

50376
1986
189

50376
1986
189

THÈSE

présentée à

L'UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE FLANDRES ARTOIS

pour obtenir le titre de

DOCTEUR - INGENIEUR

en **BIOLOGIE** et **PHYSIOLOGIE VEGETALES**

par

Bertrand DELANNOY

Ingénieur I.S.A. de LILLE



NITRIFICATION BIOLOGIQUE-APPLICATION AUX EFFLUENTS DE SUCRERIE TRAITES PAR METHANISATION

**Etude comparative en réacteurs pilotes de procédés à cellules fixées
Optimisation des conditions de conservation et de reprise de
l'activité nitrifiante**

Soutenue le 28 Octobre 1986 devant la Commission d'Examen

Jury :	Président :	Monsieur	J.	GUILLAUME
	Rapporteurs :	Messieurs	G.	MARTIN
			J.M.	ROVEL
	Examineurs :	Messieurs	P.	DEVILLERS
			G.	ALBAGNAC
			R.	TAILLIEZ
			R.	DUSAUTOIS

SIGLES ET ABBREVIATIONS UTILISEES

Cette page libre permet au lecteur d'accompagner la lecture du texte et de certains tableaux.

La liste suivante n'est pas exhaustive, mais regroupe les notations et abréviations les plus souvent rencontrées dans la thèse. Certaines unités sont assez peu usitées mais correspondent à celles couramment mentionnées dans les études précédentes sur la nitrification.

A.D.N.	: Acide Desoxyribo Nucléique	
A.G.V.	: Acides Gras Volatils	
anoxie	: environnement privé d'oxygène	
aw	: Activité de l'eau assimilée à l'humidité relative de l'air	
Batch	: Culture discontinue	
Ca	: calcium	
CH ₄	: méthane	
C/N _A	: Rapport carbone sur azote d'un milieu	
C.O.T.	: Carbone Organique Total	
D.B.O. ₅	: Demande Biologique en Oxygène (5 jours - 20°C)	
D.C.O.	: Demande Chimique en Oxygène	
éq/l (ou meq/l)	: concentration d'une solution normale (ou N/1000)	
°f	: Degré français, correspondant à 5 milliéquivalents	
(G x -)	: Grossissement microscopique	
K _O	: Constante de saturation pour l'oxygène	
K _m	: Constante de saturation définie sur la vitesse d'oxydation	
K _s	: Constante de saturation définie sur le taux de croissance	
Lit turbulent	: Lit fluidisé aéré (par opposition à lit expansé)	
log ₁₀ ou Log	: logarithme à base 10	
M.e.s.	: Matières en suspension	
M.P.N.	: Most Probable Number ou Nombre le Plus Probable	
M.v.s.	: Matières volatiles en suspension	
Nb	: <u>Nitrobacter sp</u>	
Ns	: <u>Nitrosomonas sp</u>	
N - NH ₄	: Azote ammoniacal	} toutes ces formes sont exprimées en azote
N - NO ₂	: Azote nitreux	
N - NO ₃	: Azote nitrique	
N ox	: Azote oxydé	
N.T.K.	: Azote Total Kjeldahl	
Od	: Concentration limitante en oxygène dissous	
S	: Surface spécifique d'un matériau	
t°	: température	
T.A.C.	: Titre Alcalimétrique Complet (meq/l ou °f)	
(V/V)	: dilution volume-volume	
Y	: coefficient de rendement cellulaire	
μ _{max}	: taux de croissance maximum	
Ø	: diamètre	

Cette thèse a été réalisée dans le cadre d'un Contrat Industriel de Formation par la Recherche attribué par l'Association Nationale pour la Recherche Technique (1) au Syndicat National des Fabricants de Sucre de France (2).

Le travail se situe dans le cadre d'une étude complète demandée par l'interprofession Betterave-Sucre et a fait l'objet d'une collaboration entre l'Institut de Recherches de l'Industrie Sucrière (3), laboratoire d'accueil, et l'Institut National de la Recherche Agronomique (3).

Les travaux dont les résultats sont exposés ci-après ont été réalisés, pour la partie industrielle, à la sucrerie Beghin-Say de THUMERIES (4), en relation avec les sociétés de traitement d'eau suivantes : Société Générale pour les Techniques Nouvelles (5), Degremont (6), Omnium de Traitements et de Valorisation (7) et l'Air Liquide (8).

Je remercie tous ces organismes et sociétés d'avoir réuni les conditions logistiques et financières qui m'ont permis de mener à bien ces recherches.

Je remercie tout particulièrement le Groupe Paritaire, présidé par Monsieur BURGER.

- | | |
|--|--|
| (1) ANRT
16, avenue Bugeaud
75116 PARIS | (5) SGN
1, rue des Hérons
78184 ST QUENTIN EN YVELINES |
| (2) SNFS
23, avenue d'Iéna
75783 PARIS | (6) DEGREMONT
18, avenue du 18 Juin 1940
92508 RUEIL MALMAISON |
| (3) IRIS
369, rue Jules Guesde
59651 VILLENEUVE D'ASCQ

INRA
(même adresse) | (7) OTV
Chemin de la Digue
BP 76
78600 MAISONS LAFFITTE |
| (4) Société BEGHIN-SAY
59239 THUMERIES | (8) L'AIR LIQUIDE
C.R.D.G.
BP 15
38360 SASSENAGE |

Je remercie Monsieur P. DEVILLERS, Directeur de l'IRIS, de m'avoir accueilli dans son Institut pendant plus de trois ans afin de prolonger mes études par un contrat dont je mesure les nombreux avantages.

Je remercie tout spécialement Monsieur J.P. LESCURE, Chef du Service Chimique de l'IRIS, responsable de mes travaux, qui a su me guider et me conseiller, tout en me laissant une part d'initiative importante, preuve de toute la confiance qu'il m'a accordée dans l'orientation de mes recherches.

J'exprime toute ma reconnaissance à Messieurs G. ALBAGNAC, H.C. DUBOURGUIER et D. VERRIER de l'INRA dont la disponibilité et les conseils judicieux m'ont beaucoup apporté sur le plan de la rigueur scientifique.

Ma reconnaissance va également à Monsieur le Professeur J. GUILLAUME, qui a accepté la présidence de mon Jury de Thèse et qui, à plusieurs reprises, a su me faire bénéficier de sa riche expérience.

J'exprime mes vifs remerciements à Monsieur le Professeur G. MARTIN, qui m'a fait l'honneur de participer à mon Jury ; je lui suis très reconnaissant de l'intérêt qu'il m'a témoigné au cours de cette étude.

Que Messieurs J.M. ROVEL, R. TAILLIEZ et R. DUSAUTOIS soient remerciés d'avoir accepté de juger ce travail et de participer au Jury de Thèse.

Je tiens à remercier très sincèrement Monsieur S. HONORE, Directeur Technique de la sucrerie Beghin-Say de THUMERIES dont la disponibilité et la mise à disposition de moyens importants ont fortement contribué à la réussite des essais pilotes dans son établissement.

Cette étude n'aurait pu être menée à bien sans l'aide précieuse de l'ensemble du personnel de l'IRIS et de l'INRA, tout particulièrement de Mademoiselle G. DERUY et de Messieurs P. BOURLET, J.P. DUCATILLON, P. LAGEAT ; que toutes ces personnes trouvent ici l'expression de ma profonde gratitude.

J'exprime également toute ma sympathie à Mme F. DERVEAUX et Mlle C. URBIN pour leur travail efficace de mise en forme du présent document ainsi que de nombreux autres.

Il me reste à saluer ma famille, mes amis, qui, sans le savoir parfois, m'ont beaucoup aidé tout au long de cette étude.

R E S U M E

La présente étude montre la faisabilité biologique et technologique du post-traitement de nitrification adapté à un effluent de digesteur anaérobie en sucrerie.

Une première partie est consacrée à une synthèse bibliographique sur la nitrification, volontairement orientée sur les aspects particuliers du traitement des eaux méthanisées de sucrerie et de leur rejet.

Dans une deuxième partie est décrite et commentée l'expérimentation conduite à la sucrerie de THUMERIES (59). On étudie dans un premier temps de façon très complète le Biofiltre anaérobie dont la bonne marche conditionne le post-traitement aérobie. Quatre pilotes de nitrification à biomasse fixée sont alors testés en parallèle durant deux campagnes d'essais. L'étude montre qu'après trois semaines de montée en charge, on peut traiter jusqu'à 1,5 kg d'azote ammoniacal par m³ et par jour, ce qui correspond à des temps de séjour inférieurs à 1,5 heure dans les appareils, ceci avec des rendements d'élimination supérieurs à 95 %. Les meilleurs résultats sont obtenus sur les procédés à supports poreux et utilisant l'air comme source d'oxygène. Les principales difficultés rencontrées lors de ces essais sont liées aux caractéristiques de l'effluent méthanisé : équilibre calco-carbonique, fuite en carbone organique dissous et relargages occasionnels de boues méthanigènes.

Dans une troisième partie sont présentées les principales études complémentaires réalisées sur pilotes de laboratoire. Elles sont destinées à optimiser certains paramètres de fonctionnement et à définir des conditions fiables de conservation de la flore nitrifiante durant l'intercampagne sucrière. Les expériences sont toutes réalisées sur supports poreux. On montre tout d'abord que la phase de démarrage peut être réduite de près d'une semaine par dopage en CO₂ de l'air de process. On expérimente ensuite le principe d'une décarbonatation préalable de l'eau. Cette décarbonatation doit être partielle et semble difficile à conduire sur le plan industriel. Enfin, on évalue les charges organiques qui peuvent inhiber la nitrification en culture fixée. Lorsqu'on dépasse les charges limites de 1,2-1,5 kg C.O.T./m³.j, le rendement de nitrification chute sans toutefois altérer la flore nitrifiante fixée.

Les nombreux essais de conservation des bactéries nitrifiantes permettent de définir une technique applicable sur le plan industriel. Elle consiste à immerger, in situ, à température ambiante, les supports ensemencés dans de l'eau de forage, après rinçage du matériau garni. La mise en phase stationnaire des micro-organismes 48 heures avant l'arrêt favorise leur adaptation aux conditions de jeûne total. Une perte rapide d'activité de 30-35 % est inévitable dans les quinze premiers jours; elle se stabilise ensuite. Après plusieurs phases d'arrêts et de reprises, le temps de retour aux performances initiales d'un réacteur peut être réduit à 7 jours.

Un prototype industriel de nitrification est actuellement en construction à la sucrerie de THUMERIES.

MOTS-CLEFS : Sucrerie - Traitement des eaux - Post-traitement -
Nitrification - Effluent méthanisé - Biofiltre -
Lit fluidisé - Conservation

Ce travail a fait l'objet d'une communication au congrès EWPCA - AQUATECH'86 - (Amsterdam - Sept. 1986).

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION - CADRE DE L'ETUDE

1ère PARTIE : RAPPEL BIBLIOGRAPHIQUE

I - <u>HISTORIQUE</u>	p. 2
II - <u>MICROBIOLOGIE DE LA NITRIFICATION</u>	p. 2
II-1 Habitat	
II-2 Les bactéries nitrifiantes	
II-2-a Nitrification autotrophe	
II-2-b Nitrification hétérotrophe	
II-2-c Associations	
II-3 Mécanismes biochimiques de la nitrification	
II-3-a Réactions d'oxydation	
II-3-b Synthèse cellulaire	
II-3-c Equation générale	
II-4 Les principales caractéristiques métaboliques des bactéries nitrifiantes	
III - <u>INFLUENCE DES PARAMETRES DU MILIEU SUR LA NITRIFICATION</u>	p. 7
III-1 Teneur en oxygène dissous	
III-2 Température	
III-3 pH	
III-4 Concentration en azote minéral	
III-5 Composés du milieu	
III-5-a Micronutriments et substances stimulantes	
III-5-b Inhibition de la nitrification	
III-6 Autres paramètres sur la nitrification	
III-6-a Concentration en bactéries nitrifiantes et âge de boues	
III-6-b Influence de la fixation et de la turbulence	
IV- <u>CONSERVATION DE L'ACTIVITE NITRIFIANTE</u>	p.12
IV-1 Etudes dans les sols	
IV-2 Etudes en cultures pures	
IV-2-a <u>Nitrosomonas sp</u>	
IV-2-b <u>Nitrobacter sp</u>	

V - PROCEDES DE NITRIFICATION

p.14

- V-1 Adaptation des techniques classiques à la nitrification
- V-2 Utilisation des procédés à bactéries fixées

VI - LE REJET D'EAUX NITRIFIEES

p.16

- VI-1 Mise au point
- VI-2 Effets des nitrates en rivière
- VI-3 Elimination des nitrates avant rejet

VII - CONCLUSION

p.17

2ème PARTIE : ETUDE SUR SITE INDUSTRIEL

I - THUMERIES - PRESENTATION DU SITE

p.19

- I-1 La Sucrierie de THUMERIES et les eaux résiduaires
- I-2 Circuit des eaux de la Sucrierie
 - I-2-a Circuit provisoire
 - I-2-b Projet de filière complète de traitement des eaux

II - THUMERIES - LE DIGESTEUR ANAEROBIE

p.20

- II-1 Caractéristiques et description de l'installation
- II-2 Résultats et performances
 - II-2-a Caractéristiques des eaux décantées
 - II-2-b Résultats
- II-3 Observations et mesures complémentaires
 - II-3-a Profils de digesteur
 - II-3-b Mesures en intercampagne
- II-4 Caractéristiques du rejet à nitrifier
- II-5 Conclusions

III - THUMERIES - NITRIFICATION SUR PILOTES INDUSTRIELS

p.24

- III-1 Présentation de l'étude
 - III-1-a Chronologie et plan de l'étude
 - III-1-b Mise en oeuvre de l'expérimentation
- III-2 Présentation des appareils
- III-3 Analyses et contrôles
 - III-3-a Analyses et contrôles systématiques
 - III-3-b Mesures non systématiques

- III-4 Synthèse et exploitation des résultats
 - III-4-a Ensemencement et démarrage des pilotes
 - III-4-b Performances
 - III-4-c Conservation des supports ensemencés en intercampagne

IV - CONCLUSIONS

p.32

3ème PARTIE : ETUDES COMPLEMENTAIRES DE LABORATOIRE

INTRODUCTION

A - ETUDE DE QUELQUES PARAMETRES SPECIFIQUES A LA NITRIFICATION DES EFFLUENTS METHANISES DE SUCRERIE

I - PRESENTATION DES EXPERIENCES

p.33

- I-1 Dispositifs expérimentaux
 - I-1-a Réacteurs de type "lit turbulent"
 - I-1-b Réacteurs de type "Biofiltre"
- I-2 Substrats
- I-3 Contrôles

II - INFLUENCE DE L'EQUILIBRE CALCO-CARBONIQUE DU MILIEU

p.35

- II-1 Introduction
- II-2 Décarbonatation de l'affluent
 - II-2-a But
 - II-2-b Résultats
 - II-2-c Commentaires
- II-3 Dopage en CO₂ de l'air de process
 - II-3-a But
 - II-3-b Résultats
 - II-3-c Commentaires

III - FACTEURS LIES AU FONCTIONNEMENT DU DIGESTEUR ANAEROBIE DE THUMERIES

p.39

- III-1 Introduction
- III-2 Application d'une charge organique limite
 - III-2-a But
 - III-2-b Résultats
 - III-2-c Commentaires

- III-3 Augmentation brutale de la charge organique appliquée
 - III-3-a But
 - III-3-b Résultats
 - III-3-c Commentaires

IV - CONCLUSIONS

p.42

B - OPTIMISATION DES CONDITIONS DE CONSERVATION ET DE REPRISE DE L'ACTIVITE NITRIFIANTE

I - ORIENTATION DES TRAVAUX

p.42

- I-1 Présentation
- I-2 Etude d'approche
 - I-2-a Protocole de conservation
 - I-2-b Résultats
 - I-2-c Commentaires
- I-3 Etude de quelques paramètres
 - I-3-a Température
 - I-3-b Etat physiologique des bactéries

II - CONSERVATION PAR DESHYDRATATION

p.45

- II-1 Influence de l'humidité sur la conservation
 - II-1-a But
 - II-1-b Protocole
 - II-1-c Résultats
 - II-1-d Commentaires
- II-2 Application à l'échelle pilote
 - II-2-a Protocole et évaluation de la conservation
 - II-2-b Résultats
 - II-2-c Commentaires
- II-3 Amélioration de la technique - Application d'un facteur de corrélation
 - II-3-a But
 - II-3-b Mode opératoire
 - II-3-c Résultats
 - II-3-d Commentaires

III - CONSERVATION PAR IMMERSION

p.50

- III-1 Influence du milieu de conservation
 - III-1-a But
 - III-1-b Protocole
 - III-1-c Résultats
 - III-1-d Commentaires

- III-2 Application sur pilote de laboratoire
 - III-2-a Présentation des essais
 - III-2-b Résultats
 - III-2-c Commentaires

IV - REPRISE DE LA NITRIFICATION

p.54

- IV-1 Reprise consécutive à une mauvaise conservation
 - IV-1-a Cas étudié
 - IV-1-b Résultats
 - IV-1-c Commentaires
- IV-2 Reprise consécutive à une bonne conservation

V - CONCLUSION

p.56

CONCLUSION - PERSPECTIVES

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

ANNEXES

- 1 - Méthodes analytiques
- 2 - Méthodes microbiologiques
- 3 - Méthodes de conservation : dessiccation et immersion
- 4 - Schémas des réacteurs de laboratoire
- 5 - Observations en microscopie électronique à balayage
- 6 - Publications

INTRODUCTION - CADRE DE L'ETUDE

Les Services Techniques de l'Industrie Sucrière Française ont fait figure de pionnier en matière de traitement des eaux résiduaires de sucrerie par la voie anaérobie. Les procédés évoluent depuis plus de 10 ans dans ce domaine et la dernière technologie implantée en Sucrerie Française utilise le Biofiltre, système très performant à flore immobilisée. Malheureusement, les procédés anaérobies de fermentation méthanique sont inefficaces sur la pollution azotée qui se transforme en azote ammoniacal lors de son passage dans le digesteur. Il convient donc, par souci de protection des rivières, de compléter le travail du digesteur par un traitement aérobie; on évite ainsi une nitrification naturelle dans le milieu récepteur, grande consommatrice d'oxygène.

A la demande de l'Interprofession Betterave-Sucre et sous le contrôle d'un Groupe Paritaire, des fonds communs ont été engagés et concentrés sur une opération démonstration en collaboration avec la sucrerie de THUMERIES, ceci afin de mettre en place une filière complète de traitement des eaux de la sucrerie. A terme, on doit aboutir au rejet immédiat des effluents au fil de la campagne et à la suppression des bassins de stockage. Dès 1983, la sucrerie de THUMERIES accepte d'installer un Biofiltre anaérobie, lancé et suivi par l'IRIS la même année. L'application industrielle de la nitrification quant à elle nécessite une mise au point préalable. La présente étude a donc pour but d'évaluer la faisabilité biologique et technologique de la nitrification des effluents méthanisés en sucrerie.

La nitrification (oxydation de l'azote ammoniacal en azote nitrique) est le fait de quelques bactéries, aérobies strictes, chimiolithotrophes, aux exigences physiologiques strictes et au taux de croissance faible. A ces considérations générales vient s'ajouter le contexte particulier de la sucrerie, le caractère saisonnier de ses activités et les caractéristiques précises de l'eau à nitrifier. L'orientation des travaux tient compte de l'ensemble de ces paramètres ainsi que de l'introduction récente des procédés à biomasse fixée très performants.

Une étude comparative aussi complète que possible est conduite sur quatre pilotes en collaboration avec des constructeurs à la sucrerie de THUMERIES, dans les conditions industrielles. L'objectif principal en est de définir un procédé fiable et performant et de mettre en évidence ses principales contraintes biologiques et technologiques.

Ces questions sont alors abordées une à une dans des conditions précises de laboratoire, ce qui permet de s'affranchir de certaines contraintes extérieures et d'isoler chaque aspect pour mieux le comprendre. L'ensemble des travaux est réalisé avec un souci permanent d'application industrielle.

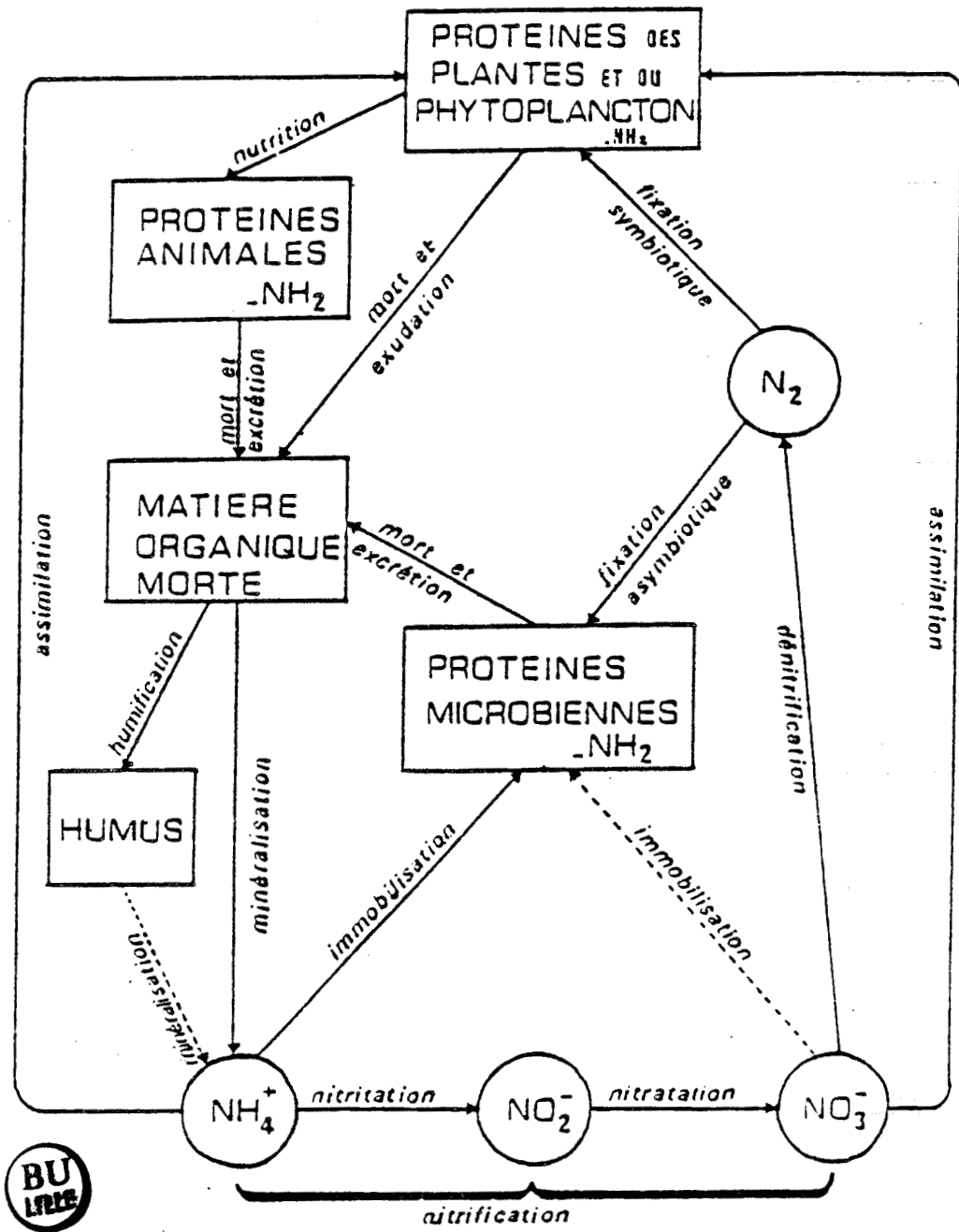


FIGURE 1 : CYCLE DE L'AZOTE

lère PARTIER A P P E L B I B L I O G R A P H I Q U EI - HISTORIQUE

La nitrification est mise en évidence, en France, par SCHLOESING et MUNTZ (1877-1879) qui démontrent la nature biologique du processus d'oxydation de l'azote ammoniacal en nitrate. Les organismes responsables de la nitrification sont identifiés par WINOGRADSKY (130) (1890-1891) qui distingue deux étapes à la réaction et isole deux catégories de bactéries ; Nitrosomonas sp (*) qui oxyde l'ammoniaque en nitrites et Nitrobacter sp (**) qui oxyde les nitrites en nitrates. WINOGRADSKY montre que ces organismes sont aérobies stricts et chimiolithotrophes obligatoires, c'est à dire qu'ils utilisent l'oxydation de leurs substrats minéraux comme seule source d'énergie et le CO₂ atmosphérique dissous comme source exclusive de carbone.

La nitrification a depuis beaucoup été étudiée, essentiellement par des agronomes et spécialistes des Sciences du sol, mais peu de données sont actuellement disponibles concernant la physiologie et l'écologie des populations bactériennes responsables du phénomène d'oxydation.

La nitrification joue un rôle très important dans le cycle de l'azote (Fig. 1).

II - MICROBIOLOGIE DE LA NITRIFICATIONII-1 Habitat

Quoiqu'ayant des exigences écologiques strictes, les bactéries nitrifiantes sont largement répandues dans la nature. Elles sont localisées dans le sol, le compost, l'eau douce, l'eau de mer, dans la plupart des environnements aérobies où les matières organiques sont minéralisées (BELSER) (11).

Dans le sol, la flore nitrifiante se situe principalement dans les 10 cm supérieurs. Elle est surtout active dans les sols cultivés aérés où elle joue un rôle important sur la productivité végétale.

(*) <u>Nitrosomonas sp</u>	Nitrosus = nitreux	{ Unités qui produisent des nitrites
	Monas = monade, unité	

(**) <u>Nitrobacter sp</u>	Nitrum = nitrate	{ Bâtonnets qui produisent des nitrates
	Bacter = bâtonnet	

Dans les estuaires, lacs et rivières, la nitrification se produit à l'interface eau-sédiments, parfois dans des zones très pauvres en oxygène (WATSON) (129).

En mer, les bactéries nitrifiantes sont localisées dans les 200 m supérieurs et à l'interface eau-sédiments.

Les germes nitrifiants se fixent naturellement sur les particules du sol, les matières détritiques en suspension dans l'eau, les bords de cuve d'aération en station d'épuration.

II-2 Les bactéries nitrifiantes

Un faible nombre de genres bactériens a été identifié et isolé. Dans la plupart des milieux, en dépit des conditions variables, la nitrification est essentiellement autotrophe (53,54).

II-2 a Nitrification autotrophe

Les bactéries nitrifiantes sont des bactéries GRAM - appartenant à la famille des Nitrobacteriaceae (19) (Bergey's manual, 8ème édition).

(Oxydation	:	Genre	Espèce	Habitat)
($\text{NH}_4^+ \longrightarrow \text{NO}_2^-$:)
(:	Nitrosomonas	europaea	sol, eau, effluents))
(:	Nitrosospira	briensis	sol)
(:		nitrosus	sol)
(:	Nitrosococcus	oceanus (*)	mer)
(:		mobilis (**)	mer)
(:	Nitrosolobus	multiformis	sol)
(:	Nitrosovibrio	tenuis (***)	sol)
($\text{NO}_2^- \longrightarrow \text{NO}_3^-$:)
(:	Nitrobacter	winogradskyi	sol, eau)
(:		(agilis))
(:	Nitrospina	gracilis	mer)
(:	Nitrococcus	mobilis	mer)



(*) - identique à Nitrosocystis oceanus (42)

(**) - nouvelle espèce (67)

(***) - nouveau genre, nouvelle espèce (48)

TABLEAU 1 : DESCRIPTION DES BACTERIES NITRIFIANTES



GENRE	MORPHOLOGIE	TAILLE (μ m)	MOBILITE	REGROUPEMENTS	MODE DE REPRODUCTION	SCHEMA DES STRUCTURES
<u>Nitrosomonas Sp</u>	<p>Bactéries en baguettes aux extrémités arrondies. Parfois, cellules ovoïdes à sphériques consécutivement à une division</p> <p>Cytomembranes périphériques, lamellaires, identiques aux bactéries photosynthétiques</p>	<p>Variable 0,8/1-2 à 1,2/2-3,5</p>	<p>+ ou -</p> <p>1-2 flagelles sub-polaires</p>	<p>Cellules isolées, par paires ou en courtes chaînes.</p> <p>En culture enrichie, regroupement en agrégats du type zooglée (surtout en culture mixte)</p>	<p>Fission binaire</p>	
<u>Nitrobacter Sp.</u>	<p>Bactéries en baguettes courtes, souvent en forme de "poire".</p> <p>Système polaire de cytomembranes constituant une coiffe en 3 structures</p>	<p>0,8/1-2</p>	<p>+ ou -</p> <p>1 flagelle polaire (4-6 μm)</p>	<p>Regroupement fréquent en zooglée en culture enrichie</p>	<p>Bourgeonnement (fission a symétrique)</p>	

Ces familles regroupent des organismes qui ont pour caractéristique physiologique commune de pouvoir se développer dans un milieu exclusivement minéral, en utilisant l'énergie libérée par oxydation des composés azotés tels que l'azote ammoniacal ou l'azote nitreux.

Les genres bactériens se distinguent par la forme, la taille et l'arrangement des diverses membranes (Tab. 1). Les cellules sont riches en cytochromes C et en matériaux de réserve (polyphosphate, glycogène, poly- β -hydroxybutyrate) (129)

II-2-b Nitrification hétérotrophe

Quelques bactéries et champignons hétérotrophes sont capables de produire des composés oxydés à partir de l'azote ammoniacal dans les mêmes conditions que les autotrophes. Le rôle in situ de ces souches est mal connu (40). EYLAR et SCHMIDT (38) rapportent que sur 1000 souches hétérotrophes isolées d'un sol qui nitrifie, seules 15 oxydent l'azote ammoniacal, dont 13 souches d'Aspergillus flavus, Arthrobacter sp, Azotobacter sp et Pseudomonas sp peuvent également contribuer à la nitrification (89).

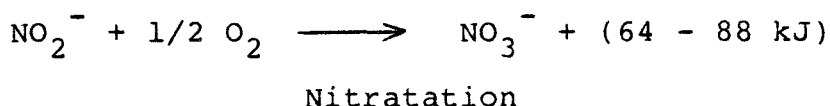
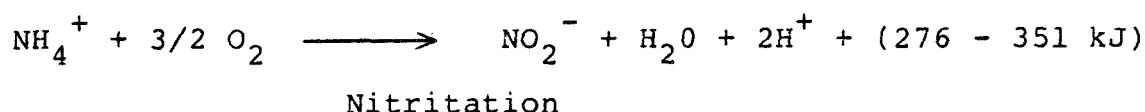
II-2-c Associations

En culture mixte, les bactéries autotrophes et hétérotrophes coexistent (13). Les bactéries hétérotrophes ont un taux de croissance très supérieur à celui des autotrophes et dominant dans la flore totale. HOCKENBURY (32) pense qu'il n'existe pas de compétition entre les deux catégories de bactéries à condition de maintenir un pH et un taux d'oxygène dissous suffisant dans le milieu. Il montre que le filtrat provenant d'un réacteur hétérotrophe a un effet antagoniste sur un réacteur nitrifiant. JONES et HOOD (61) augmentent l'activité de Nitrosomonas sp de 150 % en présence de Nocardia atlantica et d'une souche de Pseudomonas. Ces effets stimulants sont discutés mais aucun effet néfaste provoqué par des hétérotrophes sur la nitrification n'a été prouvé.

II-3 Mécanismes biochimiques de la nitrification

II-3-a Réactions d'oxydation

L'oxydation de l'ammoniaque se produit en deux étapes successives, selon les réactions suivantes (89,126).



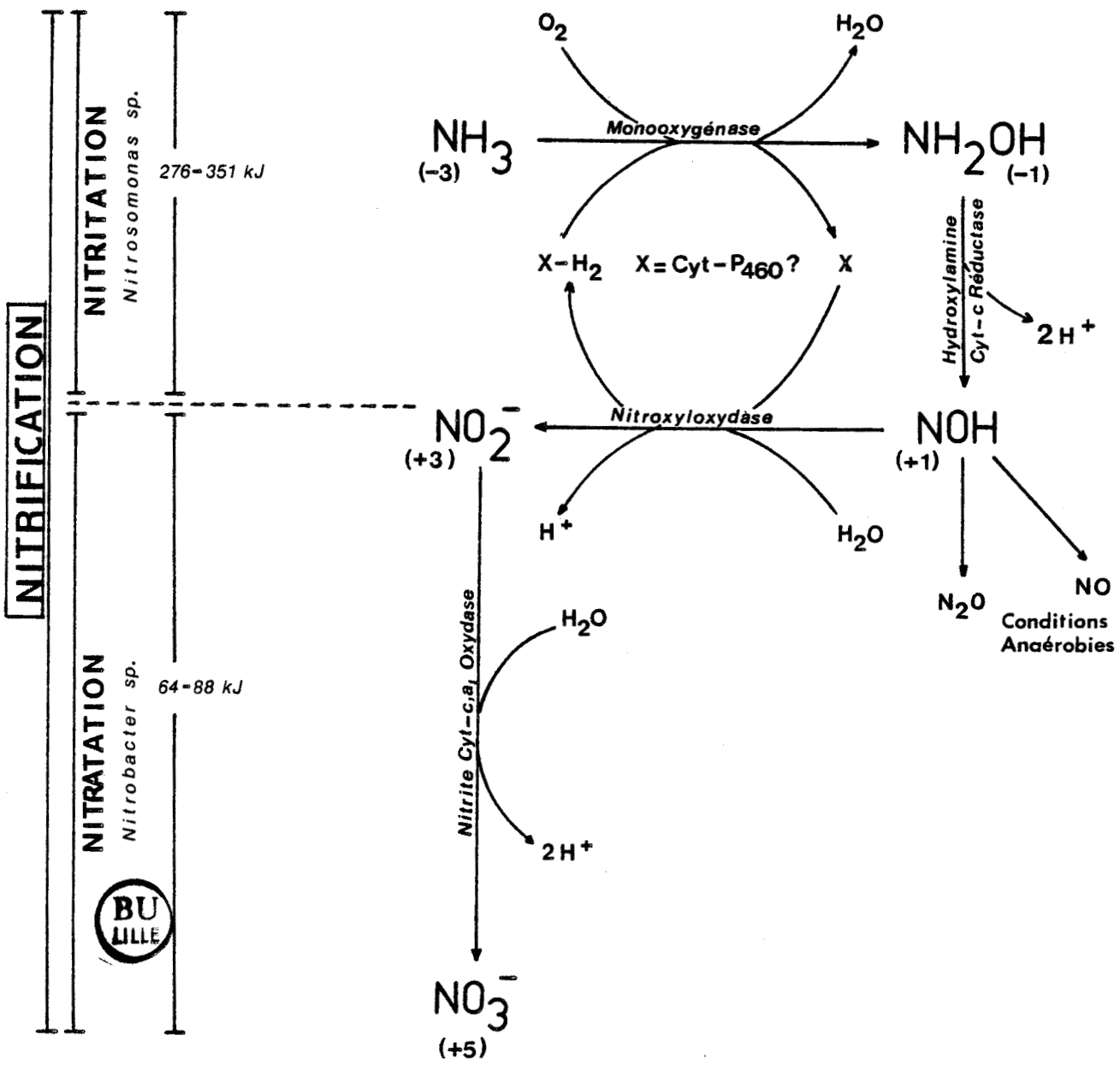


FIGURE 2 : ETAPES DE LA NITRIFICATION

Les principales réactions intermédiaires sont schématisées sur la figure 2.

