

Université Aix Marseille

TITRE :

Bioréacteur à membranes pour le traitement d'eaux usées domestiques : influence des conditions environnementales et opératoires sur l'activité des biomasses et le transfert de matière

THESE

Pour obtenir le grade de
DOCTEUR DE L'UNIVERSITE AIX MARSEILLE
Faculté des Sciences et Techniques
Discipline : Génie des procédés

Présentée et soutenue publiquement par :

Maud VILLAIN

Le 07 Décembre 2012

Ecole Doctorale : Sciences de l'environnement

JURY

C. Albasi	Directeur de recherche – CNRS Toulouse (Rapporteur)
A. Gaïd	Docteur – VEOLIA EAU (Examineur)
G. Guibaud	Professeur – Université de Limoges (Examineur)
M. Héran	Maître de conférences/HDR – Université de Montpellier II (Rapporteur)
B. Marrot	Professeur – Université Aix Marseille (Directeur)
P. Moulin	Professeur – Université Aix Marseille (Examineur)

Remerciements

Ce travail de thèse a été réalisé au sein du laboratoire de Modélisation, Mécanique et Procédés Propres de l'Université Aix-Marseille (UMR 7340) dont je remercie le directeur Patrick Bontoux et le directeur adjoint Nicolas Roche pour leur accueil

Je tiens à adresser mes profonds remerciements à Benoît Marrot, mon directeur de thèse pour son soutien et son optimisme infailible. J'ai particulièrement apprécié nos discussions toujours enrichissantes et dans la bonne humeur qui m'ont permis d'avancer pendant la thèse. Ses bonnes idées, sa maîtrise de la thématique ainsi que sa disponibilité m'ont permis de progresser dans le domaine.

Un grand merci également à Philippe Moulin, responsable de l'équipe procédés membranaires pour sa motivation et son énergie très communicative et son investissement quotidien auprès des doctorants. Merci également d'avoir accepté la présidence de mon jury de thèse et pour tous tes conseils très utiles et appréciables tout au long de ces trois années.

Mes remerciements vont également à Claire Albasi et Marc Héran pour leurs rapports d'une grande qualité qui m'ont permis d'appréhender mon sujet de thèse d'une manière différente. Les échanges qui ont eu lieu pendant la soutenance vont me permettre de compléter l'interprétation des résultats.

Merci également à Abdelkader Gaïd pour sa vision différente, côté industriel, de l'exploitation des B&M et des attentes technologiques liées à ce procédé.

Ce travail n'aurait pu aller aussi loin dans la caractérisation des polymères extracellulaires sans l'aide de Gilles Guibaud et sa doctorante Isabelle Bourven, membres du laboratoire GRESE de l'université de sciences et techniques de Limoges. Je les remercie pour leurs idées, leurs maîtrises de techniques analytiques récentes, leur temps et l'implication qu'ils ont mise dans cette thématique.

Je souhaite également remercier tout particulièrement, Elisabeth Badens, Yasmine Masmoudi et Emilie Carretier pour m'avoir apporté leur aide quand j'étais chargée de mission d'enseignement au sein de la licence et du master génie des procédés de la faculté des sciences de Marseille.

J'ai une pensée toute particulière pour les doctorants « BRMistes » (Ludiwine Clouzot, Jérémy Gagnaire, Pierre Hamon) qui ont traversé ou traversent actuellement ce travail de tous les instants pour surveiller des petites bactéries. Merci pour votre écoute et votre soutien. Merci Ludiwine pour ta présence et tes conseils lors de ma première année de thèse, je n'aurais jamais pu acquérir autant de savoir faire aussi vite sans toi. Un grand merci à Pierre également, tu as toujours été présent pour surveiller mon réacteur à ma place lors de moments difficiles pendant ces trois années.

Un grand merci à Jean-Paul super technicien qui m'a permis de réparer un nombre incalculable de pompes, de sauver une acclimatation et de remettre le B&M semi-industriel en état. Merci pour tes bonnes idées et ta disponibilité.

Je souhaiterais souligner la bonne humeur et les bons conseils des trois autres membres permanents de l'équipe procédés membranaires : Emilie, Yvan et Jean-Philippe.

Enfin je souhaiterais adresser un mot à l'ensemble du laboratoire : permanents, doctorants, post-doctorants pour la bonne humeur ambiante au laboratoire fortement appréciable.

Merci à mes parents qui malgré la distance ont toujours cru en moi et m'ont soutenu.

Et enfin en gardant le meilleur pour la fin, je voudrais dédier ce travail de thèse à mon compagnon Antoine. Tu as été un soutien infailible malgré ma possible mauvaise humeur et déprime dans les moments où la thèse n'avancait pas trop. Merci pour ton écoute, ta disponibilité et tes bonnes idées pour me remonter le moral.

Sommaire

Introduction	1
CHAPITRE 1 : Synthèse bibliographique	7
1.1 Le Bioréacteur à membranes	9
1.1.1 Intérêts du BâM	9
1.1.2 Principe du BâM	10
1.2 Les performances épuratrices du BâM. Liens avec l'activité biologique	15
1.2.1 Les paramètres opératoires utilisés	15
1.2.2 Influence de la charge	17
1.2.3 Influence de l'âge de boues	18
1.2.4 Etude des mécanismes de production de boues	24
1.2.5 Modélisation de la production de boues en régime permanent	28
1.2.6 Paramètres influençant la production de boues	29
1.3 Le colmatage membranaire	32
1.3.1 Principe du colmatage	32
1.3.2 Paramètres influençant le colmatage	35
1.4 Un facteur colmatant particulier : influence des PEC	38
1.4.1 Définition et origine	38
1.4.2 Composition et structure	38
1.4.3 Rôles des PEC	39
1.4.4 Mécanismes de production et de transfert des PMS vers le surnageant	40
1.4.5 Extraction et caractérisation des PEC	41
1.4.6 Implication des PEC solubles et liés dans le colmatage	47
1.5 Conclusions et objectifs	60
CHAPITRE 2 : Matériel et méthodes	63
2.1 Le bioréacteur à membranes	65
2.2 Caractéristiques des effluents	68
2.2.1 Effluent résiduaire urbain	68
2.2.2 Effluent synthétique	68
2.3 Les biomasses	70
2.3.1 Biomasse provenant de la STEP « la Pioline »	70
2.3.2 Biomasse provenant de la STEP « le Rousset »	71
2.4 Récapitulatif des conditions opératoires	72
2.5 Les outils analytiques	74
2.5.1 Les outils analytiques pour le suivi des acclimations	74
2.5.2 Les outils analytiques pour la caractérisation des PEC solubles	76
2.6 Les tests respirométriques	81
CHAPITRE 3 : Caractérisation des performances et du colmatage d'un BâM pour le traitement d'un effluent synthétique. Choix d'un âge de boues	85
3.1 Acclimations stabilisées à des âges de boues de 20 et 50 jours	88
3.1.1 Développement de la biomasse	88
3.1.2 Production de boues	90
3.1.3 Les capacités épuratrices des biomasses	92
3.1.4 Evolution des activités biologiques	97
3.1.5 Caractérisation des PEC solubles	105
3.1.6 Colmatage membranaire	120
3.2 Comparaison des deux acclimations	128
3.2.1 Choix d'un âge de boues	128
3.2.2 Influence de situations stressantes	131
3.3 Conclusion	142
CHAPITRE 4 : Caractérisation des performances et du colmatage d'un BâM pour le traitement d'un effluent résiduaire urbain	145

4.1 Introduction	147
4.2 Développement de la biomasse	148
4.2.1 Production de boues	149
4.2.2 Les capacités épuratrices de la biomasse	153
4.2.3 Activités biologiques	155
4.2.4 Caractérisation des PEC solubles	158
4.2.5 Colmatage membranaire	164
4.2.6 Influence de situations stressantes	170
4.2.7 Conclusion	176
CHAPITRE 5 : Impact de la nature du substrat sur les performances et le colmatage d'un Bàm à l'état stationnaire et en conditions de stress	179
5.1 Les performances globales du Bàm	181
5.2 La caractérisation du milieu biologique	186
5.2.1 PEC solubles	186
5.2.2 Taille des floes	190
5.2.3 Influence des stress sur le milieu biologique	192
5.2.4 Conclusion	195
5.3 Le colmatage	196
5.3.1 Mise en place du colmatage à l'état stable	196
5.3.2 Réversibilité du colmatage	197
5.3.3 Mécanismes impliqués dans le colmatage	200
5.4 Perturbations du procédé : Quel stress est le plus problématique ?	203
Conclusion générale et perspectives	207
Références	215
Annexes	231

Liste des figures

CHAPITRE 1

Figure 1. 1: Schéma d'un BâM _E	11
Figure 1. 2 : Schémas (a) d'un BâM _I et (b) d'un BâM _{IE}	12
Figure 1. 3 : Conditions de fonctionnement choisies (concentration en MES et TSH) en fonction de la Cm (adapté de Grasmick et al., 2007).....	17
Figure 1. 4: Evolution de la biomasse hétérotrophe active avec le TSB pour différentes charges volumiques (Lebegue, 2008a).....	22
Figure 1. 5 : Conversion de la matière organique dans les procédés à boues activées (Salhi, 2003).....	25
Figure 1. 6 : Représentation schématique du métabolisme microbien.....	26
Figure 1. 7 : Représentation schématique de la formation et de l'élimination du colmatage détachable, non détachable et irréversible (Meng et al., 2009).....	33
Figure 1. 8 : représentation schématique des paramètres affectant le colmatage et les stratégies pour le contrôler (Meng et al., 2009).....	36
Figure 1. 9 : Mécanismes de production et de relargage de PMS (Massé, 2004).....	40
Figure 1. 10 : Localisation de certains composés organiques en matrice de fluorescence 3D : 5 régions définies (Chen et al., 2003).....	45
Figure 1. 11 : comparaison des résultats récents sur l'influence du TSB sur le colmatage.....	53
Figure 1. 12 : Effet du TSB et de la charge massique sur la concentration en DCO (Pribyl et al., 1997).....	57
Figure 1. 13: Evolution de la concentration en PMS avec le TSB pour différentes charges volumiques (Lebegue, 2008a).....	58

CHAPITRE 2

Figure 2. 1 : Schéma du bioréacteur à membranes.....	65
Figure 2. 2 : Méthode de mesure de la respiration bactérienne.....	82
Figure 2. 3 : Les différentes phases caractérisant un respirogramme.....	83

CHAPITRE 3

Figure 3. 1 : Evolution des MVS et de la Cm au cours de l'acclimatation à 20 jours.....	88
Figure 3. 2 : Evolution des MVS et de la Cm au cours de l'acclimatation à 50 jours.....	89
Figure 3. 3 : Productions cumulées de boues au cours des acclimations à 20 et 50 jours.....	91
Figure 3. 4 : Taux de dégradation et Cm en DCO au cours des acclimations à 20 et 50 jours.....	92
Figure 3. 5 : Taux de dégradation et Cm en N-NH ₄ pour (a) l'acclimatation à 20 jours et (b) à 50 jours.....	94
Figure 3. 6 : Evolution des concentrations en nitrates du substrat et dans le bioréacteur au cours de (a) l'acclimatation à 20 jours et (b) 50 jours.....	96
Figure 3. 7 : Activités exogènes spécifiques des hétérotrophes et des autotrophes durant (a) l'acclimatation.....	98
Figure 3. 8 : Evolution de l'activité spécifique exogène de la biomasse avec la concentration en substrat pour les biomasses acclimatées à 20 et 50 jours.....	100
Figure 3. 9 : Influence de l'activité exogène spécifique des hétérotrophes sur celle des autotrophes au cours des acclimations à 20 et 50 jours.....	101
Figure 3. 10 : Activités endogènes spécifiques des hétérotrophes et des autotrophes durant (a) les acclimations à 20 jours et (b) 50 jours.....	103
Figure 3. 11 : Evolution des concentrations en protéines extraites des PEC solubles dans le bioréacteur et le perméat au cours des acclimations à (a) 20 et (b) 50 jours.....	106
Figure 3. 12 : Evolution des concentrations en polysaccharides extraites des PEC solubles dans le bioréacteur et le perméat au cours des acclimations à (a) 20 et (b) 50 jours.....	108
Figure 3. 13 : Evolution des concentrations en substances humiques-like extraites des PEC solubles dans le bioréacteur et le perméat au cours des acclimations à (a) 20 et (b) 50 jours.....	109

Figure 3. 14 : Exemple de matrices de fluorescence obtenues pour les PEC solubles extrait (a) du substrat, (b) du bioréacteur et (c) du perméat à un TSB de 50 jours	113
Figure 3. 15 : Evolution de l’empreinte chromatographique par CES des PEC solubles extraits du bioréacteur et du substrat pendant l’acclimatation I à 50 jours avec une détection par fluorescence (221/350 nm spécifique des protéines) *UF : unité de fluorescence.....	115
Figure 3. 16 : Evolution de l’empreinte chromatographique par CES des PEC solubles extraits du bioréacteur et du substrat pendant l’acclimatation à 50 jours avec une détection par fluorescence (350/440 nm spécifique des substances humiques-like)	116
Figure 3. 17 : Influence du TSB sur l’empreinte chromatographique par CES des PEC solubles extraits du bioréacteur avec une détection par fluorescence (221/350 nm)	118
Figure 3. 18 : Influence du TSB sur l’empreinte chromatographique par CES des PEC solubles extraits du bioréacteur avec une détection par fluorescence (350/440 nm) –Empreinte chromatographique du substrat.....	119
Figure 3. 19 : Evolution des concentrations en protéines, polysaccharides et substances humiques-like du bioréacteur et du perméat à un TSB de 20 et 50 jours.....	122
Figure 3. 20 : Chromatogrammes des protéines extraites des PEC solubles du bioréacteur et du perméat à (a) 20 jours et (b) 50 jours	124
Figure 3. 21 : Evolution de la perméabilité normée des membranes pendant les acclimations à 20 et 50 jours	126
Figure 3. 22 : Evolution de la perméabilité normée en fonction de la concentration en MVS à 20 et 50 jours ..	127
Figure 3. 23 : Observation microscopique de deux types de protozoaires de la BA du B _à M _E à un TSB de 50 jours. (a) paramécie et (b) colpode.....	133
Figure 3. 24 : Evolution des concentrations en protéines, polysaccharides et substances humiques-like (a) du bioréacteur et (b) du perméat à un TSB de 20 et 50 jours pendant les stress I, II et III	138

CHAPITRE 4

Figure 4. 1 : Evolution des MVS et de la Cm au cours de l’acclimatation en ERU	148
Figure 4. 2 : Production cumulée de boues au cours de l’acclimatation en ERU.....	150
Figure 4. 3 : Estimation de la production de boues par différents modèles et comparaison avec la bibliographie (adapté de Massé, 2004).....	152
Figure 4. 4 : Taux de dégradation et Cm en DCO au cours de l’acclimatation en ERU	153
Figure 4. 5 : Taux de dégradation et Cm en N-NH ₄ au cours de l’acclimatation en ERU.....	154
Figure 4. 6 : Activités exogènes spécifiques des hétérotrophes et des autotrophes durant l’acclimatation en ERU	156
Figure 4. 7 : Activités endogènes spécifiques des hétérotrophes et des autotrophes durant l’acclimatation en ERU	157
Figure 4. 8 : Evolution des concentrations en protéines extraites des PEC solubles dans le bioréacteur et le perméat au cours de l’acclimatation en ERU	158
Figure 4. 9 : Evolution des concentrations en substances humiques-like extraites des PEC solubles dans le bioréacteur et le perméat au cours de l’acclimatation en ERU.....	159
Figure 4. 10 : Evolution de l’empreinte chromatographique par CES des PEC solubles extraits du bioréacteur et de l’ERU pendant l’acclimatation avec une détection par fluorescence (221/350 nm spécifique des protéines) *UF : unité de fluorescence.....	161
Figure 4. 11 : Evolution de l’empreinte chromatographique par CES des PEC solubles extraits du bioréacteur et de l’ERU pendant l’acclimatation avec une détection par fluorescence (350/440 nm spécifique des substances humiques-like)	163
Figure 4. 12 : Evolution des concentrations en protéines et substances humiques-like du bioréacteur et du perméat à un TSB de 50 jours en ERU	164
Figure 4. 13 : Chromatogrammes des protéines extraites des PEC solubles du bioréacteur et du perméat à 50 jours	166
Figure 4. 14 : Evolution de la perméabilité normée de la membrane pendant l’acclimatation en ERU.....	168
Figure 4. 15 : Vitesse de recirculation et PTM dans le B _à M _E traitant un ERU.....	169
Figure 4. 16 : Evolution des concentrations en protéines et substances humiques-like du bioréacteur et du perméat à un TSB de 50 jours pendant les stress I, II et III en ERU.....	174

CHAPITRE 5

Figure 5. 1 : Evolution des concentrations moyennes en polymères dans les substrats et les boues.....	187
Figure 5. 2 : Evolutions des concentrations en PEC solubles dans les bioréacteurs durant les périodes stationnaires et de stress	192

ANNEXES

Annexe 1: droites d'étalonnage pour l'analyse de l'ammonium, de la DCO, des nitrates, des polysaccharides, des protéines et des substances humiques-like

Annexe 1. 1 : La DCO	233
Annexe 1. 2 : L'ammonium	233
Annexe 1. 3 : Les nitrates.....	233
Annexe 1. 4 : Les polysaccharides.....	234
Annexe 1. 5 : Les protéines.....	234
Annexe 1. 6 : Les substances humiques-like.....	234

Annexe 2 : droites d'étalonnages pour l'attribution de masses moléculaires apparentes à partir des volumes d'élution obtenus par chromatographie d'exclusion stérique couplée à un détecteur de fluorescence

Annexe 2. 1 : colonne Agilent Bio SEC 300 Å (protéines).....	235
Annexe 2. 2 : colonne Agilent Bio SEC 100 Å (protéines).....	235
Annexe 2. 3 : colonne Agilent Bio SEC 100 Å (substances humiques-like)	235

Annexe 3 : Evolution de la PTM et de la vitesse de recirculation au cours des deux acclimations à 20 et 50 jours

Annexe 3. 1 : A 20 jours	236
Annexe 3. 2 : A 50 jours	236

Annexe 4. 1 : Evolution de la concentration en polysaccharides extraites des PEC liés du bioréacteur dans le traitement d'un ERU

.....	237
-------	-----

Liste des Tableaux

CHAPITRE 1

Tableau 1. 1 : Classement des procédés par boues activées.....	15
Tableau 1. 2 : Activités bactériennes et rendements épuratoires obtenus dans différentes études	20
Tableau 1. 3 : Rendements de production de boues en Bàm	30
Tableau 1. 4 : Relations entre le colmatage membranaire et les facteurs influençant le colmatage à conditions hydrodynamiques constantes et membrane identique	37
Tableau 1. 5 : Influence des PEC sur le colmatage membranaire dans les Bàm.....	47
Tableau 1. 6 : Influence du rapport DCO/NH ₄ sur la production de PEC.....	50
Tableau 1. 7: Concentrations en PEC liés obtenues dans différentes études.....	55
Tableau 1. 8 : Distribution de taille des PEC solubles (obtenus par filtration) issus de Bàm.....	59

CHAPITRE 2

Tableau 2. 1 : Caractéristiques des membranes d'ultrafiltration	66
Tableau 2. 2 : Caractéristiques moyennes de l'ERU d'entrée	68
Tableau 2. 3 : Composition massique du substrat synthétique	69
Tableau 2. 4 : Performances moyennes de la STEP « la Pioline » en 2011	70
Tableau 2. 5 : Performances moyennes de la STEP « le Rousset » au premier semestre 2012.....	71
Tableau 2. 6 : Paramètres opératoires des différentes acclimations réalisées.....	72
Tableau 2. 7 : protocole de dosage des polysaccharides	77
Tableau 2. 8 : Protocoles de dosages des protéines et substances humiques	78
Tableau 2. 9 : Caractéristiques des colonnes d'exclusion stérique.....	80

CHAPITRE 3

Tableau 3. 1 : Masses moléculaires apparentes des protéines et substances humiques-like extraites des PEC solubles du Bàm stabilisé à 20 ou 50 jours.....	120
Tableau 3. 2 : Evolution des rétentions totales et spécifiques des PEC solubles avec le TSB	122
Tableau 3. 3: Evolution des rendements épuratoires, des MVS et des activités biologiques avec le TSB et le stress appliqué.....	134
Tableau 3. 4 : Evolution des rétentions totales et spécifiques des PEC solubles avec le TSB et le stress appliqué	139

CHAPITRE 4

Tableau 4. 1 : Valeurs des constantes cinétiques et stœchiométriques utilisées.....	151
Tableau 4. 2 : Estimation de la production de boues par différents modèles pour un âge de boues de 50 jours en ERU	151
Tableau 4. 3 : Masses moléculaires apparentes des protéines et substances humiques-like extraites des PEC solubles du Bàm stabilisé à 50 jours en ERU	163
Tableau 4. 4 : Evolution des rétentions totales et spécifiques des PEC solubles au cours du temps.....	165
Tableau 4. 5 : Evolution des rendements épuratoires, des MVS et des activités biologiques avec le stress appliqué pendant le traitement d'un ERU.....	172
Tableau 4. 6 : Evolution des rétentions totales et spécifiques des PEC solubles au cours du temps en ERU	175

CHAPITRE 5

Tableau 5. 1 : Influence de la nature de l'effluent d'entrée sur les performances globales du Bàm _E	181
Tableau 5. 2: Caractéristiques principales du substrat utilisé pour la détermination de l'activité exogène hétérotrophe	183
Tableau 5. 3 : Distributions des masses moléculaires apparentes des protéines extraites des PEC des substrats et bioréacteurs	189
Tableau 5. 4 : Distributions des masses moléculaires apparentes des substances humiques-like extraites des PEC des substrats et bioréacteurs	190
Tableau 5. 5 : Distributions des masses moléculaires apparentes des protéines extraites des PEC des bioréacteurs après différents stress	194
Tableau 5. 6 : Distributions des masses moléculaires apparentes des substances humiques-like extraites des PEC des bioréacteurs après différents stress	194
Tableau 5. 7 : Récapitulatif des conditions de fonctionnement pour les campagnes expérimentales en ERU et ES et mise en place du colmatage membranaire.....	196
Tableau 5. 8 : Résistances hydrauliques liées au colmatage membranaire	198
Tableau 5. 9 : Potentiel de perturbations des stress I, II et III en fonction du substrat d'alimentation dans les Bàm	204

LISTE DES ABBREVIATIONS

A	Autotrophes	
ASM	Activated sludge model	
ATP	Adénosine triphosphate	
BA	Boues activées	
BàM	Bioréacteur à membranes	
BàM_E	Bioréacteur à membranes externes	
BàM_I	Bioréacteur à membranes immergées	
BàM_{IE}	Bioréacteur à membranes immergées externes	
BCA	Bicinchonic acid	
CES	Chromatographie d'exclusion stérique	
C_m	Charge massique	(kg _{DCO} .kg _{MVS} ⁻¹ .j ⁻¹)
COT	Carbone organique total	
C_v	Charge volumique	(kg _{DCO} .m ⁻³ .j ⁻¹)
D₅₀	Diamètre moyen	
DBO	Demande biologique en oxygène	(g _{DBO} .g _{MVS} ⁻¹)
DCO	Demande chimique en oxygène	(g _{DCO} .g _{MVS} ⁻¹)
DMM	Distribution de masses moléculaires	
EEM 3D	Excitation/emission matrix 3 dimensions	
EH	Equivalent habitant	
ERU	Effluent réel urbain	
ES	Effluent synthétique	
H	Hétérotrophes	
J	Flux de perméat	(L.h ⁻¹ .m ⁻²)
L_p	Perméabilité membranaire	(L.h ⁻¹ .m ⁻² .bar ⁻¹)
MES	Matières en suspension	(g.L ⁻¹)
MM	Matières minérales	(g.L ⁻¹)
MVS	Matières volatiles en suspension	(g.L ⁻¹)
OUR	Oxygen uptake rate	(mg _{O2} .L ⁻¹ .h ⁻¹)
PEC	Polymères extracellulaires	

PMS	Produits microbiens solubles	
PN	Protéines	
PS	Polysaccharides	
PTM	Pression transmembranaire	(bar)
R	Résistance hydraulique	(m ⁻¹)
REC	Résine échangeuse de cations	
SBR	Sequencing batch reactor	
SH	Substances humiques	
SOUR	Specific oxygen uptake rate	(mg _{O2} ·g _{MVS} ⁻¹ ·h ⁻¹)
STEP	Station d'épuration	
TSB	Temps de séjour biologique	(j)
TSH	Temps de séjour hydraulique	(h)
Y_{obs}	Rendement de production de boues	(-)

Introduction

INTRODUCTION

En 2005, la commission européenne a décidé de promouvoir le traitement des eaux usées par bioréacteurs à membranes (BàM) en finançant quatre projets totalement dédiés à la recherche, au développement, à la construction et au transfert de technologie de ce procédé prometteur. Les quatre projets nommés AMEDEUS, EUROMBRA, MBR-TRAIN et PURATREAT se sont déroulés de 2005 jusqu'à 2009. Suite à ces projets, de nombreuses conclusions sont ressorties notamment sur les recherches futures à entreprendre pour améliorer la compétitivité de ce procédé.

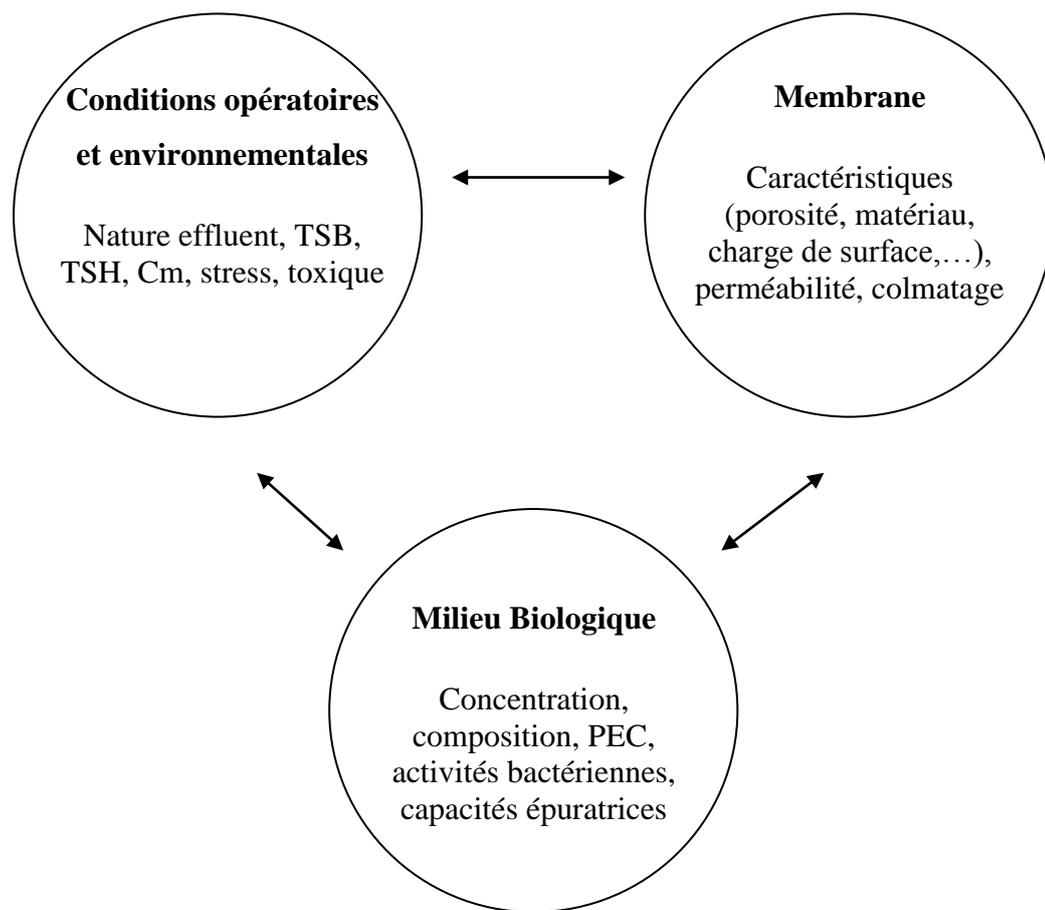
Pour les membres de la commission européenne, de nombreux problèmes entravent l'expansion du BàM sur le marché européen. Ils citent la caractérisation de l'eau usée, le colmatage membranaire, le choix de l'âge de boues, la consommation énergétique ainsi que les coûts de maintenance comme principaux verrous qu'il faut continuer à étudier.

Ainsi, bien que les BàM utilisés pour le traitement des eaux usées aient été intensément étudiés ces dernières années, des incertitudes sur le choix adéquat des paramètres opératoires pour l'obtention d'une épuration maximale des polluants existent toujours. Les paramètres concernent notamment le temps de séjour des boues (TSB), l'activité des biomasses autotrophes et hétérotrophes et la limitation du colmatage des membranes. A cela peut être rajouté un manque de données au niveau des conséquences de stress infligés à la biomasse par une variation des paramètres environnementaux (variation charge massique (Cm), défaut d'aération, toxique) sur les BàM et leurs performances.

En ce qui concerne l'explication du colmatage, sa limitation ainsi que la détermination des paramètres mis en cause, la plupart des études réalisées proposent de relier la nature et la mise en place du colmatage à des paramètres globaux de caractérisation de la biomasse (MES, viscosité, taille des floes, concentrations en PEC solubles et liés) ou à des paramètres opératoires tels que le TSB ou la Cm.

Cependant, aux vues de la diversité de résultats contradictoires obtenus pour déterminer l'influence d'un même paramètre sur le colmatage, la pertinence du paramètre, son protocole de mesure ainsi que la mise en œuvre même de ces études sont à remettre en cause.

Ainsi afin de mieux comprendre les interactions qui relient les conditions environnementales et opératoires des Bàm, avec le milieu biologique et le colmatage de la membrane (comme schématisé ci-après), il est important de mettre en œuvre de nouvelles approches de caractérisation du milieu biologique.



En ce qui concerne l'implication des PEC dans le colmatage, d'autres moyens plus poussés que la simple mesure des concentrations des principaux constituants que sont les protéines et les polysaccharides doivent être mis en œuvre pour comprendre leur implication dans le colmatage.

Ce travail de thèse est focalisé sur l'étude et la caractérisation du milieu biologique en fonction d'un paramètre opératoire particulier : le TSB et en fonction des conditions environnementales (nature de l'effluent synthétique ou réel ; stress biologiques).

Ce manuscrit est organisé en cinq chapitres.

Le **chapitre 1** présente une synthèse des performances globales des Bàm et des caractéristiques du colmatage en fonction des paramètres opératoires et environnementaux.

Le **chapitre 2** se constitue des différents matériels et méthodes nécessaires à cette étude. Après la présentation du Bàm à l'échelle pilote employé, les biomasses épuratrices utilisées pour l'ensemencement ainsi que les effluents synthétique et réel urbain destinés à alimenter les Bàm sont décrits. Les outils analytiques pour le suivi des acclimations, pour la caractérisation du milieu biologique et notamment des polymères extracellulaires (PEC) ainsi que les outils biologiques sont également détaillés dans ce chapitre.

Le **chapitre 3** se consacre à la caractérisation des performances épuratrices, des activités biologiques et du colmatage membranaire de Bàm à deux âges de boues spécifiques dans le cas du traitement d'un effluent synthétique. Le but étant de déterminer le temps de séjour biologique le plus intéressant en termes de performances biologiques et de limitation du colmatage. Afin d'éviter les effets conjoints de la baisse de charge massique et de l'augmentation du TSB sur les caractéristiques du milieu biologique, la charge massique est maintenue constante, à l'inverse de nombreuses études, pour les biomasses stabilisées aux deux âges de boues. Dans un second temps, les deux biomasses sont volontairement confrontées à des situations stressantes (variation de la charge massique, carence en oxygène et substrat) dans le but de caractériser l'impact de telles situations habituellement rencontrées dans l'épuration biologique d'effluents mais également d'identifier si à un TSB donné, la biomasse n'offre pas une meilleure résistance aux stress générés.

Le **chapitre 4** présente l'étude réalisée sur site avec un effluent réel urbain. L'âge de boues considéré comme le plus approprié dans le chapitre 3 est utilisé. Les objectifs principaux sont d'évaluer les performances épuratrices et les activités biologiques du Bàm. Mais également de caractériser le milieu biologique et notamment les PEC solubles considérés comme l'un des principaux problèmes dans l'établissement du colmatage membranaire. Les mêmes

situations stressantes que celles étudiées dans le chapitre précédent sont effectuées afin de vérifier si la nature de l'effluent affecte les conséquences de tels stress.

Le **chapitre 5** a pour visée une comparaison de tous les résultats obtenus dans les deux chapitres précédents. Cette comparaison est rendue possible par l'exécution des deux campagnes expérimentales dans le même BâM et à un choix des paramètres opératoires quasi identiques dans les deux cas. Le but est d'évaluer l'impact de la nature de l'effluent (synthétique ou réel) sur les principales caractéristiques d'un BâM en conditions stationnaires et dans le cas de stress.

La conclusion générale regroupe les principaux résultats de ce travail de thèse. Elle permet de faire le point sur le TSB le plus approprié pour l'épuration d'effluents domestiques mais également de clarifier une partie du trouble résidant entre les caractéristiques de BâM en effluent réel et synthétique. Les perspectives de cette étude sont également énoncées afin de proposer des pistes de recherches complémentaires suite à cette étude.

CHAPITRE 1 : Synthèse bibliographique

1.1 Le Bioréacteur à membranes

En 2005, le marché mondial du Bàm représentait approximativement 217 millions de dollars. Avec une croissance moyenne de 10,9 % par an, ce procédé a subi une expansion beaucoup plus rapide que tous les autres procédés en matière de traitement des eaux usées (5,5 %) y compris les autres procédés membranaires (entre 8 et 10 %) (Judd, 2008 ; Le-Clech et al., 2006).

Actuellement le marché est en plein essor. Plus de vingt stations de traitements des eaux usées avec une capacité supérieure à 500 équivalents habitant (EH) ont été mises en service entre 2002 et 2005. En 2008 en Europe, 800 Bàm ont été implantés dans les différents secteurs d'activités dont 37 ayant une capacité supérieure à 5000 m³.j⁻¹. En 10 ans, la capacité de traitement est passée de quelques milliers d'EH à de grandes stations desservant plus de 100 000 EH.

1.1.1 Intérêts du Bàm

En comparaison des systèmes classiques à boues activées, l'utilisation des Bàm présente des avantages indéniables (Judd, 2008). Le décanteur secondaire étant remplacé par des membranes, la forte compacité du procédé à laquelle s'ajoute une qualité d'eau traitée supérieure aux stations d'épuration (STEP) conventionnelles sont des avantages attractifs pour les industriels et les municipalités. De plus, la technologie Bàm est devenue plus concurrentielle par rapport aux STEP classiques en raison du prix des modules membranaires réduit avec plus de garantie, une efficacité énergétique accrue et une meilleure conception et pratiques d'exploitation.

En Europe la directive cadre sur le traitement des eaux usées urbaines (UWWTD, 91/271/EEC) impose des normes de rejets drastiques qui nécessitent l'amélioration des procédés de traitement actuels. Grâce à l'utilisation des membranes ayant des seuils de coupure inférieurs (jusqu'à environ 0,04 µm (Sweity et al., 2011)) à la taille moyenne des bactéries libres (1 µm) et de certains virus (0,1 µm à 0,01 µm), les matières en suspension (MES) qui sont composées de floccs contenant les différentes espèces microbiennes sont aisément et complètement retenues par la membrane. Ainsi les Bàm présentent l'avantage de pouvoir désinfecter en partie les eaux usées sans utiliser d'oxydants, ce qui permet d'éviter la production de molécules cancérogènes (Wisniewski, 2007). Cette barrière physique permet

donc d'avoir une qualité d'effluent traité respectueuse des normes en vigueur. Ce qui n'est pas toujours le cas dans les STEP classiques où l'efficacité et la fiabilité de l'épuration restent étroitement dépendantes du bon déroulement de la phase de décantation qui elle-même est liée à la qualité de l'effluent à traiter. Or les variations de charge volumique et massique, le déversement de produits toxiques, les dysfonctionnements de paramètres opératoires ainsi que le développement de bactéries filamenteuses ne sont pas rares.

Un autre avantage des Bàm est une indépendance totale entre le temps de séjour hydraulique (TSH) et l'âge de boues appliqué contrairement aux STEP classiques où un TSH faible correspondra forcément à un âge de boues important. Si les STEP conventionnelles peuvent avoir un âge de boues jusqu'à 20 jours, le Bàm offre la possibilité de travailler à des âges de boues beaucoup plus longs (Lee et al., 2003 ; Han et al., 2005 ; Van den Broeck et al., 2012). Cette possibilité est un réel avantage car des bactéries à croissance plus lente telles que les bactéries autotrophes peuvent se développer. Il est alors possible de travailler avec une biomasse plus diversifiée et plus efficace (Khongnakorn et al., 2007) pour le traitement de l'ammonium (Ouyang et Liu, 2009) mais également de certains micropolluants par cométabolisme (Delgado, 2009 ; Clouzot et al., 2010). Une autre conséquence directe de cette augmentation du TSB est une diminution des volumes de boue à extraire et donc à post-traiter.

1.1.2 Principe du Bàm

Le Bàm correspond au couplage d'un procédé biologique et d'un procédé physique de filtration membranaire pour épurer les eaux usées. Dans un Bàm les membranes d'ultra ou de microfiltration sont généralement utilisées. La force motrice est la différence de pression entre les deux côtés de la membrane. Seuls l'eau et les composés qui ont des tailles moléculaires inférieures au seuil de coupure de la membrane traversent les pores de celle-ci. La totalité de la biomasse est retenue et maintenue au sein du système biologique indépendamment de ses propriétés (décantation, âge, taille des floes).

1.1.2.1 Configuration externe

La configuration à boucle externe du B_àM (B_àM_E) (Figure 1. 1) est la première à avoir été mise sur le marché dès la fin des années 60. Ces systèmes ont été brevetés presque simultanément par Dorr Oliver et Rhône Poulenc (procédé UBIS) (Smith et al., 1969). Ils ont été mis en place pour des applications particulières comme la réutilisation des eaux usées domestiques des immeubles japonais.

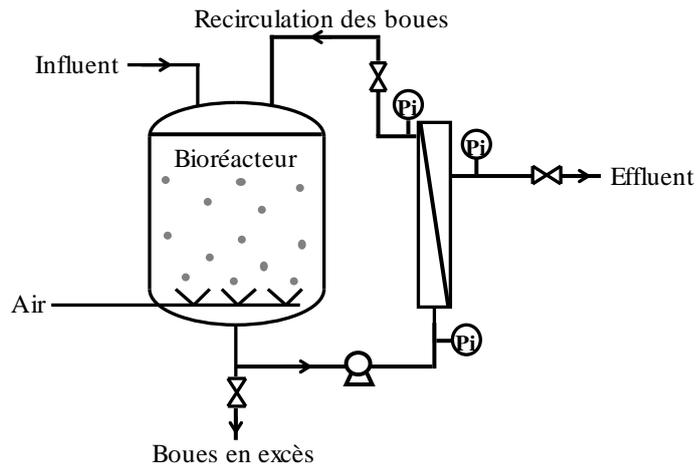


Figure 1. 1: Schéma d'un B_àM_E

Avec un système de pompage adapté, la boue est recirculée du bassin biologique vers le module de filtration placé à l'extérieur du bioréacteur. La filtration mise en œuvre est de type tangential. La vitesse de recirculation en entrée de module est comprise entre 2 et 5 m.s⁻¹ (Tardieu et al., 1999 ; Xing et al., 2000 ; Clouzot et al., 2011). L'application de ces fortes vitesses tangentielles permet de lutter efficacement contre le colmatage des membranes et autorise une production importante de perméat pouvant aller jusqu'à 170 L.h⁻¹.m⁻² (Gander et al., 2000 ; Xing et al., 2000). Les membranes généralement utilisées sont de type tubulaire céramique. L'avantage de ce type de membranes est une très bonne résistance aux lavages chimiques intenses étant donné qu'elles supportent des températures jusqu'à 80°C et des plages de pH de 2 à 13. Néanmoins la commercialisation de ce procédé a été limitée à cause du coût d'investissement dû aux membranes mais également à la forte consommation énergétique engendrée par l'utilisation de pompes centrifuges. En effet la consommation énergétique des B_àM_E (0,7 à 50 kW.m⁻³ (Gander et al., 2000 ; Le-Clech et al., 2006) est

supérieure à celle des systèmes à boues activées (BA) conventionnels ($0,3 \text{ kW.m}^{-3}$) (Yamamoto et al., 1989).

1.1.2.2 Configuration immergée

Vingt ans après la commercialisation des premiers B \grave{a} M $_E$, les B \grave{a} M immergées (B \grave{a} M $_I$) proposés par Yamamoto et al., (1989) sont apparus (Figure 1. 2) pour essayer de minimiser les coûts énergétiques engendrés par les B \grave{a} M $_E$.

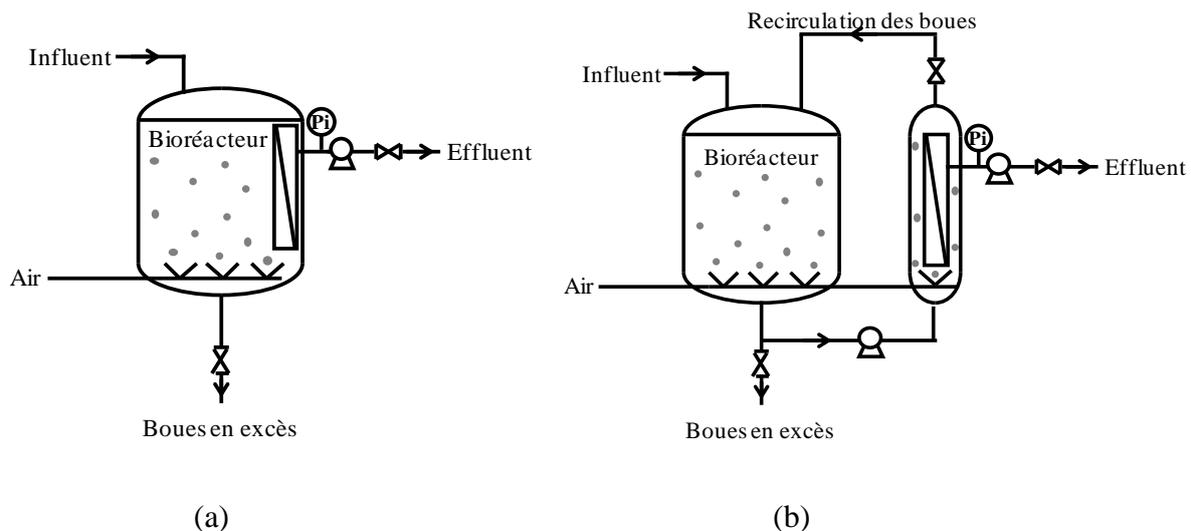


Figure 1. 2 : Schémas (a) d'un B \grave{a} M $_I$ et (b) d'un B \grave{a} M $_{IE}$

La pression transmembranaire est créée par une pompe de suction qui aspire le perméat au travers des membranes (Pression $< 1 \text{ bar}$). Les modules utilisés sont généralement des fibres creuses (la filtration frontale a lieu de l'extérieur vers l'intérieur des fibres) ou des membranes planes organiques. L'aération par l'intermédiaire de fines bulles dans le bassin biologique permet de fournir l'oxygène nécessaire au métabolisme bactérien. A la membrane, une aération efficace permet de lutter contre le colmatage, en créant une agitation à proximité de celles-ci. Cette configuration présente l'avantage de conditions plus douces pour la biomasse mais surtout une consommation énergétique faible ($< 1 \text{ kW.m}^{-3}$) (Le-Clech et al., 2006). Dans cette configuration les flux de perméat ne dépassent souvent pas les $50 \text{ L.h}^{-1}.\text{m}^{-2}$ (Gander et al., 2000) et pour des fonctionnements à long terme la gamme de flux généralement rencontrée se situe entre 5 et $20 \text{ L.h}^{-1}.\text{m}^{-2}$ (Chang et al., 2002). Malgré cette baisse de productivité, cette configuration a permis l'essor du marché des B \grave{a} M en traitement

d'effluents urbains grâce notamment aux moindres coûts énergétiques mais également à la baisse du prix des membranes organiques par rapport à la configuration externe (membranes céramiques).

Une dernière configuration a vu le jour ces dernières années : le B_àM immergées externes (B_àM_{IE}) (Figure 1. 2). Cette nouvelle configuration placée dans la catégorie des configurations internes, résulte d'un compromis entre les B_àM_E et les B_àM_I. Les membranes sont immergées dans un carter à l'extérieur du bassin biologique. Les membranes généralement utilisées sont des fibres creuses ou des membranes planes organiques. La filtration est semi-frontale. Cette configuration facilite les opérations de maintenance (nettoyages chimiques, inspections). Les flux obtenus sont les mêmes que ceux obtenus pour les B_àM_I. L'avantage de ces deux configurations (B_àM_I/B_àM_{IE}) est de découpler l'aération nécessaire au métabolisme bactérien de celle nécessaire au décolmatage des membranes.

1.1.2.3 Comparaison du B_àM_E et du B_àM_I/B_àM_{IE}

L'inconvénient majeur de la configuration immergée se trouve au niveau de la gestion du colmatage et de l'exploitation du procédé. Afin d'éviter le colmatage des fibres creuses généralement employées, des rétrolavages peuvent être effectués (injection de perméat dans le sens inverse précédent la filtration) mais cette technique nécessite l'arrêt de la production et la réutilisation du perméat. Cette méthode reste coûteuse énergétiquement et peut endommager l'intégrité des membranes (Braak et al., 2011). L'introduction d'un temps de relaxation à l'arrêt de la filtration permet des rétrolavages plus efficaces dus à l'absence de flux convectif pendant cette période (Hong et al., 2002). A partir de ce postulat de nombreuses études ont essayé d'optimiser les temps de filtration, de relaxation et de rétrolavage (Yigit et al., 2009 ; Wu et al., 2010). L'aspersion d'air au voisinage des membranes peut également permettre une limitation du colmatage. Cette technique s'avère plus efficace que celles précédemment décrites (Chang et Fane, 2001) et fait l'objet de nombreuses recherches sur la vitesse de l'air, les caractéristiques des bulles (taille, forme et fréquence d'injection), les systèmes d'injection et l'homogénéité de ces bulles dans la biomasse pour réduire les coûts liés à l'aération dans les B_àM_I qui représentent jusqu'à 90 % de l'énergie consommée pour une unité volumique de perméat produite (Melin et al., 2006).

Ces vitesses offrent également l'avantage de limiter le développement des bactéries filamenteuses et de diminuer la taille des floccs bactériens (Defrance et al., 2000 ; Wisniewski

et al., 2000). Les petits floes ainsi obtenus offrent une surface d'échange plus grande entre les micro-organismes, l'oxygène et les nutriments garantissant ainsi une meilleure activité biologique mais semble également engendrer une meilleure biosorption de certains polluants sur les floes (Clouzot et al., 2011).

Grâce à un coût à l'achat plus faible des Bàm_I, le nombre d'installations ne cesse de croître ces dernières années. Néanmoins, l'investissement membranaire pour les Bàm_I est plus élevé étant donné les faibles flux de perméat obtenus. Enfin à cette différence il faut ajouter la durée de vie plus faible des membranes organiques par rapport aux membranes céramiques.

1.2 Les performances épuratrices du BâM. Liens avec l'activité biologique.

1.2.1 Les paramètres opératoires utilisés

Le bon fonctionnement d'un BâM est la résultante d'un compromis entre les valeurs optimales de TSH, de charge volumique (C_v), de C_m et de TSB pouvant être appliqués (Tableau 1. 1) afin de garantir une épuration maximale de la demande chimique en oxygène (DCO) par les bactéries hétérotrophes et de l'azote en deux étapes : la nitrification en milieu aérobie où les autotrophes transforment l'ammonium en nitrates puis la dénitrification qui s'opère en milieu anoxie et où les hétérotrophes dégradent la DCO en puisant leur source d'oxygène dans les nitrates précédemment formés.

Tableau 1. 1 : Classement des procédés par boues activées

Appellation	Aération prolongée	Faible charge	Moyenne charge	Forte charge	Très forte charge
Caractéristiques					
Charge massique ($\text{kg}_{\text{DBO}_5} \cdot \text{kg}_{\text{MES}}^{-1} \cdot \text{jr}^{-1}$)	< 0,08	0,08 à 0,25	0,25 à 0,5	0,5 à 1	> 1
Charge volumique ($\text{kg}_{\text{DBO}_5} \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{jr}^{-1}$)	< 0,32	< 0,4	0,8 à 1	1 à 1,5	> 5
Age de boues (j)	> 18	13 à 18	3 à 7	1 à 3	0,3 à 0,7
Concentration des boues ($\text{kg} \cdot \text{m}^{-3}$)	4 à 6	3 à 5	3 à 4	2 à 3	< 3
Rendement d'élimination de la DBO_5	> 90 %	90 %	80 à 90 %	< 80 %	
Nitrification	très avancée	avancée	commencée	faible à nulle	

Lors du dimensionnement d'un BâM, un premier objectif est de minimiser le TSH afin d'augmenter les capacités de traitement mais également de permettre un meilleur contrôle du système en cas de dysfonctionnement.

A l'opposé, une C_v maximisée entraîne un meilleur rendement d'épuration. En d'autres termes, pour un volume constant la quantité de polluants traitée est augmentée. Cependant, de

trop fortes C_v ont pour autre conséquence de dépasser les capacités d'aération des bassins biologiques ce qui provoque une limitation par l'oxygène de l'élimination des polluants.

Un paramètre supplémentaire régissant les rendements d'épuration est la C_m , qui représente la quantité de matière organique appliquée à la biomasse. En minimisant la C_m , le rendement épuratoire est maximisé et la production de boues minimisée. Pour diminuer cette C_m , il faut augmenter la concentration en bactéries du bioréacteur.

La Figure 1. 3 schématise les conditions de fonctionnement régulièrement choisies pour le traitement d'effluents réels urbains (ERU) en considérant la concentration en DCO de l'effluent d'entrée ainsi que le débit d'alimentation fixes. Ces conditions de fonctionnement se situent dans les zones A et B. Dans la zone A, le TSH est proche de ceux des systèmes classiques à BA travaillant à faible C_m et il n'y a pas de gain en compacité sur le bassin biologique par rapport aux STEP conventionnelles. En revanche la concentration en biomasse plus élevée que dans les systèmes classiques permet de travailler à une C_m plus faible et donc de minimiser la production de boues et d'améliorer l'épuration. Dans la zone B, le TSH plus court que dans les systèmes classiques permet d'établir un bassin biologique plus compact. Cependant aucun gain n'est fait sur la production de boues car le TSH plus faible engendre des C_m légèrement plus élevées que dans la zone A.

La zone C correspond plus à fonctionnement adapté pour la biodégradation d'effluents industriels qui sont souvent fortement chargés en polluants.

Les paramètres opératoires choisis correspondent donc au meilleur compromis pouvant être obtenus pour garantir une importante capacité épuratoire (baisse du TSH) en prenant en compte une limitation de la production de boues (baisse de la charge massique et hausse du TSH), la compacité du procédé souhaité (baisse du TSH) et une limitation du colmatage et des problèmes de transfert d'oxygène vers la biomasse.

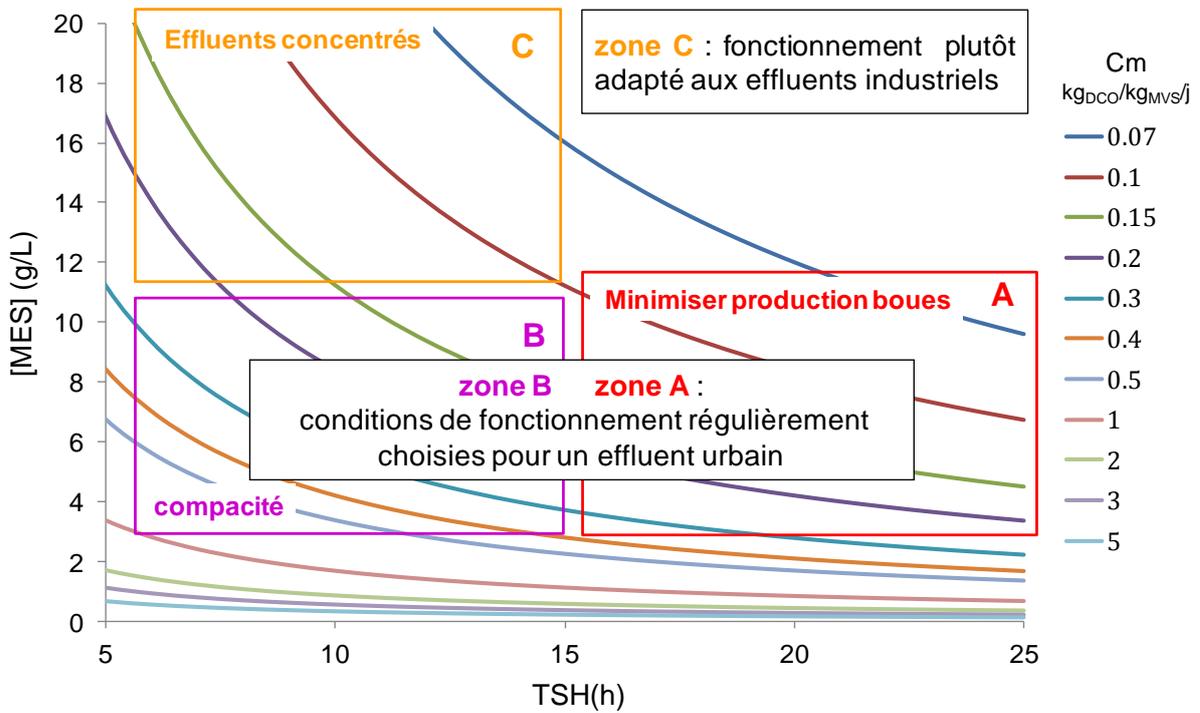


Figure 1. 3 : Conditions de fonctionnement choisies (concentration en MES et TSH) en fonction de la C_m (adapté de Grasmick et al., 2007)

1.2.2 Influence de la charge

Les bactéries hétérotrophes sont capables d'éliminer le carbone organique sur une large gamme de charges volumiques ou massiques appliquées en conditions stationnaires (Shen et al., 2010 ; Johir et al., 2012 ; Khoshfetrat et al., 2012) et non stationnaires. Johir et al., (2012) montrent que l'épuration de la DCO d'un effluent synthétique dans un BàM_I est maintenue supérieure à 90 % pour des charges volumiques comprises entre $0,5 - 3 \text{ kg}_{\text{DCO}} \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{j}^{-1}$. Lebegue et al., (2008a) observent une épuration de près de 99 % de la DCO d'un effluent synthétique au bout d'à peine 10 jours après une décharge accidentelle de $192 \text{ kg}_{\text{DCO}} \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{j}^{-1}$.

Lobos et al., (2008) montrent que pendant les périodes où leur BàM se trouve être à forte C_m ($12 \text{ g}_{\text{DCO}} \cdot \text{g}_{\text{MVS}}^{-1} \cdot \text{j}^{-1}$), la multiplication cellulaire est favorisée. Ainsi la concentration en biomasse augmente avec la charge massique.

L'étude réalisée par Han et al., (2005) montre que l'activité des hétérotrophes augmentent avec la C_m (entre $0,15$ et $0,05 \text{ kg}_{\text{DCO}} \cdot \text{kg}_{\text{MVS}}^{-1} \cdot \text{j}^{-1}$). Une plus grande quantité de DCO étant à biodégrader il est normal que les bactéries hétérotrophes utilisent plus d'oxygène pour dégrader cet afflux de DCO. Cette remarque est également valable pour les autotrophes sur la gamme de charges où leur épuration de l'ammonium est efficace (Pollice et al., 2008).

Concernant la biomasse autotrophe, elle montre des limites d'épuration de l'ammonium à forte charge volumique. En maintenant constant le ratio C/N de leur effluent synthétique dont la charge volumique varie entre $0,5 - 3 \text{ kg}_{\text{DCO}} \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{j}^{-1}$, Johir et al., (2012) mesurent une épuration d'environ 84 % du N-NH_4^+ pour des charges comprises entre 0,5 et $1 \text{ kg}_{\text{DCO}} \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{j}^{-1}$. Ce rendement baisse à 60 % dès que la charge augmente à $2 \text{ kg}_{\text{DCO}} \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{j}^{-1}$. Les auteurs évoquent la compétition entre les besoins en oxygène accrus des hétérotrophes et des autotrophes pour expliquer le phénomène. Une autre explication peut être une inhibition de l'activité des autotrophes par l'augmentation de la concentration en ammonium. Gagnaire (2010) montre avec un $\text{B}\hat{\text{a}}\text{M}_\text{E}$ alimenté avec un effluent synthétique que la cinétique de consommation de l'ammonium suit un phénomène d'inhibition par excès de substrat. Cette inhibition de la dégradation de l'ammonium est constatée dès que la concentration en ammonium dépasse les $350 \text{ mg}_{\text{N-NH}_4^+} \cdot \text{L}^{-1}$.

1.2.3 Influence de l'âge de boues

De nombreuses études sont réalisées sur l'influence de l'âge de boues sur les performances de $\text{B}\hat{\text{a}}\text{M}$ en termes d'épuration et d'activité bactérienne pour le traitement d'ERU et d'effluents synthétiques (Huang et al., 2001 ; Han et al., 2005 ; Clouzot et al., 2011) (Tableau 1.2). Peu importe les conditions opératoires et environnementales testées dans le Tableau 1. 2, les hétérotrophes dégradent toujours en fonctionnement stationnaire des bioréacteurs plus de 90 % de la DCO entrante.

Une plus grande disparité dans le traitement de l'ammonium est obtenue en fonction des études considérées. Par exemple Liang et al., (2010) et Han et al., (2005) obtiennent respectivement dans leur $\text{B}\hat{\text{a}}\text{M}_\text{I}$ des rendements d'élimination du N-NH_4^+ de 69 % et 87 % dans le traitement d'un effluent synthétique à des TSB de 20 jours et 30 jours. Alors que Huang et al., (2001) et Pollice et al., (2008) trouvent des rendements égaux à 99% dans le cas du traitement d'ERU au même TSB de 20 jours. La nature de l'effluent et sa composition semblent donc avoir une importance quant à l'efficacité de traitement de l'ammonium mais il n'existe aucune étude permettant de comparer dans le même type de réacteur avec les mêmes conditions opératoires l'impact de la nature de l'effluent sur l'élimination de l'azote.

Les études répertoriées dans le Tableau 1. 2 montrent que pour une augmentation du TSB, les concentrations en MVS augmentent et les activités spécifiques des hétérotrophes et autotrophes baissent (Huang et al., 2001 ; Han et al., 2005 ; Pollice et al., 2008).

Tableau 1. 2 : Activités bactériennes et rendements épuratoires obtenus dans différentes études

procédé	Type effluent	MVS (g _{MVS} ·L ⁻¹)	Cm (kg _{DCO} ·kg _{MVS} ⁻¹ ·j ⁻¹)	Cv (kg _{DCO} ·m ⁻³ ·j ⁻¹)	TSB (j)	TSH (h)	DCO (%)	NH4 ⁺ (%)	SOUR ^(c)	SOUR	Référence
									Hétérotrophes (mg _{O2} ·g _{MVS} ⁻¹ ·h ⁻¹)	Autotrophes (mg _{O2} ·g _{MVS} ⁻¹ ·h ⁻¹)	
BàM _I	municipal	0,4	-	-	5	5	96	94	5	7	Huang (2001)
BàM _I	municipal	1,8	-	-	10	5	94	94	3,5	9	Huang (2001)
BàM _I	municipal	3	-	-	20	5	96	99	2,4	6	Huang (2001)
BàM _I	municipal	4	-	-	40	5	95	97	2	2,1	Huang (2001)
BàM _I	synthétique	12	0,1	0,6-1,5	∞	8,3	93	-	-	-	Liu (2005)
BàM _I	synthétique	7 ^(a)	0,15 ^(b)	1	30	12	92	87	3,4	1,3	Han (2005)
BàM _I	synthétique	10	0,1	1	50	12	94	94	3,4	1,2	Han (2005)
BàM _I	synthétique	14	0,07	1	70	12	97	96	3,5	1,2	Han (2005)
BàM _I	synthétique	18	0,05	1	100	12	96	89	2,7	1,1	Han (2005)

^(a) Exprimé en g_{MES}·L⁻¹; ^(b) exprimé en kg_{DCO}·kg_{MES}⁻¹·j⁻¹ ^(c)SOUR : specific oxygen uptake rate

Tableau 1.2 (suite) : Activités bactériennes et rendements épuratoires obtenus dans différentes études

procédé	Type effluent	MVS (g _{MVS} ·L ⁻¹)	Cm (kg _{DCO} ·kg _{MVS} ⁻¹ ·j ⁻¹)	Cv (kg _{DCO} ·m ⁻³ ·j ⁻¹)	TSB (j)	TSH (h)	DCO (%)	NH ₄ ⁺ (%)	SOUR	SOUR	Référence
									Hétérotrophes (mg _{O₂} ·g _{MVS} ⁻¹ ·h ⁻¹)	Autotrophes (mg _{O₂} ·g _{MVS} ⁻¹ ·h ⁻¹)	
BàM _I	municipal	3,7 ^(a)	-	1,2	20	-	92	99	15	15	Pollice (2008)
BàM _I	municipal	6,1	-	1,2	40	-	92	99	5	13	Pollice (2008)
BàM _I	municipal	7,9	-	1,2	60	-	95	99	5	15	Pollice (2008)
BàM _I	municipal	9,4	-	1,2	80	-	94	99	5	10	Pollice (2008)
BàM _I	municipal	22,9	-	1,2	∞	-	86	99	1	2	Pollice (2008)
BàM _I	synthétique	-	-	0,5	20	24	98	69	47	30	Liang (2010)
BàM _I	synthétique	9,2	0,2	1,6	50	25	99	99	8	6,6	Clouzot (2011)
BàM _E	synthétique	8,5	0,2	1,6	50	25	99	85	10,6	5,6	Clouzot (2011)

^(a) Exprimé en g_{MES}·L⁻¹

Ces études sur l'influence du TSB sont faites à une charge volumique fixe. Ainsi aux TSB les plus faibles où les purges de biomasse sont plus importantes, les concentrations en MVS sont à leur valeur la plus basse, les charges massiques à leur valeur la plus haute. Il en résulte donc une activité plus élevée des bactéries autotrophes et hétérotrophes.

Avec l'augmentation de l'âge de boues et par conséquent la diminution des purges, les concentrations en MVS augmentent diminuant ainsi la charge massique appliquée et les activités bactériennes spécifiques. Lebegue (2008a) annonce ainsi à l'aide du activated sludge model 3 (ASM 3) (Figure 1. 4) que la charge volumique appliquée impacte directement sur la part de biomasse hétérotrophe (X_{BH}) active du système. Elle affirme également qu'il est inutile de travailler à des âges de boues supérieures à 30 jours car la part active de biomasse hétérotrophe est stable et que seule la partie inerte augmente. Malheureusement cette étude ne s'est pas intéressée à la biomasse autotrophe dont le développement est accentué avec l'augmentation du TSB.

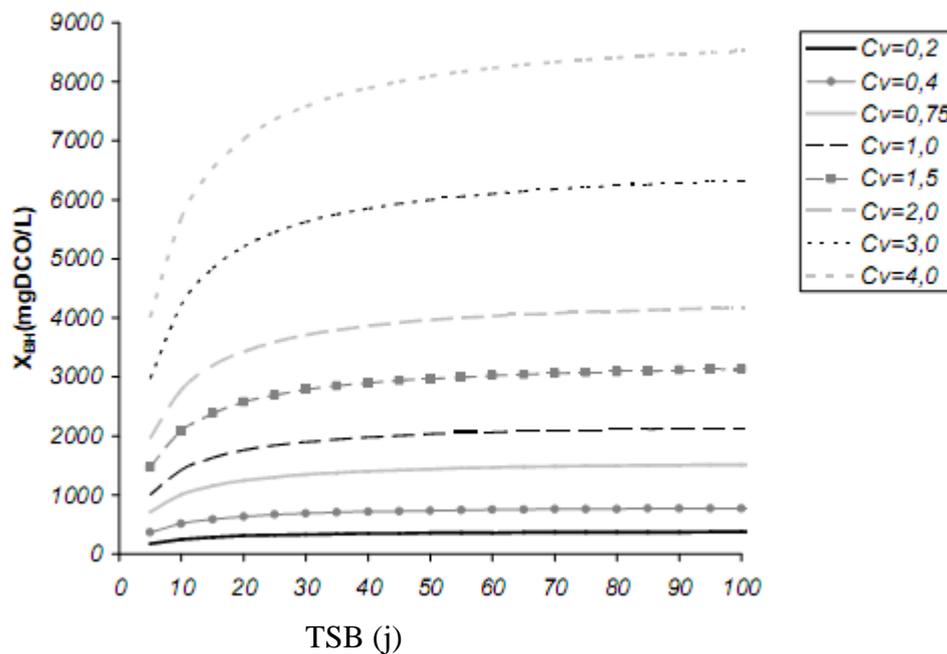


Figure 1. 4: Evolution de la biomasse hétérotrophe active avec le TSB pour différentes charges volumiques (Lebegue, 2008a)

Si Spérandio et Espinosa, (2008) sont d'accord avec cette irrémédiable augmentation des matières inertes avec le TSB quoiqu'apparemment surestimées par le modèle ASM 3, ils montrent cependant pour la biomasse autotrophe que la part active augmente avec le TSB (calcul de l'activité maximale volumétrique ($\text{mg}_{\text{O}_2} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$)). Ils constatent une baisse de l'activité spécifique des autotrophes aux forts âges de boues (53 et 110 jours) car la part active des autotrophes augmente moins vite que la partie inerte contenue dans les MVS provenant de l'effluent et du mécanisme de décroissance bactérienne. Les études répertoriées dans le Tableau 1. 2 et réalisées par Huang et al., (2001), Han et al., (2005) ainsi que Pollice et al., (2008) jusqu'à un TSB de 60 jours montrent également ce phénomène pour les biomasses autotrophes et hétérotrophes. Alors que leurs activités spécifiques diminuent avec le TSB, leurs activités maximales volumiques augmentent.

Malgré les baisses d'activités spécifiques des autotrophes constatées entre 7 et $2,1 \text{ mg}_{\text{O}_2} \cdot \text{g}_{\text{MVS}}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ pour des TSB respectivement de 5 à 40 jours, Huang et al., (2001) constatent des rendements d'épuration en ammonium contenu dans ERU supérieurs à 90 %. Il en est de même pour Pollice et al., (2008) qui trouvent une épuration de l'ammonium d'un ERU constante à 99 % avec des baisses d'activités spécifiques des autotrophes de 15 à $2 \text{ mg}_{\text{O}_2} \cdot \text{g}_{\text{MVS}}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ pour des TSB allant de 20 jours à la rétention totale de la biomasse.

Dans le cas du traitement de l'ammonium contenu dans un effluent synthétique, Han et al., (2005) montrent l'existence d'un optimum de son épuration à 96 % quand le TSB est à 70 jours avec juste une baisse de $0,1 \text{ mg}_{\text{O}_2} \cdot \text{g}_{\text{MVS}}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ de l'activité autotrophe par rapport à un TSB de 30 jours. Les auteurs expliquent cette baisse de rendement d'épuration de l'ammonium au-delà d'un TSB de 70 jours par une baisse de la vitesse de nitrification liée à un transfert d'oxygène plus faible vers les bactéries en raison d'une concentration élevée en MVS ($18 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$) et à un phénomène de compétition des micro-organismes vis-à-vis du substrat du à la faible charge massique appliquée.

Dans ces études, les effets de l'âge de boues sur les activités des hétérotrophes et autotrophes sont malheureusement indissociables de ceux générés par la baisse de la charge massique. Aucune étude ne traite de l'influence de l'âge de boues à charge massique fixe.

