

Université
de Toulouse

THÈSE

**En vue de l'obtention du
DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE**

Délivré par :

Institut National des Sciences Appliquées de Toulouse (INSA Toulouse)

Discipline ou spécialité :

Génie des Procédés et de l'Environnement

Présentée et soutenue par :

Ahlem FILALI

le : vendredi 16 décembre 2011

Titre :

Analyse et modélisation du traitement de l'azote dans un procédé de granulation aérobie hybride

JURY

Nicolas BERNET, Directeur de recherches, INRA, LBE, Narbonne (Rapporteur)

Jesus COLPRIM, Professeur, LEQUIA-UdG, Girona (Rapporteur)

Alain LINE, Professeur, INSA, LISBP, Toulouse (Président du jury)

Eberhard MORGENROTH, Professeur, ETH, Eawag, Dübendorf (Examinateur)

Yolaine BESSIERE, Maître de Conférences, INSA, LISBP, Toulouse (Directrice de thèse)

Mathieu SPERANDIO, Professeur, INSA, LISBP, Toulouse (Directeur de thèse)

Ecole doctorale :

Mécanique, Energétique, Génie civil et Procédés (MEGeP)

Unité de recherche :

Laboratoire d'Ingénierie des Systèmes Biologiques et Procédés (LISBP)

Directeur(s) de Thèse :

Yolaine BESSIERE et Mathieu SPERANDIO

Rapporteurs :

Nicolas BERNET et Jesus COLPRIM

THESE

INSTITUT NATIONAL DES SCIENCES APPLIQUEES DE
TOULOUSE

En vue de l'obtention du

DOCTORAT

SCIENCES DES PROCEDES
SPECIALITE : GENIE DES PROCEDES ET DE L'ENVIRONNEMENT

Ahlem FILALI

ANALYSE ET MODELISATION DU TRAITEMENT DE L'AZOTE DANS UN PROCEDE DE GRANULATION AEROBIE HYBRIDE

JURY

Nicolas BERNET, Directeur de recherches, INRA, LBE, Narbonne (Rapporteur)

Jesús COLPRIM, Professeur, LEQUIA-UdG, Girona (Rapporteur)

Alain LINE, Professeur, INSA, LISBP, Toulouse (Président du jury)

Eberhard MORGENROTH, Professeur, ETH, Eawag, Dübendorf (Examineur)

Yolaine BESSIERE, Maître de Conférences, INSA, LISBP, Toulouse (Directrice de thèse)

Mathieu SPERANDIO, Professeur, INSA, LISBP, Toulouse (Directeur de thèse)

Production scientifique liée à cette thèse

- **Filali, A.**, Y. Bessière, M. Spérandio (2011).
Effects of oxygen concentration on the nitrifying activity of an aerobic hybrid granular sludge reactor. *Water Science and Technology*, 2012.65 (2):p.289-95.
- **Filali, A.**, A. Manas, M. Mercade, Y. Bessière, B. Biscans, M. Spérandio.
Stability and performances of two GSBP operated in alternating anoxic/aerobic or anaerobic/aerobic conditions for nutrient removal. *Biochemical Engineering Journal*, 2012. 67(0):p. 10-19.
- **Filali, A.**, Y. Bessière, M. Spérandio.
Combining flocs and granular sludge: An alternative strategy for nitrogen removal? Nutrient Recovery and Management Conference, organized by the WEF, Miami 9 - 12 January 2011.
- **Filali, A.**, Y. Bessière, M. Spérandio.
Reliability of nitrogen removal in an aerobic granular hybrid sludge reactor. Société Française du Génie des Procédés SFGP, Lille du 29 Novembre au 1^{er} décembre 2011.
- **Filali, A.**, Y. Bessière, M. Spérandio.
Etude et modélisation d'un réacteur à boue granulaire hybride. Cinquièmes v journées du RNB : Les Biofilms au service des Biotechnologies, Narbonne du 24 - 26 Janvier 2012.

Résumé

Dans ce travail, le traitement des nutriments et plus particulièrement celui de l'azote en procédé de granulation aérobie a été étudié.

L'approche expérimentale a dans un premier temps eu pour objet de comparer la stabilité des caractéristiques physiques et microbiologiques d'agrégats développés dans deux réacteurs fonctionnant en alternances de phases anaérobie / aérobie ou anoxie / aérobie. L'opération d'un procédé de granulation aérobie en alternance de phases anoxie / aérobie a favorisé la stabilisation des performances de traitement de l'azote et notamment celle de la nitrification. Le développement d'une boue hybride comprenant une fraction de floccs et de granules a été observé.

Dans le but d'évaluer comment le caractère hybride de la boue obtenue en conditions anoxie/aérobie oriente les performances et vitesses de transformation de l'azote, une caractérisation ex-situ des limitations au transfert d'oxygène au sein des floccs, granules et boue hybride a été réalisée par respirométrie. En complément, la localisation des espèces nitrifiantes par la technique d'hybridation fluorescente in situ (FISH) a été réalisée. Les résultats obtenus indiquent que la présence de floccs au sein d'une boue granulaire permet d'augmenter la vitesse de la nitrification, en particulier pour de faibles concentrations en oxygène dissous. D'autre part, il est ici mis en évidence la nécessité de contrôler simultanément le ratio flocc/granules et la taille des granules en vue de l'optimisation du traitement de l'azote.

Enfin un outil mathématique permettant de décrire les phénomènes réactionnels ayant lieu au sein d'une biomasse hybride a été développé. Celui-ci a été employé dans le but d'optimiser le fonctionnement du procédé hybride par l'évaluation de l'effet des propriétés physiques de la biomasse, et plus particulièrement de la proportion de granules en présence, pouvant conduire à une élimination efficace de l'azote et à l'augmentation de la robustesse du procédé vis-à-vis de diminutions ponctuelles de l'oxygène dissous.

Summary

In this work, the treatment of nutrients, especially that of nitrogen in aerobic granulation process was studied.

The experimental approach has initially been intended to compare the stability and the physical and microbiological characteristics of aggregates developed in two reactors operating in alternating anaerobic / aerobic or anoxic / aerobic conditions. The presence of a pre-anoxic phase promoted the stabilization of nitrogen removal performances and especially those of nitrification. The development of a hybrid sludge process containing a fraction of flocs and granules was observed.

In order to evaluate and quantify the influence of the simultaneous presence of flocs and granules in the nitrifying activity of the hybrid sludge developed in the alternating anoxic / aerobic conditions, the nitrification rate and oxygen limitation of flocs, granules and hybrid sludge was assessed using respirometric assays at different dissolved oxygen concentrations. The spatial distribution of nitrifying bacteria was investigated using fluorescence in situ hybridization (FISH). Results indicated that the presence of flocs with granules could increase the rate of nitrification to transitory reductions of aeration. On the other hand, the optimization of nitrogen removal requires the simultaneous control of the floc to granule ratio and granule size.

Finally, a mathematical model to describe the reaction phenomena taking place in the hybrid biomass was developed. It was used in order to optimize the operation of the hybrid process through the evaluation of the effect of physical properties of biomass, specifically the ratio of granules and flocs in the reactor that can lead to efficient removal of nitrogen and increase the robustness of the process.

Remerciements

Cette thèse a été réalisée au Laboratoire d'Ingénierie des Systèmes Biologiques et Procédés (LISBP) de l'INSA de Toulouse. Je remercie le directeur du LISBP, le Pr. Nick LINLEY de m'avoir accueillie au sein de sa structure de recherche.

Je remercie les membres de mon jury de thèse, et en premier lieu, le Pr. Alain LINE pour avoir accepté de présider ce jury et pour l'intérêt qu'il a porté à mon travail de recherche. Je souhaite également remercier les professeurs Jesús COLPRIM et Nicolas BERNET pour avoir accepté d'en être les rapporteurs. Mes remerciements vont également au Pr. Eberhard MORGENROTH pour ses nombreux commentaires et remarques pertinentes.

Je tiens à remercier très chaleureusement mes deux co-directeurs de thèse, le Dr. Yolaine BESSIERE et le Pr. Mathieu SPERANDIO de m'avoir permis de découvrir le fabuleux monde des granules. Je vous suis très reconnaissante pour la confiance que vous m'avez accordée, vos précieux conseils et votre disponibilité tout au long de ma thèse.

Un grand merci à Evrard MENGELLE et Mansour BOUNOUBA pour leur aide technique plus que précieuse. Les réacteurs n'auraient certainement pas survécus trois ans sans votre aide ! Merci à Delphine DELAGNES pour avoir bien voulu prendre en charge les réacteurs durant la redoutable phase de rédaction. Je remercie également Myriam MERCADE et Cécile POUZET pour m'avoir respectivement formée à la technique d'hybridation FISH et à l'utilisation de la microscopie confocale.

Je n'oublie pas mes collègues « SYMBIOSE » qui ont contribué à rendre la vie au laboratoire plus douce. Merci aux granuleux, Angéla et Cédric, pour votre aide, les publis partagées mais plus encore pour les bons moments passés ensemble en dehors du labo. Merci à Etienne, Elizabeth, Michel, Sébastien, Xavier, Yoan, Laetitia, Sophie, Irène et les deux Mathieu P pour vos encouragements et votre soutien lors de la rédaction mais aussi pour les nombreuses pauses café/clopes/clémentines (avec parfois les trois en même temps) ! Pour finir, j'ai une pensée toute particulière pour Paula BOE qui a été d'une aide précieuse lors de ma dernière année de thèse.

Merci à tous !

Sommaire

AVANT-PROPOS	1
CHAPITRE I: Synthèse bibliographique	5
1 Introduction : les procédés de granulation aérobie (GSBR)	7
1.1 Définition des granules microbiens développés en condition aérobie	8
1.2 Facteurs opératoires influençant la formation des granules aérobies.....	9
1.3 Potentiel et limites de la technologie de granulation aérobie	10
2 Traitement de l'azote et populations nitrifiantes	13
2.1 Description des processus majeurs de traitement de l'azote	13
2.2 Facteurs du milieu influençant la croissance respective des nitrifiants (différentiant les AOB et NOB).....	20
3 Traitement de l'azote dans les procédés à biomasse densifiée	22
3.1 Relation entre les limitations au transfert et la structure des agrégats.....	22
3.2 Analyse de la compétition entre bactéries hétérotrophes et autotrophes.....	26
3.3 Interactions entre les bactéries nitrifiantes AOB et NOB	30
4 Conduite et modélisation des GSBRs pour l'élimination des nutriments	31
4.1 Conduite des GSBRs	31
4.2 Modélisation des GSBRs.....	35
5 Conclusions et objectifs de l'étude	36
CHAPITRE II: Matériel et Méthodes	47
1 Réacteurs à granulation aérobie GSBR	49
1.1 Description de l'installation expérimentale	49
1.2 Caractéristiques de l'influent synthétique	52
2 Techniques de caractérisation	52
2.1 Analyses normalisées	52

2.2	Techniques de caractérisation physique de la boue	53
3	<i>Hybridation in situ FISH</i>	54
3.1	Sondes et fluorochromes	55
3.2	Procédure de marquage.....	57
3.3	Acquisition d'images.....	59
4	<i>Tests de respirométrie ouverte</i>	61
5	<i>Modélisation</i>	62
5.1	Description du réacteur dans le modèle	62
5.2	Description des granules et du détachement surfacique.....	62
5.3	Bilans.....	63
6	<i>Synthèse du matériel et méthodes mis en œuvre</i>	64
CHAPITRE III: Résultats		67
Stabilité et performances de deux GSBR opérant en alternance anoxie/aérobie ou anaérobie/aérobie pour l'élimination simultanée de C, N et P		67
1	<i>Introduction</i>	70
2	<i>Materials and methods</i>	71
2.1	Reactor operating conditions	71
2.2	Analytical characterization of the liquid and solid phases	73
2.3	Microbial characterization.....	73
3	<i>Results</i>	74
3.1	Performance stability	74
3.2	Evolution of sludge properties.....	77
3.3	Nitrogen removal	79
3.4	Phosphorus removal.....	83
4	<i>Discussion</i>	85
5	<i>Conclusion</i>	88

CHAPITRE IV : Résultats	95
Etude de la nitrification dans une boue granulaire hybride : localisation des espèces et limitation par l'oxygène	95
1 Introduction	97
2 Matériel et méthodes.....	99
2.1 Réacteurs GSBRS et conditions opératoires	99
2.2 Nitrification.....	99
3 Résultats et discussion.....	101
3.1 Caractérisation de l'évolution de la nitrification et dénitrification en fonction des caractéristiques de la biomasse hybride.....	101
3.2 Effet de l'oxygène dissous sur l'activité de nitrification	105
3.3 Répartition des nitrifiants.....	108
4 Discussion générale	117
5 Conclusions.....	118
CHAPITRE V : Résultats.....	123
Analyse et modélisation de l'azote dans un réacteur granulaire à boue hybride.....	123
1 Introduction	125
2 Développement du modèle	125
2.1 Modèle cinétique	125
2.2 Modélisation du système hybride.....	136
2.3 Initialisation.....	140
3 Résultats.....	141
3.1 Cinétiques dans le réacteur GSBRS.....	141
3.2 Essais respirométriques : répartition flocs / granules et effet de la concentration en oxygène dissous sur la nitrification.....	143
3.3 Analyse de la répartition spatiale des bactéries nitrifiantes dans les granules	145
3.4 Discussion et analyse du modèle	146

<i>4 Effet des paramètres opératoires sur la nitrification et la dénitrification dans le procédé hybride.....</i>	<i>146</i>
4.1 Variation de la proportion de floes et de granules.....	146
4.2 Analyse et discussion de la variation de la proportion de floes et de granules.....	151
<i>5 Conclusions.....</i>	<i>157</i>
CONCLUSIONS GENERALES	161
ANNEXES.....	167

Liste des figures

Figure 0. Nombre de publications sur les boues granulaires aérobies (source Web of Science)	3
Figure I.1. Photographies de granules obtenues avec : (a) microscopie électronique à balayage (MEB) et (b) microscopie optique	8
Figure I.2. Réaction de dénitrification catalysée par les nitrate (NAR), nitrite (NIR), oxyde nitrique (NOR) et oxyde nitreux (N2OR) réductases	19
Figure I.3. Représentation schématique des interfaces biologiques d'un biofilm en fonction du facteur G	23
Figure I.4. Distribution de la biomasse en fonction de l'épaisseur du biofilm pour différentes valeurs de γ_{S,O_2}	25
Figure I.5. Evolution de l'activité des populations autotrophes et hétérotrophes pour différents ratio DCO/N	27
Figure I.6. Schéma du métabolisme des PAO en conditions anaérobie (gauche) et aérobie (droite) et de l'évolution des composés de stockages intracellulaires (trait plein) et des composés dans la phase liquide (trait en pointillé) durant ces conditions	32
Figure I.7. Principe de la nitrification dénitrification simultanée	33
Figure I.8. Evolution de la charge appliquée (■), de la nitrification (□) et de la dénitrification (▣) dans le réacteur en alternance de phase anoxie/aérobie (gauche) et dans le réacteur purement aérobie (droite)	34
Figure II.1. Schéma du système SBAR	50
Figure II.2. Description d'un cycle de fonctionnement du SBAR	51
Figure II.3. Principales étapes de l'hybridation in situ FISH	57
Figure II.4. Exemple d'ajustement du signal fluorescent	60
Figure II.5. Schéma du respiromètre	61
Figure III.1. Evolution of suspended solids during the reactors run period (■) MLSS, (□) MLVSS and (▲) SVI in R1 (a) and R2 (b)	75
Figure III.2. Evolution of removal efficiencies of (○) COD, (△) N-NH ₄ , (◇) TN (□) P-PO ₄ and (*) Ca ²⁺ in R1 (a) and R2 (b)	76
Figure III.3. Evolution of the proportion of granules in MLSS and in volume of the hybrid sludge in both reactors	77
Figure III.4. Relationship between the MLSS concentration with the granule percentage in volume	78
Figure III.5. Micrographs of microbial aggregates at different operating times : (a) R1-162 days ; (b) R2-162 days; (c) R1-238 days; (d) R2-238 days; (e) R2-250 days (scale bar = 2mm)	78
Figure III.6. Typical profile of soluble compounds in both reactors during a cycle study performed on day 167. The separation between the anoxic (R1) or anaerobic (R2) /aerobic phases is depicted by a vertical line	80
Figure III.7. Confocal laser scanning microscopy images of FISH micrographs of nitrifiers. Half granule section of R1 (a) and part of the section (c and d). Half granule section of R2 (b) and part of the section (g). Confocal laser scanning micrographs of FISH performed on a flocs of R1 (e) and filamentous bacteria of R2 (f).	82

Figure III.8. Microscopic images of the stained 10 μ m-cut granules: (a) R1; (b) R2; (c) R1 filamentous bacteria; (d) R2 filamentous bacteria. The scale bar=100 μ m for (a) and (b) and 5 μ m for (c) and (d).	84
Figure III.9. Illustration des conséquences du coefficient γ_{S,O_2} (monospecies 2D biofilm model – TU Delft). Concentration de l'oxygène dissous de 2,5 mg L ⁻¹ (gauche) et 5 mg L ⁻¹ (droite)	91
Figure IV.1. Evolution de la concentration des matières en suspension (■), matières volatiles en suspension (□) et de la vitesse superficielle de gaz (---) au cours de l'étude	101
Figure IV.2. Distribution de la taille des agrégats en volume au cours des trois phases	102
Figure IV.3. Evolution de la taille des granules au cours de l'étude. Phase I (a), phase II (b) et phase III (c) Echelle =2 mm	103
Figure IV.4. Cinétiques respirométriques pour les granules (a), les flocs (b) et la boue hybride (c). rO ₂ (●), OD (—), pH (—), TN (■), N-NO ₃ (▲), N-NO ₂ (▲), N-NH ₄ (◆)	106
Figure IV.5. Evolution d'activité de nitrification en fonction de la concentration en oxygène dissous pour les granules (a), flocs (b) et la boue hybride (c). Les barres d'erreur affichées sur cette figure représentent l'écartype relatif à chaque mesure	106
Figure IV.6. Contribution des flocs (■) et des granules (■) à l'activité de nitrification (première étape de conversion : ammonium en nitrite) de la boue hybride	108
Figure IV.7. Evolution de la vitesse de nitrification (a), nitrification (b) et du ratio rNOB :rAOB (c) en fonction de la concentration en oxygène dissous	109
Figure IV.8. Cinétiques respirométriques de nitrification et nitrification pour les flocs (a) et les granules (b). rO ₂ (●), OD (—), pH (-.-), TN (■), N-NO ₃ (▲), N-NO ₂ (▲), N-NH ₄ (◆). Les traits représentent les injections de substrats successives : NaNO ₂ (trait plein) et NH ₄ Cl (en pointillé.)	111
Figure IV.9. Images de coupes médianes de granules (a, b) et de parties du granules (c,d, e) marquées en DAPI (ADN, bleu), Nso190et Nso1225 (AOB, magenta) et Nit3 et Ntspa662 (NOB, jaune). Les pointillés indiquent l'emplacement du cœur minéral (détaché lors de la coupe au cryomicrotome et lors de la procédure d'hybridation FISH)	113
Figure IV.10. Images de flocs marqués avec DAPI (ADN, bleu), Nso190et Nso1225 (AOB, magenta) et Nit3 et Ntspa662 (NOB, jaune). Les images a c correspondent respectivement aux images b et d mais sans marquage. Les cercles rouges (b et d) indiquent la présence de bactéries nitrifiantes.	116
Figure V.1. Représentation schématique du modèle. Adaptée de la représentation schématique des modèles ASM proposée par Comeau et Takács, (2008)	127
Figure V.2. Répartition des volumes de flocs et de granules dans le GSBP après décantation	137
Figure V.3. Evolution des matières en suspension (gauche) et de l'indice de boue (droite) de la biomasse hybride en fonction de la fraction de flocs. Données expérimentales (●), estimation (—)	139
Figure V.4. Evolution de la concentration expérimentale et simulée des formes azotées (a) et de la DCO et l'oxygène (b) au cours d'un cycle du SBAR (jour 719/ 55)	142
Figure V.5. Modélisation de l'effet de l'oxygène dissous sur l'activité de nitrification des agrégats biologiques. Le cercle reporté sur la figure de l'AUR des granules indique une valeur de l'AUR surestimée à cause du stripping de l'ammonium.	143
Figure V.6. Modélisation de l'activité de nitrification et nitrification des agrégats biologiques. Les données expérimentales (data) sont représentées par les puces et les données issues de simulations sont en trait	144
Figure V.7. Comparaison de la distribution spatiale dans les granules obtenue par simulation et par la technique FISH. (au jour 714/50, MESgranule/MES boue = 0,7)	145

Figure V.8. Evolution des formes azotées (à gauche) et de la DCO et de l'oxygène dissous (à droite) au cours d'une cinétique du SBAR pour différentes fractions de floes : a) 0/9, b) 3/9 et c) 9/9	148
Figure V.9. Profil de concentration de la biomasse dans les granules pour différentes fractions de floes : a) 0/9 b) 3/9 et c) 8/9	150
Figure V.10. Evolution de la vitesse de nitrification en fonction de la concentration d'oxygène dissous pour différentes fractions de floes dans la boue hybride, en supposant le diamètre des granules constant ($d=3$ mm)	151
Figure V.11. Evolution de la vitesse de nitrification (a) et dénitrification (b) en fonction de la proportion de granules en masse pour une même taille de granule ($d=3$ mm). Les points correspondent à la moyenne de la vitesse de nitrification et dénitrification mesurée aux trois phases du réacteur, les barres indiquent l'ampleur de la variation des vitesses.	152
Figure V.12. Modélisation de l'effet de la taille des granules sur la vitesse de nitrification. Simulations à long terme pour une concentration de granules constante de 20 g L^{-1} et un $KLa=1000 \text{ j}^{-1}$ ($d=3$ mm)	153
Figure V.13. Evolution de la concentration des composés particuliers (gauche) et de l'oxygène (droite) en fonction du rayon des granules : a) $250\mu\text{m}$, b) $600\mu\text{m}$ et c) $1200\mu\text{m}$	154
Figure V.14. Evolution de l'activité de nitrification (a) et dénitrification (b) modélisée et expérimentale selon les caractéristiques de la boue hybride développée à différentes phases du GSBR	155
Figure AI.1. Evolution des formes azotées (gauche) et de la DCO et Oxygène dissous (droite) lors de cinétiques du GSBR pour différentes fractions de floe : a) 1/9, b) 5/9, c) 7/9 et d) 8/9	169
Figure AI.2. Profil de concentration de la biomasse dans les granules pour différentes fractions de floes : a) 1/9, b) 5/9 et c) 7/9	170

Liste des tableaux

Tableau I.1. Rendements de croissance et de consommation de l'oxygène de la réaction de nitrification	15
Tableau I.2. Paramètres cinétiques de croissance et de décès des bactéries nitrifiantes	17
Tableau I.3. Constantes d'affinité des bactéries nitrifiantes pour le substrat azoté et l'oxygène	18
Tableau II.1. Conditions opératoires générales des deux réacteurs	51
Tableau II.2. Composition de l'influent alimentant les réacteurs	52
Tableau II.3. Techniques analytiques employées et leur norme associée	53
Tableau II.4. Sondes oligonucléotidiques	55
Tableau II.5. Fluorochromes, longueur d'onde d'excitation et d'émission associés	56
Tableau II.6. Couleur de représentation des espèces microbiennes ciblées	56
Tableau II.7. Récapitulatif du matériel et méthodes mis en œuvre dans cette étude	64
Table III.1. Operating conditions of both reactors	72
Tableau IV.1. Performances du réacteur au cours de l'étude	103
Tableau IV.2. Vitesses d'oxydation de NH_4^+ et NO_2^- et ratio $r_{\text{NOB}} : r_{\text{AOB}}$	112
Tableau V.1. Description des processus biologiques	128
Tableau V.2. Matrice stœchiométrique des processus biologiques par des organismes hétérotrophes	129
Tableau V.3. Matrice stœchiométrique des processus biologiques par des organismes autotrophes	130
Tableau V.4. Définition et valeurs des paramètres pour les processus autotrophiques (20°C)	131
Tableau V.5. Définition et valeurs des paramètres pour les processus hétérotrophiques (20°C)	133
Tableau V.6. Vitesse de réaction des processus biologiques	135
Tableau V.7. Valeurs des coefficients de diffusion	136
Tableau V.8. Récapitulatif des paramètres d'initialisation et des résultats de simulations	149
Tableau AI.1. Composition des tampons d'hybridation aux différentes concentrations en formamide utilisées	168
Tableau AI.2. Composition des tampons de rinçage correspondant au pourcentage de formamide utilisé lors de l'hybridation	168
Tableau AI.3. Concentration en biomasse en fonction pour différentes fractions de floes	171

Nomenclature

AGV	Acide Gras Volatil	
AOB, $X_{B, AOB}$	Bactéries Ammonium Oxydantes (nitritante)	mg DCO L ⁻¹
AUR	Vitesse de consommation de l'ammonium	mg L ⁻¹ h ⁻¹
b	Taux de décès	j ⁻¹
C _{S0}	Concentration du substrat dans la phase liquide	g DCO m ⁻³
C _{xm}	Concentration de la biomasse dans le biofilm	g DCO _x m ⁻³
d	Diamètre de granules	m
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole, dihydrochloride	
DCO	Demande Chimique en Oxygène	mg O ₂ L ⁻¹
DN-GAO	Organisme Accumulateur de Glycogène Dénitrifiant	
D _{NO3}	Coefficient de diffusion des nitrates	m ² j ⁻¹
DN-PAO	Organisme Accumulateur de Polyphosphate Dénitrifiant	
D _{O2}	Coefficient de diffusion de l'oxygène	m ² j ⁻¹
D _S	Coefficient de diffusion du substrat	m ² j ⁻¹
FA	Formamide	
FISH	Hybridation fluorescente <i>in situ</i>	
G	Gradient de vitesse moyenne	s ⁻¹
GAO	Organisme Accumulateur de Glycogène	
GSBR	Réacteur granulaire à alimentation séquentielle	
HAP	l'hydroxy-apatite	
IB _{boue}	Indice de boue de la biomasse hybride	mL g ⁻¹
J _{LF}	Flux de substrat à la surface du biofilm	g m ⁻² j ⁻¹
K _a	constante d'acidité pour le couple NH ₄ ⁺ /NH ₃	
K _{La}	Coefficient volumique de transfert	j ⁻¹
K _{La surface}	Coefficient de transfert surfacique	j ⁻¹
L _f	Epaisseur du biofilm	m
L _{fmax}	Epaisseur du biofilm de consigne	m
MES	Matière En Suspension	g L ⁻¹
MVS	Matière Volatile en Suspension	g L ⁻¹
NIT	Organisme nitrifiant (AOB et NOB)	
NO ₂ UR	Vitesse de consommation de nitrite	mg N L ⁻¹ h ⁻¹
NO ₃ UR	Vitesse de consommation de nitrate	mg N L ⁻¹ h ⁻¹
NOB, $X_{B, NOB}$	Bactéries Nitrite Oxydante (nitratante)	mg DCO L ⁻¹

NO _x AR	Vitesse d'accumulation des NO _x	mg _N L ⁻¹ h ⁻¹
NSP	Nombre de granules	
OD, S _O	Concentration en oxygène dissous	g O ₂ m ⁻³
OHO, X _{B, H}	Organisme Hétérotrophe Ordinaire	mg DCO L ⁻¹
OLR	Charge organique volumique	Kg DCO j ⁻¹ m ⁻³
PAO	Organisme Accumulateur de Polyphosphate (organisme déphosphatant)	
PFA	Paraformaldéhyde	
PHB	Poly-Hydroxy Butyrate	
rO ₂	Vitesse de consommation d'oxygène	mgO ₂ L ⁻¹ h ⁻¹
SAV, SGV	Vitesse Superficielle Ascensionnelle	cm s ⁻¹
SBR	Réacteur à alimentation séquentielle	
SND	Nitrification Dénitrification Simultanée	
SNDPR	Nitrification, dénitrification et déphosphatation simultanées	
S _{NH}	Ammonium	mg _N L ⁻¹
S _{NO₃, Lf}	Concentration des nitrates à l'interface du biofilm	g _{N-NO₃} m ⁻³
S _{NOA}	Nitrate	mg _N L ⁻¹
S _{NOI}	Nitrite	mg _N L ⁻¹
S _{O₂, Lf}	Concentration de l'oxygène à l'interface du biofilm	g O ₂ m ⁻³
S _{O₂max}	Concentration en oxygène de consigne	g O ₂ m ⁻³
S _S	Substrat organique soluble et rapidement biodégradable	mg DCO L ⁻¹
S _{S, Lf}	Concentration du substrat à l'interface du biofilm	g DCO m ⁻³
S _{NH, inf}	Concentration en ammonium dans l'influent	g _N m ⁻³
S _{NH, S}	Concentration en ammonium dans l'effluent de sortie	g _N m ⁻³
T	Température	°C
UASB	Réacteur anaérobie à flux ascendant	
V _{boue}	Volume de décantât de la biomasse hybride	L
VER	Fraction d'Echange Volumique	%
V _{granule}	Volume de granule	m ³
V _R	Volume utile de réacteur	L
X _I	Matières particulaires inertes produites par la lyse cellulaire ou la respiration endogène	mg DCO L ⁻¹
X _{STO}	Composés de stockage intracellulaire	mg DCO L ⁻¹
γ _{S,NO₃}	Coefficient de pénétration relative du substrat et nitrate	
γ _{S,O₂}	Coefficient de pénétration relative du substrat et oxygène	
θ _b	Temps de séjour des solides	j
θ _{bmin}	Temps de séjour minimum des solides	j

θ_H	Temps de séjour hydraulique	j ou h
u_{de}	Vitesse de détachement du biofilm	m j ⁻¹
u_F	Vitesse de croissance du biofilm	m j ⁻¹
ε_S	Fraction volumique de solide	
ρ_x	Densité des granules	g DCO L ⁻¹
$Y_{H,NO}$	Rendement de conversion en condition anoxie	g DCO _x g ⁻¹ DCO
Y_{H,O_2}	Rendement de conversion en condition aérobie	g DCO _x g ⁻¹ DCO
$Y_{H,S}$	Rendement de conversion sur le substrat carboné	g DCO _x g ⁻¹ DCO
μ	Taux de croissance	j ⁻¹
μ_{max}	Taux de croissance maximum	j ⁻¹

AVANT-PROPOS

La Directive–Cadre Européenne sur l’Eau adoptée le 23 octobre 2000 (2000/60/CE) a pour objectifs la prévention et la réduction de la pollution, la promotion d’une utilisation durable de l’eau, la protection de l’environnement et l’amélioration de l’état des écosystèmes aquatiques. Son objectif ultime est d’atteindre un «bon état» écologique et chimique de toutes les eaux communautaires d’ici à 2015.

Le traitement des eaux résiduaires urbaines ou industrielles devra alors satisfaire une réglementation de plus en plus stricte et notamment vis-à-vis des nutriments (azote et phosphore notamment) dont un rejet massif peut entraîner des déséquilibres importants se manifestant par le phénomène d’eutrophisation du milieu récepteur.

Les procédés de granulation aérobie (GSBR) développés depuis une dizaine d’années constituent une technologie prometteuse pour le traitement biologique des nutriments comme en témoigne le nombre croissant d’études menées sur le sujet ces dernières années (Figure 0). Plus denses et plus compactes que les procédés traditionnels de traitement biologique à boue activée, les procédés de granulation aérobie présentent également l’avantage de regrouper au sein d’une même matrice différentes fonctionnalités biologiques qui permettent de traiter simultanément les nutriments.

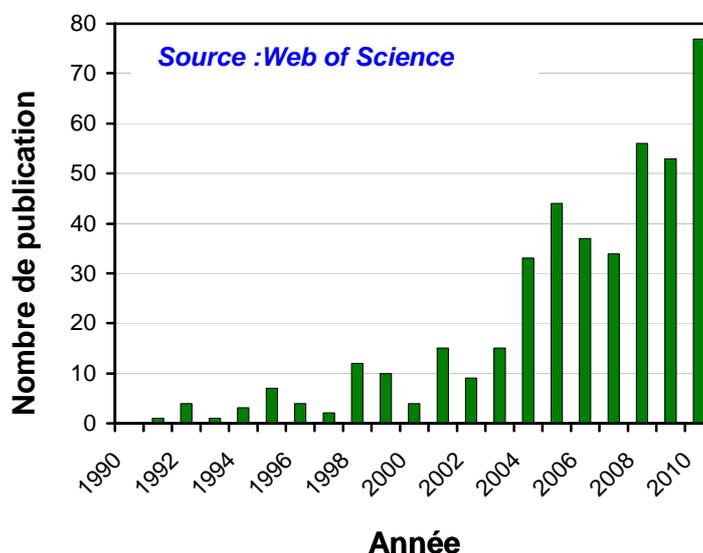


Figure 0. Nombre de publications sur les boues granulaires aérobies (source *Web of Science*)

Au sein du laboratoire d’Ingénierie des Systèmes Biologiques et des Procédés (LISBP), l’étude d’un procédé de granulation aérobie a été initiée par les travaux de thèse de Junfeng Wan (2009) dont l’objectif était de mieux comprendre les interactions entre les processus de transformation de l’azote

et la formation de granules développés en conditions aérobies. Ces travaux ont notamment permis de démontrer l'importance des gradients de concentration en accepteur d'électron (O_2 et NO_3^-) dans la structure des agrégats et la stabilité de la nitrification qui constitue un des points faibles de l'opération des GSBRs.

De plus, ces recherches ont soulevé de nombreuses questions qui ont constitué le point de départ de 3 thèses traitant parallèlement différents axes de la granulation aérobie.

Le premier axe de recherche concerne l'étude des mécanismes de traitement du phosphore par le processus de biominéralisation et celui de la déphosphatation biologique. Le second traite de l'étude et de la caractérisation de la matrice d'exopolymères et de son rôle dans la cohésion des granules aérobies

Enfin le troisième axe d'étude qui va être au cœur du travail présenté ici porte sur l'analyse du traitement de l'azote dans un procédé de granulation aérobie hybride.

Dans un premier temps, une synthèse bibliographique est réalisée de façon à présenter l'état de l'art sur l'élimination de l'azote en granulation aérobie et ainsi de dégager les objectifs de ce travail.

Par la suite une brève présentation du matériel utilisé au cours de l'ensemble de l'étude est proposée. Il est à noter que, du fait de la diversité des outils et méthodes utilisées, les conditions opératoires et méthodologies seront rappelées en début de chaque partie de résultat.

Enfin, les résultats seront présentés et discutés autour de trois axes :

1. Comprendre les mécanismes impliqués dans la stabilité (ou l'instabilité) de deux procédés de granulation aérobie fonctionnant en alternance de phase anaérobie/aérobie et anoxie/aérobie.
2. Evaluer et quantifier les avantages (ou inconvénients) de la coexistence de floes et de granules au sein d'un réacteur granulaire à boue hybride.
3. Optimiser le fonctionnement d'un réacteur granulaire à boue hybride à travers l'évaluation des propriétés physiques de la biomasse pouvant conduire à une élimination efficace de l'azote et à l'augmentation de la robustesse du procédé vis-à-vis de diminutions ponctuelles de l'oxygène dissous.

CHAPITRE I: Synthèse bibliographique

1 Introduction : les procédés de granulation aérobie (GSBR)

Le traitement biologique d'effluents chargés en pollution organique, azotée et phosphorée est depuis longtemps mis en place dans des systèmes du type boue activée utilisant une biomasse épuratrice floculée. Du fait de la structure de cette biomasse, ces réacteurs nécessitent de grandes surfaces (et volumes) de décanteurs et le réacteur biologique ne peut fonctionner à une concentration en biomasse supérieure à 5 - 6 g L⁻¹. Il en découle une surface au sol importante.

La technologie des bioréacteurs à membranes, très développés ces dernières années, en remplaçant les décanteurs secondaires par des membranes permet d'améliorer la compacité des procédés en permettant de travailler à des concentrations en biomasse plus élevées. Ces procédés sont cependant plus consommateurs en énergie du fait des besoins en aération des membranes (minimisation du colmatage) et du transfert d'oxygène qui est très défavorisé dans une boue floculée et concentrée.

Les procédés à biomasse fixée constituent une alternative intéressante à ces procédés. En effet, le développement des bactéries sous forme de biofilm sur des supports, permet d'éliminer les décanteurs secondaires, et de mieux découpler le temps de séjour hydraulique (θ_H) et temps de séjour des solides (θ_b). Il est alors possible d'accroître la concentration en biomasse dans ces bioréacteurs, et donc de traiter des charges volumiques plus importantes tout en diminuant la surface au sol. Mais ces systèmes nécessitent la présence d'un support physique minéral ou organique.

Les agrégats granulaires ont d'abord été développés dans des systèmes anaérobies dans des réacteurs de type UASB (Upflow Anaerobic Sludge Blanket). Cette technologie bien que très intéressante pour sa compacité et pour la production de biogaz valorisable ne permet cependant pas l'élimination de l'azote et du phosphore contenus dans les eaux résiduaires. Dans ce contexte la technologie de granulation aérobie s'est développée il y a une dizaine d'années et se présente comme une alternative intéressante aux procédés aérobies conventionnels.

La formation de granules microbiens en condition aérobie dans un système de traitement des eaux à d'abord été observée dans un réacteur USB (Réacteur à lit de boue et flux ascendant) et rapportée par Mishima et Nakamura (1991). A la fin des années 1990, les recherches sur la structure et la formation des biofilms conduisent à l'apparition des premiers réacteurs aérobies à boues granulaires (GSBR), sans matériaux support et opérant avec une alimentation séquentielle SBR (Morgenroth *et al.* 1997). Ces travaux mettent en évidence le grand potentiel de la granulation aérobie pour le traitement biologique des nutriments.

1.1 Définition des granules microbiens développés en condition aérobie

Les granules microbiens sont décrits dans la littérature comme des agrégats denses et compacts présentant une forme plus ou moins sphérique au contour bien défini (Figure I.1). Ils sont composés d'une matrice d'exopolymères dans laquelle est emprisonnée une large gamme de micro-organismes. Ces micro-organismes (en particulier des bactéries) se développent sous forme de micro-colonies pouvant être réparties à différentes profondeurs du granule.

Lors du premier Workshop à Munich en 2004 une définition plus rigoureuse est proposée (de Kreuk *et al.* 2004) : « **Les granules constituant les boues granulaires aérobies doivent être considérés comme des agrégats d'origine microbienne, ne s'agglomérant pas lorsque les contraintes hydrodynamiques sont réduites, et décantant plus rapidement que les floccs de boues activées** ».

Plus récemment, Wan *et al.* (2011) complètent cette définition et proposent de définir également les granules aérobies comme : « **Agrégats microbiens dont la densité est plus élevée que celle des floccs et dont la cohésion est suffisante pour que leur taille ne soit pas calibrée par l'échelle de turbulence** ».

Ces deux définitions soulignent la différence de structure entre les boues flocculées et granulaires, qui au niveau du procédé de traitement leur confère de nombreux avantages incluant de **très bonnes propriétés de décantation** qui leur confèrent une grande capacité de rétention de la biomasse ainsi que **la présence de zones anaérobie et anoxie** qui permettent de maintenir une large gamme de micro-organismes impliquées dans le traitement de l'azote et du phosphore.

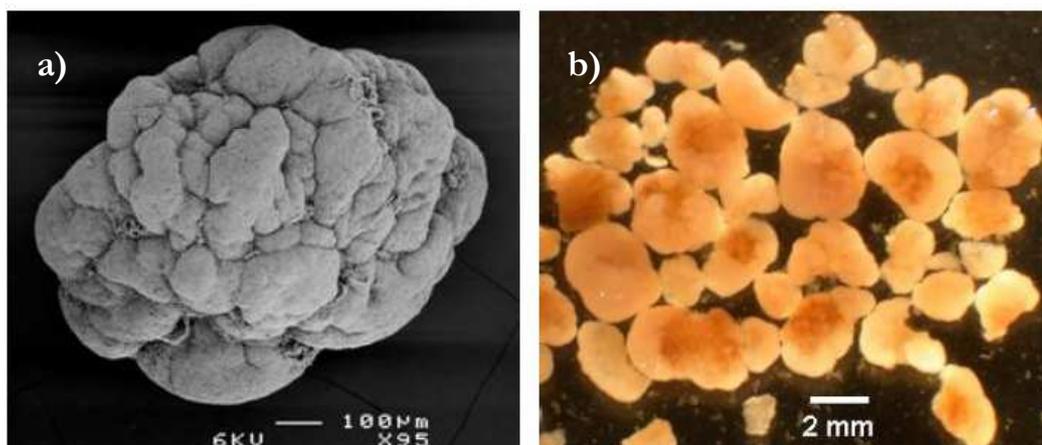


Figure I.1. Photographies de granules obtenues avec : (a) microscopie électronique à balayage (MEB) et (b) microscopie optique (Lemaire *et al.* 2008)

1.2 Facteurs opératoires influençant la formation des granules aérobies

La formation des granules est issue d'un processus graduel impliquant une densification progressive des floccs, leur transformation en granules puis finalement la formation de granules matures (Wan *et al.* 2011). Différentes hypothèses ont été proposées dans la littérature pour expliquer la formation des granules aérobies et les mécanismes biologiques ou physicochimiques impliqués dans leur formation sont controversés. De fait, la transformation d'une boue flocculée à une boue granulaire est aujourd'hui expliquée par un ensemble de paramètres opératoires des procédés favorisant la densification des agrégats biologiques et la sélection des granules. A l'échelle laboratoire les principaux paramètres opératoires identifiés comme susceptibles de favoriser la formation des granules aérobies sont :

- **De faibles temps de décantation et de purge ainsi qu'une fraction d'échange volumique importante (VER)** qui permettent de sélectionner uniquement les agrégats denses décantant rapidement. Ainsi, il est généralement recommandé d'employer un temps de décantation de quelques minutes (Qin *et al.* 2004; Coma 2011).
- **Un mode d'alimentation séquencé** qui permet d'imposer des gradients de concentration plus élevés que dans les procédés continus. Ces gradients favorisent la diffusion du substrat au cœur du granule et permettent une croissance plus homogène au sein de l'agrégat (voir la section 3.1.1 de ce chapitre). De plus ce mode d'alimentation permet d'imposer des alternances entre une période courte durant laquelle le substrat est en excès (« feast ») suivie d'une période de famine relativement longue. Ces alternances de phases favorisent le stockage de composés de stockage intracellulaires qui seront consommés préférentiellement lors de la phase de carence en substrat (ou famine). Ce mode d'alimentation permet la croissance de granules denses et limite la croissance filamenteuse (de Kreuk et van Loosdrecht 2004). De plus, certaines études rapportent que les bactéries deviennent, sous un régime répété de phases de carence et de famine, plus hydrophobes ce qui favorise leur agrégation (Campos *et al.* 2009).
- **Un taux d'aération important** généralement exprimé par la vitesse superficielle ascensionnelle (SAV). Dans les réacteurs granulaires de type air lift ou colonne à bulle, l'aération joue deux rôles (1) elle contrôle l'hydrodynamique au sein des réacteurs et (2) conditionne le transfert de l'oxygène dans la phase liquide. Un fort taux d'aération est susceptible à la fois d'engendrer des contraintes de cisaillement favorisant le détachement surfacique de particules peu cohésives, de stimuler les bactéries à sécréter plus de polysaccharides extracellulaires, contribuant à une structure plus compacte et plus résistante, de réduire la résistance au transfert dans la couche limite à la surface des agrégats, et enfin de fournir une concentration en oxygène dissous suffisante pour la dégradation des substrats (Tay *et al.* 2001b; Liu et Tay 2002).

On peut considérer que certains paramètres sont générateurs des granules en favorisant la densification des agrégats microbiens : en particulier les forts gradients de concentration en accepteur d'électron et substrats ainsi que la sélection d'organismes à taux de croissance faibles. Par ailleurs d'autres paramètres opératoires, comme la décantation courte, permettent d'accélérer la sélection des granules et le lessivage des floes. Les travaux récents de Wan *et al.* (2011) montrent par exemple que de forts débits d'air et une décantation très courte ne sont pas indispensables pour former des granules si les gradients de concentration en substrat et accepteurs d'électrons sont suffisamment importants.

1.3 Potentiel et limites de la technologie de granulation aérobie

La granulation aérobie est considérée comme une technologie prometteuse pour le traitement biologique des effluents chargés en pollution carbonée, azotée et phosphatée (Campos *et al.* 2009). Les boues granulaires cultivées sur effluent synthétique (généralement acétate, glucose, éthanol) dans des réacteurs aérobie à alimentation séquentielle (SBR) ont démontré de très bonnes efficacités pour le traitement de la pollution carbonée et azotée (Jang *et al.* 2003; Yang *et al.* 2003; de Kreuk *et al.* 2007; Wan et Spérandio. 2009) et, dans certains cas, phosphatée (Lin *et al.* 2003; Kishida *et al.* 2006; de Kreuk *et al.* 2007). Les cas d'application de la technologie de granulation aérobie pour le traitement d'effluents réels sont plus rares, celles-ci ont majoritairement été réalisées avec des effluents fortement chargés en matière organiques (Arrojo *et al.* 2004; Yilmaz *et al.* 2008) et plus rares sont les cas d'application avec des effluents peu concentrés et de faibles charges organiques (Liu *et al.* 2010b; Coma, 2011). En particulier l'application à des effluents chargés en matière en suspension comme les effluents urbains reste délicate (Coma, 2011).

L'application des boues granulaires aérobies pour le traitement d'effluents complexes à l'échelle industrielle est encore délicate et nécessite une meilleure compréhension des processus impliqués dans leur formation, les raisons de leur stabilité ou instabilité mais aussi une optimisation des conditions opératoires afin de réduire les coûts de fonctionnement principalement liés à l'aération.

1.3.1 Limitation de la nitrification par l'accessible à l'oxygène dissous

Dans les systèmes aérobies traitant un substrat mixte (carbone et azote), il est généralement observé que les bactéries hétérotrophes (à fort taux de croissance) se développent en grande partie en surface, tandis que les bactéries nitrifiantes (à faible taux de croissance) sont distribuées plus en profondeur. De ce fait, il en résulte que plus la concentration des bactéries hétérotrophes est importante en surface (cas des effluents fortement chargés en pollution carbonée) et plus la disponibilité en oxygène dans les couches internes de l'agrégat diminue. Ainsi, dans le but de stabiliser la nitrification, les procédés de granulation aérobie sont généralement opérés avec de forts taux

d'aération, ce qui présente l'inconvénient de limiter la nitrification dénitrification simultanée (SND) et d'engendrer des coûts de fonctionnement élevés.

Ainsi, dans le but d'optimiser le traitement de l'azote et de diminuer les besoins en aération, Mosquera-Corral *et al.* (2005) ont étudié l'effet de diminutions momentanées et prolongées de l'aération sur la structure et les performances épuratoires d'un réacteur GSB. Les résultats relatifs aux réductions temporaires de concentration (avec des concentrations à saturation allant de 10 à 100%) rapportent une augmentation du rendement d'élimination de l'azote total du fait de l'augmentation de la dénitrification. Conjointement, les auteurs observent une diminution de la vitesse d'élimination de l'ammonium d'environ 45% et 12% pour les concentrations à saturation de l'oxygène dissous de 10% et 20%, respectivement. Par ailleurs, leurs résultats rapportent qu'il est difficile de former des granules stables avec une réduction prolongée de l'oxygène dissous (concentrations à saturation de 40%), alors qu'il était possible à fort taux d'aération (100%).

Plus récemment, Yilmaz *et al.* (2008) ont étudié l'influence du temps de séjour hydraulique sur les performances de nitrification dans des boues granulaires aérobies. Leurs résultats indiquent que l'augmentation de la concentration des bactéries nitrifiantes suite à la diminution du temps de séjour hydraulique (θ_H) ne conduit pas à l'augmentation de l'activité de nitrification de la boue granulaire. Les auteurs expliquent ces résultats par la présence de fortes limitations au transfert d'oxygène dans les granules. En effet, la diminution du temps de séjour hydraulique entraîne l'augmentation des charges volumiques appliquées en substrat carboné et azoté et de fait provoque également l'augmentation de la demande en oxygène, ce qui réduit la profondeur de diffusion de l'oxygène. Les profils d'oxygène mesurés dans les granules aérobies, confirment cette hypothèse et indiquent une faible profondeur de diffusion d'oxygène dans les granules.

1.3.2 *Traitement d'effluents réels contenant des matières particulaires*

Le traitement des matières particulaires est un aspect important pour l'extension de la granulation aérobie au traitement d'effluents urbains puisque la majeure partie des polluants les composant se présente sous forme particulaire ou colloïdale (Campos *et al.* 2009). L'application de la granulation aérobie pour le traitement d'effluents réels incluant un mélange de pollution organique particulaire et soluble indique que la pollution particulaire n'est que partiellement dégradée avec les granules aérobies (Arrojo *et al.* 2004; Schwarzenbeck *et al.* 2004; Yilmaz *et al.* 2008). D'après plusieurs études, il apparaît que le rendement d'élimination des matières en suspension est corrélé à leur taille. Ainsi, l'étude de Schwarzenbeck *et al.* (2004) rapporte que pour des particules de diamètre moyen de moins de 50 μm , le rendement d'épuration est de 80% tandis qu'il est de moins de 40% lorsque le diamètre moyen des particules est au dessus de cette taille. Les auteurs expliquent cette faible dégradation de la matière particulaire par l'effet concomitant de deux phénomènes : (1) la faible

intégration des matières colloïdales dans la matrice du biofilm et (2) l'action des protozoaires développés à la surface des granules.

Par ailleurs, pour des effluents fortement chargés en substrat particulaire, du fait de la faible fraction de carbone organique consommée, il en résulte un temps de mise en régime nécessaire à la formation des granules aérobies et à la stabilisation du procédé trop long (de Kreuk et van Loosdrecht 2006; Liu *et al.* 2010b; Coma, 2011). Dans ces conditions, il est difficile de former des bous granulaires pures et il est généralement observé la formation d'une boue contenant un mélange de granules et de floccs. Par exemple, les travaux de Liu *et al.* (2010) axés sur l'étude de la formation de granules aérobies avec un effluent urbain rapportent que le temps nécessaire à la formation et la stabilisation du procédé est très long (400 jour) et que la boue formée contient une fraction de floccs, celle-ci a varié dans l'étude de 5 à 30%.

Dans ces conditions, l'application d'une forte pression de sélection des particules par la décantation, dans le but de sélectionner et favoriser la formation de granules aérobies, peut être critique pour le maintien des micro-organismes à faible taux de croissance tels que les nitrifiants. Ceci a notamment été observé par Coma *et al.* (2011) qui rapportent que dans une boue granulaire majoritairement composée de floccs, l'application d'un temps de décantation court (2 min) diminue le temps de séjour de la biomasse active dans le réacteur et génère transitoirement une perte de la nitrification et de la déphosphoration biologique. Le retour d'une épuration efficace des nutriments n'est observé que lorsqu'une fraction suffisante de granules a été développée.

Ainsi, l'application de la technologie de granulation aérobie pour le traitement d'effluents réels fait apparaître plusieurs contraintes. En effet, il est observé que lors du traitement d'effluents réels comprenant des matières en suspension la formation d'une boue granulaire pure est délicate. Dans ces conditions, la sélection des granules aérobies par décantation conduit à déstabiliser la nitrification, qui n'est retrouvée que lorsqu'une fraction importante de granules est formée. Cependant, si la fraction de carbone organique facilement biodégradable est trop faible comme dans le cas d'effluents urbains, la formation de granules et la stabilisation des procédés nécessite un temps important et à contrario si cette fraction est trop importante, la croissance rapide des granules est observée et on peut alors craindre une forte compétition entre les bactéries hétérotrophes et autotrophes pour l'oxygène.

De fait, la croissance simultanée d'une biomasse floculée et d'une biomasse densifiée présentant une structure physique et un niveau de résistance au transfert de l'oxygène différents, pourrait constituer un atout dans l'augmentation de la robustesse des procédés. En effet, la croissance des bactéries autotrophes dans les floccs est possible dès lors que le temps de séjour de la biomasse est relativement important. De plus, ces agrégats présentent une résistance au transfert de masse du substrat et de l'oxygène plus faible que celle des granules aérobies, ce qui limite la compétition

microbienne pour l'oxygène. De fait, on peut penser que la coexistence de ces deux types d'agrégats au sein d'un même réacteur pourrait peut être augmenter la robustesse du procédé sur le long terme mais aussi à court terme lors d'augmentations ponctuelles de la charge organique ou de diminutions momentanées de la concentration en oxygène dissous.

Comme nous l'avons exposé la nitrification est un des points sensibles de l'opération des procédés de traitement biologique (à boue activée mais aussi à granulation aérobie). Nous allons donc dans la partie suivante de ce chapitre nous concentrer dans un premier temps sur la caractérisation des populations nitrifiantes ainsi que des paramètres cinétiques de la nitrification. Puis, nous caractériserons les mécanismes de la compétition microbienne entre bactéries autotrophes et hétérotrophes mais aussi entre les deux grands groupes de bactéries autotrophes au sein des agrégats denses tels que les biofilm et les granules aérobies. Pour finir nous décrirons les principaux modes de conduites des procédés de granulation aérobie pour le traitement simultané des nutriments.

2 Traitement de l'azote et populations nitrifiantes

2.1 Description des processus majeurs de traitement de l'azote

Dans les procédés classiques à boues activées, la nitrification et la dénitrification sont les principaux processus mis en œuvre pour l'élimination de l'azote. Ces réactions sont catalysées par deux grands types de biomasse :

- **La biomasse hétérotrophe**, principale composante des boues, elle est responsable des réactions de transformation de la matière organique en condition aérobie ou anoxie (c'est à dire en absence d'oxygène mais en présence d'azote oxydé).
- **La biomasse autotrophe**, qui est responsable des réactions d'oxydation de l'ammonium en conditions aérobies.

2.1.1 Nitrification

La nitrification correspond à l'oxydation biologique de l'azote ammoniacal en nitrates via les nitrites. Cette réaction s'effectue en deux étapes, la nitrification et la nitrification, réalisées par des bactéries ammonium-oxydantes ou nitrifiantes (AOB) et les nitrite-oxydantes ou nitrifiantes (NOB), respectivement. Les bactéries de la nitrification utilisent le carbone minéral (HCO_3^- et CO_2) comme source de carbone, des molécules inorganiques ($\text{NH}_3/\text{NH}_4^+$, NO_2^-) comme source d'énergie (donneurs d'électrons) et l'oxygène comme accepteur final d'électrons dans la chaîne respiratoire. En raison du faible gain d'énergie issu de l'oxydation de l'ammonium et du nitrite, le taux de croissance

des bactéries nitrifiantes ainsi que leur rendements d'assimilation sont faibles, notamment si on les compare à ceux des bactéries hétérotrophes.

2.1.1.1 Diversité des populations nitrifiantes

Les ammonium-oxydantes (AOB)

Les bactéries nitrifiantes sont regroupées en cinq genres dont le nom commence par le préfixe "Nitroso-" (Bergey, 1985): *Nitrosomonas*, *Nitrosococcus*, *Nitrospira*, *Nitrosolobus* et *Nitrosovibrio*. L'espèce la plus étudiée (espèce de référence) est *Nitrosomonas europaea*. Pendant longtemps *Nitrosomonas europaea* a été la seule espèce reconnue du genre *Nitrosomonas*, mais de récentes études montrent que le genre *Nitrosomonas* est en réalité partagé en 5 sous-groupes. Ces différentes espèces présentent des différences en termes de paramètres cinétiques.

Les nitrite- oxydantes (NOB)

Les bactéries nitrifiantes (préfixe « Nitro-») appartiennent à quatre genres bactériens distincts *Nitrobacter*, *Nitrococcus*, *Nitrospina* et *Nitrospira*. Pendant longtemps, le genre *Nitrobacter* a été considéré comme la bactérie clé responsable de l'oxydation des nitrites en nitrates (Tchobanoglous et Burton, 1991). Avec l'apparition de nouvelles techniques d'identification telles que l'hybridation fluorescente *in situ* (FISH), de nombreuses études révèlent que le genre *Nitrospira* est également impliqué dans la nitrification (Burrell *et al.* 1998; Juretschko *et al.* 1998; Daims *et al.* 2001).

En réalité, il apparaît que les deux espèces cohabitent au sein des agrégats biologiques et que leur structuration en son sein dépendrait à la fois des méthodes utilisées pour la détection (méthodes culturales ou de biologie moléculaire) mais aussi des facteurs environnementaux tels que la concentration en oxygène et substrat dans les effluents à traiter. Ainsi, *Nitrospira* serait adaptée aux faibles concentrations en oxygène et nitrite, tandis que *Nitrobacter* se développerait à de fortes concentrations (Schramm *et al.* 1999; Nogueira et Melo, 2006).

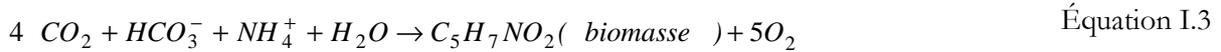
2.1.1.2 Biochimie et stœchiométrie de la nitrification

Les réactions d'oxydation d'ammonium et de nitrites sont représentées par les Equations I.1 et I.2, respectivement :

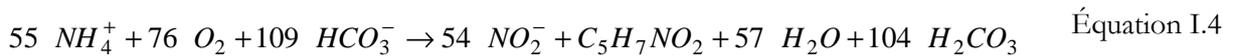


Avec G l'énergie libérée par l'oxydation d'un atome d'azote : $G_1 = 276-351 \text{ kJ}/(\text{mol N})$; $G_2 = 64,4-87,5 \text{ kJ}/(\text{mol N})$.

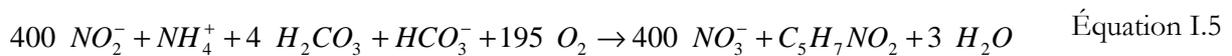
Chaque espèce nitrifiante doit également utiliser l'azote pour ses besoins cellulaires de croissance. Cette réaction de synthèse est la suivante :



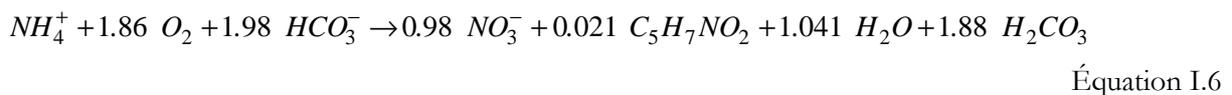
La combinaison de chaque réaction d'oxydation avec la réaction de synthèse conduit aux deux réactions de nitritation et nitratisation. La réaction de nitritation (Equation I.4) décrit le métabolisme des bactéries nitritantes.



La réaction de nitratisation (Equation I.5) décrit le métabolisme des bactéries nitratantes :



La nitrification qui résulte de la somme des réactions de nitritation et nitratisation peut dans le cas où il n'y a pas d'accumulation des nitrites (cas le plus courant car la nitritation est l'étape limitante) être décrite par l'Equation I.6:



A partir des équations précédentes, il est possible de déterminer les rendements associés. Ceux-ci sont résumés dans le Tableau I.1 :

Tableau I.4. Rendements de croissance et de consommation de l'oxygène de la réaction de nitrification

	Nitritation	Nitratisation
Rendement de croissance (g DCO-X / g Noxydé)	0,14	0,02
Rendement de consommation (gO ₂ / g Noxydé)	3,43	1,11

2.1.1.3 Paramètres cinétiques de la nitrification

La dynamique des bactéries autotrophes est classiquement décrite par une équation de type Monod (1942) dont le formalisme est présenté par l'Equation I.7:

$$\frac{dX}{dt} = (\mu - b) X \quad \text{Équation I.7}$$

Le terme μ (j^{-1}) représente le taux de croissance des bactéries alors que b (j^{-1}) représente la diminution de la concentration de la biomasse due au décès.

Le taux de croissance réel d'une biomasse est généralement exprimé par un taux de croissance maximal (μ_{max}) pondéré par des facteurs limitants liés aux conditions environnementales (température, concentration du substrat, pH, inhibiteurs, ...), son calcul est représenté par l'Equation I.8:

$$\mu = \mu_{max} \cdot f(T) \cdot f(pH) \cdot f(inhibition) \cdot \frac{S_1}{K_{S1} + S_1} \cdot \frac{S_2}{K_{S2} + S_2} \quad \text{Équation I.8}$$

La mortalité résulte de la dégénérescence naturelle des bactéries en absence de substrat d'une part, et de l'action de bactériophages et de la prédation des protozoaires d'autre part. Le taux de mortalité (b) dépend de certaines conditions opératoires des procédés dont les conditions d'oxygénation du milieu. En effet, un certain nombre d'études indique que le taux de décès diffère en conditions aérobie, anoxie, anaérobie ou en conditions d'alternance de phases.

Le Tableau I.5 regroupe les récentes valeurs des taux de croissance et de décès des bactéries nitrifiantes (dans les procédés à boue activées, bioréacteurs à membranes et en culture pure) recensées dans la littérature. Notons que les valeurs des paramètres cinétiques des bactéries nitrifiantes mais aussi hétérotrophes observées pour des procédés à granulation aérobie sont données dans le chapitre résultats : partie modélisation.

Le taux de croissance maximum des deux populations de bactéries nitrifiantes présente une large gamme de variation. Ceci peut s'expliquer par le fait que la valeur du taux de croissance dépend de plusieurs paramètres dont la nature des souches et de leur stratégie, les conditions de croissance (nature de l'effluent : réel ou synthétique, concentration du substrat et de l'oxygène), la nature de l'environnement local (présence ou non de limitations au transfert du substrat et de l'oxygène), mais aussi de la technique employée pour l'estimation des paramètres cinétiques (respirométrie, cinétique, modélisation...). Les valeurs moyennes du taux de croissance maximum des AOB et NOB estimées par Munz *et al.* (2011) sur un large panel d'études (pour une température de 20°C et un pH de 7-8) est de $\mu_{AOBmax} = 0,9 \pm 0,5 \text{ j}^{-1}$ et $\mu_{NOBmax} = 1,4 \pm 0,9 \text{ j}^{-1}$ pour un effluent synthétique et de $\mu_{AOBmax} = 0,7 \pm 0,4 \text{ j}^{-1}$ et $\mu_{NOBmax} = 0,8 \pm 0,4 \text{ j}^{-1}$ pour un effluent domestique ou industriel.

Les valeurs du taux de décès qui sont similaires pour les AOB et NOB varient également dans une large gamme selon les conditions de leur estimation. En effet, la littérature révèle que ces taux sont significativement inférieurs en conditions anoxies qu'en conditions aérobies (Martinage et Paul 2000; Salem *et al.* 2006; Munz *et al.* 2011). Ceci s'explique par le fait que la prédation des protozoaires qui est considérée comme l'un des processus majeurs impliqué dans le décès de la biomasse (Van Loosdrecht et Henze, 1999) est fortement affectée par la concentration en oxygène dissous (Griffiths 1997).