II-3-a-1 La nitritation

La biochimie de la première étape est la plus complexe. Elle passe par la formation d'hydroxylamine et d'autres intermédiaires instables. L'oxydation initiale de l'ammoniaque en hydroxylamine est énergétiquement défavorable et constitue l'étape limitante de l'ensemble du processus de nitrification. Cette réaction justifie le temps de latence observé lors du démarrage d'une culture de Nitrosomonas sp (57). L'oxydation de l'hydroxylamine en nitrite est un processus semicyclique lié à un système cytochrome et à une partie du NO_2^- formé. Cette oxydation conduit vraisemblablement à la formation d'un cofacteur réduit (XH_2 sur la Fig. 2) qui induit alors la première réaction.

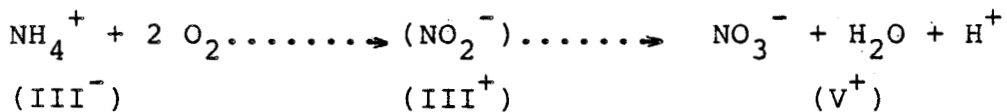
II-3-a-2 La nitratisation

La réaction se produit en une seule étape, l'oxygène utilisé provenant de l'eau et non pas de l'oxygène moléculaire (126). L'énergie produite par la réaction est plus faible que celle de la nitritation, justifiant le rendement cellulaire de Nitrobacter sp, inférieur à celui de Nitrosomonas sp.

Les électrons sont transférés grâce à un complexe respiratoire multienzymatique qui renferme les cytochromes c, a_1 et la nitrite-oxydase.

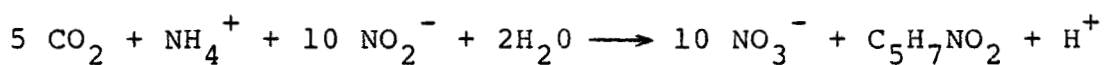
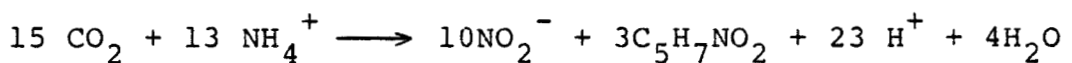
II-3-a-3 Réaction globale

L'équation globale de l'oxydation de l'ammoniaque en nitrate s'écrit :



II-3-b Synthèse cellulaire

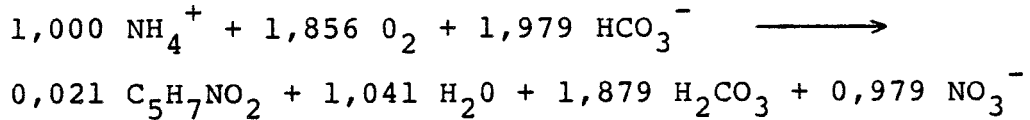
Le CO_2 est fixé suivant le cycle de CALVIN par toutes les bactéries nitrifiantes. En assimilant la composition de la biomasse à la formule $\text{C}_5\text{H}_7\text{NO}_2$, la synthèse des micro-organismes s'écrit (99)



Les protons H^+ sont neutralisés par les bicarbonates en équilibre dans le milieu ($pH < 8,5$)

II-3-c Equation générale

L'équation générale de la nitrification combine l'oxydation de l'azote et la synthèse des bactéries :



Cette équation générale met en valeur trois facteurs importants affectant la nitrification dans son application au traitement des eaux.

. Le métabolisme aérobie des bactéries nitrifiantes entraîne une consommation d'oxygène de 4,2 - 4,5 mg O_2 par mg d'azote éliminé ou oxydé.

. Le rendement cellulaire par unité est très faible; 0,17 mg M.v.s. par mg d'azote oxydé. La nitrification produit peu de biomasse.

. La nitrification libère des protons H^+ , représentant, à l'équilibre, une consommation de 7 mg d'alcalinité par mg d'azote ammoniacal oxydé.

II-4 Les principales caractéristiques métaboliques des bactéries nitrifiantes.

Si la notion d'autotrophie stricte définie par WINOGRADSKY en 1899 reste vraie pour Nitrosomonas sp, elle tend à disparaître pour Nitrobacter sp qui peut assimiler des composés organiques simples comme source d'énergie : acétate, pyruvate, formiate. Il est maintenant acquis que la paroi des bactéries nitrifiantes est perméable à de nombreux composés organiques dont le carbone peut être incorporé dans les matériaux cellulaires (70,71,105,107,111).

L'assimilation du CO_2 nécessite sa réduction et donc de l'énergie. Si globalement les réactions de nitritation et de nitrification sont exergoniques, une partie de cette énergie est utilisée pour fournir le pouvoir réducteur. La fixation d'une mole de CO_2 , compte tenu du faible rendement du couplage d'énergie (10-15 %), nécessite l'oxydation de 17-25 moles de NH_4^+ pour Nitrosomonas sp et 67-100 moles de NO_2^- pour Nitrobacter sp (132). Les bactéries nitrifiantes ont un métabolisme très exigeant, expliquant leur croissance lente, directement liée à l'oxydation de l'azote minéral en conditions de substrat non limitant.

L'existence d'un cycle de KREBS complet est discuté chez les bactéries chimiolithotrophes (81).

Les principales caractéristiques des bactéries nitrifiantes sont reportées dans le tableau ci-dessous (Tab. 2) et comparées au métabolisme de souches hétérotrophes cultivées sur glucose (111). Suivant les conditions expérimentales, les valeurs sont très différentes :

TABLEAU 2 : PARAMETRES DE CINETIQUE CHEZ LES BACTERIES NITRIFIANTES

	Nitrosomonas	Nitrobacter	Hétérotrophe (*)
Y théorique (g mat.cell/g.N ox)	0,29	0,084	
Y mesuré (g mat.cell/g.N ox)	0,03-0,13	0,02-0,08	0,37- 0,79
μ_{max} (j^{-1})	0,46-2,2	0,28-1,44	7,2 -17,0
Ks (ou Km)**(mg N/l)	0,06-5,6	0,06-8,4	1-181
K ₀ (mg O/l)	0,3 -1,3	0,25-1,3	0,0007-0,1

(*) Selon CHIU et al (26)

(**) Les valeurs des constantes de saturation définies sur les vitesses de réactions (Km) et sur les taux de croissance (Ks) sont généralement confondues.

Généralement, les valeurs de Ks obtenues en cultures mixtes sont plus élevées et les taux de croissance plus faibles qu'en cultures pures.

L'influence des paramètres du milieu sur la nitrification affecte surtout Nitrosomonas sp., la nitrification constituant l'étape limitante du processus d'oxydation.

III - INFLUENCE DES PARAMETRES DU MILIEU SUR LA NITRIFICATION

III-1 Influence de la teneur en oxygène dissous

Les bactéries nitrifiantes sont des bactéries aérobies strictes. Elles apparaissent comme de mauvais compétiteurs aux faibles concentrations en oxygène dissous. STREMBOM et PADUSKA (112) ont comparé les résultats obtenus par différents auteurs relatifs aux concentrations limitantes en oxygène dissous dans différents systèmes (cultures pures, cultures mixtes, stations d'épuration)(Tab. 3).

TABLEAU 3 : EFFET DE LA CONCENTRATION EN OXYGENE DISSOUS SUR LA NITRIFICATION

Organisme	Oxygène dissous mg/l	Conditions et remarques	Références bibliographiques
	Ks	Od.	
<u>Nitrosomonas</u>	0,3	20°C-culture pure	(78)
	0,25	Culture pure (*)	Cité dans (112)
		1,0 : Ordre zéro-cult. pure	Cité dans (112)
		2,0 : Ordre zéro	(66)
<u>Nitrobacter</u>	1,84-2,86	Cul. pure techni-	Cité dans (112)
	0,83	ques respirométri-	
		ques ampérométri-	
		ques et microcalo-	
		rimétriques	
	0,34-0,48	20°-29° et 35°C	(16)
	0,72	respectivement	
		:(valeurs calculées):	
		2,0 : ordre zéro	Cité dans (112)
		4,0 : ordre zéro	(66)
<u>Nitrifiants en général</u>	0,8	dans le sol	Cité dans (112)
		:(valeurs calculées):	
	2,0	dans des boues activées	Cité dans (112)
		0,2 : inhibition dans	(35)
		des boues activées:	



(*) Ordre zéro : concentration minimale en oxygène dissous pour une cinétique d'ordre zéro

De ces données, il ressort une assez grande différence entre les valeurs de constantes de saturation et de concentrations limitantes en oxygène dissous (méthodes de mesure, état des cultures, mécanismes de diffusion de l'oxygène, autres facteurs de l'environnement). La gamme de concentration en oxygène dissous minimal permettant une nitrification optimale se situe entre 1 et 4 mg O/l. Il n'est pas mentionné dans la littérature d'inhibition par excès d'oxygène dissous dans le milieu.

En conditions d'anoxie ou d'anaérobiose, Nitrosomonas sp est capable de réduire NO_2^- et de produire un mélange gazeux NO , N_2O . Il en est de même pour Nitrosolobus, Nitrosospira, Nitrosococcus sp (41). Dans les sols et les systèmes aquatiques, il apparaît que la nitrification est une source importante de N_2O . De même, Nitrobacter sp est capable de réduire NO_3^- en NO_2^- (11). En général, dans les milieux naturels, peuvent coexister ou se succéder nitrification et dénitrification (sols, rivières, stations).

III-2 Influence de la température

Les températures optimales pour la nitrification en cultures pures se situent entre 25° et 36°C (84), bien que des températures plus élevées aient été rapportées pour Nitrobacter sp (42°C) (89).

D'une manière générale, la nitrification est nulle au-dessous de 5°C et au delà de 45°C (89), les températures létales se situant aux environs de 55°C pour les deux espèces.

Aux faibles et aux fortes températures, Nitrobacter sp est plus affecté que Nitrosomonas sp (98) et on assiste généralement à une accumulation de nitrites dans le milieu. KNOWLES et al (66) estiment que le taux de croissance spécifique de Nitrosomonas sp est augmenté de 9,5 % par élévation de température de 1°C et celui de Nitrobacter sp de 5,9 % dans une gamme de température de 8 à 23°C.

La température intervient également de façon indirecte sur la nitrification en modifiant la concentration en oxygène dissous ou la teneur en NH_3 (97).

III-3 Influence du pH

Les bactéries nitrifiantes sont légèrement basophiles, avec un pH optimum compris entre 7,5 et 8,5 (Tab. 4). Le pH optimal n'est pas clairement défini.

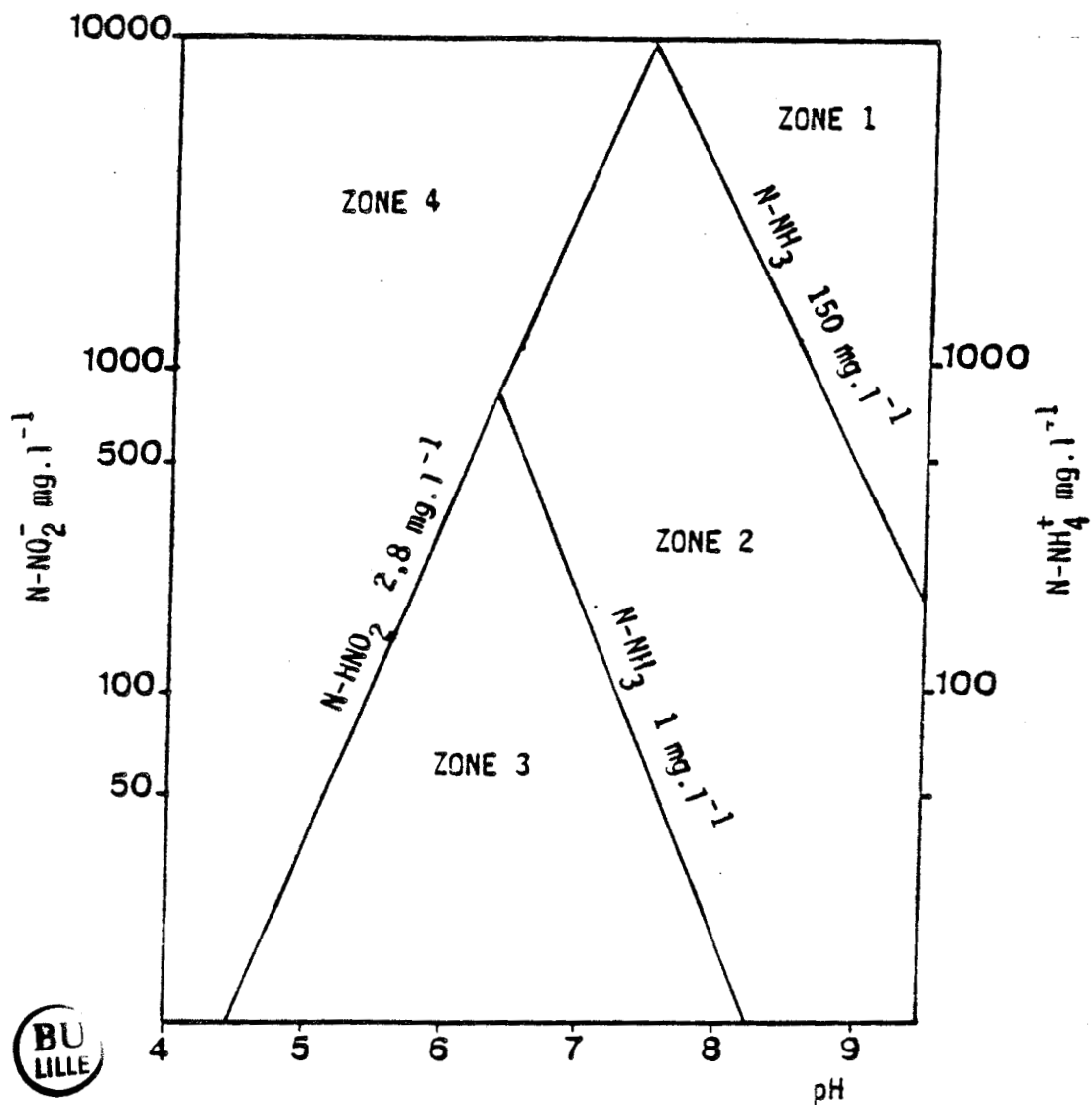


FIGURE 3 : INHIBITION DE LA NITRIFICATION PAR L'AMMONIAC ET L'ACIDE NITREUX

- Zone 1 : Inhibition de Nitrosomonas sp et Nitrobacter sp
- Zone 2 : Inhibition de Nitrobacter sp par NH_3
- Zone 3 : Nitrification complète
- Zone 4 : Inhibition de Nitrobacter sp par HNO_2

TABLEAU 4 : EFFET DU pH SUR LE DEVELOPPEMENT DES BACTERIES NITRIFIANTES

pH	Degré d'inhibition	Organisme en culture pure	Référence
8,3-8,6	0	<u>Nitrosomonas sp</u>	(72)
7,9-9,2	0		(36)
6,2	50 %		
9,6	50 %		
8,0-8,5	0		(61)
6,5-7,0	90 %		
8,5-8,8	0		(53,54)
7,9	50 %		
9,3	50 %		
7,5-8,0	0		(78)
7,2-8,2	0	<u>Nitrobacter sp</u>	(72)
8,0	0		(4)
6,5	50 %		
9,0	50 %		
7,3-8,4	0		(16)



L'intervalle de pH compatible avec la nitrification est plus large en cultures mixtes. Les bactéries, dans leur environnement naturel, semblent tolérer des pH très faibles, phénomène lié à la concentration en azote minéral et au pouvoir tampon des milieux (32,7).

L'explication la plus satisfaisante de l'effet du pH sur les bactéries nitrifiantes est donnée par ANTHONISEN et al (7). L'hypothèse du modèle d'ANTHONISEN est basée sur l'équilibre des différentes formes ionisées et non-ionisées ($\text{NH}_3/\text{NH}_4^+$), ($\text{NO}_2^-/\text{HNO}_2$), ($\text{NO}_3^-/\text{HNO}_3$) en fonction du pH. L'inhibition de la nitrification intervient à plusieurs niveaux et se résume par le diagramme opérationnel d'ANTHONISEN (Fig. 3). L'inhibition est due en fait à une pénétration préférentielle et à une accumulation nocive des formes libres de l'ammoniac ou de l'acide nitreux dans les cellules bactériennes.

Ces formes d'inhibition se manifestent surtout pour des concentrations élevées en azote minéral (NH_4^+ , NO_2^-).

TABLEAU 5 : SUBSTANCES INDISPENSABLES OU STIMULANTES
POUR LA NITRIFICATION

SUBSTANCE	CONCENTRATION (mg/l)	EFFET	
Phosphate	310 exprimé en P	Requis pour NsC et Nbc	(72)
	5 exprimé en P	Requis pour Nbc	
			(4)
Magnésium		Requis pour NsC et Nbc	(72)
	5	Requis pour Nbc	(4)
	10,5-50,5	Aucun effet sur NsA	(106)
	(en tant que MgSO ₄ 7H ₂ O)	NsA+	(78)
	12,5-50	Léger NsA-	
	50-100		
Molybdène		NbA+	(4)
	10	Accroissement x 11 pour NbA et C	(31)
	100,0	Léger NbA, Nbc	
Fer		Requis pour NsC et Nbc	(72)
	0,5-0,6	NaC+	(106)
	7	Requis pour Nbc	(4)
	6 (en FeSO ₄)	NsA+	(66)
Calcium	-	Requis pour Nbc	(72)
	0,5-10	NsA+ en présence de 5 mg/l EDTA	(78)
Cuivre	-	Requis pour Nbc	(72)
	0-0,06	NsA+ avec 5 mg/l d'EDTA	(78)
	0,1	Léger NsA+ ; avec plus fortes concentrations NsA-	(120)
	0,1-0,5	NsA	(106)
Sodium	0,6-1,5	NsA+ , NsC-	(78)
	1,5-7,0	NsA- , NsC+	
Zinc	1	Nbc+	(4)
EDTA	5	NsA+ , NbA	(78)
Acétate	60	Nbc+	(31)
NH ₂ OH	660	Resting cells NsA+	(57)
		Sphéroplastes NsA+	(116)
A. Aminés (sérine, Glutamine, Ac. Aspartique)	4	NsA+ , NsC+	(28)
Vitamines (Acides nicotinique, ascorbique, panthothénique)	50	Nbc+	(91)
Biotine	0,15	NbA x 2 à 4 , Nbc+	(69)
Cendres de sirop de maïs	sirop à 0,05-1 %	NsC+	(45)

Les bactéries nitrifiantes n'ont pas de besoin spécifique en potassium et en soufre (89).



Ns = Nitrosomonas sp

Nb = Nitrobacter sp

A = Activité

C = Croissance

+ = stimulation

- = inhibition

III-4 Influence de la concentration en azote minéral

En conditions de substrat non limitant, les bactéries nitrifiantes sont influencées par leur propre substrat et plus encore par le substrat l'une de l'autre (89). Dans la pratique de la nitrification des eaux, les concentrations inhibitrices de la croissance des micro-organismes sont relativement élevées, de l'ordre de 500 à 1000 mg N/l en azote ammoniacal ou nitreux et 2000 mg N/l en azote nitrique (16,95,131,132). Il est cependant difficile, dans un milieu de culture d'enrichissement de laboratoire, d'appliquer de fortes concentrations en substrat (7). Le rendement de croissance des bactéries nitrifiantes étant faible, les cultures finales sont toujours peu denses (62).

L'inhibition par les fortes concentrations en azote ammoniacal, nitreux ou nitrique, liée au pH, est fréquente dans le traitement des eaux industrielles, agricoles et d'élevage (105) ainsi que dans les sols fraîchement fertilisés (49). A pH 7, il faut 200 mg N-NH₄/l pour inhiber Nitrobacter sp. A pH 9, 3 mg N-NH₄/l suffisent pour l'inhiber (13).

III-5 Influence des composés du milieu

III-5-a Micronutriments et substances stimulantes

Il faut distinguer d'une part les substances requises pour la croissance des micro-organismes et d'autre part les substances qui favorisent cette croissance, dont la détermination reste assez empirique. Ces produits peuvent agir directement sur le métabolisme des micro-organismes en tant que nutriments ou indirectement en modifiant les conditions du milieu (pH, potentiel redox, complexation). Les réponses varient d'une espèce bactérienne à l'autre (129) et il est très difficile de définir des conditions optimales de croissance et d'activité des deux groupes de bactéries nitrifiantes en interaction. La plupart des travaux ont été réalisés en cultures pures (Tab. 5) et la physiologie des germes nitrifiants reste mal connue.

Dans tous les cas, la croissance des bactéries nécessite la présence de CO₂, d'azote ammoniacal ou nitreux et d'oxygène dissous quoique l'anoxie ne soit pas létale (89). Le rôle exact du CO₂ et sa disponibilité dans le milieu sont mal connus.

TABLEAU 6 : SUBSTANCES INHIBITRICES DE LA NITRIFICATION

COMPOSES	CONCENTRATION	NIVEAU	TOXICITE	REFERENCE
<u>ORGANIQUES</u>				
Acétone	2 g/l	75 %		Nitrif Boues activées (120)
Aniline	1 mg/l	50 %		Ns (32)
Bisulfure de carbone	35 mg/l	75 %		"
n-Butanol	8,2 g/l	50 %		Nit Cult. pures (32)
Chloroforme	18 mg/l	50 %		" " Ba
Ethanol	2,4 g/l	75 %		" " Ba (32)
Hydrazine	58 mg/l	75 %		" " Ba
Méthanol	160 mg/l	50 %		Cultures pures (58)
Phénol	5,6 mg/l	50 %		" Ba (58)
n-Propanol	20 g/l	50 %		Cultures pures (58)
Thio-urée	0,076mg/l	50 %		" Ba "
<u>A. AMINES</u>				
L-Lysine	4 mg/l	100 %		<u>Nitrosomonas sp</u> (28)
Valine				
Hydroxyproline	10 M	Seuil		<u>Nitrobacter sp</u> (31)
Thréonine				
Méthionine	9 mg/l	50 %		Ns, Nb (28)
L-Arginine	1,7 mg/l	50 %		" "
Thiamine	5 mg/l	100 %		Ns
Peptone	10 mg/l	60 %		Ns, Nb (120)
L-Histidine	0,5 mg/l	50 %		Ns, Nb
<u>NON-ORGANIQUES</u>				
AgCl ₂	0,25 mg/l	100 %		Ns
Cu ²⁺	0,4 mg/l			
Cr ²⁺	1 mg/l			
Cr ³⁺	0,25 mg/l			
Ni	0,1 mg/l	Seuil		Ns (79)
HgCl ₂	2 mg/l			Ns (89)
Pb ²⁺	0,5-1 mg/l	100 %		
Zn ²⁺	10 mg/l			



III-5-b Inhibition de la nitrification

Les principales substances inhibitrices de la nitrification sont à la fois des composés organiques et non-organiques (Tab. 6).

En règle générale, l'effet des toxiques est plus important sur les cultures pures que sur les cultures mixtes (89). De même, les inhibiteurs spécifiques de la nitrification sont plus sensibles à long terme sur Nitrosomonas sp que sur Nitrobacter sp, à l'exception de quelques composés (chlorure de potassium, cyanate de sodium, sulfate d'hydrazine). Enfin, l'effet des métaux lourds est beaucoup plus important sur les cultures en croissance que sur les cultures âgées (106).

En cultures mixtes, l'inhibition par les produits organiques est parfois directe, de type compétitive et non compétitive, ou indirecte (32); Les composés organiques sont alors rapidement oxydés par la flore hétérotrophe à croissance rapide qui consomme l'oxygène dissous de façon prioritaire et empêche la nitrification. Les composés organiques sont rarement létaux. Peu de données sont disponibles concernant l'action de produits excrétés par d'autres organismes (17). En règle générale, des tests de nitrification en laboratoire, avec témoin, permettent de déceler un composé toxique éventuel dans le substrat à nitrifier (80).

III-6 Influence d'autres paramètres sur la nitrification

L'étude se limite aux principaux paramètres qui conditionnent la nitrification et son application au traitement des eaux.

III-6-a Concentration en bactéries nitrifiantes et âge des boues

Le taux de nitrification est lié à la concentration en micro-organismes présents. Les valeurs citées varient beaucoup selon la méthode de numération employée (M.P.N., immunofluorescence, matières volatiles). En boues activées, la concentration en bactéries nitrifiantes exprimée par M.P.N. est de 10^3 - 10^4 bactéries par ml (19).

L'activité nitrifiante varie entre 110-250 mg Nox/g bact.h à 20-30°C pour des cultures pures et 0,5-6 mg Nox/g bact.h pour des systèmes type boues activées (79,89,99). La concentration en bactéries nitrifiantes influence surtout le démarrage d'une unité au moment de son ensemencement, liant un phénomène d'adaptation (50,92) et d'activation à un phénomène de croissance. En règle générale, c'est la concentration en bactéries nitrifiantes qui conditionne les performances d'une installation, leur taux de croissance étant le plus faible (79). Pour accéder à une nitrification importante, il faut un âge de boues élevé, de l'ordre de 3 à 4 jours en boues activées (35). L'âge de boues critique dépend des différents facteurs qui contrôlent la croissance des bactéries nitrifiantes, notamment la température. Il dépend également de la proportion de germes nitrifiants dans la flore totale (105).

III-6-b Influence de la fixation et de la turbulence

L'accrochage spontané des bactéries nitrifiantes sur des supports naturels a longtemps amené les auteurs à conclure à sa nécessité (105). Cette notion est maintenant abandonnée (36,78,106) à la fois pour Nitrosomonas sp et Nitrobacter sp.

La rétention des micro-organismes sur des particules solides est exploitée en traitement d'eaux dans les systèmes à bactéries fixées ; elle permet une concentration importante en bactéries nitrifiantes et une diminution du temps de séjour hydraulique (19,119).

La turbulence n'influence la nitrification que par une meilleure disponibilité de l'oxygène pour les bactéries en améliorant à la fois son transfert en phase dissoute et sa diffusion au sein des floes ou du biofilm (105).

IV - CONSERVATION DE L'ACTIVITE NITRIFIANTE

IV-1 - Etudes dans les sols

La nitrification dans les sols est un processus microbien essentiel qui permet aux plantes d'incorporer l'azote. La persistance de cette nitrification sans précautions particulières montre la résistance de ces micro-organismes ou d'une partie d'entre eux. ALEXANDER (5) rapporte que la nitrification dans des sols stockés à sec peut être maintenue pendant 14 ans. Inversement, CHEN et ALEXANDER (24) affirment que dans les sols soumis à dessiccation prolongée, les bactéries GRAM - asporogènes sont éliminées dans les deux semaines, sans exception. DOMMERGUES (34) montre que la nitrification est inhibée dans les sols à forte tension d'humidité ($pF(*)4,5 - 5,0$) sans préciser s'il s'agit de létalité. Les taux de nitrification diminuent de façon exponentielle quand le pF augmente ($e=Ae^{-\beta pF}$) (9).

(*) $pF = \log_{10} cm H_2O$

IV-2 Etudes en cultures pures

La conservation des souches pures n'est pas maîtrisée et conduit parfois à la perte de souches isolées. Elle conduit toujours à une perte importante d'activité. Il n'existe pas de forme de dormance connue (19,129).

IV-2-a Nitrosomonas sp

Historiquement, BOLTJES (cité dans (19)) est parvenu à maintenir ses cultures pures sur gélose enrichie en albumine d'oeuf. MEIKLEJOHN (83), après 18 mois de stockage dans des conditions variables, a perdu l'ensemble de ses souches nitritantes. JENSEN (cité dans (28)) a également perdu une souche nitritante qu'il avait isolée : seul, le transfert régulier, de laboratoire en laboratoire lui a permis de la retrouver.

GUNDERSEN (44) n'est jamais parvenu à maintenir une culture de Nitrosomonas sp plus d'un an.

ENGEL et ALEXANDER (36) ont stocké une suspension cellulaire de Nitrosomonas sp à 4°C pendant 1 mois ; ils ont constaté une perte importante d'activité des souches. LEWIS et PRAMER (77) par contre ont réussi à conserver leurs cultures pures dans un tampon phosphate 0,05 M - 0,1 M plus de 12 mois, sans perte d'activité ni contamination. LOVELESS et PAINTER (78) sont parvenus à maintenir une souche isolée de boues activées pendant 18 mois et toujours active à 100 %, moyennant de nombreuses cultures parallèles de vérification, dont beaucoup ont échoué. Ils suggèrent une étude plus approfondie du rôle des oligo-éléments sur la conservation des souches nitritantes. WASTON (129) propose de stocker les cultures liquides à 15°C et à l'obscurité et de les transférer dans les 4 ou 6 mois en milieu ammoniacal tamponné. Il propose également de les stocker dans l'azote liquide avec un refroidissement de 4°C par minute : le taux de survie est alors de plus de 90 %.

IV-2-b Nitrobacter sp

La conservation des bactéries nitratantes semble plus facile. ALEEM et ALEXANDER (4) ont conservé des extraits cellulaires de Nitrobacter sp à 4°C et congelés. Ils constatent une baisse d'activité de la nitrite-oxydase de 35 % en 2 jours. Sur une durée plus longue, les préparations congelées sont plus résistantes. RENNIE et SCHMIDT (100) ont stocké une souche de Nitrobacter sp, isolée du sol, en sacs de polyéthylène à 4°C pendant 21 jours. Ils comptent par immunofluorescence un nombre identique de bactéries avant et après conservation. WATSON (129) propose les mêmes protocoles que pour les bactéries nitritantes.

NAVARRO, BERTINI et FAUP (87) congèlent Nitrobacter sp. à -18°C dans une solution aqueuse de glycérol à 10 %, après concentration de la biomasse par centrifugation. Ils retrouvent une activité satisfaisante. Les bactéries fixées semblent résister à des conditions de stress important. AUDIC (8) mentionne une activité nitrifiante résiduelle de 50 % en réacteur après 21 jours de non-alimentation. Par contre, une durée supérieure à 30 j entraîne une chute de l'activité qui correspond à une valeur inférieure à 10 % du rendement d'oxydation. Elle serait due à une altération des cellules.

IV-3 Etudes en cultures mixtes

La majorité des résultats obtenus sont des constatations consécutives à des perturbations d'installations de traitement d'eaux.

DEVILLERS (33) étudiant une installation d'eau potable en culture fixée suggère que la suppression de l'ammoniaque entraîne la mort et la décomposition des bactéries dont il constituait le substrat ; les bactéries fixées se dispersent alors. RICHARD et al (101) rapportent que des arrêts inférieurs à 24 heures sont sans importance et sont suivis d'une reprise rapide de la nitrification. BELSER (11) constate que la fluctuation des températures sur une installation a un effet bactéricide sur la flore nitrifiante. ABELIOVICH (1) étudie la nitrification dans des eaux très polluées. Il pose la question de la survie des bactéries nitrifiantes avec de fortes concentrations en ammoniaque, l'absence de nitrite, nitrate et oxygène, la D.C.O. étant supérieure à 500 mg O/l. La présence de substrats carbonés simples (acétate, pyruvate, formiate) semble aider à la conservation de la flore nitrifiante autotrophe. Enfin, HOCKENBURY (52) constate une période de latence sur la nitrification à la suite d'une période d'anaérobiose de courte durée.

En règle générale, la conservation des bactéries nitrifiantes est plus facile en cultures mixtes qu'en cultures pures et la létalité est plus faible en cultures fixées qu'en boues activées.

V - PROCÉDES DE NITRIFICATION

L'élimination de l'azote ammoniacal intervient généralement en traitement de finition dans un schéma d'épuration d'eaux résiduaires (105), couplée ou non à une dénitrification. Elle est souvent indispensable dans le cas de production d'eau potable. La voie biologique est intéressante car la pollution azotée (NH_4^+ , NO_3^-) se trouve essentiellement dans la fraction dissoute des eaux polluées (79).

V-1 Adaptation des techniques classiques à la nitrification

Hormis le lagunage naturel ou aéré peu efficace (85), la nitrification par boues activées est le procédé classique le plus répandu en France. L'eau à traiter est mise en contact avec les boues activées nitrifiantes dans un bassin agité et aéré. Pour que l'oxydation de l'ammoniaque intervienne, l'âge des boues doit se situer entre 8 et 20 jours en fonction de la pollution carbonée et de la température notamment. Les charges azotées traitées sont assez faibles et ce principe de culture libre continue est fragile : flottation des boues en cas de dénitrification spontanée, oxygénation limitante, sensibilité aux variations de température (10,92,115). Une récente amélioration consiste à introduire des particules solides au sein de la culture libre (76).

L'adaptation des lits bactériens à ruissellement et des disques biologiques à la nitrification est assez ancienne (127). Elle est toujours utilisée en France, notamment en stations urbaines (64). L'eau à épurer percole ou avance sur un matériau de garnissage qui favorise la fixation des bactéries épuratrices. Ces bactéries s'autosélectionnent à mesure du transit de l'eau dans les appareils. On forme alors un gradient vertical de dépollution dans le cas du lit bactérien, un gradient horizontal dans le cas des biodisques. La taille et le coût des installations restent importants et les charges azotées appliquées sont limitées.

V-2 Utilisation des procédés à bactéries fixées

L'eau à traiter traverse un garnissage de matériau inerte ou actif (65,68), fin ou très fin, sur lequel sont piégées et fixées les bactéries épuratrices. Les deux principales technologies -avec leurs variantes- sont le lit fixé et le lit expansé -fluidisé ou turbulent-. Les principaux avantages de ces procédés sont :

- la réduction de la taille des installations, étant donné la concentration de la biomasse active sur les matériaux supports.

- le maintien dans les réacteurs de boues d'âge élevé, ce qui permet de bons rendements d'élimination de l'ammoniaque et un traitement de finition de la pollution carbonée résiduelle.

- la stabilité de la flore fixée face aux perturbations éventuelles de fonctionnement -défaut d'oxygénation- pollution accidentelle,...

Les procédés varient selon la nature et la taille du matériau utilisé et le type d'aération choisi : air comprimé, air enrichi en oxygène, oxygène ou peroxyde d'hydrogène (133).

Les réacteurs à lit fixé présentent des risques de colmatage, par les boues en excès ou par le carbonate de calcium qui se déposent et nécessitent des lavages périodiques (92). Les réacteurs à lit fluidisé ou turbulent requièrent le maintien d'une expansion et d'une oxygénation homogènes (118). De plus, il est difficile de séparer les boues formées du matériau support (92).

Ces technologies avancées évoluent et prennent un essor considérable depuis quelques années, notamment par des approches en stations pilotes (43,96,121,134).

VI - LE REJET D'EFFLUENTS NITRIFIES en RIVIERE

VI-1 Mise au point

La présence de nitrates et ses conséquences sur la qualité des eaux fait l'objet de nombreuses études et communications et la législation dans ce domaine est très stricte (63,79). Les causes, les mécanismes, les caractéristiques et la cinétique des phénomènes et réactions liés à la présence de nitrates dans l'eau sont très complexes et loin d'être tous élucidés actuellement (63). L'étude de la pollution par les nitrates nécessite une distinction fondamentale suivant la nature des eaux dans lesquelles ils se trouvent ou risquent de se trouver. L'approche du phénomène est différente si l'on s'intéresse à des eaux souterraines potables ou à potabiliser, ou si l'on étudie les eaux superficielles et notamment les eaux de rivières et de retenues d'eau. L'Industrie Sucrière rejette ses effluents soit par épandage, soit en rivière après traitement (73,74). Dans un cas comme dans l'autre, les rejets peuvent être à l'origine de pollution azotée. Seul le deuxième cas est développé ci-après.

VI-2 Effets des nitrates en rivière

Les nitrates, forme la plus oxydée de l'azote, sont beaucoup moins nocifs pour le milieu naturel que l'azote ammoniacal qui appauvrit la rivière en oxygène et qui est toxique pour la faune aquatique. Par contre, en conjonction avec le phosphore, ils favorisent l'eutrophisation et donc une perturbation de l'équilibre biologique (63,104).

