (3) – déposer les échantillons dans les bouteilles de 300 ml; (4) – ajouter de l'eau; (5) – mesurer la concentration de l'oxygène dissous; (6) – ajouter de N (NaNO_3), P (K_2HPO_4), matière biodégradable (temps 0); (7) – remplir les bouteilles avec de l'eau; (8) – fermer les bouteilles avec des bouchons; (9) – placer les bouteilles sur la table agitatrice pendant 5 heures à la température de la pièce; (10) – mesure la concentration de l'oxygène dissous; (11) – calcule à l'activité de la biomasse en $\text{mg O}_2/\text{L}$ par cm^3 du filtre. Comme une source de carbone, les auteurs utilisent un mélange de l'acétate (CH_3COOH), du formate (HCOOH), du formaldéhyde (HCHO) et du glyoxale ($\text{C}_2\text{H}_2\text{O}_2$). Le ratio C : N : P utilisé est de 15:5:1 (w/w/w) pour mieux représenter les conditions dans un filtre à charbon actif en grains. La période d'incubation est de 5 heures, puisque ce temps permet à la biomasse dans les échantillons (1–8 g, masse humide) de consommer une quantité significative d'oxygène (0,2 – 4 $\text{mg O}_2/\text{L}$) pour réaliser les mesures. Les résultats sont calculés en consommation d'oxygène durant 5 heures par unité volume du filtre en $\text{mg O}_2/\text{L} \cdot \text{cm}^3$ du filtre soit de 1,94 $\text{mg O}_2/\text{L} \cdot \text{cm}^3$ sur la surface du filtre à 0,05 $\text{mg O}_2/\text{L} \cdot \text{cm}^3$ au fond du filtre (60 cm). Selon les auteurs, les résultats de la méthode peuvent être utilisés pour la caractérisation de différents types de biofiltres en terme du potentiel de la biomasse de dégrader la matière organique biodégradable présente dans les eaux à traitées.

Lee et Lim (2005) quantifient aussi le processus de biorégénération du CA par des mesures de TUO avec un respiromètre manométrique placé dans une chambre à température constante. Les auteurs comparent la consommation d'oxygène uniquement pour la biodégradation avec celle de l'adsorption simultanée et la biodégradation des phénols et d'alkyle-phénol substitué. La quantité

de substrats éliminée par la biodégradation est déterminée par la consommation d'oxygène et soustraite de la concentration du substrat initial pour calculer la quantité de substrat adsorbée par le charbon activé. La différence entre le chargement initial et final du carbone est posée comme la quantité biorégénérée.

Ng et al. (2009) appliquent la méthode de respirométrie afin de comparer et quantifier l'efficacité de biorégénération de CAP et des balles de riz pyrolysé chargées avec de p-nitrophénol (PNP) respectivement, par des mesures de la consommation d'oxygène en utilisant le TUO selon deux approches: (i) adsorption simultanée et la biodégradation et (ii) l'adsorption et la biodégradation séquentielle. Les auteurs constatent que la première approche est entravée par l'exigence de déterminer correctement le chargement initial de l'adsorbant. Cependant, la deuxième approche fournit une bonne estimation de la limite supérieure de l'efficacité de biorégénération de l'adsorbant chargé. Le respiromètre utilisé lors de cette étude est celui de la compagnie « Labsource » du model WTW System Oxitop Control qui mesure en continu la DBO de l'échantillon c'est-à-dire en absence d'un apport d'oxygène externe.

2.3.2 Autres méthodes d'évaluation de la biomasse hétérotrophe sur du CA

Évaluer la biomasse active sur du CA est un objectif d'intérêt puisqu'on suppose que les conditions maximisant l'activité biologique du CA devraient aussi permettre les meilleures performances des procédés biologiques, bien que cette relation de cause à effet ne soit pas toujours observée (Seredynska-Sobecka et al., 2006). Dallaire (2009) a synthétisé les méthodes ayant été utilisées jusqu'à maintenant pour évaluer le degré de colonisation du CA (tableau 2-1). Le tableau 2-1 résume les avantages et les désavantages de chacune des méthodes utilisées pour évaluer la biomasse sur du CA. En effet, les méthodes peuvent être divisées à deux groupes. Le premier groupe touche les méthodes qui mesurent la biomasse en quantifiant directement les bactéries, telles les méthodes de compte direct total (CDT), de compte des bactéries hétérotrophes aérobies et anaérobies (BHAA) et la méthode d'extraction des phospholipides. Le deuxième groupe regroupe les méthodes qui mesurent l'activité de la biomasse, soit les méthodes du glucose radioactif, de la réduction de l'INT. La méthode ATP est plutôt dans la catégorie des méthodes actives puisqu'elle mesure un composé retrouvé dans les cellules, mais la concentration de ce composé dans la cellule dépend de l'état physiologique celle-ci.

Cependant, les méthodes citées ci-dessus pour le cas du CAG ne sont pas applicables pour les cas de CAP. Par exemple, lorsque la méthode de CDT est utilisée pour quantifier la biomasse sur le CAG on rencontre des difficultés insurmontables au niveau du comptage des bactéries sur la surface des graines qui est en trois dimensions. Cependant, le développement d'un processus de détachement de la biomasse est complexe, car il faut tenir compte du pourcentage de détachement de la biomasse et de l'effet du traitement sur les cellules (lyse) pour obtenir une quantification précise de la biomasse présente sur le charbon (Magic-Knezev et Van der Kooij, 2004). De la même façon, il est impossible de réaliser la méthode de BHAA directement sur le charbon actif en grains puisqu'il faut préalablement détacher la biomasse de celui-ci avec les inconvénients que cela comporte. Quant à l'application de la méthode des phospholipides dans le cas du CAG, il est possible qu'une partie des phospholipides mesurés provienne d'organismes supérieurs (protozoaires) présents dans le biofiltre, ce qui surestimera (ou : faussera en les surestimant) les résultats expérimentaux. De son côté, la méthode du glucose radioactif est liée à l'utilisation des matériaux radioactifs, ce qui cause plusieurs problèmes tels que l'élimination des déchets, l'approvisionnement en matériel radioactif, le coût de celui-ci et l'adaptation de mesures de sécurité liées à leur utilisation, d'autant plus que certains laboratoires ne possèdent pas l'équipement, les possibilités de mesures de sécurité ni le personnel nécessaire à l'utilisation de matériel radioactif et ne peut donc pas utiliser cette méthode.

La méthode du INT est une méthode simple et efficace qui fonctionne très bien pour quantifier la biomasse sur un support (Dallaire, 2009). Cependant, la méthode dépend de l'état physiologique de la biomasse, de telle façon que dans une phase de croissance exponentielle, des résultats hétérogènes peuvent être observés et cela peut nuire à la reproductibilité des résultats.

Quant à la méthode ATP, il était constaté récemment de Dallaire (2009) que la méthode n'est pas applicable pour le cas de CA à cause d'une forte adsorption de l'ATP par la surface du charbon, ce qui fausse les résultats expérimentaux. Cependant, la méthode de respirométrie ne nécessite pas de décrochage de la biomasse, elle est peu influencée par la respiration des organismes supérieurs, ne nécessite pas de matériel radioactif, ce qui fait d'elle une excellente alternative dans le cas du CAP.

Tableau 2-1. Comparaison de différentes méthodes de quantification de la biomasse sur le charbon actif, (Dallaire, 2009).

Nom de la méthode	Avantages	Désavantages	Références
Compte Direct total	Permet de visualiser la colonisation sur le charbon	(i) impossible de dénombrer les bactéries sur le grain de charbon; (ii) nécessite le détachement de la biomasse	(Magic-Knezev et van der Kooij, 2004) (Hobbie, 1977)
Bactéries Hétérotrophes Aérobie et Anaérobies	(i) méthode relativement simple; (ii) requiert du matériel de laboratoire de base	(i) tient compte seulement des bactéries capables de se reproduire; (ii) nécessite le détachement de la biomasse	(Magic-Knezev et van der Kooij, 2004) (Stewart, 1990)
Adénosine Triphosphate	(i) bonne limite de détection; (ii) résultats corrélés avec BHAA et CDT	(i) sensibilité de la procédure d'extraction; (ii) dépend de l'état physiologique de la biomasse	(Magic-Knezev et van der Kooij, 2004) (Velten, 2007) (Deininger et Lee, 2001)
Extraction des phospholipides	(i) analyse directement sur le CAG; (ii) requiert du matériel de laboratoire de base	(i) méthode fastidieuse; (ii) ne mesure pas l'activité de la biomasse	(Seredynska-Sobecka et al. 2006) (Wang et al. 1995)
Glucose radioactif	(i) permet de mesurer la biomasse directement sur le CAG; (ii) mesure l'activité de la biomasse	(i) manipulation et élimination du matériel radioactif; (ii) utilisation du glucose libre	(Servais et Billen, 1991) (Servais et al. 1994)
Réduction du INT	(i) ne perturbe pas la biomasse; (ii) résultats corrélés avec ATP et consommation d'oxygène	Dépend de l'état physiologique de la biomasse	(Fonseca et al. 2001) (Kim et Koopman, 1994) (Blenkinsopp et Lock, 1989)

CHAPITRE 3. OBJECTIFS ET HYPOTHÈSES DE RECHERCHE

L'objectif général de cette recherche est de développer une méthode visant à quantifier la biomasse hétérotrophe active colonisant du charbon actif en poudre (CAP) à l'aide d'une méthode respirométrique, c.-à-d. basée sur la mesure de la consommation d'oxygène. Plus spécifiquement, il est proposé de :

1. Optimiser les conditions d'application d'une méthode respirométrique, c.-à-d. le type et la concentration de substrat, la masse de CAP et la vitesse d'agitation.

Hypothèse de recherche : La respirométrie est fonction des conditions d'application de la méthode. Les conditions optimales sont celles qui favorisent la répétabilité de la méthode et offrent des conditions d'incubation qui sont représentatives des conditions environnementales.

Cet objectif sera atteint en testant systématiquement l'impact de conditions d'incubation sur la biomasse hétérotrophe évaluée à l'aide de la technique de Wentzel et al. (1995) sur du CAP. Il s'agit d'une méthode couramment utilisée dans le domaine des eaux usées à l'aide de laquelle on peut déterminer la concentration de la biomasse hétérotrophe aérobie (Z_{BH}) dans un échantillon donné. La méthode transforme les données d'un essai de respirométrie exprimées sous forme de TUO en \ln TUO en fonction du temps. Ensuite, la pente et l'ordonnée à l'origine de la partie linéaire sont remplacées dans l'équation montrée précédemment (chapitre 2.2.1) afin de calculer la concentration de la biomasse hétérotrophe aérobie exprimée en mg DCO/L.

2. Comparer à l'aide de la respirométrie l'activité hétérotrophe pour des CAP de 25 et 200 μm .

Hypothèse de recherche : La surface de colonisation est plus importante pour du CAP de 25 μm que celui de 200 μm ce qui devrait favoriser le support d'une plus grande biomasse hétérotrophe.

Cet objectif sera atteint en colonisant au laboratoire deux CAP (25 et 200 μm) et en comparant par la suite les biomasses évaluées selon la technique de Wentzel et al. (1995).

3. Documenter l'activité de CAP colonisé au laboratoire, en pilote et d'un CAG provenant d'un filtre industriel de l'usine de Ste-Rose.

Hypothèse de recherche: L'activité de la biomasse provenant du laboratoire devrait être supérieure à celle du pilote Opaline-B et celle du CAG de Ste Rose.

Après une première série d'essais avec du CAP colonisé au laboratoire, la méthode de respirométrie sera appliquée pour le cas de CAP colonisé au sein du pilote Opaline-B et du CAG d'une installation à pleine échelle.

CHAPITRE 4. MATÉRIEL ET MÉTHODES

Pour appliquer la méthode de respirométrie dans le cas du charbon actif en poudre (CAP), sa surface devait être préalablement colonisée avec des bactéries hétérotrophes aérobies. Afin d'atteindre cet objectif, deux pilotes étaient mis en marche, soit le pilote au laboratoire avec deux différents diamètres du CAP, soit 25 et 200 μm (Pica Hydro LP22, à base de bois) (section 4.1.1) ou bien le pilote biomembrane de la chaire GRSNG en eau potable, situé dans l'usine de purification des eaux Sainte-Rose (section 4.1.2). Ensuite, la méthode respirométrique était utilisée afin de comparer l'activité bactérienne des deux différents diamètres du CAP colonisé au laboratoire (section 4.2). Par la suite, la méthode était appliquée pour déterminer l'activité bactérienne dans le cas du CAP de 25 μm provenant du pilote membranaire de la chaire. Le respiromètre utilisé lors des essais était du modèle Challenge AER-200 de la compagnie *Challenge Environmental Systems Inc.* (section 4.2.2).

4.1 Colonisation du CAP

4.1.1. CAP colonisé au laboratoire

4.1.1.1 Procédure de colonisation du CAP

La colonisation du CAP était réalisée dans deux réacteurs brassés et aérés en continu. Les réacteurs utilisés (figure 4-1) étaient constitués de deux cylindres en plastique, chacun avec un volume de 10 L dédié au CAP de 25 ou 200 μm . Les parois étaient couvertes avec du papier d'aluminium, afin d'éviter la pénétration de la lumière. Dans chaque des deux réacteurs, le volume occupé par le mélange CAP – eau était de 8 L pour une concentration de CAP de 60 g/L en masse sèche ou 182 et 162 g/L exprimée en masse humide, respectivement pour le CAP de 25 μm et 200 μm . Le pH dans les deux réacteurs était maintenu à 7,70 par des ajustements quotidiens à l'aide d'une solution basique (10N NaOH), afin de soutenir les meilleures conditions pour les bactéries nitrifiantes. La température des deux réacteurs était la température des laboratoires, soit environ 22-23 °C.

L'extrait de levure (du type BD Bactotm Yeast Extract) a été utilisé comme source de carbone organique dissous biodégradable (COD_b), azote, phosphore et des microéléments traces comme le Zn, Mn, Fe, Cu, Al, nécessaires pour la croissance de la biomasse bactérienne. Une solution mère utilisée pour l'ensemencement des réacteurs avec une concentration de 20 g/L était préparée

avec de l'eau Mili-Q et par la suite, autoclave à 121 °C pendant 15 min dans des bouteilles de polypropylène d'un litre. Les bouteilles stériles avec la solution d'extrait de levure étaient ensuite entreposées à 4 °C. Chaque semaine, 400 ml d'une la solution mère d'extrait de levure autoclavé (~57 mg C/g CAP sec/semaine) était ajoutée dans les réacteurs.



Figure 4-1. Réacteurs d'ensemencement de 25 µm (gauche) et 200 µm (droite).

Pour conserver un volume stable de 8 L, un volume de 400 ml de chacun des deux réacteurs était filtré et le filtrat était éliminé avant chaque ajout d'extrait de levure. Les deux réacteurs étaient agités en permanence à une vitesse de 60 rpm. L'aération des réacteurs était fournie par un diffuseur poreux.

Lors des essais de respirométrie, une certaine masse de CAP devait être prélevée des réacteurs. Afin de garder constante la concentration de CAP dans les deux réacteurs après chaque prélèvement, la masse sèche de CAP requise pour les essais était compensée par l'ajout d'une masse équivalente. Les ratios sec/humide nécessaires pour calculer la masse de CAP sec à ajouter

pour les deux diamètres ont été déterminés au début des essais, soit 0,3 ([SDEV=0,01], p=3) et 0,34 ([SDEV=0], p=3) respectivement pour le CAP de 25 et 200 μm .

4.1.1.2 Observation du CAP par microscopie en épifluorescence

Afin de déterminer qualitativement le degré de colonisation des CAP de 25 et 200 μm , une observation microscopique a été réalisée deux mois après le début de l'ensemencement. À cette fin, 1 ml d'échantillon de chacun des CAP ont été dilués et puis mélangés avec 3 μl de *BacLight[™]*, un marqueur qui permet de distinguer les bactéries dont l'intégrité de la membrane cellulaire est intacte (vertes fluorescentes) ou compromise (rouges fluorescents). Les échantillons furent incubés au noir pendant 15 minutes. Par la suite, le mélange était filtré sur un filtre noir de porosité de 0,22 μm du modèle GTBP à la compagnie *Millipore*. Le filtre était ensuite déposé sur une lame et observé à l'aide d'un microscope à épifluorescence à l'aide d'un grossissement de 1000X. La procédure détaillée de la mise en œuvre de la méthode de marquage est présentée à l'Annexe I. Les photos du CAP colonisé sont présentées au chapitre 5.1.1.

4.1.2 CAP colonisé sur le pilote Opaline-B

Alors que le CAP des deux diamètres (25 et 200 μm) était colonisé au laboratoire avec des fortes doses d'extrait de levure, celui du pilote de la chaire situé à l'usine Sainte-Rose était colonisé de façon naturelle. Le pilote (figure 4-2) était composé de deux bioréacteurs membranaires (procédé commercialisé sous le nom de OpalineB[®]) alimentés en parallèle à partir d'eau décantée ozonée. Les modules de fibres creuses Puron en polyéthersulphone étaient installés en configuration immergée et aérés de manière à maintenir le CAP en suspension et minimiser le colmatage des membranes.



Figure 4-2. Les deux réacteurs du pilote Opaline-B situé à l'usine Sainte-Rose

Les deux bioréacteurs ont été opérés sur une période continue de 100 jours avec une concentration de 20 g/L de CAP PicahydroLP39 (25 μm) et des flux de filtration de 15, 30 et 45 L/m²*h. Pendant la période de suivi des essais, la température de l'eau alimentant les bioréacteurs a varié de 10 à 25⁰C. Chaque réacteur possède un volume de 172 L d'eau (180 L avec les membranes).

4.2 Description des méthodes respirométriques

4.2.1 Procédures générales

4.2.1.1 Récupération du CAP par filtration

Avant le début de chaque essai, le CAP était filtré à l'aide de filtres du type *Whatman 40* avec une porosité de 8 μm . Un volume de 35 ml CAP était prélevé avec une pipette stérile à des portions et filtré sous vide. À trois reprises, le CAP était rincé avec une solution stérile de NaCl (0,085 % m/v) afin d'enlever les traces de nutriments et les bactéries libres présentes dans l'eau interstitielle. Une fois le CAP filtré et rincé, la masse désirée du CAP était pesée dans des coupelles d'aluminium et ensuite transférée dans des tubes stériles jetables de 50 ml remplis avec

15 ml de la solution saline stérile. Le contenu de ces tubes stériles était transféré dans les réacteurs tout juste avant le démarrage d'un essai de respirométrie.

Comme les CAP humides de 25 et 200 μm ont des densités humides différentes parce qu'ils ne retiennent pas les mêmes quantités d'eau lors de la filtration, une détermination des ratios CAP sec/CAP humide était réalisée en triplicata avant le début de chaque filtration afin de déterminer les masses réelles pesées des deux types de charbon. Trois coupelles d'aluminium avec des masses humides d'environ 1 g pour les deux diamètres étaient placées dans un four à 105 $^{\circ}\text{C}$ pendant au moins 12 heures. Les masses du CAP avant et après le séchage ont été ensuite utilisées pour le calcul des ratios sec/humide.

4.2.1.2 Préparation de l'eau d'ensemencement pour les essais respirométriques

Lors des essais de respirométrie, la solution de NaCl de 0,085 % (w/v) utilisée pour le lavage du CAP a aussi été initialement utilisée comme eau de dilution pour la mise en suspension du CAP dans les réacteurs de respirométrie.

Pour chaque essai de respirométrie, la solution de NaCl était préparée avec de l'eau Milli-Q et son pH était ajusté à 7,5-8,0. Après la correction de pH, la solution de l'eau saline était stérilisée par autoclavage à 121 $^{\circ}\text{C}$ pendant 15 min. Par la suite, les bouteilles étaient entreposées dans la chambre froide à 4 $^{\circ}\text{C}$ avant le début de l'essai. L'eau saline stérile était réchauffée à la température ambiante avant son utilisation pour un essai de respirométrie.

Dans un deuxième temps, l'utilisation d'eau autoclave a été abandonnée au profit de l'utilisation de l'eau du robinet déchlorée (ERD). Cette solution s'est avérée plus performante, car la procédure d'autoclavage dégaze en partie l'oxygène dissous et décroche une partie de la biomasse de la surface du CAP, ce qui induit alors une consommation abiotique d'oxygène au début des essais de respirométrie afin de permettre une mise en équilibre des échantillons.

Pour la préparation de l'eau de robinet, un récipient en plastique propre était rempli avec de l'eau de robinet et ensuite mis en aération pendant au moins 24 heures avant le début de l'essai. Le but de l'aération était d'enlever le chlore résiduel de l'eau qui pourrait inactiver la biomasse dans les échantillons. Pendant tout le temps, la chaudière était couverte avec un papier d'aluminium afin d'éviter une re-contamination l'eau.

4.2.1.3 Préparation des témoins

Dans le cas des témoins, deux stratégies d'inhibition de l'activité biologique furent testées. Dans un premier temps, le CAP a été inactivé par autoclavage. Tel que discuté précédemment, l'autoclavage s'est avéré problématique en raison du dégazage de l'eau et du décrochage de la biomasse de la surface du charbon qu'il induit dans les échantillons. Une portion des essais ont donc plutôt été réalisés en utilisant l'azide de sodium (1 g NaN_3/L) pour inhiber l'activité hétérotrophe.

Le tableau suivant résume les conditions d'essai qui ont été testées pour optimiser le choix des conditions témoins. Tous ces essais ont été réalisés en ajoutant 1 g de CAP dans 600 ml, 500 ppm C d'extrait de levure et l'inhibiteur de nitrification.

Tableau 4-1. Différentes conditions testées lors de l'essai

Série	Solutions d'ensemencement	Inhibition de l'activité hétérotrophe
I		Aucun CAP
II	Eau du robinet	CAP colonisé
III	déchlorée par aération 24 h	CAP autoclavé
IV		CAP + NaN_3
V	Eau saline stérile	CAP colonisé
VI		CAP autoclavé

4.2.1.4 Choix de la concentration et du type de substrat

Trois différents types de substrat ont été testés comme source de carbone – soit l'extrait de levure, l'acétate de sodium et le glucose. Le ratio visé entre les éléments C, N, et P dans les échantillons était respectivement de 100 : 10 : 1 ou bien 500 mg C/L : 50 mg N/L : 5 mg P/L. L'ajout d'azote et de phosphore était obtenu à l'aide de NH_4Cl et de KH_2PO_4 , respectivement. Dans le cas de l'extrait de levure, il a été posé que le ratio C : N : P était déjà optimal.

Après l'ajout des différents volumes des solutions dans les échantillons, les bouteilles étaient remplies jusqu'à un volume de 500 ml avec de l'eau de robinet déchlorée et aérée. Par la suite, les masses du CAP préalablement pesées étaient distribuées dans chaque bouteille. Après la dilution des solutions ajoutées dans les bouteilles, le pH était ajusté dans la plage de 7,5 à 8.0 à l'aide d'une solution de NaOH (1N).

4.2.2 Utilisation du respiromètre Challenge AER-200

4.2.2.1 Principe de fonctionnement

Le respiromètre Challenge AER-200 (figure 4-3) de la compagnie « *Challenge Environmental Systems inc.* » a été utilisé lors de la majorité des essais de respirométrie.