Tableau I.5. Paramètres cinétiques de croissance et de décès des bactéries nitrifiantes

	Espèces	Type de procédé	T (°C)	Taux de croissance μ_{\max} (j ⁻¹)	Taux de décès b (j ⁻¹)	Référence
AOB	Culture mixte	⁽¹⁾ Boue activée	20 ± 1	1,05 - 1,4	0,28 ⁽²⁾ /0,07 ⁽³⁾	(Münz <i>et al.</i> 2011)
	Culture mixte	Boue activée	20 ± 1	0,72 ± 0,2	0,1 ± 0,06	(Münz <i>et al.</i> 2010)
	Culture mixte	BRM	20 ± 1	0,35 ± 0,07	0,08 ± 0,04	(Münz <i>et al.</i> 2010)
	Culture enrichie en nitrifiant	⁽¹⁾ Boue activée	25	0,43 ± 0,24 0,57 ± 0,24	-	(Chandran <i>et al.</i> 2008)
	<i>Nitrosomonas europaea/eutropha</i>	⁽¹⁾ Isolat de boue	-	0,66 ± 0,09	0,044	(Park et Noguera 2007)
	<i>Nitrosomonas oligotropha</i>	⁽¹⁾ Isolat de boue	-	0,77 ± 0,14	0,083	
	<i>Nitrosomonas europaea</i>	Boue activée	20 -22	2,71 ± 0,26* 1,95 ± 0,28**	-	(Park et Noguera 2004)
	Culture mixte	Boue activée	20	0,83	0,09	(Katehis <i>et al.</i> 2002)
Culture mixte	⁽¹⁾ Boue activée	25	0,69	-	(Hanaki <i>et al.</i> 1990)	
NOB	Culture mixte	⁽¹⁾ Boue activée	20	0,91-1,31	0,27 ⁽²⁾ /0,04 ⁽³⁾	(Münz <i>et al.</i> 2011)
	Culture mixte	Boue activée	20 ± 1	0,42 ± 0,2	0,11 ± 0,02	(Münz <i>et al.</i> 2010)
	Culture mixte	BRM	20 ± 1	0,41 ± 0,06	0,11 ± 0,02	
	Culture enrichie en nitrifiant	⁽¹⁾ Boue activée	25	0,55 ± 0,24 0,65	-	(Chandran <i>et al.</i> 2008)

(1) Procédé alimenté avec un influent synthétique.

(2) Taux de décès estimé en conditions aérobie, et en condition anoxie (3).

* Culture acclimatée aux faibles concentrations en oxygène dissous 0,12 – 0,24 mg L⁻¹.

** Culture acclimatée aux fortes concentrations en oxygène dissous 8,5 mg L⁻¹.

L'Equation I.8 fait également apparaître une constante de Monod (K_s) qui s'apparente à l'inverse d'une constante d'affinité des bactéries vis-à-vis d'un substrat S. Lorsque la concentration en substrat dans le milieu est élevée (on dit que le substrat est non limitant), le taux de croissance est alors indépendant de la concentration en substrat et il est directement proportionnel à la quantité de biomasse active présente dans le milieu.

Il est généralement admis que l'affinité des bactéries nitritantes pour l'oxygène est plus élevée (K_{O_2} plus faible) que celle des bactéries nitrifiantes pour qui il devient donc plus difficile d'oxyder les

nitrites dans le cas d'une compétition pour l'oxygène. Cependant les valeurs des constantes d'affinité pour l'oxygène des bactéries AOB et NOB données dans la littérature sont très variables (voir Tableau I.3). De plus, elles sont sur certains intervalles communes aux deux types bactériens. L'importante variation des constantes d'affinité est en partie due à une différence de niveaux de résistance au transfert de l'oxygène dans les agrégats. Ces résistances au transfert sont variables d'une étude à l'autre car elles dépendent de la distribution de taille des particules des agrégats étudiés mais aussi de leur structure interne. Cependant, les études menées par Laanbroek *et al.* (1994), Ciudad *et al.* (2006) et Blackburne *et al.* (2008) confirment l'hypothèse selon laquelle les bactéries nitrifiantes (NOB) sont plus sensibles que les nitrifiantes (AOB) aux limitations en oxygène.

Tableau I.6. Constantes d'affinité des bactéries nitrifiantes pour le substrat azoté et l'oxygène.

	Espèces	Origine	T (°C)	K _s * (mg _N L ⁻¹)	K _{O₂} (mg _{O₂} L ⁻¹)	Référence
AOB	Culture enrichie en nitrifiant	⁽¹⁾ Boue activée	25	0,42 ± 0,18 0,5 ± 0,23	-	(Chandran <i>et al.</i> 2008)
	Nitrosomonas europaea/eutropha	⁽¹⁾ Isolat de boue	-	1,62 ± 0,97	0,24 ± 0,13	(Park et Noguera 2007)
	<i>Nitrosomonas oligotropha</i>	⁽¹⁾ Isolat de boue	-	0,48 ± 0,35	1,22 ± 0,43	
	Culture enrichie en nitrifiants	Boue activée	20	0,3	0,99 ± 0,05	(Ciudad <i>et al.</i> 2006)
	AOB dominance <i>Nitrosomonas oligotropha</i>	Boue activée	20	0,14 ± 0,1 ⁽²⁾	0,79 ± 0,08	(Manser <i>et al.</i> 2005)
	AOB dominance de <i>Nitrosomonas oligotropha</i>	BRM	20	0,13 ± 0,05 ⁽²⁾	0,18 ± 0,04	
	<i>Nitrosomonas europaea</i>	Boue activée	20-22	-	1,21 ± 0,3 0,98 ± 0,42	(Park et Noguera 2004)
	<i>Nitrosomonas europaea</i>	Culture pure	25	-	0,22 – 0,56	(Laanbroek <i>et al.</i> 1994)
	Culture mixte	⁽¹⁾ Boue	25	1,00	-	(Hanaki <i>et al.</i> 1990)
NOB	Culture enrichie en nitrifiant	⁽¹⁾ Boue activée	25	1,1 -1,6	-	(Chandran <i>et al.</i> 2008)
	Culture enrichie <i>Nitrobacter</i>	⁽¹⁾ Boue activée	22 ± 1	1,2 -1,3	0,43 ± 0,08	(Blackburne <i>et al.</i> 2007)
	Culture enrichie <i>Nitrospira</i>	⁽¹⁾ Boue activée	22 ± 1	0,9-1,1	0,54 ± 0,14	
	Culture enrichie en nitrifiants	Boue activée	20	2,2 x 10 ⁻⁴	1,4 ± 0,2	(Ciudad <i>et al.</i> 2006)

NOB dominance <i>Nitrospira</i>	Boue activée	20	$0,28 \pm 0,2^{(2)}$	$0,47 \pm 0,04$	(Manser <i>et al.</i> 2005)
NOB dominance <i>Nitrospira</i>	BRM	20	$0,17 \pm 0,06^{(2)}$	$0,13 \pm 0,06$	
<i>Nitrobacter Hamburgensis</i>	Culture pure	25	-	0,17 - 4,33	(Laanbroek <i>et al.</i> 1994)
<i>Nitrobacter Winogradskyi</i>	Culture pure	25	-	0,7 - 5,3	(Laanbroek et Gerards 1993)

(1) Procédé alimenté avec un influent synthétique.

(2) Expériences réalisées à 15°C.

* Le substrat considéré pour les AOB et soit NH_3 ou NH_4^+ , celui des NOB est NO_2^- sauf pour Ciudad *et al.* 2006 pour qui c'est l'acide nitreux HNO_2 .

2.1.2 Dénitrification

La dénitrification correspond au processus de dégradation de la pollution organique par voie anoxique. La première étape de la dénitrification est la conversion des nitrates en nitrites. Cette première étape est ensuite suivie par la production de monoxyde d'azote, puis de protoxyde d'azote et enfin d'azote gazeux. Différentes enzymes appelées réductases permettent de catalyser cette réaction, comme l'illustre la Figure I.2.

Au sein d'agrégats biologiques, la dénitrification est réalisée par deux types de bactéries hétérotrophes, celles ayant la faculté d'accumuler le polyphosphate (DN-PAO) et le glycogène (DN-GAO) et celles ne possédant pas cette faculté appelées OHO (Organismes hétérotrophes ordinaires).

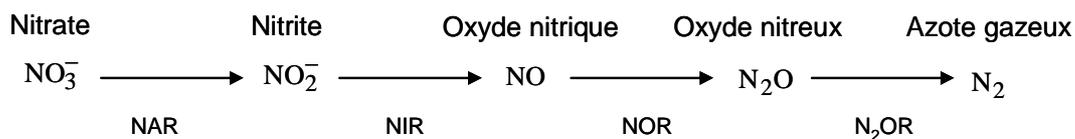
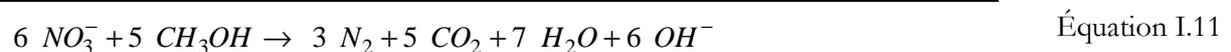
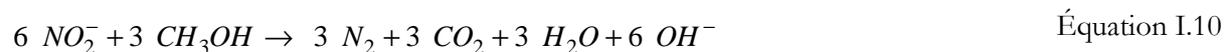
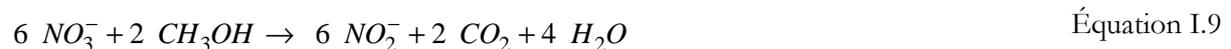


Figure I.2. Réaction de dénitrification catalysée par les nitrate (NAR), nitrite (NIR), oxyde nitrique (NOR) et oxyde nitreux (N₂OR) réductases.

Les réactions simplifiées de la dénitrification avec le méthanol comme source de carbone sont les suivantes :



L'Equation I.11 ne tient pas en compte les besoins pour la croissance cellulaire (ici le rapport DCO/N théorique est de 2,86 g DCO/ g N-NO₃⁻ ou 1,71 g DCO/ g N-NO₂⁻). Cependant, une fraction de la matière organique est utilisée pour la croissance cellulaire ; et dans ces conditions le rapport DCO/N dépendra du rendement de conversion ($Y_{H,S}$) des bactéries hétérotrophes (Equation I.12) :

$$\frac{\Delta DCO}{\Delta N - NO_3^-} = \frac{2,86}{1 - Y_{H,S}} \quad \text{ou} \quad \frac{\Delta DCO}{\Delta N - NO_2^-} = \frac{1,71}{1 - Y_{H,S}} \quad \text{Équation I.12}$$

2.2 Facteurs du milieu influençant la croissance respective des nitrifiants (différenciant les AOB et NOB)

L'étude des mécanismes gouvernant la compétition des bactéries nitrifiantes entre les AOB et NOB est motivée par la compréhension du processus du shunt des nitrates dont le principe est celui d'une nitrification limitée au stade des nitrites, la dénitrification réduisant alors directement les nitrites accumulés. Les avantages du shunt des nitrates sont: (1) une réduction de 25% des besoins en oxygène nécessaire pour la nitrification (Gibbs *et al.* 2004), et (2) environ 40% de réduction des besoins en carbone organique pour la dénitrification (Tchobanoglous et Burton 1991).

L'accomplissement du shunt des nitrates nécessite de favoriser la croissance des bactéries nitritantes (AOB) au détriment des nitratantes (NOB). La littérature révèle qu'un certain nombre de paramètres opératoires des procédés influencent la croissance respective des AOB et NOB et permettent de favoriser la compétition entre ces deux populations.

2.2.1 La température

Les cinétiques de croissance (μ_{\max} et K_s) des bactéries nitrifiantes dépendent de la température du milieu. Cependant, la variation du taux de croissance en fonction de la température est différente entre les AOB et NOB, ce qui constitue un paramètre clé du contrôle de la compétition microbienne (Kim *et al.* 2006; Van Hulle *et al.* 2007). En effet, pour de fortes températures (supérieure à 25°C) la vitesse maximale de croissance des AOB devient supérieure à celle des NOB et l'inverse est observé pour des températures inférieures à 25°C (Hellings *et al.* 1998; Zhu *et al.* 2008). Ceci explique pourquoi la majorité des procédés de nitrification partielle fonctionnent à des températures élevées. La stratégie du procédé SHARON® (Single reactor system for High activity Ammonia Removal Over Nitrite), développé par la Delft University of Technology (Hellings *et al.* 1998) est d'appliquer des températures suffisamment élevées (30-40°C) pour que le taux de croissance des bactéries

nitratantes soit inférieur à celui des bactéries nitritantes et d'ajuster le temps de séjour des micro-organismes de sorte à lessiver les NOB.

2.2.2 La teneur en oxygène dissous

L'oxygène dissous étant un réactif pour lequel l'affinité des bactéries nitritantes est supérieure à celle des nitratantes (Tableau I.6), une concentration suffisamment faible en oxygène dissous peut induire une limitation sélective de la réaction de nitrification. La littérature indique que l'accumulation des nitrites est obtenue dans les procédés pour une gamme de concentrations en oxygène dissous allant de 0,2 à 2 mg L⁻¹ (Garrido *et al.* 1997; Wang et Yang 2004; Blackburne *et al.* 2008; Aslan *et al.* 2009). Cependant, selon la structure et le niveau de résistance au transfert de l'oxygène dans les agrégats, la diminution de la concentration en oxygène dissous peut être critique pour le développement des AOB. Ainsi, par exemple Garrido *et al.* (1997) observent que dans un biofilm (forte résistance au transfert) les deux processus de nitrification et nitrification sont affectés à partir de concentrations inférieures à 1 mg L⁻¹ alors que la concentration couramment employée dans les procédés à nitrification partielle appliqués aux boues activées (faibles résistances) est d'environ 0,5 mg L⁻¹.

2.2.3 L'inhibition par NH₃

La présence d'ammoniac libre dans les effluents résulte d'un équilibre acido-basique (NH₄⁺/NH₃) qui dépend de la concentration en azote ammoniacal et des conditions de pH et de température. La concentration de l'ammoniac libre peut être décrite selon Anthonisen *et al.* (1976) par l'équation suivante :

$$[N - NH_3] = \frac{[NH_{Tot}] \times 10^{pH}}{1/Ka + 10^{pH}} \quad \text{avec} \quad 1/Ka = \exp [6334/(273+T)] \quad \text{Équation I.13}$$

Avec NH_{Tot} est la concentration de l'azote ammoniacal total (NH₃ + NH₄), Ka est la constante d'acidité pour le couple NH₄⁺/NH₃ (Ka à 25°C = 10^{-9.24}) et T est la température (°C).

La littérature révèle que les bactéries nitrifiantes sont sensibles aux formes libres de l'ammoniac NH₃. Cependant, les seuils de concentration en NH₃ entraînant une inhibition sont sensiblement différents entre les deux espèces. Les travaux de Anthonisen *et al.* (1976) rapportent que l'activité des AOB est inhibée pour des concentrations allant de 10 à 150 mg N-NH₃ L⁻¹ contre 0,1 à 1 mg N-NH₃ L⁻¹ pour les NOB. Plus récemment, Abeling et Seyfried. (1992) ont montré qu'une concentration de 1 à 5 mg N-NH₃ L⁻¹ permettait d'inhiber la nitrification et pas la nitritation. Cependant, des valeurs seuils d'inhibition des NOB plus élevées (de 6,6 à 8,9 mg N-NH₃ L⁻¹) ont été rapportées dans la littérature (Mauret *et al.* 1996).

De plus, il a été démontré que les bactéries nitrifiantes de type *Nitrobacter*, si elles sont acclimatées peuvent tolérer des concentrations très élevées de NH_3 (jusqu'à $40 \text{ mg N-NH}_3 \text{ L}^{-1}$), alors que les populations non acclimatées sont inhibées à partir de concentrations de $3,5 \text{ mg N-NH}_3 \text{ L}^{-1}$ (Turk et Mavinic 1989).

3 Traitement de l'azote dans les procédés à biomasse densifiée

Dans les procédés à biomasse fixée (biofilms) ou auto-fixée (granules), le temps de séjour des solides est découplé du temps de séjour hydraulique, ce qui permet théoriquement d'augmenter la concentration en biomasse dans le réacteur et ainsi d'accroître la capacité volumique du procédé. Par ailleurs, ce découplage est particulièrement intéressant pour le maintien des bactéries à faible taux de croissance telles que les bactéries nitrifiantes. Cependant, l'accroissement de la taille et de la densité des agrégats génère des limitations au transfert de l'oxygène et du substrat dont résulte une organisation spatiale des communautés microbiennes bien plus hétérogène que dans les flocons. Ces espèces réunies au sein d'une même matrice biologique vont interagir les unes avec les autres. Ces interactions peuvent avoir des effets positifs ou négatifs sur les micro-organismes composant le système. La compétition microbienne vis-à-vis des nutriments et de l'oxygène est souvent considérée comme la principale interaction déterminant la composition et le comportement d'une communauté microbienne. De ce fait, elle est susceptible de déterminer les dynamiques de concentration des populations microbiennes et ainsi avoir un impact sur les performances globales des procédés.

Dans cette partie nous nous intéresserons à l'étude de l'effet des limitations au transfert de l'oxygène et du substrat sur la structure physique ainsi que sur la compétition microbienne au sein d'agrégats denses tels que les biofilms et les granules aérobies et à son impact sur les performances des procédés.

3.1 Relation entre les limitations au transfert et la structure des agrégats

3.1.1 Régimes de croissance des biofilms

Au sein des agrégats denses les gradients de concentrations de l'oxygène et du substrat sont conditionnés par le taux de transfert du substrat par diffusion et par le taux de croissance maximum des micro-organismes. Les travaux de Picioreanu *et al.* (1998) montrent qu'il existe un lien entre la structure des agrégats et la présence de gradients de concentrations dans les biofilms. Selon cette étude le mode de croissance des biofilms peut être évalué par le paramètre « G », qui définit le ratio entre le taux de croissance maximum des micro-organismes et le taux de transfert (similaire au carré du module de Thiele) selon l'Equation suivante :

$$G = \frac{L_f^2 \mu_{max} C_{xm}}{D_s C_{s0}} \quad \text{Équation I.14}$$

Avec : L_f est l'épaisseur du biofilm (m), μ_{max} est le taux de croissance maximum (j^{-1}), D_s est le coefficient de diffusion ($m^2 j^{-1}$), C_{xm} est la concentration maximum de la biomasse dans le biofilm (g DCOx m^{-3}) et C_{s0} est la concentration en substrat dans la phase liquide (g DCO m^{-3}).

Le calcul du paramètre G permet de définir si le mode de croissance du biofilm est limité par le transfert (valeur de G supérieure à 10) ou par la croissance (valeur de G inférieure à 10). Lorsque le régime de croissance des biofilms est limité par le transfert, le substrat ne diffuse que sur une fraction du biofilm et la croissance des micro-organismes n'est alors possible que sur les couches superficielles. Il en résulte le développement d'un biofilm avec une structure hétérogène voire filamenteuse en surface (Figure I.3 b). A contrario, pour de faibles valeurs de G (limitation par la croissance), le substrat qui pénètre sur l'ensemble du biofilm permet une croissance bien plus homogène des micro-organismes sur l'ensemble de l'agrégat. Dans ces conditions, le biofilm se développe de manière plus lisse et régulière (Figure I.3 c).

En résumé il apparaît que tout phénomène permettant d'accroître le transfert surfacique (par le mélange ou le détachement de particules) et de favoriser le développement de micro-organismes à faible taux de croissance (tels que les nitrifiants) permettrait d'augmenter la stabilité des agrégats biologiques.

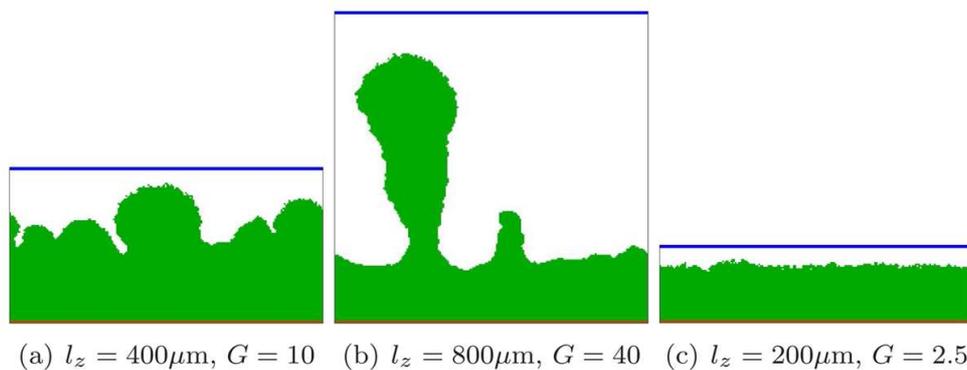


Figure I.3. Représentation schématique des interfaces biologiques d'un biofilm en fonction du facteur G (Poplawski *et al.* 2008)

3.1.2 Cas particulier des accepteurs d'électrons (oxygène et nitrate)

Dans un système aérobie avec un substrat mixte (carbone et azote), il est généralement observé que les bactéries ayant le taux de croissance le plus élevé (hétérotrophes) se développent en grande

partie en surface, tandis que les bactéries nitrifiantes (à faible taux de croissance) sont distribuées plus en profondeur. Il en résulte que plus la concentration des bactéries hétérotrophes est importante en surface et plus la disponibilité de l'oxygène dans les couches internes de l'agrégat diminue (Gonenc et Harremoës 1990; Zhang *et al.* 1994; Okabe *et al.* 2004).

Une approche « simple » permet de prédire le potentiel de coexistence des bactéries autotrophes et hétérotrophes. Celle-ci est basée sur le calcul du régime de croissance des bactéries hétérotrophes vis-à-vis des limitations par l'oxygène et par le substrat. Selon cette approche la coexistence des bactéries hétérotrophes et autotrophes n'est possible que si les bactéries hétérotrophes sont limitées par le substrat. A contrario, si les bactéries hétérotrophes sont limitées par l'oxygène, la croissance des bactéries à faible taux de croissance (nitrifiantes) dans les zones internes des agrégats n'est plus possible du fait des carences en oxygène.

Le régime de croissance des bactéries hétérotrophes peut être évalué par le calcul du paramètre γ_{S,O_2} tel que (Henze *et al.* 1995) :

$$\gamma_{S,O_2} = (1 - Y_{H,S}) \frac{D_S S_{S,Lf}}{D_{O_2} S_{O_2,Lf}} \quad \text{Équation I.15}$$

Où $Y_{H,S}$ est le rendement de croissance des hétérotrophes (g DCO_x g⁻¹ DCO), D_S est le coefficient de diffusion du substrat (m² j⁻¹), D_{O_2} est le coefficient de diffusion de l'oxygène (m² j⁻¹), $S_{S,Lf}$ est la concentration du substrat à la surface du biofilm (g DCO m⁻³) et $S_{O_2,Lf}$ est la concentration de l'oxygène à la surface du biofilm (g O₂ m⁻³).

Une valeur de γ_{S,O_2} inférieure à 1 indique que le substrat organique est potentiellement limitant à l'intérieur du biofilm alors que l'oxygène diffuse sur toute l'épaisseur du biofilm. Lorsque γ_{S,O_2} est supérieur à 1, l'oxygène est potentiellement limitant à l'intérieur du biofilm, le substrat organique diffusant sur toute l'épaisseur. Enfin pour une valeur de γ_{S,O_2} proche de 1, l'oxygène et le substrat organique sont simultanément limitants à l'intérieur du biofilm.

L'influence du rapport γ_{S,O_2} sur la compétition microbienne a été étudiée expérimentalement et par simulation numérique. A titre d'exemple on peut citer les travaux de Elenter *et al.* en 2007 menés sur un biofilm mixte. Les résultats expérimentaux de cette étude montrent que l'augmentation du rapport γ_{S,O_2} (avec l'augmentation de la charge de carbone organique) d'une valeur de 0,3 à 1,1 entraîne une chute du flux d'azote nitrifié de $1,4 \pm 0,1$ g_N m⁻² j⁻¹ à $0,2 \pm 0,1$ g_N m⁻² j⁻¹. Parallèlement, les auteurs observent une diminution de la proportion des bactéries ammonium oxydantes (quantifiée par la technique FISH). Celle-ci qui était initialement de 5% (pour $\gamma_{S,O_2} = 0,3$) diminue jusqu'à 1,2% (pour $\gamma_{S,O_2} = 1,1$). Les résultats des simulations numériques (modèle 1D), indiquent que lorsque le

ratio γ_{S,O_2} est augmenté la vitesse de croissance des bactéries hétérotrophes devient significativement supérieure à celle des bactéries autotrophes. De fait, celles-ci vont alors se développer principalement en surface limitant ainsi l'apport de l'oxygène dans les couches internes du biofilm et par là même la croissance des bactéries nitrifiantes (Figure I.4).

Plus récemment l'étude de Derlon (2008) indique que l'implantation de la nitrification au sein d'un biofilm mixte n'est possible que pour des valeurs de γ_{S,O_2} inférieur à 0,2. Lorsque le ratio dépasse cette valeur critique, l'oxygène devient limitant et la croissance des bactéries nitrifiantes est alors impossible.

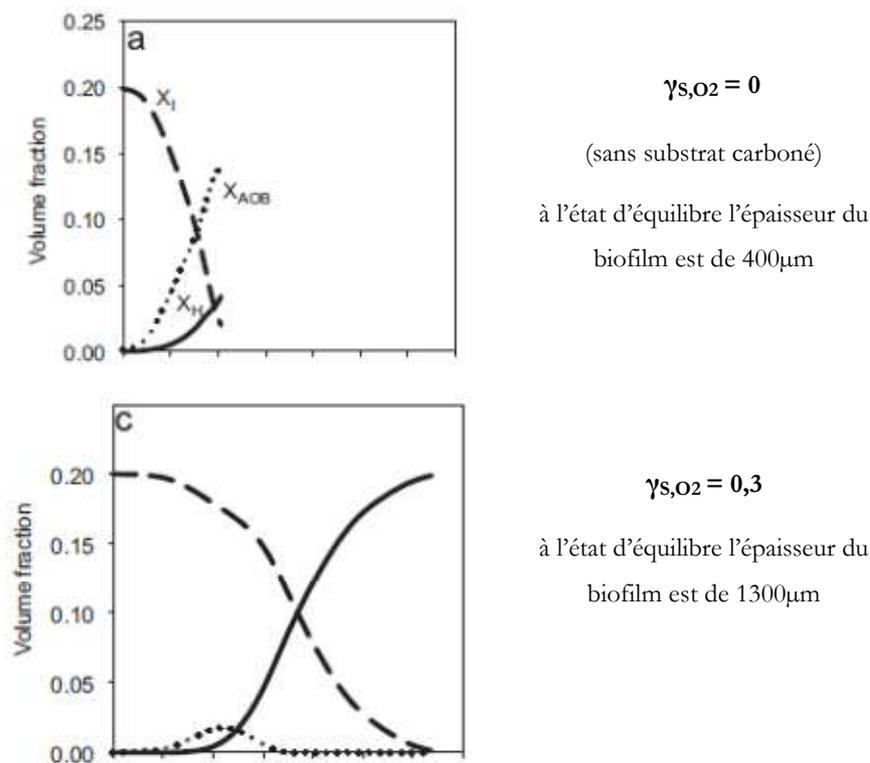


Figure I.4. Distribution de la biomasse en fonction de l'épaisseur du biofilm pour différentes valeurs de γ_{S,O_2} (Elenter *et al.* 2007)

L'oxygène n'étant pas le seul accepteur d'électrons pour les bactéries hétérotrophes, il est possible de définir un rapport γ entre le substrat organique (donneur d'électron) et d'autres accepteurs d'électrons que l'oxygène tels que les nitrates ou nitrites. Ainsi Wan et Spérandio (2009) définissent un γ_{S,NO_3} tel que :

$$\gamma_{S,NO_3} = \left(\frac{1 - Y_{H,S}}{2,86} \right) \frac{D_S S_{S,Lf}}{D_{NO_3} S_{NO_3,Lf}} \quad \text{Équation I.16}$$

Où D_{NO_3} est le coefficient de diffusion des nitrates ($m^2 j^{-1}$) et $S_{NO_3,Lf}$ est la concentration des nitrates à la surface du biofilm ($g_{N-NO_3} m^{-3}$).

3.2 Analyse de la compétition entre bactéries hétérotrophes et autotrophes

3.2.1 Rôle du rapport DCO/N

Le rapport DCO/N est un facteur important de l'opération des procédés qui détermine les dynamiques des populations nitrifiantes et hétérotrophes dans les agrégats biologiques (Okabe *et al.* 1996; Liu *et al.* 2010). En effet, les bactéries nitrifiantes qui ont un taux de croissance plus faible que celui des hétérotrophes bénéficient logiquement de la diminution du rapport DCO/N. Cependant, de trop faibles concentrations du substrat organique peuvent en contre partie limiter la dénitrification et donc l'efficacité de traitement de l'azote total. En présence d'excès de substrat organique (fort rapport DCO/N), les bactéries hétérotrophes prennent l'avantage sur les nitrifiants et il en résulte une stratification de la répartition spatiale des bactéries au sein des agrégats qui peut être critique pour la nitrification. La déstabilisation de la nitrification peut être expliquée par deux raisons : (1) le flux d'azote nitrifiable est celui disponible après assimilation d'une fraction de l'azote par les bactéries hétérotrophes et (2) les limitations au transfert de l'oxygène dans les zones internes des agrégats du fait de la forte activité hétérotrophique dans les couches superficielles conduisent à une limitation par l'accepteur d'électron.

Dans des réacteurs à alimentation séquentielle, Yang *et al.* (2005) ont étudié l'effet de l'augmentation du rapport N/DCO (dans une gamme allant de 5/100 à 30/100) sur l'activité de nitrification et les propriétés physiques de granules aérobies. Les résultats obtenus indiquent que l'augmentation de ce ratio conduit à un enrichissement en bactéries nitrifiantes et à l'augmentation des vitesses spécifiques de nitrification. Parallèlement les granules développés sont plus petits et plus denses. Les résultats de cette étude confirment que la diminution du taux de croissance des agrégats favorise la densification et la stabilité des agrégats biologiques.

Une étude similaire a été réalisée récemment dans un réacteur à biofilm aéré sur membrane par Liu *et al.* en 2010. Dans le but d'étudier l'influence du rapport DCO/N sur la répartition microbienne des nitrifiants dans les biofilms ainsi que sur les performances du procédé, le rapport DCO/N a été varié de 0 (sans substrat organique) à 6. Les résultats indiquent que les meilleurs rendements d'élimination de l'azote sont obtenus pour un ratio DCO/N de 5. Au dessous de ce ratio (DCO/N = 0 et 3), l'épaisseur du biofilm étant faible le substrat organique est majoritairement oxydé en condition aérobie ce qui limite la dénitrification et conduit à l'accumulation de nitrates dans l'effluent.

Au dessus de ce rapport ($\text{DCO}/\text{N} = 6$), la vitesse de croissance des bactéries hétérotrophes augmente fortement et la compétition microbienne pour l'oxygène et l'azote devient critique pour la nitrification. L'analyse de tests de respirométrie appliqués sur des échantillons de biofilms cultivés avec ces différents ratios indique que l'augmentation du rapport DCO/N conduit à la diminution de la vitesse de consommation spécifique des nitrifiants et à l'augmentation de celle des hétérotrophes (Figure I.5). Ces résultats confirment ceux obtenus par une étude précédente (Okabe *et al.* 1995) et indiquent que l'abondance de la population de bactéries nitrifiantes diminue avec l'augmentation du ratio DCO/N . La répartition spatiale des bactéries nitrifiantes analysée par la technique FISH rapporte qu'en condition d'absence de substrat organique ($\text{DCO}/\text{N}=0$), les bactéries nitrifiantes (AOB et NOB) se distribuent de manière homogène sur l'ensemble du biofilm. A contrario, pour un rapport DCO/N de 5, les seules bactéries nitrifiantes observées sont celles localisées dans les zones internes du biofilm à proximité des membranes et donc de l'oxygène dissous.

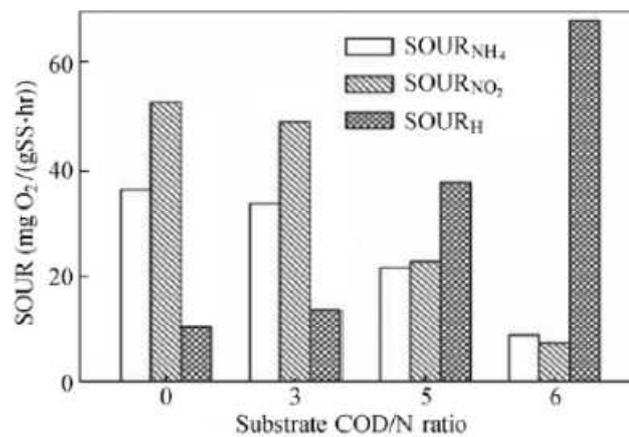


Figure I.5. Evolution de l'activité des populations autotrophes et hétérotrophes pour différents ratio DCO/N (Liu *et al.* 2010)

3.2.2 Rôle du détachement

Au sein d'un système biologique, l'implantation d'une population microbienne dépend de son taux de croissance spécifique et de son temps de rétention. Dans les procédés à boue activée, la concentration de la biomasse est homogène dans le réacteur comme dans les agrégats, de fait le temps de séjour de la biomasse (fixé par le taux de purge) est le même pour toutes les espèces microbiennes. Dans ce cas on parlera de temps de séjour moyen global. Dans les agrégats denses tels que les biofilms et les granules nous avons vu précédemment que la distribution de la biomasse est hétérogène. Dans ce cas, il convient de considérer un temps de séjour spécifique de la biomasse qui

dépendra à la fois de la concentration locale de chaque espèce microbienne et de son taux de détachement spécifique.

Au sein des biofilms, les principaux grands mécanismes de détachement étudiés sont : (1) l'érosion de surface et (2) le sloughing. L'érosion est généralement définie comme un phénomène continu qui entraîne le détachement surfacique de petites particules tandis que le sloughing correspond au détachement de grandes particules dont la taille est du même ordre de grandeur que l'épaisseur du biofilm.

L'effet du mode de détachement sur la compétition entre bactéries hétérotrophes et autotrophes a fait l'objet d'une étude théorique menée par Morgenroth et Wilderer (2000). Les résultats comparant l'effet d'un phénomène d'érosion continu de surface (avec une épaisseur constante du biofilm) et le détachement par sloughing indiquent que le mode de détachement contrôle l'organisation spatiale des populations microbiennes au sein des biofilms et influence les performances des procédés. D'après cette étude, il apparaît qu'entre deux événements de détachement volumique (sloughing) les bactéries hétérotrophes en surface du biofilm se développent avec un fort taux de croissance alors que le décès dans les zones internes du biofilm est plus faible. Ceci s'explique par le fait que le détachement par sloughing permet d'alimenter cette zone interne ponctuellement en substrat et en oxygène, ce qui limite le décès et l'inactivation. Comparé au détachement surfacique continu, la concentration de bactéries hétérotrophes maintenue dans le biofilm par sloughing est multipliée par 3. Notons cependant, que celle des bactéries nitrifiantes reste quasiment constante quelque soit le mode de détachement. Cette étude présente l'intérêt de montrer que le mode de détachement généralement imposé dans les modèles (continu surfacique) ne permet pas de prédire de manière correcte les dynamiques d'évolution des populations microbiennes dans les biofilms.

Derlon (2008) démontre que la compétition microbienne au sein des biofilms est gouvernée par le mode de détachement mais qu'il convient également de considérer sa fréquence. Les résultats de cette étude théorique indiquent que lorsque la fréquence de détachement est relativement faible, le détachement par sloughing permet la croissance des bactéries hétérotrophes en surface du biofilm. Cependant, pour une fréquence de détachement élevée, la biomasse hétérotrophe majoritaire est régulièrement éliminée du système, et par conséquent la croissance des nitrifiants est cette fois ci favorisée.

Notons que pour l'instant les mécanismes de détachement dans les procédés à granulation aérobie sont encore peu étudiés et l'influence du détachement sur la compétition microbienne dans ces agrégats n'a, à notre connaissance, jamais encore été réalisée. Cependant, puisque les granules aérobies sont considérées comme un cas spécifique de biofilms, on peut penser que les mécanismes de détachement dans les granules s'apparentent à ceux des biofilms. Une étude théorique et

expérimentale visant à caractériser et évaluer les différentes contraintes appliquées à la surface des granules a récemment été réalisée (Ren *et al.* 2009). Les contraintes considérées dans cette étude sont de deux types : (1) contraintes hydrodynamiques provenant de la circulation du liquide et (2) contraintes de collision entre granule-bulles de gaz et intergranules. Les résultats indiquent que le détachement dans les réacteurs à granulation aérobie de type colonne à bulle est principalement lié aux contraintes de collision entre les granules et les bulles de gaz et intergranules.

3.2.3 Cas particulier des boues hybrides

Les procédés hybrides alliant la croissance simultanée d'une biomasse floculée et d'une biomasse fixée permettent grâce au découplage entre le temps de séjour hydraulique et le temps de séjour des solides d'augmenter la concentration de la biomasse active dans les procédés et de favoriser le développement des bactéries à faible taux de croissance. La formation d'une biomasse hybride a généralement été réalisée grâce au développement de biofilms sur des supports en plastiques maintenus en suspension dans le réacteur (Von Münch *et al.* 2000; Artiga *et al.* 2005; Oyanedel *et al.* 2005).

Dans des réacteurs aérobies hybrides à filtration membranaire en imposant des temps de séjour de floccs allant de 1 à 10 jours, Artiga *et al.* (2005) ont développé une biomasse hybride comprenant des biofilms et des floccs en suspension. Les deux réacteurs ont été alimentés avec des effluents réels fortement chargés en substrat carboné et en azote (DCO/N varié de 3,6 à 5). La compétition de la croissance microbienne entre la biomasse fixée et la biomasse en suspension a été étudiée à l'aide de tests de respirométrie. Les résultats obtenus indiquent que la majorité de la DCO est consommée par la biomasse en suspension tandis que 50% à 60% de la capacité de nitrification des réacteurs est localisée dans les biofilms. Par ailleurs, il a été observé que l'augmentation de la charge organique dans les deux réacteurs n'a pas eu d'effets négatifs sur la nitrification. Ainsi, cette étude montre que la croissance de bactéries hétérotrophes dans la biomasse floculée permet la consommation d'une partie majeure de la DCO diminuant ainsi la compétition microbienne au sein des biofilms.

Des résultats similaires ont été obtenus avec des biofilms développés dans un réacteur à lit mobile (Ochoa *et al.* 2002). Dans cette étude les performances du réacteur hybride ont été comparées à celles d'un procédé à boue activée classique. Trois temps de séjour de la biomasse floculée ont été testés, lesquels sont 3 ; 5,7 et 8 jours. Les résultats obtenus indiquent que la croissance du biofilm permet de doubler la concentration de la biomasse active dans le réacteur hybride. De plus, l'analyse de la répartition des activités nitrifiantes et hétérotrophes entre le biofilm et les floccs indique que la majorité des nitrifiants se sont développés dans le biofilm (95% et 98-99% pour les âges de boue de floccs de 3 ; 5,7 et 8 jour, respectivement), et que seulement 60% des hétérotrophes ont colonisés le biofilm.

Dans les procédés de granulation en condition aérobie, le développement simultané d'une biomasse floculée avec celui de granules a déjà été observé (Carvalho *et al.* 2006; Wan *et al.* 2009; Coma *et al.* 2010). Cependant, pour la plupart des études, le développement de la biomasse floculée est expliqué par un processus d'agrégation insuffisant ainsi que par l'instabilité des granules liés aux conditions opératoires des procédés. L'activité respective des floes et des granules n'a jusqu'à présent peu ou pas été considérée et seule l'activité globale des systèmes hybrides a été étudiée. Seule l'étude menée par Carvalho *et al.* en 2006 s'est intéressée à la caractérisation d'un système hybride (contenant floes et granules) par le moyen de tests de respirométrie, de mesure de profil de l'oxygène dans les granules et de la technique de l'hybridation fluorescente *in situ* FISH. Les résultats de cette étude indiquent une nette différence de la localisation des bactéries AOB et NOB dans les floes et les granules. En effet, il a été observé que plus de 79% des NOB se sont développés dans les granules aérobies tandis que les AOB se sont préférentiellement développés dans les floes (70%). Les auteurs attribuent cette différence de croissance des bactéries nitrifiantes dans les floes et les granules à une différence des temps de séjours apparent des différents agrégats.

3.3 Interactions entre les bactéries nitrifiantes AOB et NOB

Du fait de la forte compétition microbienne entre les bactéries hétérotrophes et autotrophes dans les agrégats denses, la répartition spatiale des bactéries nitrifiantes (AOB et NOB) n'a souvent été observée que sur une fraction des agrégats. Dans les systèmes éliminant l'azote, les bactéries autotrophes telles que *Nitrosomonas spp* ont été observées dans des zones allant de 70 à 100 μm de la surface des granules (Tay *et al.* 2002). Plus récemment l'étude menée par Jang *et al.* (2003) rapporte que l'oxydation de l'ammonium n'est observée que dans les couches du granule suffisamment aérées. La distribution de l'espèce *Nitrosomonas spp* (marquée avec la sonde Nsm 156) dans cette étude est corrélée au profil de diffusion de l'oxygène dans le granule. Le développement de ces bactéries se fait à cette profondeur car : (1) ces zones sont encore suffisamment aérées pour permettre la nitrification et (2) du fait de leur faible taux de croissance, les bactéries autotrophes se développent derrière le mur des bactéries hétérotrophes, qui lui sera localisé plus en périphérie. Cette configuration a notamment été observée par Lemaire *et al.* (2008) dans des granules développés en condition aérobie avec effluent réel.

Au sein de granules aérobies, la présence de pores et de canaux, pouvant pénétrer jusqu'à une profondeur de 900 μm , a été mise en évidence (Tay *et al.* 2002; Tay *et al.* 2003; Lemaire *et al.* 2008). La présence de ces pores semblerait faciliter le transport de l'oxygène et du substrat à l'intérieur et à l'extérieur du granule. Ainsi, les bactéries nitrifiantes généralement localisées uniquement dans les couches aérées des granules, ont été observées également dans des zones plus profondes (Lemaire *et al.* 2008).

L'étude de la répartition des NOB dans les agrégats denses rapporte que ces dernières sont généralement distribuées dans les zones internes des agrégats derrière ou à proximité des bactéries ammonium oxydantes. Ces configurations ont été observées aussi bien dans les biofilms (Okabe *et al.* 1999; Schramm *et al.* 1999; Lydmark *et al.* 2006) que dans les granules aérobies (Shi *et al.* 2009). Les auteurs expliquent généralement cette configuration par une compétition entre les deux populations de bactéries nitrifiantes pour l'oxygène. En effet, puisque l'oxygène dissous est un réactif pour lequel l'affinité des bactéries nitrifiantes est supérieure à celle des nitratantes, il est probable que les fortes limitations au transfert de l'oxygène observées dans les agrégats denses conditionnent également la stratification des populations nitrifiantes. Une autre hypothèse souvent soulevée est celle d'une interaction de type commensalisme entre les AOB et NOB. Celle-ci s'explique par la localisation rapprochée des colonies bactériennes et par le fait que la croissance des NOB dans les agrégats nécessite les nitrites qui eux sont produits par l'oxydation de l'ammonium par les AOB (Okabe *et al.* 1996; Okabe *et al.* 1999). Une autre hypothèse est celle de l'inhibition par l'ammoniac libre soulevée par les procédés fonctionnant à forte charge en ammonium Shi *et al.*(2009). Dans cette étude le suivi des dynamiques des bactéries nitrifiantes a été réalisé avec la technique FISH. Les résultats de marquages révèlent qu'il existe une distribution spatiale hétérogène selon le groupe des bactéries nitrifiantes. En effet, les AOB ont principalement été observées en surface tandis que les NOB ont été localisées plus en profondeur. Après plus de 120 jours de suivi, les résultats de marquages FISH confirment la dominance des AOB. Ainsi, la localisation avantageuse des AOB (abondance du substrat et de l'oxygène) ainsi que l'inhibition par l'ammoniac libre ont permis de donner l'avantage aux bactéries nitritantes sur les nitratantes.

4 Conduite et modélisation des GSBRs pour l'élimination des nutriments

4.1 Conduite des GSBRs

L'élimination effective des nutriments (azote et phosphore) nécessite la présence simultanée ou successive de conditions aérobie, anaérobie et anoxie dans les procédés.

Les procédés de granulation aérobie ont tout d'abord été opérés en conditions purement aérobies. Cependant, la littérature révèle que le taux d'aération imposé dans les procédés joue alors un rôle crucial dans le processus de formation et dans le maintien de la stabilité des agrégats biologiques (Beun *et al.* 1999; Tay *et al.* 2002). De fait, il apparaît très vite que le développement de granules dans des systèmes purement aérobies est limité du fait de leurs besoins énergétiques et coûts élevés et parce que l'élimination effective de l'azote et du phosphore nécessite une alternance de conditions

anoxie et anaérobie. Par conséquent l'opération des procédés avec une alternance de phases anaérobie/aérobie et anoxie/aérobie a été proposée.

La déphosphatation biologique a été principalement réalisée dans un premier temps dans des procédés combinant des conditions anaérobie et aérobie. Le principe de l'élimination biologique du phosphore dans ces procédés (Figure I.6) repose sur la suraccumulation de polyphosphates par les bactéries (Mino *et al.* 1987). En conditions anaérobies, certaines bactéries hétérotrophes (dites déphosphatantes PAO) stockent de manière intracellulaire des poly-hydroxy-alcanoates à partir des acides gras volatils. Parallèlement, elles dégradent leurs réserves de polyphosphates intracellulaires et libèrent dans le milieu des orthophosphates. En phase aérobie, ces bactéries consomment les réserves de PHA initialement stockées lors de la phase anaérobie pour leur besoin de croissance et stockent d'avantage de polyphosphates. L'opération des procédés avec une phase anaérobie permet donc le développement des cultures riches en bactéries déphosphatantes PAO. Cependant, il a été observé que le développement des PAO dans ces systèmes était parfois limité du fait de leur compétition avec les organismes accumulateurs de glycogène GAO. En effet, ces derniers sont en compétition avec les PAO à la fois pour le substrat carbonée et les accepteurs d'électrons (oxygène ou NO_x).

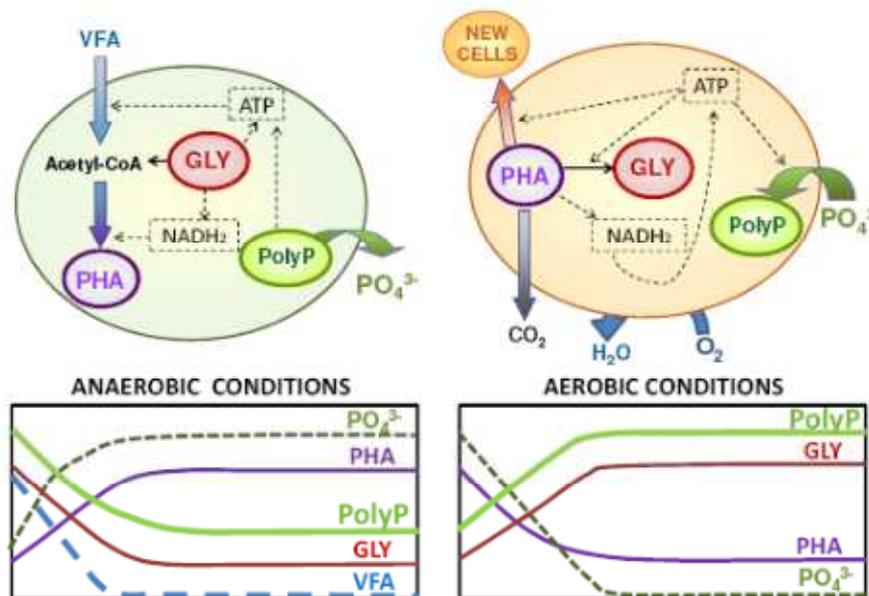


Figure I.6. Schéma du métabolisme des PAO en conditions anaérobie (gauche) et aérobie (droite) et de l'évolution des composés de stockages intracellulaires (trait plein) et des composés dans la phase liquide (trait en pointillé) durant ces conditions (Coma, 2011)

Dans les procédés de traitement de l'azote l'élimination effective de l'azote est réalisée grâce à la nitrification dénitrification simultanée (SND). Le principe de la SND (Figure I.7) repose sur la présence de limitations au transfert d'oxygène qui induisent la création d'une zone anoxique au centre

de l'agrégat et une zone aérobie en périphérie. Ainsi, théoriquement, il est possible de maintenir une nitrification dans les zones faiblement limitées par l'oxygène (en périphérie) tout en ayant une dénitrification dans les zones où l'oxygène est épuisé (au cœur). La SND suppose que les nitrates produits par les autotrophes lors de la nitrification sont utilisés par les hétérotrophes au cœur de l'agrégat pour réaliser la dénitrification (Li *et al.* 2008).

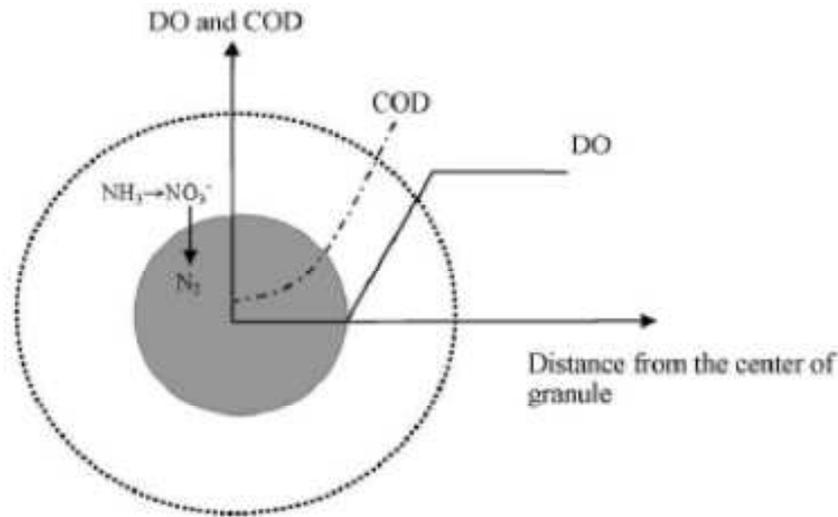


Figure I.7. Principe de la nitrification-dénitrification simultanée (Li *et al.*, 2008)

La clé pour optimiser la SND réside donc en partie dans le contrôle de la zone anoxique dans les agrégats. Cette zone dépend à la fois de la concentration en oxygène dissous imposée dans la phase liquide, de l'activité des populations bactériennes ainsi que de la densité des agrégats. Si la diminution de la concentration de l'oxygène dissous permet d'augmenter les performances de dénitrification des procédés granulaires, celle-ci peut être en revanche critique pour le maintien de la nitrification et de la stabilité physique des granules aérobies (Mosquera-Corral *et al.* 2005).

Afin de compenser le potentiel de diffusion limité de l'oxygène dissous dans les granules aérobies, une alternative intéressante proposée par Wan *et al.* (2009) est de fournir un accepteur d'électron alternatif tel que le nitrate en appliquant en amont une phase anoxique. Dans cette étude, les propriétés physiques d'agrégats développés dans deux réacteurs (SBR) fonctionnant à fort ratio DCO/O₂ (1200 mg_{DCO} L⁻¹/2,5 mg_{O₂} L⁻¹) avec différents accepteurs d'électrons (O₂ et nitrate) ont été comparées. Un premier réacteur a fonctionné en conditions purement aérobie tandis que le deuxième a fonctionné en alternance de phases anoxique/aérobie (grâce à un supplément de nitrate dans l'influent).

Les résultats obtenus indiquent que les agrégats développés en conditions d'alternance de phases présentaient une structure dense proche de celle des granules tandis que ceux développés dans le système purement aérobie s'apparentaient plus à des floccs de boue activée. Les auteurs expliquent la structure floculée des agrégats par la croissance des hétérotrophes en limitation par l'oxygène. En

effet, l'analyse des rapports γ entre le potentiel de diffusion du substrat carboné et celui des accepteurs d'électrons (O_2 et NO_3) indique que l'oxygène est très rapidement limitant dans les agrégats puisque le rapport γ_{s,O_2} est bien plus élevé que 1 (voir § 3.1.2). A contrario, les nitrates dont le ratio est 80 fois inférieur à celui de l'oxygène, diffusent profondément et permettent la croissance anoxie des hétérotrophes au cœur des agrégats.

Par ailleurs, leurs résultats indiquent que l'application d'une phase anoxie en début de cycle permet de stabiliser la nitrification lors de l'augmentation de la charge organique et en azote, alors que la nitrification est perdue dans le système purement aérobie du fait de la compétition avec les espèces hétérotrophes (Figure I.8). Le maintien de la nitrification malgré un environnement de plus en plus défavorable est possible grâce à la croissance anoxie des bactéries hétérotrophes au cœur des agrégats. En effet, les résultats de simulation 1-D appliqués à ces expériences confirment que l'apport de nitrates permet une croissance interne des hétérotrophes plus importante mais augmente également le stockage de composés internes.

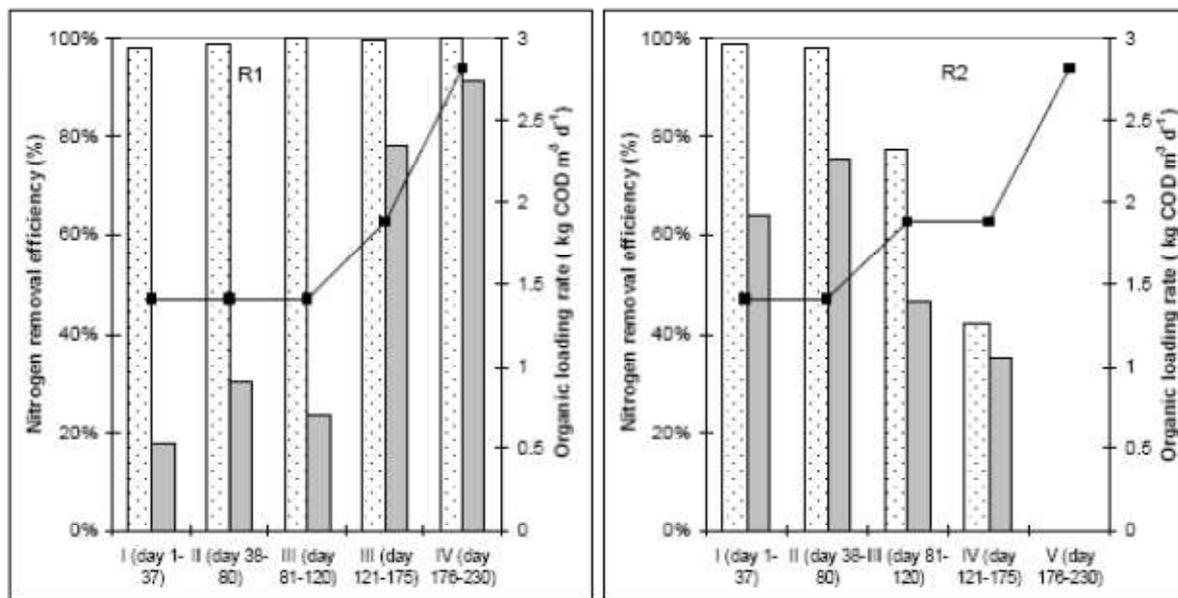


Figure I.8. Evolution de la charge appliquée (■), de la nitrification (▤) et de la dénitrification (▥) dans le réacteur en alternance de phase anoxie/aérobie (gauche) et dans le réacteur purement aérobie (droite) (Wan *et al.* 2009)

Ainsi, il apparaît que dans un environnement concurrentiel de par la présence du substrat carboné, l'application d'une phase anoxie permet de minimiser la compétition microbienne pour l'oxygène et favorise la stabilité des propriétés physiques des agrégats ainsi que le maintien de la nitrification.

4.2 Modélisation des GSBRs

La modélisation mathématique est un outil particulièrement adapté à l'étude des processus complexes, spatialisés et dynamiques, telle que les réacteurs à boues granulaires aérobies (de Kreuk *et al.* 2004).

Les systèmes à boues granulaires aérobies ont été principalement modélisés avec deux types de modèles : (1) les modèles continus de type 1-D implémentés pour la plus part sur des plateformes comme AQUASIM (Reichert 1998) et (2) les modèles de type individu-centré permettant une description en 2-D des agrégats et de la distribution spatiale des espèces.

Le choix du type de modèle à employer doit être réalisé en fonction des objectifs attendus du modèle. En effet, les modèles de type 1-D permettent de décrire la croissance multi-espèces au sein des agrégats, mais celle-ci est considérée uniquement selon un seul axe, ce qui ne correspond pas à la réalité de la croissance des microorganismes. Cependant, ils permettent de décrire de manière très satisfaisante l'évolution des composés solubles dans les agrégats et dans la phase liquide des réacteurs. En effet, l'étude menée par Matsumoto *et al.* (2010) sur la formation de granules aérobies nitrifiants et dans laquelle les profils de distribution des produits solubles (azote, oxygène, NO_x...) et des bactéries nitrifiantes dans les granules mesurés expérimentalement et obtenus par simulations 1-D et 2-D, indique que les profils de distribution des produits solubles dans les granules et dans la phase liquide sont similaires pour les deux types de modèles 1-D et 2-D.

Les modèles 2-D présentent l'avantage de décrire une structure complexe des agrégats incluant la formation de micro-colonies ou de structures plus filamenteuses et de fait permettent de mieux représenter l'hétérogénéité des agrégats biologiques. En contre partie, ces modèles nécessitent une description beaucoup plus précise des phénomènes locaux tels que le transport des bactéries, la division cellulaire, la distribution des exopolymères et le transfert local (de Kreuk *et al.* 2004). De plus, contrairement aux modèles 1-D, le temps de calcul dans les modèles de type 2-D est beaucoup plus important, ce qui constitue un de leurs inconvénients majeurs.

Différents modèles cinétiques ont été proposés dans la littérature. Ces modèles sont principalement basés sur les modèles de type ASM et incluent les phénomènes de stockage intracellulaire qui sont très importants dans les granules aérobies. Les principaux points de divergences entre les modèles cinétiques proposés dans la littérature sont relatifs à :

a) *La description des mécanismes de stockage*

Dans certaines études le stockage et la croissance sont découplés. Dans ces modèles il est supposé que les composés organiques sont d'abord transformés en matière de stockage avant d'être utilisés pour la croissance, comme dans le cas des modèles ASM3 (Gujer *et al.* 1999). Dans d'autres

études les phénomènes de stockage et de croissance sont considérés simultanément (Sin *et al.* 2005; Ni et Yu. 2008; Vazquez-Padin *et al.* 2010). En effet, il a été démontré expérimentalement qu'en condition d'excès de substrat, le surplus de substrat ne pouvant être utilisé pour la croissance pouvait être converti parallèlement en composés de stockage.

b) *La description de la nitrification et dénitrification*

Les modèles basés sur ASM 3 décrivent la nitrification en une seule étape et ne font pas la distinction entre les bactéries ammonium oxydante et nitrites oxydantes (Gujer *et al.* 1999; de Kreuk *et al.* 2007; Ni *et al.* 2008). Dans le but de mieux décrire la nitrification ainsi que la dénitrification sur les accepteurs d'électrons alternatifs tels que les nitrites et les nitrates, certains auteurs proposent de considérer les nitrites comme composés intermédiaires de la nitrification et/ou de la dénitrification (Fang *et al.* 2009; Vazquez-Padin *et al.* 2010).

5 Conclusions et objectifs de l'étude

La technologie de granulation aérobie de part sa compacité constitue une alternative intéressante aux procédés conventionnels à boue activée. Cependant, son utilisation à l'échelle industrielle pour le traitement des effluents fait encore apparaître des questions du ressort de la recherche et laissent entrevoir des axes d'optimisation.

D'une part pour les effluents chargés en matière organique particulaire, la faible dégradation des matières en suspension par les granules aérobies conduit à la formation d'une biomasse hybride comprenant une fraction de floccs et de granules. La sélection des granules aérobies par le lessivage des floccs conduit généralement à la perturbation plus ou moins prolongée de la nitrification qui n'est rétablie que lorsque une fraction significative de granules aérobies a été formée et si la charge organique appliquée n'est pas trop élevée pour permettre un développement simultané des bactéries dégradant le carbone et des espèces nitrifiantes dans le biofilm.

D'autre part, la stabilité des granules aérobies formées va par la suite dépendre de la dynamique de l'évolution des populations microbiennes autotrophes et hétérotrophes gouvernées par l'accessibilité au substrat et à l'oxygène dissous. Une résistance au transfert de l'oxygène trop importante (du fait d'une structure dense, d'une aération insuffisante ou d'une charge organique trop élevée) peut entraîner la déstabilisation des propriétés physiques des agrégats et conduit généralement à la perte de la nitrification qui constitue un des points sensibles de l'opération des procédés de granulation aérobies.

L'étude bibliographique réalisée sur les modes de conduite des procédés de granulation aérobies indique que l'application d'une alternance de phases anaérobie/aérobie ou anoxie/aérobie est

nécessaire pour traiter efficacement les nutriments (N et P) et diminuer les besoins énergétiques en aération des GSBRs.

Ainsi, les différents objectifs de cette étude sont :

Dans un premier temps, de comprendre les mécanismes impliqués dans la stabilité (ou l'instabilité) de deux procédés de granulation aérobie. Pour cela, deux réacteurs alimentés avec un mélange de 4 sources de carbone et fonctionnant avec un taux d'aération similaire ont été suivis en parallèle sur une durée d'étude d'un an. Un premier réacteur était opéré avec une alternance de conditions anoxie/aérobie, alors que le deuxième était opéré avec une alternance de conditions anaérobie/aérobie. Les performances épuratoires des procédés ainsi que la structure des agrégats (Indice de boue, taille des agrégats, présence ou non de bactéries filamenteuses, répartition spatiale des espèces nitrifiantes...) développés dans chaque réacteur ont été étudiés.

Puis, nous nous intéresserons à la caractérisation et à l'évaluation des avantages ou inconvénients de la coexistence de floes et de granules pour l'élimination de l'azote dans un réacteur à boue granulaire hybride. Pour cela, la contribution respective des floes et des granules dans l'activité de nitrification de la boue hybride a été quantifiée et les limitations au transfert de l'oxygène de chaque type d'agrégat ont été étudiées par respirométrie à différentes concentrations en oxygène dissous. De plus, la caractérisation de la répartition spatiale des AOB et NOB au sein des granules a été réalisée au moyen de la technique FISH.