1.2.4 Etude des mécanismes de production de boues

1.2.4.1 Production de boues et métabolisme cellulaire

Dans le cas d'une culture pure, le profil de croissance généralement adopté contient une phase de latence suivi par une phase exponentielle, puis une phase stationnaire et enfin une phase de décès. Le modèle classiquement employé est le modèle de Monod qui relie la quantité de substrat consommé (S) à la quantité de biomasse formée (X) (Equations 1.1 et 1.2) :

$$X = Y_H \cdot S \quad (1.1)$$

$$Y_H = -\frac{dX}{dS} \quad (1.2)$$

Or ce taux de conversion est un taux de conversion maximal et il ne représente pas la production de boue d'un procédé (Y_{obs}). Plusieurs paramètres pris en compte par Henze et al., (1986) dans les modèles ASM sont indispensables pour obtenir une valeur approchant la production de boue réelle :

- La production nette des micro-organismes résultant d'un bilan entre leur croissance suite à la consommation de substrats biodégradables et leur décroissance cellulaire lors du métabolisme endogène, de la croissance cryptique et des processus de maintenance,
- L'accumulation de matières minérales en suspension,
- L'accumulation de matières organiques non biodégradables (réfractaires).

La Figure 1. 5 schématise les mécanismes biologiques et physiques régissant la production de boues. Les composés lentement biodégradables sont progressivement hydrolysés et deviennent ainsi facilement assimilables par les bactéries. Les molécules facilement biodégradables sont partiellement oxydées par les microorganismes hétérotrophes et sont dans le même temps utilisées pour la croissance cellulaire. Une autre partie intervient dans les réactions de maintenance cellulaire.

Lors de la lyse cellulaire et du décès, la biomasse est oxydée et peut conduire à une production de composés inertes, majoritairement particulaires.

Les MES sont donc constituées de biomasse, de DCO non biodégradable et de DCO hydrolysable.

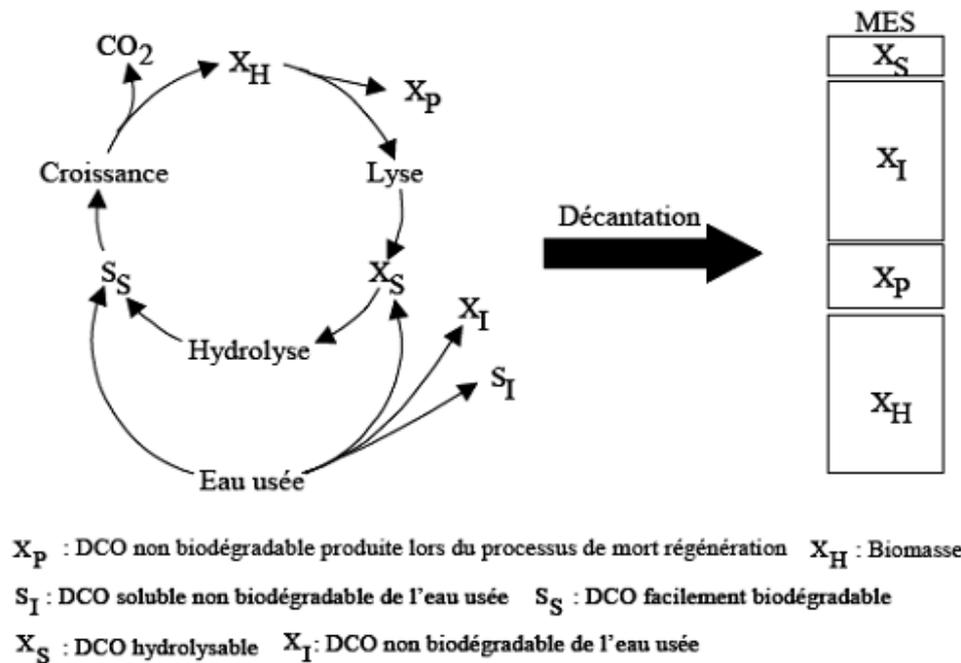


Figure 1. 5 : Conversion de la matière organique dans les procédés à boues activées (Salhi, 2003)

1.2.4.2 L'hydrolyse

L'hydrolyse correspond au processus au cours duquel les composés à haute masse moléculaire sont fractionnés en composés de structure plus simple assimilables par les bactéries.

La vitesse d'hydrolyse peut être décrite par l'équation 1.3 :

$$\frac{dX_S}{dt} = -k_H \frac{\frac{X_S}{X_H}}{K_X + \frac{X_S}{X_H}} X_H \quad (1.3)$$

Avec :

K_H : constante d'hydrolyse (j^{-1})

K_X : constante de demi saturation (-)

X_S : concentration en substrat hydrolysable ($\text{g}_{\text{DCO}} \cdot \text{L}^{-1}$)

X_H : concentration en biomasse ($\text{g}_{\text{MVS}} \cdot \text{L}^{-1}$)

Dans le cas de boues activées, la concentration en substrat hydrolysable est généralement très inférieure à celle de la biomasse. Un excès d'enzymes est alors constaté et l'équation 1.4 s'écrit :

$$\frac{dX_S}{dt} = -k_H X_S \quad (1.4)$$

La vitesse d'hydrolyse est donc indépendante de la concentration en biomasse.

1.2.4.3 La croissance cellulaire

En tant que sources d'énergie, les nutriments sont oxydés et l'énergie produite au cours de l'oxydation est transférée sous forme de composés riches en énergie, la plupart du temps sous forme d'adénosine triphosphate (ATP). Ces réactions d'oxydation ou de dégradation constituent le catabolisme cellulaire. L'énergie libérée sert alors aux réactions de synthèse cellulaire (anabolisme) ou de maintenance cellulaire (Figure 1. 6). Les fonctions de maintenance comprennent le renouvellement du matériel cellulaire, le travail osmotique pour maintenir les gradients de concentration de part et d'autre de la cellule, la mobilité de la cellule et la préservation du pH intracellulaire (Garcia-Ochoa et al., 2010).

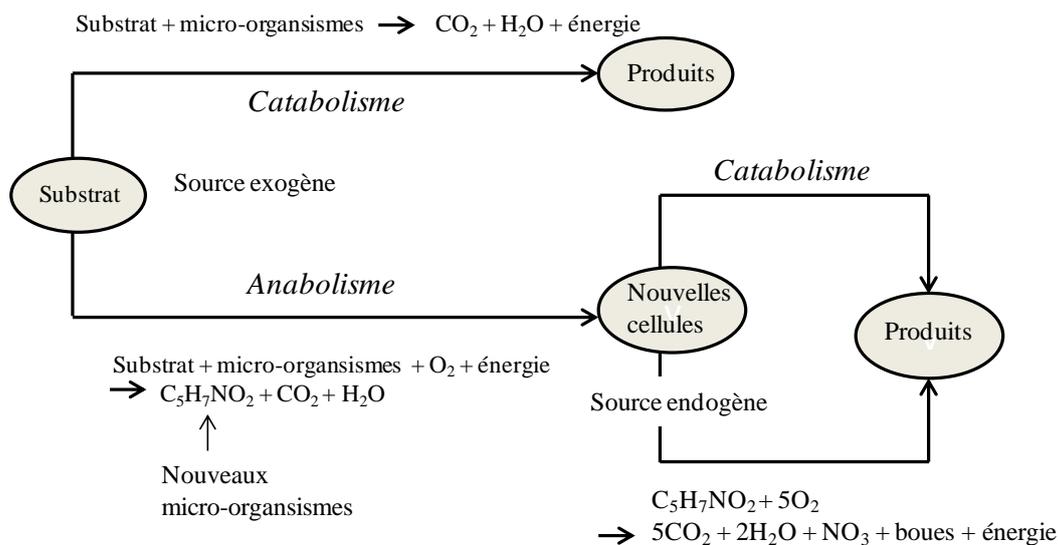


Figure 1. 6 : Représentation schématique du métabolisme microbien

Généralement les modèles cinétiques de croissance cellulaire sont d'ordre 1 par rapport à la concentration en biomasse active et sont décrits par l'équation 1.5 :

$$\frac{dX_H}{dt} = \mu_{\max} \frac{S_s}{S_s + K_s} X_H \quad (1.5)$$

Avec :

K_S : constante de demi saturation ($\text{g}_{\text{DCO}} \cdot \text{L}^{-1}$)

S_S : concentration en substrat facilement biodégradable ($\text{g}_{\text{DCO}} \cdot \text{L}^{-1}$)

μ_{\max} : taux de croissance maximal (j^{-1})

X_H : concentration en biomasse ($\text{g}_{\text{MVS}} \cdot \text{L}^{-1}$)

1.2.4.4 Le métabolisme de décroissance

Trois concepts généraux permettent d'expliquer la diminution de production de boues :

- La croissance cryptique correspond à la consommation des résidus cellulaires autochtones pour la formation de biomasse (concept de mort-régénération),
- La respiration endogène où les composants cellulaires sont oxydés par les micro-organismes. Les bactéries assimilent les polymères de réserve intracellulaires pour assurer les besoins de maintenance en l'absence de substrat exogène
- La maintenance cellulaire. A l'opposé des deux autres concepts, celui-ci est consommateur de substrat exogène.

Peu importe le métabolisme de décroissance envisagé, la diminution de la concentration en biomasse active est généralement assimilée à une cinétique de pseudo ordre 1 (Equation 1.6) :

$$\frac{dX_H}{dt} = -b \cdot X_H \quad (1.6)$$

1.2.5 Modélisation de la production de boues en régime permanent

Suivant le concept de décroissance adopté, il existe plusieurs modèles reliant le rendement de production de boues Y_{obs} au temps de séjour des micro-organismes.

Selon le concept de décès cellulaire, le rendement de production de boues s'écrit (Equation 1.7) :

$$Y_{obs} = \frac{Y_H}{1 + k_d \cdot TSB} \quad (1.7)$$

Avec :

Y_H : Rendement intrinsèque de conversion du substrat en biomasse

K_d : Constante de décès (basée sur la diminution des MVS) (j^{-1})

TSB : Temps de séjour des boues (j)

Avec le modèle de maintenance développé par Pirt (1965), une partie de l'énergie est utilisée pour les besoins de la croissance et une autre pour les besoins de maintenance. Le coefficient de décroissance cellulaire est alors proportionnel au rendement de conversion et l'expression de production de boues observée s'exprime par (Equation 1.8) :

$$Y_{obs} = \frac{Y_H}{1 + m_s \cdot Y_H \cdot TSB} \quad (1.8)$$

Avec m_s : Taux spécifique de consommation de substrat pour la maintenance ($g_{DCO} \cdot g_{MVS}^{-1} \cdot j^{-1}$)

Les modèles ASM reprennent le concept de mort-régénération en faisant l'hypothèse qu'une fraction de la biomasse décédée est utilisée par d'autres micro-organismes et qu'une fraction de cette biomasse, notée f_p , est inerte et s'accumule dans la boue. Le rendement de production de boues est défini par (Equation 1.9) :

$$Y_{obs} = \frac{Y_H (1 + b \cdot f_p \cdot TSB)}{1 + b \cdot TSB (1 - Y_H (1 - f_p))} \quad (1.9)$$

Avec

b : constante de décès basée sur la biomasse active (j^{-1})

f_p : fraction de biomasse lysée non biodégradable

Enfin, le modèle de « fraction particulaire inerte de l'eau usée » est ajouté dans les modèles ASM. Il est alors considéré qu'une fraction de la DCO de l'eau usée est trop lentement biodégradable et peut être considérée inerte à l'échelle de temps du procédé. En association avec le concept de mort-régénération, ce modèle conduit à la relation (Equation 1.10) :

$$Y_{obs} = f_{xi} + (1 - f_{xi}) \cdot \frac{Y_H (1 + b \cdot f_p \cdot TSB)}{1 + b \cdot TSB (1 - Y_H (1 - f_p))} \quad (1.10)$$

Avec f_{xi} : fraction particulaire inerte de l'eau usée

1.2.6 Paramètres influençant la production de boues

1.2.6.1 Paramètres opératoires

Parmi les paramètres opératoires influençant la production de boues, deux paramètres étant l'âge de boues et la charge massique ont un effet prépondérant.

En ce qui concerne l'évolution de la production de boues avec la charge massique, il est évident que plus la C_m est forte plus la production de boues augmente. Quel que soit l'effluent utilisé, Lee et al., (2003) et Massé et al., (2006) montrent qu'avec l'augmentation de la C_m , le rendement de production de boues augmente (Tableau 1. 3).

La corrélation entre l'augmentation du temps de séjour des boues et la diminution de la production de boues est largement étudiée dans la littérature (Lee et al., 2003). Le Tableau 1. 3 donne une synthèse des rendements de production de boues dans différentes configurations de Bàm traitant différents effluents à âge de boues fixé ou à rétention totale de la biomasse.

Dans le cas d'une rétention totale de la biomasse alimentée soit par un effluent réel (Muller et al., 1995) soit par un effluent synthétique (Heran et al., 2008), des rendements de production de boues très faibles sont obtenus avec des valeurs respectivement de 0,09 et 0,041 $\text{kg}_{\text{MVS}} \cdot \text{kg}_{\text{DCO}}^{-1}$. Ces rendements sont relativement bas par rapport à ceux obtenus dans

les systèmes à boues activées classiques fonctionnant à faible charge ($0,3 \text{ kg}_{\text{MVS}} \cdot \text{kg}_{\text{DCO}}^{-1}$) (Daigger et Buttz, 1992). Heran et al., (2008) montrent qu'à ces âges de boues extrêmes, l'augmentation de la concentration en MVS ne peut être attribuée à une augmentation de l'activité bactérienne qui est maintenue constante et qu'elle se compose en fait de débris cellulaires, de bactéries mortes et de produits microbiens.

Tableau 1. 3 : Rendements de production de boues en BâM

TSB (j)	C_m (kg_DCO·kg_MV_S⁻¹·j⁻¹)	Y_{obs} (kg_MV_S·kg_DCO⁻¹)	procédé	effluent	Référence
∞	-	0,09	BâM _E	municipal	Muller (1995)
20	0,013	0,16	BâM _I	Glucose	Lee (2003)
40	0,008	0,12	BâM _I	Glucose	Lee (2003)
60	0,007	0,1	BâM _I	Glucose	Lee (2003)
3,5	1,67	0,2	BâM _E	éthanol	Ognier (2004)
10	0,38	0,31	BâM _I	municipal	Massé (2006)
53	0,12	0,22	BâM _I	municipal	Massé (2006)
110	0,10	0,13	BâM _I	municipal	Massé (2006)
∞	0,37-0,06	0,041	BâM _I	acétate	Héran (2008)

Lee et al., (2003) et Massé et al., (2006) montrent bien la minimisation de la production de boues avec l'augmentation du TSB. Cependant ces auteurs ne travaillaient pas à charge massique constante durant leurs expériences à divers âge de boues. En effet la charge massique diminue à mesure que la concentration en MVS augmente dans le réacteur. De ce fait il est difficile de savoir si la baisse d'activité constatée est due à l'augmentation du TSB ou à la baisse de la charge massique. Il paraît donc important de faire des études complémentaires pour dissocier les effets de l'âge de boues et de la charge massique sur la production de boues.

La comparaison des travaux de la littérature montre que l'âge de boues et la C_m ne sont pas les seuls paramètres à prendre en compte pour expliquer la production de boues. Avec un procédé par BA à un TSB de 20 jours, Cicek et al., (1999) obtiennent une production de boues inférieure ($0,22 \text{ kg}_{\text{MVS}} \cdot \text{kg}_{\text{DCO}}^{-1}$) par rapport à un BâM_E fonctionnant à un TSB de 30 jours ($0,27 \text{ kg}_{\text{MVS}} \cdot \text{kg}_{\text{DCO}}^{-1}$) alors que tous les autres paramètres opératoires sont maintenus

constants. La baisse de la production de boues paraît donc plus faible dans le Bàm que dans le réacteur à BA alors qu'il fonctionne à un TSB plus élevé. Les paramètres opératoires que sont le TSB et la C_m seuls ne permettent pas forcément d'expliquer les productions de boues obtenues, d'autres paramètres influencent donc la production de boues et doivent être pris en compte pour expliquer les phénomènes impliqués dans la production de boues (nature de l'effluent, flore microbienne, configuration des réacteurs).

1.2.6.2 Fraction inerte de l'effluent

La nature de l'effluent à traiter est à prendre en compte dans l'évaluation de la production de boues. Salhi (2003) montre l'influence majeure de la fraction inerte des ERU sur la production de boues. Pour un TSB de 12 jours, une eau contenant 10 % de composés inertes conduit à un rendement de production de boues de $0,35 \text{ g}_{\text{DCO}} \cdot \text{g}_{\text{DCOéliminée}}^{-1}$ alors qu'il augmente jusqu'à $0,43 \text{ g}_{\text{DCO}} \cdot \text{g}_{\text{DCOéliminée}}^{-1}$ quand l'eau contient 20 % de composés inertes.

En effet, concernant les matières minérales particulières, elles doivent théoriquement conduire à une augmentation de la fraction minérale des MES avec l'âge de boues. Elles sont calculées par un bilan de matière entre les matières minérales entrantes et celles purgées avec les boues. Cependant Heran et al., (2008) constatent que pour une rétention totale de la biomasse en traitant un effluent synthétique, le rapport MVS/MES reste constant à 0,8. Ce qui signifie qu'aucune minéralisation ne se produit. Pollice et al., (2004), dans le cas du traitement d'une ERU prédécantée, montrent que le rapport $\text{MM}_{\text{entrée}}/\text{MM}_{\text{boue}}$ (MM étant les matières minérales en suspension) reste constant à 44 %. Ils affirment donc que les composés minéraux entrant dans le réacteur ne s'y accumulent pas et qu'ils sont probablement solubilisés en produisant des composés ayant une taille moléculaire plus faible que les pores de la membrane. Spérandio et Espinosa, (2008) confirment cette hypothèse et montrent que les modèles ASM1 et 3 surestiment les concentrations en MM en suspension de 50 à 150 %. La plus grande différence est observée pour des âges de boues élevés (53 et 110 jours) et est accentuée avec une décroissance du pH du à la nitrification (pH constaté vers 6 - 6,5). Si l'effluent influence le rendement de production de boues, à ce jour aucune étude ne compare le Y_{obs} obtenu pour un Bàm fonctionnant exactement avec les mêmes paramètres opératoires hormis la nature de l'effluent (synthétique ou réel). Ce genre d'études permettrait d'évaluer l'impact de la matière minérale de l'effluent réel sur le rendement de production de boues.

1.3 Le colmatage membranaire

Les difficultés opérationnelles les plus souvent rapportées quant à l'utilisation des Bàm sont liées aux problèmes de transfert de matière dans le réacteur biologique et à la membrane. Dans le réacteur c'est le transfert d'oxygène et de nutriments vers les bactéries qui s'avère être crucial car une concentration en biomasse deux à trois fois supérieure est rencontrée par rapport aux STEP conventionnelles. A la membrane, la problématique concerne le colmatage. La plupart des études publiées ces dernières années visent à trouver les conditions opératoires adaptées pour garantir une épuration des effluents efficace mais également une minimisation des problèmes liés à l'utilisation de Bàm.

1.3.1 Principe du colmatage

1.3.1.1 Caractéristiques du colmatage membranaire dans les Bàm

Le colmatage membranaire est un phénomène très complexe qui peut mettre en jeu différents mécanismes. La taille des floccs, des particules, la présence de colloïdes, de solutés et de polymères extracellulaires sont autant d'éléments impliqués dans le colmatage de la membrane. Si les particules colmatantes ont des dimensions similaires aux pores de la membrane tels que les colloïdes ou plus petites comme les solutés, les phénomènes d'adsorption sur les parois des pores et d'obstruction se produisent préférentiellement. Cependant si les particules colmatantes ont des dimensions supérieures à celles des pores, un gâteau va se former à la surface de la membrane.

Meng et al., (2009) proposent de définir trois types de colmatage (Figure 1. 7) :

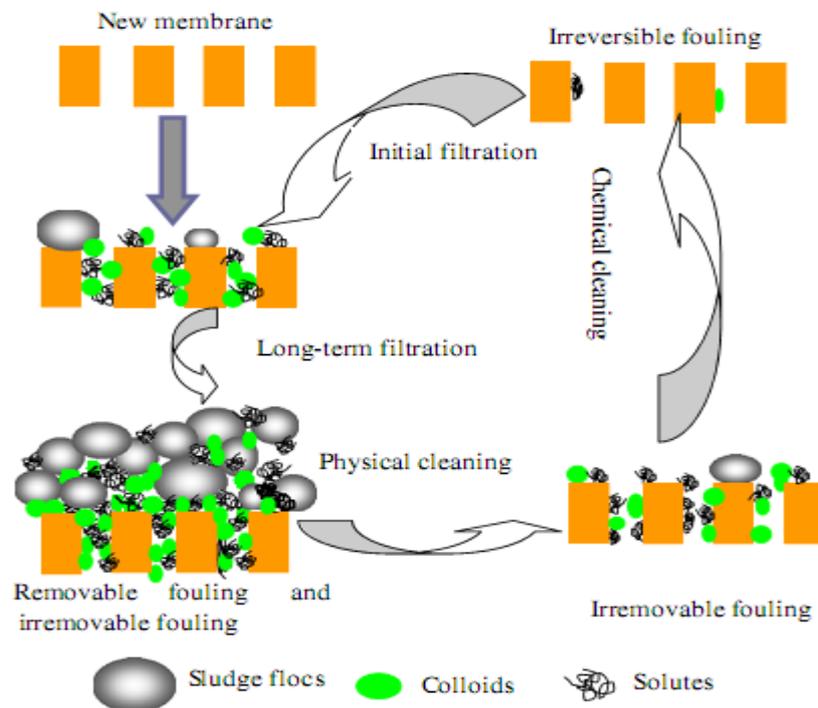


Figure 1. 7 : Représentation schématique de la formation et de l'élimination du colmatage détachable, non détachable et irréversible (Meng et al., 2009)

- Le colmatage détachable qui peut être facilement enlevé par un nettoyage physique tel que le retro lavage. Il est généralement attribué aux phénomènes d'obstruction des pores et à la formation d'un gâteau. Il est souvent considéré comme ayant la contribution la plus importante dans le colmatage membranaire.
- Le colmatage non détachable qui nécessite le recours à un traitement chimique pour être éliminé. Pendant la filtration initiale, les cellules microbiennes, les colloïdes et les solutés pénètrent dans la membrane et précipitent dans les pores. Ensuite, pour des fonctionnements de BÀM plus longs, les cellules déposées se multiplient et produisent des PEC qui bouchent les pores et forment une couche colmatante solidement reliée aux pores de la membrane.
- Le colmatage irréversible qui est permanent et donc ne peut être détaché de la membrane. Il est attribué aux mécanismes d'adsorption et de polarisation de concentration. L'adsorption peut se faire soit à l'intérieur des pores soit à la surface de

la membrane par interactions physico-chimiques entre le matériau membranaire et la suspension à filtrer. La polarisation de concentration correspond à une accumulation de solutés aux alentours de la membrane. Un gradient de concentration est ainsi créé, entraînant un flux de diffusion de la membrane vers la solution. Cette deuxième couche filtrante est appelée couche de gel et peut résulter en une précipitation de nombreux sels (tels que le calcium ou le phosphore).

Du point de vue constitutif, le colmatage est divisé en trois parties :

- Le colmatage biologique se réfère au dépôt, à la croissance et au métabolisme des cellules microbiennes et des floccs à la surface de la membrane.
- Le colmatage organique tient compte du dépôt de biopolymères tels que les protéines ou les polysaccharides sur la membrane. Metzger et al., (2007) ont fait une étude détaillée pour caractériser ces dépôts de biopolymères dans les B&M. Ils ont fractionné en trois couches le colmatage de la membrane, la couche supérieure, la couche intermédiaire et la couche inférieure qui est la plus profondément ancrée dans la membrane. Ils en ont conclu que la couche supérieure est principalement composée d'un colmatage détachable dont la composition est très proche de celles des floccs présents dans le bioréacteur. La couche intermédiaire est composée d'agrégats bactériens et majoritairement de polysaccharides. Et la couche inférieure qui constitue le colmatage non détachable est principalement composée de PEC liés principalement de nature protéique.
- Le colmatage minéral qui est dû à la précipitation de minéraux dans la membrane.

Les conséquences principales du colmatage membranaire sont une réduction du flux de perméat et une augmentation de la pression transmembranaire (PTM).

La loi de Darcy associée au modèle des résistances en série permet d'exprimer le flux de perméat J ($\text{m}^3 \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{m}^{-2}$) fonction des pressions appliquées et des résistances (Equation 1.11).

$$J = \frac{PTM}{\eta(R_M + R_S)} \quad (1.11) \text{ avec } R_S = R_A + R_D + R_P$$

Avec η la viscosité apparente (Pa.s) du perméat, R_M la résistance hydraulique de la membrane (m^{-1}) et R_S la somme des résistances liées au colmatage de la membrane par les phénomènes d'adsorption R_A (m^{-1}), de dépôt d'un gâteau R_D et de polarisation R_P (m^{-1}).

Cho et Fan (2002) proposent une évolution de la PTM en fonction du temps de filtration en trois étapes :

- Etape 1 : une augmentation rapide et courte (quelques heures) de la PTM lors d'une filtration à flux constant associé à la mise en place du colmatage irréversible
- Etape 2 : une augmentation lente et faible de la PTM dû à l'accumulation de substances issues de l'activité biologique à la membrane et à la formation d'un gâteau
- Etape 3 : saut de PTM qui nécessite obligatoirement un lavage de la membrane

Les auteurs expliquent ce saut de PTM comme la conséquence d'un colmatage membranaire sévère qui pourrait causer des changements dans la valeur du flux local qui deviendrait supérieur au flux critique. Zhang et al., (2006) ajoutent que ce saut de PTM peut provenir de changements brutaux dans la structure du biofilm ou du gâteau à la surface de la membrane. Ce saut de PTM apparaît inévitablement dans un fonctionnement de B_àM à long terme et dépend des paramètres opératoires. Les interactions de ces différents paramètres opératoires ne sont pas clairement définies et le but majeur de la stratégie du contrôle du colmatage est de retarder ce saut de PTM en modifiant les caractéristiques de la boue activée ou en décroissant le flux trans-membranaire.

1.3.2 Paramètres influençant le colmatage

Le-Clech et al., (2006) classent en quatre groupes les facteurs impliqués dans le colmatage membranaire : les conditions opératoires, les caractéristiques de l'effluent, les caractéristiques de la biomasse et le matériel constitutif de la membrane (Figure 1. 8).

Les paramètres opératoires tels que le TSB, le TSH, la concentration en oxygène dissous, les charges massiques et volumiques influencent la structure de la biomasse ainsi que son activité. Leur optimisation peut donc modifier les caractéristiques de la biomasse et minimiser leur impact sur le colmatage

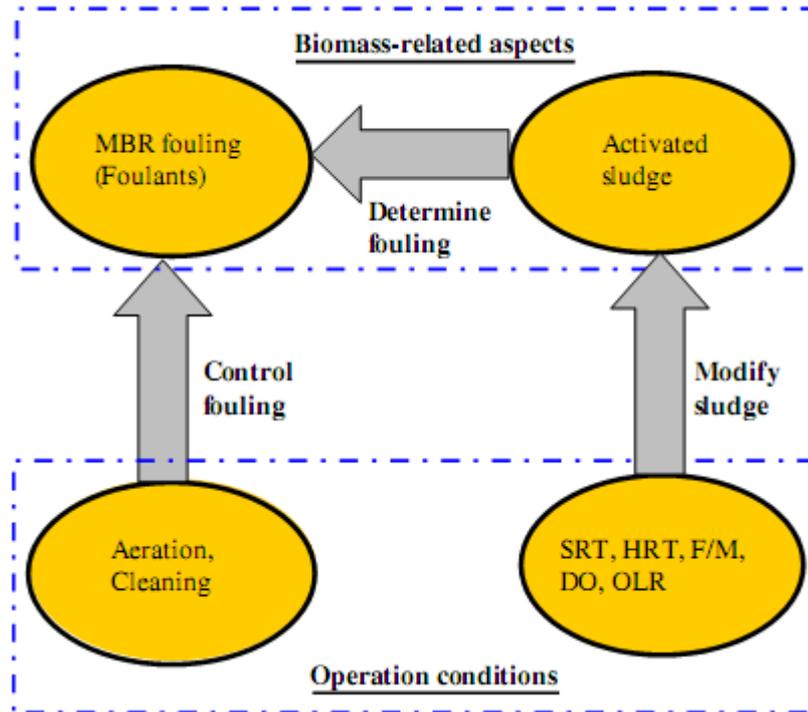


Figure 1. 8 : représentation schématique des paramètres affectant le colmatage et les stratégies pour le contrôler (Meng et al., 2009)

Meng et al., (2009) résumant à partir de la littérature, les relations entre le colmatage membranaire et les facteurs influençant le colmatage (Tableau 1. 4).

Les interactions complexes qui existent entre ces différents paramètres compliquent fortement la compréhension du phénomène de colmatage. Pour un procédé de BâM donné, les caractéristiques du colmatage dépendent directement des caractéristiques de la biomasse et des conditions hydrodynamiques.

Mais, les conditions opératoires ainsi que les caractéristiques de l'effluent ont une action indirecte sur le colmatage membranaire en modifiant les caractéristiques de la biomasse (structure, activité). De plus, toutes ces études sont effectuées à différentes échelles (laboratoire, semi-industrielle, réelle), avec différentes configurations, avec des modules membranaires aux caractéristiques très distinctes et avec un choix des paramètres opératoires différent.

Tableau 1. 4 : Relations entre le colmatage membranaire et les facteurs influençant le colmatage à conditions hydrodynamiques constantes et membrane identique

Facteur	Effet sur le colmatage membranaire	Référence
<i>Caractéristiques de la biomasse</i>		
MES	Augmentation de la résistance du gâteau quand la concentration en MES s'élève de 1 à 4 g.L ⁻¹	Chang (2005)
	Augmentation du potentiel de colmatage quand la concentration en MES s'élève de 12 à 18 g.L ⁻¹	Psoch (2006)
Viscosité apparente	Augmentation de la résistance à la membrane avec la viscosité apparente	Chae (2006)
Cm	La vitesse de colmatage augmente avec Cm	Trussell (2006)
	Quand Cm augmente le colmatage non détachable pour MES (2-3g/L) et le colmatage détachable pour MES (8-12 g/L) augmentent aussi	Watanabe (2006)
<i>Paramètres opératoires</i>		
Aération	L'augmentation de l'intensité d'aération augmente la perméabilité	Trussell (2007)
TSB	Quand TSB augmente le potentiel colmatant des PEC solubles augmente	Liang (2007)
	Quand TSB baisse de 30 à 3 jours, l'épaisseur du dépôt de PEC augmente à la surface membranaire	Sweity (2011)
	Quand TSB augmente de 10 à 50 jours, vitesse de colmatage baisse	Van den Broeck (2012)
Flux de perméat	Un flux de perméat sous critique atténue le colmatage irréversible	Lebegue (2008b)

La nature de l'effluent peut également avoir une influence sur la structure des floccs et donc sur le colmatage. McAdam et al., (2007) montrent que la nature du substrat carboné a une influence sur la stabilité des floccs. Dans leur B_àM_I où le cisaillement est imposé, avec de l'éthanol les floccs sont résistants alors que la biomasse nourrie avec de l'acide acétique conduit à la libération de quantités importantes de petites particules (colloïdes et solutés) à cause de la structure plus lâche et plus grosse des floccs.

1.4 Un facteur colmatant particulier : influence des PEC

1.4.1 Définition et origine

La réussite du traitement biologique des eaux usées par boues activées réside dans le fait que la croissance bactérienne dominante est la croissance floculée. Pour un traitement classique par le procédé de BA, Canler et al., (1999) insiste sur le fait que ce type de croissance permet une séparation optimale de l'ensemble floc bactérien-eau traitée au niveau du clarificateur et garantit une meilleure qualité de l'eau traitée.

Les flocs de boues activées correspondent à des cas particuliers de croissance de biofilm. Ils peuvent être décrits comme des agrégats cellulaires intégrés dans une matrice de polymères extracellulaires : les PEC (McSwain et al., 2005). D'autres composés sont présents au sein de ces amas comme des cations multivalents, des particules organiques et inorganiques ainsi que des colloïdes et des composés dissous. La présence des PEC au sein de cet amas cellulaire peut résulter de différents procédés microbiens tels que la sécrétion bactérienne active, la lyse cellulaire ou provenir de l'adsorption de molécules de l'environnement (Wingender et al., 1999).

1.4.2 Composition et structure

Les PEC sont un mélange complexe de biopolymères comprenant des polysaccharides et des protéines qui sont en quantité majeure par rapport aux substances humiques like, acides uroniques et nucléiques présents en quantité plus faible (Sponza, 2003). Des études montrent que ces molécules peuvent être combinées et former dans les PEC des glycoprotéines (Bourven et al., 2012) ou encore des lipopolysaccharides (Görner et al., 2003).

Ils sont localisés à la surface et/ou à la périphérie des cellules. Différentes structures de PEC peuvent apparaître suivant la nature de l'effluent ou les conditions de traitement utilisées. Ainsi les cellules sont parfois enchevêtrées dans une fine matrice de substances visqueuses et parfois des structures fibrillaires prédominent (Wingender et al., 1999). Plusieurs auteurs, dont Nielsen et al., (1997) pensent que les PEC peuvent être décomposés en deux types distincts : les PEC solubles qui seraient libres et les PEC liés qui seraient très proches voire attachés aux cellules bactériennes. Plusieurs théories en partie contradictoires tentent de distinguer les PEC liés des PEC solubles. (Breedveld et al., 1990) proposent de les différencier par leurs diverses compositions chimiques. D'autres auteurs essaient de distinguer ces deux types de PEC par leurs

différences de cinétiques d'adsorption et de désorption à la matrice des PEC (Nielsen et al., 1997) ou comme Laspidou et Rittmann, (2002) qui les différencient par la théorie des produits microbiens solubles (PMS) et sur leur origine. Certains auteurs définissent les PEC par leur mode d'extraction (Wingender et al., 1999). Ainsi les PEC solubles requièrent un traitement minimal pour être séparés des cellules bactériennes tel que la centrifugation à de basses accélérations (quelques milliers de g) (Massé et al., 2006 ; Germain et al., 2007) alors que les PEC liés nécessitent une méthode d'extraction plus poussée nécessitant la dispersion du biofilm.

A la suite de cette partie les distinctions et terminologies suivantes seront adoptées car de très nombreuses études montrent le rôle essentiel de ces fractions vis-à-vis de la filtration membranaire et de leur implication dans le colmatage (Meng et al., 2009) : PEC liés, PMS lorsque ces polymères sont trouvés dans le surnageant et issus d'une sécrétion par la biomasse ou PEC solubles, dans le cas où l'origine des PEC du surnageant n'est pas spécifiée. Enfin le terme global de PEC sera employé pour parler de l'ensemble de ces polymères.

1.4.3 Rôles des PEC

Les PEC jouent un rôle crucial car ils maintiennent la stabilité mécanique de la matrice microbienne. En effet, Dignac et al., (1998) supposent que les acides aminés qui sont chargés négativement et issus des protéines constituant les PEC de boues activées, sont impliqués dans la formation de liaisons électrostatiques avec les cations multivalents. Sobeck et Higgins, (2002) appuient cette hypothèse par la théorie DCB « divalent cation bridging » qui selon eux, explique le mieux le rôle des cations divalents dans le processus de biofloculation. Par l'ajout de Mg^{2+} ou Ca^{2+} l'agrégation des floes se trouve favorisée en formant des ponts avec les groupements fonctionnels chargés négativement des PEC.

Une autre fonction essentielle de ces protéines extracellulaires présentes dans les PEC de boues activées est leur activité enzymatique qui permet une digestion des macromolécules exogènes aux biofilms apportant ainsi des nutriments de petits poids moléculaires rapidement utilisables par les microorganismes immobilisés dans la matrice du biofilm (Wingender et al., 1999).

Les PEC permettent également d'augmenter la résistance des microorganismes des biofilms face aux substances exogènes toxiques. Cette caractéristique est principalement due aux changements physiologiques dont sont capables les microorganismes des biofilms face à des éléments toxiques mais aussi au rôle de barrière des PEC (Wingender et al., 1999). Par

exemple, de nombreux auteurs attribuent aux PEC la capacité de pouvoir fixer les éléments métalliques souvent toxiques contenus dans les effluents. Liu et Fang, (2002a) impliquent les sites de liaisons électrostatiques de PEC extraits de biofilms dont les concentrations totales sont 20 à 30 fois supérieures à celle à la surface de cellules bactériennes dans ce phénomène de rétention des éléments métalliques.

1.4.4 Mécanismes de production et de transfert des PMS vers le surnageant

La Figure 1.9 (Massé, 2004) résume l'ensemble des mécanismes de production, de transfert et de biodégradation des PMS en lien direct avec la biomasse active et les PEC liés.

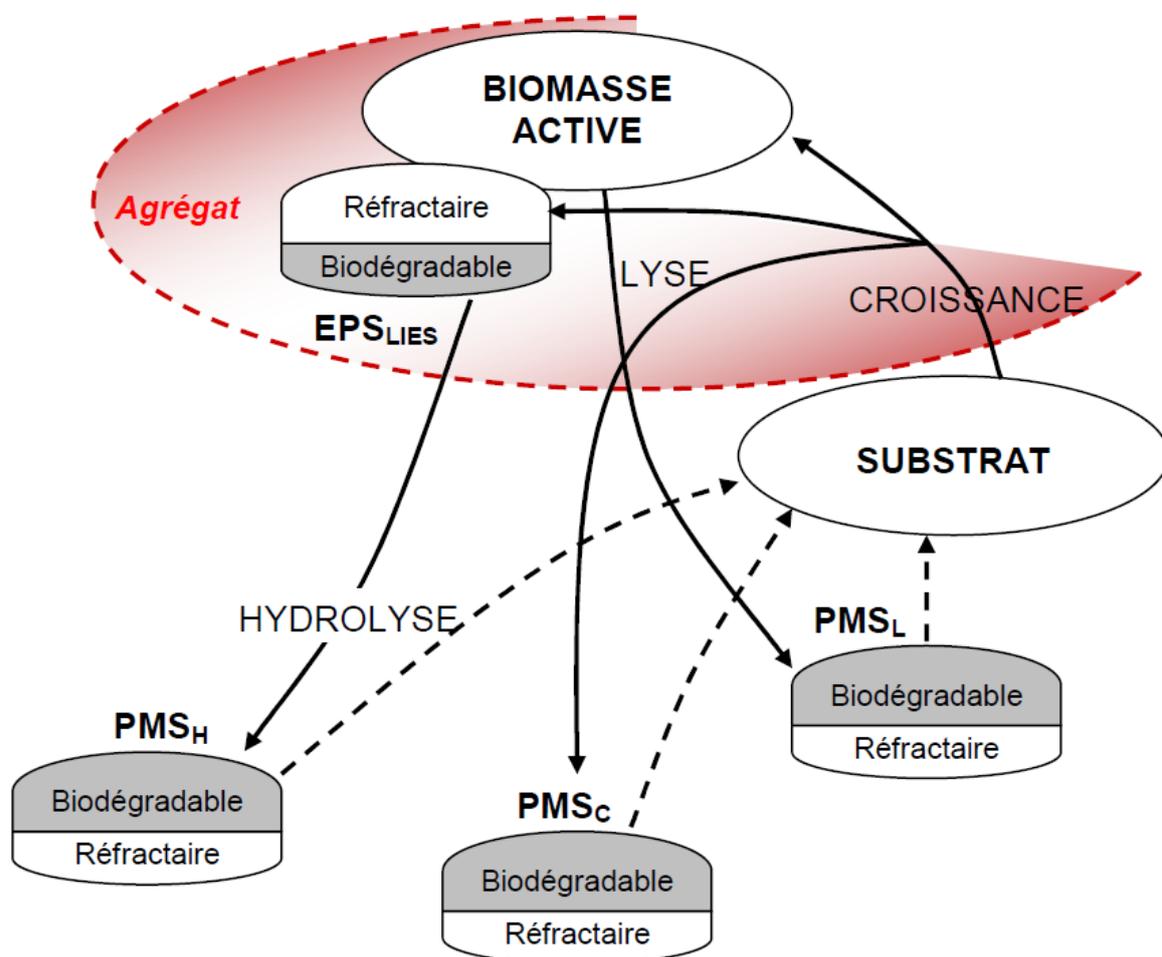


Figure 1. 9 : Mécanismes de production et de relargage de PMS (Massé, 2004)

Trois origines majeures sont envisagées pour les PMS. Toutes ces fractions possèdent à la fois une partie biodégradable et une partie réfractaire à la biodégradation :

- l'hydrolyse des PEC liés par des enzymes libérées par la biomasse (PMS_H),
- la croissance cellulaire (PMS_C). 96 % des PMS_C seraient biodégradables (Papore, 1998). Néanmoins, Shin et al., (2003) annoncent qu'une période d'acclimatation serait nécessaire,
- la lyse bactérienne (PMS_L).

1.4.5 Extraction et caractérisation des PEC

1.4.5.1 Les différentes méthodes d'extraction

L'extraction des PEC consiste à disperser les floccs en détruisant les liens entre les microorganismes et la matrice de polymères qui les réunit grâce à l'utilisation de méthodes basées sur un traitement physique ou chimique (Comte, 2005). Les PEC sont par la suite récupérés dans le surnageant du biofilm dispersé après centrifugation ou ultracentrifugation.

Les principales méthodes physiques utilisées pour l'extraction des PEC sont la sonication qui fragmente et détruit mécaniquement les floccs par l'utilisation d'ultrasons (King et Forster, 1990) et le chauffage qui permet de rompre certaines liaisons fragiles et ainsi libérer les PEC des floccs (Kawase et Moo-young, 1991). Le plus souvent ces traitements physiques sont associés à l'utilisation d'un tampon comme le tampon phosphate à $pH = 7$ ou encore des aldéhydes pour limiter la lyse cellulaire (Azeredo et al., 2003).

Le principe des extractions chimiques est de mettre en contact les biofilms avec un réactif chimique qui favorise la libération des PEC. Ils sont ensuite récupérés par ultracentrifugation. Il existe un grand nombre de produits chimiques utilisés mais les principales catégories sont (Liu et Fang, 2002b) :

- les agents chélatants comme l'EDTA (éthylène diamine tétra acétique) qui complexe les ions calcium présents à la surface des floccs permettant ainsi de les disperser et de libérer les PEC (Sanin et Vesilind, 2000)
- des bases telles que NaOH qui disperse les biofilms par répulsions électrostatiques dues aux charges négatives des PEC et surfaces bactériennes augmentées avec le pH
 - des alcools ou des acides qui permettent une précipitation plus ou moins sélective des composants des PEC,

- des aldéhydes tels que le glutaraldéhyde qui fixe les cellules bactériennes, libérant ainsi les PEC de toutes interactions. Les aldéhydes ont aussi la réputation d'empêcher la lyse des cellules, lors de l'extraction en réagissant avec les groupements amine, hydroxyle, carboxylique, phosphorique et sulfonique des protéines et des acides nucléiques des membranes cellulaires empêchant ainsi la contamination de la solution de PEC extraite par du matériel intracellulaire.

Il est reporté par Comte et al., (2006) que beaucoup d'études combinent entre elles les méthodes physiques et/ou chimiques pour augmenter le rendement d'extraction des PEC. C'est le cas des résines échangeuses de cations (REC). Cette méthode se base à la fois sur un traitement chimique puisqu'elle retient les cations divalents qui maintiennent la cohésion des floes et sur un traitement physique car elle cisaille les floes lors de la phase d'agitation nécessaire à l'extraction des PEC (Frølund et al., 1996).

1.4.5.2 Limites et influences de ces différentes méthodes d'extraction

Pour Frølund et al., (1996), l'extraction correspond à l'étape clé utilisée pour déterminer la quantité et la composition des PEC de boues activées. Ras et al., (2008a) ont tenté de développer un protocole de multi méthodes d'extraction pour augmenter le rendement d'extraction de la fraction protéique des PEC. D'après les prédictions de leur modèle, il faudrait appliquer neuf fois consécutivement leur protocole afin d'extraire toute la fraction protéique des PEC issues de boues activées.

Comte et al, (2006) ont comparé huit méthodes d'extraction différentes afin de connaître l'influence de chaque méthode sur la quantité de PEC de boues activées extraits et sur leur composition. Les empreintes chromatographiques de chromatographie d'exclusion stérique obtenues pour les extractions physiques sont relativement homogènes sauf pour le chauffage alors que chaque type d'extraction chimique donnait un résultat spécifique. Quantitativement, avec les méthodes physiques les PEC représentent en masse seulement 2 à 4% de la masse sèche de la boue alors que les méthodes chimiques permettent d'atteindre des valeurs de 17 à 47% (Comte et al., 2006). Cependant, qualitativement ces auteurs montrent par analyse infra rouge que les extractions à l'aide de réactifs chimiques contaminent les PEC en affectant leurs compositions chimiques.

Zhang et al, (1999) dans leur comparaison de cinq méthodes d'extraction différentes basée sur l'évaluation des rendements obtenus en carbohydrates et protéines, prouvent également que la quantité et la composition des PEC extraits dépendent fortement de la méthode employée. Une centrifugation en présence de formaldéhyde est plus appropriée pour la séparation des carbohydrates et une extraction par chauffage est plus efficace pour l'extraction des protéines.

Une évaluation critique des différentes méthodes employées permet à Denkhaus et al., (2007) de définir que l'utilisation de la résine cationique est le procédé le plus efficace et le plus approprié pour extraire les PEC car il provoque peu de lyse cellulaire. Les arguments de Dignac et al., (1998) étayent cette conclusion en précisant que contrairement aux réactifs chimiques, la REC ne contamine pas les échantillons de PEC et qu'elle peut être facilement retirée par décantation. Toutefois, l'efficacité d'une méthode d'extraction est aussi liée au protocole d'extraction utilisé et à ses conditions expérimentales. Frølund et al., (1996) montrent notamment que des temps d'extraction importants associés à un mélange intensif permettent d'obtenir un meilleur rendement qu'avec des temps plus courts.

1.4.5.3 Méthodes de caractérisation des PEC

De nombreuses méthodes colorimétriques ayant pour but de caractériser les fractions biochimiques des PEC existent. Ainsi les méthodes de Lowry ou Bradford peuvent être utilisées pour doser le contenu de protéines des PEC ou encore le réactif à l'antrone ou la méthode de Dubois permettent de doser les sucres totaux contenus dans les PEC. Toutefois Frølund et al., (1996) et plus récemment (Ras et al., 2008b) montrent des interférences dans ces méthodes de dosages très répandues et des résultats très variables suivant le choix de la méthode. Ainsi Frølund et al., (1996) proposent une correction de la teneur en protéines en fonction de la teneur en acides humiques like alors que Ras et al. (2008b) conseillent d'utiliser la méthode BCA (bicinchonic acid) pour déterminer cette même teneur. Les méthodes colorimétriques, quoique facilement accessibles, ne permettent qu'une caractérisation très partielle de la solution de PEC. L'une des principales limites réside dans le choix des étalons. Du glucose est utilisé pour l'étalonnage lors du dosage des sucres totaux et de l'albumine bovine lors du dosage des protéines. Ainsi, les résultats dépendent d'une référence qui est peu représentative de la complexité de la matrice d'étude (Dignac et al., 1998). Il est donc nécessaire de valider d'autres méthodes de caractérisation des PEC. Malheureusement, ces investigations sont encore très marginales. Pour palier les faiblesses des méthodes de caractérisations biochimiques, des auteurs

préfèrent doser spécifiquement les monomères comme les teneurs en chaque acide aminée ou encore en sucres ou acides uroniques (Brown et Lester, 1982). Des tentatives de caractérisation des solutions de PEC par résonance magnétique nucléaire ont été réalisées (Zhou et al., 2001), mais manquent de références pour faire des interprétations fiables. La spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier employée par quelques auteurs comme (Zhou et al., 2001) permet de caractériser les fonctions chimiques présentes dans la solution de PEC. Concernant la quantité de polymères solubles, des analyses globales peuvent être utilisées (COT, DCO) (Lee et al., 2003 ; Clouzot et al., 2011). Certains auteurs fractionnent à l'aide de résines et en fonction de leur polarité les fractions hydrophobes et transphiliques des PEC solubles (Jarusutthiriak et al., 2002). La fraction transphilique est de taille plus petite que la fraction hydrophobe et principalement composée de substances humiques. Quelques travaux réalisés en chromatographie d'exclusion stérique (CES) apportent des éléments de caractérisation supplémentaires des solutions de PEC grâce à l'étude des empreintes chromatographiques qui sont différentes suivant l'origine du PEC, la technique d'extraction utilisée ou encore si les bassins de boues activées d'où les PEC proviennent présentent des dysfonctionnements (Garnier et al, 2005). Enfin cette méthode est souvent employée pour déterminer la répartition des poids moléculaires des molécules de PEC (Comte et al., 2007). Cette dernière technique semble prometteuse dans ses apports à la caractérisation des solutions de PEC, mais elle demande de nombreuses vérifications, trop souvent ignorées, pour valider les résultats obtenus. Par exemple, la présence d'interactions ioniques et/ou hydrophobes entre le matériau composant la colonne chromatographique et les molécules issues des PEC peuvent conduire à la détermination erronée des poids moléculaires apparents des molécules présentes dans les PEC.

Une nouvelle technique d'abord utilisée pour caractériser la matière organique dissoute des eaux naturelles (Senesi, 1990 ; Mayer et al., 1999 ; Baker, 2004) est en pleine évolution et permet de caractériser les PEC : la spectrofluorimétrie 3 dimensions. Cet outil d'analyse permet d'obtenir des matrices 3 dimensions d'excitation et d'émission de fluorescence (EEM 3D). Henderson et al., (2009) montrent que les matrices de fluorescences 3D sont un outil potentiel de contrôle des eaux recyclées. En effet, la technique est rapide, facile à mettre en œuvre (pas de préparation d'échantillons au préalable) et ne détruit pas l'échantillon. Chen et al., (2003) ont défini une carte des zones où se trouvent les différents composés organiques tels que les protéines-like et les substances humiques-like (Figure 1. 10).

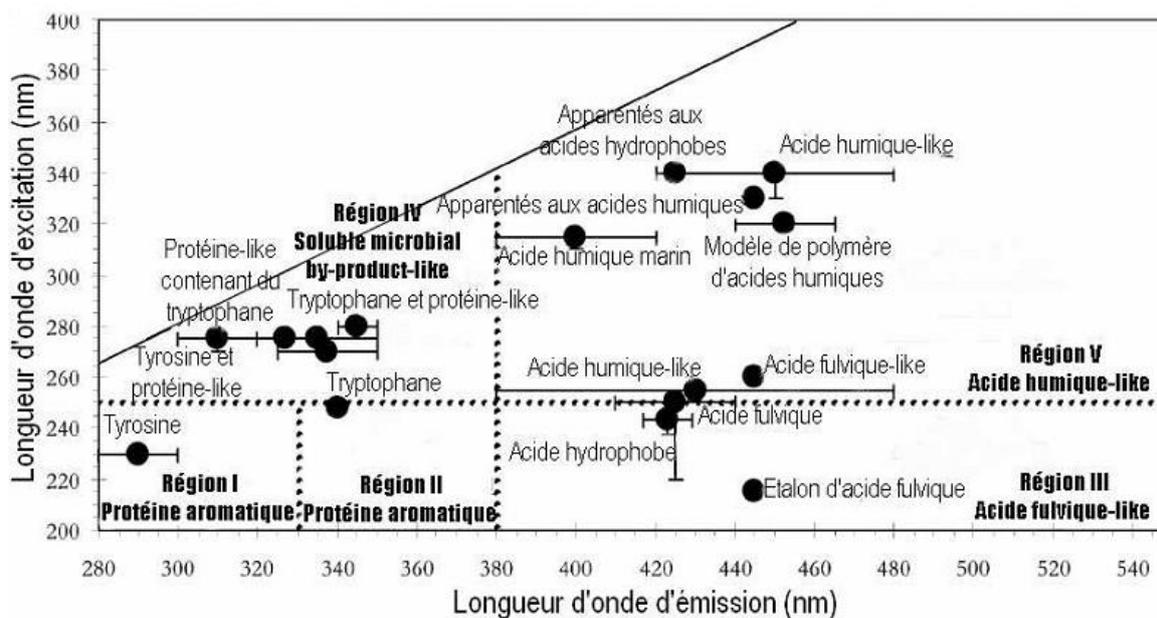


Figure 1. 10 : Localisation de certains composés organiques en matrice de fluorescence 3D : 5 régions définies (Chen et al., 2003)

Ainsi les protéines-like (émission < 380 nm) sont décrites dans trois régions :

- région IV : (excitation > 250 nm) : « soluble microbial by-product-like » sont les espèces associées à des composés dérivant des protéines et contenant les acides aminés comme le tryptophane ou la tyrosine (libres ou liés)
- région I : (excitation/émission : 250/ < 330 nm) : fluorescence des protéines associée à la présence de tyrosine (libre ou liée)
- région II : (excitation/émission : < 250 nm/330 nm) : fluorescence des protéines associée à la présence de tryptophane (libre ou liée)

Les substances humiques-like (émission > 380 nm) sont décrites dans deux régions :

- région III (excitation < 250 nm) : fluorescence des acides fulviques-like
- région V (excitation > 250 nm) : fluorescence des acides humiques-like

Les acides aminés libres, tyrosine et tryptophane émettent à de plus courtes longueur d'onde que ces mêmes acides aminés intégrés aux protéines en raison de leur liaison avec les protéines (Determann et al., 1994).

Les protéines montrent une fluorescence plus importante dans la région II (Bourven et al., 2012).

La variation de localisation des maxima d'émission fluorescente peut être attribuée à une différence de la composition chimique de la matière organique des PEC (Liu et al., 2011). Les déplacements des maxima de fluorescence dans une région donnée sont donc une source d'informations résultant d'une différence de la structure chimique de l'échantillon. Ces signatures fluorescentes du contenu organique peuvent ainsi être potentiellement impactées par l'origine des boues, la nature de l'effluent à traiter ou le métabolisme bactérien. Ainsi Coble, (1996) montre que la décomposition de macromolécules se traduit par un déplacement des longueurs d'ondes d'excitation et d'émission vers les petites longueurs d'ondes.

Cette technique est tout récemment utilisée pour obtenir les longueurs d'onde précises d'excitation et d'émission caractérisant les protéines-like et les substances humiques-like de fractions de PMS et de PEC dans des boues activées (Tsai et al., 2008).

Hong et al., (2012) l'utilise pour caractériser les PEC de boues activées ainsi que les fractions impliquées dans le colmatage à différents TSH. En passant ensuite les échantillons par CES avec un détecteur de fluorescence réglé à ces longueurs d'onde spécifiques, la taille des molécules constituant les fractions peut être obtenue. C'est un apport considérable pour connaître avec précision la taille des molécules colmatantes dans les Bàm (Liu et al., 2011).

Grâce à cette méthode couplant EEM 3D puis CES avec détecteur de fluorescence, Aryal et al (2009) suivent l'évolution temporelle des fractions colmatantes attachées à des membranes planes sur des périodes allant de deux à vingt jours à 250/340 nm.

Cet outil est encore très peu exploité, or son utilisation permettrait d'apporter de nombreuses informations structurelles sur les composés spécifiques des PEC influençant le colmatage mais aussi sur l'évolution de ces composés en fonction des conditions environnementales et opératoires de la biomasse. En effet la mise en place du colmatage ne peut être simplement reliée à l'évolution des concentrations en PEC liés et PMS. La littérature montre à ce sujet de trop nombreuses contradictions qui vont être décrites dans la partie suivante.

1.4.6 Implication des PEC solubles et liés dans le colmatage

Les PEC sont considérés comme la cause principale du colmatage membranaire dans les Bàm. De nombreuses études ont été faites sur l'influence des PEC sur le colmatage membranaire dans les Bàm. Quelques uns des résultats obtenus sont présentés dans le Tableau 1. 5.

Tableau 1. 5 : Influence des PEC sur le colmatage membranaire dans les Bàm

Résultats	Référence
La filtrabilité diminue quand la concentration en PEC solubles augmente	Rosenberger (2002)
Les PEC solubles seuls n'ont pas d'influence sur le colmatage La concentration en PEC liés : facteur colmatant prédominant	Li (2008)
Quand la concentration en polysaccharides des PEC augmente la vitesse de colmatage aussi	Drews (2006)
Quand la concentration en PEC (probablement concentration en polysaccharides) augmente la résistance à la filtration aussi et la perméabilité du gâteau diminue	Chae (2006)
La quantité de polysaccharides des PEC solubles est un indicateur possible du colmatage	Le-Clech (2005)
La résistance à la filtration est déterminée par les PEC solubles	Jeong (2007)

Dans la littérature, les auteurs ne sont pas tous d'accord quand à l'impact des PEC sur le colmatage membranaire (Drews et al., 2006). En effet certains affirment qu'il existe un lien évident entre la teneur en PEC et le colmatage membranaire (Rosenberger et Kraume 2002) et d'autres sont plus réservés (Pollice et al., 2005). De plus même les auteurs qui attribuent aux PEC une responsabilité dans le phénomène de colmatage ne sont pas d'accord sur la fraction des PEC mise en cause. Li et al., (2008) pensent que la concentration en PEC liés est le facteur colmatant prédominant et que les PEC solubles seuls ne peuvent influencer le colmatage membranaire. Zhou et al., (2007) indiquent que la composition et la quantité de polymères attachés à la membrane influencent le colmatage et que c'est la totalité des polymères dans la suspension de BA qu'il faut prendre en compte et pas seulement la teneur en PEC liés. Le-Clech et al.,(2005), déterminent que les PEC solubles dont la quantité de polysaccharides qu'ils contiennent sont un indicateur possible du colmatage.

Ces différences majeures d'interprétation notamment pour les PEC liés peuvent être attribuées aux méthodes d'extraction employées qui diffèrent d'une étude à l'autre car suivant la méthode employée les rendements obtenus sont très variables (Zhang et al., 1999). En effet il n'existe pas de méthode standard. Ainsi certains auteurs comme Le-Clech et al., (2005) ou Chae et al., (2006) utilisent un traitement thermique quand d'autres tels que Rosenberger et Kraume (2002) et Li et al., (2008) utilisent juste une centrifugation et des lavages successifs pour extraire les PEC solubles puis une REC pour les PEC liés.

Après ces extractions, généralement les concentrations en PEC extraites sont assimilées à la somme des concentrations en protéines et polysaccharides (Massé et al., 2006 ; Di bella et al., 2011). Il faut garder à l'esprit que cette approximation est fautive étant donné que les méthodes d'estimation des concentrations en protéines et polysaccharides sont différentes, donc avec des unités différentes. Cependant elle est largement employée dans la littérature pour comparer les conséquences de diverses conditions opératoires sur la concentration totale en PEC. Cette approximation sera donc employée dans la suite de ce manuscrit. Les concentrations en protéines et polysaccharides sont mesurées grâce aux méthodes de Lowry pour les protéines et Dubois pour les polysaccharides (Drews et al., 2006 ; Chae et al., 2006) ou avec le réactif à l'antrone pour (Jeong et al., 2007). Or dans le paragraphe 1.4.5.2, les limites de telles méthodes sont constatées. Pourtant certains auteurs affirment que les protéines étant majoritaires et constituées de grosses molécules, le colmatage est principalement lié à la concentration en protéines (Metzger, et al., 2007). Cependant, ici encore la communauté scientifique n'est pas d'accord. La majorité affirme qu'au contraire les polysaccharides représente la fraction la plus colmatante (Zhang, et al., 2006).

Malgré de nombreux désaccords quant à l'origine exacte du colmatage et les mécanismes le contrôlant, il semble être communément accepté que les PEC solubles soient un facteur non négligeable dans l'établissement du colmatage (Kimura et al., 2009). A partir de ce postulat, les recherches se focalisent sur une caractérisation plus précise de ce colmatage et sur les paramètres opératoires pouvant être optimisés. A cause de la barrière membranaire, les PMS s'accumulent plus facilement dans les B&M que dans les systèmes à boues activées classiques. Geng et Hall (2007) observent que la distribution de tailles des floes ainsi que la concentration en PEC solubles du surnageant ont le plus d'influence sur la capacité colmatante de la boue. Plusieurs études prouvent que les polysaccharides contenus dans les PEC solubles ont plus d'impact sur le colmatage que les protéines (Rosenberger et al., 2006 ; Yigit et al., 2009).

Etant donné que les PMS proviennent en partie d'un hydrolysate des PEC liés (PMS_H), il est important de faire un état des lieux sur les différents paramètres influençant la production de PEC liés et de PEC solubles dans le surnageant et de ce fait qui peuvent participer au colmatage membranaire.

1.4.6.1 Paramètres influençant la production de PEC liés

1.4.6.1.1 Type de substrat

La composition du substrat (en terme de biodégradabilité mais également de proportion en substrats carbonés, azotés et phosphorés) a un effet avéré sur la communauté microbienne présente dans la boue ainsi que sur le métabolisme des bactéries et par conséquent sur les mécanismes de sécrétion des PEC (Fishman et al., 1997). Li et Yang, (2007) montrent que les bactéries issues de boues activées nourries avec de l'acétate ont une production de PEC plus faible que celles qui sont alimentées avec du glucose. Sponza (2002, 2003) examine la production de PEC de boues activées provenant de réacteurs biologiques traitant différents types d'effluents. Les résultats montrent qu'en conditions stationnaires le contenu protéique des boues activées traitant des eaux usées urbaines et de distillerie est plus élevé que dans les biomasses alimentées avec des effluents issus des industries papetières, pétrochimiques et textiles. Ainsi d'une manière générale les boues ont une concentration en PEC d'autant plus importante que les effluents ont une fraction élevée de substrats facilement biodégradables. C'est pour cette raison que les effluents industriels difficilement biodégradables (papeteries, industries pétrochimiques, etc.) conduisent à des teneurs plus faibles en PEC.

1.4.6.1.2 Apport nutritionnel

Si la biodégradabilité d'un effluent est un paramètre influant la production de PEC, son apport nutritionnel l'est tout autant. Les PEC peuvent être dégradés comme source de carbone et source d'énergie quand l'apport nutritionnel provenant du substrat est limité. La quantité de nutriments a un effet significatif sur la production et la composition de PEC (Sheng et al., 2010). Le contenu en PEC augmente avec une augmentation de la charge massique (Jang et al., 2007). Le rapport DCO/NH_4 a également une influence notable sur la composition des PEC (Tableau 1. 6). D'une manière générale quand ce ratio augmente, une diminution de la proportion de protéines par rapport à celle des polysaccharides est observée.

Pour une limitation en substrat carboné ($\text{DCO}/\text{NH}_4 < 20$) la proportion de protéines augmente avec la diminution du rapport (Bura et al., 1998; Durmaz et Sanin, 2001). Brown et al., (1977) rappellent que lors d'une limitation en nutriments carbonés, la production de PEC est plus importante. Les micro-organismes utilisent alors préférentiellement les PEC produits comme substrat pour assurer leurs besoins en énergie de maintenance. La faible part de substrat restant est alors biodégradée pour la synthèse de polysaccharides.

Pour une limitation de l'apport azoté ($\text{DCO}/\text{NH}_4 > 20$), la quantité relative de protéines baisse. Cependant en comparant les résultats des études de Bura et al., (1998) et Durmaz et Sanin, (2001), il apparaît que les mécanismes de production des PEC sont différents car l'augmentation du rapport DCO/NH_4 se traduit par une augmentation de la concentration en polysaccharides et une diminution en protéines pour Durmaz et Sanin, (2001) alors que pour Bura et al., (1998), seul le contenu en protéines varie. Il faut noter que les substrats carbonés sont différents d'une étude à l'autre.

Tableau 1. 6 : Influence du rapport DCO/NH_4 sur la production de PEC

DCO/NH_4	$\text{PEC}_{\text{Protéines}}$ ($\text{mg}\cdot\text{g}_{\text{MVS}}^{-1}$)	$\text{PEC}_{\text{Polysaccharides}}$ ($\text{mg}\cdot\text{g}_{\text{MVS}}^{-1}$)	$\text{PEC}_{\text{PN/PS}}$	Références
20	85,0	28,2	3,0	Bura (1998)
100	20,3	28,1	0,7	
5	32,0	7,7	4,3	Durmaz et Sanin (2001)
17,5	20,3	15,2	1,3	
40	11,8	44,2	0,2	
3,3	-	-	0,3	Shufang (2004)
5	-	-	0,2	
10	-	-	0,2	
20	-	-	0,2	

PN : protéines ; PS : polysaccharides

La production de PEC peut être accentuée quand l'apport en phosphore est insuffisant (Liu et al., 2006). Bura et al., (1998) et Hoa et al., (2003) trouvent que le contenu en polysaccharides des PEC extraits de boues activées augmente quand le phosphore est limitant.

Il apparaît donc clairement que la nature et la composition de l'effluent traité affecte la quantité de polymères sécrétés. Le type d'effluent traité spécifie également le type de

communauté microbienne présente dans le bioréacteur et par conséquent le type de PEC sécrétés.

1.4.6.2 Les conditions environnementales

1.4.6.2.1 La concentration en oxygène

Les conditions aérobies ou anaérobies peuvent influencer la production de PEC. Le contenu en PEC décroît en conditions anaérobies (Nielsen et al., 1996). Il est reporté que les floccs de boues activées subissent une défloculation en condition de limitation en oxygène qui pourrait être due à un mécanisme impliquant la suppression de la production de PEC ou aussi à leur hydrolyse. Rasmussen et al., (1994) évoquent le relargage des cations impliqués dans la floculation lors d'épisodes anaérobies pour expliquer la defloculation. Shin et al., (2001) comparent la production de PEC de boues activées de trois bioréacteurs pour trois concentrations en oxygène différentes (concentrations non spécifiées). Ils prouvent que pour une concentration élevée en oxygène la production de polysaccharides des PEC augmente avec le temps alors que le contenu en protéines reste stable. En revanche pour une faible concentration en oxygène, les concentrations en protéines et polysaccharides sont stables. Dans une étude plus récente, Gao et al., (2011) testent trois concentrations en oxygène ($4,0 - 2,0 - 0,5 \text{ mg}_{\text{O}_2} \cdot \text{L}^{-1}$) dans un bioréacteur à membrane anoxie/aérobie. Ils prouvent un important changement des communautés bactériennes présentes et de leur structure pour une concentration en oxygène de $0,5 \text{ mg}_{\text{O}_2} \cdot \text{L}^{-1}$ ainsi qu'une plus grande quantité de protéines et de polysaccharides sécrétés.

1.4.6.2.2 Les contraintes hydrodynamiques

Les contraintes hydrodynamiques peuvent influencer la composition des PEC. Une augmentation de ces contraintes ou de l'intensité de l'aération peut augmenter le contenu en PEC des boues activées (Adav et al., 2007). Certaines études obtiennent que le contenu en polysaccharides des PEC extraits de boues activées augmente avec le débit d'air injecté dans un réacteur type sequencing batch reactor (SBR) alors que la concentration en protéines reste identique pour différents débits d'air (Shin et al., 2001). Cela peut indiquer que ces contraintes stimulent les bactéries à produire plus de polysaccharides (Sheng et al., 2010). Ramasamy et Zhang, (2005) observent qu'une augmentation rapide des contraintes

hydrodynamiques mène à un relargage plus élevé de polysaccharides, mais qu'après une courte période de stabilisation à ce niveau de contrainte, la concentration en polysaccharides retourne à son niveau d'origine.

1.4.6.2.3 La présence de substances toxiques

La présence accidentelle de produits toxiques engendre souvent une perte de viabilité des micro-organismes suivie par une lyse des cellules et donc une libération de polymères. Certaines recherches montrent qu'en présence de produits toxiques comme les métaux lourds, les micro-organismes de boues activées et de biofilms produisent plus de PEC pour se protéger du changement brutal de leur environnement (Fang et al., 2002 ; Aquino et Stuckey, 2004 ; Priester et al., 2006). Il a été prouvé qu'en conditions toxiques l'augmentation du contenu en protéines dépasse largement ceux des autres composants des PEC, et que des protéines de stress telles que la protéine GroEL peut être relarguée en importante quantité dans le cas de la présence notamment de cadmium, d'acétone et de pentachlorophénol (Bott et Love, 2001). Pour certaines substances toxiques, il existe une concentration seuil au dessus de laquelle la production de PEC est moins significative (Sheng et al., 2005). Cependant certaines substances toxiques peuvent inhiber la production de PEC. C'est le cas du dimercaptopropanol qui a une concentration juste en dessous de la concentration minimale inhibitrice, réduit significativement la production de PEC de *Brevundimonas diminuta*.