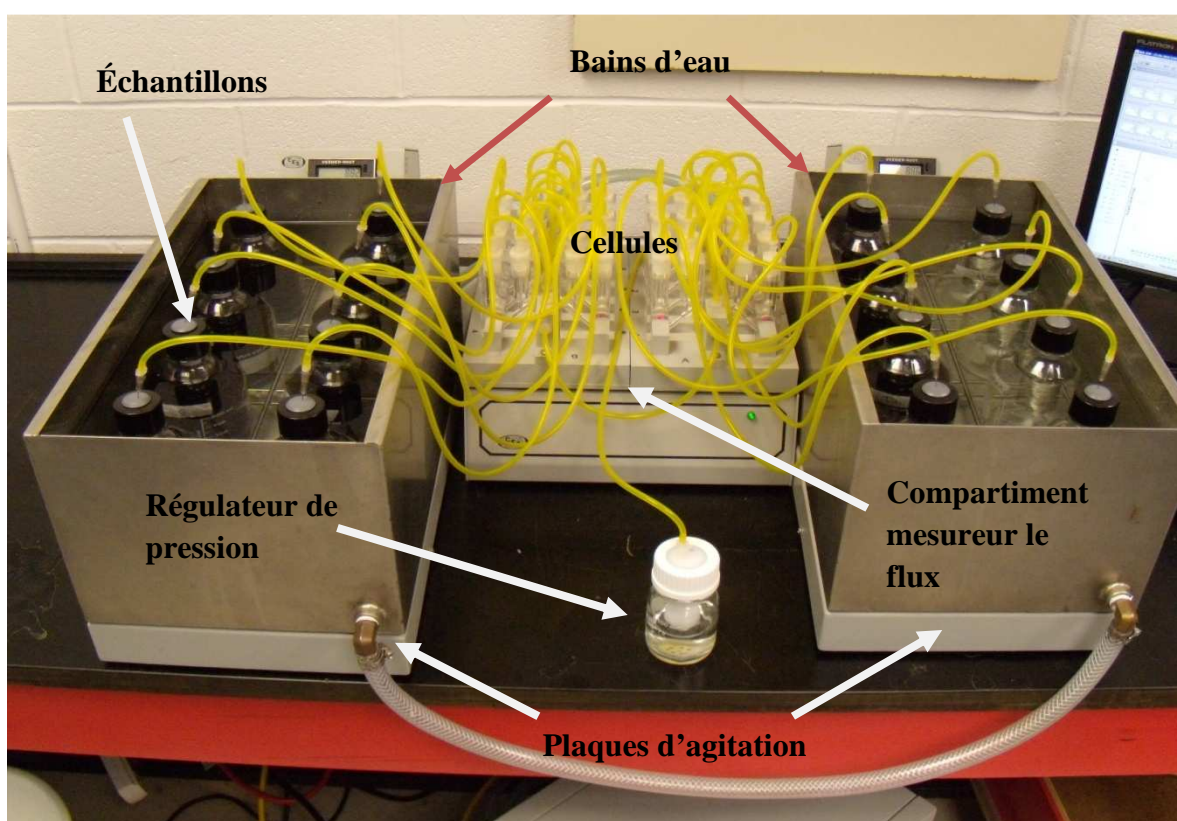


Figure 4-3. Respiromètre Challenge AER-200

L'appareil est branché à un ordinateur qui enregistre et illustre les consommations d'O₂ dans les réacteurs. Cette partie de l'appareil possède plusieurs cellules mesurant le volume de l'oxygène consommé par les échantillons. Les cellules (figure 4-4) qui sont remplies d'huile possèdent deux parties liées au fond avec un canal qui est traversé par un faisceau lumineux. L'oxygène qui entre

dans la partie droite de la cellule passe à travers le canal en formant des bulles qui traversent le faisceau lumineux et l'ordinateur enregistre une consommation d'oxygène en comptant le nombre de bulles calibrées pénétrant le réacteur. Étant donné le fait que chaque cellule produit des bulles de taille légèrement différente, l'ordinateur doit être préalablement calibré, afin de calculer le volume exact de l'oxygène qui passe à travers le faisceau lumineux. De son côté, la partie gauche de la cellule est branchée à l'aide d'une aiguille dans le septum de la bouteille placée dans le bain d'eau. L'oxygène nécessaire pour la respiration bactérienne dans les échantillons était approvisionné par une bonbonne d'oxygène pur sous pression, branché au compartiment mesureur de flux. Les échantillons étaient placés dans deux bains d'eau thermostatés à 20 °C. Il est à noter que le thermostat doit être allumé au moins 2 heures avant le début de l'essai, afin de pouvoir refroidir l'eau dans les bassins à 20 °C. Chaque bain d'eau est placé sur une plaque d'agitation à vitesse variable.



Figure 4-4. Cellule mesurant le flux

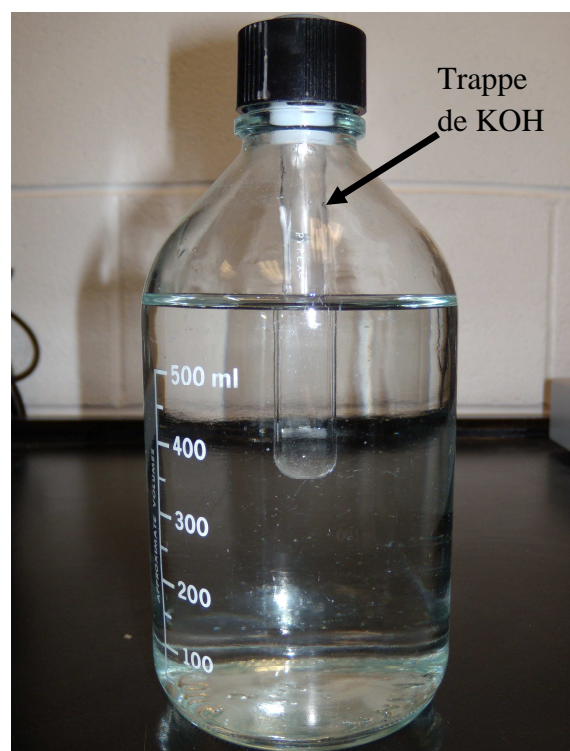


Figure 4-5. Trappe de KOH

Étant donné la présence de substrat dans les échantillons, la biomasse hétérotrophe consomme de l'oxygène et expire de CO₂ qui est absorbé par des trappes de KOH (figure 4-5). Les trappes de

KOH représentent des tubes en verre d'un volume de 10 ml remplis avec 5 ml d'une solution de KOH à 35 % (m/v). Le rôle de ces trappes est d'éviter l'accumulation de CO₂ dans les bouteilles, ce qui force son remplacement par de l'O₂.

L'oxygène qui passe à travers l'appareil doit être toujours en surplus, afin d'assurer une faible pressurisation des cellules. L'oxygène qui n'est pas consommé sort par le régulateur de pression avec une vitesse de 2 – 3 bulles par seconde. En effet, la pression dans l'appareil peut être contrôlée en augmentant ou diminuant le niveau d'eau au dessus de la sortie de l'oxygène dans le régulateur de pression. Il est à noter que les bains d'eau doivent être remplis avec suffisamment d'eau pour que les bouteilles soient couvertes jusqu'aux bouchons. Si une bouteille n'est pas bien couverte avec de l'eau de refroidissement, la différence entre la température ambiante et celle du liquide diminuera le vide dans la bouteille ce qui faussera les résultats.

4.2.2.2 Mode opératoire

Avant chaque essai de respirométrie, les réacteurs (des bouteilles *Wheaton, Fisher Scientific Co.*) étaient bien lavés avec de savon et rincées trois fois avec de l'eau Milli-Q. Ensuite, on y ajoutait 600 ml de la solution de mise en suspension (l'eau saline stérile ou l'eau du robinet déchlorée), la masse de CAP (variable selon les essais), les nutriments (variable selon les essais), l'inhibiteur de nitrification et le barreau magnétique (requis pour le brassage). Un inhibiteur en poudre de la compagnie HACH (2-chloro-6-(Trihlorometyle) pyridine) visant à éliminer l'activité des bactéries nitrifiantes à été ajouté (0,16 g pour un échantillon de 600 ml) dans chaque bouteille (ainsi que dans les témoins). Il est à noter que tous les essais furent réalisés en duplicata.

Les tubes de KOH étaient rincés avec de l'eau Milli-Q, puis enveloppés dans une feuille d'aluminium et déposés dans l'autoclave. Les anneaux en plastique non autoclavable utilisés pour les trappes de KOH étaient désinfectés en les trempant dans une solution d'eau de Javel à 0,2 % (v/v) pendant au moins 12 heures et ensuite, lavés avec de l'eau saline stérile. Les aiguilles et les septums ont été changés avant le début de chaque essai afin de préserver la stérilité de milieu. Lors des essais, la bonbonne d'oxygène pur était ouverte et le débit dans le régulateur de pression ajusté à 8-10 bulles par seconde. On vérifiait d'abord la calibration des cellules : à l'aide d'une seringue stérile, les cellules étaient purgées l'une après l'autre en validant l'information sur le

moniteur. Après la purge des cellules, l'essai était redémarré en ajustant le débit d'oxygène à 2 – 3 bulles par seconde.

4.2.3 Respiromètre avec mesure de l'oxygène dissous en continu

Suite à la difficulté de maintenir des conditions aérobies avec le respiromètre Challenge AER-200, il a été proposé vers la fin du projet de mesurer la consommation de l'oxygène dissous de la biomasse hétérotrophe dans l'échantillon en absence d'un apport d'oxygène externe.



Figure 4-6. Sonde d'oxygène dissous

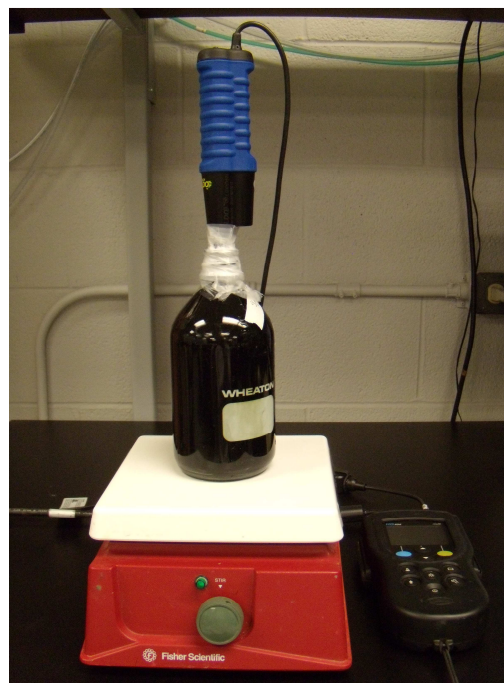


Figure 4-7. Montage de la sonde d'OD

L'eau d'ensemencement des échantillons était de l'eau de robinet et déchlorée par aération selon la procédure décrite précédemment. La consommation de l'oxygène dissous en continu était mesurée à l'aide d'une sonde (figure 4.6) du modèle *HQ 40d multi* de la compagnie *HACH*. Après le montage de la sonde (figure 4.7), le goulot de la bouteille était couvert avec de la paraffine, afin d'éviter l'apport d'oxygène de l'extérieur. Pour la réalisation des essais, l'extrait de levure (500 ppm C) et la masse désirée de CAP (de 0,1 à 11 g humides selon les essais) étaient déposés dans une bouteille *Wheaton* de 500 ml à laquelle on ajoutait 30 ml de solution de NaN_3 (section 4.2.1.3) dans le cas des témoins et 0,16 g d'inhibiteur de nitrification pour tous les échantillons. Par la suite, la bouteille était remplie avec de l'eau du robinet déchlorée jusqu'au

rebord et la sonde d'OD y était finalement insérée. La durée des essais dépendait du temps nécessaire de la biomasse pour consommer l'OD au complet, typiquement moins de 11 heures. Dans le cas de ces essais, les bouteilles n'étaient pas thermostatées. La température ambiante du laboratoire est de 21-23 °C. Le CAP était maintenu en agitation par un barreau magnétique dont la vitesse de rotation était ajustée à 400 rpm.

CHAPITRE 5. PRÉSENTATION DES RÉSULTATS

Ce chapitre présente les résultats des essais réalisés dans le cadre de ce projet de façon chronologique. En effet, la mise au point initiale de la méthode respirométrique a principalement été effectuée à l'aide de CAP colonisé au laboratoire et de mesures respirométriques à l'aide du respiromètre Challenge AER-200. Ces résultats seront présentés à la section 5.1. Par la suite, pour diverses raisons dont nous traiterons plus loin, il a été décidé d'utiliser du CAP colonisé en pilote, soit des conditions de colonisation du CAP plus représentatives. Enfin, l'utilisation du respiromètre Challenge AER-200 a progressivement été abandonnée au profit d'une simple mesure du taux de décroissance de l'oxygène en bouteille fermée (de type DBO₅). Ces résultats seront présentés à la section 5.2. Finalement, les essais de comparaison de CAP et de CAG sont présentés à la dernière section, soit la section 5.3.

5.1 Essais de respirométrie avec du CAP colonisé au laboratoire

Un certain nombre d'essais ont été réalisés avec le CAP-laboratoire dans le but de déterminer les conditions optimales pour un essai de respirométrie. Les variables d'incubation à optimiser étaient :

- la concentration et le type de substrat (exprimée en mg C/L),
- la masse de CAP et
- la vitesse d'agitation.

Pour les besoins de ces essais, il a été décidé d'utiliser dans un premier temps l'extrait de levure en guise de source de substrat. Ce substrat offre l'avantage de réunir, au sein d'un seul produit, le carbone, l'azote, le phosphore ainsi que les autres micronutriments nécessaires à la croissance des microorganismes.

Au démarrage du projet, aucun CAP colonisé biologiquement dans des conditions représentatives n'était disponible. Il a donc été décidé de coloniser artificiellement du CAP au laboratoire selon la technique décrite au chapitre 4.1.1.1. Rappelons que des CAP de 25 et 200 μm ont été colonisés à cette occasion.

5.1.1 Observation qualitative du degré de colonisation par microscopie en épifluorescence (*BacLighttm*)

Environ deux mois après le début de l'ensemencement du CAP en laboratoire, un échantillon des deux CAP ont été colorés au *BacLight* et ensuite observés au microscope (chapitre 4.1.1.2 et Annexe I) afin de déterminer qualitativement le degré de colonisation bactérienne de la surface. Les photographies sont effectuées à un grossissement de 1000X sur un microscope à épifluorescence (Olympus BX51) avec illumination d'une lampe à mercure équipée d'un filtre GFP.

Les petites particules noires qu'on voit sur les photos (figure 5-1 et 5-2) représentent les grains de charbon de 25 µm. On observera que la surface des plus petites particules est colonisée beaucoup plus que celle des particules de plus grande taille. On voit aussi qu'il y a un certain nombre de bactéries libres dans l'eau autour des particules. Il est à noter que les bactéries en vert sont en bon état tandis que celles en jaune ou en rouge ont des membranes cellulaires endommagées.

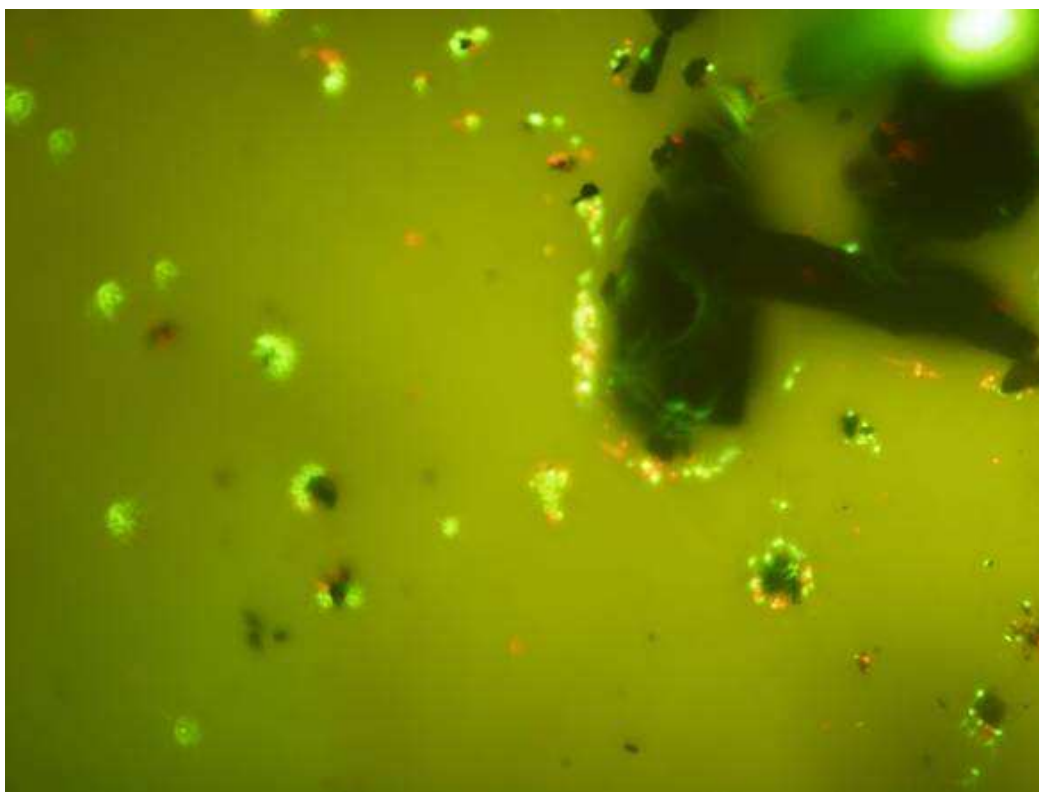


Figure 5-1. CAP-laboratoire de 25 µm coloré au *BacLighttm*

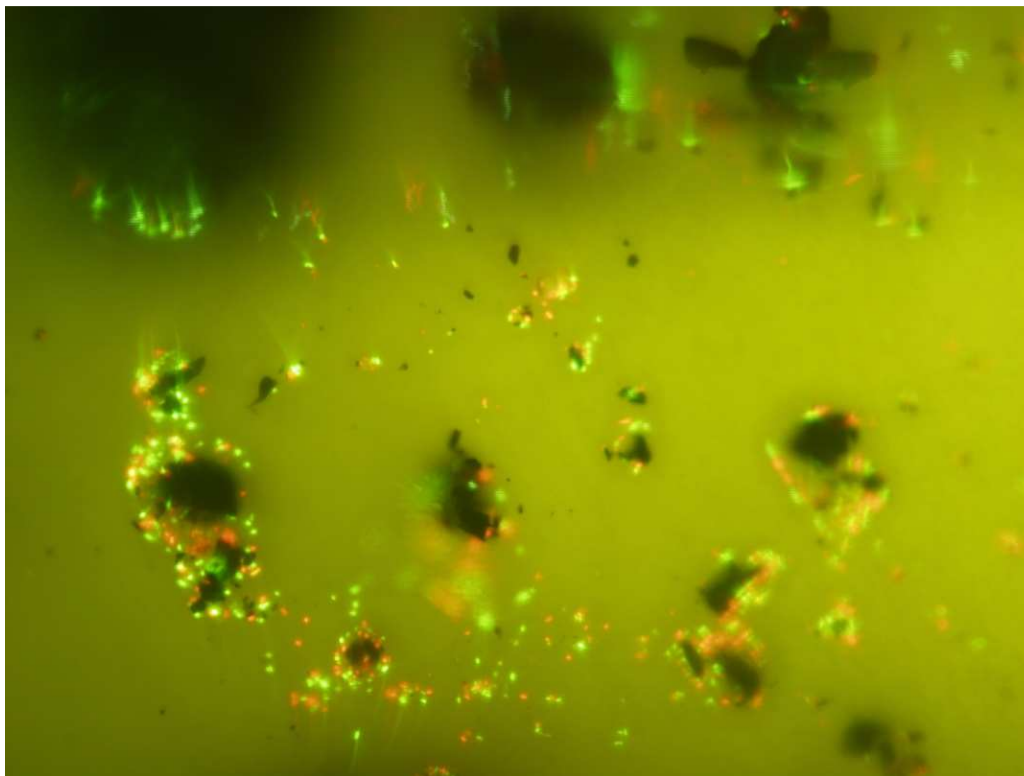


Figure 5-2. CAP-laboratoire de 25 µm coloré au BacLight™

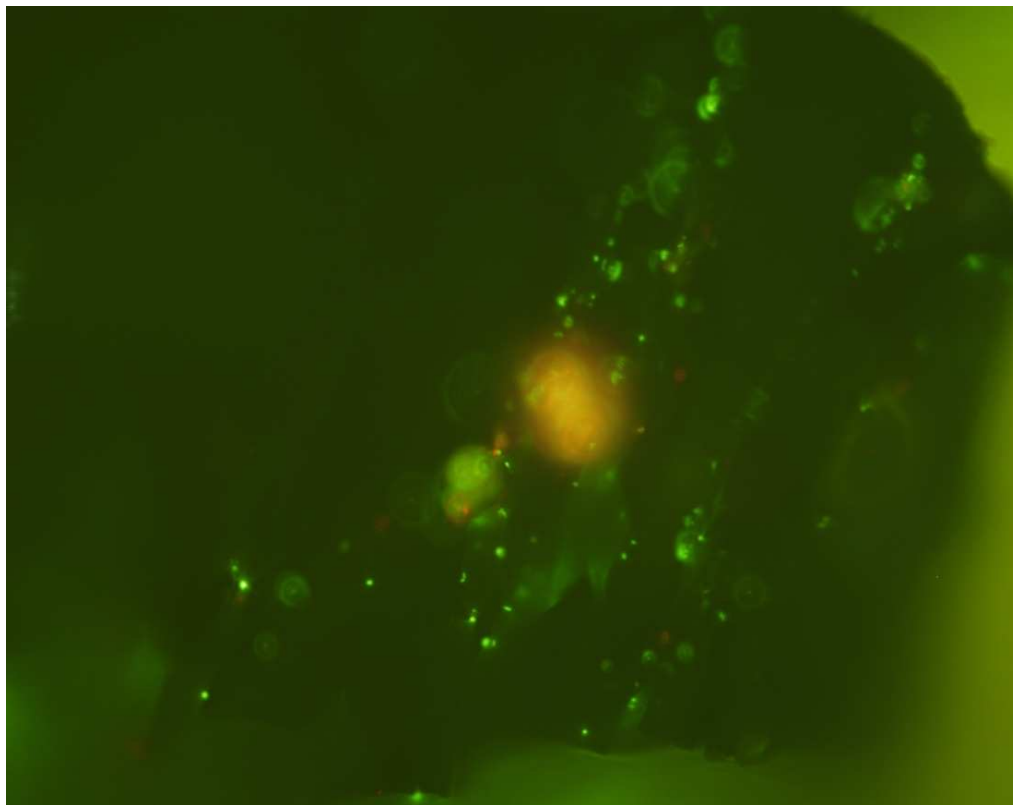


Figure 5-3. CAP-laboratoire de 200 µm coloré au BacLight™

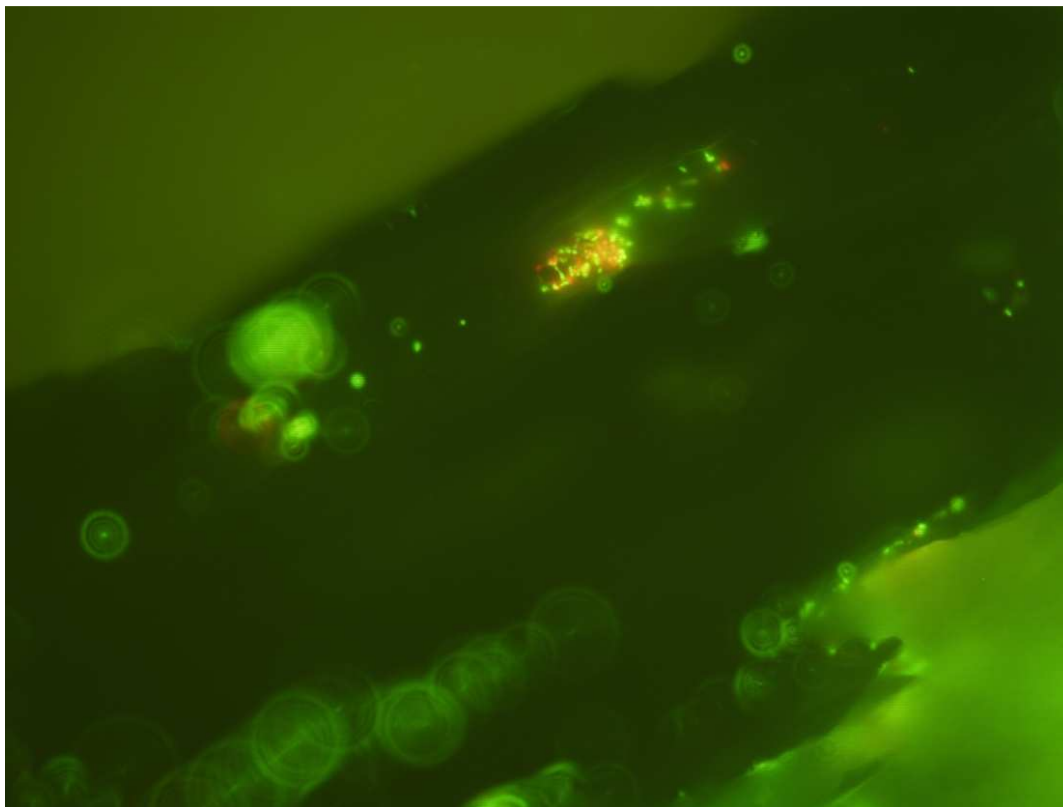


Figure 5-4. CAP-laboratoire de 200 µm coloré au BacLighttm

Ce sont surtout des bactéries avec des membranes perméabilisées (marquées en rouge/orange) qui sont détachées de la surface des particules.

Les photos (figure 5-3 et 5-4) montrent la surface des grains du CAP de 200 µm qui semble moins colonisée par champ microscopique que celle des particules de CAP de 25 µm. Alors que le CAP de 25 µm était colonisé de façon uniforme, celui de 200 µm montre des petites colonies de bactéries distribuées non uniformément sur la surface des particules.

5.1.2 Choix de la concentration optimale de substrat

Deux séries d'essais menés simultanément pour les deux diamètres de CAP (soit 25 et 200 µm) ont été réalisés le 23 juillet 2009 afin de choisir la concentration optimale de substrat (exprimée en termes de carbone) par bouteille. Le but de cet essai est de déterminer quelle est la concentration de C au dessous de laquelle le carbone devenait le composé limitant pour la croissance de la biomasse hétérotrophe aérobie.

Les essais ont été effectués selon la méthodologie décrite dans le chapitre 4.2.1. Brièvement, trois concentrations d'extrait de levure ont été testées, soit 5, 50 et 500 mg C/L. Une solution stérile d'extrait de levure était utilisée comme source de substrat. Quelques jours avant le début des essais, une analyse de la solution d'extrait de levure autoclave a été réalisée dans le but de déterminer la concentration du C. Les résultats ont montré une concentration moyenne de 8600 ± 190 mg C/L.

Un ajout de 0,16 g d'inhibiteur de nitrification (chapitre 4.2.2.2) était inséré dans chaque bouteille afin d'éliminer l'influence des bactéries nitrifiantes. La vitesse d'agitation était fixée à 400 rpm et la température dans les bains d'eau était maintenue à 20°C . La durée des essais était de 20 heures. Les essais ont été répétés à quatre reprises (c.-à-d. quatre journées différentes). Étant donné la bonne reproductibilité des résultats des quatre séries d'essais, seulement ceux de la dernière série sont présentés aux figures 5-5 et 5-6. Chaque courbe représente la moyenne de deux répliquats d'incubation. Les résultats pour les premières trois séries d'essais sont présentés à l'Annexe II (figures 9-1 – 9-3 en TUO et figures 9-4 – 9-7 en consommation d'oxygène).