Enfin, un modèle mathématique permettant de décrire les phénomènes réactionnels ayant lieu au sein d'une biomasse hybride a été développé et validé. Il s'agit d'un modèle 1-D mis en œuvre dans le logiciel de simulation pour les applications environnementales AQUASIM® dont les bases sont celles de «ASM3» prenant en compte la transformation du substrat organique en composé de stockage. Le modèle ainsi développé permettra d'optimiser le fonctionnement du procédé de granulation aérobie hybride à travers l'évaluation de la fraction optimale de floes et de granules pouvant conduire à une élimination efficace de l'azote et à l'augmentation de la robustesse du procédé vis-à-vis de diminutions ponctuelles de l'oxygène dissous.

Références

- Adav, S. S., D. J. Lee, K. Y. Show and J. H. Tay (2008) Aerobic granular sludge: Recent advances, *Biotechnology Advances* 26 (5), 411-423.
- Anthonisen, A. C., R. C. Loehr, T. B. S. Prakasam and E. G. Srinath (1976) Inhibition of Nitrification by Ammonia and Nitrous-Acid, *Journal Water Pollution Control Federation* 48 (5), 835-852.
- Arrojo, B., A. Mosquera-Corral, J. M. Garrido and R. Mendez (2004) Aerobic granulation with industrial wastewater in sequencing batch reactors, *Water Research* 38 (14-15), 3389-3399.
- Artiga, P., V. Oyanedel, J. M. Garrido and R. Mendez (2005) An innovative biofilm-suspended biomass hybrid membrane bioreactor for wastewater treatment, *Desalination* 179 (1-3), 171-179.
- Aslan, S., L. Miller and M. Dahab (2009) Ammonium oxidation via nitrite accumulation under limited oxygen concentration in sequencing batch reactors, *Bioresource Technology* 100 (2), 659-664.
- Bergey (1985) Aerobic Chemolithrophic bacteria and associated organisms, *Manual of systematic microbiology* 3 pp. 1807-1834.
- Beun, J. J., A. Hendriks, M. C. M. Van Loosdrecht, E. Morgenroth, P. A. Wilderer and J. J. Heijnen (1999) Aerobic granulation in a sequencing batch reactor, *Water Research* 33 (10), 2283-2290.
- Blackburne, R., V. M. Vadivelu, Z. G. Yuan and J. Keller (2007) Kinetic characterisation of an enriched Nitrospira culture with comparison to Nitrobacter, *Water Research* 41 (14), 3033-3042.
- Blackburne, R., Z. G. Yuan and J. Keller (2008) Partial nitrification to nitrite using low dissolved oxygen concentration as the main selection factor, *Biodegradation* 19 (2), 303-312.
- Burrell, P. C., J. Keller and L. L. Blackall (1998) Microbiology of a nitrite-oxidizing bioreactor, *Applied and Environmental Microbiology* 64 (5), 1878-1883.
- Campos, J. L., M. Figueroa, A. Mosquera-Corral and R. Méndez (2009) Sludge aerobic granulation: state of the art, *International Journal of Environmental Engineering* 1 (2), 136-151.
- Carvalho, G., R. L. Meyer, Z. G. Yuan and J. Keller (2006) Differential distribution of ammonia- and nitrite-oxidising bacteria in flocs and granules from a nitrifying/denitrifying sequencing batch reactor, *Enzyme and Microbial Technology* 39 (7), 1392-1398.
- Chandran, K., Z. Q. Hu and B. F. Smets (2008) A critical comparison of extant batch respirometric and substrate depletion assays for estimation of nitrification biokinetics, *Biotechnology and Bioengineering* 101 (1), 62-72.

- Ciudad, G., A. Werner, C. Bornhardt, C. Munoz and C. Antileo (2006) Differential kinetics of ammonia- and nitrite-oxidizing bacteria: A simple kinetic study based on oxygen affinity and proton release during nitrification, *Process Biochemistry* 41 (8), 1764-1772.
- Coma, M. (2011) Biological nutrient removal in SBR technology: from floccular to granular sludge (thesis). LEQUIA-UdG group. Laboratory of Chemical and Environmental Engineering. University of Girona.
- Coma, M., S. Puig, M. D. Balaguer and J. Colprim (2010) The role of nitrate and nitrite in a granular sludge process treating low-strength wastewater, *Chemical Engineering Journal* 164 (1), 208-213.
- Daims, H., U. Purkhold, L. Bjerrum, E. Arnold, P. A. Wilderer and M. Wagner (2001) Nitrification in sequencing biofilm batch reactors: Lessons from molecular approaches, *Water Science and Technology* 43 (3), 9-18.
- de Kreuk, M. K., L. M. M. de Bruin and M. C. M. van Loosdrecht (2004) Process intensification of municipal wastewater treatment by aerobic granular sludge systems, *European Symposium on Environmental Biotechnology, Eseb 2004* 103-106.
- de Kreuk, M. K., C. Picioreanu, M. Hosseini, J. B. Xavier and M. C. M. van Loosdrecht (2007) Kinetic model of a granular sludge SBR: Influences on nutrient removal, *Biotechnology and Bioengineering* 97 (4), 801-815.
- de Kreuk, M. K. and M. C. M. van Loosdrecht (2004) Selection of slow growing organisms as a means for improving aerobic granular sludge stability, *Water Science and Technology* 49 (11-12), 9-17.
- de Kreuk, M. K. and M. C. M. van Loosdrecht (2006) Formation of aerobic granules with domestic sewage, *Journal of Environmental Engineering-Asce* 132 (6), 694-697.
- Derlon, N. (2008) Analyse de la compétition microbienne entre bactéries autotrophes et hétérotrophes au sein d'un biofilm éliminant l'azote (thèse). LISBP. INSA de Toulouse.
- Elenter, D., K. Milferstedt, W. Zhang, M. Hausner and E. Morgenroth (2007) Influence of detachment on substrate removal and microbial ecology in a heterotrophic/autotrophic biofilm, *Water Research* 41 (20), 4657-4671.
- Fang, F., B. J. Ni, X. Y. Li, G. P. Sheng and H. Q. Yu (2009) Kinetic analysis on the two-step processes of AOB and NOB in aerobic nitrifying granules, *Applied Microbiology and Biotechnology* 83 (6), 1159-1169.

- Garrido, J. M., W. A. J. vanBenthum, M. C. M. vanLoosdrecht and J. J. Heijnen (1997) Influence of dissolved oxygen concentration on nitrite accumulation in a biofilm airlift suspension reactor, *Biotechnology and Bioengineering* 53 (2), 168-178.
- Gibbs, B. M., L. R. Shephard, K. A. Third and R. Cord-Ruwisch (2004) The presence of ammonium facilitates nitrite reduction under PHB driven simultaneous nitrification and denitrification, *Water Science and Technology* 50 (10), 181-188.
- Gonenc, E. and P. Harremoës (1990) Nitrification in Rotating-Disk Systems.2. Criteria for Simultaneous Mineralization and Nitrification, *Water Research* 24 (4), 499-505.
- Griffiths, P. "The rate of death and predation in activated sludge systems incorporating anoxic zones." *Proceedings of BNR3, Brisbane, Australia.*, (1997).
- Gujer, W., M. Henze, T. Mino and M. van Loosdrecht (1999) Activated sludge model No. 3 (vol 39, pg 183, 1999), *Water Science and Technology* 39 (12), Ar1-Ar1.
- Hanaki, K., C. Wantawin and S. Ohgaki (1990) Nitrification at Low-Levels of Dissolved-Oxygen with and without Organic Loading in a Suspended-Growth Reactor, *Water Research* 24 (3), 297-302.
- Hellinga, C., A. A. J. C. Schellen, J. W. Mulder, M. C. M. van Loosdrecht and J. J. Heijnen (1998) The SHARON process: An innovative method for nitrogen removal from ammonium-rich waste water, *Water Science and Technology* 37 (9), 135-142.
- Henze, M., P. Harremoës, J. L. C. Jansen and E. Arvin (1995) *Wastewater Treatment: Biological and chemical processes.*, Berlin.
- Jang, A., Y. H. Yoon, I. S. Kim, K. S. Kim and P. L. Bishop (2003) Characterization and evaluation of aerobic granules in sequencing batch reactor, *Journal of Biotechnology* 105 (1-2), 71-82.
- Juretschko, S., G. Timmermann, M. Schmid, K. H. Schleifer, A. Pommerening-Roser, H. P. Koops and M. Wagner (1998) Combined molecular and conventional analyses of nitrifying bacterium diversity in activated sludge: *Nitrosococcus mobilis* and *Nitrospira*-like bacteria as dominant populations, *Applied and Environmental Microbiology* 64 (8), 3042-3051.
- Katchis, D., J. Fillos and L. A. Carrio (2002) Comparison of bench scale testing methods for nitrifier growth rate measurement, *Water Science and Technology* 46 (1-2), 289-295.
- Kim, D. J., D. I. Lee and J. Keller (2006) Effect of temperature and free ammonia on nitrification and nitrite accumulation in landfill leachate and analysis of its nitrifying bacterial community by FISH, *Bioresource Technology* 97 (3), 459-468.

- Kishida, N., J. Kim, S. Tsuneda and R. Sudo (2006) Anaerobic/oxic/anoxic granular sludge process as an effective nutrient removal process utilizing denitrifying polyphosphate-accumulating organisms, *Water Research* 40 (12), 2303-2310.
- Laanbroek, H. J., P. L. E. Bodelier and S. Gerards (1994) Oxygen-Consumption Kinetics of *Nitrosomonas-Europaea* and *Nitrobacter-Hamburgensis* Grown in Mixed Continuous Cultures at Different Oxygen Concentrations, *Archives of Microbiology* 161 (2), 156-162.
- Lemaire, R. (2007) Development and fundamental investigations of innovative technologies for biological nutrient removal from abattoir wastewater (thesis). Advanced Water Management Centre. Brisbane, University of Queensland.
- Lemaire, R., R. I. Webb and Z. G. Yuan (2008) Micro-scale observations of the structure of aerobic microbial granules used for the treatment of nutrient-rich industrial wastewater, *Isme Journal* 2 (5), 528-541.
- Li, Y., Y. Liu, L. Shen and F. Chen (2008) DO diffusion profile in aerobic granule and its microbiological implications, *Enzyme and Microbial Technology* 43 (4-5), 349-354.
- Lin, Y. M., Y. Liu and J. H. Tay (2003) Development and characteristics of phosphorus-accumulating microbial granules in sequencing batch reactors, *Applied Microbiology and Biotechnology* 62 (4), 430-435.
- Liu, H. J., F. L. Yang, S. Y. Shi and X. C. Liu (2010a) Effect of substrate COD/N ratio on performance and microbial community structure of a membrane aerated biofilm reactor, *Journal of Environmental Sciences-China* 22 (4), 540-546.
- Liu, Y. and J. H. Tay (2002) The essential role of hydrodynamic shear force in the formation of biofilm and granular sludge, *Water Research* 36 (7), 1653-1665.
- Liu, Y. Q., B. Moy, Y. H. Kong and J. H. Tay (2010b) Formation, physical characteristics and microbial community structure of aerobic granules in a pilot-scale sequencing batch reactor for real wastewater treatment, *Enzyme and Microbial Technology* 46 (6), 520-525.
- Lydmark, P., M. Lind, F. Sorensson and M. Hermansson (2006) Vertical distribution of nitrifying populations in bacterial biofilms from a full-scale nitrifying trickling filter, *Environmental Microbiology* 8 (11), 2036-2049.
- Manser, R., W. Gujer and H. Siegrist (2005) Consequences of mass transfer effects on the kinetics of nitrifiers, *Water Research* 39 (19), 4633-4642.
- Martinage, V. and E. Paul (2000) Effect of environmental parameters on autotrophic decay rate (b(A)). *Environmental Technology* 21 (1), 31-41.

- Matsumoto, S., M. Katoku, G. Saeki, A. Terada, Y. Aoi, S. Tsuneda, C. Picioreanu and M. C. M. van Loosdrecht (2010) Microbial community structure in autotrophic nitrifying granules characterized by experimental and simulation analyses, *Environmental Microbiology* 12 (1), 192-206.
- Mauret, M., E. Paul, E. PuechCostes, M. T. Maurette and P. Baptiste (1996) Application of experimental research methodology to the study of nitrification in mixed culture, *Water Science and Technology* 34 (1-2), 245-252.
- Mino, T., V. Arun, Y. Tsuzuki and T. Matsuo (1987) Effect of phosphorus accumulation on acetate metabolism in the biological phosphorus removal., *Biological phosphate removal from wastewaters*, Oxford: Pergamon Press.Pp.27-38.
- Mishima, K. and M. Nakamura (1991) Self-Immobilization of Aerobic Activated-Sludge - a Pilot-Study of the Aerobic Upflow Sludge Blanket Process in Municipal Sewage-Treatment, *Water Science and Technology* 23 (4-6), 981-990.
- Morgenroth, E., T. Sherden, M. C. M. van Loosdrecht, J. J. Heijnen and P. A. Wilderer (1997) Aerobic granular sludge in a sequencing batch reactor, *Water Research* 31 (12), 3191-3194.
- Morgenroth, E. and P. A. Wilderer (2000) Influence of detachment mechanisms on competition in biofilms, *Water Research* 34 (2), 417-426.
- Mosquera-Corral, A., M. K. de Kreuk, J. J. Heijnen and M. C. M. van Loosdrecht (2005) Effects of oxygen concentration on N-removal in an aerobic granular sludge reactor, *Water Research* 39 (12), 2676-2686.
- Moussa, M. S., C. M. Hooijmans, H. J. Lubberding, H. J. Gijzen and M. C. M. van Loosdrecht (2005) Modelling nitrification, heterotrophic growth and predation in activated sludge, *Water Research* 39 (20), 5080-5098.
- Münz, G., C. Lubello and J. A. Oleszkiewicz (2011) Factors affecting the growth rates of ammonium and nitrite oxidizing bacteria, *Chemosphere* 83 (5), 720-725.
- Münz, G., G. Mori, C. Vannini and C. Lubello (2010) Kinetic parameters and inhibition response of ammonia- and nitrite-oxidizing bacteria in membrane bioreactors and conventional activated sludge processes, *Environmental Technology* 31 (14), 1557-1564.
- Ni, B. J. and H. Q. Yu (2008) Storage and growth of denitrifiers in aerobic granules: Part I. Model development, *Biotechnology and Bioengineering* 99 (2), 314-323.
- Ni, B. J., H. Q. Yu and Y. J. Sun (2008) Modeling simultaneous autotrophic and heterotrophic growth in aerobic granules, *Water Research* 42 (6-7), 1583-1594.

- Nogueira, R. and L. F. Melo (2006) Competition between *Nitrospira* spp. and *Nitrobacter* spp. in nitrite-oxidizing bioreactors, *Biotechnology and Bioengineering* 95 (1), 169-175.
- Ochoa, J. C., J. Colprim, B. Palacios, E. Paul and P. Chatellier (2002) Active heterotrophic and autotrophic biomass distribution between fixed and suspended systems in a hybrid biological reactor, *Water Science and Technology* 46 (1-2), 397-404.
- Okabe, S., K. Hirata and Y. Watanabe (1995) Dynamic changes in spatial microbial distribution in mixed-population biofilms: Experimental results and model simulation, *Water Science and Technology* 32 (8), 67-74.
- Okabe, S., K. Hiratia, Y. Ozawa and Y. Watanabe (1996) Spatial microbial distributions of nitrifiers and heterotrophs in mixed-population biofilms, *Biotechnology and Bioengineering* 50 (1), 24-35.
- Okabe, S., T. Kindaichi, T. Ito and H. Satoh (2004) Analysis of size distribution and areal cell density of ammonia-oxidizing bacterial microcolonies in relation to substrate microprofiles in biofilms, *Biotechnology and Bioengineering* 85 (1), 86-95.
- Okabe, S., H. Satoh and Y. Watanabe (1999) In situ analysis of nitrifying biofilms as determined by in situ hybridization and the use of microelectrodes, *Applied and Environmental Microbiology* 65 (7), 3182-3191.
- Oyanedel, V., J. L. Campos, J. M. Garrido, V. Lazarova and R. Mendez (2005) Development of a membrane-assisted hybrid bioreactor for ammonia and COD removal in wastewaters, *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* 80 (2), 206-215.
- Park, H. D. and D. R. Noguera (2004) Evaluating the effect of dissolved oxygen on ammonia-oxidizing bacterial communities in activated sludge, *Water Research* 38 (14-15), 3275-3286.
- Park, H. D. and D. R. Noguera (2007) Characterization of two ammonia-oxidizing bacteria isolated from reactors operated with low dissolved oxygen concentrations, *Journal of Applied Microbiology* 102 (5), 1401-1417.
- Picioreanu, C., M. C. M. van Loosdrecht and J. J. Heijnen (1998) Mathematical modeling of biofilm structure with a hybrid differential-discrete cellular automaton approach, *Biotechnology and Bioengineering* 58 (1), 101-116.
- Poplawski, N. J., A. Shirinifard, M. Swat and J. A. Glazier (2008) Simulation of single-species bacterial-biofilm growth using the Glazier-Graner-Hogeweg model and the CompuCell3D modeling environment, *Mathematical Biosciences and Engineering* 5 (2), 355-388.
- Qin, L., Y. Liu and J. H. Tay (2004) Effect of settling time on aerobic granulation in a sequencing batch reactor, *Biochemical Engineering Journal* 21 (1), 47-52.

- Reichert, P. (1998) AQUASIM 2.0—user manual, computer program for the identification and simulation of aquatic systems, Dübendorf, Switzerland, Swiss Federal Institute for Environmental Science and Technology (EAWAG)
- Ren, T. T., Y. Mu, L. Liu, X. Y. Li and H. Q. Yu (2009) Quantification of the shear stresses in a microbial granular sludge reactor, *Water Research* 43 (18), 4643-4651.
- Salem, S., M. S. Moussa and M. C. M. van Loosdrecht (2006) Determination of the decay rate of nitrifying bacteria, *Biotechnology and Bioengineering* 94 (2), 252-262.
- Schramm, A., D. de Beer, J. C. van den Heuvel, S. Ottengraf and R. Amann (1999) Microscale distribution of populations and activities of *Nitrospira* and *Nitrospira* spp. along a macroscale gradient in a nitrifying bioreactor: Quantification by in situ hybridization and the use of microsensors, *Applied and Environmental Microbiology* 65 (8), 3690-3696.
- Schwarzenbeck, N., R. Erley and P. A. Wilderer (2004) Aerobic granular sludge in an SBR-system treating wastewater rich in particulate matter, *Water Science and Technology* 49 (11-12), 41-46.
- Shi, X. Y., H. Q. Yu, Y. J. Sun and X. Huang (2009) Characteristics of aerobic granules rich in autotrophic ammonium-oxidizing bacteria in a sequencing batch reactor, *Chemical Engineering Journal* 147 (2-3), 102-109.
- Sin, G., A. Guisasola, D. J. W. De Pauw, J. A. Baeza, J. Carrera and P. A. Vanrolleghem (2005) A new approach for modelling simultaneous storage and growth processes for activated sludge systems under aerobic conditions, *Biotechnology and Bioengineering* 92 (5), 600-613.
- Tay, J. H., V. Ivanov, S. Pan and S. T. L. Tay (2002) Specific layers in aerobically grown microbial granules, *Letters in Applied Microbiology* 34 (4), 254-257.
- Tay, J. H., Q. S. Liu and Y. Liu (2001a) Microscopic observation of aerobic granulation in sequential aerobic sludge blanket reactor, *Journal of Applied Microbiology* 91 (1), 168-175.
- Tay, J. H., Y. Liu and Q. S. Liu (2001b) Microscopic observation of aerobic granulation in sequential aerobic sludge blanket reactor, *Journal of Applied Microbiology* 91 (1), 168-175.
- Tay, J. H., S. T. L. Tay, V. Ivanov, S. Pan, H. L. Jiang and Q. S. Liu (2003) Biomass and porosity profiles in microbial granules used for aerobic wastewater treatment, *Letters in Applied Microbiology* 36 (5), 297-301.
- Tchobanoglous, G. and F. L. Burton (1991) *Metcalf and Eddy, Wastewater Engineering Treatment, Disposal and Reuse*, McGraw-Hill, New York.

- Turk, O. and D. S. Mavinic (1989) Maintaining Nitrite Buildup in a System Acclimated to Free Ammonia, *Water Research* 23 (11), 1383-1388.
- Van Hulle, S. W. H., E. I. P. Volcke, J. L. Teruel, B. Donckels, M. C. M. van Loosdrecht and P. A. Vanrolleghem (2007) Influence of temperature and pH on the kinetics of the Sharon nitrification process, *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* 82 (5), 471-480.
- Van Loosdrecht, M. C. M. and M. Henze (1999) Maintenance, endogenous respiration, lysis, decay and predation, *Water Science and Technology* 39 (1), 107-117.
- Vazquez-Padin, J. R., J. Perez, A. Mosquera-Corral, J. L. Campos, R. Mendez and J. Carrera (2010) Modelling aerobic granular SBR at variable COD/N ratios including accurate description of total solids concentration, *Biochemical Engineering Journal* 49 (2), 173-184.
- Von Munch, E., K. Barr, S. Watts and J. Keller (2000) Suspended carrier technology allows upgrading high-rate activated sludge plants for nitrogen removal via process intensification, *Water Science and Technology* 41 (4-5), 5-12.
- Wan, J. F., Y. Bessière and M. Spérandio (2009) Alternating anoxic feast/aerobic famine condition for improving granular sludge formation in sequencing batch airlift reactor at reduced aeration rate, *Water Research* 43 (20), 5097-5108.
- Wan, J. F. and M. Spérandio (2009) Possible role of denitrification on aerobic granular sludge formation in sequencing batch reactor, *Chemosphere* 75 (2), 220-227.
- Wang, J. L. and N. Yang (2004) Partial nitrification under limited dissolved oxygen conditions, *Process Biochemistry* 39 (10), 1223-1229.
- Yang, S. F., J. H. Tay and Y. Liu (2003) A novel granular sludge sequencing batch reactor for removal of organic and nitrogen from wastewater, *Journal of Biotechnology* 106 (1), 77-86.
- Yang, S. F., J. H. Tay and Y. Liu (2005) Effect of substrate nitrogen/chemical oxygen demand ratio on the formation of aerobic granules, *Journal of Environmental Engineering-Asce* 131 (1), 86-92.
- Yilmaz, G., R. Lemaire, J. Keller and Z. Yuan (2008) Simultaneous nitrification, denitrification, and phosphorus removal from nutrient-rich industrial wastewater using granular sludge, *Biotechnology and Bioengineering* 100 (3), 529-541.
- Zeng, R. J., R. Lemaire, Z. Yuan and J. Keller (2004) A novel wastewater treatment process: simultaneous nitrification, denitrification and phosphorus removal, *Water Science and Technology* 50 (10), 163-170.

Zhang, T. C., Y. C. Fu and P. L. Bishop (1994) Competition in Biofilms, *Water Science and Technology* 29 (10-11), 263-270.

Zhu, G., Y. Peng, B. Li, J. Guo, Q. Yang and S. Wang (2008) Biological removal of nitrogen from wastewater, *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, Vol 192 192 159-195.

CHAPITRE II: Matériel et Méthodes

L'objectif de ce chapitre est de présenter le matériel utilisé au cours de notre étude. Ainsi, dans un premier temps les réacteurs utilisés pour le développement des boues granulaires ainsi que les conditions opératoires imposées seront décrits. Ensuite, les méthodes analytiques seront détaillées : il s'agira de présenter les caractérisations macroscopiques, du milieu ou plus spécifiquement des agrégats, susceptibles d'amener des éléments d'interprétation concernant les conditions d'élimination de l'azote. Pour finir, les outils de caractérisation des fonctionnalités présentes dans nos systèmes seront décrits.

1 Réacteurs à granulation aérobie GSBR

1.1 Description de l'installation expérimentale

Les boues granulaires ont été cultivées dans deux réacteurs à alimentation séquentielle de type air lift totalement automatisés (GSBR). La Figure II.1 représente le schéma d'un réacteur, le deuxième étant en tout point identique. Les réacteurs sont cylindriques en polyacrylate à double enveloppe et d'un volume utile de 17 L. Le diamètre intérieur est de 15 cm et la hauteur totale est 105 cm ($H/D = 7$). Une plaque (longueur : largeur = 83:15 cm) est placée verticalement au milieu du réacteur, divisant ainsi la colonne en deux zones : ascension et descente. L'air est introduit par une membrane en silicone de 4 mm d'épaisseur au bas du réacteur, et permet d'assurer la circulation de l'air, du liquide et des solides. Un débitmètre et une électro-vanne sont utilisés pour contrôler l'injection de gaz (air ou azote) et la vitesse superficielle correspondante, qui est calculée comme le rapport du débit d'air sur la demi-surface de la colonne.

L'influent synthétique (renouvelé tous les 2 jours) est stocké dans un tank réfrigéré à 4°C afin d'éviter la dégradation des composés. L'influent alimente la colonne par un piquage dans le $\frac{1}{4}$ bas de la colonne. Pour éviter les variations de température, susceptibles d'influencer fortement les activités biologiques notamment nitrifiantes, un préchauffage de l'alimentation jusqu'à 18°C est réalisé avant l'entrée dans le GSBR. De plus, la température du réacteur est maintenue à environ $20 \pm 2^\circ\text{C}$ par la circulation d'eau thermostatée dans une double enveloppe. L'eau traitée est vidangée en milieu de colonne. La fraction volumique d'échange correspondante est de 47%.

Les sondes pH (Electrode Schott N6280) et oxygène dissous (WTW TriOxmatic 701) en ligne permettent une acquisition des données toutes les 30 s. Au cours d'un cycle, le pH fluctue entre 7,2 et 9,2. Ce paramètre est suivi mais non régulé.

Les réacteurs fonctionnent dans un mode séquentiel (Figure II.2), avec un cycle de 4 heures défini comme suit: alimentation (15min), injection de N_2 (20min), injection d'air (2h25), décantation (30min) et vidange (30min).

Dans ce système aucune purge de boue n'est imposée (si ce n'est les prélèvements effectués pour les diverses caractérisations). Ainsi les boues peuvent s'accumuler tant que leur niveau à la fin de la décantation n'atteint pas le point de piquage médian, piquage duquel la vidange de l'eau traitée est réalisée. Lorsque la concentration en MES est suffisante pour que ce volume soit atteint, une purge s'effectue naturellement sur la fraction supérieure au niveau du voile de boue à chaque vidange d'effluent.

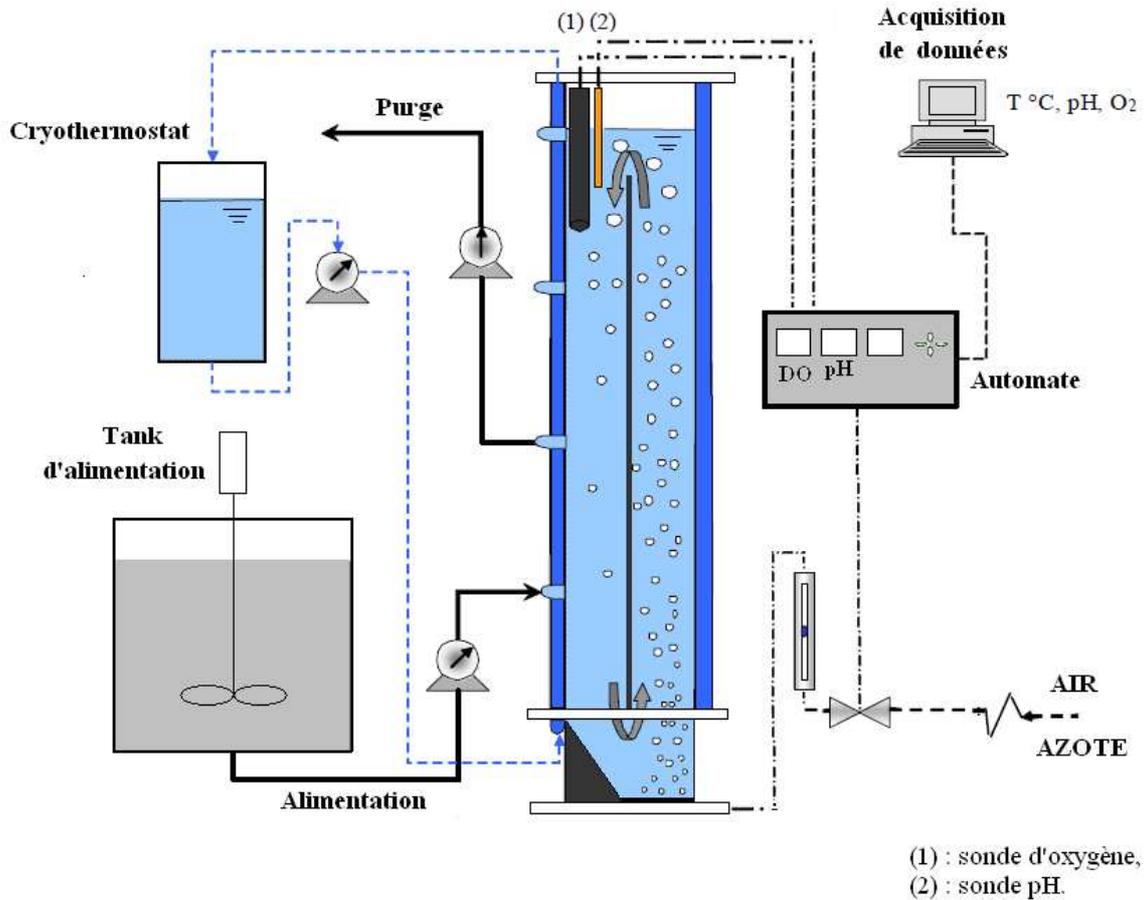


Figure II.1. Schéma du système SBAR

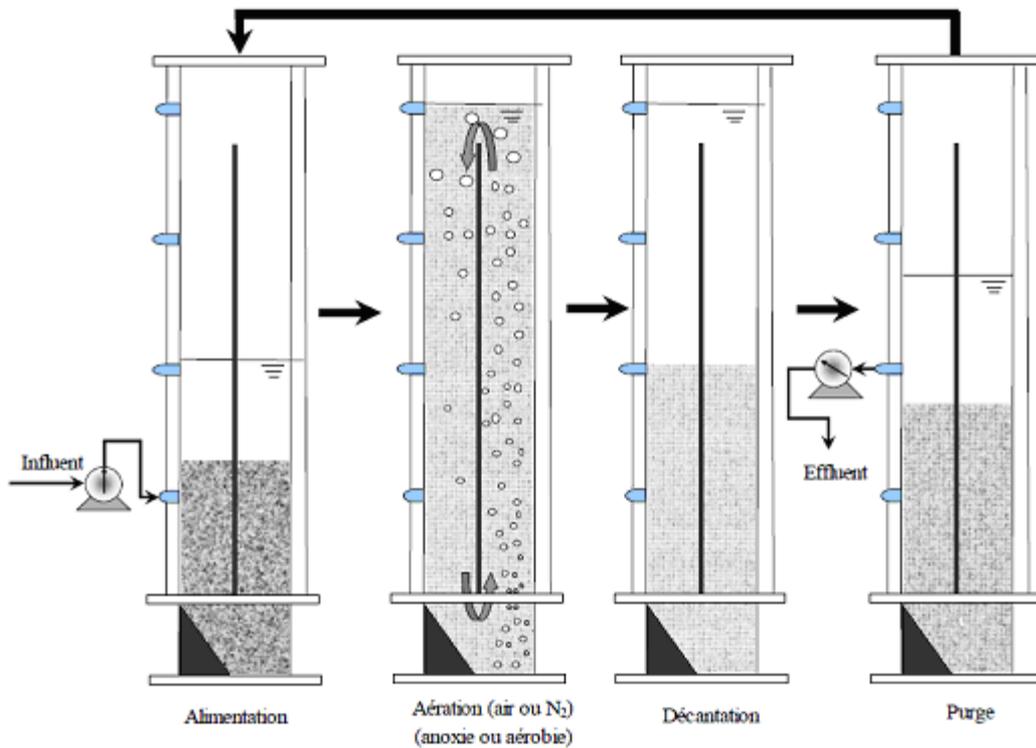


Figure II.2. Description d'un cycle de fonctionnement du SBAR

Les principales caractéristiques de fonctionnement des réacteurs sont données dans le Tableau II.1.

Tableau II.1. Conditions opératoires générales des deux réacteurs

Paramètres de fonctionnement	R1	R2
Volume journalier d'alimentation ($L j^{-1}$)	48	
Temps de séjour hydraulique (h)	8,5	
Charge ammoniacale volumique ($kg N-NH_4 j^{-1} m^{-3}$)	0,14	
Charge organique volumique ($kg DCO j^{-1} m^{-3}$)	2,8	
Vitesse superficielle de N_2 ($cm s^{-1}$)	$1,0 \pm 0,1$	$0,6 \pm 0,1$
Vitesse superficielle de l'air ($cm s^{-1}$)	$1,0 \pm 0,1$	
Température ($^{\circ}C$)	20 ± 2	
pH	7,5 – 9,2	7,2 - 8,5

1.2 Caractéristiques de l'influent synthétique

L'alimentation des réacteurs s'effectue au moyen d'un influent synthétique composé d'une source de carbone organique mixte contenant: glucose, acétate de sodium, éthanol et propionate de sodium, ce afin de préserver la diversité des consortia. Chacune de ces molécules organiques contribue à 25 % de la DCO totale de l'influent (1000 mg L⁻¹). L'unique différence entre les deux réacteurs vis-à-vis de l'alimentation, est l'ajout d'un supplément de nitrates dans l'influent du réacteur R1 visant à maintenir une condition strictement anoxique (et non anaérobie) durant la phase non aérée. Le réacteur R2 quant à lui fonctionne avec une alternance anaérobie/aérobie. Le Tableau II.2 donne la composition totale de cet influent.

Tableau II.2. Composition de l'influent alimentant les réacteurs

Composés	Concentration	
	R1	R2
25% de DCO pour chaque source de carbone Glucose, acétate de sodium, éthanol et propionate de sodium (mg DCO L ⁻¹)	1000	
NH ₄ Cl (mg N L ⁻¹)	50	
NaNO ₃ (mg N L ⁻¹)	100	0
NaHCO ₃ (mg L ⁻¹)	100	
KH ₂ PO ₄ (mg P L ⁻¹)	22	
MgSO ₄ 7H ₂ O (mg L ⁻¹)	12	
CaCl ₂ (mg L ⁻¹)	30	
FeSO ₄ (mg L ⁻¹)	4	
éléments traces (CuSO ₄ 5H ₂ O, MnCl ₂ , ZnCl ₂) ; (1mL/L)		

2 Techniques de caractérisation

2.1 Analyses normalisées

Le suivi du fonctionnement des réacteurs est réalisé au moyen de différentes méthodes d'analyse comprenant : l'analyse de la DCO soluble, MES et MVS ainsi que le dosage des ions ammonium, nitrites, nitrates et phosphate. Le Tableau II.3 résume l'intégralité des méthodes normalisées employées (AFNOR (1994)).

Tableau II.3. Techniques analytiques employées et leur norme associée

Analyse	Méthode et appareillage	Norme
DCO soluble	DCO après filtration (filtre nylon 0,2 µm) Réactif DCO et 2h de chauffage à 150 °C	NFT 90.101
MES MVS	Boues centrifugées pendant 15 min à 4500 g Séchées 24 h dans le Four (105 °C) - MES Puis séchées 2 h dans le Four (500 °C) - MVS	NFT 90.105
NH ₄ ⁺	Méthode de micro-NESSLER méthode colorimétrique au réactif de Nessler (filtre nylon 0,2 µm)	NFT 90-015
NO ₂ ⁻	Méthode DIONEX Chromatographie ionique (filtre nylon 0,2 µm)	NFT 90-042
NO ₃ ⁻	Méthode DIONEX Chromatographie ionique (filtre nylon 0,2 µm)	NFT 90-042
PO ₄ ³⁻	Méthode DIONEX Chromatographie ionique (filtre nylon 0,2 µm)	NFT 90-042

2.2 Techniques de caractérisation physique de la boue

a) Séparation des boues hybrides

Du fait de la faible sélection imposée par la décantation, qui, il est important de le noter, a une durée (30 min) plus longue que celle appliquée dans la littérature, la boue issue des réacteurs se compose de floccs et de granules. Dans le but d'étudier séparément ces différents agrégats, une méthode de séparation ex-situ a été appliquée. Celle-ci consiste en un tamisage à 315 µm de la boue hybride. Puis, les granules ainsi isolés sont rincés avec de l'eau distillée afin de les débarrasser de la fraction de floccs restée adhérente à leur surface.

b) Décantabilité des boues

La décantabilité des boues est évaluée par la détermination de l'indice de boues (IB) dans le réacteur. L'indice de boue représente le volume spécifique de la boue (mL), après un certain temps de décantation, occupé par 1 g de boue. L'indice de boue est déterminé par la mesure de la hauteur du lit de granules et de floccs après décantation pendant une durée fixée (généralement 5 min ou 30 min). Connaissant la géométrie du réacteur, le volume occupé respectivement par les floccs et les granules peut alors être déterminé. L'indice de boue est obtenu par la formule suivante :

$$IB_{boue} = \frac{V_{boue} \cdot 1000}{MES_{boue} \cdot 17} \quad \text{Équation II.1}$$

Où : IB_{boue} , est l'indice de boue des agrégats après un temps de décantation t ($\text{mL g}^{-1} \text{MES}$) ; V_{boue} représente le volume du décantât des agrégats (L) ; MES est la concentration des matières en suspension (g L^{-1}).

c) *Granulométrie laser*

La mesure de la taille des agrégats est déterminée avec un granulomètre Mastersizer 2000 (MALVERN Instrument SA). Cette technique repose sur la propriété des matériaux à diffracter la lumière. Toute particule éclairée par un faisceau laser diffracte la lumière dans toutes les directions avec une répartition d'intensité qui dépend de sa taille.

Dans la pratique, un échantillon de boue diluée avec de l'eau de sortie du réacteur (centrifugé à 10000 G pendant 10 minutes) est injecté dans une cellule de mesure grâce à une pompe péristaltique située en aval de la cellule de façon à éviter que les agrégats ne soient soumis à un cisaillement non désiré avant la mesure. Dans cette étude, l'indice de réfraction du dispersant est considéré égal à 1,33 et correspond à l'indice de réfraction de l'eau. Pour les particules, principalement composées de matière organique, l'indice de réfraction retenu est de 1,596.

La gamme de mesure de cet appareil varie entre 0,02 et 2000 μm . Ainsi, lorsque le diamètre des granules ne dépassait pas le seuil de coupure de l'appareil (en début d'étude), l'analyse granulométrique des boues a été employée afin d'accéder à la répartition de taille des agrégats et aux paramètres globaux en résultant (diamètre médian, diamètre le plus probable ...).

d) *Observation microscopique*

L'évolution de la morphologie des agrégats biologiques est suivie au moyen d'observations microscopiques régulières. Les photographies sont prises avec loupe binoculaire (Wild M420) et une caméra (Sony XC-75CE). Le diamètre moyen des granules a été déterminé par un traitement d'image fait avec le logiciel Visilog 6.5 dès lors que la taille des objets observés dépassait la gamme de mesure du granulomètre laser.

3 Hybridation in situ FISH

Dans l'objectif d'étudier la diversité microbienne ainsi que la répartition spatiale au sein des agrégats biologiques, la technique d'hybridation *in situ* de sondes fluorescentes (FISH) a été retenue. Cette technique consiste à hybrider des oligonucléotides de 18 à 20 bases (appelés sondes) marqués par un fluorochrome, à des séquences spécifiques des ARN ribosomiaux 16S du groupe ciblé. La

spécificité des sondes peut être très diverse : universelle (spécifique de procaryote), spécifique de branche (Gram positif à haut GC, Gram positif à bas GC, branche alpha des proteobacterie,...), spécifique de genre ou spécifique d'espèce (Amann, 1995).

Il est possible grâce à un code de couleur spécifique au fluorochrome utilisé de localiser, au sein d'une population mixte, l'espèce recherchée. C'est pourquoi, cette technique est fréquemment utilisée pour déterminer la fraction d'une population ciblée dans la biomasse totale à partir de la comparaison des surfaces marquées par une sonde spécifique et une sonde généraliste. Comparée aux autres méthodes de biologie moléculaires basées sur la PCR, la technique FISH présente l'avantage de la visualisation microscopique. Elle permet donc de localiser un groupe bactérien ciblé au sein d'un système mixte complexe. C'est donc dans le but d'étudier la répartition des espèces nitrifiantes (AOB et NOB) au sein de floes et de granules aérobies que la technique FISH a été employée.

3.1 Sondes et fluorochromes

3.1.1 Sondes

Chaque sonde est définie par une séquence, qui permet de cibler un groupe bactérien spécifique. Pour chaque sonde, la concentration en formamide du tampon d'hybridation est ajustée en fonction de la séquence nucléotidique, afin d'établir des conditions de stringence permettant l'hybridation à la cible, tout en évitant le marquage non spécifique. Les différentes sondes FISH utilisées lors de cette étude (Eurofins MWG Operan) sont présentées dans le Tableau II.4.

Tableau II.4. Sondes oligonucléotidiques

Cible	Sonde	Séquence	% FA*	Référence
Ensemble des bactéries	EUB338 I	5'-GCT GCC TCC CGT AGG AGT- 3'	<u>35</u> 0-60 ⁽¹⁾	(Amann et al., 1990; Daims et al., 1999)
	EUB338 II	5'-GCA GCC ACC CGT AGG TGT- 3'		
	EUB338 III	5'-GCT GCC ACC CGT AGG TGT- 3'		
Ensemble des AOB	Nso190	5'-CGA TCC CCT GCT TTT CTC-3'	<u>55</u>	(Mobarry et al., 1996)
	Nso1225	5'-CGC CAT TGT ATT ACG TGT GA-3'	<u>35</u>	
<i>Genus Nitrospira</i>	Ntspa662	5'- GGA ATT CCG CGC TCC TCT- 3'	<u>35</u>	(Daims et al., 2000)
	Comp Ntspa662	5'- GGA ATT CCG CTC TCC TCT- 3'		
<i>Nitrobacter spp.</i>	Nit3	5'- CCT GTG CTC CAT GCT CCG- 3'	<u>40</u>	(Wagner et al., 1996)
	Comp Nit3	5'- CCT GTG CTC CAG GCT CCG- 3'		

*Concentration de formamide dans le tampon d'hybridation (celle employée dans cette étude est soulignée).

⁽¹⁾ Gamme de concentration de formamide employée dans la littérature avec la sonde EUB_{mix}.

Remarques :

- Les sondes EUB 338 I, II et III permettent de marquer l'ensemble des bactéries (Amann et al., 1990; Daims et al., 1999). Ces sondes ont toujours été utilisées simultanément et sont regroupées sous le nom d'EUBmix. Il a été parfois nécessaire de marquer la biomasse totale avec un marquage de l'ADN avec DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole, dihydrochloride).
- Le marquage des bactéries nitrifiantes a nécessité l'emploi de deux sondes : Nso190 et Nso1225. Puisque ces sondes présentent différentes conditions de stringence (i.e. différents pourcentages de formamide), leur utilisation a nécessité une hybridation successive. La sonde nécessitant la stringence la plus importante (NSO 190) a été hybridée en premier.
- Le marquage des bactéries nitrifiantes a été réalisé par le marquage simultané des groupes *Nitrospira* (avec la sonde Ntspa662) et *Nitrobacter* (avec la sonde Nit3). Les sondes ciblant les bactéries nitrifiantes ont été associées à des sondes « compétiteurs ». Les sondes compétiteurs ne sont pas marquées par un fluorochrome, elles saturent les sites de séquences proches des organismes non ciblés afin de limiter le marquage non spécifique. Les sondes compétiteurs sont ajoutées directement sur le tampon d'hybridation en concentration équimolaire à celle des sondes.

3.1.2 Fluorochromes et couleur de représentation des marquages

Le Tableau II.5 présente les trois fluorochromes utilisés ainsi que leurs pics d'excitation et d'émission tandis que le Tableau II.6 présente la couleur de représentation associée à chaque marquage microbien effectué dans cette étude.

Tableau II.5. Fluorochromes, longueur d'onde d'excitation et d'émission associés

Nom	Pic d'excitation (nm)	Pic d'émission (nm)
DAPI	350	456
FTTC	488	550
CY3	543	630

Tableau II.6. Couleur de représentation des espèces microbiennes ciblées

Cible	Sonde	Couleur associée
ADN	DAPI	bleu
Ensemble des bactéries	EUBmix	bleu
Ensemble des AOB	Nso190 + Nso 1225	magenta
Ensemble des NOB	Nit 3+Ntspa 662	jaune

3.2 Procédure de marquage

La procédure de marquage employée est celle décrite par Amann (1995). Elle comprend plusieurs étapes : (1) fixation de l'échantillon, (2) préparation de l'échantillon, (3) hybridation avec les sondes oligonucléotidiques, (4) rinçage et (5) montage sur une lamelle et visualisation au microscope confocal. Ces différentes étapes sont résumées sur la Figure II.3.

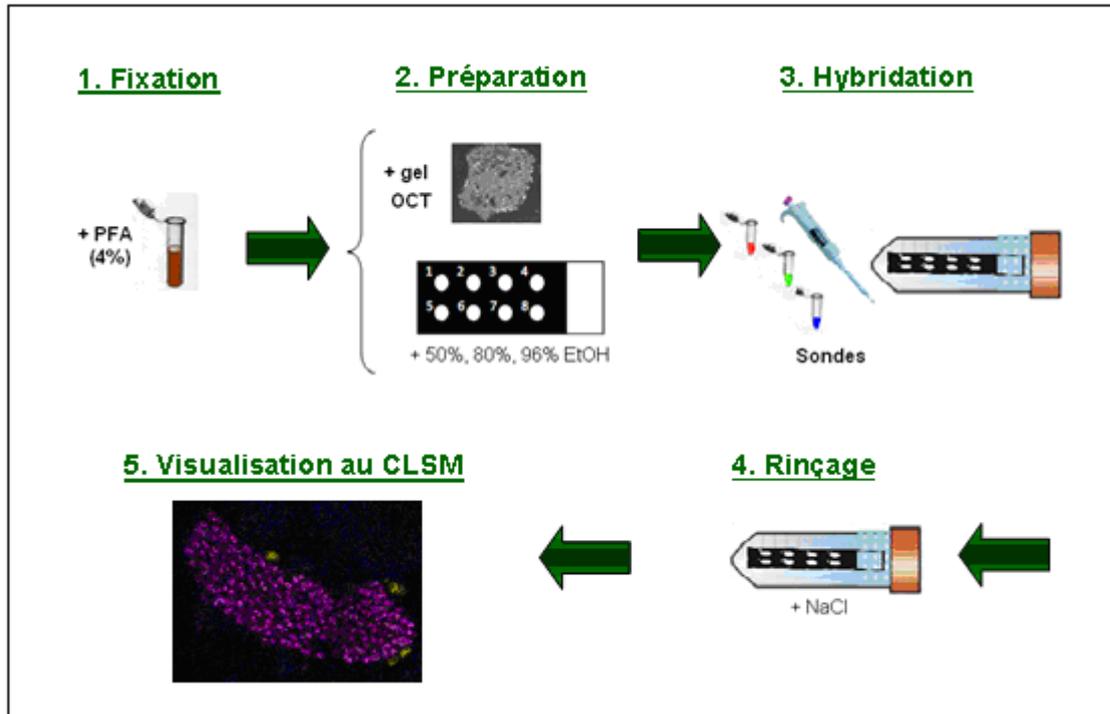


Figure II.3. Principales étapes de l'hybridation in situ FISH (adapté de Coma, 2011)

1) Fixation des échantillons

Immédiatement après prélèvement, les échantillons de floes et de granules sont rincés une fois avec du tampon phosphate salin PBS (de l'anglais phosphate buffered saline) puis plongés dans une solution contenant du paraformaldéhyde (PFA) à 4%. L'étape de fixation au PFA est une étape clef dans la procédure de marquage FISH car elle vise à inactiver toute activité enzymatique, empêchant ainsi l'évolution de l'échantillon (croissance, lyse...) après prélèvement. Les échantillons de floes et de granules sont laissés à incuber dans la solution de fixation à 4°C pendant 2 h et 12 h, respectivement. Puis, s'en suit une série de rinçage au PBS afin d'éliminer toute trace de PFA (3 rinçages pour les floes, 10 pour les granules). Les échantillons sont ensuite plongés dans une solution PBS : Ethanol (50 :50 en volume) et stockés à -20°C.

2) Préparation des échantillons

24h avant d'entamer la procédure d'hybridation, les échantillons de granules sont plongés dans un gel OCT (Tissue-Tek®) et entreposés à 4°C. Le gel OCT se compose de glycol et de résines solubles dans l'eau. Il est couramment utilisé comme support lors des coupes au cryomicrotome. En pénétrant dans les pores des agrégats biologiques, le gel OCT permet de limiter la détérioration de la structure interne des agrégats denses lors de congélation précédant la coupe. Les granules sont découpés à une température de -20°C avec un cryomicrotome (Leica CM3050 S) et avec une épaisseur de 40 µm.

Les échantillons de flocs ou de granules sont ensuite déposés sur des lames à puits préalablement traitées à la polylysine (0,01 g polylysine dans 100 mL d'eau). Ce traitement a pour objectif d'augmenter l'adhérence des échantillons aux lames et d'en limiter les pertes. Puis, les échantillons sont déshydratés par dépôts successifs de gouttes d'éthanol de concentration croissante (50, 80 et 96%) et ce afin d'augmenter la pénétration des sondes à travers les membranes cellulaires et retirer le gel OCT.

3) Hybridation

La solution de tampon d'hybridation est composée de tris HCl, SDS, NaCl, d'eau et d'un pourcentage de formamide spécifique à la sonde utilisée (pour plus de détail sur les concentrations, voir Tableau AI.1 présenté en Annexe I). Un volume de 10 µL de cette solution est déposé de façon à recouvrir toute la surface des puits. Puis, 1 µL de solution stock de chaque sonde est rajouté par dessus la solution d'hybridation et est mélangé à celle-ci afin de recouvrir l'échantillon. La lame ainsi préparée est introduite dans un tube de 50 mL de type Falcon contenant du papier absorbant. Le volume restant du tampon d'hybridation est utilisé pour imbiber le papier absorbant, qui est déposé dans le tube afin d'éviter l'évaporation du tampon d'hybridation en saturant l'air contenu dans le tube de la solution en formamide. Le tube est alors fermé et incubé à 46°C pendant 1h30.

Remarque :

- L'utilisation combinée de sondes oligonucléotidiques nécessitant différentes conditions de stringence (i.e. différents pourcentage de formamide) a été réalisée au moyen d'hybridations successives. La sonde nécessitant la stringence la plus importante (le pourcentage de formamide le plus élevé) a été hybridée en premier (Wagner *et al.* 1994). Ainsi, l'hybridation de l'ensemble des populations nitrifiantes (AOB et NOB) a nécessité 3 hybridations successives.

4) Rinçage

L'étape de rinçage vise à enlever l'excédent de sondes non appariées et à éliminer les appariements non spécifiques. Elle s'effectue au moyen d'un tampon contenant un pourcentage de

NaCl spécifique au pourcentage de formamide utilisé pour l'hybridation (Voir Tableau AI.2 présenté en Annexe I). Lors du rinçage les échantillons sont recouverts du tampon préalablement chauffé et sont laissés à incuber à 48°C pendant 10 min. La lame est par la suite brièvement rincée à l'eau distillée puis séchée à l'air libre.

5) Montage sur lamelle et visualisation microscopique

La dernière étape consiste à préparer la lame hybridée à la visualisation au microscope. Ceci s'effectue en ajoutant dans chaque puits une goutte d'une solution de montage (Citifluor Ltd) et en fixant à la lame une lamelle. Le Citifluor permet de limiter les phénomènes de perte de la fluorescence des fluorochromes (blanchissement des échantillons) après une longue durée d'excitation.

3.3 Acquisition d'images

3.3.1 Principales caractéristiques du microscope confocal

Les échantillons marqués sont observés au microscope confocal à balayage laser (LEICA AOBS SP2 disponible à la plateforme Imagerie TRI, IFR : FR3450), qui permet d'acquérir des images du marquage par plans focaux. L'excitation des différents fluorochromes employés dans cette étude a été réalisée au moyen de deux lasers. Le FITC, CY3 et DAPI ont été excités avec un laser argon (488nm), un laser Hélium-Néon (543nm) et une diode (405nm) et collectés à 498-550 nm, 571-630 nm et 415-450 nm, respectivement.

Parce que les spectres d'excitation et d'émission des fluorochromes employés se chevauchent, les observations ont été acquises selon un mode séquentiel. Ceci signifie que les lasers excitent séquentiellement par plan focal chaque fluorochromes. L'image résultante est constituée par la superposition des images obtenues via ces trois canaux.

Trois objectifs en immersion à l'huile ont été utilisés : X16, X63 et X100 avec une ouverture numérique de 0,5 ; 1,4 et 1,4, respectivement. La prise d'image de parties de granules a été réalisée avec l'objectif X16. Le nombre d'images nécessaires à la reconstitution d'un granule varie entre 20 et 30 photos selon les dimensions de l'agrégat. La reconstitution du granule a été réalisée sur un logiciel libre d'édition de graphismes vectoriels (Inkscape). De plus, pour chaque acquisition, un ensemble (ou stack) d'images pour chaque plan z de l'échantillon est enregistré. La distance (ou pas) entre chaque plan z varie dans cette étude de 0,2 à 1µm.

3.3.2 Ajustement du signal

Au cours des expériences, les paramètres d'acquisition du microscope confocal sont maintenus constants. Ces paramètres ont été définis de manière optimale afin d'obtenir une gamme d'intensité

fluorescente la plus dynamique possible (de 0 à 255 niveaux de gris), avec un minimum de pixels saturés et de sous exposés.

La procédure consiste à définir un seuil d'intensité de fluorescence limite (ou offset) en dessous duquel la fluorescence est assimilée au bruit de fond et considérée nulle. Cette limite est ajustée en fonction de l'intensité d'auto fluorescence des agrégats étudiés et ce pour chaque fluorochrome. Ainsi, seuls les pixels correspondant au marquage de la biomasse seront conservés. Puis, l'intensité des pixels marqués est ajustée par amplification du signal (ou gain). Pour finir, une procédure de moyennage est appliquée afin de réduire le bruit de fond. Le moyennage consiste à balayer chaque plan focal 2 ou 3 fois et ne conserver que les pixels communs à toutes les acquisitions (par définition la position des pixels due au bruit de fond varie d'un passage à l'autre). Un moyennage de 2 ou 3 a été appliqué.

Dans toutes les mesures effectuées, l'intensité des lasers n'est jamais modifiée (réglage paramétré pour chaque fluorochrome), et seuls les paramètres d'amplification du signal sont ajustés.

En pratique, ces réglages sont réalisés en visualisant l'image en mode « indicateur de niveau » où les pixels ayant un niveau de gris inférieur à zéro apparaissent en vert, et les pixels surexposés (niveau de gris > 255) en bleu. Pour chaque laser, le gain du détecteur est ajusté de façon à n'observer que quelques pixels saturés (en bleu) ; puis l'offset est ajusté de façon à ce que le fond ne soit pas sous-exposé. Le fond de l'image doit être vert tacheté de quelques points noirs, car ainsi l'amplification permet d'obtenir un signal non-nul dès qu'un objet présente une faible intensité de fluorescence. La Figure II.4 présente un exemple de ces réglages.

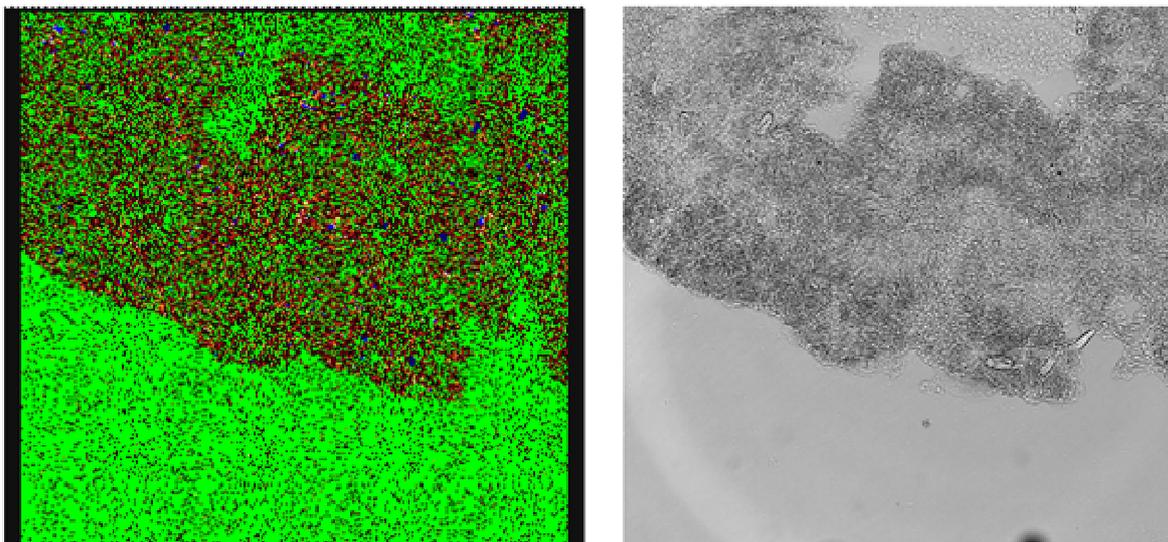


Figure II.4. Exemple d'ajustement du signal fluorescent

4 Tests de respirométrie ouverte

La respirométrie consiste à mesurer l'activité respiratoire de l'échantillon comme indicateur de l'activité bactérienne (en l'occurrence nitrifiante). Elle est réalisée dans un réacteur appelé respiromètre. Il existe deux types de respirométrie : fermée et ouverte. Dans la première (fermée), un réacteur agité et aéré contenant l'échantillon est relié à une cellule de mesure munie d'une sonde oxygène, par l'intermédiaire d'une pompe péristaltique. La mesure de la vitesse de consommation de l'oxygène dissous est réalisée dans la cellule de mesure et ce après chaque phase de renouvellement du liquide. Ainsi, au cours d'un test, l'échantillon est soumis à plusieurs passages répétés par une pompe péristaltique.

Afin de garantir le maintien de la structure physique des granules aérobies, l'étude de l'activité de nitrification des agrégats biologiques (flocs, granules et boue hybride) a été réalisée au moyen de la respirométrie ouverte. Dans ce cas, la mesure de la concentration de en oxygène dissous est réalisée directement dans le réacteur (Figure II.5). Lors de la mesure, un ordinateur enregistre la concentration en oxygène dissous dans un intervalle de 3 secondes, et la vitesse de respiration est déduite de la pente de diminution de la concentration de en oxygène. Pour le calcul de la pente, un minimum de 10 points a été imposé. La procédure employée pour les tests de respirométrie est détaillée dans le chapitre IV.

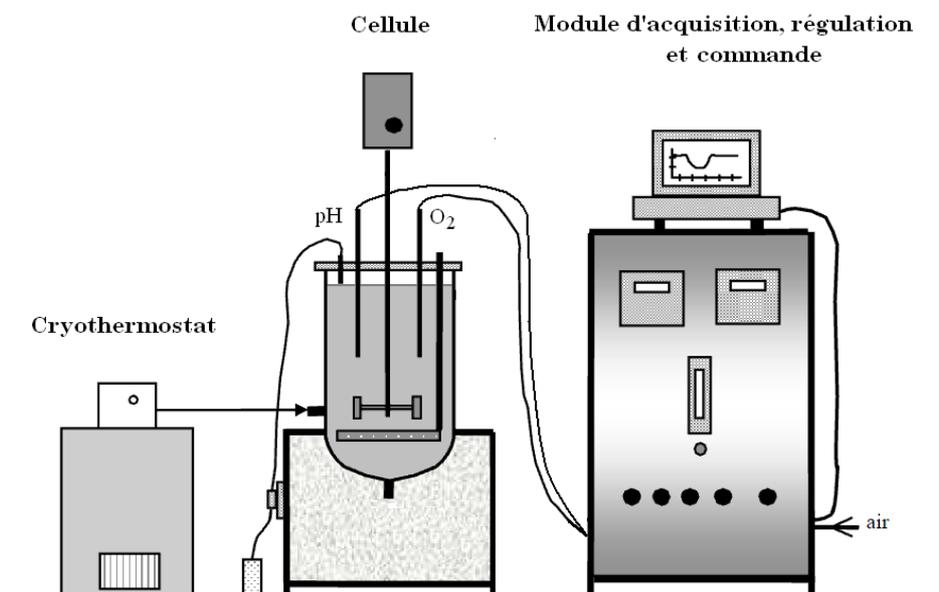


Figure II.5. Schéma du respiromètre

5 Modélisation

Le modèle mathématique employé pour décrire les performances du réacteur granulaire à boue hybride R1 est basé sur un modèle développé dans l'équipe au cours de la thèse de Wan (2009). Il s'agit d'un modèle 1-D mis en œuvre dans le logiciel AQUASIM® (version 2.1 g) de simulation pour les applications environnementales (Reichert, 1998).

Dans cette partie nous allons décrire de façon succincte l'outil de modélisation utilisé, le développement du modèle biologique ainsi que la prise en compte du caractère hybride de la boue développée dans notre système expérimental sera quant à lui exposé dans le chapitre V (modélisation).

5.1 Description du réacteur dans le modèle

Le réacteur biofilm sous AQUASIM® comprend deux compartiments :

1. le biofilm qui comprend la matrice biologique et le volume poreux la constituant
2. le liquide qui comprend aussi bien les composés solubles que les composés particuliers (représentant les flocs). Ce compartiment est défini comme parfaitement agité.

Cette configuration de réacteur permettra donc de modéliser les mécanismes simultanément dans les flocs (considérés comme homogènes) et dans les granules en considérant les phénomènes associés aux agrégats densifiés (transport de solutés et produits).

5.2 Description des granules et du détachement surfacique

Dans notre modèle, les granules sont assimilés à des sphères de taille homogène et constante au cours du temps. La sphéricité de l'agrégat est décrite en imposant une surface dépendant du rayon (et du nombre) des granules considérés. Le diamètre est maintenu constant en appliquant un modèle de détachement de surface, où la vitesse de détachement, u_{de} , dépendant du diamètre des agrégats et de la vitesse de croissance, u_F (Lackner et al., 2008) :

$$u_{de} = u_F \left(\frac{L_f}{L_{f\max}} \right)^{10000}, \text{ si } u_F > 0, \quad \text{sinon } u_{de} = 0 \quad \text{Équation II.2}$$

Où : L_f est l'épaisseur simulée et $L_{f\max}$ la valeur de consigne ; dans le cas de granules, ces grandeurs sont équivalentes au rayon de l'agrégat.