On assiste alors à une synthèse chlorophyllienne qui provoque une prolifération de phytoplancton (63,79).

Dans certaines conditions, les nitrates peuvent être réduits en nitrites.

Les nitrates peuvent provenir de sources ponctuelles (industries, stations urbaines) et des apports diffus d'origine agricole. L'effet des nitrates d'origine ponctuelle dépend de la saisonnalité des rejets, du flux de pollution azotée, de l'effet de dilution des effluents dans la rivière, de la présence ou non d'éléments nutritifs (azote organique, phosphore).

L'ensemble de ces critères doit être considéré pour évaluer les conséquences réelles d'une source de nitrates et, si nécessaire, maîtriser sa production et son rejet en rivière.

VI-3 Elimination des nitrates avant rejet

Dans certaines situations, le rejet ponctuel de nitrates ne nécessite pas de traitement particulier. On assiste alors à une dénitrification naturelle, ou à une dilution importante des nitrates dans le milieu récepteur, n'entraînant pas de véritable enrichissement de la rivière en éléments nutritifs. Cette solution entraîne cependant une fuite importante en oxygène stocké sous forme NO_3 .

La dénitrification biologique conduit à éliminer véritablement l'azote nitrique en le transformant en azote gazeux et en récupérant ainsi une partie de l'oxygène dépensé lors de la nitrification (79). Ce procédé nécessite toutefois un apport de pollution carbonée et peut provoquer une légère fuite de carbone organique et éventuellement d'ammoniaque (79). De plus, la dénitrification tertiaire en aval nécessite un ouvrage indépendant, qui, quel que soit le procédé choisi, est d'un coût supplémentaire. Enfin, avant d'envisager un traitement de dénitrification, il convient de s'assurer que toute la pollution azotée est collectée, faute de quoi les efforts consentis n'auront qu'une faible efficacité au niveau de la rivière (104).

VII - CONCLUSION

Ces données bibliographiques montrent que l'étude de la nitrification biologique nécessite la connaissance approfondie des micro-organismes qui en sont responsables. Les bactéries nitrifiantes ont un métabolisme de type chimiolithotrophe et sont très sensibles aux conditions du milieu. Leurs particularités métaboliques et physiologiques expliquent en grande partie les difficultés rencontrées lors de l'étude de ces germes et de l'évaluation de leur activité in vivo et in vitro (2,3,20,21,22,23,36,109,110,119).

L'isolement et la culture des bactéries nitrifiantes sont délicats. Leur cinétique varie, selon que l'on travaille sur des cultures pures ou des cultures mixtes (2,77,83,109). Les méthodes de numération des germes sont mal adaptées à la nitrification, qu'elles soient directes (immunofluorescence, matières volatiles, comptages microscopiques) ou indirectes (M.P.N., tests d'activité nitrifiante par bilan azote ou consommation d'oxygène) (11,12,15,46,117). La physiologie et l'écologie des bactéries nitrifiantes sont en fait assez mal connues et l'application de la nitrification au traitement des eaux reste en partie basée sur des observations d'ordre général.

La nitrification est un processus en deux étapes, dont la nitrification est l'étape limitante (pH, transfert d'O₂, concentration en NH₄, t°). L'optimisation du processus biologique nécessite l'équilibre des deux populations entre elles ainsi que l'équilibre de la flore nitrifiante et de la flore hétérotrophe. Aussi, le choix du procédé, quel que soit le substrat à nitrifier doit s'orienter vers le maintien d'une flore bactérienne concentrée et stable au sein du réacteur, étant donné son faible taux de croissance. L'essor des procédés à film fixé en nitrification s'explique par cette recherche de l'amélioration de la productivité des réacteurs, à laquelle viennent s'ajouter des exigences technico-économiques, notamment sur les coûts de fonctionnement et d'entretien des ouvrages.

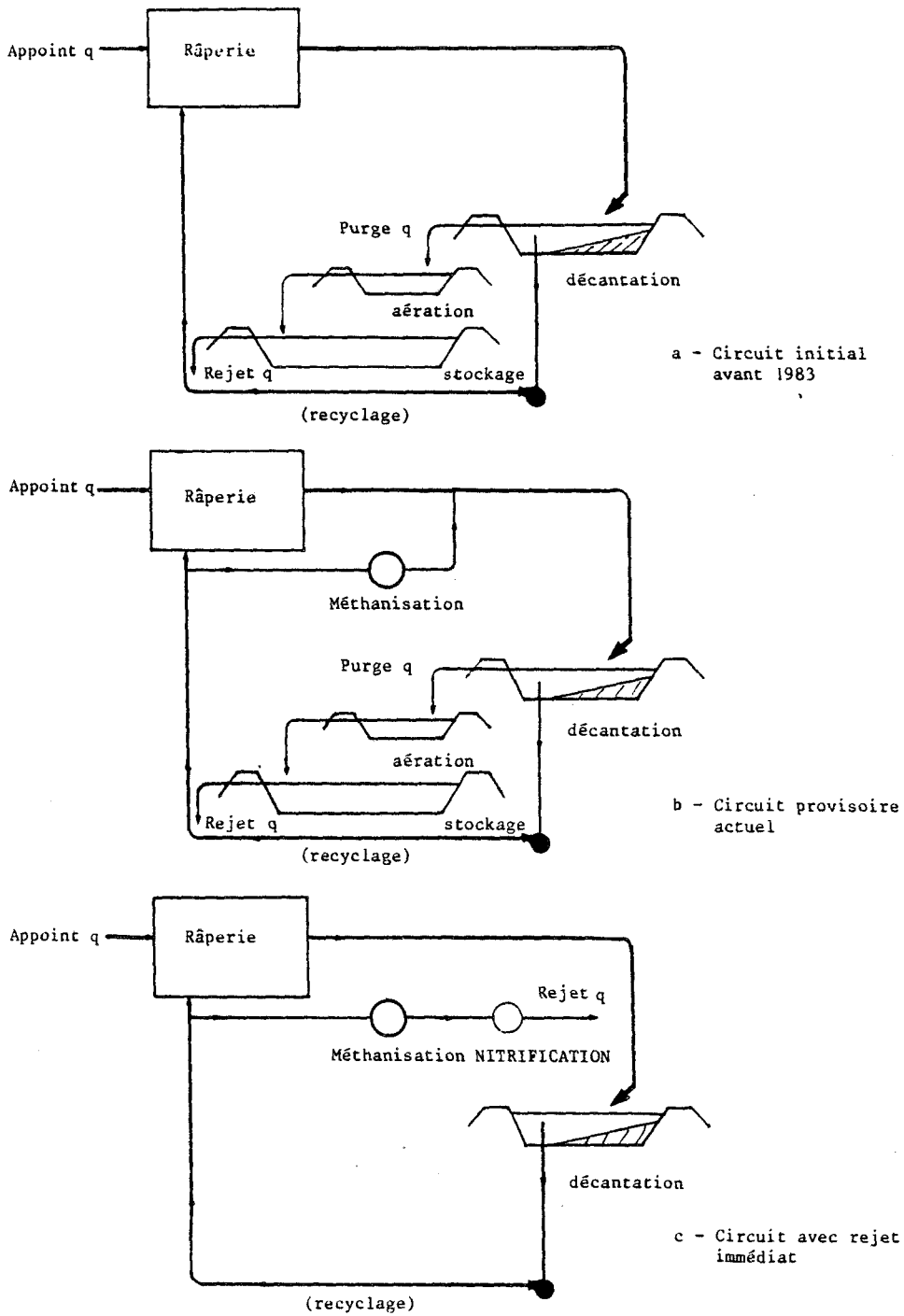


FIGURE 4 : CIRCUIT DES EAUX DE LA SUCRERIE DE THUMERIES



2ème PARTIE

ETUDE SUR SITE INDUSTRIEL

I- THUMERIES - PRESENTATION DU SITE

I-1 La sucrerie de THUMERIES et les eaux résiduaires

La sucrerie de THUMERIES a une capacité de traitement de 7000 tonnes de betteraves par jour (37). Sur une campagne moyenne (65-75 jours), cela représente le rejet quotidien de 16 tonnes de D.C.O. contenues dans 2500 à 3000 m³ d'effluents excédentaires. Les eaux résiduaires sont principalement les eaux boueuses provenant du lavoir, auxquelles il convient d'ajouter les jus de pressage d'herbes et les rejets de l'usine (purges diverses, lavage des sols, effluents Quentin (*). La sucrerie travaille également des sirops en intercampagne, période durant laquelle l'émission de pollution est limitée aux effluents peu importants de l'atelier de conditionnement.

I-2 Circuit des eaux de la sucrerie

I-2-a Circuit provisoire

L'usine dispose de 13 ha de bassins à terre qui se décomposent en deux bassins de décantation, soit 220 000 m³. Ceux-ci reçoivent l'ensemble des effluents de la sucrerie.

Les eaux décantées sont recyclées au cours de la campagne et se concentrent en pollution, essentiellement composée d'Acides Gras Volatils (74).

Jusqu'en 1983, afin de compenser l'appoint d'eau propre, une purge permettait de rejeter l'excédent d'eau vers un bassin d'aération de 30 000 m³ muni de 6 aérateurs de surface de 20 CV, puis vers une lagune de stockage de 50 000 m³ d'où s'effectuait le rejet vers le milieu récepteur (Fig. 4a).

En 1983, un digesteur anaérobie est inséré sur le recyclage des eaux décantées dans le but de traiter les 16 tonnes de pollution émises quotidiennement par la sucrerie (Fig. 4b).

(*) Depuis quelques années, le procédé Quentin n'est plus utilisé.

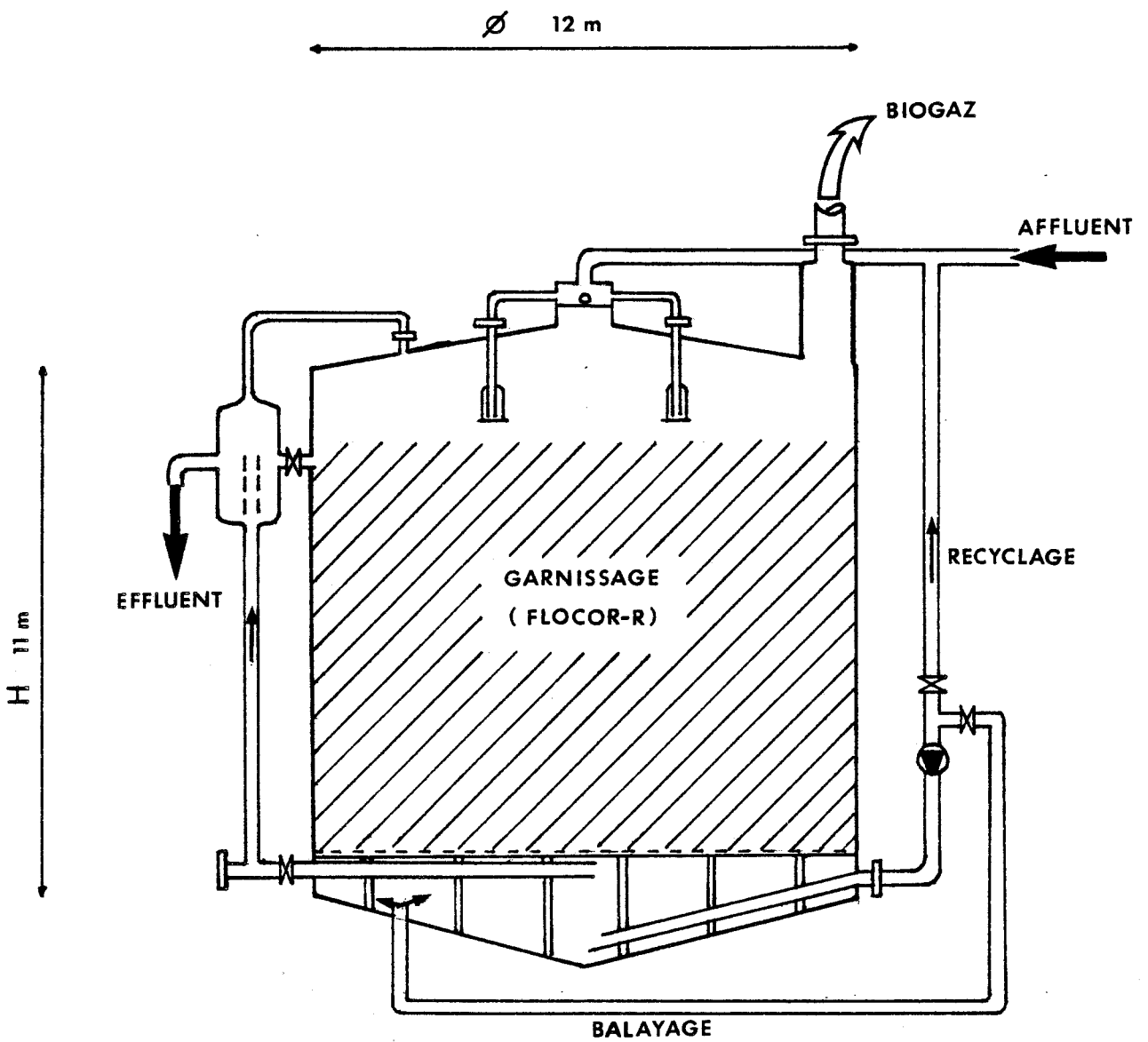


FIGURE 5 : DIGESTEUR ANAEROBIE DE THUMERIES

Provisoirement, les eaux méthanisées sont réinjectées dans le bassin à boues et permettent une déconcentration en D.C.O. du circuit ainsi d'ailleurs qu'un ensemencement partiel de ces bassins (75) en bactéries anaérobies.

La campagne de cristallisation des sirops, qui dure 1 mois environ, permet de réchauffer les eaux résiduaires stockées dans les bassins de décantation et d'en traiter une partie par méthanisation. L'effluent traité est alors retourné vers le bassin d'aération.

I-2-b Projet de filière complète de traitement des eaux

La recherche et la mise au point d'un procédé à cellules fixées de post-traitement aérobie des effluents méthanisés doivent permettre d'éliminer une partie du carbone organique résiduel et de nitrifier l'azote ammoniacal de ces eaux. Ceci conduira à la suppression des bassins de stockage de la sucrerie (Fig. 4c) et au rejet immédiat des eaux, dans le milieu naturel, au fil de la campagne.

II - THUMERIES - LE DIGESTEUR ANAEROBIE

II-1 Caractéristiques et description de l'installation

Afin de répondre à ses besoins, la sucrerie de THUMERIES a installé en 1983 un Biofiltre anaérobie d'un volume total de 1 400 m³. Le garnissage (1 100 m³) est constitué d'anneaux de plastique ondulé de type "flocor R" (230 m²/m³) supporté par un caillebotis (114,125). Le digesteur qui fonctionne en flux descendant est conçu et dimensionné pour traiter 16,3 tonnes de D.C.O. par jour, avec un débit maximum de 150 m³/h. L'eau résiduaire, réchauffée à 35°C, percole à travers le garnissage et est épurée au contact du biofilm qui se développe sur le support (Fig. 5). L'effluent méthanisé est alors renvoyé provisoirement dans le bassin à boues.

Le biogaz produit, brûlé directement en chaudière, est réinjecté dans le circuit vapeur de l'usine.

II-2 Résultats et performances

II-2-a Caractéristiques des eaux décantées

Les eaux se chargent assez progressivement au cours de la campagne, leur composition moyenne variant dans les limites suivantes :

pH	5,5 - 7,0
D.B.O. ₅	2000-4500 mg O/l
D.C.O. totale	4000-7000 mg O/l
D.C.O. soluble	3500-6500 mg O/l
Fraction organique principale	A.G.V.
Azote Kjeldahl	60-120 mg N/l
Matières en suspension	50-200 mg/l
Calcium	400-800 mg Ca/l
Sulfates	< 200 mg S/l
Chlorures	400-600 mg Cl/l
Inhibiteurs	Néant

II-2-b Résultats

Les cinq campagnes de fonctionnement du digesteur ont fait l'objet de rapports et publications détaillées (30,74,75,124). Les principales performances du Biofiltre sont résumées dans le tableau 7 :

TABLEAU 7 : PERFORMANCES DU BIOFILTRE ANAEROBIE

(Temps de séjour hydraulique	: 8-10 heures)
(Charge volumique traitée	: 13 kg DCO/m ³ j)
(Rendement sur la D.C.O. totale	: 90 %)
(Rendement sur la D.C.O. soluble	: 95 %)
(Biogaz - Efficacité volumique	: 5 m ³ /m ³ j)
(% CH ₄ du biogaz	: 80-88 %)
(Production de vapeur	: 30-50 t/j)

II-3 Observations et mesures complémentaires

Le Biofiltre de THUMERIES a fait l'objet de quelques mesures afin de mieux comprendre les phénomènes observés et de déterminer les limites du procédé.

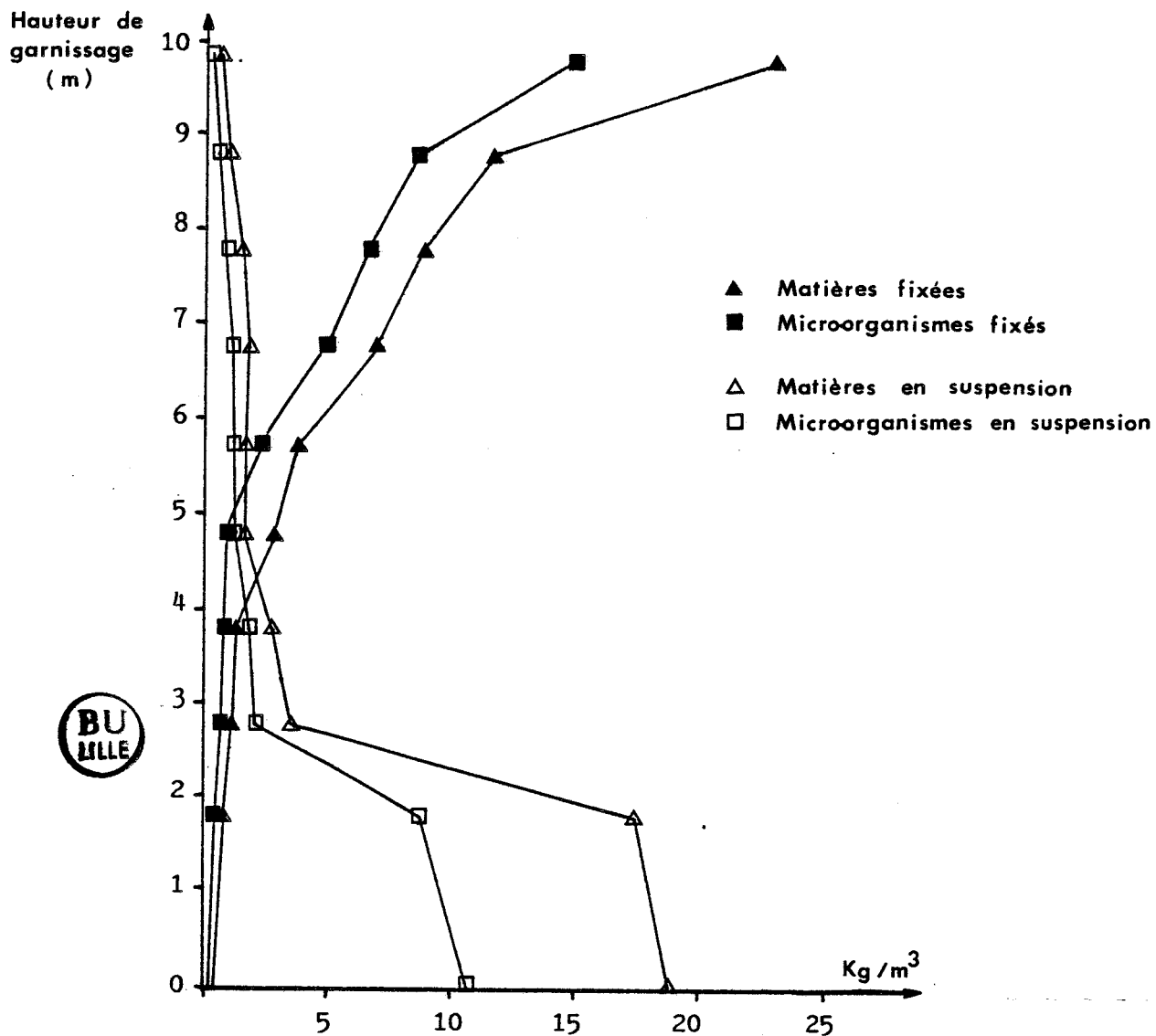
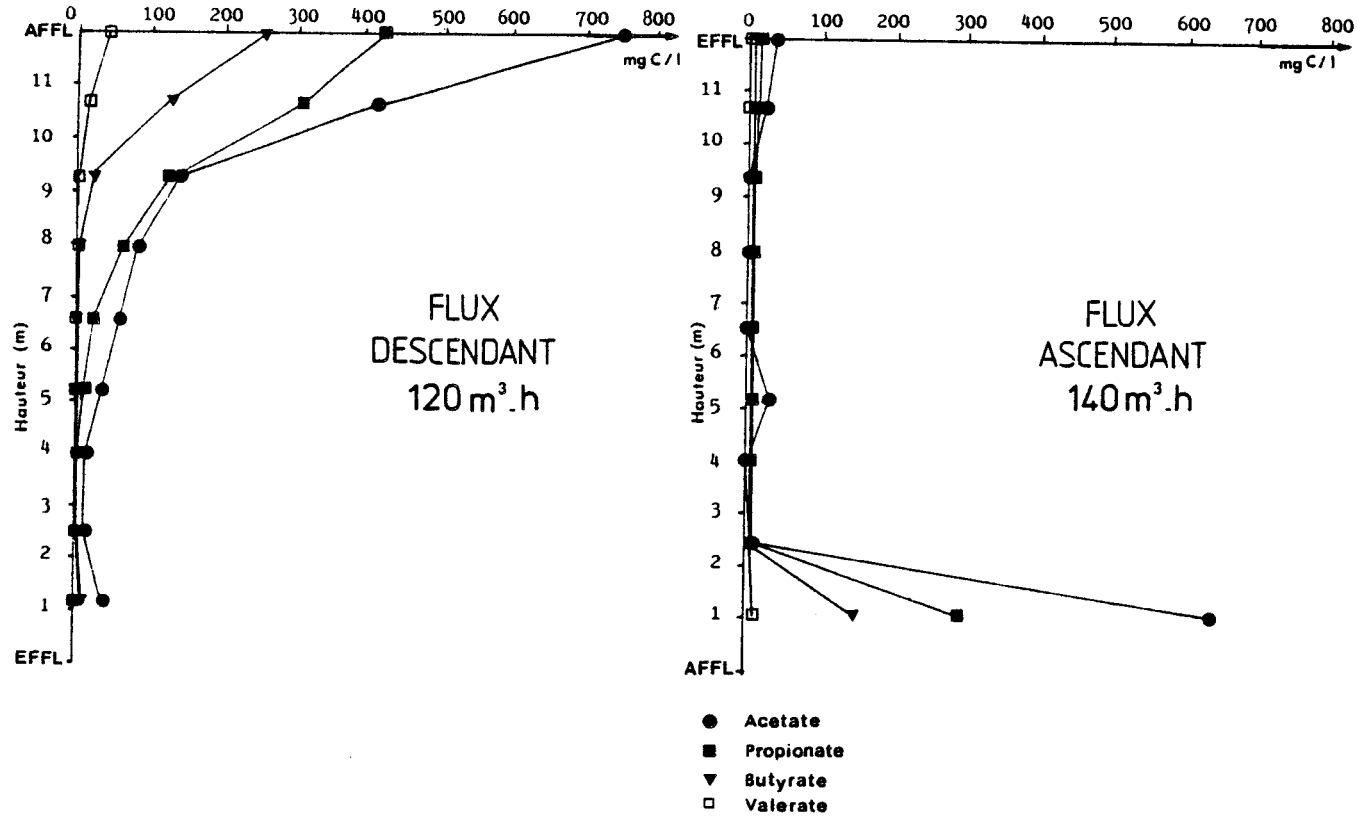


FIGURE 6 : PROFILS DE DIGESTEUR THUMERIES

II-3-a Profils de digesteur

Des profils réguliers ont été réalisés sur la phase liquide (A.G.V.) et sur les anneaux garnis prélevés à différentes profondeurs dans le filtre.

Les mesures sont également réalisées après inversion du sens de marche de l'appareil. On constate alors une double répartition de la flore (Fig. 6) :

- une flore fixée sur les anneaux de PVC, formant un gradient de concentration du haut vers le bas du digesteur,
- une flore libre décantée dans le bas de l'appareil.

Cette répartition des micro-organismes dans le filtre est tout à fait en accord avec les profils d'A.G.V. réalisés sur le digesteur. Les Acides Gras Volatils sont dégradés dans la moitié supérieure du fermenteur par la flore fixée, très active lorsque la conduite de l'appareil se fait en flux descendant. De même, les A.G.V. sont entièrement dégradés par la flore libre en bas de cuve lorsque l'appareil est conduit en flux ascendant. Cette même conduite entraîne un début de colonisation du matériau dans la partie centrale du digesteur.

Ces observations s'expliquent par le faible taux de recyclage appliqué au digesteur et l'effet "piston" qui en résulte. De plus, une grande partie du matériau n'étant pas colonisée, on dispose d'une marge de sécurité importante et les performances du digesteur vont certainement dépasser l'objectif initial de 16 tonnes de D.C.O. éliminées par jour.

II-3-b Mesures en intercampagne

Durant les périodes d'intercampagne, le digesteur est mis à l'arrêt. Les supportsensemencés sont conservés in situ, immergés, sans précautions particulières. L'eau interstitielle est échantillonnée régulièrement et analysée à l'IRIS (Tab. 8). On constate de façon reproductible à chaque arrêt, une augmentation progressive et importante de l'azote total, exclusivement sous forme ammoniacale. Le pH est très stable durant ces périodes d'arrêt. On remarque également une augmentation du carbone minéral. Les valeurs sont identiques en tout point du fermenteur.

Ce phénomène, en l'absence d'étude à caractère fondamental, peut être attribué à une solubilisation lente des matières protéiques et à une auto-digestion de bactéries, qui tendent vers un auto-conditionnement stable du digesteur à l'état de dormance.



TABLEAU 8 : EAU DE DIGESTEUR - EVOLUTION EN INTERCAMPAGNE

Nombre de jours après arrêt	INTERCAMPAGNE 84 (Sirop 84 --> Betteraves 84)				INTERCAMPAGNE 84-85 (*) (Betteraves 84 --> Sirop 85)				INTERCAMPAGNE 85 (Sirop 85 --> Betteraves 85)				INTERCAMPAGNE 85-86 (**) (Bett. 85 --> Bett. 86)			
	pH	COT (mg C/l)	Cm	NH ₄ ⁺ (***) (mg N/l)	pH	COT	Cm	NH ₄ ⁺	pH	COT	Cm	NH ₄ ⁺	pH	COT	Cm	NH ₄ ⁺
0	7,30	200	500	85	7,40	228	376	60	7,50	122	219	40	7,50	210	460	50
10	7,40	80	610	105					7,45	89	230	63	7,40	50	482	155
20	7,40	43	752	208					7,40	27	343	110	7,45	49	490	205
30	7,35	44	753	326	7,40	30	430	275	7,40	19	345	136	7,40	38	515	293
60	7,40	50	832	363	7,40	21	476	326	7,50	23	358	174	7,40	34	544	367
90	7,40	44	839	388					7,40	33	423	236	7,45			492
120									7,40	30	439	264	7,40			640
150	7,40	72	852	400									7,40	92	1174	705
160									7,40	23	464	279	7,35	115	1180	667
185	7,40	70	879	405									7,35	120	1160	705
200													7,30	140	1187	785

(*) Dispositif hors-gel - Pas d'échantillonnage

(**) Le Digesteur n'a pas fonctionné en Campagne Sirop 1986

(***) NH₄⁺ = forme exclusive du NTK

A la remise en service du digesteur, le phénomène disparaît rapidement et l'azote ammoniacal accumulé est lessivé, produisant d'ailleurs une pointe dans les rejets d'azote. Il ne gêne en rien le redémarrage de la méthanisation. La conservation de la biomasse fixée anaérobie ne pose aucun problème particulier.

II-4 Caractéristiques du rejet à nitrifier

La nitrification biologique est un traitement d'eaux en grande partie débarrassées de leur pollution carbonée. Son bon déroulement dépend de la qualité de l'effluent digéré. Sa composition moyenne évolue d'une campagne à l'autre, mais les fluctuations sur une même campagne sont assez faibles.

t°	35°C
pH	7,3 - 7,5
D.B.O. ₅	20 - 70 mg O/l
D.C.O. totale	200 - 400 mg O/l
D.C.O. soluble	80 - 250 mg O/l
Azote Kjeldahl	50 - 120 mg N/l
Azote ammoniacal	50 - 100 mg N/l
Alcalinité	20 - 30 meq/l
Calcium	200 - 500 mg Ca/l
Matières en suspension	<300 mg/l
Phosphore total	4 - 8 mg P/l

Ces valeurs appellent quelques remarques :

- Globalement, le substrat est compatible avec une flore nitrifiante à caractère autotrophe. Le post-traitement a pour double objectif de diminuer au maximum le carbone organique résiduel et de nitrifier les eaux.

- La forte teneur de l'effluent en CO₂ dissous et en calcium peut entraîner des risques d'entartrage au cours de la nitrification.

- Des pertes brutales de matières en suspension dans l'effluent méthanisé peuvent gêner la nitrification par phénomène d'asphyxie ou d'enrobage des bactéries nitrifiantes. Afin d'éviter ces risques, il est prévu d'insérer un décanteur lamellaire entre le digesteur et l'unité de nitrification. Les fuites en M.e.s. du digesteur se produisent surtout en phase de balayage du fond de cuve.

II-5 Conclusions

Le Biofiltre de THUMERIES apporte un perfectionnement par rapport aux procédés classiques (74,75). Il permet d'augmenter la charge volumique de façon importante et ainsi de réduire l'encombrement de l'installation.

La marche en flux descendant permet une bonne homogénéisation du substrat due au contre-courant gaz-liquide. Le Biofiltre est surtout efficace dans sa partie supérieure et, dans les conditions d'exploitation, le volume utile de l'appareil n'est pas optimisé. Ces remarques ont permis d'améliorer la configuration du procédé pour d'autres installations et notamment celle du digesteur de la sucrerie d'AULNOIS-SOUS-LAON (17,51). Sa conception est mixte : il comporte en effet une partie Biofiltre et une zone libre à la base du filtre, permettant le développement d'un lit de boues et préservant également le fermenteur d'un éventuel colmatage dans sa partie inférieure (51).

III - THUMERIES - NITRIFICATION SUR PILOTES INDUSTRIELS

III-1 Présentation de l'étude

Les travaux réalisés à l'IRIS sur la nitrification et, l'abandon de la technique du "lit de boues" (30,73) en raison de la fragilité du procédé, ont conduit à poursuivre les recherches vers les techniques à flore fixée plus stables.

L'expérimentation de THUMERIES commence dès l'implantation et la mise en service du digesteur anaérobie en 1983. Cette étude d'approche est réalisée sur 2 pilotes en collaboration avec 2 constructeurs : DEGREMONT et l'AIR LIQUIDE. La période d'essais est très courte. La véritable expérimentation est réalisée en 1984-1985 sur quatre pilotes fonctionnant en parallèle en collaboration avec 3 constructeurs : OTV, DEGREMONT et L'AIR LIQUIDE. Le quatrième pilote est inspiré de la technique SGN du biofiltre anaérobie implanté à THUMERIES. L'expérimentation est complétée par des essais de décantation et flottation sur prototypes.

L'objectif de l'étude est fixé par la composition limite à respecter pour l'effluent :

D.B.O. ₅	30 mg O/l
D.C.O.	150 mg O/l
Azote ammoniacal	5-10 mg N/l
Matières en suspension	30 mg/l

III-1-a Chronologie et plan de l'étude

L'expérience se déroule en 4 phases principales :

1ère phase : Essais de Campagne Sucrière 1983 (1,5 mois) et de campagne sirop 1984 (1 mois).

Cette première étape de l'étude sur le site industriel a pour but principal l'adaptation de procédés nouveaux et la mise au point de prototypes sur les plans techniques (hydraulique des matériaux supports, transfert d'oxygène, entartrage) et biologique (protocole d'ensemencement, t°, équilibre des effluents à nitrifier).

2ème phase : Essais de campagne sucrière 1984 (2 mois).

Cette phase a pour principal objectif d'ensemencer les réacteurs et d'acclimater les souches nitrifiantes aux effluents méthanisés. Il s'agit également d'adapter les matériels aux conditions d'exploitation et ainsi d'augmenter progressivement les charges appliquées en azote ammoniacal.

3ème phase : Période d'intercampagne (2,5 mois)

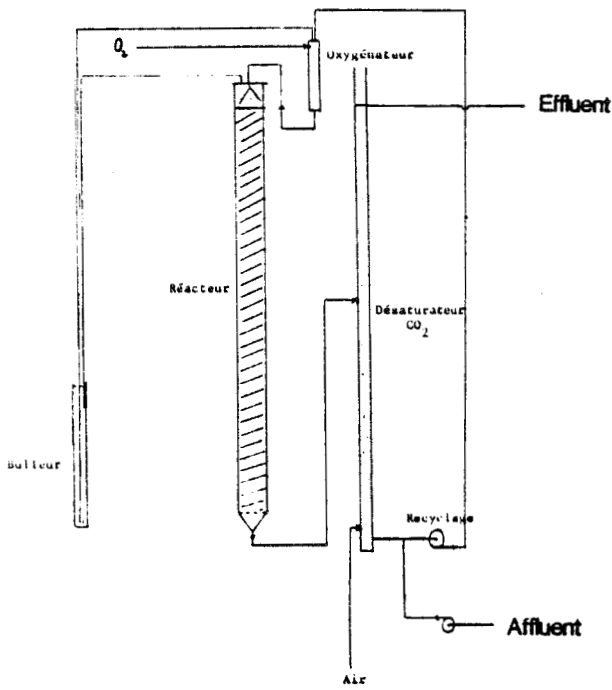
La mise à l'arrêt des installations pilotes durant l'intercampagne doit permettre de tester la conservation de l'activité nitrifiante selon une technique de séchage mise au point à l'IRIS.

4ème phase : Essais de campagne Sirop 1985 (2 mois)

Cette dernière partie de l'étude sur site industriel a pour but de suivre la reprise de l'activité nitrifiante des différents supports conservés et d'évaluer le temps de retour à l'équilibre. Il s'agit ensuite de déterminer les limites biologiques des appareils et d'optimiser les différents paramètres de fonctionnement, afin de dimensionner une unité industrielle de post-traitement répondant aux contraintes du rejet direct.