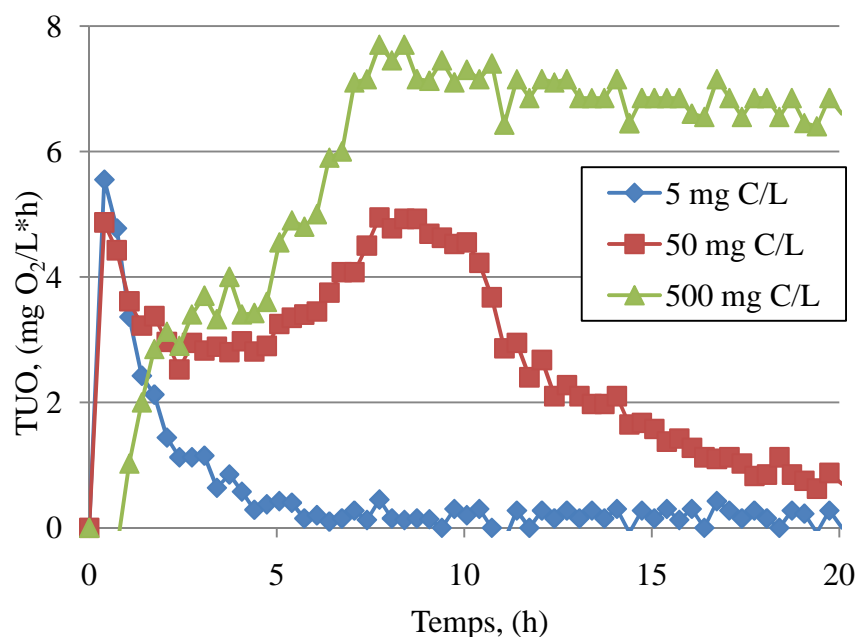


Figure 5-5. Taux d'utilisation de l'oxygène (TUO) pour le CAP de $25 \mu\text{m}$ avec des différentes concentrations (en mg C/L) d'extrait de levure en fonction du temps. Masse humide de CAP : 3 g dans 600 ml, température -20°C .

La figure 5-5 présente la variation du TUO en fonction du temps pour trois différentes concentration de carbone et la même masse du CAP-laboratoire de 25 μm soit 3 g masse humide. On voit que la courbe de la dose de 5 mg C/L possède un pic au début suivi d'une rapide diminution qui peut être expliquée par l'épuisement du carbone dans la bouteille.

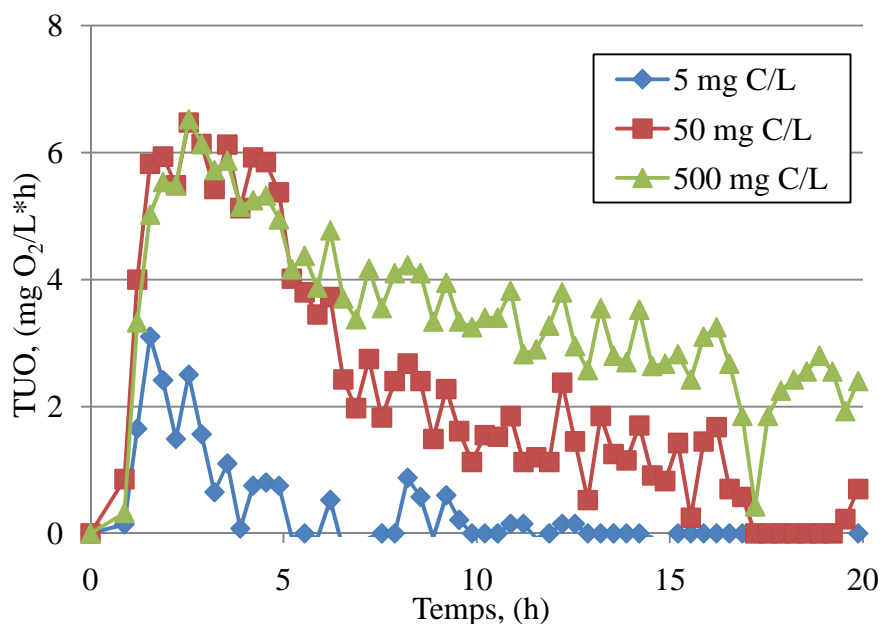


Figure 5-6. Taux d'utilisation de l'oxygène (TUO) pour le CAP de 200 μm avec des différentes concentrations (en mg C/L) d'extrait de levure en fonction du temps. Masse humide de CAP : 3 g dans 600 ml, température - 20 °C.

Cependant, la courbe de la dose de 50 mg C/L possède le même pic au début, mais la tendance suit s'approche à une courbe de respiration endogène. Il est à noter que le même type de courbes nous était montré de Marc-André Labelle (eaux usées). Il utilisait le même respiromètre afin d'examiner la respiration endogène des boues activées provenant des différentes stations d'épuration des eaux usées. Toutefois, la courbe de la dose de 500 mg C/L a une tendance exponentielle au début et plafonne par la suite ce qui peut être expliqué par l'épuisement de l'oxygène dissous dans la bouteille. Cependant, il est à noter que la concentration d'OD dans les bouteilles n'était pas mesurée lors des essais de la première série. En effet, l'absence d'OD dans les bouteilles de respirométrie a été constatée avec une mesure juste à la fin de chaque essai.

Quant au même essai avec de charbon de 200 μm (figure 5-6), on voit que pour la dose de 5 mg C/L le pic est plus bas et arrive plus tard ce qui signifie la plus faible activité bactérienne de la

biomasse sur la surface de 200 μm par rapport de celle de 25 μm . Cependant, on observe que les courbes des deux autres concentrations testées soit 50 et 500 mg C/L sont semblables. Alors, étant donné que les concentrations appliquées sont différentes, ce phénomène s'explique probablement par l'OD dans la bouteille qui devient le composé limitant à cette vitesse d'agitation, soit 400 rpm.

Finalement, la concentration de 500 mg C/L a été choisie comme optimale (c.-à-d. non limitante) étant donné les valeurs du TUO supérieures à celles de 5 et 50 mg C/L, ainsi que la linéarité des graphiques qui lui corresponde (figures 9-4 – 9-7). De la même façon, les concentrations de 5 et 50 mg C/L ne pouvaient pas être choisies comme optimales à cause des pentes qui plafonnaient après une certaine période de temps. Cependant, il est probable qu'une concentration d'extrait de levure inférieure puisse en fait être utilisée pour les essais puisque (i) les problèmes d'anaérobiose ont rendus plus difficile l'interprétation des résultats et (ii) étant donné le plus faible degré de colonisation du CAP du pilote Opaline par rapport à celui provenant du laboratoire, il faut s'attendre que la concentration d'extrait de levure soit encore plus en excès avec le CAP environnemental que le CAP de laboratoire. Quoi qu'il en soit, pour la suite des essais, la concentration d'extrait de levure de 500 mg C/L a été utilisée pour tous les essais. Notons par ailleurs que cette concentration consiste également la concentration de glucose utilisée dans la méthode de mesure de la biomasse par glucose radioactif (Servais et al., 1991,1992).

5.1.3 Variation du pH lors d'un essai de respirométrie

Un essai (n=2) a été réalisé dans le but d'étudier la variation de pH lors de la préparation et la réalisation de la méthode de respirométrie. En général, la plage de pH visée est de 7,5 à 8,0. Alors, le but était de vérifier si le pH sortira de cette plage après l'ajout des différentes doses d'extrait de levure et masses de CAP (figure 5-7).

Il est à noter que lors de cet essai le pH était uniquement mesuré sans aucun ajustement au début ou en cours d'essai. L'essai était préparé selon la méthodologie décrite dans le chapitre 4.2.1. Une dose de 0,16 g d'inhibiteur de nitrification (HACH) était ajoutée dans chaque bouteille afin d'éliminer l'influence des bactéries nitrifiantes. L'essai a été réalisé pour le CAP de 25 et 200 μm

en ajoutant 200 ou 5000 mg C/L d'extrait de levure. Les conditions testées sont présentées dans l'Annexe III, tableau 9-1.

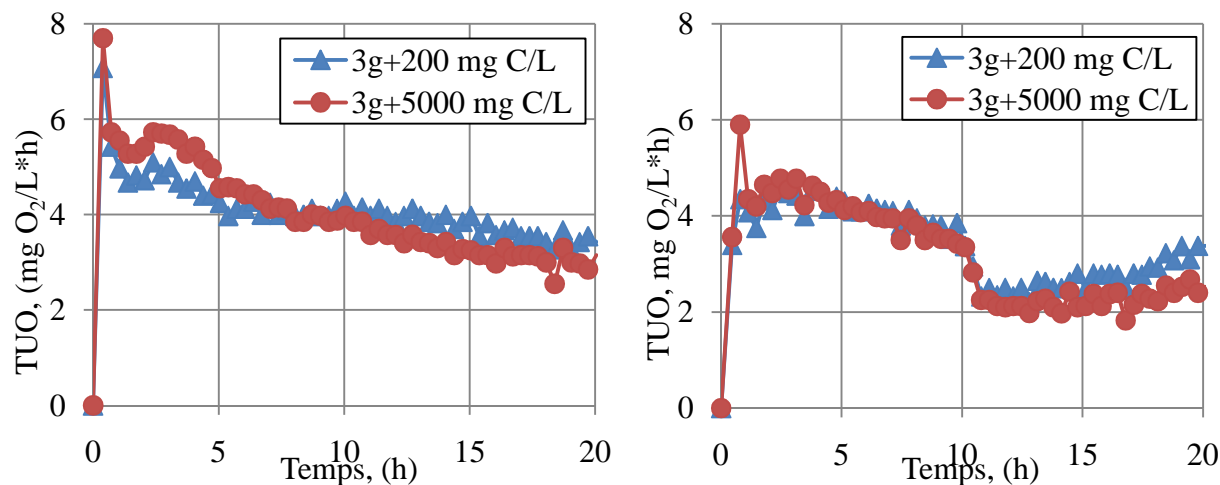


Figure 5-7. Consommation d'oxygène en fonction du temps pour l'essai avec une forte dose d'extrait de levure : a) CAP-laboratoire de 25 µm; b) CAP-laboratoire de 200 µm.

Selon la figure 5-7, on voit tout d'abord qu'indépendamment de la dose d'extrait de levure, la variation du TUO en fonction du temps pour les mêmes masses de CAP reste négligeable. Cependant, lors des essais, on observe une faible diminution du pH (de 0,4 à 0,7) (tableau 9-1 à l'Annexe III) dans la plage de 6,9 à 7,7. Étant donné que les bactéries nitrifiantes étaient inhibées avec une forte dose d'inhibiteur, cette diminution du pH peut être probablement expliquée avec par l'accumulation de CO₂ dans la phase liquide à cause de la faible vitesse d'agitation soit 400 rpm. Cependant, cette diminution du pH ne causait pas des problèmes au niveau de l'activité bactérienne ce qui ne justifiait donc pas l'ajout de tampon.

5.1.4 Choix de la masse optimale du CAP

Pendant la période du 23 juillet au 29 juillet 2009, deux séries d'essais (n=2) ont été réalisées dans le but de choisir la masse optimale de CAP nécessaire pour la méthode de respirométrie. Il était anticipé qu'une masse trop faible limitait la précision de la méthode en raison de trop faible consommation d'oxygène et qu'une masse trop importante puisse nuire à la diffusion de l'oxygène au sein du respiromètre.

Plusieurs masses ont donc été testées, soit des masses humides par bouteille (de 600 ml) : 1g, 3 g, 6 g, 9 g, 12 g et 15 g. La concentration d'extrait de levure était de 500 mg/L et la vitesse d'agitation était ajustée à 400 rpm. Une dose de 0,16 g d'inhibiteur de nitrification était ajoutée dans chaque bouteille.

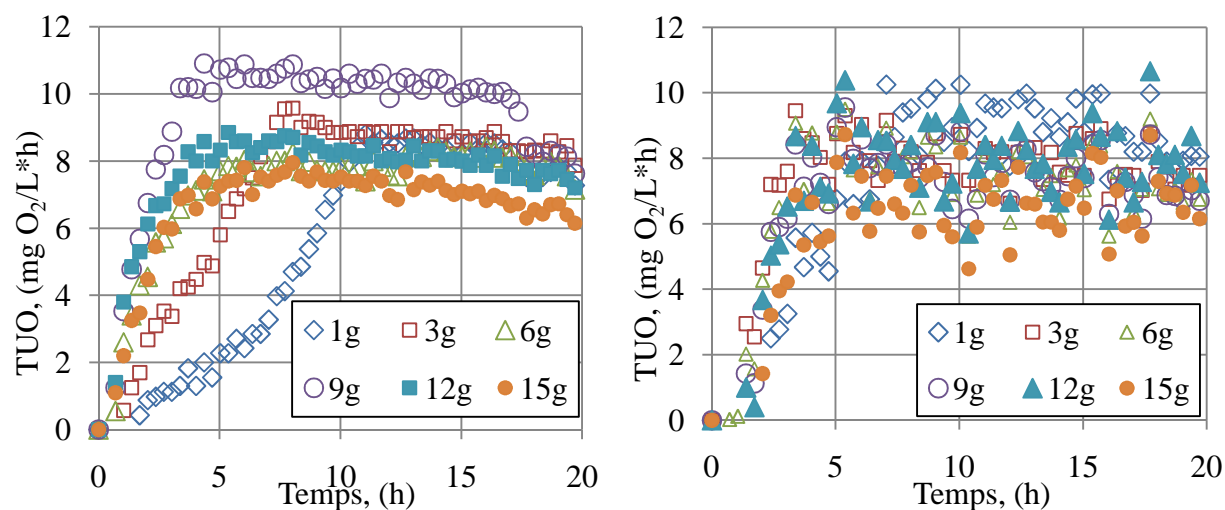


Figure 5-8. TUO en en fonction du temps pour le : a) CAP-laboratoire de 25 μm ; b) CAP-laboratoire de 200 μm .

Les courbes du taux d'utilisation d'oxygène en fonction du temps (TUO) sont présentées à la figure 5-8. On remarquera tout de suite qu'avec l'augmentation de la masse du CAP par bouteille les courbes perdent leurs allures exponentielles, ce qui suggère qu'une carence d'oxygène s'est produite durant les essais. De plus, l'effet est plus fortement ressenti dans le cas du CAP de 200 μm . Cependant, il est à noter que lors de cet essai, toutes les bouteilles étaient brassées à 400 rpm. En effet, comme il a été constaté plus tard, le vortex créé à cette vitesse d'agitation était si faible, qu'il ne pouvait pas assurer un bon transfert d'oxygène de la phase gazeuse à la phase liquide. Autrement dit, à cette vitesse d'agitation, le potentiel respirométrique de la biomasse dans les bouteilles n'était pas assuré par le transfert d'oxygène de la phase gazeuse à la phase liquide.

Suite à ces observations, il a été décidé de plutôt étudier l'impact de la vitesse d'agitation sur le TUO en faisant l'hypothèse qu'une hausse de l'agitation permettrait d'accroître le transfert d'oxygène et ainsi résoudre ce problème. Des essais ont été redémarrés afin de vérifier la concentration d'oxygène dans les bouteilles durant l'incubation avec le respiromètre Challenge

AER-200. Les résultats de cette investigation sont présentés au tableau 5-1 un peu plus loin. On notera que la concentration d'oxygène est très faible après 20 heures d'incubation. En théorie, le respiromètre devrait combler en continu la demande en oxygène; d'autant plus que les TUO observées sont à l'intérieur des gammes prescrites par le manufacturier de l'appareil (de 0 à 500 mg O₂/L*h).

5.1.5 Choix de la vitesse d'agitation optimale

Ces essais ont eu pour but de déterminer quelle était la vitesse d'agitation optimale pour assurer un bon transfert d'oxygène de la phase gazeuse à la phase liquide et ainsi prévenir les conditions anaérobies dans le respiromètre. Il est à noter que tous les essais étaient préparés selon la méthodologie décrite dans le chapitre 4.2.1.

Première série d'essais

Dans un premier temps, deux masses différentes de CAP ont été testées soit 3 et 15 g (masse humide de CAP-laboratoire de 25 µm) par bouteille (n=4). Les échantillons étaient dopés avec 500 mg C/L d'extrait de levure et 0,16 g d'inhibiteur de nitrification. Au début de l'essai, la vitesse d'agitation dans les deux réacteurs était ajustée à 400 rpm. L'oxygène dissous (OD) a été mesuré 3 fois : au début de l'essai (t₀), après la 23^{ième} heure et au bout de 30 heures. Il est à noter qu'une bouteille était sacrifiée pour chaque nouvelle mesure d'OD.

Lors de cet essai, il était observé que la concentration d'OD était insuffisante après la 23^{ième} heure. Devant ce constat, les deux bouteilles ouvertes pour la mesure d'OD ont été aérées de < 1 mg O₂/L jusqu'à 9 mg O₂/L en quelques minutes et ensuite branchées à nouveau au respiromètre dans un deuxième bassin d'incubation brassé à 400 rpm. Simultanément, la vitesse d'agitation dans le premier bassin a été augmentée de 400 à 1000 rpm jusqu'à la fin de l'essai pour étudier l'impact sur le TUO pour les deux réacteurs restants dans ce bassin. La figure 5-9 présente l'impact de ce changement d'agitation sur le TUO.

Il apparaît clairement que le TUO n'augmente pas de façon exponentielle pendant toute l'incubation à 400 rpm. Lorsque l'agitation est haussée à 1000 rpm, le TUO se met alors à progresser. Il est intéressant de noter que les concentrations d'OD à la fin de l'essai (30 heures) dans les deux bouteilles re-saturées et brassées à 1000 rpm furent de 3,5 mg O₂/L pour la bouteille avec de 3 g CAP et 3,2 mg O₂/L pour la bouteille avec 15 g de CAP.

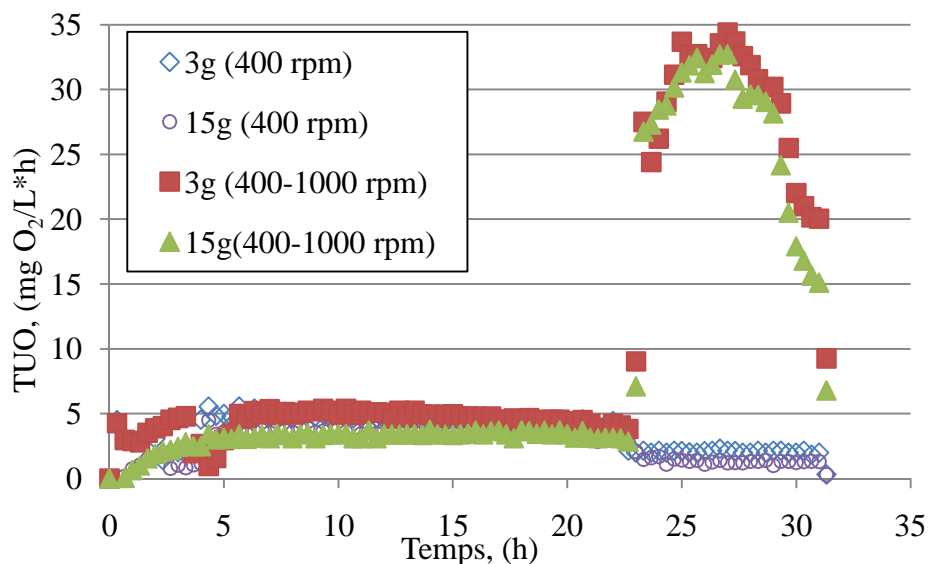


Figure 5-9. TUO en fonction du temps pour le CAP de 25 μm avec des différentes vitesses d'agitation.

Tableau 5-1. Mesures de l'oxygène dissous et de la consommation d'oxygène pour quatre différentes vitesses d'agitation

Masse humide de CAP (g)	Après 18 heures d'incubation				Après 25 heures d'incubation			
	400 rpm		800 rpm		900 rpm		1000 rpm	
	OD mg/l	Oxygène consommé (mg)	OD, mg/l	Oxygène consommé (mg)	OD mg/l	Oxygène consommé (mg)	OD mg/l	Oxygène consommé (mg)
0.4	0.1	31	0.1	46	0.1	160	< 2	231
0.6	0.1	35	0.1	65	0.1	175	< 2	237
0.8	0.1	39	0.1	52	0.1	143	< 2	219
1.0	0.1	38	0.1	87	0.1	127	3.4	240
Témoin 0.4	10	11.1	9.7	6.4	9.6	11.1	9.2	6.4
Témoin 0.6	9.5	10.9	9.7	9.0	9.1	10.9	9.2	8.9
Témoin 0.8	9.5	11.2	9.5	9.5	9.0	11.1	8.9	9.5
Témoin 1.0	9.4	11.5	9.9	8.1	9.0	11.5	9.2	8.1

Considérant les résultats précédents, le but de l'essai suivant était d'examiner la variation de la consommation d'O₂ pour des vitesses d'agitation croissantes et différentes masses humides de CAP. De même façon que pour l'essai précédent, l'extrait de levure était utilisé comme une source de carbone (500 mg C/L). Les bactéries nitrifiantes étaient inhibées avec un ajout d'inhibiteur de nitrification de 0,16 g. Les résultats de l'essai sont présentés dans le tableau 5-1.

Du tableau ci-dessus, on voit que les échantillons étaient toujours en absence d'OD sauf ceux à 1000 rpm où la concentration augmentait jusqu'à une certaine valeur après l'augmentation de la vitesse d'agitation de 800 à 1000 rpm, mais malgré cela, la concentration d'OD reste toujours négligeable. On voit donc que l'augmentation de la vitesse d'agitation provoque une augmentation de la concentration d'OD résiduel dans les bouteilles lors d'un essai de respirométrie. Donc, il semble que la vitesse d'agitation de 1000 rpm soit le meilleur choix pour un essai de respirométrie. Cependant, ces résultats étaient insatisfaisants puisque nous aurions préféré obtenir un résultat indépendant de la vitesse d'agitation. De plus, il a été observé (tableau 5-1) que, même pour l'agitation de 1000 rpm, la consommation totale d'oxygène après 25 heures d'incubation était inversée corrélée avec la masse humide de CAP ajoutée dans la bouteille. Ce résultat apparaît surprenant puisqu'on devrait s'attendre *a priori* que la consommation d'oxygène soit proportionnelle à la biomasse présente et donc, à la concentration de CAP dans la bouteille. Suite à ces constats, la décision fût prise de mettre de côté l'utilisation du respiromètre Challenge AER-200 pour revenir vers des essais en bouteilles fermées et agitées sans ajout d'oxygène. La présentation de ces résultats fait l'objet de la section 5.2. Cependant, avant de poursuivre la présentation des travaux d'optimisation de la méthode, la comparaison des CAP de 25 et 200 µm au laboratoire sera effectuée à la prochaine section à l'aide des respiromètres obtenus sur le Challenge AER-200.

5.1.6 Détermination de la concentration de la biomasse hétérotrophe aérobie (Z_{BH}) pour les deux diamètres de CAP

La méthode de régression linéaire (chapitre 2.2.1) proposée par Wentzel et al. (1995) a été utilisée afin de déterminer la concentration de la biomasse hétérotrophe colonisant la surface du CAP des deux diamètres testés : soit 25 et 200 µm. Les différentes concentrations de Z_{BH} déterminées à l'aide de cette technique ainsi que les graphiques du TUO en fonction du temps des

séries d'essai du 16 juin 2009 au 23 juillet 2009 sont présentées à l'Annexe IV (tableaux 9-2 et 9-3).

Bien que la méthode ne soit pas optimisée, une comparaison a tout de même été entreprise puisqu'on s'intéressait alors plutôt à une différence relative entre les deux CAP qu'à une valeur absolue. Il a donc été posé que l'imperfection de la méthode allait se répercuter autant sur le CAP de 25 et 200 μm , tous autres paramètres étant équivalents. Pour les besoins de cette comparaison, les résultats des deux premières séries d'essais mentionnées précédemment ont été utilisés (section 5.1.2 et 5.1.4). Au total, cinq comparaisons ont été réalisées entre le 16 juin et le 23 juillet 2009.