1.4.6.2.4 Les paramètres opératoires – L'âge de boues

L'âge de boues est considéré par certains auteurs comme l'un des paramètres opératoires influençant le plus le colmatage membranaire (Grelier et al., 2006). La disparité des résultats obtenus sur l'évolution des PEC liés aux floes de boues activées en relation avec l'âge de boues et le colmatage contribue à alimenter une controverse sur ce sujet (Figure 1. 1 et Tableau 1. 7). Il n'existe aucune relation claire entre ces paramètres et cela est du à plusieurs facteurs :

- La nature de l'effluent à traiter ainsi que sa composition,
- La gamme d'âges de boues testés,
- Les autres paramètres opératoires (MVS, TSH,...),
- La méthode d'extraction des PEC employée,

- La méthode de dosage utilisée.

La disparité des résultats entraîne des conclusions différentes suivant les études.

Un exemple de ces contradictions est représenté sur la Figure 1. 1 qui répertorie les résultats récents sur l'évolution du colmatage dû à l'augmentation de concentration des PEC liés en fonction du TSB (Meng et al., 2009).

Lee et al., (2003) et Han et al., (2005) observent les mêmes augmentations de PEC liés à mesure que le TSB augmente. Ng et al., (2005) et Zhang et al., (2006) concluent qu'il est préférable de travailler vers un TSB de 20 jours car la concentration en PEC liés y est plus faible qu'à 3-5 et 10 jours. Au vue de ces résultats il semblerait que travailler à un TSB trop faible résulterait en un colmatage plus prononcé.

Meng et al., (2009) en répertoriant ces résultats concluent qu'il est un choix judicieux de travailler dans la gamme optimale de TSB située entre 20 et 50 jours pour contrôler la concentration en PEC liés et le colmatage membranaire. Cependant l'étude réalisée par Ahmed et al., (2007) reste en contradiction avec cette hypothèse car ils montrent un colmatage plus faible à mesure que le TSB augmente de 20 à 100 jours.

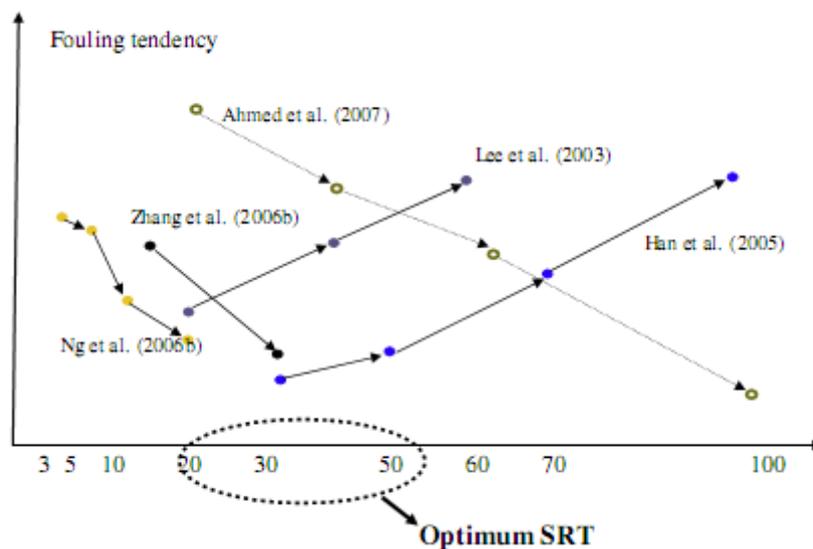


Figure 1. 11 : comparaison des résultats récents sur l'influence du TSB sur le colmatage (Meng et al., 2009)

En ce qui concerne l'évolution des composés distincts des PEC (protéines et polysaccharides) en fonction du TSB des tendances bien marquées se dégagent (Tableau 1. 7) mais aucune conclusion ne peut être faite car ces évolutions sont différentes suivant les études. Certains

auteurs reportent une augmentation du contenu protéique des PEC liés avec le TSB (Liao et al., 2001 ; Lee et al., 2003) et d'autres montrent l'exact opposé (Massé et al., 2006 ; Su et al., 2011). Le même constat peut être fait en ce qui concerne l'évolution des polysaccharides.

Tableau 1. 7: Concentrations en PEC liés obtenues dans différentes études

Procédé	Type effluent	TSB (j)	TSH (h)	MVS (g.L ⁻¹)	Cm (kg _D CO.kg _{MVS} ⁻¹ .j ⁻¹)	Extraction	PN ^(a) (mg.g _{MVS} ⁻¹)	PS ^(b) (mg.g _{MVS} ⁻¹)	SH ^(c) (mg.g _{MVS} ⁻¹)	PN/PS	Référence
BàM _I	Glucose	4-20	6,2	-	-	Ultrasons + REC ^(d)	9,5-16	3,5-7,5	-	1,27-4,57	Liao (2001)
BàM _I	synthétique	20	7,8	2,8	0,33	thermique	29,9	32,7	-	0,91	Lee (2003)
BàM _I	synthétique	40	7,8	4,4	0,21	thermique	35,7	34	-	1,05	Lee (2003)
BàM _I	synthétique	60	7,8	5,5	0,17	thermique	35,5	29	-	1,22	Lee (2003)
BàM _I	municipal	10	16	1,9	0,35	Ultrasons + REC	30,1	7,9	12,7	4	Massé (2006)
BàM _I	municipal	53	16	6	0,11	Ultrasons + REC	5,5	1,9	-	2	Massé (2006)
BàM _I	synthétique	10		3 ^(e)	0,4 ^(f)	NaOH + formaldéhyde	0,05 ^(g)	0,02 ^(g)	-	-	Su (2011)
BàM _I	synthétique	60		12	0,1	NaOH + formaldéhyde	0,03	0,02	-	-	Su (2011)

^(a) PN : protéines ^(b) PS : polysaccharides ^(c) SH : substances humiques ^(d) REC : résine échangeuse de cations ^(e) exprimé en g_{MES}.L⁻¹ ^(f) exprimé en kg_{COT}.kg_{MES}⁻¹.j⁻¹ ^(g) exprimé en mg.L⁻¹

1.4.6.3 Paramètres influençant la production-consommation de PMS

La quantité ainsi que la qualité des PMS retrouvés dans le surnageant peuvent être influencées par différents paramètres environnementaux et opératoires.

1.4.6.3.1 Le substrat, les MES et la concentration en oxygène

La quantité de PMS augmente généralement avec l'élévation de la concentration en substrat. (Jeong, 1995) parle d'une augmentation très rapide, de l'ordre de quelques minutes associée à une croissance cellulaire maximale. Le modèle de formation des PMS proposé par Lapsidou et Rittmann (2002) repose d'ailleurs sur une production de PMS dépendante de la concentration en substrat. Drews et al., (2007) constatent sans pouvoir l'expliquer que la quantité de nitrates contenus dans le milieu liquide possède une influence sur l'élimination des PMS.

Kuo et al., (1996) montre que la quantité de PMS générés est beaucoup plus importante quand la biomasse est alimentée avec du glucose comparée à une alimentation avec de l'acétate.

Concernant l'évolution des PMS avec la concentration en MES, plusieurs auteurs proposent une augmentation de la vitesse de production des PMS en lien direct avec l'augmentation de la concentration en biomasse (Lapsidou et Rittmann, 2002).

La concentration en oxygène dissous dans le bioréacteur influence également l'élimination des PMS. Leur dégradation est plus faible pour de faibles concentrations en oxygène dissous. Par conséquent pour garantir de faibles concentrations en PMS, un apport suffisant en oxygène doit être apporté.

1.4.6.3.2 Influence de l'ajout de composés toxiques sur la production de PMS

D'une manière générale, l'ajout d'un composé toxique dans un bioréacteur entraîne une importante lyse cellulaire d'où une importante quantité de PMS libérée dans le milieu liquide. Jeong (1995) explique cette augmentation par une inhibition de la biomasse par le substrat.

Lesage (2005) observe, après ajout de 2,4- diméthylphénol dans un BâMI, une augmentation très importante des PEC solubles et notamment en protéines. L'injection du composé toxique entraîne le relargage de polymères en très fortes quantités (900 à 1000 mg.L⁻¹) dans le surnageant. En parallèle il observe une augmentation brutale de la PTM et donc du colmatage

qui semble être directement relié à l'augmentation de la concentration en polymères. L'hypothèse mécanistique avancée est celle de la formation d'un gel de protéines à la surface de la membrane qui augmente la résistance de filtration et par conséquent diminue le seuil de coupure de la membrane dynamique (membrane + dépôt).

Papore (1998) montre que l'ajout d'agents inhibiteurs (3,5-dichlorophénol ou cuivre) lors de la dégradation de glucose engendre une augmentation de la fraction de PMS réfractaire (non biodégradable). L'étude de la nature (taille, propriétés chimiques) des PMS spécifiquement libérés avec la présence de toxique est un sujet qui nécessiterait des études futures plus approfondies.

1.4.6.3.3 Age de boues et charge organique

Pribyl et al., (1997) montrent l'existence d'un optimum d'âge de boues ou de charge massique concernant la production de PMS (Figure 1.12).

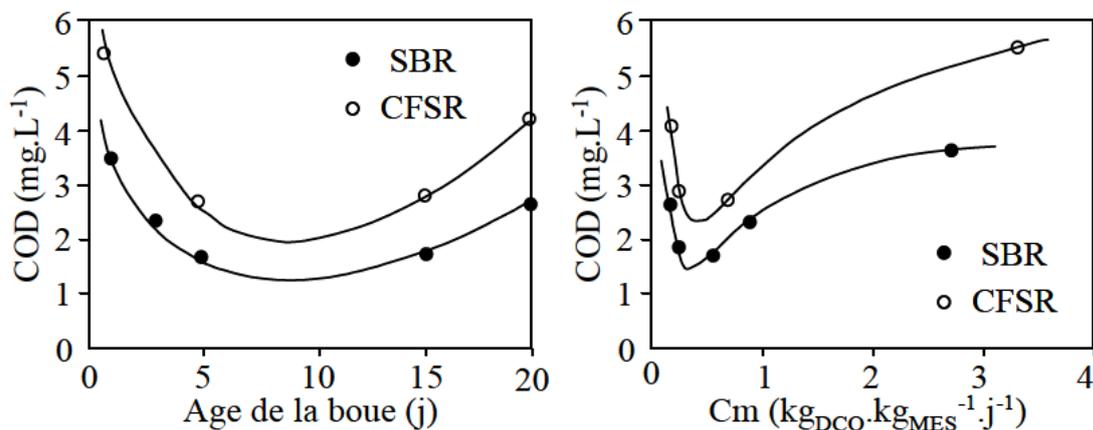


Figure 1. 12 : Effet du TSB et de la charge massique sur la concentration en DCO (Pribyl et al., 1997)

Pour les systèmes aérobies cet optimum se situerait à un TSB de 9 jours et à 0,2 kg_{DCO}.kg_{MES}⁻¹.j⁻¹ pour la charge massique.

En intégrant la production-consommation des PMS dans le modèle ASM3, Lebegue (2008a) propose une évolution de la concentration globale en PMS dans les BâM avec l'âge de boues et la charge volumique (Figure 1. 13) sur des gammes respectivement de 0 à 100 jours et de 0,2 à 4 kg_{DCO}.m⁻³.j⁻¹. Elle montre ainsi que plus la charge volumique augmente, plus la

concentration en PMS croît pour des conditions stables du réacteur. L'augmentation du TSB à charge volumique constante permet de diminuer la concentration en PMS du surnageant.

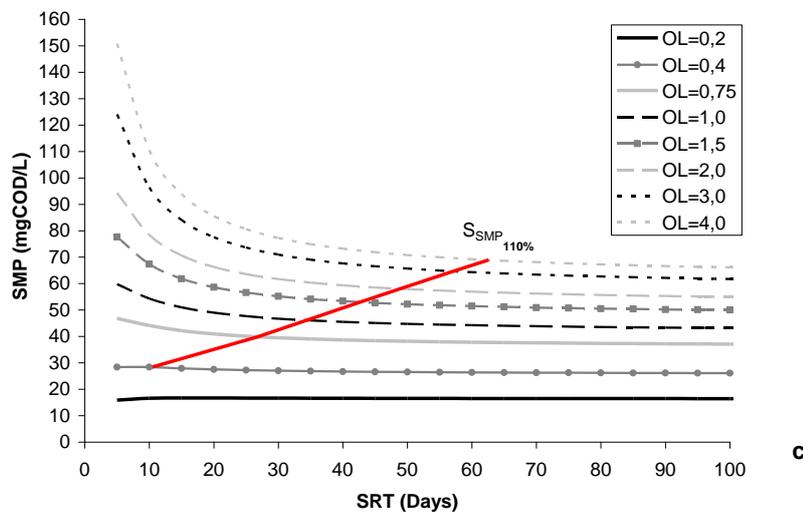


Figure 1. 13: Evolution de la concentration en PMS avec le TSB pour différentes charges volumiques (Lebegue, 2008a)

En fait, à faible âge de boues ou à forte charge organique, la biomasse est incapable de dégrader toutes les substances organiques en solution, alors que pour une charge organique faible, les bactéries dégradent tout le substrat présent mais libèrent des PMS.

Pour des âges de boues élevés les PMS_L sont prédominants car la croissance biologique est faible, alors que ceux associés à la croissance cellulaire (PMS_C) vont être majoritaires aux faibles âges de boues, là où la croissance observée est plus forte.

De nombreux auteurs sont en accord avec ce résultat de baisse de la concentration totale en PMS avec l'augmentation de l'âge de boues à charge volumique constante (Lee et al., 2003 ; Rosenberger et al., 2006 ; Liang et al., 2007). Plusieurs auteurs obtiennent la même baisse de la concentration en polysaccharides des PMS avec l'augmentation du TSB à charge volumique constante (Lee et al., 2003 ; Rosenberger et al., 2006 ; Zhang et al., 2006 ; Liang et al., 2007) alors que des disparités existent quant à l'évolution des protéines extraites des PMS qui augmentent dans certains cas (Lee et al., 2003) et baissent dans d'autres (Liang et al., 2007).

1.4.6.4 Masses moléculaires des PEC solubles

Le Tableau 1. 8 rassemble certaines données de la littérature sur la distribution des tailles des PEC solubles issus de boues de Bàm.

Tableau 1. 8 : Distribution de taille des PEC solubles (obtenus par filtration) issus de Bàm

Masse moléculaire	Référence
>100 kDa : 16 % ; 30-100 kDa : 9 % ; 3-30 kDa : 23 % ; <3 kDa : 52 %	Huang (2000) ^{(a)(c)}
>100 kDa : 31 % ; 30-100 kDa : 8 % ; 3-30 kDa : 32 % ; <3 kDa : 29 %	Lee (2003) ^{(b)(d)}
>100 kDa : 20 % ; 30-100 kDa : 37 % ; 10-30 kDa : 12 % ; 1-10 kDa : 18 % ; <1 kDa : 13 %	Shin et Kang (2003) ^{(a)(d)}
>30 kDa : 23 % ; 10-30 kDa : 10 % ; 3-10 kDa : 5 % ; <3 kDa : 62 %	Liang (2007) ^{(a)(d)}

^(a)Mesures par COT^(b) mesures par DCO^(c) centrifugation 15 min 4000 rpm^(d) filtration sur 0,45 µm

Les masses moléculaires des PEC solubles varient d'après ces études entre 0,1 à plus de 100 kDa.

Même si dans ces études une distribution de masses moléculaires bimodale est rencontrée, une importante disparité dans les résultats est obtenue. Brookes et al., (2003) soulignent que la distribution de taille des PEC solubles varie au moins de façon hebdomadaire en fonction de la concentration en MES et du TSB. Cependant Liang et al., (2007) prouvent pour des TSB variant de 10 à 40 jours que la distribution de masses moléculaires varient très peu et que les masses moléculaires des PEC solubles de leur effluent synthétique sont très proches de celles des PMS cités dans le Tableau 1. 8. La différence de substrat utilisé, de procédé, de conditions opératoires rendent toute comparaison entre les études compliquée.

Or une comparaison en fonction du substrat utilisé, des conditions opératoires, des stress générés, des masses moléculaires des PEC solubles semble néanmoins importante à étudier étant donné la capacité des PEC solubles à être retenus par les membranes et leur impact potentiel sur le colmatage. Les résultats acquis lors de cette étude en substrat réel et synthétique en conditions stables à différents âges de boues et en conditions de stress seront donc comparés entre eux pour essayer d'apporter un élément de réponse à cette problématique.

1.5 Conclusions et objectifs

L'un des paramètres opératoires influençant le plus les performances épuratrices, les activités bactériennes, la production de boues et le colmatage membranaire se trouve être le TSB. Bien que de très nombreux travaux aient traité de cette problématique du choix adapté de l'âge de boues, de nombreux résultats contradictoires en partie du aux autres conditions opératoires fixées, à la configuration du Bàm, au protocole de changement de l'âge de boues empêchent une détermination sûre du TSB le plus adapté. L'étude bibliographique révèle que la plupart des études essayant de déterminer le meilleur TSB en Bàm ne fonctionne pas à Cm fixe. Or ce deuxième paramètre possède une influence également non négligeable sur les caractéristiques du milieu biologique, sa production de boues ainsi que sur le colmatage membranaire. Une étude à Cm fixe faisant varier le TSB semble donc pertinente pour isoler les effets de l'âge de boues de ceux de la Cm et déterminer un âge de boues approprié

A l'échelle laboratoire généralement un effluent synthétique est utilisé car il offre une composition stable et reproductible. Cependant certaines études pour plus de pertinence vis-à-vis de l'épuration d'ERU, utilisent un effluent réel qui peut être renouvelé tous les jours ou stocké plusieurs jours avec ou sans addition de substrats synthétiques pour uniformiser les concentrations notamment en carbone organique et en ammonium. L'étude bibliographique montre clairement que la nature du substrat synthétique notamment de la source carbonnée utilisée (glucose, acétate, éthanol) influence les caractéristiques du milieu biologique (taille et stabilité des floccs, concentrations en PEC solubles et liés) et de ce fait possède une influence sur le colmatage. A ce jour aucune étude utilisant un même Bàm ne compare les effets de la nature du substrat (réel ou synthétique) sur les caractéristiques du milieu biologique, les performances des biomasses autotrophes et hétérotrophes en lien avec le colmatage. Or des études de ce type permettraient peut être d'apporter des éléments de réponse à la grande variété de résultats obtenus dans ce domaine.

Si de multiples études existent concernant la caractérisation des performances épuratrices, le colmatage, les activités biologiques en fonction des paramètres opératoires à l'état stationnaire, celles en conditions instables sont beaucoup moins nombreuses. Cependant dans les Bàm comme dans tout autre procédé biologique, les dysfonctionnements des paramètres opératoires et environnementaux créant une situation de stress pour la biomasse ne sont pas

rare. Ces stress tels que des variations de la C_m , des défauts dans l'aération, de la qualité de l'effluent, de température, de pH affectent directement le milieu biologique et ses performances. Des études complémentaires semblent utiles pour déterminer dans des cas de stress parfaitement maîtrisés la résistance de la biomasse et les conséquences à la fois sur le colmatage et les performances épuratrices.

Enfin l'étude bibliographique montre l'importante disparité des résultats obtenus sur l'implication des PEC (surtout pour les PEC liés) dans le colmatage et sur leur caractérisation en fonction de divers paramètres opératoires et environnementaux. L'une des raisons clairement identifiée est l'absence de protocoles standards d'extraction des PEC mais également d'analyse quantitative de leurs principaux constituants qui sont les protéines, les polysaccharides et les substances humiques. Aux vues de l'importante variété de résultats obtenus sur l'influence des PEC et de leurs constituants sur le colmatage, les concentrations de ces principaux constituants contenus dans les PEC solubles et liés ne sont pas un paramètre suffisamment pertinent pour la détermination de leur implication dans le colmatage. La mesure de ces concentrations doit être couplée avec d'autres techniques qualitatives telles que la chromatographie d'exclusion stérique, les matrices de fluorescence 3D afin d'apporter des informations utiles à la détermination de leur responsabilité dans le colmatage. Notre étude s'est concentrée exclusivement sur l'étude des PEC solubles extraits du B&M (PMS + PEC solubles de l'effluent d'entrée) car d'une part depuis quelques années leur implication dans le colmatage ne semble plus faire de doute et d'autre part leur protocole d'extraction qui est souvent une simple centrifugation est commun à la plupart de la littérature et permet donc une comparaison avec celle-ci.

Les principaux objectifs de cette étude sont donc :

- i) A C_m fixe, déterminer l'âge de boues qui garantie des biomasses autotrophes et hétérotrophes actives, des épurations en DCO et ammonium maximales, une production de boues faible ainsi qu'une limitation du colmatage par une caractérisation de celui-ci. Déterminer si la biomasse se trouve être plus affectée par la provocation des mêmes stress (variations C_m , défaut d'aération) à un âge de boues donné.
- ii) Déterminer l'influence de la nature de l'effluent d'entrée (ERU ou synthétique) sur l'ensemble des performances du BâM à l'état stationnaire et pendant les différentes situations de stress testées.

CHAPITRE 2 : Matériel et méthodes

2.1 Le bioréacteur à membranes

Le pilote (*Polymem, Toulouse, France*) se constitue d'un bioréacteur avec un volume utile de 30 L dans lequel se trouve un serpentin immergé qui permet de maintenir la température du milieu à $25 \pm 2^\circ\text{C}$ (Figure 2. 1). Une membrane céramique est placée dans un carter à l'extérieur du réacteur biologique (Tableau 2. 1).

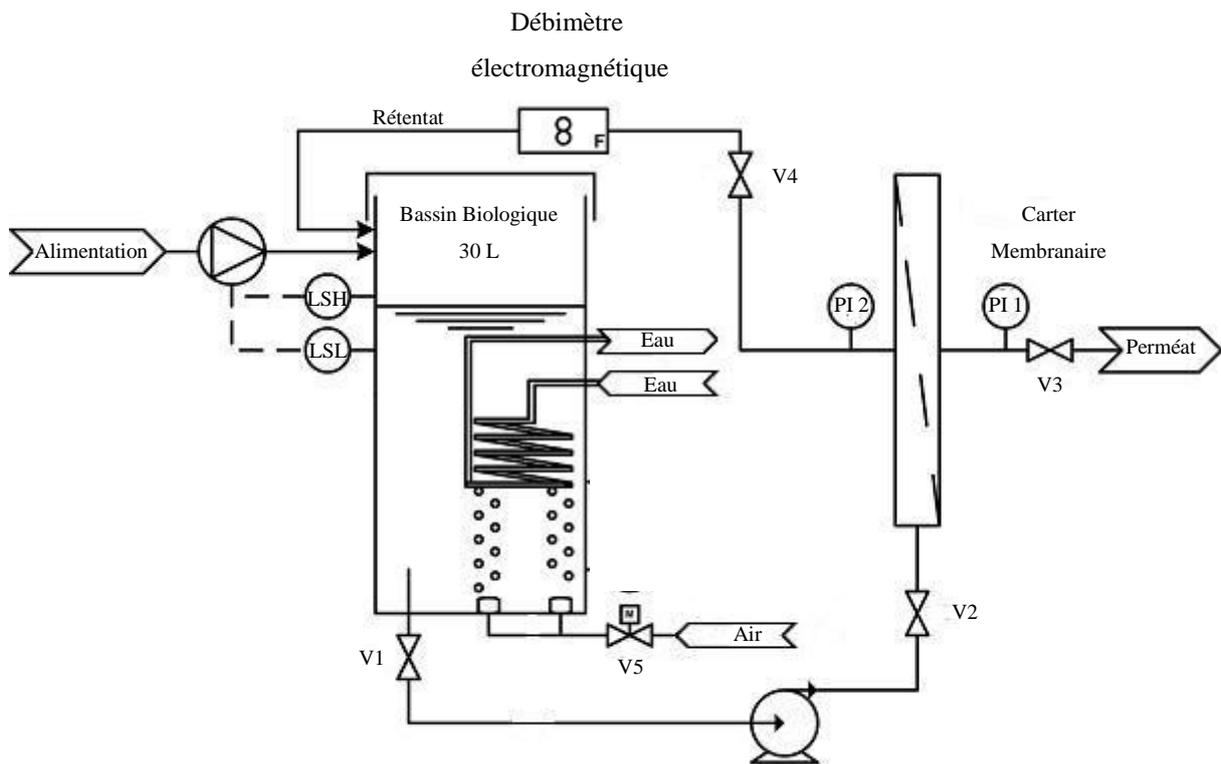


Figure 2. 1 : Schéma du bioréacteur à membranes

L'aération du milieu biologique est en mode séquentiel, 2 h aéré/ 1 h non aéré, par l'intermédiaire de l'électrovanne V5. L'aération est faite sous forme de fines bulles grâce à quatre poreux, le débit étant contrôlé par un débitmètre à billes (gamme : $0\text{-}40 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$). Une sonde à oxygène permet de suivre la concentration en oxygène dissous qui est maintenue supérieure à $2 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ en phase de nitrification et inférieure à $2 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ durant la phase de dénitrification.

Tableau 2. 1 : Caractéristiques des membranes d'ultrafiltration

Fabricant	NOVASEP
Type	Carbosep ® M1
Configuration	Tubulaire-monocanal
Matériau	ZrO ₂ -TiO ₂
Perméabilité initiale à 20°C (L.h ⁻¹ .m ⁻² .bar ⁻¹)	110
Seuil de coupure (kDa)	150
Surface totale de filtration (cm ²)	222

L'installation n'étant pas équipée d'un contrôleur de pH, afin de maintenir la neutralité du milieu biologique lors de l'acidification due à la réaction de nitrification une solution basique d'hydrogénocarbonate de sodium (NaHCO₃) est utilisée à une concentration de 0,2 g.L⁻¹. Elle est directement placée dans le substrat synthétique. L'alimentation en effluent est réalisée par l'intermédiaire d'une pompe doseuse (*Prominent*). Elle est régulée par deux capteurs de niveau et compense le débit de perméat extrait de l'unité. Une pompe centrifuge inox (Multi-V202-OSE-M/2/B, *Salmson, France*) assure la recirculation des boues vers la membrane. La vitesse du fluide qui circule tangentiellement à la membrane est fixée à environ 4 m.s⁻¹ grâce à la vanne V4 et à la mesure du débit de rétentat (débitmètre électromagnétique *Siemens* MAG 5000). Le maintien à un âge de boues donné est effectué par l'intermédiaire de purges quotidiennes durant la phase aérée pour assurer une homogénéité de la boue prélevée.

Durant toutes les expérimentations, le pilote a fonctionné sans rétrolavages automatiques pour suivre l'impact des différentes conditions testées (âge de boues, stress) sur le colmatage membranaire.

Les membranes sont lavées chimiquement dans un pilote en inox externe spécifiquement utilisé pour les phases de lavage. Un premier lavage à la soude concentrée à 40 g.L⁻¹ est réalisé pendant 45 min en présence de chlore et chauffée à 80 °C à l'aide d'un bain thermostaté afin d'éliminer la partie organique du colmatage (majoritairement présent dans les Bàm). Afin de revenir à la neutralité du perméat plusieurs lavages à l'eau du robinet successifs sont réalisés.

Un lavage de 45 min à l'acide nitrique est ensuite réalisé (68 %, *Prolabo*) à une concentration de 15 g.L⁻¹ pour enlever le colmatage minéral. Des lavages successifs à l'eau du robinet sont ensuite effectués pour un retour à pH neutre du perméat.

Durant les différentes phases de lavages une PTM fixe de 2 bar est appliquée. La perméabilité à l'eau est ensuite mesurée et comparée à la perméabilité initiale.

2.2 Caractéristiques des effluents

2.2.1 Effluent résiduaire urbain

L'ERU est prélevé après les différents prétraitements (dégrillage, déshuilage, déssablage) dans la station d'épuration par bioréacteur à membranes immergées externes (BàM_{IE}) de la ville de Rousset de 12 000 EH. L'eau est collectée tous les matins (entre 8 h et 12 h) dans une tulipe et elle subit une filtration supplémentaire au moyen d'un filtre à poche de seuil de coupure 200 µm avant d'être stockée à température ambiante dans une cuve de 100 L et d'être envoyé dans le pilote. Le Tableau 2. 2 rassemble les principales caractéristiques de l'ERU pendant la durée de l'étude. Les analyses sur l'ERU prétraité ont été réalisées par un laboratoire certifié COFRAC.

Tableau 2. 2 : Caractéristiques moyennes de l'ERU d'entrée

Paramètre	Mars 2012	Avril 2012	Mai 2012	Juin 2012
MES (mg.L ⁻¹)	270 ± 20	283 ± 35	323 ± 64	284 ± 42
DCO (mg.L ⁻¹)	665 ± 78	767 ± 212	626 ± 14	720 ± 95
DBO (mg.L ⁻¹)	255 ± 35	279 ± 92	157 ± 85	282 ± 28
N-NH ₄ ⁺ (mg.L ⁻¹)	51 ± 4	44 ± 11	29 ± 15	52 ± 4
Azote global (mg.L ⁻¹)	67 ± 6	62 ± 15	47 ± 12	71 ± 4
Phosphore total (mg.L ⁻¹)	8 ± 1	7 ± 1	5 ± 2	8 ± 1

2.2.2 Effluent synthétique

L'objectif est de reproduire synthétiquement les eaux usées arrivant en STEP afin de suivre l'acclimatation des populations hétérotrophes et autotrophes au nouveau substrat et d'évaluer en conditions stationnaires leurs performances épuratoires. Les proportions massiques des différents constituants de l'effluent synthétique sont rassemblées dans le Tableau 2. 3 et sont fixées par la littérature (Han et al., 2005 ; Barrioz-Martinez, 2006).

Tableau 2. 3 : Composition massique du substrat synthétique

C₆H₁₂O₆	(NH₄)₂SO₄	MgSO₄	KH₂PO₄	CaCl₂
2,1	1	0,1	0,2	0,02

Les micro-organismes hétérotrophes vont se développer en dégradant le carbone organique sous forme de glucose. Les bactéries autotrophes vont quant à elles dégrader l'ammonium NH₄⁺ issu de (NH₄)₂SO₄ (99 %, *Chem-Lab*). Des sels minéraux sont ajoutés au substrat MgSO₄.7H₂O, KH₂PO₄ (99,5 % *Chem-Lab*) et CaCl₂.2H₂O (98 %, *Prolabo*). Le rapport C/N/P appliqué est typique des effluents synthétiques pour les acclimatations en laboratoire : 100/10/2 avec C correspondant au carbone organique.

2.3 Les biomasses

Les deux acclimations réalisées avec l'effluent synthétique sontensemencées avec la biomasse provenant de la STEP « la Pioline ». Afin de gagner quelques semaines sur l'acclimation en ERU, la biomasse, déjà acclimatée à l'ERU, est prélevée dans le Bàm du Rousset. Les deux stations fonctionnent au même âge de boues et les caractéristiques globales (Tableaux 2.2 et 2.4) de l'effluent à traiter sont très proches.

2.3.1 Biomasse provenant de la STEP « la Pioline »

Pour les deux acclimations réalisées avec l'effluent synthétique au laboratoire M2P2, les BA ont été prélevées dans la STEP classique de « la Pioline » d'Aix en Provence dont les capacités sont de 165 000 équivalents habitants. La station traite au maximum $40\,000\text{ m}^3\cdot\text{j}^{-1}$ d'eaux usées urbaines ($9\,850\text{ kg}_{\text{DBO}}\cdot\text{j}^{-1}$) réparties sur deux filières de traitement biologique. Chaque filière est constituée de deux bassins concentriques. Dans un premier bassin de $17\,000\text{ m}^3$ des cycles d'aération (2h aéré // 1h non aéré) permettent d'alterner entre des phases d'aérobie et d'anoxie. Au centre de ce même bassin, un autre de $3\,500\text{ m}^3$ assure des conditions d'anaérobie. Le TSH de la station est d'environ vingt heures.

Le Bàm estensemencé avec des BA prélevées au niveau de la boucle de recirculation dont les concentrations en MVS sont en moyenne de $3\text{ g}_{\text{MVS}}\cdot\text{L}^{-1}$. Les performances de la STEP en 2011 (année de réalisation des campagnes I et II) sont présentées dans le Tableau 2. 4. Le TSB est maintenu entre quinze et vingt jours. Les rendements épuratoires sont tous supérieurs à 90% à l'exception du phosphore qui respecte néanmoins la norme annuelle. La C_m moyenne appliquée au bassin biologique est de $0,12\text{ kg}_{\text{DBO5}}\cdot\text{kg}_{\text{MVS}}^{-1}\cdot\text{j}^{-1}$.

Tableau 2. 4 : Performances moyennes de la STEP « la Pioline » en 2011

Paramètre	Concentration entrée ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)	Concentration sortie ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)	Norme rejet ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)	Rendement (%)
MES	290 ± 20	10 ± 4	≤ 35	$96,6 \pm 1,6$
DCO	615 ± 31	27 ± 9	≤ 125	$95,6 \pm 1$
DBO	295 ± 60	4 ± 2	≤ 25	$98,6 \pm 0,5$
N-NH4+	35 ± 6	$2 \pm 0,8$	≤ 3 (T > 12°C)	$94,5 \pm 0,2$
Azote global	57 ± 4	$1 \pm 0,5$	≤ 10	$98,2 \pm 1,3$
Phosphore total	8 ± 1	$0,9 \pm 0,3$	≤ 1 (moyenne annuelle)	$88,8 \pm 2,5$

2.3.2 Biomasse provenant de la STEP « le Rousset »

L'acclimatation est effectuée sur site avec l'ERU de la STEP du Rousset pour pouvoir renouveler l'effluent quotidiennement. Bien que le BâM à l'échelle pilote soit placé sur site, le fonctionnement en mode séquentiel de la tulipe d'alimentation n'a pas permis une alimentation en continue du pilote. Celle-ci aurait entraîné des dysfonctionnements d'ordre mécanique aux niveaux de la pompe d'alimentation et du BâM lorsqu'elle était vide. Le BâM_{IE} composé de 8 modules de fibres creuses (Puron) de surface filtrante totale 3000 m². 1800 m³.j⁻¹ peuvent être traités au maximum. La station se décompose en trois bassins concentriques : celui situé à l'extérieur (diamètre le plus grand) contient la biomasse qui a servi à l'ensemencement du pilote dont la valeur moyenne des MVS est de 6 g.L⁻¹. Dans ce bassin l'aération est syncopée en 10 min aération/40 min sans air. Le bassin du milieu contient l'effluent d'entrée non prétraité. Enfin le plus petit bassin contient la biomasse en phase anaérobie. L'alimentation en ERU prétraité se fait dans ce dernier bassin par surverse d'une tulipe. Le volume total du bassin biologique est de 1900 m³. Le TSH de la station est maintenu vers 25 heures. Les performances de la STEP du Rousset pour le premier semestre 2012 sont rassemblées dans le Tableau 2. 5.

Tableau 2. 5 : Performances moyennes de la STEP « le Rousset » au premier semestre 2012

Paramètre	Concentration entrée (mg.L ⁻¹)	Concentration sortie (mg.L ⁻¹)	Norme rejet (mg.L ⁻¹)	Rendement (%)
MES	290 ± 47	13 ± 5	≤ 35	96 ± 1,4
DCO	695 ± 100	46 ± 10	≤ 125	93 ± 0,8
DBO	243 ± 60	11,5 ± 4	≤ 25	95 ± 1
N-NH ₄ ⁺	44 ± 9	1	≤ 3 (T > 12°C)	98 ± 0,5
Azote global	62 ± 9	2 ± 0,5	≤ 10	97 ± 1,1
Phosphore total	7 ± 1	0,2 ± 0,1	≤ 1 (moyenne annuelle)	97 ± 2,3

Les rendements épuratoires sont tous supérieurs à 90 % et respectueux des normes en vigueur. La Cm moyenne appliquée au bassin biologique est de 0,1 kg_{DB05}.kg_{MVS}⁻¹.j⁻¹. Le TSB est maintenu entre 20 et 25 jours.

2.4 Récapitulatif des conditions opératoires

Le Tableau 2. 6 rassemble les paramètres opératoires rencontrés une fois que les différentes biomasses sont acclimatées. Les acclimations notées I et II correspondent à celles qui sont effectuées en laboratoire avec l'effluent synthétique (ES) à des âges de boues respectifs de 20 et 50 jours. La troisième acclimation (III) s'est déroulée avec le même BâM sur le site du Rousset et la biomasse est alimentée avec un ERU.

Tableau 2. 6 : Paramètres opératoires des différentes acclimations réalisées

	Paramètres	Acclimation I	Acclimation II	Acclimation III
Substrat	Nature substrat	Synthétique	Synthétique	Réel
	N-NH₄ (kg.kg _{MVS} ⁻¹ .j ⁻¹)	0,015 ± 0,001	0,016 ± 0,003	0,014 ± 0,008
	DCO (kg.kg _{MVS} ⁻¹ .j ⁻¹)	0,23 ± 0,02	0,21 ± 0,02	0,19 ± 0,02
Biomasse	TSB (j)	20	50	50
	MES (g _{MES} .L ⁻¹)	10,1 ± 0,8	9,1 ± 1,2	7,6 ± 0,9
	MVS (%)	81 ± 1	82 ± 1	78 ± 2
Procédé	Volume (L)	18	18	15
	TSH (h)	24 ± 1	24 ± 1	9 ± 3
	Débit de perméat (L.h ⁻¹)	0,75 ± 0,02	0,76 ± 0,02	1,64 ± 0,4
	Flux de perméat 20°C (L.h ⁻¹ .m ⁻²)	33,8 ± 1,9	32,6 ± 2,5	70,1 ± 16
	Vitesse de recirculation (m.s ⁻¹)	3,5 - 4	3,5 - 4	3,5 - 4
	PTM (bar)	1,3 ± 0.1	1,3 ± 0.1	1,2 ± 0.2
Contrôle	Cycles aération (aéré//non aéré)	2h//1h	2h//1h	2h//1h
	Oxygène dissous (mg _{O₂} .L ⁻¹)	0 - 6	0 - 6	0 - 6
	pH	7 - 8	7 - 8	7 - 8
	Température (°C)	24,9 ± 2,5	27,7 ± 3	27,1 ± 2,4

Pour les trois acclimations le débit d'alimentation est égal au débit de perméat. Les températures des acclimations II et III sont légèrement supérieures à celle de l'acclimation I en raison de la saison estivale de fonctionnement de ces deux expérimentations.

Afin de pouvoir effectuer une comparaison entre les résultats obtenus pour les acclimations II et III fonctionnant au même TSB mais avec respectivement un ES et un ERU, le choix de fonctionner aux mêmes charges massiques en DCO et en ammonium est fait. Cependant, étant donné la différence de concentrations en DCO et en ammonium entre l'effluent réel et synthétique, dans les conditions de fonctionnement en effluent réel, le TSH est diminué à 9 ± 3 h.

2.5 Les outils analytiques

2.5.1 Les outils analytiques pour le suivi des acclimations

2.5.1.1 Prélèvement des échantillons

Durant les acclimations, un suivi quotidien des MES et MVS est effectué pour avoir une première idée de l'évolution de la biomasse dans le procédé. Deux fois par semaine, pour s'assurer du bon déroulement de la nitrification et dénitrification, des analyses en NH_4^+ et NO_3^- sont réalisées dans le réacteur biologique. Une fois par semaine la DCO est évaluée dans le bioréacteur.

Des cycles d'aération ayant été mis en place pour garantir une bonne nitrification et dénitrification, le prélèvement des échantillons dans le bioréacteur doit être fait en fin de phase aérée. En effet les concentrations en ammonium et nitrates sont directement dépendantes des cycles d'aération imposés. Les concentrations en NH_4^+ et NO_3^- sont ainsi comparables d'une analyse à l'autre et l'aération permet d'obtenir un échantillon de biomasse homogène.

La fraction solide des prélèvements est séparée de la phase soluble de la boue par une centrifugation de 15 min à $13\,500 \text{ tr.min}^{-1}$ (centrifugeuse 2-16, *Sigma*). La partie liquide est ensuite filtrée sur filtre à café (taille moyenne des pores $100 \mu\text{m}$) pour enlever toutes les particules. Les analyses en DCO, NH_4^+ et NO_3^- peuvent ensuite être réalisées. Les mêmes analyses sont réalisées à partir d'échantillons de substrat synthétique (sans la centrifugation et la filtration) et d'ERU avec le même protocole que les échantillons de biomasse.

Concernant la détermination de la DCO, des analyses complémentaires sont réalisées dans le perméat. Pour NH_4^+ et NO_3^- , des analyses préliminaires ont confirmé l'égalité des concentrations de ses deux composés de part et d'autre de la membrane. Ainsi à partir des données obtenues dans le substrat et le perméat les rendements d'élimination en DCO, NH_4^+ et NO_3^- peuvent être déterminés.

2.5.1.2 Mesure des MES et des MVS

Les culots issus de la centrifugation sont placés dans un four (*Nabertherm*) à $105 \text{ }^\circ\text{C}$ pendant 24 h. La valeur des MES est obtenue après pesée des culots secs. Ses culots sont ensuite

replacés au four à 550°C pendant 2 h et après différence de pesée entre le séchage à 105 °C et le passage au four à 550°C, les MVS sont obtenus.

2.5.1.3 Analyse de la DCO

La DCO correspond à la quantité d'oxygène nécessaire pour oxyder chimiquement les molécules organiques. Avec les kits *Aqua Lytic* (20-1500 mg.L⁻¹) basés sur une réaction d'oxydation par le dichromate de potassium (K₂Cr₂O₇) dans un milieu sulfurique et chauffé à 105 °C pendant 2 h, la DCO des échantillons est déterminée. La DCO équivalente à la quantité d'oxygène consommée par l'oxydation de la matière organique est lue après refroidissement des échantillons au spectrophotomètre (DR/2500, *Hach*) à 605 nm. La droite d'étalonnage placée en annexe A.1.1 permet de revenir à la concentration en DCO (mg.L⁻¹).

2.5.1.4 Détermination du contenu en NH₄⁺ et NO₃⁻

Avec les kits *Merk* (2-150 mg_{N-NH₄}.L⁻¹ et 0-20 mg_{N-NO₃}.L⁻¹), les contenus en ammonium et nitrates sont déterminés. Le principe est identique à celui de l'analyse de la DCO et relève de réactions colorimétriques suivi d'une lecture directe par spectrophotométrie à 712 nm pour l'ammonium et à 525 nm pour les nitrates. Grâce aux droites d'étalonnage situées en annexe A.1.2 et A.1.3 les concentrations respectives en ammonium et nitrates sont évaluées.

2.5.1.5 Mesure de la granulométrie

L'identification de la distribution granulométrique des floes de boues activées est faite avec un granulomètre laser (*Malvern Mastersizer S*) avec une longueur focale qui permet la mesure de particules avec des tailles comprises entre 0,1 et 900 µm. Avant tout passage dans le granulomètre, les échantillons de boue sont dilués 100 fois. Le diluant utilisé correspond au surnageant de la biomasse obtenu après ultracentrifugation (*Beckam Coulter Optima L-100 XP*) pendant 20 min à 80 000 tr.min⁻¹. La solution ainsi obtenue est passée à travers le faisceau laser du granulomètre au moyen d'une pompe péristaltique à petite vitesse pour ne pas endommager les floes avant leur passage dans la cellule.

La distribution de taille des particules ainsi que le diamètre moyen (d₅₀) des floes sont ensuite obtenus. Pour chaque échantillon trois passages sont effectués dans le granulomètre. Les valeurs de d₅₀ obtenues correspondent donc à une moyenne prise sur 3 valeurs, avec un pourcentage d'erreur inférieur à 10 %.

2.5.2 Les outils analytiques pour la caractérisation des PEC solubles

2.5.2.1 Extraction

Toutes les étapes de l'extraction des PEC solubles de floccs de boues activées sont faites à 4°C pour éviter d'une part une lyse cellulaire et donc une libération de matériel intracellulaire pouvant fausser les concentrations recherchées en protéines, substances humiques et polysaccharides et d'autre part pour stopper toute activité microbienne pouvant consommer les PEC solubles recherchés. L'extraction des PEC solubles est faite pour quantifier par dosage colorimétrique les protéines, les substances humiques et les polysaccharides des échantillons mais aussi pour caractériser les masses moléculaires apparentes des fractions colmatantes de protéines et substances humiques dans le cas des trois acclimations en phase stationnaire mais également en période de stress par une analyse par chromatographie d'exclusion stérique couplée à un fluorimètre.

Le but de l'extraction n'étant pas d'obtenir le meilleur rendement d'extraction possible en PEC mais uniquement les PEC solubles, la méthode la plus douce possible est employée. C'est pour cette raison que la centrifugation est préférée à des méthodes chimiques ou physiques plus drastiques.

La première étape de l'extraction consiste à prélever un volume de 30 mL de boues activées du réacteur biologique en phase aérée et à le placer dans une fiole à centrifugation. L'étape de centrifugation se déroule à 4°C, 6800 tr.min⁻¹ pendant 20 min. Le surnageant contient les PEC solubles qui sont directement placés dans un flacon bouché et conservés au congélateur à -18 °C.

2.5.2.2 Dosages colorimétriques

Dans tous les cas la lecture des absorbances s'effectue avec un spectrophotomètre et les dosages sont répétés deux fois. Les concentrations en PEC solubles s'expriment en mg d'équivalent du produit étalon par gramme de MVS initialement présent dans l'échantillon.

2.5.2.2.1 Polysaccharides

La méthode reprise ici est celle développée par Dubois et al., (1956). L'échantillon est chauffé en présence d'acide sulfurique et de phénol. Les polysaccharides sont hydrolysés durant le

chauffage par l'acide sulfurique, puis les monosaccharides sont déshydratés par le phénol (coloration orange). Le Tableau 2. 7 décrit le protocole de dosage employé.

Tableau 2. 7 : protocole de dosage des polysaccharides

Polysaccharides
0,5 mL d'échantillon
0,5 mL de phénol à 5 % (m/V)
Homogénéisation
2,5 mL d'acide sulfurique
Homogénéisation
10 min à 100°C
30 min à l'obscurité
Lecture à 492 nm

La droite d'étalonnage permettant de revenir à la concentration en polysaccharides est située en annexe A.1.4 et a été effectuée avec du D-(+)- glucose (99,5 %, *Sigma-Aldrich*).

2.5.2.2.2 Protéines et substances humiques

Des interférences existant lors de la mesure spectrophotométrique des protéines, Frolund et al., (1995) ont modifié la méthode initialement mise au point par Lowry pour prendre en compte les substances humiques. La méthode consiste à former un complexe entre les liaisons peptidiques et le sulfate de cuivre CuSO_4 en milieu alcalin. Ce complexe réduit alors les acides phosphomolybdiques et phosphotungstiques du réactif Phénol-Folin-Ciocalteau pour donner un second complexe de couleur bleue. Pour différencier les protéines des substances humiques le développement de la couleur bleue est mesuré en présence et en l'absence de CuSO_4 .

En présence de CuSO_4 les protéines et les substances humiques sont dosées. En l'absence de CuSO_4 les substances humiques ainsi que les acides aminés chromogènes sont mesurés.

A partir des absorbances lues avec et sans le CuSO_4 , il est possible de revenir aux valeurs d'absorbance des substances humiques et des protéines (Equations 2.1 et 2.2) :

A_1 : absorbance pour le dosage avec CuSO_4

A_2 : absorbance pour le dosage sans CuSO_4

$$A_{\text{protéines}} = 1,25 \times (A_1 - A_2) \quad (2.1)$$

$$A_{SH} = A_2 - 0,2 A_{\text{protéines}} \quad (2.2)$$

Le protocole des dosages avec et sans le CuSO_4 est décrit dans le Tableau 2. 8 et les composés suivant ont été utilisés :

A : solution de Na_2CO_3 à 2 % (m/V) dans NaOH à 0.1 N

B : solution de CuSO_4 à 0,5 % (m/V) dans tartrate double de Na et K à 1 % (m/V)

C : solution de tartrate double de Na et K à 1 % (m/V)

D : 1 mL de B avec 50 mL de A

E : 1 mL de C avec 50 mL de A

F : Réactif de Folin (2 N) (dilution par 2 avec de l'eau distillée)

Tableau 2. 8 : Protocoles de dosages des protéines et substances humiques

Dosage avec CuSO_4	Dosage sans CuSO_4
2,5 mL de D	2,5 mL de E
0,5 mL d'échantillon	0,5 mL d'échantillon
Homogénéisation	Homogénéisation
Repos de 10 min	Repos de 10 min
0,25 mL de F	0,25 mL de F
Homogénéisation	Homogénéisation
Repos de 30 min	Repos de 30 min
Lecture à 650 nm	Lecture à 650 nm

Les droites d'étalonnage permettant de revenir aux concentrations en protéines et substances humiques sont placées en annexes A.1.5 et A.1.6 et ont été respectivement réalisées avec du sérum d'albumine bovine (98 %, *Sigma-Aldrich*) et des acides humiques (*Sigma-Aldrich*).

2.5.2.3 Méthode de caractérisation des PEC solubles

2.5.2.3.1 Matrices d'excitation-émission fluorescence en 3 dimensions (3D)

L'analyse des échantillons de PEC solubles par fluorimétrie 3D (RF-5301 PC, *Shimadzu* ; logiciel d'acquisition *Panorama Fluorescence 2.1*) permet d'obtenir les spectres de fluorescence des composés organiques contenus dans les échantillons par un balayage simultané d'une plage spectrale de longueurs d'onde d'excitation (220 nm à 400 nm avec un

pas de 5 nm) et d'émission (240 à 550 nm). Les zones correspondent à des groupes fonctionnels de la matière organique et donc peuvent correspondre à des molécules comme les protéines et les substances humiques (Chen et al., 2003).

Les échantillons sont dilués (V/V) avec la phase mobile à double concentration utilisée en CES avant d'être analysés (tampon phosphate 100 mM ; pH $7,0 \pm 0,1$; sans NaCl).

En appliquant cette méthode sur les échantillons de PEC solubles en phase stationnaire et pendant les stress provoqués dans les différentes acclimations, les couples de longueurs d'onde d'excitation-émission spécifiques aux protéines-like et substances humiques-like des échantillons peuvent être déterminés. En utilisant par la suite ces longueurs d'onde spécifiques pour la détection fluorimétrique qui succède à la séparation par CES et un étalonnage approprié pour les deux types de molécules visés, les masses moléculaires apparentes des protéines et substances humiques des échantillons peuvent être obtenues.

2.5.2.3.2 Chromatographie d'exclusion stérique (CES) haute pression couplée à une détection fluorescence

La CES permet de séparer des molécules organiques natives en fonction de leur volume hydrodynamique (taille). Suivant leur taille, les molécules éluées peuvent plus ou moins pénétrer dans les pores de la phase stationnaire qui est constituée d'un gel polymère. Ainsi, les molécules les plus petites sont d'avantage retenues que les plus grosses, d'où un temps de rétention plus long pour les premières par rapport aux secondes. Chaque colonne possède un domaine de séparation spécifique : les macromolécules dont le volume hydrodynamique est trop important sortent dans le volume mort, tandis que celles trop petites éluent avec la phase mobile en fin d'injection.

Le chromatographe (*Hitachi LA Chrom, Merck*) est composé d'un injecteur d'échantillons automatique (L7200) avec boucle de 100 μL , d'une pompe haute pression (L7100), d'une colonne d'exclusion stérique et d'un détecteur de fluorescence (L7485).

La phase mobile correspond à celle recommandée par le constructeur des colonnes : NaCl 150 mM, tampon phosphate 50 mM (NaH_2PO_4 et Na_2HPO_4) ajusté à pH $7,0 \pm 0,1$ avec du NaOH 2 M. Avant utilisation, la phase mobile est filtrée à 0,22 μm et dégazée pendant 20 min. Les caractéristiques des deux colonnes utilisées sont spécifiées dans le Tableau 2. 9.

Tableau 2. 9 : Caractéristiques des colonnes d'exclusion stérique

Système CES	Intervalle théorique de séparation (kDa)	Pression maximale autorisée (bar)	Débit phase mobile (mL.min⁻¹)	Volume de perméation totale (mL)	Domaine d'application de l'étalon (kDa)	Equation de la droite d'étalonnage
Agilent Bio SEC- 300 Å	5-1250	200	1	11,5	13,7-670 (protéines)	*Log (M)= - 0,43 Ve + 8,4
Agilent Bio SEC- 100 Å	0,1-100	200	1	10	3,8-69 (protéines)	Log (M)= - 0,45 Ve + 7,4
Agilent Bio SEC- 100 Å	0,1-100	200	1	10	0,21-13 (substances humiques)	Log (M)= - 0,32 Ve + 6,2

*M : masse moléculaire apparente ; Ve : Volume d'élution

Afin de pouvoir déterminer des masses moléculaires apparentes aux protéines et substances humiques ainsi séparées, des droites d'étalonnage sont réalisées (annexes A.2.1, A.2.2 et A.2.3). La colonne « Agilent Bio SEC- 300 Å » séparant théoriquement des molécules de hauts poids moléculaires entre 5 et 1250 kDa est étalonnée avec les protéines suivantes : la tyroglobuline (670 kDa), l'immunoglobuline G (155 kDa), l'albumine bovine (69 kDa), la ribonuclease A (13,7 kDa). Concernant la colonne « Agilent Bio SEC- 100 Å » séparant théoriquement des molécules de faibles poids moléculaires entre 0,1 et 100 kDa, elle est à la fois étalonnée avec des protéines et des substances humiques. Pour les protéines, les molécules suivantes sont utilisées : l'albumine bovine, l'ovalbumine (45 kDa), la ribonuclease A et le glucagon (3,8 kDa) et pour les substances humiques quatre polymères de sulphonate de polystyrène de masse molaire comprise entre 0,21 et 13 kDa ont été utilisés. Le volume de perméation totale est déterminé par injection de NaNO₃ (0,6 g.L⁻¹).

Juste avant l'analyse par CES les échantillons sont péalablement filtrés à 0,22 µm.

2.6 Les tests respirométriques

L'objectif des tests respirométriques est de pouvoir suivre au cours des acclimations, pendant les phases stationnaires et pendant les stress générés, l'évolution des activités des biomasses autotrophes et hétérotrophes.

Dans le processus de respiration aérobie des autotrophes et hétérotrophes, l'oxygène dissous correspond à l'accepteur final d'électrons de la chaîne respiratoire de ces micro-organismes. Par conséquent la consommation de l'oxygène peut être directement reliée à la croissance de la biomasse et à la consommation de substrat. La masse d'oxygène consommée par unité de volume et de temps correspond donc à la respiration des bactéries ou à leur vitesse de consommation de l'oxygène (OUR pour oxygen uptake rate). La vitesse de consommation de l'oxygène est largement reconnue dans la littérature pour caractériser la viabilité de la biomasse (Spanjers et al., 1998).

La distinction respiration endogène/exogène y est souvent faite.

- **La respiration endogène** correspond à la vitesse de consommation de l'oxygène par les micro-organismes en l'absence de substrat d'origine externe et résulte de la consommation de résidus cellulaires autochtones comme substrat pour la formation de biomasse (concept de mort-régénération), de la respiration des protozoaires (Ray et Peters, 2008) et de la consommation d'énergie de maintenance.
- **La respiration exogène maximale** représente la consommation de l'oxygène par une population microbienne en présence d'un excès de substrat. En ajoutant le même excès d'un substrat identique dans les mêmes conditions, une comparaison des respirations exogènes maximales des micro-organismes au cours d'une acclimation ou pour différentes biomasses acclimatées peut être faite.
- **La respiration spécifique** : il s'agit de la vitesse de consommation de l'oxygène en conditions endogènes ou exogènes maximales rapportés à la concentration de MES ou plus souvent de MVS (elle s'exprime en $\text{mg}_{\text{O}_2} \cdot \text{g}_{\text{MVS}}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$). Le terme utilisé est alors le SOUR (specific oxygen uptake rate). Cette activité spécifique permet d'exprimer la respiration spécifique des bactéries viables et actives. Mais seulement en théorie car certains auteurs prouvent que les MVS ne contiennent pas uniquement la biomasse

active mais également une fraction organique inerte provenant de l'effluent d'entrée et du métabolisme bactérien (Lebegue, 2008a ; Spérandio et al., 2008).

Durant toutes les acclimatations, la variation des respirations endogènes et exogènes maximales spécifiques des micro-organismes autotrophes et hétérotrophes est évaluée par l'intermédiaire de tests respirométriques.

La respiration des bactéries est quantifiée en suivant la diminution de l'oxygène dissous dans un réacteur lors de la transition entre une phase aérée et une phase anoxie (Figure 2. 2). La pente de la droite obtenue divisée par la concentration en MVS donne le SOUR.

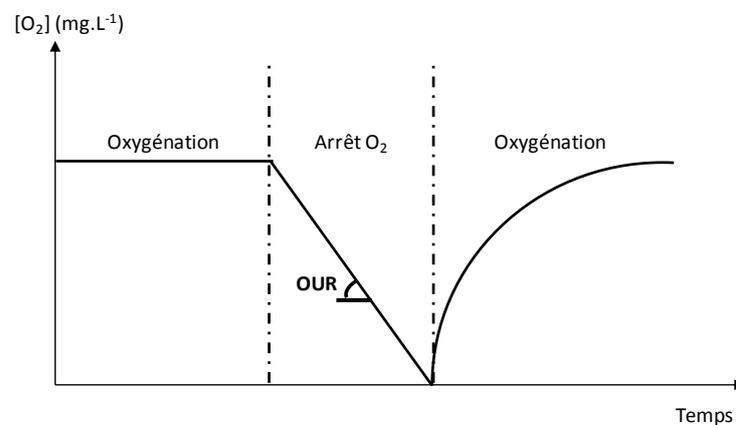


Figure 2. 2 : Méthode de mesure de la respiration bactérienne

Le dispositif expérimental se compose d'un béccher d'1 L continuellement aéré par l'air diffusé à travers un poreux et d'un béccher de 50 mL non aéré. Une sonde à oxygène (LDO, *Hach Lange*) est immergée dans le béccher de 50 mL, ce même volume est prélevé du béccher contenant la biomasse en phase aérée vers le béccher non alimenté en oxygène. Pendant 2 min la variation de la concentration en oxygène est mesurée. A la fin de cette mesure les 50 mL de boues sont réinjectés dans le béccher en phase aérobie. L'opération se répète toutes les 2 min pendant les 4 h du test respirométrique. Cette méthode utilisant 2 bécchers est préférée à celle utilisant une succession de phases aérées/non aérées afin de ne pas perturber les conditions aérobies nécessaires à la consommation des différents substrats ajoutés.

Le respirogramme (Figure 2. 3) est obtenu par juxtaposition de l'ensemble des SOUR obtenus. Pendant la première étape, les bactéries sont en conditions endogènes garanties par

l'absence d'apport en substrat pendant une période de 4 à 6 h. Aucune distinction entre les autotrophes (A) et les hétérotrophes (H) ne peut être faite, il s'agit de la respiration endogène globale de la biomasse. Dans la phase 2, un ajout en excès de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ est effectué à la concentration de $0,02 \text{ g}_{\text{N-NH}_4} \cdot \text{g}_{\text{MVS}}^{-1}$ afin d'obtenir la respiration exogène maximale des autotrophes pouvant être associée à la réaction de nitrification. Lorsque la totalité de l'ammonium est consommé un retour à la première étape est constaté.

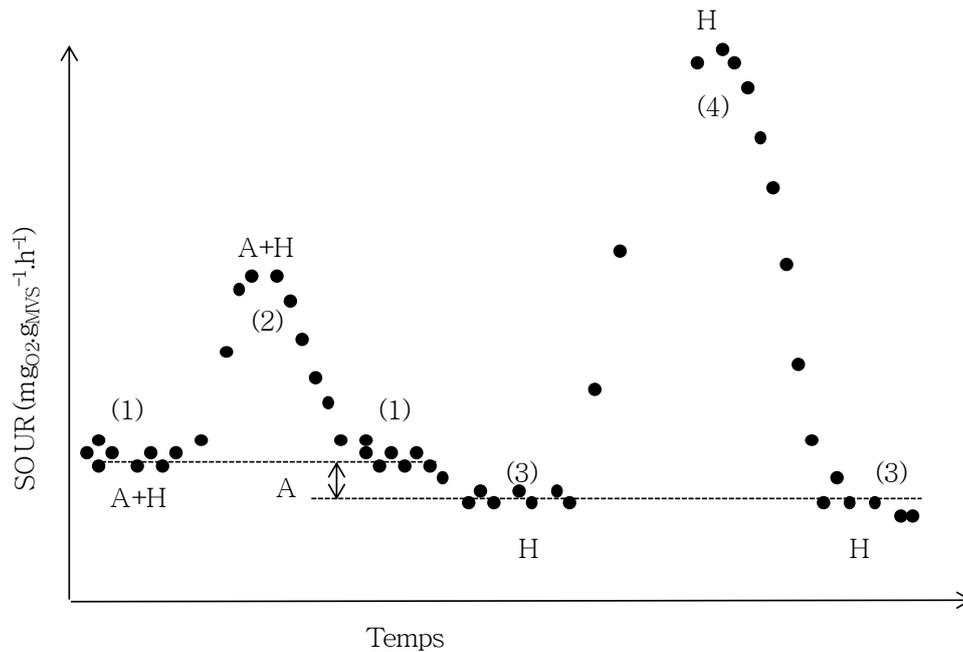


Figure 2. 3 : Les différentes phases caractérisant un respirogramme

Une solution d'allylthiourée (98 %, *Sigma-Aldrich*) est ajoutée ($0,1 \text{ g} \cdot \text{g}_{\text{MVS}}^{-1}$) pour inhiber l'étape de nitrification. Plus spécifiquement cette molécule inhibe la première étape d'oxydation de l'ammonium en nitrites par les bactéries autotrophes. Suite à cette étape, la respiration endogène spécifique aux bactéries autotrophes peut être obtenue. Par différence entre la respiration endogène obtenue dans l'étape 1 et celle-ci, la respiration endogène spécifique des hétérotrophes est mesurée.

Enfin, dans une dernière étape (4), un ajout de carbone organique sous forme de glucose ($0,3 \text{ g} \cdot \text{g}_{\text{MVS}}^{-1}$) est effectué. La respiration maximale obtenue est associée à la consommation du carbone organique par les hétérotrophes. Un retour à la phase 3 est ensuite constaté.

La validation des concentrations fixées en ammonium, glucose et allylthiourée est optimisée au laboratoire M2P2 lors de la thèse de L. Clouzot (2009). Ces valeurs correspondent aux concentrations minimales à partir desquels les respirations exogènes maximales spécifiques sont obtenues pour l'ammonium et le glucose et une inhibition complète dans le cas d'un ajout d'allylthiourée.

CHAPITRE 3 : Caractérisation des performances et du colmatage d'un BâM pour le traitement d'un effluent synthétique. Choix d'un âge de boues

L'objectif de ce chapitre est d'évaluer les performances épuratrices et de caractériser le colmatage d'un BâM_E en fonction de l'âge de boues. Deux acclimatations sont réalisées pour deux TSB fixés à 20 ou 50 jours.

Afin d'éviter les effets conjoints de la baisse de charge massique et de l'augmentation du TSB sur la croissance bactérienne, sur les activités spécifiques exogènes et endogènes de la biomasse et sur la production de PEC à l'inverse de nombreuses études faites sur l'influence du TSB dans les BâM, la charge massique est maintenue constante à $0,2 \text{ kg}_{\text{DCO}} \cdot \text{kg}_{\text{MVS}}^{-1} \cdot \text{j}^{-1}$ pour les biomasses stabilisées à deux âges de boues.

Tout au long des acclimatations et après stabilisation à un âge de boues donné, les rendements épuratoires en ammonium et en DCO, les activités endogènes et exogènes spécifiques des biomasses autotrophes et hétérotrophes ainsi que les PEC solubles et leur influence sur le colmatage sont caractérisés.

Suite à cette étude comparative à l'état stationnaire, un choix du TSB le plus intéressant est fait. En complément de cette étude, plusieurs situations stressantes pour la biomasse liées à une variation importante de la charge massique et à un manque d'oxygène sont simulées. Le but étant dans un premier temps d'évaluer les performances des biomasses stabilisées à 20 et 50 jours en conditions non stationnaires et dans un deuxième temps de voir si à un âge de boues donné, la biomasse n'offre pas plus de résistance aux stress appliqués.

3.1 Acclimations stabilisées à des âges de boues de 20 et 50 jours

3.1.1 Développement de la biomasse

Des BA de la STEP « la Pioline » sont concentrées dans le BâM à $6,5 \text{ g}_{\text{MVS}} \cdot \text{L}^{-1}$ soit environ $8 \text{ g}_{\text{MES}} \cdot \text{L}^{-1}$ pour être représentatif des concentrations en biomasse typiquement rencontrées dans les BâM. L'évolution des MVS ainsi que de la C_m sont représentées et scindées en quatre phases distinctes caractéristiques de l'évolution du procédé (Figure 3. 1). Tout au long de l'acclimation les MVS représentent une part de 80 % des MES.

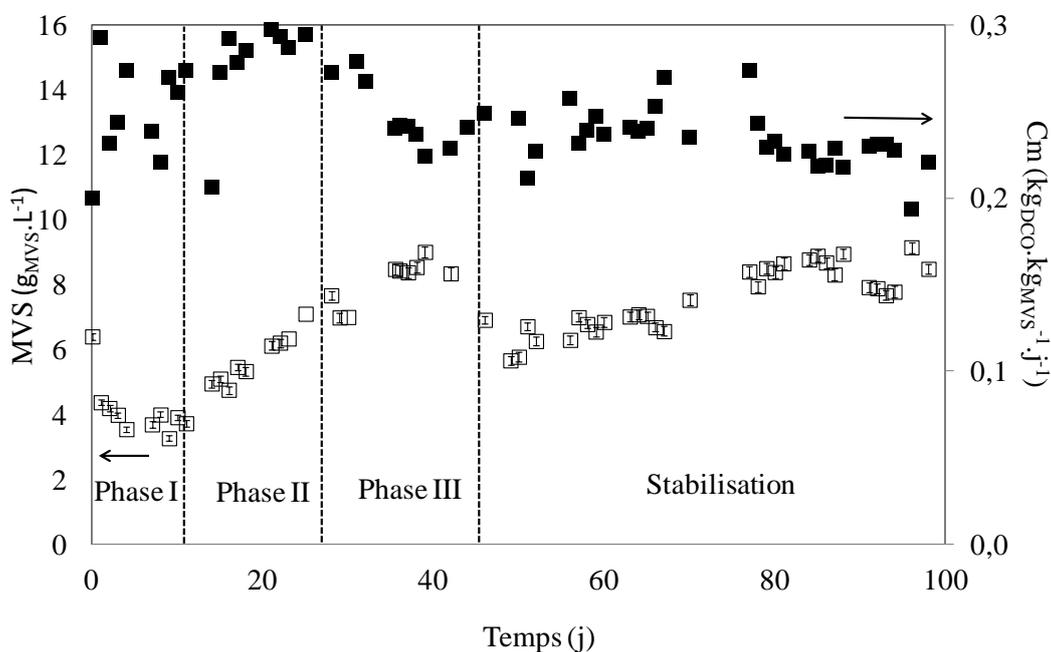


Figure 3. 1 : Evolution des MVS et de la C_m au cours de l'acclimation à 20 jours

Les dix premiers jours (phase I) correspondent à une phase de latence pendant laquelle les concentrations en MVS chutent en raison des changements imposés par les nouvelles conditions hydrodynamiques du réacteur et par celles liées au nouveau substrat synthétique. Environ 30 % de la biomasse est ainsi hydrolysée pendant la première journée. La charge massique initialement fixée à $0,2 \text{ kg}_{\text{DCO}} \cdot \text{kg}_{\text{MVS}}^{-1} \cdot \text{j}^{-1}$ subit d'abord une augmentation à cause de la chute brutale des MVS et est ensuite diminuée pour s'adapter à la décroissance de la biomasse.