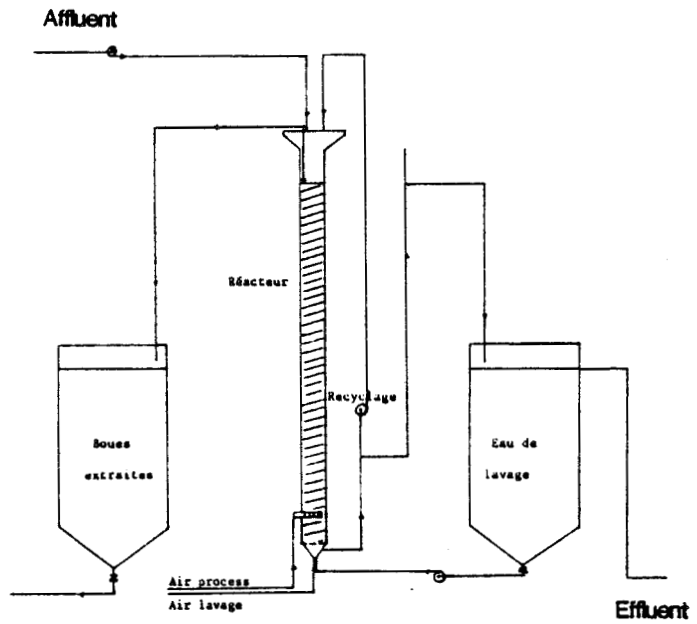
III-1-b Mise en oeuvre de l'expérimentation

Les essais sont réalisés à proximité du digesteur, l'ensemble des installations pilotes étant regroupé dans un hall d'essais couvert, monté pour l'occasion. L'ensemble des équipements reste sur place durant l'intercampagne.



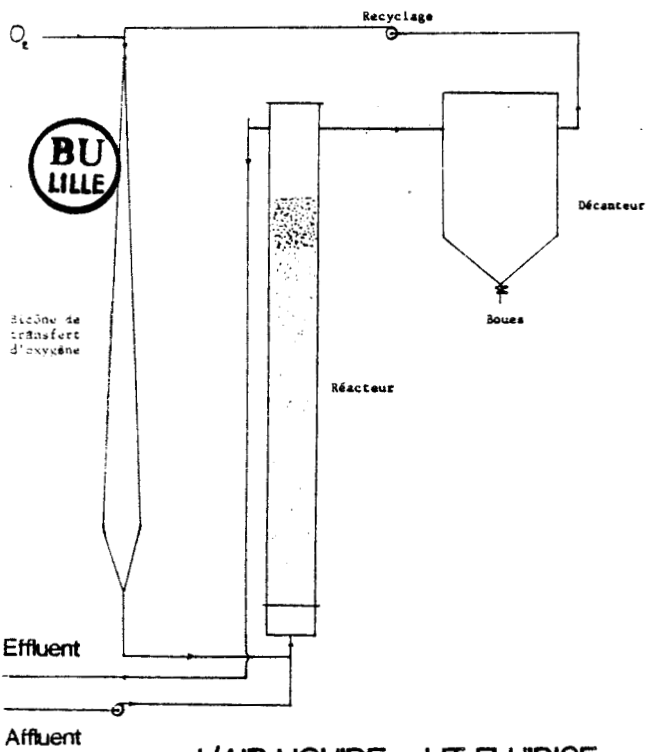
FLOCOR -LIT FIXE-

Ech : 1/50



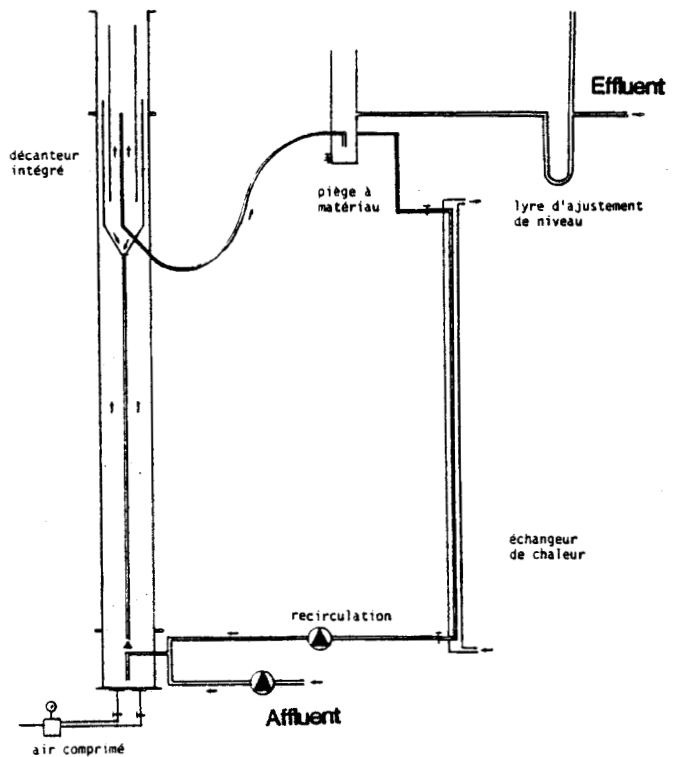
OTV - FILTRE BIOCARBONE-

Ech : 1/20



L'AIR LIQUIDE -LIT FLUIDISE-

Ech : 1/25



DEGREMONT -LIT FLUIDISE-

Ech : 1/30

Une partie de l'effluent traité par le digesteur anaérobie ($2\text{m}^3/\text{h} - 35^\circ\text{C}$) est déviée vers un décanteur lamellaire type SERPAC afin de piéger les excédents de boues relargés par le fermenteur. L'effluent décanté alimente alors les quatre pilotes par une cuve tampon sur laquelle on recircule en permanence afin de maintenir une température de $25-30^\circ\text{C}$ à l'entrée des différents réacteurs. Chaque appareil est équipé d'un compteur-totaliseur permettant de contrôler le volume d'eau passé quotidiennement. Les effluents nitrifiés sont collectés et renvoyés avec les rejets de la sucrerie. Indépendamment, un flottateur SGN est testé afin de mesurer l'efficacité de cet appareil sur l'effluent méthanisé par rapport au décanteur lamellaire. Les résultats sont décevants et ne seront pas commentés dans ce qui suit.

III-2 Présentation des appareils

Le décanteur lamellaire est un SERPAC $4/10\text{ m}^3$ de cellules orientées, équivalent à 4 m^2 de surface projetée de décantation. On favorise la floculation des boues par recyclage d'une partie d'entre elles et par injection de peroxyde d'hydrogène dans la chambre de réaction.

Quatre procédés différents de nitrification sont testés en parallèle, utilisant tous des bactéries fixées. Les principales caractéristiques des pilotes sont regroupées dans le tableau 9 et représentées sur la figure 7.

TABLEAU 9 : CARACTERISTIQUES TECHNIQUES DES PILOTES

	: OTV	: FLOCOR R	: DEGREMONT	: L'AIR LIQUIDE)
Procédé	: Filtre	: Filtre	: lit turbulent	: lit fluidisé)
Support	: Schiste expansé : Biodagène	: Anneaux ondu- : lés PVC	: Pierre ponce : broyée	: sable tamisé)
	: \emptyset 3-6 mm	: Flocor R : $S = 250\text{ m}^2/\text{m}^3$: \emptyset 200-300 μm	: \emptyset 200-250 μm)
Aération	: Air comprimé	: Oxygène pur	: Air comprimé	: Oxygène pur)
Flux	: descendant	: descendant	: ascendant	: ascendant)
Particularités	: Procédé au : point (Biocar- : bone) éprouvé : sur pollutions : carbonée et : azotée (64) : : Lavages périodiques : nécessaires	: lère expéri- : mentation en : traitement : aérobie. : Prédissolution : de l'oxygène : sous-pression, : recyclage : nécessaire	: Mise au point : du procédé : sur le site : en Campagnes : betterave : 1983 et sirop : 1984 : Dispositif de : décantation : interne évi- : tant les : fuites de : pierre ponce	: Procédé per- : formant en : pollution : carbonée et : testé pour la : première fois) : en nitrifica- : tion à : THUMERIES en : 1983. : Régulation : entièrement : automatisée : $O_2, t^\circ,$: débits).)

III-3 Analyses et contrôles

Le suivi du décanteur lamellaire et des pilotes est réalisé en partie sur le site grâce à l'implantation d'un laboratoire de terrain, qui permet de réagir instantanément sur les appareils. Les analyses et observations complémentaires ainsi que l'exploitation des résultats sont réalisées à l'IRIS.

Les méthodes analytiques couramment utilisées sont décrites en Annexe 1.

III-3-a Analyses et contrôles systématiques

Le décanteur lamellaire fait l'objet d'analyses quotidiennes entrée-sortie de la D.C.O., du Carbone Organique Total et du carbone minéral sur échantillons homogénéisés et centrifugés, des Matières en suspension et des Matières volatiles en suspension. On mesure également les purges de boues.

Le suivi biologique des pilotes consiste principalement à analyser quotidiennement ou après chaque intervention les composés azotés du milieu, avant et après nitrification : NH_4 , NO_2 , NO_3 .

On mesure également sur l'affluent décanté et sur les effluents traités : pH, D.C.O., Carbone Organique, Carbone minéral, Matières en suspension, Matières volatiles en suspension, T.A.C. et calcium.

Ces analyses sont accompagnées de relevés réguliers de points de consigne et d'enregistrements continus : température dans les réacteurs, débits d'alimentation en eau-air-oxygène, débits de recirculation.

On étalonne régulièrement les débitmètres, pH mètres et oxymètres.

III-3-b Mesures non systématiques

Quelques analyses complémentaires (D.B.O.₅, Azote Kjeldahl, A.G.V. résiduels, Phosphore) sont réalisées ainsi que des profils de réacteurs. On mesure également les quantités de matières fixées sur les supports, ceci étant accompagné d'observations en microscopies optique et électronique à balayage.

III-4 Synthèse et exploitation des résultats

III-4-a Ensemencement et démarrage des pilotes

Chaque appareil a un protocole de démarrage différent, résumé dans le tableau 10. La température des réacteurs est maintenue entre 15-20°C (OTV, FLOCOR) et 20-25°C (DEGREMONT, L'AIR LIQUIDE). Les résultats de cette phase ne permettent pas de comparer les procédés étant donné la diversité des inoculums, des substrats et des paramètres de lancement.

TABLEAU 10 : DEMARRAGE DES REACTEURS

	BIOFILTRE AERE	BIOFILTRE OXYGENE	LIT TURBULENT	LIT FLUIDISE
Source de l'inoculum:	Support pré-ensemencé sur effluent urbain	Boues station Nit-Dé nit de la sucrerie de BUCY	Boues station de nitrification de COLOMBES	Boues hétérotrophes de laiterie congelées
Protocole d'ensemencement	Simple acclimatation. Mise en circuit fermé sur effluent de digesteur	Ensemencement massif. Mise en recyclage sur effluent de digesteur enrichi en bicarbonate d'ammonium	Ensemencement massif en deux temps. Alimentation en substrat minéral synthétique	. Phase hétérotrophe sur substrat organique (lait, sels minéraux, AGV). . Phase autotrophe progressive sur substrat mixte puis minéral
Démarrage de la nitrification:	24 h	10 j	5 j	15 j
Temps de colonisation	-	Piégeage rapide de la biomasse - 5 j Colonisation effective en 2 mois	20 j	Assez lent



On peut cependant remarquer que :

- L'ensemencement réalisé à partir de boues nitrifiantes actives est plus rapide et plus efficace que les ensemencements massifs en boues mixtes à dominante hétérotrophe. Ces dernières nécessitent un temps assez long d'acclimatation pour rendre majoritaire la faible partie de bactéries nitrifiantes qu'elles contiennent au départ.

- La colonisation effective des matériaux est liée à leur nature (porosité, taille) et conditionne l'efficacité des réacteurs. Les supports poreux sont mieux adaptés à la rétention et à l'accrochage stable des bactéries nitrifiantes et des floccs bactériens.

- Dans la période initiale, la montée en charge est surtout contrôlée par la fixation des bactéries. Le développement assez lent du biofilm nitrifiant rend cette phase particulièrement importante. Le démarrage n'est pas forcément plus rapide que dans un système classique type boues activées (35), mais les fuites en micro-organismes sont moindres.

III-4-b Performances

III-4-b-1 Le décanteur lamellaire -----

Au cours des essais, le décanteur lamellaire permet une rétention moyenne de 63 % des M.e.s. et 47 % des M.v.s. contenues dans l'effluent de digesteur.

Les teneurs moyennes de l'eau décantée sont de 260 mg M.e.s./l dont 140 mg M.v.s./l.

La rétention correspondante en D.C.O. est de 30 % et l'abattement en Azote organique est de l'ordre de 15 %. L'utilisation du peroxyde d'hydrogène 2 % à raison de 1 litre pour 1000 litres d'eau a pour but d'oxyder les bactéries anaérobies et de bloquer la production de méthane. On alourdit ainsi les floccs bactériens, ce qui permet leur décantation. Le traitement est satisfaisant et s'accompagne d'une recirculation d'une partie des boues décantées dont le débit est optimisé au cinquième du débit d'alimentation de la cellule.

Il est à signaler qu'au cours de cette décantation, la température de l'effluent de digesteur passe de 35°C à 30°C en moyenne. Cet effet secondaire est bénéfique pour la nitrification qui suit puisque sa température optimale est de 25-28°C.

TABLEAU 11 : SYNTHÈSE DES RESULTATS SUR PILOTES

TYPE DE REACTEUR	BIOFILTRE AERE	BIOFILTRE OXYGENE	LIT TURBULENT	LIT FLUIDISE
TEMPS DE SEJOUR HYDRAULIQUE	1 à 1,5 heures	6 à 7 heures	2 à 3 heures	> 2 heures
<u>Traitement de l'azote</u>				
Rendement NH ₄ ⁺	> 95 %	Irrégulier	95 %	70 % instable
Oxydation	100 % NO ₃ ⁻	70 % NO ₂ ⁻ 30 % NO ₃ ⁻	ε NO ₂ ⁻ 99 % NO ₃ ⁻	40 % NO ₂ ⁻ 60 % NO ₃ ⁻
Charge volumique traitée (kg N/m ³ .j)				
Moy.	1,4	0,3	0,8	0,5
Max.	1,7	0,4	1,0	0,7
<u>Traitement du carbone organique</u>				
Rendement DOD	53 % (*)	51 %	56 %	40 %
DOD rejet (mg O/l) probabilité à 95% (ε)	142	190	176	228
<u>Entartrage</u>	Risque élevé de colmatage Décarbonatation partielle nécessaire	Pas d'entartrage	Dépôts sur la pierre-ponce ensemencée ↳ Parasité	Risque inexistant
<u>Matières en suspension</u>				
	Mes (mg/l) Mvs (mg/l)		Mes (mg/l) Mvs (mg/l)	Mes (mg/l) Mvs (mg/l)
	Moy. sd Moy. sd		Moy. sd Moy. sd	Moy. sd Moy. sd
Après décantation	260 180 140 65		260 180 140 65	260 180 140 65
Après décarbonatation	180 95 110 50			
Après nitrification	66 40 34 25		202 94 90 39	185 128 96 58
Effet surcharge DOD	Oxygène limitant Retour rapide à l'équilibre	Asphyxie b.nitrifiantes par biomasse hétérotrophe Rééquilibrage très lent	Production et fuite de boues hétérotrophes diffuses Nitrification stable	Phénomène surmonté par dopage en O ₂
Effet période d'anoxie	Sans conséquence	Déstabilisation du système d'oxygénation	Protocole de remise en fluidisation assez délicat	Décrochage partiel de la biomasse - système instable



(*) Sur eau décarbonatée.

III-4-b-2 Les pilotes de nitrification

Une fois l'ensemencement en bactéries nitrifiantes établi, chaque appareil est alimenté en effluent méthanisé et décanté. Les pilotes fonctionnent alors dans les mêmes conditions, à l'exception du Biocarbone qui est précédé d'une décarbonatation rendue indispensable en cours d'expérimentation. Les résultats consignés dans le tableau 11 sont ceux dégagés sur l'ensemble des deux campagnes d'essais de cinquante jours chacune. Il faut signaler que l'AIR LIQUIDE a testé un nouveau matériau support en deuxième campagne : sable ϕ 250 μ m.

Les principaux enseignements à retenir de ces deux campagnes d'essais sont les suivants :

- La faisabilité biologique et technologique du post-traitement des eaux de sucrerie préalablement méthanisées est maintenant bien établie. L'élimination de l'azote ammoniacal peut se faire avec un rendement d'environ 95 %, à une charge volumique d'environ 1,5 kg N-NH₄/m³.j, ce qui correspond à 1-1,5 heure de temps de séjour hydraulique. Le post-traitement aérobie permet une élimination simultanée de la D.B.O.₅ résiduelle et d'environ 50 % de la D.C.O. soluble.

- Les performances diffèrent d'un procédé à l'autre. Ces essais font ressortir l'importance du choix d'une technique et de ses principaux paramètres de fonctionnement.

- La nitrification est un phénomène lent et la fixation des populations nitrifiantes sur des supports inertes est une solution intéressante pour pallier les limitations biologiques des bactéries. L'avantage est donné aux matériaux poreux qui assurent une fixation stable ; la rétention des micro-organismes y est efficace et persiste en cas d'à-coups de charge polluante.

- Les procédés d'oxygénation au gaz pur se révèlent peu performants. Les charges azotées traitées restent en deçà des estimations de laboratoire. La prédissolution de l'oxygène semble favoriser la rétention de composés volatils dont les conséquences sur le pH entraînent une inhibition partielle de la nitrification. Leur régulation permet cependant de surmonter un excès de pollution organique temporaire alors que les procédés à réaction simple sont limités par une capacité d'oxygénation plus faible. De plus, les procédés utilisant l'oxygène pur prédissous ne présentent pas de risque de précipitation de carbonate de calcium, les systèmes étant biphasiques.

- Les procédés en milieu triphasique sont très sensibles à l'entartrage. Les bicarbonates présents en quantité importante dans l'effluent méthanisé ont en fait un double effet sur ces procédés : ils procurent à l'eau un fort pouvoir tampon ce qui limite les chutes importantes de pH et de T.A.C. dues à la réaction de nitrification. Le deuxième effet est provoqué par l'aération de l'eau, qui entraîne un départ de gaz carbonique et une précipitation de carbonate de calcium. Ces dépôts calciques se produisent en fine pellicule sur les parois des réacteurs, et tous les points sensibles du dispositif. Ils enrobent

progressivement les supportsensemencés et peuvent diminuer l'activité biologique en réduisant le nombre de sites actifs. La précipitation du carbonate de calcium peut aboutir à un colmatage partiel du matériau, avec formation d'agglomérats (lit turbulent), ou une prise en masse incompatible avec le procédé Biocarbone (schiste). La décarbonatation à la chaux avant nitrification est efficace, mais difficile à conduire. En effet, la réaction de nitrification nécessite elle-même de l'alcalinité (2 équivalents bicarbonates par équivalent ammonium) et la décarbonatation préalable de l'eau ne doit être que partielle.

Les matériaux colonisés ont fait l'objet de nombreuses observations microscopiques. Quelques photos sont regroupées en Annexe 5.

III-4-c Conservation des supportsensemencés en intercampagne

Durant l'intervalle de 2 mois et demi séparant les deux campagnes d'essais, le digesteur anaérobie et les pilotes de nitrification sont mis à l'arrêt. Il convient de conserver la flore nitrifiante dans de bonnes conditions permettant le maintien et la reprise rapide de son activité oxydante. La technique de conservation choisie est l'égouttage et l'assèchement rapide des supports in situ afin de mettre les bactéries actives dans un état dormant permettant leur stockage à l'air libre. La biomasse est réactivée par réhydratation avec de l'effluent de digesteur quelques jours avant la reprise de campagne.

La phase d'égouttage et d'assèchement des matériaux doit être rapide, afin d'éviter la formation de zones locales d'anoxie. Cette opération est facile sur les matériaux grossiers (schiste, Flocor). Elle est plus délicate sur les matériaux fins (pierre-ponce, sable) dont les espaces intergranulaires sont réduits.

La réactivation rapide des souches conservées dépend essentiellement de la température de reprise, défavorable si elle est inférieure à 20°C, ainsi que des caractéristiques du milieu de réhydratation, qui doit être le plus minéral possible.

Malheureusement, les conditions expérimentales ont été très sévères à THUMERIES durant la période d'arrêt (Début 1985). Le froid a perturbé le bon déroulement de la phase d'assèchement des matériaux, provoquant une prise en masse de la pierre-ponce et un détachement partiel des boues fixées sur le Flocor.

L'étude complète de la conservation des bactéries nitrifiantes fixées en intercampagne est reprise au laboratoire.

IV - CONCLUSIONS

Les essais de nitrification réalisés à THUMERIES ont permis d'atteindre des performances intéressantes. Deux procédés ont été retenus pour la phase ultime de réalisation industrielle : le filtre Biocarbone d'OTV et le lit turbulent sur pierre-ponce de DEGREMONT.

Les résultats obtenus sur pilotes constituent le principal critère de dimensionnement d'une installation. Il faut souligner que la durée assez courte de l'expérimentation sur le site industriel n'a pas permis d'atteindre les limites biologiques du lit turbulent. Le filtre Biocarbone bénéficiait d'un pré-ensemencement et ceci a permis d'obtenir plus rapidement la charge maximale admissible par cet appareil.

Les deux procédés nécessitent l'ajustement de paramètres peu ou pas étudiés durant l'expérimentation de THUMERIES; l'optimisation du rapport air/eau reste à affiner. L'entartrage et notamment l'évolution à long terme des matériaux poreux demande un travail complémentaire. Une étude complète de laboratoire concernant la conservation et la reprise d'activité de la flore fixée s'avère indispensable, étant donné le peu d'informations recueillies sur le site industriel à ce sujet.

Enfin, le choix du procédé est lié au contexte particulier de la sucrerie :

- ses objectifs orientés vers une optimisation de la productivité de l'unité de nitrification,
- ses contraintes, dépendantes des normes de rejet susceptibles d'être imposées par l'Agence de l'Eau,
- le coût et l'entretien de l'installation.

3ème PARTIE

ETUDES COMPLEMENTAIRES DE LABORATOIRE

INTRODUCTION

Les études de laboratoire sont conduites avec un souci permanent d'application industrielle, orientées à la fois vers l'optimisation du processus de nitrification et vers la mise au point d'un procédé fiable et pratique de conservation des bactéries nitrifiantes. Les expériences s'inspirent directement des expérimentations pilotes faites sur le site de THUMERIES et de leurs résultats. Elles sont généralement indépendantes les unes des autres et sont donc présentées séparément.

A - ETUDE DE QUELQUES PARAMETRES SPECIFIQUES A LA NITRIFICATION DES EFFLUENTS DE SUCRERIE METHANISES

I - PRESENTATION DES EXPERIENCES

I-1 - Dispositifs expérimentaux

Par mesure de simplification, les schémas des différents pilotes de laboratoire utilisés sont regroupés et numérotés en Annexe 4. Chaque expérience a son protocole spécifique, les conditions de travail restant constantes; température (19-22°C), matériaux supports (schiste expansé, pierre ponce), inoculum de départ.

I-1-a Réacteurs de type "lit turbulent"

Les réacteurs sont constitués de colonnes de verre munies de séparateurs internes permettant une décantation et un recyclage du support fluidisé. Ce support est constitué de pierre ponce finement broyée et tamisée \emptyset 200-300 μ m, occupant 25 % du volume utile des réacteurs à l'arrêt.

L'air injecté a la double fonction d'oxygéner le milieu et de fluidiser le support. Le rapport air/eau est toujours fixé de manière à éviter toute limitation en oxygène.

I-1-b Réacteurs de type "Biofiltre"

Les réacteurs sont constitués de simples colonnes de verre d'un volume utile de 700 ml, garnies de 500 ml de schiste expansé type Biodagène. L'alimentation est réalisée en flux descendant à contre-courant de l'aération. Le lavage du matériau est réalisé périodiquement par simple vidange du réacteur et rinçage du matériau support.

I-2 Substrats

Le substrat de base est constitué d'effluent de digesteur de THUMERIES prélevé pendant les périodes de fonctionnement et stabilisé à 4°C. On utilise également de l'eau méthanisée stockée dans le digesteur durant l'intercampagne; les caractéristiques de ce substrat évoluent au cours du stockage (Tab. 8).

Quel que soit le milieu choisi, on essaie pour toutes les études d'alimenter les réacteurs avec une eau ayant des caractéristiques constantes et reproductibles, soit par dilution, soit par complémentation en éléments nutritifs. La composition moyenne du substrat est la suivante :

t°.....	19 - 22°C
pH.....	7,3 - 7,5
C.O.T.	25 - 100 mg C/l
Azote ammoniacal	100 - 250 mg N/l
Alcalinité	20 - 40 meq/l ou 100 - 200 °f/l

I-3 Contrôles

La nitrification est contrôlée essentiellement par dosages chimiques des différentes formes de l'azote avant et après nitrification (NH_4^+ , NO_2^- , NO_3^-). On suit également l'évolution du carbone (organique et minéral), ainsi que les principaux paramètres liés à la nitrification (calcium, pH,...).

L'ensemble des méthodes analytiques utilisées est regroupé en Annexe 1.

Les résultats exprimés en charge sont systématiquement corrigés des variations imputables aux prélèvements de matériau pour effectuer des tests d'activité en Batch. Ces tests d'activité sont décrits en Annexe 2.

II - INFLUENCE DE L'EQUILIBRE CALCO-CARBONIQUE DU MILIEU

II-1 Introduction

Les bactéries nitrifiantes consomment du T.A.C., que l'on trouve en excès sous forme de bicarbonates dans les effluents de sucrerie méthanisés. L'aération intense du milieu a plusieurs effets simultanés sur le carbone minéral, qui se transforme :

- par assimilation, sous forme de CO_2 dissous pour la synthèse des bactéries nitrifiantes :
- par neutralisation des protons produits pendant la nitrification,
- par stripping, en gaz carbonique, entraîné par l'air en excès,
- par précipitation, en CaCO_3 .

L'excès se retrouve sous forme dissoute dans l'effluent nitrifié. La constatation de ces phénomènes instables sur pilotes industriels conduit à l'étude au laboratoire de deux facteurs de correction sur l'équilibre calco-carbonique :

- une décarbonatation partielle préalable de l'affluent afin d'éviter un entartrage des réacteurs et des supports,
- un dopage de l'air en CO_2 afin de pallier une éventuelle carence en carbone minéral² disponible, surtout en phase de démarrage d'un réacteur en circuit fermé.

II-2 Décarbonatation de l'affluent

II-2-a But

L'effluent de digesteur de THUMERIES est décarbonaté partiellement à différentes doses de chaux, de manière à constituer une gamme de T.A.C. Le but de l'expérience est de déterminer le meilleur rapport T.A.C./Azote pour la nitrification en milieu aéré.

NITRIFICATION SUR PIERRE PONCE

Kg N-NH₄/m³.j

$R = \text{TAC} / \text{N} (^{\circ}\text{f} / \text{mg N})$

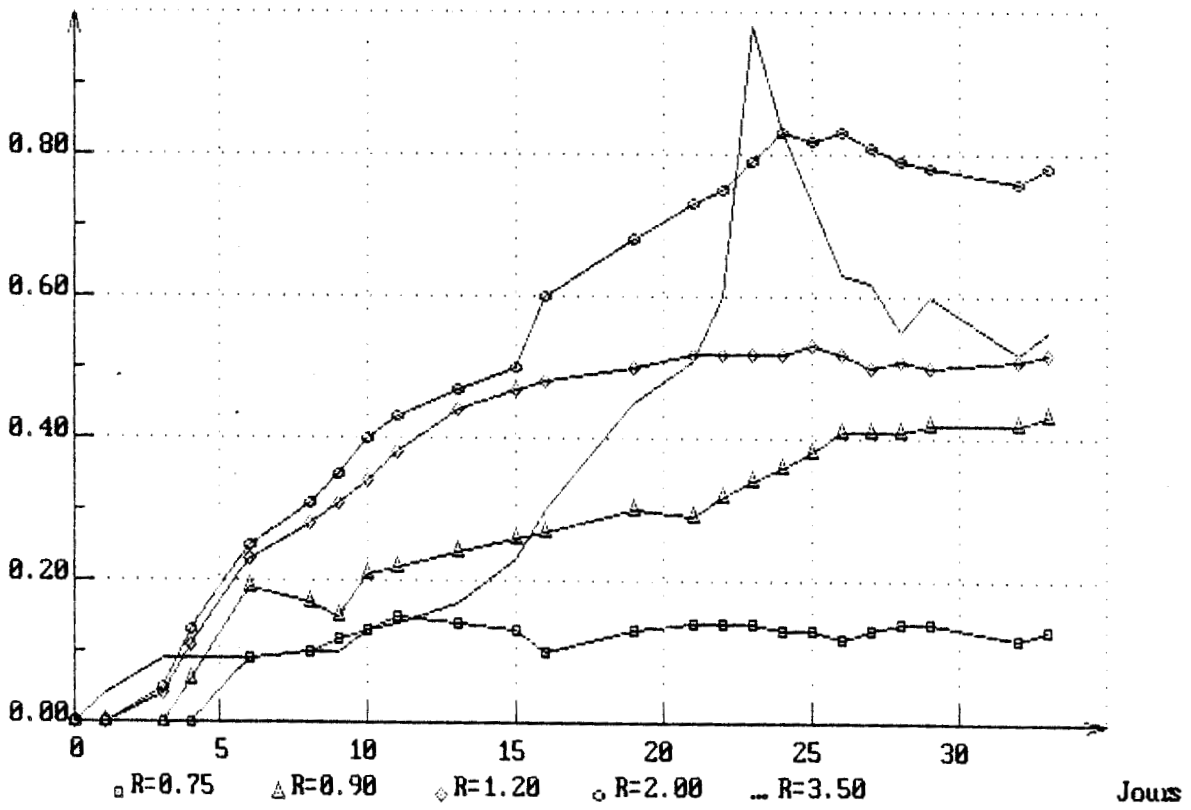


FIGURE 8 : INFLUENCE DU T.A.C. (R=T.A.C./AZOTE) SUR LA CHARGE AZOTEE TRAITEE



II-2-b Résultats

L'expérience est réalisée en réacteurs à lit turbulent type 1 (Annexe 4) sur support pierre ponce, l'inoculum de départ étant constitué de boues nitrifiantes actives provenant d'un lavage de filtre aérobie. La consommation théorique de T.A.C. pour la nitrification est de 0,7°f par mg d'azote oxydé.

Trois niveaux de décarbonatation sont étudiés dans les mêmes conditions et comparés à un témoin non décarbonaté. Les performances du pilote en lit turbulent testé à THUMERIES sont citées en référence. Les résultats sont regroupés dans le tableau 12 et sur la figure 8.

TABLEAU 12 : INFLUENCE DU T.A.C. SUR LA NITRIFICATION

Conditions	LABORATOIRE				PILOTE
	DECARBONATATION				THUMERIES
				Témoin	
T.A.C./N (°f/mg N)	0,75	0,90	1,2	2,0	3,5
Nitrification	:	:	:	:	:
Temps de latence	5 jours	4 jours	3 jours	3 jours	1 jour
Début fixation bactérienne	7 jours	5 jours	3 jours	3 jours	
Charge azotée traitée max. (kg N/m ³ .j)	:	:	:	:	:
à 30 j.	0,14	0,41	0,53	0,83	0,98
à 60 j.	0,15	0,40	0,52	0,59	0,70(*)
% NO ₃	50 %	60 %	95 %	99 %	99 %
Entartrage	:	:	:	:	:
Calcium fixé sur pierre ponce	:	:	:	:	:
à 30 jours	Nul	Nul	0,05 g%g	3 g%g	13 g%g
à 60 jours	Nul	Nul	0,06 g%g	12 g%g	13,5 g%g
T.A.C. effluent	0	0	Traces	Fuite per: manente	Fuite per: manente

(*) à 45 jours

Parallèlement à ces essais, on évalue la consommation de T.A.C. due à la simple aération du milieu et au déplacement de l'équilibre calco-carbonique qu'elle entraîne. L'expérience est réalisée sur un réacteur garni, non ensemencé, sur lequel on applique la même charge azotée que les sur les appareils ensemencés.



La consommation de T.A.C. est alors de 0,2 °f par mg d'azote oxydé théorique.

II-2-c Commentaires

Sans décarbonatation préalable, l'oxydation de l'azote démarre rapidement et la charge azotée traitée est satisfaisante. Cependant, on assiste à un entartrage progressif du matériau poreux qui altère quelque peu les résultats sur la durée de l'expérience. Les performances sont nettement diminuées à 60 jours.

La pellicule de CaCO_3 en formation encombre les sites d'accrochage des micro-organismes et donc diminue l'activité biologique du réacteur.

La décarbonatation permet d'éviter l'enrobage de la pierre ponce, mais limite alors la nitrification, qui est stable mais peu importante. La précipitation ou la transformation d'éléments nutritifs peut entraîner une carence.

Le T.A.C. est dans ce cas le principal facteur limitant de la nitrification. En effet, les réacteurs traitant respectivement 0,15 et 0,40 kg d'azote par m^3 et par jour placés dans les mêmes conditions que le témoin atteignent rapidement la même charge traitée.

Il paraît assez difficile d'appliquer une décarbonatation préalable des effluents méthanisés avant nitrification à l'échelle industrielle. La conduite de cette décarbonatation nécessiterait une régulation permanente et aboutirait quoi qu'il en soit à des performances biologiques inférieures au témoin non décarbonaté. La réaction de nitrification et les phénomènes d'entartrage ne peuvent être dissociés. Il convient plus raisonnablement de s'orienter vers un détartrage périodique du support à l'acide dilué, traitement à caractère essentiellement préventif, sur lequel nous possédons encore peu d'informations.

II-3 Dopage en CO_2 de l'air de process

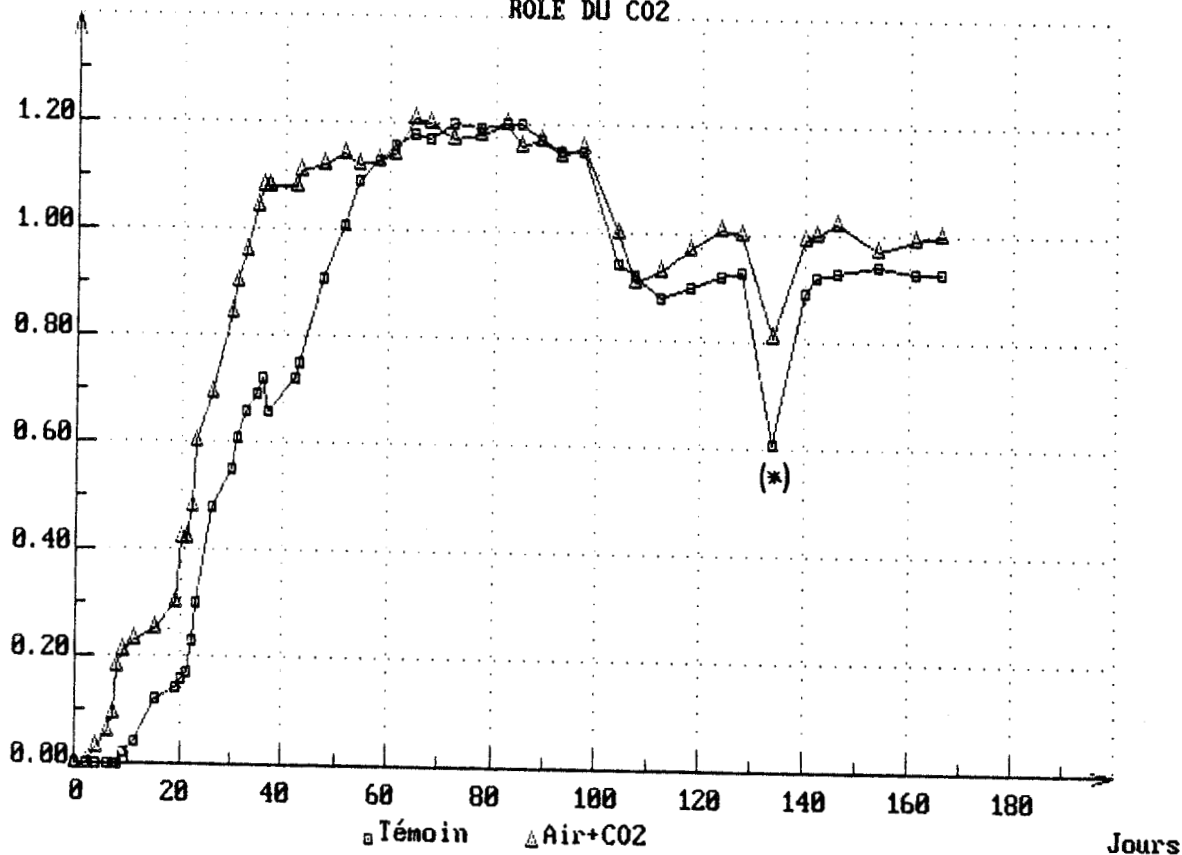
II-3-a But

Il faut tout d'abord rappeler que les échecs en cultures pures nitrifiantes en conditions strictement autotrophes peuvent s'expliquer par la carence en CO_2 disponible dans les milieux de croissance (89).