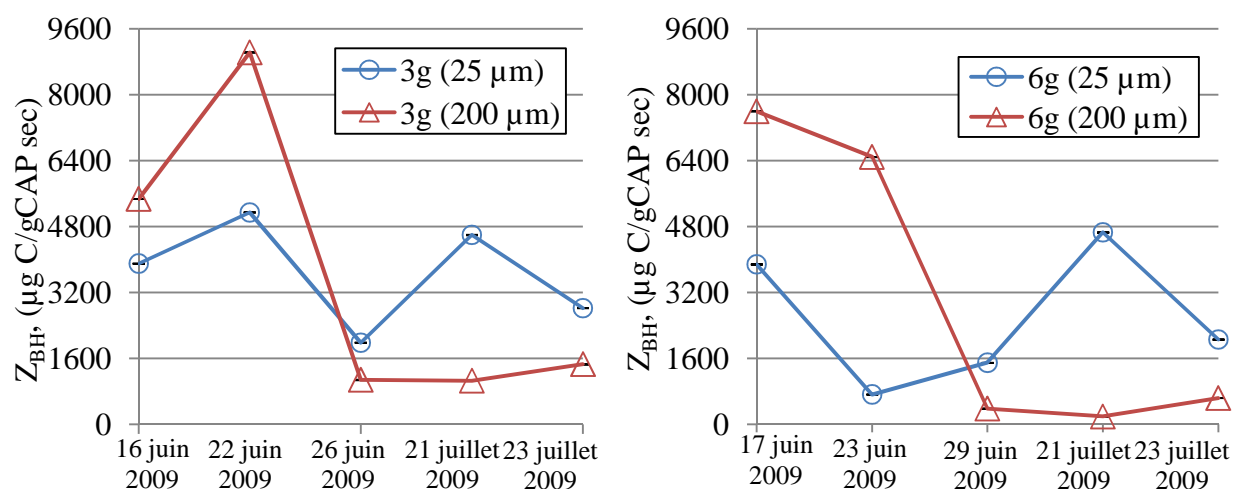


Figure 5-10. Variation de la concentration de la biomasse hétérotrophe aérobie (Z_{BH}) en fonction des dates des essais de : a) 3 g de CAP-laboratoire de 25 et 200 μm ; b) 6 g de CAP-laboratoire de 25 et 200 μm .

Alors que la figure 5-10a présente les concentrations calculées pour une masse de CAP de 3 g; la figure 5-10b présente les résultats obtenus en utilisant 6 g de CAP. Pour le CAP 200 μm , on observe une diminution de la biomasse hétérotrophe après la semaine du 22 juin 2009. Cette diminution peut être expliquée avec une panne du système d'aération du réacteur de colonisation du CAP pendant le week-end. La forte concentration de substrat présent dans l'eau ($\approx 60 \text{ mg C/g CAP sec}$) ainsi que l'absence d'aération a provoqué des conditions anaérobies confirmées par la présence d'une forte odeur désagréable qui dégazait de la surface du réacteur. En effet, pendant la suivante, on voit une lente augmentation due au rétablissement du système d'aération du réacteur.

Concernant la différence entre les CAP de 25 et 200 μm , les résultats indiquent que le CAP de 200 μm est plus colonisé que celui de 25 μm ($p = 0,076$). La différence est tout près du seuil habituel de signification statistique ($p = 0,05$). Ce résultat est donc cohérent avec les conclusions de Dallaire (2009) que le CAP de 200 μm est plus colonisé que celui de 25 μm . Cependant, les résultats sont en contrevains avec les observations microscopiques et notre hypothèse de départ.

5.2 Essais de respirométrie avec de CAP du pilote Opaline-B

Après les premières séries d'essais réalisés du 16 juin au 23 juillet 2009 avec de CAP-laboratoire, il a été constaté que ce charbon démontrait une activité respiratoire très importante, probablement non représentative d'un CAP colonisé dans des conditions de traitement de l'eau potable. Ainsi, lors des essais de respirométrie, la consommation du substrat commençait peu après l'ajout du charbon dans la bouteille même pour des échantillons avec des masses de CAP assez faibles, soit 1 g. Comme la biomasse était entretenue avec de l'extrait de levure, elle était aussi acclimatée à ce substrat. Donc, le CAP-laboratoire était loin des conditions réelles où l'on s'attend à ce que les concentrations de substrat et de biomasse soient toutes deux beaucoup plus faibles.

Pour cette raison, le projet du pilote CAP-laboratoire a été abandonné afin de poursuivre les essais de respirométrie avec du CAP-Opaline colonisé de façon naturelle avec de l'eau décantée ozonée. Donc, les essais suivants réalisés dans le cadre de ce projet avaient pour but de développer la méthode de respirométrie dans les axes suivants – (i) choix d'un témoin; (ii) choix du type de substrat; (iii) choix de la masse optimale de CAP; (iv) application de la méthode de régression linéaire afin de déterminer la concentration de la biomasse hétérotrophe aérobie colonisant la surface de CAP-Opaline.

5.2.1 Définition des conditions d'incubation pour les échantillons témoins

Lors des essais avec du CAP-laboratoire, il a été constaté une forte consommation d'oxygène par les témoins autoclavés qui augmentait de 0,3 à 1,1 mg O_2 par heure en augmentant la masse de CAP autoclavée de 1 à 15 g masse humide. Cette consommation était causée par deux facteurs liés l'un avec l'autre, soit l'autoclavage et soit le processus d'adsorption d'oxygène à la surface du CAP. En effet, le processus d'autoclavage provoque un dégazage de l'eau jusqu'à des concentrations d'OD assez faibles soit 2,5 – 3,0 mg O_2/L . Comme les bouteilles sont fermées hermétiquement après l'autoclavage, l'eau conserve toujours des faibles concentrations d'OD. La

bouteille est cependant ouverte lors des manipulations précédentes l'essai afin d'ajouter le CAP, l'extrait de levure, etc. Il a été observé que ces manipulations haussaient la concentration d'OD, parfois jusqu'à 6 mg O₂/L. Les valeurs d'OD dans les bouteilles au début des essais étaient donc loin d'être en conditions de saturation soit 8,2 – 8,5 mg O₂/L. Ce déséquilibre entraînait une consommation rapide d'oxygène de quelques mg/L dès le début de l'essai dans le respiromètre Challenge AER-200. Pour le CAP-laboratoire fortement colonisé, cette consommation des témoins n'était pas gênante puisque la consommation d'OD était très élevée. Cependant, lorsque les essais ont débuté avec les échantillons CAP environnementaux, il est devenu apparent que la consommation d'OD induite par l'autoclavage devait être solutionnée. De plus, il semblait également que lors de l'autoclavage une certaine partie de la biomasse se détachait de la surface en libérant potentiellement les pores du charbon ce qui favoriserait l'adsorption de l'OD sur la surface de CAP. En effet, cette hypothèse était supportée par les observations de la biomasse colonisant la surface du CAP grâce à la technique Baclighttm. Lors de ces observations, il a été constaté que la lamelle commençait à chauffer et l'eau à se vaporiser après une plus longue exposition à la lumière de la lampe du microscope. La biomasse devenait alors rouge (c.-à-d. morte) et se détachait de la surface des particules du charbon ce qui se voit assez bien sur la photo de la figure 5.2. Alors, comme le processus de l'autoclavage chauffe l'eau on peut supposer que l'effet de décrochage se soit plus fortement exprimé.

Afin d'éviter les inconvénients dus à l'autoclavage, une alternative simple a été testée dans le but d'inhiber l'activité biologique soit l'ajout d'une solution de 1 g/L d'azide de sodium (NaN₃) (Lesage, 2009). De plus, l'eau du robinet déchlorée a été utilisée plutôt qu'une eau saline stérile.

La figure 5-11 présente les résultats de cette approche en la comparant à l'utilisation de solution saline stérilisée par autoclavage et à des échantillons environnementaux utilisant 1 g de CAP du procédé Opaline. L'utilisation d'eau du robinet déchlorée (ERD) avec du CAP autoclave provoque une consommation qui augmente lentement, mais atteint une consommation finale supérieure à celle de la solution saline stérile avec de CAP autoclavé. Enfin, l'utilisation de l'ERD combinée avec l'azide de sodium produit les plus faibles consommations. Comme cette approche (ERD+NaN₃) est également la plus simple à mettre en œuvre, elle a été par la suite utilisée pour préparer les échantillons témoins.

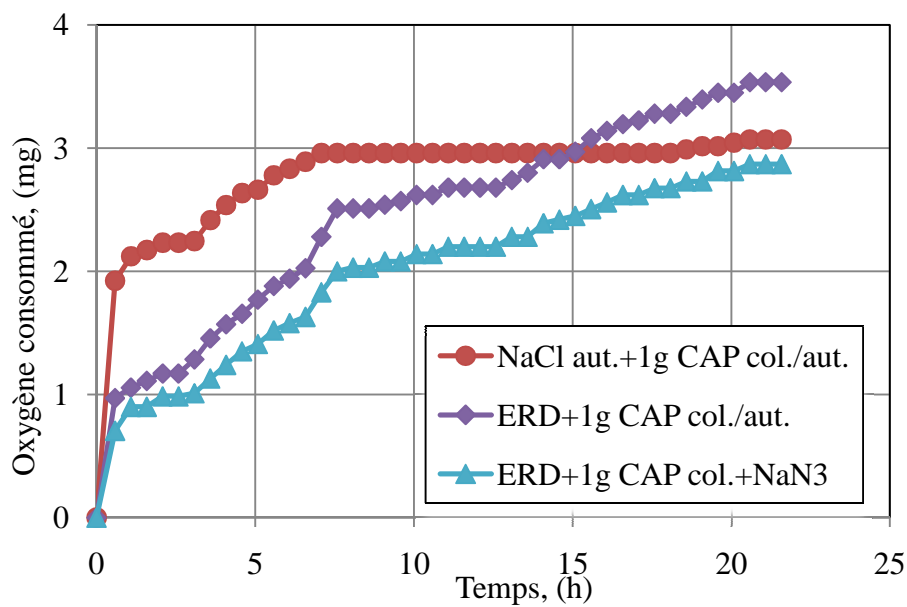


Figure 5-11. Consommation d'oxygène en fonction du temps pour les différents types de témoins testés dans le cas du CAP-Opaline. ERD-eau de robinet déchlorée, CAP col./aut.-charbon colonisé et ensuite autoclavé, NaN3-ajout de solution de NaN_3 (1g/L).

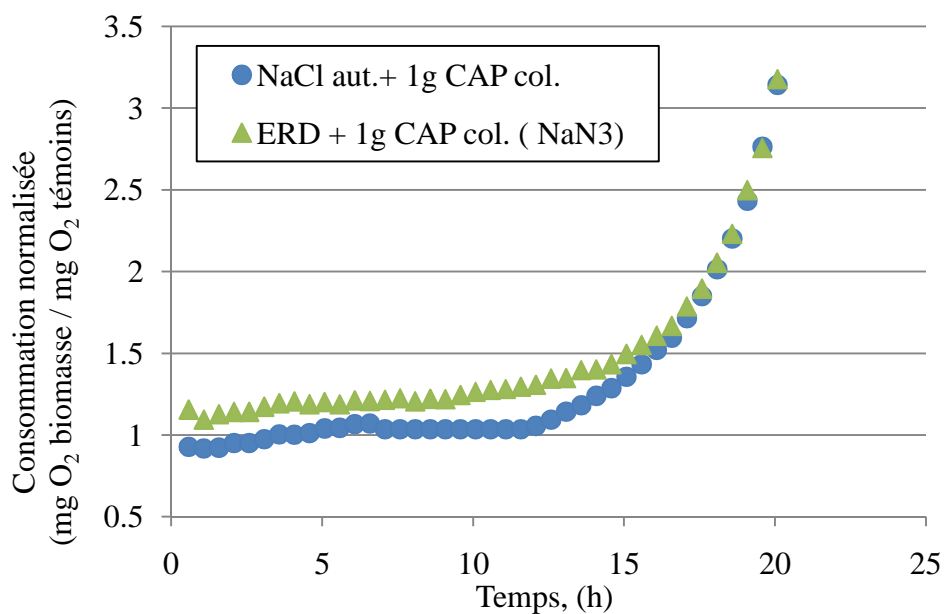


Figure 5-12. Consommation normalisée en fonction du temps pour du CAP-Opaline

D'un autre côté, on voulait savoir si les conditions testées permettaient d'obtenir des consommations d'OD qui étaient significativement supérieures à celles des témoins afin de

s'assurer de la sensibilité de la méthode. La figure 5-12 présente les courbes de la consommation d'OD normalisée des conditions testées en fonction du temps. Ces courbes sont obtenues en divisant la consommation des échantillons de CAP colonisés par celle de l'échantillon témoin. On note sur cette figure que l'utilisation d'azide de sodium a permis de maximiser la différence de consommation d'OD par rapport aux témoins. On doit tout de même attendre près de 15 heures avant que celle-ci soit 1.5X plus importante que celle des témoins. Comme l'azide donne de meilleures performances que l'autoclavage, celui-ci a été totalement remplacé par l'usage d'eau de robinet déchlorée avec ajout de NaN_3 pour la préparation des témoins. Cette approche permet ainsi d'augmenter la sensibilité de la méthode en réduisant la consommation d'oxygène du témoin.

5.2.2 Choix de la masse optimale de CAP-Opaline

Du 29 janvier au 10 février 2009, deux essais de respirométrie (900 rpm, 500 mg C/L d'extrait de levure, 0,16 g inhibiteur) ont été réalisés dans des bouteilles fermées dans le but de déterminer la masse optimale à utiliser. Le CAP-Opaline a été utilisé pour ces deux essais. Rappelons qu'une augmentation de la masse de CAP augmente la consommation d'oxygène par la biomasse, mais également par adsorption de l'OD sur le CAP. Les masses testées étaient : 3 g, 4 g, 5 g, 6 g, 8 g, 10 g, 12 g et 15 g (masse humide) dans 600 ml. Il est à noter que les essais ont été préparés selon la nouvelle méthodologie (ERD; NaN_3) décrite dans le chapitre 4.2.1.

On remarque à la figure 5-13 que les temps de latence sont influencés par la masse ajoutée : une plus grande masse diminue le temps de latence avant la phase exponentielle. Ce phénomène est particulièrement apparent sur la figure 5-13b. Pour les deux essais cependant, la croissance exponentielle progresse similairement pour les deux échantillonnages, et ce, indépendamment de la masse de CAP ajoutée. En effet, cette allure exponentielle des courbes signifiait une croissance de la biomasse non limitée par la concentration d'OD dans la bouteille. Cependant, il est à noter que les mesures d'OD faites à la fin des essais ont montré des concentrations finales d'environ 2 mg O_2/L pour les faibles masses de 0,1, 0,5 et 1,0 g (masse humide) et une absence d'OD dans les bouteilles avec des masses plus élevées (supérieures de 1 g).

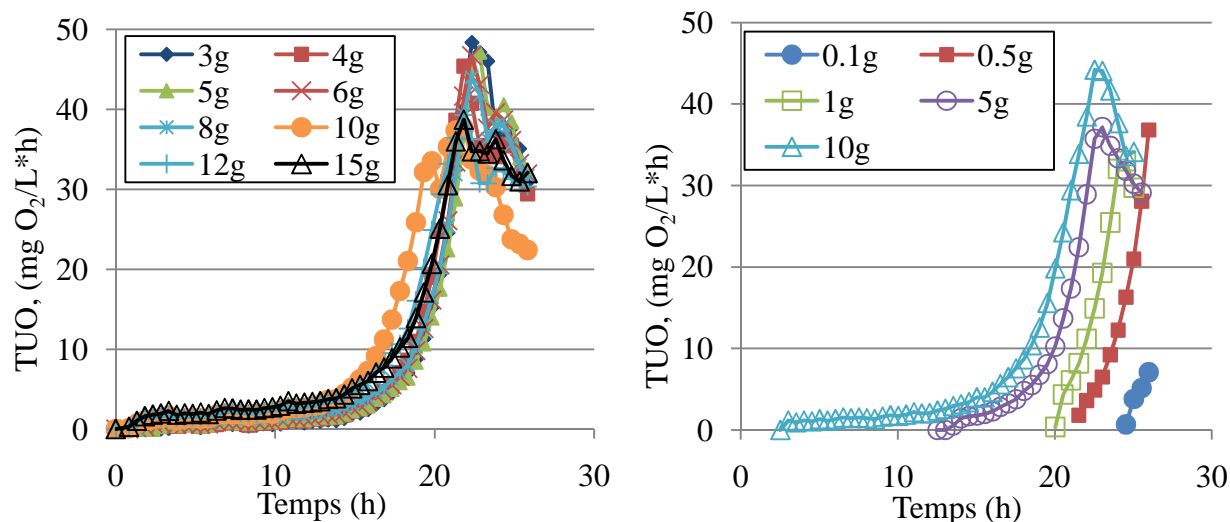


Figure 5-13. Courbes de TUD en fonction de temps : a) essai de 29 janvier 2009; b) essai de 10 février 2009. Vitesse d'agitation = 900rpm, $T=20^{\circ}\text{C}$, 500 ppm C/L (extrait de levure).

Alors, on suppose que grâce à la nouvelle méthodologie utilisée pour la préparation des essais (chapitre 4.2.1.2), le problème d'absence d'OD était partiellement résolu, c.-à-d. résolu pour les plus faibles masses testées. Par contre, pour les plus grandes masses de CAP (à partir de 3 g masse humide) le problème avec la faible concentration d'OD (inférieure de $0,3 \text{ mg O}_2/\text{L}$) était toujours présent. Alors, la plage de 0,5 à 1,0 g (masse humide) a été choisie comme optimale pour un essai de respirométrie dans le cas de CAP-Opaline avec le respiromètre AER-200. Cependant, la masse humide de 0,1 g n'était pas considérée dans la plage optimale à cause de l'absence d'une phase exponentielle.

5.2.3 Impacts de la masse sur la détermination de la concentration de biomasse hétérotrophe active

Les résultats des deux essais discutés précédemment (chapitre 5.2.2) ont été utilisés afin de définir l'impact du choix de la masse de CAP ajoutée sur le calcul de la concentration de biomasse active (Z_{BH}).

Les valeurs de Z_{BH} pour les deux essais réalisés avec le respiromètre sont présentées sur les figures 5-14. La méthode de Wentzel a été utilisée afin d'évaluer la biomasse hétérotrophe. Les pentes et ordonnées à l'origine ont été calculées pour la phase linéaire de la relation $\ln TUD$ vs t . Ces paramètres ont alors été injectés dans l'équation 2-7 afin d'obtenir Z_{BH} . La concentration de biomasse a finalement été normalisée en divisant par la masse sèche de CAP présente dans la

bouteille. Les mesures de biomasse, exprimées en $\mu\text{g DCO/L}$, ont été ramenées sur la base plus commune de $\mu\text{g C/L}$ en posant 0.52 g C/g MVES et $1.42 \text{ g DCO/g MVES}$.

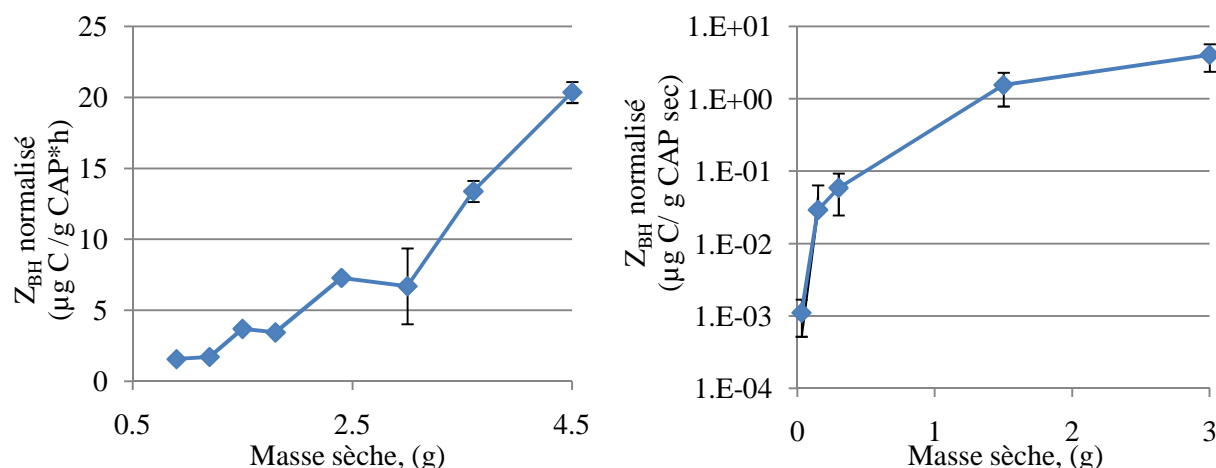


Figure 5-14. Z_{BH} normalisée en fonction de la masse sèche de CAP déterminée par la méthode de régression linéaire lors de choix de la masse optimale de CAP-Opaline pour : a) l'essai de 29 janvier 2010; b) l'essai de 10 février 2010.

Contrairement aux attentes, la valeur de Z_{BH} dépend de la masse de CAP utilisée. Une hausse de la masse de CAP augmente l'estimation de Z_{BH} . Le calcul de Z_{BH} est dominé par l'estimateur de l'ordonnée à l'origine, c'est-à-dire la phase de latence. Or, on a vu à la figure 5-14b que la masse influence grandement le temps de latence. Cette influence n'est pas contrebalancée par la normalisation qui consiste à diviser la valeur de Z_{BH} par la masse de CAP. Les valeurs de Z_{BH} des deux essais sont présentées à l'Annexe V, tableaux 9-4 et 9-5.

Enfin, on remarquera à la figure 5-14 qu'il y a une très importante différence de biomasse entre les deux essais. Cependant, la raison pour laquelle s'observe cette diminution n'a jamais été expliquée.

En conclusion, la valeur de Z_{BH} normalisée ($\mu\text{g C/g CAP sec}$) est fortement influencée par le choix de la masse de CAP utilisée. Suite à ce constat, il a été décidé de procéder à des essais avec un respiromètre en cuvée sans apport d'oxygène afin de mieux comprendre ce phénomène. Ces résultats seront présentés à la section 5.2.5.

5.2.4 Impact de la source de carbone

Le 27 avril 2010, trois différents types de substrat ont été testés dans le but de déterminer l'impact du choix de la source de carbone soit l'extrait de levure, l'acétate ou le glucose. La concentration de carbone ajoutée était de 500 mg C/L avec un ratio C : N : P de 100 : 10 : 1. La masse de charbon utilisée pour tous ces essais était de 1 g masse humide. Le CAP provenait du pilote Opaline et avait donc été colonisé en conditions environnementales. L'essai (n=2) était préparé selon la méthodologie décrite dans le chapitre 4.2.1.4. Étant donné que l'extrait de levure représente un composé chimique complexe formé de débris cellulaires, il a été supposé qu'elle possédait le ratio C : N : P désiré.

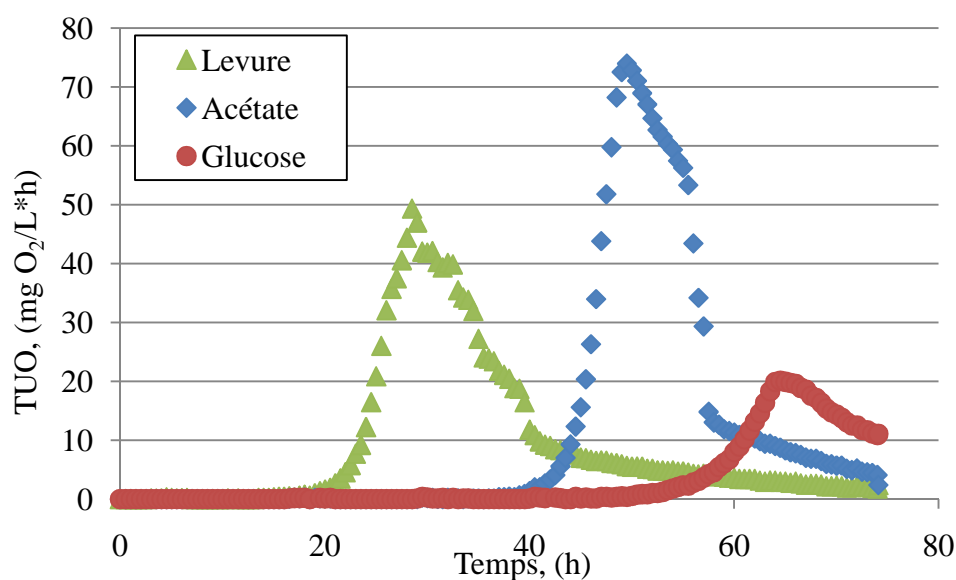


Figure 5-15. TUO en fonction du temps pour les trois types de substrat : extrait de levure, acétate et glucose. Agitation - 900 rpm, T =20°C, ratio C : N : P – 100 : 10 : 1. Masse humide – 1 g CAP-Opaline. Les courbes représentent un moyen de deux réplicatas.

Il est à noter qu'afin d'assurer les meilleures conditions pour un essai de respirométrie, le pH du milieu ambiant était mesuré après la préparation des échantillons. La plage dans laquelle pH oscillé avant le début des essais était de 7,5 à 7,9.

La figure 5-15 présente les valeurs du TUO pour les trois types de substrat utilisé en fonction du temps. Il se voit que la bouteille avec de l'extrait de levure comme source de carbone commence à consommer d'oxygène externe environ 20 heures après le début de l'essai ce qui est deux fois

plus rapide que pour l'échantillon avec l'acétate et trois fois plus rapide que pour les bouteilles avec le glucose.