La « phase II » est caractérisée par une légère augmentation des MVS révélant une croissance de la biomasse. La C_m est augmentée jusqu'à $0,3 \text{ kg}_{\text{DCO}} \cdot \text{kg}_{\text{MVS}}^{-1} \cdot \text{j}^{-1}$ dans le but de favoriser le développement de la biomasse.

Ces deux premières étapes sont imposées par le système alors que les deux suivantes sont contrôlées pour imposer les conditions opératoires de l'étude.

Pendant la « phase III » la C_m est volontairement diminuée pour limiter la croissance bactérienne et ainsi stabiliser la biomasse.

La dernière étape correspond à une stabilisation du procédé après quarante-six jours d'acclimatation à une charge massique de $0,23 \pm 0,02 \text{ kg}_{\text{DCO}} \cdot \text{kg}_{\text{MVS}}^{-1} \cdot \text{j}^{-1}$ et une concentration en MVS de $8,2 \pm 0,7 \text{ g}_{\text{MVS}} \cdot \text{L}^{-1}$ à un âge de boues de 20 jours. Les biomasses seront considérées comme stables dès qu'une production de boues cumulée sera atteinte

Le développement de la biomasse durant la deuxième campagne peut également être divisé en quatre étapes (Figure 3. 2). Les BA sont initialement concentrées à $6,5 \text{ g}_{\text{MVS}} \cdot \text{L}^{-1}$ comme lors de la première acclimatation. 44 % des MVS sont perdues lors de la première journée de la « phase I » de cette acclimatation.

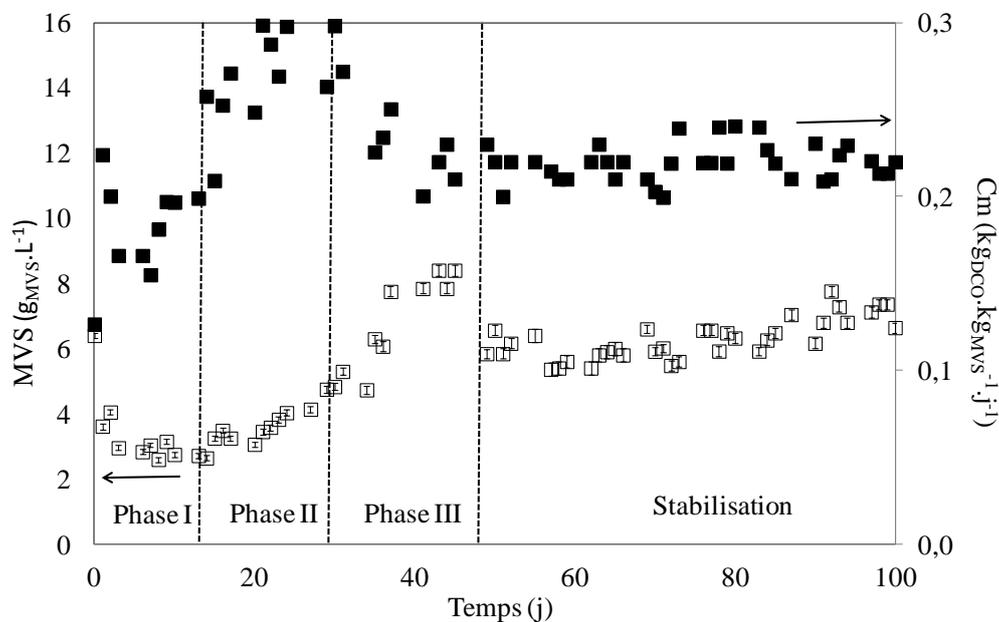


Figure 3. 2 : Evolution des MVS et de la C_m au cours de l'acclimatation à 50 jours

Une croissance de la biomasse est observée avec une augmentation de la Cm jusqu'à $0,3 \text{ kg}_{\text{DCO}} \cdot \text{kg}_{\text{MVS}}^{-1} \cdot \text{j}^{-1}$ (phase II). Ensuite la baisse de la Cm a limité le développement de la biomasse (phase III).

Au bout de quarante-neuf jours la phase de stabilisation débute pour une Cm et une concentration en MVS à des valeurs respectives de $0,22 \pm 0,01 \text{ kg}_{\text{DCO}} \cdot \text{kg}_{\text{MVS}}^{-1} \cdot \text{j}^{-1}$ et $7,0 \pm 0,7 \text{ g}_{\text{MVS}} \cdot \text{L}^{-1}$ à un âge de boues de 50 jours.

3.1.2 Production de boues

Le calcul de la production journalière de boues (P_x) est fait suivant les équations 3.0 et 3.1 :

$$P_x = Q_p \times MVS_R + V_R \times \frac{\Delta MVS_R}{\Delta t} \quad (3.0) \quad \text{et} \quad P_{x_{\text{cumulée}}} = \sum_{\text{jour}=1}^i P_x \quad (3.1)$$

Avec :

P_x Production journalière de boues ($\text{g} \cdot \text{j}^{-1}$)

Q_p Débit de purges ($\text{L} \cdot \text{j}^{-1}$)

MVS_R Matières volatiles en suspension au sein du bioréacteur ($\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)

ΔMVS_R Variation de la concentration en MVS au sein du bioréacteur ($\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)

L'évolution de la P_x cumulée est suivie tout au long des acclimatations. Cette évolution tient compte des purges quotidiennes utilisées pour fixer le TSB soit vingt soit à cinquante jours. Ces purges sont effectuées en fin de phase aérée pour garantir l'homogénéité du prélèvement et aussitôt après la purge, un volume identique d'eau du robinet est ajouté dans le bioréacteur pour éviter l'introduction automatique de substrat. Par cette méthode la charge massique appliquée de $0,2 \text{ kg}_{\text{DCO}} \cdot \text{kg}_{\text{MVS}}^{-1} \cdot \text{j}^{-1}$ au cours des expériences est garantie.

Le procédé est considéré comme stable dès que la linéarité de la P_x cumulée est obtenue (Delgado, 2009) (Figure 3. 3).

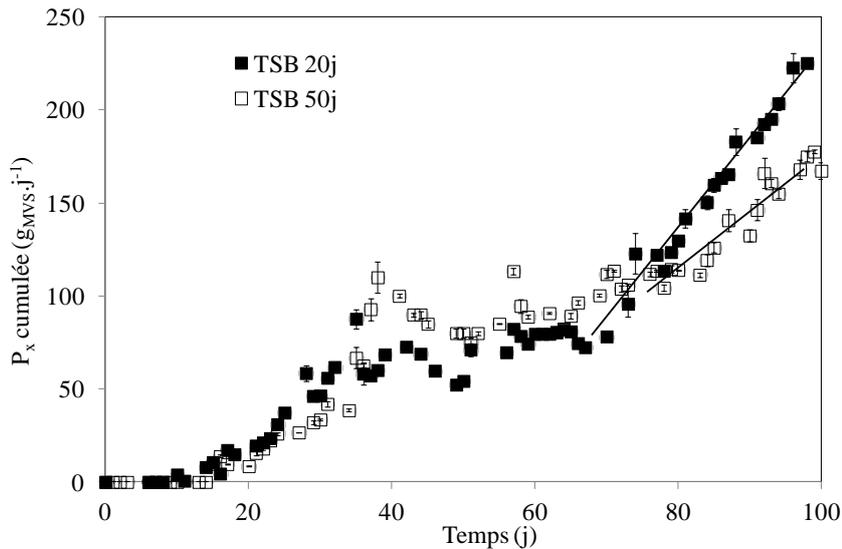


Figure 3.3 : Productions cumulées de boues au cours des acclimations à 20 et 50 jours

Les quatre étapes précédemment décrites (Partie 3.1.1) pour le développement de la biomasse sont retrouvées. Une phase de latence d'une vingtaine de jours est observée au cours des deux acclimations. Durant cette phase aucune production de biomasse n'est relevée.

Pendant la « phase II » la P_x cumulée augmente révélant la croissance de la biomasse due à l'augmentation de la charge massique. Puis dans une « phase III », lorsque la C_m est baissée pour réguler la croissance bactérienne, une baisse conjointe de la P_x cumulée est observable. La phase de stabilisation est atteinte au bout de soixante-six jours pour l'acclimation à un TSB de 20 jours et après quatre-vingt jours pour l'acclimation à un âge de boues de 50 jours. La vitesse de production de boues est de $0,42 \text{ kg}_{\text{MVS}} \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{j}^{-1}$ à un TSB de 20 jours et de $0,12 \text{ kg}_{\text{MVS}} \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{j}^{-1}$ à un âge de boues de 50 jours. La production de boue est donc plus lente avec l'augmentation de l'âge de boues. Ce résultat est donc en accord avec la littérature.

L'étude réalisée par Fernando Delgado Zambrano, 2009 dans un BàM_E à un TSB fixé à 50 jours confirme l'ordre de grandeur des valeurs de production de boues obtenues dans cette étude. Après soixante jours d'acclimation, la P_x cumulée est d'environ $110 \text{ g}_{\text{MVS}} \cdot \text{j}^{-1}$ et au bout de cent jours elle se trouve vers $250 \text{ g}_{\text{MVS}} \cdot \text{j}^{-1}$. Par conséquent, la cohérence des résultats souligne le lien indéniable entre le TSB et la quantité de boue accumulée dans le procédé.

La charge massique étant fixe et quasi identique pour les deux acclimations, une comparaison des capacités épuratrices et des activités biologiques des deux biomasses ainsi que des relargages de PEC solubles en lien avec le colmatage membranaire est donc possible.

3.1.3 Les capacités épuratrices des biomasses

Les capacités épuratrices des biomasses sont évaluées à partir d'un suivi des rendements d'élimination de la DCO et de l'azote.

3.1.3.1 Elimination du carbone organique

Les taux de dégradation de la DCO sont comparés au cours des deux acclimations et après stabilisation des biomasses aux âges de boues de 20 et 50 jours (Figure 3. 4).

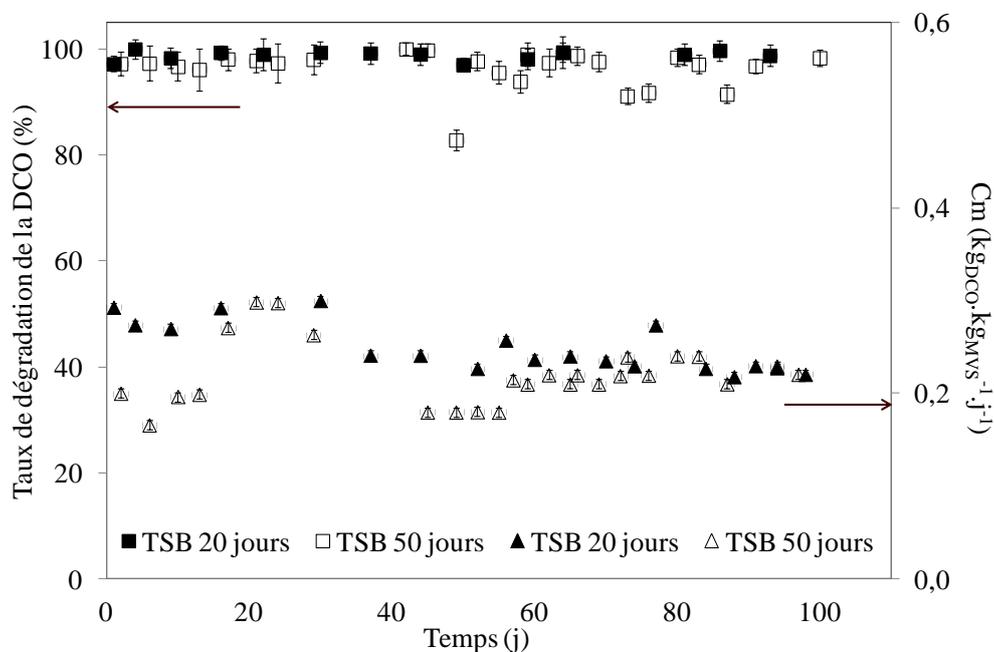


Figure 3. 4 : Taux de dégradation et C_m en DCO au cours des acclimations à 20 et 50 jours

Aux cours des trois différentes phases d'acclimation (jusqu'au jour 49 environ) des taux de dégradation de la DCO identiques et très élevés sont obtenus pour les deux acclimations (respectivement de $99 \pm 1\%$ pour l'acclimation à 20 jours et $98 \pm 1\%$ pour l'acclimation à 50 jours) avec une charge massique légèrement supérieure durant les vingt premiers jours de l'acclimation I.

Au 49^{ème} jour de la deuxième acclimatation, une chute du taux de dégradation de la DCO à 83 ± 2 % est constatée. Une concentration en DCO environ six fois supérieure ($160 \text{ mg}_{\text{DCO}} \cdot \text{L}^{-1}$) aux valeurs habituellement obtenues dans le perméat est trouvée. Cette chute s'est produite pendant la phase III, période pendant laquelle la charge massique est abaissée pour stabiliser la croissance bactérienne. La baisse de C_m de $0,07 \text{ kg}_{\text{DCO}} \cdot \text{kg}_{\text{MVS}}^{-1} \cdot \text{j}^{-1}$ en une semaine est peut être trop rapide. Elle a entraîné une perte de biomasse de $2 \text{ g}_{\text{MVS}} \cdot \text{L}^{-1}$ avec sans doute une libération du contenu organique intracellulaire dans le bioréacteur. Ce contenu intracellulaire doit être caractérisé par des fractions de petits poids moléculaires (inférieurs au seuil de coupure de la membrane) pour se retrouver dans le perméat et faire augmenter sa valeur de DCO. L'étude réalisée partie 5.2.3 apportera des éléments de réponse à cette caractérisation des fractions libérées pendant ce stress.

A charge massique constante les performances épuratrices du BâM vis-à-vis du carbone organique sont donc maintenues aux alentours de 100 % pour un âge de boue de 20 jours et une légère baisse est constatée pour un TSB de 50 jours. Pollice et al., (2008) observent également une baisse du taux d'élimination du carbone organique pour un bioréacteur traitant un effluent réel entre un TSB de 60 jours (95 %) et une rétention totale de la biomasse (86 %). Une des hypothèses avancée par les auteurs est une augmentation de la lyse cellulaire ou de la production de PMS avec une élévation du TSB.

3.1.3.2 Elimination de l'ammonium et des nitrates

La Cm et le taux de dégradation de l'ammonium sont également comparés entre les deux acclimations (Figure 3. 5). La gestion de la charge massique en ammonium est identique à celle en DCO puisqu'un rapport de 100/10/2 (C/N/P) est fixé.

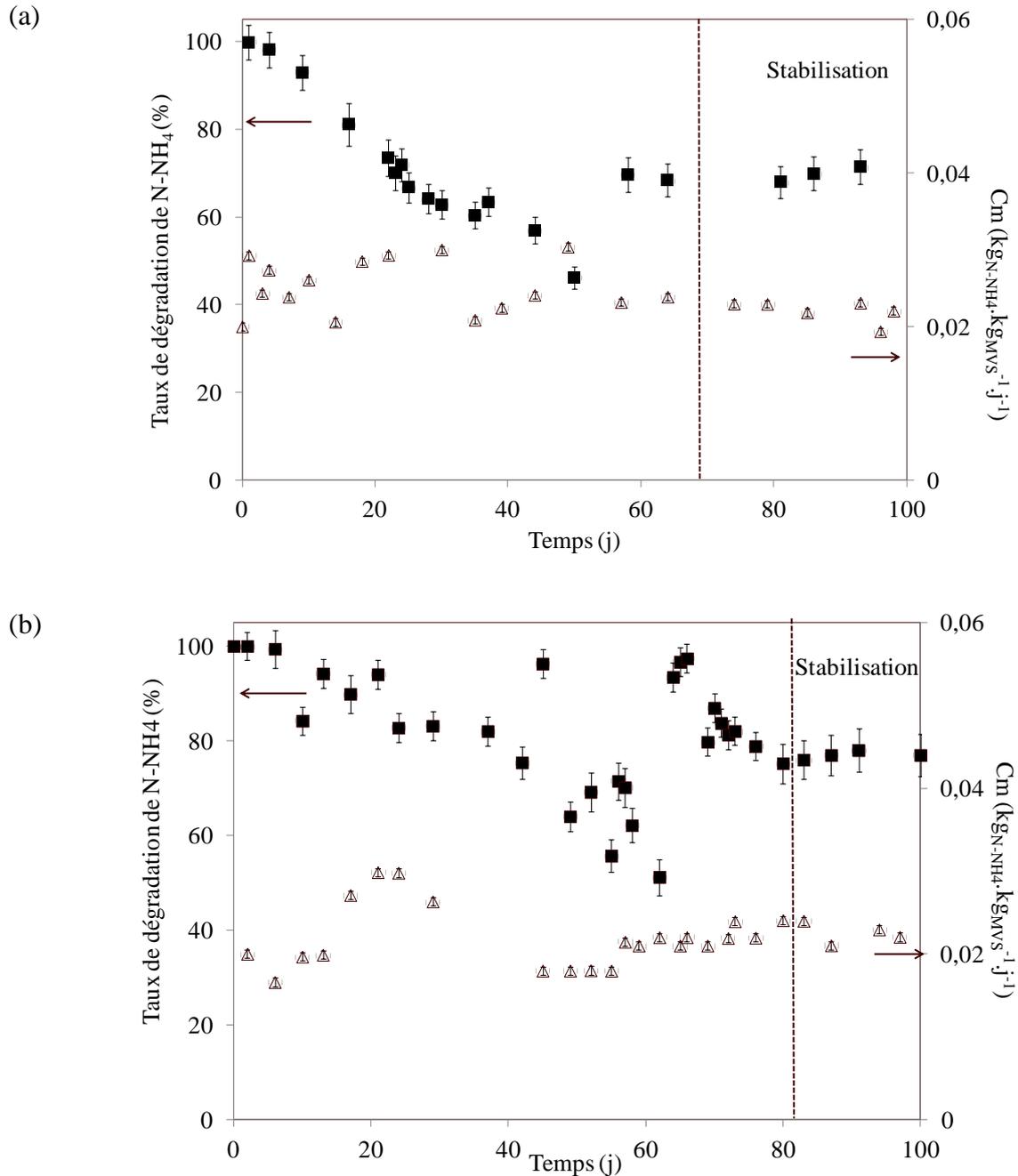


Figure 3. 5 : Taux de dégradation et Cm en N-NH4 pour (a) l'acclimation à 20 jours et (b) à 50 jours

Initialement pour les deux acclimations l'élimination de l'ammonium est quasiment totale mais dès les premiers jours une décroissance des performances est constatée. La plus basse valeur du taux de dégradation de l'ammonium est constatée au jour 50 avec seulement 46 % d'élimination pour l'acclimation à 20 jours et avec 51 % d'élimination au jour 62 durant l'acclimation à 50 jours. Le même phénomène semble s'être répété pendant les deux acclimations. La « phase III » des acclimations est caractérisée par une baisse simultanée et progressive des charges massiques en DCO et ammonium afin de stabiliser les biomasses à des charges de $0,2 \text{ kg}_{\text{DCO}}.\text{kg}_{\text{MVS}}^{-1}.\text{j}^{-1}$ et $0,02 \text{ kg}_{\text{N-NH}_4}.\text{kg}_{\text{MVS}}^{-1}.\text{j}^{-1}$. Ce manque de substrat peut avoir généré un stress chez les micro-organismes autotrophes avec une perte de viabilité d'une partie de cette communauté microbienne. Cette hypothèse rejoint le constat fait lors de la baisse d'élimination de la DCO obtenue au jour 49 pendant l'acclimation à 50 jours accompagnée d'une forte concentration en DCO dans le perméat sans doute due à une importante lyse cellulaire. Une autre hypothèse est une baisse significative de la vitesse de nitrification à cause d'un phénomène de compétition des autotrophes pour l'ammonium en conditions de baisse de la charge massique ; hypothèse déjà avancée par Han et al., (2005).

A charge massique identique des taux d'élimination de $70 \pm 4 \%$ et $77 \pm 4 \%$ sont respectivement obtenus pour les biomasses stabilisées à des âges de boues de 20 et 50 jours. L'élimination de l'ammonium augmente donc avec le TSB. Ce résultat est en accord avec de nombreuses études qui ont évaluées l'influence du TSB sur l'épuration de l'ammonium (Huang et al., 2001 ; Han et al., 2005).

Liang et al., (2010) ont obtenu un taux de dégradation de l'ammonium similaire (69 %) à un âge de boues de 20 jours dans un $\text{B}\grave{\text{a}}\text{M}_\text{I}$ traitant un effluent synthétique. Cependant, d'une manière générale, les taux d'élimination de l'ammonium constatés dans cette étude sont relativement bas en comparaison de ceux pouvant être obtenus dans la littérature autour de 100 % (Pollice et al., 2008 ; Clouzot et al., 2011). Clouzot et al., (2011) mettent en avant les conditions cisailantes plus fortes dans les $\text{B}\grave{\text{a}}\text{M}_\text{E}$ et l'extrême sensibilité des micro-organismes autotrophes vis-à-vis de ces conditions pour expliquer les baisses de rendements épuratoires en ammonium dans ce type de $\text{B}\grave{\text{a}}\text{M}$ en traitant un effluent synthétique. D'autre part les études réalisées avec des ERU obtiennent souvent des taux d'élimination proches de 100 %. Se pose donc la question de savoir si l'effluent synthétique utilisé qui est à l'image des

ESde la littérature n'est peut-être pas adapté ou assez riche pour garantir une élimination maximale de l'ammonium.

Les concentrations en nitrates sont suivies pour évaluer l'efficacité de la dénitrification (Figure 3. 6).

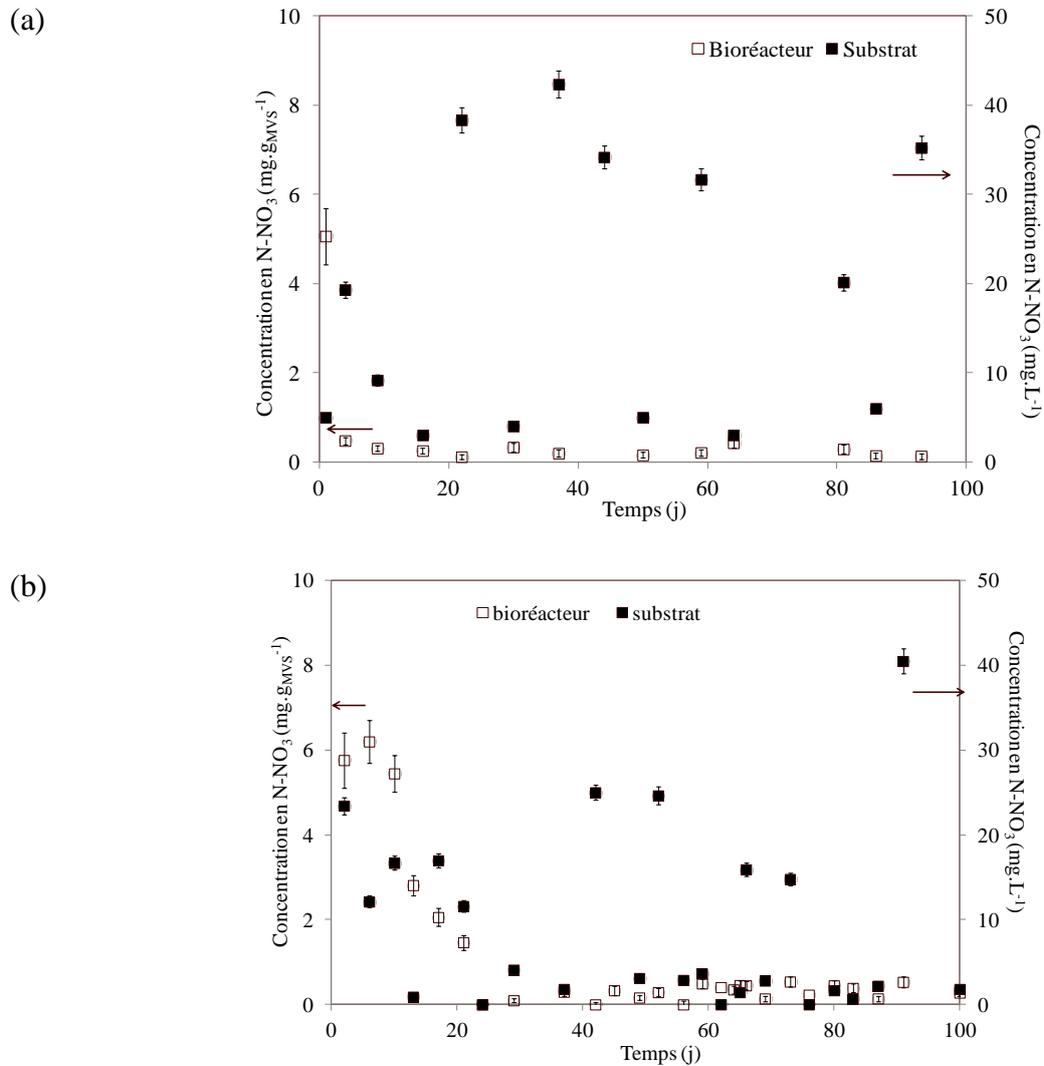


Figure 3. 6 : Evolution des concentrations en nitrates du substrat et dans le bioréacteur au cours de (a) l'acclimatation à 20 jours et (b) 50 jours

Concernant la stabilité de l'effluent qui est conservé à température ambiante sans agitation, il s'avère que cet effluent synthétique se biodégrade dans la cuve d'alimentation et qu'une diminution des concentrations en ammonium et DCO est observée. Pour éviter cette

transformation de l'effluent, celui-ci est renouvelé tous les deux jours sauf pour le week end où dans ce cas il est gardé trois jours.

La figure 3.6 montre des concentrations résiduelles dans le bioréacteur très faibles, inférieures à $0,5 \text{ mg}_{\text{N-NO}_3} \cdot \text{g}_{\text{MVS}}^{-1}$ pour les biomasses acclimatées aux deux TSB. Un pic initial avec une valeur comprise entre 5 et $6 \text{ mg}_{\text{N-NO}_3} \cdot \text{g}_{\text{MVS}}^{-1}$ dans le bioréacteur est constaté pour les deux acclimations.

Au moment de sa constitution le substrat est dépourvu de nitrates. Cependant une importante variabilité de concentrations en nitrates est mesurée dans l'effluent synthétique et des pics allant jusqu'à environ $40\text{-}50 \text{ mg}_{\text{N-NO}_3} \cdot \text{L}^{-1}$ sont observés. La dégradation de l'ammonium du substrat par des bactéries nitrifiantes doit être à l'origine de la présence de nitrates. La présence de nitrates dans le substrat n'a provoqué aucune accumulation dans le bioréacteur étant donné le maintien de faibles concentrations en nitrates.

3.1.4 Evolution des activités biologiques

Les activités maximales spécifiques des biomasses sont mesurées tout au long des acclimations avec un apport en carbone ou en ammonium pour différencier les activités maximales spécifiques des hétérotrophes et des autotrophes (Figure 3. 7).

Cette respiration exogène correspond à l'oxydation d'un substrat fournissant l'énergie indispensable pour assumer les fonctions vitales des micro-organismes.

Les points obtenus au jour zéro pour les activités spécifiques exogènes des autotrophes et des hétérotrophes correspondent aux activités initiales des BA de la STEP de « la Pioline » qui ont servi auxensemencements dans les Bàm.

D'une manière générale, l'activité des hétérotrophes ne cesse d'augmenter tout au long des deux acclimations pour atteindre des valeurs moyennes de $43 \pm 3 \text{ mg}_{\text{O}_2} \cdot \text{g}_{\text{MVS}}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ et $49 \pm 5 \text{ mg}_{\text{O}_2} \cdot \text{g}_{\text{MVS}}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ respectivement à un TSB stabilisé à 20 et 50 jours.

Liang et al., (2010) obtiennent également un SOUR de $47 \text{ mg}_{\text{O}_2} \cdot \text{g}_{\text{MVS}}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ pour la population hétérotrophe de leur Bàm_I à un âge de boues de 20 jours alimenté avec un effluent synthétique ; malheureusement la charge massique appliquée n'est pas spécifiée. Ces fortes valeurs d'activités des hétérotrophes ne sont pas communes dans la littérature. Au cours du

traitement d'un effluent synthétique dans un BâM_I, Han et al., (2005) ont mesuré un SOUR des hétérotrophes constant à environ $3 \text{ mg}_{\text{O}_2} \cdot \text{g}_{\text{MVS}}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ quand le TSB et la charge massique varient respectivement entre 30 et 70 jours et entre $0,15$ et $0,05 \text{ kg}_{\text{DCO}} \cdot \text{kg}_{\text{MVS}}^{-1} \cdot \text{j}^{-1}$.

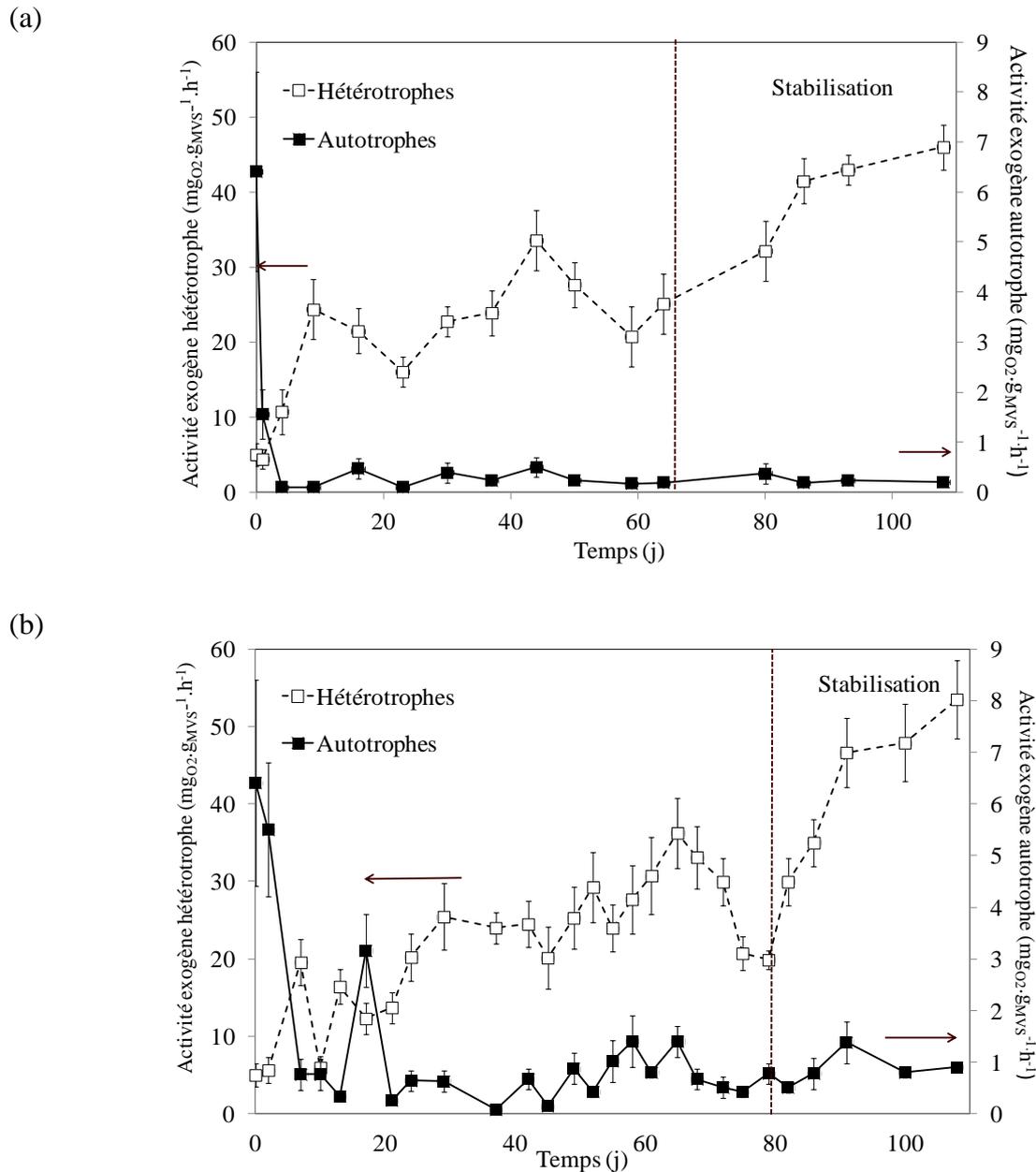


Figure 3. 7 : Activités exogènes spécifiques des hétérotrophes et des autotrophes durant (a) l'acclimation à 20 jours et (b) à 50 jours

Mais là encore, la comparaison est difficile étant donné l'impossibilité de dissocier l'effet de l'âge de boues de celui de la charge ; la charge massique variant en même temps que l'âge de boues.

Cette étude montre qu'en maintenant la même charge massique à des TSB de 20 et 50 jours, l'activité spécifique de la biomasse hétérotrophe se maintient et montre même une légère augmentation. En isolant la variation de l'âge de boues de celle de la Cm sur l'activité spécifique des hétérotrophes, il peut être conclu que la baisse de SOUR rencontrée dans de nombreuses études (Huang et al., 2001 ; Han et al., 2005 ; Pollice et al., 2008) est imputable à la baisse de la charge massique et non pas à l'augmentation du TSB.

La légère augmentation de l'activité spécifique maximale de la biomasse hétérotrophe obtenue à un âge de boues de 50 jours (Figure 3.7) ainsi que l'évolution des SOUR de la biomasse obtenue pour des ajouts croissants en substrat (Figure 3. 8) prouvent que la biomasse acclimatée à 50 jours possède une consommation d'oxygène supérieure pour dégrader la même quantité de substrat. Ce résultat peut être expliqué par une augmentation de la part active de la biomasse avec l'âge de boues et/ou par une dégradation plus rapide du substrat pour une part active relativement stable de la biomasse. Selon la littérature, pour les âges de boues testés la part active de la biomasse est constante (Héran et al., 2008 ; Spérandio et Espinosa, 2008) ainsi l'hypothèse principale retenue est donc une accélération de la consommation du substrat .

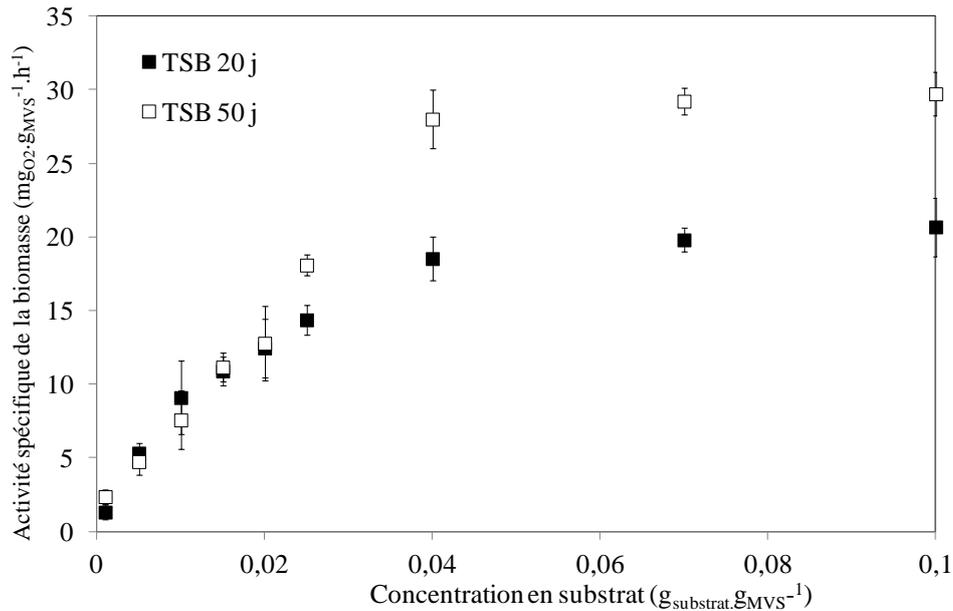


Figure 3. 8 : Evolution de l'activité spécifique exogène de la biomasse avec la concentration en substrat pour les biomasses acclimatées à 20 et 50 jours

Si l'activité spécifique de la biomasse est identique pour des faibles ajouts en substrat inférieurs à $0,02 g_{\text{substrat}} \cdot g_{\text{MVS}}^{-1}$, l'activité spécifique de la biomasse est environ supérieure de 40 % pour un TSB de 50 jours et pour des concentrations en substrat supérieures à $0,04 g_{\text{substrat}} \cdot g_{\text{MVS}}^{-1}$ (Figure 3. 8). Ce résultat montre que la biomasse acclimatée à 50 jours consomme plus d'oxygène pour biodégrader plus vite la même quantité de substrat. Ainsi certes les besoins en oxygène à 50 jours sont accrus mais la capacité de traitement de la biomasse est augmentée.

Contrairement aux bactéries hétérotrophes, les bactéries autotrophes sont soumises à une phase d'adaptation représentée par un déclin rapide de leur activité spécifique (Figure 3.7) au cours des dix premiers jours après leur introduction dans le BâM. Tout au long des acclimations et après stabilisation à un TSB, leur activité reste toujours inférieure à celle initialement obtenue avec les BA de STEP (environ $7 mg_{O_2} \cdot g_{\text{MVS}}^{-1} \cdot h^{-1}$). La C_m plus forte que dans les STEP ($0,02 kg_{N-NH_4^+} \cdot kg_{\text{MVS}}^{-1} \cdot j^{-1}$) doit certainement jouer un rôle dans cette baisse d'activité. Si l'activité spécifique des autotrophes reste à un niveau très bas pour un âge de boues de 20 jours ($0,2 \pm 0,1 mg_{O_2} \cdot g_{\text{MVS}}^{-1} \cdot h^{-1}$) une légère augmentation est constatée pour un TSB de 50 jours avec un SOUR à $0,9 \pm 0,2 mg_{O_2} \cdot g_{\text{MVS}}^{-1} \cdot h^{-1}$. Avec des rendements

d'élimination du N-NH₄ à 77 ± 4 % pour un TSB de 50 jours contre 70 ± 4 % pour un TSB de 20 jours, les activités spécifiques exogènes obtenues pour les autotrophes indiquent bien qu'à un âge de boues plus élevé, la biomasse autotrophe caractérisée par des espèces à croissance lente s'est développée. Spérandio et Espinosa, (2008) montrent que la vitesse de nitrification volumique maximale augmente avec l'âge de boues variant entre 10 et 110 jours. Ils imputent cette évolution à une augmentation de la part active de la biomasse autotrophe avec l'âge de boues. Cependant ils observent aussi que la vitesse spécifique de nitrification diminue avec le TSB (vitesse de nitrification volumique divisée par les MVS) car le pourcentage de biomasse autotrophe active même si il augmente avec le TSB, diminue lorsqu'il est rapporté à l'évolution croissante des MES (MVS et matières inertes) avec le TSB. Dans notre étude, le substrat étant facilement biodégradable et donc sans matières inertes, l'augmentation de la part active de la biomasse autotrophe avec l'âge de boues est visible avec la mesure de leur activité spécifique exogène maximale.

Dès la mise en place de purges pour stabiliser les acclimations aux âges de boues de 20 ou 50 jours, il est intéressant de noter qu'une augmentation de l'activité exogène spécifique des autotrophes est corrélée avec l'augmentation de l'activité des hétérotrophes (Figure 3. 9).

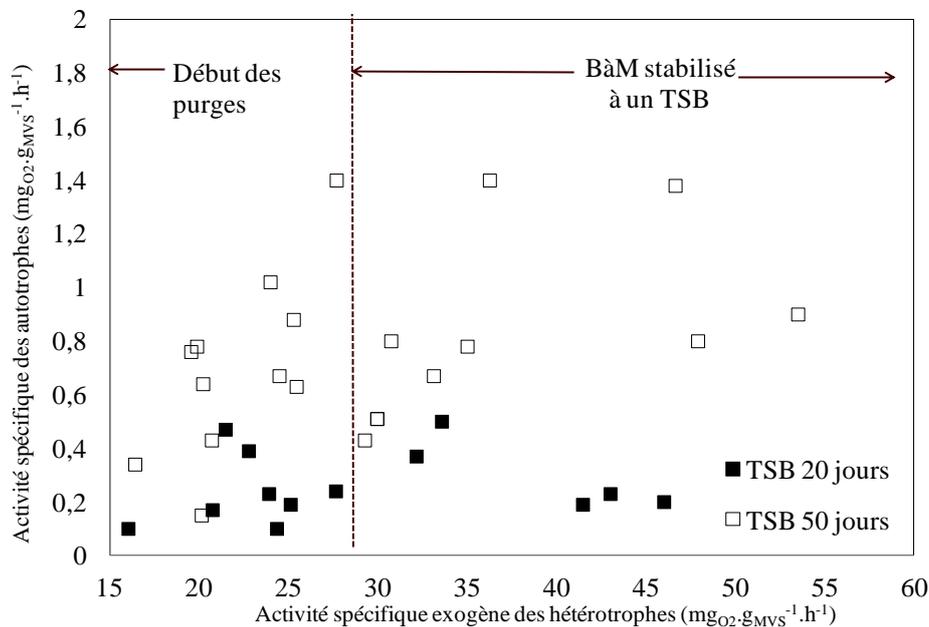
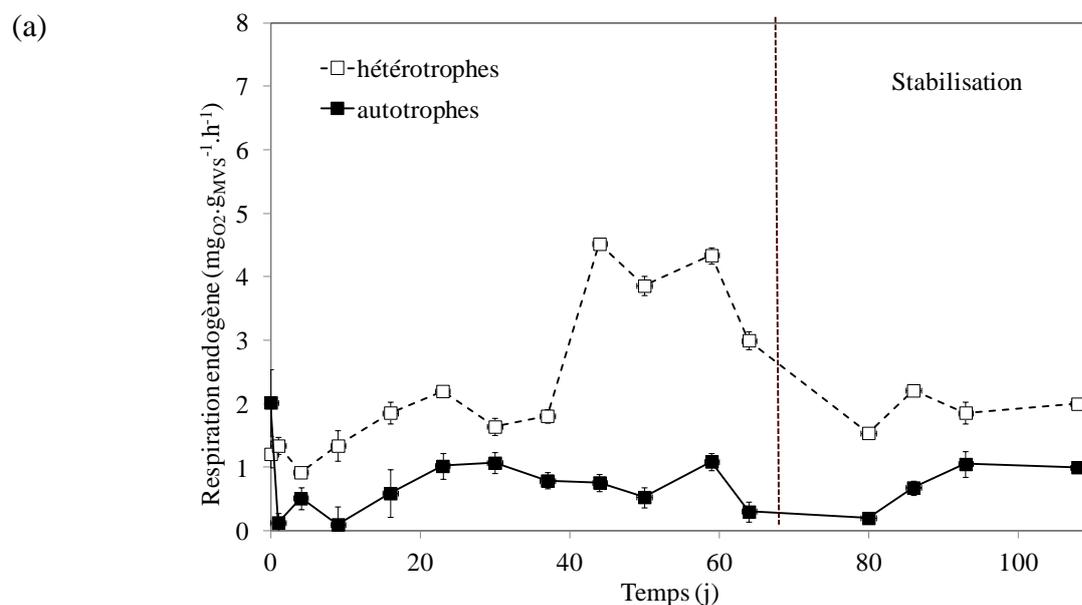


Figure 3. 9 : Influence de l'activité exogène spécifique des hétérotrophes sur celle des autotrophes au cours des acclimations à 20 et 50 jours

L'épuration de l'ammonium n'étant pas complète avec l'effluent synthétique aux deux âges de boues testés, une carence dans la composition et/ou les quantités choisies pour l'élaboration du substrat synthétique notamment en carbone inorganique peuvent être des raisons aux rendements épuratoires mesurés. Quand les bactéries hétérotrophes augmentent leur activité exogène, il est supposé qu'elles consomment plus rapidement le substrat produisant ainsi plus de CO₂.

En effet, avec une augmentation conjointe du TSB à 50 jours et de l'activité exogène des hétérotrophes, les autotrophes ont eu le temps de se développer et d'utiliser le carbone inorganique produit lors de la consommation de la DCO par les hétérotrophes pour dégrader l'ammonium.

Les respirations endogènes des micro-organismes autotrophes et hétérotrophes sont également suivies (Figure 3. 10). La respiration endogène est définie en conditions de carence en substrat exogène lorsque les micro-organismes consomment le matériel cellulaire autochtone pour maintenir leurs fonctionnalités vitales.



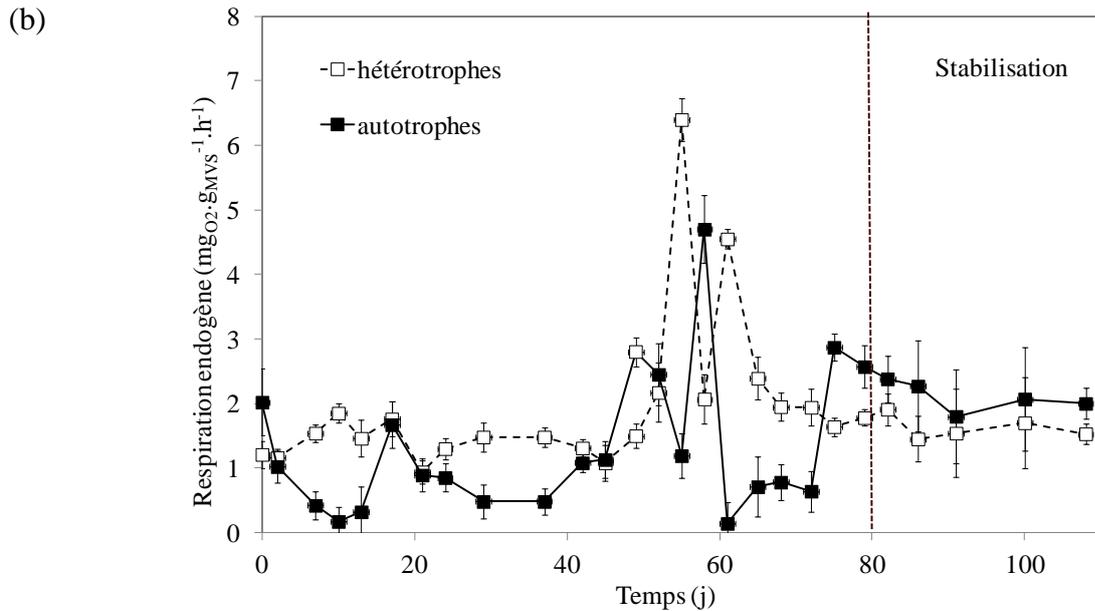


Figure 3. 10 : Activités endogènes spécifiques des hétérotrophes et des autotrophes durant (a) les acclimations à 20 jours et (b) 50 jours

Les activités endogènes des hétérotrophes sont relativement constantes pendant les quarante premiers jours à environ $2 \text{ mgO}_2 \cdot \text{gMVS}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ pour les deux acclimations. La même augmentation de leur respiration est observée des jours 40 à 60. Cette période correspond pour les deux acclimations à la fin de la « phase III » et au début de la phase de stabilisation quand la charge massique est volontairement baissée pour limiter la croissance et stabiliser les deux acclimations à une charge constante de $0,2 \text{ kg}_{\text{DCO}} \cdot \text{kgMVS}^{-1} \cdot \text{j}^{-1}$. Cette augmentation de leur respiration montre que les hétérotrophes stressées par le manque de substrat ont orienté leur métabolisme vers la maintenance cellulaire au lieu de la croissance. Ce résultat est lié aux baisses d'activités exogènes spécifiques des hétérotrophes constatées pendant la même période.

Après stabilisation quelque soit l'âge de boues, les hétérotrophes possèdent approximativement les mêmes respirations endogènes à $2 \pm 0,5 \text{ mgO}_2 \cdot \text{gMVS}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$. Ce résultat montre que les besoins de maintenance des biomasses sont similaires aux deux âges de boues testés et qu'aucun de ces deux âges de boues n'entraîne de besoins en oxygène supplémentaires pour conserver l'intégrité de la biomasse.

Pour les autotrophes, dans les deux acclimations, la même baisse initiale comparée à la respiration endogène des autotrophes des BA qui ont servi à l'ensemencement est observée. Après s'être maintenu à un niveau très bas dans les deux acclimations, une différenciation est obtenue après 40 jours dans le bioréacteur. Tandis que pour l'acclimation à 20 jours, la respiration endogène autotrophe reste basse à $0,7 \pm 0,1 \text{ mg}_{\text{O}_2} \cdot \text{g}_{\text{MVS}}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$, pour l'acclimation à 50 jours une stabilisation à $2,1 \pm 0,5 \text{ mg}_{\text{O}_2} \cdot \text{g}_{\text{MVS}}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ est atteinte. Comme un meilleur développement des autotrophes est observé pour un TSB de 50 jours, une explication de l'augmentation de leur respiration endogène peut résider dans le simple fait que le pourcentage de biomasse autotrophe active par gramme de MVS augmente engendrant une augmentation par trois de leur respiration endogène.

3.1.5 Caractérisation des PEC solubles

L'âge de boues a une influence directe sur l'activité microbienne et par conséquent sur la présence de produits microbiens solubles (PMS) dans le milieu biologique. Les PMS sont principalement composés de protéines, de polysaccharides et de substances humiques-like. Des quantités non négligeables de ces composés sont retrouvées dans le substrat synthétique. Ils seront caractérisés et comparés à ceux mesurés dans le substrat réel dans le chapitre 5. En raison de cet apport par le substrat, une distinction entre la part issue de l'activité biologique de celle en provenance de l'effluent n'est pas envisageable. C'est pourquoi le terme PEC solubles est employé par la suite.

L'évolution des trois constituants majeurs des PEC solubles est suivie au cours des deux acclimations dans le bioréacteur et dans le perméat afin d'évaluer la qualité de celui-ci.

Ensuite, grâce à une méthode couplant l'analyse des échantillons de PEC solubles par fluorimétrie 3D et la caractérisation par CES couplé à un détecteur à fluorescence, les masses moléculaires des différentes fractions de protéines et substances humiques contenues dans les PEC solubles peuvent être établies.

3.1.5.1 Evolution des concentrations en PEC solubles

Au cours des acclimations à 20 et 50 jours, avant la stabilisation des biomasses, des concentrations en protéines relativement stables extraites des PEC solubles des bioréacteurs sont obtenues à environ $5 \text{ mg.g}_{\text{MVS}}^{-1}$ (Figure 3. 11). Celles dans le perméat sont plus faibles que les concentrations en protéines extraites des PEC solubles des bioréacteurs mais cependant des concentrations légèrement plus élevées sont obtenues dans le perméat à 50 jours.

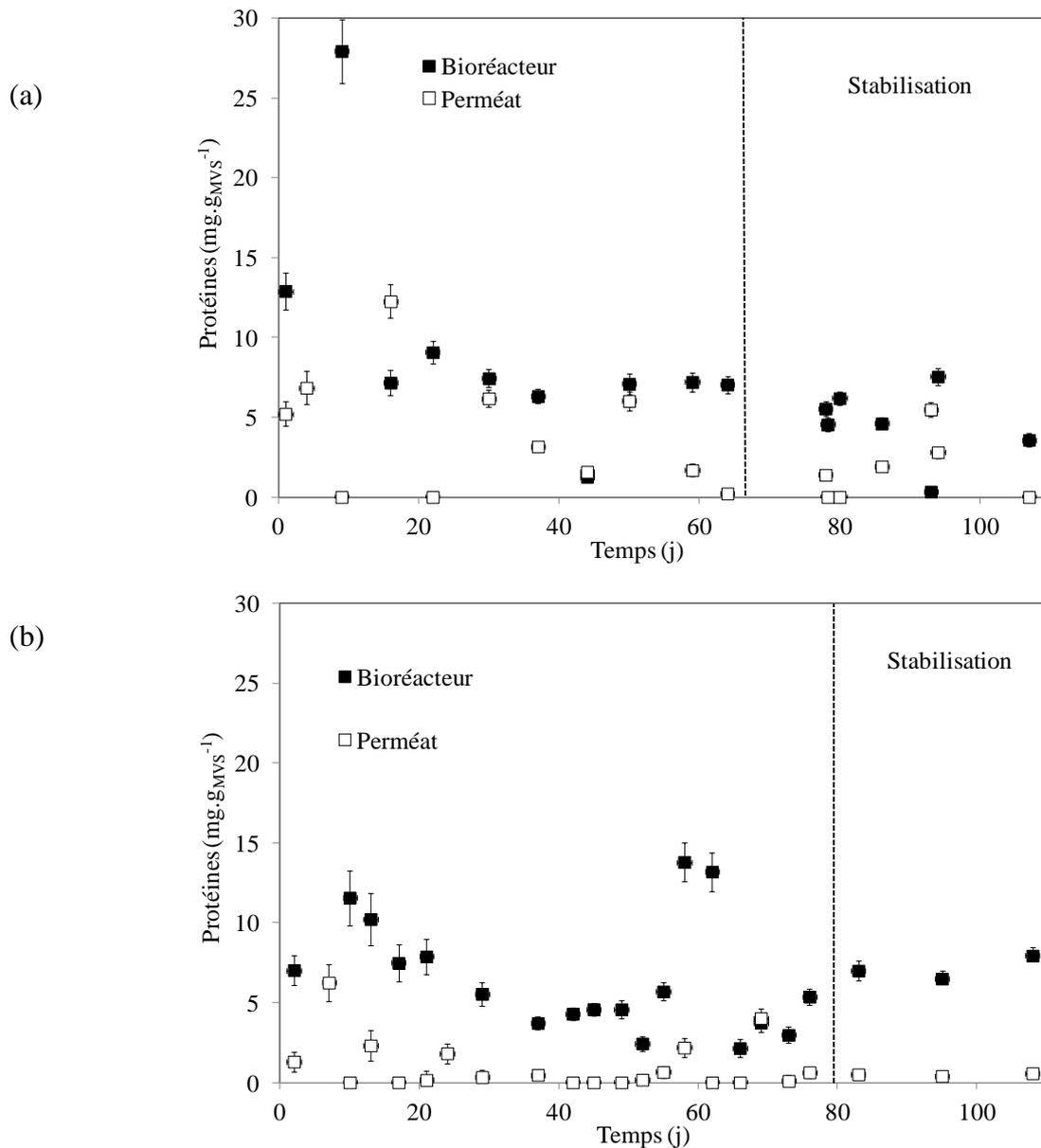


Figure 3.11 : Evolution des concentrations en protéines extraites des PEC solubles dans le bioréacteur et le perméat au cours des acclimations à (a) 20 et (b) 50 jours

Toutefois au début de ces acclimations une augmentation progressive de la concentration en protéines contenues dans les PEC solubles du bioréacteur est mesurée autour du jour 10 pour l'acclimation à 20 jours ($28 \text{ mg.g}_{\text{MVS}}^{-1}$) et pour celle à 50 jours ($12 \text{ mg.g}_{\text{MVS}}^{-1}$). Ce relargage de protéines se produit durant la période de latence des acclimations durant laquelle une importante lyse cellulaire est constatée à cause notamment du changement de conditions hydrodynamiques (recirculation de la biomasse à travers la pompe centrifuge) de la biomasse. La même allure est observée dans le perméat mais à des teneurs en protéines plus faibles que dans le bioréacteur. Une plus grande quantité de protéines de tailles inférieures au

seuil de coupure membranaire (150 kDa) se retrouve dans le perméat. Elles sont liées à l'importante lyse cellulaire constatée par la perte de biomasse pendant cette période et sont sans doute composées des fractions protéiques contenues dans les membranes des cellules microbiennes et dans le matériel intracellulaire.

Un deuxième pic est observé seulement durant la « phase III » à 50 jours (jour 58-61). Pendant cette phase la charge massique est baissée afin de réguler la croissance bactérienne et l'étude des respirations endogènes de la biomasse a révélé un stress de la biomasse pendant cette phase. Cette étape est réalisée un peu plus brutalement qu'au cours de l'acclimatation à 20 jours. Ce qui peut être à l'origine de ce relargage de protéines accru.

Après stabilisation des biomasses, les protéines contenues dans les PEC solubles sont mesurées à une concentration moyenne légèrement supérieure à 50 jours ($6,7 \pm 1,4 \text{ mg.g}_{\text{MVS}}^{-1}$) par rapport à 20 jours dans le bioréacteur ($4,5 \pm 0,4 \text{ mg.g}_{\text{MVS}}^{-1}$). Ces concentrations stables indiquent un fonctionnement stable du Bàm dans les deux cas (Aryal et al., 2009). Dans le perméat, à un TSB de 20 jours des concentrations légèrement supérieures d'environ $1 \text{ mg.g}_{\text{MVS}}^{-1}$ sont mesurées.

Concernant les polysaccharides, des concentrations stables sont obtenues tout au long de la première acclimatation avec des concentrations d'environ $4 \text{ mg.g}_{\text{MVS}}^{-1}$ pour ceux extraits des PEC solubles du réacteur et quasi nulles dans le perméat (Figure 3. 12). Seul un pic est observé dans le réacteur à $7,6 \text{ mg.g}_{\text{MVS}}^{-1}$ au jour 60 de la « phase III » dont la cause doit certainement être la baisse de la Cm qui a généré un stress bactérien.

Au cours de l'acclimatation II, si les concentrations en polysaccharides contenues dans les PEC solubles du bioréacteur sont proches de celles obtenues pendant la première acclimatation autour du jour 40, deux pics majeurs sont observés pendant les « phases I et III ».

Après stabilisation, les concentrations en polysaccharides mesurées dans le bioréacteur à 50 jours sont quatre fois supérieures ($7,8 \pm 1,4 \text{ mg.g}_{\text{MVS}}^{-1}$) à celles obtenues à 20 jours ($2,2 \pm 0,4 \text{ mg.g}_{\text{MVS}}^{-1}$). Aucune concentration n'est détectée dans le perméat à 20 jours et une concentration résiduelle de $1 \text{ mg.g}_{\text{MVS}}^{-1}$ est mesurée à 50 jours.

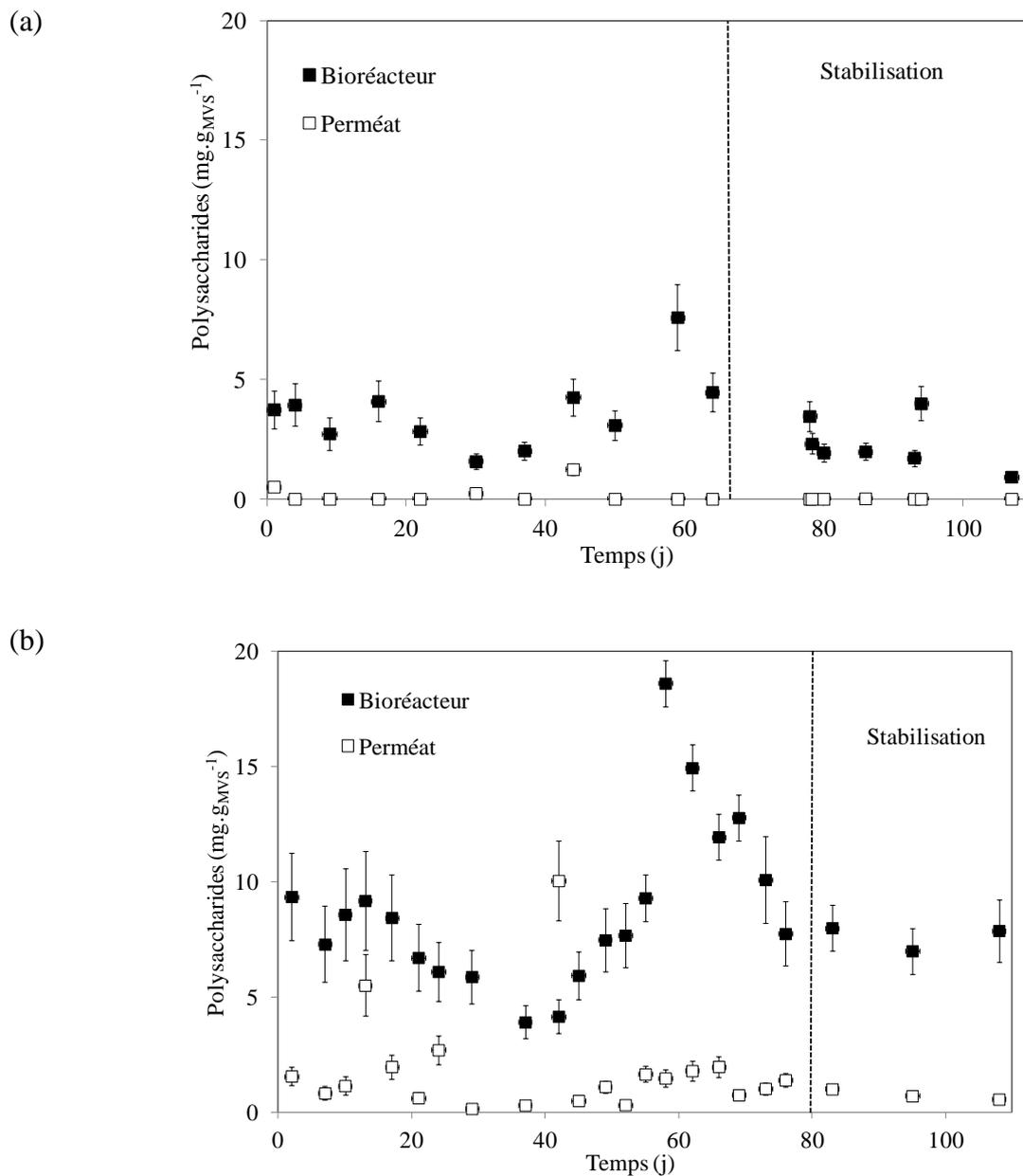


Figure 3. 12 : Evolution des concentrations en polysaccharides extraites des PEC solubles dans le bioréacteur et le perméat au cours des acclimations à (a) 20 et (b) 50 jours

Les substances humiques retrouvées dans les eaux usées proviennent normalement quasi exclusivement de la percolation des eaux à travers les sols. Or dans les PEC solubles du bioréacteur, pendant les deux acclimations des substances humiques sont dosées à des quantités non négligeables (Figure 3. 13).

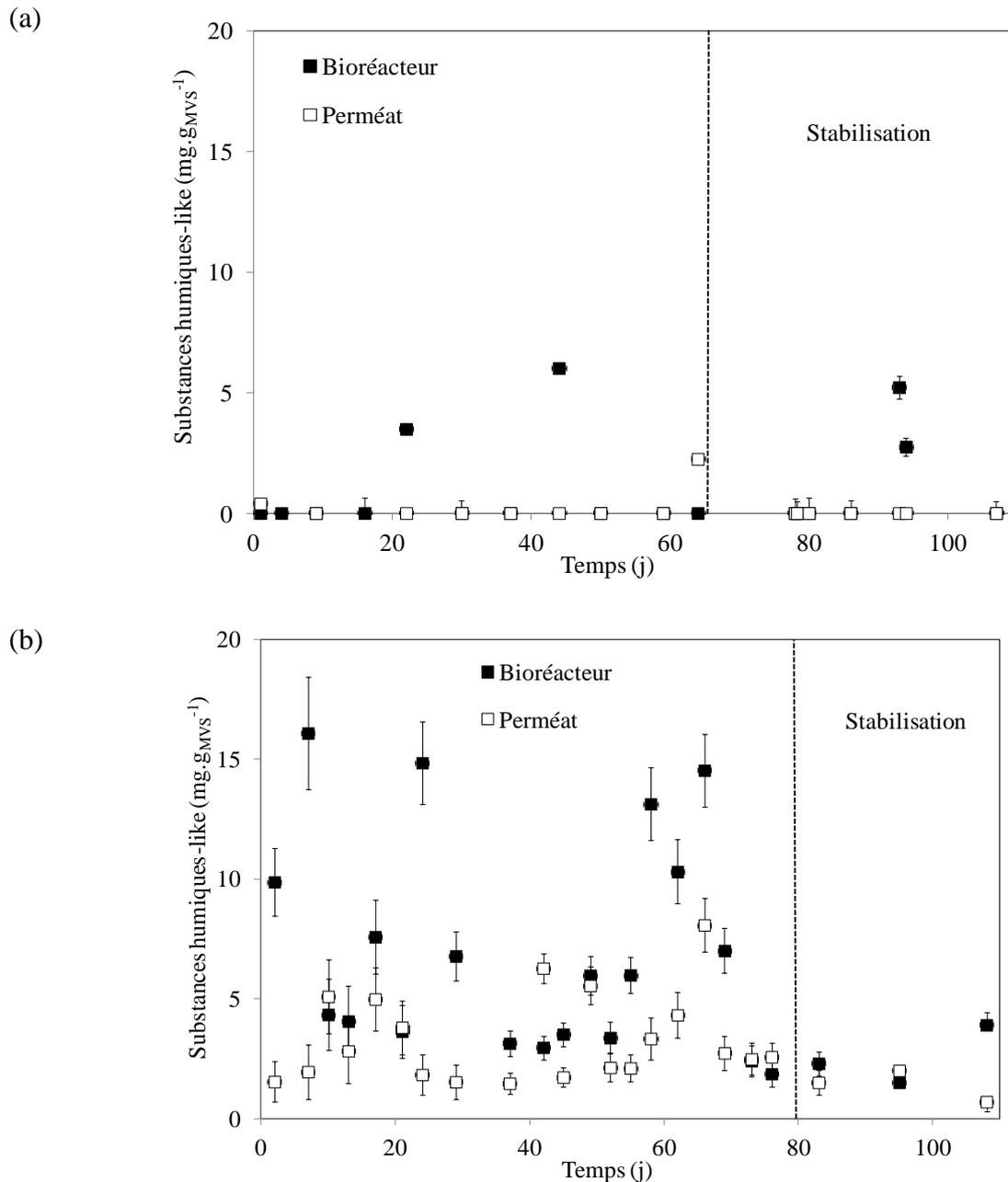


Figure 3. 13 : Evolution des concentrations en substances humiques-like extraites des PEC solubles dans le bioréacteur et le perméat au cours des acclimatations à (a) 20 et (b) 50 jours

Plusieurs auteurs ont également mesurés des substances humiques dans la matrice de polymères extracellulaires entourant les bactéries. Comme ces substances humiques ne proviennent pas du sol, elles sont souvent dénommées « substances humiques-like ». Cette dénomination sera adoptée tout au long du manuscrit.

Elles sont issues des dégradations biologiques et chimiques de molécules organiques de l'environnement et ont subi une repolymérisation (Francioso et al., 2002). Elles sont composées de groupements phénoliques, amines et carboxyliques (Wuertz et al., 2001). Dans les PEC, les substances humiques-like proviennent d'une adsorption ou d'une dégradation des polymères par les micro-organismes.

Les substances humiques-like sont mesurées dans les PEC solubles du bioréacteur à des concentrations très souvent supérieures à celles obtenues dans l'effluent synthétique (résultats montrés dans la partie 5.2.1). Ainsi à la quantité de substances humiques-like provenant de l'effluent vient s'ajouter dans le bioréacteur celle directement issue de la dégradation et/ou de modifications de la matière organique par les micro-organismes. Ces molécules de petites tailles (de quelques kDa, Bourven et al., 2012) sont très peu retenues par la membrane et donc se retrouvent dans le perméat à des concentrations proches de celles obtenues dans le réacteur.

Une différence importante dans la quantité de substances humiques-like des PEC solubles mesurée dans le bioréacteur est constatée au cours de l'acclimatation à 50 jours par rapport à l'acclimatation à 20 jours où des substances humiques-like sont seulement détectées deux fois. Aucun changement n'ayant été effectué dans le protocole de mise au point du substrat ou de gestion du B_àM, cette différence peut être liée au TSB de 20 jours qui est trop faible pour permettre leur fabrication et leur intégration dans les PEC solubles dans des quantités suffisantes pour être détectable à ce TSB par la méthode colorimétrique employée.

A l'état stationnaire, des concentrations moyennes respectivement d'environ 1 et 3 mg.g_{MVS}⁻¹ sont obtenues à 20 et 50 jours.

Ainsi à un TSB de 50 jours, un contenu en PEC solubles ($17,4 \pm 3,3$ mg.g_{MVS}⁻¹) de plus de deux fois supérieur à celui obtenu à 20 jours ($7,6 \pm 1,5$ mg.g_{MVS}⁻¹) est mesuré. Ce résultat montre qu'à charge massique constante, la biomasse s'avère avoir une activité plus élevée à un TSB de 50 jours. Les protéines contenues dans les PEC solubles sont en grande partie composées d'enzymes. L'augmentation de la concentration en protéines dans les PEC solubles et donc de ces enzymes avec l'âge de boues peut expliquer en partie l'augmentation de la vitesse de consommation du substrat par les bactéries.