Lors d'un ensemencement ou d'un démarrage de réacteur nitrifiant, le milieu s'épuise rapidement en bicarbonates, consommés en partie par les bactéries nitrifiantes et dégagés sous forme de CO_2 .

Kg N-NH₄/m³.j

NITRIFICATION SUR PIERRE PONCE

ROLE DU CO₂

(*) Défaut d'aération pendant 24 heures

FIGURE 9 : INTERET DU CO₂ SUR UN DEMARRAGE DE NITRIFICATION

TABLEAU 13

	TEMOIN	AIR + CO ₂
NO₂⁻ (mg N/l) et (% N _{ox})		
5 j	3,4 (3 %)	90 (76 %)
60 j	0	79,9 (43 %)
160 j	11,0 (5 %)	77,5 (33 %)
ACTIVITE NITRIFIANTE (mg N _{ox} /g.ponce j)		
5 j	12	66
60 j	190	197
160 j	175	194
Calcium fixé (g Ca/g.ponce)		
5 j	0	0
60 j	0,13	0,05
160 j	1,55	0,08

En enrichissant l'air en CO_2 (20 %), on peut espérer un démarrage plus rapide de la nitrification en assurant les besoins des micro-organismes en CO_2 , notamment Nitrosomonas sp.. On étudie l'effet stimulant du gaz carbonique et ses conséquences à long terme sur la nitrification.

Les résultats obtenus sont confirmés à plusieurs reprises. On ne présente ici qu'une seule étude représentative.

II-3-b Résultats

L'expérience est réalisée en réacteurs à lit turbulent type 2, spécialement conçus pour optimiser les transferts gaz-liquide (Annexe 4).

L'appareil dopé en CO_2 est comparé à un témoin placé dans les mêmes conditions pendant les 6 mois d'expérience. Les résultats exprimés en charge azotée traitée sont repris sur la figure 9. Ils sont complétés par d'autres mesures (Tab. 13).

Le CO_2 permet de gagner 15 jours sur la montée en charge avec un démarrage très rapide de la nitrification et une flore nitrifiante plus active. En régime nominal, l'effet du CO_2 s'atténue et les performances des deux appareils sont alors identiques. Au 100ème jour, le changement de substrat, enrichi en chlorure d'ammonium, entraîne une dégradation des résultats, accompagnée d'une chute des rendements d'oxydation de l'azote, surtout sur le témoin. Des analyses de gaz à différents pourcentages de CO_2 dans l'air montrent qu'une fraction de 20 % de CO_2 constitue un optimum en régime nominal des appareils, la dissolution du CO_2 étant quasi totale.

II-3-c Commentaires

Il faut signaler que la montée en charge sur les deux réacteurs dure entre 40 et 60 jours, temps relativement long expliqué par la faible quantité d'inoculum de départ.

La disponibilité du CO_2 dans le milieu favorise surtout la nitrification, avec une transformation quasi totale de l'ammoniaque en nitrites. La conversion en nitrates est incomplète et la fuite en nitrites dans l'effluent est permanente. Le CO_2 joue également le rôle de régulateur de pH. La nitrification provoque une acidification du milieu, masquée par les effets de l'aération intense du milieu. Globalement, le pH au sein du réacteur est alcalin et peut dépasser 8,5. Les bactéries nitrifiantes sont très sensibles au pH (7) et le CO_2 acidifiant permet alors de stabiliser l'équilibre calco-carbonique; le pH se stabilise à 7,5 - 8,0. Ceci a pour conséquence de maintenir le carbone minéral sous forme dissoute et d'éviter l'entartrage de la pierre ponce. Enfin, à partir du 100ème jour, le rapport T.A.C./Azote du substrat passe de 1,5 à 1,0 °f/mg N. La disponibilité en carbone minéral est meilleure sur le réacteur dopé en CO_2 , ce qui se traduit par une charge traitée supérieure et stable dans le temps.

III - FACTEURS LIES AU FONCTIONNEMENT DU DIGESTEUR ANAEROBIE DE THUMERIES

III-1 Introduction

Le fonctionnement du digesteur en flux descendant entraîne des relargages de boues méthanigènes. D'autre part, la concentration en carbone organique résiduel de l'effluent méthanisé peut augmenter pour deux raisons principales ; une perturbation biologique du digesteur (baisse de température, changement de flux) ou une application trop importante de pollution organique (débit, concentration). Ces facteurs augmentent les besoins en oxygène au cours du post-traitement. Ils atteignent un seuil critique qui conduit à l'inhibition de la nitrification.

L'arrêt accidentel du digesteur au cours de la campagne conduit à l'augmentation rapide des concentrations en azote du milieu. Les répercussions sur la nitrification sont minimales dans la mesure où le post-traitement sera également mis à l'arrêt. La reprise de la nitrification à des concentrations plus élevées en azote nécessite alors l'application d'un débit d'alimentation plus faible.

III-2 Application d'une charge organique limite

II-2-a But

Le carbone organique total, composé essentiellement d'Acides Gras Volatils, constitue un substrat potentiel pour une flore hétérotrophe à croissance rapide.

Cette flore est en compétition favorable avec les bactéries nitrifiantes autotrophes à croissance lente. On peut rapidement se trouver en conditions d'oxygène limitant et aboutir à une asphyxie difficilement réversible des germes nitrifiants. Le phénomène est bien connu en boues activées; il l'est moins en cultures fixées et demande un approfondissement.

III-2-b Résultats

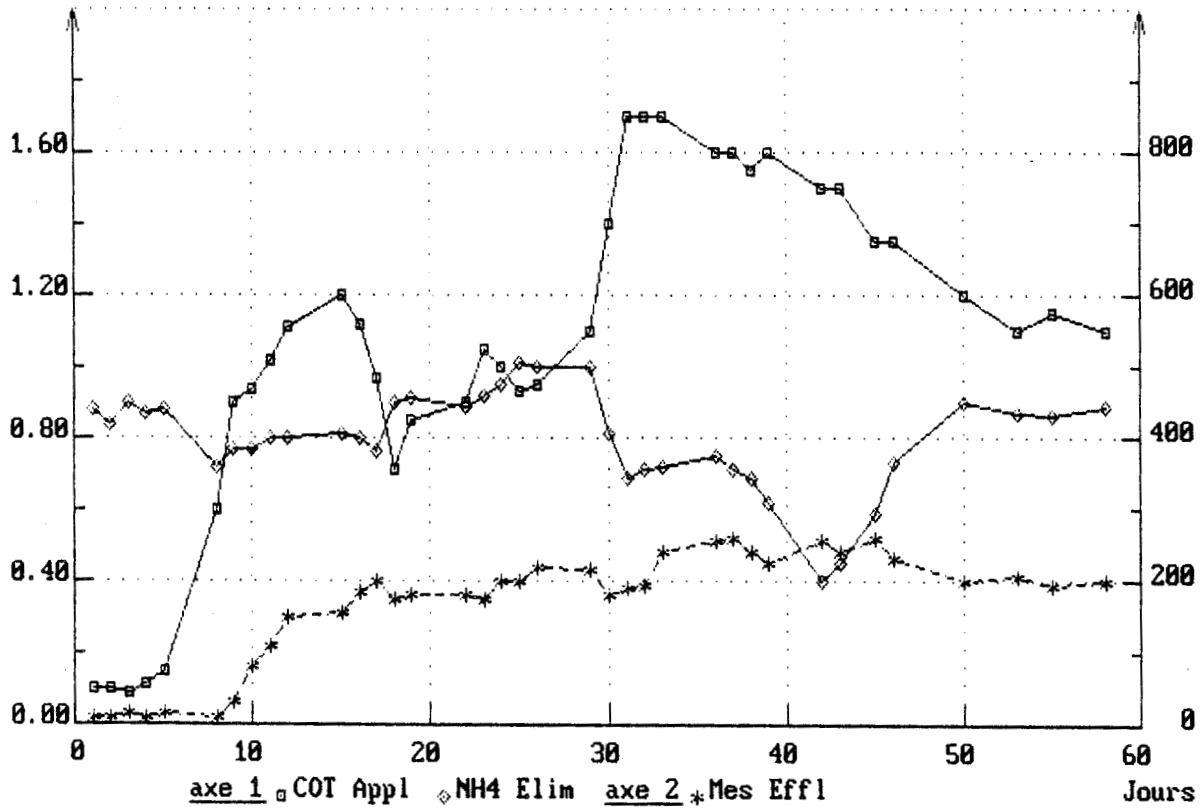
L'expérience est réalisée à 20°C à lit turbulent type 3 (Annexe 4). La montée en charge organique est faite par ajouts progressifs d'A.G.V. (*) en mélange dans l'effluent. Au départ, le réacteur nitrifie à pleine charge (0,84 kg N/m³.j.). Le temps de séjour hydraulique est stabilisé à 6 heures.

(*) Composition de mélange d'A.G.V. : 44 % Acétate, 38 % Propionate, 18 % Butyrate.

Kg N/m³.j
Kg C/m³.j

NITRIFICATION SUR PIERRE PONCE INFLUENCE DU COT

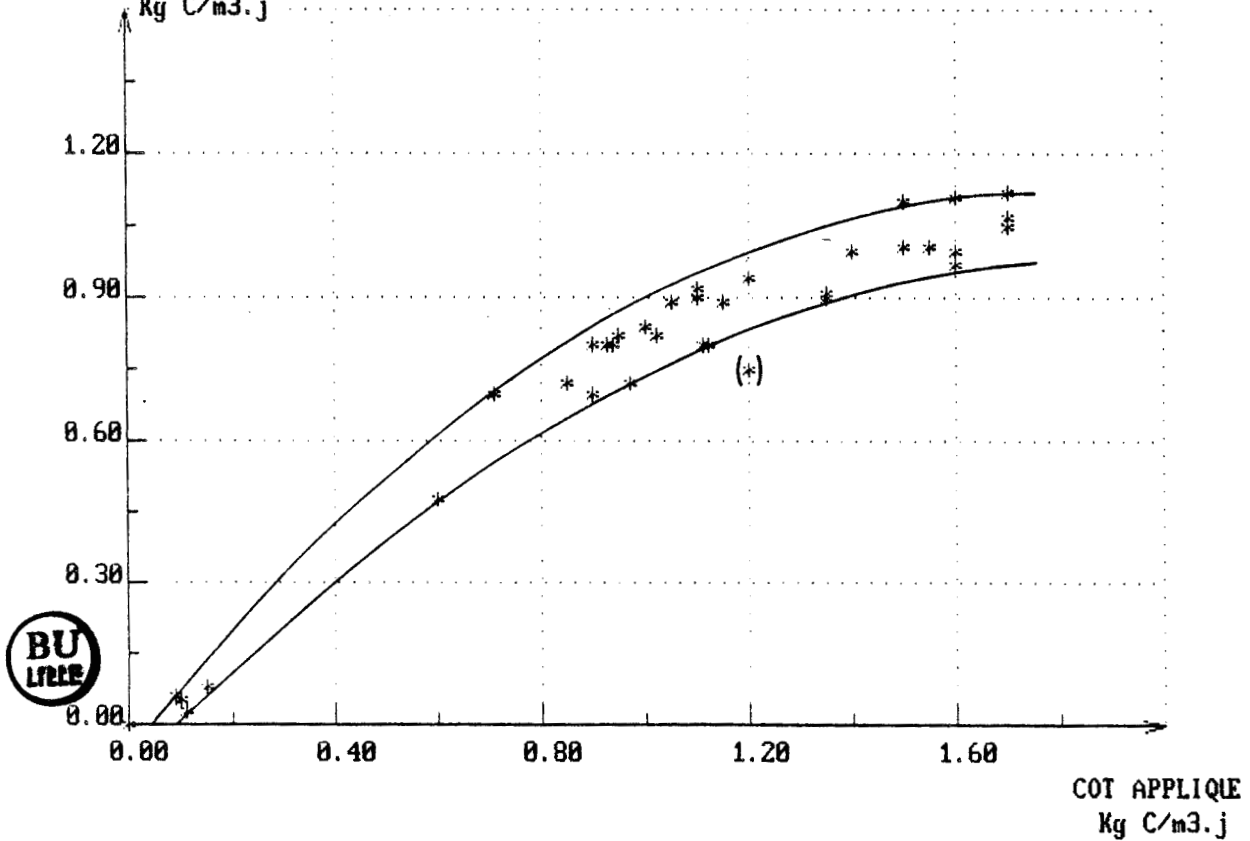
mg/l



NITRIFICATION SUR PIERRE PONCE INFLUENCE DU COT

COT TRAITE

Kg C/m³.j



FIGURES 10 ET 11

Les résultats sont illustrés par les figures 10 et 11. Dans les conditions de l'expérience, la nitrification est affectée pour une charge organique appliquée de 1,4 kg C/m³.j (jour 30). La charge organique traitée atteint alors une limite (Fig. 11). On note l'apparition de nitrites dans l'effluent. Le taux d'oxygène dissous qui était de 6,0 mg O/l en début d'expérience est alors de 0,8 mg O/l au sein du réacteur. On constate la prolifération d'une flore diffuse, filamenteuse, qui se maintient en suspension dans le milieu. Cette biomasse apparaît dès l'application de charge organique et s'évacue dans l'effluent. Son activité nitrifiante est mesurée, proche de zéro.

III-2-c Commentaires

La pollution organique appliquée est consommatrice prioritaire d'oxygène. Ce dernier devient facteur limitant, dans un premier temps pour la nitrification, puis, dans un deuxième temps, pour le traitement de la pollution carbonée. L'apparition de nitrites dans l'effluent témoigne de l'insuffisance de l'aération ; la nitrification est inhibée par manque d'oxygène au profit d'une légère dénitrification.

Le seuil de tolérance des bactéries nitrifiantes peut varier d'une expérience à l'autre, selon l'efficacité du transfert d'oxygène et du temps de séjour hydraulique dans le réacteur. Quoi qu'il en soit, on constate toujours la production de boues hétérotrophes interstitielles. Cette biomasse monopolise l'oxygène du milieu mais n'affecte pas la flore nitrifiante fixée. Le retour à des conditions normales d'alimentation d'un réacteur entraîne un rétablissement rapide de la nitrification.

III-3 AUGMENTATION BRUTALE DE LA CHARGE ORGANIQUE APPLIQUEE

III-3-a But

Cet essai complète le précédent et a pour but d'évaluer le temps de retour à une nitrification normale à la suite d'un apport brutal de pollution organique dissoute.

III-3-b Résultats

L'expérience est faite dans les mêmes conditions que la précédente. On applique des augmentations importantes de charge organique par périodes de 24 heures en tenant compte des résultats précédents. On rétablit ensuite des conditions d'alimentation normales pendant une semaine. Le temps de séjour hydraulique est de 6 heures. Les principales mesures sont regroupées dans le tableau 14

TABLEAU 14 : INFLUENCE DE LA CHARGE ORGANIQUE APPLIQUEE

Charge appliquée (kg/C.m ³ .j)	Activité nitrifiante (mg Nox/g.ponce.j)				Temps de retour 100 % nitrification	Oxygène dissous réacteur
	T	8 h	24 h	72 h		
1,00	117,0	106,2	109,7	120,0	Pas de perturbation	2,40
1,45	120,4	110,9	118,4	112,7	24 h	1,05
1,73	111,3	100,7	107,2	105,4	24 h	0,45
2,06	109,9	89,8	112,3	109,7	48 h	ε

Les tests d'activité sont réalisés sur 3 prélèvements de pierre ponce comparés à un témoin (T). L'activité réelle du matériau baisse légèrement durant l'application de la pollution carbonée. Dès le retour en conditions normales, le rétablissement de la nitrification est très rapide.

On note la forte production de nitrites pour des charges organiques appliquées de 1,73 à 2,06 kg C/m³.j. Dans les deux situations, on constate une perte d'azote dans le bilan entrée-sortie. La quantité d'oxygène dissous disponible est très faible.

III-3-c Commentaires

L'apport brutal de pollution carbonée dans un milieu nitrifiant entraîne une consommation d'oxygène supplémentaire. L'oxygène peut être déficitaire, dû à un système de transfert qui limite sa disponibilité. On assiste à une perte d'azote dans le circuit qui peut être expliquée par plusieurs phénomènes (38, 40) :

- dénitrification dans un milieu riche en matière carbonée et en phase d'anoxie,
- fuite sous forme N₂O et NO produits par Nitrosomonas sp
- formation de biomasse hétérotrophe diffuse.

Ces conséquences sont atténuées par l'effet de dilution rapide dès le retour à une alimentation normale du réacteur. Elles peuvent pratiquement disparaître si on met ce réacteur en circuit fermé durant quelques heures.

IV - CONCLUSIONS

Les travaux réalisés sur pilotes de laboratoire simulent des situations qui peuvent se produire dans les conditions industrielles. Les résultats bruts obtenus ne sont cependant pas transposables directement, certains paramètres étant différents : température, transfert d'oxygène... Ces expériences ont pour intérêt d'essayer de comprendre les mécanismes de la nitrification après traitement anaérobie et permettre ainsi :

- de déconseiller une décarbonatation préalable de l'eau ;
- de préconiser certaines interventions (dopage en CO₂ au démarrage),
- de réagir en cas de perturbation de la filière de traitement.

B - OPTIMISATION DES CONDITIONS DE CONSERVATION ET DE REPRISE DE L'ACTIVITE NITRIFIANTE

I - ORIENTATION DES RECHERCHES

I-1 Présentation

Les quelques informations bibliographiques (1ère Partie - IV-) montrent la fragilité des germes nitrifiants en conditions de jeûne, surtout lorsqu'ils sont étudiés en culture pure.

La longue durée de l'intercampagne sucrière incite à trouver des conditions assez simples de conservation de la flore nitrifiante. Le but est de minimiser le stress (température, pH, pression osmotique, substrat) appliqué aux micro-organismes et de les placer dans un état de dormance, avec un taux de métabolisme endogène le plus faible possible. On cherche à stocker les supports ensemencés in situ et à les réactiver ensuite le plus rapidement possible en minimisant le temps de latence des cultures et en favorisant leur croissance.

Les travaux sont réalisés à différentes échelles, sur schiste et sur pierre ponce. Ils sont présentés dans leur ordre chronologique d'étude.

I-2 Etude d'approche sur schiste

Cette première étude est réalisée avant l'expérimentation sur pilotes de THUMERIES.

NITRIFICATION SUR SCHISTE
ESSAIS STOCKAGE

mgNox/mgMvs. h

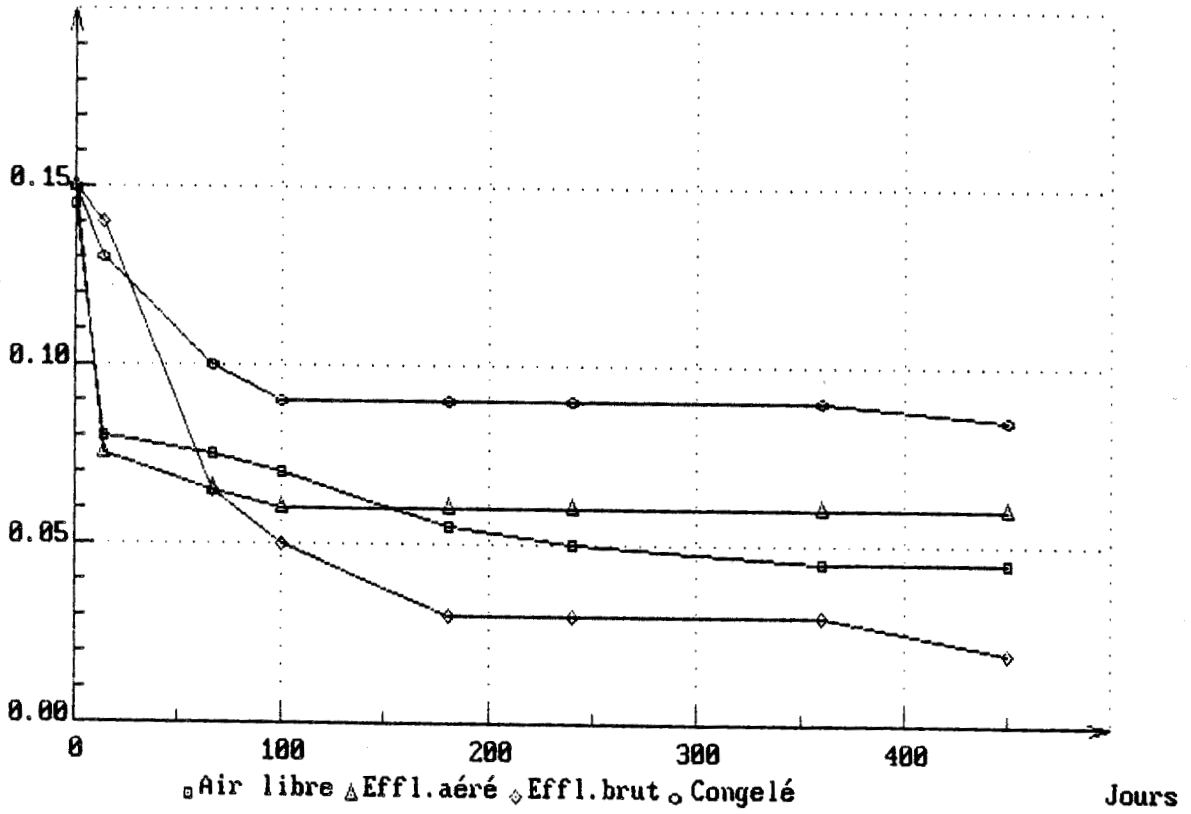


FIGURE 12 : ACTIVITE NITRIFIANTE RESIDUELLE DES
MATIERES FIXEES SUR SCHISTE



I-2-a Protocoles de conservation

Quatre méthodes de conservation sont définies et testées en parallèle sur du schiste fonctionnant à pleine charge (1,1 kg N/m³.j) sur effluent méthanisé.

- . Congélation rapide du matériau à - 18°C dans une solution cryoprotectrice de glycérol à 10 % (V/V) à base d'effluent nitrifié (87). (Congelé sur figure 12)

- . Egouttage et déshydratation rapide du matériau, puis stockage à l'air ambiant. (Air libre)

- . Rinçage et immersion du matériau dans l'effluent nitrifié. (Effl. brut)

- . Rinçage et immersion du matériau dans l'effluent nitrifié, en maintenant une oxygénation permanente du milieu par bullage d'air. (Effl. aéré)

Des tests d'activité nitrifiante décrits en Annexe 2 sont réalisés sur 450 jours de stockage.

I-2-b Résultats

On constate une perte rapide de l'activité nitrifiante (Fig. 12) dans les quinze premiers jours de jeûne; elle s'atténue ensuite pour se stabiliser après trois mois de stockage. Les cellules les moins affectées sont les bactéries congelées. Le matériau asséché perd régulièrement de l'activité ; parallèlement, il continue à se déshydrater. Les humidités réelles faites sur le support passent de 12,5 % en début d'expérience, à 7,5 % au 240ème jour et à 4,5 % au 360ème jour de stockage. Dans les conditions d'immersion sans aération, la perte d'activité est également importante. On constate une dénitrification quasi immédiate et un décrochage de la biomasse fixée. Le matériau immergé et aéré en permanence présente une bonne résistance face aux conditions de jeûne.

I-2-c- Commentaires

Le principal enseignement de ces essais est la tolérance à des arrêts prolongés des bactéries nitrifiantes fixées en cultures mixtes. La présence de surfaces et de liaisons fixatrices peut favoriser cette résistance. Les bactéries sont altérées, mais conservent leurs propriétés d'oxydation au cours du stockage.

La congélation permet de garder une activité satisfaisante, mais reste une technique de laboratoire. Deux techniques sont à retenir :

- . l'assèchement du matériau, en contrôlant son humidité qui semble conditionner la conservation,

- . l'immersion du matériau, avec un milieu de conservation approprié.

I-3 Etude de quelques paramètres

I-3-a Température

Différents essais de conservation réalisés à température constante (20°C, 4°C) ne montrent pas de différence significative. Au contraire, les fluctuations de température sur un même essai peuvent avoir un effet bactéricide, surtout lorsque cette température descend au dessous de 0°C. On crée des lésions cellulaires irréversibles.

Les essais réalisés à THUMERIES et au laboratoire en conditions extérieures en sont la preuve.

La température au sein d'un réacteur industriel varie lentement. Selon le type de conservation (aérée ou immergée), le paramètre n'a pas la même importance. Les fluctuations de température sont plus importantes pour les bactéries en contact avec l'air ambiant et risquent de compromettre en partie leur reprise d'activité.

I-3-b Etat physiologique des bactéries

On apprend, dans la littérature (103) et au cours d'essais réalisés au laboratoire, que la survie des bactéries est liée à leur état physiologique au moment de l'arrêt. L'essai est réalisé sur pierre ponce conservée par assèchement. Il apparaît (Tabl. 15) que les bactéries en fin de phase exponentielle ou en début de phase stationnaire s'adaptent mieux aux conditions de stress provoquées par le jeûne. On procède à une mise en circuit fermé du réacteur 48 heures avant l'arrêt total; ce qui correspond au temps nécessaire à la disparition totale de l'azote ammoniacal du milieu.

Les conditions de substrat limitant sont alors établies progressivement et permettent un conditionnement de l'écosystème et notamment des germes à croissance lente.

TABLEAU 15 : INFLUENCE DE L'ETAT PHYSIOLOGIQUE DES BACTERIES NITRIFIANTES SUR LEUR TAUX DE SURVIE (%)

(DUREE DE CONSERVATION)	(PHASE DE CROISSANCE)	(DEBUT PHASE STATIONNAIRE)	(FIN PHASE STATIONNAIRE)
(24 h)	(85 %)	(85 %)	(80 %)
(5 j)	(60 %)	(64 %)	(60 %)
(15 j)	(41 %)	(47 %)	(45 %)
(30 j)	(38 %)	(38 %)	(40 %)
(60 j)	(30 %)	(36 %)	(35 %)
(120 j)	(22 %)	(35 %)	(32 %)

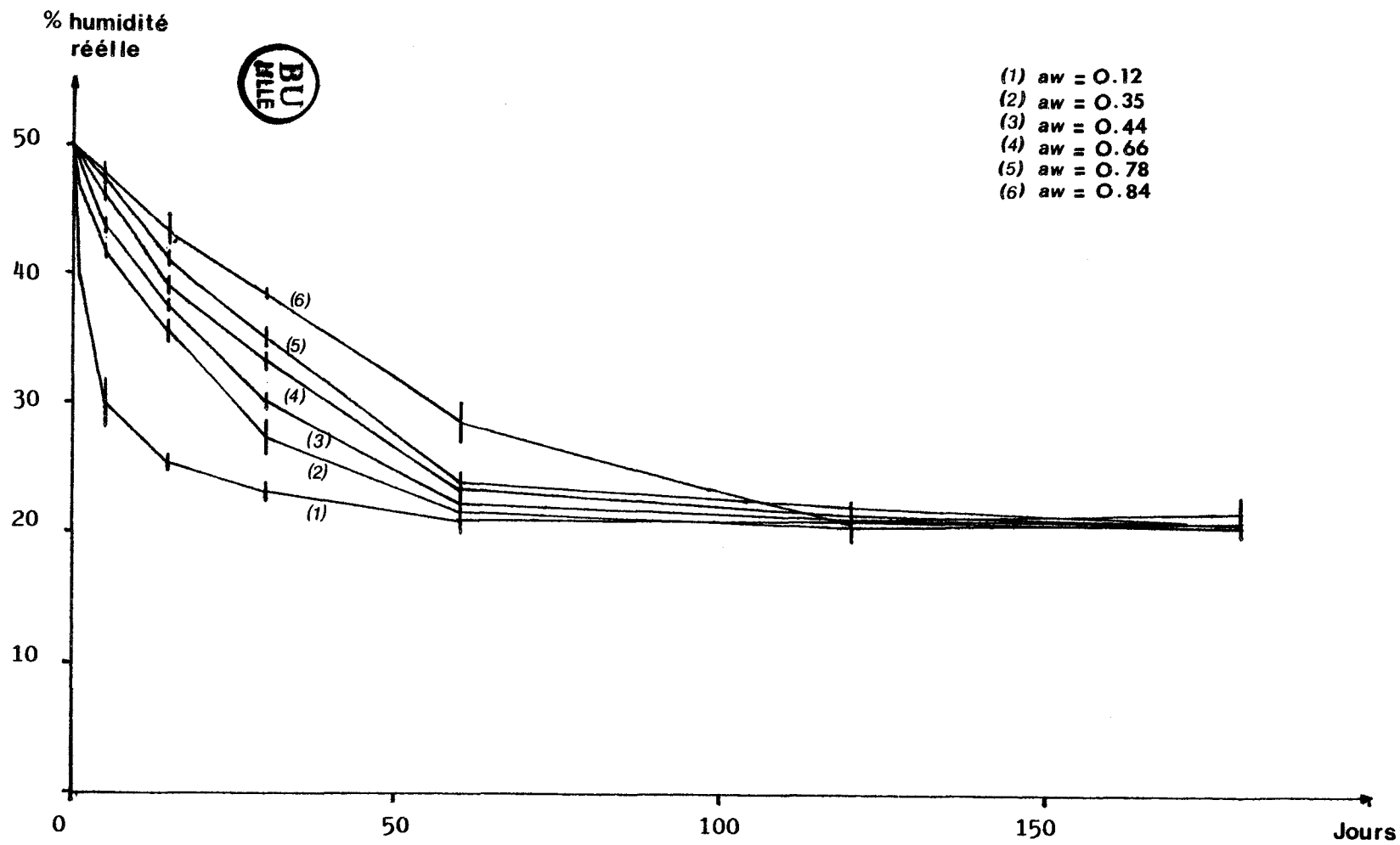


FIGURE 13 : PERTE EN EAU DE LA PIERRE PONCE AU COURS DE LA CONSERVATION

Un état physiologique favorable au moment de la mise en conservation a une double influence : sur la survie des bactéries, sur leur vitesse de reprise. Les deux facteurs sont corrélés.

II - CONSERVATION PAR DESHYDRATATION

II-1 Influence de l'humidité sur la conservation

II-1-a But

L'assèchement affecte l'ensemble de la flore fixée à des degrés différents. La tolérance à la dessiccation définit un seuil de siccité critique en deçà duquel on provoque des lésions irréversibles sur les bactéries (membranes, ADN) en modifiant leur teneur intracellulaire en eau (6,64,88,103). La création d'un environnement protecteur demande la détermination de l'humidité relative la mieux supportée par les bactéries nitrifiantes.

II-1-b Protocole

Différentes atmosphères sont créées et contrôlées en dessiccateurs à l'aide de solutés non toxiques (Annexe 3). La pierre ponceensemencée et homogénéisée est dispersée en monocouche dans des coupelles. Celles-ci sont réparties dans chacun des dessiccateurs dont l'atmosphère est stabilisée pendant 3 jours. La pierre ponce est prélevée sur un réacteur fonctionnant à plein régime et placé en circuit fermé 48 heures avant l'arrêt total. Un essai est réalisé en conditions extérieures. On suit la réactivité du matériau ou des bactéries qui y sont fixées par différentes mesures décrites avec précision en Annexe 2 (tests d'activité résiduelle, comptages de bactéries revivifiables).

On relève parallèlement l'humidité réelle des supports conservés. Enfin, on réalise quelques mesures complémentaires destinées à ajuster les résultats (activité résiduelle du matériau décapé, témoins systématiques).

II-1-c Résultats

L'ensemble des mesures est repris dans les tableaux 16 et 17 et sur les figures 13 et 14. On constate une baisse rapide et générale de l'activité nitrifiante dans tous les milieux, avec toutefois une baisse plus modérée sur les matériaux conservés à aw 0,66.