Pour chaque concentration en biomasse (exprimée en MVS) dans le réacteur considéré (GSBR ou respiromètre), correspond un nombre de granules (NSP). Celui-ci a été calculé comme suit :

$$NSP = \frac{MVS \cdot V_R}{V_{granule} \epsilon_s \rho_x} \quad \text{Équation II.3}$$

Où : MVS est la concentration en matière volatile en suspension (g L^{-1}), ϵ_s est la fraction volumique de solide (fixée à 0,6), ρ_x est la densité des granules (fixée à 100 g DCO L^{-1} de matrice).

5.3 Bilans

a) Processus biologiques

Au sein d'un réacteur biologique, diverses conversions prennent place, donnant lieu à la production ou la consommation d'un ou plusieurs composés (qu'ils soient solubles et particulaires). La vitesse réactionnelle globale d'un composé r_i , est donnée par :

$$r_i = \sum_j v_{ij} \rho_j \quad \text{Équation II.4}$$

Où : v_{ij} est le coefficient stœchiométrique impliquant chaque variable i dans chaque processus j et ρ_j est la vitesse de réaction du processus j .

Les composantes particulaires sont définies par le terme « X_i » et les composantes solubles par les termes « S_i » respectivement pour décrire leur concentration dans la réaction biologique. Les composés particulaires englobent les bactéries actives et inertes alors que les composés dissous, notés par la suite S , incluent les substrats (composés azotés, carbonés et oxygène) et les produits issus de l'activité microbienne (ammonium, DCO facilement biodégradable).

b) Transfert d'oxygène

Le transfert gaz-liquide qui régit la concentration d'oxygène dissous est décrit par l'équation suivante :

$$T = K_L a (S_{O_2, \max} - S_{O_2}) \quad \text{Équation II.5}$$

Où : $K_L a$ est le coefficient volumique de transfert (1000 j^{-1}), $S_{O_2, \max}$ est la concentration en oxygène à saturation à une température de 20°C ($9,2 \text{ mg L}^{-1}$) et S_{O_2} est la concentration en oxygène dissous.

c) Bilans dans l'agrégat

L'équation résolue par AQUASIM® pour décrire l'accumulation des composés particuliers, tenant compte de l'advection et du flux de production, dans l'agrégat est :

$$\frac{\partial X_i}{\partial t} = -u_F \frac{\partial X_i}{\partial z} + \left(r_{Xi} - \frac{X_i}{1-\theta} \sum \frac{r_{Xi}}{\rho_{Xi}} \right) \quad \text{Équation II.6}$$

Où : r_{Xi} est la vitesse réactionnelle du composé particulaire X_i telle que définie par l'Equation II.4 et θ est la porosité de l'agrégat.

L'Equation II.5 est quant à elle utilisée pour décrire le devenir des composés dissous dans l'agrégat (i.e. dans les pores) :

$$\frac{\partial S_j}{\partial t} = \left(\frac{1-\theta}{\theta} \right) u_F \frac{\partial S_j}{\partial z} + \frac{1}{\theta \cdot A} \frac{\partial}{\partial z} \left(A \cdot \theta \cdot D_{Si} \frac{\partial S_j}{\partial z} \right) + \frac{1}{\theta} \sum \frac{r_{Xi}}{\rho_{Xi}} \cdot S_j + \frac{1}{\theta} \cdot r_{Sj} \quad \text{Équation II.5}$$

Ainsi sont pris en compte l'effet de l'expansion du biofilm sur la concentration en composés solubles, la diffusion du substrat dans le biofilm ainsi que la consommation ou production de composés solubles par les communautés bactériennes.

6 Synthèse du matériel et méthodes mis en œuvre

Le Tableau II.7 résume le matériel et méthodes employés ainsi que les objectifs associés à chaque étude.

Tableau II.7. Récapitulatif du matériel et méthodes mis en œuvre dans cette étude

Pilote	Procédures de caractérisation	Objectifs	Section
Réacteurs airlifts à alimentation séquentielle R1 et R2	<u>Caractérisation in situ :</u>		
	Cinétiques		
	Bilans entrée/sortie	Comparer l'effet des conditions de culture en alternance de phase anoxie/aérobie (R1) et anaérobie/aérobie (R2) sur les performances de traitement des nutriments et les caractéristiques physiques et microbiologiques des agrégats développés.	Chapitre III
	<u>Caractérisation ex situ :</u>		
Hybridation en fluorescence in situ (FISH)			
Marquage du Poly-hydroxy butyrate (PHB)			

Réacteur à alimentation séquentielle R1	<u>Caractérisation in situ :</u>	Quantifier la contribution des floccs et des granules dans l'activité de nitrification de la boue hybride et évaluer les avantages de cette coexistence notamment vis-à-vis de la sensibilité aux concentrations en oxygène dissous.	Chapitre IV
	Cinétique Bilans entrée/sortie <u>Caractérisation ex situ :</u> Tests de respirométrie		
	Hybridation en fluorescence in situ FISH		
Réacteur à alimentation séquentielle R1	Développer un modèle et évaluer ses capacités à :		Chapitre V
	1. Décrire les phénomènes réactionnels ayant lieu au sein d'une biomasse hybride comprenant une fraction de granule et de floccs. 2. Prédire l'effet de l'oxygène dissous sur l'activité de nitrification des agrégats biologiques		

Références

- AFNOR, 1994. Recueil de normes française-Qualité de l'eau.
- Amann, R. (1995). In situ identification of micro-organisms by whole cell hybridization with rRNA-targeted acid probes. In: Molecular Microbial Ecology Manual, Edited by A.D.L. Akkermans, J.D. van Elsas & F.J. de Bruijn. London : Kluwer, pp. MMEM-3.3.6/1-MMEM-3.3.6/15.
- Amann, R.I., Krumholz, L. and Stahl, D.A. (1990) Fluorescent-Oligonucleotide Probing of Whole Cells for Determinative, Phylogenetic, and Environmental-Studies in Microbiology. *Journal of Bacteriology* 172(2), 762-770.
- Biesterfeld, S., Figueroa, L., Hernandez, M. and Russell, P. (2001) Quantification of nitrifying bacterial populations in a full-scale nitrifying trickling filter using fluorescent in situ hybridization. *Water Environment Research* 73(3), 329-338.
- Daims, H., Bruhl, A., Amann, R., Schleifer, K.H. and Wagner, M. (1999) The domain-specific probe EUB338 is insufficient for the detection of all Bacteria: Development and evaluation of a more comprehensive probe set. *Systematic and Applied Microbiology* 22(3), 434-444.
- Daims, H., Nielsen, P.H., Nielsen, J.L., Juretschko, S. and Wagner, M. (2000) Novel Nitrospira-like bacteria as dominant nitrite-oxidizers in biofilms from wastewater treatment plants: diversity and in situ physiology. *Water Science and Technology* 41(4-5), 85-90.

- Mobarry, B.K., Wagner, M., Urbain, V., Rittmann, B.E. and Stahl, D.A. (1996) Phylogenetic probes for analyzing abundance and spatial organization of nitrifying bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* 62(6), 2156-2162.
- Reichert, P. (1998) AQUASIM 2.0—user manual, computer program for the identification and simulation of aquatic systems. Dübendorf, Switzerland, Swiss Federal Institute for Environmental Science and Technology (EAWAG).
- Rittmann, B.E., Lapidou, C.S., Flax, J., Stahl, D.A., Urbain, V., Harduin, H., van der Waarde, J.J., Geurkink, B., Henssen, M.J.C., Brouwer, H., Klapwijk, A. and Wetterauw, M. (1999) Molecular and modeling analyses of the structure and function of nitrifying activated sludge. *Water Science and Technology* 39(1), 51-59.
- Wagner, M., Amann, R., Kampfer, P., Assmus, B., Hartmann, A., Hutzler, P., Springer, N. and Schleifer, K.H. (1994) Identification and in-Situ Detection of Gram-Negative Filamentous Bacteria in Activated-Sludge. *Systematic and Applied Microbiology* 17(3), 405-417.
- Wagner, M., Rath, G., Koops, H.P., Flood, J. and Amann, R. (1996) In situ analysis of nitrifying bacteria in sewage treatment plants. *Water Science and Technology* 34(1-2), 237-244.
- Wan, J.F., Bessière, Y. and Spérandio, M. (2009) Alternating anoxic feast/aerobic famine condition for improving granular sludge formation in sequencing batch airlift reactor at reduced aeration rate. *Water Research* 43(20), 5097-5108.

CHAPITRE III: Résultats

**Stabilité et performances de deux GSBP opérant
en alternance anoxie/aérobie ou
anaérobie/aérobie pour l'élimination simultanée
de C, N et P**

Introduction du chapitre III: objectifs et approche

Ce chapitre a pour objectif d'étudier et de comprendre les mécanismes impliqués dans la stabilité (ou l'instabilité) de deux procédés de granulation aérobie. Il s'agit plus précisément de comparer l'effet de l'alternance de phases anaérobie/aérobie et anoxie/aérobie sur les performances et la stabilité d'un procédé de granulation aérobie pour l'élimination simultanée des nutriments (C, N et P).

Deux réacteurs alimentés avec un mélange de 4 sources de carbone et fonctionnant avec un taux d'aération similaire ont été suivis en parallèle sur une durée d'étude d'un an. Le premier réacteur (R1) était opéré avec une alternance de conditions anoxie/aérobie, alors que le deuxième (R2) était opéré avec une alternance de conditions anaérobie/aérobie. Les performances épuratoires des procédés ainsi que la structure des agrégats (indice de boue, taille des agrégats, présence ou non de bactéries filamenteuses, répartition spatiale des espèces nitrifiantes...) développés dans chaque réacteur ont été étudiés.

Les principaux résultats de cette étude, obtenus conjointement aux travaux de thèse d'A. Manas, ont été publiés dans la revue *Biochemical Engineering Journal* (2012). Suite à la publication une discussion complémentaire et une conclusion seront développées.

Filali, A., A. Manas, M. Mercade, Y. Bessière, B. Biscans, M. Spérandio. Stability and performances of two GSBP operated in alternating anoxic/aerobic or anaerobic/aerobic conditions for nutrient removal. Biochemical Engineering Journal, 2012. 67(0):p. 10-19.

Stability and performance of two GSBR operated in alternating anoxic/aerobic or anaerobic/aerobic conditions for nutrient removal

Ahlem Filali^{a,b,c,1}, Angéla Mañas^{a,b,c,d,1}, Myriam Mercade^{a,b,c}, Yolaine Bessière^{a,b,c}, Béatrice Biscans^d, Mathieu Spérandio^{a,b,c*}

^a Université de Toulouse; INSA, UPS, INP; LISBP, 135 Avenue de Rangueil, F-31077 Toulouse, France

^b INRA, UMR792 Ingénierie des Systèmes Biologiques et des Procédés, F-31400 Toulouse, France

^c CNRS, UMR5504, F-31400 Toulouse, France

^e CNRS, Laboratoire de Génie Chimique, UMR5503; 4, allée Emile Monso BP 84234-F-31432 Toulouse Cedex 4

Corresponding author* : Mathieu Spérandio: sperandio@insa-toulouse.fr

Abstract

Two granular sludge sequencing batch reactors (GSBR) with alternating anoxic / aerobic (R1) and anaerobic / aerobic (R2) conditions were operated with a 4-carbon-source synthetic influent. Very good physical properties for the granular sludge (SVI < 20 mL g⁻¹) and high solid concentrations (up to 35 g L⁻¹) were obtained in the bioreactor operated with a pre-anoxic phase with additional nitrate (R1). In contrast, performance and granule settleability were lower in R2 due to the development of filamentous heterotrophic bacteria on the surface of granules. These disturbances were linked to the fact that a fraction of COD remained during the aerobic phase, which was not stored during the anaerobic period. To stabilize a GSBR with a mixture of organic carbon sources, it is thus necessary to maximize the amount of substrate used during the non-aerated, anaerobic or anoxic, phase. Comparable phosphate removal efficiency was observed in both systems; enhanced biological P removal being greater in anaerobic/aerobic conditions, whereas the contribution of precipitation (Ca-P) was more significant in anoxic/aerobic conditions.

Keywords: aerobic granulation, nitrification, denitrification, phosphorus, filamentous, precipitation

* Corresponding author at : Université de Toulouse, INSA, UPS, INP, LISBP, 135 Avenue de Rangueil, F-31077 Toulouse, France. Tel : +33 5 61 55 97 55. E-mail address: sperandio@insa-toulouse.fr (M. Spérandio).

¹ These authors contributed equally to this work.

Nomenclature

ACP	Amorphous Calcium Phosphate ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2 \cdot \text{XH}_2\text{O}$)
AOB	Ammonium Oxidizing Bacteria
COD	Chemical Oxygen Demand (mg L^{-1})
DO	Dissolved Oxygen concentration (mg L^{-1})
EBPR	Enhanced Biological Phosphorus Removal
EPS	Extracellular Polymeric Substance
GSBR	Granular Sequencing Batch Reactor
HAP	Hydroxy-apatite ($\text{Ca}_5(\text{OH})(\text{PO}_4)_3$)
MLSS	Mixed Liquor Suspended Solid (g L^{-1})
MLVSS	Mixed Liquor Volatile Suspended Solid (g L^{-1})
NOB	Nitrite Oxidizing Bacteria
OLR	Organic Loading Rate ($\text{Kg COD m}^{-3}\text{d}^{-1}$)
PAO	Polyphosphate Accumulating Organism
SAV	Superficial Air Velocity (cm s^{-1})
SND	Simultaneous Nitrification Denitrification
SVI	Sludge Volume Index (mL g^{-1})
VFA	Volatile Fatty acid

1 Introduction

The aerobic granular sludge process has been proposed as a promising approach to biological wastewater treatment [1]. Thanks to their dense structure, aerobic granules have very good settling ability that allows high biomass retention in the bioreactor. This enables the process to withstand high-strength wastewater and results in a biological reactor having a smaller volume than conventional activated sludge systems [2]. The size and density of the granules enable simultaneous nitrification, denitrification and phosphorus removal, SNDPR, [3-4] to be maintained. However, the operating conditions that guarantee the stability of performance and physical properties of aerobic granular sludge still need consideration. Instability and poorer properties of granular sludge have been reported for real sewage, for example, compared to the ideal results reported with purely acetate fed granules [5-7].

Various operating parameters have been identified that influence granule formation in aerobic systems. They include the aeration rate, substrate feeding mode, organic loading rate, and settling time [8-12]. In granular sludge sequencing batch reactors (GSBR), the aeration rate plays two major roles: firstly, it imposes the hydrodynamic conditions in the reactor and, secondly, it controls the oxygen mass transfer in the aggregates. High aeration rate has been shown to provide high shear force, which erodes the surface of granules; to stimulate bacterial strains to secrete more extracellular polymeric substances (EPS), thus enhancing structural integrity; to reduce substrate transfer resistance in the

liquid boundary layer at the granule surface; and to provide sufficient oxygen for organic substrate degradation [8, 13]. Various studies have demonstrated that a high aeration rate (expressed by the superficial air velocity SAV) accelerates the formation of stable aerobic granules. Beun et al. [14] showed that smooth, stable granules could be obtained only with an SAV above 2.0 cm s^{-1} . Tay et al. [13] found that regular, rounder, compact aerobic granules could be formed only above a minimum aeration rate (SAV= 1.2 cm s^{-1}). Hence, the development of stable aerobic granules in pure aerobic systems is limited because of the high energy demand involved in aeration [15] and because efficient nitrogen and phosphorus removal requires the presence of anaerobic or anoxic and aerobic conditions [16].

Alternating anoxic / aerobic and anaerobic / aerobic conditions have both been reported to be helpful for granulation. Possible explanations for this are that conversion of readily biodegradable COD to internal stored biopolymers limits the substrate utilization rate during the aerobic phase [17] or that anoxic growth inside the granule improves aggregate density [18-19]. Another reason is that alternating non-aerated feast periods and aerated famine periods encourages the selection of slow-growing bacteria, which are supposed to be positive for the densification of bio-aggregates [9]. The work of Wan et al. [18] showed that the alternating anoxic feast and aerobic famine regime allowed the formation of stable aerobic granules and simultaneous nitrification denitrification (SND) at reduced air flow rate (SAV = 0.6 cm s^{-1}). On the other hand, the alternation of anaerobic and aerobic conditions has been widely reported to promote internal biopolymer storage and enhance biological phosphorus removal by polyphosphate-accumulating organisms [20-21].

Therefore, the aim of this study is to compare the effect of alternating anoxic / aerobic and anaerobic / aerobic conditions on the performance and stability of an aerobic granular sludge process for simultaneous carbon, nitrogen and phosphorus removal. For this purpose, two reactors were run in parallel. They were fed with a mixture of organic substrates and operated with a similar aeration rate. The first reactor (R1) was operated with alternating anoxic / aerobic conditions, the second one (R2) was operated with alternating anaerobic / aerobic conditions. Process performance and the microscale structure of granules were investigated for both reactors.

2 Materials and methods

2.1 Reactor operating conditions

The experimental set-up included two geometrically identical Granular Sequencing Batch Reactors (GSBR), each with a working volume of 17 L (internal diameter = 15 cm, total height = 105 cm, H/D ratio = 7). Both reactors were inoculated with the same concentration of a stabilized hybrid

sludge (containing both flocs and granules) cultivated in alternating anoxic / aerobic conditions. The initial MLSS and MLVSS concentrations were 19.5 g L^{-1} and 13.1 g L^{-1} respectively. The initial SVI was $22 \text{ mL g}^{-1}_{\text{MLSS}}$. Reactor R1 was operated with alternating anoxic / aerobic conditions, whereas R2 was operated with alternating anaerobic / aerobic conditions. Each reactor was operated sequentially with a cycle time of 4 h including 15 min of feeding, 20 min of anoxic or anaerobic reaction (nitrogen gas injection); 145 min of aerobic reaction; 30 min of settling and 30 min of discharge (with a volumetric exchange ratio of 47%). The aeration rate was similar in both reactors, with a superficial air upflow velocity (SAV) of $1.0 \pm 0.1 \text{ cm s}^{-1}$. Both reactors were fed at the bottom of the column when aeration was stopped (static fill). The feed consisted of a synthetic substrate [18] having the following composition: COD of 1000 mg L^{-1} (25% contribution each of glucose, acetate, propionic acid and ethanol), $[\text{PO}_4^{3-}] = 30 \text{ mgP L}^{-1}$, $[\text{Ca}^{2+}] = 46 \text{ mg L}^{-1}$, $[\text{HCO}_3^-] = 100 \text{ mg L}^{-1}$, $[\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}] = 12 \text{ mg L}^{-1}$, $[\text{NH}_4^+] = 50 \text{ mgN L}^{-1}$. A COD/N-NH₄⁺ ratio of 20 was maintained. Nitrate was dosed in R1 in order to maintain anoxic conditions after feeding ($[\text{NO}_3^-] = 100 \text{ mgN L}^{-1}$). The pH probe and DO probe were installed online and the data were acquired every 30 s by computer. pH fluctuated naturally during a reactor cycle, from 7.5 to 9.2 in R1 and from 7.2 to 8.5 in R2. The temperature was maintained at $20 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ with a water jacket. The reactor performance was monitored through weekly cycle studies, in which samples were analyzed at regular intervals during an SBAR cycle. Table III.1 summarizes the main operating conditions of the two reactors.

Due to annual closure, the supply of influent to the reactors was interrupted for two consecutive weeks and the cycle of operation was modified: the new 2-h cycle consisted of 15 min aeration and 105 min settling. This period (from day 105 to day 120) is referred to as the “starvation period”.

Table III.1. Operating conditions of both reactors

	R1	R2
Volumetric exchange ratio (%)	47	
Hydraulic retention time (h)	8.5	
Organic loading rate ($\text{kg DCO m}^{-3} \text{ d}^{-1}$)	2.8	
Ammonia loading rate ($\text{kg N-NH}_4 \text{ m}^{-3} \text{ d}^{-1}$)	0.14	
Nitrate loading rate ($\text{kg N-NO}_3 \text{ m}^{-3} \text{ d}^{-1}$)	0.28	0
Phosphorus loading rate ($\text{kg P-PO}_4 \text{ m}^{-3} \text{ d}^{-1}$)	0.08	
Superficial upflow velocity of air (cm s^{-1})	1.0 ± 0.1	
Superficial upflow velocity of N ₂ (cm s^{-1})	1.0 ± 0.1	0.6 ± 0.1
Temperature ($^\circ\text{C}$)	20 ± 2	
pH (not regulated)	7.5 – 9.2	7.2 - 8.5

2.2 Analytical characterization of the liquid and solid phases

Analyses were conducted according to standard methods (AFNOR) [22]. COD (NFT 90-101), MLSS (NFT 90-105) and MLVSS (NFT 90-106). NO_2^- , NO_3^- , PO_4^{3-} , NH_4^+ , Ca^{2+} , K^+ , Mg^{2+} concentrations were analyzed by ion chromatography (IC25, 2003, DIONEX, USA) with prior filtering of the samples through a 0.2 μm pore-size acetate filter. The Sludge Volume Index (SVI) was measured in the reactor after 30 min of settling and showed less than $\pm 10\%$ of difference relative to the standard procedure in a graduated test tube. Microscopic observations of sludge samples were made with a Biomed-Leitz® binocular photonic microscope. Particle size distribution was measured with a Malvern 2000 Mastersizer® analyzer and with statistical image processing.

The proportion of granules by mass and by volume was estimated using Eqs. (III.1) and (III.2) respectively:

$$\text{Percentage of granules by mass} = \frac{MLSS_{\text{granule}} \cdot 100}{MLSS_{\text{hybrid sludge}}} \quad \text{Equation III.1}$$

$$\text{Percentage of granules by volume} = \frac{V_{\text{granule}} \cdot 100}{V_{\text{hybrid sludge}}} \quad \text{Equation III.2}$$

Where $MLSS_{\text{granule}}$ and $MLSS_{\text{hybrid sludge}}$ are the mixed liquor suspended solids in granules and hybrid sludge respectively. In order to assess the MLSS of granules, sieving at 315 μm was performed as described in Filali et al. [23]. V_{granule} and $V_{\text{hybrid sludge}}$ represent the apparent volume of granules and hybrid sludge, respectively, in the reactor after 30 min of settling.

2.3 Microbial characterization

2.3.1 FISH probing

Floc and granule samples were fixed as described in Filali et al. [23]. Filamentous bacteria that had developed at the surface of granules were detached with a sterile scalpel and subjected to the same procedure as the flocs. In situ hybridization was performed according to the standard hybridization protocol [24]. The fluorescently labeled oligonucleotide probes used were as follows: Nso190 and Nso1225 (labeled with FITC) for AOB [25], Nit3 (labeled with Cy3) for *Nitrobacter spp.* [26] and Ntspa662 (labeled with Cy3) for *Nitrospira spp.* [27]. DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole, dihydrochloride) was used to stain all the DNA containing organisms. To avoid non specific staining, unlabeled competitor probes CNit3 and CNtspa662 were added with equimolar amount of Nit3 and Ntspa662, respectively.

Fluorescent in situ hybridization images were collected with a confocal laser scanning microscope (LEICA SP2, DMRXA2, Germany) using an argon laser (488 nm) for FITC excitation, a helium neon laser for Cy3 (543 nm) and a diode laser for DAPI (405 nm). Their fluorescence was respectively detected at 498–550 nm, 571–630 nm or 415–450 nm. To obtain images of half-granule sections, 10 to 20 overlapping, consecutive images of 1024x1024 pixels were acquired (depending on the size of the granule) using a 16x oil objective. The final composite image of the granule section was then reconstructed from all the single images collected using INKSCAPE open source scalable vector graphics. Images of bacterial clusters were acquired using a 100x oil objective.

2.3.2 PHB staining

Poly-hydroxy butyrate (PHB) staining was carried out following a protocol adapted from Pandolfi et al. [28]. Samples were cut to 100- μm thickness and spread over a glass plate. Once air-dried, the samples were placed in a solution of Sudan black for 5 min, then rinsed with ethanol at 70 vol.% and dried. Safranin was dropped on to the dry samples, covering them completely, and left in contact for 5 s. The samples were dried again, then rinsed with distilled water and observed with an optical microscope. Safranin was used to show up the cytoplasmic membranes in red (bacterial cells) whereas Sudan black stained the PHB inclusions blue.

3 Results

3.1 Performance stability

Figs. III.1 and III.2 show the evolution of solid concentration and the removal efficiencies of reactors R1 and R2 respectively, during the whole operation. Both reactors were started with similar seeds and showed the same suspended solids concentration, i.e. 19.5 gTSS L⁻¹ and 13.1 gVSS L⁻¹, together with very good settling properties (SVI was initially close to 22 mL g⁻¹).

After about 50 days of running and up to the end of the study (300 days), performance was very stable in the anoxic/aerobic reactor (R1). The removal of soluble COD, ammonia and total nitrogen were 96%, 100% and 89%, respectively. The removal yields of phosphorous gradually increased and stabilized at 45%. MLSS and MLVSS first stabilized around 21.0 \pm 1.5 gTSS L⁻¹ and 13.8 \pm 1.2 gVSS L⁻¹ respectively and then gradually accumulated in the reactor up to 35 gTSS L⁻¹ and 25 gVSS L⁻¹, with a VSS / TSS ratio of 65-70%. The accumulation of suspended solids was also associated with a decrease of SVI (16 \pm 2 mL g⁻¹). Performances were stable and it was interesting to observe that, after a starvation period of 15 days (starting on day 105) during which it was not fed, the

reactor was easily started again and it took less than one week for removal performances to be fully recovered, underlining the robustness of granules from R1.

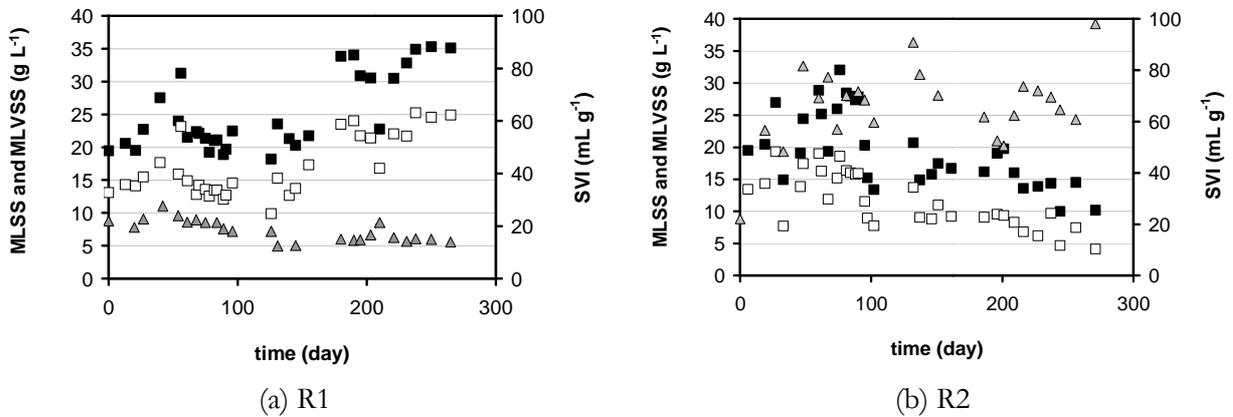
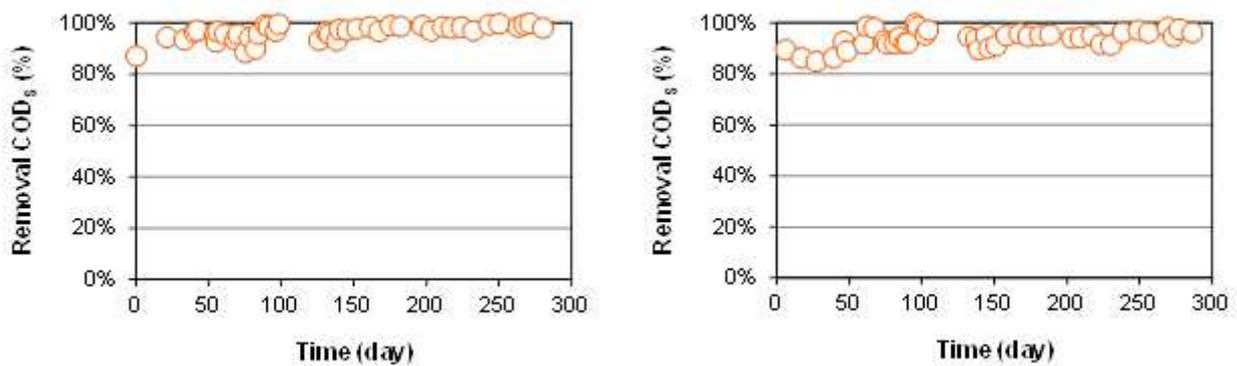


Figure III.1. Evolution of suspended solids during the reactors run period (■) MLSS, (□) MLVSS and (▲) SVI in R1 (a) and R2 (b)

In the second reactor (R2), performance initially declined and neither the sludge concentration nor the reactor performances were fully stabilized at any time during the study. The MLSS concentration initially increased, reaching 32 g L⁻¹, but then progressively decreased to less than 10 g L⁻¹. The sludge volume index (SVI) fluctuated around 70 ± 15 mL g⁻¹ during the first 100 days and then increased to 90 mL g⁻¹. The COD removal efficiency varied between 90 and 95%, whereas ammonia and total nitrogen removal yields fluctuated from 60% to 100% (mean values of 86% and 84% respectively). Phosphorus removal oscillated from 10 to 80% with a mean efficiency of 42%.



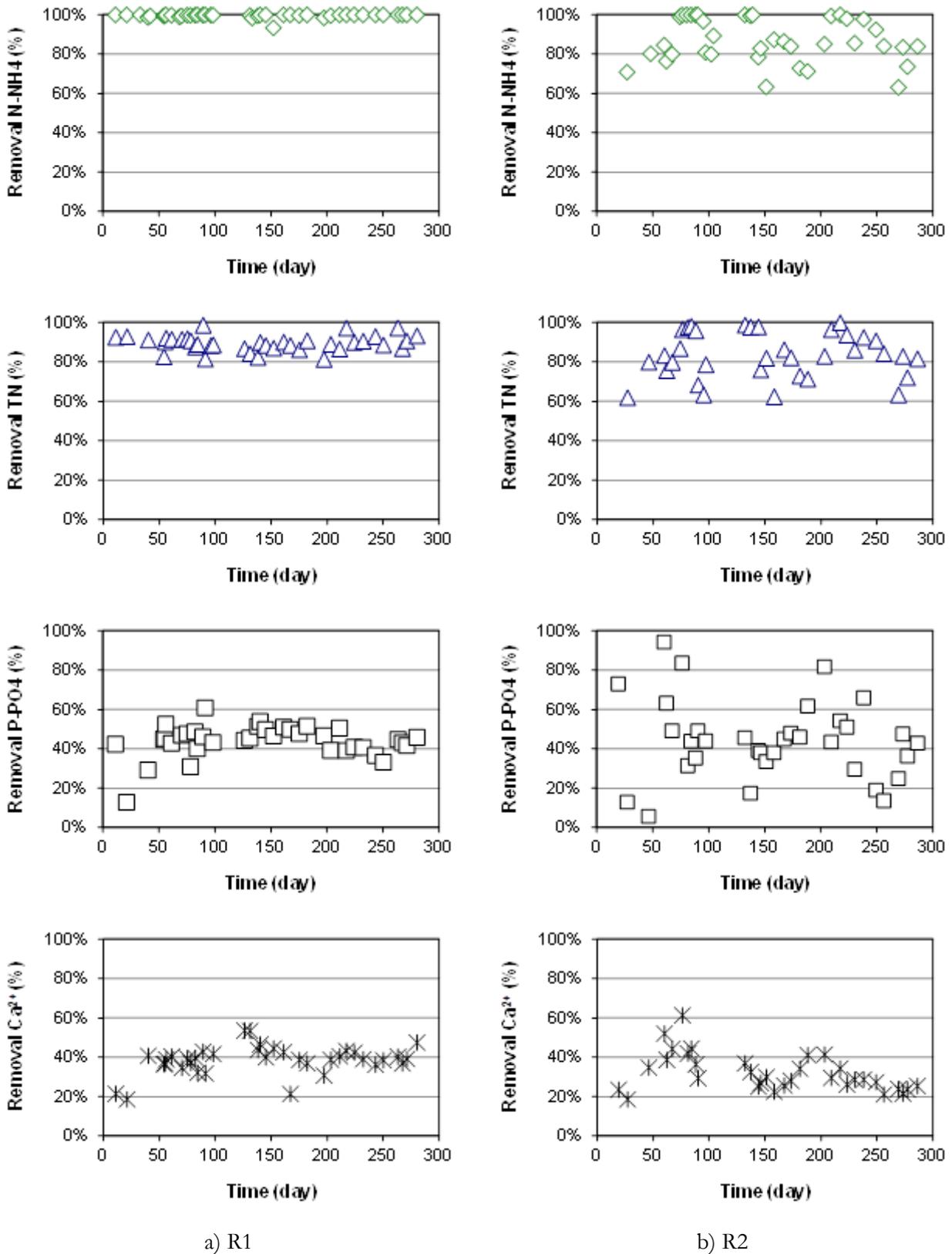


Figure III.2. Evolution of removal efficiencies of (○) COD, (△) N-NH₄, (◇) TN (□) P-PO₄ and (✱) Ca²⁺ in R1 (a) and R2 (b)

3.2 Evolution of sludge properties

As both reactors were initially seeded with a mixture of granules and flocs, the evolution of the percentage of granules in the two reactors was an interesting indicator of sludge properties (Fig III.3). A slight enrichment in granules was observed in R1, the granule percentage increasing from 60 to 80% of total volume and constituting more than 90% of the mass. Granule size also progressively increased (from 1 to 3 mm). Concomitantly, a decreasing proportion of flocs was maintained throughout the study.

In contrast, in R2, sludge properties evolved differently. From day 33, an increase of granule fraction by mass was observed, together with a decrease of their fraction by volume, which clearly indicates a strong modification of aggregate properties and floc washout. This can be explained by the fact that granules rapidly became bigger (from 1 to 4 mm of diameter) due to a filamentous (fluffy) growth on the surface. As granular sludge occupied a larger volume in the reactor after settling, flocs were washed-out and the granule percentage initially increased. Concomitantly, filamentous suspended growth was also observed and the flocs thus generated, even though they contributed little to the total mass of sludge, were likely to occupy a large volume and to considerably affect sludge settling as the SVI rose to $70 \pm 15 \text{ mL g}^{-1}$.

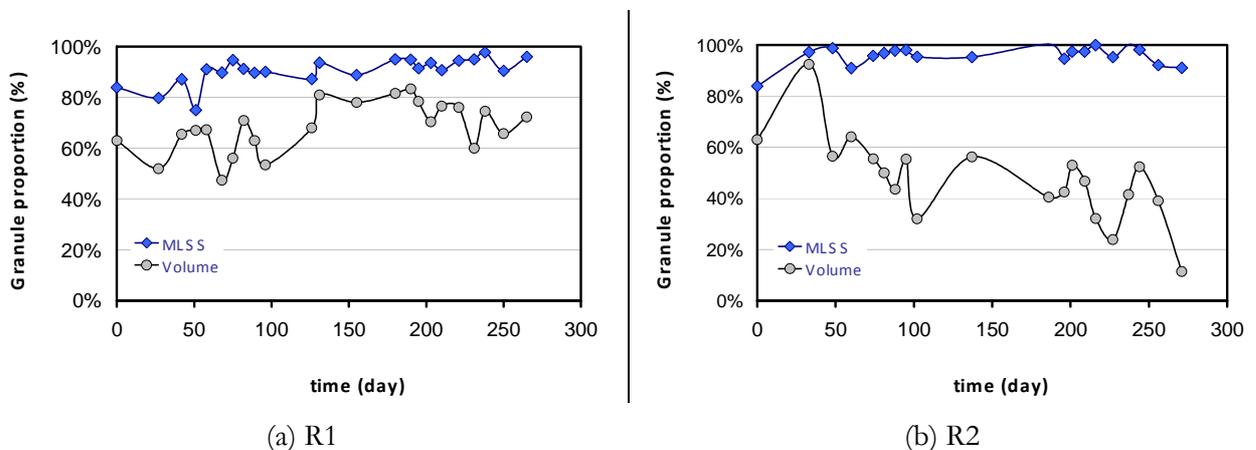


Figure III.3. Evolution of the proportion of granules in MLSS and in volume of the hybrid sludge in both reactors

Figure III.4 shows the correlation between the MLSS concentration and the percentage of granules in both reactors. It indicates that the MLSS globally increased with the proportion of the volume occupied by the granules and the diminution of suspended biomass growth.

From the microscope observations (Figure III.5) it can be seen that granules from R1 presented a smooth round surface similar to the granules initially seeded (Fig III.5 a). In contrast, as already mentioned, filamentous bacteria grew out from the surface of R2 granules (Fig III.5 b), and this filamentous layer seemed to cause oxygen transfer limitation as indicated by the release of gas

bubbles (Fig III.5 e). As suggested by Mosquera-Corral et al. [15], long-term anaerobic conditions inside the granule could lead to growth of methanogenic bacteria.

With time, the surface of some of the mature granules from both reactors became cracked and broken, revealing a stronger core (Figs. III.5 c and III.5 d). The strength of the internal part of the granules was probably explained by mineral precipitation as demonstrated by Mañas et al. [29]. Whereas, in R1, the loss of efficiency due to mature granule disintegration seemed to be compensated by the birth of small, new ones, granules from R2 progressively lost their density but no new small granules seemed to be generated in this reactor.

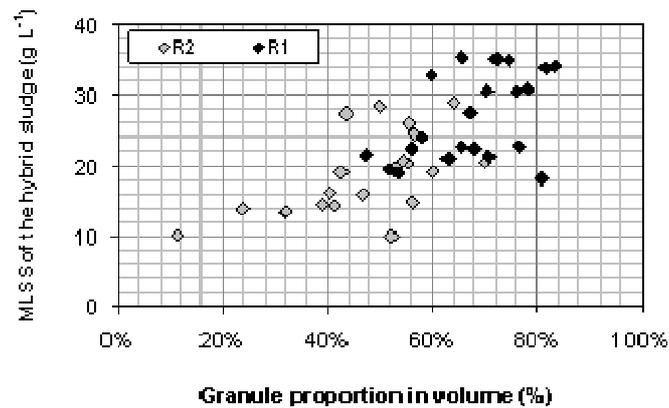


Figure III.4. Relationship between the MLSS concentration with the granule percentage in volume

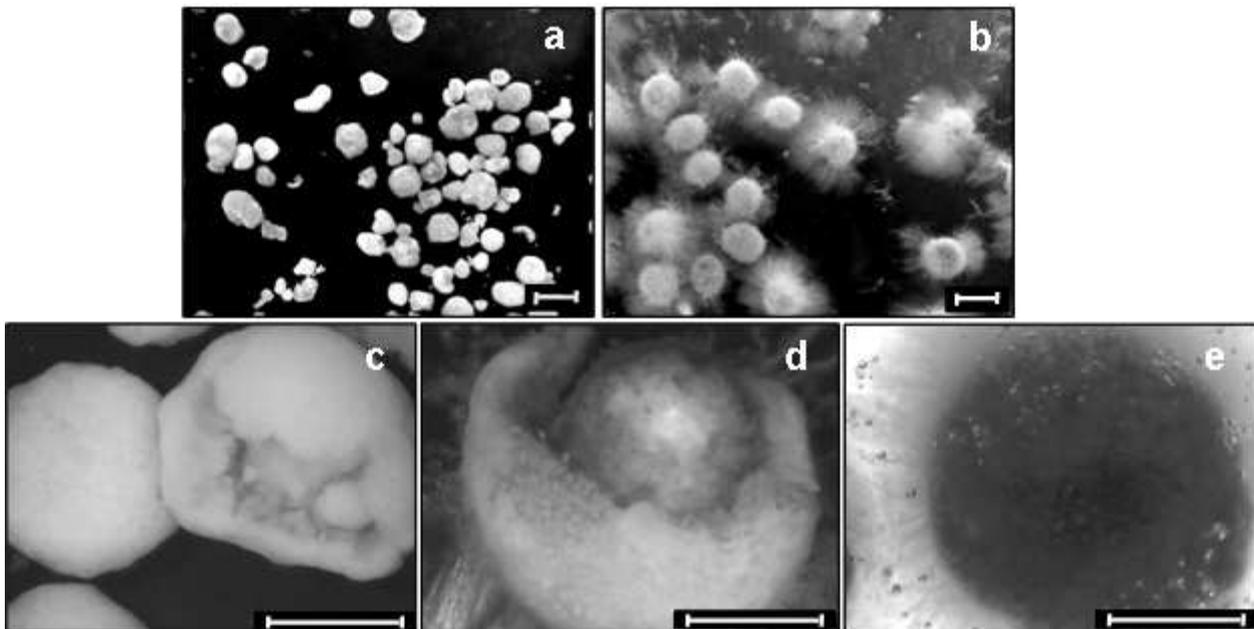


Figure III.5. Micrographs of microbial aggregates at different operating times : (a) R1-162 days ; (b) R2-162 days; (c) R1-238 days; (d) R2-238 days; (e) R2-250 days (scale bar = 2mm)

3.3 Nitrogen removal

3.3.1 Kinetics

Kinetic analyses were performed during the batch cycle to assess COD, nitrogen and phosphorus removal (Figure III.6).

During the anoxic phase in reactor R1, COD and nitrate were rapidly depleted. Denitrification occurred at a rate of $350 \text{ mgN L}^{-1} \text{ h}^{-1}$, and nitrite concentration increased, transiently reaching 5 mgN L^{-1} . Ammonium was depleted after 1.5 h during the aerobic phase, 46% being removed by heterotrophic assimilation during the anoxic period and 54% aerobically at a rate (AUR) of $8.9 \text{ mgN L}^{-1} \text{ h}^{-1}$. Nitrite and nitrate accumulated, reaching 6 mgN L^{-1} and 14 mgN L^{-1} respectively. DO was first stabilized at 5 mg L^{-1} during nitrification and then increased to 6.3 mg L^{-1} after ammonia depletion. The stable profile of TN during the aerobic period indicates that simultaneous nitrification denitrification did not occur significantly in this reactor. This could be explained by DO not being low enough and insufficient organic carbon being stored during the anoxic (feast) phase to allow denitrification in the granules during the aerated phase.

In reactor R2, during the non-aerated phase, the COD decreased by 134 mg L^{-1} , which corresponds to 25% of the COD fed to the system, and reached a plateau at about 400 mg L^{-1} . During the aerated phase, the oxygen profile reached a first plateau at 2.5 mg L^{-1} , a second plateau at 4 mg L^{-1} , and then increased to 6.3 mg L^{-1} after 85% of the COD had been removed. The pH increase from 7.2 to 8.2 during the first oxygen plateau indicated probable consumption of VFA and stripping of CO_2 . During the second plateau, ammonium was progressively consumed but nitrate and nitrite concentration remained negligible. Concomitantly, the presence of AOB was demonstrated by FISH analysis in granules from R2 whereas NOB were not detected (see Section 3.2.2). In addition, the nitrification rate was also measured in batch respirometric tests with granular sludge collected from R2 at the end of the aerobic phase (at DO of 5 mg L^{-1} , with ammonia addition of 10 mgN L^{-1} , without addition of organic carbon). AUR was $0.99 \text{ mgN g}^{-1} \text{ VSS h}^{-1}$, no nitrate was observed and nitrite accumulated at a rate of $0.57 \text{ mgN g}^{-1} \text{ VSS h}^{-1}$. These observations encourage us to think that ammonium was simultaneously removed by heterotrophic assimilation and SND during the aerobic phase in the reactor R2. Due to heterotrophic bacteria respiration and growth on storage compounds, the nitrite produced by AOB was fully consumed and some of the ammonia was also assimilated. This is in accordance with the presence of AOB and the absence of NOB in these granules. Despite the fact that the AUR in R2 was close to that observed in R1 ($8.3 \text{ mgN L}^{-1} \text{ h}^{-1}$), the ammonium was not depleted at the end of the cycle because ammonium started to be nitrified after the COD was depleted. Before that, the oxygen level was probably too low in the granules due to high heterotrophic activity.

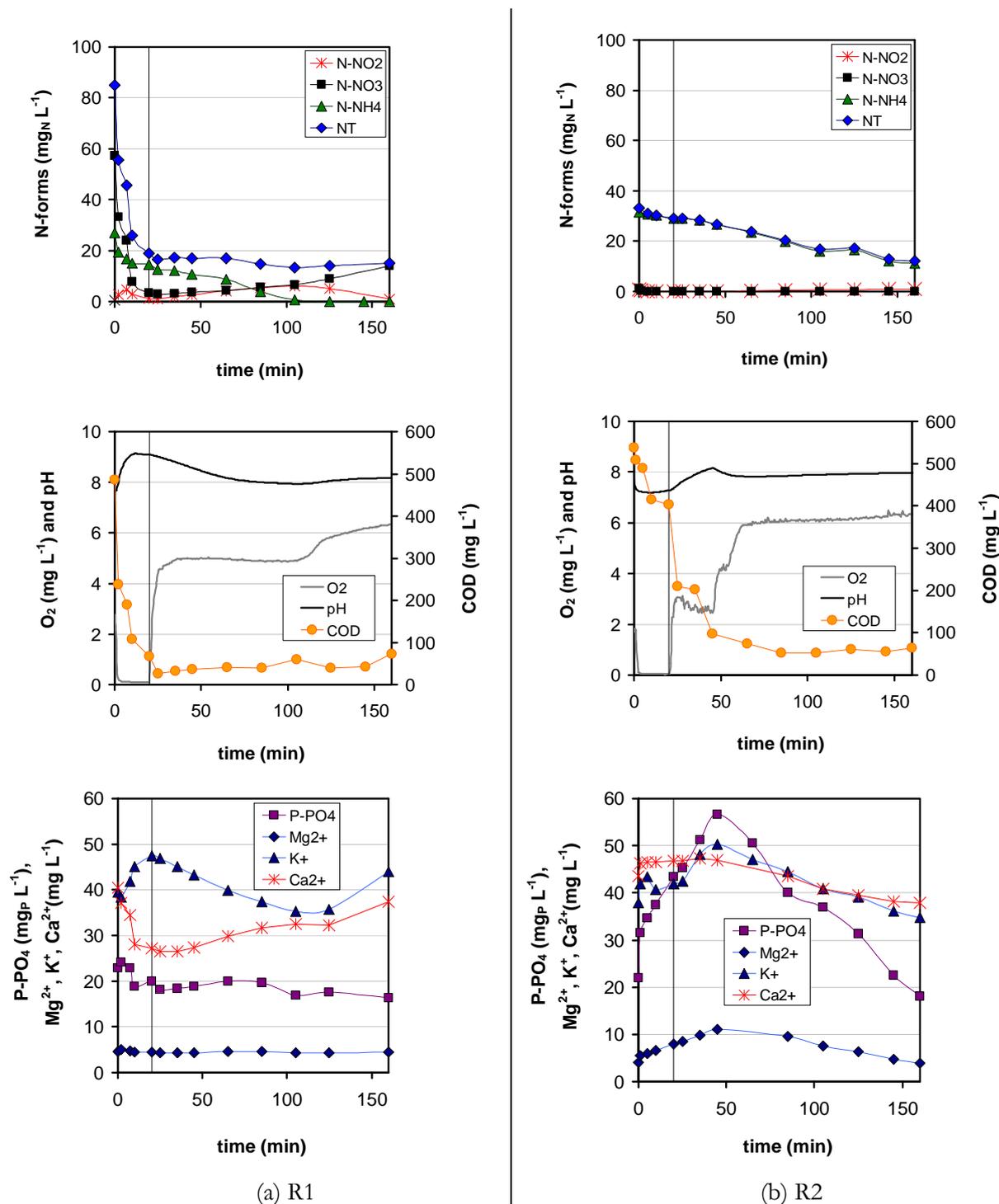


Figure III.6. Typical profile of soluble compounds in both reactors during a cycle study performed on day 167. The separation between the anoxic (R1) or anaerobic (R2) / aerobic phases is depicted by a vertical line

The final concentration of ammonium in the effluent was 11 mgN L^{-1} here but varied greatly from one cycle to another, leading to unstable ammonium removal efficiency (Fig III.2 b). This critical instability of nitrification was due to the small proportion of ammonia assimilated during the

non-aerated phase and to the strong competition between heterotrophic and autotrophic bacteria for oxygen during the aerobic phase.

3.3.2 *Spatial distribution of nitrifiers*

FISH analysis was performed to assess the microscale structure of granules and the localization of nitrifying bacteria. Figure III.7 shows the images of granules from R1 (a, c and d) and R2 (b and g), together with suspended biomass from R1 (e) and filamentous bacteria from R2 (f). DAPI staining (blue) indicated the presence of heterotrophic bacteria in the granules. Fig. b confirms that granules from R2 were much more irregular than those of R1 (a).

In the first reactor, the localization of nitrifiers in the granules did not change significantly during the run. The image of a half-granule section (Fig III.7 a) shows that AOB (magenta) were distributed throughout the granule and, in particular, near large channels and internal voids. The NOB (yellow) were found to be located in deeper layers of the granule (about 250 μm from the surface) and profusely around the internal core of the granule. As observed in previous studies [30-31], channels and internal voids may play a key role in the transport of oxygen and substrate, which would explain this localization. AOB were found to form dense bacterial clusters with sizes ranging from 10 to 50 μm (Fig III.7 c). NOB clusters were dense and small, their size rarely exceeding 10 μm (Fig 21.d). Hybridization of samples of flocs from R1 was also performed (Fig III.7 e). AOB were frequently observed in floc samples, forming large, dense clusters, whereas very few NOB were observed.

The spatial distribution of nitrifiers in a half-granule section of R2 (observed on day 227) is reported in Fig III.7 b. The distribution of AOB in R2 granules was less extensive than the distribution observed in R1. AOB were located only in the outermost 250 μm of the granule. Their distribution was not homogenous through that layer. AOB clusters colonized some large parts of the aggregate and were totally absent from others. In addition, many of them were found to develop at the surface of the granule. Fig III.7 g shows typical dense clusters of AOB that have developed near the surface of the granule. Conversely to R1, AOB clusters in R2 were relatively small and rarely exceeded a size of 20 μm . The hybridization of NOB with the oligonucleotides Nit3 and Ntspa662 gave a low signal similar to background noise and no typical bacterial clusters could be identified (with a magnification x100). It was thus concluded that NOB were not significantly present in granules from R2. The hybridization of samples of flocs and filamentous bacteria from R2 indicated that suspended biomass did not contain nitrifying bacteria, be they AOB or NOB (result not shown). The same result was obtained with filamentous bacteria developed at the surface of the granules in R2 as shown in Fig III.7 f. The absence of NOB confirms that SND favors the direct denitrification of nitrite in the core of granules, which progressively limits the development of NOB.

The FISH results corroborate the kinetic assessment that neither nitrite nor nitrate was accumulated (Section 3.3.1), indicating that nitrifiers are difficult to maintain in an anaerobic/aerobic system because of strong competition with heterotrophs for oxygen and space. Furthermore, the absence of NOB in the reactor confirms that SND favours the direct denitrification of nitrite in the core of granules, which progressively limits the development of NOB.

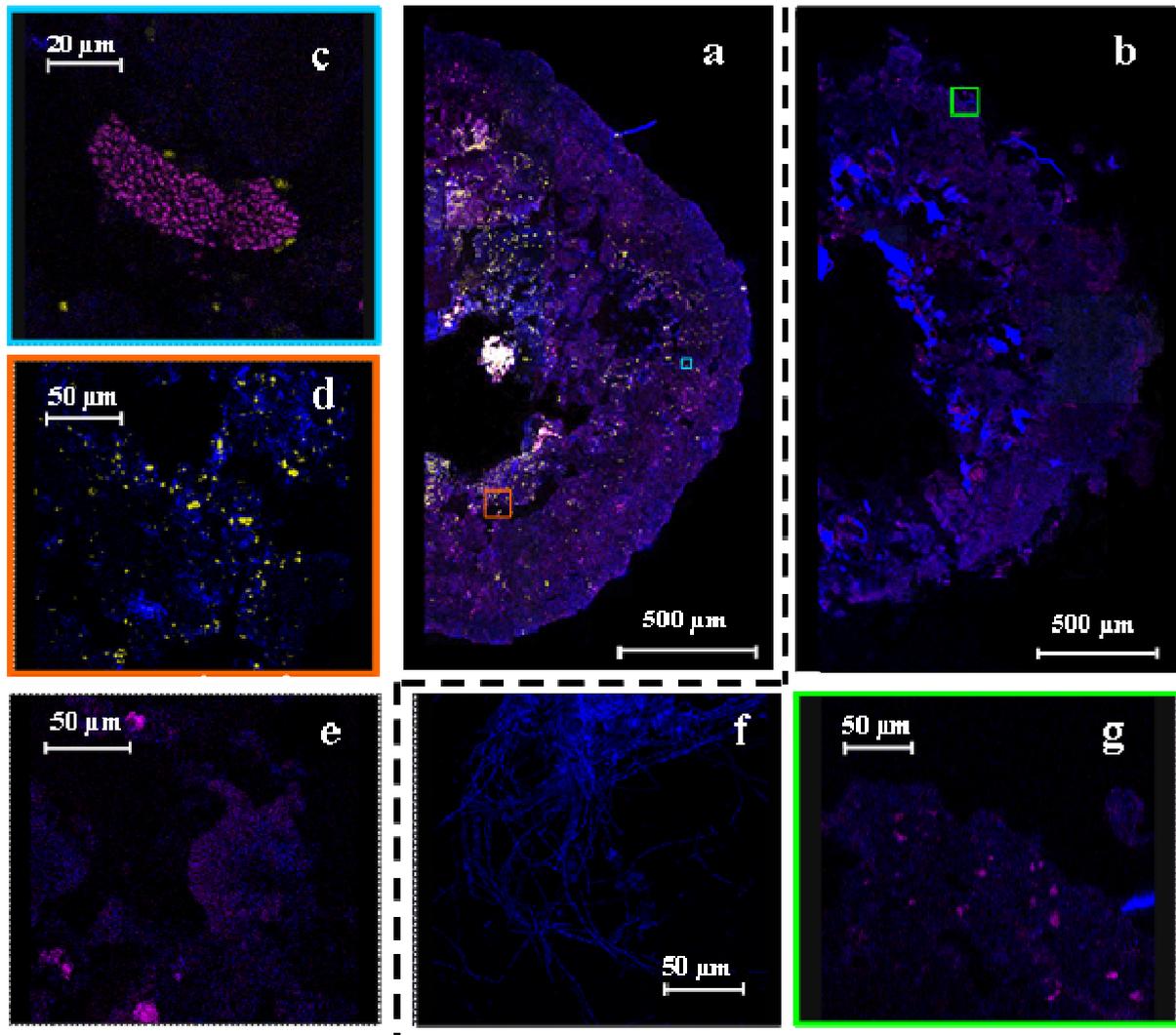


Figure III.7. Confocal laser scanning microscopy images of FISH micrographs of nitrifiers. Half granule section of R1 (a) and part of the section (c and d). Half granule section of R2 (b) and part of the section (g). Confocal laser scanning micrographs of FISH performed on a flocs of R1 (e) and filamentous bacteria of R2 (f). AOB appear in magenta (hybridized with FITC-labelled Nso190 +Nso1225), NOB appear in yellow (hybridized with Cy3-labelled Nit3+Ntspa662), other bacteria appear in blue (DNA staining with DAPI).

3.4 Phosphorus removal

3.4.1 Kinetics

Kinetics assessed over a reactor cycle (Fig III.6) showed the different processes involved in phosphorus removal. In R1 (Fig III.6 a), a rapid decrease of PO_4 was observed during the anoxic phase concomitant with pH increase due to denitrification. It has been demonstrated previously [29] that calcium phosphate precipitation is responsible for this phenomenon. There was no apparent anaerobic phosphate release in R1 during the unaerated period. This observation seems logical because, usually, a pre-anaerobic (rather than anoxic) period is used to induce biological phosphate removal. Here, nitrate was preferentially used by ordinary heterotrophic bacteria for substrate oxidation. However, a little polyphosphate-accumulating organism (PAO) activity can nevertheless be suspected in reactor R1 for two reasons : first, the potassium concentration showed a profile (release and uptake) typically explained by its inclusion in a polyphosphate structure and, second, specific anaerobic batch tests performed with granular from R1 (with acetate as the sole carbon source, without additional calcium or magnesium at a pH that avoided precipitation) showed a P release rate of $2.18 \text{ mgP g}^{-1} \text{ MLVSS h}^{-1}$, which is comparable to data obtained with EBPR granular sludge [32]. The presence of PAO in reactor R1 could appear surprising as this reactor was operated mainly in anoxic/aerobic conditions. However, it should be noted that nitrate and nitrite were depleted after 10-15 min and the end of the period was anaerobic. Moreover, due the density of granules, an anaerobic zone could be found inside them, even though nitrate and nitrite were measured in the bulk. Thus, anaerobic P release and uptake was possibly masked by P precipitation in the GSBP reactor R1. Finally, despite the possible presence of PAO, the contribution of biological reactions to P removal was probably low compared to precipitation (see Section 3.4.3).

As shown by Fig III.6 b, significant anaerobic release of PO_4 took place in the second reactor (R2). This release continued during the first oxygen step in the aerobic phase ($\text{DO} = 2.5 \text{ mg L}^{-1}$), which means that some of the PAO were still converting substrate (VFA) to internal polymers (as suggested by the concomitant pH increase). This was possibly due to the presence of anaerobic zones in the granule during this phase as oxygen uptake rate was high until COD was depleted in the reactor. In the kinetics presented, the final phosphate concentration is similar to that observed in reactor R1. However, depending on the cycle, phosphate removal was unstable in R2. This may have been due to significant variability in the heterotrophic activity at the beginning of the aerobic phase (Fig III.2 b), which would influence P uptake rate. Another explanation could be the heterogeneous sludge wastage imposed in the granular sludge process. Sludge was naturally wasted via loss of suspended solids after biomass detachment from granules. This means that it was difficult to set a given retention time for bacteria as in the conventional EBPR processes. Here the apparent mean SRT varied from 5 to 15 days based on the suspended mass balance. However, local SRTs in the

granules were probably higher. The biological P removal would be probably have been more stable if a regular wastage of granules had been performed. This assumption needs to be confirmed in future work.

3.4.2 PHB staining

Bacterial carbon storage was analysed using the PHB staining technique in both reactors. Fig III.8 a and III.8 b show granule sections, one from R1 and one from R2, obtained from samples collected at the beginning of the aerobic phase (PHB granules are stained blue/black whereas cytoplasmic membranes (cells) are stained pink/red).

PHB was distributed in a thin layer in the peripheral zone of the granules and in the internal part of the granules, close to internal voids and channels. Comparison of samples from the two reactors indicated that PHB in the granules from R2 was more present in the peripheral zone, including the filamentous bacterial outgrowth (Fig III.8 d). This confirms that high heterotrophic activity and carbon storage occurred at the surface whereas growth/storage in the center became difficult, probably because of diffusion limitation in the granules from R2.

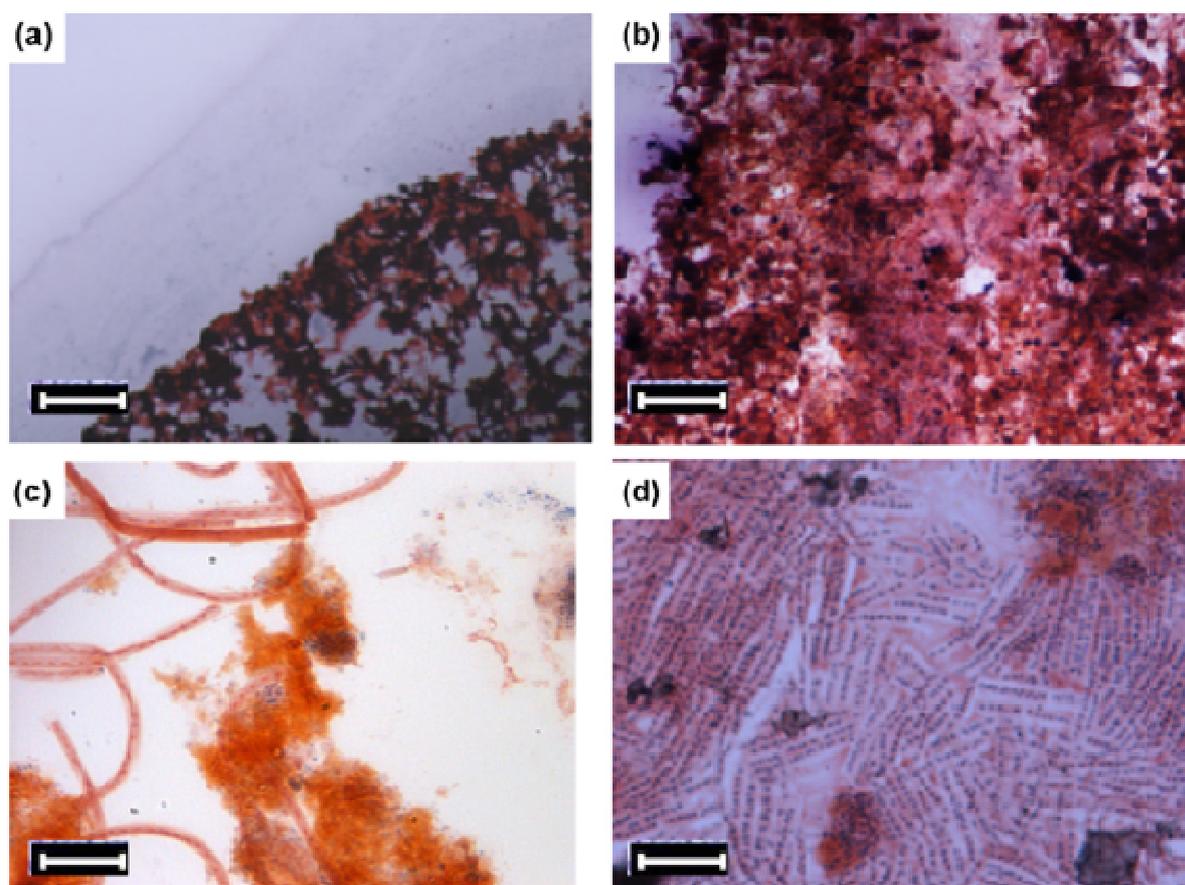


Figure III.8. Microscopic images of the stained 10 μ m-cut granules: (a) R1; (b) R2; (c) R1 filamentous bacteria; (d) R2 filamentous bacteria. The scale bar=100 μ m for (a) and (b) and 5 μ m for (c) and (d). PHB granules are stained in blue/black whereas cytoplasmic membrane (cells) are stained in pink/red

3.4.3 *Phosphate precipitation contribution*

The contribution of precipitation to overall P removal can be estimated from calcium behavior. Calcium is not implicated significantly in the biological formation of polyphosphate [33] but precipitates mainly in the form of calcium phosphate as demonstrated by Mañas et al. [29]. From thermodynamical analysis, amorphous calcium phosphate (ACP) and hydroxy-apatite (HAP) were the most probable minerals. X-ray diffraction patterns (not shown) were compared for granules from R1 and R2, and showed that the most significant mineral was HAP ($\text{Ca}_5(\text{OH})(\text{PO}_4)_3$) although, in the case of the R1 spectrum, it also indicated a small amount of whitlockite ($\text{Ca}_{18}\text{Mg}_2\text{H}_2(\text{PO}_4)_{14}$).