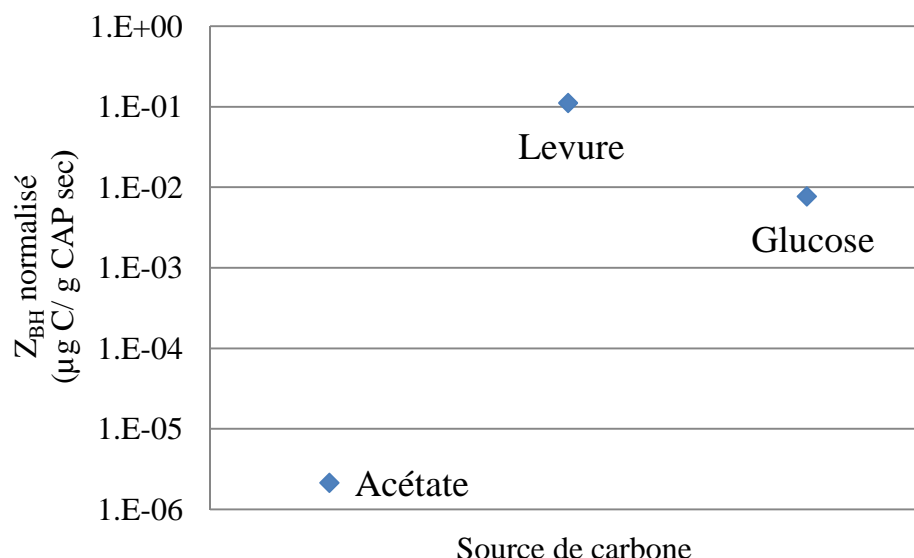


Figure 5-16. Z_{BH} normalisée en fonction du temps pour les trois types de substrat : extrait de levure, acétate et glucose. Agitation - 900 rpm, $T = 20^{\circ}\text{C}$, ratio C : N : P – 100 : 10 : 1. Masse humide – 1 g CAP-Opaline.

Quant à la biomasse, les résultats de l'essai ont été utilisés afin de calculer la concentration de la biomasse hétérotrophe aérobie (Z_{BH} exprimée en $\mu\text{g C/g CAP sec}$) pour les trois types de substrat (figure 5-16). On constate que la plus grande concentration de biomasse est déterminée avec l'extrait de levure comme source de carbone. Ensuite, on trouve la valeur du glucose et à la fin celle de l'acétate. Alors, l'extrait de levure a été retenu comme le meilleur choix entre les trois types de substrat testés. Ce choix était appuyé sur la simplicité et la rapidité de préparation des essais avec d'extrait de levure ainsi le fait qu'elle possède de C, N, P et les micronutriments nécessaires pour la croissance bactérienne. Les valeurs de la concentration de la biomasse hétérotrophe de cet essai sont présentées dans le tableau 9-6 à l'Annexe VI.

5.2.5 Essais de respirométrie en bouteille fermée

Pendant la période du 23 au 27 avril 2010, une dernière série d'essais de respirométrie a été effectuée avec du CAP-Opaline en utilisant cette fois une sonde mesurant la décroissance de l'OD dans une bouteille de respirométrie en présence de substrat. Le but était de mesurer la consommation d'oxygène en continu à court terme par la biomasse présente dans la bouteille de

respirométrie sans un apport d'oxygène externe et de confirmer l'impact de la masse de CAP utilisée sur l'estimation de la biomasse (Z_{BH}).

Sept différentes masses de CAP-Opaline ont alors été testées en duplicatas soit : 0,1 g, 0,5 g, 1 g, 5 g, 7 g, 9 g et 11 g (masse humide) par bouteille de 600 ml sous les conditions typiques d'incubation (500 ppm C d'extrait de levure, inhibiteur, $T=23-24$ °C). Les bouteilles étaient remplies au complet, soit 700 ml. La vitesse d'agitation était environ de 400 rpm, soit juste assez pour éviter la décantation du CAP. Dans le cas des essais en bouteille, l'agitation n'est pas utilisée pour transférer l'oxygène ce qui explique que nous ayons utilisé une valeur plus faible. Les courbes de la consommation d'oxygène normalisée et le TUO en fonction de temps sont présentées à la figure 5-17.

De la même façon que dans le cas de CAP-laboratoire, les valeurs du TUO et celles de la consommation d'oxygène diminuent avec l'augmentation de la masse de CAP. Cependant, la raison pour laquelle ces valeurs restent faibles touche l'épuisement de l'OD dans la bouteille qui devient alors le facteur limitant. Toujours à cause de l'épuisement de l'oxygène on n'observe pas une allure exponentielle pour le TUO des plus grandes masses testées (>1 g) (figure 5-17b).

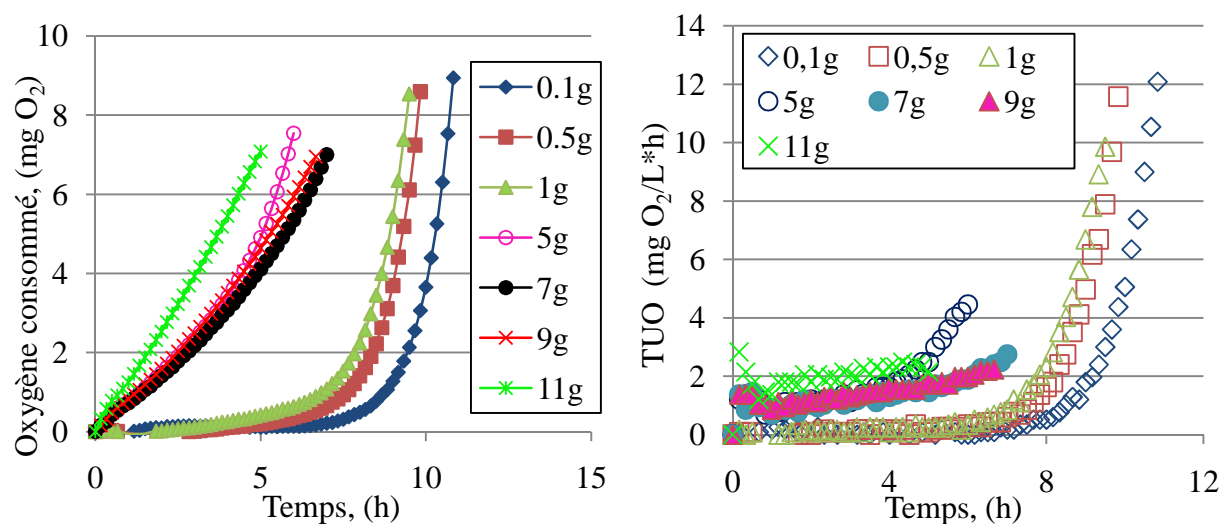


Figure 5-17. Consommation d'oxygène (a) et TUO (b) en fonction du temps pour tous les essais avec la sonde d'OD.

De la figure 5-18, il se voit que le charbon des témoins se sature pendant les premières quelques heures et que l'augmentation de la masse de CAP par bouteille diminue le temps de saturation du

témoin. Il y a donc un désavantage à utiliser une trop grande masse de CAP puisque la consommation abiotique augmente alors.

En réalité, les consommations d'oxygène des témoins lors des essais avec la sonde d'OD atteignent des valeurs dans la plage de 0,5 à 2,5 mg O₂ ce qui était déjà observé dans le cas des essais avec du CAP-Opaline et le respiromètre Challenge AER-200. Toutefois, la consommation des témoins lors des essais du CAP-Opaline avec le respiromètre augmente jusqu'à des valeurs de 2,9 mg O₂ au bout de 30 heures. En effet, la consommation des témoins des essais avec la sonde d'OD reste toujours inférieure (surtout pour les plus grandes masses testées) à celle avec le respiromètre à cause de l'épuisement de l'OD dans la bouteille. Les plus grandes masses de charbon adsorbent plus vite l'oxygène dans la bouteille de telle façon que le charbon est alors en compétition à court terme avec la biomasse pour la consommation d'oxygène.

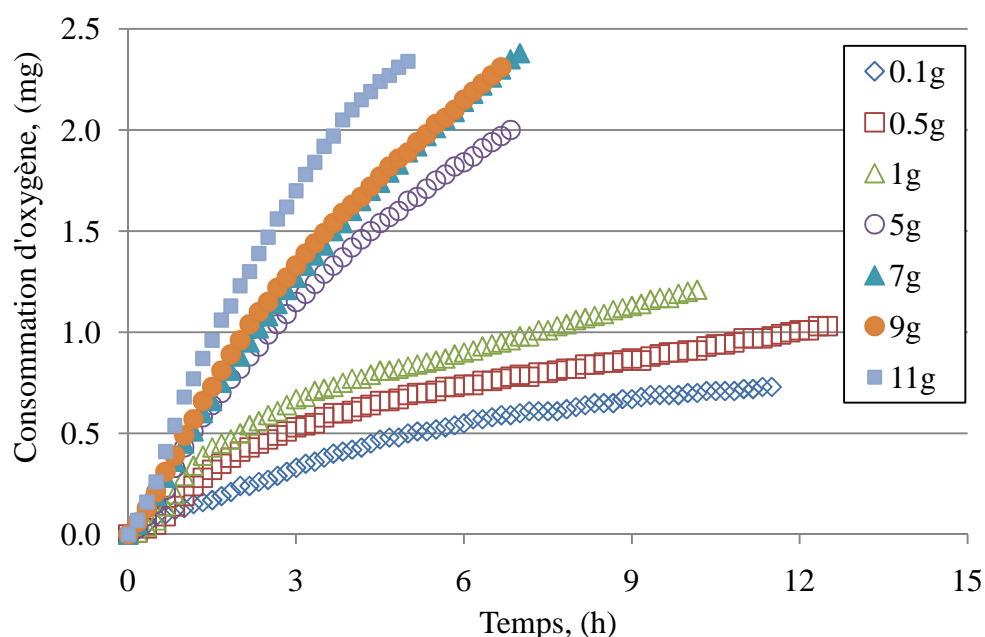


Figure 5-18. Consommation d'oxygène des témoins en fonction du temps pour tous les essais avec la sonde d'OD.

Quant à la méthode de régression linéaire, elle a été utilisée afin de calculer la concentration de la biomasse hétérotrophe aérobie (Z_{BH}) colonisant la surface du CAP-Opaline (figure 5-19). Les concentrations calculées pour toutes les masses testées sont présentées dans le tableau 9-7 à l'Annexe VII.

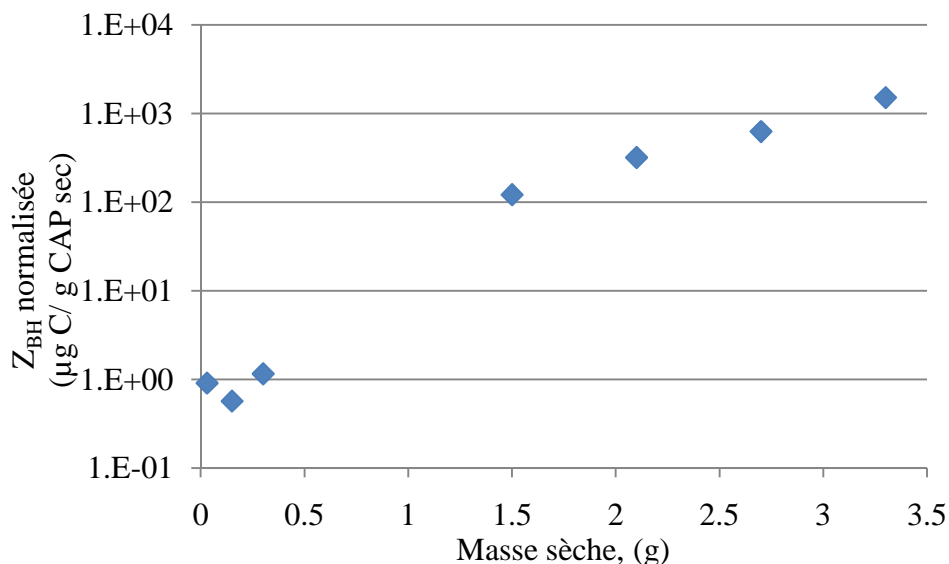


Figure 5-19. Z_{BH} normalisée en fonction de la masse sèche de CAP par bouteille pour les essais avec la sonde d'OD.

Tel que constaté précédemment dans le cas des essais avec le respiromètre Challenge AER-200 et du CAP-Opaline, on observe une augmentation des valeurs de Z_{BH} avec l'augmentation de la masse de CAP par bouteille. Cependant, nous sommes d'avis que seuls les résultats des masses de 0,1 g, 0,5 g et 1 g de CAP (masse humide) peuvent être acceptés comme pertinents. En effet, les courbes des plus grandes masses de CAP ne présentent pas la montée exponentielle caractéristique d'un essai de respirométrie. Cette situation est due au fait que les bouteilles avec 5-11 g de CAP consomment trop d'oxygène par adsorption (voir figure 5-19). Il apparaît donc souhaitable de limiter la masse de CAP ajoutée à moins de 1 g afin de limiter l'impact de l'adsorption sur le résultat de respirométrie.

5.3 Essais avec du CAG colonisé au laboratoire

Le 23 mars 2010, un essai de respirométrie (n=2) avec le respiromètre Challenge AER-200 a été réalisé avec de CAG provenant d'un filtre biologique de l'usine Sainte-Rose qui avait été alimenté pendant une semaine avec d'extrait de levure. L'essai était préparé selon la méthodologie décrite dans le chapitre 4.2.1.

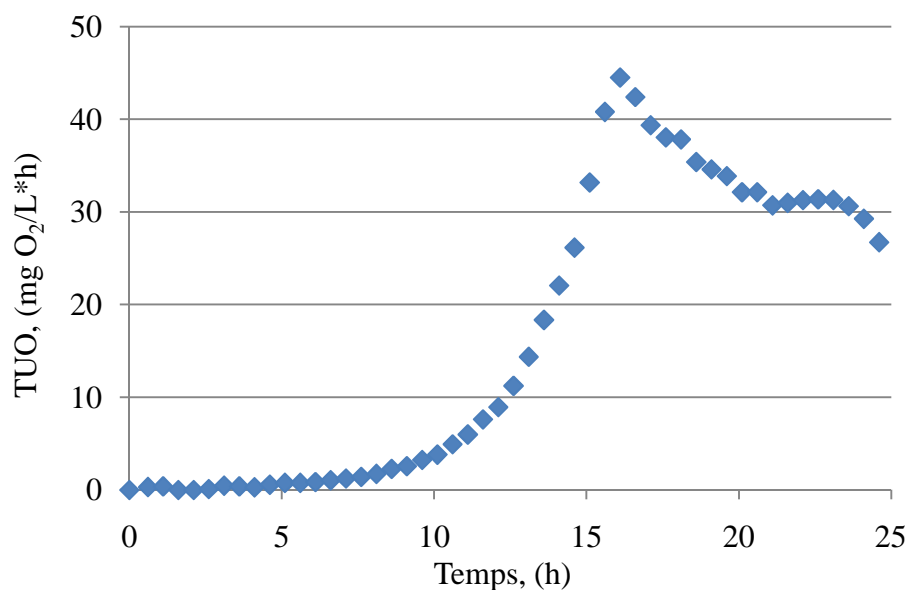


Figure 5-20. TUO en fonction du temps du CAG provenant de l'usine Sainte-Rose et colonisé au laboratoire à l'extrait de levure. Masse humide de charbon – 1 g; extrait de levure – 500 mg C/L; 0,16 g d'inhibiteur de nitrification, vitesse d'agitation – 900 rpm.

De la figure 5-20, on voit que le TUO en fonction du temps augmente de façon exponentielle ce qui signifie, comme il était discuté précédemment une croissance bactérienne non limitée par la concentration d'OD dans la bouteille. En effet, cela se doit à deux raisons : (i) la vitesse d'agitation utilisée lors des essais était de 900 rpm ce qui assurait un bon transfert d'oxygène; (ii) l'absence d'autoclavage du charbon et le milieu ambiant.

Quant à la méthode de régression linéaire, elle a été utilisée afin de calculer la concentration de la biomasse hétérotrophe aérobie colonisant la surface des graines du CAG. La valeur calculée est de 135 $\mu\text{g C/g CAG sec}$ (0,060 mg DCO/L) avec une pente de 0,4146 et une ordonnée à l'origine de -2,7844. La masse de CAG testée était de 1 g masse humide. Le ratio sec/humide était déterminé en triplicata, soit 0,34 [SDEV=0,01].

CHAPITRE 6. DISCUSSION

L'objectif de ce chapitre est de discuter et critiquer les résultats expérimentaux présentés précédemment de façon séquentielle. Afin de valider les résultats expérimentaux obtenus dans le cadre de ce projet, ils seront comparés avec ceux de la littérature scientifique. Finalement, des recommandations de conditions d'utilisation pour la suite des essais seront apportées.

6.1 Choix de témoin

Après les premières séries d'essais avec du CAP-laboratoire, il a été constaté une forte consommation d'oxygène des témoins autoclavés. En effet, la consommation augmentait de 0,3 à 1,1 mg O₂ par heure en augmentant la masse de CAP par bouteille de 1,0 g à 15 g (masse humide).

En théorie, le but d'un témoin de respirométrie est d'éliminer l'influence à la consommation non contribué par la respiration bactérienne. De plus, la préparation du témoin ne devrait pas influencer sa capacité de consommation d'oxygène. Cependant, comme il a déjà été mentionné, l'autoclavage dégazait l'eau et décrochait une partie de la biomasse de la surface du charbon.

Suite à l'essai du choix de témoin (section 5.2.1), l'azide de sodium proposé par Lesage (2009) à une concentration de 1g/L (dose de 600 mg) à été retenu comme inhibiteur d'activité biologique. L'azide est déjà connu comme un excellent inhibiteur bactérien dans le domaine de la respirométrie : 1,56 mg – Chandran et Smets et al. (1999), Guisasola et al. (2005); 0,13 mg – Sanchez et al. (2004).

Étant donné que le témoin préparé avec de l'ERD et de la solution d'azide de sodium (figure 5-11) avait la plus faible consommation d'oxygène par rapport les autres témoins, il a été choisi comme le « vrai témoin » pour un essai de respirométrie. Finalement, après le changement de la méthodologie, la consommation des témoins variait dans la plage de 0,03 à 0,15 mg O₂ par heure pour les masses humides de CAP de 1 à 15 g.

6.2 Impact de l'agitation pour les essais avec le respiromètre AER-200

La vitesse d'agitation est le paramètre le plus important contrôlant le transfert d'oxygène d'une phase gazeuse à une phase liquide (Freitas et Teixeira, 2001). Cependant, le transfert d'oxygène

augmente de façon linéaire avec l'augmentation de la vitesse d'agitation (Roman et Tudose, 1997; Freitas et Teixeira, 2001; Littlejohns et Daugulis, 2007). Par contre, le transfert d'oxygène diminue avec l'augmentation de la masse de CAP dans l'échantillon (Apar, 2010).

Dans leur article, Moon et Young, (2005) examinent les différents facteurs influençant le transfert d'oxygène de la phase gazeuse à la phase liquide lors d'un essai de respirométrie avec des boues activées. De plus, ils se servent du même type de respiromètre utilisé lors du présent projet soit le *Challenge AER-200*. De la même façon, Moon et Young constatent une augmentation de coefficient de transfert d'oxygène (respectivement du TUO) avec l'augmentation de la vitesse d'agitation.

Nous avons vu qu'une augmentation de la vitesse d'agitation de 400 rpm à 1000 rpm, le TUO se met à progresser de 5 à 35 mg O₂/L*h ce qui appuie les résultats précités. Cependant, les résultats montrent clairement qu'indépendamment la vitesse d'agitation, la concentration d'OD dans les bouteilles reste toujours négligeable à la fin des essais, sauf pour celle de 1000 rpm où les concentrations d'OD commencent à augmenter. Alors, on peut déduire qu'à partir de 1000 rpm, le transfert d'oxygène commence à couvrir partiellement le potentiel de respiration de la biomasse présent dans la bouteille. Donc, on pourrait penser à utiliser des vitesses d'agitation supérieures à 1000 rpm. Malheureusement, à des vitesses plus élevées, les barreaux devenaient instables et commençaient à sauter dans les bouteilles ce qui fausse alors les résultats expérimentaux. Finalement, étant donné la limite au niveau de la vitesse d'agitation, la seule solution qui était entreprise était celle de remplacer les barreaux magnétiques de 37×7 mm avec ceux 45×7 mm. Le choix de cette décision était appuyé par le fait que l'augmentation de la longueur des barreaux magnétiques augmente le TUO de façon linéaire (Moon et Young, 2005).

À la fin, la pertinence de cette décision a été confirmée lors des essais suivants avec une faible masse de CAP soit 1 g masse humide. Il demeure cependant le fait qu'il est serait préférable d'utiliser un respiromètre pour lequel les résultats ne sont pas étroitement liés au mode opératoire. Pour cette raison, nous avons abandonné l'utilisation du respiromètre AER-200 durant notre projet pour revenir vers un respiromètre en bouteille fermée sans apport externe d'oxygène.

6.3 Impact de la concentration du substrat

L'interprétation de l'essai sur l'impact de la concentration de carbone est problématique, car il est probable qu'il y ait eu une carence d'O₂ durant ces essais ce qui rend difficile l'interprétation d'une carence de carbone. En effet, il devait y avoir un autre facteur limitant étant donné l'absence d'une allure exponentielle de toutes les courbes, même celles pour une concentration de 5000 mg C/L (figure 5-7). En effet, on doit tenir compte aussi de la concentration d'OD qui pourrait être aussi un facteur limitant. En réalité, l'absence d'OD dans les bouteilles était confirmée par les mesures subséquentes d'OD faites juste à la fin d'autres essais. De plus, une odeur désagréable (marécageuse, plus forte dans les bouteilles de 500 mg C/L) était constatée après l'ouverture de toutes les bouteilles à la fin des essais. Cela sans doute signifiait la présence des conditions anaérobies développées lors des essais étant donné la présence de substrat et l'absence d'OD. Alors, on peut déduire que l'épuisement du carbone d'un côté et le faible taux de transfert d'oxygène de l'autre sont influencés en même temps les essais avec du CAP-laboratoire lors du choix de substrat.

Finalement, dans le but d'être conservatif, la concentration de 500 mg C/L a été retenue comme raisonnable pour un essai de respirométrie. En effet, des concentrations de cet ordre de grandeur sont déjà utilisées dans la pratique afin de déterminer l'activité bactérienne : Servais et al. (1991, 1992) – 500 mg C/L; Dallaire, (2009), Markarian et al. (2010) – 430 mg C/L.

Cependant, cette concentration de carbone ne peut pas être rencontrée en conditions naturelles. En effet, la concentration de carbone biodégradable dans les eaux d'une rivière varie en fonction des saisons et reste toujours négligeable (quelques milligrammes par litre) par rapport de la concentration choisie de 500 ppm C. Alors, afin de s'approcher au maximum aux conditions naturelles, il aurait été mieux de déterminer la fraction rapidement biodégradable de l'extrait de levure et par la suite d'utiliser une dose qui s'approche au maximum à ces conditions. Comme cela n'était jamais fait, il est recommandé que ces essais soient repris à l'avenir.

6.4 Impact du type de substrat

Le temps de latence des échantillons avec de l'extrait de levure comme source de carbone est deux fois inférieur à celui des bouteilles avec acétate et presque trois fois plus petit que celui des échantillons avec glucose. Il n'est donc pas surprenant que les valeurs de Z_{BH} varient selon la

source de substrat utilisée étant donné que le temps de latence influence grandement le calcul de Z_{BH} selon la méthode de Wentzel et al. (1995).

En théorie, il serait idéal d'utiliser le substrat auquel la biomasse est déjà acclimatée. Or, ce substrat est constitué d'un assemblage complexe de composés organiques variés impossibles à reproduire au laboratoire. La méthode de Urfer et Huck (2001) développée pour le CAG utilise un assemblage de quatre aldéhydes alors que Servais et al. (1991, 1992) utilisent plutôt le glucose. L'acétate de sodium nous apparaissait à priori un substrat intéressant puisque c'est un substrat simple qui peut être utilisé par toutes les bactéries hétérotrophes. Cependant, les résultats démontrent que l'utilisation d'extrait de levure raccourcit la durée de l'essai par rapport au glucose ou à l'acétate. En définitive, il a été retenu de choisir l'extrait de levure qui offre également comme autre avantage une plus grande simplicité en termes de manipulations au laboratoire. En effet, les bouteilles avec du glucose et l'acétate toujours nécessitaient une correction de pH avant l'ajout de la biomasse ce qui compliquait et prolongeait la procédure de préparation des échantillons. D'autre côté, il est possible que la présence de micronutriments naturellement présents dans l'extrait de levure explique ce résultat. En effet, des micronutriments n'étaient jamais ajoutés dans les bouteilles avec d'acétate et de glucose. Donc, les résultats de l'essai avec trois types de substrat peuvent être partiellement expliqués à l'aide de l'hypothèse d'une carence de micronutriments qui s'est produite tout au long des essais. Cependant, cette hypothèse n'a pas été validée et faite alors l'objet des futurs essais.

6.5 Respiromètre en bouteille fermée vs respiromètre Challenge AER-200

Il a été observé que la consommation d'oxygène commence après une certaine période de temps nommé *temps de latence*. En théorie, le temps de latence représente la période pendant laquelle les bactéries adaptent leurs appareils enzymatiques afin d'être capables d'assimiler le substrat présent. Cependant, le temps de latence enregistré avec le respiromètre ne correspond pas tout à fait à une phase d'adaptation de la biomasse au substrat. En réalité, le temps de latence enregistré à l'aide du respiromètre Challenge AER-200 représente le temps pendant lequel la biomasse épuise l'OD dans la bouteille jusqu'à un tel point, qu'elle commence à consommer de l'oxygène externe (provenant de la bonbonne d'oxygène pur), ce qui correspond au moment où le respiromètre enregistre la première consommation de la bouteille. Alors, un essai de respirométrie peut être séparé en deux parties différentes : (i) de l'ajout du CAP dans la bouteille

en présence de substrat jusqu'au moment où la bouteille commence à consommer d'oxygène externe (consommation à court terme); (ii) du moment où le respiromètre enregistre le début de la consommation d'oxygène externe jusqu'à la fin de l'essai (consommation à long terme). En effet, le respiromètre Challenge AER-200 ne mesure que la consommation bactérienne de la deuxième période d'un essai de respirométrie, c'est – à – dire qu'il ne tient pas compte de l'activité bactérienne à court terme. Autrement dit, le respiromètre Challenge AER-200 ne mesure que l'activité bactérienne d'une biomasse déjà habituée au substrat. Cependant, afin de déterminer quelle était la concentration réelle de la biomasse non adaptée au substrat, on devait examiner l'activité bactérienne à court terme afin de ne pas se trouver à privilégier la mesure de l'activité respiratoire de la fraction qui utilise et croit le plus efficacement sur l'extrait de levure.