A 20 jours les protéines sont présentes majoritairement et représentent 59 % de la quantité totale de PEC solubles et à 50 jours ceux sont les polysaccharides majoritaires à 45 %. Cette inversion de constitution en fonction du TSB montre un changement dans le métabolisme bactérien mais également une modification de la composition de la communauté bactérienne présente (Liao et al., 2001). Entre 20 et 50 jours une augmentation du contenu protéique extrait des PEC solubles de 49 % est mesurée alors que la concentration en polysaccharides a augmenté de 255 %. Ainsi avec l'augmentation du TSB, d'une part le substrat semble converti plutôt en polysaccharides qu'en protéines et d'autre part les protéines semblent avoir des cinétiques de dégradation plus rapides que celles des polysaccharides. Cette hypothèse a déjà été avancée par Massé (2004).

3.1.5.2 Caractérisation des PEC solubles par fluorimétrie 3D

L'analyse des matrices 3 dimensions d'excitation et d'émission de fluorescence des PEC solubles extraits du bioréacteur et du perméat (Figure 3. 14) permet de connaître les couples de longueur d'onde d'excitation et émission auxquels il faut se placer pour obtenir une empreinte chromatographique spécifique aux protéines et substances humiques-like par CES avec un détecteur de fluorescence.

Une même dilution par 5 (V/V) est réalisée pour obtenir les matrices présentées dans la figure 3.14. Pour les protéines, un maximum d'intensité est détecté dans la région II caractéristique des protéines associées au tryptophane libre ou lié pour les deux échantillons. Concernant les substances humiques-like ce maximum se situe dans la région V.

Le choix des couples de longueur d'onde d'excitation/émission pour l'analyse des protéines et des substances humiques-like se base sur les matrices obtenues après le passage de plusieurs échantillons des trois compartiments durant les deux acclimatations.

Ces couples de longueur d'onde d'excitation/émission sont fixés à 221 nm/350 nm pour les protéines et 350 nm/440 nm pour les substances humiques-like.

L'analyse de ces matrices permet d'avoir un rapide aperçu de la qualité du perméat ainsi que de sa composition en matière organique et sur le type de molécule retenue par la membrane. La figure 3.14 montre clairement que la quasi-totalité des constituants des PEC solubles du bioréacteur sont arrêtés par la membrane et que le perméat se compose de très faibles résidus

de protéines, substances humiques et fulviques-like. Dans cette étude, cet outil est uniquement utilisé de manière qualitative mais avec un étalonnage adapté, une détermination semi quantitative des différents composants des PEC solubles peut être obtenue à partir des intensités des EEM 3D.

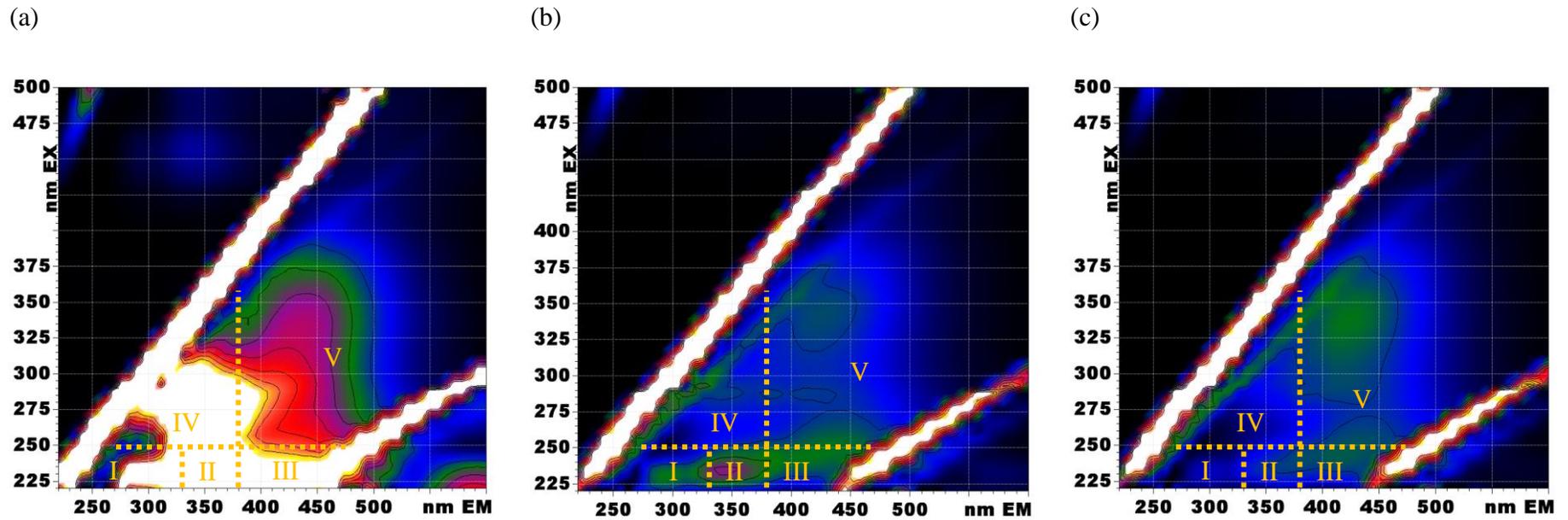


Figure 3. 14 : Exemple de matrices de fluorescence obtenues pour les PEC solubles extrait (a) du substrat, (b) du bioréacteur et (c) du perméat à un TSB de 50 jours

3.1.5.3 Caractérisation des PEC solubles par CES couplée à un détecteur de fluorescence

3.1.5.3.1 Evolution au cours de l'acclimatation

Grâce aux couples de longueurs d'onde d'excitation et d'émission déterminés avec les EEM 3D, les contenus en protéines et substances humiques-like des PEC solubles du bioréacteur et du substrat sont suivis d'abord au cours d'une acclimatation (Figures 3.15 et 3.16). Les chromatogrammes sont obtenus avec la colonne Agilent Bio SEC- 300 Å. Les résultats sont présentés seulement pour l'acclimatation II.

Au jour 2 de l'acclimatation à 50 jours, les protéines sont caractérisées par un pic éluant à 5 mL, un vers 9 mL et un amas de pics situé entre 10 et 15 mL. Après la stabilisation du procédé (jour 90 à un TSB de 50 j), des baisses de fluorescence sont notables pour le pic à 5 mL et pour l'ensemble entre 10 et 15 mL qui subit également une modification du nombre de pics. Un nouveau petit pic apparaît vers 7 mL et il apporte la preuve que des modifications structurales des protéines se sont produites. Ces baisses de fluorescence peuvent être imputables à un changement de conformation des molécules présentes mais également à une baisse de la quantité des protéines. La diminution de la concentration en protéines est prouvée grâce au suivi réalisé dans la partie 3.1.5. Au jour 2, une hydrolyse importante de biomasse s'est produite dans le B_àM à cause des stress générés par le changement de substrat mais également par les forts cisaillements imposés par la pompe centrifuge. Des débris cellulaires et du matériel intracellulaire à forte teneur protéique ont dû être relargués dans le milieu liquide. Ils sont sans doute à l'origine du changement d'empreinte chromatographique entre le jour 2 et le jour 90.

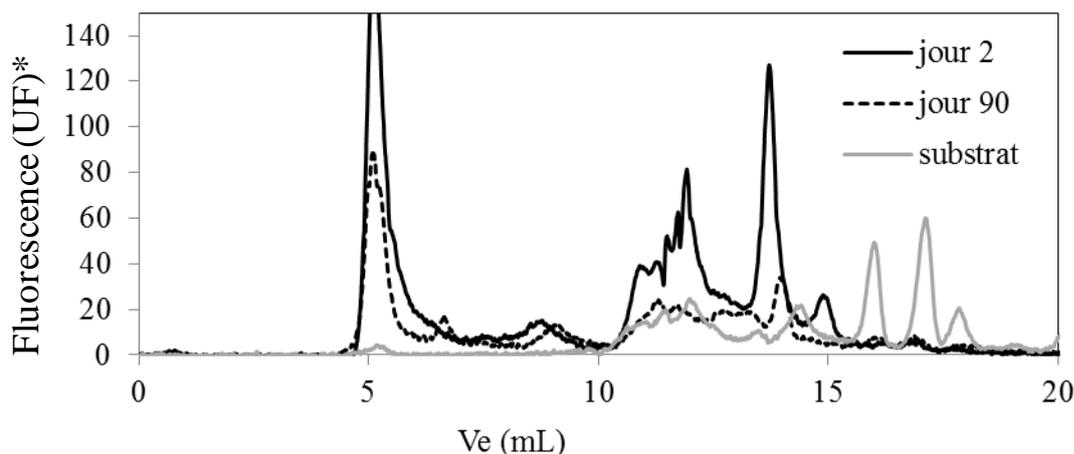


Figure 3. 15 : Evolution de l’empreinte chromatographique par CES des PEC solubles extraits du bioréacteur et du substrat pendant l’acclimatation I à 50 jours avec une détection par fluorescence (221/350 nm spécifique des protéines) *UF : unité de fluorescence

Avec la droite d’étalonnage réalisée avec des protéines pour obtenir les poids moléculaires, la colonne Agilent Bio SEC- 300 Å ne permet de séparer que des molécules ayant des volumes d’élution compris entre 6 et 10 mL et donc avec des masses moléculaires apparentes comprises entre 670 et 13,7 kDa. Or les échantillons sont caractérisés par un pic éluant à un volume plus faible (5 mL) que cette gamme et par un groupe de molécules entre 10 et 15 mL. Pour les grosses molécules à 5 mL, il n’existe pas de colonne permettant leur séparation. Il peut donc juste être dit que leur masse est supérieure à 670 kDa. Ces molécules sont trop grosses pour être des protéines seules, elles correspondent donc à des bio-polymères dont les sous unités seraient un assemblage de protéines de plus petites tailles liées entre elles soit par des forces électrostatiques, hydrophobes ou des pontages liés au cation Ca. De plus le substrat se compose uniquement de petites molécules éluant après 10 mL (hors gamme de la colonne). Ainsi les bio-polymères se forment dans le Bàm.

La littérature a mis en évidence l’existence de ces ensembles de bio-polymères qui sont bien plus gros que les molécules organiques constitutives des PEC solubles (Sun et al., 2008 ; Sun et al., 2011 ; Johir et al., 2012). Les bio-polymères qui ont des tailles s’approchant de petits floccs de biomasse diffèrent de ceux-ci par leur composition. Ils sont surtout constitués de polymères alors que les floccs sont riches en micro-organismes.

Pour les molécules dont les volumes d'éluion se trouvent entre 10 et 15 mL, la colonne Agilent Bio SEC- 100 Å sera par la suite utilisée pour attribuer des masses moléculaires apparentes à un maximum de ces molécules situées dans la gamme de séparation. Une partie de ces protéines semble provenir du substrat (10-13 mL) étant donné la similitude des empreintes ainsi que leur intensité dans cette gamme. En revanche les pics sortant après 15 mL pour le substrat ne sont pas retrouvés dans le bioréacteur. Une recombinaison de ces petites molécules avec la matière organique du bioréacteur a sans doute lieu.

En ce qui concerne les substances humiques-like, le même profil chromatographique est obtenu entre les jours 2 et 90 avec des volumes d'éluion compris entre 10 et 15 mL et une forte baisse de la fluorescence. Ces pics sont identiques à ceux obtenus dans le substrat. Toutes les molécules contenues dans les PEC solubles du bioréacteur et du substrat sont de très petites tailles et éluent quasiment toutes après le volume de perméation totale de la colonne Agilent Bio SEC- 300 Å (11,5 mL). Cette colonne n'est pas adaptée pour la séparation des substances humiques car elle permet de distinguer des grosses molécules dont la masse moléculaire apparente se trouve entre 670 et 13,7 kDa.

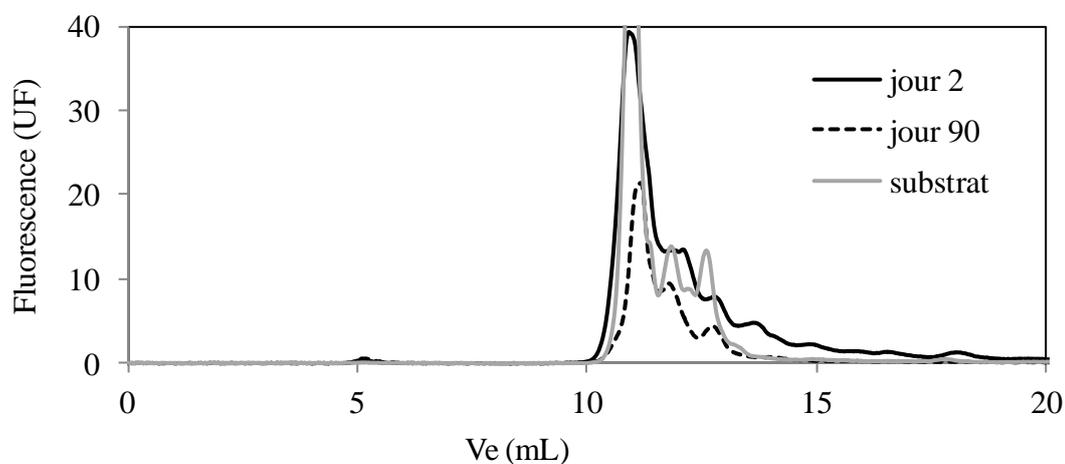


Figure 3. 16 : Evolution de l'empreinte chromatographique par CES des PEC solubles extraits du bioréacteur et du substrat pendant l'acclimatation à 50 jours avec une détection par fluorescence (350/440 nm spécifique des substances humiques-like)

Ainsi toutes ces substances humiques-like de petites tailles sortent en même temps de la colonne modifiant l'empreinte chromatographique et la rendant inexploitable. C'est pourquoi par la suite les substances humiques-like ne seront séparées que par la colonne Agilent Bio

SEC- 100 Å permettant une distinction des molécules dont la masse moléculaire se situe dans la gamme 0,2-13 kDa.

3.1.5.3.2 Evolution en fonction de l'âge de boues

A partir des empreintes chromatographiques (Figures 3.15 et 3.16) et des droites d'étalonnage réalisées avec des protéines étalons et des polymères de sulphonate de polystyrène pour les substances humiques-like, des masses moléculaires apparentes sont attribuées aux pics éluant dans la même gamme que les étalons (Tableau 3. 1). Dans le cas des protéines certaines masses sont données après passage au travers de la colonne permettant de séparer les molécules de hauts poids moléculaires (Agilent Bio SEC- 300 Å), les plus petites sont déterminées avec la colonne Agilent Bio SEC- 100 Å.

Deux différences majeures sont constatées entre les protéines extraites des PEC solubles du bioréacteur à un TSB de 20 et 50 jours (Figure 3. 17). La première provient d'une différence de fluorescence du pic situé vers 5mL et attribuée aux bio-polymères (masse > 670 kDa). Ce pic est plus intense à un TSB de 20 jours qu'à 50 jours. Plusieurs hypothèses peuvent expliquer cette différence. Les bio-polymères ont pu changer de structure entre les deux âges de boues, ils sont peut-être biodégradés au profit de molécules plus petites ou ils sont tout simplement plus abondants à 20 jours.

La deuxième différence se trouve au niveau de l'apparition d'un groupe de pics entre 12 et 15 mL pour un âge de boues de 50 jours qui correspond à l'élution de protéines de petites tailles (< 0,4 kDa) absentes à 20 jours. L'apparition de ces petites molécules est sans doute liée au métabolisme bactérien. Un parallèle peut être fait entre la disparition du pic correspondant aux bio-polymères et l'apparition de ces petites molécules à 50 jours. Dans la partie 3.1.4 sur l'évolution de l'activité biologique il est montré que les bactéries dégradent le substrat plus rapidement. Or pour accélérer la dégradation du substrat, les bactéries ont sans doute produit plus d'enzymes qui ont peut-être dégradé en partie ces bio-polymères. Shin et al., (2003) confirment qu'avec l'allongement du TSB de 40 à 80 jours, la proportion de molécules de petites tailles (<1 kDa) augmente au détriment des molécules de taille comprise entre 30 et 100 kDa et supérieure à 100 kDa et que ce phénomène est dû à la dégradation des PMS par les bactéries.

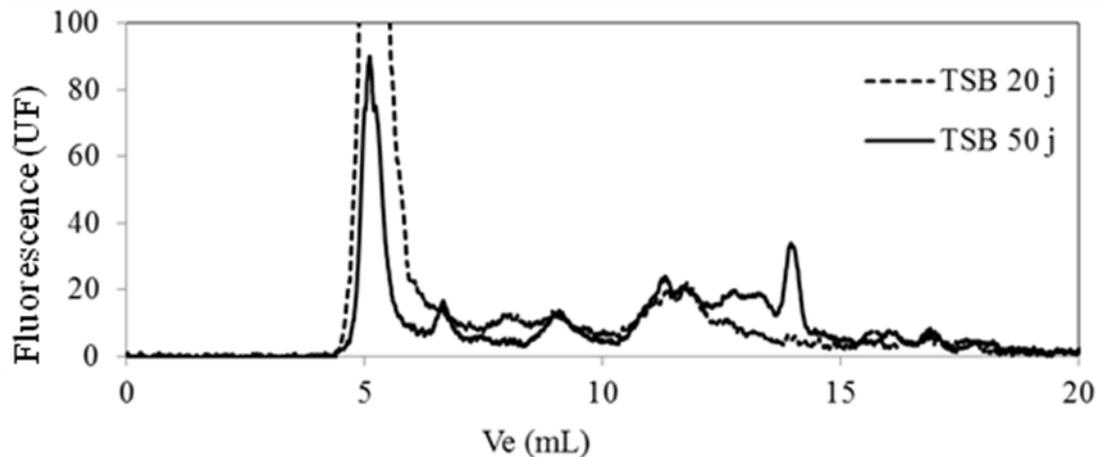


Figure 3. 17 : Influence du TSB sur l’empreinte chromatographique par CES des PEC solubles extraits du bioréacteur avec une détection par fluorescence (221/350 nm)

La comparaison des chromatogrammes au couple de longueurs d’onde spécifiques des substances humiques-like du substrat avec ceux des biomasses stabilisées révèle des distinctions dans la position des pics, leur intensité ainsi que leur nombre. Autant de différences qui permettent de dire que les substances humiques-like du substrat subissent des transformations dans le bioréacteur (recombinaison, biodégradation).

Concernant l’évolution des substances humiques-like avec le TSB, de nombreuses différences sont visibles tant en terme de nombre de pics que de fluorescence (Figure 3. 18). L’empreinte chromatographique des substances humiques-like extraites des PEC solubles du bioréacteur à un TSB de 50 jours se compose de trois pics entre 9 et 10 mL (1,9 kDa ; 1,6 kDa ; 1,2 kDa) ainsi que de six autres pics après 10 mL (<0,9 kDa) avec des fluorescences très faibles. L’empreinte caractérisant les substances humiques-like à 20 jours se décompose également en trois pics situés entre 9 et 10 mL avec des volumes d’élution différents de ceux obtenus à 50 jours (2,1 kDa ; 1,4 kDa ; 1, 2 kDa) et de cinq autres pics après 10 mL (<0,9 kDa) avec des fluorescences plus fortes qu’à 50 jours. Ces molécules, apparentées à des substances humiques étant donné qu’elles sont détectables par dosage colorimétrique, ne sont que très rarement étudiées dans le cas du traitement par Bàm d’un effluent synthétique. Cependant vu leur petites tailles, elles peuvent participer aux différents mécanismes du colmatage membranaire par adsorption sur la membrane ou dans les pores de celle-ci à leur état natif ou en se réarrangeant avec d’autres polymères pour former des structures plus grosses.

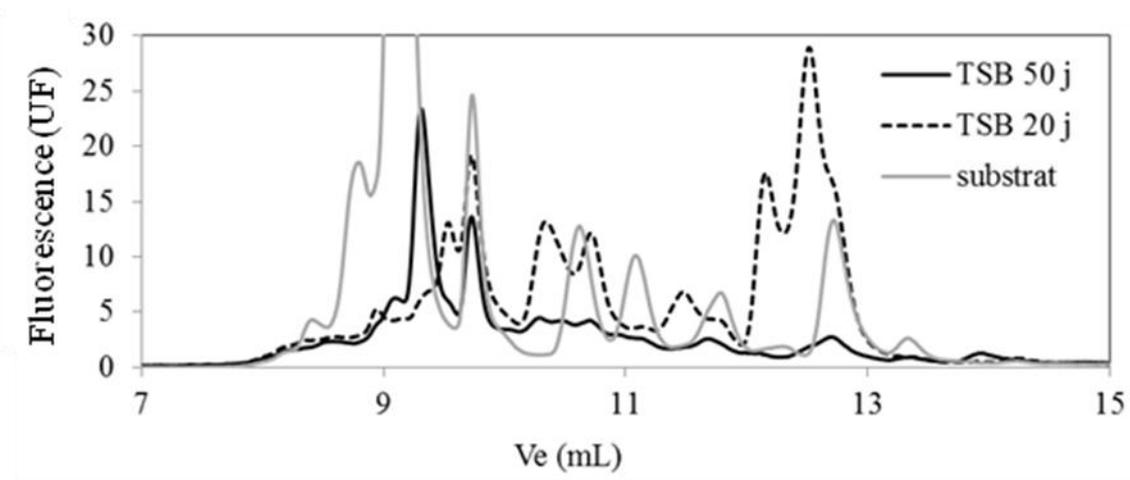


Figure 3. 18 : Influence du TSB sur l’empreinte chromatographique par CES des PEC solubles extraits du bioréacteur avec une détection par fluorescence (350/440 nm) –Empreinte chromatographique du substrat

L’utilisation récente des EEM 3D révèle très bien la présence de substances humiques-like lors du traitement par BâM d’un effluent synthétique (Aryal et al., 2009 ; Kimura et al., 2009).

Grâce à l’analyse des EEM 3D des PMS issus de trois BâM dont les âges de boues sont fixés à 17, 51 et 102 jours, Kimura et al., (2009) aboutissent également à la conclusion selon laquelle les caractéristiques des PMS varient énormément avec l’âge de boues. A 17 jours, le pic le plus intense se situe dans la zone des protéines-like alors qu’à 102 jours il se trouve plutôt vers les substances humiques-like. En utilisant une analyse des monosaccharides, durant la même expérience ils montrent une variation de la distribution des monosaccharides présents en fonction du TSB.

Tableau 3. 1 : Masses moléculaires apparentes des protéines et substances humiques-like extraites des PEC solubles du Bàm stabilisé à 20 ou 50 jours

Protéines		
Type de colonne	300 Å	100 Å
Agilent Bio SEC		
20 jours	>670 kDa ; 123 kDa ; 41 kDa	1,1 kDa ; 0,6 kDa ; 0,5 kDa
50 jours	>670 kDa ; 330 kDa ; 41 kDa	2,5 kDa ; 1,3 kDa ; 1,1 kDa ; <0,4 kDa (2 pics)
Substances humiques-like		
Type de colonne	100 Å	
Agilent Bio SEC		
20 jours	2,1 kDa ; 1,4 kDa ; 1, 2 kDa ; <0,9 kDa (5 pics)	
50 jours	1,9 kDa ; 1,6 kDa ; 1,2 kDa ; <0,9 kDa (6 pics)	

Grâce à cette méthode couplant l'analyse des PEC solubles par EEM 3D et par CES avec une détection de la fluorescence, les masses moléculaires apparentes des différentes fractions de protéines et substances humiques-like peuvent être données avec plus de précision qu'avec les différentes méthodes ne permettant l'accès qu'à une gamme de masses moléculaires (Huang et al., 2001 ; Shin et Kang., 2003 ; Liang et al., 2007). En revanche avec cette méthode les tailles des différentes fractions de polysaccharides ne sont pas mesurées. Jang et al., (2007) montrent que les polysaccharides d'un Bàm_I traitant un effluent réel ont une distribution bimodale qui se répartie entre des tailles supérieures à 10 kDa et inférieures à 1 kDa. Shen et al., (2012) confirment cette distribution bimodale mais la fraction de haut poids moléculaire se trouve au-dessus de 100 kDa.

3.1.6 Colmatage membranaire

Les PEC solubles issus de l'activité biologique et du substrat sont impliqués dans le colmatage des membranes. Leur caractérisation dans la partie 3.1.5 a mis en évidence des différences en termes de composition, de quantité mais également de distribution de masses moléculaires apparentes au cours de l'acclimatation et en fonction de l'âge de boues.

A l'aide du suivi de la perméabilité des membranes, de la caractérisation des fractions de PEC solubles retenues par les membranes et de la détermination des masses moléculaires apparentes des fractions colmatantes, le colmatage est caractérisé au cours des acclimatations et l'influence de l'âge de boues à charge massique constante sur le colmatage est déterminé.

3.1.6.1 Rétention membranaire des PEC solubles

La rétention totale des PEC solubles est sensiblement meilleure à un TSB de 50 jours (Tableau 3. 2) avec 82 % des molécules retenues contre 76 % à 20 jours. Cependant la concentration totale en PEC solubles à 50 jours est plus de deux fois supérieure à celle obtenue à 20 jours (Figure 3. 19).

Le perméat change de composition avec l'âge de boues puisqu'il est deux fois plus concentré en PEC solubles à 50 jours ($3,2 \text{ mg} \cdot \text{g}_{\text{MVS}}^{-1}$) qu'à 20 jours ($1,9 \text{ mg} \cdot \text{g}_{\text{MVS}}^{-1}$). Les polysaccharides qui sont retenus à 100 % à un TSB de 20 jours constituent 30 % du perméat à 50 jours.

Ce résultat de changement de composition du perméat en fonction de l'âge de boues est en accord avec les travaux de Kimura et al., (2009) qui montrent que les caractéristiques des PMS extraits du surnageant du bioréacteur et de la surface membranaire sont différentes et évoluent avec le TSB. Il est donc tout à fait logique d'obtenir des variations de compositions du perméat.

La concentration plus élevée de PEC solubles du perméat à 50 jours permet d'expliquer la rétention de la DCO légèrement inférieure à 50 jours (96 %) par rapport à 20 jours (99 %). Toutes les molécules composant les PEC solubles sont de nature organique et sont donc également dosées lors de la mesure de DCO du perméat. Le rendement d'élimination de la DCO se faisant par un bilan de matière entre le substrat et le perméat, cela explique la différence de rendement obtenue. Ainsi les bactéries hétérotrophes dégradent aussi efficacement et totalement la DCO à un TSB de 20 ou 50 jours ; la différence est attribuée à la concentration en PEC solubles plus élevée dans le perméat à 50 jours. Jang et al., (2007) confirment cette hypothèse et montrent que 83 à 91 % de la DCO détectée dans le perméat provient des protéines et polysaccharides détectés dans celui-ci.

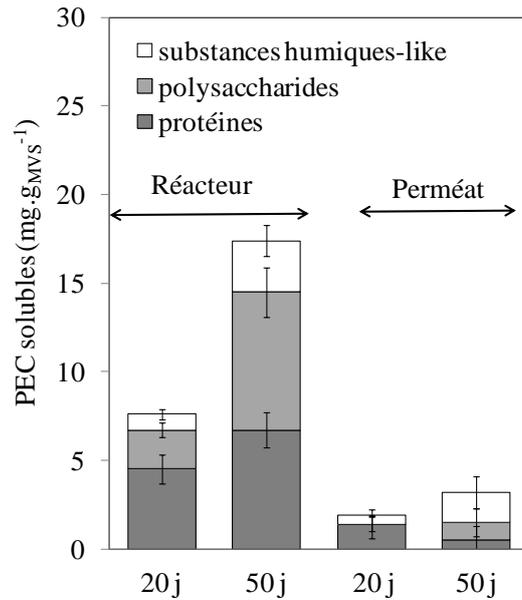


Figure 3. 19 : Evolution des concentrations en protéines, polysaccharides et substances humiques-like du bioréacteur et du perméat à un TSB de 20 et 50 jours

Une inversion du type de molécules majoritairement retenu par l'ensemble membrane et dépôt se produit en fonction du TSB. Si les protéines sont majoritairement retenues à 50 jours ce sont les polysaccharides à 20 jours.

Les substances humiques-like en raison de leurs petites tailles mesurées dans la partie 3.1.5 ne sont retenues qu'à hauteur d'environ 40 % par la membrane pour les deux TSB.

Tableau 3. 2 : Evolution des rétentions totales et spécifiques des PEC solubles avec le TSB

TSB (j)	Rétention totale (%)	Rétention PN* (%)	Rétention PS* (%)	Rétention SH* (%)
20	76 ± 3	71 ± 3	100	44 ± 2
50	82 ± 2	93 ± 1	87 ± 2	41 ± 1

*PN : protéines ; PS : polysaccharides ; SH : substances humiques-like

La forte rétention des polysaccharides pour les deux âges de boues indique que la plupart de ces molécules doit avoir une taille supérieure au seuil de coupure de la membrane soit 150 kDa. Ce résultat va à l'encontre de ceux obtenus par Garnier et al., (2005) qui annoncent que les polysaccharides extraits de PEC de BA de diverses origines caractérisés par CES ne dépassent pas les 1 kDa.

3.1.6.2 Masses moléculaires des fractions colmatantes

Avec les empreintes chromatographiques des protéines extraites des PEC solubles du bioréacteur et du perméat à 20 et 50 jours (Figure 3. 20), les masses moléculaires apparentes des fractions protéiques colmatantes sont déterminées.

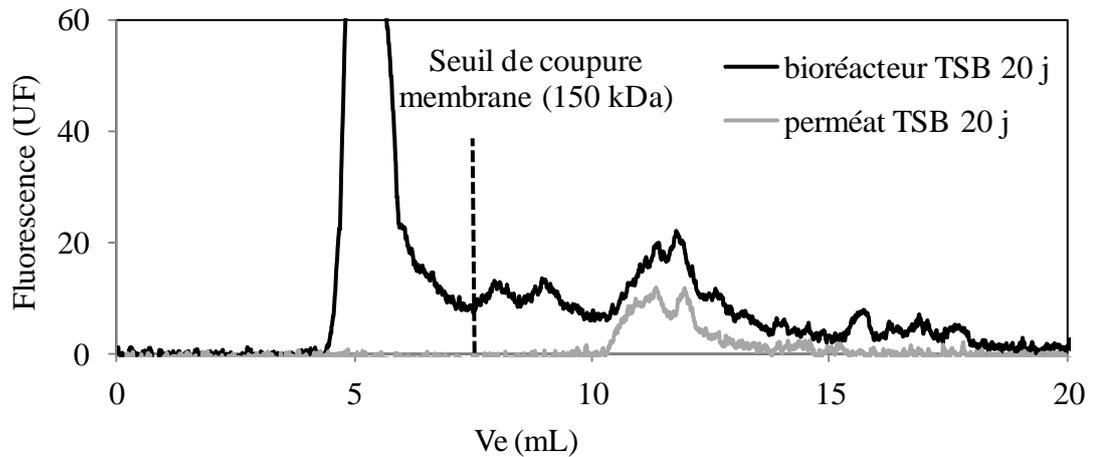
Le seuil de coupure de la membrane est de 150 kDa, ainsi aux deux TSB les bio-polymères de masses moléculaires apparentes >670 kDa sont entièrement arrêtés par la membrane. La fraction qui a une masse de 330 kDa à 50 jours est également stoppée.

Ensuite toutes les fractions protéiques restantes dans les PEC solubles du bioréacteur ont des masses moléculaires apparentes inférieures au seuil de coupure de la membrane. Cependant les molécules de tailles comprises entre 150 kDa et 13 kDa sont aussi totalement arrêtées par la barrière membranaire. Ainsi à 20 jours les molécules de 123 kDa et 41 kDa, qui sont également présentes à 50 jours, sont retenues par l'ensemble membrane et dépôt.

Toutes les autres petites molécules de tailles inférieures à 3 kDa sont partiellement retenues par la membrane car une baisse de la fluorescence des pics correspondants à ces fractions est constatée sur les chromatogrammes.

La fraction protéique du perméat se compose donc pour les deux âges de boues exclusivement de protéines avec des masses moléculaires apparentes inférieures à 3 kDa. Ce résultat confirme celui de Jang et al., (2007) qui montrent que 81 % des protéines et des polysaccharides contenues dans le perméat ont une taille inférieure à 1 kDa.

(a)



(b)

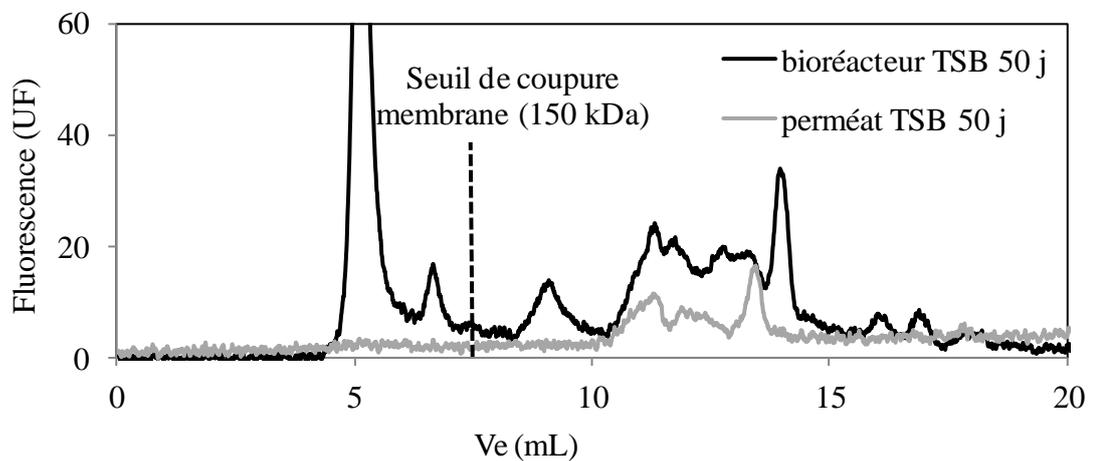


Figure 3. 20 : Chromatogrammes des protéines extraites des PEC solubles du bioréacteur et du perméat à (a) 20 jours et (b) 50 jours

Pour les substances humiques-like, toutes les molécules détectées dans le bioréacteur aux TSB de 20 et 50 jours ont des tailles très inférieures au seuil de coupure de la membrane (<3 kDa) (Tableau 3. 1). Aux deux âges de boues, seule une faible baisse de la fluorescence est constatée entre les chromatogrammes des substances humiques-like du bioréacteur et du perméat. Les substances humiques-like détectées dans le perméat à 20 et 50 jours sont donc composées de fractions de tailles inférieures à 3 kDa.

Les bio-polymères sont selon plusieurs auteurs la fraction la plus colmatante des PEC solubles (Johir et al., 2012 ; Shen et al., 2012). Leur présence dans le bioréacteur est clairement liée au procédé de Bàm. Johir et al., (2012) ont comparé le surnageant de deux bioréacteurs : l'un avec une membrane et l'autre sans. Celui opérant sans membrane possède une concentration supérieure de bio-polymères de 1,3 à 4 mg.L⁻¹ par rapport au réacteur avec la membrane et les bio-polymères sont absents du perméat (<0,02 mg.L⁻¹). Par cette expérience les auteurs confirment que la majeure partie des bio-polymères est retenue par la membrane et qu'ils causent un sévère colmatage à la membrane qui est amplifié avec notamment l'agrégation de molécules organiques plus petites telles que les substances humiques-like. Sun et al., (2011) définissent leur Bàm_I comme un système fermé qui concentre les molécules organiques colmatantes dans le bioréacteur. Cela résulte en une transformation des PMS en amas de bio-polymères qui permettent la formation d'un gâteau à la surface membranaire.

Shen et al., (2010) ont montré que le colmatage initial des membranes est plus lié au blocage des pores qu'aux phénomènes d'adsorption. Ils incriminent en particulier les bio-polymères qui ont des tailles comparables aux pores de la membrane. Ils ne négligent pas pour autant les petites molécules qui participent à la baisse du flux de perméat à long terme par adsorption sur ou dans les pores de la membrane.

Aryal et al., (2009) ont une interprétation différente de l'établissement du colmatage. Ils ont montré que la composition de la couche colmatante à la surface de la membrane évolue avec le temps. Pendant les neuf premiers jours de la filtration, les fractions colmatantes sont surtout composées de substances à faibles masses moléculaires alors qu'à plus long terme (entre neuf et vingt jours) un plus grand nombre de bio-polymères constitue cette couche.

3.1.6.3 Evolution de la perméabilité membranaire

L'évolution de la perméabilité normée des membranes peut comme pour l'évolution des MVS se décomposer en trois phases distinctes suivies d'une étape de stabilisation (Figure 3. 21)

Après une perte quasi instantanée de perméabilité associée à la filtration de biomasse et à la mise en place du colmatage irréversible (Cho et Fan, 2002), une augmentation de la perméabilité normée est obtenue sur les deux acclimations pendant les dix premiers jours.

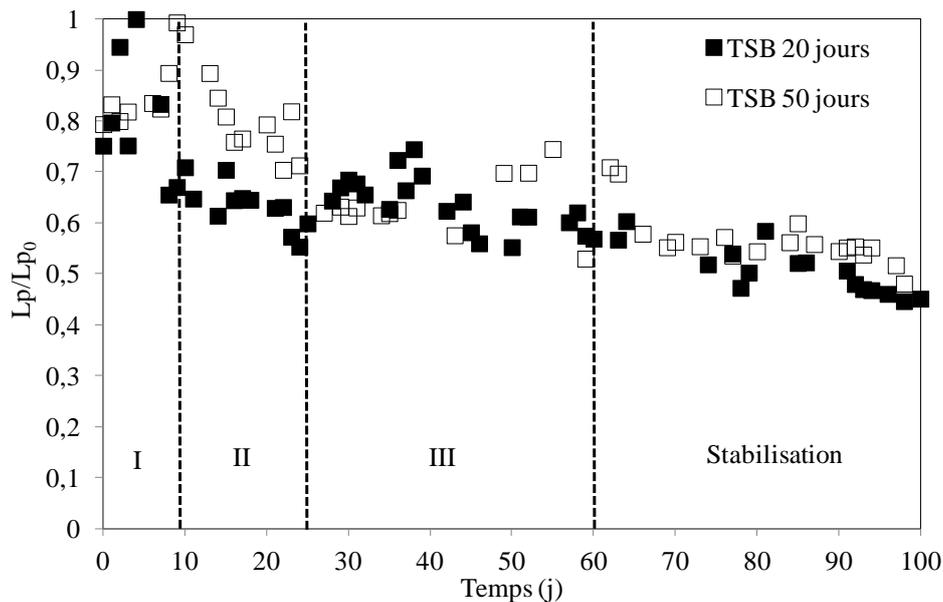


Figure 3. 21 : Evolution de la perméabilité normée des membranes pendant les acclimations à 20 et 50 jours

Ces dix premiers jours de la « phase I » sont caractérisés par une lyse cellulaire importante avec certes un relargage important de protéines et de polysaccharides mais également avec une importante chute des MVS (baisse de 30 % de la concentration en MVS à 20 jours et 44 % à 50 jours après un jour dans le réacteur). Avec un milieu réactionnel beaucoup moins concentré en biomasse et avec une viscosité apparente plus faible pour le même flux de perméat, la PTM à appliquer se trouve être plus faible (annexe A.3).

La « phase II » correspond à la phase exponentielle de croissance de la biomasse ainsi avec l'augmentation de la concentration en MVS, la perméabilité normée chute. La « phase III » se caractérise par une régulation de la croissance bactérienne effectuée en baissant la C_m et en la

stabilisant à $0,2 \text{ kg}_{\text{DCO}} \cdot \text{kg}_{\text{MVS}}^{-1} \cdot \text{j}^{-1}$. Pendant cette phase, la perméabilité normée augmente à cause de la chute des MVS liée à la baisse de la C_m puis la perméabilité normée diminue progressivement entre la fin de cette phase et l'étape de stabilisation.

La perméabilité normée est donc influencée par l'évolution de la concentration en MVS du bioréacteur ; la perméabilité normée subit une baisse quand la concentration en MVS augmente (Figure 3. 22).

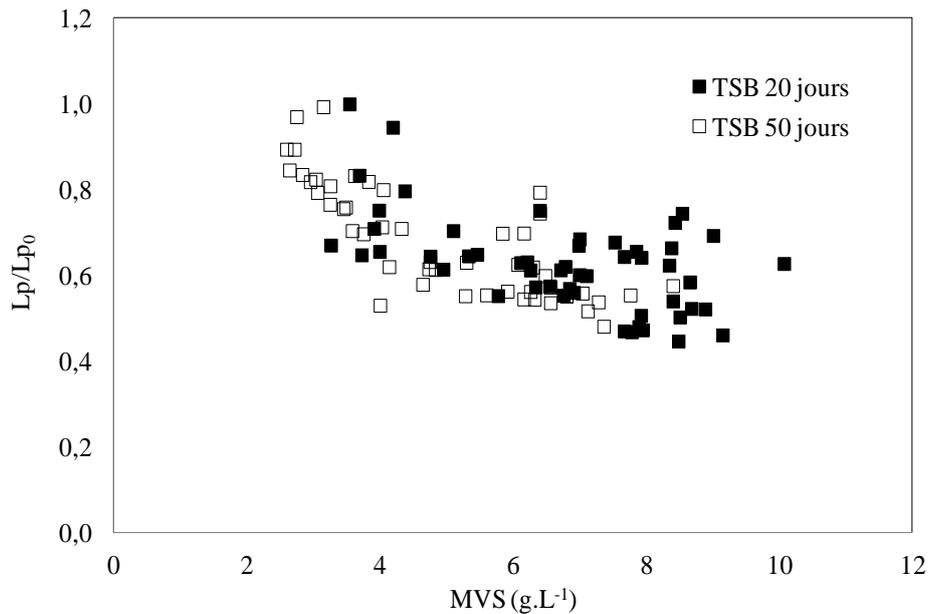


Figure 3. 22 : Evolution de la perméabilité normée en fonction de la concentration en MVS à 20 et 50 jours

Après stabilisation à un TSB spécifique, l'évolution de la perméabilité normée est identique.

Le colmatage membranaire est principalement limité par l'application d'une vitesse de recirculation élevée comprise entre $3,5$ et $4 \text{ m} \cdot \text{s}^{-1}$. Dans ces conditions, les différences de quantités et de tailles des différentes fractions de PEC solubles obtenues aux deux âges de boues testés n'ont pas modifié l'établissement du colmatage.

3.2 Comparaison des deux acclimations

3.2.1 Choix d'un âge de boues

Au travers des deux acclimations réalisées et stabilisées à un TSB de 20 et 50 jours, le but est de caractériser les performances des deux BâM à l'état stationnaire et de déterminer le TSB qui semble être le plus approprié dans les conditions de l'étude. La charge massique étant fixée à $0,2 \text{ kg}_{\text{DCO}} \cdot \text{kg}_{\text{MVS}}^{-1} \cdot \text{j}^{-1}$ dans les deux cas, les divers changements constatés sur l'ensemble du procédé peuvent être directement reliés à l'âge de boues.

Les deux BâM sont stabilisés à des concentrations en MVS de $8,2 \pm 0,7$ et $7,0 \pm 0,7 \text{ g}_{\text{MVS}} \cdot \text{L}^{-1}$ pour des âges de boues respectifs de 20 et 50 jours. La vitesse de production de boues est de $0,42 \text{ kg}_{\text{MVS}} \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{j}^{-1}$ à 20 jours et de $0,12 \text{ kg}_{\text{MVS}} \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{j}^{-1}$ à 50 jours. La boue en excès restant un déchet coûteux à éliminer par les stations d'épuration, le fonctionnement à un âge de boues élevé reste plus avantageux de ce point de vue.

L'étude des activités exogènes spécifiques de la biomasse révèle qu'à charge massique fixe, l'activité exogène spécifique des hétérotrophes à 50 jours se maintient voire dépasse légèrement celle obtenue à 20 jours pour une épuration stable de la DCO supérieure à 90 %. Des ajouts croissants en substrat (concentration supérieure à $0,04 \text{ g}_{\text{substrat}} \cdot \text{g}_{\text{MVS}}^{-1}$) montrent que la biomasse acclimatée à 50 jours possède une consommation d'oxygène supérieure pour dégrader la même quantité de substrat. Ce résultat indique donc une accélération de la consommation du substrat à 50 jours.

L'activité exogène spécifique des autotrophes augmente également avec l'âge de boues et l'élimination de l'ammonium augmente avec le TSB pour arriver à $77 \pm 4 \%$ à 50 jours. Toutefois ces rendements d'élimination en ammonium ainsi que les activités exogènes spécifiques des autotrophes assez basses suggèrent une carence dans la composition de l'effluent synthétique (carbone inorganique) et/ou comme le proposent Clouzot et al., (2011) un problème d'adaptation des autotrophes aux conditions cisailantes dans ce type de BâM.

La composition des PEC solubles relargués dans le surnageant du bioréacteur montre une évolution en fonction du TSB et donc liée au métabolisme bactérien. Au-delà de l'aspect quantitatif qui révèle une augmentation de la concentration en PEC solubles dans le

bioréacteur entre 20 ($7,6 \pm 1,5 \text{ mg.g}_{\text{MVS}}^{-1}$) et 50 jours ($17,4 \pm 3,3 \text{ mg.g}_{\text{MVS}}^{-1}$), une inversion du constituant majeur des PEC solubles est mesurée. Les protéines sont majoritaires à 59 % à 20 jours alors que ceux sont les polysaccharides à 45 % à 50 jours. Avec l'augmentation du TSB, la biomasse semble d'une part convertir le substrat préférentiellement en polysaccharides et d'autre part dégrader plus rapidement les protéines que les polysaccharides.

Les masses moléculaires apparentes des protéines et substances humiques-like caractérisées, révèlent des variations dans les hauts poids moléculaires ($>100 \text{ kDa}$) pour les protéines mais également dans les très petits ($<3 \text{ kDa}$) pour les protéines et les substances humiques-like en fonction du TSB. Ces variations de compositions et de tailles des PEC solubles du bioréacteur affectent directement les caractéristiques du perméat et son liées au métabolisme bactérien. La plus grande fraction de protéines de petites tailles semble due à leur dégradation par les bactéries.

Malgré tous ces changements quantitatifs et structurels des PEC solubles, aucun impact n'est mis en évidence sur l'évolution du colmatage au cours des deux expériences.

Ainsi, aux vues des résultats, il semblerait plus judicieux de se placer à un âge de boues de 50 jours pour garantir notamment une élimination de la DCO et de l'ammonium maximale ainsi qu'une production de boues plus faible.

Dans les procédés de traitement des eaux usées, il n'est pas rare que la biomasse se retrouve dans des conditions non stationnaires à cause de variations journalières, saisonnières ou accidentelles de la charge et du débit d'effluent à traiter. Ces conditions opératoires instables peuvent détériorer la qualité des floccs bactériens, faire varier les activités microbiennes et les performances du traitement (Sponza, 2003 ; Jang et al., 2007). La quantité de PEC est sensible aux variations des conditions environnementales comme la charge organique, les conditions aérobie et anaérobie (Sheng et al., 2010) et peut donc altérer la qualité de l'effluent de sortie ainsi que le colmatage.

La partie ci-après vise à caractériser pendant les trois mêmes situations stressantes, les performances ainsi que le colmatage des Bàm stabilisés à deux âges de boues différents et de

comparer le comportement et la réactivité des biomasses hétérotrophes et autotrophes face à ces dysfonctionnements.

3.2.2 Influence de situations stressantes

3.2.2.1 Evaluation des performances des biomasses

Trois situations stressantes sont simulées pour déterminer leur impact sur les caractéristiques de la biomasse en fonction de l'âge de boues. Les trois stress générés correspondent à une variation significative de la charge organique de l'effluent d'entrée (baisse et hausse de la charge massique) pouvant se produire avec les variations saisonnières, de fortes pluies, des déversements de pollution accidentelles et pour le dernier stress lors d'une coupure d'électricité dans la station d'épuration (coupure de l'aération du bassin biologique et absence d'alimentation en substrat).

Les stress sont provoqués dans le même ordre pour les deux biomasses stabilisées à 20 ou 50 jours avec une période de dix jours entre chaque stress pour revenir à la stabilité du procédé en termes de production de boues, de rendements épuratoires en ammonium et DCO et d'activités biologiques.

Le premier stress est une baisse de la C_m de 50 % pendant une journée. Le deuxième est une hausse de la C_m de 400 % pendant une journée également. Le dernier correspond à une coupure d'air et de substrat pendant 24 h. Pour les deux stress touchant la C_m , le ratio C/N/P est maintenu identique à celui imposé au cours des deux acclimatations (*i.e.* 100/10/2).

Pour évaluer l'effet de chaque stress sur les performances des B_àM, les taux d'élimination en DCO et ammonium, les activités spécifiques exogènes et endogènes des bactéries autotrophes et hétérotrophes ainsi que les MVS sont mesurés deux heures après chaque stress (Tableau 3. 3). Les contenus en PEC solubles du bioréacteur et du perméat sont ensuite évalués dans chaque condition de stress.

Après le premier stress et à cause du manque de nourriture en comparaison de la concentration en biomasse présente, à 20 et 50 jours la concentration en MVS décroît respectivement de 6 et 11 %. Les bactéries autotrophes et hétérotrophes augmentent simultanément leurs respirations endogènes et diminuent leurs activités exogènes. Ces résultats suggèrent qu'une partie des ressources énergétiques est redirigée de la croissance vers la gestion de ce stress et la protection des micro-organismes.

Alors que le taux d'élimination de la DCO est maintenu à son niveau le plus haut dans les deux expériences, l'élimination de l'ammonium est réduite d'au moins 25 %. Les bactéries hétérotrophes se sont très bien adaptées à cette condition de carence en substrat en baissant leur activité spécifique exogène et ont utilisé tout le carbone organique disponible pour maintenir une concentration très basse en DCO dans le perméat.

Au contraire, les bactéries autotrophes semblent avoir été plus stressées par cette absence de substrat soudaine que les hétérotrophes car elles ont augmenté de manière plus significative leur respiration endogène que les hétérotrophes. La baisse de la charge massique a nécessité chez les autotrophes des besoins endogènes en oxygène plus importants pour gérer les conséquences liées à la baisse d'apport nutritionnel. Han et al., 2005 observent également une baisse de l'activité exogène spécifique des autotrophes dans leur étude à un TSB élevé de 100 jours. La charge volumique étant fixe tout au long de leur campagne et la concentration en MVS augmentant, ils attribuent cette baisse d'activité à un moins bon transfert de l'oxygène vers les bactéries autotrophes en raison de l'augmentation de la concentration en MES et donc de la viscosité du milieu mais également à un phénomène de compétition des bactéries autotrophes pour le substrat à cause de la faible charge massique résultante de cette étude à fort âge de boues. Etant donné que la concentration en MVS a subi une légère baisse suite à ce stress, la deuxième hypothèse semble plus probable.

Une autre hypothèse est celle de la prédation exercée par les organismes unicellulaires eucaryotes tels que les protozoaires qui comprennent trois groupes principaux : les amibes, les flagellés et les ciliés dans les boues activés. La plupart de ces organismes sont hétérotrophes. Ils intègrent donc la matière organique mais également des bactéries qui composent une des bases de leur alimentation.

Plusieurs auteurs ont mis en évidence l'impact de tels organismes sur la nitrification et le taux de décès de la biomasse autotrophe.

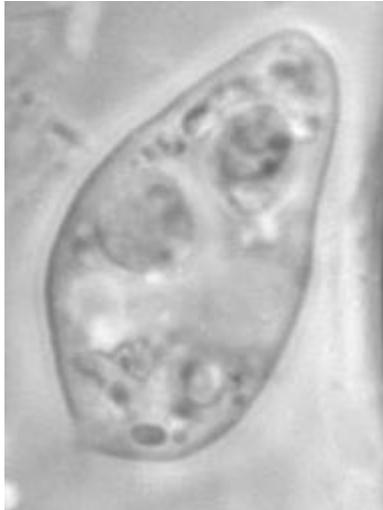
Lee et Welander (1994), ont étudié le rôle de la prédation sur la nitrification. Ils concluent qu'après inhibition des prédateurs, la nitrification augmente rapidement avec une stabilisation à une valeur deux fois plus haute qu'avant l'inhibition des prédateurs. Bouchez et al., (2000) montrent que la prédation des protozoaires est la principale raison qui empêche l'augmentation de la nitrification dans leur procédé SBR. Le Bihan et al., (2001) prouvent que

les amibes contribuent fortement à l'augmentation du taux de décès de la biomasse autotrophe.

La biomasse autotrophe semble constituer une cible de choix pour les prédateurs. Une des raisons est qu'elles sont très souvent assemblées sous forme de micro-colonies de petites tailles. Larsen et al., (2008) montrent que les *Nitrosomonas oligotropha* sont rassemblées dans des micro-colonies de tailles moyennes comprises entre 13 et 22,5 μm et que la plupart des *Nitrospira spp.* forment des floccs de diamètre moyen compris entre 9 et 22,5 μm . Or Luxmy et al., (2000) montrent que dans un BâM avec l'augmentation du nombre de prédateurs, le nombre de floccs de 10 μm diminue. En d'autres termes, les petits floccs sont les plus sujets à la prédation.

Au cours des deux acclimations des protozoaires sont observés dans le bioréacteur (Figure 3. 23). Ils pourraient donc dans le cas d'une baisse de la charge massique contribuer à la baisse d'activité exogène des autotrophes. Enfin si cette hypothèse est exacte après ce stress, le taux de décès des autotrophes doit être plus élevé.

(a)



(b)

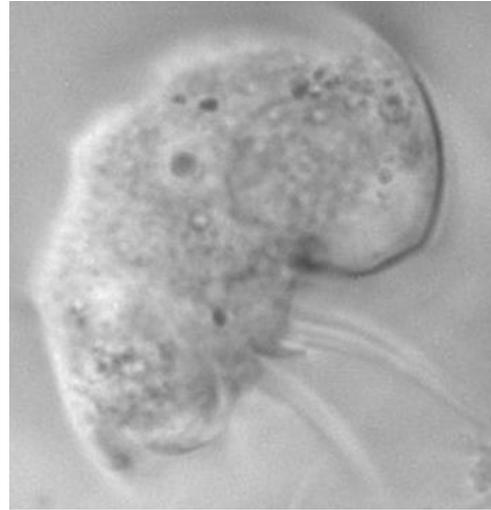


Figure 3. 23 : Observation microscopique de deux types de protozoaires de la BA du BâM_E à un TSB de 50 jours. (a) paramécie et (b) colpode

Tableau 3. 3: Evolution des rendements épuratoires, des MVS et des activités biologiques avec le TSB et le stress appliqué

TSB (j)	procédé stable		Stress I (Baisse Cm)		Stress II (Augmentation Cm)		Stress III (24 h sans air et substrat)		
	20	50	20	50	20	50	20	50	
	Taux d'élimination (%)								
DCO	99 ± 1	96 ± 3	stable	-3 % ± 1	-7 % ± 4	+ 3 % ± 1	-1 % ± 1	+ 1 % ± 1	
N-NH ₄ ⁺	70 ± 4	77 ± 4	-25 % ± 3	-27 % ± 4	- 48 % ± 1	-48 % ± 2	-8 % ± 3	- 10 % ± 2	
Activités biologiques (mg_{O2}·g_{MVS}⁻¹·h⁻¹)									
Hétérotrophes	exogène	43,5 ± 3,2	49,3 ± 3,6	-34 % ± 2	-43 % ± 5	+ 45 % ± 5	+16 % ± 3	-34 % ± 3	-35 % ± 2
	endogène	2,0 ± 0,1	1,7 ± 0,4	+50 % ± 3	+24 % ± 2	+100 % ± 9	+112 % ± 9	+75 % ± 8	+153 % ± 9
Autotrophes	exogène	0,2 ± 0,1	0,9 ± 0,2	-33 % ± 2	-50 % ± 9	-64 % ± 7	-86 % ± 7	-33 % ± 4	-14 % ± 1
	endogène	0,7 ± 0,1	2,1 ± 0,5	+86 % ± 4	+123 % ± 6	+200 % ± 10	+50 % ± 2	-57 % ± 4	-19 % ± 2
MVS (g.L⁻¹)									
		8,2 ± 0,7	7,0 ± 0,7	-6 % ± 2	-11 % ± 2	+20 % ± 2	+37 % ± 2	-13 % ± 2	-15 % ± 2

Le deuxième stress correspond à une augmentation pendant 24 h de quatre fois la charge massique habituellement fixée. Cette augmentation de C_m apporte suffisamment de substrat aux micro-organismes pour qu'ils augmentent la synthèse de nouvelles cellules. Après un jour, les MVS ont augmenté de 20 % pour un TSB de 20 jours et de 37 % à 50 jours.

Les bactéries hétérotrophes sont capables d'accroître leur activité exogène spécifique pour faire face à cet excès de carbone organique à dégrader. Ainsi un rendement d'élimination toujours supérieur à 90 % est maintenu. Durant les deux expériences, les respirations endogènes des hétérotrophes sont doublées en comparaison de celles mesurées à l'état stationnaire. Il semblerait donc aussi que l'excès de substrat contribue à faire augmenter les réactions liées au catabolisme bactérien et donc à la synthèse de produits de stockage. Lebegue (2008a) montre également la forte capacité d'adaptation des micro-organismes hétérotrophes aux fortes charges. Après un ajout accidentel de $6 \text{ g}_{\text{DCO}} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{j}^{-1}$, 95 % d'élimination de la DCO est maintenue.

Le comportement des bactéries autotrophes est à l'opposé de celui des hétérotrophes suite au stress II. L'augmentation de la C_m a provoqué une chute de 48 % de l'élimination de l'ammonium. D'autres études ont reporté une élimination plus faible de l'ammonium à forte charge (Gagnaire, 2010 ; Johir et al., 2012). Johir et al., (2012) expliquent cette baisse par la compétition qui peut se produire entre les autotrophes et les hétérotrophes vis-à-vis de la consommation de l'oxygène.

L'activité exogène spécifique des autotrophes subit une forte chute et leur respiration endogène augmente significativement. Ce phénomène montre que pendant le stress II, les micro-organismes autotrophes sont en état de protection pour gérer ce stress. Mauret et al., (1996) explique cette réaction des autotrophes par la trop forte concentration en ammonium qui a créée une inhibition de ce type de micro-organismes. Gagnaire, (2010) rapporte l'existence d'une telle inhibition à partir de $350 \text{ mg}_{\text{N-NH}_4} \cdot \text{L}^{-1}$. Cette hypothèse semble probable car des concentrations en ammonium allant jusqu'à $400 \text{ mg}_{\text{N-NH}_4} \cdot \text{L}^{-1}$ sont détectées dans le réacteur après le stress.

A partir de ces résultats concernant le stress II, il peut être affirmé que la majeure partie de la biomasse générée pendant ce stress est de nature hétérotrophe.

Le dernier stress (III) correspond à une absence d'air et de nutriments pendant 24 h. Après ce stress, la biomasse est resoumise à des conditions normales de charge massique et d'oxygène pendant deux heures avant la prise d'échantillons pour effectuer les mêmes analyses que pour les deux stress précédents.

Une chute des MVS comparable pour les deux TSB est observée. Dans cette situation l'utilisation des PEC pour la maintenance cellulaire est favorisée. Les résultats de Lobos et al., (2005) sont en accord avec ceux de cette étude. A faible rapport de substrat par rapport aux micro-organismes, une rapide décroissance des MVS est observée mais qu'elle ne s'accompagne pas d'une lyse cellulaire. Cette baisse des MVS est principalement due à la consommation des produits de stockage. Cette explication est également valable pour la chute de MVS constatée après le stress I.

Comme les hétérotrophes sont aérobies facultatives, cette période n'est pas stressante pour ce type de bactéries. Elles ont juste augmenté leur respiration endogène pour consommer les PEC stockés et simultanément réduit leur activité exogène. Le même taux d'élimination de la DCO est obtenu malgré la baisse d'activité exogène des hétérotrophes.

Concernant les bactéries autotrophes, elles sont aérobies strictes, ce qui implique la présence nécessaire d'oxygène pour l'ensemble de leur métabolisme. En raison de l'absence d'air pendant 24 h, leur consommation globale d'oxygène (besoins endogènes et exogènes) a diminué après le retour de l'aération. Leur taux d'élimination de l'ammonium ne subit pas de baisse importante en comparaison des deux autres stress. La faible baisse notée peut être attribuée à la baisse d'activité exogène des autotrophes qui a sans doute ralenti l'utilisation de l'ammonium.

Contrairement aux stress I et II, les respirations endogènes des bactéries autotrophes ont diminué après le stress III. Le procédé de festin/famine développé dans les procédés avec un syncopage de l'aération offre une explication à ce phénomène (Lee et Oleszkiewicz, 2003). Les bactéries autotrophes rencontrent de manière routinière cette situation où l'énergie ne peut pas provenir de la dégradation d'un substrat exogène en raison de l'absence d'oxygène. Ainsi elles ont sans doute augmenté leur tolérance vis-à-vis de ce type de carence. En d'autres termes, la population autotrophe du Bàm est habituée à ce type de situation qui n'a pas créé

de dommages structurels particuliers. C'est pour cette raison que leur respiration endogène n'augmente pas.

3.2.2.2 Relargage de PEC solubles et rétention membranaire en situation de stress

Pendant les stress, la plus forte baisse de rétention des PEC solubles par la membrane est obtenue après le stress III (absence d'air et de nutriments pendant 24 h) (Figure 3. 24 et Tableau 3. 4). Pour les deux TSB, la quasi-totalité de la concentration en protéines retrouvée dans les PEC solubles du bioréacteur se retrouve dans le perméat et plus de 60 % des polysaccharides et des substances humiques-like présents dans les PEC solubles du bioréacteur à un TSB de 50 jours, sont détectés dans le perméat. Alors que ces composés sont absents dans le perméat à 20 jours.

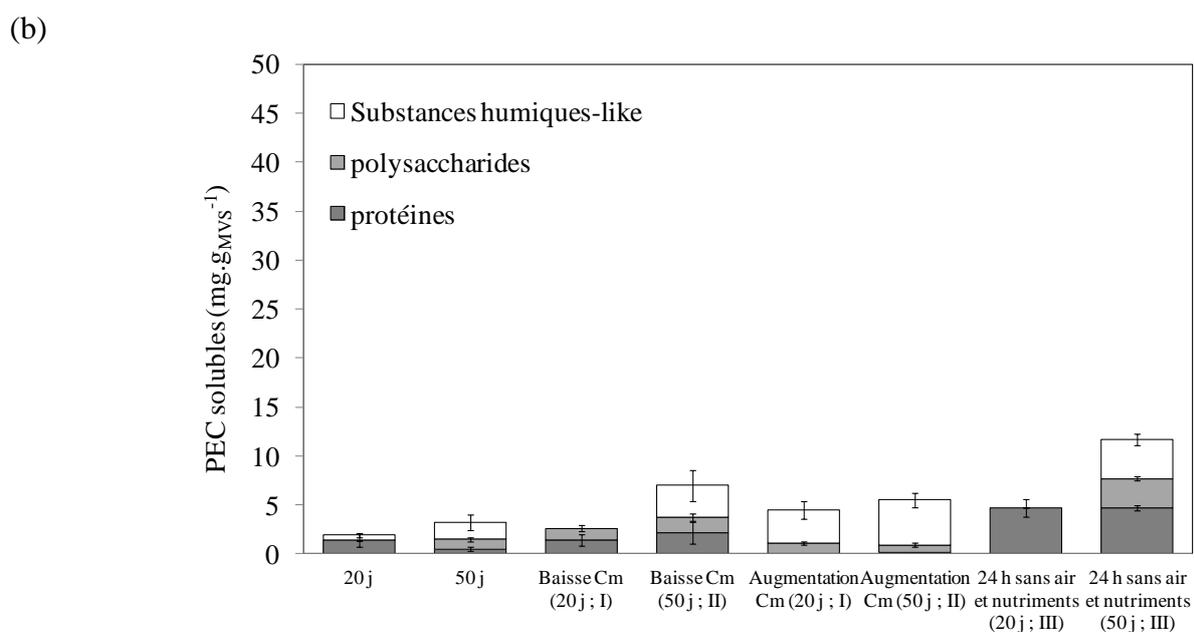
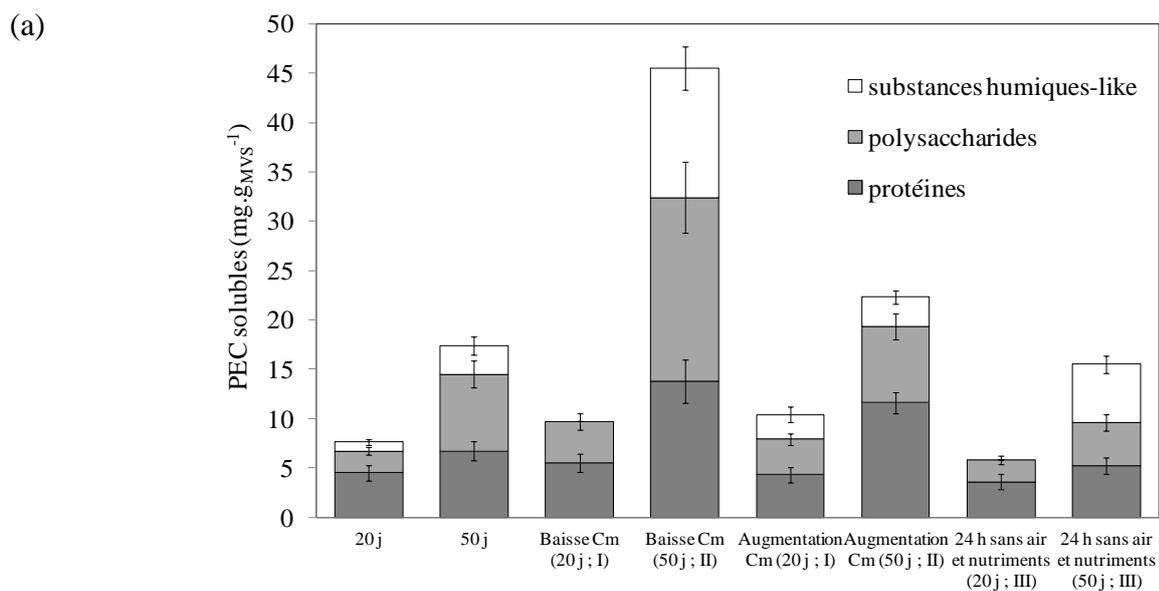


Figure 3. 24 : Evolution des concentrations en protéines, polysaccharides et substances humiques-like (a) du bioréacteur et (b) du perméat à un TSB de 20 et 50 jours pendant les stress I, II et III

Tableau 3. 4 : Evolution des rétentions totales et spécifiques des PEC solubles avec le TSB et le stress appliqué

TSB (j)	Rétention totale (%)	Rétention PN*	Rétention PS*	Rétention SH*
20				
Stress I	73 ± 4	75 ± 3	71 ± 4	-
Stress II	57 ± 5	100	69 ± 5	-36 ± 3
Stress III	19 ± 7	-31 ± 6	100	-
50				
Stress I	85 ± 2	84 ± 5	92 ± 3	75 ± 4
Stress II	75 ± 4	99 ± 3	90 ± 5	-53 ± 4
Stress III	25 ± 6	10 ± 5	32 ± 4	32 ± 3

*PN : protéines ; PS : polysaccharides ; SH : substances humiques-like

Pendant le stress III, une chute similaire de la concentration en MVS est observée (Tableau 3. 3). Elle est due à la consommation des produits de stockage dans les PEC donc par les micro-organismes (Zhang et Bishop, 2003). Plusieurs auteurs ont montré que pendant les premiers jours dans des conditions d'anaérobiose, les concentrations en polysaccharides et protéines diminuent (Nielsen et al., 1997). Les floccs de boues activées ont tendance à déflocculer à cause de la suppression de la production de PEC ainsi que de leur consommation.

Dans le cas du stress III, quel que soit l'âge de boues, la rétention des polysaccharides est toujours supérieure à celle des protéines pour des concentrations dans le bioréacteur relativement proches. Cela suggère que les bactéries dégradent préférentiellement les protéines. Une étude menée par Stricot (2004) sur la caractérisation des mécanismes de sécrétions des produits microbiens solubles lors du stockage aérobie de boues issues d'un Bàm_I montre que les cinétiques de dégradation des protéines extracellulaires sont plus rapides que celles des polysaccharides.