Precipitation was mainly controlled by pH in the bioreactors. Calcium concentration decreased in R1 during the anoxic phase when pH reached the highest values, close to 9, and calcium was progressively released during the aerobic period as pH decreased with nitrification (Fig III.6 a). The calcium profile in R2 (Fig III.6 b) remained stable during the anaerobic period with stable pH around 7.5 but decreased during the aerobic phase as a consequence of pH increasing to 8. The total Ca^{2+} removal was 40% in reactor 1 (see Fig III.2) whereas it progressively decreased to 20% in reactor R2 (more unstable). This tends to show that calcium phosphate precipitation was greater in the first reactor than in the second, which is consistent with the fact that mean pH was higher in the first reactor due to more intense denitrification. More details on the relation between pH, calcium concentration and phosphate precipitation in granules can be found in a recent article by Mañas et al. [34].

4 Discussion

In this study, significant differences were observed between GSBRs in terms of performances and stability. These differences can firstly be explained by the fact that anoxic/aerobic conditions encouraged pre-denitrification (R1) whereas anaerobic/aerobic conditions favoured biological phosphorus removal (R2). Secondly, another important consequence of working with a mixture of carbon sources and a relatively short anaerobic period in R2 was the fact that a fraction of the easily biodegradable organic carbon substrate was not removed anaerobically but was degraded in the aerobic period, which probably explains the growth of filamentous bacteria. Despite the fact that alternating anaerobic/aerobic conditions theoretically favour granulation by promoting carbon storage, filamentous bacteria that developed at the surface of granules had a negative impact on settleability and nitrification.

The stability of physical properties is a key issue for ensuring the long-term operation of a granular sludge reactor, and it is characterized by proper settleability which guarantees high biomass retention. In this study, very low sludge volume index (15 mL g^{-1}) and stable, high MLSS

concentration (up to 35 g L⁻¹) were obtained in the GSBP operated with alternating anoxic/aerobic conditions (R1). In contrast, filamentous growth at the surface of granules (and finally in the bulk) progressively deteriorated the properties and performance of granular sludge from reactor R2 operated with alternating anaerobic/aerobic phases (SVI = 70 ± 15 mL g⁻¹, MLVSS dropped to 10 g L⁻¹). Filamentous growth has previously been observed in aerobic granular sludge SBRs, resulting from a change in the wastewater composition, organic loading rate (OLR) or DO concentration [13, 15, 35-36]. It is generally accepted that filamentous growth is favored at low substrate or oxygen availability. For instance Mosquera-Corral et al [15] noted that aerobic granules lost their stability due to the outgrowth of filamentous bacteria when the DO was reduced to less than 40% of saturation. In the present study, despite similar aeration rates being imposed in both reactors, lower DO concentration was obtained at the beginning of the aerobic phase in R2 (anaerobic/aerobic) due to residual COD that was not removed during the non-aerated phase. This leads us to think that, here, filamentous growth was due to oxygen-limited growth of heterotrophic bacteria with an easily available carbon source (glucose, ethanol or residual acetate or propionate) at the beginning of the aerobic phase. The high COD: DO ratio maintained in the bulk at this period made it difficult for a dense biofilm to grow on the surface of the granules†.

Traditionally, physiological studies have revealed that most of the filamentous bacteria have strictly aerobic metabolisms, although a small number of morphotypes have been claimed to have fermentative metabolisms [37] giving them selection advantages in anaerobic/aerobic systems. A plug-flow regime reactor like the SBR exerts a selection pressure on floc-forming bacteria through the high gradients of substrate preserved [38] and the conversion of easily biodegradable substrate to internal polymers [17]. In this work with a carbon source composed of glucose, propionate, acetate and ethanol, only a fraction of COD was removed anaerobically and converted to PHB. As the anaerobic period was relatively short, anaerobic fermentation did not play an important role in the reactor studied. The consequence was that a fraction of COD was not stored by PAO and was still present in the aerobic phase. This was detrimental to granule properties due to filamentous growth. A reactor with a longer pre-anaerobic phase or a pre-fermentation phase would probably be beneficial to granular sludge formation. An alternative solution would be to increase the aeration rate as shown by Mosquera-Corral et al. [15] but this would induce higher energy consumption.

The presence of nitrate during the feast period seemed critical for the stability of the granules in the first reactor (R1). A first explanation is that COD was fully removed by denitrification, thus guaranteeing the absence of COD in the aerobic phase (unlike in R2). Moreover, as shown by Wan et

† Cette hypothèse est développée dans une discussion complémentaire présentée à la fin de la publication.

al. [18], the anoxic growth of heterotrophic bacteria in the inner layers could encourage aggregate densification. Both these situations are likely to enhance the strengthening of the granule structure and improve granule stability. In real wastewater, nitrate and nitrite are rarely present and cannot reasonably be injected continuously, except perhaps during start up to accelerate the formation of granules. This means that, for granular sludge stability, it is critical to maximize the amount of substrate used during the non-aerated (either anaerobic or anoxic) phase. For that reason, an adequate combination of anoxic, anaerobic and aerobic phases could be chosen, according to the ratio between COD, nitrogen and phosphorus in the influent [5].

The differences in terms of nutrient removal should also be pointed out. First, stable full nitrification was maintained in R1 and ammonium nitrifying bacteria (AOB) were found to be distributed evenly throughout the granule. In contrast, filamentous heterotrophic bacteria growing at the periphery of granules in R2 made nitrification difficult and unstable, and FISH analysis confirmed that nitrifying bacteria were located behind the layer of filaments. On the other hand, SND (during the aerobic phase) was observed less in R1 than in R2. This can be explained by the fact that less stored COD was available for denitrification during the aerobic period in a system working with a pre-anoxic phase (R1). Regarding phosphorus, biological P release was lower in R1 than in R2, which was logically explained by less VFA storage by PAO in anoxic conditions, but global P removal efficiency was similar and more stable in R1. This was because more calcium phosphate precipitated in R1, thanks to a higher pH due to denitrification. Although some authors have questioned the active role of calcium in EBPR [39-40], the role of calcium precipitation in granular sludge performance and properties still needs more investigation. In this study, based on the calcium mass balance and considering that most of the calcium was removed via precipitation, the contribution of precipitation was estimated as in Mañas et al. [34]. Depending on the pH, 60-70% of phosphorus removal was due to the precipitation mechanism in R1 whereas precipitation was responsible for 40-45% of P removal in R2. Hence the significant contribution of calcium phosphate precipitation should be considered when evaluating the fate of removed phosphorus in GSBP. Only part of phosphorus removed is extracted as polyphosphate in the biomass and most of it can be accumulated in the granules, mainly as calcium phosphate (depending on the pH, and the wastewater calcium and phosphate concentration). Consequently, a dedicated work would be necessary to find the optimal extraction strategy for granules, considering the effect of precipitation on granule strength and stability.

5 Conclusion

In this study, significant differences were observed between two GSBs working in anoxic/aerobic and anaerobic/aerobic conditions.

In the anoxic/aerobic reactor, very good settling properties for granular sludge ($SVI \approx 20 \text{ mL g}^{-1}$) and high MLSS concentration were stabilized. Full and stable nitrification was obtained. A pre-anoxic period resulted in the COD being used directly for denitrification, thus limiting biological phosphorous removal and SND but inducing more calcium-phosphate precipitation due to pH increase.

Filamentous bacteria were observed in the anaerobic/aerobic reactor and were detrimental to granular sludge properties and performances. A possible explanation is the presence of residual, easily biodegradable COD at the end of the anaerobic phase, which was then degraded aerobically. A critical point when using a mixture of organic carbon sources is thus to maximize the amount of substrate used during the non-aerated, either anaerobic or anoxic, phase.

Acknowledgments

The authors would like to acknowledge P. Boe, C. Caudan, S. Julien, E. Mengelle, M. Bounouba, and D. Delagnes for their helpful contribution to the execution of this work and C. Pouzet (T.R.I. imaging unit, FR3450, Castanet Tolosan) for her help with the confocal microscopy.

References

1. de Kreuk, M.K., N. Kishida, and M.C.M. van Loosdrecht, *Aerobic granular sludge - state of the art*. Water Science and Technology, 2007. 55(8-9): p. 75-81.
2. Morgenroth, E., et al., *Aerobic granular sludge in a sequencing batch reactor*. Water Research, 1997. 31(12): p. 3191-3194.
3. de Kreuk, M., J.J. Heijnen, and M.C.M. van Loosdrecht, *Simultaneous COD, nitrogen, and phosphate removal by aerobic granular sludge*. Biotechnology and Bioengineering, 2005. 90(6): p. 761-769.
4. Yilmaz, G., et al., *Simultaneous nitrification, denitrification, and phosphorus removal from nutrient-rich industrial wastewater using granular sludge*. Biotechnology and Bioengineering, 2008. 100(3): p. 529-541.
5. Coma, M., et al., *The role of nitrate and nitrite in a granular sludge process treating low-strength wastewater*. Chemical Engineering Journal, 2010. 164(1): p. 208-213.
6. Liu, Y.Q., et al., *Formation, physical characteristics and microbial community structure of aerobic granules in a pilot-scale sequencing batch reactor for real wastewater treatment*. Enzyme and Microbial Technology, 2010. 46(6): p. 520-525.

7. Nor-Anuar, A., et al., *Study on the Strength Characteristic of Aerobic Granular Sludge*. Water Science and Technology, 2011. in press.
8. Liu, Y. and J.H. Tay, *The essential role of hydrodynamic shear force in the formation of biofilm and granular sludge*. Water Research, 2002. 36(7): p. 1653-1665.
9. Liu, Y., S.F. Yang, and J.H. Tay, *Improved stability of aerobic granules by selecting slow-growing nitrifying bacteria*. Journal of Biotechnology, 2004. 108(2): p. 161-169.
10. McSwain, B.S., R.L. Irvine, and P.A. Wilderer, *Effect of intermittent feeding on aerobic granule structure*. Water Science and Technology, 2004. 49(11-12): p. 19-25.
11. Moy, B.Y.P., et al., *High organic loading influences the physical characteristics of aerobic sludge granules*. Letters in Applied Microbiology, 2002. 34(6): p. 407-412.
12. Qin, L., Y. Liu, and J.H. Tay, *Effect of settling time on aerobic granulation in sequencing batch reactor*. Biochemical Engineering Journal, 2004. 21(1): p. 47-52.
13. Tay, J.H., Q.S. Liu, and Y. Liu, *The effects of shear force on the formation, structure and metabolism of aerobic granules*. Applied Microbiology and Biotechnology, 2001. 57(1-2): p. 227-233.
14. Beun, J.J., et al., *Aerobic granulation in a sequencing batch reactor*. Water Research, 1999. 33(10): p. 2283-2290.
15. Mosquera-Corral, A., et al., *Effects of oxygen concentration on N-removal in an aerobic granular sludge reactor*. Water Research, 2005. 39(12): p. 2676-2686.
16. Tsuneda, S., et al., *Simultaneous nitrogen and phosphorus removal using denitrifying phosphate-accumulating organisms in a sequencing batch reactor*. Biochemical Engineering Journal, 2006. 27(3): p. 191-196.
17. vanLoosdrecht, M.C.M., M.A. Pot, and J.J. Heijnen, *Importance of bacterial storage polymers in bioprocesses*. Water Science and Technology, 1997. 35(1): p. 41-47.
18. Wan, J.F., Y. Bessière, and M. Spérandio, *Alternating anoxic feast/aerobic famine condition for improving granular sludge formation in sequencing batch airlift reactor at reduced aeration rate*. Water Research, 2009. 43(20): p. 5097-5108.
19. Zhang, H., et al., *Enhanced biological nutrient removal using MUCT-MBR system*. Bioresource Technology, 2009. 100(3): p. 1048-1054.
20. Janssen, P., K. Meinema, and H. Van der Roest, *Biological Phosphorus Removal : Manual for Design and Operation*. 2002, STOWA IWA Publisher : 186-196.
21. Mino, T., et al., *Modeling Glycogen-Storage and Denitrification Capability of Microorganisms in Enhanced Biological Phosphate Removal Processes*. Water Science and Technology, 1995. 31(2): p. 25-34.
22. AFNOR, *standard-methods . (1994) Recueil des normes française-Qualité de l'eau*.
23. Filali, A., Y. Bessiere, and M. Sperandio, *Effects of oxygen concentration on the nitrifying activity of an aerobic hybrid granular sludge reactor*. Water Sci Technol, 2012. 65(2): p. 289-95.
24. Amann, R., *In situ identification of micro-organisms by whole cell hybridization with rRNA-targeted acid probes*. In: *Molecular Microbial Ecology Manual*. Edited by A.D.L. Akkermans, J.D. van Elsas & F.J.

- de Bruijn*. pp. MMEM-3.3.6/1-MMEM-3.3.6/15. Molecular Microbial Ecology Manual, ed. J.D.v.E.F.J.d.B. Edited by A.D.L. Akkermans. Vol. pp. MMEM-3.3.6/1-MMEM-3.3.6/15. 1995.
25. Mobarry, B.K., et al., *Phylogenetic probes for analyzing abundance and spatial organization of nitrifying bacteria*. Applied and Environmental Microbiology, 1996. 62(6): p. 2156-2162.
 26. Wagner, M., et al., *In situ analysis of nitrifying bacteria in sewage treatment plants*. Water Science and Technology, 1996. 34(1-2): p. 237-244.
 27. Daims, H., et al., *Novel Nitrospira-like bacteria as dominant nitrite-oxidizers in biofilms from wastewater treatment plants: diversity and in situ physiology*. Water Science and Technology, 2000. 41(4-5): p. 85-90.
 28. Pandolfi, D., M.N. Pons, and M. da Motta, *Characterization of PHB storage in activated sludge extended filamentous bacteria by automated colour image analysis*. Biotechnology Letters, 2007. 29(8): p. 1263-1269.
 29. Mañas, A., B. Biscans, and M. Sperandio, *Biologically induced phosphorus precipitation in aerobic granular sludge process*. Water Research, 2011. 45(12): p. 3776-3786.
 30. Ivanov, V., et al., *Formation and structure of granulated microbial aggregates used in aerobic wastewater treatment*. Water Science and Technology, 2005. 52(7): p. 13-19.
 31. Zheng, Y.M., H.Q. Yu, and G.P. Sheng, *Physical and chemical characteristics of granular activated sludge from a sequencing batch airlift reactor*. Process Biochemistry, 2005. 40(2): p. 645-650.
 32. Park, J.K., et al., *A biological phosphorus removal potential test for wastewaters*. Water Environment Research, 2001. 73(3): p. 374-382.
 33. Jardin, N. and H.J. Popel, *Behavior of waste activated sludge from enhanced biological phosphorus removal during sludge treatment*. Water Environment Research, 1996. 68(6): p. 965-973.
 34. Mañas, A., et al., *Parameters influencing calcium phosphate precipitation in granular sludge sequencing batch reactor*. Chemical Engineering Science, 2012. 77(0): p. 165-175.
 35. Schwarzenbeck, N., R. Erley, and P.A. Wilderer, *Aerobic granular sludge in an SBR-system treating wastewater rich in particulate matter*. Water Science and Technology, 2004. 49(11-12): p. 41-46.
 36. Zheng, Y.M., et al., *Formation and instability of aerobic granules under high organic loading conditions*. Chemosphere, 2006. 63(10): p. 1791-1800.
 37. Nowak, G. and G.D. Brown, *Characteristics of Nostocoida-Limicola and Its Activity in Activated-Sludge Suspension*. Research Journal of the Water Pollution Control Federation, 1990. 62(2): p. 137-142.
 38. Martins, A.M.P., et al., *Filamentous bulking sludge - a critical review*. Water Research, 2004. 38(4): p. 793-817.
 39. Bonting, C.F.C., et al., *The Elemental Composition Dynamics of Large Polyphosphate Granules in Acinetobacter Strain 210A*. Archives of Microbiology, 1993. 159(5): p. 428-434.
 40. Schonborn, C., H.D. Bauer, and I. Roske, *Stability of enhanced biological phosphorus removal and composition of polyphosphate granules*. Water Research, 2001. 35(13): p. 3190-3196.

Discussion complémentaire du chapitre III

Nous avons observé dans cette étude que la stabilité physique des agrégats biologiques est un paramètre clé duquel dépend l'opération sur le long terme des procédés de granulation aérobie. Nous allons de fait, dans cette discussion complémentaire, préciser les effets de la disponibilité des accepteurs d'électrons (O_2 et $N-NO_3^-$) sur la stabilité et l'instabilité des agrégats biologiques.

Dans notre étude, bien que les taux d'aération imposés dans les deux réacteurs aient été similaires, la concentration de l'oxygène dissous en début de phase aérobie est sensiblement différente dans les deux réacteurs. Elle est de 5 mg L^{-1} et $2,5 \text{ mg L}^{-1}$ dans R1 et R2, respectivement. La faible concentration en oxygène dissous dans R2 s'explique par la présence d'une forte activité hétérotrophique liée à la présence d'une fraction de DCO non consommée durant la phase anaérobie. De fait, on peut penser que la croissance filamenteuse dans R2 est causée par la croissance de bactéries hétérotrophes sur des substrats facilement biodégradables en condition de limitation par l'oxygène comme c'est le cas en début de phase aérobie. En effet, le ratio DCO : OD (auquel correspond un coefficient γ_{S,O_2} de 34^*) en début de phase aérobie semble trop élevé pour favoriser la croissance de biofilm dense à la surface des granules (en comparaison le coefficient γ_{S,O_2} en début de phase aérobie dans le réacteur R1 n'est que de $2,8^*$).

Ainsi comme l'illustre la Figure III.9 présentant une simulation de développement de biofilms à différentes concentration de l'oxygène dissous (réalisée avec le modèle 2D de Delft University of Technology), les fortes concentrations (de l'ordre de 5 mg L^{-1}) favorisent le développement d'un biofilm dense et compacte tandis que de faibles concentrations ($OD = 2,5 \text{ mg L}^{-1}$) conduisent au développement d'un biofilm hétérogène avec une structure filamenteuse en surface.

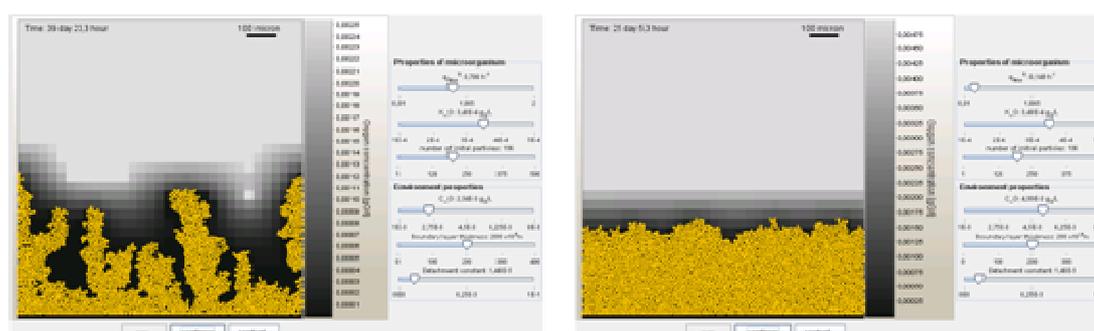


Figure III.9. Illustration des conséquences du coefficient γ_{S,O_2} (monospecies 2D biofilm model – TU Delft). Concentration de l'oxygène dissous de $2,5 \text{ mg L}^{-1}$ (gauche) et 5 mg L^{-1} (droite)

* Le coefficient γ_{S,O_2} a été calculé à partir de l'Equation I.15 présentée dans le chapitre étude bibliographique (§3.1.2). Les valeurs des coefficients de diffusion de l'oxygène et du substrat ainsi que le taux de conversion sur le substrat organique sont celles présentées dans le chapitre V (Tableau V.5).

La stabilité des agrégats et les performances du réacteur (R1) semblent fortement favorisées par la présence de nitrates durant la phase d'excès de substrat. En effet, l'application d'une phase anoxie permet d'éliminer toute la DCO via la dénitrification, garantissant son absence durant la phase aérobie. Comme l'ont montré les travaux de Li *et al.* (2008), en conditions de carence en substrat carboné, la demande en oxygène étant plus faible, ce dernier peut alors diffuser plus profondément dans les granules aérobies. Par conséquent dans ces conditions la croissance des bactéries nitrifiantes est favorisée du fait de la faible compétition pour l'oxygène.

D'autre part comme l'a montré l'étude de Wan *et al.* (2009) la croissance anoxie au cœur des agrégats (favorisée par l'apport de nitrates) est susceptible de favoriser la croissance des bactéries nitrifiantes dans les couches superficielles ou à proximité de zones riches en oxygène. En effet, la répartition des bactéries nitrifiantes (AOB) au sein des granules de R1 obtenues avec la technique FISH montre que ces dernières sont distribuées de manière homogène sur l'ensemble du granule. Cette distribution contraste avec celle rapportée par Tay *et al.* (2002) et Lemaire *et al.* (2008) dans les granules aérobies où le développement des nitrifiants n'est observé que sur une fraction du granule indiquant une forte compétition microbienne pour l'oxygène.

De plus, il est à noter que les agrégats de R1 contiennent une fraction de biomasse floculée, qui, à priori, oppose moins de résistance au transfert de l'oxygène que les granules aérobies. Cependant, si la présence d'une phase anoxie favorise la nitrification, elle défavorise en contrepartie la SND. Ceci peut s'expliquer par le fait que la concentration en oxygène dans les granules n'est pas assez faible et par le fait que la fraction de DCO stockée durant la phase anoxie n'était pas suffisante pour permettre la dénitrification durant la phase aérée.

Conclusion du chapitre III

Les conclusions majeures de ce chapitre dont l'objectif était de comparer deux bioréacteurs séquencés à boue granulaire (GSBR) fonctionnant en alternance de phase anoxie/aérobie (R1) et anaérobie/aérobie (R2) sont :

- De très bonnes propriétés de décantation de la boue hybride ($IB < 20 \text{ mL g}^{-1}$) et des concentrations élevées en MES (jusqu'à 35 g L^{-1}) ont été stabilisées dans le réacteur fonctionnant en alternance de conditions anoxie/aérobie (R1). A contrario, les propriétés physiques des granules développés dans le réacteur fonctionnant en alternance de conditions anaérobie/aérobie (R2), n'ont cessé de se détériorer tout au long de l'étude. Cela s'est traduit par une forte augmentation de l'indice de boue ($IB > 70 \text{ mL g}^{-1}$) et une nette diminution de la concentration en MVS (jusqu'à 10 g L^{-1}).

- L'application d'une phase anoxie (R1) permet de consommer la quasi-totalité du substrat carboné et limite de fait la compétition microbienne pour l'oxygène. Il en résulte une nitrification totale et stable de l'ammonium sur toute la durée de l'étude. Cependant, il apparaît que la présence d'une phase anoxie limite en contrepartie la SND du fait de la faible fraction de DCO stockée durant la phase d'excès de substrat.

- Même si l'alternance de conditions anaérobie/aérobie favorise théoriquement la granulation aérobie par le stockage interne du carbone, le développement de bactéries filamenteuses dans R2 a très sévèrement détérioré les propriétés physiques des agrégats et a fortement déstabilisé la nitrification. Ceci s'explique par la présence d'une fraction de la DCO (non stockée) durant la phase aérobie induisant l'apparition d'une forte compétition microbienne pour l'oxygène.

- Des rendements comparables de l'élimination du phosphore ont été obtenus dans les deux réacteurs. La déphosphatation biologique est plus importante en condition anaérobie/aérobie ; tandis que la précipitation de (Ca-P) est plus importante en condition anoxie/aérobie.

Ainsi, les performances les plus stables ont été obtenues dans le réacteur R1 qui a été opéré au total durant plus de 900 jours. Dans ce réacteur le développement d'une boue hybride a été constaté et on peut s'interroger sur le rôle de la présence simultanée des floes et de granules sur la fiabilisation du procédé. Le chapitre suivant va donc se focaliser sur ce caractère hybride et sur les conséquences en termes de performances et sur les vitesses de transformation de l'azote.

CHAPITRE IV : Résultats

**Etude de la nitrification dans une boue granulaire
hybride : localisation des espèces et limitation par
l'oxygène**

1 Introduction

Dans le chapitre précédent, nous avons comparé deux réacteurs à boues granulaires et analysé l'effet des alternances anoxie/aérobie et anaérobie/aérobie sur les propriétés des granules et les performances du GSBR. Le réacteur R1 (fonctionnant en alternance de phase anoxie/aérobie) présentait une bonne stabilité physique des granules et les performances épuratoires les plus stables, et en particulier celle de la nitrification. Ce réacteur présentait une certaine proportion de floccs et de granules coexistant et formant une boue dite « hybride ». De fait, nous allons dans cette partie analyser l'effet de la présence des floccs dans la boue granulaire et en particulier sur la nitrification. Nous nous intéresserons au réacteur R1 qui a été opéré sur plus de 900 jours avec différents rapports volumiques floccs / granules.

La présence de bactéries en suspension dans les boues granulaires a été assez peu étudiée dans la littérature. Elle est pourtant difficile à éviter au niveau industriel, en particulier si les effluents contiennent des matières en suspension (Yilmaz *et al.* 2008; Coma *et al.* 2010). La compétition de la croissance entre bactéries en suspension et bactéries d'un biofilm a été étudiée pour les espèces hétérotrophes (Caylet, 2010) et aussi pour les bactéries nitrifiantes dans des lits mobiles (Ochoa *et al.*, 2002) et dans les réacteurs hybrides à filtration membranaire (Artiga *et al.* 2005). Les résultats relatifs à ces études indiquent que dans ces systèmes hybrides la croissance des bactéries hétérotrophes peut avoir lieu majoritairement dans les floccs tandis que celle des espèces nitrifiantes (AOB) se fait dans les biofilms. Dans un système ainsi distribué, la fraction de bactéries hétérotrophes développée dans les floccs consomme une partie majeure du substrat soluble ce qui permet de diminuer la compétition microbienne pour l'oxygène au sein des biofilms et de favoriser le maintien de la nitrification. Il apparaît aussi clairement que la nature des communautés microbiennes présentes dans les floccs dépend du temps de séjour imposé à la biomasse en suspension (Caylet, 2010).

La structure dense des granules (ou biofilms) aérobies, qui génère naturellement des limitations au transfert de masse de l'oxygène peut, être critique pour la nitrification, et ce, en fonction de la répartition spatiale des espèces nitrifiantes dans l'agrégat. Du fait de la forte compétition microbienne, le développement des bactéries nitrifiantes a généralement été observé sur une fraction limitée du granule (Tay *et al.* 2002). Les travaux de Lemaire *et al.* (2008) rapportent une distribution particulièrement stratifiée, où les nitrifiants se développent derrière une épaisseur de bactéries hétérotrophes. Dans ces conditions la disponibilité de l'oxygène pour la nitrification peut être fortement réduite, en fonction de la concentration en oxygène dissous dans la phase liquide et de l'activité des bactéries hétérotrophes donc de la concentration ou du flux de substrat carboné.

Mosquera-Corral *et al.* (2005) ont étudié l'effet de la diminution de la concentration en oxygène dissous sur les performances d'un procédé de granulation aérobie. Les résultats relatifs aux réductions temporaires de concentration (avec des concentrations à saturation allant de 10 à 100%) révèlent une augmentation du rendement d'élimination de l'azote total du fait de l'augmentation de la dénitrification. Conjointement, les auteurs observent une diminution de la vitesse d'élimination de l'ammonium d'environ 45% et 12% pour les concentrations à saturation de l'oxygène dissous de 10% et 20%, respectivement. Une étude similaire a été réalisée par Yuan et Gao en 2010 avec des concentrations en oxygène dissous allant de 4,5 à 1 mg L⁻¹. Leurs résultats soulignent qu'il existe une concentration d'oxygène dissous optimum (2,5 mg L⁻¹), qui permet de garantir à la fois de bonnes performances de dénitrification et une vitesse de nitrification relativement élevée. L'étude de l'effet de l'oxygène dissous sur les performances d'élimination de l'azote ainsi que sur la compétition entre les bactéries autotrophes et hétérotrophes pour l'oxygène a été réalisée par simulation numérique (de Kreuk *et al.* 2007). Le développement d'une biomasse granulaire à différentes concentrations de l'oxygène dissous a été simulé (2, 4 et 10 mg L⁻¹). Les résultats obtenus indiquent que la diminution de la concentration de l'oxygène dissous permet d'augmenter le rendement d'élimination de l'azote total (du fait de l'augmentation de la dénitrification). Cependant, à faible concentration la nitrification est très sévèrement diminuée. Par ailleurs, cette étude indique que l'opération du réacteur à forte concentration en oxygène dissous (10 mg L⁻¹), permet à ce dernier de diffuser plus en profondeur dans le granule, limitant ainsi la compétition microbienne pour l'oxygène. La distribution des nitrifiants dans les granules est alors plus étendue.

Ainsi, il apparaît que la formation d'une boue granulaire pure est délicate particulièrement lors du traitement d'effluents réels comprenant des matières en suspension. Parallèlement la stabilité des agrégats formés et les performances épuratoires des procédés vont par la suite dépendre des dynamiques de croissance des bactéries hétérotrophes et autotrophes au sein des agrégats, lesquelles sont gouvernées par les conditions opératoires des procédés (rapport DCO/N, concentration de l'oxygène dissous, charges organiques volumiques...) et par la structure physique des agrégats (taille, densité...). De fait, on peut envisager que la croissance simultanée d'une biomasse floculée et d'une biomasse densifiée présentant une structure physique et un niveau de résistance au transfert de l'oxygène différents, pourrait constituer un atout dans l'augmentation de la robustesse de l'élimination de l'azote au long terme, mais aussi à court terme lors d'augmentations ponctuelles de la charge organique ou de diminutions de la concentration en oxygène dissous.

Le but de ce chapitre est d'évaluer les avantages ou les inconvénients de la coexistence de floes et de granules sur l'élimination de l'azote dans un réacteur à boue granulaire hybride. Pour cela, nous avons caractérisé et quantifié la contribution des floes et des granules dans l'activité de nitrification de la boue hybride. Les limitations au transfert d'oxygène de chaque type d'agrégat ont

été étudiées par respirométrie à différentes concentrations en oxygène dissous. De plus, la caractérisation de la répartition spatiale des AOB et NOB au sein des granules a été réalisée au moyen de l'hybridation in situ FISH.

2 Matériel et méthodes

2.1 Réacteurs GSBRs et conditions opératoires

La boue granulaire hybride a été cultivée dans un réacteur à alimentation séquentielle de type air lift (R1) d'un volume utile de 17 L sur une durée de plus de 900 jours. L'alimentation est constituée d'un effluent synthétique caractérisé par un rapport DCO : N-NH₄ de 20 et l'ajout de nitrate de sodium qui permet d'assurer des conditions strictement anoxies en absence d'oxygène (détails de la composition de l'effluent dans le chapitre matériel et méthodes). Le réacteur opère selon un mode séquentiel avec une durée de cycle de 4h incluant 15 min d'alimentation, 20 min de réaction anoxie (avec injection d'azote), 2h25 de réaction aérobie (avec injection d'air), 30 min de décantation et 30 min de purge (avec une fraction volumique d'échange de 47%). Les conditions opératoires ont été maintenues constantes durant toute la durée de l'étude, seule la vitesse superficielle de gaz a été modifiée durant la seconde phase de 0,56 à 1,1 cm s⁻¹ de façon à maintenir une recirculation de la biomasse malgré l'augmentation significative de la concentration (Voir Figure IV.1).

2.2 Nitrification

2.2.1 *Mesure de l'activité par respirométrie ouverte*

La respirométrie a été employée pour répondre à deux objectifs : (1) caractériser la répartition de l'activité de nitrification et nitratisation au sein des floes et des granules et (2) mesurer l'effet de la concentration en oxygène dissous sur l'activité de nitrification de chacun des agrégats biologiques.

2.2.1.1 *Description de l'installation*

Une cellule en verre d'un volume utile de 2 L munie d'une sonde oxygène et pH a été employée pour la mesure de la vitesse de consommation biologique (schéma de l'installation dans le chapitre matériel et méthodes). La concentration en oxygène dissous dans la cellule a été imposée par une régulation de l'électrovanne d'aération. Lorsque la concentration en oxygène dissous atteint la valeur haute de la consigne ($OD_{\text{consigne}} + 0,5 \text{ mgO}_2 \text{ L}^{-1}$) l'aération est arrêtée et la vitesse de consommation de l'oxygène dissous apparente (r_{O_2}) est déduite de la pente de diminution de l'oxygène au cours du temps. La cellule est automatiquement réaérée lorsque la concentration en oxygène atteint la valeur

basse de la consigne ($OD_{\text{consigne}} - 0,5 \text{ mgO}_2 \text{ L}^{-1}$). La température est fixée à $21 \pm 0,2^\circ\text{C}$ au moyen d'un cryostat et d'une double enveloppe. La contribution du transfert d'oxygène par la surface libre a été quantifiée pour chaque consigne d'oxygène dissous via la détermination du coefficient de transfert surfacique de l'oxygène $K_{La_{\text{surface}}}$. La valeur du rO_2 a par la suite été corrigée selon l'Equation IV.1:

$$rO_2 = rO_{2, \text{app}} + K_{La_{\text{surface}}}(C^* - C) \quad \text{Équation IV.1}$$

Où : C^* est la concentration en oxygène à la saturation ($\text{mgO}_2 \text{ L}^{-1}$), C est la concentration en oxygène ($\text{mgO}_2 \text{ L}^{-1}$).

2.2.1.2 Protocole opératoire

a) Echantillonnage

Pour chaque test, un volume de 4 L de boue hybride a été prélevé à la fin de la phase aérobie d'un cycle du réacteur. 2 L sont utilisés pour caractériser l'activité de la biomasse hybride. Pour les 2 L restants floccs et granules ont été séparés par un tamisage et dilués dans le surnageant de sortie du réacteur (préalablement filtré à $0,2 \mu\text{m}$) afin de former pour chaque type d'agrégat 2 L de biomasse. Les échantillons ont été par la suite maintenus en condition endogène pendant 1 à 2 h afin d'épuiser le substrat exogène. Ainsi, avant la première injection il n'y a plus d'ammonium dans le surnageant et seule une concentration résiduelle de DCO persiste ($< 30 \text{ mg L}^{-1}$).

b) Mesure de l'activité de nitrification et nitratisation

L'activité de nitrification des floccs, granules et de la boue hybride a été quantifiée à différentes concentrations en oxygène dissous (OD) allant de 2 à $5 \text{ mgO}_2 \text{ L}^{-1}$. La durée de chaque palier est au minimum d'une heure. Des ajouts réguliers de solutions concentrées en NH_4Cl ($6 \text{ g}_{\text{N-NH}_4} \text{ L}^{-1}$) et NaHCO_3 (19 g L^{-1}) sont réalisés durant l'expérience afin d'assurer des conditions de non limitation par le substrat. Au cours de chaque palier de concentration en oxygène dissous un échantillonnage régulier est effectué afin de mesurer les concentrations en ammonium, nitrite et nitrate et en déduire les vitesses d'oxydation de l'ammonium (AUR) et d'accumulation des NO_x (NO_xAR).

c) Analytique

Les échantillons prélevés au cours des différents tests de respirométrie ont été analysés selon les méthodes normalisées AFNOR (1994). La mesure de la concentration en ammonium a été réalisée avec la méthode de micro-NESSLER (NFT 90-015). La concentration des nitrites, nitrates a été mesurée par chromatographie en phase liquide (IC25, 2003, DIONEX, USA) selon la norme (NFT 90-042). La concentration de la DCO soluble a été mesurée selon la norme (NFT 90.101). La concentration des matières en suspension et volatiles en suspension ont été mesurées selon la norme (NFT 90.105). La mesure de la taille des agrégats biologiques est déterminée avec un granulomètre

Mastersizer 2000 (MALVERN Instrument SA) et par traitement d'image fait avec le logiciel Visilog 6.5 dès lors que la taille des objets observés dépassait la gamme de mesure du granulomètre laser (2000 μm).

2.2.2 Localisation spatiale par l'hybridation *in situ* FISH

Les échantillons de flocs et de granules sont fixés dans une solution à 4% de paraformaldehyde et à une température de 4°C pendant 2h et 12h, respectivement. Des coupes d'une épaisseur de 40 μm de granules préalablement immergés dans un gel Tissue-Tek OCT (Sakura Finetek, USA) pendant 24h sont réalisées au moyen d'un cryomicrotome (Leica CM3050 S, Germany) à -21°C. L'hybridation *in situ* FISH est réalisée selon le protocole standard décrit par Amann, (1995). Les sondes oligonucléotidiques utilisées sont les suivantes : Nso 190 et Nso 1225 pour les AOB (Mobbary *et al.* 1996), Nit3 pour *Nitrobacter* spp. (Wagner *et al.* 1996) and Ntspa662 pour *Nitrospira* spp. (Daims *et al.* 2000). Une solution de montage contenant du DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole, dihydrochloride) a été employée pour le marquage de l'ensemble de l'ADN des échantillons. Les échantillons marqués sont observés au microscope confocal à balayage laser (LEICA AOBSP2). La Fluorescéine isothiocyanate (FITC), la cyanine (Cy3) et le DAPI sont excités avec un laser argon (488nm), un laser Hélium-Néon (516 nm) et une diode laser (405 nm) et collectés à 498–550 nm, 571–630 nm et 415-450 nm, respectivement. La prise d'images de sections de granule a été réalisée avec un objectif en immersion à l'huile X16. La reconstitution du granule a été réalisée sur un logiciel libre d'édition de graphismes vectoriels (Inkscape). La prise d'image de colonies de bactéries a nécessité l'utilisation d'un objectif en immersion à l'huile X100.

3 Résultats et discussion

3.1 Caractérisation de l'évolution de la nitrification et dénitrification en fonction des caractéristiques de la biomasse hybride

L'opération du réacteur avec une faible sélection (30 min de décantation) a conduit à la formation d'une boue hybride comprenant biomasses floculées et granulaires. Au cours de l'étude, nous avons assisté à une augmentation de la proportion et de la taille des granules. La Figure IV.1 présente l'évolution de la concentration en MES sur l'ensemble de la durée de l'étude. Les Figures IV.2 et IV.3 présentent respectivement la distribution de la taille des particules en volume et les photographies des granules développés au cours des trois phases de fonctionnement du réacteur.

Afin de respecter l'échelle de temps proposée dans la première partie de résultats (chapitre III), les résultats sont présentés avec une double échelle de temps. La première échelle débute avec

l'ensemencement du réacteur fonctionnant en conditions anaérobie/aérobie (R2). La seconde échelle correspond à la totalité de la durée de l'opération du réacteur R1.

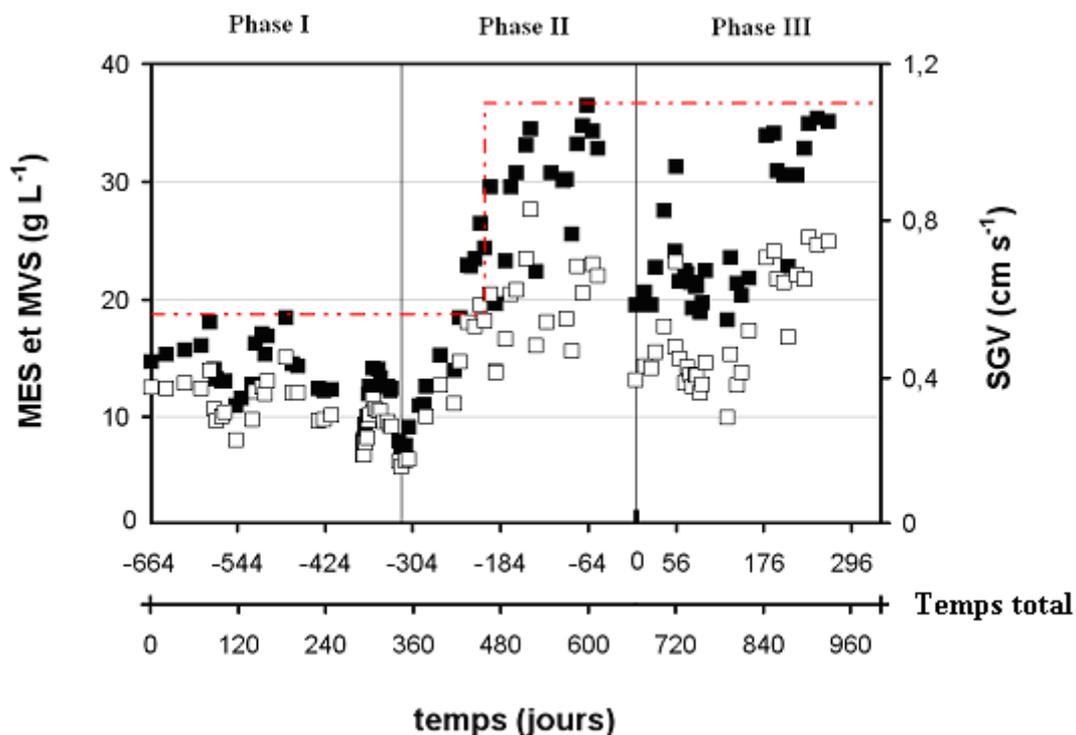


Figure IV.1. Evolution de la concentration des matières en suspension (■), matières volatiles en suspension (□) et de la vitesse superficielle de gaz (---) au cours de l'étude

Durant la première phase (I), la biomasse était composée majoritairement de floccs dont la contribution en masse (MES) dans la boue hybride était d'environ 70%. La distribution granulométrique des particules en volume est monomodale centrée respectivement autour d'un diamètre de 115 μm et 200 μm après 100 jours et 330 jours de fonctionnement (Fig IV.2). Ici, la transition entre les deux types de biomasses granulaire et floculée n'est pas marquée mais la distribution très étendue traduit une forte hétérogénéité. L'analyse d'image de granules séparés des floccs par tamisage indique que le diamètre moyen des granules développés lors de cette première phase est passé de 280 μm en début d'étude à 550 μm (Fig IV.2, Fig IV.3 a). La diminution de la concentration en biomasse à la fin de la première phase (à partir du jour 311) est attribuée à de fortes variations de la température (de l'ordre 6°C) au cours des cycles du réacteur dues à un dysfonctionnement du système de préchauffage de l'alimentation. Ce dysfonctionnement a eu pour conséquence la déstabilisation du réacteur avec la perte de la moitié de la concentration en biomasse et la diminution de la vitesse de nitrification. Néanmoins le rendement moyen de l'élimination de l'ammonium sur cette période était de 100% indiquant que la totalité de l'ammonium était éliminée au cours du cycle du GSBP.

Lors de la phase II, la proportion ainsi que la taille des granules ont fortement augmentées. En effet, la distribution granulométrique des particules en volume initialement monomodale est à présent bimodale indiquant que la biomasse est alors composée de deux types bien distincts d'agrégats biologiques. Le diamètre médian des floccs et des granules est respectivement de 98 μm et 680 μm après 430 jours de fonctionnement. A la fin de cette seconde phase (après 620 jours de fonctionnement), le diamètre des granules a augmenté atteignant une valeur moyenne de 1,0 mm (Fig IV.3 b). La proportion en masse des granules a également augmentée, celle-ci est passée 50 à 70%. Du fait de l'augmentation de la concentration en masse de la boue hybride la vitesse superficielle des gaz a du être augmentée ($\text{SGV} = 1,1 \text{ cm s}^{-1}$) afin d'assurer le maintien de la circulation de la biomasse dans le réacteur (jour 451 /-213). En fin de la phase II, 9L de boue hybride ont été prélevés du réacteur afin d'ensemencer un second (R2). C'est pourquoi la concentration de la biomasse qui était en fin de seconde phase d'environ 20 g L^{-1} passe à 11 g L^{-1} au début de la troisième phase.

Lors de cette dernière phase (phase III), la biomasse hybride était composée majoritairement de granules dont la proportion en masse s'est stabilisée autour de 90%. Le diamètre moyen des granules a augmenté en fin de phase atteignant une valeur moyenne de 3,3 mm (après 900 jours de fonctionnement). Notons que lors de cette dernière phase, le diamètre des granules a été déterminé par analyse d'images réalisée uniquement sur les échantillons de granules (lesquels ont été séparés des floccs par tamisage), c'est pourquoi la distribution granulométrique des floccs en volume n'est pas visible sur la Figure IV.2 (jour 900).

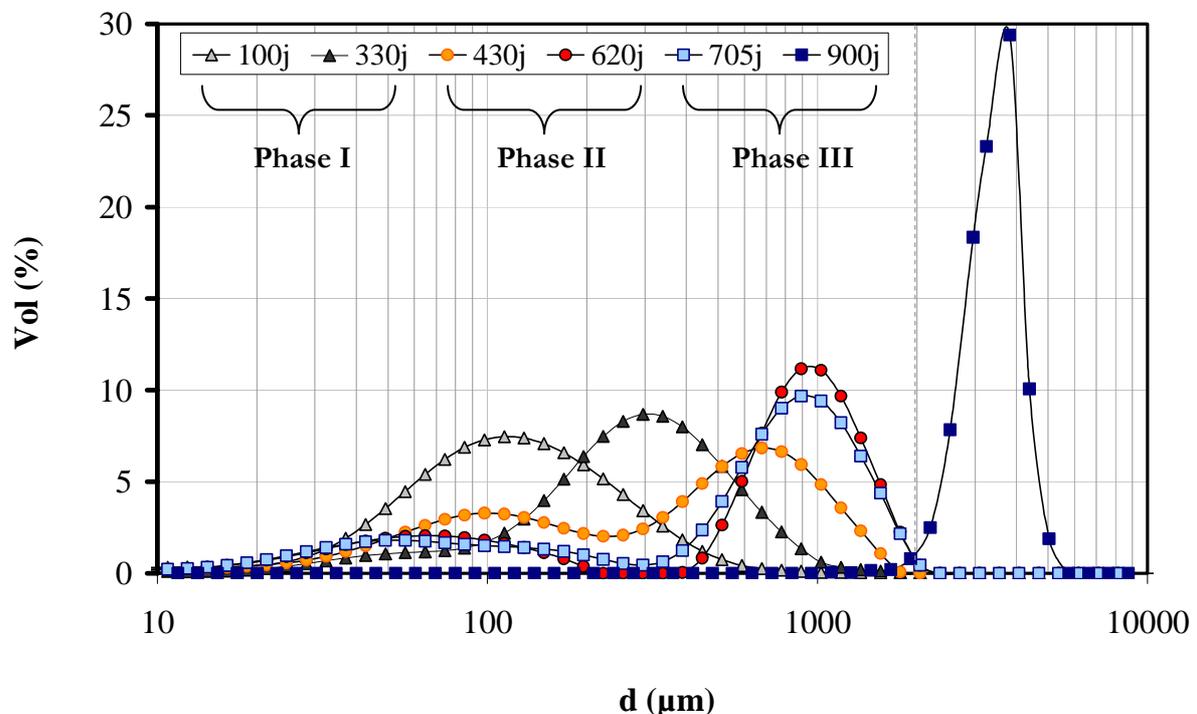


Figure IV.2. Distribution de la taille des agrégats en volume au cours des trois phases

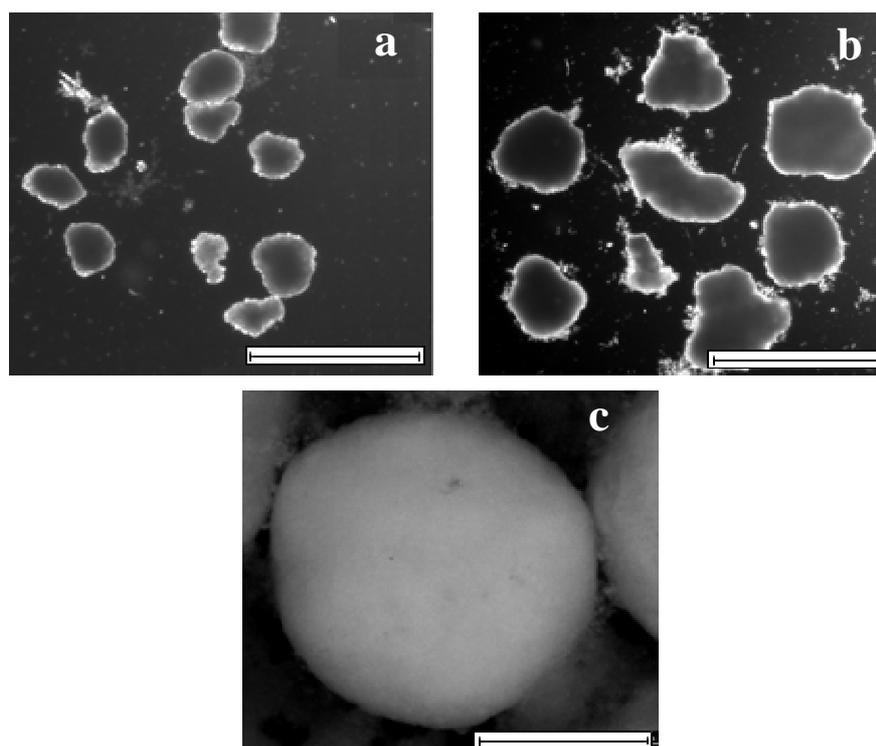


Figure IV.3. Evolution de la taille des granules au cours de l'étude. Phase I (a), phase II (b) et phase III (c)
Echelle = 2 mm

Les rendements moyens d'élimination de la DCO, de l'azote total, de l'ammonium ainsi que les vitesses de consommation de l'ammonium et des nitrates (AUR et NO₃UR) sur la période étudiée sont présentés dans le Tableau IV.1.

Tableau IV.1. Performances du réacteur au cours de l'étude

	Phase I	Phase II	Phase III
Diamètre moyen des granules (μm)	280 - 550	680 - 1030	1030 - 3340
Proportion des granules en MES (%)	30	50 - 70	90
Rendement DCO (%)	96	95	97
Rendement NT (%)	92	95	89
Rendement NH ₄ (%)	100	100	99
AUR (mg _N L ⁻¹ h ⁻¹)	13,8	10,2	7,8
NO ₃ UR (mg _N L ⁻¹ h ⁻¹)	186	290	316

Les rendements moyens d'élimination de la DCO, NT et NH₄ ont été calculés à partir d'analyses hebdomadaires réalisées sur le réacteur. Les vitesses de consommation de l'ammonium AUR (durant la phase aérobie) et des nitrates NO₃UR (durant la phase anoxie) ont été calculées à partir de cinétiques réalisées à différentes périodes de fonctionnement du réacteur.

Si les rendements moyens d'élimination de la DCO, de l'ammonium et de l'azote total ont relativement peu évolué au cours de l'étude, les vitesses de consommation de l'ammonium (en phase

aérobie) et de nitrates (en phase anoxie) ont quant à elles fortement variées en fonction des propriétés de la boue hybride. La vitesse moyenne de consommation de l'ammonium AUR initialement à $13,8 \text{ mg}_{\text{N-NH}_4} \text{ L}^{-1}$ (durant la phase I) a diminué de près de 30% et 45% durant les phases II et III respectivement, et ce malgré l'augmentation de la vitesse superficielle d'air (la concentration en OD lors du palier de nitrification était de $3 \text{ mg}_{\text{O}_2} \text{ L}^{-1}$ et $5 \text{ mg}_{\text{O}_2} \text{ L}^{-1}$ lors des phases I et III, respectivement). Inversement, la vitesse d'élimination des nitrates (NO_3UR) initialement à $186 \text{ mg}_{\text{N-NO}_3} \text{ L}^{-1}$ a augmentée de près de 56% et 70% durant les phases II et III, respectivement.

Ces résultats indiquent que l'augmentation de la taille et de la proportion de granules influence les vitesses de ces réactions biologiques. Ceci peut s'expliquer par la contribution simultanée de deux mécanismes : (1) la diminution de la surface spécifique (due à l'augmentation du diamètre des granules et à la diminution de la proportion de floes) et de fait l'augmentation des limitations au transfert de l'oxygène et (2) l'augmentation de la concentration en biomasse hétérotrophe dans les granules en particulier et dans le réacteur en général (du fait d'une diminution de la proportion de floes).

La surface spécifique est définie comme étant l'aire superficielle par gramme de solide, exprimée en $\text{m}^2 \text{ g}^{-1}$. Elle dépend de la taille des solides, des irrégularités de surface (rugosité) mais aussi de la porosité interne des solides. De cette définition il en ressort que la surface spécifique augmente pour des petites particules avec une structure poreuse (telles que les floes) et diminue pour les structure denses (telles que les granules) qui offrent une plus faible surface développée. Le transfert de l'oxygène au sein des agrégats dépend évidemment du gradient de concentration entre la phase liquide et l'intérieur des agrégats mais il dépend aussi des propriétés physiques des agrégats via notamment leur surface spécifique. De fait, la nitrification qui est un processus aérobie dont la vitesse est limitée par la concentration en oxygène, bénéficie logiquement de l'augmentation des surfaces d'échanges (présence de floes et de granules petits). Parallèlement, de par les bonnes propriétés de décantation des granules ($\text{IB} = 15 \text{ mL g}^{-1}$), l'augmentation de la proportion de granules permet de stabiliser des concentrations plus élevées en biomasse (jusqu'à 35 g L^{-1} durant la phase II et III contre seulement 18 g L^{-1} durant la phase I). Au vu des concentrations non limitantes en DCO et nitrates la dénitrification, qui rappelons-le a lieu principalement durant la phase anoxie, profite naturellement de l'augmentation de la concentration en biomasse hétérotrophe dans le réacteur.

3.2 Effet de l'oxygène dissous sur l'activité de nitrification

L'activité de nitrification des floes, granules et de la boue hybride a été caractérisée au début de la troisième période (jour 714/50) de fonctionnement du réacteur. Elle a été évaluée à travers la vitesse de consommation de l'oxygène r_{O_2} , la vitesse de consommation de l'ammonium AUR ainsi

que la vitesse d'accumulation des nitrites et nitrates NO_xAR . La Figure IV.4 présente l'évolution du $r\text{O}_2$ ainsi que celle des concentrations en formes azotées solubles pour les différents agrégats, seuls (flocs, granules) ou en mélange (boue hybride), en fonction de la concentration en oxygène dissous.

Puisque les tests de respirométrie ont été conduits après une heure de mise en endogène et sans ajout de DCO, la dénitrification peut être considérée comme négligeable et la vitesse d'accumulation des NO_x constitue dans ce cas une bonne estimation de l'activité de nitrification. Dans le cas de la boue granulaire et hybride (a et c), l'azote total est stable pour les faibles concentrations en oxygène (2 et 3 $\text{mgO}_2 \text{L}^{-1}$) confirmant ainsi cette hypothèse. Néanmoins, nous observons une diminution de l'azote total pour les fortes concentrations en oxygène dissous (4 et 5 $\text{mgO}_2 \text{L}^{-1}$), qui peut être attribuée à l'augmentation du stripping de l'ammoniac due à des concentrations en azote ammoniacal élevées et à l'augmentation du débit d'air (de 40 à 100 L h^{-1}).

La Figure IV.5 présente l'évolution de l'activité de nitrification pour les différents agrégats en fonction de la concentration en oxygène dissous.

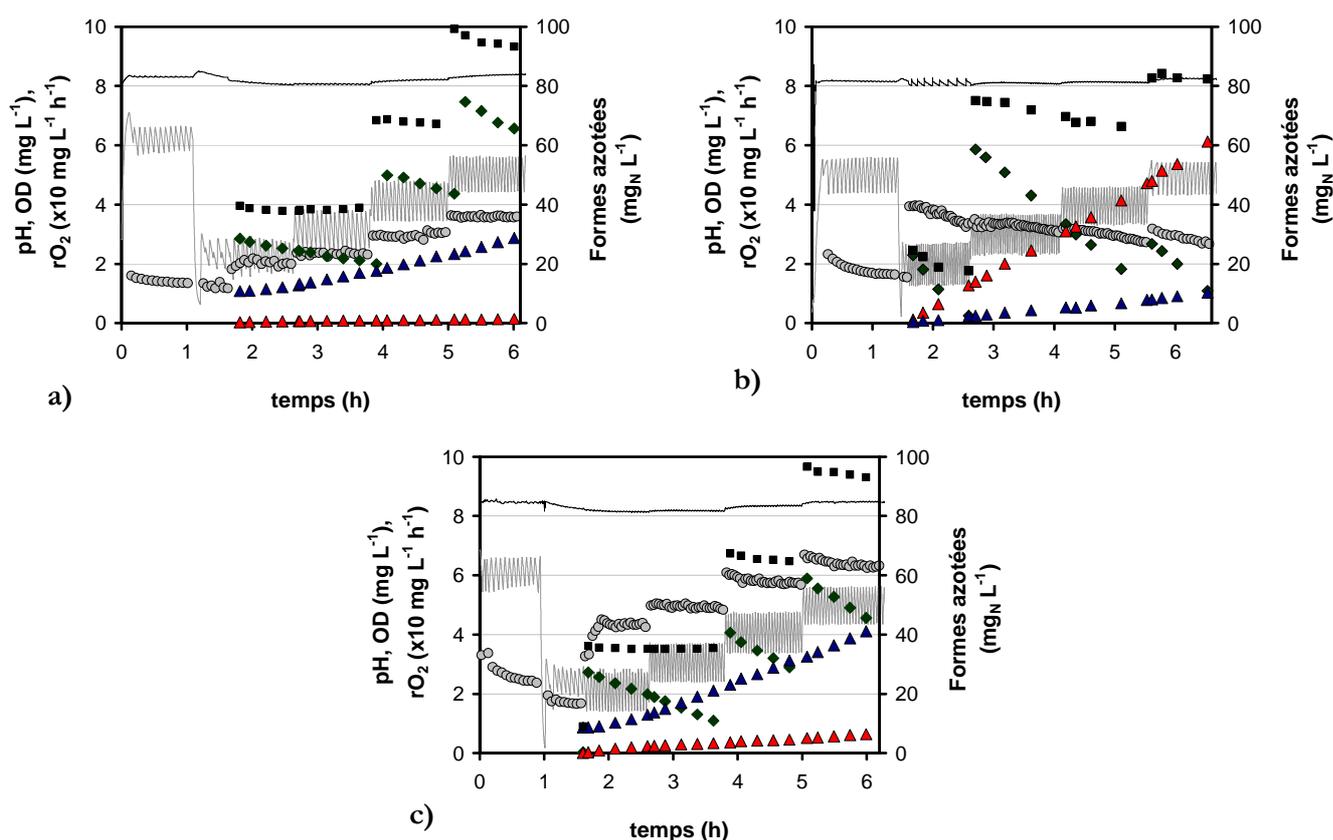


Figure IV.4. Cinétiques respirométriques pour les granules (a), les flocs (b) et la boue hybride (c). $r\text{O}_2$ (○), OD (—), pH (—), TN (■), N- NO_3 (▲), N- NO_2 (▲), N- NH_4 (◆)

La Figure IV.5 a) et c) montre que dans le cas de la boue granulaire et hybride, l'AUR et le $r\text{O}_2$ augmentent avec la concentration en oxygène dissous. Cette tendance est confirmée par le NO_xAR , qui passe de 6,9 $\text{mg}_\text{N} \text{ L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ à 10,7 $\text{mg}_\text{N} \text{ L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ et de 2,3 $\text{mg}_\text{N} \text{ L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ à 5,3 $\text{mg}_\text{N} \text{ L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ pour la boue

hybride et granulaire, respectivement. En revanche, dans le cas des floccs (b), l'activité de nitrification ne semble pas être corrélée à la concentration en oxygène dissous. Le profil de l'AUR et de NO_xAR est quasi constant alors que celui du rO₂ semble légèrement décroître pour les concentrations en oxygène de 3 et 4 mgO₂ L⁻¹ puis augmenter à forte concentration (5 mgO₂ L⁻¹).