Ainsi, ce nouvel argument explique pourquoi l'utilisation du respiromètre Challenge AER-200 a été abandonnée dans le but de poursuivre les essais avec du CAP-Opaline avec une sonde mesurant la décroissance de la concentration d'OD dans une bouteille fermée.

6.6 Paramètres influençant la méthode de Wentzel et al. (1995)

Les paramètres les plus importants qui influencent la méthode de Wentzel et al. (1995) pour évaluer la valeur de Z_{BH} sont le temps de latence et le type du substrat. Alors, il sera logique de supposer que la diminution du temps de latence corresponde à des concentrations de la biomasse plus élevées. Cependant, l'essai avec de trois types de substrat nous a montré que cette supposition n'était pas tout à fait juste. En effet, la bouteille avec du glucose avait un temps de latence de 60 heures et possédait pourtant plus de biomasse ($7,69 \times 10^{-3} \mu\text{g C/g CAP sec}$) que celle avec de l'acétate ($2,13 \times 10^{-6} \mu\text{g C/g CAP sec}$) avec un temps de latence de 40 heures. En réalité, la raison c'est que la pente de la croissance du glucose est inférieure (dégradation plus lente) à celle de l'acétate et intersectera également une ordonnée à l'origine supérieure à celui de l'acétate. Alors, on peut conclure que : (i) la méthode de régression linéaire ne tient pas compte ni de la vitesse de dégradation du substrat, ni du TUO maximal atteint lors de l'essai; (ii) un TUO plus élevé ne correspond pas toujours à une concentration de la biomasse plus élevée, mais plutôt à une activité plus élevée.

6.7 Masse optimale du charbon

Lors de présent projet, la masse optimale pour un essai de respirométrie était déterminée deux fois, soit pour les deux types de charbon testés : le CAP-laboratoire et le CAP-Opaline. En théorie, une masse de CAP sera optimale si son activité biologique est maximale pour un taux d'adsorption minimal.

Nous avons vu que, avec l'augmentation de la masse de CAP-laboratoire, les courbes perdent leurs allures exponentielles et deviennent plutôt linéaires. On observe également que le temps pour lequel le TUO atteint ses valeurs maximales diminue en augmentant la masse de charbon dans la bouteille. En réalité, la raison pour laquelle le TUO atteint ses valeurs maximales si vite (pendant les premières 5 heures de l'essai) c'est dû au charbon. Le CAP dans la bouteille adsorbe l'oxygène (encore plus après une étape d'autoclavage). Alors, il sera logique de supposer que si on met plus de charbon dans la bouteille, il faut s'attendre à un taux d'adsorption d'oxygène plus élevé ce qui était constaté sur les témoins. Alors, on peut déduire que l'augmentation de la masse de CAP par bouteille provoque une compétition entre la biomasse et l'adsorption sur le charbon au niveau de l'OD (figure 5-8). En effet, l'allure des courbes se transforme d'exponentielle, ce qui caractérise une croissance bactérienne (1 g de CAP), à linéaire ce qui décrit probablement plutôt la somme entre l'adsorption d'oxygène par le CAP et la consommation bactérienne.

Finalement, la masse humide de 1 g a été choisie comme optimale pour un essai de respirométrie dans le cas de CAP-laboratoire étant donné : (i) son allure exponentielle, (ii) les valeurs du TUO maximales et (iii) la faible consommation d'O₂ de son témoin.

Quant au charbon du pilote Opaline (figure 5-13), de la même façon comme pour le CAP-laboratoire, les plus faibles masses testées étaient choisies soit 0,5 et 1,0 g masse humide.

6.8 Comparaison des CAP de 25 et 200 µm

Concernant la différence entre les CAP de 25 et 200 µm, les résultats (avant la panne du système s'aération) indiquent (tableaux 9-2 et 9-3 à l'Annexe IV) que le CAP de 200 µm est beaucoup plus colonisé que celui de 25 µm ($p = 0,076$). Ce résultat est en contrevains avec les observations microscopiques et notre hypothèse de départ.

En effet, si on compare les deux diamètres de charbon de laboratoire pour le 22 juin 2009 (la date avant la panne du système d'aération), on verra que les 3 g de CAP de 25 μm possèdent de 5142 $\mu\text{g C/g CAP sec}$ alors que les 3 g de CAP de 200 μm possèdent plutôt de 9023 $\mu\text{g C/g CAP sec}$. De la même façon, les 6 g de CAP de 25 μm possèdent de 727 $\mu\text{g C/g CAP sec}$ alors que ceux de CAP de 200 μm hébergent de 6488 $\mu\text{g C/g CAP sec}$.

Alors, on voit qu'à cette date, le CAP de 200 μm est beaucoup plus colonisé que celui de 25 μm . Cependant, après la panne du système d'aération du réacteur de 200 μm , la concentration de la biomasse diminue au-dessous de celle du CAP de 25 μm ce qui se voit des résultats des tableaux 9-2 et 9-3 à l'Annexe IV. En effet, pendant les semaines qui suivent, le CAP de 25 μm possédait toujours plus de biomasse que celui de 200 μm pour les mêmes masses testées. Donc, on a posé l'hypothèse que les conditions anaérobies causées par la panne du système d'aération ont provoqué des changements physiques de la surface du charbon ce qui a diminué la surface accessible aux bactéries. Toutefois, cette hypothèse s'appuie sur l'observation des deux réacteurs tout au long du projet. En effet, le pH du réacteur de 200 μm diminuait plus lentement et exigeait des corrections une fois par 2-3 jours par rapport au réacteur de 25 μm où le pH devait être corrigé quotidiennement ce qui signifie une activité bactérienne plus élevée. Il est à noter que cette diminution du pH était due aux bactéries nitrifiantes qui étaient plus développées dans le réacteur du charbon de 25 μm .

D'un autre côté, la différence entre les deux diamètres en question est encore plus évidente en comparant les valeurs de Z_{BH} à la base de la surface totale (surface externe) des particules du charbon pour une masse donnée. Cependant, la surface des pores ne peut pas être utilisée étant donné leur diamètre soit 2-3 nm par rapport au diamètre d'une bactérie qui varie de 0,5 à quelques micromètres. Donc, la surface des pores n'est que de surface non colonisable. Alors, en utilisant juste la surface externe des particules du charbon des deux diamètres, on verra que les 3 g de CAP de 25 μm hébergent 9,6 mg C/m^2 alors que les 3 g de CAP de 200 μm possèdent plutôt de 135 mg C/m^2 . De la même façon, les 6 g de CAP de 25 μm possèdent de 1,4 mg C/m^2 alors que les 6 g de CAP de 200 μm hébergent plutôt de 97 mg C/m^2 .

Donc, on voit que pour les mêmes masses testées, le CAP de 200 μm possède beaucoup plus de biomasse par unité de surface que celui de 25 μm ce qui est en contrevains avec les observations microscopiques au début. Cependant, il est à noter qu'une autre observation au BacLight™ des

deux diamètres n'était pas faite jusqu'à la fin du projet. Donc, une prolifération de la biomasse sur la surface du CAP de 200 μm après l'observation au BacLighttm est tout à fait possible.

Par ailleurs, si on compare les valeurs de Z_{BH} du même diamètre de CAP mais obtenues avec des masses de 3 ou 6 g de CAP, on verra que la masse de 3 g possède des concentrations de biomasse supérieures à celles de 6 g ce qui n'est pas en accord avec les attentes. En théorie, deux fois plus de charbon doit avoir au moins deux fois plus de biomasse. En réalité, cela ne peut pas être observé à cause des facteurs suivant : (i) l'adsorption d'oxygène du charbon dans la bouteille de respirométrie qui diminue la concentration d'OD; (ii) l'absence d'OD dans les bouteilles (quelques heures après le début d'un essai) due aux faibles vitesses d'agitation et taux de transfert d'oxygène (TTO). En effet, plus la masse augmente, plus elle adsorbe d'oxygène. Alors, en augmentant la masse de CAP par bouteille, la concentration de l'oxygène disponible pour la respiration bactérienne diminuera ce qui faussera les résultats expérimentaux.

Finalement, la panne du système d'aération, ainsi que les conditions anaérobies tout au long des essais avec de CAP-laboratoire ne permettent pas une analyse assez précis surtout pour les plus grandes masses testées (supérieures à 3 g).

6.9 Comparaison entre CAP-laboratoire, CAP-Opaline et CAG-Sainte Rose

Sur la base de données acquises lors des essais de respirométrie, on peut également comparer le CAP-laboratoire avec le CAP-Opaline et le CAG-Sainte Rose. Alors, pour une masse humide de 1 g des trois types de charbon on constate que le CAP-laboratoire est colonisé par 1527 $\mu\text{g C/g}$ CAP sec par rapport au CAP-Opaline et CAG-Ste Rose qui possèdent de 0,059 $\mu\text{g C/g}$ CAP sec et 135 $\mu\text{g C/g}$ CAG sec respectivement. En effet, le CAP-laboratoire était colonisé avec des fortes doses d'extrait de levure (57 mg C/g CAP sec) ce qui explique la concentration bactérienne plus élevée. De son côté, le CAP-Opaline était colonisé de façon naturelle avec de l'eau décantée ozonée de la chaîne de traitement de l'usine. Alors, étant donné que l'eau naturelle est moins riche en nutriments que l'extrait de levure, il est normal que la concentration de la biomasse qui lui corresponde soit inférieure à celle de CAP colonisé à l'extrait de levure.

Quant au CAG-Ste Rose, il provenait d'un filtre biologique de l'usine Ste Rose. Cependant, il avait été alimenté au laboratoire pendant une semaine avec d'extrait de levure (projet d'Amélie

Reygrobellet) ce qui explique sa concentration de biomasse plus élevée que celle de CAP-Opaline. Cependant, on remarque que la concentration de la biomasse colonisant la surface de CAG atteint une valeur relativement élevée. En effet, il serait souhaitable d'effectuer des comparaisons sur du CAP et du CAG colonisés dans les mêmes conditions environnementales.

Par ailleurs, il a été constaté une différence significative en comparant les résultats du CAP-Opaline acquis lors des essais avec du respiromètre Challenge AER-200 et ceux acquis lors des essais avec la sonde d'OD (tableau 9-5 à l'Annexe VI et tableau 9-7 à l'Annexe VII). En effet, pour les mêmes masses testées, les concentrations acquises avec la sonde d'OD sont supérieures que celles obtenues avec le respiromètre (tableau 6-1).

Tableau 6-1. Valeurs de Z_{BH} des essais réalisés avec le respiromètre AER-200 et la sonde d'OD

Masse humide, (g)	Masse sèche, (g)	AER-200	Sonde OD
		$\mu\text{g C/g CAP sec}$	$\mu\text{g C/g CAP sec}$
0.1	0,03	0.00110	0.902
0.5	0,15	0.02910	0.566
1.0	0,3	0.05884	1.149

En théorie, les concentrations acquises avec la sonde d'OD doivent correspondre aux concentrations réelles de la biomasse au début de l'essai. De plus, la concentration de la biomasse doit augmenter tout au long d'un essai de respirométrie. Par contre, on voit que la biomasse déterminée à court terme (sonde) est supérieure à celle déterminée à long terme (respiromètre). Toutefois, on ne doit pas oublier le fait que les deux essais ne sont pas faits en mêmes temps. Alors, il est possible que cette différence soit due à la variation de l'activité bactérienne du CAP-Opaline avec le temps (exemple : résultats de 29 janvier et 10 février 2010 à l'Annexe 9-5). Alors, pour des résultats satisfaisants, les deux essais devraient être répétés la même journée.

6.10 Comparaison des résultats de la méthode de régression linéaire avec ceux de la littérature

En 2009, Dallaire a utilisé la méthode de régression linéaire (Wentzel et al., 1995) afin de déterminer la concentration de la biomasse hétérotrophe aérobie colonisant la surface de CAP de 25 et 200 μm (les deux charbons sont du même type que ceux utilisés dans le cadre de présent

projet). La méthodologie utilisée pour la préparation des essais est la même que celle décrite dans le chapitre 4.2.1. Contrairement au présent projet, Dallaire constate qu'il n'y a pas de différence significative entre les CAP de 200 μm et de 25 μm des bioréacteurs colonisés à la solution d'extrait de levure ($p = 0,86$). Cependant, il atteint la même conclusion que le CAP de 200 μm est plus colonisé que celui de 25 μm . En effet, les 3 grammes du CAP de 200 μm hébergeaient 1072 $\mu\text{g C/g CAP sec}$ de biomasse et les 3 grammes de CAP de 25 μm avaient 953 $\mu\text{g C/g CAP sec}$ de biomasse. Cependant, les valeurs de Z_{BH} (tableaux 9-2 et 9-3) calculées dans le cadre de présent projet pour la date du 22 juin 2009 (avant la panne du système d'aération) étaient de 5142 et 1079 $\mu\text{g C/g CAP sec}$ pour la même masse testée du CAP de 25 et 200 μm respectivement. Cependant, les raisons pour lesquelles on observe une différence entre les valeurs de Z_{BH} des deux études est probablement la dose d'extrait de levure ajoutée : tout au long de présent projet, les deux réacteurs étaient alimentés avec des fortes doses d'extrait de levure (57 mg C/g CAP sec) par rapport aux doses de Dallaire de 6 mg C/g CAP sec. Quant aux résultats pour la reste de période d'observation, (jusqu'au 23 juillet 2009), il était constaté que la panne du système d'aération avait nui à la biomasse aérobie. Sans savoir pourquoi, ce résultat se voyait mieux avec les plus grandes masses testées (6 g de CAP). De plus, le CAP de 200 μm commençait à coller plus facilement sur les murs du réacteur. De plus, l'eau est devenue plus visqueuse, ce qui réduisant l'évaporation. En effet, le réacteur de 25 μm subissait des ajouts de l'eau 2 fois par semaine tandis que celui de 200 μm , une fois à chaque deux semaines. À la fin, les observations sur le réacteur de 200 μm faites tout au long du présent projet nous ont permis de constater les changements physiques que le CAP subissait. De plus, il semblait que ces changements défavorisaient la croissance de la biomasse.

Dallaire a aussi réalisé des essais de respirométrie (selon la même méthodologie) avec du CAP provenant de 5 bioréacteurs d'Ara Markarian situés dans l'usine de purification des eaux Pont-Viau. Les résultats sont publiés dans Markarian et al. (2010). Chaque bioréacteur avait un volume d'un litre et était alimenté en eau ozonée de l'usine. Les concentrations de charbon dans les bioréacteurs étaient de l'ordre de 5 g/L ou de 25 g/L et un des bioréacteurs avait un âge de charbon de 30 jours. Alors que les deux premiers réacteurs possédaient du CAP de 25 μm du type Pica Hydro LP39, les autres possédaient du CAP de 200 μm du type Pica Hydro L30-260. Après la transformation des résultats de Markarian et al. (2010) à l'aide de la méthode de régression linéaire, on constate que pour la même concentration du charbon dans les réacteurs (5 g/L), le

CAP de 25 μm est beaucoup plus colonisé que celui de 200 μm soit 432 et 72 $\mu\text{g C/g CAP sec}$, respectivement. Quant les réacteurs de 25 g CAP/L, ils possèdent des concentrations de biomasse soit 5,9 et 20 $\mu\text{g C/g CAP sec}$ pour les réacteurs de 25 et 200 μm respectivement. De plus, on observe que l'augmentation de la masse de CAP dans les réacteurs nuit à l'activité bactérienne. En effet, pour le même diamètre de charbon, la concentration de la biomasse diminue avec l'augmentation de la concentration du charbon dans le réacteur de 5 à 25 g/L soit respectivement de 432 à 5,9 $\mu\text{g C/g CAP sec}$ pour les réacteurs de 25 μm et de 72 à 20 $\mu\text{g C/g CAP sec}$ pour les réacteurs de 200 μm . Donc, on peut poser l'hypothèse que si la concentration du substrat ajouté dans les deux réacteurs du présent projet était plus faible l'effet de la concentration de CAP constaté par Markarian et al. (2010) aurait aussi été observé. Cependant, la forte concentration d'extrait de levure ajoutée a engendré une biomasse plus colonisée.

Alors, étant donné les résultats discutés ci-dessus, on peut formuler les conclusions suivantes : (i) le diamètre a un effet significatif sur la colonisation du CA, en effet le CAP de 200 μm est plus favorable à la colonisation que celui de 25 μm ; (ii) un plus long arrêt du système d'aération (quelques jours) peut diminuer de façon significative la concentration de la biomasse aérobie sur la surface du charbon.

Quant au CAG de Reygrobellet (2010) mentionné précédemment, la concentration de la biomasse colonisant sa surface de charbon peut être comparée avec celle de Servais et al. (1991). Servais détermine la concentration de la biomasse hétérotrophe aérobie dans un filtre biologique à l'aide d'une nouvelle (à cette époque-là) méthode nommée méthode au glucose radioactif. La méthode consiste l'ajout du glucose radioactif (^{14}C -glucose) dans un volume fermé en présence du charbon actif en grains biologique (CAGB) et une trappe de KOH qui adsorbe le $^{14}\text{CO}_2$. La biomasse consomme le ^{14}C -glucose et expiré de $^{14}\text{CO}_2$ proportionnel à la consommation du ^{14}C -glucose.

Tout au long de ces essais, Servais et al. (1991) déterminent que la concentration de la biomasse hétérotrophe aérobie dans les filtres biologiques étudiés varie de 2,5 à 10,9 $\mu\text{g C par cm}^3$ d'échantillon. À l'aide du volume de l'échantillon (2 mL) et la masse humide de CAG (1,28 g/mL) on retrouve une concentration de la biomasse qui varie de 5,7 à 25 $\mu\text{g C/g CAG sec}$. Alors, à titre comparatif les deux CAG (d'Amélie et de Servais) possèdent des concentrations de biomasse très semblables. Cependant, il est normal que le CAG-Ste Rose soit plus riche en biomasse puisqu'il était colonisé à l'extrait de levure pendant une semaine. Cependant, la

présence d'un seul essai avec du CAG-Ste Rose ne permet pas de déterminer quelle est l'ampleur de la plage de variation de la concentration de la biomasse sur le CAG-Ste Rose. Cela devra faire l'objet des études suivantes.

CHAPITRE 7. CONCLUSION

Dans le cadre de ce projet, le développement de la méthode de respirométrie pour mesurer l'activité de la biomasse hétérotrophe sur du CAP a été réalisée. Deux différentes sources de CAP étaient alors examinées, soit du CAP de 25 et 200 μm colonisé au laboratoire et, soit du CAP provenant du pilote Opaline de la chaire GRSNG en eau potable. De plus, la méthode de Wentzel et al. (1995) a été utilisée afin d'évaluer la biomasse hétérotrophe sur le CAP. Les résultats reçus tout au long de ce projet nous ont permis de développer la méthode de respirométrie dans le cas de CAP. Quant aux objectifs spécifiques, la majeure partie de ceux-ci a été réalisée et plusieurs conclusions ont été élaborées suite à l'évaluation des résultats acquis tout au long de ce projet. Ainsi, on peut résumer les conclusions suivantes :

1. En ce qui concerne les échantillons témoins :
 - la préparation de la solution d'ensemencement par autoclavage n'est pas recommandée, car elle cause une réduction de l'OD. La simple utilisation de l'eau du robinet déchlorée donne des résultats satisfaisants.
 - en alternative à l'autoclavage, l'activité biologique des témoins peut être inhibé par une dose de 1 g/L de NaN_3 représente une excellente alternative à l'autoclavage.
2. En ce qui concerne le choix de la technique respirométrique :
 - le respiromètre utilisé lors des essais (Challenge AER-200) ne mesure que l'activité bactérienne à long terme. En effet, le respiromètre enregistre la consommation d'oxygène de l'échantillon à partir du moment où la bouteille commence à consommer l'oxygène externe.
 - la mesure de l'OD dans une bouteille fermée sans apport externe d' O_2 est préférée à l'utilisation du respiromètre Challenge AER-200, car il simplifie l'interprétation des résultats en éliminant toute la question de l'efficacité de transfert de l' O_2 externe et en permettant une mesure à court terme de la consommation d'OD dans les échantillons.
3. En ce qui concerne les conditions de réalisation des essais :
 - l'utilisation d'une masse trop élevée biaise le résultat de respirométrie en raison de l'impact de l'adsorption du CAP sur la consommation d' O_2 . Il est souhaitable d'utiliser moins de 0,5 à 1,0 g de CAP (masse humide).
 - l'extrait de levure, à une concentration de 500 mg C/L, a été retenu comme substrat;

- les barreaux magnétiques de 45×7 mm (*Fisher Scientific*) sont préférables pour un essai de respirométrie.
 - la vitesse d'agitation de 900 rpm est préférable pour des essais avec le respiromètre Challenge AER-200.
4. En ce qui concerne les comparaisons d'activité sur du charbon actif :
- le CAP de 200 µm est plus colonisé que celui de 25 µm. De plus, il était constaté que le charbon de 200 µm subit avec le temps des changements physiques qui défavorisent la croissance bactérienne (c.-à-d. une floculation);
 - le CAP colonisé au laboratoire avec de l'extrait de levure est plus colonisé que celui provenant du pilote Opaline colonisé de façon naturelle;
 - le CAG-Ste Rose colonisé pendant une semaine à l'extrait de levure possède plus de biomasse que le CAP-Opaline colonisé de façon naturelle.

RÉFÉRENCES

- Abson, J. W., Furness, C. D. & Howe, C. (1967). Development of the Simcar respirometer and its application to waste treatment. *Water Pollution Control*, 607-621.
- Aichinger, G., Grady, Jr. C. P. L. & Tabak, H. H. (1993). Application of respirometric biodegradability to slightly soluble organic compounds, *Water Environment Research*. 64(7), 890-900.
- Aktas, O., & Çeçen, F. (2007). Bioregeneration of activated carbon: a Review. *Int. Biodeter. Biodegr.* 59(4), 257–272.
- Apar, D. K. (2010). Gas-liquid mass transfer studies for biomass support materials in a bioreactor. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 85(5), 668-673.
- Arthur, R. M. (1964). An automated BOD respirometer. Proceeding of 19th. *Purdue Industrial Waste Conference, W. Lafayette, Indiana*, 628-638.
- Arthur, R. M. & Hursta, W. N. (1968). Short term BOD using the automatic respirometre. Proceeding of 23rd *Purdue Industrial Waste Conference, W. Lafayette, Indiana*, 242-250.
- Arthur, R. M. (1979a). On-line instruments and their use in activated sludge process control. *Advances in Instrumentation. Proceedings of the ISA Conference and Exhibit.* 34(1), 309-318.
- Arthur, R. M., Kent, L. W. & Raymond, R. J. (1979b). Automatic respirometry – a unique tool for determining dign parameters for a cannery domestic wastewaters treatment plant. *Proceeding of 34th Purdue Industrial Waste Conference, W. Lafayette, Indiana*, 309-318.
- Arthur, R. M. (1985). Twenty years on respirometry. *Proceedings of the 39th Purdue Industrial Waste Conference, W. Lafayette, Indiana*, 861-874.
- Arthur, R. M. & Arthur, R. (1994). Thirty years of respirometry, *Proceeding of 34th Purdue Industrial Waste Conference, W. Lafayette, Indiana*, 14.
- Benes, O., Spanjers, H. & Holba, M. (2002). Respirometry techniques and activated sludge models. *Water Science and Technology*, 46(4–5), 1–6.

- Blenkinsopp, S. A. & Lock, M. A. (1989). The measurement of electron transport system activity on river biofilms. *Water research*, 24(4), 441-445.
- Bridie, A. L. (1969). Determination of biochemical oxygen demand with continuous recording of oxygen uptake. *Water Research*. 3, 157-165.
- Brown, S. C., Grady, Jr. C. P. L. & Tabak, H. H. (1990). Biodegradation kinetics of substituted phenolics : demonstration of a protocol based on electrolytic respirometry. *Water Research*. 24(7), 853-861.
- Cech, J. S., Chodoba, J. & Grau, P. (1985). Determination of kinetic constants of activated sludge microorganisms. *Water Science and Technology*. 17, 259-272.
- Chandran, K. & Smets, B. (1999). Nitrification inhibition measurement using a rapid extant respirometric assay. *Proceedings of the Mid-Atlantic Industrial Waste Conference*, 79-88.
- Chu, K. H., van Veldhuizen, H. M. & van Loosdrecht, M. C. M. (2003). Respirometric measurement of kinetic parameters: effect of activated sludge floc size. *Water Science and Technology*, 48(8), 61-68.
- Cokgor, E. U., Sozen , S., Orhon, D. & Henze, M. (1998). Respirometric analysis of activated sludge behaviour – I Assessment of the readily biodegradable substrate. *Wat. Res.*, 32(2), 461-475.
- Cokgor, E. U., Zengin, G. Z., Tas, D. O., Oktay, S., Randall, C. & Orhon, D. (2006). Respirometric Assessment of Primary Sludge Fermentation Products. *Journal of Environment Engineering*, 132(1), 68-74.
- Cokgor, E. U., Sozen, S. Insel, G. & Orhon, D. (2009). Respirometric evaluation of biodegradation characteristics of dairy wastewater for organic carbon removal. *Environmental Technology*, 30(11), 1169-1176.
- Constable, S. W., Rozich, A. F., DeHaas, R. & Colvin, R. J. (1992). Respirometric investigation of activated sludge bioinhibition by cobalt/manganese catalyst. *Proceeding of 46th Purdue Industrial Waste Conference, W. Lafayette, Indiana*, 659-670.