Dans ces expériences de stress, une augmentation de la respiration endogène des bactéries hétérotrophes est constatée (Tableau 3.3). Ce résultat confirme donc l'hydrolyse des PEC

solubles et du fait de leur plus petite taille, leur passage au travers des pores de la membrane (rétention totale des PEC solubles seulement de 19 % à 20 j et de 25 % à 50 j).

La baisse de la rétention totale est entièrement provoquée par le passage de protéines plus petites à un TSB de 20 jours. La rétention négative de celles-ci indique qu'une concentration plus importante de protéines est retrouvée dans le perméat que dans le bioréacteur. Une partie des protéines déjà retenue sur ou dans les pores de la membrane a dû passer au travers de la membrane pendant le stress III.

A 50 j, seulement 10 % des protéines et 32 % des polysaccharides sont retenus par la membrane. Cette fois, une responsabilité conjointe de la chute de la rétention membranaire est attribuée à ces deux composants. En fonction de l'âge de boues et pendant le stress III, la taille des polysaccharides a subi un important changement. Etant donné leur faible rétention à 50 jours, elles sont sans doute plus petites.

La baisse de C_m (stress I) provoque une augmentation importante de l'excrétion de l'ensemble des composants des PEC solubles dans le bioréacteur à 50 jours (contenu 2,5 fois plus grand qu'en conditions normales). A 20 jours, 22 % de protéines et 90 % de polysaccharides en plus sont mesurés. Malgré ces relargages importants, la rétention de ces composés est quasi identique à celle obtenue dans des conditions normales.

En comparaison avec le stress III où la biomasse n'a eu ni air ni nutriments pendant 24 heures, pendant le stress I la charge massique subit une simple baisse de $0,1 \text{ kg}_{\text{DCO}} \cdot \text{kg}_{\text{MVS}}^{-1} \cdot \text{j}^{-1}$. Dans le cas de ce stress I, pour survivre les bactéries n'ont pas eu à biodégrader les PEC solubles et ainsi moins de produits d'hydrolyse sont formés.

L'augmentation de la C_m cause un relargage important de protéines dans le surnageant du bioréacteur à 50 jours (73 %). Alors que la concentration en protéines reste stable à 20 jours, les polysaccharides augmente de 64 %. Lobos et al., (2005) ont également observé une augmentation rapide du contenu en protéines solubles après l'augmentation de l'apport en substrat par rapport à la concentration en bactéries.

La forte concentration en DCO à dégrader suite à ce stress, a provoqué une augmentation des activités endogène et exogène des hétérotrophes. La dégradation de cet excès de DCO entraîne la synthèse par les bactéries de plus d'enzymes et l'augmentation des besoins totaux

en oxygène de la biomasse hétérotrophe montre qu'elle est capable d'accélérer son métabolisme pour biodégrader cet excès. De plus, aux deux TSB des augmentations des MVS de 20 et 37 % sont constatées respectivement à 20 et 50 jours. L'énergie produite par la dégradation du substrat a en partie été utilisée pour la synthèse de nouvelles bactéries.

Après ce stress II, aux deux âges de boues, des rétentions négatives des substances humiques-like sont mesurées. Le même phénomène a dû se produire entraînant des substances humiques-like adsorbées sur ou dans les pores de la membrane dans le perméat.

La même particularité de composition des perméats à 20 et 50 jours est constatée après le stress II : aucune protéine n'est relarguée. Dans ce cas précis, les protéines formées doivent avoir des spécificités physico-chimiques (taille, charge, groupement fonctionnel) qui les empêchent de passer au travers de la membrane.

3.3 Conclusion

Au travers des dysfonctionnements provoqués aux deux âges de boues, la biomasse hétérotrophe se révèle être parfaitement adaptée pour gérer ce type de situations et elle est capable de réguler son activité exogène et sa respiration endogène pour répondre rapidement aux changements imposés dans le bioréacteur tout en maintenant une forte épuration de la DCO.

La biomasse autotrophe affiche une plus grande sensibilité notamment dans le cas de la baisse puis de la hausse de la charge massique. En effet suite aux variations de C_m , la biomasse autotrophe baisse conjointement ses besoins en oxygène pour la dégradation de substrat et augmente ceux relatifs à sa maintenance cellulaire. Ces changements d'orientation des besoins en oxygène de la biomasse autotrophe annonce un mécanisme de protection vis-à-vis du milieu extérieur. L'état de protection des autotrophes dans ces deux situations a eu pour conséquence une forte baisse de l'épuration de l'ammonium de 48 % après la hausse de C_m et de 25 % suite à la baisse de charge. Les principales causes de ce comportement de la biomasse autotrophe sont identifiées comme étant une inhibition par le substrat azoté dans le cas de la hausse de charge et deux hypothèses majeures sont mises en avant pour la baisse de la charge : une compétition de la biomasse à cause de la baisse de la quantité d'ammonium par rapport à la quantité de micro-organismes autotrophes et/ou une influence de la prédation exercée par les protozoaires spécifiquement sur la population autotrophe.

Si dans le cas de la baisse de charge la rétention des PEC solubles reste élevée à plus de 70 % aux deux âges de boues, la membrane perd toute efficacité pour retenir les PEC solubles après un arrêt de 24 h de l'apport nutritif et de l'oxygène à 20 et 50 jours.

L'évaluation des rétentions spécifiques en protéines, polysaccharides et substances humiques-like évoluent en fonction du stress appliqué et donc également les caractéristiques de structure et de composition du colmatage membranaire.

La réalisation de ces dysfonctionnements a permis de mettre en évidence une gestion similaire du stress par les bactéries à des âges de boues différents. La biomasse semble toutefois plus réactive pour s'adapter aux changements de conditions opératoires imposés à un âge de boues

de 50 jours car à chaque stress, la chute ou la hausse de la concentration en MVS est légèrement plus accentuée à cet âge de boues.

CHAPITRE 4 : Caractérisation des performances et du colmatage d'un BâM pour le traitement d'un effluent résiduaire urbain.

4.1 Introduction

Ce chapitre a pour but de caractériser les performances épuratrices, les activités biologiques et le colmatage membranaire d'un Bàm_E placé sur la station d'épuration du Rousset. L'âge de boues est fixé à 50 jours au vu des performances du Bàm obtenues dans le chapitre précédent.

Afin de dissocier les effets de l'âge de boues de ceux de la charge massique appliquée sur l'ensemble des caractéristiques du pilote, la charge massique est fixée à environ $0,2 \text{ kg}_{\text{DCO}} \cdot \text{kg}_{\text{MVS}}^{-1} \cdot \text{j}^{-1}$.

Tout au long de l'acclimatation en ERU et à l'état stationnaire, les rendements épuratoires en ammonium et DCO, les activités endogènes et exogènes spécifiques des biomasses autotrophes et hétérotrophes ainsi que les PEC solubles et leur influence sur le colmatage sont caractérisés.

Afin d'évaluer la résistance des micro-organismes acclimatés avec un ERU en cas de stress, les trois situations stressantes provoquées dans le chapitre précédent sont également effectuées sur cette biomasse.

4.2 Développement de la biomasse

Afin de faciliter l'acclimatation de la biomasse dans le B_àM_E, des boues provenant directement de la station d'épuration du Rousset et donc déjà adaptées à l'ERU sont introduites dans le pilote. La concentration en MVS moyenne de la biomasse est de 6 g.L⁻¹. Aucune concentration de la biomasse dans le réacteur n'est effectuée.

L'évolution des MVS est suivie au cours de l'acclimatation et après stabilisation du procédé (Figure 4. 1).

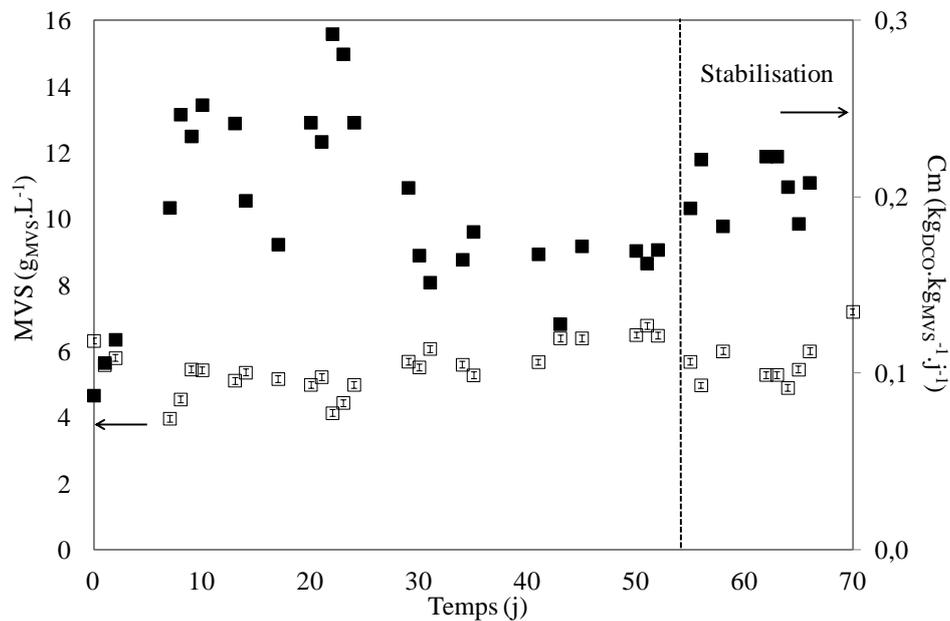


Figure 4. 1 : Evolution des MVS et de la Cm au cours de l'acclimatation en ERU

Une baisse de près de 40 % de la concentration en MVS initialement introduite se produit lors des sept premiers jours dans le bioréacteur. Le cisaillement important dans les B_àM_E semble être responsable de cette perte de biomasse. Les faibles Cm obtenues pendant les dix premiers jours sont dues à un fort épisode de pluie pendant cette période ainsi qu'à l'application d'un débit de perméat (Qp) trop faible et un TSH trop long pour pouvoir satisfaire les besoins en substrat de la biomasse. Ces valeurs initialement fixées à 0,75 L.h⁻¹ et 24 h sont modifiées pour atteindre 1,64 ± 0,4 L.h⁻¹ et 9 ± 3 h afin de fournir la quantité de substrat nécessaire à la croissance bactérienne. C'est donc pour cette raison qu'une forte augmentation de la charge massique est observée les dix premiers jours. Les deux baisses consécutives de la charge

massique entre premièrement les jours 10 et 15 et deuxièmement entre les jours 24 et 31 sont provoquées par une baisse importante du flux de perméat. En effet, pendant 30 jours, la concentration en MVS reste stable à environ 5 g.L^{-1} . Pour s'assurer de l'état de croissance de la biomasse, il est préférable d'attendre une augmentation de la concentration en MVS avant de commencer à effectuer des purges pour stabiliser à un TSB de 50 jours. C'est pour cette raison que le débit de perméat est progressivement augmenté durant les périodes entre les jours 0 et 10 puis 17 à 23 afin d'obtenir une C_m supérieure à $0,2 \text{ kg}_{\text{DCO}}.\text{kg}_{\text{MVS}}^{-1}.\text{j}^{-1}$. Pour augmenter le flux de perméat, il est nécessaire de travailler à une PTM plus importante. Cependant en quelques jours seulement une baisse significative du flux de perméat ainsi qu'un saut de PTM sont observés. Ils traduisent un colmatage sévère de la membrane qui peut seulement être enlevé par une procédure de lavages chimiques.

Après le deuxième changement de membrane au jour 36, le débit de perméat ainsi que la PTM sont laissés fixes à respectivement $1,64 \pm 0,4 \text{ L.h}^{-1}$ et $1,1 \pm 0,02 \text{ bar}$ pour éviter de reproduire ce phénomène et des purges quotidiennes sont effectuées jusqu'à atteindre la stabilité de la concentration en MVS du procédé à un âge de boues de 50 jours.

La biomasse est finalement stabilisée après une cinquantaine de jours à une valeur de $5,9 \pm 0,7 \text{ g}_{\text{MVS}}.\text{L}^{-1}$ pour une charge massique de $0,19 \pm 0,02 \text{ kg}_{\text{DCO}}.\text{kg}_{\text{MVS}}^{-1}.\text{j}^{-1}$.

4.2.1 Production de boues

Stabilisée à 50 jours, la biomasse a une vitesse de production de boues de $0,12 \text{ kg}_{\text{MVS}}.\text{m}^{-3}.\text{j}^{-1}$ à partir du jour 50 (Figure 4. 2).

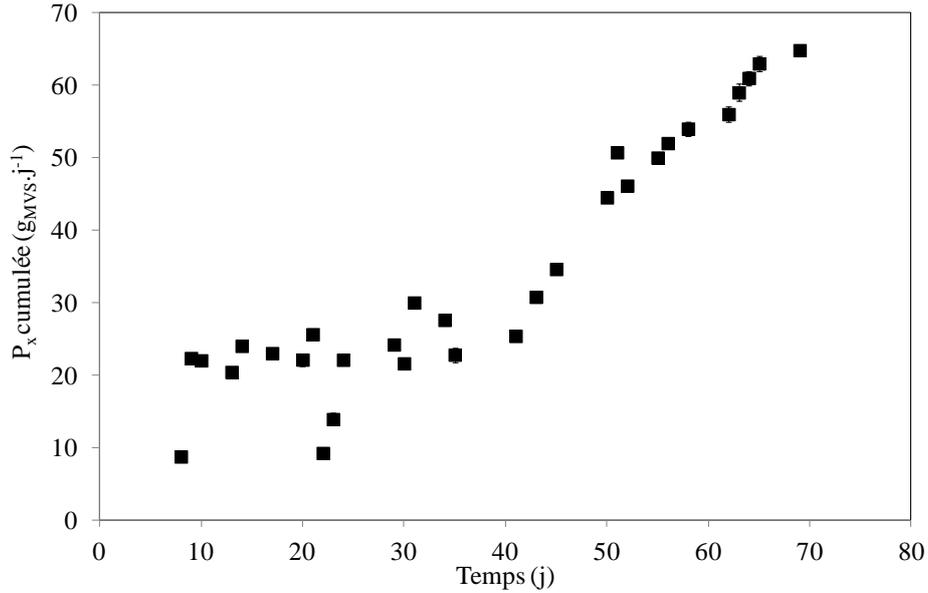


Figure 4. 2 : Production cumulée de boues au cours de l’acclimatation en ERU

Le rapport des pentes des droites de $\Delta DCO_{cumul\acute{e}e}$ sur la P_x cumulée donne accès au rendement de production de boues (Y_{obs}). $\Delta DCO_{cumul\acute{e}e}$ est obtenu grâce aux équations suivantes (Equations 4.1 et 4.2) :

$$DCO_{elim} = DCO_E \times Q_E - DCO_S \times (Q_S + Q_P) \quad (4.1) \quad \text{et} \quad \Delta DCO_{cumul\acute{e}e} = \sum_{jour=1}^i DCO_{elim} \quad (4.2)$$

Avec :

DCO_{elim} DCO éliminée journalière (g.j⁻¹)

DCO_E DCO dans l’effluent d’alimentation (g.L⁻¹)

DCO_S DCO dans le perméat (g.L⁻¹)

Q_E Débit d’alimentation (L.j⁻¹)

Q_S Débit de sortie (L.j⁻¹)

L’estimation du rendement de production de boues est de $0,17 \pm 0,02 \text{ kg}_{MVS}.\text{kg}_{DCO}^{-1}$. Cette valeur se trouve être du même ordre de grandeur que les valeurs de production de boues trouvées par Buisson et al., (1998) ($0,2 \text{ kg}_{MVS}.\text{kg}_{DCO}^{-1}$) ou Massé et al., (2006)

(0,21 kg_{MVS}.kg_{DICO}⁻¹) dans leur traitement par Bàm_I d'ERU à des âges de boues proches de celui étudié dans cette étude.

Différents modèles permettent d'exprimer la production de biomasse Y_{obs} en tenant compte de l'âge de boues (chapitre 1). Le Tableau 4. 2 donne les valeurs de Y_{obs} obtenues expérimentalement et grâce aux différents modèles. Les valeurs des différentes constantes issues de la bibliographie utilisées pour effectuer la simulation des productions de boues sont données dans le Tableau 4. 1.

Tableau 4. 1 : Valeurs des constantes cinétiques et stœchiométriques utilisées

$K_d :$	0,05 j ⁻¹	Metcalf et Eddy (1991)
$Y_H :$	0,44 g _{MVS} .g _{DICO} ⁻¹	Metcalf et Eddy (1991)
$m_s :$	0,1 j ⁻¹	-
$b :$	0,62 j ⁻¹	Henze (1987)
$f_p :$	0,08 g _{DICO} .g _{DICO} ⁻¹	Henze (1987)
$f_{xi} :$	0,1	Salhi (2003)

Tableau 4. 2 : Estimation de la production de boues par différents modèles pour un âge de boues de 50 jours en ERU

		Y_{obs} (kg _{MVS} .kg _{DICO} ⁻¹)
		TSB 50 jours
Valeur expérimentale		0,17 ± 0,02
Concepts		
Endogène	$Y_{obs} = \frac{Y_H}{1 + k_d \cdot TSB}$	0,13
Maintenance	$Y_{obs} = \frac{Y_H}{1 + m_s \cdot Y_H \cdot TSB}$	0,14
Mort-régénération	$Y_{obs} = \frac{Y_H (1 + b \cdot f_p \cdot TSB)}{1 + b \cdot TSB (1 - Y_H (1 - f_p))}$	0,08
Mort-régénération avec fraction inerte	$Y_{obs} = f_{xi} + (1 - f_{xi}) \cdot \frac{Y_H (1 + b \cdot f_p \cdot TSB)}{1 + b \cdot TSB (1 - Y_H (1 - f_p))}$	0,17

La plus grande partie de ces modèles a été initialement développée et utilisée pour prédire les productions de boues pour des TSB n'excédant pas 20 jours. Ainsi lorsque les constantes cinétiques issues de la bibliographie sont utilisées, ces modèles sous-estiment la production de boues pour un TSB de 50 jours. C'est le cas pour les modèles de respiration endogène, de maintenance et de mort-régénération sans la prise en compte d'une fraction inerte. En revanche pour des TSB inférieurs à 20 jours (Cicek., 2001 ; Massé., 2004) les modèles de respiration endogène et de maintenance cités simulent parfaitement le rendement de production de boues (Figure 4. 3)

Le résultat obtenu avec le dernier modèle (mort-régénération) donne une valeur similaire à la valeur expérimentale de $0,17 \text{ kg}_{\text{MVS}}.\text{kg}_{\text{DCO}}^{-1}$ à la condition de tenir compte de la fraction inerte de l'effluent et d'avoir une bonne estimation de cette valeur. En effet sans ce terme de fraction inerte, l'estimation du rendement de production de boues est la plus éloignée de la valeur expérimentale et est sous-estimée à $0,08 \text{ kg}_{\text{MVS}}.\text{kg}_{\text{DCO}}^{-1}$.

La détermination de la fraction inerte semble être primordiale car avec une valeur trop haute, le rendement de production de boues peut vite devenir supérieur à la valeur réelle (Salhi, 2003). La Figure 4. 3 illustre bien ce phénomène. Dans le cas de notre étude, le rendement de production de boues est surestimé de 35 % avec une fraction inerte doublée de 10 à 20 %.

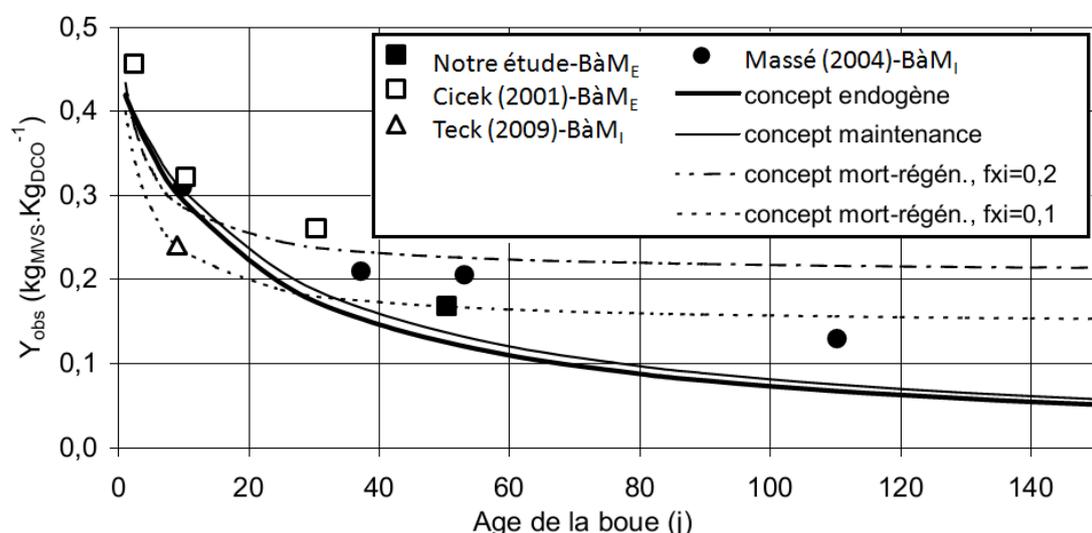


Figure 4. 3 : Estimation de la production de boues par différents modèles et comparaison avec la bibliographie (adapté de Massé., 2004)

Il peut également être remarqué qu'aucun de ces modèles ne prédit correctement le rendement de production de boues sur toute la gamme exposée dans la Figure 4. 3. Pour des TSB extrêmement élevés (110 jours ; Massé., 2004), le concept de mort-régénération surestime la valeur de Y_{obs} . Une hypothèse peut être que la DCO considérée comme inerte à un TSB de 50 jours se trouve être hydrolysable à des TSB dépassant les 100 jours. C'est le cas notamment de certaines fractions de PEC telles que les polysaccharides qui ont des taux d'hydrolyse pouvant être plus faibles que les taux de décès de la biomasse. Leur cinétique d'hydrolyse peut être prépondérante à des âges de boues élevés.

4.2.2 Les capacités épuratrices de la biomasse

Sur toute la durée de l'acclimatation une très bonne épuration de la DCO est obtenue à $97 \pm 3 \%$ (Figure 4. 4).

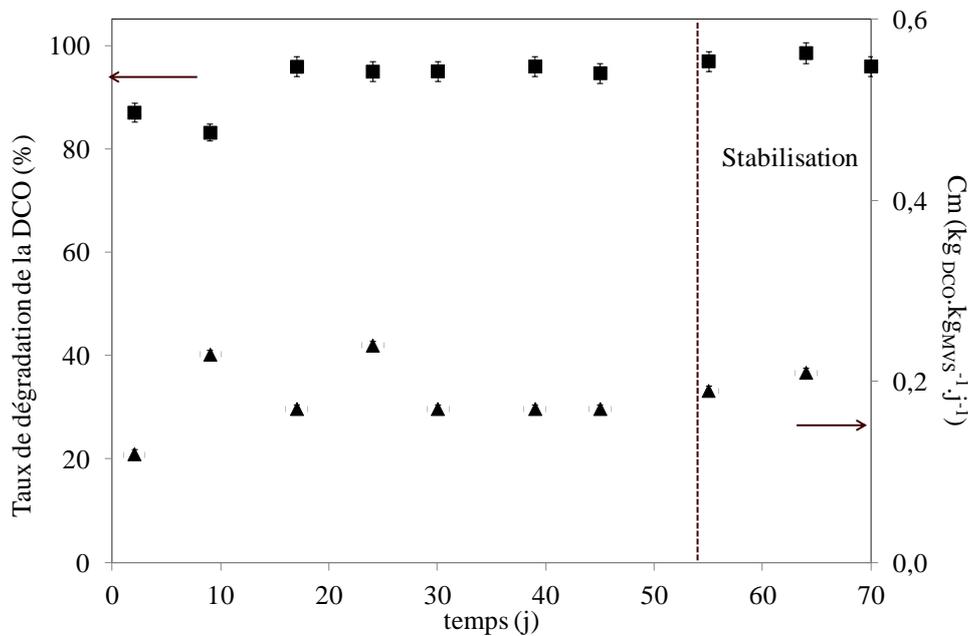


Figure 4. 4 : Taux de dégradation et C_m en DCO au cours de l'acclimatation en ERU

Les plus faibles taux d'élimination (inférieurs à 90 %) sont constatés pendant les dix premiers jours de l'acclimatation. Le stress occasionné par l'introduction dans un $B\grave{a}M_E$ à fort cisaillement auquel la biomasse est soumise pendant cette période est sans doute à l'origine d'un épisode important de lyse cellulaire et donc de relargage de DCO soluble dans le

surnageant du bioréacteur. Une autre explication est que le jour 10 correspond au jour où la charge massique est volontairement augmentée et donc une partie de l'apport supplémentaire en DCO n'est peut être pas encore dégradé par les hétérotrophes.

Les valeurs d'élimination de la DCO obtenues après les dix premiers jours correspondent tout à fait aux valeurs annoncées par d'autres auteurs travaillant en ERU (Huang et al., 2001 ; Pollice et al., 2008).

En ce qui concerne le traitement de l'ammonium, celui-ci est tout aussi efficace étant donné que des rendements d'élimination proches de 100 % sont mesurés tout au long de l'acclimatation (Figure 4. 5). Ce résultat est également en accord avec les valeurs pouvant être obtenues dans la bibliographie (Huang et al., 2001 ; Pollice et al., 2008).

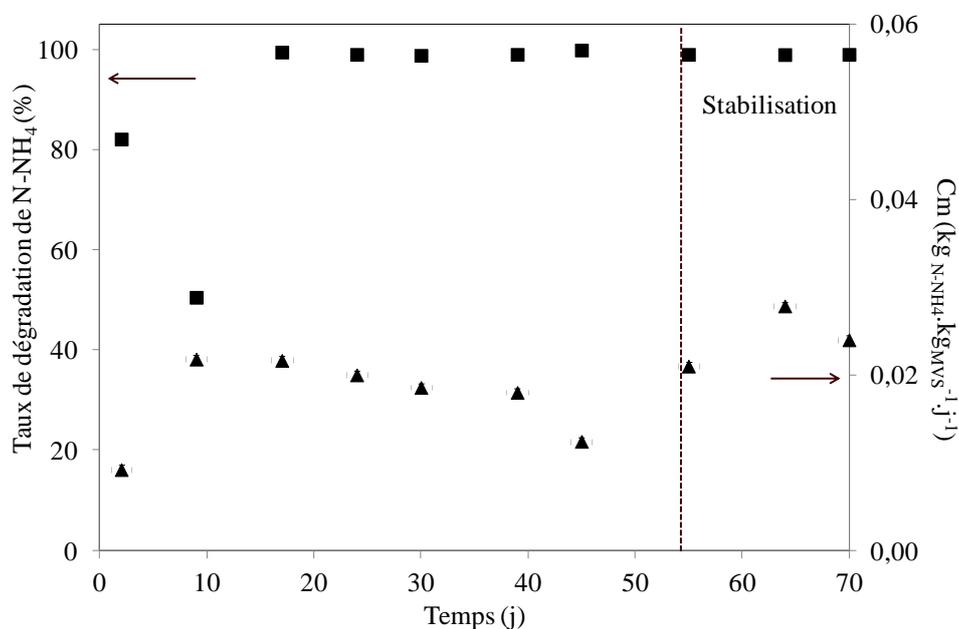


Figure 4. 5 : Taux de dégradation et Cm en N-NH4 au cours de l'acclimatation en ERU

Une baisse des performances épuratrices est néanmoins constatée au jour 10 de l'acclimatation. C'est à partir de ce jour précis que simultanément le débit de perméat est augmenté et du coup le TSH abaissé afin de doubler la Cm pour arriver à une valeur de 0,02 kg_{N-NH4+}.kg_{MVS}⁻¹.j⁻¹. Ainsi au jour 10, jour de modifications des paramètres opératoires et jour d'analyse du taux d'élimination en ammonium, la biomasse n'a pas eu le temps de

dégrader ce nouvel apport en ammonium, ce qui baisse donc le rendement d'élimination en ammonium.

Le suivi de la concentration en nitrates est réalisé dans le bioréacteur pour évaluer les performances de la biomasse en termes de dénitrification. Des concentrations toujours inférieures à $1 \text{ mg}_{\text{N-NO}_3\text{-g}_{\text{MVS}}^{-1}}$ sont mesurées avec un pic initial à $4,1 \pm 0,5 \text{ mg}_{\text{N-NO}_3\text{-g}_{\text{MVS}}^{-1}}$. L'étape de dénitrification se réalise correctement tout au long de l'acclimatation.

Dans le cas du traitement d'un ERU, aux vues des rendements d'élimination en ammonium obtenus après seulement dix jours, la biomasse autotrophe possède la capacité de s'adapter quasiment aussi rapidement que la biomasse hétérotrophe aux conditions hydrodynamiques particulières du B_{àM}_E. Clouzot et al., (2011) mettent en cause le cisaillement du B_{àM}_E et la sensibilité des autotrophes pour expliquer les rendements en ammonium inférieurs obtenus lors du traitement d'un effluent synthétique dans cette configuration par rapport au B_{àM}_I. Il semble donc que les conditions particulièrement cisailantes du B_{àM}_E ne sont pas en cause dans la baisse d'épuration de l'ammonium et que la nature ainsi que la composition du substrat ont une influence majeure sur cette baisse.

De plus Larsen et al., (2008) montre que plusieurs espèces représentatives de la communauté bactérienne autotrophe nitrifiante se trouvent dans les BA sous forme de micro-colonies dont le diamètre moyen n'excède pas les 23 μm . Ils prouvent que ces micro-colonies sont très résistantes à de fort taux de cisaillement et qu'elles restent pratiquement intactes.

4.2.3 Activités biologiques

Les activités spécifiques exogènes et endogènes des biomasses autotrophes et hétérotrophes initiales correspondent aux activités mesurées pour la biomasse du Rousset avant l'ensemencement (Figure 4. 6). Les mesures d'activités spécifiques exogènes des autotrophes et hétérotrophes sont réalisées respectivement avec de l'ammonium et l'ERU.

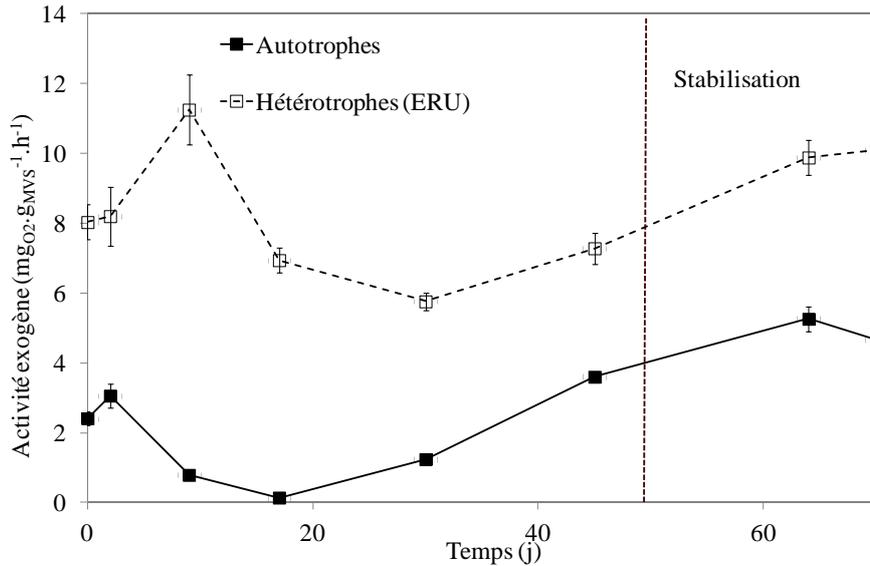


Figure 4. 6 : Activités exogènes spécifiques des hétérotrophes et des autotrophes durant l’acclimation en ERU

Au jour 10, une hausse de l’activité exogène spécifique des hétérotrophes est observée en même temps qu’une baisse de l’activité des autotrophes. La hausse d’activité des hétérotrophes peut être mise en parallèle de la baisse du rendement épuratoire en DCO pendant la même période qui est due à une hausse de la charge massique et à une lyse cellulaire. Les bactéries hétérotrophes augmentent leur activité de plus de 40 % pendant cette période. Elles mettent donc à profit le nouvel apport en DCO provenant de l’augmentation de la Cm mais également de la lyse cellulaire qui a libéré de nombreuses molécules organiques hydrolysables par la population hétérotrophe. Concernant la baisse d’activité des autotrophes durant la même période, elle reste inexplicée. En effet, la Cm en ammonium étant plus élevée, une hausse de l’activité autotrophe aurait du être observée. Aucun problème n’étant survenu dans le pilote pendant cette période, aucune explication n’est apportée.

Après ces variations, les activités de la biomasse se retrouvent quasiment à leur valeur initiale, pour finalement avec l’instauration des purges et la stabilisation du système à 50 jours, augmenter et se stabiliser à $9,1 \pm 1,2 \text{ mgO}_2.\text{gMVS}^{-1}.\text{h}^{-1}$ pour les hétérotrophes et $4,5 \pm 0,3 \text{ mgO}_2.\text{gMVS}^{-1}.\text{h}^{-1}$ pour les autotrophes. L’ordre de grandeur des valeurs obtenues est le même que dans d’autres études de la bibliographie réalisées en BâM avec un effluent réel à un TSB de 40 jours (Huang et al., 2001 ; Pollice et al., 2008). Cependant dans ces études, les

activités spécifiques exogènes mesurées sont identiques (Huang et al., 2001) à $2 \text{ mg}_{\text{O}_2} \cdot \text{g}_{\text{MVS}}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ pour les deux types de bactéries ou dans l'étude réalisée par Pollice et al., (2008), les autotrophes possèdent un SOUR supérieur ($13 \text{ mg}_{\text{O}_2} \cdot \text{g}_{\text{MVS}}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$) à celui des hétérotrophes ($5 \text{ mg}_{\text{O}_2} \cdot \text{g}_{\text{MVS}}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$). L'absence de données sur la composition et les concentrations de substrat ajoutées lors des tests de respirométrie pratiquées dans ces études ne permet pas de comparer leur protocole à celui utilisé dans cette étude et donc de confirmer l'hypothèse selon laquelle les différences observées sont liées à des variations de substrat.

Concernant l'activité endogène spécifique des hétérotrophes (Figure 4. 7), elle ne subit pas de variations significatives durant la totalité de l'étude et est stable à $1 \pm 0,2 \text{ mg}_{\text{O}_2} \cdot \text{g}_{\text{MVS}}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$. La baisse de charge progressive autour du dixième jour n'a donc généré aucun stress visible chez cette population. Le SOUR endogène des autotrophes initialement vers $0,9 \text{ mg}_{\text{O}_2} \cdot \text{g}_{\text{MVS}}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ diminue jusqu'à $0,2 \text{ mg}_{\text{O}_2} \cdot \text{g}_{\text{MVS}}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ au jour 10. Cette baisse est donc simultanée avec celle de leur activité exogène. Cette évolution du SOUR endogène montre que les autotrophes ne se sont pas placées en état de protection et de stress. Elles sont déjà adaptées à cet effluent réel et à ces variations de Cm. Tout de suite après ce dysfonctionnement leurs activités spécifiques endogène et exogène remontent et elles sont capables d'éliminer la totalité de l'ammonium présent dans l'ERU. Le SOUR endogène se stabilise à $0,4 \pm 0,1 \text{ mg}_{\text{O}_2} \cdot \text{g}_{\text{MVS}}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$.

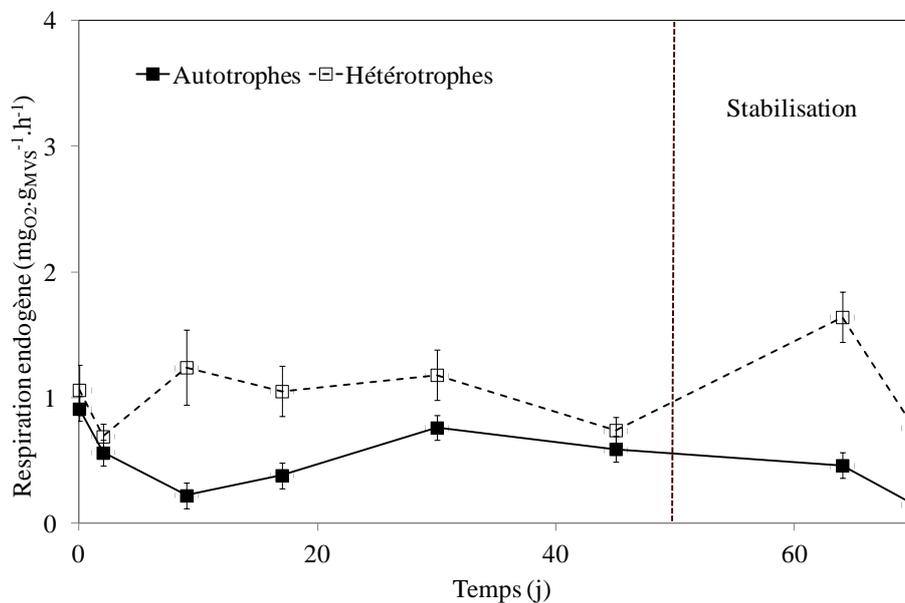


Figure 4. 7 : Activités endogènes spécifiques des hétérotrophes et des autotrophes durant l'acclimatation en ERU

4.2.4 Caractérisation des PEC solubles

4.2.4.1 Evolution des concentrations en PEC solubles

Un pic de protéines est observé au jour 10 avec $17 \text{ mg.g}_{\text{MVS}}^{-1}$ (Figure 4. 8). Il peut aisément être corrélé à la lyse cellulaire intervenant au même moment de l'acclimatation. Ensuite la concentration en protéines des PEC solubles diminue pour finalement se stabiliser à $7,1 \pm 0,5 \text{ mg.g}_{\text{MVS}}^{-1}$.

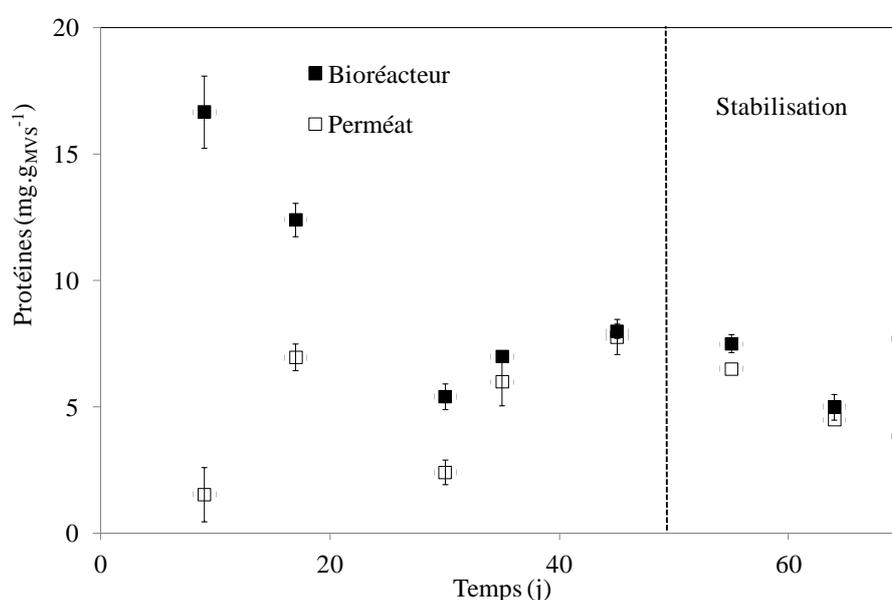


Figure 4. 8 : Evolution des concentrations en protéines extraites des PEC solubles dans le bioréacteur et le perméat au cours de l'acclimatation en ERU

Si au tout début de l'acclimatation, la concentration en protéines mesurée dans le perméat est faible ($1,5 \text{ mg.g}_{\text{MVS}}^{-1}$), elle augmente au cours de l'acclimatation puis est égale à $5,7 \pm 0,4 \text{ mg.g}_{\text{MVS}}^{-1}$ à l'état stationnaire. La rétention des protéines diminue donc au cours de l'acclimatation. Il semblerait que les caractéristiques des protéines évoluent pendant l'acclimatation. La détermination des masses moléculaires apparentes caractéristiques des différents échantillons de protéines pris au cours du temps apportera sans doute des éléments de réponse à ce phénomène.

L'évolution des concentrations en substances humiques-like est également suivie dans le bioréacteur et le perméat (Figure 4. 9). La majeure partie des substances humiques-like provient du substrat. Leurs concentrations évoluent entre 17 et 3 mg.g_{MVS}⁻¹ dans le bioréacteur.

Les concentrations mesurées dans le perméat fluctuent entre des valeurs proches de zéro et les concentrations retrouvées dans le bioréacteur.

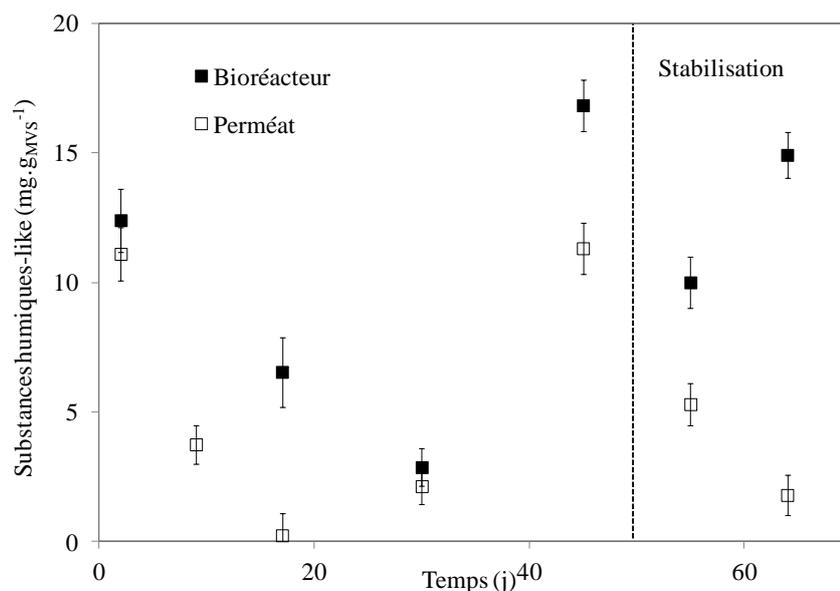


Figure 4. 9 : Evolution des concentrations en substances humiques-like extraites des PEC solubles dans le bioréacteur et le perméat au cours de l'acclimatation en ERU

La petite taille des substances humiques-like permet d'expliquer les concentrations retrouvées dans le perméat souvent proches de celles du bioréacteur. La structure des substances humiques, malgré la modernisation des techniques d'investigation, reste mal connue (Joly et al., 2000 ; Francou, 2003). Plusieurs modèles existent pour les représenter mais ils reflètent surtout la diversité de conceptions de leurs auteurs et il n'existe pas d'arguments permettant de dire que ces modèles représentent correctement les substances humiques (Burdon, 2001 ; Calvet, 2003). Cependant d'une manière générale, les substances humiques sont connues pour avoir une forte capacité à se recombinaison avec la matière organique en formant des liaisons de différentes natures avec celle-ci (Stenvenson, 1982). Cette propriété des substances humiques permettrait donc d'expliquer les périodes de l'expérience durant lesquelles elles sont

retrouvées dans des proportions plus faibles dans le perméat par une recombinaison des substances humiques avec les floccs de boues activés, les PEC solubles et le dépôt sur la membrane.

Le suivi de l'évolution des polysaccharides des PEC solubles du surnageant du bioréacteur et du perméat révèle une particularité : ils sont uniquement présents dans le bioréacteur à des concentrations inférieures à $4 \text{ mg.g}_{\text{MVS}}^{-1}$ pendant les 20 premiers jours de l'acclimatation puis ne sont plus détectés pendant 50 jours. Pendant les 20 jours les polysaccharides sont pratiquement absents du perméat ($0,3 \text{ mg.g}_{\text{MVS}}^{-1}$). Cependant ils sont continuellement mesurés dans le substrat à une concentration moyenne de $8 \pm 5 \text{ mg.L}^{-1}$. Ils contribuent seulement à hauteur de 5 % dans les PEC totaux de l'ERU. Ce pourcentage est faible par rapport à l'étude réalisée par Massé (2004) où 20 % de polysaccharides sont présents dans les PEC totaux de leur ERU provenant de l'agglomération de Toulouse.

Ainsi la concentration en polysaccharides de l'effluent semble varier de manière assez importante en fonction de son origine. Etant donné que les polysaccharides provenant du substrat ne sont pas mesurés dans la partie soluble des PEC du bioréacteur après 20 jours, la totalité des polysaccharides doit être liée aux floccs bactériens.

Dans ce cas précis, la mesure des polysaccharides des PEC liés aux floccs bactériens (annexe A.4) révèlent une concentration moyenne à l'état stable de $2,2 \pm 1,6 \text{ mg.g}_{\text{MVS}}^{-1}$ (soit environ 11 mg.L^{-1}). Ainsi l'ensemble des polysaccharides du substrat s'adsorbe sur les floccs bactériens et fait partie intégrante des PEC liés. Cette concentration légèrement supérieure à celle retrouvée dans le substrat montre qu'une petite partie des polysaccharides est directement issue du métabolisme bactérien.

Le rapport DCO/NH_4 est inférieur à 20 sur toute la durée de l'étude (moyenne à 12 ± 3). Or pour une limitation en substrat carboné ($\text{DCO}/\text{NH}_4 < 20$) la proportion de protéines augmente avec la diminution du rapport (Bura et al., 1998 ; Durmaz et Sanin, 2001). Brown et al., (1977) rappellent que dans ces conditions la production de PEC est plus grande et que les micro-organismes utilisent préférentiellement les PEC produits comme substrat pour assurer leurs besoins en énergie de maintenance. La faible part de substrat restant est alors biodégradée pour la synthèse de polysaccharides.

Les polymères les plus présents dans le surnageant de la biomasse et dans le perméat sont donc les substances humiques et les protéines.

4.2.4.2 Caractérisation des PEC solubles par CES couplée à un détecteur de fluorescence

4.2.4.2.1 Evolution au cours de l'acclimatation

Les matrices de fluorescence 3D sont obtenues pour plusieurs échantillons de PEC solubles de l'ERU, du réacteur et du perméat. Elles révèlent des pics de fluorescence aux mêmes longueurs d'onde d'excitation et d'émission obtenues pour l'analyse des PEC solubles des deux acclimations en effluent synthétique. Ainsi les empreintes chromatographiques par CES avec détection de la fluorescence sont effectuées aux couples 221/350 nm pour les protéines et 350/440 nm pour les substances humiques-like.

Le chromatogramme des protéines solubles dans le réacteur obtenu au jour 2 de l'acclimatation est superposé à celui du jour 60 correspondant à une biomasse acclimatée ainsi qu'à celui de l'effluent d'entrée (Figure 4. 10).

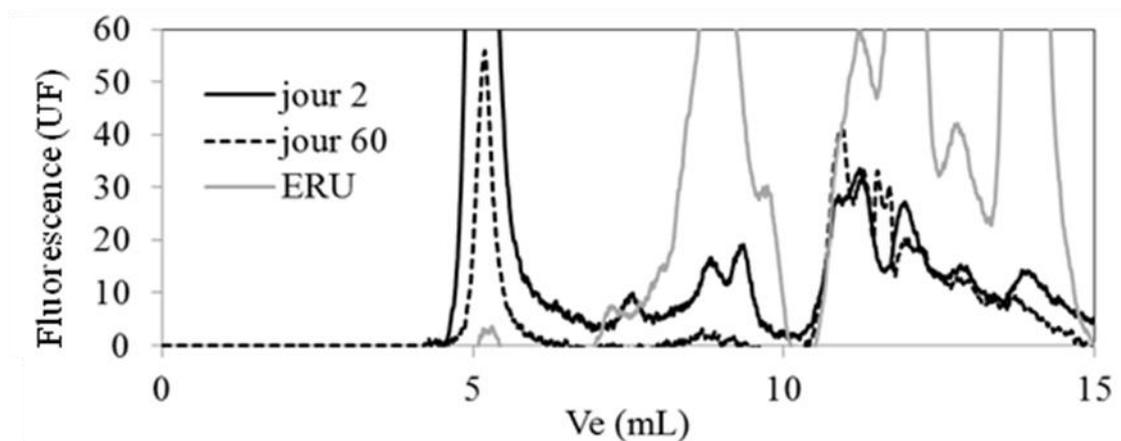


Figure 4. 10 : Evolution de l'empreinte chromatographique par CES des PEC solubles extraits du bioréacteur et de l'ERU pendant l'acclimatation avec une détection par fluorescence (221/350 nm spécifique des protéines) *UF : unité de fluorescence

Trois évolutions majeures sont identifiées pour les protéines du bioréacteur durant l'acclimatation en ERU. La première concerne une baisse d'intensité du pic éluant vers 5 mL

et correspondant aux bio-polymères de masses supérieures à 670 kDa. Les explications envisageables sont un changement de conformation des bio-polymères pouvant être influencé par la configuration du BâM (cisaillement) et le métabolisme bactérien ainsi qu'une diminution de leur concentration liée à leur biodégradation et à leur accumulation dans le dépôt à la surface de la membrane. L'analyse du chromatogramme de l'ERU montre que les bio-polymères n'existent pas dans l'effluent d'entrée et donc qu'elles ont issues de l'agglomération de polymères au sein du BâM. Jin et al., (2010) montrent également que ces fractions de hauts poids moléculaires sont exclusivement présentes dans le bioréacteur.

La deuxième correspond à la disparition des 3 pics entre 7 et 10 mL avec des masses moléculaires apparentes comprises entre 170 et 25 kDa entre le jour 2 et 60. Les hypothèses émises pour les bio-polymères sont également appropriées pour expliquer ces disparitions. En revanche, des molécules avec les mêmes volumes d'éluion sont présentes dans l'effluent d'entrée. Cette gamme de molécules participe peut-être à l'élaboration des bio-polymères.

Enfin, la dernière modification se produit dans l'amas de pics éluant après 10 mL et concerne donc les petites molécules (< 3 kDa). Des variations de la fluorescence ainsi que du nombre de pics sont constatés entre les jours 2 et 60. Ces petites protéines peuvent correspondre à des produits issus de la biodégradation et donc liées au métabolisme bactérien. Comme celui-ci évolue avec la stabilisation à un TSB de 50 jours, cette hypothèse est envisageable. Une autre hypothèse est qu'elles proviennent de l'ERU. En effet à des fluorescences beaucoup plus fortes, des protéines éluant dans la même gamme sont analysées dans l'ERU. Enfin il ne faut pas oublier que l'éluion tardive de ces molécules (après le volume de perméation) peut être lié en plus de leur faible masse aux interactions de type électrostatiques et/ou hydrophobes que les protéines entretiennent avec le matériel de la colonne.

Pour les substances humiques-like seule une baisse de fluorescence du signal est visible entre les jours 2 et 60, pouvant être due à un changement de conformation ou à des variations quantitatives (Figure 4. 11). Les deux premiers pics détectés sur les chromatogrammes des PEC solubles issus du bioréacteur ne sont pas présents dans l'ERU. Ces molécules plus grosses sont sans doute issues d'un réarrangement des substances humiques-like dans le BâM aboutissant à des structures légèrement plus grosses.

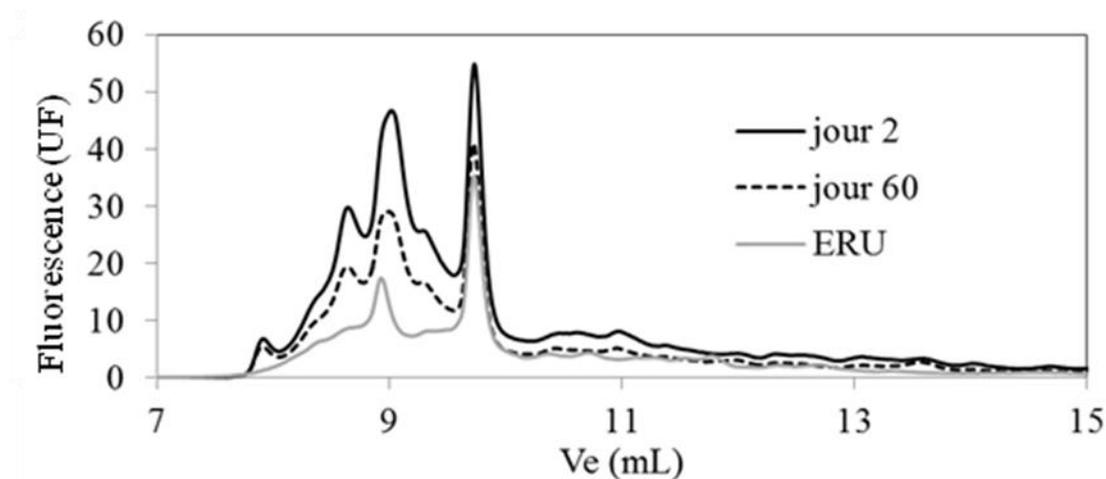


Figure 4. 11 : Evolution de l’empreinte chromatographique par CES des PEC solubles extraits du bioréacteur et de l’ERU pendant l’acclimation avec une détection par fluorescence (350/440 nm spécifique des substances humiques-like)

Le Tableau 4. 3 donne à l’état stationnaire, les masses moléculaires apparentes des protéines et substances humiques-like contenues dans les PEC solubles du bioréacteur.

La distribution de taille des protéines est clairement bimodal avec une partie avec des très hautes masses moléculaires : les bio-polymères (>670 kDa) et une partie avec de nombreuses molécules de petites masses (< 3 kDa). Cette distribution est classique des procédés de traitement des eaux usées (Garnier et al., 2005).

Tableau 4. 3 : Masses moléculaires apparentes des protéines et substances humiques-like extraites des PEC solubles du BâM stabilisé à 50 jours en ERU

Protéines		
colonne	300 Å	100 Å
Agilent Bio SEC		
Masses moléculaires	>670 kDa	2,5 kDa ; 1,6 kDa ; 1,1 kDa ; 1 kDa ; 0,8 kDa ; 0,6 kDa ; <0,4 kDa (2 pics)
Substances humiques-like		
colonne	100 Å	
Agilent Bio SEC		
Masses moléculaires	4,4 kDa ; 2,6 kDa ; 2,1 kDa ; 1,2 kDa	

4.2.5 Colmatage membranaire

4.2.5.1 Rétention membranaire des PEC solubles

Pendant la phase stationnaire de fonctionnement du BâM, l'évolution de la rétention totale des PEC solubles et spécifique aux substances humiques-like et protéines est suivie (Tableau 4. 4). La Figure 4. 12 représente les concentrations en substances humiques-like et protéines de trois prélèvements pris sur une vingtaine de jours de la phase stationnaire.

La concentration en protéines des PEC solubles extraits du bioréacteur est relativement stable en comparaison de celle des substances humiques-like. Sur la période d'étude les protéines représentent entre 25 et 43 % du contenu en PEC solubles du bioréacteur et les substances humiques-like sont majoritaires entre 57 et 75 %.

Dans le perméat, les concentrations en protéines mesurées sont quasi identiques à celles obtenues dans le bioréacteur. Leur rétention par la membrane est très faible et elle s'échelonne entre 3 % et 13 % (Tableau 4. 4). En général, dans les procédés à BA, les polysaccharides sont considérés comme les éléments structuraux fondamentaux, alors que les protéines sont localisées dans la matrice de PEC (Flemming et Wingender, 2003 ; Khor et al., 2007). En l'absence de ces polysaccharides, il est probable que la majeure partie des protéines se retrouve libre dans le milieu liquide. Etant donné qu'elles sont composées de très nombreuses molécules de petites tailles, cette hypothèse explique de manière vraisemblable leur faible taux de rétention.

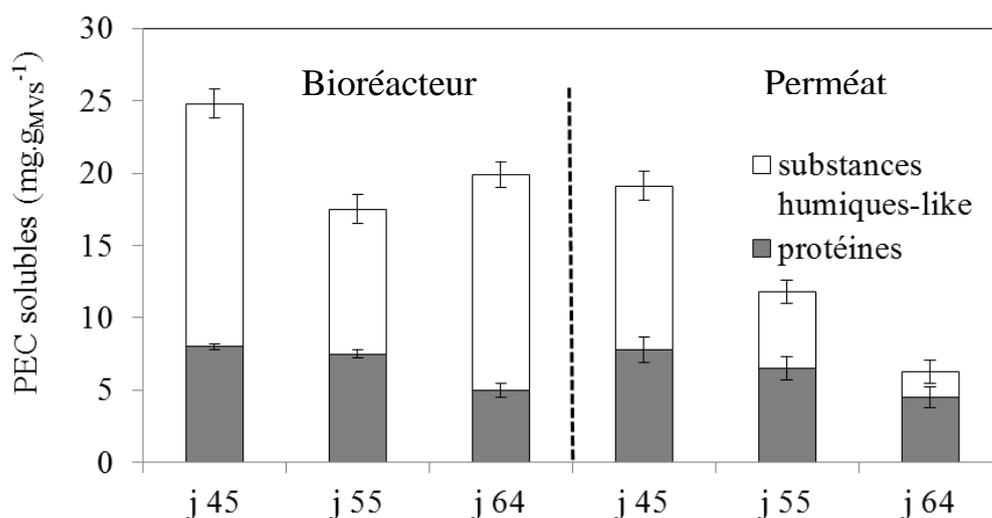


Figure 4. 12 : Evolution des concentrations en protéines et substances humiques-like du bioréacteur et du perméat à un TSB de 50 jours en ERU

Si au jour 45, la rétention des substances humiques-like est également très faible (33 %) avec une concentration dans le perméat de $11,3 \text{ mg.g}_{\text{MVS}}^{-1}$, elle augmente au cours de la phase stationnaire pour être à 47 % au jour 55 et à 88 % au jour 64. Khor et al., (2007) précise qu'avec l'établissement du colmatage dans les BâM, progressivement la taille des pores des membranes diminuent améliorant ainsi la rétention de certaines molécules organiques. L'augmentation de la rétention des substances humiques-like au cours de la phase stationnaire prouve que malgré leur petite taille, leur structure complexe et composée d'une multitude de sites d'adsorption leur permet de s'adsorber sur les floes ainsi que sur le gâteau formé à la surface de la membrane.

Ainsi au cours de cette période de stabilité la composition en PEC solubles du perméat change au profit des protéines, qui comme elles ne sont pratiquement pas retenues, deviennent le composé majoritaire au jour 64 à 71 %.

Tableau 4. 4 : Evolution des rétentions totales et spécifiques des PEC solubles au cours du temps

jour	Rétention totale (%)	Rétention PN* (%)	Rétention SH* (%)
45	23 ± 3	3 ± 1	33 ± 4
55	33 ± 2	13 ± 2	47 ± 4
64	68 ± 4	10 ± 2	88 ± 5

*PN : protéines ; SH : substances humiques-like

4.2.5.2 Masses moléculaires des fractions colmatantes

La Figure 4. 13 montre que la membrane stoppe efficacement la fraction protéique de masse moléculaire supérieure à 670 kDa. En revanche toutes les petites molécules précédemment caractérisées avec des tailles inférieures à 3 kDa passent au travers de la membrane.

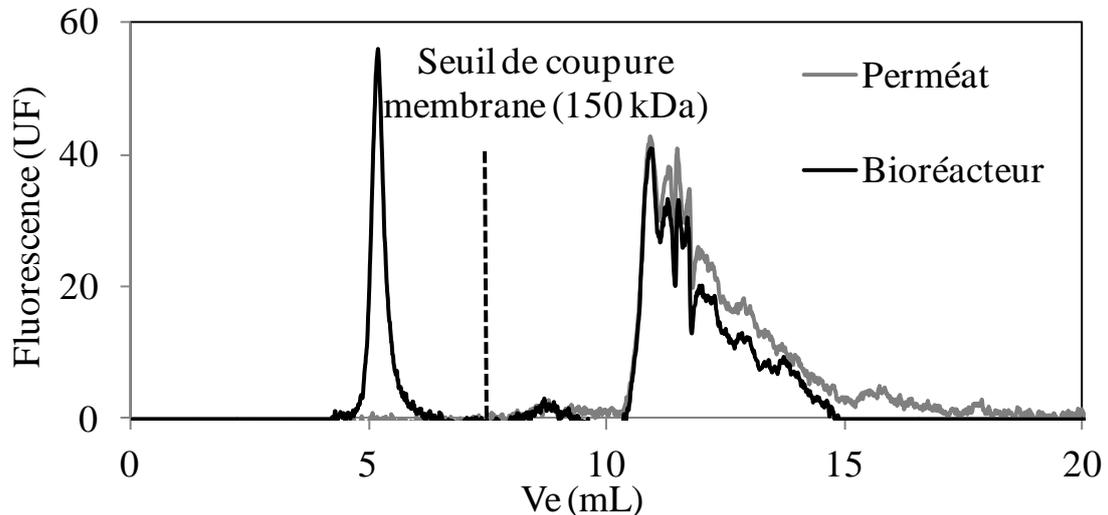


Figure 4. 13 : Chromatogrammes des protéines extraites des PEC solubles du bioréacteur et du perméat à 50 jours

L'évaluation de la rétention spécifique des protéines par la membrane (Tableau 4. 4) montre leur faible rétention de moins de 15 % tout au long de la phase stationnaire. La distribution de tailles des protéines se répartissant entre les bio-polymères (>670 kDa) et les petites protéines (<3 kDa), la rétention mesurée prouve que plus de 85 % du contenu protéique des PEC solubles du bioréacteur se compose de protéines avec des tailles inférieures à 3 kDa.

Sur cette période d'une vingtaine de jours, la rétention des protéines reste très basse. La structure de ces fractions protéiques ne semblerait donc pas favoriser leur adsorption à la surface des floes et sur le dépôt à la surface de la membrane.

En ce qui concerne les substances humiques-like, le chromatogramme les caractérisant dans le perméat est similaire à celui les représentant dans le bioréacteur (Figure 4. 11) avec cependant une baisse générale de la fluorescence. Aucune fraction caractérisant les substances

humiques-like n'est donc mieux arrêtée par la membrane qu'une autre et le perméat est donc composé des mêmes fractions que celles mesurées dans les PEC solubles du bioréacteur.

Ces résultats montrent que le processus de colmatage membranaire semble être lié aux biopolymères à fort contenu en protéines mais qui ne représentent qu'une faible partie des protéines présentes dans les PEC solubles et aux substances humiques like dont l'adsorption augmente au cours du temps.

4.2.5.3 Evolution de la perméabilité membranaire et gestion du flux

Au cours de la période d'acclimatation, la membrane a dû être lavée chimiquement (protocole de lavage à la soude puis à l'acide nitrique) deux fois aux jours 15 et 36 (Figure 4. 14). Ces lavages sont dus à l'établissement du colmatage qui s'est accéléré avec une mauvaise gestion du flux de perméat et de la PTM pendant cette période (Figure 4. 15).

En effet durant les premiers jours, dans le but d'augmenter l'apport nutritif des bactéries et donc la charge massique, le débit de perméat est augmenté de $0,75 \text{ L.h}^{-1}$ à $1,64 \text{ L.h}^{-1}$. Afin d'augmenter le débit de perméat, la PTM est progressivement élevée de 0,6 bar à 1,4 bar au jour 10. La vitesse de recirculation initialement fixée à 4 m.s^{-1} est également progressivement abaissée en fermant une vanne située après le carter membranaire et qui a pour effet d'augmenter le flux de perméat et la PTM.

Dans ces conditions non adaptées à la gestion d'un flux durable, un saut de PTM ainsi qu'une baisse brutale de la perméabilité normée de la membrane se produisent. La perméabilité initiale de la membrane est retrouvée après une succession de lavages chimiques.

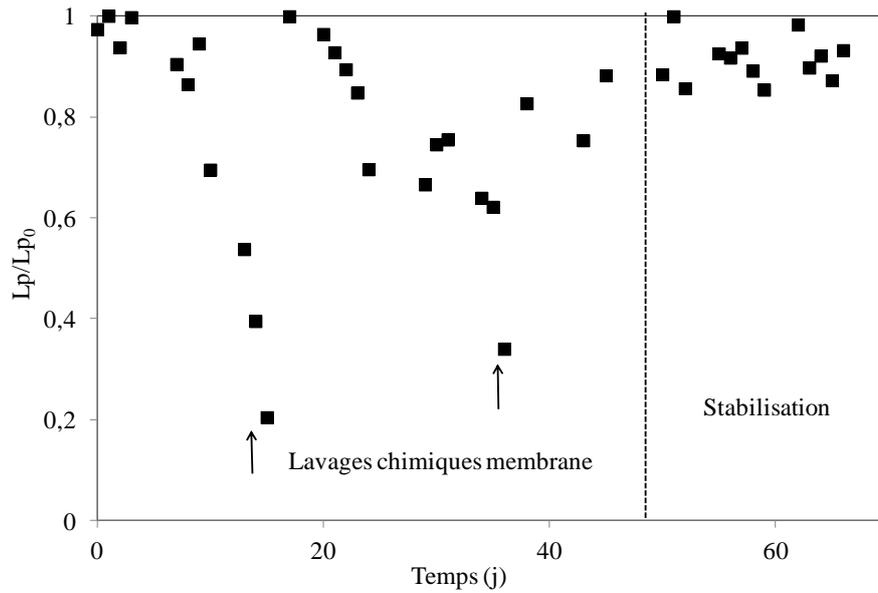


Figure 4. 14 : Evolution de la perméabilité normée de la membrane pendant l’acclimation en ERU

Après le deuxième lavage de la membrane au jour 36, le débit de perméat, la PTM ainsi que la vitesse de recirculation sont laissés fixes à respectivement $1,64 \pm 0,4 \text{ L.h}^{-1}$, $1,1 \pm 0,02 \text{ bar}$ et 4 m.s^{-1} pour éviter de reproduire ce phénomène et des purges quotidiennes sont effectuées jusqu’à atteindre la stabilité de la concentration en MVS du procédé à un âge de boues de 50 jours.

La biomasse est finalement stabilisée après une quarantaine de jours à une valeur de $5,9 \pm 0,7 \text{ g}_{\text{MVS}} \cdot \text{L}^{-1}$ pour une charge massique de $0,19 \pm 0,02 \text{ kg}_{\text{DCO}} \cdot \text{kg}_{\text{MVS}}^{-1} \cdot \text{j}^{-1}$.

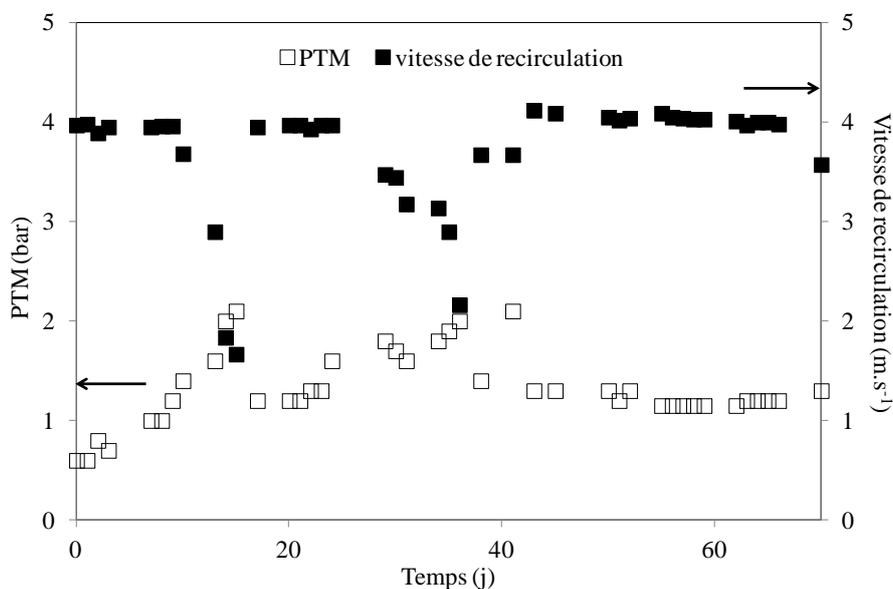


Figure 4. 15 : Vitesse de recirculation et PTM dans le BâM_E traitant un ERU

Ainsi pendant les quarante premiers jours en plus de l'effet des bio-polymères de nature protéique et des substances humiques-like sur le colmatage, celui a été accéléré par une gestion difficile des paramètres opératoires. Une fois le régime stationnaire établi, pendant trente jours le flux s'est maintenu. Afin de constater l'influence des bio-polymères et des substances humiques-like sur la perméabilité membranaire, des mesures auraient dû être faites sur une période plus longue.