TABLEAU 16 :

**ACTIVITE NITRIFIANTE RESIDUELLE (% ACTIVITE INITIALE - A. N. R.)
ET TEMPS DE REGENERATION (h/g.PIERRE PONCE - T.R.)**

Durée de conservation a.w.	24 heures		5 jours		15 jours		30 jours		60 jours		120 jours		180 jours	
	ANR	TR	ANR	TR	ANR	TR	ANR	TR	ANR	TR	ANR	TR	ANR	TR
0,12	56		30		21	150	14	170	13	170	12	200	10	200
0,35	59		29		26	125	22	125	20	145	20	150	21	165
0,44	71		49		38	80	34	100	32	105	23	125	20	130
0,66	86	< 48 h	78	< 72 h	70	70	59	100	43	100	32	110	29	100
0,78	66		57		51	80	36	100	28	100	23	125	22	125
0,84	64		36		23	100	20	125	18	150	19	150	19	165
1 (1)	79		50		45	30	34	50	33	50	31	65	32	70
1 (2)	79		74		62	30	50	50	42	50	39	60	40	60
Atmosphère extérieure	24		11		10	170	4	240	4	>270	3	?	ε	-

TABLEAU 17 :

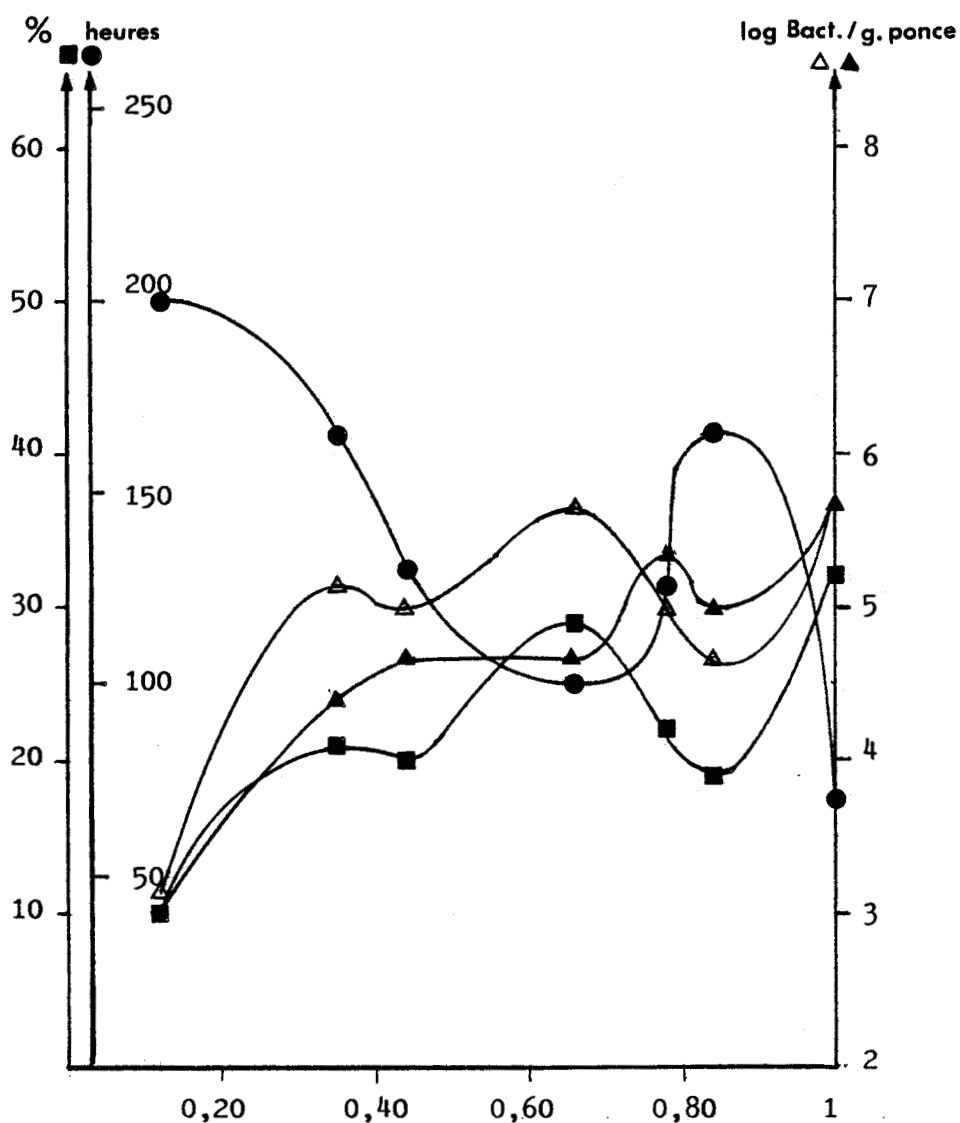
**NUMERATIONS NITROSOMONAS SP ET NITROBACTER SP
EN Log₁₀ BACTERIE / g.PIERRE PONCE**

Durée de conservation a.w.	24 heures		5 jours		15 jours		30 jours		60 jours		120 jours		180 jours	
	Log Ns	Log Nb	Log Ns	Log Nb	Log Ns	Log Nb	Log Ns	Log Nb	Log Ns	Log Nb	Log Ns	Log Nb	Log Ns	Log Nb
0,12	8,53	8,00	7,15	6,78	5,20	5,70	4,78	5,41	3,66	4,66	3,66	4,00	3,15	3,00
0,35	8,78	8,41	7,41	7,34	6,66	6,15	6,66	5,66	5,66	5,00	5,00	4,66	5,15	4,41
0,44	8,66	8,41	8,20	7,66	7,78	6,66	6,20	5,78	5,66	5,41	5,00	4,78	5,00	4,66
0,66	9,66	9,41	8,78	9,66	7,66	7,66	6,78	6,66	6,41	6,66	5,66	5,00	5,66	4,66
0,78	8,66	8,66	8,41	8,15	7,66	7,66	6,41	6,15	5,00	6,15	5,15	5,00	5,00	5,34
0,84	9,20	8,78	8,41	8,34	7,66	7,78	6,66	6,66	5,15	5,66	5,00	5,15	4,66	5,00
1 (1)	8,78	8,66	7,78	7,66	7,20	6,66	6,20	6,00	5,66	5,78	6,00	5,00	5,66	5,66
1 (2)	9,66	9,20	9,15	8,66	8,20	8,20	7,20	6,66	6,20	6,20	6,00	5,66	6,00	6,00
Atmosphère extérieure	8,66	7,66	6,78	6,19	4,00	4,66	3,20	3,34	3,20	3,20	2,20	?	Non déterminé	

(1) Immersion dans de l'eau méthanisée

(2) Immersion dans de l'eau méthanisée et sous atmosphère d'oxygène





- Activité Nitrifiante Résiduelle
- Temps de Régénération
- △ *Nitrosomonas sp.* revivifiables
- ▲ *Nitrobacter sp.* revivifiables

FIGURE 14 : MESURES A 180 JOURS DE DESSICATION

Les temps de régénération suivent la même allure générale. Le nombre de bactéries nitrifiantes revivifiables évolue beaucoup plus lentement et de façon régulière de même que l'humidité réelle de la pierre ponce. Nitrobacter sp résiste mieux à la dessiccation et on assiste à une inversion de la dominance des deux flores après 60 jours de stockage.

Certaines différences, qui n'apparaissent pas dans le tableau 16, sont notées au cours des tests d'activité nitrifiante. A partir du 60^{ème} jour de conservation, les tests révèlent la présence de nitrites intermédiaires, totalement oxydés en fin de Batch. Cette remarque ne concerne pas les échantillons immergés ($a_w = 1$).

II-1-d Commentaires

Cette expérience montre l'importance de l'humidité relative du milieu sur la conservation de la capacité nitrifiante d'un matériau ensemencé. Elle montre également l'importance de l'humidité réelle du matériau qui influence, à long terme, directement le taux de survie des bactéries. Les micro-organismes perdent une partie de leur eau liée, ce qui les conduit à la létalité.

Les numérations sont réalisées sur les bactéries vivantes décrochées de leur support (Annexe 2). L'évolution des résultats sont uniquement dus à la mortalité des micro-organismes, le décrochage restant efficace quelles que soient les humidités du milieu et du matériau. Ceci est confirmé par des tests nitrifiants faits sur les supports décapés incubés durant 21 jours; les tests sont tous négatifs. La mortalité conditionne la reprise de la nitrification. Afin de recoloniser le matériau, on veillera à favoriser la croissance des bactéries nitrifiantes au redémarrage d'une culture.

Le matériau, conservé en monocouche, présente une surface d'échange très importante avec l'atmosphère. Les effets de déshydratation seraient vraisemblablement plus lents pour un support stocké en vrac dans un réacteur. On risque alors de créer des zones d'anoxie et d'anaérobiose qui sont néfastes. Les risques sont d'autant plus élevés que le matériau est fin.

II-2 Application à l'échelle pilote

II-2-a Protocole et évaluation de la conservation

Les essais sont réalisés à l'issue de l'expérimentation de THUMERIES, sur la colonne de 20 litres garnie de schiste ensemencé. Le garnissage est égoutté in situ après 48 heures de mise en circuit fermé. Le matériau est ensuite transféré au laboratoire dans une colonne de plexiglas dans laquelle on insuffle de l'air comprimé par la base pour accélérer la dessiccation. On stoppe l'aération forcée lorsque l'humidité réelle du matériau atteint 12,7 %. Cette valeur est alors maintenue à $12,5 \pm 0,5$ % par insufflation d'air humide. Le matériau est brassé afin d'éviter la formation de gradients d'humidité. L'humidité relative et la température de stockage sont celles du laboratoire.

Kg N-NH₄/m³.j

NITRIFICATION SUR SCHISTE
STOCKAGE A SEC

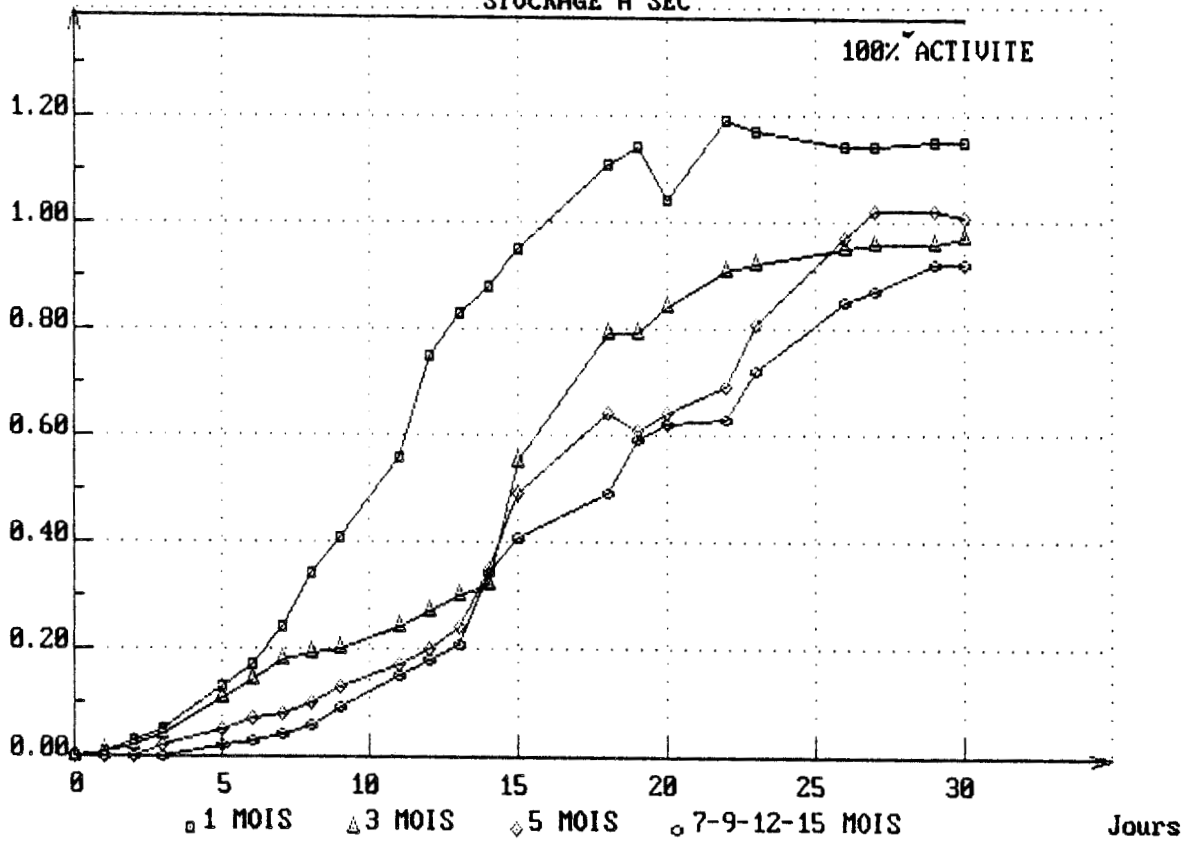


FIGURE 15 : REPRISE DE LA NITRIFICATION SUR SCHISTE APRES
DIFFERENTES PERIODES DE CONSERVATION A SEC



On reprend régulièrement 500 ml de matériau en réacteur Biofiltre (Annexe 4) sur lequel on étudie l'allure de la montée en charge ammoniacale et la charge maximale traitée. Parallèlement, on réalise un test d'activité nitrifiante sur le schiste conservé. On fait de même à l'arrêt du réacteur après la reprise.

II-2-b Résultats

La figure 15 et le tableau 18 illustrent l'ensemble des résultats obtenus.

TABEAU 18 : MESURES SUR SCHISTE CONSERVE A SEC EN COLONNE DE 20 l.

(Durée de (conservation (% M.v.s. sur schiste		Activité Nitrifiante : (mg Nox/mg (M.v.s.).h)		Humidité schiste (%)
		: Avant (*)	: Après	: Avant	: Après	
(t ₀	: 3,6	: (3,6)	: 0,220	: (0,220)	: 12,7
(13 j.	: 3,5	:	: 0,106	:	: 12,4
(1 mois	: 3,7	: 3,8	: 0,079	: 0,194	: 12,0
(2 mois	: 3,5	:	: 0,067	:	: 12,9
(3 mois	: 3,6	: 3,8	: 0,065	: 0,177	: 12,0
(5 mois	: 3,4	: 3,8	: 0,044	: 0,168	: 12,0
(7 mois	: 3,5	: 3,7	: 0,049	: 0,163	: 12,4
(9 mois	: 3,6	: 3,7	: 0,041	: 0,160	: 12,5
(12 mois	: 3,5	: 3,8	: 0,040	: 0,158	: 14,1(**)
(15 mois	: 3,6	: 3,7	: 0,042	: 0,162	: 12,5

(*) Avant : Avant reprise
Après : Après reprise (48 heures circuit fermé)

(**) Humidité relative de l'air très élevée



Les courbes obtenues après 7, 9, 12 et 15 mois de stockage sont similaires et représentées par leur moyenne. L'allure générale des reprises d'activité nitrifiante est semblable quelle que soit la durée de conservation. La perte d'activité se stabilise après 3 mois de stockage. On remarque cependant que le temps de latence observé augmente avec le temps de stockage. De même, la charge azotée traitée par le réacteur diminue. Dans tous les cas, les performances maximales sont obtenues avant 30 jours de reprise.

Le tableau 18 montre que la biomasse fixée évolue très peu durant la conservation et à l'issue des périodes de reprise de 30 jours. On remarque également que l'activité résiduelle du matériau conservé suit la même allure que lors des essais décrits auparavant (Fig. 12) : chute rapide dans les 15 premiers jours de conservation, puis stabilisation après 3 mois de conservation.

On constate, pour terminer, que la réactivité du matériau se récupère partiellement au cours des 30 jours de reprise, sans toutefois atteindre l'activité initiale de 0,220 mg Nox/mg (M.v.s.).h.

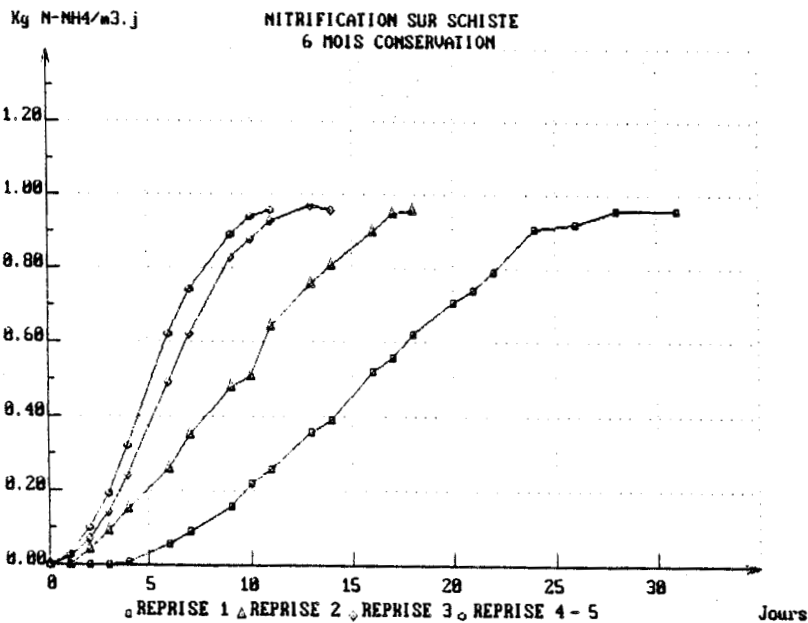
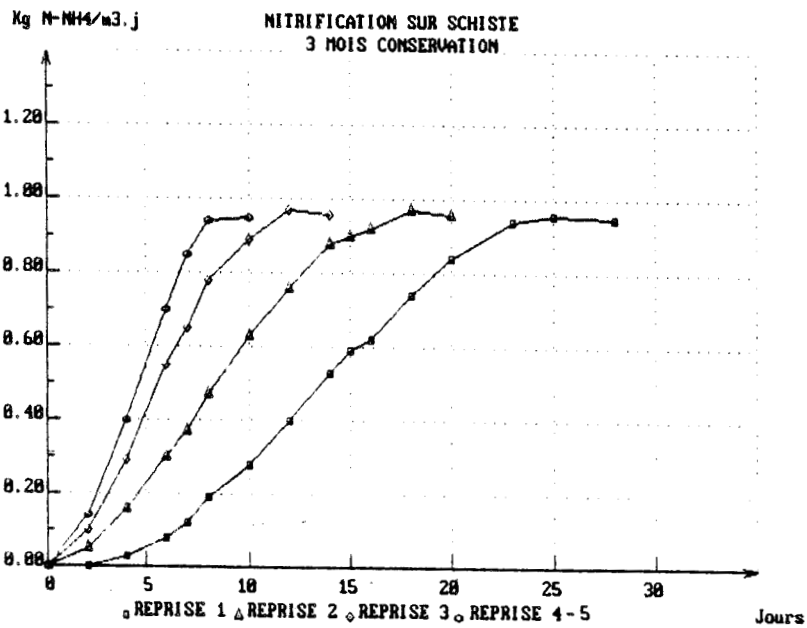
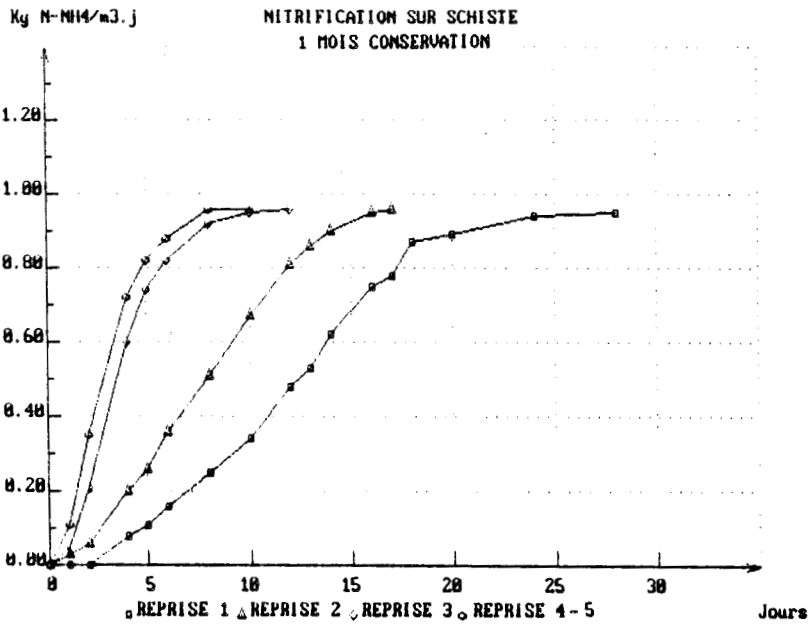
II-2-c Commentaires

La conservation par séchage contrôlé de la flore nitrifiante fixée est fiable à long terme, la perte d'activité du matériau est stabilisée après 3 mois de conservation. L'augmentation du temps de latence au redémarrage n'affecte pas la cinétique de montée en charge. Toutefois, le matériau ne retrouve pas son activité initiale. Les mesures de biomasse fixée (Tab. 18) montrent que cette perte n'est pas due au décrochage de bactéries. Ceci est d'ailleurs vérifié sur les réacteurs au début de la reprise par des mesures de Matières en suspension. La déshydratation provoque un assèchement des cellules périphériques qui créent un environnement protecteur pour les couches inférieures, ce qui rend difficile l'accrochage de nouvelles bactéries. La mesure des M.v.s. prend en compte les bactéries mortes. Ceci est confirmé par les comptages de bactéries nitrifiantes revivifiables réalisés sur pierre ponce; ils montrent l'extinction progressive des bactéries fixées dans le temps.

II-3 Amélioration de la technique - Application d'un facteur de correction

II-3-a But

Le stress provoqué par l'arrêt d'un réacteur exerce une pression de sélection des micro-organismes. Seules les bactéries résistantes survivent et on émet l'hypothèse qu'après plusieurs cycles d'arrêts et de reprises, les temps de latence et le retour aux performances initiales d'un réacteur seront de plus en plus rapides. La biomasse est de plus en plus résistante, atteignant toutefois un maximum lié à la biologie des bactéries. Le but est d'essayer une technique qui consiste à sélectionner le plus rapidement possible les germes résistants.



**FIGURE 16 : REPRISES SUCCESSIVES DE LA NITRIFICATION
SUR SCHISTE APRES DIFFERENTES PERIODES DE STOCKAGE
A SEC**

II-3-b Mode opératoire

Le fait de garder le matériau in situ simplifie considérablement la mise en oeuvre du procédé et les manipulations sont réduites au maximum.

L'essai est toujours réalisé sur le schiste de THUMERIES transféré au laboratoire. On reprend 500 ml de matériau en réacteur Biofiltre (Annexe 4) après 1 mois, 3 mois et 6 mois de conservation. On effectue, pour chacun de ces prélèvements, une succession de 5 reprises entrecoupées par des arrêts de 15 jours. Cette durée est fixée en fonction de deux critères :

- pour des périodes inférieures à 15 jours, les bactéries ne se trouvent pas encore à l'équilibre, aboutissant à leur protection vis à vis des conditions de substrat limitant.

- pour des périodes supérieures à 15 jours, la perte d'activité et la mortalité sont importantes et ne permettent plus de reprises de courte durée; le temps de latence des cultures est trop long.

La progression de la conservation est évaluée par la vitesse à laquelle les réacteurs retrouvent leur charge traitée initiale. Dès que celle-ci est atteinte, les réacteurs sont mis en circuit fermé pendant 48 heures. On les place ensuite en phase d'arrêt. Les expériences durent entre 145 et 160 jours chacune.

II-3-c Résultats

Les résultats obtenus après 1 mois, 3 mois et 6 mois de conservation sont illustrés sur la figure 16. L'activité nitrifiante du matériau au cours des essais est reprise dans le tableau 19.

TABLEAU 19 : TESTS D'ACTIVITE SUR SCHISTE CONSERVE

Durée de conservation	Activité Nitrifiante (mg Nox/mg(M.v.s.).h)	
	Avant reprises	Après reprises
t_0	0,220	(0,220)
1 mois	0,079	0,201
3 mois	0,065	0,197
6 mois	0,047	0,195

On voit sur les courbes que le temps de latence, quelle que soit la durée de stockage initial tend à se réduire pour se stabiliser à 24 heures après 3 cycles d'arrêts et de reprises. La vitesse de retour à une charge traitée maximale augmente rapidement, pour atteindre une limite de 7-10 jours .

L'activité nitrifiante des bactéries fixées se stabilise à 0,200 mg Nox/mg (M.v.s.)h après les 5 reprises (Activité initiale : 0,220 mg Nox/mg (M.v.s.)h).

II-3-d Commentaires

Le gain de temps sur une reprise est considérable, soit 15 jours après 6 mois de conservation à sec. On atteint ce maximum après 3 cycles d'arrêts et de reprises ; les 4ème et 5ème cycles ne sont pas nécessaires, ce qui présente un intérêt sur la durée totale de la procédure. Les propriétés de résistance acquises par les bactéries transparaissent assez mal dans les mesures d'activité nitrifiante. Les réactivités sont calculées par rapport aux Matières volatiles fixées, mortes ou vivantes. On peut supposer que les bactéries nitrifiantes qui survivent sont en fait plus actives (94).

Il reste à confirmer que ces propriétés se maintiennent au cours d'un arrêt prolongé au terme des 3 cycles de reprise. Dans les conditions industrielles, se pose le problème de la température de conservation et de reprise de la nitrification. Des températures trop basses risquent en effet de bloquer, voire d'altérer la flore fixée (97).

III - CONSERVATION PAR IMMERSION

III-1 Influence du milieu de conservation

III-1-a But

Les bactéries nitrifiantes sont chimiolithotrophes. Deux hypothèses sont alors émises :

. Les bactéries utilisent le CO_2 dissous comme source exclusive de carbone. Les composés organiques simples constituent des réserves de CO_2 , qui est alors métabolisé par les bactéries nitrifiantes (27,59,89). L'immersion des germes en milieu organique constitue peut être un moyen de conservation à long terme, le CO_2 présent permettant un métabolisme ralenti.

. Les bactéries autotrophes sont sensibles à la présence de toute substance nutritive durant leur conservation (carbone organique, NH_4^+ , NO_2^- , NO_3^-). Ces produits peuvent entraîner le développement d'une flore annexe et modifier ainsi l'équilibre des populations dans le milieu. L'immersion des germes nitrifiants, après rinçage, en eau de forage constitue un milieu "neutre" qui peut être favorable à la conservation à long terme, à l'exemple de Rhizobium (29). Il convient de rappeler d'après BOYLEN et MULKS (18) que plus le taux de métabolisme endogène d'une cellule est faible, plus les réserves cytoplasmiques sont consommées lentement et plus le temps de survie est long. Cela permet une reprise rapide de l'activité quand les conditions sont à nouveau favorables.

TABLEAU 20 :

ACTIVITE NITRIFIANTE RESIDUELLE (% ACTIVITE INITIALE - A. N. R.)
 ET TEMPS DE REGENERATION (h/g. PIERRE PONCE - T. R.)

Durée de conservation Immersion	24 heures		5 jours		15 jours		30 jours		60 jours		120 jours		180 jours		
	ANR	TR	ANR	TR	ANR	TR	ANR	TR	ANR	TR	ANR	TR	ANR	TR	
Eau de forage	75		70		65	30	65	30	65	30	60	35	55	30	
Eau de forage (4°C)	76		75		60	35	60	40	57	45	55	50	55	55	
Eau méthanisée (1)															
Eau nitrifiée	72		60		56	35	51	45	49	45	40	60	35	70	
Eau nitrifiée (2)	Acétate	53		29		20	50	5	50	<5	100		ND ⁽⁵⁾	—	ND
	Propionate	43		19		17	45	10	50	8	70	5	120		ND
	Pyruvate	50	< 48 h	26	< 48 h	25	45	8	50	7	100	5	ND		ND
	Formiate	50		20		17	45	10	50	5	70		ND	—	ND
	Lactate	51		29		21	30	17	30	16	45	20	60	20	60
	Mélange AGV (3)	37		17		14	100	5	120	<5	145		ND	—	ND
Eau nitrifiée	Extrait de levure	35		15		14	70	5	100	<5	100		ND	—	ND
Eau décantée non méthanisée diluée 5 fois (4)	45		50		45	45	35	45	35	50	30	50	30	50	

TABLEAU 21 :

NUMERATIONS NITROSOMONAS SP ET NITROBACTER SP
 EN Log₁₀ BACTERIE / g. PIERRE PONCE

Temps de conservation Immersion	24 heures		5 jours		15 jours		30 jours		60 jours		120 jours		180 jours		
	Log Ns	Log Nb	Log Ns	Log Nb	Log Ns	Log Nb	Log Ns	Log Nb	Log Ns	Log Nb	Log Ns	Log Nb	Log Ns	Log Nb	
Eau de forage	9,66	9,66	8,78	8,15	7,15	6,66	6,78	6,66	6,66	6,66	6,60	6,66	6,20	6,00	
Eau de forage (4°C)	9,66	9,66	9,00	8,66	7,66	7,00	6,66	7,00	6,00	6,00	6,00	6,00	5,66	6,00	
Eau nitrifiée	8,66	9,20	8,41	8,00	6,66	6,34	6,20	6,20	6,20	6,20	ND	ND	ND	ND	
Eau nitrifiée (2)	Acétate	8,66	8,00	7,41	7,66	7,00	7,00	6,20	6,41	6,00	6,00	ND	ND	ND	ND
	Propionate	8,53	8,00	7,78	7,66	7,15	7,00	6,20	6,20	6,66	6,20	ND	ND	ND	ND
	Pyruvate	8,66	8,41	7,20	6,66	6,66	6,00	5,66	5,73	5,00	5,20	ND	ND	ND	ND
	Formiate	8,66	8,00	7,20	7,20	7,00	6,66	6,00	5,66	5,20	5,20	ND	ND	ND	ND
	Lactate	9,20	8,78	8,78	8,41	7,41	7,66	6,20	6,66	5,66	5,73	5,00	5,00	4,20	5,00
	Mélange AGV (3)	8,66	8,41	7,20	6,66	6,00	5,66	5,41	5,15	5,00	4,41	ND	ND	ND	ND
Eau nitrifiée	Extrait de levure	8,53	8,00	8,00	8,00	6,60	7,15	5,78	6,00	5,66	6,20	ND	ND	ND	ND
Eau décantée non méthanisée	9,66	9,66	9,00	9,66	7,00	7,15	6,66	6,66	6,00	5,41	5,66	5,66	5,00	4,41	

(1) Cf. Tablé et 17

(2) Complémentation à 1 g Carbone Organique par litre

(3) 50 % Acétate, 20 % Propionate, 10 % Butyrate, 10 % Valérate

(4) Seule la dilution ayant donné des résultats intéressants est exploitée ici

(5) ND = Non-déterminé

III-1-b Protocole

Les mesures sont réalisées sur pierre ponce pour les essais en présence de matière organique, sur schiste et sur pierre ponce pour les essais de conservation sur eau de forage.

Différents milieux organiques sont testés, naturels ou synthétiques. Ils sont à base d'eau industrielle prélevée à THUMERIES à différents stades de la filière d'épuration. L'eau de forage est également prélevée à THUMERIES. Leur composition exacte est donnée en Annexe 3.

La température de conservation n'est mentionnée que lorsqu'elle diffère de 20°C. La pierre ponce active provient d'un pilote de laboratoire à lit turbulent type 3 fonctionnant à pleine charge (1,2 kg Nox/m³.j) et mis en circuit fermé pendant 48 heures. La ponce est répartie en vrac, à raison de 100 ml, dans les différents milieux. Le volume final est ajusté à 400 ml. Cette fraction de 25 % de matériau correspond à celle que l'on trouve dans un réacteur au repos.

On suit alors les mêmes paramètres qu'au cours des essais de dessiccation : tests d'activité nitrifiante et comptages des bactéries revivifiables en fonction du temps (Annexe 2). On suit également la dénitrification dans les milieux organiques ainsi que l'évolution des différentes formes du carbone dissous. On regarde enfin le comportement du matériau et des bactéries fixées (lyse bactérienne, décrochage).

III-1-c Résultats

L'ensemble des résultats tient compte de l'évaporation naturelle des milieux, avec une correction systématique des analyses. Les tableaux 20 et 21 montrent que les composés organiques n'ont pas d'effet positif sur la conservation. On constate une dénitrification complète dans les 5 premiers jours de stockage, avec une phase intermédiaire de production de nitrites. Le carbone organique est consommé dans un premier temps, puis sa concentration se stabilise à 200-300 mg C/l après 30 jours. Enfin, les milieux se troublent et on assiste à la prolifération d'une flore hétérotrophe qui décante et constitue une épaisse pellicule couvrant le biofilm nitrifiant. L'odeur putride dégagée par la plupart des milieux est caractéristique d'écosystèmes en décomposition.

Les résultats obtenus sur eau de forage indiquent une bonne adaptation des bactéries nitrifiantes aux conditions de jeûne. Leur activité résiduelle après 6 mois de conservation est de 55 % et leur temps de régénération assez court (30-35 heures). La composition de l'eau de stockage évolue très peu. On ne détecte pas de carbone organique, d'azote organique, ou de phosphore en solution, témoins de la décomposition bactérienne. Le nombre de micro-organismes nitrifiants revivifiables se stabilise après 60 jours de conservation.

Kg N-NH₄/m³.j

NITRIFICATION SUR PIERRE PONCE
STOCKAGE IMMERGE

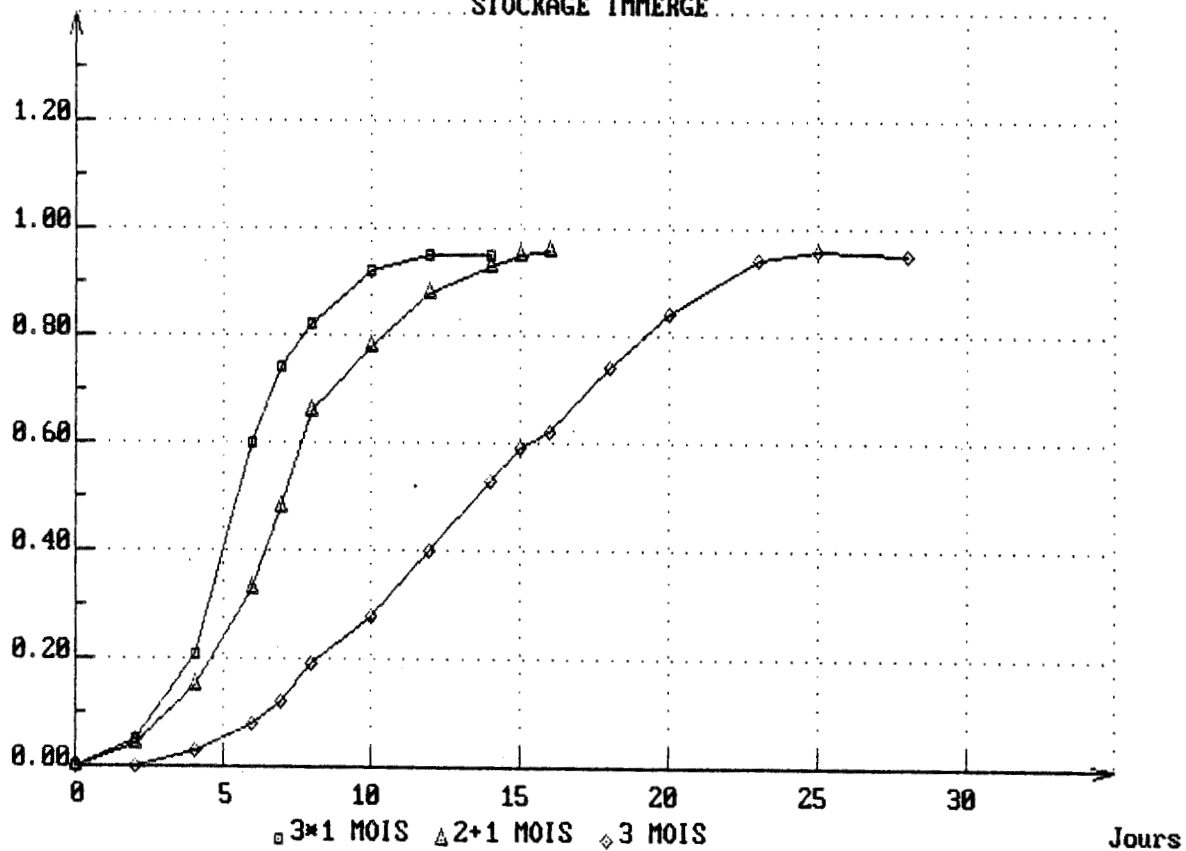


FIGURE 17 : REPRISE DE LA NITRIFICATION EN FONCTION
DE LA PROCEDURE DE CONSERVATION

3*1 MOIS = 3 arrêts d'un mois

2+1 MOIS = arrêt de 2 mois suivi d'un arrêt d'un mois

3 MOIS = arrêt de 3 mois



III-1-d Commentaires

La flore nitrifiante est sensible à la présence de matière organique. Le carbone dissous et les bactéries en décomposition constituent un substrat de choix pour les micro-organismes hétérotrophes qui survivent. La sécrétion de métabolites et la diffusion d'éléments issus de lyses bactériennes peuvent rendre le milieu toxique et inhibiteur pour les bactéries nitrifiantes au repos.

L'immersion en eau de forage semble être un moyen efficace pour maintenir une activité nitrifiante résiduelle stable. Ce milieu sans éléments nutritifs est néfaste pour les micro-organismes à croissance rapide, qui se trouvent brutalement en conditions de substrat limitant. Les bactéries nitrifiantes ont une croissance lente et sont alors favorisées. On suppose qu'elles mettent progressivement en place un dispositif de vie ralentie. Leur adaptation aux conditions de jeûne serait due à l'établissement d'un taux de métabolisme endogène et une utilisation de l'énergie de maintenance assez faibles (29). Le non-renouvellement du milieu de stockage peut conduire à l'accumulation de certains produits de décomposition. Ceci n'a pas été constaté lors des essais mais demande l'analyse régulière de l'eau interstitielle par mesure préventive.

III-2 Application sur pilote de laboratoire

III-2-a Présentation des essais

Compte tenu des bons résultats obtenus en conservation par déshydratation lorsqu'on applique une série de reprises et d'arrêts, ce facteur de correction est tout de suite testé en conservation par immersion.

Une première étude, réalisée sur pierre ponce, montre l'intérêt de suivre une telle procédure (Fig. 17). A durée de conservation égale, le matériau repris régulièrement présente une cinétique de montée en charge très supérieure à celle du matériau stocké sans reprises intermédiaires. On gagne plus de 10 jours sur cette courte expérience de 3 mois de conservation.