- Dallaire, P. O. (2009). Développement d'une méthode de quantification de la biomasse sur du charbon actif en poudre. *Mémoire de maîtrise, École Polytechnique de Montréal, Québec, Canada.*
- Daebel, H., Manser, R. & Gujer, W. (2007). Exploring temporal variations of oxygen saturation constants of nitrifying bacteria. *Water Research*, 41(5), 1094-1102.
- Deininger, R. A. & Lee, J. Y. (2001). Rapid determination of bacteria in drinking water using an ATP assay. *Field Analytical Chemistry & Technology*, 5(4), 185-189.
- Desjardins, R. (1997). Le traitement des eaux 2^e éd., *Éditions de l'École Polytechnique de Montréal, Montréal.*
- De Jonge, R.J., Breure, A.M., & Andel, J.G., (1996a). Bioregeneration of powdered activated carbon (PAC) loaded with aromatic compounds. *Water Res*, 30(4), 875– 882.
- Dimock, R. et Morgenroth, E. (2006). The influence of particle size on microbial hydrolysis of protein particles in activated sludge. *Water Research*, 40(10), 2064-2074.
- Edwards, G. L. & Sherrard, J. H. (1982). Measurement and validity of oxygen uptake as an activated sludge process control parameter. *Journal WPCF*. 54(12), 1546-1552.
- Fonseca, A. C., Scott Summers, R. & Hernandez, M. T. (2001). Comparative measurements of microbial activity in drinking water biofilters. *Water Research*, 35(16), 3817-3824.
- Gaudy, Jr., A. F., Rozich, A. F., Garniewski, S., Moran, N. R. & Ekambaran, A. (1988a). Methodology for utilizing respirometric data to assess biodegradation kinetics. *Proceedings of the 42th Purdue Industrial Waste Conference, W. Lafayette, Indiana*. 573-585.
- Guisasola, A., Jubany, I., Baeza, J. A., Carrera, J. & Lafuente, J. (2005). Respirometric estimation of the oxygen affinity constants for biological ammonium and nitrite oxidation. *Journal of chemical technology and biotechnology*, 80(4), 388 -396.

- Guwy, A. J., Buckland, H., Hawkes, F. R. & Hawkes, D. L. (1998). Active biomass in activated sludge: Comparison of respirometry with catalase activity measured using an on-line monitor. *Wat. Res.*, 32(12), 3705-3709.
- Huang, J. Y. C., Cheng, M. D. & Mueller, J. T. (1985). Oxygen uptake rates for determining microbial activity and application. *Water research*. 19(3), 373-381.
- Hurst, C. J. (1992). *Modeling the metabolic and physiologic activities of microorganisms*, John Wiley and Sons, Inc., New York.
- Hobbie, J. E., Daley, R. J. & Jasper, S. (1977). Use of nuclepore filters for counting bacteria by fluorescence microscopy. *Appl. Environ. Microbiol.*, 33(5), 1225-1228.
- Ivancev-Tumbas, I., Dalmacija, B., Tamas, Z., Karlovic, E., 1998. Reuse of biologically regenerated activated carbon for phenol removal. *Water Research*, 32(4), 1085–1094.
- Jenkins, D. (1960). The use of manometric methods in the study of sewage and trade wastes. *Waste Treatment-Proceedings of the Second Symposium of Wastewaters, Ed, Issac, P.C.G., Pergamon Press*, 97-125.
- Kappeler, J. & Gujer, W. (1992). Estimation of kinetic parameters of heterotrophic biomass under aerobic conditions and characterization of wastewater for activated sludge modeling. *Wat. Sci. Tech.*, 25(6), 125–139.
- Kim, C., & Koopman, B. (1994). INT-Dehydrogenase activity test for assessing chlorine and hydrogen peroxide inhibition of filamentous pure cultures and activated sludge. *Water research*, 28(5), 1117-1121.
- King, E. F. & Duka, B. J. (1986). Respirometric techniques. *Toxicity Testing Using Microorganisms. Ed. Issac, P. C. G., Pergamon Press*, 97-125.
- Lee, K.M., Lim, P.E., 2005. Bioregeneration of powdered activated carbon in the treatment of alkyl-substituted phenolic compounds in simultaneous adsorption and biodegradation processes. *Chemosphere*, 58(4), 407–426.

- Lesage, G. (2009). Etude de l'élimination de substances aromatiques dangereuses dans un procédé couplant adsorption et biodegradation. *Thèse de doctorat, INSA de Toulouse, France.*
- Liang, C. H., Chiang, P. C. & Chang, E. E. (2003). Systematic Approach to Quantify Adsorption and Biodegradation Capacities on Biological Activated Carbon Following Ozonation. *Science and Engineering*, 25(5), 351-361.
- Madden, M. & Tittlebaum, M. (1984). Oxygen uptake rates associated with biological treatment of pentachlorophenol wastewater. *Journal Environ. Sci. Health*. 321-335.
- Magic-Knezev, A. & Van der Kooij, D. (2004). Optimisation and significance of ATP analysis for measuring active biomass in granular activated carbon filters used in water treatment. *Water Research*, 38(18), 3971-3979.
- Mahendraker, M., & Viraraghavan, T. (1995). Respirometry in the Environmental Engineering. *Environ. Sci. Health*. 30(4),713-734.
- Marsili-Libelli, S., D'Ardes, V. & Bondi, C. (2008). Development of a open-vessel single-stage respirometer. *Water Science and Technology*, 57(10), 1675-1682.
- Mathieu, S. & Entienne, P. (2000). Estimation of wastewater biodegradable COD fraction by combining respirometric experiments in various So/Xo ratios. *Wat. Res.*, 34(4), 123-1246.
- Metcalf and Eddy, Inc. (2003). Wastewater Engineering – Treatment and reuse. 4^e éd., *McGraw-Hill, NY.*
- Moon, H. M. & Young, J. C. (2005). Factors affecting oxygen-transfer rates in headspace-gas respirometers. *Water Environment Research*, 77(5), 465-471.
- Monod, J. (1949). The growth of bacterial cultures, *Annual Review of Microbiology*, 3, 371-394.
- Munz, G., Gori, R., Cammilli, L. & Lubello, C. (2008). Characterization of tannery wastewater and biomass in a membrane bioreactor using respirometric analysis. *Bioresource Technology*, 99(18), 8612-8618.

- Mytelka, A.I. & Brenner, W.E. (1970). An automatic recording respiromètre. *ISA Transactions*, 9(1),17-21.
- Naziruddin, M., Grady, Jr. C. P. L. & Tabak, H. H. (1993). Determination of biodegradability kinetics of volatile organic compounds through the use of respirometry. *Water Environment Federation, 66 th Annual Conference and Exposition, Proceeding, Anaheim, CA, Oct. 2-7*, 361-372.
- Orshansky, F., Narkis, N., (1997). Characteristics of organics removal by PACT simultaneous adsorption and biodegradation. *Water Res.* 31(3), 391–398.
- Orhon, D., Sozen, S. & Artan, N. (1996). Effect of heterotrophic yield on the assessment of the correction factor for anoxic growth. *Water Science and Technology*. 34(5-6 pt 3), 67-74.
- Patoczka, J., Puliam, G. W. & Chowning, G. L. (1989). Determination of toxicity thresholds of industrial wastewaters to activated sludge process using fed batch reactor. *Proceeding of 43th Purdue Industrial Waste Conference, W. Lafayette, Indiana*. 51-59.
- Reygrobelle, A. (2010). Impacts des conditions d'exploitation sur les performances d'un filtre au charbon actif biologique (CAB). *Mémoire de maîtrise, École Polytechnique de Montréal, Québec, Canada*.
- Ros, M., Dular, M. & Farkas, P. (1988a). An improved method using respirography for the design of activated aeration systems. *Water Research*. 22(12), 1483-1489.
- Ros, M., Dular, M. & Farkas, P. (1988 b). Measurement of respiration of activated sludge. *Water Research*. 22(11), 1405-1411.
- Ros, M. (1993). Respirometry of activated sludge. *Technomic Publishing Co. Inc, Lancaster, Pennsylvania, US*.
- Sanchez, O., Aspé E., Marti, M. C. & Roeckel, M. (2004). The effect of sodium chloride on the two-step kinetics of the nitrifying process. *Water Environ. Res.* 76(1), 73-80.
- Servais, P., Billen, G., Ventresque, C., & Bablon G.P. (1991). Microbial activity in GAC filters at the Choisy-le-Roi treatment plant. *J. AWWA*. 83(2), 62-68.

- Servais P., Billen G., Bouillot P. & Benezet M. (1992). A pilot study of biological GAC filtration in drinking water treatment. *J. Water SRT-Aqua* 41(3), 163.
- Servais, P., Laurent, P., & Randon, G. (1992). Mesure de la biomasse et de l'activité bactérienne dans l'eau de distribution. *Revue des sciences de l'eau*. 5 (4), 473-488.
- Servais, P., Billen, G. & Bouillot, P. (1994). Biological colonization of granular activated carbon filters in drinking- water treatment. *Journal of Environmental Engineering*, 120(4), 888-899.
- Seredynska-Sobecka, B., Tomaszewska, M., Janus, M., & Morawski, A. (2006). *Biological activation of carbon filters*. *Water research*. 40(16), 355-363.
- Sierp, F. (1928). A new method for determining biochemical oxygen demand. *Industrial and Engineering Chemistry*, 20(3), 247.
- Silva, M., Fernandes, A., Mendes, A., Manaia, C.M., Nunes, O.C., 2004. Preliminary feasibility study for the use of an adsorption/bioregeneration system for molinate removal from effluents. *Water Res.* 38(11), 2677–2684.
- Spanjers, H. & Vanrolleghem, P. (1995). Respirometry as a tool for rapid characterization of wastewater and activated sludge. *Wat. Sci. Tech.*, 31(2), 105-114.
- Spanjers, H., Vanrolleghem, P., Olsson, G. & Dold, P. (1996). Respirometry in control of the activated sludge process. *Wat. Sci. Tech.*, 34(3-4), 117-126.
- Spanjers, H., Takacs, I. & Brouwer, H. (1999). Direct parameter extraction from respirograms for wastewater and biomass characterization. *Wat. Sci. Tech.*, 39(4), 137-145.
- Spérandio, M., Urbain, V., Ginestet, P., Audic, M. J. & Paul, E. (2001). Application of COD fractionation by a new combined technique: comparison of various wastewaters and sources of variability. *Water Science and Technology*, 43(1), 181–190.
- Sperandio, M., Masse, A., Espinosa-Bouchot, M. C. & Cabassud, C. (2005). Characterization of sludge structure and activity in submerged membrane bioreactor. *Water Science & Technology*, 52(10–11), 401-408.

- Stephenson T., Judd, S., Jefferson, B., & Brindle, K. (2000). Membrane bioreactors for wastewater treatment. *IWA London*.
- Stewart, M. H., Wolfe, R. L. & Means, E. G. (1990). Assessment of the bacteriological activity associated with granular activated carbon treatment of drinking water. *Appl. Environ. Microbiol.*, 56(12), 3822-3829.
- Strotmann, U. J., Geldem, A., Kuhn, A., Gendig, C. & Klein, S. (1999). Evaluation of a Respirometric Test Method to Determine the Heterotrophic Yield Coefficient of Activated Sludge Bacteria. *Chemosphere*. 38(15), 3555-3570.
- Syamsiah, S., Hadi, I.S., 2004. Adsorption cycles and effect of microbial population on phenol removal using natural zeolit. *Sep. Purif. Technol.* 34(1-3), 125–133.
- Tebbutt, T. H. Y. & Berkun, M. (1976). Respirometric determination of BOD. *Water Rescherch*, 10(7), 613-617.
- Therien, N., Le Calve, P. & Jones, P. (1984). A respirometric study of the influence of aliphatic alcohols on activated sludges. *Water Research*. 18(7), 905-910.
- Urfer, D. & Huck P. M. (2001). Measurement of biomass activity in drinking water biofilters using a respirometric method. *Wat. Res.*, 35(6), 1469–1477.
- Vanrolleghem, P. A., Spanjers, H., Petersen, B., Ginestet, P. & Takacs, I. (1999). Estimating (combinations of) activated sludge model no. 1 parameters and components by respirometry. *Wat. Sci. Tech.*, 39(1), 195-214.
- Velten, S., Hammes, F., Boller, M. & Egli, T. (2007). Rapid and direct estimation of active biomass on granular activated carbon through adenosine tri-phosphate (ATP) determination. *Water Research*, 41(9), 1973-1983.
- Wang, J. Z., Summer, R. S. & Miltner, R. J. (1995). Biofiltration performance. 1. Relationship to biomass. *Water Works Association*, 87(12), 55-63.

- Wentzel M. C., Mbewe, A. & Ekama, G. A. (1995). Batch test for measurement of readily biodegradable COD and active organism concentrations in municipal wastewaters. *Water SA* 21(2), 117-124.
- Wentzel, M. C., Ubisi, M. F. & Ekama, G. A. (1998). Heterotrophic active biomass component of activated sludge mixed liquor. *Wat. Sci Tech.*, 37(4/5), 79–87.
- Wiggins, B. A., Jones, S. H. & Alexander, M. (1987). Explanations for the acclimation period preceding the mineralization of organic chemicals in aquatic environments. *Appl. Environ Microbiol.* 53(4), 791-796.
- Wooldridge, W. R. & Standfast, A. F. B. (1936). The use of the Barcroft differential manometer in the estimation of the oxygen absorption of sewage. *Biochemical Journal.* 30, 141-148.
- Young, J. C. & Baumann, E. R. (1976). The electrolytic respirometer - I factors affecting oxygen uptake measurements. *Water Research.* 10 (11), 1031-1040.
- Young, J. C., Kuss, M. L. & Nelson, M. A. (1991). Use of anaerobic respiromètres for measuring gas production in toxicity and treatability tests. *84th Annual Meeting of the Air and Waste Management Association.* 1-14.
- Ziglio, G., Andreottola, G., Foladori, P. & Ragazzi, M. (2001). Experimental validation of a single-OUR method for wastewater RBCOD characterization. *Water Science and Technology*, 43(11), 119–126.
- Zhang, S. & Huck, P. M. (1996). Parameter estimation for bio-film processes in biological water treatment. *Water Research*, 30(2), 456-464.

ANNEXE

ANNEXE I – Coloration au BacLight

- 1- Mélanger 1 ml d'échantillon avec 3 µl de BacLight^(TM) et incuber au noir pendant 15 minutes
- 2- Filtrer l'échantillon

Pour filtrer l'échantillon

- 1- Placer le sous-filtre de porosité 0.8 µm sur le socle en verre fritté
- 2- L'humecter à l'aide de quelques gouttes de solution saline stérile filtrée
- 3- Placer le filtre noir de porosité 0.22 µm sur le sous-filtre
- 4- Déposer le cône de filtration et placer la pince bleue de façon à obtenir un système étanche
- 5- Mettre tout le contenu de l'éprouvette, à l'aide d'une pipette Eppendorf, dans le cône
- 6- Filtrer au moyen d'un vide faible
- 7- Rincer les parois du cône avec 5 ml de solution saline stérile filtrée en rinçant bien les parois
- 8- Prendre une lame et y déposer une très petite goutte de solution saline. Y déposer le filtre et couvrir à l'aide d'une lamelle enduite d'une goutte d'huile.
- 9- Identifier la lame et déposer une goutte d'huile sur le côté supérieur de la lamelle
- 10- Compter la lame au microscope sur dix champs : grossissement 1000X - Immersion

Le colorant BacLight (TM) permet de faire la différence entre les bactéries totales et les viables par leurs couleurs très différentes. Les bactéries mortes sont rouges ou oranges; les viables sont vertes.

Calcul :
$$\text{Nombre de bactéries par millilitre d'échantillon} = (M * Tc) / V$$

M : nombre moyen de bactéries par champs

V : volume d'échantillon filtré

Tc : Taille d'un champ microscopique au grossissement 1000X

ANNEXE II – Choix de la concentration optimale pour les deux diamètres de CAP-laboratoire

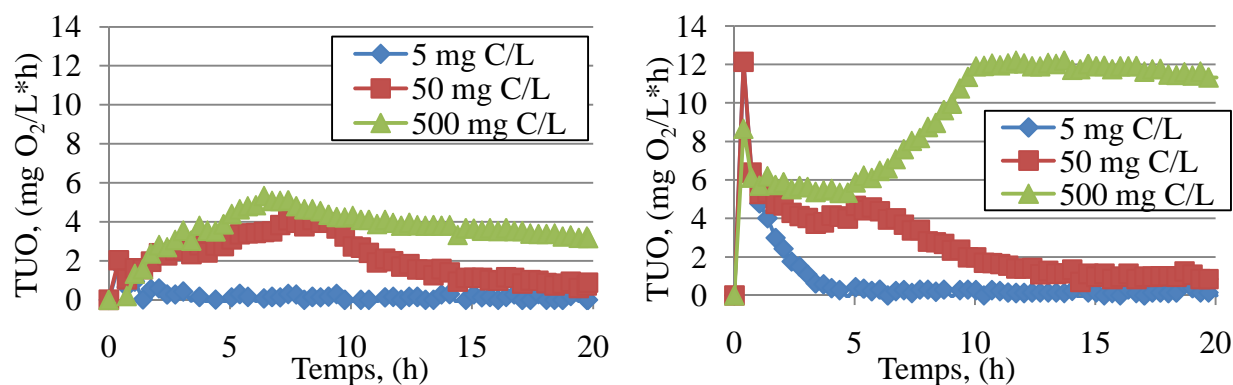


Figure 9-1. TUO en fonction de temps pour 3 g (masse humide) de CAP-laboratoire de : a) 25 µm; b) 200 µm avec des différentes doses d'extrait de levure – première série d'essais.

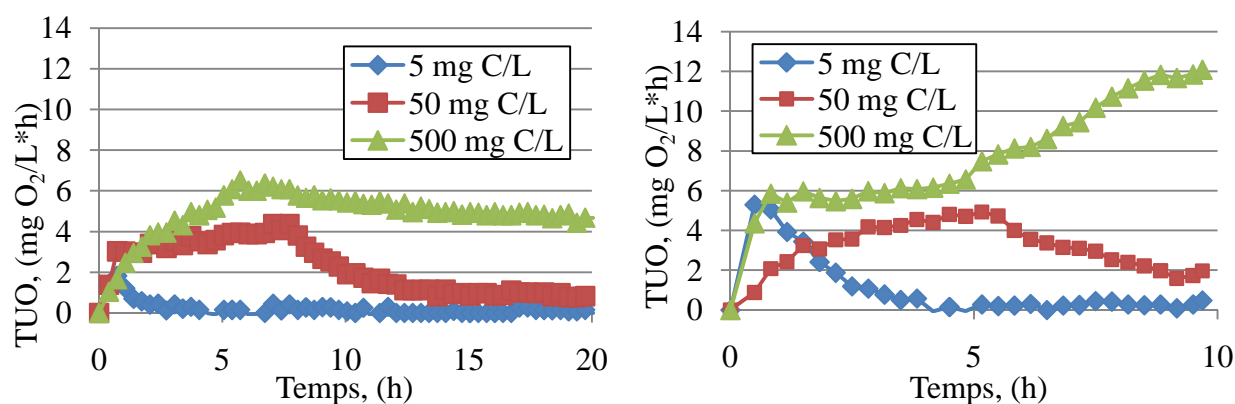


Figure 9-2. TUO en fonction de temps pour 3 g (masse humide) de CAP-laboratoire de : a) 25 µm; b) 200 µm avec des différentes doses d'extrait de levure – deuxième série d'essais.

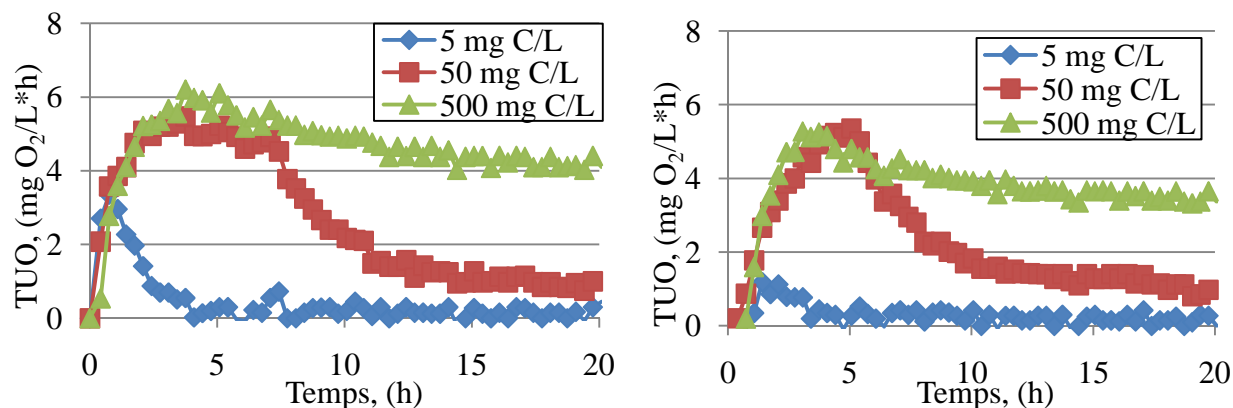


Figure 9-3. TUO en fonction de temps pour 3 g (masse humide) de CAP-laboratoire de : a) 25 µm; b) 200 µm avec des différentes doses d'extrait de levure – troisième série d'essais.

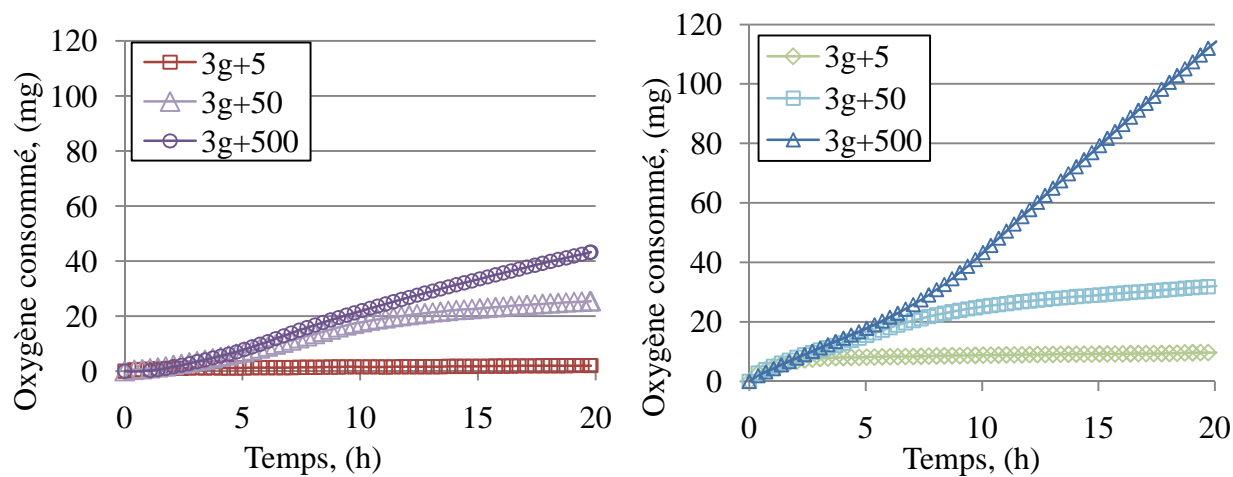


Figure 9-4. Consommation d'oxygène en fonction de temps pour le CAP de : a) 25 μm; b) 200 μm avec des différentes doses d'extrait de levure en mg C/L – première série d'essais.

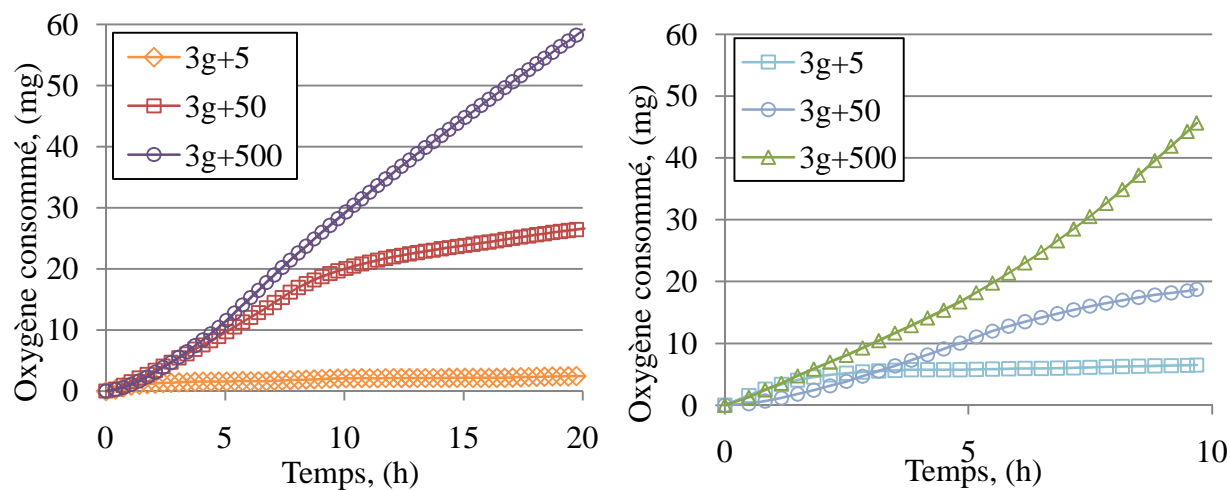


Figure 9-5. Consommation d'oxygène en fonction de temps pour le CAP de : a) 25 μm; b) 200 μm avec des différentes doses d'extrait de levure en mg C/L – deuxième série d'essais.