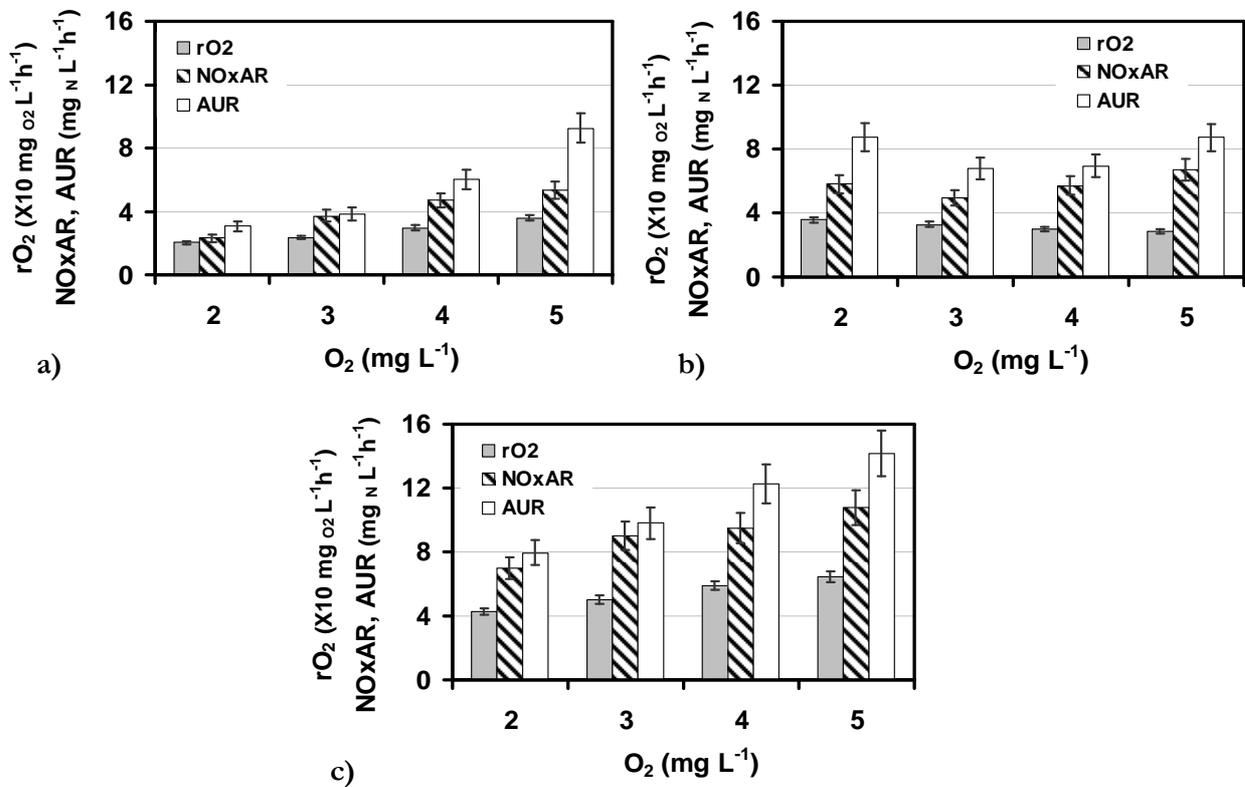


Figure IV.5. Evolution d'activité de nitrification en fonction de la concentration en oxygène dissous pour les granules (a), floccs (b) et la boue hybride (c). Les barres d'erreur affichées sur cette figure représentent l'écartype relatif à chaque mesure

Ces résultats confirment que la concentration en oxygène dissous (dans cette gamme de concentration de 2 à 5 mg L⁻¹) ne constitue pas un facteur limitant de l'activité des floccs. Les limitations au transfert de l'oxygène dans les floccs sont donc susceptibles d'apparaître à des concentrations inférieures à 2 mgO₂ L⁻¹. Ce résultat est en accord avec la concentration en oxygène dissous de fonctionnement des procédés à boue activée (2 mgO₂ L⁻¹). A contrario, l'activité de nitrification des granules semble fortement limitée par le transfert de l'oxygène dissous. L'observation de la Figure IV.5 a) montre qu'à forte concentration (OD= 5 mgO₂ L⁻¹), l'activité de nitrification des granules est toujours limitée puisqu'aucun plateau n'est encore visualisé. De fait, l'exploitation du potentiel maximal de nitrification des granules nécessiterait de monter à des concentrations plus élevées encore, permettant ainsi à l'oxygène de pénétrer plus en profondeur dans le granule. Une fraction plus large de bactéries nitrifiantes aurait peut être ainsi accès à l'oxygène. Les limitations au transfert de l'oxygène au sein d'agrégats denses tels que les granules ont déjà été mises en évidence à l'aide de microsondes O₂. Les travaux réalisés par Li *et al.* (2008) sur des granules avec un diamètre de

2,6 mm (comparable au diamètre des granules étudiés) montrent qu'en présence de substrat, l'oxygène ne diffuse que sur une épaisseur de 400 μ m de la surface du granule (avec une concentration de l'OD dans le liquide de 6 mg L⁻¹). Ainsi, la présence de limitations au transfert de l'oxygène dans les granules et ce même à forte concentration (5 mgO₂ L⁻¹), est en adéquation avec les travaux de Li *et al.* (2008).

D'autre part, les résultats obtenus dans notre étude montrent que la boue hybride bénéficie de la contribution simultanée des floes et des granules. En effet, la diminution du taux de nitrification lorsque la concentration d'oxygène passe de 5 à 2 mgO₂ L⁻¹ est plus importante dans le cas de la boue granulaire pure que dans le cas de la boue hybride. Ainsi, les diminutions de l'AUR, NO_xAR et rO₂ sont respectivement de 71%,57% et 43% pour la boue granulaire contre 43%, 35% et 33% pour la boue hybride.

La contribution respective des floes et des granules à l'activité de nitrification de la boue hybride a été déterminée à partir des NO_xAR pour chaque concentration en oxygène dissous (Figure IV.6). La contribution des floes à l'activité de nitrification de la boue hybride est d'environ 57% pour des concentrations d'oxygène dissous de 3, 4 et 5 mg L⁻¹. A faible concentration (2 mgO₂ L⁻¹), celle-ci augmente jusqu'à 72%. Ainsi, il apparaît que la présence de floes dans la boue hybride permet de maintenir la stabilité de la nitrification à faible concentration en oxygène dissous.

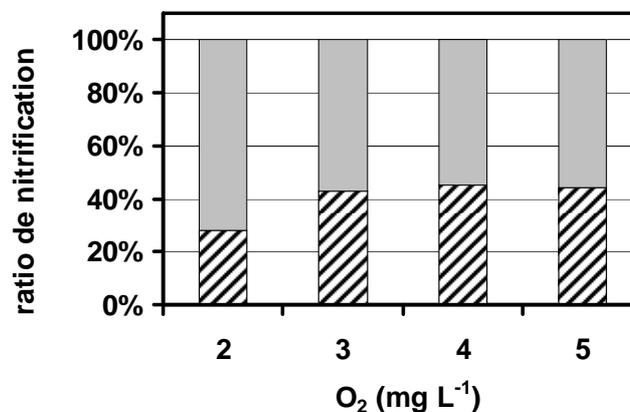


Figure IV.6. Contribution des floes (□) et des granules (▨) à l'activité de nitrification (première étape de conversion : ammonium en nitrite) de la boue hybride

3.3 Répartition des nitrifiants

3.3.1 Analyse cinétique

Dans cette partie, nous nous sommes intéressés à l'étude et à la quantification de l'activité de nitrification des bactéries ammonium oxydantes (AOB) et nitrification des nitrite oxydantes (NOB) au sein des floes et des granules. Pour ce faire, nous avons calculé la vitesse d'accumulation des nitrites

(NO_2AR) ainsi que la vitesse d'accumulation des NO_x . La vitesse de nitrification (r_{AOB}) est définie comme la vitesse d'accumulation des NO_x tandis que la vitesse de nitrification (r_{NOB}) est définie comme la vitesse d'oxydation des nitrites par les NOB et calculée à partir de la différence entre la vitesse d'accumulation des NO_x et celle des NO_2^- (Equation IV.2). Il à noter que la vitesse de nitrification est quantifiée pour une concentration en substrat (NH_4^+) non limitante.

$$r_{\text{AOB}} = \text{NO}_x\text{AR} \quad \text{et} \quad r_{\text{NOB}} = \text{NO}_x\text{AR} - \text{NO}_2\text{AR} \quad \text{Équation IV.2}$$

La Figure IV.7 présente l'évolution de la vitesse de nitrification, nitrification ainsi que le ratio $r_{\text{NOB}} : r_{\text{AOB}}$ en fonction de la concentration en oxygène dissous pour les agrégats isolés (flocs, granules) et la boue hybride.

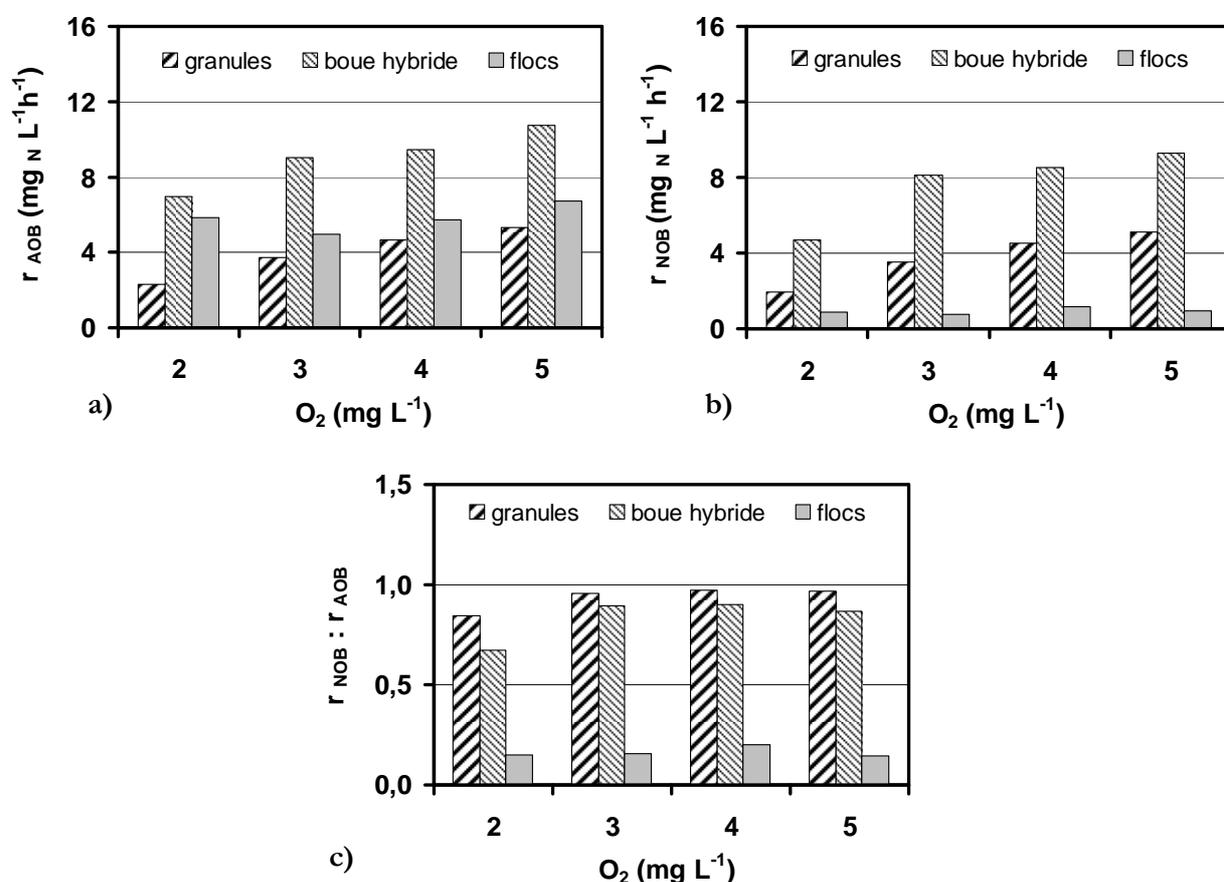


Figure IV.7. Evolution de la vitesse de nitrification (a), nitrification (b) et du ratio $r_{\text{NOB}} : r_{\text{AOB}}$ (c) en fonction de la concentration en oxygène dissous

Les résultats indiquent que l'activité de nitrification est relativement importante dans le cas de la boue hybride et granulaire et particulièrement faible dans le cas des flocs (Figure b et c). En effet, on peut constater que pour toutes les concentrations en oxygène dissous le ratio $r_{\text{NOB}} : r_{\text{AOB}}$ est supérieur à 0,7 pour la boue granulaire et hybride et inférieur à 0,2 pour les flocs. Ce résultat suggère que les

flocs contiennent une très faible fraction de bactéries nitrite oxydantes. Celles-ci sont préférentiellement distribuées dans les agrégats denses tels que les granules aérobies.

D'autre part, ces résultats indiquent que même si l'activité de nitrification dans les flocs est très faible ($< 1 \text{ mg N L}^{-1} \text{ h}^{-1}$), l'activité de la boue hybride est en moyenne 2 fois supérieure à celle des granules (Fig IV.7 b). Ceci met en évidence une synergie entre les flocs et les granules au sein de la boue hybride. Cette synergie peut s'expliquer par la présence d'une limitation des NOB par les nitrites lors de la caractérisation des granules seuls puisqu'il n'est pas observé d'accumulation de nitrites dans cette configuration (Fig IV.4 a). Au sein de la boue hybride, la faible activité de nitrification des flocs se traduit par une accumulation de nitrites dans le réacteur (Fig IV.4 b). Ces derniers peuvent alors diffuser dans les granules augmentant ainsi le flux de nitrites pour la nitrification.

L'étude de la répartition des nitrifiants au sein des flocs et granules a fait l'objet d'une seconde expérimentation (jour 839/175). Celle-ci a été réalisée afin de dissiper tout doute concernant une possible inhibition de la nitrification dans les flocs par l'ammoniac libre (NH_3), qui pourrait expliquer la faible activité de nitrification dans les flocs. Cette hypothèse a été soulevée suite à la diminution du $r\text{O}_2$ après la seconde injection de substrat pour les concentrations de 3 et $4 \text{ mgO}_2 \text{ L}^{-1}$ (Fig IV.5 b). Puisque la concentration de l'ammoniac libre estimée lors du test effectué sur les flocs seuls atteignait une valeur de $3,4 \text{ mg}_\text{N} \text{ L}^{-1}$ (pour une concentration en ammonium de $69 \text{ mg}_{\text{N-NH}_4} \text{ L}^{-1}$, un pH de 8,07 et une température de 21°C), cette concentration est trop faible pour inhiber l'activité des AOB mais est assez élevée pour inhiber celle des NOB (Anthonisen *et al.* 1976).

Dans cette nouvelle expérience l'activité de nitrification a été évaluée avec l'injection d'une solution de nitrite de sodium, l'activité de nitrification a été évaluée avec l'injection d'une solution de chlorure d'ammonium. L'expérience a été effectuée avec une concentration en oxygène dissous de 6 mg L^{-1} . La Figure IV.8 présente les respirogrammes obtenus et le Tableau IV.2 regroupe les vitesses d'oxydation de l'ammonium et des nitrites ainsi que le ratio $r_{\text{NOB}} : r_{\text{AOB}}$ calculés à partir du suivi des formes solubles d'azote minéral.

Dans le cas des flocs (a) aucune augmentation de la respiration suite à l'injection des nitrites n'est observée ; le $r\text{O}_2$ après ajout de substrat est équivalent au $r\text{O}_2$ endogène ($15 \text{ mgO}_2 \text{ L}^{-1} \text{ h}^{-1}$). La faible activité de nitrification des flocs est confirmée par la faible vitesse d'oxydation des nitrites ($0,7 \text{ mg}_{\text{N-NO}_2} \text{ L}^{-1} \text{ h}^{-1}$). Suite à l'ajout du second substrat (chlorure d'ammonium), la respiration augmente pour atteindre une valeur maximale de $32 \text{ mgO}_2 \text{ L}^{-1} \text{ h}^{-1}$. La vitesse de nitrification mesurée est de $5,2 \text{ mg}_{\text{N-NH}_4} \text{ L}^{-1} \text{ h}^{-1}$. Le ratio entre la respiration exogène et la vitesse de nitrification correspondante ($r\text{O}_{2\text{max}}/\text{AUR} = 3,27 \text{ gO}_2 \text{ g}^{-1} \text{ N-NH}_4 \text{ oxydé}$) est proche de la valeur théorique ($3,43 \text{ gO}_2 \text{ g}^{-1} \text{ N-NH}_4 \text{ oxydé}$).

Le respirogramme correspondant aux granules (b) présente un profil différent de celui des flocs. En effet, une réponse liée à l'activité de nitrification est observée pour la boue granulaire. Suite à

l'injection des nitrites, la respiration biologique augmente graduellement pour atteindre une valeur maximale de $32,45 \text{ mg}_{\text{O}_2} \text{ L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ (calculée à partir de 5 points). Puis, celle-ci diminue du fait de la carence en substrat. La vitesse d'oxydation des nitrites estimée est de $8 \text{ mg}_{\text{N-NO}_2} \text{ L}^{-1} \text{ h}^{-1}$. Le ratio entre la respiration exogène et la vitesse de nitrification correspondante ($r_{\text{O}_2\text{max}} / \text{NO}_2\text{UR} = 1,16 \text{ g}_{\text{O}_2} \text{ g}^{-1} \text{N-NO}_2 \text{ oxydé}$) est là encore très proche de la valeur théorique ($1,1 \text{ g}_{\text{O}_2} \text{ g}^{-1} \text{N-NO}_2 \text{ oxydé}$). L'injection de l'ammonium provoque une augmentation de la respiration qui atteint rapidement un plateau. En condition d'excès de substrat, la respiration correspond à l'activité maximale, elle est de $69,6 \text{ mg}_{\text{O}_2} \text{ L}^{-1} \text{ h}^{-1}$. La vitesse de nitrification estimée est de $12,5 \text{ mg}_{\text{N-NH}_4} \text{ L}^{-1} \text{ h}^{-1}$. Le ratio entre la vitesse de nitrification et la respiration exogène correspondante est de $3,12 \text{ g}_{\text{O}_2} \text{ g}^{-1} \text{N-NH}_4 \text{ oxydé}$.

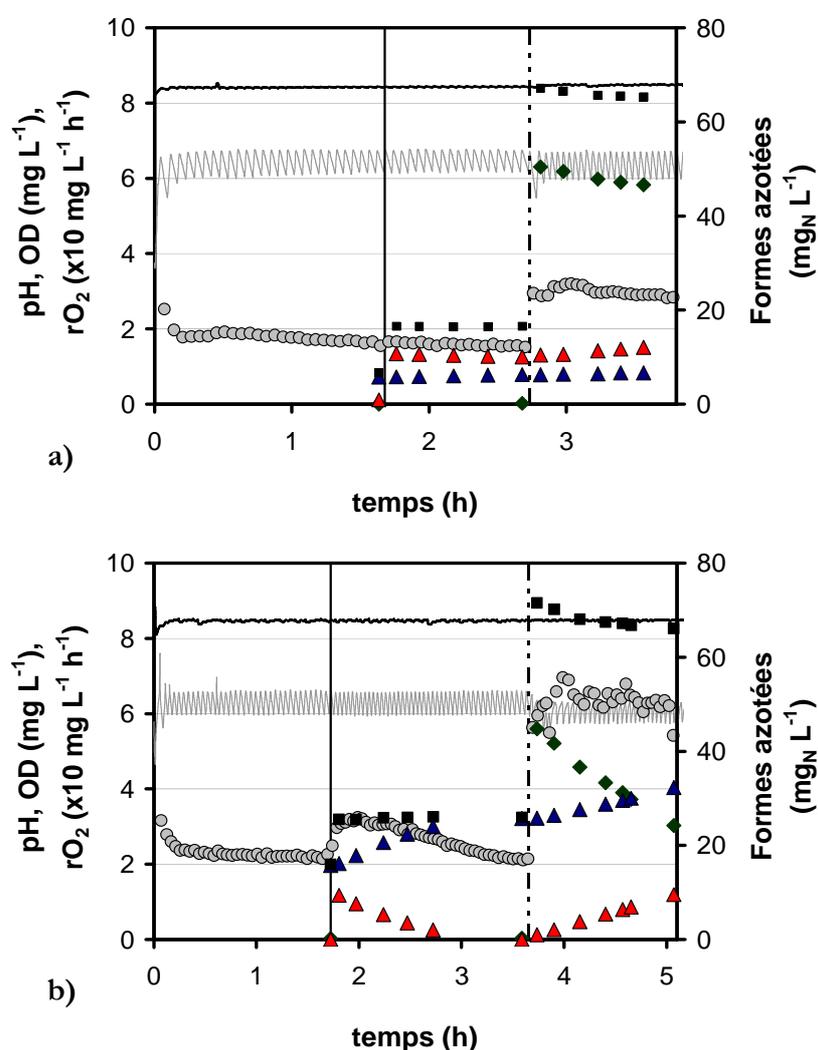


Figure IV.8. Cinétiques respirométriques de nitrification et nitratation pour les floes (a) et les granules (b). rO₂ (○), OD (—), pH (· · ·), TN (■), N-NO₃ (▲), N-NO₂ (△), N-NH₄ (◆). Les traits représentent les injections de substrats successives : NaNO₂ (trait plein) et NH₄Cl (en pointillé).

Le ratio de l'activité de nitrification et nitrification estimé à partir du ratio des vitesses d'oxydation des nitrites et de l'ammonium pour les floes et les granules est de 0,14 et 0,64, respectivement. Les résultats relatifs aux floes sont en accord avec ceux présentés précédemment (test de respirométrie avec les paliers d'oxygène dissous) et confirment la faible teneur en bactéries nitrifiantes des floes. Cependant, nous notons une diminution de la proportion de NOB dans les granules. En effet le ratio de $r_{NOB} : r_{AOB}$ qui était en début de troisième phase (jour 714/50) de 0,93 est passé à 0,64 au jour 839/175. La diminution de la contribution des NOB dans la communauté nitrifiante en fin de la troisième phase est probablement due à une stabilisation du procédé et des dynamiques de population microbiennes au sein des granules.

Tableau IV.2. Vitesses d'oxydation de NH_4^+ et NO_2^- et ratio $r_{NOB} : r_{AOB}$

	Granules	Floes
AUR ($mg_{N-NH_4} L^{-1}h^{-1}$)	12,55 (n=8, $R^2=0,998$)	5,17 (n=6, $R^2=0,992$)
NO_2UR ($mg_{N-NO_2} L^{-1}h^{-1}$)	8,02 (n=5, $R^2=0,995$)	0,74 (n=5, $R^2=0,997$)
$r_{NOB} : r_{AOB}$	0,64	0,14

Les valeurs de l'AUR et NO_2UR ont été déterminées à partir de régressions linéaires des concentrations en ammonium et nitrite, le R^2 et n (nombre de point utilisé lors de la régression) sont présentés sur le tableau.

3.3.2 Observations FISH

L'hybridation in situ FISH a été employée afin de caractériser la répartition spatiale des nitrifiants au sein des granules. Plusieurs prélèvements au cours de la phase III ont donc été effectués et analysés avec cette technique. Cependant aucune évolution notable de la répartition des AOB et NOB n'a été observée au cours de cette phase. Nous présentons dans cette partie deux exemples de distributions distincts des nitrifiants fréquemment observées simultanément (Figure IV.9).

Dans le granule de gauche (a), les bactéries ammonium oxydantes AOB apparaissant en magenta sont distribuées sur l'ensemble du granule. Elles sont principalement localisées sur une épaisseur de 500 μm de la surface du granule. Les nitrite oxydantes NOB (jaune) sont très peu présentes en surface. Elles sont distribuées en profondeur du granule (à environ 200 μm de la surface) et concentrées au centre à proximité du cœur minéral (solide minéral délimité par pointillé). Dans le granule de droite (b), les AOB sont très peu détectées en surface du granule. Elles sont principalement localisées à partir de 100 μm de la surface et concentrées autour de macro-pores. La répartition des NOB dans le granule (b) est plus étendue que celle observée dans le granule (a), cette population étant ici principalement localisée en profondeur du granule mais aussi autour de macro-

pores. Les colonies de AOB observées sont denses ; leur taille varie de 10 à 50 μm (c et e). Les colonies de NOB sont elles aussi très denses ; leur taille ne dépasse pas les 10 μm (d).

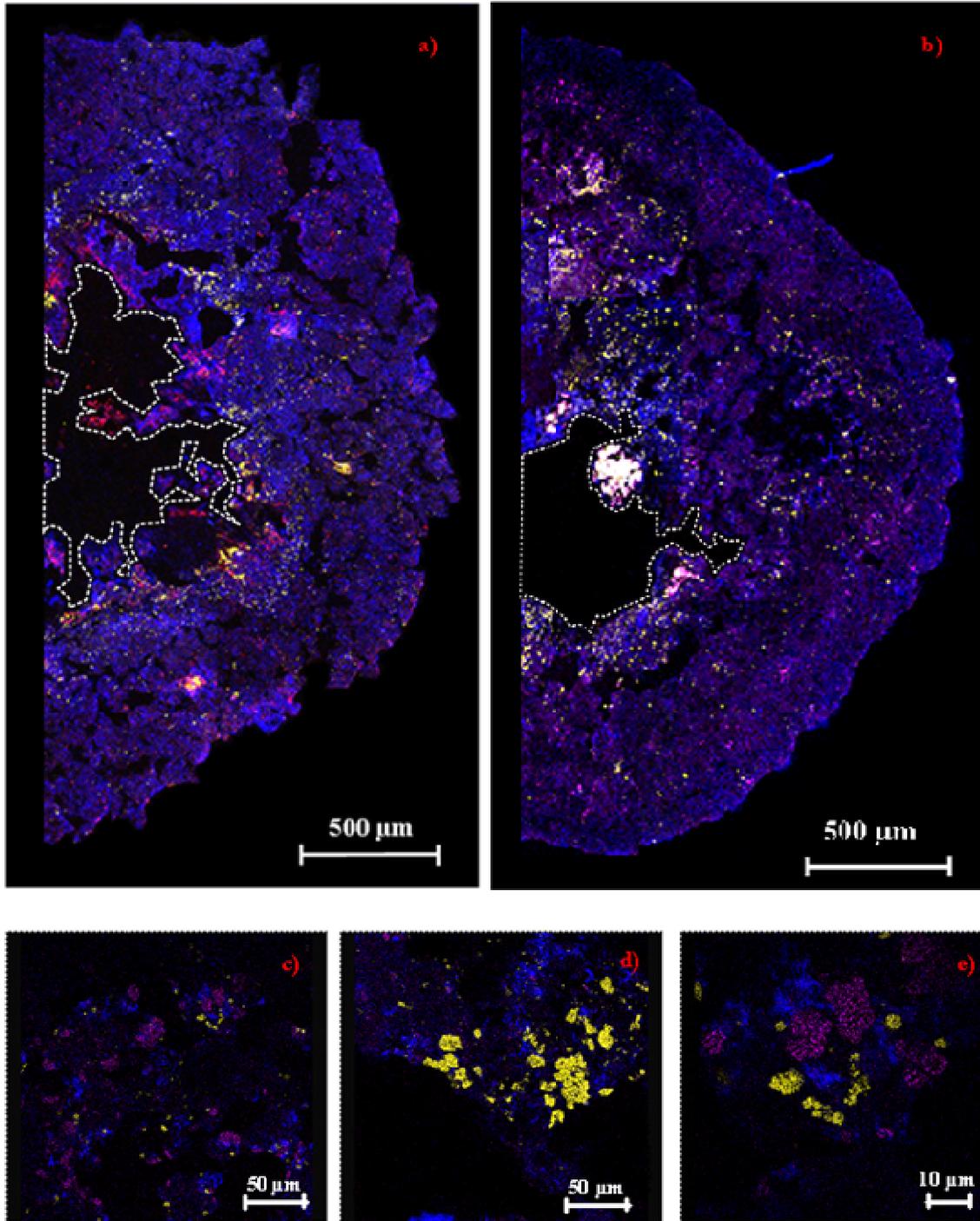


Figure IV.9. Images de coupes médianes de granules (a, b) et de parties du granules (c,d, e) marquées en DAPI (ADN, bleu), Nso190et Nso1225 (AOB, magenta) et Nit3 et Ntspa662 (NOB, jaune). Les pointillés indiquent l'emplacement du cœur minéral (détaché lors de la coupe au cryomicrotome et lors de la procédure d'hybridation FISH)

L'observation du marquage des bactéries nitrifiantes montre que leur distribution est fortement corrélée à la structure interne des granules et à la disponibilité de l'oxygène dissous. En effet, il a été démontré dans le cas de biofilms, que la profondeur de pénétration de l'oxygène est généralement bien corrélée aux zones de forte oxydation de l'ammonium (Schramm *et al.* (1996) ; Okabe *et al.* (2002) ; Gieseke *et al.* (2005)). Dans le cas de granules aérobies, l'étude menée par Jang *et al.* (2003) rapporte que l'oxydation de l'ammonium n'est observée que dans les couches du granule suffisamment aérées. La distribution de l'espèce *Nitrosomonas spp* (marquée avec la sonde Nsm 156) est corrélée au profil de diffusion de l'oxygène dans le granule. Dans notre étude, deux configurations de distributions de AOB corrélées à la structure interne ont été observées. Sur la Figure IV.9 (a) on observe la présence de nombreux macro-pores ou canaux (avec des tailles pouvant dépasser 50 μm) partant de la surface du granule, la distribution des AOB dans ce granule est alors aussi bien en surface qu'en profondeur. A contrario, dans le granule b, la porosité interne du granule dans les couches surfaciques semble plus faible que celle observée dans le granule a, dans ce cas, peu de AOB ont été détectées en surface du granule. Le rôle crucial des macro-pores (ou canaux) dans le transport de l'oxygène, substrats et des métabolites à l'intérieur ainsi qu'à l'extérieur des granules a déjà été souligné (Ivanov *et al.* (2005); Zheng *et al.* (2005), Lemaire *et al.* (2008)). Ainsi, il apparaît que la porosité des granules est variable et que celle-ci détermine la distribution des espèces nitrifiantes au sein des granules aérobies.

Du fait de la forte affinité des bactéries nitrite oxydantes (NOB) pour l'oxygène, on s'attendait à une répartition similaire des AOB et NOB. Etonnamment, les NOB sont très peu présentes en surface; elles sont distribuées en profondeur du granule (à environ 200 μm de la surface) et concentrées au centre du granule à proximité du cœur minéral, ce qui confirme la présence d'oxygène au cœur des agrégats. Des distributions internes similaires de NOB ont été observées dans le cas de biofilms (Okabe *et al.* 1999 ; Lydmark *et al.* 2006 ; Schramm *et al.* 1999) et de granules (Shi *et al.* 2009). Les auteurs expliquent généralement cette configuration par une forte compétition entre AOB et NOB pour l'oxygène. Cependant, pour des températures inférieures à 30°C (ce qui est le cas dans notre étude), il est généralement admis que le taux de croissance des NOB est supérieur à celui des AOB. En effet, la température est l'un des paramètres opératoire couramment utilisé pour le lessivage des NOB dans les procédés à nitrification partielle tels que le procédé SHARON® (Hellinga *et al.* (1998)). De fait, cette hypothèse seule ne suffit pas à expliquer la distribution en profondeur des NOB. Une autre hypothèse est celle de l'inhibition par NH_3 qui a été soulevée dans les procédés fonctionnant à forte charge en ammonium Shi *et al.* (2009). Dans le cas de notre étude, du fait de la dénitrification, le pH augmente fortement et peut atteindre au sein du GSBR une valeur 9,2 (cf. Figure III.6 a). La concentration en NH_3 correspondant à cette augmentation du pH est en moyenne de 3,6 mg L^{-1} . Cette concentration comme nous l'avons évoquée précédemment est au dessus des seuils d'inhibition des NOB. De fait, on peut penser que les NOB qui ont réussi à se développer dans

les granules sont celles qui sont distribuées derrière une épaisseur d'AOB car ces dernières non seulement fournissent le substrat nécessaire au développement des NOB mais aussi oxydent l'ammonium diminuant ainsi localement l'inhibition.

Le marquage de bactéries nitrifiantes dans les floccs a également été réalisé (Figure IV.10). Les AOB ont fréquemment été visualisées dans les échantillons de floccs. L'analyse d'images de l'hybridation FISH indique que ces bactéries se présentent sous forme de colonies denses dont la taille varie entre 5 et 50 μm (f, e et b). La présence de NOB dans les floccs est quant à elle très faible. Quelques petits clusters avec une taille inférieure à 10 μm ont été observés (ils sont indiqués par un cercle rouge sur les figures b et d). De plus, seule la bactérie *Nitrospira* marquée avec la sonde Ntspa662 a été détectée. Aucun marquage de *Nitrobacter* avec la sonde Nit3 n'a été observé.

Cette différence de distribution de NOB dans les floccs et les granules au sein d'une boue hybride a déjà été constatée (Carvalho *et al.* 2006) où plus de 79% du total des NOB (entre floccs et granules) était localisé dans les granules. Plusieurs hypothèses peuvent expliquer la faible présence des NOB dans les floccs : (1) l'inhibition par NH_3 déjà évoquée et (2) la différence de temps de séjour entre floccs et granules.

La seconde hypothèse est relative à l'âge de boue minimum (θ_{bmin}) nécessaire au développement des NOB dans les floccs. Ce paramètre crucial dans le dimensionnement des procédés dépend à la fois du taux de croissance des bactéries et de leur taux de décès ($\theta_{bmin} = 1/(\mu - b)$). Si l'on considère les paramètres de taux de croissance et de décès couramment utilisés en modélisation* ($\mu_{max} = 0,8 \text{ j}^{-1}$ et $b = 0,15 \text{ j}^{-1}$ et $K_{NOI} = 0,5 \text{ g}_N \text{ m}^{-3}$, avec une température de 20°C), ainsi que la concentration moyenne des nitrites et d'oxygène dissous durant la phase aérobie, l'âge minimum des floccs permettant le développement des NOB (θ_{bmin}) est de 2,1 jour. Dans notre étude, le bilan de masse appliqué au réacteur indique que le temps de séjour apparent est sensiblement différent entre les floccs et les granules avec une moyenne de 260 jours pour les granules contre seulement 2 jours pour les floccs. Ainsi, il apparaît que le temps de séjour des floccs est insuffisant pour permettre le développement et l'implantation des NOB dans les floccs. Notons que le temps de séjour apparent des floccs est également trop faible pour permettre la croissance des bactéries ammonium oxydante dans les floccs ($\theta_{bmin} = 2,5 \text{ jour}$)*. Cependant, contrairement aux NOB, la répartition des AOB se fait également en surface des granules. On peut alors penser que leur présence dans les floccs est due à un

* Les références des valeurs de paramètres du taux de croissance et de décès des AOB et NOB sont données dans le chapitre modélisation (chapitre V).

détachement surfacique continu de particules à la surface des granules qui pourrait participer à leur maintien dans les floccs.

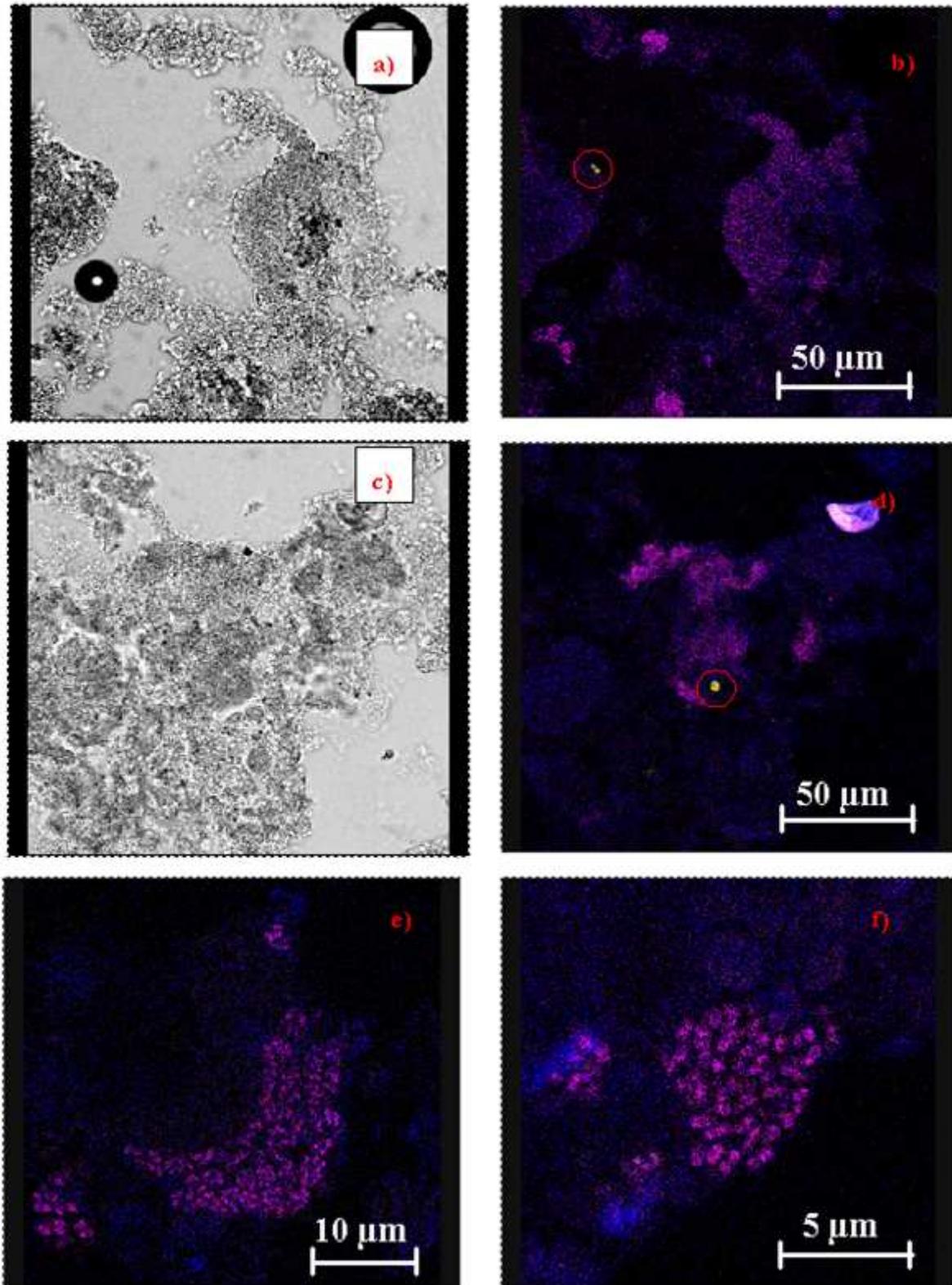


Figure IV.10. Images de floccs marqués avec DAPI (ADN, bleu), Nso190et Nso1225 (AOB, magenta) et Nit3 et Ntspa662 (NOB, jaune). Les images a c correspondent respectivement aux images b et d mais sans marquage. Les cercles rouges (b et d) indiquent la présence de bactéries nitrifiantes.

4 Discussion générale

Dans les procédés à rétention de biomasse, l'âge de boue est à un des paramètres clé contrôlant la concentration en biomasse stabilisée dans le procédé (IV.3). Théoriquement pour des micro-organismes nitrifiants (dont les AOB) la concentration en bactéries est donnée par la l'expression suivante :

$$X_{B,AOB} = \frac{Y_{AOB} (S_{NH,inf} - S_{NH,S})}{(b_{AOB} + 1/\theta_b) \theta_H} \quad \text{Équation IV.3}$$

Dans laquelle Y_{AOB} est le rendement de conversion du substrat azoté (g DCOx g⁻¹ N), $S_{NH,inf}$ et $S_{NH,S}$ sont respectivement les concentrations en substrat ammoniacal dans l'influent et en sortie du procédé (g N m⁻³) et θ_H est le temps de séjour hydraulique (fixé à 8,5 h sur toute la durée de l'étude expérimentale).

D'après cette équation, on peut voir que pour un temps de séjour hydraulique fixe, la concentration en biomasse stabilisée dans le procédé à l'équilibre augmente avec l'âge de boue. Lors du processus de granulation, l'augmentation de la densité de la boue permet de maintenir une concentration plus élevée ainsi qu'un âge de boues moyen plus élevé.

Le suivi des performances du GSBP sur toute la durée de l'étude (3 ans), indique que l'augmentation de la fraction de granules et de leur diamètre a un impact négatif sur les vitesses de nitrification de la boue hybride (Tableau IV.1). En effet, la vitesse moyenne de consommation de l'ammonium AUR a diminué de près de 30% et 45% durant les phases II et III respectivement, et ce malgré l'augmentation de la concentration en biomasse stabilisée dans le réacteur. Nous attribuons cette diminution de l'activité de nitrification à une diminution de l'aire spécifique et de fait à une augmentation de la résistance au transfert d'oxygène au sein des agrégats. En effet, les tests de respirométrie effectués lors de la phase III confirment que l'activité de nitrification dans les granules est fortement limitée et ce même à une concentration élevée de 5 mg L⁻¹. Ce résultat tend à montrer que l'augmentation des limitations au transfert d'oxygène au sein de la boue hybride, favorisées par l'augmentation de la proportion et du diamètre de granules, limite la nitrification qui n'est alors réalisée que par une fraction des bactéries nitrifiantes. Il en résulte que l'augmentation théorique de la concentration de la biomasse nitrifiante n'est pas forcément corrélée à l'augmentation de son activité.

Ainsi, si l'activité de nitrification est fortement dépendante de l'âge de boue dans les procédés à boue activées, celle des procédés de granulation aérobie n'est plus fonction de ce seul paramètre. L'étude menée par Yilmaz *et al* en 2008 sur l'influence du temps de séjour hydraulique (θ_H) sur l'activité de nitrification d'une boue granulaire, rapporte que la diminution du temps de séjour hydraulique ne conduit pas à une augmentation de l'activité de nitrification comme prévu par

l'Equation IV.3. Les auteurs expliquent cette contradiction entre les résultats théoriques et expérimentaux par la présence de fortes limitations au transfert d'oxygène dans les granules. En effet, la diminution du temps de séjour hydraulique entraîne l'augmentation des charges volumiques appliquées en substrat carbonée et en azoté et de fait provoque également l'augmentation de la demande en oxygène pour la dégradation du substrat. Les profils d'oxygène mesurés dans les granules aérobies, confirment cette hypothèse et indiquent une faible profondeur de diffusion d'oxygène dans les granules (300 μm de la surface avec une concentration de 5 mg L⁻¹ dans le liquide). Dans notre étude les très bonnes propriétés de décantation des granules ont permis ici d'assurer un âge de boue moyen jusqu'à 260 jours, mais le facteur limitant dans ces procédés est lié à la structure physique des agrégats qui offre une plus grande résistance au transfert d'oxygène (comparativement aux floccs) et accentue de fait la compétition microbienne entre les bactéries hétérotrophes et autotrophes. Ainsi, il apparaît que le contrôle de la proportion de floccs et de granules au sein de la boue hybride est un facteur crucial pour l'optimisation de l'élimination de l'azote.

5 Conclusions

Cette étude porte sur la caractérisation des performances de l'élimination de l'azote et de la répartition des bactéries nitrifiantes au sein d'une boue granulaire hybride. L'analyse de la répartition spatiale des bactéries nitrifiantes au sein des granules indique que les bactéries ammonium oxydantes sont présentes sur l'ensemble du granule. De plus, leur répartition semble particulièrement corrélée à la présence de macro-porosités et donc à la disponibilité de l'oxygène dissous. La répartition des nitrite oxydantes est quant à elle moins étendue. Ces dernières ont principalement été détectées au cœur des granules. Leur localisation est probablement liée à une inhibition par l'ammoniac libre et à une interaction entre les AOB et NOB. L'analyse de la composition des floccs par la technique FISH et la respirométrie indique que les AOB se distribuent de manière homogène entre floccs et granules alors que les NOB sont principalement localisées dans les granules.

Les limitations au transfert de masse de l'oxygène au sein des floccs, granules et boue hybride ont été caractérisées à travers des tests de respirométrie. Les résultats confirment que l'activité de nitrification dans les floccs n'est plus limitée pour des concentrations de l'oxygène dissous supérieures à 2 mg_{O₂} L⁻¹. A contrario, l'activité des granules est toujours limitée et ce même à forte concentration (5 mg_{O₂} L⁻¹). Par ailleurs, les résultats obtenus soulèvent la présence d'une synergie entre les floccs et les granules au sein de la boue hybride permettant d'atténuer la limitation des NOB par les nitrites.

Ainsi, l'opération du système avec une boue hybride est susceptible, grâce à la présence des floccs, d'augmenter la robustesse de la nitrification par rapport à un système à boues granulaires. Ceci

peut être déterminant par exemple suite à des diminutions momentanées de la concentration de l'oxygène ou à une augmentation de la charge organique.

Parallèlement, les granules microbiens permettent de maintenir les micro-organismes à faible taux de croissance, et en particulier comme nous l'avons montré les NOB. Il est à noter également que la présence de granules permet d'augmenter significativement la vitesse de dénitrification.

Le suivi des performances du GSBRR sur toute la durée de l'étude, indique que l'augmentation de la fraction de granules et de leur diamètre a un impact négatif sur les vitesses de nitrification de la boue hybride et ce malgré l'augmentation théorique de la concentration des bactéries nitrifiantes. Cette baisse d'activité de nitrification est expliquée par une diminution de l'aire spécifique et de fait à une augmentation de la résistance au transfert d'oxygène au sein des agrégats. Ainsi, il apparaît qu'au sein de la boue hybride le contrôle de la fraction de granules mais aussi de leur diamètre est crucial pour l'optimisation de l'élimination de l'azote.

Finalement, le ratio optimal de floccs et de granule devrait être évalué en fonction de certains paramètres opératoires du système tels que : la composition de l'effluent, le ratio DCO /N et le taux d'aération. Cette fraction pourrait être contrôlée par le biais de purges sélectives de floccs ou de granules effectuées à différentes hauteurs du lit de boue. La maîtrise de la taille des granules reste complexe mais pourrait être envisagée par le contrôle de contraintes hydrodynamiques.

Ainsi, l'objectif du chapitre suivant est dans un premier temps de présenter un modèle mathématique permettant de décrire les phénomènes réactionnels ayant lieu au sein d'une biomasse hybride. Cet outil permettrait d'optimiser le fonctionnement du procédé hybride à travers l'évaluation de la fraction optimale de floccs et de granules pouvant conduire à une élimination efficace de l'azote et à l'augmentation de la robustesse du procédé.

Références

AFNOR, 1994. Recueil de normes française-Qualité de l'eau.

Amann, R. (1995) In situ identification of micro-organisms by whole cell hybridization with rRNA-targeted acid probes. In: Molecular Microbial Ecology Manual, Edited by A.D.L. Akkermans, J.D. van Elsas & F.J. de Bruijn. London : Kluwer, pp. MEM-3.3.6/1-MEM-3.3.6/15.

Anthonisen, A. C., R. C. Loehr, T. B. S. Prakasam and E. G. Srinath (1976) Inhibition of Nitrification by Ammonia and Nitrous-Acid, Journal Water Pollution Control Federation 48 (5), 835-852.

- Artiga, P., V. Oyanedel, J. M. Garrido and R. Mendez (2005) An innovative biofilm-suspended biomass hybrid membrane bioreactor for wastewater treatment, *Desalination* 179 (1-3), 171-179.
- Carvalho, G., R. L. Meyer, Z. G. Yuan and J. Keller (2006) Differential distribution of ammonia- and nitrite-oxidising bacteria in flocs and granules from a nitrifying/denitrifying sequencing batch reactor, *Enzyme and Microbial Technology* 39 (7), 1392-1398.
- Caylet, A. (2010) Etude et modélisation de la compétition entre bactéries planctoniques et attachées dans un réacteur aérobie à biofilm (thesis), Université Montpellier II.
- Coma, M., S. Puig, M. D. Balaguer and J. Colprim (2010) The role of nitrate and nitrite in a granular sludge process treating low-strength wastewater, *Chemical Engineering Journal* 164 (1), 208-213.
- Daims, H., P. H. Nielsen, J. L. Nielsen, S. Juretschko and M. Wagner (2000) Novel Nitrospira-like bacteria as dominant nitrite-oxidizers in biofilms from wastewater treatment plants: diversity and in situ physiology, *Water Science and Technology* 41 (4-5), 85-90.
- de Kreuk, M. K., C. Picioreanu, M. Hosseini, J. B. Xavier and M. C. M. van Loosdrecht (2007) Kinetic model of a granular sludge SBR: Influences on nutrient removal, *Biotechnology and Bioengineering* 97 (4), 801-815.
- Gieseke, A., J. L. Nielsen, R. Amann, P. H. Nielsen and D. de Beer (2005) In situ substrate conversion and assimilation by nitrifying bacteria in a model biofilm, *Environmental Microbiology* 7 (9), 1392-1404.
- Ivanov, V., S. T. L. Tay, Q. S. Liu, X. H. Wang, Z. W. Wang and J. H. Tay (2005) Formation and structure of granulated microbial aggregates used in aerobic wastewater treatment, *Water Science and Technology* 52 (7), 13-19.
- Jang, A., Y. H. Yoon, I. S. Kim, K. S. Kim and P. L. Bishop (2003) Characterization and evaluation of aerobic granules in sequencing batch reactor, *Journal of Biotechnology* 105 (1-2), 71-82.
- Janssen MJ., K. Meinema, H. F. van der Roest (2002) *Biological Phosphorus Removal: Manual for Design and Operation*. STOWA IWA Publisher: 186-196.
- Lemaire, R., R. I. Webb and Z. G. Yuan (2008) Micro-scale observations of the structure of aerobic microbial granules used for the treatment of nutrient-rich industrial wastewater, *Isme Journal* 2 (5), 528-541.
- Li, Y., Y. Liu, L. Shen and F. Chen (2008) DO diffusion profile in aerobic granule and its microbiological implications, *Enzyme and Microbial Technology* 43 (4-5), 349-354.

- Lydmark, P., M. Lind, F. Sorensson and M. Hermansson (2006) Vertical distribution of nitrifying populations in bacterial biofilms from a full-scale nitrifying trickling filter, *Environmental Microbiology* 8 (11), 2036-2049.
- Mobarry, B. K., M. Wagner, V. Urbain, B. E. Rittmann and D. A. Stahl (1996) Phylogenetic probes for analyzing abundance and spatial organization of nitrifying bacteria, *Applied and Environmental Microbiology* 62 (6), 2156-2162.
- Mosquera-Corral, A., M. K. de Kreuk, J. J. Heijnen and M. C. M. van Loosdrecht (2005) Effects of oxygen concentration on N-removal in an aerobic granular sludge reactor, *Water Research* 39 (12), 2676-2686.
- Ochoa, J. C., J. Colprim, B. Palacios, E. Paul and P. Chatellier (2002) Active heterotrophic and autotrophic biomass distribution between fixed and suspended systems in a hybrid biological reactor, *Water Science and Technology* 46 (1-2), 397-404.
- Okabe, S., H. Naitoh, H. Satoh and Y. Watanabe (2002) Structure and function of nitrifying biofilms as determined by molecular techniques and the use of microelectrodes, *Water Science and Technology* 46 (1-2), 233-241.
- Okabe, S., H. Satoh and Y. Watanabe (1999) In situ analysis of nitrifying biofilms as determined by in situ hybridization and the use of microelectrodes, *Applied and Environmental Microbiology* 65 (7), 3182-3191.
- Schramm, A., D. de Beer, J. C. van den Heuvel, S. Ottengraf and R. Amann (1999) Microscale distribution of populations and activities of *Nitrosospira* and *Nitrospira* spp. along a macroscale gradient in a nitrifying bioreactor: Quantification by in situ hybridization and the use of microsensors, *Applied and Environmental Microbiology* 65 (8), 3690-3696.
- Schramm, A., L. H. Larsen, N. P. Revsbech, N. B. Ramsing, R. Amann and K. H. Schleifer (1996) Structure and function of a nitrifying biofilm as determined by in situ hybridization and the use of microelectrodes, *Applied and Environmental Microbiology* 62 (12), 4641-4647.
- Shi, X. Y., H. Q. Yu, Y. J. Sun and X. Huang (2009) Characteristics of aerobic granules rich in autotrophic ammonium-oxidizing bacteria in a sequencing batch reactor, *Chemical Engineering Journal* 147 (2-3), 102-109.
- Tay, J. H., V. Ivanov, S. Pan and S. T. L. Tay (2002) Specific layers in aerobically grown microbial granules, *Letters in Applied Microbiology* 34 (4), 254-257.
- W.Yuan, X. J. and D. Gao (2010) Effect of dissolved oxygen on nitrogen removal and process control in aerobic granular sludge reactor, *Journal of Hazardous Materials* 178 (1-3), 1041-1045.

- Wagner, M., G. Rath, H. P. Koops, J. Flood and R. Amann (1996) In situ analysis of nitrifying bacteria in sewage treatment plants, *Water Science and Technology* 34 (1-2), 237-244.
- Yilmaz, G., R. Lemaire, J. Keller and Z. Yuan (2008) Simultaneous nitrification, denitrification, and phosphorus removal from nutrient-rich industrial wastewater using granular sludge, *Biotechnology and Bioengineering* 100 (3), 529-541.
- Zheng, Y. M., H. Q. Yu and G. P. Sheng (2005) Physical and chemical characteristics of granular activated sludge from a sequencing batch airlift reactor, *Process Biochemistry* 40 (2), 645-650.

CHAPITRE V : Résultats

Analyse et modélisation de l'azote dans un réacteur granulaire à boue hybride

1 Introduction

Comme nous l'avons discuté dans le chapitre précédent, l'opération du système avec une boue hybride présente plusieurs avantages par rapport à un système à boues granulaires pures : (1) maintenir une vitesse de nitrification plus élevée, (2) réduire la limitation de la nitrification par l'oxygène dissous. En effet, le suivi des performances du réacteur indique que l'augmentation de la fraction de granules engendre des limitations croissantes au transfert de l'oxygène dans les granules qui réduisent la nitrification.

Ainsi, il apparaît que l'optimisation de l'élimination de l'azote nécessite d'optimiser la fraction de floccs et de granules au sein de la boue. C'est dans ce but qu'un outil mathématique permettant de décrire les phénomènes réactionnels ayant lieu au sein d'une biomasse hybride a été développé. Les bases du modèle sont celles de «ASM3» intégrant les phénomènes de transformation du substrat organique en composés de stockage. Le développement simultané d'une biomasse granulaire et floculée au sein d'un même réacteur a été réalisé au moyen de la régulation de la concentration des matières en suspension par le biais d'un soutirage.

Après une étape de calibration du modèle, les données issues des simulations seront confrontées aux données expérimentales dans le but d'évaluer la capacité du modèle à : (1) décrire les cinétiques réactionnelles au cours d'un cycle du réacteur et (2) prédire l'effet de l'oxygène dissous sur l'activité de nitrification des floccs, granules et de la boue hybride. Puis, une étude plus exploratoire nous permettra d'évaluer l'effet du ratio floccs/ granules sur les performances du procédé ainsi que sur la répartition microbienne au sein des agrégats biologiques.

2 Développement du modèle

2.1 Modèle cinétique

2.1.1 *Structure et processus*

Les bases du modèle sont celles de «ASM3» prenant en compte la transformation du substrat organique en composés de stockage. Trois modifications ont été apportées au modèle ASM3 afin de décrire les performances du réacteur granulaire. La matrice de Gujer du modèle est donnée dans les Tableaux V.1 et V.2. Les valeurs des paramètres cinétiques sont données dans les Tableaux V.3 et V.4 et enfin le Tableau V.5 regroupe les vitesses de réaction des processus biologiques.

La première modification est relative à l'introduction de la croissance et du stockage simultané des composés organiques par les hétérotrophes en condition d'excès de substrat. Dans le modèle ASM3 les phénomènes de stockage et de croissance sont successifs. Il est supposé que les composés organiques sont d'abord transformés en matière de stockage avant d'être utilisés pour la croissance, ce qui n'est pas en accord avec l'expérience. En effet, il a été démontré expérimentalement qu'en condition d'excès de substrat, le surplus de substrat ne pouvant être utilisé pour la croissance pouvait être converti parallèlement en composés de stockage. Nous avons donc adopté ce dernier principe, proposé par plusieurs auteurs (Beun *et al.*, 2000, Krishna and Van Loosdrecht, 1999, Sin *et al.*, 2005).

La seconde modification est relative à l'introduction des nitrites comme composé intermédiaire de la nitrification et dénitrification. La nitrification est décrite en deux étapes avec en premier lieu l'oxydation de l'ammonium en nitrites par les AOB puis leur oxydation en nitrates par les NOB. La dénitrification est alors décrite en condition anoxique (sur nitrite ou nitrate) à partir du substrat organique soluble mais aussi des réserves de stockage.

La troisième modification est une simplification du modèle ASM3. En effet, le modèle ASM3 considère un composé particulaire supplémentaire : le substrat particulaire lentement biodégradable (X_s), nécessitant une étape d'hydrolyse intracellulaire (pour former S_s) pour être assimilé par les hétérotrophes. Ce composé particulaire n'a pas été introduit dans notre modèle car l'influent alimentant le réacteur est un influent synthétique qui ne contient que des substrats organiques facilement biodégradables.

2.1.2 Paramètres biologiques

Le modèle compte 26 processus, dont 23 sont des processus biologiques relatifs aux organismes hétérotrophes et autotrophes. Le Tableau V.1 et la Figure V.1 décrivent l'ensemble des processus biologiques considérés dans le modèle.

La démarche adoptée lors de la calibration du modèle a été d'imposer des valeurs de paramètres cinétiques couramment employés dans la littérature (Tableaux V.4 et V.5) et de n'ajuster qu'un nombre restreint de paramètres. Ainsi, dans le but de mieux décrire le stockage de la DCO et la croissance anoxie des hétérotrophes, seuls les paramètres $Y_{H,S}$ et Y_{STO} ont été calibrés afin d'ajuster la concentration de la DCO et des nitrates. Durant la phase aérobie, seuls les taux de croissance spécifiques maximum des AOB et NOB (μ_{mAOB} et μ_{mNOB}) ont été calibrés afin d'ajuster la concentration de l'ammonium et de l'azote total.

Notons que tous les processus pouvant être réalisés en conditions aérobie ou anoxie (avec nitrate ou nitrite) ont été réduits d'un facteur anoxique η_g en condition anoxie. De plus, comme proposé dans ASM3, la diminution du rendement énergétique (ATP) de la respiration en condition

anoxique est également prise en compte. Considérant une réduction des rendements énergétiques en condition anoxie de 25% comparé à ceux en condition aérobie (Tchobanoglous and Burton 1991), les taux de conversion en condition anoxie ont été calculés comme suit :

$$\frac{Y_{H,NO}}{1-Y_{H,NO}} = 0,75 \frac{Y_{H,O2}}{1-Y_{H,O2}} \quad \text{Équation V.1}$$

Où $Y_{H,NO}$ est le rendement de conversion en condition anoxie ; $Y_{H,O2}$ est le rendement de conversion en condition aérobie.