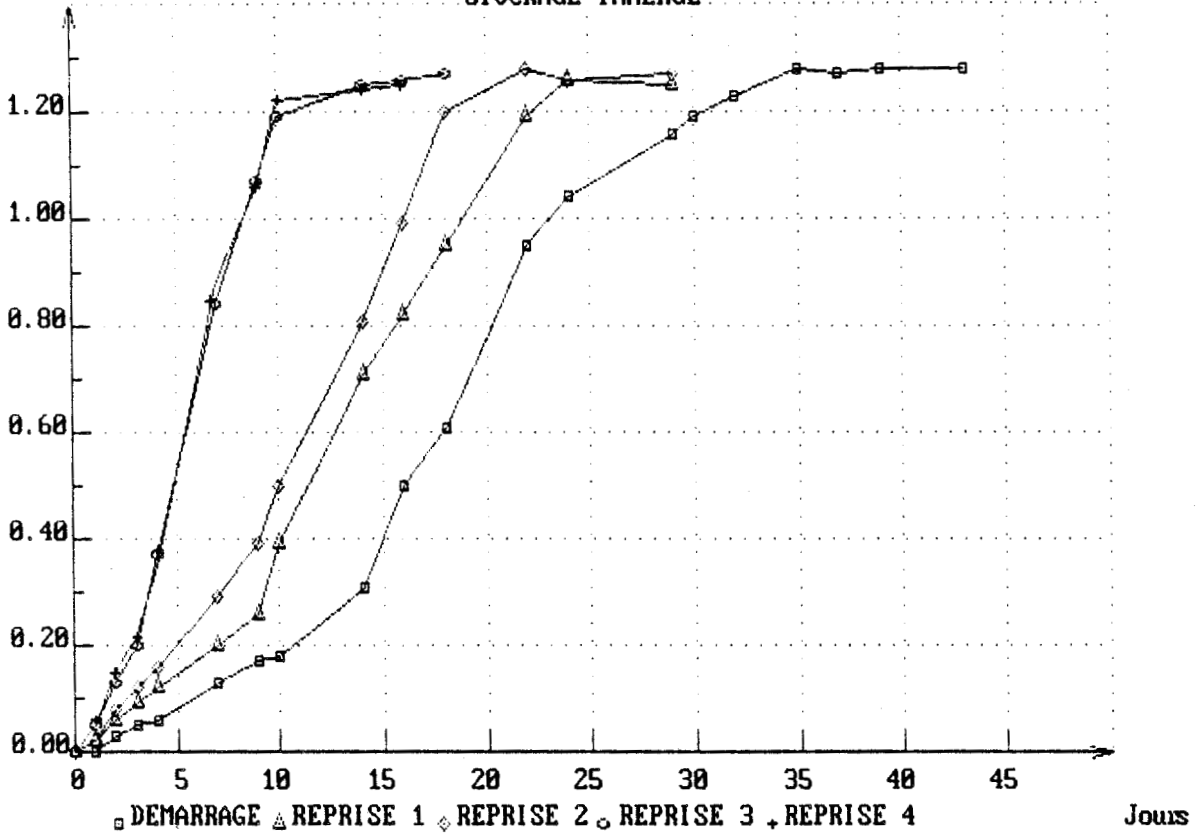
Les essais sont alors orientés vers cette procédure, en essayant de l'affiner et surtout de réduire sa durée totale. Ils sont réalisés parallèlement sur schiste et pierre ponce. L'objectif n'est pas de comparer les deux matériaux mais de s'assurer du bon comportement de la flore nitrifiante fixée sur chacun d'eux.

On décide de travailler sur des supports neufs, ensemencés à partir de boues nitrifiantes actives provenant de la station expérimentale de COLOMBES.

Les réacteurs sont de type Biofiltre et Lit turbulent type 1 (Annexe 4) alimentés en effluent méthanisé prélevé en intercampagne à THUMERIES.

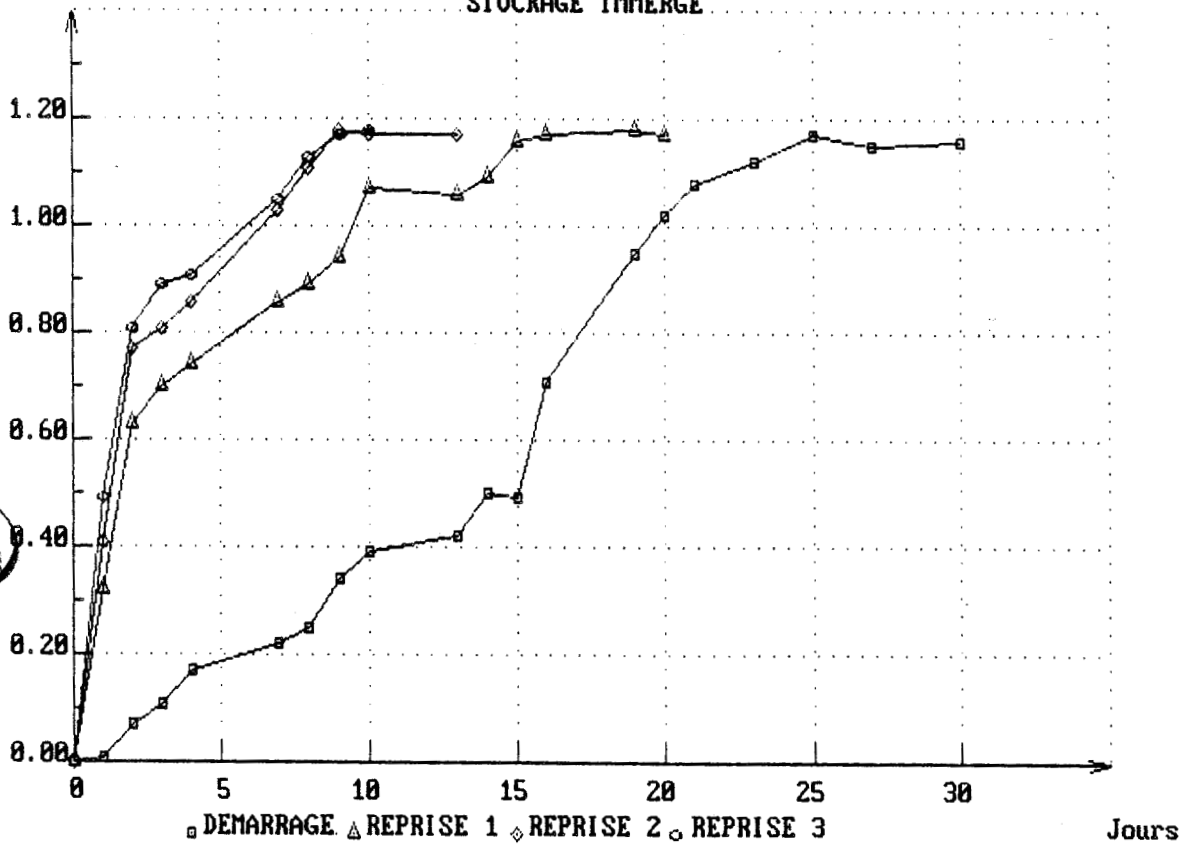
Kg N-NH₄/m³.j

NITRIFICATION SUR SCHISTE
STOCKAGE IMMERGE



Kg N-NH₄/m³.j

NITRIFICATION SUR PIERRE PONCE
STOCKAGE IMMERGE



FIGURES 18 ET 19 : REPRISES SUCCESSIVES DE LA NITRIFICATION SUR SCHISTE ET PIERRE PONCE APRES DEMARRAGE

BU
LILLE

Après le démarrage et la mise en régime nominal des réacteurs, on applique une série d'arrêts fixés à 15 jours. Avant leur arrêt total, les réacteurs sont placés 48 heures en circuit fermé. On procède alors à une vidange complète du milieu suivie de 3 lavages à l'eau de forage. Ceci permet d'éliminer les Matières en suspension et les éléments nutritifs résiduels.

La reprise s'effectue après vidange de l'eau de conservation et remplissage progressif en effluent méthanisé aéré. L'arrêt suivant est appliqué lorsque le réacteur traite à nouveau sa charge azotée initiale.

Le nombre de cycles est lié à l'allure des courbes de reprises successives. On arrête définitivement les réacteurs lorsque la cinétique des deux dernières est identique.

III-2-b Résultats

Il faut tout d'abord mentionner que le démarrage des réacteurs s'est effectué en 25-30 jours (Fig. 18,19).

Le schiste nécessite 3 cycles d'arrêts et de reprises pour atteindre sa vitesse limite de reprise. La montée en charge est alors réalisée presque en totalité en 10 jours. La durée totale du protocole, dans les conditions expérimentales, sans tenir compte du dernier cycle, est de 128 jours.

La pierre ponce atteint sa vitesse maximale de reprise après 2 cycles. La dernière incubation est réalisée en 9 jours. Dans les conditions opératoires, la durée totale de la procédure, sans considérer le dernier cycle, est de 68 jours.

Dans aucun cas, on ne constate de décrochage bactérien. Les micro-organismes non oxygénés prennent une coloration plus foncée au cours du stockage. Les matériaux retrouvent leur aspect normal dès les premières heures de réoxygénation.

III-2-c Commentaires

Ces essais montrent que, globalement, les réacteurs conservent le même potentiel biologique qu'au départ. Deux réserves sont à émettre quant à l'exploitation industrielle du procédé de stockage.

. La durée totale du protocole est importante (68 jours), et se situe en fin de campagne (Décembre). Les reprises successives peuvent être optimisées et réduites de quelques jours en fin d'incubation. Au contraire, les périodes d'arrêts intermédiaires de 15 jours sont fixes. Une durée plus courte ne permet pas aux micro-organismes d'acquérir une résistance fiable dans le temps ; un arrêt prolongé annule alors le gain de temps observé au cours des reprises successives de conditionnement.

. La durée de l'intercampagne impose un arrêt total de la nitrification pendant plusieurs mois à l'issue de la procédure de conditionnement. On ne possède pas encore d'informations complètes sur la bonne conservation dans le temps des propriétés de résistance acquises par les bactéries nitrifiantes. Cette maintenance n'a peut-être pas un caractère définitif et dépend de nombreux facteurs liés avant tout à la nature des bactéries. L'étude est en cours et ses conclusions seront exploitées avant l'application éventuelle de la procédure sur le plan industriel dès cette campagne 1986.

IV - REPRISE DE LA NITRIFICATION

IV-1 Reprise consécutive à une mauvaise conservation

IV-1-a Cas étudié

La procédure de conservation des différents matériaux au cours des essais pilotes de THUMERIES a été perturbée par la fluctuation importante de la température extérieure. La pierre ponce a été particulièrement affectée. Au redémarrage du lit turbulent, on ne note pas de reprise d'activité de la flore nitrifiante. Ceci est dû vraisemblablement à l'altération physiologique des bactéries fixées; celles-ci créent une assise de cellules mortes qui encombre les sites d'accrochage pour d'autres bactéries nitrifiantes. Le matériau est alors étudié au laboratoire en réacteur à lit turbulent type 1 (Annexe 4) sur effluent méthanisé prélevé à THUMERIES.

Le réensemencement direct du matériau brut ne permet pas de retrouver une activité nitrifiante significative. L'inoculum reste en suspension et traite une charge azotée inférieure à 0,08 kg N/m³.j.

On décide alors de tester trois protocoles de reprise en parallèle :

- Traitement de surface du matériau inactif au peroxyde d'hydrogène (H₂O₂), 5% (V/V) durant 15 min. suivi d'un réensemencement.

- Remplacement en deux temps de la pierre ponce altérée par du matériau neuf sans réensemencement.

- Décapage du matériau à l'acide chlorhydrique (HCl) 0,5 N durant 15 min. suivi de plusieurs lavages et d'un réensemencement.

IV-2-b Résultats

Le tableau 22 résume l'état du matériau après traitement et la figure 20 illustre les résultats obtenus.

NITRIFICATION SUR PIERRE PONCE
MATERIAU TRAITE

Kg N-NH₄/m³.j

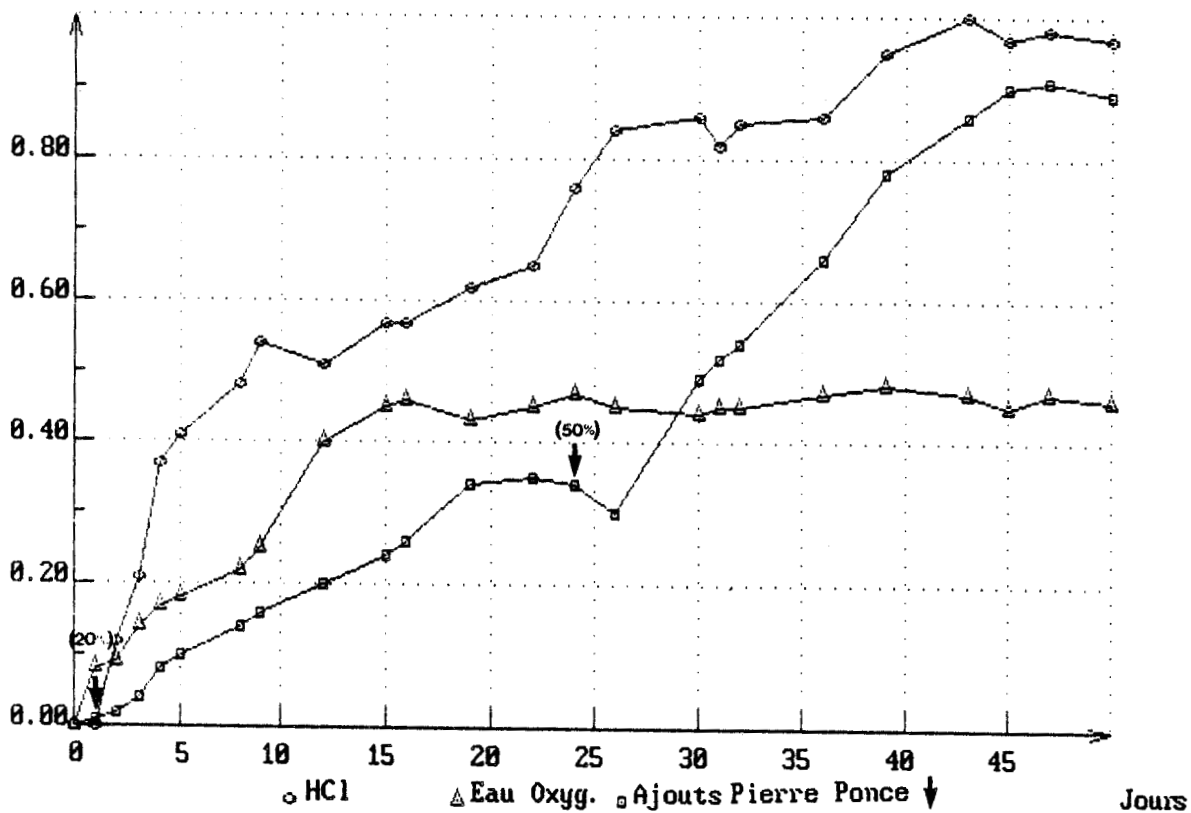


FIGURE 20 : REPRIS DE LA NITRIFICATION APRES DIFFERENTS TRAITEMENTS SUR LA PIERRE PONCE



TABLEAU 22 : ETAT DE LA PIERRE-PONCE EN DEBUT D'EXPERIENCE

(:	Témoïn	:	Traitement	:	Traitement	:	Ajouts de)
(:	THUMERIES	:	HCl	:	H ₂ O ₂	:	ponce)
(Calcium	:	:	:	:	:	:	:	:)
((g%g)	:	18 g	:	0 g	:	17,6 g	:	13,6 g)
(M.v.s.	:	:	:	:	:	:	:	:)
((g%g)	:	3,7 g	:	0 g	:	3,0 g	:	2,5 g)

Le matériau traité à l'acide chlorhydrique est totalement détartré et décapé. L'allure de la montée en charge du réacteur est semblable à celle d'un démarrage de matériau neuf.

Le traitement au peroxyde d'hydrogène est une simple attaque de surface et les performances du réacteur sont rapidement limitées à 0,43 kg d'azote éliminé par m³ et par jour.

Le premier ajout de pierre ponce neuve remplace 20 % du poids de matériau. La montée en charge est alors progressive et atteint un palier à 0,34 kg d'azote traité par m³ et par jour. Un ajout supplémentaire de pierre ponce correspondant à 50 % du poids de matériau (jour 24) entraîne une nouvelle montée en charge azotée qui atteint alors 0,90 kg N/m³.j.

IV-2-c Commentaires

La pierre ponce altérée ne nitrifie plus. La montée en charge du réacteur ayant reçu de la pierre ponce neuve correspond à la seule mise en activité de la fraction de matériau neuf. La pierre ponce mal conservée est incapable d'adsorber de nouvelles bactéries.

Le décapage complet du support semble être la solution la plus efficace. L'utilisation d'un acide fort est radicale. L'acide chlorhydrique 0,1 N donne le même résultat pour un temps de réaction plus long (1 heure).

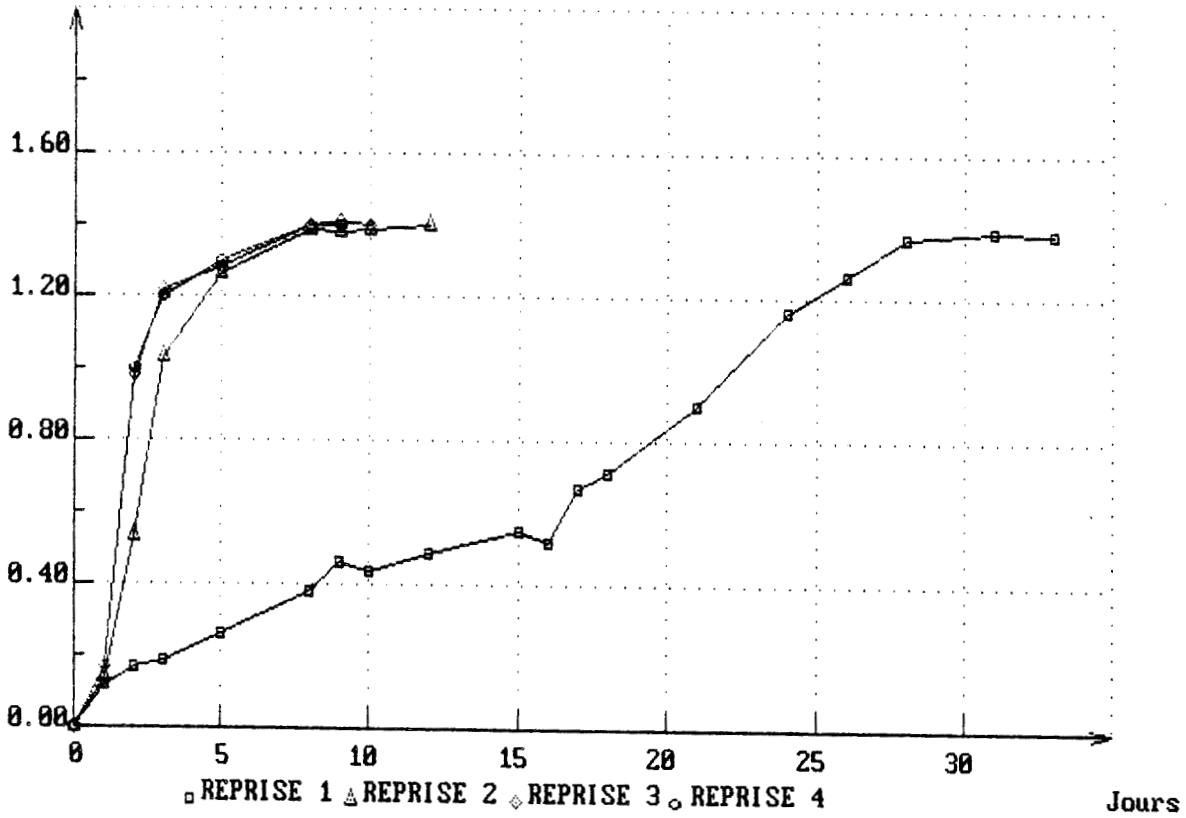
La méthode peut être extrapolée à un éventuel détartrage préventif en cours ou en fin de campagne sur un réacteur industriel. On peut alors préconiser l'utilisation d'acide dilué suivie d'un réensemencement partiel du matériau décapé en surface.

IV-3 Reprise consécutive à une bonne conservation

La reprise d'un support conservé est tributaire de quelques facteurs qu'il convient d'optimiser et de respecter.

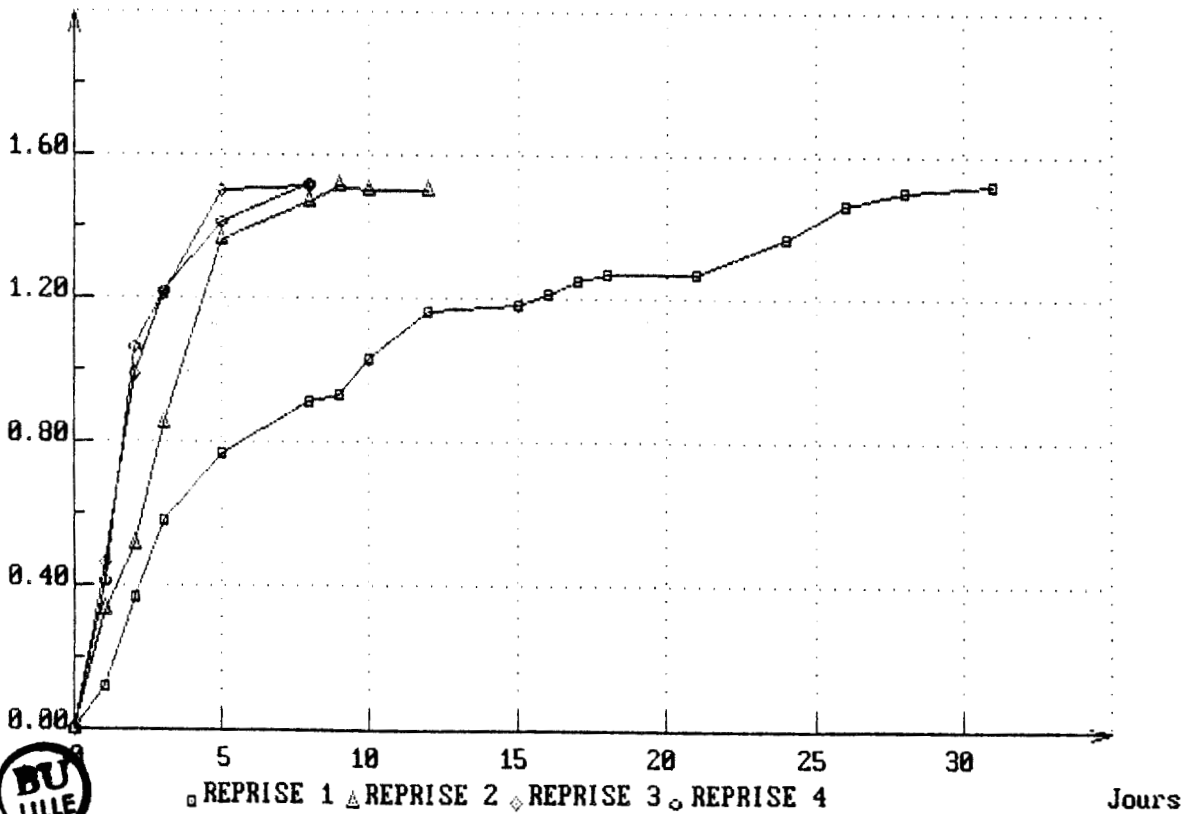
NITRIFICATION SUR PIERRE PONCE
1er STOCKAGE A SEC

Kg N-NH₄/m³.j



NITRIFICATION SUR PIERRE PONCE
1er STOCKAGE A SEC

Kg N-NH₄/m³.j



FIGURES 21 ET 22 : REPRISES SUCCESSIVES DE LA NITRIFICATION SUR PIERRE PONCE CONSERVEE A SEC PUIS IMMERGEE

Les données bibliographiques concernant la mise en évidence et l'exploitation de facteurs de réactivation sont peu nombreuses. Elles concernent essentiellement l'effet stimulant de l'hydroxylamine sur l'étape limitante de la nitrification que constitue le passage de l'azote ammoniacal à l'hydroxylamine (55,56)(Fig. 2). De nombreux essais réalisés au laboratoire n'ont pas abouti. D'autres facteurs de réactivation sont actuellement recherchés.

On bénéficie, en conditions industrielles, d'une température relativement favorable et constante de l'effluent méthanisé. La nitrification se fait entre 25°C et 30°C, température optimale de croissance des bactéries nitrifiantes (84). De même, le fort pouvoir tampon des eaux de sucrerie permet d'assurer les besoins en carbone minéral des bactéries et de maintenir des conditions de pH favorables. Pour une période de mise en circuit fermé prolongée, on peut avoir besoin d'une source extérieure de carbone (gaz carbonique, bicarbonate de potassium).

La concentration en azote ammoniacal lors de la reprise doit respecter le diagramme d'ANTHONISEN (Fig. 3). Dans le cas d'un arrêt prolongé du digesteur, on peut avoir recours à une dilution de l'eau méthanisée alors fortement concentrée en azote (Tab. 8).

Le cas particulier d'une conservation mixte est présenté sur les figures 21 et 22. Les supports stockés à l'air libre durant 4 mois sont réactivés, puis mis en périodes de jeûne en eau de forage. On remarque que les vitesses de reprises sont très bonnes et rapidement stabilisées à 5-7 jours. La pierre ponce en provenance d'essais entrepris à COLOMBES travaillait à très forte charge (3 kg N/m³.j) et sa colonisation est importante : celle-ci semble favoriser la conservation. Cette hypothèse fera l'objet de travaux ultérieurs.

V - CONCLUSION

L'étude de conservation de la flore nitrifiante est basée sur l'utilisation de méthodes et de moyens simples, applicables à l'échelle industrielle. Les bactéries nitrifiantes fixées semblent moins sensibles aux conditions de jeûne que sous forme de boues activées. Toutefois, quel que soit le procédé choisi, on constate une perte rapide d'activité. Celle-ci s'accompagne d'une extinction progressive des micro-organismes, importante dans le cas de mauvaises conservations. La réactivation répétée de la biomasse stockée à sec et en eau de forage permet d'acclimater et de sélectionner les souches résistantes et d'accélérer ainsi la reprise d'activité d'un réacteur. Cette propriété acquise par les bactéries nitrifiantes sur des périodes de conservation intermédiaires de 15 jours est très importante. On vérifie actuellement au laboratoire sa fiabilité et sa stabilité sur de longues périodes de conservation. Sur le plan industriel, il serait intéressant de bénéficier du même phénomène d'accélération des reprises avec diminution du temps de latence d'une campagne sucrière à l'autre. Les effets constatés au laboratoire sur une courte durée seraient ainsi répercutés sur plusieurs campagnes. La digestion anaérobie, bien qu'ayant une biologie différente de la nitrification, vérifie ces remarques.

Les techniques d'évaluation de la conservation définies au laboratoire sont celles couramment utilisées pour l'étude de la nitrification (12,13,46,82,108). Elles sont bien adaptées au contexte de l'étude. La précision de ces mesures a déjà fait l'objet de nombreux travaux (11,32,82,30). Une mise au point préalable et de nombreux tests de reproductibilité ont été indispensables.

CONCLUSION - PERSPECTIVES

Cette étude s'est inscrite dans un programme destiné à mettre en place une filière complète de traitement des eaux résiduaires de sucrerie. Son but est de permettre, à terme, le rejet des eaux épurées au fil de la campagne. La sucrerie de THUMERIES a accepté ce projet en deux étapes : digestion anaérobie et nitrification en post-traitement aérobie.

Le Biofiltre anaérobie a été mis en service à THUMERIES dès 1983. Un effort particulier a été produit pour adapter le fermenteur au contexte de la sucrerie. Cette première étape de travail avait une double importance : assurer la fiabilité du procédé installé pour la première fois en France à l'échelle industrielle et vérifier le bon fonctionnement du digesteur qui conditionne le post-traitement. Les performances enregistrées en flux ascendant comme en flux descendant et la qualité des effluents méthanisés ont permis d'entreprendre la seconde partie du traitement.

L'étude de la nitrification présentait un aspect novateur et a nécessité l'approfondissement de l'influence de quelques paramètres liés au cadre spécifique d'une industrie saisonnière. Les essais de nitrification réalisés sur pilotes en 1984 et 1985 ont montré l'intérêt des procédés à biomasse fixée sur des supports poreux utilisant l'air comme source d'oxygène. Sur la courte durée de l'expérimentation, la faisabilité biologique et technologique de la nitrification a été démontrée. La charge volumique traitée s'est élevée à 1,5 kg d'azote ammoniacal par m³ et par jour, avec des rendements supérieurs à 95 %, ceci pour un temps de séjour hydraulique inférieur à 1,5 heure. Simultanément, la D.C.O. résiduelle a été réduite de 50 %. Les performances enregistrées sur ces appareils constituent le principal critère de dimensionnement d'une installation.

Les travaux complémentaires de laboratoire ont été réalisés avec un souci permanent d'application industrielle. Ils ont permis de comprendre, et, par la suite, de s'affranchir des principales difficultés rencontrées sur le terrain : entartrage des matériaux supports au cours de l'aération, carence en carbone minéral au démarrage (circuit fermé prolongé), surcharge de pollution organique dissoute. La connaissance de ces phénomènes facilite la marche à suivre en cas de dysfonctionnement biologique.

Nous nous sommes employés ensuite à définir un protocole fiable et performant de maintenance biologique au sein des réacteurs nitrifiants pour la période d'intercampagne. Une procédure simple d'immersion des supports garnis en eau de forage nous a paru être la meilleure solution. L'autre alternative était le stockage par déshydratation des matériaux, sensible aux variations de température et à l'humidité relative du milieu. Dans tous les cas, nous avons constaté une perte rapide d'activité accompagnée d'une mortalité des bactéries nitrifiantes. La technique d'immersion a été affinée et considérablement améliorée par l'application d'arrêts et de reprises d'activité répétés. Dans le temps défini pour l'étude, nous avons pu montrer sa fiabilité à court terme après 3 cycles d'arrêts (15 jours) et de reprises (9 jours).

Nous nous attachons actuellement à progresser dans la connaissance des facteurs de protection et de réactivation des bactéries nitrifiantes. La stabilité des propriétés cinétiques acquises par les microorganismes au fur et à mesure de leur acclimatation aux conditions de jeûne est également à l'étude.

L'étape ultime de l'étude est l'application de la nitrification à l'échelle industrielle; celle-ci est actuellement en cours de réalisation à THUMERIES, sur une partie des effluents du digesteur. La mise en place de cette filière complète devrait constituer la preuve qu'il est possible de supprimer les bassins de stockage en sucrerie. Elle devrait permettre en tous les cas de concevoir un rejet direct d'une partie des eaux de la sucrerie au fil de la campagne. Cet aspect novateur devrait servir de référence dans l'industrie sucrière.