4.2.6 Influence de situations stressantes

Les trois stress provoqués lors des acclimations réalisées avec un effluent synthétique sont également effectués au cours de l'acclimation réalisée avec l'ERU du Rousset. Les stress sont provoqués dans le même ordre que pour les deux autres expériences avec également une période de latence de dix jours entre chaque stress pour revenir à un procédé stable en termes de production de boues, de rendements épuratoires en ammonium et DCO et d'activités biologiques.

Le premier stress est une baisse de la Cm de 0,2 à 0,1 $\text{kg}_{\text{DCO}} \cdot \text{kg}_{\text{MVS}}^{-1} \cdot \text{j}^{-1}$ pendant une journée. Le deuxième est une hausse de la Cm de 0,2 à 0,8 $\text{kg}_{\text{DCO}} \cdot \text{kg}_{\text{MVS}}^{-1} \cdot \text{j}^{-1}$ pendant une journée également. Le dernier correspond à une coupure d'air et de substrat pendant 24 h.

La baisse de la charge massique est réalisée en diminuant le débit d'alimentation et simultanément le débit de perméat pour éviter de vidanger le bioréacteur.

Concernant le deuxième stress, la concentration en DCO étant fixée par l'effluent d'entrée, afin d'atteindre la charge massique de 0,8 $\text{kg}_{\text{DCO}} \cdot \text{kg}_{\text{MVS}}^{-1} \cdot \text{j}^{-1}$, le choix de diluer la biomasse avec de l'eau du robinet est fait pour obtenir la charge massique voulue sans modifier le débit d'alimentation fixé comme tout au long de l'acclimation à 1,64 $\text{L} \cdot \text{h}^{-1}$.

Les performances épuratrices de la biomasse ainsi que ses caractéristiques en termes d'activité et de croissance sont évaluées. L'influence de ces stress sur le relargage de PEC solubles est également étudiée. L'étude bibliographique a mis en évidence leur rôle important de ces exopolymères dans le colmatage, ainsi l'évolution de leur rétention par la membrane est caractérisée.

4.2.6.1 Evaluation des performances de la biomasse

Le Tableau 4. 5 rassemble les mesures faites lors des différents stress générés dans le bioréacteur.

Suite au premier stress (baisse de la Cm), la concentration en MVS diminue de 7 %. Face à cette baisse de charge, les bactéries autotrophes et hétérotrophes réagissent différemment.

Alors que les hétérotrophes augmentent légèrement leur activité exogène et baissent simultanément leur respiration endogène, l'exact opposé se produit pour la population autotrophe.

Le rendement d'élimination de l'ammonium est maintenu à presque 100 %, ce qui prouve une parfaite adaptation des autotrophes à cette situation qui ont diminué leur vitesse de consommation de l'ammonium et parallèlement augmenté leur respiration endogène redirigeant sans doute une partie des ressources énergétiques vers leur maintenance cellulaire.

Une légère baisse (5 %) du taux d'élimination de la DCO est constatée après le stress I. Or les bactéries hétérotrophes ne se sont pas placées dans un état de protection de leur intégrité cellulaire. Leur activité exogène a même subi une augmentation d'environ 11 %. La légère lyse cellulaire accompagnant ce stress a sans doute contribué aux relargages de molécules organiques de tailles très inférieures au seuil de coupure membranaire. Les molécules participent certainement à la mesure de DCO effectuée dans le perméat et faisant ainsi légèrement baisser le rendement d'élimination de la DCO qui est calculé à partir d'un bilan de matière entre la DCO contenue dans l'effluent d'entrée et le perméat.

Ces molécules étant parfaitement biodégradables par les micro-organismes hétérotrophes, elles ont servi de substrat aux bactéries hétérotrophes pendant ce stress.

Lors de l'augmentation de la charge massique (stress II), les hétérotrophes ont accéléré leur consommation d'oxygène de 82 % afin de dégrader l'excès de substrat présent. En même temps elles ont augmenté leur respiration endogène. Etant donné qu'une augmentation de 38 % des MVS est mesurée après le stress II, une partie importante de l'énergie produite lors de la consommation de la DCO est utilisée pour la synthèse de nouvelles bactéries hétérotrophes. La petite baisse de 5 % d'épuration de la DCO est sans doute due à l'excès de DCO pas encore dégradé ou à l'accumulation de PEC solubles issus de la croissance bactérienne dans le milieu liquide.

Il peut être affirmé que la totalité de la biomasse synthétisée est de nature hétérotrophe car les micro-organismes autotrophes se sont placés dans un état de protection.

Tableau 4. 5 : Evolution des rendements épuratoires, des MVS et des activités biologiques avec le stress appliqué pendant le traitement d'un ERU

		procédé stable	Stress I (Baisse Cm)	Stress II (Augmentation Cm)	Stress III (24 h sans air et substrat)
Taux d'élimination (%)					
DCO		97 ± 3	-5 % ± 4	-5 % ± 4	-8 % ± 3
N-NH ₄ ⁺		99 ± 1	stable	- 42 % ± 1	-1 % ± 2
Activités biologiques (mgO₂·g_{MVS}⁻¹·h⁻¹)					
Hétérotrophes	exogène	9,1 ± 1,2	+11 % ± 1	+ 82 % ± 4	+ 9 % ± 4
	endogène	1 ± 0,2	-34 % ± 3	+130 % ± 6	-20 % ± 4
Autotrophes	exogène	4,5 ± 0,3	-16 % ± 3	-100 % ± 8	+ 4 % ± 2
	endogène	0,4 ± 0,1	+88 % ± 4	+650 % ± 15	-63 % ± 6
MVS (g.L⁻¹)		5,9 ± 0,7	-7 % ± 1	+38 % ± 2	-8 % ± 2

En effet, ils ont totalement stoppé leur consommation d'oxygène dédiée à la dégradation de l'ammonium et leur respiration endogène a augmenté de 650 %. L'ammonium s'est donc accumulé dans le bioréacteur et comme cette molécule a une masse moléculaire très en dessous du seuil de coupure de la membrane, elle se retrouve dans le perméat faisant ainsi inévitablement baisser son rendement d'élimination.

Le dernier stress (stress III : 24 h sans air et nutriments) n'a eu que de très faibles conséquences sur les performances des deux types de biomasse ; elles ont très bien géré cette situation.

Une baisse de 8 % de la concentration en MVS a sans doute contribué à la diminution du taux d'élimination de la DCO et également à la légère accélération de la consommation d'oxygène par la population hétérotrophe qui a utilisé les molécules organiques libérées comme substrat.

Ce stress n'a pas eu plus de conséquences sur la biomasse autotrophe qui a maintenu une élimination de l'ammonium aux alentours de 100 %.

A chacun de ces stress provoqués, un lien étroit est constaté entre les activités des micro-organismes et la libération de PEC solubles qui dans le cas des stress I et III proviennent de la lyse cellulaire et pour le deuxième stress de la croissance directe des bactéries hétérotrophes.

Le colmatage de la membrane étant directement influencé par ces exopolymères, il paraît intéressant de les caractériser après de tels stress et de constater dans quelles mesures ils affectent le colmatage membranaire ainsi que la qualité de l'effluent de sortie.

4.2.6.2 Relargage de PEC solubles et rétention membranaire en situation de stress

Les compositions en substances humiques-like ainsi qu'en protéines des PEC solubles du bioréacteur sont mesurées après les trois stress (Figure 4. 16). Une absence totale de polysaccharides est également constatée comme tout au long de l'acclimatation.

Comme pendant la phase stationnaire du réacteur, le contenu en substances humiques-like des PEC solubles varie fortement dans le réacteur. Il passe de 21,4 mg.g_{MVS}⁻¹ pendant le stress I à 0,8 mg.g_{MVS}⁻¹ pendant le stress III. Leur concentration étant pendant les stress toujours supérieure dans l'effluent d'entrée, elles peuvent provenir de l'ERU mais également s'être détachées des PEC liés.

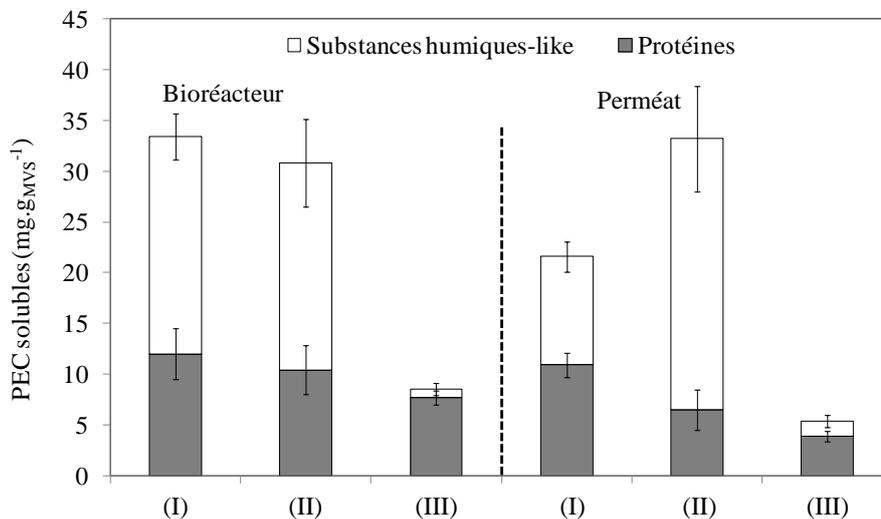


Figure 4. 16 : Evolution des concentrations en protéines et substances humiques-like du bioréacteur et du perméat à un TSB de 50 jours pendant les stress I, II et III en ERU

Si les substances humiques-like sont retenues à 50 % après le stress I (Tableau 4. 6), elles ne sont absolument pas arrêtées par la membrane dans les deux autres situations. Dans ces deux derniers cas, elles se retrouvent mêmes à des concentrations supérieures dans le perméat par rapport au bioréacteur. Des différences de structures dans le bioréacteur sont sans doute à l'origine de la variation de rétention obtenue.

Tableau 4. 6 : Evolution des rétentions totales et spécifiques des PEC solubles au cours du temps en ERU

TSB (j)	Rétention totale (%)	Rétention PN* (%)	Rétention SH* (%)
Stress I	-1 ± 2	9 ± 1	50 ± 2
Stress II	-8 ± 1	38 ± 3	-31 ± 3
Stress III	36 ± 4	49 ± 6	-88 ± 4

*PN : protéines ; SH : substances humiques-like

Pour les protéines, des rétentions toujours inférieures à 50 % sont mesurées. Elles ne sont arrêtées qu'à 9 % après le stress I. Cette rétention est toutefois du même ordre de grandeur que pour un fonctionnement stable du réacteur où les protéines solubles mises en évidence à la fois dans le réacteur et l'ERU ont des masses moléculaires inférieures à 3 kDa. Ainsi pour les stress II et III la rétention des protéines se trouve améliorée par rapport aux conditions normales de fonctionnement. Après ces stress, la structure des protéines solubles relarguées pourrait faciliter leur agglomération sous forme de bio-polymères et donc présenter des propriétés plus colmatantes qu'en condition stables.

D'une manière générale, la membrane n'est pas une barrière efficace pour la rétention des PEC solubles en conditions de stress. En effet lors des stress I et II davantage de PEC solubles sont mesurés dans le perméat par rapport au contenu du bioréacteur. Et dans le cas du stress III une rétention de 36 % seulement est obtenue. Ces résultats de baisse de rétention sont en accord avec les travaux menés par Garnier et al., (2005) qui prouvent que pendant certaines situations de dysfonctionnement du procédé des molécules de petites tailles sont libérées. Lebegue (2008a) énonce le même résultat après une importante variation de pH et d'augmentation de charge organique qui contribue à la présence de PMS de faibles masses moléculaires. Cependant dans son étude, ces petites fractions sont mieux retenues par la membrane.

4.2.7 Conclusion

Dans ce chapitre, le Bàm_E s'est révélé être un procédé approprié pour le traitement conjoint de la DCO et de l'ammonium. Une phase d'adaptation très courte (une dizaine de jours) est suffisante aux bactéries autotrophes pour aboutir à un traitement efficace de l'ammonium. Elles sont donc très performantes en conditions cisailantes et possèdent une activité exogène spécifique supérieure à la biomasse autotrophe provenant initialement de la station du Rousset à l'état stationnaire.

Le modèle de mort-régénération avec le terme correspondant à la présence d'une fraction inerte détermine très bien la production de boues du procédé.

Une des particularités de l'effluent d'entrée de la STEP du Rousset est sa très faible teneur en polysaccharides qui une fois dans le bioréacteur viennent se lier aux floccs bactériens. Ainsi les PEC solubles du Bàm sont totalement dépourvus de polysaccharides. Le rapport DCO/NH₄⁺ inférieur à 20 semble expliquer le faible contenu en polysaccharides de l'ERU.

Cette absence de polysaccharides dans le bioréacteur, lien matriciel nécessaire pour maintenir liés les amas de PEC, n'est pas sans conséquence. Près de 85 % des protéines extraites des PEC solubles ont des masses moléculaires inférieures à 3 kDa qui en l'absence de polysaccharides passent aisément au travers des pores de la membrane. Leur rétention est ainsi très faible tout au long de l'acclimatation (inférieure à 15 %).

Les substances humiques-like proviennent principalement de l'ERU et leur rétention semble s'améliorer pendant la période de stabilité du réacteur.

La fraction de PEC solubles qui influence le colmatage se trouve être majoritairement composé des bio-polymères de très hautes masses moléculaires ainsi que des substances humiques-like.

Par deux fois durant l'acclimatation, la membrane a dû subir des lavages chimiques intensifs en raison d'une mauvaise gestion du flux mais également du colmatage de la membrane.

Enfin le système a également été suivi pendant des conditions instationnaires entraînant des variations de charges massiques ainsi qu'un arrêt complet du système (*e.g.* absence d'oxygène et de nutriments).

La biomasse hétérotrophe s'est parfaitement adaptée à l'ensemble des stress provoqués en épurant toujours plus de 90 % de la DCO entrante. Les baisses du taux d'épuration sont uniquement dues à la présence accrue de PEC solubles dans le bioréacteur suite à une lyse de la biomasse ou dans le cas d'une augmentation de la charge massique à une production plus importante de PMS solubles.

Concernant les autotrophes souvent jugées comme une population sensible à toute modification environnementale, elles ont très bien résistées à la baisse de la charge massique et l'absence d'air et de nutriments de 24 h. En revanche une inhibition totale de leur activité exogène spécifique ainsi qu'une très forte augmentation de leur respiration endogène ont été les résultats d'une charge massique multipliée par quatre. Ce résultat atteste de l'effet inhibiteur de fortes concentrations en ammonium sur les performances des autotrophes.

Une autre conséquence de ces stress a été une variation importante de la qualité du perméat. La barrière membranaire s'avère être totalement inefficace pour retenir les PEC solubles relargués après les trois stress.

CHAPITRE 5 : Impact de la nature du substrat sur les performances et le colmatage d'un Bàm à l'état stationnaire et en conditions de stress.

5.1 Les performances globales du BâM

Les performances globales du BâM lors d'un fonctionnement avec l'ES type eaux usées urbaines et l'ERU sont récapitulées dans le Tableau 5. 1. L'utilisation du même pilote avec les mêmes paramètres opératoires pour ces deux campagnes expérimentales, ainsi que le maintien des Cm en DCO et en ammonium au même ordre de grandeur permettent de faire une comparaison de ces deux expériences.

Tableau 5. 1 : Influence de la nature de l'effluent d'entrée sur les performances globales du BâM_E

	Effluent synthétique (ES)	ERU
Cm DCO (kg_{DCO}.kg_{MVS}⁻¹.j⁻¹)	0,21 ± 0,02	0,19 ± 0,02
Cm N-NH₄⁺ (kg_{N-NH₄⁺}.kg_{MVS}⁻¹.j⁻¹)	0,016 ± 0,003	0,014 ± 0,008
Rendements épuratoires (%)		
DCO	96 ± 3	97 ± 3
N-NH ₄ ⁺	77 ± 4	99 ± 1
Activités biologiques (mg_{O₂}.g_{MVS}⁻¹.h⁻¹)		
Hétérotrophes : Exogène	49,3 ± 3,6	9,1 ± 1,2
Endogène	1,7 ± 0,4	1 ± 0,2
Autotrophes : Exogène	0,9 ± 0,2	4,5 ± 0,3
Endogène	2,1 ± 0,5	0,4 ± 0,1
Y obs (kg_{MVS}.kg_{DCO}⁻¹)	0,14 ± 0,1	0,17 ± 0,2

Pour une épuration identique de la DCO, l'activité des hétérotrophes du BâM fonctionnant avec l'ES est cinq fois supérieure à celle obtenue pour le traitement de l'ERU. Même si les charges massiques en DCO sont quasi identiques, l'ES se compose uniquement de glucose qui est facilement biodégradable, ce qui n'est pas le cas de l'ERU. En effet bien qu'il soit considéré comme biodégradable (rapport DCO/DBO₅ = 2,9), environ 65 % de la DCO n'est que lentement biodégradable. Ainsi si les charges massiques sont calculées par rapport à la concentration en DBO de l'effluent, celle de l'effluent synthétique (0,21 ± 0,02 kg_{DBO}.kg_{MVS}⁻¹.j⁻¹) devient quasiment deux fois supérieure à celle de l'ERU (0,11 ± 0,02 kg_{DBO}.kg_{MVS}⁻¹.j⁻¹).

La différence des activités hétérotrophes constatées pendant le traitement de ces deux types d'effluent provient donc en partie de l'apport double de DBO dans le cas de ES. De plus la

respiration endogène des hétérotrophes pour la campagne réalisée en ES est pratiquement deux fois supérieure à celle des hétérotrophes en ERU. L'apport plus important en substrat dans le cas de l'ES a permis un meilleur développement de la biomasse active.

C'est à cause des limites du procédé que le même apport en DBO n'a pu être fait. Cependant les rendements de production de boues obtenus dans les campagnes expérimentales en ER ($0,17 \text{ kg}_{\text{MVS}} \cdot \text{kg}_{\text{DCO}}^{-1}$) et en ES ($0,14 \text{ kg}_{\text{MVS}} \cdot \text{kg}_{\text{DCO}}^{-1}$) sont très proches. La faible différence peut avoir plusieurs origines. La première est liée à la présence d'une fraction inerte dans la biomasse qui provient de l'ERU mais également de la fraction non hydrolysable issue de la mort bactérienne. La seconde a peut être un lien avec une variation du taux de décès de la biomasse ainsi que des taux d'hydrolyse des PEC. L'impact de la DCO particulaire considérée comme inerte de l'ERU sur Y_{obs} est très faible et à un TSB de 50 j, la plupart de cette DCO n'est pas inerte mais lentement hydrolysable.

Ainsi avec des rendements de productions de boues quasi identiques, et une même élimination de la DCO, il peut être affirmé que la plupart de la DCO contenue dans l'ERU est biodégradable à 50 jours par la biomasse.

L'évolution du métabolisme bactérien lors d'un apport croissant en substrat est bien connue. Les besoins en oxygène liés à la dégradation du substrat sont proportionnels à l'apport en substrat. En effet, tout d'abord, sans apport exogène seuls les besoins pour la respiration endogène subsistent (maintenance et catabolisme seuls). Puis, au fur et à mesure que l'apport de substrat augmente, les besoins de maintenance s'accroissent avec le regain d'activité (développement de la biomasse active) pour permettre ensuite avec un apport de substrat plus important, à la voie de synthèse cellulaire (anabolisme) de se mettre en place impliquant une demande énergétique plus grande et donc, une respiration plus importante.

L'activité des hétérotrophes en ES obtenue est très forte en comparaison des valeurs tirées de la bibliographie (Tableau 5. 2).

Tableau 5. 2: Caractéristiques principales du substrat utilisé pour la détermination de l'activité exogène hétérotrophe

Substrat	Concentration ($\text{g}_{\text{substrat}} \cdot \text{g}_{\text{MVS}}^{-1}$)	Activité exogène hétérotrophe ($\text{mg}_{\text{O}_2} \cdot \text{g}_{\text{MVS}}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$)	Référence
Glucose	0,3	49,3	Cette étude
Glucose	0,3	10,6	Clouzot (2009)
Glucose	0,01	3,4	Han (2005)
Acétate	-	47	Liang (2010)

La valeur mesurée dans cette étude est comparable à l'activité des hétérotrophes ($10,6 \text{ mg}_{\text{O}_2} \cdot \text{g}_{\text{MVS}}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$) de la campagne expérimentale réalisée par L. Clouzot (2009) dans un BâM_E pour une charge identique ($0,2 \text{ kg}_{\text{DCO}} \cdot \text{kg}_{\text{MVS}}^{-1} \cdot \text{j}^{-1}$ réalisée avec du glucose), car le protocole respirométrique utilisé est strictement identique au notre. L'auteur explique que lors de la campagne expérimentale, le substrat synthétique n'était pas assez souvent renouvelé. Ainsi sa dégradation dans le bac d'alimentation a pu favoriser l'apparition de métabolites inhibiteurs de la biomasse et donc influencer la valeur d'activité hétérotrophe obtenue.

Malheureusement étant donné la variété de protocoles (nature du substrat et concentration) employés pour évaluer l'activité respirométrique de la biomasse il apparaît que toute comparaison semble hasardeuse (Tableau 5. 2). De plus aux vues des concentrations en DCO appliquées afin de mesurer l'activité hétérotrophe, certaines études ne se trouvent pas dans le cas d'une activité exogène maximale alors que c'est le cas dans cette étude.

Ainsi une uniformisation des protocoles respirométriques semble nécessaire afin de pouvoir comparer les différents travaux de la littérature et de pouvoir évaluer l'impact des paramètres opératoires et des conditions environnementales sur les activités biologiques de biomasses utilisées pour le traitement d'eaux usées urbaines.

Concernant l'influence de la nature de l'effluent sur les autotrophes et leur épuration de l'ammonium, l'étude du Tableau 5. 1 révèle un meilleur développement de la biomasse autotrophe (activité exogène de $4,5 \text{ mg}_{\text{O}_2} \cdot \text{g}_{\text{MVS}}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$) avec une élimination du N-NH_4^+ proche de 100 % dans le cas de l'ERU alors que pour l'ES l'ammonium n'est dégradé qu'à 77 % avec une activité autotrophe très faible ($0,9 \text{ mg}_{\text{O}_2} \cdot \text{g}_{\text{MVS}}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$). L'impact des forts cisaillements liés à l'utilisation d'un BâM_E sur les performances des autotrophes semble donc négligeable

et ne permet pas d'expliquer la baisse de rendement épuratoire en ammonium constatée lors du fonctionnement du pilote avec un ES. Mais seule une étude comparative B_àM_E/B_àM_I avec un ERU aurait pu confirmer cette hypothèse. En effet bien que l'épuration de l'ammonium soit totale dans les conditions testées en ERU, il n'est pas improbable que l'activité spécifique exogène des autotrophes soit supérieure dans un B_àM_I dans les mêmes conditions. Il est envisageable que les autotrophes utilisent une partie de l'énergie pour résister aux fortes contraintes de cisaillement du B_àM_E.

Une limitation de la nitrification par un manque de carbone inorganique (CI) est rarement prise en compte dans la littérature étant donné qu'il se trouve être présent en abondance dans les eaux usées et que le CO₂ produit par les hétérotrophes lors de l'oxydation de la DCO apporte le complément éventuel nécessaire à une nitrification efficace (Guisasola, 2007).

A un pH proche de la neutralité, la plupart du CI total présent dans le système se trouve sous la forme d'hydrogénocarbonate HCO₃⁻. 8,7 mg.L⁻¹ de HCO₃⁻ sont nécessaires pour oxyder 1 mg.L⁻¹ d'ammonium en nitrates. L'ERU du Rousset étant en moyenne composée de 480 mg.L⁻¹ de HCO₃⁻ et de 30 mg.L⁻¹ de N-NH₄⁺, la quantité de CI de l'effluent est plus que suffisante pour obtenir une nitrification complète. C'est l'une des raisons pour lesquelles avec un fonctionnement à faible Cm que les études réalisées avec des B_àM en condition de traitement d'effluents urbains réels obtiennent souvent des rendements d'élimination de l'ammonium proches de 100 % (Huang et al., 2001 ; Pollice et al., 2008 ; Braclow et al., 2010).

Dans de nombreuses études (Han et al., 2005 ; Liang et al., 2010 ; Feng et al., 2012), l'ES se compose d'eau du robinet dans laquelle une source de carbone organique est mélangée avec une source d'ammonium, de phosphate et différents sels minéraux. Pour Aix en provence la moyenne de la concentration en hydrogénocarbonate pour l'année 2011/2012 est de 181 mg.L⁻¹. Cette concentration en hydrogénocarbonate est insuffisante pour éliminer totalement l'ammonium de l'ES si sa concentration est au dessus de 21 mg_{N-NH₄⁺}.L⁻¹. L'apport en CI à destination du traitement de l'ammonium est donc négligé.

Le seul apport en CI est généralement effectué pour réguler le pH à une valeur proche de la neutralité, soit à partir d'un contrôleur de pH, soit par ajout direct du CI dans l'ES comme dans notre étude. Dans la plupart des études des solutions de NaHCO₃ (Guo et al., 2007 ;

Clouzot et al., 2011) ou Na_2CO_3 ou CaCO_3 (Fu et al., 2009) sont employées. Cependant dans de nombreux travaux la régulation de pH est faite sans préciser le composé chimique utilisé (Holler et al., 2001 ; Han et al., 2005) ou elle n'est même pas mentionnée (Liang et al., 2010 ; Feng et al., 2012).

Notre étude avec un ES est volontairement effectuée en n'ajoutant qu'une concentration faible de NaHCO_3 pour participer à la régulation du pH mais sans influencer la nitrification. Le but étant de se mettre dans la même situation que de nombreuses études en position de limitation en CI pour la nitrification. Pour notre ES la concentration en hydrogénocarbonate est de 326 mg.L^{-1} , cette concentration est faible par rapport au 1000 mg.L^{-1} qu'il aurait fallu pour dégrader les $115 \text{ mg}_{\text{N-NH}_4^+}.\text{L}^{-1}$ présents en moyenne dans l'ES à l'état stable.

A un TSB de 50 jours, comme montré dans le chapitre 3, partie 3.1.3.2 l'ammonium est éliminé à 77 % avec une activité autotrophe très faible. L'activité des hétérotrophes et la libération de CO_2 via l'oxydation du carbone organique montrent une influence sur l'activité des autotrophes et leur taux d'élimination de l'ammonium. Mais la concentration en CO_2 libérée est insuffisante pour obtenir une nitrification complète. Un ajout en carbone inorganique aurait du être fait à la fin de cette expérience afin de vérifier la véracité de cette hypothèse mais une casse mécanique ainsi qu'une perte de la biomasse acclimatée l'ont empêché.

Les études qui ne mentionnent ni un contrôle du pH, ni un ajout de carbone inorganique obtiennent des abattements en ammonium légèrement plus faibles que notre étude à 69 % pour Liang et al., (2010) et 75 % pour Feng et al., (2012) au même âge de boues de 20 jours. Il peut être supposé que le CO_2 libéré par les hétérotrophes est certes utilisé par les autotrophes mais également consommé par les H_3O^+ relargués lors de l'acidification du milieu due à la nitrification.

Au contraire les études ayant maintenu à la neutralité le milieu et dont la C_m est comprise entre 0,1 et $0,2 \text{ kg}_{\text{DCO}}.\text{kg}_{\text{MVS}}^{-1}.\text{j}^{-1}$ obtiennent de meilleurs rendements d'élimination. C'est le cas de l'étude réalisée par Han et al (2005) où 94 % de l'ammonium est biodégradé à un TSB de 50 jours. Fu et al., (2009) ainsi que Clouzot et al., (2011) trouvent également de meilleurs rendements à respectivement 84 et 85 %.

Le manque de carbone inorganique influence clairement l'activité des autotrophes. En effet elle est de $4,5 \text{ mg}_{\text{O}_2} \cdot \text{g}_{\text{MVS}}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ dans notre étude en ER ce qui correspond au même ordre de grandeur que d'autres études en ER (Huang et al., 2001 ; Pollice et al., 2008). Alors qu'en ES sous limitation en CI, leur activité n'est plus que de $0,9 \text{ mg}_{\text{O}_2} \cdot \text{g}_{\text{MVS}}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ soit une chute de 80 % de leur activité. Dans le cas du traitement d'ES avec une régulation du pH, Clouzot et al., (2011) retrouve des valeurs proches de celles mesurées en ER ($5,6 \text{ mg}_{\text{O}_2} \cdot \text{g}_{\text{MVS}}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$).

5.2 La caractérisation du milieu biologique

5.2.1 PEC solubles

Les concentrations moyennes de chacun des polymères solubles présents dans les substrats et les bioréacteurs durant la phase stationnaire des acclimations réalisées en ES et ERU sont résumées dans la Figure 5. 1.

La concentration moyenne en polysaccharides de l'ES n'est volontairement pas représentée. En effet, le carbone organique utilisé pour l'ES étant du glucose, la majeure partie des polysaccharides mesurés dans l'ES est directement liée à la présence du glucose dans l'effluent. La part liée à la présence de bactéries et à la dégradation du substrat est considérée comme faible par rapport à la concentration en glucose.

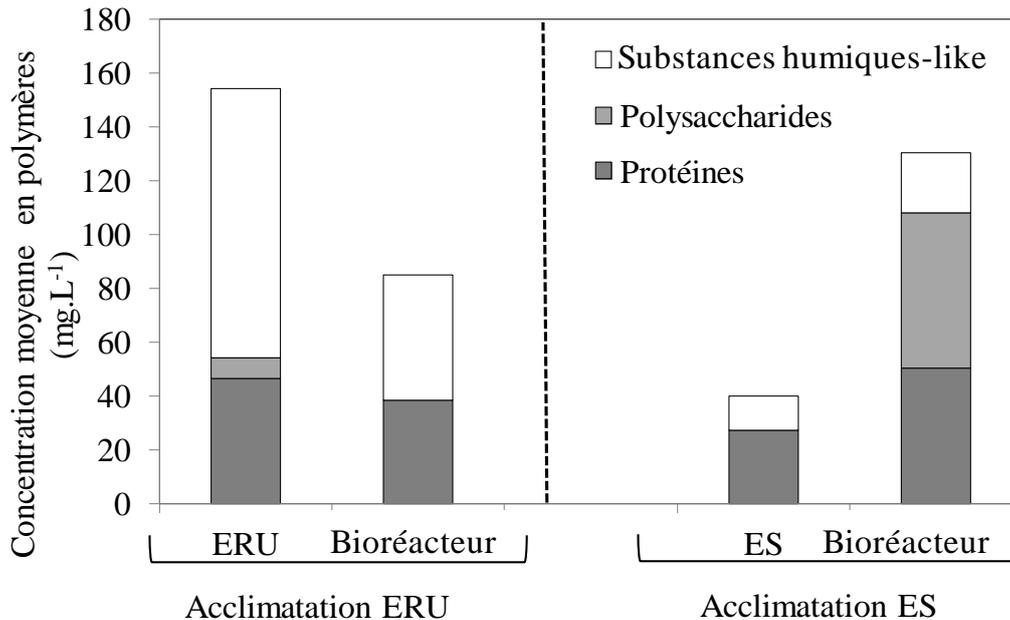


Figure 5. 1 : Evolution des concentrations moyennes en polymères dans les substrats et les boues

L'apport total de polymères par l'ES est faible (40 mg.L⁻¹) et ne représente qu'environ le quart de celui provenant de l'ERU (155 mg.L⁻¹). Les polymères de l'ERU se composent majoritairement de substances humiques-like (65 %) alors que ceux de l'ES contiennent surtout des protéines (63 %). La forte teneur en substances humiques-like de l'ERU s'explique simplement par le fait que les eaux usées urbaines sont en contact avec les sols et les déchets où une dégradation de la matière organique a lieu. Cependant il n'est pas à exclure que la composition de l'ERU peut aussi conduire la biomasse à modifier une partie des molécules et à générer plus facilement des substances humiques-like.

En ce qui concerne les PEC solubles des boues, ils présentent des proportions en polymères différentes de ceux des substrats et également des proportions différentes entre eux.

Les PEC solubles les plus présents dans la biomasse de l'acclimatation en ES sont les protéines à 38 % (50 mg.L⁻¹) et les polysaccharides à 46 % (58 mg.L⁻¹). La concentration en protéines est plus grande dans les PEC solubles de la biomasse que dans l'ES. Cela montre bien en plus de l'apport de l'ES, une production de protéines en lien avec le métabolisme microbien sous forme soluble dans le bioréacteur. Etant donné que le glucose est un substrat

facilement biodégradable, les polysaccharides majoritairement mesurés dans le surnageant de la boue en ES peuvent être reliés aux PEC solubles et à une origine bactérienne. Quant aux substances humiques-like, leur concentration est 40 % plus élevée dans les PEC solubles du bioréacteur alimenté en ERU (22 mg.L⁻¹) que dans le bioréacteur alimenté par l'ES (13 mg.L⁻¹).

Contrairement à l'acclimatation réalisée avec l'ES où la concentration totale en PEC solubles augmente entre l'ES et le bioréacteur, celle du bioréacteur réalisée pendant la campagne expérimentale en ERU baisse par rapport à celle de l'ERU. Les PEC solubles du Bàm ne contiennent pas de polysaccharides, les concentrations en protéines et substances humiques-like ont baissé respectivement de 8 mg.L⁻¹ et 53 mg.L⁻¹. Les polysaccharides de l'effluent se trouvent totalement adsorbés sur les floccs car le perméat ne contient pas de polysaccharides. Les polysaccharides de l'effluent ont donc des tailles supérieures au seuil de coupure de la membrane de 150 kDa. La baisse du contenu en substances humiques-like de l'ERU vers le bioréacteur peut être due à divers phénomènes que sont leur adsorption sur les floccs, leur participation au contenu des PEC liés, leur élimination par la purge quotidienne et leur passage à travers la membrane car leurs tailles sont inférieures à 5 kDa. Concernant les protéines, très certainement une sécrétion active de la part de la biomasse doit avoir lieu mais elle est sans doute masquée par le fait qu'une grande partie n'est pas retenue par la membrane. Le tableau 4.4 du chapitre 4 montre que les protéines ne sont retenues qu'entre 3 et 13 % par la membrane ce qui signifie que plus de 85 % des protéines sont de petites tailles.

Les Tableaux 5.3 et 5.4 donnent la répartition des poids moléculaires des protéines et substances humiques-like des substrats et des bioréacteurs durant les deux campagnes expérimentales.

Pour les protéines (Tableau 5. 3), une caractéristique de l'ES est qu'il ne se compose que de petites protéines (<5 kDa) alors que l'ERU contient une fraction à >670 kDa jusque là considérée comme uniquement présente dans les Bàm, une fraction à 50 kDa et une multitude de petites protéines. L'ERU étant un milieu plus complexe que l'ES, il contient plus de substances humiques, de cations divalents qui peuvent participer à la création de plus grosses structures dans lesquels des protéines peuvent s'agglomérer.

Cependant cette répartition s'inverse totalement dans le BâM où les protéines de l'acclimatation avec un ES se compose de trois fractions de grandes tailles (>670 kDa ; 330 kDa ; 41 kDa) alors qu'il ne reste que celle supérieure à 670 kDa dans le cas du BâM alimenté par l'ERU.

Un plus grand nombre de petites fractions (<2,5 kDa) de nature protéique est observée dans le BâM alimenté avec l'ERU (8 fractions) en comparaison de celui nourri avec l'ES (5 fractions).

Tableau 5. 3 : Distributions des masses moléculaires apparentes des protéines extraites des PEC des substrats et bioréacteurs

	Type d'effluent	Distribution des masses moléculaires apparentes des protéines
Substrat	ES	4,6 kDa ; 0,8 kDa ; <0,4 kDa (6 pics)
	ERU	>670 kDa ; 50 kDa ; 2,5 kDa ; 1,1 kDa ; < 0,4 kDa (9 pics)
Bioréacteur	ES	>670 kDa ; 330 kDa ; 41 kDa ; 2,5 kDa ; 1,3 kDa ; 1,1 kDa ; <0,4 kDa (2 pics)
	ERU	>670 kDa ; 2,5 kDa ; 1,6 kDa ; 1,1 kDa ; 1 kDa ; 0,8 kDa ; 0,6 kDa ; <0,4 kDa (2 pics)

En ce qui concerne les substances humiques-like (Tableau 5. 4) celles de l'ES se composent d'un grand nombre de petites fractions (7 fractions) alors que l'ERU possède une distribution bimodale de ces substances humiques-like.

Si ces fractions sont encore plus nombreuses et plus petites dans le BâM alimenté avec l'ES, celles concernant le pilote avec l'ERU contiennent deux fractions de tailles quasi identiques aux fractions de substances humiques-like retrouvées dans l'ERU ainsi que de deux fractions plus grosses et qui n'existent pas dans l'ERU. Ces deux nouvelles fractions de 4,4 et 2,6 kDa sont donc générées dans le bioréacteur et certainement reliées à des phénomènes d'adsorption des substances humiques-like. De plus les concentrations en cations divalents Ca^{2+} ($100 \pm 10 \text{ mg.L}^{-1}$) et Mg^{2+} ($13 \pm 3 \text{ mg.L}^{-1}$) de l'ERU sont plus fortes que celles fixées dans l'ES à $4 \text{ mg}_{\text{Ca}^{2+}} \cdot \text{L}^{-1}$ et $13 \text{ mg}_{\text{Mg}^{2+}} \cdot \text{L}^{-1}$. Or les substances humiques-like peuvent former des

complexes stables avec ces cations. Ainsi la présence d'une plus grande quantité de cations divalents peut favoriser l'agglomération des substances humiques-like.

Tableau 5. 4 : Distributions des masses moléculaires apparentes des substances humiques-like extraites des PEC des substrats et bioréacteurs

	Type d'effluent	Distribution des masses moléculaires apparentes des substances humiques-like
Substrat	ES	2,6 kDa ; 2,1 kDa ; 1,2 kDa ; < 0,9 kDa (4 pics)
	ERU	2,4 kDa ; 1,2 kDa
Bioréacteur	ES	1,9 kDa ; 1,6 kDa ; 1,2 kDa ; <0,9 kDa (6 pics)
	ERU	4,4 kDa ; 2,6 kDa ; 2,1 kDa ; 1,2 kDa

5.2.2 Taille des floccs

A l'état stationnaire, le diamètre moyen des floccs de la campagne expérimentale faite avec l'ERU est de $35 \pm 4 \mu\text{m}$ alors que le d_{50} est de $78 \pm 6 \mu\text{m}$ lorsque l'ES est utilisé pour alimenter le pilote.

Ce résultat est contradictoire avec les concentrations en cations Ca^{2+} et Mg^{2+} qui sont plus grandes dans l'ERU. En effet de plus importantes quantités de Mg^{2+} ou Ca^{2+} favorisent l'agrégation des floccs en formant des ponts avec les groupements fonctionnels chargés négativement des PEC. Une des hypothèses permettant d'expliquer la plus petite taille des floccs de l'acclimatation en ERU réside donc dans la structure des PEC et notamment dans le nombre de sites fonctionnels chargés négativement permettant la création de liaisons entre les amas bactériens. De plus la concentration totale en PEC solubles est plus faible dans le bioréacteur alimenté avec un ERU avec moins de protéines et une absence totale de polysaccharides. Ainsi peut être que les floccs du BâM avec l'ERU ne peuvent être plus gros en raison d'un manque de PEC solubles et donc de sites chargés négativement pour créer ces liens entre les amas bactériens. Enfin, une dernière possibilité pour expliquer cette taille plus faible des floccs en ERU est la forte présence de cations monovalents telles que Na^+ et K^+ qui peuvent se fixer aux sites chargés négativement des PEC solubles sans avoir la possibilité de former des ponts entre les

amas bactériens. Malheureusement seules des mesures de concentrations en cations monovalents de l'ERU auraient permis de valider cette hypothèse.

D'autres caractéristiques liées à la nature de l'effluent et du milieu biologique permettent d'apporter une explication à ce phénomène.

Les polysaccharides sont totalement absents sous forme soluble dans le Bàm. Or ces polymères peuvent servir d'agent flocculant et induire une élévation de la taille des floccs lorsqu'ils sont présents en forte quantité.

Massé (2004) montre qu'avec une augmentation de la concentration en MES de 5,5 à 7,8 g.L⁻¹, le d₅₀ s'élève de 80 à 95 µm. La concentration en MES du Bàm dans le cas de l'acclimatation en ERU est de 7,6 g.L⁻¹ et de 9,1 g.L⁻¹ pour la campagne réalisée avec un ES. La variation de MES entre les deux expérimentations influence donc certainement le diamètre moyen des floccs.

Les caractéristiques structurelles de la source de carbone organique utilisée en tant que substrat révèle un impact sur la taille des floccs. Grabinska-Loniewska (1991) démontre que les BA alimentées avec des acides faibles présentent de très larges floccs, alors que les BA nourries avec des alcools montrent des tailles identiques aux floccs de STEP conventionnelles. Macadam et al (2007) confirment en ajoutant que les biomasses nourries avec de l'acide acétique montrent une production de gros floccs à structure lâche très sensible aux forts cisaillements alors qu'avec de l'éthanol les floccs plus compacts sont également plus résistants à un cisaillement plus poussé. Par conséquent, des auteurs tels que Holakoo et al., (2007) utilisent préférentiellement le glucose pour nourrir la biomasse de leur Bàm_I plutôt que l'acétate afin d'éviter tout risque de colmatage supplémentaire par la libération d'une multitude de petites particules. C'est également ce qui a orienté le choix du glucose comme source de carbone organique pour les acclimatations réalisées en ES dans cette étude.

Ainsi la nature de la source de carbone organique de l'ERU peut expliquer la présence de floccs beaucoup plus petits que ceux de l'acclimatation en ES.

5.2.3 Influence des stress sur le milieu biologique

La Figure 5. 2 compare les concentrations en PEC solubles des Bàm après les trois stress identiques provoqués durant les campagnes expérimentales en ERU et ES. Les Tableaux 5.5 et 5.6 donnent la distribution de masses moléculaires apparentes des protéines et substances humiques-like libérées.

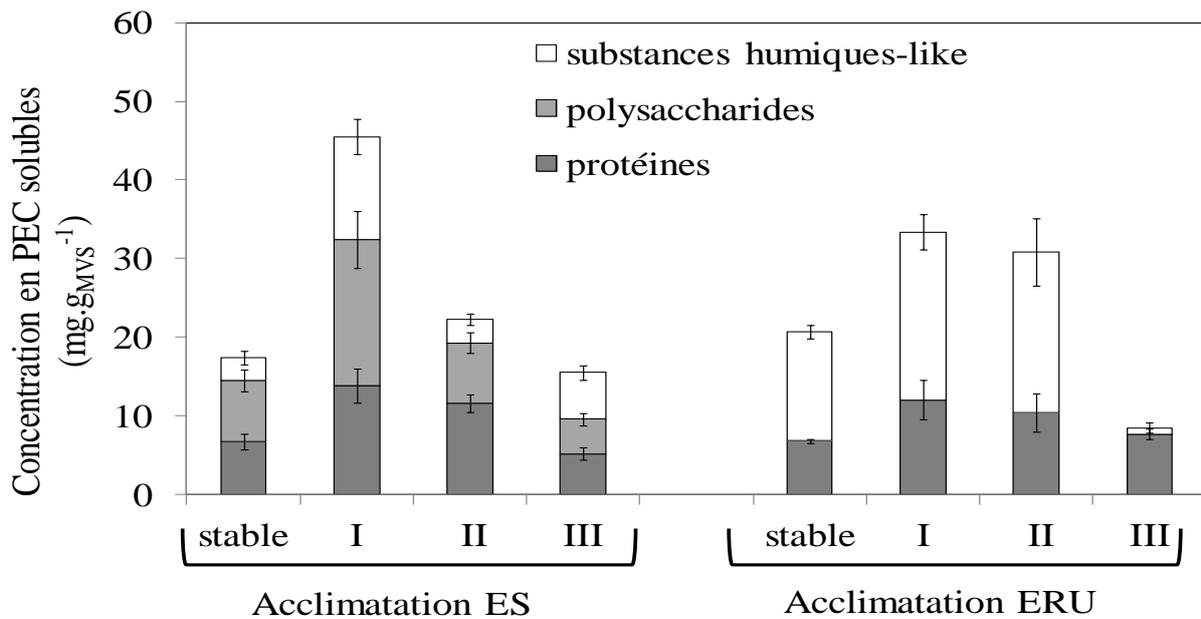


Figure 5. 2 : Evolutions des concentrations en PEC solubles dans les bioréacteurs durant les périodes stationnaires et de stress

Si la comparaison de l'évolution de la concentration en polysaccharides solubles ne peut être faite entre les deux expériences étant donné leur absence de l'acclimation en ERU, cette comparaison est possible pour les protéines.

En fonction du stress réalisé et peu importe le substrat utilisé, la concentration en protéines solubles suit la même tendance par rapport à celle mesurée à l'état stable (Figure 5. 2). Dans les deux cas (ES et ERU) le stress I (baisse de C_m) et le II (élévation de C_m) provoquent une libération de protéines solubles avec une quantité plus importante tout de même après le stress I.

Après le stress I, les protéines solubles relâchées en ERU et ES ne présentent pas les mêmes caractéristiques. Alors que de grosses structures (403 kDa ; 222 kDa ; 17 kDa) inexistantes à l'état stable en ES sont relarguées, dans le cas de l'ERU, des petites fractions protéiques disparaissent (1 kDa ; 0,8 kDa ; 0,6 kDa).

Après le stress II, une plus grande cohérence est obtenue quant à l'évolution de la taille des fractions protéiques. A part les bio-polymères de tailles supérieures à 670 kDa, toutes les autres grosses fractions présentes ont disparu et il ne reste que les très petites. De plus de nouvelles fractions de tailles inférieures à 0,4 kDa sont constatées.

Le stress III (24 h sans air et substrat) ne provoque pas de changement quantitatif significatif dans les deux cas par rapport à l'état stable et les distributions de masses moléculaires apparentes des protéines sont conservées dans les bioréacteurs par rapport à l'état stable.

Tableau 5. 5 : Distributions des masses moléculaires apparentes des protéines extraites des PEC des bioréacteurs après différents stress

Stress	Type d'effluent	Distribution des masses moléculaires apparentes des protéines
I	ES	>670 kDa ; 403 kDa ; 222 kDa ; 37 kDa ; 17 kDa ; 2,2 kDa ; 1,2 kDa ; <0,4 kDa (3 pics)
	ERU	>670 kDa ; 2,5 kDa ; 1,6 kDa ; 1,1 kDa ; <0,4 kDa (1 pic)
II	ES	>670 kDa ; 1,1 kDa ; <0,4 kDa (5 pics)
	ERU	>670 kDa ; 2,5 kDa ; <0,4 kDa (4 pics)
III	ES	>670 kDa ; 330 kDa ; 41 kDa ; 2,5 kDa ; 1,3 kDa ; 1,1 kDa ; <0,4 kDa (2 pics)
	ERU	>670 kDa ; 2,5 kDa ; 1,6 kDa ; 1,1 kDa ; 1 kDa ; 0,8 kDa ; 0,6 kDa ; <0,4 kDa (2 pics)

En ce qui concerne l'évolution des tailles des substances humiques-like, peu importe le stress généré les substances humiques-like ont des petites tailles qui restent dans la même gamme (4,4 kDa <0,9 kDa). Les variations constatées dépendent surtout des différents phénomènes de recombinaison de la matière organique au sein des bioréacteurs, des substances humiques-like en provenance de l'effluent et également des dégradations biologiques pouvant avoir lieu.

Tableau 5. 6 : Distributions des masses moléculaires apparentes des substances humiques-like extraites des PEC des bioréacteurs après différents stress

Stress	Type d'effluent	Distribution des masses moléculaires apparentes des substances humiques-like
I	ES	2,2 kDa ; 1,2 kDa ; <0,9 kDa (3 pics)
	ERU	4,4 kDa ; 2,1 kDa ; 1,2 kDa
II	ES	2,2 kDa ; 1,7 kDa ; 1,2 kDa ; <0,9 kDa (3 pics)
	ERU	4,4 kDa ; 2,9 kDa ; 2,1 kDa ; 1,5 kDa
III	ES	1,9 kDa ; 1,6 kDa ; 1,2 kDa ; <0,9 kDa (6 pics)
	ERU	4,4 kDa ; 2,6 kDa ; 2,1 kDa ; 1,2 kDa

5.2.4 Conclusion

La caractérisation des milieux biologiques des deux Bàm fonctionnant en ES et ERU a permis de mettre en évidence des différences significatives entre les deux milieux :

- Les floes de BA en ERU sont plus petits que ceux obtenus en ES
- La concentration totale en PEC solubles du Bàm alimenté en ES est plus grande que celle du Bàm dont le substrat est l'ERU dont 46 % sont des polysaccharides totalement absents de la campagne avec l'ERU.
- Les protéines des PEC solubles du Bàm en ES se composent de nombreuses fractions avec des tailles supérieures à 40 kDa alors que les protéines provenant du Bàm en ERU contiennent surtout des petites fractions de tailles inférieures ou égales à 2,5 kDa.

Toutes ces différences entre les deux milieux biologiques peuvent fortement influencer les mécanismes impliqués dans l'établissement du colmatage et le fonctionnement durable du procédé.

Par conséquent les caractéristiques des milieux biologiques des acclimations en ERU et ES vont maintenant être reliées à l'établissement du colmatage et aux mécanismes impliqués en conditions stables dans la partie suivante. L'influence des stress notamment I et II qui sont maintenant connus pour libérer des protéines et substances humiques-like de différentes tailles par rapport à un fonctionnement normal sera également évaluée.

5.3 Le colmatage

5.3.1 Mise en place du colmatage à l'état stable

Pendant la période de fonctionnement à l'état stable de 30 jours des deux Bàm, la vitesse de colmatage de la membrane est sept fois plus rapide lors du fonctionnement en ERU (Tableau 5. 7). De plus avant d'atteindre l'état stationnaire lors de la campagne en ERU, deux lavages chimiques de la membrane ont été pratiqués alors que la membrane utilisée pour l'acclimatation en ES n'est lavée qu'à la fin de la campagne expérimentale. Ainsi la vitesse de colmatage mesurée lors de l'acclimatation en ERU n'est pas influencée par les différents dépôts et fractions colmatantes qui se sont accumulés avant la stabilisation de la biomasse contrairement à la vitesse de colmatage obtenue en ES qui est néanmoins très inférieure.

L'influence du fonctionnement sans lavage du pilote en ES sur le colmatage est toutefois visible quand les PTM appliquées sont comparées. Elles se trouvent être quasiment identiques alors que le Bàm en ERU délivre un flux de perméat plus de deux fois supérieur à celui obtenu en ES. Ainsi le fait de ne pas avoir lavé la membrane pendant la période d'acclimatation en ES a engendré l'établissement du colmatage de la membrane et pour maintenir un flux de perméat à 20 °C de 32,6 L.h⁻¹.m⁻² une PTM plus élevée que ce qu'elle aurait été dans le cas d'une membrane propre, a du être appliquée.

Tableau 5. 7 : Récapitulatif des conditions de fonctionnement pour les campagnes expérimentales en ERU et ES et mise en place du colmatage membranaire

	Campagne ES	Campagne ERU
Paramètres opératoires		
PTM (bar)	1,3 ± 0.1	1,2 ± 0.2
MES (g _{MES} .L ⁻¹)	9,1 ± 1,2	7,6 ± 0,9
TSH (h)	24 ± 1	9 ± 3
Flux de perméat 20°C (L.h ⁻¹ .m ⁻²)	32,6 ± 2,5	70,1 ± 16
Vitesse de recirculation (m.s ⁻¹)	3,5 - 4	3,5 - 4
Période totale de fonctionnement à l'état stable (j)	30	30
Nombre de lavages chimiques	1	3
Vitesse de colmatage à l'état stable (kPa.h⁻¹)	0,013	0,088

Si l'influence du milieu biologique sur l'établissement et les mécanismes du colmatage seront développés dans la partie 5.3.3, les paramètres opératoires utilisés pour les deux campagnes expérimentales ont également un impact sur la vitesse de colmatage à l'état stable.

Afin de comparer les deux campagnes, le choix de travailler à la même charge massique en ERU et ES est fait. Or les concentrations en DCO et $N-NH_4^+$ de l'ERU étant plus faibles et variables par rapport à celles de l'ES, un TSH plus faible est appliqué et donc un flux de perméat plus fort.

Cependant, la diminution du TSH entraîne une accélération du colmatage membranaire (Cho et al., 2005 ; Viero et al., 2008 ; Hong et al., 2012). Ainsi clairement, la baisse du TSH entre les deux expériences a accéléré le colmatage dans le cas de la campagne en ERU. Ainsi une comparaison du colmatage va être faite en gardant à l'esprit qu'elle n'est pas rigoureuse à cause de cette variation de TSH et donc de flux de perméat. Cependant elle est tout de même effectuée car la comparaison des résistances hydrauliques avec les caractéristiques des milieux biologiques va permettre d'orienter la responsabilité de certains facteurs dans le colmatage en fonction de la nature de l'effluent.

5.3.2 Réversibilité du colmatage

Après la période de fonctionnement de 30 jours à l'état stable, la membrane céramique est retirée du BâM_E et placée dans un pilote de lavage afin d'étudier la réversibilité du colmatage. Ainsi, directement après son installation dans le pilote de lavage, sa perméabilité à l'eau est mesurée puis des séquences de lavages hydrauliques puis chimiques sont pratiquées. Après chaque séquence, la perméabilité à l'eau de la membrane est déterminée.

Les lavages suivants sont effectués :

- Lavage 1 : lavage à l'eau de 15 minutes à 1,5 bar
- Lavages 2 et 3 : lavage à la soude (1 h) puis à l'acide nitrique (45 minutes) à 1,5 bar

Après mesure de la perméabilité (L_p) et connaissant la résistance initiale de la membrane ($3,3 \cdot 10^{12} \text{ m}^{-1}$), la résistance du colmatage résiduel après chaque lavage est déterminée en utilisant le modèle des résistances en série (Equation 5.1) :

$$L_p = \frac{1}{\mu \times (R_m + R_c)} \quad (5.1)$$

Avec L_p : perméabilité de la membrane colmatée ($\text{m}^3 \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{Pa}^{-1}$)

R_c : résistance de colmatage (m^{-1})

R_m : résistance hydraulique de la membrane (m^{-1})

μ : viscosité dynamique du perméat à la température de filtration ($\text{Pa} \cdot \text{s}$)

Ainsi, les différentes résistances hydrauliques correspondantes aux différentes fractions du colmatage sont attribuées. La définition de Meng et al., (2009) du colmatage est utilisée. Elle distingue le colmatage détachable (enlevable par une action physique sur la membrane) du colmatage non détachable (nécessité de lavages chimiques) et enfin du colmatage irréversible qui comme son nom l'indique ne peut être éliminé.

Les résistances hydrauliques R_0 , R_1 et R_2 sont donc calculées et correspondent respectivement aux résistances hydrauliques liées au colmatage détachable, au colmatage non détachable et au colmatage irréversible (Tableau 5. 8).

Tableau 5. 8 : Résistances hydrauliques liées au colmatage membranaire

Dénomination de la résistance hydraulique	Valeur (m^{-1})	
	Campagne ES	Campagne ERU
R_0	$3,6 \cdot 10^{11}$	$3,2 \cdot 10^{11}$
R_1	$4,4 \cdot 10^{12}$	$6,7 \cdot 10^{12}$
R_2	$2,1 \cdot 10^{10}$	$4,3 \cdot 10^{10}$

Le calcul des résistances hydrauliques révèle que la majeure partie du colmatage peut être considérée comme non détachable et qu'elle nécessite donc des lavages chimiques pour être retirée. Le colmatage non détachable représente 92 % du colmatage dans la campagne en ES et 94 % dans celle en ERU.

Une très faible partie du colmatage est détachable. Il correspond à 7 % du colmatage total dans le cas de l'ES et à 4 % pour l'étude en ERU.

Enfin le colmatage irréversible correspond à 1% du colmatage total durant l'expérience en ES et 2 % en ERU.

Ainsi la plus grosse partie du colmatage est non détachable et nécessite des lavages chimiques. La partie suivante va permettre de préciser les mécanismes ainsi que les fractions du milieu biologique impliqués dans les différentes parties du colmatage.

5.3.3 Mécanismes impliqués dans le colmatage

Le colmatage détachable est causé par la création d'un gâteau à la surface de la membrane. Il est dû aux particules ayant des tailles bien supérieures au seuil de coupure membranaire telles que les floccs de BA ainsi que les colloïdes. Chu et Li (2005) et Sun et al., (2008) montrent que la présence de biopolymères à la surface de la membrane permet une adhésion plus facile et rapide des bactéries. De plus la présence de PEC à la membrane permet aux floccs d'être accrochés plus fortement et donc d'augmenter sa résistance aux lavages physiques. Le colmatage détachable est supérieur lors de l'acclimatation en ES (7 %) par rapport en ERU (4 %). Or en ES, une plus forte présence de composés de nature protéique de hauts poids moléculaires (entre 40 et > 670 kDa) est observée. Sun et al., (2008) annoncent que ces biopolymères se comportent comme un gel qui facilite le développement d'un gâteau de filtration imperméable à la surface de la membrane et donc très colmatant. Ainsi les 3 % supplémentaires du colmatage détachable au cours du traitement de l'ES peuvent être causés par la plus grande quantité et variété de biopolymères en présence.

Cependant ces fractions de colmatage détachable restent très faibles par rapport au colmatage non détachable supérieur à 90 % au cours des deux campagnes. La forte vitesse de recirculation appliquée au voisinage de la membrane (4 m.s^{-1}) permet de limiter fortement l'établissement du colmatage détachable par un moyen physique et donc le seul restant est principalement de nature non détachable.

Le colmatage non détachable est causé par le blocage des pores de la membrane (Meng et al., 2009). Ce mécanisme se produit pour une filtration à long-terme et est lié aux floccs bactériens et aux PEC solubles qui s'accumulent parce qu'ils ont des tailles supérieures aux pores de la membrane ou parce qu'ils viennent s'adsorber sur la matière colmatante déjà présente. Une fois accrochées à la membrane, les bactéries peuvent se multiplier et développer leur réseau de polymères pour former une couche colmatante solidement attachée à la membrane.

Même si la proportion du colmatage non détachable est quasiment identique pour les deux campagnes expérimentales, la vitesse du colmatage à long terme, sept fois plus rapide en ERU, peut être principalement attribuée au colmatage non détachable. Bien que les PTM soient identiques lors de la période de fonctionnement à long terme pendant les deux acclimations, le flux de perméat est plus de deux fois supérieur dans le cas de l'ERU.

Ainsi une plus grande quantité de particules (flocs, PEC solubles, colloïdes) est amenée au voisinage de la membrane. De plus en ERU, les flocs de BA sont plus petits que ceux obtenus lors du traitement d'un ES. Or Massé (2004) prouve que pour des flocs de Bàm plus petits que ceux de BA, la vitesse de colmatage est plus forte. Ils montrent également que filtrer une boue avec des flocs de plus petites dimensions entraîne une plus grande capacité du dépôt à se comprimer et donc une augmentation de la vitesse de colmatage quand la pression augmente.

La présence des PEC solubles et notamment des protéines dans la structure de ce dépôt est démontré par Shiau et al., (2004). Ils prouvent que lors de la filtration d'une solution de protéines, la montée soudaine de la résistance de colmatage est due à la compression du dépôt de filtration. La montée soudaine de la résistance de colmatage intervient plus tôt lorsque soit la pression appliquée à la filtration soit la concentration en protéines sont plus grandes. Ce résultat prouve qu'un dépôt de protéines est compressible et que des paramètres tels que la pression appliquée ou la concentration en protéines modifient sa compressibilité.

Le colmatage irréversible est permanent et ne peut donc pas être enlevé. La pénétration à l'intérieur des pores de la membrane de particules plus petites que les pores et leur adsorption sur le matériau membranaire constitue le mécanisme principal du colmatage irréversible. Il représente la plus faible part du colmatage. Il est de 1 % pour la campagne en ES et 2 % en ERU. La majeure partie des protéines des PEC solubles étant de petites tailles ($\leq 2,5$ kDa) ainsi que leur plus forte teneur en substances humiques-like durant l'acclimatation en ERU permet sans doute d'apporter un élément de réponse à cette légère augmentation du colmatage irréversible lors du traitement d'un ERU. Cependant seuls des prélèvements ainsi qu'une caractérisation du colmatage irréversible permettrait de connaître sa nature réelle.

Enfin, le fait d'avoir effectué des lavages à l'acide nitrique et à la soude permet l'accès à la répartition entre le colmatage inorganique et organique. Si le colmatage organique représente 87 % du colmatage total pour le Bàm en ES, il est de 72 % quand le Bàm traite l'ERU. Le colmatage organique fait référence à l'ensemble de la matière organique présente dans le Bàm qui peut venir colmater la membrane. Ainsi le colmatage organique englobe les PEC (protéines, polysaccharides et substances humiques) provenant de l'effluent et du métabolisme bactérien, les flocs bactériens ainsi que les colloïdes organiques. Le Bàm

fonctionnant avec l'ES possédant une concentration totale en PEC soluble 63 % au dessus de celle en ERU avec une forte présence de biopolymères de nature protéique, une concentration en biomasse supérieure de $1,5 \text{ g.L}^{-1}$, il semble logique de trouver une proportion plus forte pour le colmatage organique en ES.

Le colmatage inorganique est plus deux fois supérieur dans le cas de l'ERU (28 % du colmatage total) par rapport à l'ES (13 % du colmatage total). Le colmatage inorganique peut se présenter sous deux formes : la précipitation chimique et la précipitation biologique. Dans les Bàm, une multitude de cations et d'anions peuvent être présents tels que Ca^{2+} , Mg^{2+} , Al^{3+} , Fe^{3+} , CO_3^{2-} , SO_4^{2-} , PO_4^{3-} , OH^- , etc. La concentration de polarisation aboutie à une concentration plus importante de ces ions à la surface membranaire. La précipitation chimique intervient quand la concentration de ces espèces chimiques excède la concentration à saturation. Les carbonates sont un des sels couramment rencontrés dans le colmatage inorganique. L'aération et la production de CO_2 par les bactéries peuvent affecter la saturation des carbonates et le pH de la BA. Les carbonates de métaux tels que Ca, Mg, et Fe peuvent augmenter le potentiel colmatant de la matière inorganique (You et al., 2005).

La précipitation biologique est également possible. Les PEC solubles du bioréacteur contiennent des groupements ionisables comme COO^- , CO_3^{2-} , SO_4^{2-} , PO_4^{3-} , OH^- . Les ions métalliques peuvent être facilement capturés par ces ions chargés négativement et donc jouer un rôle prépondérant dans la mise en place du colmatage.

En ERU, le colmatage inorganique représente plus du double de celui évalué en ES, avec notamment une somme des concentrations en cations Mg^{2+} et Ca^{2+} sept fois supérieure en ERU par rapport à celle en ES. Une étude plus approfondie des concentrations en ions présents dans les deux Bàm aurait été nécessaire mais il semble avéré que le colmatage inorganique plus important en ERU est du aux plus fortes concentrations en ions présents dans l'ERU et le Bàm.

5.4 Perturbations du procédé : Quel stress est le plus problématique ?

Les principaux effets des différents stress testés sur les Bàm en conditions de traitement d'un ES et d'un ERU sont répertoriés dans le Tableau 5. 9. Le but est de déterminer lequel de ces stress est potentiellement le plus problématique pour le fonctionnement du Bàm en fonction de l'effluent traité et d'effectuer une classification de ces stress en fonction des désagréments occasionnés.

Les paramètres suivants sont pris en compte pour évaluer le potentiel perturbateur de chaque stress : les rendements d'élimination en DCO et ammonium, les activités exogènes des autotrophes et hétérotrophes ainsi que le potentiel colmatant des PEC solubles évalué par la variation de la quantité totale libérée ainsi que l'évolution de la taille des protéines lors des différents stress. Dans ce tableau seule la taille des protéines est prise en compte car la méthode utilisée n'a pas permis de caractériser la taille des polysaccharides et les substances humiques-like ont des masses moléculaires qui restent dans une gamme trop restreinte.

Le stress ayant le potentiel le plus perturbateur de la campagne en ERU se trouve être le stress II (augmentation de la Cm) qui a engendré une inhibition de la nitrification et donc des autotrophes, la libération d'une plus grande quantité de PEC solubles et un changement structurel des protéines avec de plus petites tailles

Tableau 5. 9 : Potentiel de perturbations des stress I, II et III en fonction du substrat d'alimentation dans les Bàm

Paramètre stress	Campagne ES			Campagne ERU		
	I (baisse Cm)	II (hausse Cm)	III (24 h sans air et nutriments)	I (baisse Cm)	II (hausse Cm)	III (24 h sans air et nutriments)
Effet sur l'élimination :						
DCO	-	+	+	-	-	-
N-NH ₄ ⁺	--	---	-	stable	---	-
Effet sur l'activité exogène biologique :						
Autotrophes	--	--	-	-	--	+
Hétérotrophes	--	+	--	+	++	+
Potentiel colmatant PEC solubles :						
Taille (protéines)	Libération grosses fractions (>40 kDa)	Apparition petites fractions (<0,4 kDa)	stable	Disparition petites fractions (<0,4 kDa)	Apparition petites fractions (<0,4 kDa)	stable
quantité	++	+	-	++	++	-

+ / ++ : hausse/forte hausse ; - / -- : baisse/forte baisse

En ce qui concerne la campagne en ES, le stress le plus déroutant pour le Bàm est le stress I (baisse de la Cm). Bien que le stress II soit responsable d'une plus forte baisse d'activité des autotrophes et du rendement d'élimination en ammonium, le potentiel colmatant des PEC solubles libérés pendant le stress I semble plus inquiétant. En effet une plus forte quantité de PEC solubles totale est relarguée pendant ce stress avec notamment l'apparition de grosses fractions de nature protéique. Alors que suite au stress II des quantités de PEC solubles plus faibles sont retrouvées dans le milieu liquide avec uniquement des petites molécules qui ne peuvent que s'adsorber sur ou dans les pores de la membrane ou sur les fractions colmatantes déjà présentes sur la membrane. Ainsi ces petites particules libérées ne peuvent participer qu'au colmatage à long terme du Bàm.

Le stress III est pour les deux campagnes expérimentales celui qui cause le moins de variations du Bàm. Le potentiel colmatant des PEC solubles reste stable car des quantités identiques au fonctionnement stationnaire sont mesurées et les protéines gardent les mêmes structures. De plus uniquement de très légères variations sont perceptibles au niveau des rendements épuratoires et des activités biologiques exogènes.

Ainsi une classification peut être faite du stress le plus problématique au moins problématique pour les deux campagnes expérimentales :

- En ERU : stress II > stress I > stress III
- En ES : stress I > stress II > stress III

La raison principale pour laquelle le stress I paraît être plus perturbant pour le Bàm que le stress II dans le cas du traitement d'un ES est le potentiel colmatant des PEC solubles.

Conclusion générale et perspectives

Le marché européen des BâM est en pleine expansion, la capacité de traitement est passée en quelques années de quelques milliers d'équivalent habitant (EH) à de grandes stations desservant plus de 100 000 EH. Cependant son essor, en particulier dans le traitement d'effluents urbains, se trouve tout de même freiné par différents verrous technologiques.

L'un d'entre eux réside dans le choix des paramètres opératoires afin de garantir à la fois une épuration maximale des principaux polluants des eaux usées municipales que sont la DCO et l'ammonium, afin de maintenir ou d'accentuer l'activité des biomasses autotrophes et hétérotrophes et afin de limiter le colmatage membranaire.