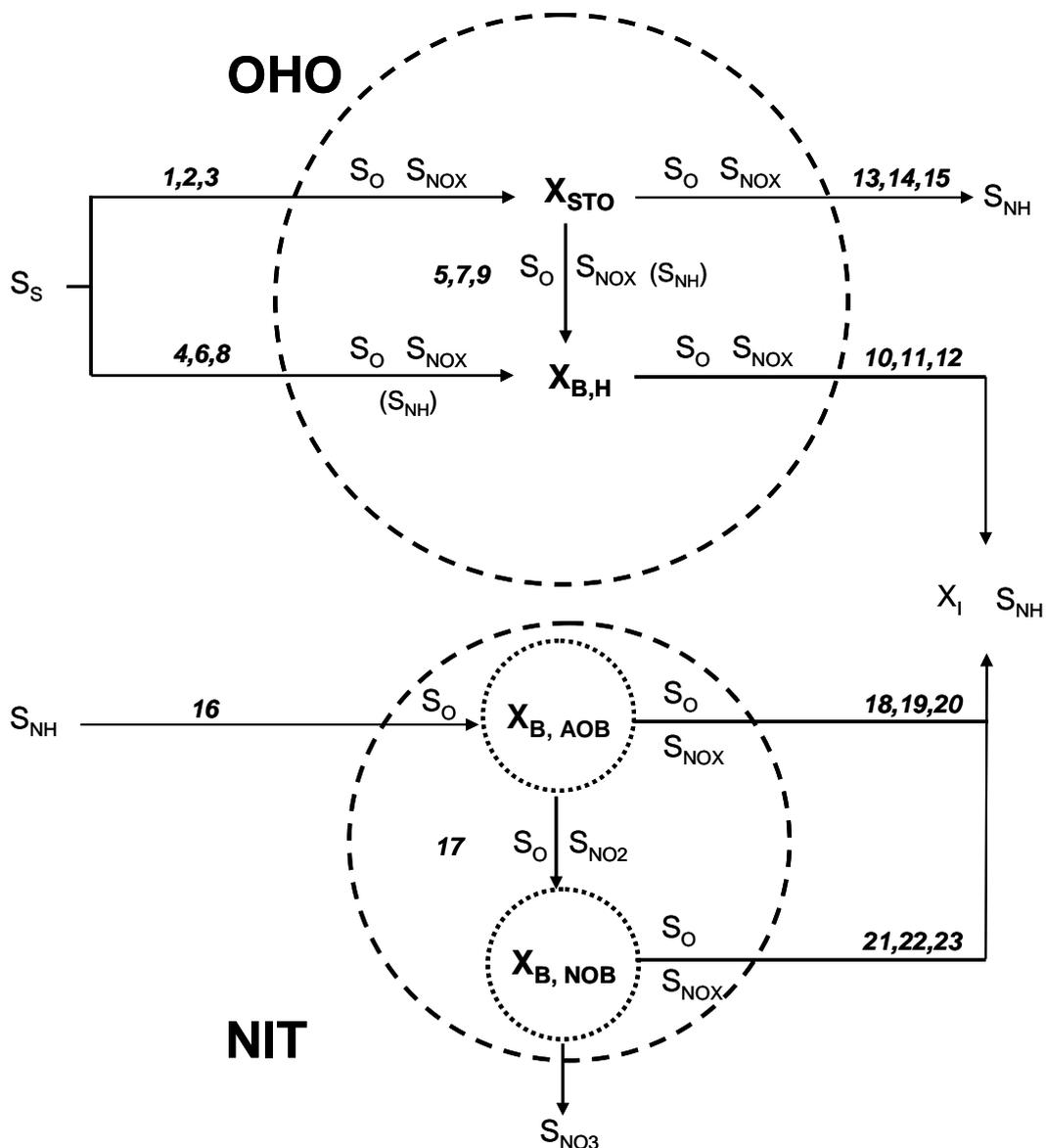


Figure V.1. Représentation schématique du modèle. Adaptée de la représentation schématique des modèles ASM proposée par Comeau et Takács, (2008)

Tableau V.1. Description des processus biologiques

Processus		Description
Organismes hétérotrophes		
Le stockage		
1	Stockage en aérobie avec S_S	Ce processus décrit la transformation de la matière organique facilement biodégradable en composés de stockage intracellulaires. L'oxydation du substrat facilement biodégradable peut se faire en conditions aérobie ou anoxie avec nitrite et nitrate. Le modèle ne prend pas en compte le stockage anaérobie réalisable par les PAO et GAO.
2	Stockage anoxie avec nitrate	
3	Stockage anoxie avec nitrite	
La croissance		
4	Croissance aérobie sur S_S	Ces processus décrivent la croissance des espèces hétérotrophes à partir soit du substrat soluble (S_S), soit à partir des réserves intracellulaires constituées (X_{STO}). Ces deux processus ont lieu en aérobie et en anoxie avec nitrite ou nitrate. Alors que la croissance sur S_S est décrite par un modèle de Monod, la croissance à partir de l'hydrolyse des polymères de stockage (X_{STO}) suit un modèle de Comtois.
5	Croissance aérobie sur X_{STO}	
6	Croissance anoxie avec nitrite sur S_S	
7	Croissance anoxie avec nitrite sur X_{STO}	
8	Croissance anoxie avec nitrate sur S_S	
9	Croissance anoxie avec nitrate sur X_{STO}	
La respiration		
10	Respiration endogène aérobie	Basée sur ASM3, la respiration endogène décrit la diminution de la biomasse active, son auto-oxydation et la libération de produits inertes associés.
11	Respiration endogène anoxie avec S_{NOA}	
12	Respiration endogène anoxie avec S_{NOI}	
13	Respiration aérobie de X_{STO}	Les organismes hétérotrophes utilisent les composés de stockage pour leurs besoins endogènes (maintenance). Il n'y a pas ici de production d'inerte, les composés de stockages sont totalement oxydés avec oxygène, nitrate ou nitrites.
14	Respiration anoxie avec nitrate de X_{STO}	
15	Respiration anoxie avec nitrite de X_{STO}	
Organismes autotrophes		
La croissance		
16	Croissance aérobie des AOB	Ces processus décrivent la croissance des bactéries autotrophes nitrifiantes et nitratantes sur leur substrat respectif (ammonium et nitrite). L'inhibition par de fortes concentrations en ammonium et nitrite n'a pas été considérée dans le modèle.
17	Croissance aérobie des NOB	
La respiration		
18	Respiration endogène des AOB	Ces processus décrivent la respiration endogène des bactéries nitrifiantes en aérobie, et en anoxie avec les nitrites et nitrates. Les bactéries autotrophes nitrifiantes étant aérobies strictes, il s'agit en fait de décrire en une seule cinétique le décès des nitrifiants (en aérobie ou anoxie) suivie de l'oxydation de leur produits de lyse que l'on considère non limitante car à priori catalysée par d'autres espèces hétérotrophes. C'est pourquoi ces processus sont également réduits en anoxie par le même facteur de réduction η_g que pour les hétérotrophes.
19	Respiration endogène anoxie des AOB sur nitrite	
20	Respiration endogène anoxie des AOB sur nitrate	
21	Respiration endogène aérobie des NOB	
22	Respiration endogène anoxie des NOB sur nitrite	
23	Respiration endogène anoxie des NOB sur nitrate	

Tableau V.2. Matrice stœchiométrique des processus biologiques par des organismes hétérotrophes

j	V _{ij}	i	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Vitesse de réaction
			S _s	X _I	X _{B,H}	X _{B,AOB}	X _{B,NOB}	S _o	S _{NOI}	S _{NOA}	S _{NH}	X _{STO}	
Organismes hétérotrophes													
1	Stockage aérobic avec S _s		$-\frac{1}{Y_{STO}}$					$-\frac{(1-Y_{STO})}{Y_{STO}}$				1	ρ_1
2	Stockage anoxie avec nitrate		$-\frac{1}{Y_{STO}}$							$-\frac{(1-Y_{STO})}{2,86Y_{STO}}$		1	ρ_2
3	Stockage anoxie avec nitrite		$-\frac{1}{Y_{STO}}$						$-\frac{(1-Y_{STO})}{1,71Y_{STO}}$			1	ρ_3
4	Croissance aérobic sur S _s		$-\frac{1}{Y_{H,S}}$		1			$-\frac{(1-Y_{H,S})}{Y_{H,S}}$			$-i_{XB}$		ρ_4
5	Croissance aérobic sur X _{STO}				1			$-\frac{(1-Y_{H,STO})}{Y_{H,STO}}$			$-i_{XB}$	$-\frac{1}{Y_{H,STO}}$	ρ_5
6	Croissance anoxie avec nitrite sur S _s		$-\frac{1}{Y_{H,S}}$		1			$-\frac{(1-Y_{H,S})}{1,71Y_{H,S}}$			$-i_{XB}$		ρ_6
7	Croissance anoxie avec nitrite sur X _{STO}				1			$-\frac{(1-Y_{H,STO})}{1,71Y_{H,STO}}$			$-i_{XB}$	$-\frac{1}{Y_{H,STO}}$	ρ_7
8	Croissance anoxie avec nitrate sur S _s		$-\frac{1}{Y_{H,S}}$		1					$-\frac{(1-Y_{H,S})}{2,86Y_{H,S}}$	$-i_{XB}$		ρ_8
9	Croissance anoxie avec nitrate sur X _{STO}				1					$-\frac{(1-Y_{H,STO})}{2,86Y_{H,STO}}$	$-i_{XB}$	$-\frac{1}{Y_{H,STO}}$	ρ_9
10	Respiration endogène aérobic			f_i	-1			$-(1-f_i)$			$i_{XB} - f_i * i_{xp}$		ρ_{10}
11	Respiration endogène anoxie avec nitrate			f_i	-1					$-\frac{(1-f_i)}{2,86}$	$i_{XB} - f_i * i_{xp}$		ρ_{11}
12	Respiration endogène anoxie avec nitrite			f_i	-1				$-\frac{(1-f_i)}{1,71}$		$i_{XB} - f_i * i_{xp}$		ρ_{12}
13	Respiration aérobic de X _{STO}							-1				-1	ρ_{13}
14	Respiration anoxie avec nitrate de X _{STO}									$-\frac{1}{2,86}$		-1	ρ_{14}

15	Respiration anoxie avec nitrite de X_{STO}								$-\frac{1}{1,71}$			-1	ρ_{15}
----	--	--	--	--	--	--	--	--	-------------------	--	--	----	-------------

Tableau V.3. Matrice stœchiométrique des processus biologiques par des organismes autotrophes

j	V_{ij}	i	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Vitesse de réaction
			S_s	X_I	$X_{B,H}$	$X_{B,AOB}$	$X_{B,NOB}$	S_o	S_{NOI}	S_{NOA}	S_{NH}	X_{STO}	
Organismes autotrophes													
16	Croissance aérobie des nitritants (AOB)					1		$-\frac{(3,43 - Y_{AOB})}{Y_{AOB}}$	$\frac{1}{Y_{AOB}}$		$-i_{XB} - \frac{1}{Y_{AOB}}$		ρ_{16}
17	Croissance aérobie des nitratants (NOB)						1	$-\frac{(1,14 - Y_{NOB})}{Y_{NOB}}$	$-\frac{1}{Y_{NOB}}$	$\frac{1}{Y_{NOB}}$	$-i_{XB}$		ρ_{17}
18	Respiration endogène aérobie AOB		f_I			-1		$-(1-f_I)$			$i_{XB} - f_I * i_{xp}$		ρ_{18}
19	Respiration endogène anoxie AOB sur nitrite		f_I			-1		$-\frac{(1-f_I)}{1,71}$			$i_{XB} - f_I * i_{xp}$		ρ_{19}
20	Respiration endogène anoxie AOB sur nitrate		f_I			-1				$-\frac{(1-f_I)}{2,86}$	$i_{XB} - f_I * i_{xp}$		ρ_{20}
21	Respiration endogène aérobie NOB		f_I				-1	$-(1-f_I)$			$i_{XB} - f_I * i_{xp}$		ρ_{21}
22	Respiration endogène anoxie NOB sur nitrite		f_I				-1	$-\frac{(1-f_I)}{1,71}$			$i_{XB} - f_I * i_{xp}$		ρ_{22}
23	Respiration endogène anoxie NOB sur nitrate		f_I				-1			$-\frac{(1-f_I)}{2,86}$	$i_{XB} - f_I * i_{xp}$		ρ_{23}

Tableau V.4. Définition et valeurs des paramètres pour les processus autotrophiques (20°C)

Symbole	Définition	Valeur		Référence	(Henze et al. 1987)	(Gujer et al., 1999)	(Ni et al., 2008)	(Vazquez-Padin et al., 2010)
		Aérobic	Anoxie					
Bactéries nitritantes ($X_{B,AOB}$)								
μ_{mAOB}	Taux de croissance spécifique maximum (j^{-1})	0,6		calibration	0,8	1	1,2	1,1
b_{AOB}	Taux de décès (j^{-1})	0,15		(Gujer et al., 1999)		0,15/0,05	0,15	0,18
$b_{AOB,NO}$	Taux de décès en anoxie (j^{-1})	0,0275		-				
$K_{NH,AOB}$	Constante d'affinité pour l'ammonium pour la croissance ($g\ N\ m^{-3}$)	0,14		(Manser et al., 2005)	1	1	1	1
$K_{O_2,AOB}$	Constante d'affinité pour l'oxygène pour la croissance ($g\ O_2\ m^{-3}$)	0,5		(Gujer et al., 1999)	0,4	0,5	0,5	0,74
$K_{NO_3,AOB}$	Constante d'affinité pour les nitrates lors du décès ($g\ N\ m^{-3}$)	0,5 (= $K_{NO_3,H}$)		(1)				1
$K_{NO_2,AOB}$	Constante d'affinité pour les nitrites lors du décès ($g\ N\ m^{-3}$)	0,5 (= $K_{NO_2,H}$)		(1)				1
Y_{AOB}	Taux de conversion ($g\ DCO\ g^{-1}\ N$)	0,21		(Wiesmann, 1994)	0,24	0,24	0,24	0,18
Bactéries nitrifiantes ($X_{B,NOB}$)								
μ_{mNOB}	Taux de croissance spécifique maximum (j^{-1})	0,81		calibration				0,96
b_{NOB}	Taux de décès (j^{-1})	0,15 (= b_{AOB})		(Munz et al. 2011)				0,16
$b_{NOB,NO}$	Taux de décès en anoxie (j^{-1})	0,0275 (= b_{AOB})		(Munz et al. 2011)				

$K_{NH,NOB}$	Constante d'affinité pour l'ammonium (g N m ⁻³)	0,01	(Koch et al., 2000)	
$K_{O,NOB}$	Constante d'affinité pour l'oxygène pour la croissance (g O ₂ m ⁻³)	1 (= 2* $K_{O,AOB}$)	-	1,75
$K_{NOA,NOB}$	Constante d'affinité pour les nitrates lors du décès (g N m ⁻³)	0,5 (= $K_{NOA,H}$)	(1)	1
$K_{NOI,NOB}$	Constante d'affinité pour les nitrites pour la croissance (g N m ⁻³)	0,5	(Manser et al. 2005)	1
Y_{NOB}	Taux de conversion (g DCO g ⁻¹ N)	0,03	(Alleman, 1985)	0,08

(1) Puisque la dénitrification des bactéries nitrifiantes n'est pas considérée dans notre modèle, le terme "respiration endogène anoxie des autotrophes" décrit finalement un processus qui regroupe le relargage de produits de lyse des bactéries nitrifiantes et l'oxydation de ces produits par les bactéries hétérotrophes. C'est pourquoi les constantes d'affinité pour les nitrite et nitrate des organismes nitrifiants sont celle des bactéries hétérotrophes.

Tableau V.5. Définition et valeurs des paramètres pour les processus hétérotrophiques (20°C)

Symbole	Définition	Valeur Aérobie/Anoxie	Référence	(Henze et al. 1987) ASM1	(Gujer et al., 1999) ASM3	(Ni et al., 2008)	(Vazquez- Padin et al., 2010)	(Sin et al., 2005)	
Bactéries hétérotrophes (X_{B,H})									
$\mu_{mH,S}$	Taux de croissance spécifique maximum sur S _s (j ⁻¹)	2,6	(Henze et al., 2000)	6	2	1,68	2,6	0,72	1,3
$\mu_{mH,STO}$	Taux de croissance spécifique maximum sur STO (j ⁻¹)	2,6 (= $\mu_{mH,S}$)	(Vazquez-Padin et al., 2010)			3,6	2,6	0,72	1,3
b_H	Taux de décès (j ⁻¹)	0,2	(Gujer et al., 1999)	0,62	0,2/0,1	0,38	0,26	0,2	0,2
$b_{H,NO}$	Taux de décès en anoxie (j ⁻¹)	0,055							
$K_{NH,H}$	Constante d'affinité pour l'ammonium (g N m ⁻³)	0,01	(Gujer et al., 1999)		0,01	0,01			
$K_{O,H}$	Constante d'affinité pour l'oxygène (g O ₂ m ⁻³)	0,2	(Gujer et al., 1999)	0,2	0,2	0,2	0,2		
$K_{S,H}$	Constante d'affinité pour le substrat organique	0,6	(Sin et al., 2005)	20	2	11,38	4	0,6	0,67
K_{STO}	Constante d'affinité pour les composés de stockage	1	(Gujer et al., 1999)		1	1	1		
$K_{NOA,H}$	Constante d'affinité pour Les nitrates (g N m ⁻³)	0,5	(Gujer et al., 1999)	0,5	0,5	0,5	0,5		
$K_{NOI,H}$	Constante d'affinité pour Les nitrites (g N m ⁻³)	0,5	(Henze et al., 2000)				0,5		
$Y_{H,S}$	Taux de conversion sur le substrat organique (g DCO _x /g DCO)	0,63/0,54	calibration	0,67		0,58	0,57	0,61	0,58

Y_{STO}	Taux de stockage sur le substrat soluble (g DCO _{xsto} /g DCO)	0,85/0,81	calibration			0,81	0,80	0,83	0,81
$Y_{H,STO}$	Taux de conversion sur les composés de stockages (g DCO _x /g DCO _{xsto})	0,68/0,57	(Sin et al., 2005)			0,68	0,68	0,71	0,68
k_{STO}	Taux maximum de stockage de X _{sto} (j ⁻¹)	5	(Gujer et al., 1999)		5	6	6,6	0,4	3,31
b_{STO}	Coefficient de respiration endogène	0,2	(Gujer et al., 1999)		0,2/0,1	0,38	0,26	0,2	0,2
$b_{STO,NO}$	Coefficient de respiration endogène en anoxie	0,055	-						
η_g	Facteur de réduction anoxique	0,55	(Ni et al., 2008)	0,8	0,6	0,55	0,6		
Autres paramètres									
f_i	Fraction de biomasse inerte produite par la lyse cellulaire	0,2	(Gujer et al., 1999)		0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
i_{xb}	Fraction d'azote dans la biomasse	0,086	(Henze et al., 1987)	0,086	0,07	0,07	0,08		
i_{xp}	Fraction d'azote dans les produits de lyse	0,018	mesure		0,02	0,02	0,04		

Tableau V.6. Vitesse de réaction des processus biologiques

Vitesse de réaction	Cinétique
ρ_1	$k_{STO} \frac{S_S}{S_S + K_{S,H}} \frac{S_O}{S_O + K_{O,H}} X_{B,H}$
ρ_2	$k_{STO} \eta_g \frac{S_S}{S_S + K_{S,H}} \frac{K_{O,H}}{S_O + K_{O,H}} \frac{S_{NOA}}{S_{NOA} + K_{NOA,H}} \frac{S_{NOA}}{S_{NOA} + S_{NOI}} X_{B,H}$
ρ_3	$k_{STO} \eta_g \frac{S_S}{S_S + K_{S,H}} \frac{K_{O,H}}{S_O + K_{O,H}} \frac{S_{NOI}}{S_{NOI} + K_{NOI,H}} \frac{S_{NOI}}{S_{NOA} + S_{NOI}} X_{B,H}$
ρ_4	$\mu_{mH,STO} \frac{S_S}{S_S + K_{S,H}} \frac{S_O}{S_O + K_{O,H}} \frac{S_{NH}}{S_{NH} + K_{NH,H}} X_{B,H}$
ρ_5	$\mu_{mH,STO} \frac{X_{STO}/X_{B,H}}{X_{STO}/X_{B,H} + K_{STO}} \frac{K_S}{S_S + K_{S,H}} \frac{S_O}{S_O + K_{O,H}} \frac{S_{NH}}{S_{NH} + K_{NH,H}} X_{B,H}$
ρ_6	$\eta_g \mu_{mH,S} \frac{S_S}{S_S + K_{S,H}} \frac{K_{O,H}}{K_{O,H} + S_O} \frac{S_{NOI}}{S_{NOI} + K_{NOI,H}} \frac{S_{NH}}{S_{NH} + K_{NH,H}} \frac{S_{NOI}}{S_{NOA} + S_{NOI}} X_{B,H}$
ρ_7	$\eta_g \mu_{mH,STO} \frac{X_{STO}/X_{B,H}}{X_{STO}/X_{B,H} + K_{STO}} \frac{K_S}{S_S + K_{S,H}} \frac{K_{O,H}}{S_O + K_{O,H}} \frac{S_{NOI}}{S_{NOI} + K_{NOI,H}} \frac{S_{NH}}{S_{NH} + K_{NH,H}} \frac{S_{NOI}}{S_{NOA} + S_{NOI}} X_{B,H}$
ρ_8	$\eta_g \mu_{mH,S} \frac{S_S}{S_S + K_{S,H}} \frac{K_{O,H}}{K_{O,H} + S_O} \frac{S_{NOA}}{S_{NOA} + K_{NOA,H}} \frac{S_{NH}}{S_{NH} + K_{NH,H}} \frac{S_{NOA}}{S_{NOA} + S_{NOI}} X_{B,H}$
ρ_9	$\eta_g \mu_{mH,STO} \frac{X_{STO}/X_{B,H}}{X_{STO}/X_{B,H} + K_{STO}} \frac{K_S}{S_S + K_{S,H}} \frac{K_{O,H}}{S_O + K_{O,H}} \frac{S_{NOA}}{S_{NOA} + K_{NOA,H}} \frac{S_{NH}}{S_{NH} + K_{NH,H}} \frac{S_{NOA}}{S_{NOA} + S_{NOI}} X_{B,H}$
ρ_{10}	$b_H \frac{S_O}{S_O + K_{O,H}} X_{B,H}$
ρ_{11}	$b_{H,NO} \frac{K_{O,H}}{S_O + K_{O,H}} \frac{S_{NOA}}{S_{NOA} + K_{NOA,H}} \frac{S_{NOA}}{S_{NOA} + S_{NOI}} X_{B,H}$
ρ_{12}	$b_{H,NO} \frac{K_{O,H}}{S_O + K_{O,H}} \frac{S_{NOI}}{S_{NOI} + K_{NOI,H}} \frac{S_{NOI}}{S_{NOA} + S_{NOI}} X_{B,H}$
ρ_{13}	$b_{STO} \frac{S_O}{S_O + K_{O,H}} X_{STO}$
ρ_{14}	$b_{STO,NO} \frac{K_{O,H}}{S_O + K_{O,H}} \frac{S_{NOA}}{S_{NOA} + K_{NOA,H}} \frac{S_{NOA}}{S_{NOA} + S_{NOI}} X_{STO}$
ρ_{15}	$b_{STO,NO} \frac{K_{O,H}}{S_O + K_{O,H}} \frac{S_{NOI}}{S_{NOI} + K_{NOI,H}} \frac{S_{NOI}}{S_{NOA} + S_{NOI}} X_{STO}$
ρ_{16}	$\mu_{mAOB} \frac{S_{NH}}{S_{NH} + K_{NH,AOB}} \frac{S_O}{S_O + K_{O,AOB}} X_{B,AOB}$
ρ_{17}	$\mu_{mNOB} \frac{S_{NOI}}{S_{NOI} + K_{NOI,NOB}} \frac{S_O}{S_O + K_{O,NOB}} \frac{S_{NH}}{S_{NH} + K_{NH,NOB}} X_{B,NOB}$
ρ_{18}	$b_{AOB} \frac{S_O}{S_O + K_{O,AOB}} X_{B,AOB}$
ρ_{19}	$b_{AOB,NO} \frac{K_{O,AOB}}{S_O + K_{O,AOB}} \frac{S_{NOI}}{S_{NOI} + K_{NOI,AOB}} \frac{S_{NOI}}{S_{NOA} + S_{NOI}} X_{B,AOB}$
ρ_{20}	$b_{NOB,NO} \frac{K_{O,NOB}}{S_O + K_{O,NOB}} \frac{S_{NOA}}{S_{NOA} + K_{NOA,AOB}} \frac{S_{NOA}}{S_{NOA} + S_{NOI}} X_{B,AOB}$
ρ_{21}	$b_{NOB} \frac{S_O}{S_O + K_{O,NOB}} X_{B,NOB}$
ρ_{22}	$b_{NOB,NO} \frac{K_{O,NOB}}{S_O + K_{O,NOB}} \frac{S_{NOI}}{S_{NOI} + K_{NOI,NOB}} \frac{S_{NOI}}{S_{NOA} + S_{NOI}} X_{B,NOB}$
ρ_{23}	$b_{NOB,NO} \frac{K_{O,NOB}}{S_O + K_{O,NOB}} \frac{S_{NOA}}{S_{NOA} + K_{NOA,NOB}} \frac{S_{NOA}}{S_{NOA} + S_{NOI}} X_{B,NOB}$

Tableau V.7. Valeurs des coefficients de diffusion

Symbole	Définition	Valeur modèle	Valeur (Vazquez-Padin et al., 2010)	Valeur (Derlon, 2008)
ε_s	Porosité du granule	0,6	Variable*	0,8
D_{O_2}	Coefficient de diffusion de l'oxygène ($m^2 j^{-1}$)	0,00018	0,000172	0,00022
D_S	Coefficient de diffusion de la DCO ($m^2 j^{-1}$)	0,000104	0,000100	0,000104
D_{NH}	Coefficient de diffusion de l'ammonium ($m^2 j^{-1}$)	0,000141	0,000161	0,000141
D_{NOI}	Coefficient de diffusion des nitrites ($m^2 j^{-1}$)	0,000137	0,000147	0,000137
D_{NOA}	Coefficient de diffusion des nitrates ($m^2 j^{-1}$)	0,000137	0,000147	0,000137
δ	Épaisseur de la sous couche diffusionnelle (μm)	0		200

*La porosité a été définie comme variable le long du rayon du granule (axe Z) : la porosité au centre du granule est de 0,6 ; dans les couches superficielles du granule elle est de 0,8.

2.2 Modélisation du système hybride

Le modèle mathématique employé pour décrire la dynamique du réacteur granulaire à boue hybride est un modèle 1-D mis en œuvre dans le logiciel de simulation pour les applications environnementales AQUASIM® (Reichert, 1998).

La modélisation d'une boue hybride comprenant une biomasse fixée (granules) et floculée implique de maîtriser la concentration respective des floes et granules au cours du temps.

2.2.1 Relation entre la concentration en MES et les propriétés de décantation

Dans les procédés conventionnels à boue activée, la concentration de la biomasse floculée stabilisée en régime permanent (consigne) résulte principalement d'un compromis entre le rendement d'épuration désiré et les contraintes de place (volumes respectifs du réacteur et décanteur). Dans ces procédés la concentration de la biomasse et son âge de boue sont homogènes, connus et maîtrisés.

Dans le réacteur hybride, contrairement aux systèmes à boue granulaire pure dans lesquels la durée de décantation est très courte, une durée de décantation de 30 minutes est maintenue. Cette durée est suffisamment longue pour laisser décanter les granules et une partie des floes (et sélectionner des floes avec de bonnes propriétés de décantation). La purge de floes et de granules n'a donc été induite que (1) par les prélèvements effectués pour les mesures de MES et caractérisation (300 mL/semaine, $MES_{moyen} = 25 \text{ g L}^{-1}$), (2) la perte de biomasse (principalement floculée) qui a lieu lors de la vidange d'effluent dont les premiers volumes contiennent des matières en suspension, provenant du haut du voile de boue. Suivant les périodes de fonctionnement, en fonction de ces

prélèvements et purges, la proportion des granules en masse (MES) a été stabilisée sur trois différents paliers (30%, 50-70% et 90%, voir Tableau IV.1 du chapitre précédent).

La concentration de chaque type d'agrégat (flocs ou granules) maintenue dans le système va dépendre de ses propriétés respectives de décantation et d'épaississement, caractérisées par leur indice de boue. En effet lors de la décantation, les granules, qui décantent plus rapidement que les flocs, sont maintenus dans le bas du réacteur. Ces granules ne sont pas purgés avec l'effluent tant que leur niveau n'atteint pas le point de vidange de l'eau traitée. Quelques granules sont cependant parfois prisonniers du lit de flocs et sont purgés avec le haut du lit de flocs. Le volume de flocs (et leur concentration) maintenu dans le réacteur dépend alors du volume laissé entre le haut du lit de granules et le haut du voile de boue imposé par le point de vidange (voir Figure V.2).

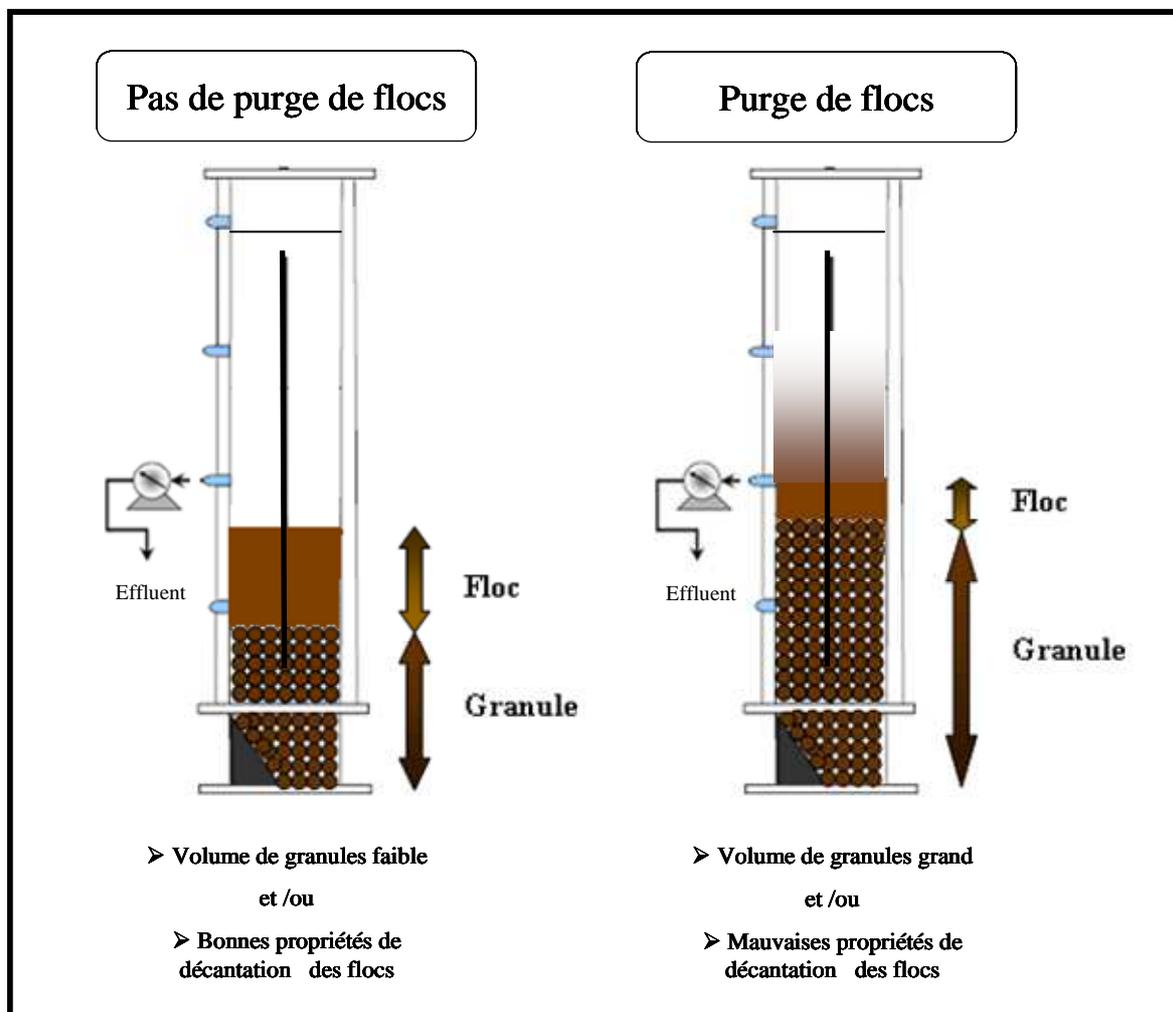


Figure V.2. Répartition des volumes de flocs et de granules dans le GSBP après décantation

Le volume maximal de la biomasse (V_1) retenu dans le réacteur après décantation dépend du ratio volumique d'échange (VER) comme l'indique l'Equation V.2 :

$$V_1 = (1 - VER) \cdot V_R = V_{floc} + V_{granule} \quad \text{Equation V.2}$$

Où V_1 est le volume maximal de boue retenu dans le réacteur après décantation (9L) ; V_R est le volume utile du réacteur (17 L) ; V_{floc} et $V_{granule}$ sont respectivement le volume occupé par les floccs et les granules après décantation (L).

A partir des propriétés de décantation des différents agrégats (IB), la concentration stabilisée dans le réacteur peut être estimée selon l'Equation V.3 :

$$V_1 = \frac{V_R}{1000} (MES_{floc} \cdot IB_{floc} + MES_{granule} \cdot IB_{granule}) = \frac{V_R}{1000} (MES_{boue} \cdot IB_{boue}) \quad \text{Equation V.3}$$

Où IB_{floc} , $IB_{granule}$ et IB_{boue} sont les indices de boue des floccs, des granules et la biomasse hybride respectivement (mL g^{-1}). MES_{floc} , $MES_{granule}$ et MES_{boue} sont les concentrations des matières en suspension des floccs, granules et de la boue hybride respectivement (g L^{-1}).

Ainsi connaissant la proportion volumique des floccs et des granules (%), il est possible d'estimer la concentration des matières en suspension de la boue hybride pouvant être stabilisée dans le réacteur ainsi que ses propriétés de décantation selon les Equations V.4 et V.5, respectivement :

$$MES_{boue} = (1 - VER) \cdot 1000 \cdot \left(\frac{\%floc}{100 \cdot IB_{floc}} + \frac{\%granule}{100 \cdot IB_{granule}} \right) \quad \text{Equation V.4}$$

$$IB_{boue} = \frac{(1 - VER) \cdot 1000}{MES_{boue}} \quad \text{Equation V.5}$$

Où %floc et %granule sont respectivement les proportions respectives en floccs et en granules en volume (%).

L'estimation de la concentration des matières en suspension et de l'indice de boue de la biomasse hybride a été réalisée avec des indices de boue moyens pour les floccs et les granules calculés à partir de l'ensemble des données mesurées (23 mesures) lors de la phase III de fonctionnement du réacteur ($IB_{floc} = 90 \pm 19 \text{ mL g}^{-1}$, $IB_{granule} = 15 \pm 3 \text{ mL g}^{-1}$).

Comme nous le voyons sur la Figure V.3, il existe une très bonne adéquation entre les données de l'estimation par les équations V.4 et V.5 et les données expérimentales aussi bien sur la

concentration des matières en suspension que sur les propriétés de décantation de la boue hybride en fonction du volume de granules. Ceci nous permet de valider une procédure d'estimation des concentrations respectives en MES des floes et des granules au sein de la biomasse hybride en fonction de leurs propriétés respectives de décantation et des ratios de volume imposés entre granules et floes.

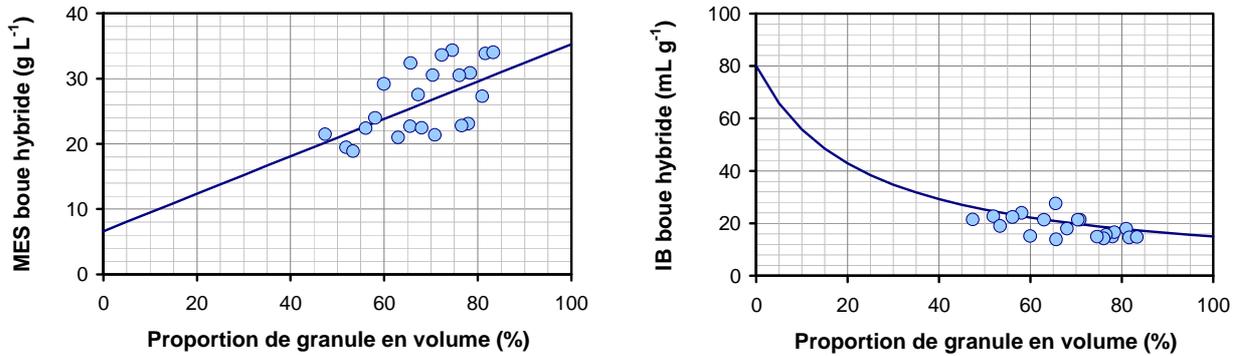


Figure V.3. Evolution des matières en suspension (gauche) et de l'indice de boue (droite) de la biomasse hybride en fonction de la fraction de floes. Données expérimentales (●), estimation (—)

2.2.2 Modélisation physique du système

La procédure de simulation du réacteur GSBP avec la boue hybride a été réalisée en prenant les hypothèses suivantes :

- chaque granule est considéré comme une particule sphérique
- le diamètre de granules est fixé (à la valeur moyenne mesurée expérimentalement) grâce à un modèle de détachement défini comme suit :

$$u_{de} = u_F \left(\frac{L_f}{L_{fmax}} \right)^{10000}, \quad \text{si } u_F > 0, \quad \text{sinon } u_{de} = 0 \quad \text{Équation V.6}$$

Où : L_f est le rayon simulé et L_{fmax} est la valeur de rayon de consigne, u_{de} est la vitesse de détachement et u_F est la vitesse de croissance des granules.

- le nombre de granules (NSP) est calculé à partir de la concentration en matières volatiles en suspension des granules dans le réacteur :

$$NSP = \frac{MVS_{granule} \cdot V_R}{V_{granule} \cdot \epsilon_s \cdot \rho_x} \quad \text{Équation V.7}$$

Où : MVS est la concentration en matières volatiles en suspension ($g L^{-1}$), ϵ_s est la fraction volumique de solide, ρ_x est la densité des granules ($100000 g_{DCO} m^{-3}$ de matrice) et $V_{granule}$ est le volume d'un granule (m^3).

La concentration des granules est ainsi constante au cours du temps, car le volume et la porosité des granules sont maintenus constants.

La présence de floccs au sein de la boue hybride est attribuée à (1) la croissance d'une biomasse planctonique et (2) au détachement de composés particulaires de la surface des granules. La concentration de la biomasse flocculée stabilisée va alors dépendre de son temps de séjour dans le réacteur imposé par le taux de purge. Au cours des simulations la concentration des matières en suspension (floccs) est maintenue constante au moyen d'un système artificiel de régulation. Celle-ci est réalisée de sorte que la concentration des floccs (MVS_{floc}) varie autour d'une concentration de consigne imposée ($MVS_{floc\ consigne}$) par l'application d'un taux de purge (Equation V.8) :

$$Taux\ de\ purge = \frac{1}{\left(\frac{MVS_{floc\ consigne}}{MVS_{floc} + 0,0001} \right)^{100}} \quad \text{Équation V.8}$$

Puis, à partir de la moyenne du taux de purge au cours d'un cycle du réacteur, un âge de boue apparent des floccs est déduit selon l'Equation V.9:

$$Age\ de\ boue = 1 / moyenne (Taux\ de\ purge) \quad \text{Équation V.9}$$

Où : $MVS_{floc\ consigne}$ et MVS_{floc} sont respectivement les concentrations des matières volatiles en suspension des floccs ($g_{DCO} m^{-3}$).

2.3 Initialisation

Lors de la simulation du réacteur GSB, des simulations à long terme sont réalisées : la répartition microbienne au sein des agrégats est initialisée en considérant la concentration des composés particulaires (X_i) constante sur toute l'épaisseur du granule. Le régime stationnaire est considéré atteint lorsqu'il n'y a plus de variation de la distribution des composés particulaires dans les granules (entre 100 et 300 jours selon les simulations).

Pour simuler les essais batch, réalisés en respirométrie, des simulations à court terme sont effectuées en prenant pour initialisation les profils stabilisés des biomasses obtenues par simulation dans le réacteur GSB. L'injection du substrat azoté ($N-NH_4$) est simulée après une phase endogène de 2 heures (conformément aux tests expérimentaux de respirométrie). L'activité de nitrification des agrégats a été étudiée pour une gamme de concentration de l'oxygène allant de 0,5 à 8 $mg\ L^{-1}$. Ces concentrations d'oxygène sont maintenues artificiellement constantes au cours des simulations en imposant une forte valeur du coefficient de transfert de l'oxygène K_{La} ($10^9\ j^{-1}$) et une concentration saturante égale à la valeur de consigne.

3 Résultats

La validation du modèle a été réalisée sur des données expérimentales avec pour critère d'être à même de :

- **décrire les cinétiques biologiques au cours d'un cycle du GSBR:** cela a été réalisé avec une cinétique effectuée lors de la troisième phase de fonctionnement du réacteur au jour 55 (et 719 jour depuis le début).
- **prédire l'effet de l'oxygène dissous sur l'activité de nitrification des agrégats biologiques :** cela a été réalisé avec les tests de respirométrie à différentes concentrations de l'oxygène dissous (effectués au jour 714/50 et présentés dans la partie II du chapitre résultats).

3.1 Cinétiques dans le réacteur GSBR

La Figure V.4 présente la simulation d'une cinétique du réacteur GSBR (réalisée au jour 719/55 de la phase III, $MVS_{\text{boue hybride}} = 15,9 \text{ g L}^{-1}$, $MVS_{\text{granule}} / MVS_{\text{boue hybride}} = 0,85$) et permet de confronter les profils de concentrations simulés et expérimentaux.

La simulation réalisée avec le modèle calibré conduit à une description satisfaisante des cinétiques biologiques. En effet, la bonne adéquation entre les concentrations modélisées et expérimentales de la DCO, nitrates et ammonium (en condition anoxie) suggère que les valeurs de paramètres stœchiométriques ($Y_{H,S}$, Y_{STO} et $Y_{H,STO}$) qui contrôlent les processus de stockage, d'oxydation et de croissance sont cohérentes. On peut d'ailleurs noter que les valeurs des paramètres $Y_{H,S}$ et Y_{STO} obtenus par calibration (0,63 et 0,85 respectivement) sont très proches des valeurs de la littérature 0,68/0,80 (Sin *et al.*, 2005, Vazquez-Padin *et al.*, 2010). On observe un léger décalage entre le profil de diminution de l'azote total simulé et expérimental en période anoxie qui provient du fait que le modèle ne décrit pas l'accumulation de nitrites durant la réaction de dénitrification et surestime la dénitrification pendant la phase d'alimentation non aérée.

Les taux de croissance spécifique maximum des AOB et NOB ont été déterminés par la calibration afin d'ajuster la concentration en ammonium et azote total pendant la phase aérobie. La valeur de ces taux obtenue par calibration ($\mu_{\text{maxAOB}} = 0,6 \text{ j}^{-1}$ et $\mu_{\text{maxNOB}} = 0,81 \text{ j}^{-1}$) est en accord avec les valeurs obtenues dans les procédés à boue activée fonctionnant en alternance de conditions anoxie/aérobie et à une température de 20°C (Katchis *et al.*, 2002, Munz *et al.*, 2011). La vitesse de consommation de l'ammonium simulée bien que légèrement surestimée ($12,5 \text{ mg}_N \text{ L}^{-1}\text{h}^{-1}$), reste néanmoins comparable à celle mesurée expérimentalement ($10,7 \text{ mg}_N \text{ L}^{-1}\text{h}^{-1}$). De plus, l'accumulation et la consommation des nitrites simulés sont en adéquation avec ceux mesurés expérimentalement. La

comparaison du profil de l'azote total simulé et expérimental indique que le modèle surestime la dénitrification en phase aérobie (SND). Ceci est probablement dû à la surestimation du stockage du substrat carboné par le modèle.

Enfin, le profil de l'évolution de l'oxygène dissous durant la phase aérobie simulé est comparable à celui enregistré durant la cinétique du réacteur (Fig V.4 b). Les valeurs de la concentration de l'oxygène dissous stabilisée au cours du palier de nitrification modélisée (5,6 mg L⁻¹) et expérimentale (5,2 mg L⁻¹) sont très proches. L'augmentation prématurée de la concentration de l'oxygène dissous indiquant l'épuisement de la totalité de l'ammonium est dû à la légère surestimation de la vitesse de consommation de l'ammonium par le modèle.

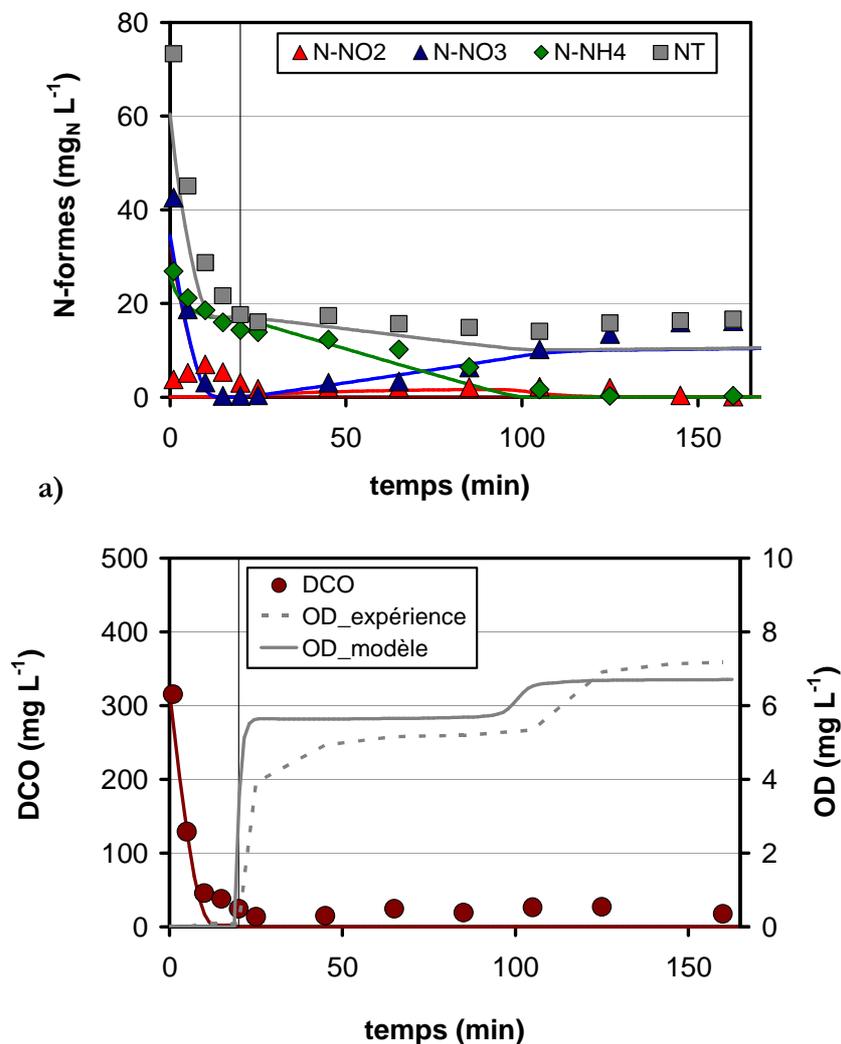


Figure V.4. Evolution de la concentration expérimentale et simulée des formes azotées (a) et de la DCO et l'oxygène (b) au cours d'un cycle du SBAR (jour 719/ 55)

3.2 Essais respirométriques : répartition flocs / granules et effet de la concentration en oxygène dissous sur la nitrification

La Figure V.5 présente l'évolution de l'activité de nitrification (r_{O_2} , AUR et NO_{xAR}) expérimentale et simulée en fonction de la concentration en oxygène dissous. Les simulations ont été réalisées sur le profil stabilisé d'une biomasse hybride (simulation long terme) comportant la même concentration en biomasse et la même proportion de flocs et de granules que celle étudiée expérimentalement (présentée dans la seconde partie du chapitre résultats, $MVS_{\text{boue hybride}} = 15 \text{ g L}^{-1}$, $MVS_{\text{granule}} / MVS_{\text{boue hybride}} = 0,7$). L'activité de nitrification a été simulée pour des concentrations d'oxygène dissous allant de 0,5 à 8 mg L^{-1} tandis que les expériences ont été réalisées avec des concentrations allant de 2 à 5 mg L^{-1} .

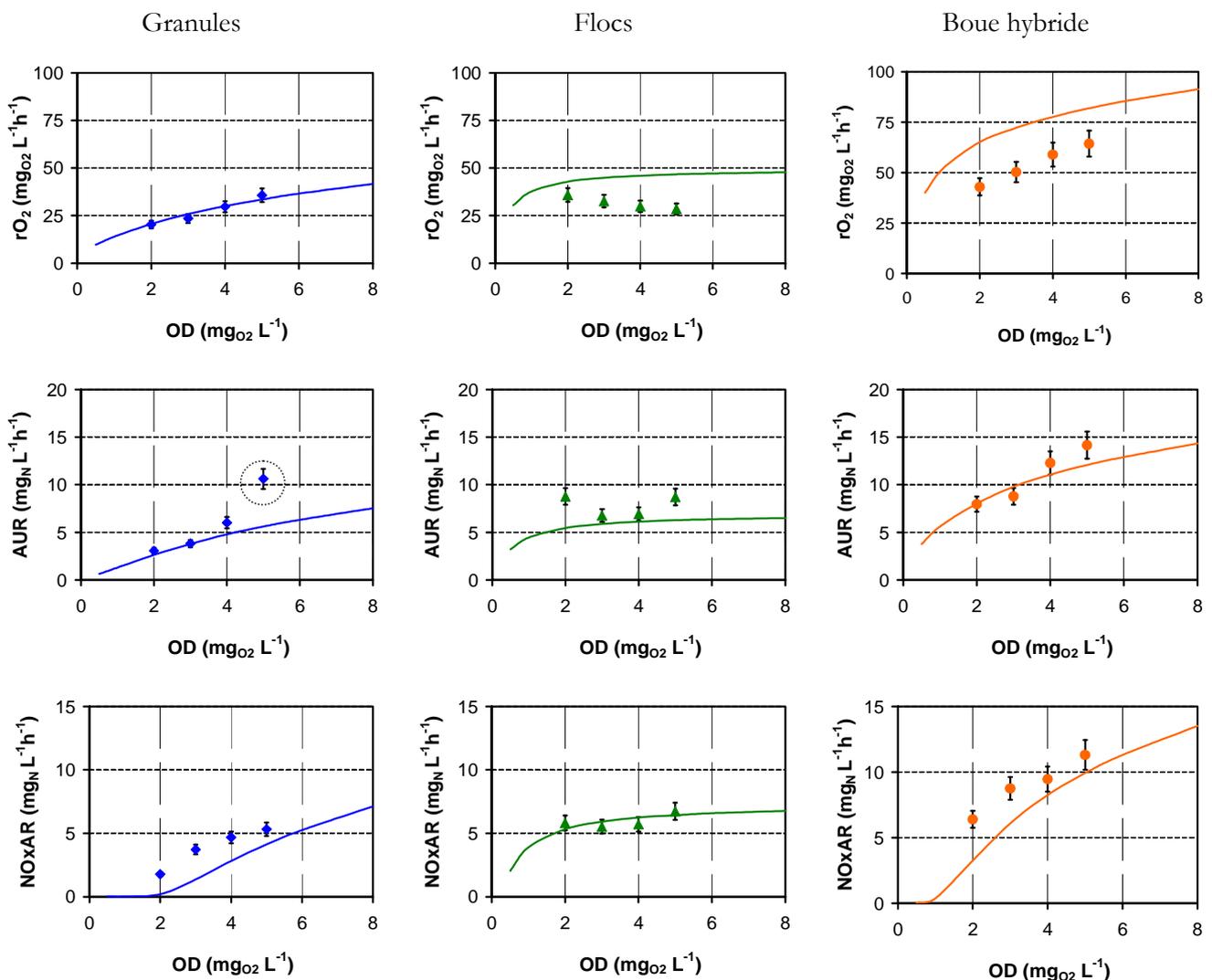


Figure V.5. Modélisation de l'effet de l'oxygène dissous sur l'activité de nitrification des agrégats biologiques. Le cercle reporté sur la figure de l'AUR des granules indique une valeur de l'AUR surestimée à cause du stripping de l'ammonium.

Globalement, le modèle décrit de manière très satisfaisante l'activité de nitrification ainsi que son évolution en fonction de la concentration en oxygène dissous, et ce pour les différents agrégats. On peut observer que la dénitrification dans les granules est légèrement surestimée particulièrement à faible concentration d'oxygène dissous (2 et 3 mg L⁻¹) où la vitesse d'accumulation des NO_x est un peu sous estimée. Ceci est également visible sur la boue hybride puisqu'elle est composée majoritairement de granules ($MVS_{granule}/MVS_{boue} = 0,70$). Comme nous l'avons évoqué précédemment, la surestimation de la dénitrification peut être une conséquence de la surestimation du stockage interne de substrat carboné dans les granules aérobies.

L'estimation de l'activité de nitritation (r_{AOB}) et nitratisation (r_{NOB}) par simulation numérique (Figure V.6) a été réalisée à partir de la vitesse d'accumulation des nitrites (NO₂AR) ainsi que la vitesse d'accumulation des NO_x (NO_xAR) dans la phase liquide (voir chapitre IV, section 3.3.1) et comparée aux résultats expérimentaux.

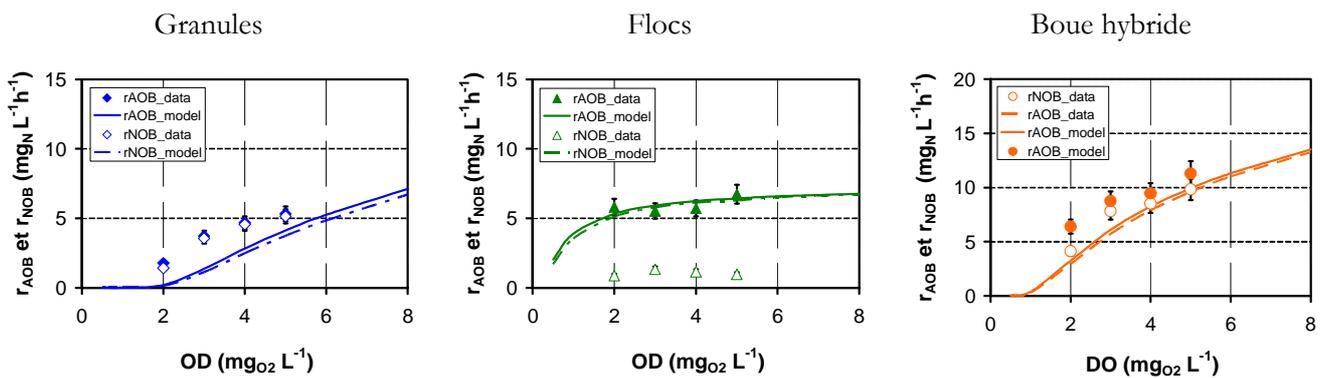


Figure V.6. Modélisation de l'activité de nitritation et nitratisation des agrégats biologiques. Les données expérimentales (data) sont représentées par les puces et les données issues de simulations sont en trait

L'observation de la Figure V.6 indique que le modèle estime correctement les activités de nitritation et nitratisation ainsi que leur évolution en fonction de la concentration d'oxygène dissous dans les granules et dans la boue hybride. Ce résultat est intéressant car il montre que la représentation 1-D permet de donner une représentation satisfaisante des processus de diffusion de l'oxygène et des conséquences sur l'activité nitrifiante.

Par contre contrairement aux résultats expérimentaux, le modèle prédit un maintien de l'activité de nitratisation (r_{NOB}) dans les flocs équivalente à celle de la nitritation. En effet, les différents tests de respirométrie ainsi que le marquage des NOB par la technique FISH (présentés dans le chapitre IV) indiquent une très faible croissance de NOB dans les flocs ($r_{NOB}/r_{AOB} = 0,2$).

3.3 Analyse de la répartition spatiale des bactéries nitrifiantes dans les granules

La Figure V.7 présente et compare les distributions spatiales des bactéries dans les granules aérobies obtenues par simulation numérique et par la technique FISH.

L'observation du profil de distribution des bactéries obtenu par simulation décrit une répartition spatiale des bactéries actives (hétérotrophes, ammonium oxydante et nitrite oxydante) en surface des granules et une accumulation des produits inertes issus de la lyse cellulaire (X_I) dans les couches plus profondes. Cependant, il apparaît que la distribution des AOB est plus étendue que celle des autres espèces puisque les AOB sont présentes dans les couches internes des granules. A contrario, la croissance des bactéries hétérotrophes et nitrite oxydantes se limite à une épaisseur de $1200\mu\text{m}$ de la surface du granule.

Au vu de ces résultats il est clair que le modèle 1-D prédit des distributions d'AOB et de NOB beaucoup plus homogènes que ceux mis en évidence par les observations microscopiques qui font apparaître des clusters de bactéries répartis de manière hétérogène.

Par ailleurs, la distribution modélisée des bactéries AOB semble plus réaliste que celle des NOB. En effet, comme nous l'avons présenté dans le chapitre précédent, les NOB sont détectées dans des zones internes des granules (à environs $250\mu\text{m}$ de la surface) et principalement au cœur à proximité du minéral. Les clusters de bactéries AOB sont plus disséminés dans le biofilm.

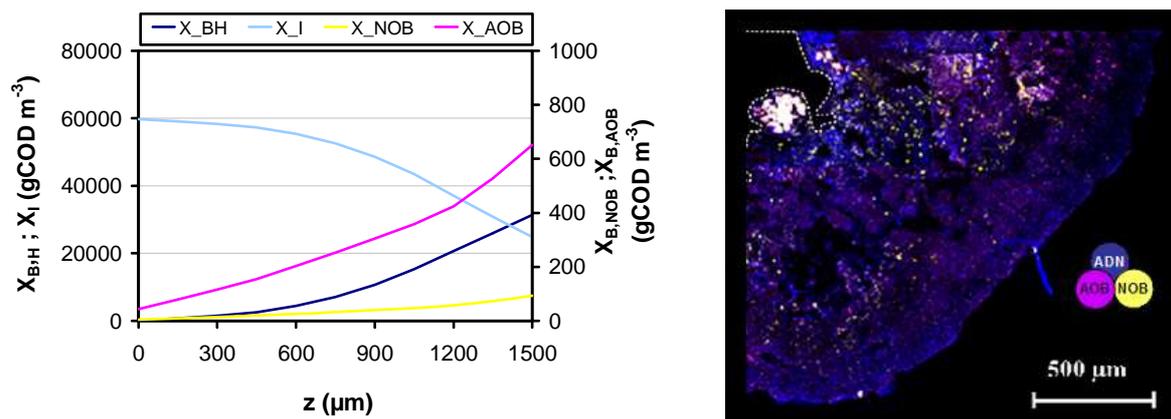


Figure V.7. Comparaison de la distribution spatiale dans les granules obtenue par simulation et par la technique FISH. (au jour 714/50, $MES_{\text{granule}}/MES_{\text{boue}} = 0,7$)

3.4 Discussion et analyse du modèle

La modélisation d'une biomasse hybride comportant une fraction de floccs et de granules nécessite de considérer la spécificité de chaque type d'agrégat (densité, résistance au transfert du substrat et d'oxygène). Le modèle développé et calibré ($Y_{H,S}$, Y_{STO} , μ_{mAOB} , μ_{mNOB}) permet de décrire de manière satisfaisante les grands mécanismes d'élimination de l'azote au sein du réacteur GSBR. De plus, la confrontation des résultats des tests de respirométrie avec les simulations indique que le modèle prédit de manière très correcte l'évolution de l'activité de nitrification (des floccs, granules et de la boue hybride) en fonction de la concentration d'oxygène dissous. Ceci démontre que les phénomènes de diffusion du substrat et de l'oxygène au sein des agrégats ainsi que leur effet sur les cinétiques réactionnelles sont correctement décrits dans le modèle et ce malgré une représentation simplifiée de la structuration spatiale de l'agrégat (modèle 1-D).

En effet, par rapport aux modélisations, l'observation microscopique montre des distributions beaucoup plus hétérogènes des bactéries nitrifiantes certainement influencées par le réseau de macropores dans le biofilm. En ce qui concerne les bactéries NOB le modèle prédit leur présence dans les floccs, ainsi qu'en surface des granules, ce qui n'est pas en accord avec l'expérimentation. Si la présence de macro-pores précédemment évoquée facilite certainement une croissance des NOB en profondeur, une seconde explication pourrait venir de l'inhibition par l'ammoniac libre, que le modèle ne considère pas. Or la concentration en ammoniac libre maximale concordant avec l'augmentation du pH est en moyenne de 3,6 mg L⁻¹. Cette concentration comme nous l'avons évoquée dans le chapitre précédent est au dessus des seuils d'inhibition des NOB reportés dans la littérature. Ceci pourrait donc également expliquer la présence des NOB plus en profondeur dans les granules, dans des zones où la concentration en ammoniac est plus faible. En l'absence d'inhibition, la croissance de NOB est alors favorisée à la fois en surface des granules et dans les floccs. Le modèle pourrait donc être adapté pour intégrer l'inhibition mais cela nécessiterait également une modélisation de l'évolution du pH dans le réacteur, ce qui n'a pas été abordé dans cette thèse.

4 Effet des paramètres opératoires sur la nitrification et la dénitrification dans le procédé hybride

4.1 Variation de la proportion de floccs et de granules

Comme nous l'avons vu dans le chapitre précédent, la variation de proportion de floccs et de granules dans la boue hybride peut influencer significativement les cinétiques de nitrification et dénitrification. Par conséquent l'étude de l'influence de l'évolution de la fraction de floccs et de

granules sur les performances du procédé et sur les distributions microbiennes a été réalisée par simulation numérique.

Les hypothèses sur lesquelles se basent ces simulations sont :

- le volume total de la boue hybride est le volume maximal de boue retenu dans le réacteur après décantation (9 L pour VER = 47 %),
- le diamètre des granules qui, correspond à celui des granules développés lors de la troisième phase de fonctionnement du GSBR, est maintenu constant pour toutes les simulations ($d = 3 \text{ mm}$),
- le volume des floccs varie de 0L (boue purement granulaire) à 9 L (boue purement flocculée). Ainsi 7 différentes configurations de boues hybrides ont été étudiées,
- la concentration des matières volatiles en suspension de chaque agrégat a été calculée à partir de la concentration de matières en suspension en appliquant un ratio MVS/MES de 0,67 et 0,77 pour les granules et les floccs, respectivement.

Les différentes configurations de la boue hybride étudiées sont regroupées dans le Tableau V.8. L'âge de boue apparent des floccs correspondant à une biomasse purement flocculée est de 5,8 jours, alors qu'il tend vers zéro pour une biomasse purement granulaire. Entre ces deux cas extrêmes, cinq cas de boue hybride sont proposés pour lesquels l'âge des boues apparent des floccs varie de 0,9 jour à 5,6 jours.

Remarque :

Afin de faciliter la lecture des résultats, seules les données relatives aux âges de boue de 0 jour (0/9) ; 2,7 (3/9) jour et 5,8 (9/9) jour seront présentées. Cependant, la totalité des résultats obtenus avec les différents âges de boue étudiés est présentée sur la Figure AI.1 (Annexe I).

4.1.1 *Cinétiques et performances du procédé*

La Figure V.8 présente trois cinétiques du GSBR réalisées avec une biomasse qui ne contient que des granules (a), que des floccs (c) et un mélange des deux (b); et le Tableau V.8 présente l'évolution de la concentration des matières volatiles en suspension et des vitesses de nitrification et dénitrification ainsi que le rendement de traitement de l'azote total en fonction de la fraction de floccs dans la boue hybride.

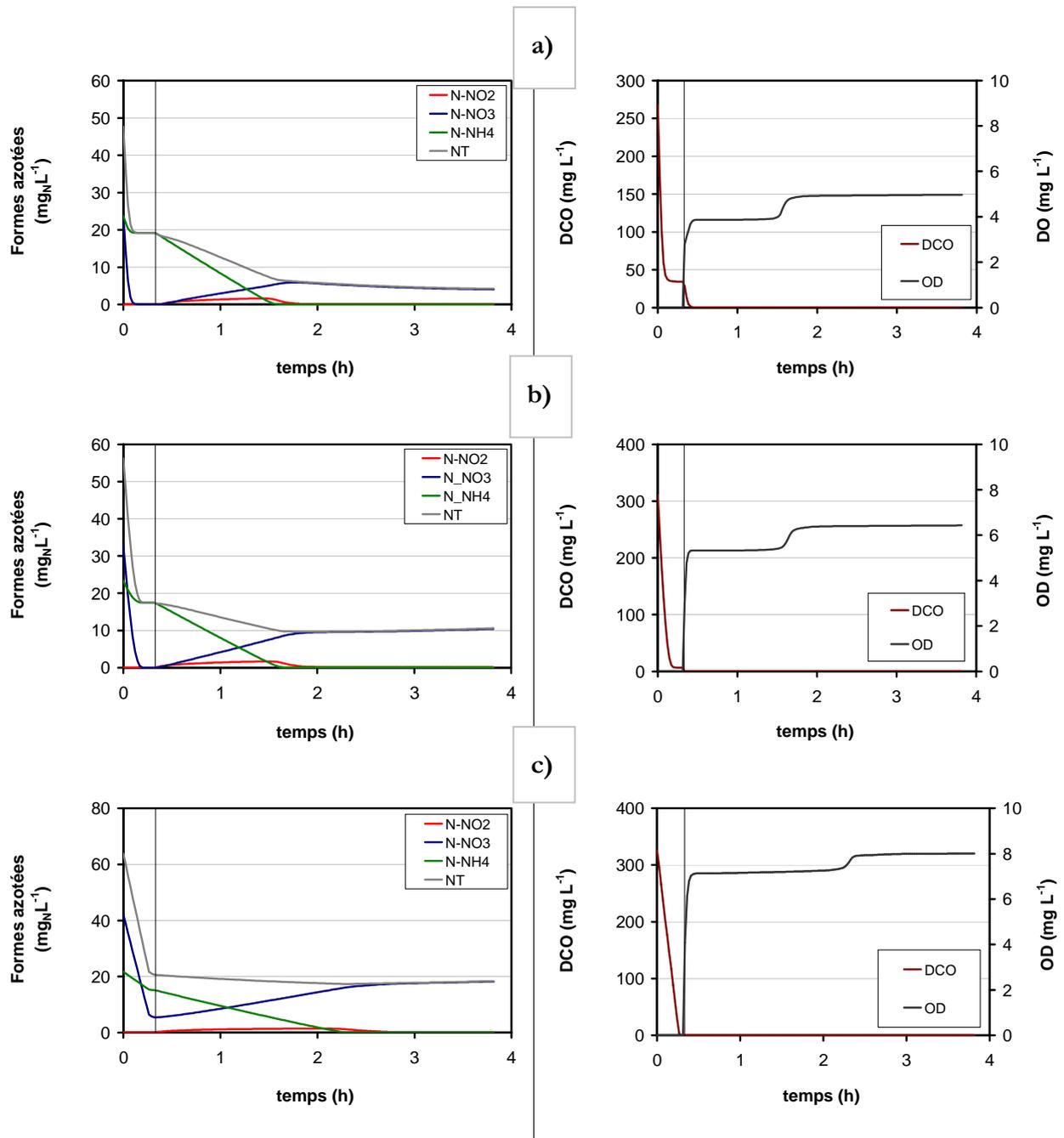


Figure V.8. Evolution des formes azotées (à gauche) et de la DCO et de l'oxygène dissous (à droite) au cours d'une cinétique du SBAR pour différentes fractions de floes : a) 0/9, b) 3/9 et c) 9/9

Globalement, l'augmentation de la fraction de granules dans la boue permet de stabiliser des concentrations de plus en plus élevées de biomasse active dans le réacteur. Ainsi, la concentration (en MVS) stabilisée dans le cas d'une boue purement granulaire est de 24 g L⁻¹ contre seulement 4,5 g L⁻¹ pour une boue floculée (Tableau V.8). De ce fait la comparaison des Figures a, b et c indique que l'augmentation de la fraction de granules accélère théoriquement les vitesses de nitrification et dénitrification. Dans ces simulations la vitesse de consommation des nitrates en anoxie (NO₃UR), de

131 mg N L⁻¹ h⁻¹ pour la boue floculée augmente jusqu'à atteindre une valeur de 306 mg N L⁻¹ h⁻¹ pour la boue granulaire pure. La vitesse de consommation de l'ammonium en conditions aérobies (AUR) de la boue purement granulaire (15,8 mg N L⁻¹h⁻¹) est presque deux fois celle de la boue floculée (8,4 mg N L⁻¹h⁻¹).