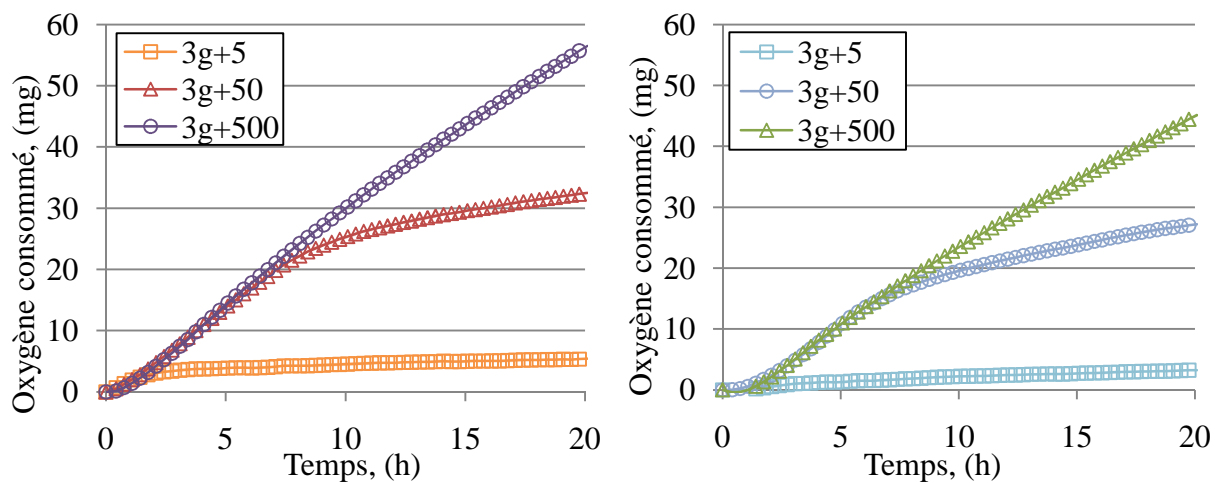


Figure 9-6. Consommation d'oxygène en fonction de temps pour le CAP de : a) 25 μm ; b) 200 μm avec des différentes doses d'extrait de levure en mg C/L – troisième série d'essais.

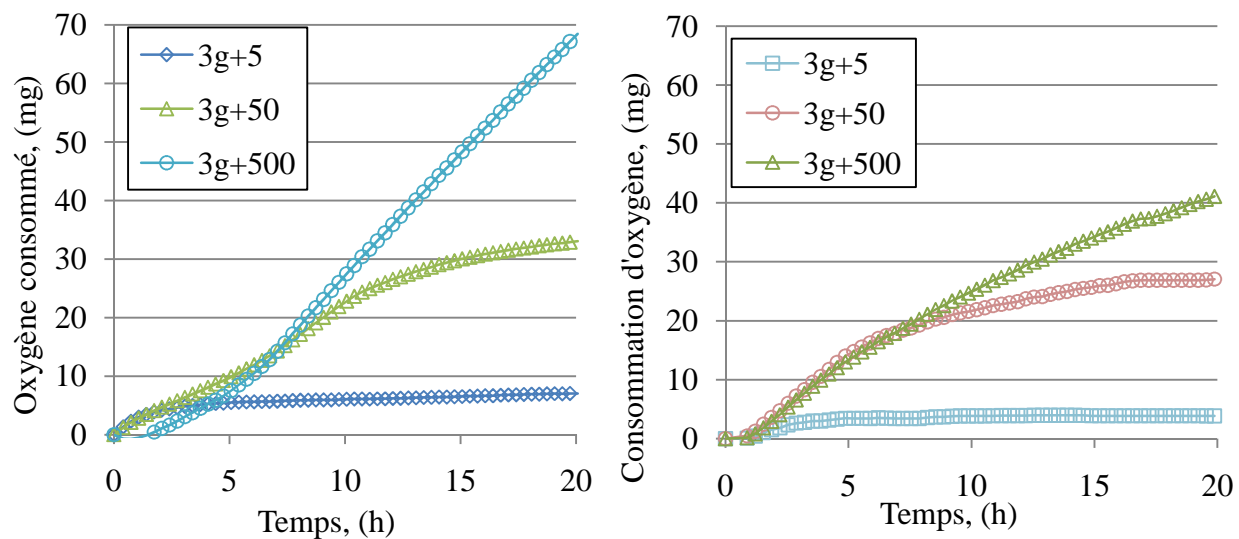


Figure 9-7. Consommation d'oxygène en fonction de temps pour le CAP de : a) 25 μm ; b) 200 μm avec des différentes doses d'extrait de levure en mg C/L – quatrième série d'essais

ANNEXE III – Variation du pH lors d'un essai de respirométrie

Tableau 9-1. Tests de mesure du pH dans chaque bouteille lors d'un essai de respirométrie

Diamètre de CAP, (μm)	Échantillon	pH				À la fin d'essai
		Avant l'autoclavagel	Après l'autoclavage	Après la levure	Après le CAP	
25 μm	3 g CAP+200 mg C/L		7.77	6.83	7.55	
	3 g CAP+200 mg C/L		8.51	6.86	7.56	
	3 g CAP+5000 mg C/L		8.68	6.76	6.92	
	3 g CAP+5000 mg C/L	8.3 - 8.4	8.73	6.83	6.96	6.6 - 7.0
	6 g CAP+200 mg C/L		7.88	6.85	7.75	
	6 g CAP+200 mg C/L		7.48	6.79	7.63	
	6 g CAP+5000 mg C/L		7.54	6.83	7.06	
	6 g CAP+5000 mg C/L		8.2	6.78	7.06	
	T3g	7.48	7.48	-	-	
	T6g	7.29	7.29	-	-	7.2 - 7.5
	T600	8.52	8.52	-	-	
200 μm	3 g CAP+200 mg C/L		7.65	6.66	7.12	
	3 g CAP+200 mg C/L		7.73	6.73	7.15	
	3 g CAP+5000 mg C/L		6.97	6.78	6.86	
	3 g CAP+5000 mg C/L	8.3 - 8.4	6.23	6.8	6.92	6.3 - 6.8
	6 g CAP+200 mg C/L		5.62	6.76	7.41	
	6 g CAP+200 mg C/L		4.92	6.64	7.37	
	6 g CAP+5000 mg C/L		6.22	6.81	6.96	
	6 g CAP+5000 mg C/L		5.48	6.83	6.85	
	T3g	7.28	7.28	-	-	
	T6g	7.2	7.2	-	-	7.0 - 7.3
	T600	6.35	6.35	-	-	

ANNEXE IV – Concentrations des la biomasse hétérotrophe aérobique des deux diamètres de CAP-laboratoire déterminées à l'aide de la méthode de régression linéaire

Tableau 9-2. Z_{BH} du CAP-laboratoire de 25 µm pour deux masses différentes

Date	Diamètre	Masse de CAP, (g)		Conditions	Substrat	Réplicata	Pente	Ordonné à l'origine	Z _{BH} (µg C/g CAP sec)
		humide	sèche						
16 juin 2009	25 µm	3	0.9	NaCl/autoclavage	extrait	1	0.1566	0.689	3978
					de levure	2	0.1541	0.636	3825
22 juin 2009	25 µm	3	0.9	NaCl/autoclavage	extrait	1	0.1803	0.8798	4261
					de levure	2	0.1397	1.0065	6023
26 juin 2009	25 µm	3	0.9	NaCl/autoclavage	extrait	1	0.3886	0.8038	1964
					de levure	2	0.4053	0.8626	2002
21 juillet 2009	25 µm	3	0.9	NaCl/autoclavage	extrait	1	0.1652	0.694	3818
					de levure	2	0.1372	0.8774	5374
23 juillet 2009	25 µm	3	0.9	NaCl/autoclavage	extrait	1	0.2256	0.6067	2658
					de levure	2	0.209	0.6526	2980
16 juin 2009	25 µm	6	1.8	NaCl/autoclavage	extrait	1	0.1435	1.3158	4011
					de levure	2	0.1539	1.3085	3751
22 juin 2009	25 µm	6	1.8	NaCl/autoclavage	extrait	1	0.4732	0.8703	872
					de levure	2	0.6057	0.7	581
26 juin 2009	25 µm	6	1.8	NaCl/autoclavage	extrait	1	0.4166	1.1057	1244
					de levure	2	0.2759	1.0632	1748
21 juillet 2009	25 µm	6	1.8	NaCl/autoclavage	extrait	1	0.1158	1.371	5067
					de levure	2	0.1286	1.2808	4246
23 juillet 2009	25 µm	6	1.8	NaCl/autoclavage	extrait	1	0.2649	0.9851	1678
					de levure	2	0.2142	1.1658	2435

Tableau 9-3. Z_{BH} du CAP-laboratoire de 200 µm pour deux masses différentes

Date	Diamètre	Masse de CAP, (g)		Conditions	Substrat	Réplicata	Pente	Ordonné à l'origine	Z _{BH} (µg C/g CAP sec)
		humide	sèche						
17 juin 2009	200 µm	3	1.02	NaCl/autoclavage	extrait	1	0.1249	1.0974	6391
					de levure	2	0.1584	0.9577	4547
23 juin 2009	200 µm	3	1.02	NaCl/autoclavage	extrait	1	0.1132	1.4807	10166
					de levure	2	0.124	1.3008	7880
29 juin 2009	200 µm	3	1.02	NaCl/autoclavage	extrait	1	0.4893	0.4553	984
					de levure	2	0.4155	0.4764	1173
21 juillet 2009	200 µm	3	1.02	NaCl/autoclavage	extrait	1	0.8052	0.2836	514
					de levure	2	0.4245	0.8092	1604
23 juillet 2009	200 µm	3	1.02	NaCl/autoclavage	extrait	1	0.452	0.731	1398
					de levure	2	0.4315	0.7726	1522
17 juin 2009	200 µm	6	2.04	NaCl/autoclavage	extrait	1	0.1082	1.7913	7193
					de levure	2	0.0973	1.8128	8000
23 juin 2009	200 µm	6	2.04	NaCl/autoclavage	extrait	1	0.1432	1.786	5673
					de levure	2	0.1247	1.9225	7302
29 juin 2009	200 µm	6	2.04	NaCl/autoclavage	extrait	1	0.6825	-0.0956	206
					de levure	2	0.5575	0.7154	564
21 juillet 2009	200 µm	6	2.04	NaCl/autoclavage	extrait	1	0.3011	-0.1695	102
					de levure	2	0.889	0.4665	280
23 juillet 2009	200 µm	6	2.04	NaCl/autoclavage	extrait	1	0.4083	0.6663	721
					de levure	2	0.4787	0.5569	556

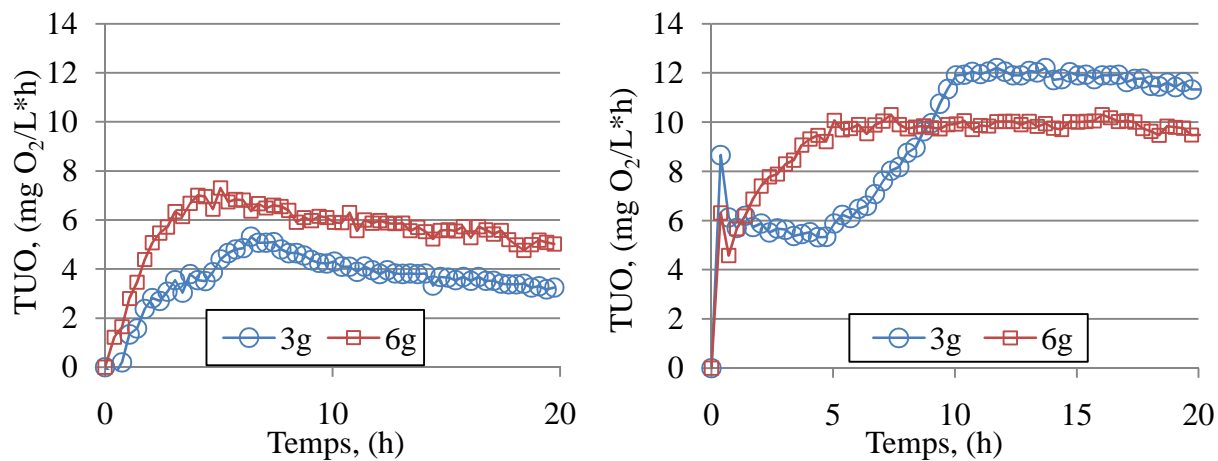


Figure 9-8. TUO en fonction de temps pour les essais de : a) le 16 juin 2009 – 25 μm; b) le 17 juin 2009 – 200 μm.

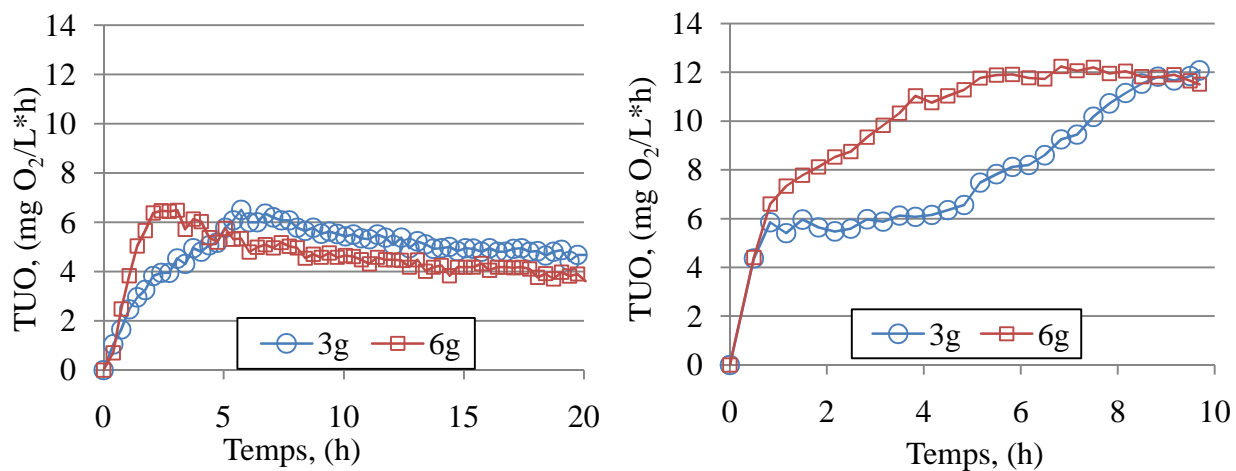


Figure 9-9. TUO en fonction de temps pour les essais de : a) le 22 juin 2009 – 25 μm; b) le 23 juin 2009 – 200 μm.

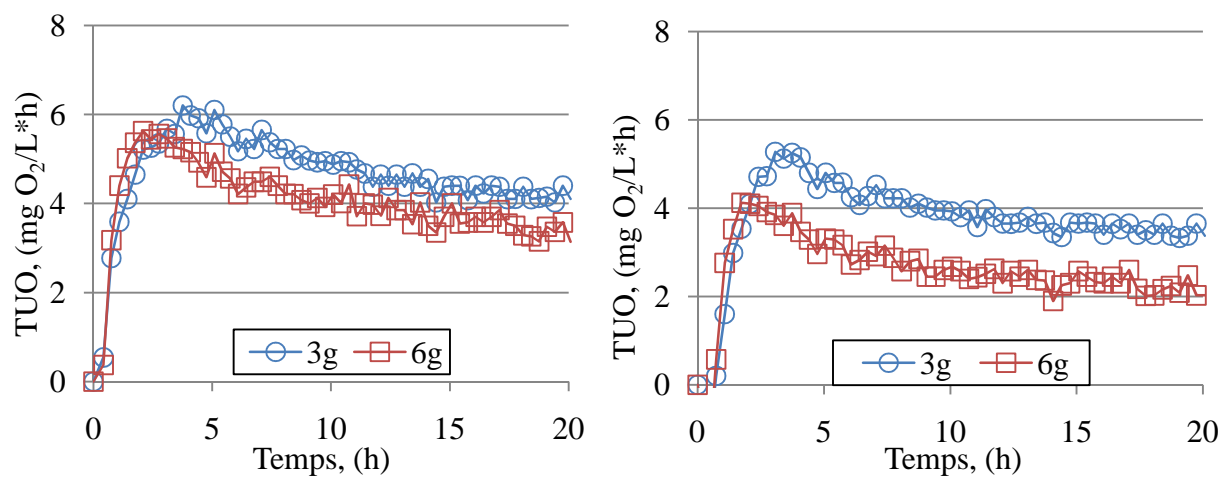


Figure 9-10. TUO en fonction de temps pour les essais de : a) le 26 juin 2009 – 25 μm ; b) le 29 juin 2009 – 200 μm .

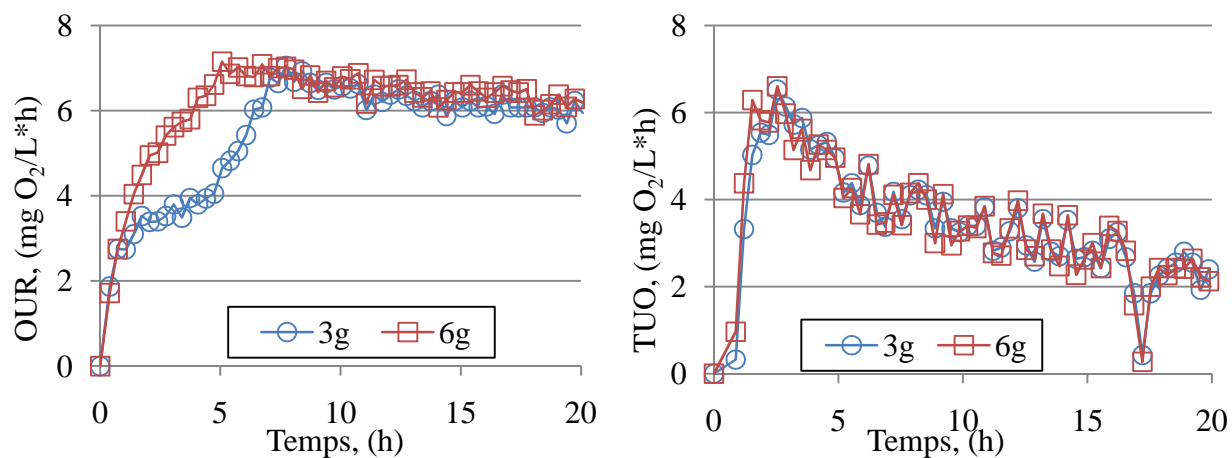


Figure 9-11. TUO en fonction de temps pour les essais du 21 juillet 2009: a) 25 μm ; b) 200 μm .

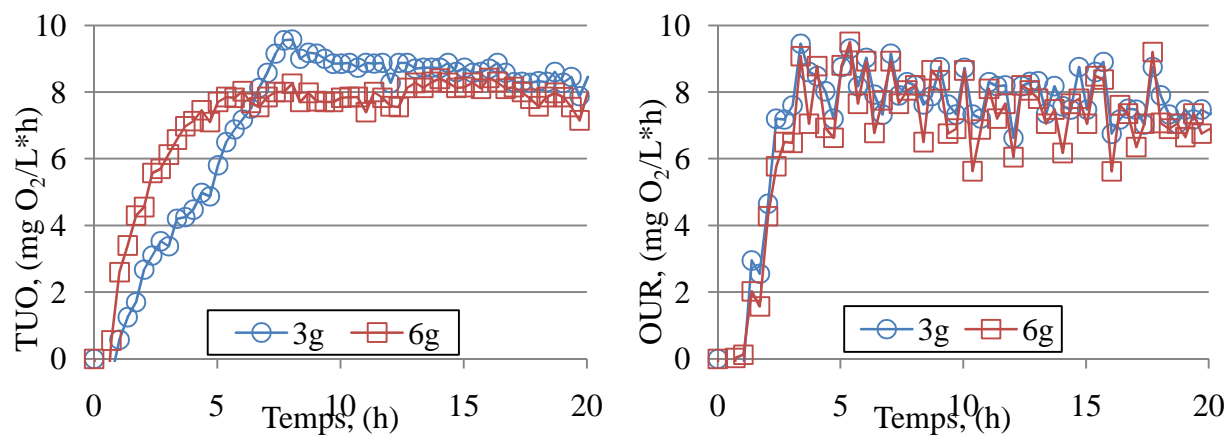


Figure 9-12. TUO en fonction de temps pour les essais du 23 juillet 2009: a) 25 μm ; b) 200 μm .

ANNEXE V – Z_{BH} normalisée des essais avec du CAP-Opaline du 29 janvier au 10 février 2010

Tableau 9-4. Valeurs de Z_{BH} , la pente et l'ordonnée à l'origine pour l'essai du 29 janvier 2010 avec du CAP-Opaline

Masse sèche, (g)	Réplicata	Pente	Ordonné à l'origine	Z_{BH} (mg DCO/L)	Z_{BH} ($\mu\text{g C/g CAP sec}$)
0.9	1	0.4471	-6.1524	0.00672	1.6398
	2	0.4522	-6.2409	0.00608	1.4849
1.2	1	0.4494	-6.0345	0.00752	1.3771
	2	0.4352	-5.6655	0.01121	2.0530
1.5	1	0.38	-4.9134	0.02702	3.9581
	2	0.3913	-5.0305	0.02338	3.4254
1.8	1	0.3921	-4.958	0.02509	3.0632
	2	0.3815	-4.7649	0.03123	3.8124
2.4	1	0.3424	-4.0006	0.07419	6.7923
	2	0.3387	-3.8757	0.08492	7.7741
3	1	0.4372	-4.7022	0.02925	2.1425
	2	0.3258	-3.3194	0.15355	11.2456
3.6	1	0.3091	-2.8845	0.24903	15.1988
	2	0.3086	-3.1593	0.18947	11.5641
4.5	1	0.2718	-2.4021	0.45397	22.1656
	2	0.2808	-2.5509	0.37972	18.5403

Tableau 9-5. Valeurs de Z_{BH} , la pente et l'ordonnée à l'origine pour l'essai du 10 février 2010 avec du CAP-Opaline.

Masse sèche, (g)	Réplicata	Pente	Ordonné à l'origine	Z_{BH} (mg DCO/L)	Z_{BH} ($\mu\text{g C/g CAP sec}$)
0.03	1	0.707	-16.888	9.43E-08	0.0007
	2	0.7077	-16.102	2.07E-07	0.0015
0.15	1	0.6515	-13.469	3.12E-06	0.0046
	2	0.5743	-11.126	3.66E-05	0.0536
0.3	1	0.5664	-10.884	4.73E-05	0.0346
	2	0.5471	-10.042	1.13E-04	0.0831
1.5	1	0.4197	-6.1845	6.90E-03	1.0114
	2	0.4148	-5.4708	1.43E-02	2.0878
3	1	0.3581	-4.5971	3.92E-02	2.8702
	2	0.3335	-4.066	7.12E-02	5.2159

ANNEXE VI – Z_{BH} normalisée de l'essai avec trois sources de substrat

Tableau 9-6. Valeurs de Z_{BH} , la pente et l'ordonnée à l'origine pour les trois types de substrats testés.

Substrat	Réplicata	Pente	L'ordonné à l'origine	Z_{BH} (mg DCO/L)	Z_{BH} (μ g C/g CAP sec)
Acétate	1	0.5172	-20.814	2.15E-09	1.57E-06
	2	0.5146	-20.279	3.65E-09	2.68E-06
Glucose	1	0.2644	-13.853	2.84E-05	2.08E-02
	2	0.2535	-13.120	2.76E-04	2.02E-01
Extrait de levure	1	0.5072	-9.224	1.01E-05	7.43E-03
	2	0.5411	-11.436	1.09E-05	7.96E-03

ANNEXE VII – Z_{BH} normalisée des essais avec du CAP-Opaline avec la sonde d'OD

Tableau 9-7. Valeurs de Z_{BH} , la pente et l'ordonnée à l'origine pour les essais réalisés avec la sonde d'OD

Masse sèche de CAP, (g)	Pente	Ordonné à l'origine	Z_{BH} (mg DCO/L)	Z_{BH} ($\mu\text{g C/g CAP}$)
0.03	1.0920	-9.2911	0.00012	0.9020
0.15	1.0960	-8.1440	0.00039	0.5661
0.3	0.9855	-6.8467	0.00157	1.1489
1.5	0.4640	-1.3084	0.82347	120.62
2.1	0.2274	-0.6660	3.02806	316.82
2.7	0.1412	-0.1544	7.65715	623.12
3.3	0.0817	0.4859	22.5635	1502.30