L'étude bibliographique révèle que l'un des paramètres opératoires sur lequel la communauté scientifique se trouve être le plus en désaccord est l'âge de boues. La même étude bibliographique met en exergue que toutes ces études évaluant l'impact du TSB sur l'ensemble des performances et caractéristiques des BâM ne travaillent pas à charge organique (massique, C_m) fixe. Ainsi, avec l'augmentation de l'âge de boues dans le système, la concentration en biomasse augmente réduisant dans le même temps la C_m . Cependant ce deuxième paramètre n'est pas sans influencer les caractéristiques du milieu biologique et donc le colmatage membranaire. L'un des objectifs de cette thèse fut d'isoler les différents effets de deux âges de boues de ceux de la C_m en la maintenant fixe et de déterminer le TSB qui garantit le meilleur compromis en termes de performances épuratrices, de biomasse active, de production de boues et de limitation du colmatage.

Deux TSB, représentatifs pour ce type de procédé ont été volontairement choisis suite à l'étude bibliographique : 20 et 50 jours. Après une étape d'environ cinquante jours d'acclimatation dans un BâM_E, les biomasses furent stabilisées respectivement à des concentrations en MVS de 8,2 et 7,0 g.L⁻¹ à 20 et 50 jours pour une C_m d'environ 0,2 kg_{DCO}.kg_{MVS}⁻¹.j⁻¹.

Par le biais de mesures respirométriques, la biomasse hétérotrophe à 50 jours s'est révélée plus rapide à dégrader des apports en substrat dont la concentration était supérieure à 0,04 g_{substrat}.g_{MVS}⁻¹. Elle nécessite un apport plus important en oxygène par rapport à la biomasse à 20 jours pour dégrader la même quantité de substrat et maintenir une élimination de la DCO supérieure à 90 %. A l'inverse des résultats obtenus par la modélisation, les activités respiratoires ou les vitesses spécifiques d'utilisation du substrat n'ont nullement diminué avec l'augmentation du TSB. Les résultats obtenus ont montré que l'accumulation de matière inerte

produite par les microorganismes est surestimée dans les modèles ASM, puisque il a été observé une non accumulation de biomasse inactive avec l'âge de boue le plus élevé. Quelque soit l'âge de boues, les hétérotrophes possèdent approximativement les mêmes respirations endogènes à $2 \text{ mg}_{\text{O}_2} \cdot \text{g}_{\text{MVS}}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$. L'intégrité de la biomasse est donc conservée aux TSB testés et aucun besoin en oxygène supplémentaire n'est nécessaire.

La biomasse autotrophe s'est avérée plus performante à 50 jours en termes d'activité exogène spécifique (multipliée par 4,5) et d'épuration de l'ammonium (+ 7 %). Ces deux campagnes ont été réalisées avec un effluent synthétique (ES) communément employé dans la littérature et dont l'apport en carbone inorganique (CI) est insuffisant pour assurer une nitrification complète. Ce manque de CI a été prouvé à 50 jours par l'influence de l'activité exogène spécifique des hétérotrophes sur celle des autotrophes. Le CO_2 libéré lors de la biodégradation du carbone organique par les hétérotrophes a servi à favoriser l'activité et l'épuration de N-NH_4^+ par les autotrophes. Elles ont montré un meilleur développement à ce même âge de boues avec une respiration endogène multipliée par trois.

Le milieu biologique a été caractérisé par son contenu en PEC solubles connu pour être un facteur colmatant de premier ordre. Les quantités des trois constituants majeures (protéines, polysaccharides et substances humiques-like) ont été suivies et les distributions de masses moléculaires (DMM) en protéines et substances humiques-like ont été obtenues par une méthode récente pour la caractérisation des PEC couplant l'analyse des matrices d'excitation/émission en 3D et la chromatographie d'exclusion stérique avec détecteur de fluorescence.

A Cm fixe, il s'avère que le TSB influence la composition et la DMM des PEC solubles. La concentration en PEC solubles est doublée avec l'augmentation de l'âge de boues et le constituant majeur se trouve être les polysaccharides à 50 jours (45 %) alors que c'était les protéines à 20 jours (59 %). Le métabolisme bactérien évolue avec le TSB et influence la part de substrat converti en protéines et polysaccharides ainsi que leur vitesse de biodégradation. Les DMM des protéines et des substances humiques-like subissent également des évolutions avec le TSB. Les bio-polymères de nature protéique de hauts poids moléculaires fortement présents à 20 jours semblent avoir été en partie biodégradés à 50 jours au profit de protéines plus petites ($< 2,5 \text{ kDa}$) par la biomasse plus active et plus rapide à dégrader la matière organique. Pour les substances humiques-like, leurs empreintes chromatographiques sont

spécifiques du TSB et elles sont caractérisées par des masses moléculaires inférieures à 2 kDa. Si la rétention totale des PEC solubles est inchangée avec le TSB, la rétention spécifique des protéines et des polysaccharides des PEC solubles est modifiée avec le TSB. Les protéines sont mieux retenues à 50 jours (93 %) alors que ce sont les polysaccharides à 20 jours (100 %). Des changements structurels (masse moléculaire, hydrophobicité, charge de surface) ainsi que des variations d'interactions avec le milieu biologique sont à l'origine de ces modifications de la rétention.

Bien que le milieu biologique ait subi des évolutions non négligeables avec l'âge de boues, aucun impact n'a été mis en évidence en ce qui concerne la mise en place du colmatage au cours des deux campagnes.

Ainsi le choix de se fixer à un âge de boues de 50 jours semble plus judicieux d'autant plus que la vitesse de production de boues est plus de trois fois supérieure à un TSB de 20 jours.

Le chapitre bibliographique a révélé qu'à ce jour et à notre connaissance, aucune étude n'avait été réalisée sur les performances de B_àM en fonction de la nature synthétique ou réelle de l'effluent. Or en laboratoire l'un ou l'autre sont utilisés et ce paramètre environnemental affecte les caractéristiques du milieu biologique (taille des floes, populations bactériennes, caractéristiques des PEC) et donc les conséquences qu'il peut avoir sur le colmatage membranaire. Ainsi tout porte à croire qu'une étude effectuée avec comme ambition de détecter les principales différences dans les performances de B_àM en fonction de la nature du substrat permettrait de lever certains des verrous permettant la comparaison entre les travaux employant les deux types d'effluents.

Les performances ainsi que le colmatage du même B_àM_E ont été comparés en fonction donc de la nature du substrat, synthétique ou réel urbain, à un TSB de 50 jours. Le choix a été fait de travailler à la même C_m au cours des deux campagnes. Cependant l'ERU étant très faiblement chargé en DCO et ammonium en comparaison de l'ES, une diminution du TSH a été effectuée dans les conditions d'ERU.

La DCO fut parfaitement dégradée dans les deux cas avec cependant une activité spécifique exogène hétérotrophe plus de cinq fois supérieure en ES. Bien que la C_m en DCO soit identique, l'ES ne se compose que de glucose facilement biodégradable alors qu'environ 65 % de la DCO de l'ERU est plus lentement biodégradable. Exprimée en DBO la C_m devient

deux fois supérieure dans l'ES et explique donc la différence d'activité. La respiration endogène plus forte en ES montre un meilleur développement de la biomasse active dans ces conditions.

L'ammonium fut totalement biodégradé en ERU alors qu'il ne l'était qu'à 77 % en ES. Avec une activité spécifique de la biomasse autotrophe cinq fois supérieure en ERU, les autotrophes se sont mieux développées dans cette configuration. Les forts cisaillements des B_{àM}_E n'ont pas empêché leur rapide adaptation dans ce type de B_{àM}. La principale explication dans les différences de rendements obtenues réside dans la limitation de l'apport en CI pour les études réalisées en ES.

Le rendement de production de boues fut légèrement supérieur en ERU (0,17 kg_{MVS}.kg_{DCO}⁻¹) par rapport à l'ES (0,14 kg_{MVS}.kg_{DCO}⁻¹). A un TSB de 50 jours, la majeure partie de la DCO peut donc être considérée comme lentement biodégradable et non pas inerte.

La caractérisation des milieux biologiques a mis en évidence des différences significatives entre les deux milieux. Malgré des concentrations en cations divalents Ca²⁺ et Mg²⁺ plus fortes en ERU, les floes de BA étaient plus petits. La modification de structure, la concentration plus faible en PEC solubles et l'absence totale de polysaccharides sont sans doute en cause dans ce changement. De plus, si les substances humiques-like sont toujours de très petites tailles en ERU en comparaison avec l'ES, les protéines sont constituées à 85 % de molécules de tailles inférieures à 3 kDa.

Toutes ces modifications du milieu biologique ont affecté les caractéristiques du colmatage et sa vitesse d'établissement qui fut sept fois plus rapide en ERU. Si la baisse du TSH est en cause dans l'augmentation de la vitesse de colmatage, les changements du milieu biologique l'ont également affecté.

Enfin, une dernière partie de cette thèse s'est intéressée aux caractéristiques des B_{àM} en conditions de stress liées à des variations de paramètres environnementaux rencontrées dans les systèmes biologiques (baisse et hausse de la Cm, défaut dans l'alimentation électrique ou maintenance (absence d'oxygène et de substrat)). Les mêmes dysfonctionnements ont été pratiqués aux deux TSB en ES. Les biomasses ont eu des gestions similaires de ces situations avec toutefois à 50 jours, une biomasse plus réactive pour s'adapter aux changements imposés.

Les impacts de ces stress ont été classés afin de mettre en évidence lequel était le plus problématique pour le fonctionnement du BâM selon la nature de l'effluent traité. En ERU, la hausse de la Cm a été la plus problématique alors que ce fut la baisse de Cm en ES. La raison principale pour laquelle la baisse de Cm fut plus dérangeante en ES est le potentiel colmatant accru des PEC solubles.

Suite à cette étude des perspectives peuvent être dégagées et s'articuler autour des principaux axes suivants :

(i) L'étude bibliographique a révélée un nombre non négligeable de données contradictoires sur l'évolution des concentrations en protéines et polysaccharides extraits des PEC liés et solubles de BâM en fonction des paramètres opératoires et environnementaux. L'impossibilité de comparer rigoureusement ces études est notamment du à l'absence de protocole standard d'extraction et de caractérisation des PEC. Il semblerait donc judicieux de proposer de tels protocoles afin d'appréhender les conséquences réelles des paramètres opératoires et environnementaux sur le relargage de PEC dans les BâM.

(ii) Dans le même but, un autre protocole commun aux travaux réalisés sur le traitement d'eaux usées par voie biologique est recommandé : celui concernant la détermination de l'activité biologique des autotrophes et hétérotrophes. En effet, l'étude réalisée dans le chapitre 5 sur la comparaison des performances d'un BâM en fonction de la nature de l'effluent a mis en évidence la diversité des protocoles de mesures respirométriques (nature substrat, concentration, détermination activité maximale)

(iii) La détermination de la DMM des protéines et des substances humiques-like des PEC solubles extraits des boues de BâM par l'utilisation des matrices de fluorescence 3D couplées avec la chromatographie d'exclusion stérique avec détection de la fluorescence, ne constitue qu'une étape dans la caractérisation des PEC solubles et de leur implication dans le colmatage des membranes de BâM. D'autres techniques doivent être développées pour avoir une détermination aussi précise de la DMM des polysaccharides. Enfin, il serait pertinent pour approfondir les caractéristiques du colmatage de s'orienter vers des études qui coupleraient la détermination de DMM des PEC, avec des méthodes permettant la caractérisation morphologique des principaux constituants des PEC ainsi que leurs charges de surface et leurs hydrophobicités. Ces données apporteraient de précieuses informations pour les modélisations visant à prédire l'établissement du colmatage membranaire.

(iv) L'étude réalisée sur l'influence de la nature de l'effluent (synthétique et réel) sur les caractéristiques de fonctionnement de Bàm fut l'une des étapes à réaliser pour comprendre les différents changements qui s'opèrent entre le laboratoire et la station d'épuration. D'autres études sur sites avec des Bàm de la taille laboratoire, semi industrielle et industrielle traitant le même effluent, avec les mêmes membranes et les mêmes conditions hydrodynamiques seraient pertinentes pour combler le fossé d'informations qu'il manque dans ce domaine.

References

A

Adav, S., Lee, D., Lai, J., 2007. Effects of aeration intensity on formation of phenol-fed aerobic granules and extracellular polymeric substances. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 77, 175-182.

Ahmed, Z., Cho, J., Lim, B.-R., Song, K.-G., Ahn, K.-H., 2007. Effects of sludge retention time on membrane fouling and microbial community structure in a membrane bioreactor. *Journal of Membrane Science*, 287, (2), 211-218.

Aquino, S., Stuckey, D., 2004. Soluble microbial products formation in anaerobic chemostats in the presence of toxic compounds. *Water Research*, 38, 255-266.

Aryal, R., Lebegue, J., Vigneswaran, S., Kandasamy, J., Grasmick, A., 2009. Identification and characterization of biofilm formed on membrane-bioreactor. *Separation and Purification Technology*, 67, 86-94.

Azeredo, J., Henriques, M., Sillankorva, S., Oliveira, R., 2003. Extraction of exopolymers from biofilms: the protective effect of glutaraldehyde. *Water Science and Technology*, 47, (5), 175-179.

B

Baker, A., Ward, D., Lietsen, S., Periera, R., Simpson, E., Slater, M., 2004. Measurement of proteins-like fluorescence in river and wastewater using a handheld spectrophotometer. *Water Research*, 38, 2934-2938.

Barrios-Martinez, A., Barbot, E., Marrot, B., Moulin, P., Roche, N., 2006. Degradation of synthetic phenol-containing wastewaters by MBR. *Journal of Membrane Science*, 281, (1-2), 288-296.

Bott, C.B., Love, N.G., 2001. The immunochemical detection of stress proteins in activated sludge exposed to toxic chemicals. *Water Research*, 35, (1), 91-100.

Bouchez, T., Patureau, D., Dabert, P., Juretschko, D., Dore, J., Delgeras, P., Moletta, R., Wagner, M., 2000. Ecological study of a bio-augmentation failure. *Environmental Microbiology*, 2, 179-190.

Bourven, I., Costa, G., Guibaud, G., 2012. Qualitative characterization of the protein fraction of exopolymeric substances (EPS) extracted with EDTA from sludge. *Bioresource Technology*, 104, 486-496.

Braak, E., Alliet, M., Schetrite, S., Albasi, C., 2011. Aeration and hydrodynamics in submerged membrane bioreactors. *Journal of Membrane Science*, 379, (1-2), 1-18.

Breedveld, M.W., Zevenhuisen, L.P.T.M., Zehnder, A.J.B., no. : . 1990. *Applied and Environmental Microbiology* 56, (7), 2080-2086.

Brookes, A., Judd, S., Reid, E., Germain, E., Smith, S.A., H, Le-Clech, P., Stephenson, T., Turra, E., Jefferson, B., 2003. Characterization and impact of biofoulants in membrane bioreactors. In Process, IMSTEC, Sydney.

Brown, C., Ellwood, D., Hunter, J., 1977. Growth of bacteria at surfaces: influence of nutrient limitation. FEMS microbiol. Lett., 163-166.

Brown, M., Lester, N., 1982. Role of bacterial extracellular polymers in metal uptake in pure bacterial culture and activated sludge. Water Research, 16, 1539-1548.

Bura, R., Cheung, M., Liao, B., Finlayson, J., Lee, B., Droppo, I., 1998. Composition of extracellular polymeric substances in the activated sludge floc matrix. Water ScienceTechnology, 37, (4-5), 325-333.

Burdon, J., 2001. Are the traditional concepts of the structures of humic substances realistic ? Soil Science, 166, 752-769.

C

Calvet, R., 2003. Le sol. Propriétés et fonction (tome 1). Eds France agricole.

Canler, J.P., Perret, J.M., Duchène, P., Cotteux, E. 1999. *Aide au diagnostic des stations d'épuration par l'observation microscopique des boues actives.*

Chae, S.-R., Ahn, Y.-T., Kang, S.-T., Shin, H.-S., 2006. Mitigated membrane fouling in a vertical submerged membrane bioreactor (VSMBR). Journal of Membrane Science, 280, (1-2), 572-581.

Chang, I.-S., Kim, S.-N., 2005. Wastewater treatment using membrane filtration-effect of biosolids concentration on cake resistance. Process Biochemistry, 40, (3-4), 1307-1314.

Chang, I., Le-Clech, P., Jefferson, B., Judd, S., 2002. Membrane fouling in membrane bioreactors for wastewater treatment. Journal of Environmental Engineering, 128, 1018-1029.

Chang, S., Fane, A.G., 2001. The effect of fibre diameter on filtration and flux distribution - relevance to submerged hollow fibre modules. Journal of Membrane Science, 184, (2), 221-231.

Chen, W., Wersterhoff, P., Leenheer, J., Booksh, K., 2003. Fluorescence Excitation-Emission Matrix regional interaction to quantify spectra for dissolved organic matter. Environmental Science and Technology, 37, 5701-5710.

Cho, B.D., Fane, A.G., 2002. Fouling transients in nominally sub-critical flux operation of a membrane bioreactor. Journal of Membrane Science, 209, (2), 391-403.

Cho, J., Song, K.-G., Ahn, K.-H., 2005. The activated sludge and microbial substances influences on membrane fouling in submerged membrane bioreactor: unstirred batch cell test. Desalination, 183, (1-3), 425-429.

Chu, H., Li, X., 2005. Membrane fouling in membrane bioreactor: sludge cake formation and fouling characteristics. *Biotechnology and bioengineering*, 90, (3), 323-331.

Cicek, N., Franco, J., Suidan, M., Urbain, V., Manem, J., 1999. Characterization and comparison of a membrane bioreactor and a conventional-activated sludge system in the treatment of wastewater containing high molecular-weight compounds. *Water Environment Research*, 71, (1).

Cicek, N., Macomber, J., Davel, J., Suidau, M., Audic, J., Genestet, p., 2001. Effects of sludge retention time on the performances and biological characteristics of membrane bioreactor. *Water Science and Technology*, 43, (11), 43-50.

Clouzot, L., 2009. Etude du bioréacteur à membrane pour l'élimination de l'hormone synthétique 17 alpha-éthynylestradiol. Thèse de doctorat, Université Paul Cézanne d'Aix-Marseille.

Clouzot, L., Doumenq, P., Vanloot, P., Roche, N., Marrot, B., 2010. Membrane bioreactors for 17[alpha]-ethynylestradiol removal. *Journal of Membrane Science*, 362, (1-2), 81-85.

Clouzot, L., Roche, N., Marrot, B., 2011. Effect of membrane bioreactor configurations on sludge structure and microbial activity. *Bioresource Technology*, 102, (2), 975-981.

Comte, S. 2005. Interactions entre des exopolymères extraits de biomasses épuratoires et les métaux. in: *Thèse de l'université de Limoges*.

Comte, S., Guibaud, G., Baudu, M., 2007. Effect of extraction method on EPS from activated sludge: An HPSEC investigation. *Journal of Hazardous Materials*, 140, (1-2), 129-137.

Comte, S., Guibaud, G., Baudu, M., 2006. Relations between extraction protocols for activated sludge extracellular polymeric substances (EPS) and EPS complexation properties: Part I. Comparison of the efficiency of eight EPS extraction methods. *Enzyme and Microbial Technology*, 38, (1-2), 237-245.

D

Daigger, G., Buttz, J., 1992. Upgrading wastewater treatment plants. Ed Water Quality Management Library, 2, 134-141.

Defrance, L., Jaffrin, M.Y., Gupta, B., Paullier, P., Geaugey, V., 2000. Contribution of various constituents of activated sludge to membrane bioreactor fouling. *Bioresource Technology*, 73, (2), 105-112.

Delgado, F.D., 2009. Bioréacteur à membrane externe pour le traitement d'effluents contenant des médicaments anticancéreux: Elimination et influence du cyclophosphamide et de ses principaux métabolites sur le procédé. Thèse de doctorat, INP Toulouse.

Denkhaus, E., Meisen, S., Telgheder, U., Wingender, J., 2007. Chemical and physical methods for characterisation of biofilms. *Microchimica Acta* (158), 1-27.

Determann, S., Reuter, R., Wagner, P., Willkomm, R., 1994. Fluorescent matter in the eastern Atlantic Ocean. Part I: Method of measurement and near-surface distribution. *Deep-Sea Research*, 41, 659-675.

Dignac, M.F., Urbain, V., Rybacki, D., Bruchet, A., Snidaro, D., Scribe, P., 1998. Chemical description of extracellular polymers: implication on activated sludge floc structure. *Water Science and Technology*, 38, (8-9), 45-53.

Drews, A., Lee, C.-H., Kraume, M., 2006. Membrane fouling - a review on the role of EPS. *Desalination*, 200, (1-3), 186-188.

Drews, A., Mante, J., Iversen, V., Vocks, M., Lesjean, B., Kraume, M., 2007. Impact of ambient conditions on SMP elimination and rejection in MBRs. *Water Research*, 41, (17), 3850-3858.

Dubois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Rebers, P.A., Smith, F., 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry*, 28, 350-356.

Durmaz, B., Sanin, F., 2001. Effect of carbon to nitrogen ratio on the composition of microbial extracellular polymers in activated sludge. *Water Science Technology*, 44, (10), 221-229.

F

Fang, H., Xu, L., Chan, K., 2002. Effects of toxic metals and chemicals on biofilms and biocorrosion. *Water Research*, 36, 4709-4716.

Feng, S., Zhang, N., Liu, H., Du, X., Liu, Y., Lin, H., 2012. The effect of COD/N ratio on process performance and membrane fouling in a submerged bioreactor. *Desalination*, 285, 232-238.

Fishman, M.L., Cescutti, P., Fett, W.F., Osman, S.F., Hoagland, P.D., Chau, H.K., 1997. Screening the physical properties of novel *Pseudomonas* exopolysaccharides by HPSEC with multi-angle light scattering and viscosity detection. *Carbohydrate Polymers* (32), 213-221.

Francioso, O., Sanchez-Cortes, S., Casarini, D., Garcia-Ramos, J., Cianotta, C., Gessa, C., 2002. Spectroscopic study of humic acids fractionated by means of tangential ultrafiltration. *Journal of molecular structure*, 609, 137-147.

Francou, C., 2003. Stabilisation de la matière organique au cours du compostage de déchets urbains : influence de la nature des déchets et du procédé de compostage. Thèse de doctorat, Institut national d'agronomie, Paris Grignon.

Frolund, B., Griebe, T., Nielsen, P.H., 1995. Enzymatic activity in the activated-sludge floc matrix. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 43, (4), 755-761.

Frølund, B., Palmgren, R., Keiding, K., Nielsen, P.H., 1996. Extraction of extracellular polymers from activated sludge using a cation exchange resin. *Water Research*, 30, (8), 1749-1758.

Fu, Z., Yang, F., Zhou, F., Xue, Y., 2009. Control of COD/N ratio for nutrient removal in a modified membrane bioreactor (MBR) treating high strength wastewater. *Bioresource Technology*, 100, (1), 136-141.

G

Gabinska-Loniewska, A., 1991. denitrification unit biocenosis. *Water Research*, 25, (12), 1565-1573.

Gagnaire, J., 2010. Couplage de procédé appliqués au traitement d'un effluent de compostage. Thèse de doctorat, M2P2, Aix-Marseille.

Gander, M., Jefferson, B., Judd, S., 2000. Aerobic MBRs for domestic wastewater treatment: a review with cost considerations. *Separation and Purification Technology*, 18, (2), 119-130.

Gao, D.-w., Fu, Y., Tao, Y., Li, X.-x., Xing, M., Gao, X.-h., Ren, N.-q., 2011. Linking microbial community structure to membrane biofouling associated with varying dissolved oxygen concentrations. *Bioresource Technology*, 102, (10), 5626-5633.

Garcia-Ochoa, F., Gomez, E., Santos, V.E., Merchuk, J.C., 2010. Oxygen uptake rate in microbial processes: An overview. *Biochemical Engineering Journal*, 49, (3), 289-307.

Garnier, C., Görner, T., Lartiges, B.S., Abdelouhab, S., de Donato, P., 2005. Characterization of activated sludge exopolymers from various origins: A combined size-exclusion chromatography and infrared microscopy study. *Water Research*, 39, (13), 3044-3054.

Geng, Z., Hall, E., Bérubé, P., 2007. Membrane fouling mechanism of a membrane enhanced biological phosphorus removal process. *Journal of Membrane Science*, 296, (1-2), 93-101.

Germain, E., Nelles, F., Drews, A., Pearce, P., Kraume, M., Reid, E., Judd, S.J., Stephenson, T., 2007. Biomass effects on oxygen transfer in membrane bioreactors. *Water Research*, 41, (5), 1038-1044.

Görner, T., de Donato, P., Ameil, M.-H., Montarges-Pelletier, E., Lartiges, B.S., 2003. Activated sludge exopolymers: separation and identification using size exclusion chromatography and infrared micro-spectroscopy. *Water Research*, 37, (10), 2388-2393.

Grasmick, A., Cabassud, C., Spérandio, M., Wisniewski, C., 2007. Bioréacteurs à membranes et traitement des eaux usées. *Les techniques de l'ingénieur*, W4140.

Grelier, P., Rosenberger, S., Tazi-Pain, A., 2006. Influence of sludge retention time on membrane bioreactor hydraulic performance. *Desalination*, 192, (1-3), 10-17.

Guisasola, A., Petzet, S., Baeza, J., Carrera, J., Lafuente, J., 2007. Inorganic carbon limitation on nitrification: experimental assessment and modelling. *Water Research*, 41, (2), 277-286.

Guo, W.S., Vigneswaran, S., Ngo, H.H., Xing, W., 2007. Experimental investigation on acclimatized wastewater for membrane bioreactors. *Desalination*, 207, (1-3), 383-391.

H

Han, S.-S., Bae, T.-H., Jang, G.-G., Tak, T.-M., 2005. Influence of sludge retention time on membrane fouling and bioactivities in membrane bioreactor system. *Process Biochemistry*, 40, (7), 2393-2400.

Henderson, R., Baker, A., Murphy, K., Hambly, A., Stuetz, R., Khan, S., 2009. Fluorescence as a monitoring tool for recycled water systems: a review. *Water Research*, 43, 863-881.

Henze, M., McGrady, C., Gujer, W., Marais, G., Matsue, T., 1987. Activated sludge model N°1, IAWPRC, Scientific and Technical report N°1.

Heran, M., Wisniewski, C., Orantes, J., Grasmick, A., 2008. Measurement of kinetic parameters in a submerged aerobic membrane bioreactor fed on acetate and operated without biomass discharge. *Biochemical Engineering Journal*, 38, (1), 70-77.

Hoa, P., Nair, L., Visvanathan, C., 2003. The effect of nutrients on extracellular polymeric substances production and its influence on sludge properties. *Water SA*, 29, 437-442.

Holakoo, L., Nakhla, G., Bassi, A.S., Yanful, E.K., 2007. Long term performance of MBR for biological nitrogen removal from synthetic municipal wastewater. *Chemosphere*, 66, (5), 849-857.

Holler, S., Trösch, W., 2001. Treatment of urban wastewater in a membrane bioreactor at high organic loading rates. *Journal of Biotechnology*, 92, (2), 95-101.

Hong, S., Aryal, R., Vigneswaran, S., Johir, M.A.H., Kandasamy, J., 2012. Influence of hydraulic retention time on the nature of foulant organics in a high rate membrane bioreactor. *Desalination*, 287, (0), 116-122.

Hong, S.P., Bae, T.H., Tak, T.M., Hong, S., Randall, A., 2002. Fouling control in activated sludge submerged hollow fiber membrane bioreactors. *Desalination*, 143, (3), 219-228.

Huang, X., Gui, P., Qian, Y., 2001. Effect of sludge retention time on microbial behaviour in a submerged membrane bioreactor. *Process Biochemistry*, 36, (10), 1001-1006.

J

Jang, N., Ren, X., Kim, G., Ahn, C., Cho, J., Kim, I.N., 2007. Characteristics of soluble microbial products and extracellular polymeric substances in the membrane bioreactor for water reuse. *Desalination*, 202, 90-98.

Jarusutthiriak, C., Amy, G., Croué, J., 2002. Fouling characteristics of wastewater effluent organic matter (EfOM) isolate on NF and UF membranes. *Desalination*, 145, 247-255.

Jeong, T.-Y., Cha, G.-C., Yoo, I.-K., Kim, D.-J., 2007. Characteristics of bio-fouling in a submerged MBR. *Desalination*, 207, (1-3), 107-113.

Jeong, Y., 1995. Caractérisation des matières organiques réfractaires dans les effluents traités par voie biologique. Thèse de doctorat, INSA de Toulouse.

Jin, L., Ong, S.L., Ng, H.Y., 2010. Comparison of fouling characteristics in different pore-sized submerged ceramic membrane bioreactors. *Water Research*, 44, (20), 5907-5918.

Johir, M.A.H., Vigneswaran, S., Sathasivan, A., Kandasamy, J., Chang, C.Y., 2012. Effect of organic loading rate on organic matter and foulant characteristics in membrane bio-reactor. *Bioresource Technology*, 113, 154-160.

Joly, H., Li, H., Belzile, N., 2000. Pyrolysis gas chromatography-mass spectroscopy of humic substances extracted from Canadian lake sediments. *Canadian journal of chemistry*, 78, 51-63.

Judd, S., 2008. The status of membrane bioreactor technology. *Trends in Biotechnology*, 26, (2), 109-116.

K

Kawase, Y., Moo-young, M., 1991. Influence of non-newtonian flow behavior on mass transfer in bubble columns with and without draft tubes. *Chem. Eng. Commun*, (40), 67-83

Khongnakorn, W., Wisniewski, C., Pottier, L., Vachoud, L., 2007. Physical properties of activated sludge in a submerged membrane bioreactor and relation with membrane fouling. *Separation and Purification Technology*, 55, (1), 125-131.

Khor, S.L., Sun, D.D., Liu, Y., Leckie, J.O., 2007. Biofouling development and rejection enhancement in long SRT MF membrane bioreactor. *Process Biochemistry*, 42, (12), 1641-1648.

Khoshfetrat, A.B., Nikakhtari, H., Sadeghifar, M., Khatibi, M.S., 2012. Influence of organic loading and aeration rates on performance of a lab-scale upflow aerated submerged fixed-film bioreactor. *Process Safety and Environmental Protection*, 89, (3), 193-197.

Kimura, K., Naruse, T., Watanabe, Y., 2009. Changes in characteristics of soluble microbial products in membrane bioreactors associated with different solid retention times: Relation to membrane fouling. *Water Research*, 43, (4), 1033-1039.

King, R.O., Forster, C.F., 1990. Effects of sonication on activated sludge. *Enzyme and Microbial Technology*, 12, (109-115).

L

Larsen, P., Nielsen, J., Svendsen, T., Nielsen, P., 2008. Adhesion characteristics of nitrifying bacteria in activated sludge *Water Research*, 42, (10-11), 2814-2826.

Laspidou, C.S., Rittmann, B.E., 2002. A unified theory for extracellular polymeric substances, soluble microbial products, and active and inert biomass. *Water Research*, 36, (11), 2711-2720.

Le-Clech, P., Chen, V., Fane, T.A.G., 2006. Fouling in membrane bioreactors used in wastewater treatment. *Journal of Membrane Science*, 284, (1-2), 17-53.

- Le-Clech, P., Jefferson, B., Judd, S.J., 2005. A comparison of submerged and sidestream tubular membrane bioreactor configurations. *Desalination*, 173, (2), 113-122.
- Le Bihan, Y., Martinage, V., Klessard, P., Paul, E., 2001. Possible effect of protozoa on the autotrophic decay rate value. *Revue des Sciences de l'eau*, 14, (1), 91-108.
- Lebegue, J., 2008a. Aération et dynamique de colmatage en bioréacteurs à membranes immergées : identification de grandeurs et phénomènes déterminants. Thèse de doctorat, Université de Montpellier II.
- Lebegue, J., Heran, M., Grasmick, A., 2008b. Membrane bioreactor: Distribution of critical flux throughout an immersed HF bundle. *Desalination*, 231, (1-3), 245-252.
- Lee, N., Welander, T., 1994. Influence of predators on nitrification in aerobic biofilm process. *Water Science and Technology*, 29, 355-363.
- Lee, W., Kang, S., Shin, H., 2003. Sludge characteristics and their contribution to microfiltration in submerged membrane bioreactors. *Journal of Membrane Science*, 216, (1-2), 217-227.
- Lee, Y., Oleszkiewicz, J.A., 2003. Effects of predation and ORP conditions on the performance of nitrifiers in activated sludge systems. *Water Research*, 37, (17), 4202-4210.
- Lesage, N., 2005. Etude d'un procédé hybride adsorption/bioréacteur à membranes pour le traitement des effluents industriels, Thèse de doctorat, INSA Toulouse.
- Li, J., Yang, F., Li, Y., Wong, F.-S., Chua, H.C., 2008. Impact of biological constituents and properties of activated sludge on membrane fouling in a novel submerged membrane bioreactor. *Desalination*, 225, (1-3), 356-365.
- Li, X.Y., Yang, S.F., 2007. Influence of loosely bound extracellular polymeric substances (EPS) on the flocculation, sedimentation and dewaterability of activated sludge. *Water Research*, 41, (5), 1022-1030.
- Liang, S., Liu, C., Song, L., 2007. Soluble microbial products in membrane bioreactor operation: Behaviors, characteristics, and fouling potential. *Water Research*, 41, (1), 95-101.
- Liang, Z., Das, A., Beerman, D., Hu, Z., 2010. Biomass characteristics of two types of submerged membrane bioreactors for nitrogen removal from wastewater. *Water Research*, 44, (11), 3313-3320.
- Liao, B., Allen, D., Droppo, I., Leppard, G., Liss, S., 2001. Surface properties of sludge and their role in bioflocculation and settleability. *Water Research*, 35, (2), 339-350.
- Liu, H., Fang, H.H.P., 2002a. Characterization of electrostatic binding sites of extracellular polymers by linear programming analysis of titration data. *Biotechnology and Bioengineering*, (80), 806-11.
- Liu, H., Fang, H.H.P., 2002b. Extraction of extracellular polymeric substances of sludges. *Journal of Biotechnology*, (95), 249-256.

Liu, J., Liu, C., EA, Liss, S., 2006. Effect of phosphorus limitation on microbial floc structure and gene expression in activated sludge. *Water Science and Technology*, 54, (1), 247-255.

Liu, R., Huang, X., Xi, J., Qian, Y., 2005. Microbial behaviour in a membrane bioreactor with complete sludge retention. *Process Biochemistry*, 40, (10), 3165-3170.

Liu, T., Chen, Z., Yu, W., You, S., 2011. Characterization of organic membrane foulants in a submerged membrane bioreactor with pre-ozonation using three-dimensional excitation-emission matrix fluorescence spectroscopy. *Water Research*, 45, 2111-2121.

Lobos, J., Wisniewski, C., Heran, M., Grasmick, A., 2005. Effects of starvation conditions on biomass behaviour for minimization of sludge production in membrane bioreactors. *Water Science and Technology*, 51, (6-7), 35-44.

Lobos, J., Wisniewski, C., Heran, M., Grasmick, A., 2008. Sequencing versus continuous membrane bioreactors: Effect of substrate to biomass ratio (F/M) on process performance. *Journal of Membrane Science*, 317, (1-2), 71-77.

M

Massé, A., 2004. Bioréacteur à membranes immergées pour le traitement des eaux résiduaires urbaines : spécificités physico-chimiques du milieu biologique et colmatage. Thèse de doctorat, Université de Toulouse.

Massé, A., Spérandio, M., Cabassud, C., 2006. Comparison of sludge characteristics and performance of a submerged membrane bioreactor and an activated sludge process at high solids retention time. *Water Research*, 40, (12), 2405-2415.

Mauret, M., Paul, E., Puech-Costes, E., Maurette, M., Baptiste, P., 1996. Application of experimental methodology to the study of nitrifiers in mixed culture. *Water Science and Technology*, 34, 245-252.

Mayer, C., Moritz, R., Kirschner, C., Borchard, W., Maibaum, R., Wingender, J., Flemming, H., 1999. The role of intermolecular interactions: Studies on model systems for bacterial biofilms. *International Journal of Biological Macromolecules*, 26, 3-16.

McAdam, E., Judd, S., Cartmell, E., Jefferson, B., 2007. Influence of substrate on fouling in anoxic immersed membrane bioreactors. *Water Research*, 41, 3859-3867.

McSwain, B.S., Irvine, R.L., Hausner, M., Wilderer, P.A., no. 2: . 2005. Composition and distribution of extracellular polymeric substances in aerobic flocs and granular sludge. *Applied and Environmental Microbiology*, 71, (2), 1051-1057.

Melin, T., Jefferson, B., Bixio, D., Thoeye, C., De Wilde, W., De Koning, J., van der Graaf, J., Wintgens, T., 2006. Membrane bioreactor technology for wastewater treatment and reuse. *Desalination*, 187, (1-3), 271-282.

Meng, F., Chae, S.-R., Drews, A., Kraume, M., Shin, H.-S., Yang, F., 2009. Recent advances in membrane bioreactors (MBRs): Membrane fouling and membrane material. *Water Research*, 43, (6), 1489-1512.

Metcalf, Eddy, 1991. *Wastewater engineering, treatment, disposal, reuse*. 3rd Ed, McGraw-Hill, New-York.

Metzger, U., Le-Clech, P., Stuetz, R.M., Frimmel, F.H., Chen, V., 2007. Characterisation of polymeric fouling in membrane bioreactors and the effect of different filtration modes. *Journal of Membrane Science*, 301, (1-2), 180-189.

Muller, E.B., Stouthamer, A.H., van Verseveld, H.W., Eikelboom, D.H., 1995. Aerobic domestic waste water treatment in a pilot plant with complete sludge retention by cross-flow filtration. *Water Research*, 29, (4), 1179-1189.

N

Ng, H.Y., Hermanowicz, S.W., 2005. Membrane bioreactor operation at short solids retention times: performance and biomass characteristics. *Water Research*, 39, (6), 981-992.

Nielsen, P., Frolund, B., Keiding, K., 1996. Changes in the composition of extracellular polymeric substances in activated sludge during anaerobic storage. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 44, 823-830.

Nielsen, P.H., Jahn, A., Palmgren, R., 1997. Conceptual model for production and composition of exopolymers in biofilms. *Water Science and Technology*, 36, (1), 11-19.

O

Ognier, S., Wisniewski, C., Grasmick, A., 2004. Membrane bioreactor fouling in sub-critical filtration conditions: a local critical flux concept. *Journal of Membrane Science*, 229, (1-2), 171-177.

Ouyang, K., Liu, J., 2009. Effect of sludge retention time on sludge characteristics and membrane fouling of membrane bioreactor. *Journal of Environmental Sciences*, 21, (10), 1329-1335.

P

Papore, L., 1998. *Etude de la production de produits microbiens solubles excrétés par des boues activées lors de la dégradation du glucose en milieu inhibiteur*, DEA, Université Paul Sabatier, Toulouse

Pirt, S., 1965. The maintenance energy of bacteria growing cultures. *Proc. R. Soc., series B23*, 224-231.

Pollice, A., Brookes, A., Jefferson, B., Judd, S., 2005. Sub-critical flux fouling in membrane bioreactors -- a review of recent literature. *Desalination*, 174, (3), 221-230.

Pollice, A., Laera, G., Blonda, M., 2004. Biomass growth and activity in a membrane bioreactor with complete sludge retention. *Water Research*, 38, (7), 1799-1808.

Pollice, A., Laera, G., Saturno, D., Giordano, C., 2008. Effects of sludge retention time on the performance of a membrane bioreactor treating municipal sewage. *Journal of Membrane Science*, 317, (1-2), 65-70.

Pribyl, M., Tucek, F., Wilderer, P., Wanner, J., 1997. Amount and nature of soluble refractory organics produced by activated sludge micro-organisms in sequencing batch and continuous flow reactors. *Water Science and Technology*, 35, (1), 27-34.

Priester, J., Olson, S., Webb, S., Neu, M., Hersman, L., Holden, P., 2006. Enhanced exopolymer production and chromium stabilization in *Pseudomonas putida* unsaturated biofilms. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 72, 1988-1996.

Psoch, C., Schiewer, S., 2006. Anti-fouling application of air sparging and backflushing for MBR. *Journal of Membrane Science*, 283, (1-2), 273-280.

R

Ramasamy, P., Zhang, X., 2005. Effects of shear stress on the secretion of extracellular polymeric substances in biofilms. *Water Science and Technology*, 52, (7), 217-223.

Ras, M., Girbal-Neuhauser, E., Paul, E., Lefebvre, D., 2008a. A high yield multi-method extraction protocol for protein quantification in activated sludge. *Bioresource Technology*, 99, (16), 7464-7471.

Ras, M., Girbal-Neuhauser, E., Paul, E., Spérandio, M., Lefebvre, D., 2008b. Protein extraction from activated sludge: An analytical approach. *Water Research*, 42, (8-9), 1867-1878.

Rasmussen, H., Bruus, J., Keiding, K., Nielsen, P.H., 1994. Observations on dewaterability and physical, chemical and microbiological changes in anaerobically stored activated sludge from a nutrient removal plant. *Water Research*, 28, 417-425.

Ray, S., Peters, C., 2008. Changes in microbiological metabolism under chemical stress. *Chemosphere*, 71, 474-483.

Rosenberger, S., Kraume, M., 2002. Filterability of activated sludge in membrane bioreactors. *Desalination*, 146, (1-3), 373-379.

Rosenberger, S., Laabs, C., Lesjean, B., Gnissr, R., Amy, G., Jekel, M., Schrotter, J., 2006. Impact of colloidal and soluble organic material on membranes performances in membrane bioreactors for municipal wastewater treatment. *Water Research*, 40, (4), 710-720.

S

Salhi, M., 2003. Procédés couplés boues activées-ozonation pour la réduction de la production de boues : étude, modélisation et intégration dans la filière de traitement de l'eau. Thèse de doctorat, INSA Toulouse.

Sanin, D., Vesilind, P.A., 2000. Bioflocculation of Activated Sludge: The Role of Calcium Ions and Extracellular Polymers. *Environmental Technology*, (21), 1405-1412.

- Senesi, N., 1990. Molecular and quantitative aspects of the chemistry of fulvic acid and its interactions with metal ions and organic chemicals. Part II. The fluorescence spectroscopy approach. *Analytica Chimica Acta*, 232, 77-106.
- Shen, L., Zhou, Y., Mahendran, B., Bagley, D.M., Liss, S.N., 2010. Membrane fouling in a fermentative hydrogen producing membrane bioreactor at different organic loading rates. *Journal of Membrane Science*, 360, (1-2), 226-233.
- Shen, Y.-x., Xiao, K., Liang, P., Sun, J.-y., Sai, S.-j., Huang, X., 2012. Characterization of soluble microbial products in 10 large-scale membrane bioreactors for municipal wastewater treatment in China. *Journal of Membrane Science*, in press.
- Sheng, G.-P., Yu, H.-Q., Li, X.-Y., 2010 Extracellular polymeric substances (EPS) of microbial aggregates in biological wastewater treatment systems: A review. *Biotechnology Advances*, 28, (6), 882-894.
- Sheng, G., Yu, H., Yue, Z., 2005. production of EPS from *Rhodospseudomonas acidophilia* in the presence of toxic substances. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 69, 216-222.
- Shiau, J., Tang, C., Lin, T., Wang, D., 2003. Role of compression of proteins aggregates in the development of filtration resistance during MF. In Process, IMSTEC, Sydney.
- Shin, H.-S., Kang, S.-T., 2003. Characteristics and fates of soluble microbial products in ceramic membrane bioreactor at various sludge retention times. *Water Research*, 37, (1), 121-127.
- Shin, H., Kang, S., Nam, S., 2001. Effect of carbohydrate and protein in the EPS on sludge settling characteristics. *Water Science and Technology*, 43, (6), 193-196.
- Shufang, Y., 2004. Development of aerobic granules for simultaneous organic carbon and nitrogen removal. PhD thesis, School of civil and environmental engineering nanyang technological university.
- Smith, C.V., DiGreggiorio, D., Talcott, R.M., 1969. The use of ultrafiltration membranes for activated sludge separation. *Proceeding of the 24th Annual Purdue Industrial Waste Conference*.
- Sobeck, D.C., Higgins, M.J., 2002. Examination of three theories for mechanisms of cation-induced bioflocculation. *Water Research*, 36, (3), 527-538.
- Spanjers, H., Vanrolleghem, P., Olsson, G., Dold, P., 1998. *Respirometry in control of the activated sludge process: principles*. IAWQ Scientific and technical report n°7, London, UK.
- Spérandio, M., Espinosa, M.C., 2008. Modelling an aerobic submerged membrane bioreactor with ASM models on a large range of sludge retention time. *Desalination*, 231, (1-3), 82-90.
- Sponza, D.T., 2002. Extracellular polymer substances and physicochemical properties of flocs in steady and unsteady-state activated sludge systems. *Process Biochemistry*, 37, (9), 983-998.

Sponza, D.T., 2003. Investigation of extracellular polymer substances (EPS) and physicochemical properties of different activated sludge flocs under steady-state conditions. *Enzyme and Microbial Technology*, 32, (3-4), 375-385.

Stevenson, F., 1982. Extraction, fraction and general chemical composition of soil organic matter. John Wiley and Sons, New York.

Stricot, M., 2004. Caractérisation des mécanismes de sécrétion des produits microbiens solubles dans les boues de bioréacteurs à membranes. DEA de Chimie et microbiologie de l'eau, Universités de Nancy, Pau et Poitiers.

Su, Y., Pan, J., Huang, C., Chang, C., 2011. Impact of sludge retention time on sludge characteristics and microbial community in MBR. *Water Science and Technology*, 63, 2250-2254.

Sun, F., Wang, X., Li, X., 2011. Change in the fouling propensity of sludge membrane bioreactors in relation to the accumulation of biopolymer clusters. *Bioresource Technology*, 102, (7), 4718-4725.

Sun, F., Wang, X., Li, X., 2008. Visualisation and characterization of biopolymer clusters in a submerged membrane bioreactor. *Journal of Membrane Science*, 325, (2), 691-697.

Sweity, A., Ying, W., Ali-Shtayeh, M.S., Yang, F., Bick, A., Oron, G., Herzberg, M., 2011. Relation between EPS adherence, viscoelastic properties, and MBR operation: Biofouling study with QCM-D. *Water Research*, 45, (19), 6430-6440.

T

Tardieu, E., Grasmick, A., Geaugey, V., Manem, J., 1999. Influence of hydrodynamics on fouling velocity in a recirculated MBR for wastewater treatment. *Journal of Membrane Science*, 156, (1), 131-140.

Teck, H., Koong, K., Sun, D., Leckie, J., 2009. Influence of prolonged sludge retention time environment on nitrification and denitrification and sludge production in submerged membrane bioreactor. *Desalination*, 245, (1-3), 28-43.

Trussell, R.S., Merlo, R.P., Hermanowicz, S.W., Jenkins, D., 2006. The effect of organic loading on process performance and membrane fouling in a submerged membrane bioreactor treating municipal wastewater. *Water Research*, 40, (14), 2675-2683.

Trussell, R.S., Merlo, R.P., Hermanowicz, S.W., Jenkins, D., 2007. Influence of mixed liquor properties and aeration intensity on membrane fouling in a submerged membrane bioreactor at high mixed liquor suspended solids concentrations. *Water Research*, 41, (5), 947-958.

Tsai, B., Chang, C., Lee, D., 2008. Fractionation of soluble microbial products (SMP) and soluble extracellular polymeric substances (EPS) from wastewater sludge. *Environmental Technology*, 29, 1127-1138.

V

Van den Broeck, R., Van Dierdonck, J., Nijskens, P., Dotremont, C., Krzeminski, P., van der Graaf, J.H.J.M., van Lier, J.B., Van Impe, J.F.M., Smets, I.Y., 2012. The influence of solids

retention time on activated sludge bioflocculation and membrane fouling in a membrane bioreactor (MBR). *Journal of Membrane Science*, 401-402, 48-55.

Viero, A., Sant' Anna Jr, G., 2008. Is hydraulic retention time an essential parameter on membrane bioreactor performances ? *Journal of Hazardous material*, 150, (1), 185-186.

W

Watanabe, Y., Kimura, K., Itonaga, T., 2006. Influence of dissolved organic carbon and suspension viscosity on membrane fouling in submerged membrane bioreactor. *Separation Science and Technology*, 41, (7), 1371-1382.

Wingender, J., Neu, T.R., Flemming, H.C., 1999. *Microbial extracellular polymeric substances : characterization, structure and function*. Springer, Berlin.

Wisniewski, C., 2007. Membrane bioreactor for water reuse. *Desalination*, 203, (1-3), 15-19.

Wisniewski, C., Grasmick, A., Leon Cruz, A., 2000. Critical particle size in membrane bioreactors: Case of a denitrifying bacterial suspension. *Journal of Membrane Science*, 178, (1-2), 141-150.

Wu, Z., Wang, Q., Wang, Z., Ma, Y., Zhou, Q., Yang, D., 2010. Membrane fouling properties under different filtration modes in a submerged membrane bioreactor. *Process Biochemistry*, 45, (10), 1699-1706.

Wuertz, S., Spaeth, R., Hinderberger, A., Griebe, T., Flemming, H., Wilderer, P., 2001. New method for extraction of EPS from biofilm and activated sludge suitable for direct quantification of sorbed metals. *Water Science and Technology*, 43, 25-31.

X

Xing, C.H., Tardieu, E., Qian, Y., Wen, X.H., 2000. Ultrafiltration membrane bioreactor for urban wastewater reclamation. *Journal of Membrane Science*, 177, (1-2), 73-82.

Y

Yamamoto, K., Hiasa, M., Mahmood, T., Matsuo, T., 1989. Direct solid-liquid separation using hollow fiber membrane in an activated-sludge aeration tank. *Water Sci technol*, 21, 43-54.

Yigit, N.O., Civelekoglu, G., Harman, I., Koseoglu, H., Kitis, M., 2009. Effects of various backwash scenarios on membrane fouling in a membrane bioreactor. *Desalination*, 237, (1-3), 346-356.

You, H., Tseng, C., Peng, M., Chang, S., Chen, Y., Peng, S., 2005. A novel application of an anaerobic membrane process in wastewater treatment. *Water Science and Technology*, 51, (6-7), 45-50.

Z

Zhang, J., Chua, H.C., Zhou, J., Fane, A.G., 2006. Factors affecting the membrane performance in submerged membrane bioreactors. *Journal of Membrane Science*, 284, (1-2), 54-66.

Zhang, X., Bishop, P.L., 2003. Biodegradability of biofilm extracellular polymeric substances. *Chemosphere*, 50, (1), 63-69.

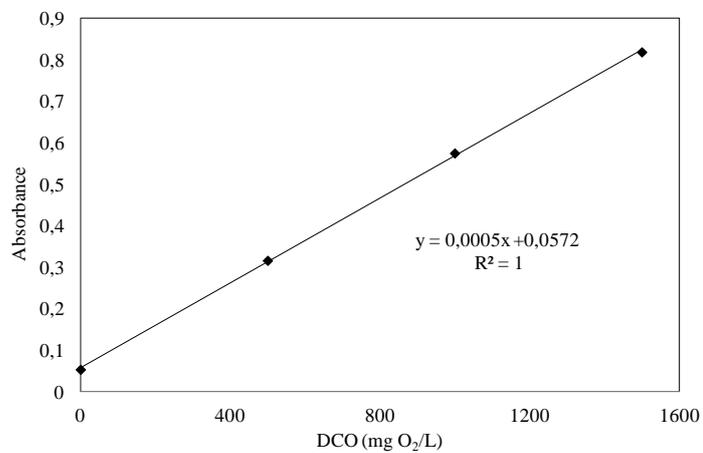
Zhang, X.Q., Bishop, P.L., Kinkle, B.K., 1999. Comparison of extraction methods for quantifying extracellular polymers in biofilms. *Water Science Technology* 39, (211).

Zhou, J., Yang, F.-l., Meng, F.-g., An, P., Wang, D., 2007. Comparison of membrane fouling during short-term filtration of aerobic granular sludge and activated sludge. *Journal of Environmental Sciences*, 19, (11), 1281-1286.

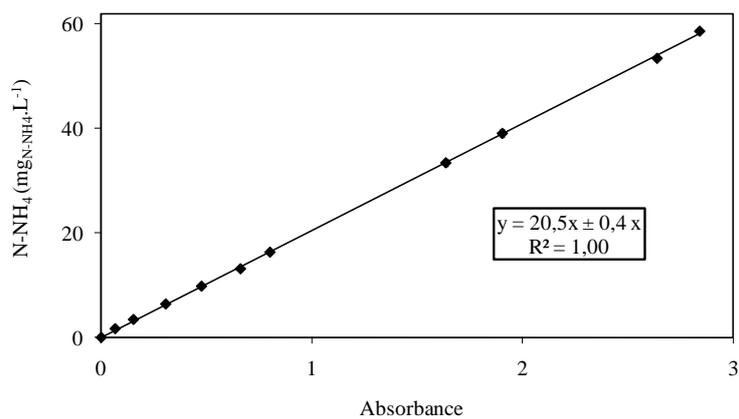
Zhou, L.X., Liang, J.R., Zhan, X.H., Wong, J., 2001. Fractionation and characterization of sludge bacterial extracellular polymers by FT-IR, C-NMR, H-NMR. *Water Science and Technology* 44, (10), 71- 78.

Annexe 1: droites d'étalonnage pour l'analyse de l'ammonium, de la DCO, des nitrates, des polysaccharides, des protéines et des substances humiques-like

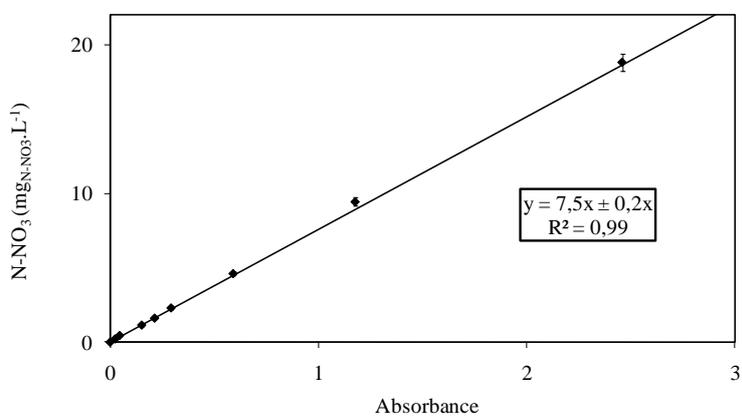
Annexe 1. 1 : La DCO



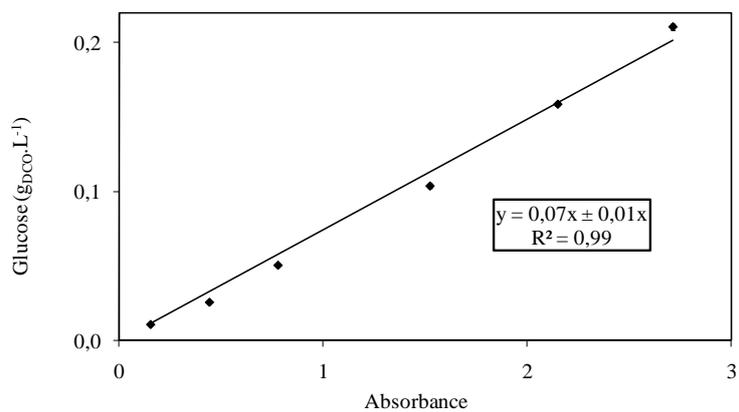
Annexe 1. 2 : L'ammonium



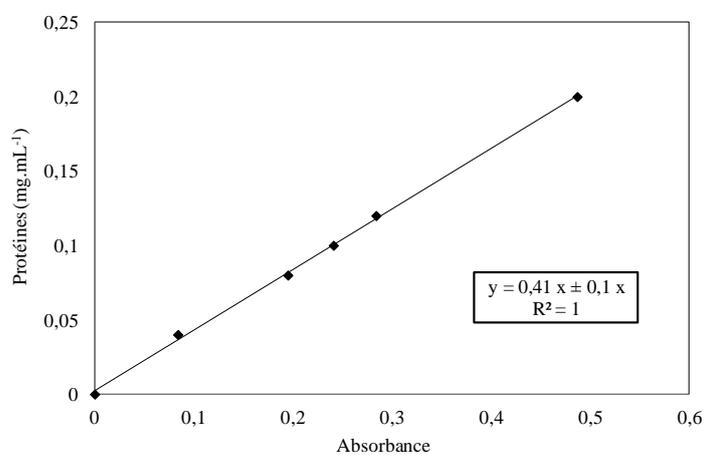
Annexe 1. 3 : Les nitrates



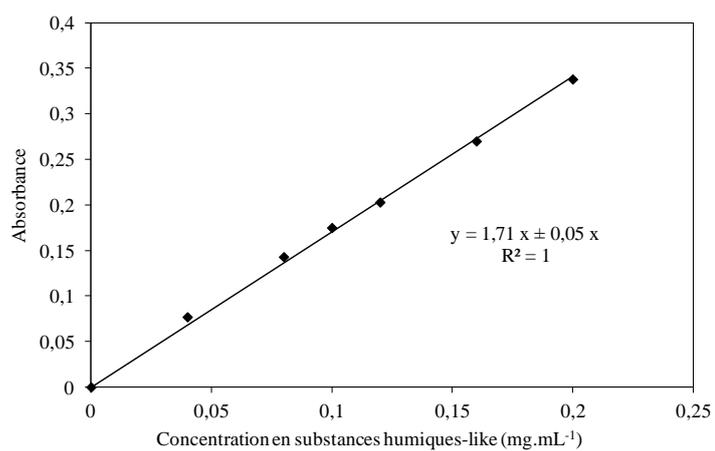
Annexe 1. 4 : Les polysaccharides



Annexe 1. 5 : Les protéines

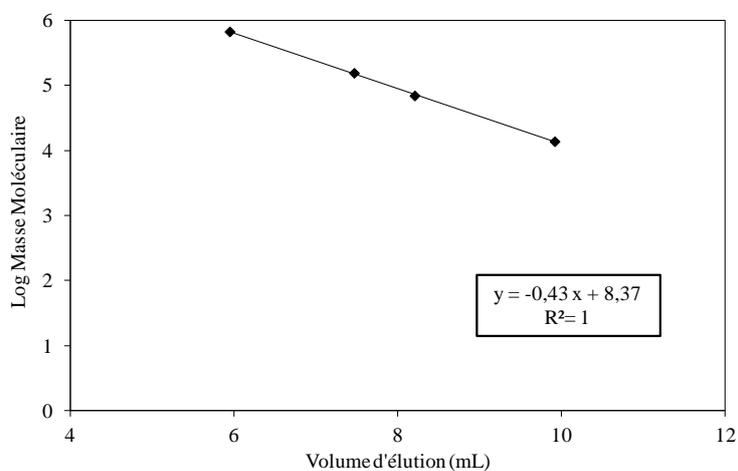


Annexe 1. 6 : Les substances humiques-like

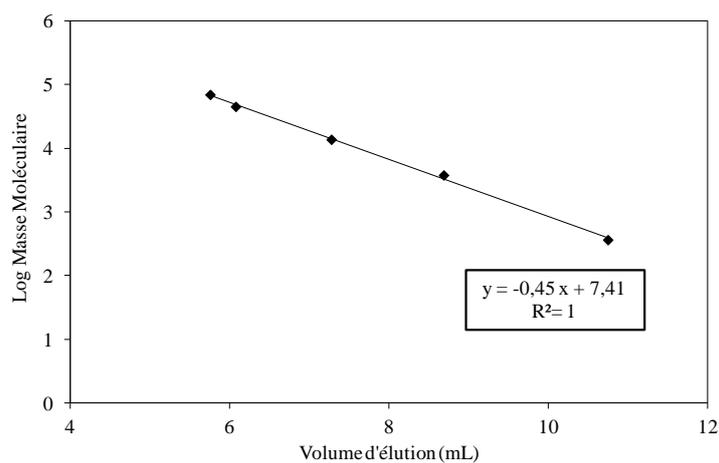


Annexe 2 : droites d'étalonnages pour l'attribution de masses moléculaires apparentes à partir des volumes d'élution obtenus par chromatographie d'exclusion stérique couplée à un détecteur de fluorescence

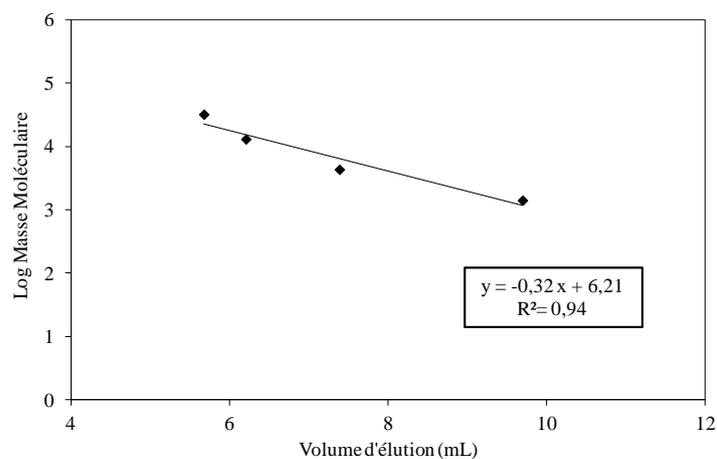
Annexe 2. 1 : colonne Agilent Bio SEC 300 Å (protéines)



Annexe 2. 2 : colonne Agilent Bio SEC 100 Å (protéines)

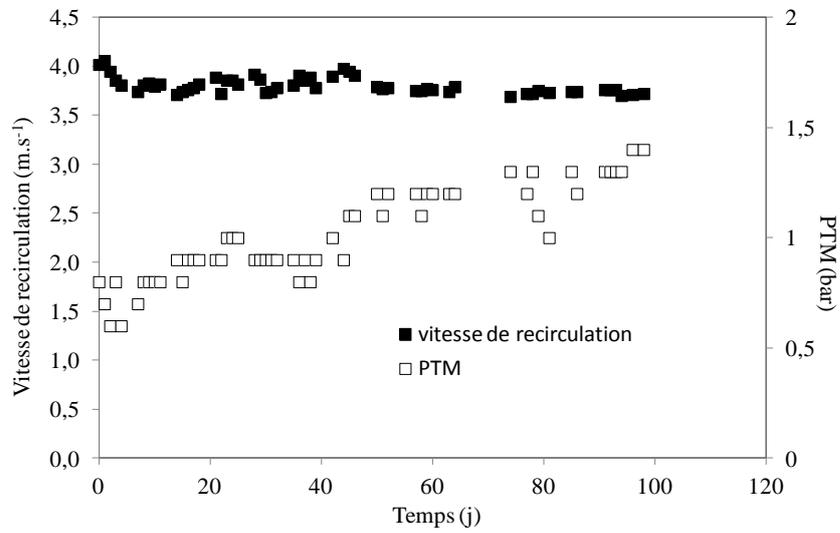


Annexe 2. 3 : colonne Agilent Bio SEC 100 Å (substances humiques-like)

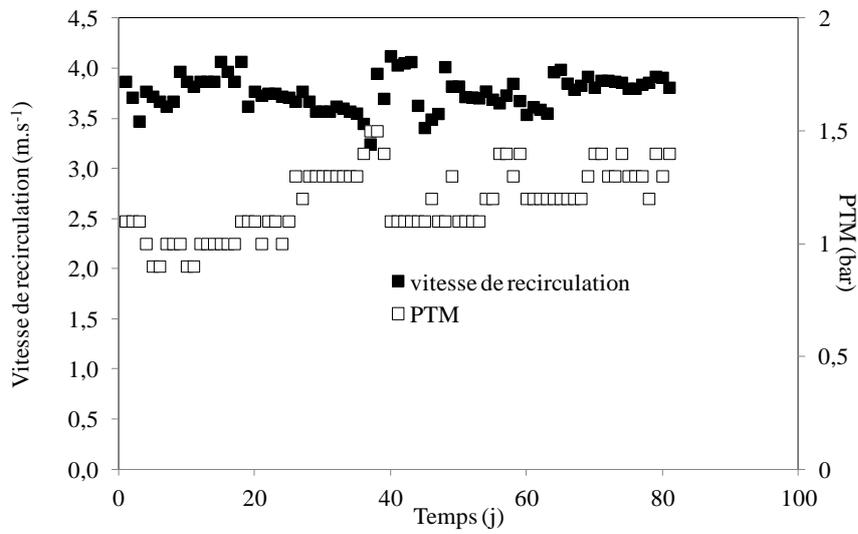


Annexe 3 : Evolution de la PTM et de la vitesse de recirculation au cours des deux acclimations à 20 et 50 jours

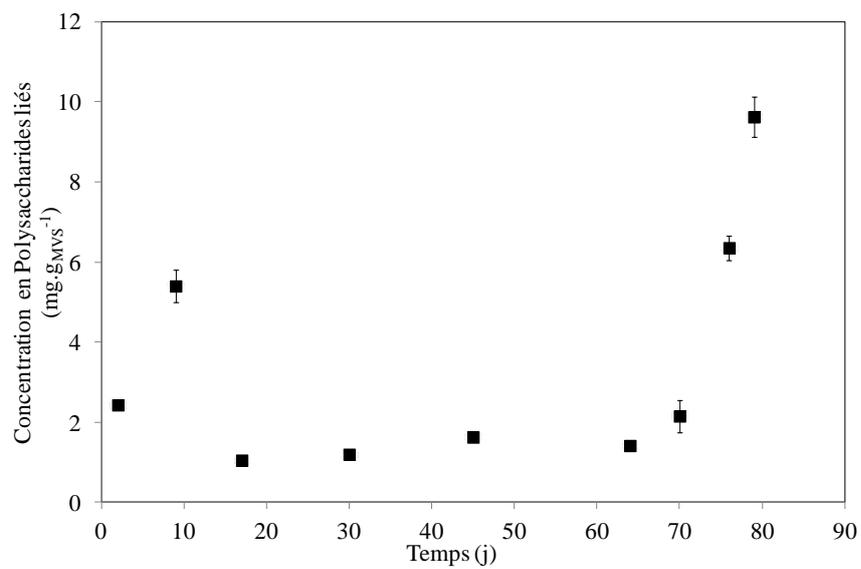
Annexe 3.1 : A 20 jours



Annexe 3.2 : A 50 jours



Annexe 4.1 : Evolution de la concentration en polysaccharides extraites des PEC liés du bioréacteur dans le traitement d'un ERU



Bioréacteur à membranes pour le traitement d'eaux usées domestiques : influence des conditions environnementales et opératoires sur l'activité des biomasses et le transfert de matière

Si le procédé de traitement des eaux usées urbaines par bioréacteur à membranes est en plein essor depuis quelques années, il ne reste pas moins plusieurs verrous technologiques qui ralentissent l'expansion de sa commercialisation. Ce travail de thèse s'attache à apporter des éléments de réponse sur quelques uns des freins à sa progression. Le premier réside dans la détermination d'un âge de boues adapté permettant une épuration maximale de l'azote et de la matière organique, par une biomasse active où le colmatage est limité et la production de boues faible. Le choix s'est porté sur 50 jours qui remplit l'ensemble de ces critères. Une autre barrière se situe dans le manque de données permettant l'extrapolation des informations obtenues en laboratoire à celles engrangées sur site. Une des étapes clés est de déterminer les conséquences du changement d'effluent (synthétique ou réel) sur les performances et le colmatage du procédé. L'utilisation d'une méthode de fluorescence récente a permis la détermination de l'implication des protéines et substances humiques-like extraits des polymères extracellulaires solubles dans le colmatage.

Mots clés : bioréacteur à membranes, âge de boues, nature effluent, polymères extracellulaires

Membrane bioreactor for urban wastewater treatment : influence of environmental and operating conditions on biological activity and mass transfer

For several years, membrane bioreactor for urban wastewater treatment has been booming. Nevertheless some issues still slow down its expansion. This work tries to answer some of the brakes to its progression. First one concerns the choice of the suitable sludge age which guarantee maximal removal rates of ammonium and organic matter, by an active biomass where fouling is limited and sludge production low. 50 days is fulfilling all the criteria. An other concern is about the lack of data allowing extrapolation from laboratory to wastewater treatment plant. One key step is to determine the impact of influent nature (synthetic or real) on process results and fouling. Use of recent fluorescence method allows determining the implication of proteins and humic substances-like from soluble extra polymeric substances on fouling.

Keywords : membrane bioreactor, sludge age, influent nature, extra polymeric substances