La présence de larges zones anoxies dans les granules favorisées à la fois par la structure dense des granules et par la faible concentration de l'oxygène dissous dans le liquide (comparativement à celle stabilisée dans le cas de la boue floculée) favorise la nitrification dénitrification simultanée lors de la phase aérobie. Ainsi, le rendement de traitement de l'azote total augmente avec la fraction de granules dans la boue hybride.

Tableau V.8. Récapitulatif des paramètres d'initialisation et des résultats de simulations

	Fraction de flocs en volume/Fraction de granules	0/100%	1/9	3/9	5/9	7/9	8/9	100%/0
Paramètres d'initialisation	Θ_b flocs (j)	0	0,9	2,7	3,9	5,2	5,6	5,8
	MVS _{floc} (g L ⁻¹)	0	0,5	1,5	2,5	3,5	4,0	4,5
	MVS _{granule} (g L ⁻¹)	23,6	21,0	15,8	10,5	5,2	2,6	0
	MVS _{boue hybride} (g L ⁻¹)	23,6	21,5	17,3	13,0	8,7	6,7	4,5
Résultats	OD* (mg L ⁻¹)	3,8	4,4	5,3	6	6,7	6,9	7,9
	AUR (mg N L ⁻¹ h ⁻¹)	15,8	15,4	13,8	11,9	9,9	8,9	8,4
	NO ₃ UR (mg N L ⁻¹ h ⁻¹)	306	273	210	181	167	149	131
	Rendement NT' (%)	97,2	95,0	92,9	92,1	91,0	89,7	87,8

*Concentration de l'oxygène dissous stabilisée dans le liquide lors du palier de nitrification.

4.1.2 Composition de la biomasse et répartition microbienne

L'évolution de la répartition spatiale des composés particuliers en fonction de la fraction de flocs dans la boue hybride sont présentées sur la Figure V.9. Les concentrations des composés particuliers stabilisées dans les flocs et les granules pour chacune des configurations de la boue hybride sont résumées dans le Tableau présenté en Annexe I.

L'analyse de la répartition spatiale des composés particuliers dans les granules aérobies indique que plus la fraction de flocs est grande et plus la répartition des bactéries actives est étendue. En particulier la répartition des AOB (en rouge) qui sont principalement en surface dans la boue granulaire pure (Fig. a) est plus étendue dans le cas d'une boue hybride développée avec un volume maximum de flocs ayant un âge de boue de 5,6 jour (Fig. c). Cela peut s'expliquer par le fait que l'augmentation de la proportion de flocs, qui sont propices à accueillir des espèces à taux de

croissance élevée (hétérotrophes), favorise la présence des bactéries à faible taux de croissance dans les granules (Voir Tableau AI.3). Ces résultats sont en accord avec ceux de Ochoa *et al.* (2002) et Artiga *et al.* (2005) qui montrent que dans un système hybride la croissance des bactéries hétérotrophes majoritaire dans les flocs permet la croissance espèces nitrifiantes dans les biofilms.

Cette simulation confirme (comme le suggèrent les résultats du chapitre précédent) que les limitations au transfert de l'oxygène dissous sont plus importantes dans les agrégats denses tels que les granules et que celles-ci limitent fortement la nitrification et donc la croissance des bactéries nitrifiantes.

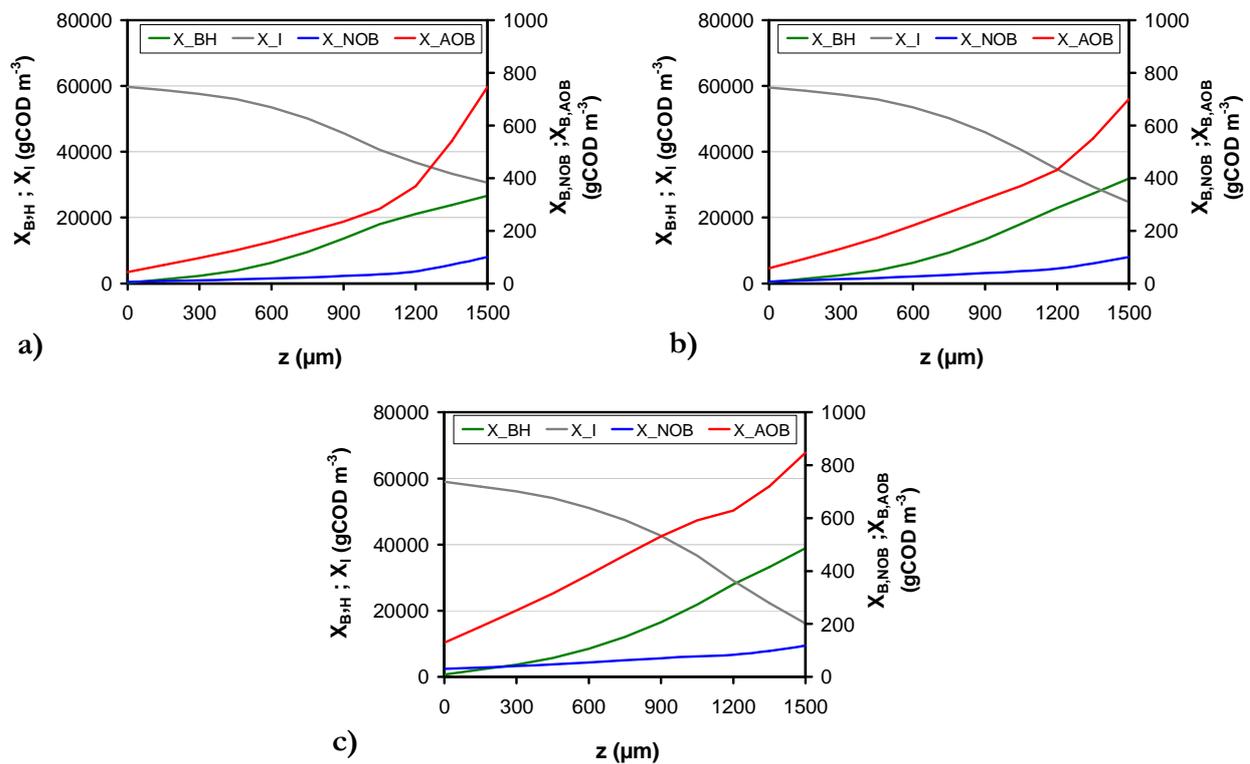


Figure V.9. Profil de concentration de la biomasse dans les granules pour différentes fractions de flocs :a) 0/9 b) 3/9 et c) 8/9

4.1.3 Effet de l'oxygène dissous sur l'activité de nitrification

Dans cette partie nous nous sommes intéressés à l'étude de la robustesse de la nitrification des différentes boues hybrides à des diminutions temporaires de la concentration d'oxygène dissous. Des simulations ont donc été réalisées en considérant une boue dont la répartition des populations a été stabilisée sur le long terme et dans laquelle les granules, lorsqu'il y en a, ont un diamètre de 3 mm. L'évaluation de l'activité de nitrification a été estimée à partir de la vitesse de consommation de l'ammonium (AUR) pour des concentrations de l'oxygène dissous allant de 0,5 à 8 mg L⁻¹.

L'observation de la Figure V.10 indique que plus la concentration d'oxygène dissous est grande et plus la vitesse de nitrification augmente avec la fraction de granules dans la boue hybride. Ceci suggère que l'on a un bénéfice des granules sur la vitesse de nitrification uniquement si la concentration en oxygène dissous est supérieure à 2 mg L⁻¹. En dessous de cette concentration, l'augmentation de la concentration des bactéries AOB est compensée par les limitations au transfert de l'oxygène.

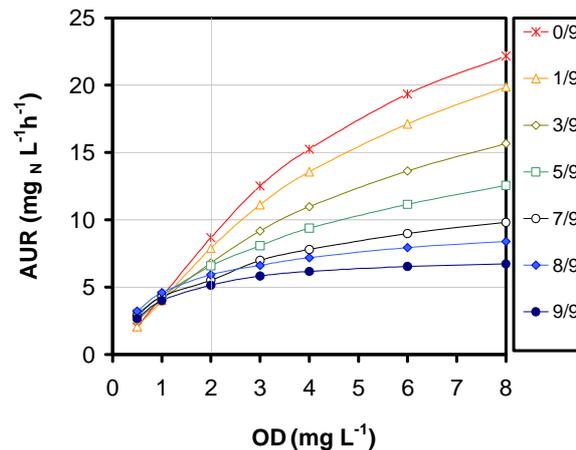


Figure V.10. Evolution de la vitesse de nitrification en fonction de la concentration d'oxygène dissous pour différentes fractions de flocculation dans la boue hybride, en supposant le diamètre des granules constant ($d=3$ mm)

4.2 Analyse et discussion de la variation de la proportion de flocculation et de granules

La modélisation de la variation de la proportion de flocculation et de granules dans la boue hybride indique que l'augmentation de la proportion de granules permet de stabiliser des concentrations croissantes en biomasse active dans le procédé et augmentent de fait les vitesses de nitrification et dénitrification. Parallèlement l'augmentation de la fraction de granules permet de traiter plus efficacement l'azote du fait de l'augmentation de la nitrification dénitrification simultanée. Ainsi, ces résultats suggèrent qu'il est préférable de favoriser la croissance de biomasse densifiée dans le procédé et limiter celle des flocculation.

Cependant, la réalité expérimentale ne confirme que partiellement ces observations. En effet l'augmentation de l'activité de dénitrification (NO_3UR) avec la proportion de granules est bien vérifiée expérimentalement. Cependant, comme le montre la Figure V.11 (a), l'augmentation de l'activité de nitrification est quant à elle démentie par le suivi du fonctionnement SBAR sur les trois phases.

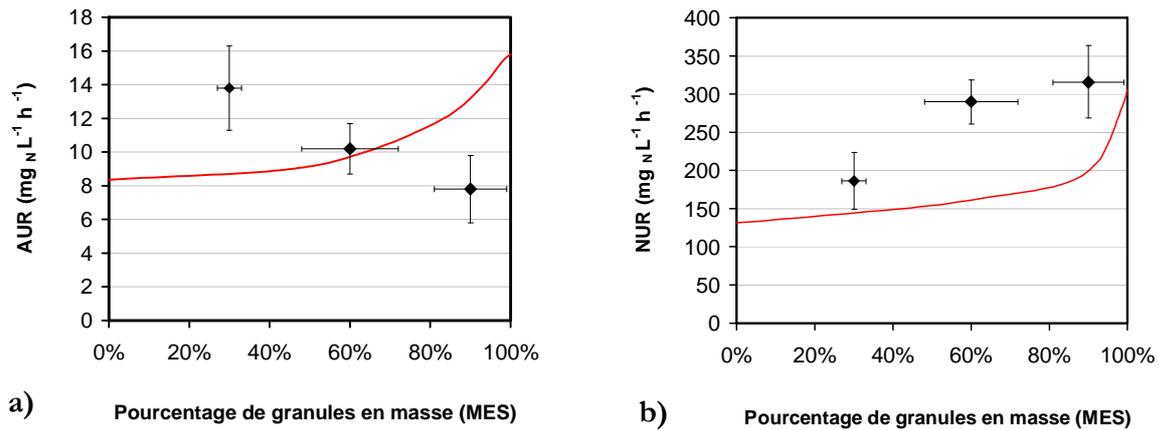


Figure V.11. Evolution de la vitesse de nitrification (a) et dénitrification (b) en fonction de la proportion de granules en masse pour une même taille de granule ($d=3$ mm). Les points correspondent à la moyenne de la vitesse de nitrification et dénitrification mesurée aux trois phases du réacteur, les barres indiquent l'ampleur de la variation des vitesses.

En effet, la simulation ne traduit pas la diminution de l'activité de nitrification lors de l'augmentation de la proportion des granules en masse dans la boue hybride. Cependant, il est à noter qu'au cours des différentes phases du GSB_R, nous avons également observé un changement du diamètre des granules qui n'est pas considéré dans ces simulations puisque elles ont toutes été réalisées avec un diamètre constant. Ainsi, on peut penser que le modèle sous estime l'activité de nitrification lors de la première phase car il surestime les limitations au transfert de l'oxygène dans les granules aérobies du fait du diamètre des agrégats imposé. En effet, durant la phase I, le diamètre moyen des granules variait 280 et 550 μm alors que celui employé lors des simulations est de 3 mm.

Dans le but d'étudier l'effet du diamètre sur les limitations au transfert d'oxygène et donc sur les performances résultantes, une étude de sensibilité de l'activité de nitrification au diamètre des granules a été réalisée. Les résultats de cette étude sont présentés ci-dessous.

4.2.1 Effet du diamètre des granules

Les simulations ont été réalisées en considérant une boue purement granulaire développée avec différents diamètres de granules. La concentration des MVS de la boue granulaire est de 20 g L⁻¹, les diamètres étudiés (500 μm , 1200 μm et 2500 μm) correspondent à la taille caractéristique des granules lors des trois phases de fonctionnement du réacteur R1 (voir chapitre IV).

La Figure V.12 présente l'évolution de la vitesse de consommation de l'ammonium en fonction du diamètre des granules. Les profils d'oxygène et des bactéries dans les agrégats pour chaque configuration sont présentés sur la Figure V.13. Le profil de l'évolution de la concentration en

oxygène dissous dans la phase liquide lors d'une cinétique dans le réacteur est présenté sur la Figure AI.3 (Annexe 1).

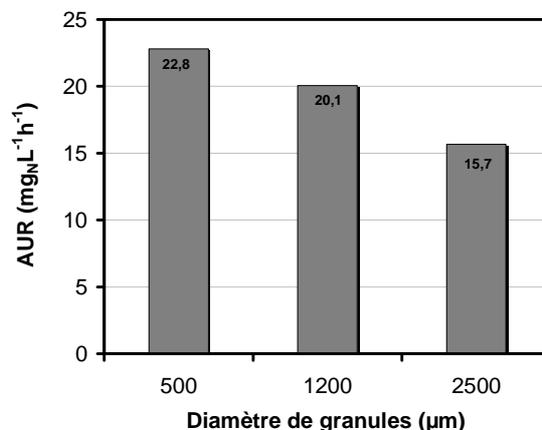


Figure V.12. Modélisation de l'effet de la taille des granules sur la vitesse de nitrification. Simulations à long terme pour une concentration de granules constante de 20 g L^{-1} et un $K_{\text{La}} = 1000 \text{ j}^{-1}$ ($d = 3 \text{ mm}$)

Pour un diamètre de granule de $500 \mu\text{m}$, les limitations au transfert de l'oxygène sont très faibles puisque ce dernier diffuse sur la totalité du granule et ce même en présence d'ammonium dans la phase liquide. Cependant du fait de la forte activité de nitrification ($\text{AUR} = 22,8 \text{ mg}_\text{N} \text{ L}^{-1}\text{h}^{-1}$) la concentration de l'oxygène stabilisée dans la phase liquide et donc dans le granule est faible (moins de 2 mg L^{-1}). Celle-ci est néanmoins assez élevée pour inhiber la SND au cœur des granules. Lorsque l'ammonium est épuisé (après 1h), la concentration en oxygène dissous augmente dans le granule pour atteindre une concentration de $4,5 \text{ mg L}^{-1}$. La répartition spatiale des bactéries est homogène dans le granule ce qui indique une non limitation par l'oxygène. Ces résultats sont en accord avec les travaux de Li *et al.* (2008), qui indiquent l'absence de zones anaérobies dans les granules avec un rayon inférieur à $500 \mu\text{m}$.

Pour des diamètres d'agrégats de $1200 \mu\text{m}$ et $2500 \mu\text{m}$ durant le plateau de nitrification le profil simulé de concentration en oxygène dans le biofilm indique que ce dernier ne diffuse que sur une partie des granules. La profondeur de diffusion de l'OD est de $300 \mu\text{m}$ et $250 \mu\text{m}$ pour les rayons de $600 \mu\text{m}$ et $1250 \mu\text{m}$, respectivement. L'observation du profil de l'azote total indique la présence de SND au cœur des granules. La répartition spatiale des bactéries actives dans ces granules est moins homogène que celle observée pour le diamètre de $500 \mu\text{m}$. De fait, la nitrification dans ces agrégats n'est réalisée efficacement que par la fraction de bactéries autotrophes située dans ces zones suffisamment aérées. En conséquent, la vitesse de consommation de l'ammonium diminue théoriquement de 12% et 28% pour les rayons de $1200 \mu\text{m}$ et $2500 \mu\text{m}$, respectivement.

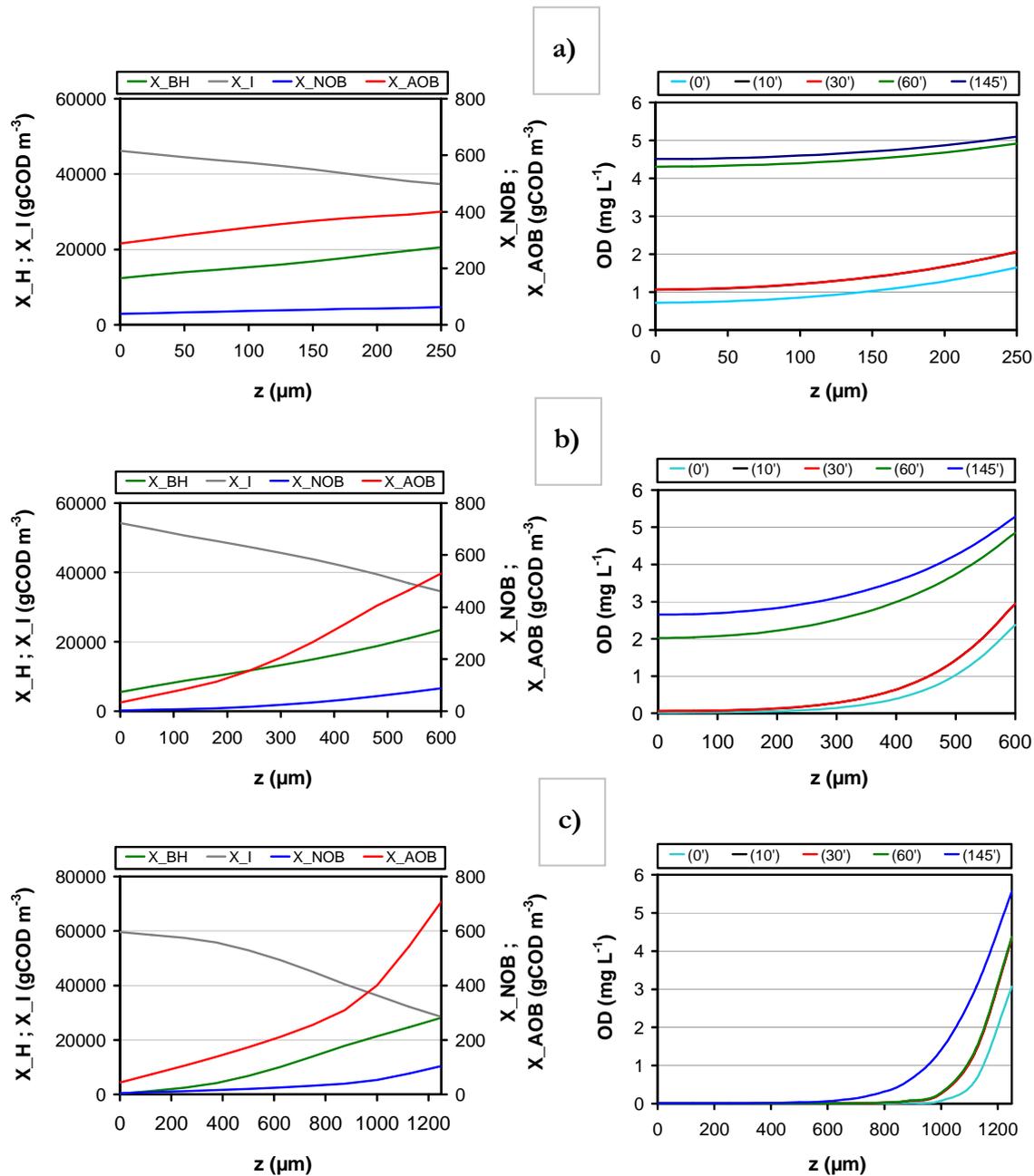


Figure V.13. Evolution de la concentration des composés particulaires (gauche) et de l'oxygène (droite) en fonction du rayon des granules : a) 250µm, b) 600µm et c) 1200µm

Ces résultats confirment que l'augmentation du diamètre des granules engendre des limitations croissantes au transfert d'oxygène qui limite la vitesse de nitrification.

Au vu des conclusions du chapitre précédent mettant en évidence une corrélation entre proportion de floes et taille des granules ainsi qu'une synergie entre ces agrégats, ces deux paramètres peuvent difficilement être dissociés. Aussi, une simulation a été réalisée avec les caractéristiques moyennes (en terme de rapport floes/ granule et de taille des granules) des trois configurations distinctes de boues hybrides développées au cours de notre étude.

4.2.2 Effet de la variation combinée de la proportion de granules et de leur diamètre

Afin d'évaluer l'effet combiné de l'augmentation de la fraction de granules et de leur taille sur les vitesses de nitrification et dénitrification du procédé GSBP, trois configurations de boue hybride dont les caractéristiques moyennes sont celles observées expérimentalement ont été étudiées. Les caractéristiques des différentes boues hybrides sont les suivantes :

- **Phase I** : la proportion en masse des granules (MES) n'est que de 30%, le diamètre de granules aérobies est de 500 μm .
- **Phase II** : la proportion en masse des granules est de 70%, le diamètre est de 1200 μm .
- **Phase III** : la proportion en masse des granules est de 90% et le diamètre est de 2500 μm .

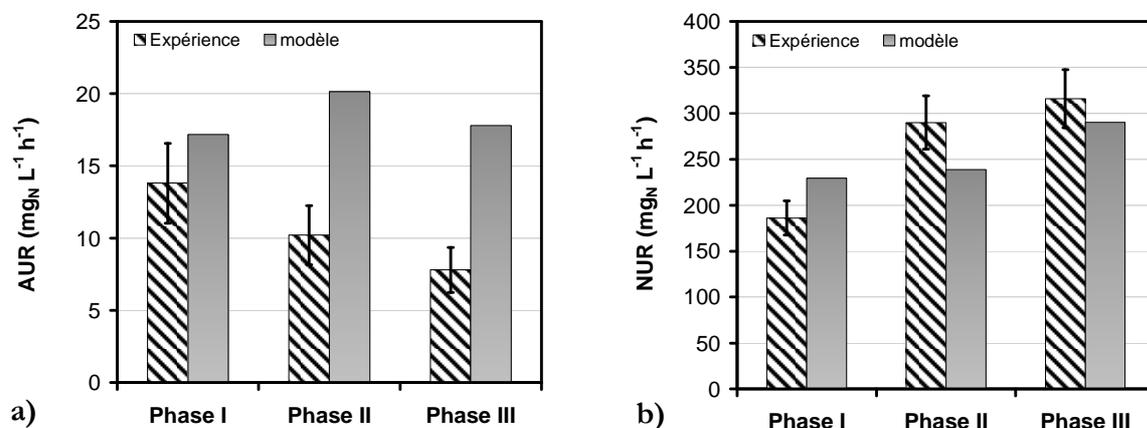


Figure V.14. Evolution de l'activité de nitrification (a) et dénitrification (b) modélisée et expérimentale selon les caractéristiques de la boue hybride développée à différentes phases du GSBP

Comme l'indique la Figure V.14 (b), le modèle décrit de manière satisfaisante l'augmentation de la vitesse de dénitrification avec l'augmentation de la proportion de granules et de leur diamètre. De plus, il est à noter que les valeurs des vitesses de dénitrification obtenues par simulation sont du même ordre de grandeur que celles mesurées expérimentalement. Ceci confirme le fait que le modèle prédit de manière correcte l'augmentation de la concentration de bactéries hétérotrophes avec l'augmentation de la fraction de granules dans la boue hybride.

Concernant l'évolution de l'activité de nitrification, on peut voir (Figure V.14 a) que le modèle prédit une augmentation de l'activité de nitrification lors de la phase II et sa diminution lors de la phase III. L'effet (négatif) de l'augmentation de taille des granules sur la vitesse de nitrification s'oppose donc à l'effet (positif) de l'augmentation de la concentration en biomasse nitrifiante. Ainsi, il apparaît que l'augmentation de la concentration en biomasse autotrophes lors de la phase III ne se traduit pas forcément par l'augmentation de l'activité de nitrification. Comme il a été suggéré dans le chapitre précédent et confirmé par les simulations numériques, ceci s'explique par l'augmentation des

limitations au transfert d'oxygène avec la taille des granules qui limitent la profondeur de diffusion d'oxygène dans les granules. La nitrification ne sera alors réalisée que par une fraction limitée des populations nitrifiantes.

Le décalage observé entre les valeurs de vitesses de nitrification expérimentales et simulées indique une mauvaise corrélation entre le diamètre des granules et le niveau de résistance au transfert de masse d'oxygène résultant. En effet, pour un diamètre de granules inférieur à 500 μm les limitations au transfert d'oxygène sont faibles et dans ces cas, le modèle prédit une activité de nitrification du même ordre de grandeur que celle mesurée expérimentalement. Cependant, lorsque le diamètre des granules dépasse cette taille caractéristique, le modèle surestime l'activité de nitrification certainement parce que les limitations au transfert d'oxygène sont sous estimées. Il apparaît donc, que l'obtention de vitesses de nitrification comparables à celles des phases II et III nécessiterait de mieux calibrer les paramètres modifiant ces propriétés de pénétration (porosité, taille, ...).

Quoi qu'il en soit, il est nécessaire de considérer simultanément le ratio floc/granules et la taille des granules si l'on veut représenter au mieux le fonctionnement d'un tel système. Ainsi, il semble donc important de s'attarder sur les mécanismes qui contrôlent la taille des granules dans ce système.

4.2.3 Analyse des mécanismes contrôlant la taille caractéristique des biofilms

La taille caractéristique d'un biofilm dépend de sa vitesse d'expansion et de la vitesse de détachement surfacique comme l'indique l'Equation V.10:

$$\frac{dL_F}{dt} = u_F(L_F) - u_d \quad \text{Équation V.10}$$

Où $\frac{dL_F}{dt}$ est la variation de l'épaisseur du biofilm au cours du temps, $u_F(L_F)$ est la vitesse d'expansion du biofilm (m j^{-1}), correspondant à la différence entre les vitesses de croissance et de décès de la biomasse et u_d est la vitesse de détachement surfacique de particules (m j^{-1}).

Ainsi, à l'état d'équilibre la taille caractéristique des biofilm (épaisseur) résulte d'un équilibre entre les phénomènes d'expansion du biofilm et de détachement. Dans les réacteurs granulaires de type colonne à bulles ou air lift, le détachement est causé par la présence de contraintes de cisaillement provenant de la circulation de la phase liquide et de la collision entre particules (Ren *et al.*, 2009, Zima-Kulisiewicz *et al.*, 2008). Les phénomènes de croissances de la biomasse sont quant à eux directement liés au flux de substrat comme l'indique l'Equation V.11:

$$\frac{dL_F}{dt} = \frac{Y J_{LF}}{X_F} - bL_F - u_d \quad \text{Équation V.11}$$

Où Y est le rendement de conversion ($\text{gDCO}_x \text{g}^{-1} \text{DCO}$), J_{LF} est le flux de substrat à la surface du biofilm ($\text{g m}^{-2} \text{j}^{-1}$), X_F est la densité de la biomasse au sein du biofilm (g DCO m^{-3}) et b est le taux de décès (j^{-1}).

Au cours de cette étude dans le but de maintenir le réacteur en conditions stabilisées, la composition ainsi que la charge organique volumique ont été maintenues constantes. Puisque la vitesse superficielle de gaz a été augmentée durant la phase II (jour 451) et que la concentration de la biomasse n'a cessé d'augmenter au cours de l'étude, à priori les contraintes de détachements au sein du réacteur non pas diminuées. De fait, on peut penser que l'augmentation de la taille et de la proportion de granules est donc causée par une augmentation de leur charge surfacique (selon l'Equation V.11). Et cette augmentation peut s'expliquer par le lessivage ponctuel ou continu des floes. Logiquement, la diminution des floes dans le réacteur augmente la charge de substrat dégradée par les granules, ce qui catalyse leur croissance.

De ce fait, il apparaît que la comparaison de différentes boues hybrides comprenant des fractions de floes et de granules variables mais avec un diamètre de granules constant, n'est peut être pas représentative de la dynamique d'évolution de la biomasse hybride et donc de son activité. Une meilleure description de cette dynamique nécessiterait de mieux décrire les mécanismes de détachement ayant lieu à la surface des granules.

Le détachement surfacique est décrit dans la littérature par de nombreux modèles qui lient le détachement à différents mécanismes : une contrainte de cisaillement (Derlon, 2008), l'épaisseur du biofilm (Elenter *et al.*, 2007, Wanner et Gujer, 1985) et le taux de consommation du substrat (Peyton et Characklis, 1993, Tijhuis *et al.*, 1995). Cette dernière approche semble être celle qui permettrait de décrire la dynamique de l'évolution des propriétés des granules en fonction de la fraction de floes et de granules stabilisée dans le réacteur.

5 Conclusions

Dans ce chapitre, un modèle mathématique permettant de décrire les phénomènes réactionnels ayant lieu au sein d'une biomasse hybride comprenant une fraction de granule et de floes a été développé.

Avec un effort de calibration relativement faible sur uniquement 4 paramètres ($Y_{H,S}$, Y_{STO} , μ_{mAOB} et μ_{mNOB}), les résultats obtenus indiquent que le modèle décrit de manière très correcte :

1. les cinétiques macroscopiques dans le réacteur fonctionnant avec une biomasse hybride.
2. l'effet d'une variation de la concentration en oxygène sur l'activité de nitrification des différents agrégats.

3. la répartition de l'activité des bactéries AOB entre les floes et les granules.
4. l'effet de la variation de la proportion de floes et granules sur la concentration totale en biomasse et sur la vitesse de dénitrification (hétérotrophe).

Cependant, certains phénomènes observés expérimentalement ne sont pas encore décrits par ce modèle et pourront faire l'objet d'une amélioration future :

1. l'absence de croissance des bactéries NOB dans les floes dans les conditions testés, probablement due à l'inhibition par l'ammoniac.
2. la diminution de la vitesse de nitrification avec la diminution de la teneur en floes, qui est attribuée à l'augmentation de diamètre des granules et aux limitations au transfert d'oxygène associées.

Une perspective intéressante à ce travail serait donc de considérer dans le modèle ces phénomènes d'inhibition par l'ammoniac libre et de confronter les résultats relatifs à la répartition de l'activité de nitrification dans les floes et granules avec les résultats de ce chapitre. Une autre perspective serait de décrire autrement les phénomènes de détachements. Ces derniers ne devraient plus être décrits comme des phénomènes continus visant à compenser la croissance afin de maintenir le diamètre des granules constant.

Par ailleurs, nos résultats suggèrent que la maîtrise du diamètre des granules qui est généralement imposé par les contraintes hydrodynamiques, peut également être réalisée indirectement en modifiant la fraction de floes au sein de la boue. Le maintien d'une fraction de floes dans le réacteur permet donc de maintenir une vitesse de nitrification plus élevée, en limitant les phénomènes de résistance au transfert de l'oxygène inhérents aux granules. Le choix d'un rapport floe/granule résulte donc d'un compromis entre la nécessité de maximiser l'activité hétérotrophe de dénitrification mais aussi celle de la nitrification.

Références

- AFNOR, 1994. Recueil de normes française-Qualité de l'eau.
- Alleman, J. E. (1985) Elevated Nitrite Occurrence in Biological Waste-Water Treatment Systems, *Water Science and Technology* 17 (2-3), 409-419.
- Artiga, P., V. Oyanedel, J. M. Garrido and R. Mendez (2005) An innovative biofilm-suspended biomass hybrid membrane bioreactor for wastewater treatment, *Desalination* 179 (1-3), 171-179.
- Comeau, Y and Takacs, I (2008) Schematic Representation of Activated Sludge Models, Proceeding WEFTEC : Session 41 through Session 50 , pp. 3266-3282(17).
- Derlon, N. (2008) Analyse de la compétition microbienne entre bactéries autotrophes et hétérotrophes au sein d'un biofilm éliminant l'azote (thèse). LISBP. INSA de Toulouse.
- Elenter, D., K. Milferstedt, W. Zhang, M. Hausner and E. Morgenroth (2007) Influence of detachment on substrate removal and microbial ecology in a heterotrophic/autotrophic biofilm, *Water Research* 41 (20), 4657-4671.
- Gujer, W., M. Henze, T. Mino and M. van Loosdrecht (1999) Activated sludge model No. 3 (vol 39, pg 183, 1999), *Water Science and Technology* 39 (12), Ar1-Ar1.
- Henze, M., C. L. P. Grady, W. Gujer, G. V. R. Marais and T. Matsuo (1987) Activated sludge Model N0.1. IAWPRC Scientific and Technical Report N0.1. IAWPRC, London,
- Henze, M., W. Gujer, T. Mino and M. C. Loosdrecht (2000) Activated Sludge Models. ASM1,ASM2,ASM2d and ASM3, *IWA Publishing*
- Katehis, D., J. Fillos and L. A. Carrio (2002) Comparison of bench scale testing methods for nitrifier growth rate measurement, *Water Science and Technology* 46 (1-2), 289-295.
- Koch, G., H. Siegrist, M. Kuhni and W. Gujer (2000) Calibration and validation of Activated Sludge Model No. 3 for Swiss municipal wastewater, *Water Research* 34 (14), 3580-3590.
- Li, Y., Y. Liu, L. Shen and F. Chen (2008) DO diffusion profile in aerobic granule and its microbiological implications, *Enzyme and Microbial Technology* 43 (4-5), 349-354.
- Manser, R., H. Siegrist and W. Gujer (2005) Consequences of mass transfer effects on the kinetics of nitrifiers, *Water Research* 39 (19), 4633-4642.
- Munz, G., C. Lubello and J. A. Oleszkiewicz (2011) Factors affecting the growth rates of ammonium and nitrite oxidizing bacteria, *Chemosphere* 83 (5), 720-725.

- Ni, B. J., H. Q. Yu and Y. J. Sun (2008) Modeling simultaneous autotrophic and heterotrophic growth in aerobic granules, *Water Research* 42 (6-7), 1583-1594.
- Ochoa, J. C., J. Colprim, B. Palacios, E. Paul and P. Chatellier (2002) Active heterotrophic and autotrophic biomass distribution between fixed and suspended systems in a hybrid biological reactor, *Water Science and Technology* 46 (1-2), 397-404.
- Peyton, B. M. and W. G. Characklis (1993) A Statistical-Analysis of the Effect of Substrate Utilization and Shear-Stress on the Kinetics of Biofilm Detachment, *Biotechnology and Bioengineering* 41 (7), 728-735.
- Reichert, P. (1998) AQUASIM 2.0—user manual, computer program for the identification and simulation of aquatic systems, *Dubendorf, Switzerland, Swiss Federal Institute for Environmental Science and Technology (EAWAG)*
- Ren, T. T., Y. Mu, L. Liu, X. Y. Li and H. Q. Yu (2009) Quantification of the shear stresses in a microbial granular sludge reactor, *Water Research* 43 (18), 4643-4651.
- Rittmann, B. E. and P. L. Mccarty (1980) Model of Steady-State-Biofilm Kinetics, *Biotechnology and Bioengineering* 22 (11), 2343-2357.
- Sin, G., A. Guisasola, D. J. W. De Pauw, J. A. Baeza, J. Carrera and P. A. Vanrolleghem (2005) A new approach for modelling simultaneous storage and growth processes for activated sludge systems under aerobic conditions, *Biotechnology and Bioengineering* 92 (5), 600-613.
- Tchobanoglous, G. and F. L. Burton (1991) Metcalf and Eddy, Wastewater Engineering Treatment, Disposal and Reuse., McGraw-Hill, New York.
- Tijhuis, L., M. C. M. Vanloosdrecht and J. J. Heijnen (1995) Dynamics of Biofilm Detachment in Biofilm Airlift Suspension Reactors, *Biotechnology and Bioengineering* 45 (6), 481-487.
- Vazquez-Padin, J. R., J. Perez, A. Mosquera-Corral, J. L. Campos, R. Mendez and J. Carrera (2010) Modelling aerobic granular SBR at variable COD/N ratios including accurate description of total solids concentration, *Biochemical Engineering Journal* 49 (2), 173-184.
- Wanner, O. and w. Gujer (1985) Competition in biofilms., *Water Science and Technology* 2-3 (17), 27-44.
- Zima-Kulisiewicz, B. E., L. Diez, W. Kowalczyk, C. Hartmann and A. Delgado (2008) Biofluid mechanical investigations in sequencing batch reactor (SBR), *Chemical Engineering Science* 63 (3), 599-608.

CONCLUSIONS GENERALES

Ce travail de recherche a porté sur l'étude du traitement simultanée des nutriments par le procédé de granulation aérobie. Plus particulièrement, notre attention s'est portée sur l'amélioration de la compréhension des mécanismes impliqués dans l'élimination de l'azote dont la maîtrise est une condition indispensable à l'implantation de ce type de procédé à l'échelle industrielle.

L'étude bibliographique réalisée dans cette étude indique que la fiabilisation de l'élimination des nutriments et la stabilisation des procédés de granulation aérobie nécessite des alternances de phases anaérobie/aérobie ou anoxie/aérobie. Ces alternances favorisent d'une part la croissance lente des micro-organismes, et notamment celle des espèces déphosphatantes et nitrifiantes, qui favorise la densification et la stabilité des agrégats biologiques. D'autre part, dans une moindre mesure, ces alternances permettent de diminuer les besoins énergétiques en aération et les coûts de fonctionnement des procédés de granulation aérobie.

L'approche expérimentale a dans un premier temps eu pour objet d'étudier la stabilité (ou l'instabilité) de deux réacteurs granulaires fonctionnant dans ces conditions d'alternances de phases. L'application d'une phase anoxie qui permet la consommation du substrat carboné sur nitrates limite la compétition microbienne pour l'oxygène durant la phase aérobie contribuant ainsi à l'amélioration de la stabilité de la nitrification. Parallèlement, du fait de la faible pression de sélection des particules par la décantation, la formation d'une boue hybride, associant floccs et granules, est observée. Les alternances anaérobie/aérobie ont quant à elles conduit au développement de bactéries filamenteuses qui à terme a fortement limité la croissance des espèces nitrifiantes dans les granules et a causé un lessivage des floccs et dans en moindre quantité des granules. La croissance filamenteuse avec ces alternances de phases est attribuée à la conséquence d'une forte compétition pour l'oxygène causée par la présence de substrat carboné durant la phase aérobie (non stocké précédemment en phase anaérobie). Ainsi, cette étude a mis en évidence des interactions fortes entre les phénomènes de compétition microbienne et la diversité de structure physique des agrégats biologiques.

Le travail s'est alors focalisé sur le système hybride développé en alternance de conditions anoxie/aérobie. Il s'agissait dans cette étude d'évaluer comment le caractère hybride de la boue pouvait orienter les performances et les vitesses de transformation de l'azote. Une caractérisation de la sensibilité de l'activité de nitrification des différents agrégats - seuls (floccs, granules) ou en mélange (hybride) - à la concentration en oxygène dissous a été réalisée par respirométrie. Selon les résultats obtenus, il apparaît que l'opération du procédé avec une boue hybride est susceptible, grâce à la présence des floccs, d'augmenter la robustesse de la nitrification par rapport à un système à boues granulaires pures. Ceci peut être déterminant par exemple suite à des diminutions momentanées de la concentration d'oxygène ou à une augmentation de la charge organique. Parallèlement, ces expériences indiquent que les granules microbiens permettent de maintenir les micro-organismes à faible taux de croissance, et en particulier les nitrite oxydantes.

Le contrôle des propriétés physiques de la biomasse hybride en termes de ratio floccs/granules stabilisé et de la taille de la boue granulaire s'avère crucial pour l'optimisation de l'élimination de l'azote. En effet, l'augmentation non maîtrisée de la proportion de granules est associée, comme nous avons pu l'observer, à une augmentation de leur taille qui si elle s'avère bénéfique pour la dénitrification est en revanche préjudiciable aux cinétiques de nitrification. Le diamètre de la biomasse granulaire va donc être un paramètre à contrôler ce qui s'annonce loin d'être trivial. Diverses pistes pourront être envisagées comme l'application de contraintes hydrodynamiques spécifiques ou encore, comme l'a démontré notre étude, par le contrôle de la fraction de floccs dans le réacteur. Ceci peut être envisagé par l'application de purges sélectives pouvant être réalisées à différentes hauteurs de la colonne.

Dans le but de disposer d'un outil permettant de comprendre et prédire l'effet de la variation des propriétés physiques de la biomasse hybride sur les performances du procédé un modèle a été développé. Celui-ci, relativement conventionnel d'un point de vue description des processus biologique puisque basé sur ASM3, se distingue de par la prise en compte du caractère hybride de la boue. Cette spécificité est intégrée via l'indice de boue de chacun des agrégats dont résulte le volume disponible pour les floccs. Les cinétiques ainsi que les conséquences de limitation par l'oxygène lors de la mise en œuvre d'une biomasse hybride, de concentration et fraction granule/flocc imposées, sont correctement décrites. De plus, le modèle réussit à décrire les tendances de l'évolution des vitesses de nitrification et dénitrification lors d'une variation simultanée de la fraction granule/floccs et de la taille des granules. Ainsi, malgré une apparente simplicité du modèle, l'outil développé permet d'ores et déjà d'évaluer l'effet de certains paramètres des procédés de granulation aérobie sur les cinétiques et performances de traitement de l'azote.

Cependant, en lien avec les perspectives évoquées précédemment, certaines améliorations devront être apportées. Celles-ci concernent notamment une meilleure description de la distribution des populations microbienne entre floccs et granules. Ceci est particulièrement vrai pour les bactéries nitrites oxydantes qui, décrites comme se développant en périphérie des granules, se trouvent largement surestimées dans les floccs. Nous avons évoqué plusieurs hypothèses pour expliquer la localisation expérimentale surprenante des NOB en profondeur des granules. L'inhibition par l'ammoniac libre, entre autres, devra donc être prise en compte dans nos modèles à venir. Ceci implique d'être à même de décrire correctement les modifications de pH induites par voie biologique. En effet, en présence d'un effluent chargé en azote ammoniacal où les augmentations de pH liées à la dénitrification seront significatives, un modèle juste pourrait mettre en évidence la nécessité de procéder à des alimentations successives et être ainsi un outil d'aide à la conduite et/ou à la conception d'installations. L'autre raison pour laquelle les NOB sont observées expérimentalement en profondeur du granule est la présence de larges canaux par lesquels l'oxygène est transporté. La prise

en compte de cette propriété structurale, de par son caractère hétérogène, proscrit les outils 1-D. Deux stratégies peuvent alors être envisagées : d'une part la modélisation par des outils de type individus centrés, d'autre part la création d'un maillage spécifique à partir de caractérisations expérimentales tridimensionnelles (tomographie par exemple), ces dernières étant de toute façon à mettre en œuvre dans un but de validation.

De même les mécanismes régissant le détachement doivent être approfondis puisque de nombreuses questions ne trouvent pas de réponse dans notre travail ni dans la littérature récente : on peut notamment supposer qu'il existe des taux de détachement spécifiques à chacune des populations, probablement liés aux propriétés de cohésion générées par les polymères extracellulaires. La prise en compte de ces EPS dans les modèles sera donc probablement un élément incontournable. L'accumulation de données expérimentales fiables pour alimenter ces modèles sera donc importante pour progresser dans la description de tels systèmes.

Finalement, ces travaux ont mis en évidence la difficulté d'optimiser l'élimination du substrat carboné et des nutriments lorsque différentes fonctionnalités biologiques sont regroupées au sein d'une même matrice biologique. Une perspective intéressante pour la fiabilisation des procédés de granulation aérobie serait peut-être de favoriser le développement des espèces hétérotrophes et autotrophes dans deux boues granulaires distinctes. Ainsi, les conditions de croissance des différentes fonctionnalités pourraient être mieux contrôlées.

ANNEXES

1 Hybridation fluorescente *in situ* FISH

1.1 Composition du tampon d'hybridation

En fonction du pourcentage de formamide à utiliser (spécifique de chaque sonde), la composition de la solution d'hybridation d'un volume total de 2 mL est donnée dans le Tableau AI.1 :

Tableau AI.1. Composition des tampons d'hybridation aux différentes concentrations en formamide utilisées

FA (%)	FA (µL)	Eau (µL)	5 M NaCl (µL)	1 M Tris HCl (µL)	10 % SDS (µL)
0	0	800	180	20	2
35	350	450	180	20	2
40	400	400	180	20	2
55	550	250	180	20	2

1.2 Composition du tampon de rinçage

De la même façon, en fonction du pourcentage de formamide utilisé dans la solution d'hybridation, la solution de rinçage contiendra un pourcentage spécifique de NaCl (Tableau AI.2) :

Tableau AI.2. Composition des tampons de rinçage correspondant au pourcentage de formamide utilisé lors de l'hybridation

FA (%)	5 M NaCl (µL)	Eau (mL)	1 M Tris HCl (µL)	0.5 M EDTA (µL)	10 % SDS (µL)
0	9000	40	1000	0	50
35	700	47,8	1000	500	50
40	460	48	1000	500	50
55	100	48,9	1000	500	50

2 Modélisation

2.1 Cinétiques du GSBR pour différentes fractions de floccs

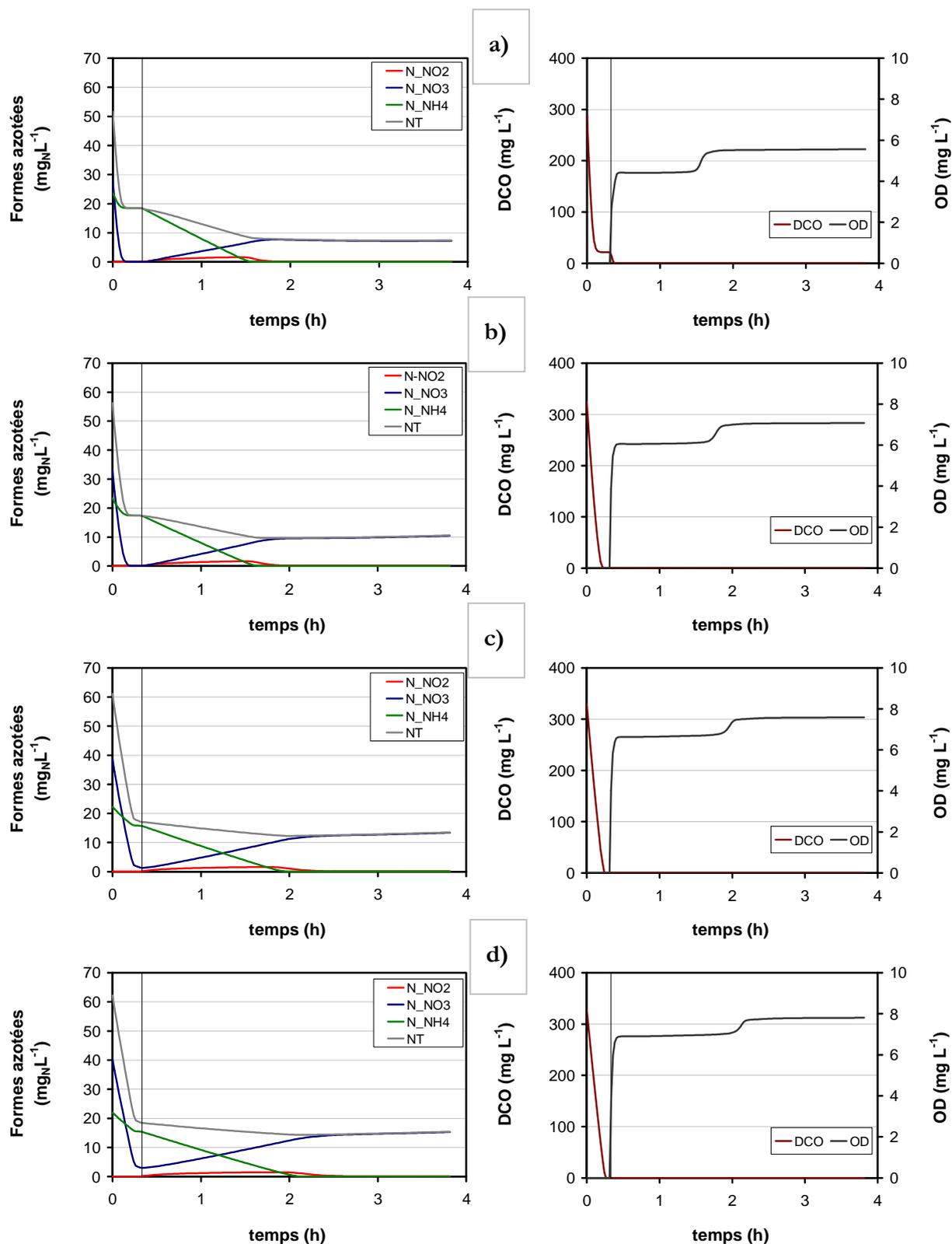


Figure AI.1. Evolution des formes azotées (gauche) et de la DCO et Oxygène dissous (droite) lors de cinétiques du GSBR pour différentes fractions de flocc : a) 1/9, b) 5/9, c) 7/9 et d) 8/9

2.2 Distribution spatiale dans les granules

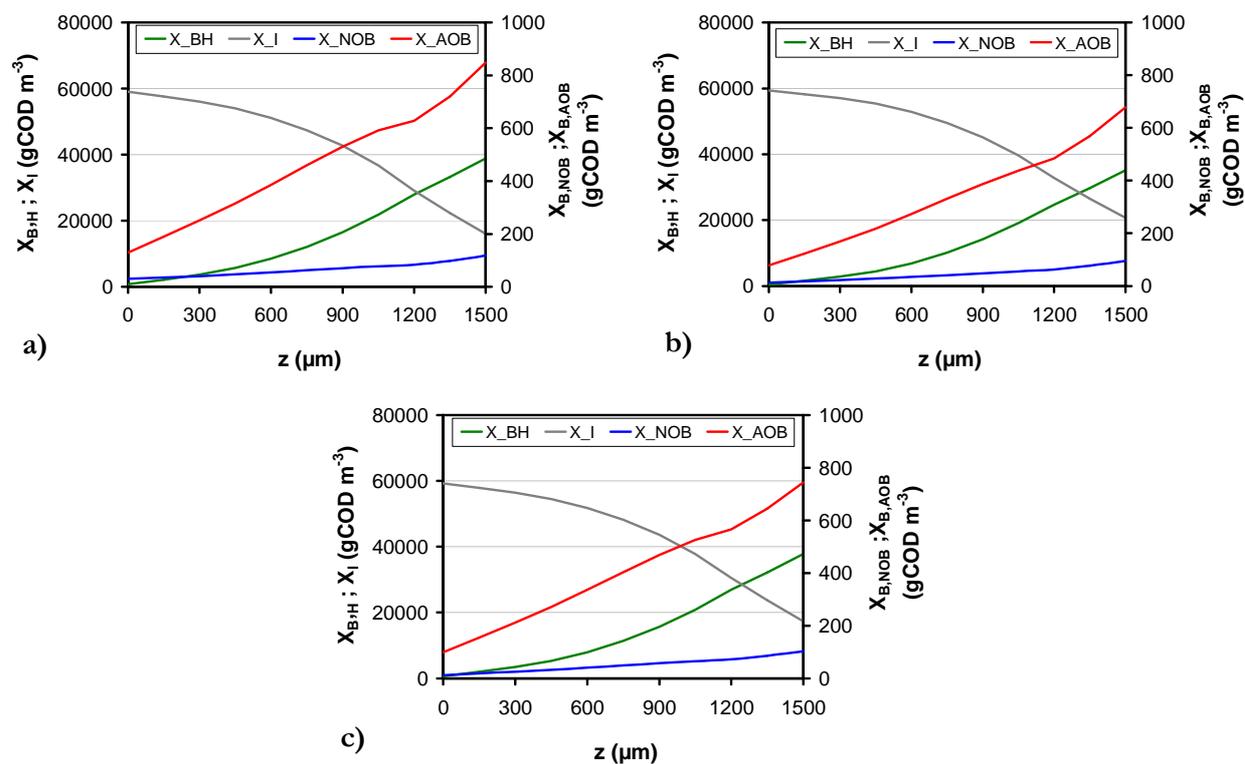
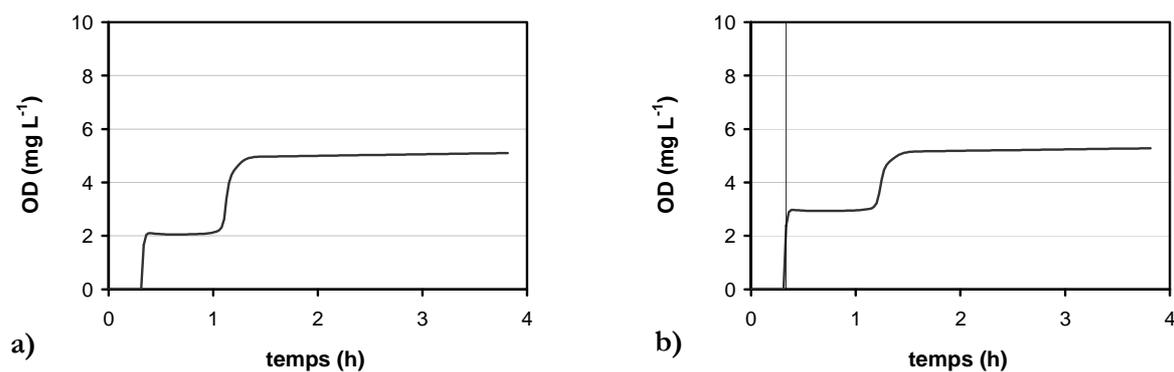


Figure AI.2. Profil de concentration de la biomasse dans les granules pour différentes fractions de floes : a) 1/9, b) 5/9 et c) 7/9

2.3 Profil d'oxygène dissous lors de cinétique pour différents diamètre de granules



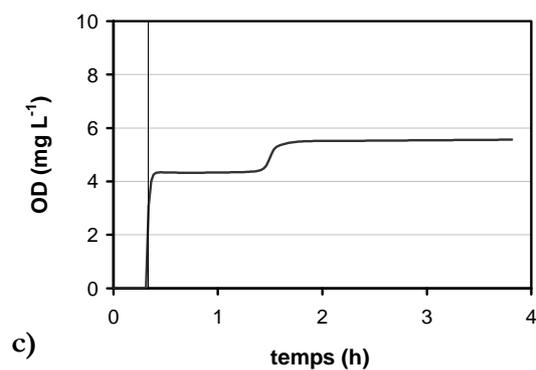


Figure AI.3. Evolution de la concentration en oxygène dissous dans la phase liquide en fonction du rayon des granules : a) 250µm, b) 600µm et c) 1200µm

2.4 Distribution en biomasse dans les floccs et les granules

Tableau AI.3. Concentration en biomasse en fonction pour différentes fractions de floccs

Fraction de floccs/fraction de granules	0/9	1/9	3/9	5/9	7/9	8/9	9/9
(g DCO m⁻³ de biomasse)							
	Granules						
X _{STO}	750,1	700,6	594,5	456,9	239,9	128,2	
X _I	22052,8	19453,9	13902,1	8781,8	4115,7	1986,0	
X _{B,H}	10550,9	9508,4	7738,0	5574,9	3038,6	1578,0	
X _{B,NOB}	28,6	26,6	21,9	15,8	8,9	5,3	
X _{B,AOB}	223,7	202,6	164,5	119,1	69,0	38,8	
(g DCO m⁻³ liquide)							
	Floccs						
X _{STO}		56,0	197,1	359,6	479,8	628,5	464,9
X _I		527,6	1139,0	1327,0	1242,0	1133,0	1066,8
X _{B,H}		464,3	1472,0	2557,0	3682,0	4191,0	4826,1
X _{B,NOB}		1,5	4,0	5,8	7,1	7,4	58,6
X _{B,AOB}		10,6	27,9		48,7	50,8	8,4

Ahlem FILALI

Tel : +33(0) 617 66 37 12

Email : filali.ahlem@gmail.com

Ingénieur en Génie des Procédés et Environnement

COMPETENCES SCIENTIFIQUES

- **Procédés chimiques et biologiques de traitement de l'eau** : traitement simultané des nutriments (C, N et P), technologie SBR, biofilms.
- **Microbiologie** : Hybridation *in situ* en fluorescence FISH, suivi de fermentations liquides (inoculation et estimation de paramètres cinétiques).
- **Modélisation** de procédés biologiques de type « boues activées » ou de type « biomasse fixée » (Logiciel AQUASIM®).
- **Métrologie** : Granulométrie laser, acquisition et traitement d'images (Visilog 6.4), caractérisation des ERU et ERI et de la biomasse, techniques de microscopie à épi-fluorescence et microscopie confocale (Leica Confocal Software, Volocity), mesure d'activités biologiques par respirométrie.

COMPETENCES TRANSVERSALES

- **Communication orale et langues**: Anglais courant et technique (congrès internationaux), Français et Arabe langues maternelles.
- **Pédagogie et encadrement** : enseignements au département du Génie des Procédés et de l'Environnement à l'INSA de Toulouse (Monitrice), encadrement de stagiaires.
- **Gestion de projets, analyse de données** expérimentales et numériques, **sens de l'organisation**.

EXPERIENCE PROFESSIONNELLE

- 2008/2011 **Monitrice/Doctorante**. INSA (Toulouse). Activité de recherche et enseignements (3 ans). «*Etude du traitement de l'azote dans un procédé de granulation aérobie hybride*».
- 2008 **Ingénieur en Génie de l'Environnement**. LISBP (Toulouse). Stage Master (6 mois). «*Etude expérimentale et théorique des effets du micro-mélange sur la croissance microbienne*».
- 2007 **Ingénieur en Génie des Procédés**. USTHB (Alger). Stage Ingénieur (6 mois). «*Etude de la dégradation photocatalytique d'un pesticide dans un réacteur photochimique à lit fixe*».

FORMATION

- 2008/2011 Doctorat Génie des procédés, INSA Toulouse, Laboratoire d'Ingénierie des Systèmes Biologiques et Procédés (LISBP).

- 2007/2008 Master 2 Recherche Génie des Procédés et de l'Environnement. Université de Toulouse III Paul Sabatier.
- 2002/2007 Ingénieur en Génie des Procédés option Environnement. Université des Sciences de la Technologie Houari Boumediene (USTHB), Département du Génie Chimique et de l'Environnement.

PRODUCTION SCIENTIFIQUE

Publication

- **Filali, A.**, A. Manas, M. Mercade, Y. Bessière, B. Biscans, M. Spérandio.
Stability and performances of two GSBR operated in alternating anoxic/aerobic or anaerobic/aerobic conditions for nutrient removal. *Biochemical Engineering Journal*, 2012. 67(0):p. 10-19.
- **Filali, A.**, Y. Bessière, M. Spérandio.
Effects of oxygen concentration on the nitrifying activity of an aerobic hybrid granular sludge reactor. *Water Science and Technology*, 2011. 65 (2):p.289-95.
- Caudan, C., **A. Filali**, M. Spérandio, D. Lefebvre, E. Girbal-Neuhauser.
Extracellular polymeric substances (EPS) from aerobic granular sludges: extraction, fractionation, and anionic properties. *Appl Biochem Biotechnol*, 2012. 166(7): p. 1685-702.
- Wan, J., I. Mozo, **A. Filali**, Y. Bessière, M. Spérandio.
Evolution of bioaggregates structure and strength during aerobic granular sludge formation. *Biochemical Engineering Journal*, 2011. 58–59(0): p. 69-78.
- Stricot, M., **A. Filali**, N. Lesage, M. Spérandio, C. Cabassud.
Side-stream membrane bioreactors: Influence of stress generated by hydrodynamics on floc structure, supernatant quality and fouling propensity. *Water Res*, 2010. 44(7): p. 2113-24.

Communication orale

- **Filali, A.**, Bessière, Y., Spérandio, M.
Experimental and theoretical analysis of a hybrid granular sludge for improving nitrogen removal, IWA Nutrient Removal and Recovery 2012, Harbin du 23 au 25 Septembre 2012.
- Pocquet, M., **Filali, A.**, Bessière, Y., Guo, L., Queinnec, I., Vanrolleghem, P., Spérandio, M.
Analysis and modelling of parameters influencing N₂O production in aerobic granular sludge process for N/DN treatment, IWA Nutrient Removal and Recovery 2012, Harbin du 23 au 25 Septembre 2012.
- **Filali, A.**, Bessière, Y., Spérandio, M.
Etude et modélisation d'un réacteur à boue granulaire hybride, Cinquièmes journées du RNB : Les Biofilms au service des Biotechnologies, Narbonne du 24 -26 Janvier 2012.
- **Filali, A.**, Bessière, Y., Spérandio, M.
Combining flocs and granular sludge: An alternative strategy for nitrogen removal? Nutrient Recovery and Management Conference (WEF), Miami du 9 au 12 Janvier 2011.
- **Filali, A.**, Bessière, Y., Spérandio, M.
Reliability of nitrogen removal in an aerobic granular hybrid sludge reactor. Société Française du Génie des Procédés SFGP, Lille du 29 Novembre au 1er décembre 2011.

- Mozo, I., **Filali, A.**, Bessière, Y., Spérandio, M.
Analysis of shear stress resistance of granules and flocs developed in various aerobic bioreactors for wastewater treatment, Société Française de Génie des Procédés SFGP, Marseille du 14 au 16 Octobre 2009.

Poster

- Caudan, C., **Filali, A.**, Spérandio, M., Lefebvre, D., Girbal-Neuhauser, E.
Extracellular Polymeric Substances (EPS) composition of aerobic granules using an improved multi-method extraction strategy, IWA World Water Congress, Montreal 2010.