La filière de traitement des eaux mise en place à THUMERIES montre la faisabilité d'un rejet direct au cours de la campagne. Cette nouvelle installation pourra servir de référence dans l'Industrie Sucrière.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- 1 ABELIOVICH A., 1985 - Nitrification of ammonia in wastewaters
Water Research 19 pp. 1097-1099
- 2 AUDIC J.M., FAUP G.M., NAVARRO J.M., 1984 - Specific activity of Nitrobacter through attachment on granular media
Water Research 18 pp. 745-750
- 3 ALEEM M.I.H., ALEXANDER M., 1958 - Cell-free nitrification by Nitrobacter
J. of Bact. 76 pp. 510-514
- 4 ALEEM M.I.H., 1970 - Oxidation of inorganic Nitrogen compounds
Ann. Rev. Plant. Physiol. 21 pp. 67-90
- 5 ALEXANDER M., 1965 - Nitrification - Soil Nitrogen. Am. Soc. Agron.
Ed. W.V. Bartholonev et F.E. Clarck - Madison
Wisconsin pp. 307-343
- 6 ANTHEUNISSE J., DE BRUIN-TOL J.W., VAN DER POL-VANSOEST M.E., 1981
- Survival of microorganisms after drying and storage
Antonie van Leeuwenhock 47 pp. 539-545
- 7 ANTHONISEN A.C., LOEHR R., PRAKASAM T., SRINATH E., 1976 - Inhibition
of Nitrification by ammonia and nitrous acid
J.W.P.C.F. 48 pp. 835-852
- 8 AUDIC J.M., 1983 - Nitrobacter immobilisé - Impact physiologique -
Influence du matériau support
Rapport Thèse DDI - UST Montpellier
- 9 BAZIN M.J., SAUNDERS P.T., PROSSER J.I., 1976
CRC Crit. Rev. Microbiol. 4 pp. 463-498
- 10 BECARRI M., MARANI D., RAMADORI R., 1979 - A critical analysis of
Nitrification alternatives
Water Research 13 pp. 185-192
- 11 BELSER L.W., 1979 - Population ecology on nitrifying bacteria
Ann. Rev. Microbiol. 33 pp. 309-333

- 12 BELSER L.W., MAYS E.L., 1982 - Use of nitrifier activity measurements to estimate the efficiency of viable nitrifier counts in soils and sediments
Applied and Env. Microbiol. 43 pp.945-948
- 13 BELSER L.W., SCHMIDT E.L., 1978 - Diversity on the ammonia oxydizing nitrifier population of a soil
Applied and Env. Microbiol. 36 pp. 584-588
- 14 BELSER L.W., SCHMIDT E.L., 1980 - Growth and oxidation kinetics of three genera of ammonia oxidizing nitrifiers
FEMS Microbiology letters 7 pp. 213-216
- 15 BILLEN G., 1976 - Evaluation of nitrifying in sediments by dark (^{14}C) - Bicarbonate incorporation
Water Research 10 pp. 51-57
- 16 BOON B., LAUDELOUT H., 1962 - Kinetics of nitrate oxidation by Nitrobacter winogradskyi Biochem J. 85 pp. 440-447
- 17 BORIES A., RAYNAL J., JOVER J.P., 1982 - Fixed-film reactor with plastic media for methane fermentation of distilleries wastewaters
Energy from Biomass 2nd E.C. conference
pp. 567-571
- 18 BOYLEN C.W., MULKS M.H., 1978 - The survival of Coryneform Bacteria during periods of prolonged nutrient starvation
J. Gen. Microbiol. 105 pp. 323-334
- 19 BUCHANAN R.E., GIBBONS N.E., 1974 - Bergey's manual of Determinative Bacteriology
Baltimore - Williams and Wilkins pp. 450-456
- 20 CHARTRAIN M., RIZET M., FAUP G., 1983 - Isolement de Nitrobacter des eaux potables et des eaux urbaines
Water Research 17 pp. 831-832
- 21 CHARTRAIN M., RIZET M., 1983 - Isolement et caractérisation biologique et physiologique de Nitrobacter présent dans les installations de nitrification d'eaux potables et d'eaux résiduaires.
TSM-L'eau 3 pp. 89-94
- 22 CHARTRAIN M., COUTE A., RIZET M., 1985 - Mise en évidence de la dominance de Nitrobacter winogradskyi sérotype agilis dans un nitrificateur à lit fixe
TSM-L'eau 2 pp. 101-104

- 23 CHARTRAIN M., AUDIC J.M., RIZET M., 1985 - Etude de la croissance de Nitrobacter winogradskyi serotype agilis
TSM-L'eau 10 pp. 465-474
- 24 CHEN M., ALEXANDER M., 1973 - Survival of soil bacteria during prolonged dessication
Soil. Biol. Biochem. 5 pp. 213-221
- 25 CHIRIFE J., ALZAMORA S.M., FERRO-FONTAN C., 1983 - Microbial growth at reduced water activities : studies of aw prediction in solutions of compatible solute
J. Appl. Bact. 54 pp. 339-343
- 26 CHIU S.Y. et coll., 1972 - Kinetic behavior of mixed populations of activated sludge
Biotechnol. Bioeng 15 pp. 1101-1121
- 27 CLARK C., SCHMIDT E.L., 1966 - Effect of mixed culture on Nitrosomonas europaea stimulated by uptake and utilization of pyruvate
J. Bact. 91 pp. 367-373
- 28 CLARK C., SCHMIDT E.L., 1967a - Growth response of Nitrosomonas europaea to amido-acids
J. Bact. 93 pp. 1302-1308
- 29 CRIST D.K., WYZA R.E., MILLS K.K., BAUER W.D., EVANS W.R., 1984 Preservation of Rhizobium viability and symbiotic infectivity by suspension in water
Applied and Env. Microb. 97 pp. 895-900
- 30 DELANNOY B., 1984 - Essais de nitrification biologique en post-traitement. Application aux effluents de sucrerie
Thèse D.E.A., U.S.T. de LILLE
- 31 DELWICHE C.C., FINSTEIN M.S., 1965 - Carbon and energy sources for the nitrifying autotroph Nitrobacter
J. Bact. 90 pp. 102-107
- 32 DEMAN (Réf. VERLAG S.), 1975 - The probability of Most Probable Number
European J. of Applied Microb. 1 pp.67-78
- 33 DEVILLERS G., 1965 - Nitrification de l'eau - Elimination de l'ammoniaque des eaux d'alimentation
TSM - L'eau 10 pp. 295-305
- 34 DOMMARGUES Y.R., 1966 - Biologie du sol
P.U.F. PARIS
- 35 DOWNING A.L., PAINTER H.A., KNOWLES G., 1964 - Nitrification in the activated sludge process
J. Proc. Inst. Sew. Purif. pp. 130-153

- 36 ENGELS M.S., ALEXANDER M., 1958 - Growth and metabolism of Nitrosomonas europaea
J. Bact. pp. 217-222
- 37 ENQUETE sur les RESULTATS TECHNIQUES des SUCRERIES FRANCAISES Campagne 1985, 1986 SNFS - IRIS
Publ. Lim. 35 p.
- 38 EYLAR O.R., SCHMIDT E.L., 1959 A survey of heterotrophic micro-organisms from soil for ability to form nitrite and nitrate
J. Gen. Microbiol. 20 pp. 473-481
- 39 FINSTEIN M.S., DELWICHE C.C., 1965 - Molybdenum as a micronutrient for Nitrobacter
J. of Bact. 89 1 pp. 123-128
- 40 FOCHT D.D., VERSTRAETE J., 1977 - Biochemical ecology of nitrification and denitrification
Adv. Microbiol. Ecology 1 pp. 135-213
- 41 GOREAU T.J., KAPLAN W.A., WOFSY S.C., Mc ELROY M.B., VALOIS F.W., WASTON S.W., 1980 - Production of NO_2 and N_2O by nitrifying bacteria at reduced concentrations of oxygen
Applied and Environ. Microbiol. 40 pp. 526-532
- 42 GOULD G.W., LEES H., 1960 - The isolation and culture of the nitrifying organisms - Part I
Can. J. Microbiol. 6 pp. 299-307
- 43 GRASMICK A., ELMALEH S., YAHY H., 1984 - Réacteur à cellules nitrifiantes immobilisées sur garnissage aéré à co ou contre-courant - Etude expérimentale et modélisation
Water Research 7 pp. 895-891
- 44 GUNDERSEN K., 1957 - Preservation of Nitrosomonas
Nature 179 p. 789
- 45 GUNDERSEN K., 1958 - Influence of corn-steep liquor on the oxidation of ammonia to nitrite by Nitrosomonas europaea
J. Gen. Microbiol. 19 pp. 190-197
- 46 HALL E.R., MURPHY K.L., 1980 - Estimation of nitrifying biomass and kinetics in wastewater
Water Research 14 pp. 297-304
- 47 HALL E.R., MURPHY K.L., 1985 - Sludge age and substrate effects on nitrification kinetics
J.W.P.C.F. 57 pp. 413-418
- 48 HARMS et coll., 1976 - An ammonia oxidizing bacterium Nitrosovibrio tenuis
Arch. Microbiol. 108 pp. 105-111
- 49 HAUCK R.D., 1981 - Nitrogen fertilizers effects on nitrogen cycles processes
Ecol. Bull. 33 pp. 551-562

- 50 HAUG R.T., MAC CARTY P.L., 1972 - Nitrification with submerged filters
J.W.P.C.F. 44 pp. 2086-2102
- 51 HENRY M., THELIER Y., 1986 - SGN méthanise les effluents chimiques et parachimiques
Chimie magazine 1 pp. 28-30
- 52 HOCKENBURY M.R., GRADY C.P.L., 1977 - Inhibition of nitrification - Effect of selected organic compounds
J.W.P.C.F. 49 pp. 768-777
- 53 HOFMAN T., LEES M. 1952 - The biochemistry of the nitrifying organisms (2)
Biochem. J. 52 pp. 140-142
- 54 HOFMAN T., LEES M., 1953 - The biochemistry of the nitrifying organisms (3)
Biochem. J. 54 pp. 293-295
- 55 HOOPER A.B., NASON A., 1965 - Characterization of hydroxylamine - Cyt c Reductase from the chemoautotrophs Nitrosomonas and Nitrocystis
The Journal of Biological Chemistry
240 pp. 4044-4057
- 56 HOOPER A.B., HANSEN J., BELL R., 1966 - Characterization of Glutamate Dehydrogenase from the ammonia-oxidizing chemoautotroph
The Journal of Biological Chemistry
242 pp. 288-296
- 57 HOOPER A.B., 1969 - Lag Phase of ammonia oxidation by resting cells of Nitrosomonas europaea
J. of Bact. 97 pp. 968-969
- 58 HOOPER A.B., TERRY K.R., 1973 - Specific inhibitors of ammonia oxidation in Nitrosomonas
J. of Bact. 115 pp. 480-485
- 59 IDA S., ALEXANDER M., 1965 - Permeability of Nitrobacter to organic compounds
J. of Bact. 90 pp. 151-156
- 60 JONES R.D., HOOD M.A., 1980 - Effects of t°, salinity and inorganic N on the rate of ammonium oxidation by nitrifiers isolated from Wetland environments
Microbiol. ecol. 6 pp. 339-347
- 61 JONES R.D., HOOD M.A., 1980 - Interaction between an ammonium oxidation by nitrifiers isolated from Wetland environments
Microbiol. ecol. 6 pp. 271-275

- 52 JOSSERRAND A., 1983 - Apport de l'immunofluorescence à l'étude écologique des germes nitrifiants (Genre Nitrobacter)
Thèse Docteur Es- Sciences (Lyon I)
n° 83-03 151 p.
- 53 KERLAN F., SENELIER Y., 1985 - La pollution des eaux par les composés de l'azote et du phosphore. Les moyens de lutte
TSM - L'eau 6 pp. 289-294
- 54 KILBERTUS G., PROTH J., VERVIER B., 1979 - Effets de la dessiccation sur les bacteries gram-negatives d'un sol
Soil Biol. Biochem. 11 pp.109-114
- 55 KINNER N.E., EIGHMY T.T., 1985 - Biological fixed-film systems
J.W.P.C.F. 57 pp. 526-531
- 56 KNOWLES G., DOWNING A.L., BARRETT M.J., 1965 - Determination of kinetic constants for nitrifying bacteria in mixed-culture with the aid of an electronic computer
J. Gen. Microbiol. 38 pp. 263-278
- 57 KOOPS et coll, 1976 - Isolation of a moderate halophilic ammonia-oxidizing bacterium - Nitrosococcus mobilis
Nov. sp. Arch. Microbiol. 107 pp. 277-282
- 58 KOWALSKI E., LEWANDOWSKI S., 1983 - Nitrification process in a packed-bed reactor with a chemically active bed
Water Research 17 pp. 157-160
- 59 KRULWICH T.A., FUNK H.B., 1965 - Stimulation of Nitrobacter agilis by biotin
J. of Bact. 90 pp. 729-733
- 70 KRÜMMEL A., HARMS H., 1982 - Effect of organic matter on growth and cell yield of ammonia oxidizing bacteria
Arch. Microbiol. 133 pp. 50-54
- 71 KUMER N.J. et al, 1983 - Studies on nitrification of aniline with acclimated sludge
Biotechn. Bioeng. 26 pp. 197-202
- 72 LEES M., 1954 - The biochemistry of the nitrifying bacteria
Symposium on autotrophic microorganisms
Cambridge University Press, London pp. 84-94
- 73 LESCURE J.P., BOURLET P., 1983 - Traitement de la pollution azotée
Sucrierie Française 71 pp. 153-160
- 74 LESCURE J.P., DELANNOY B., 1984 - Démarrage des fermentations méthaniques - Etude comparative de deux techniques à l'échelle industrielle
Sucrierie Française 82 pp. 141-147

- 75 LESCURE J.P., DELANNOY B., VERRIER D., HONORE S., VASSEUR Ch., 1985 -
 Traitement des eaux
 Sucrerie Française 93 pp. 157-164
- 76 LEWANDOWSKI S., 1985 - Nitrification process in activated sludge with
 suspended marble articles
 Water Research 19 pp. 535-539
- 77 LEWIS R.F., PRAMER D., 1958 - Isolation of Nitrosomonas in pure culture
 J. of Bact. 76 pp. 524-528
- 78 LOVELESS J.E., PAINTER H.A., 1968 - The influence of metal ion
 concentration and pH value on the growth of a Nitrosomonas strain
 isolated from activated sludge
 J. Gen. Microbiol. 52 pp. 1-14
- 79 MARTIN G., 1979 - Problème de l'azote dans les eaux
 Technique et Documentation 279 p.
- 80 MARTIN G., RICHARD Y., 1982 - Elements of the inhibition of nitrifying
 bacteria
 Water Sci. Tech. 14 pp. 781-794
- 81 MATIN A., 1978 - Organic nutrition of chemolithotrophic bacteria
 Ann. Rev. Microbiol. 32 pp. 433-468
- 82 MATULEWICH V.A., STROM P.F., FINSTEIN H.S., 1975 - Length of incubation
 for enumerating nitrifying bacteria present in various environments
 Applied Microbiol. 29 pp. 265-268
- 83 MEIKLEJOHN J., 1950 - The isolation of Nitrosomonas europaea in pure
 culture
 J. Gen. Microbiol. 4 pp. 185-191
- 84 MEIKLEJOHN J., 1954 - Some aspects of the physiology of the nitrifying
 bacteria
 Symposium on autotrophic microorganisms
 Cambridge University Press, London pp. 68-83
- 85 MIDDLEBROOKS E.J., PANO A., 1983 - Nitrogen removal in aerated lagoons
 Water Research 17 pp. 1369-1378
- 86 MULTON J.L., BIZOT H., MARTIN G., 1981 - Eau - Humidités relatives -
 Tome IV-1
 Techniques d'analyses et de contrôle dans les
 I.A.A. pp. 1-45
 Ed. Technique et Documentation - APRIA
- 87 NAVARRO J.M., BERTINI D., FAUP G.M., 1984 - Conservation de Nitrobacter
 par congélation
 TSM - L'eau 4 pp. 191-197

- 88 NELSON , PARKINSON, 1978 - Effect of starvation on survival of three bacterial isolates from an arctic soil
Can. J. Microbiol. 24 pp. 1460-1467
- 89 PAINTER H.A., 1970 - A review of litterature on inorganic Nitrogen metabolism in micro-organisms
Water Research 4 pp. 393-450
- 90 PAINTER H.A., LOVELESS J.E., 1983 - Effect of t° and pH value on the growth-rate constants of nitrifying bacteria in the activited sludge process
Water Research 17 pp. 237-248
- 91 PAN P., UMBREIT W.W., 1971 - Growth of mixed cultures of autotrophic and heterotrophic organisms
Can. J. Microbiol. 18 pp. 153-156
- 92 PHILIPOT J.M., 1981 - Elimination des diverses formes de l'azote d'un effluent urbain ou industriel avant son rejet dans le milieu naturel
Génie rural 12 pp. 13-19
- 93 PODUSKA R.A., ANDREWS J.F., 1975 - Dynamics of nitrification in the activated sludge process
J.W.P.C.F. 47 pp. 2599-2619
- 94 POSTGATE J.R., HUNTER J.R., 1962 - The survival of starved Bacteria
J. Gen. Microbiol. 29 pp. 233-263
- 95 PRAKASAM T.B.S. et coll., 1974 - Nitrogen removal from a concentrated waste by nitrification and denitrification
Proc. 29th Ind. Waste Conf. Purdue Univ.
pp. 497-509
- 96 PRAKASAM T.B.S., LUE-HING C., BOGUSH E., ZENZ D.R., 1979 - Pilot-scale studies of single stage nitrification
J.W.P.C.F. 51 pp. 1904-1918
- 97 QUINLAN A.V., 1986 - Optimum temperature shift for Nitrobacter winogradskyi
Water Research 20 pp. 611-617
- 98 RANDALL C.W., BUTH D., 1984 - Nitrite build-up in activated sludge resulting from temperature effects
J.W.P.C.F. 56 pp. 1039-1044
- 99 RAPPORT E.P.A., 1975 - Nitrogen control and phosphorus removal in sewage treatment
Ed. D.J. de RENZO, N-Jersey
- 00 RENNIE R.J., SCHMIDT E.L., 1977 - Immunofluorescence studies of Nitrobacter populations in soil
Can. J. of Microbiol. 23 pp. 1011-1017
- 01 RICHARD Y., BRENER L., MARTIN G., 1979 - Nitrification des eaux souterraines et des eaux clarifiées
TSM - L'Eau 3 pp. 157-163

- 02 ROQUES H., CAPDEVILLE B., SEROPIAN J.C., GRIGOROPOULOU, 1984
Oxygenation par le peroxyde d'hydrogene des biomasses fixees utilisees
en traitement biologique des eaux
Water Research 18 pp. 103-110
- 03 SCOTT W.J., 1958 - The effect of residual water on the survival of
dried bacteria during storage
J. Gen. Microbiol. 19 pp. 624-633
- 04 SEUX R., SOULARD B., BOUTIN P., BECHAC J.P., 1985 - Apports en azote et
en phosphore dans les retenues - Cas de la Rance Superieure
TSM - L'eau 6 pp. 265-272
- 05 SHARMA B., AHLERT R.C., 1977 - Nitrification and Nitrogen removal
Water Research 11 pp. 897-925
- 06 SKINNER F.A., WALKER N., 1961 - Growth of Nitrosomonas europaea in
batch and continuous culture
Arch. Mikrobiol. 38 pp. 339-349
- 07 SMITH A.J., HOARE D.S., 1968 - Acetate assimilation by Nitrobacter
agilis in relation to its "obligate autotrophy"
J. of Bact. 95 pp. 844-855
- 08 SOMVILLE M., 1978 - A method for the measurement of nitrification rates
in water
Water Research 12 pp. 843-848
- 09 SORIANO S., WALKER N., 1968 - Isolation of ammonia-oxidizing
autotrophic bacteria
J. Applied Bacteriol. 31 pp. 493-497
- 10 STANLEY R.M., SCHMIDT E.L., 1980 - Serological diversity of Nitrobacter
sp from soil and aquatic habitats
Appl. Env. Microbiol. 41 pp. 1069-1071
- 11 STEINMÜLLER W., BOCK E., 1976 - Growth of Nitrobacter in the presence
of organic matter - I - Mixotrophic growth -
II - Chemo-organotrophic growth
Arch. Mikrobiol. 108 pp. 299-304
- 12 STREMSTRON M.K., PODUSKA R.A., 1980 - The effect of dissolved oxygen
concentration on nitrification
Water Research 14 pp. 643-649
- 13 STROM P.F., MATULEWICH V.A., FINSTEIN M.S., 1976 - Concentrations of
nitrifying bacteria in sewages, effluents and a receiving stream and
resistance of these organisms to chlorination
Appl. Env. Microbiol. 31 pp. 731-737
- 14 SUCRERIE FRANCAISE - 1986 Présentation de l'I.R.I.S. - Numéro spécial
103 Avril pp. 108-109

- 15 SUTTON P.M., MURPHY K.L., JANK B.E., MONAGHAN B.A., 1975 - Efficacy of biological nitrification
J.W.P.C.F. 47 pp. 2665-2673
- 16 SUZUKI I. et coll., 1974 - Ammonia or ammonium ions as substrate for oxidation by Nitrosomonas europaea cells and extracts
J. of Bact. 120 pp. 556-558
- 17 SZWERINSKI H., GAISER S., BARDTKE D., 1985 - Immunofluorescence for the quantitative determination of nitrifying bacteria : Interference of the test in biofilm reactors
Appl. Microbiol. Biotechnol. 21 pp. 125-128
- 18 TANAKA H., UZMAN S., DUNN I.J., 1981 - Kinetics of nitrification using a fluidized sand bed reactor with attached growth
Biotechn. Bioengeng. 23 pp. 1683-1702
- 19 TANAKA H., DUNN I.J., 1982 - Kinetics of biofilm nitrification
Biotechn. Bioengeng. 24 pp. 669-689
- 20 TOMLINSON T.G., BOON A.G., TROTMAN C.N.A., 1966 - Inhibition of nitrification in the activated sludge process of sewage disposal
J. Appl. Bact. 29 pp. 266-291
- 21 TRAMPER J., SUWINSKA-BOROWIEC G., KLAPWIJK A., 1985 - Characterization of nitrifying bacteria immobilized in calcium alginate
Enzyme Microb. Technol. 7 pp.155-160
- 22 VAN DROOGENBROECK R., LAUDELOUT H., 1967 - Phosphate requirements of the nitrifying bacteria
Antonie Van Leeuwenhoek 33 pp. 287-296
- 23 VAN GINKEL C.G., TRAMPER J., LUYBEN K., KLAPWIJKA, 1983 - Characterization of Nitrosomonas europaea immobilized in calcium alginate
Enzyme Microb. Technol. 5 pp. 297-303
- 24 VERRIER D., LESCURE J.P., DELANNOY B., ALBAGNAC G., 1985 - Full-scale methanization of sugary waste-waters in a down-flow anaerobic filter
Energy from Biomass - 3rd E.C. Conference
pp. 547-551
- 25 WALKER N., 1978 - On the diversity of nitrifiers in nature - In microbiology ASM conference
Ed. D. SCHLESSINGER
- 26 WALLACE W., NICHOLAS D.J.D., 1969 - The biochemistry of nitrifying microorganisms
Biol. Rev. 44 pp. 359-391

- 127 WATANABE Y. et al. 1980 - Nitrification kinetics in a rotating biological disc reactor
Prog. Wat. Tech. 12 pp. 233-240
- 128 WATSON S.W., WATERBURY J.B., 1971 - Characteristics of two marine nitrite oxidizing bacteria
Arch. Mikrobiol. 77 pp. 203-220
- 129 WATSON S.W., VALOIS F.W., WATERBURY J.B., 1979 - The family Nitrobacteriaceae in Prokaryotes
Chap. 80 pp. 1004-1022
- 130 WINOGRADSKY, 1892 - Contributions à la morphologie des organismes de la nitrification
Archive des Sciences Biologiques 1
p.p. 86-137
- 131 WONG-CHONG G.H., LOEHR R.C., 1975 - The kinetics of microbial nitrification
Water Research 9-10 pp. 1099-1106
- 132 WUHRMANN K., GUJER W., 1976 - Bases microbiologiques et dynamiques des processus de nitrification et de dénitrification dans l'épuration biologique des eaux usées
Rapport international - Cours IRCHA 23 p.
- 133 YAHY H., GRASMICK A., ELMALEH S., FAUP G.M., 1982 - Nitrification par reacteur a cellules immobilisees en couche fixe et oxygénation par le peroxyde d'hydrogène
Environmental Technology Letters 3
Letters 3 pp. 281-288
- 134 YOUNG J.C., BAUMANN E.R., WALL D.J., 1975 - Packed-bed reactors for secondary effluent B.O.D. and ammonia removal
J.W.P.C.F. 47 pp. 46-56

ANNEXES

ANNEXE 1

METHODES ANALYTIQUES

On utilise en général des méthodes (Françaises) standardisées.

I - DOSAGE DES FORMES DE L'AZOTE

- . Azote ammoniacal : NF T 90-015
 - . Méthode volumétrique après distillation au Büchi
 - . Méthode colorimétrique au réactif de Nessler (Orange - 520 nm)

- . Azote total : Méthode de Kjeldahl
 - . Minéralisation de l'azote puis dosage de l'ammoniac formé

- . Azote nitreux : Méthode de Griess
 - . Méthode colorimétrique au chlorhydrate d' α -naphtylamine (Rose - 420 nm)

- . Azote nitrique : NF T 90-012 modifiée
 - . Méthode colorimétrique au salicylate de sodium (Jaune - 430 nm).

On utilise également des tests quantitatifs

- . Merckoquant 10 007 (NO_2^-)
- . Merckoquant 10 020 (NO_3^-)

II - AUTRES DOSAGES

- . Demande chimique en oxygène : NF T 90-101
 - . Méthode volumétrique par le Bichromate de potassium

- . Carbone Organique Total : Four - analyseur Beckmann et Carbone minéral
 - . Méthode par absorption du CO₂ formé
- . Oxygène dissous : NF T 90-106
 - . Méthode électrochimique par électrode polarographique
- . Matières en suspension : NF T 90-105 et Matières volatiles en suspension
 - . Méthodes par pesées à 105°C et 450°C après filtration ou centrifugation de l'échantillon
- . Alcalinité - T.A.C. : NF T 90-036
 - . Méthode potentiométrique de neutralisation de l'échantillon à pH 4,3
- . Calcium : Absorption atomique sur Perkin Elmer 5 000
 - . Méthode spectrophotométrique de flamme
- . Acides gras volatils : Chromatographe Varian 3 700
 - . Méthode chromatographique en phase gazeuse Détecteur à ionisation de flamme
- . Phosphates (Ortho) : NF T 90-023
 - . Méthode colorimétrique phosphomolybdique (Bleu - 880 nm)

III - TESTS COLORIMÉTRIQUES QUALITATIFS

Adaptation de méthodes classiques à la titration sur microplaques (200 µl de milieu)

- . Azote nitreux : Méthode à l'acide sulfamilique
Violet = +
Incolore = -

- . Azote nitrique : Réactif à la Brucine après disparition des nitrites qui interfèrent à l'acide amidosulfurique 10 %
Rouge = +
Incolore = -

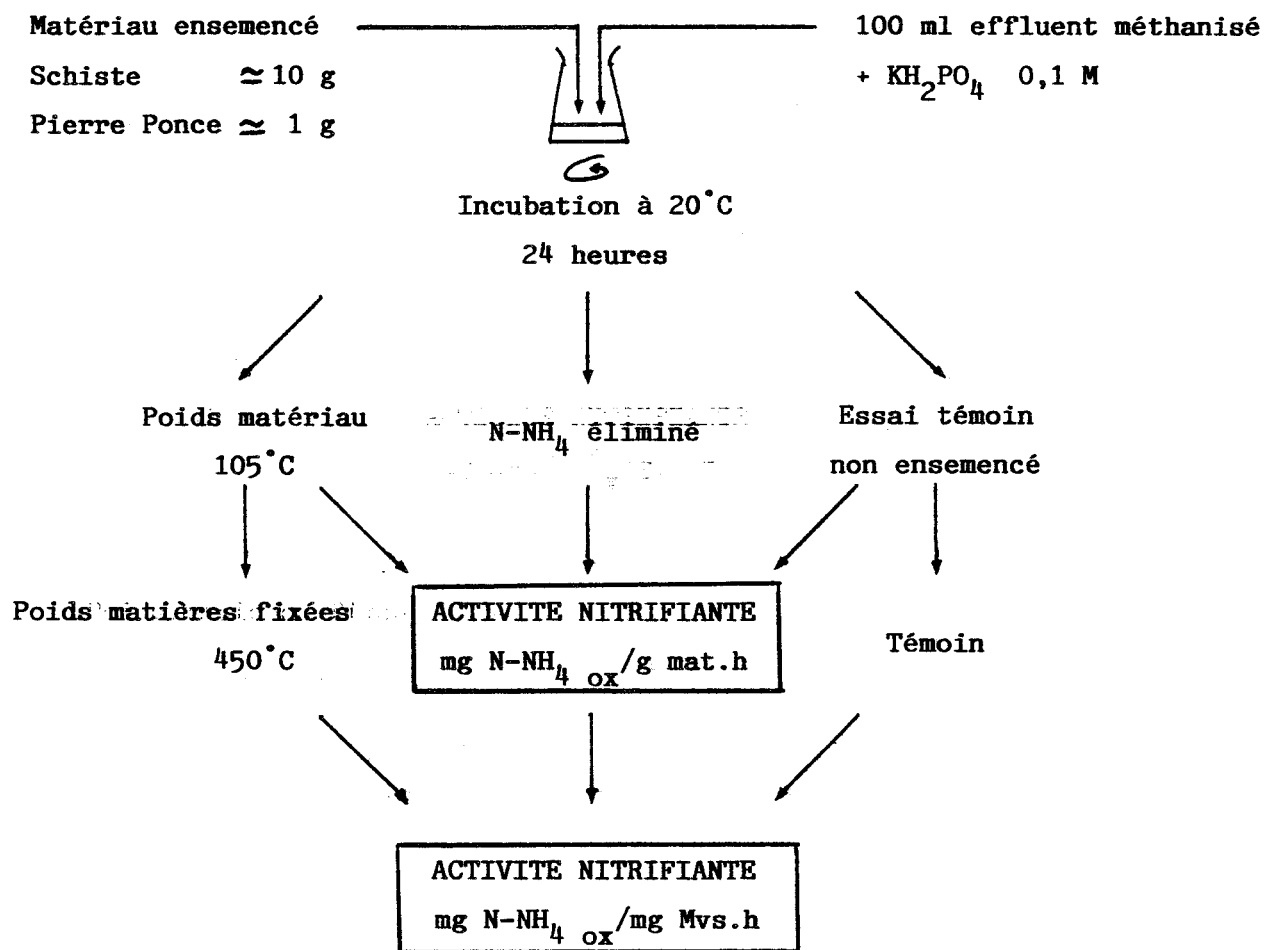


FIGURE 23 : TEST D'ACTIVITE NITRIFIANTE

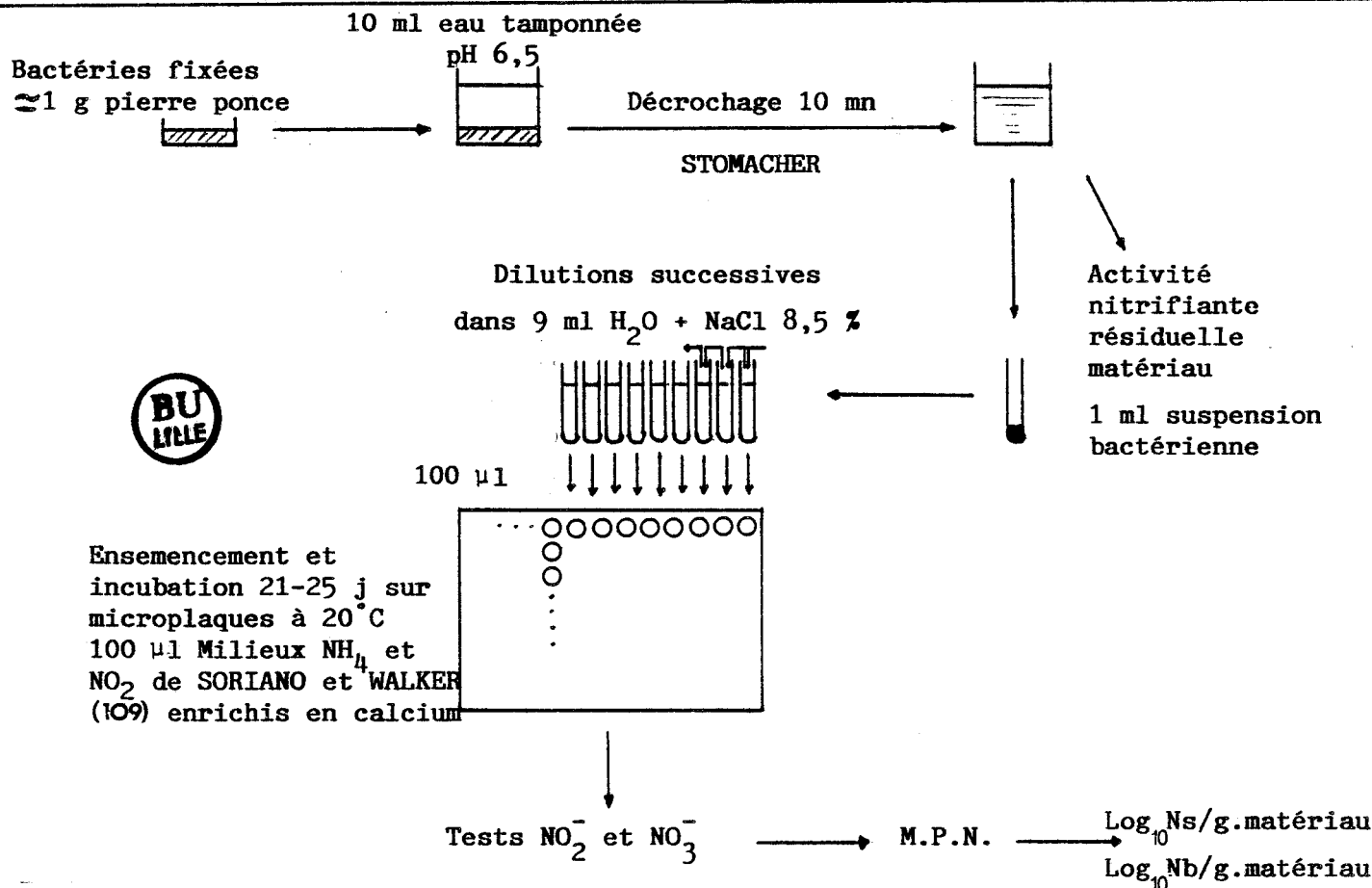


FIGURE 24 : NUMERATION BACTERIES NITRIFIANTES

ANNEXE 2

METHODES MICROBIOLOGIQUES

I - TEST D'ACTIVITE NITRIFIANTE

Le test consiste à incuber à 20°C une masse précise de matériau ensemencé dans un milieu tamponné contenant de l'azote ammoniacal. On mesure la disparition de cet azote ammoniacal en fonction du temps, par rapport à un témoin non ensemencé. Ces tests en Batch sont réalisés sur table secouante BIOBLOCK Réf. 74402 à 200 tours/mn. Le protocole est résumé sur la figure 23.

Deux séries de tests sont faits :

- sur 24 heures d'incubation, on mesure la quantité d'azote éliminé
- jusqu'à disparition totale de l'azote ammoniacal, on mesure le temps nécessaire à l'épuisement du milieu.
(Limite = 0,2 mg N/l)

II - NUMERATIONS DE Nitrosomonas sp ET Nitrobacter sp APRES DECROCHAGE SUR PIERRE-PONCE

Principe : Décrocher les bactéries nitrifiantes de leur support et les compter par la technique MPN de dilutions successives.

Protocole : Voir figure 24

Etudes préliminaires :

- Optimisation du temps de décrochage au STOMACHER 80
- Optimisation du temps d'incubation nécessaire à la revivification des germes (82)
- Etude statistique d'homogénéité du matériau prélevé
- Choix du milieu d'incubation (30)
- Adaptation de méthodes d'analyses classiques aux tests de révélation NO₂ et NO₃ (Annexe 1).

ANNEXE 3

METHODES DE CONSERVATION - DESSICATION ET IMMERSION

I - METHODE DE DESSICATION

On place les dessicateurs en atmosphère contrôlée avec des solutés qui ont la propriété de stabiliser l'humidité du milieu et de ne pas manifester de toxicité envers les bactéries (25,86).

Soluté	Concentration	aw théorique	aw mesuré
Silica Gel		0	0,12 (*)
KC ₂ H ₃ O ₂	255 g%g H ₂ O	0,22	0,35 (**)
K ₂ CO ₃	140 g%g	0,43	0,44
NaNO ₂	72 g%g	0,66	0,66
NaCl	36 g%g	0,75	0,78
KCl	35 g%g	0,83	0,84
Immersion (***)		1	1

La stabilisation des dessicateurs est inférieure à 72 heures. L'humidité relative des milieux est mesurée périodiquement par des hygromètres placés dans chaque enceinte fermée.

II - METHODE D'IMMERSION

II-1 Milieux organiques

. Milieux à base d'eau nitrifiée

Le rapport C/N est compris entre 7,5 et 8.

- (*) aw = 0,02 après renouvellement du Silica Gel à 2 semaines
(**) Ecart toujours observé
(***) L'immersion est réalisée en effluent de digesteur pré-oxygéné

(COMPOSE ORGANIQUE	: COT (mg C/l)	: C. min. (mg C/l)	: NO ₃ ⁻ (mg N/l)	: pH)
(Acétate de sodium	: 963	: 41	: 121,3	: 7,5)
(Propionate de calcium	: 886	: 41	: 117,4	: 7,7)
(Pyruvate de sodium	: 952	: 46	: 127,4	: 7,6)
(Formate de calcium	: 954	: 44	: 129,1	: 7,6)
(Lactate de calcium	: 965	: 41	: 124,7	: 7,5)
(Mélange A.G.V.	: 945	: 36	: 126,0	: 8,5)
(Extrait de levure purifiée	: 904	: 46	: 113,7	: 7,0)
(Témoins eau nitrifiée	: 26	: 49	: 124,0	: 7,5)

. Milieux à base d'eau de bassin non traitée

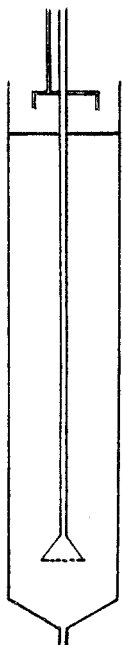
pH	5,75
C.O.T.	989 mg C/l
Carbone minéral	216 mg C/l
Azote ammoniacal	58,4 mg N/l
Azote nitrique	Néant
Calcium	450 mg Ca/l

II-2 Eau de forage

Les concentrations indiquées correspondent à la moyenne de plusieurs analyses, très semblables.

pH	7,65
C.O.T.	Traces
Carbone minéral	85 mg C/l
Azote ammoniacal	0,2 mg N/l
Azote nitrique	0,9 mg N/l
Calcium	52 mg Ca/l

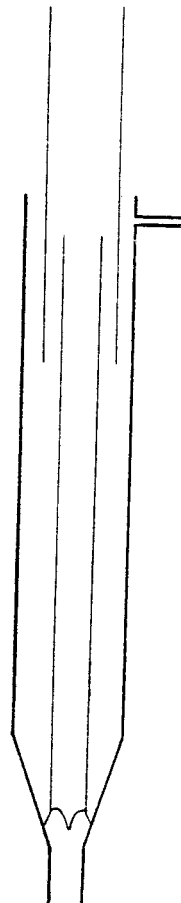
SCHMAS DES REACTEURS
DE LABORATOIRE



$V_{\text{utile}} = 700 \text{ ml}$

Biofiltre

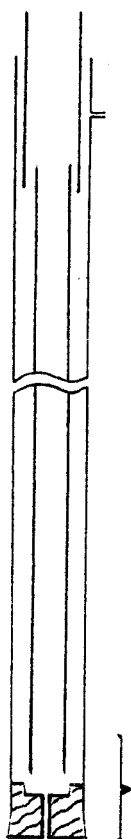
Ech 1/5



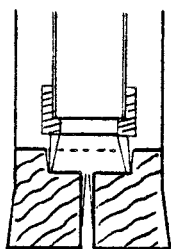
$V_{\text{utile}} = 700 \text{ ml}$

lit turbulent type 1

Ech 1/5

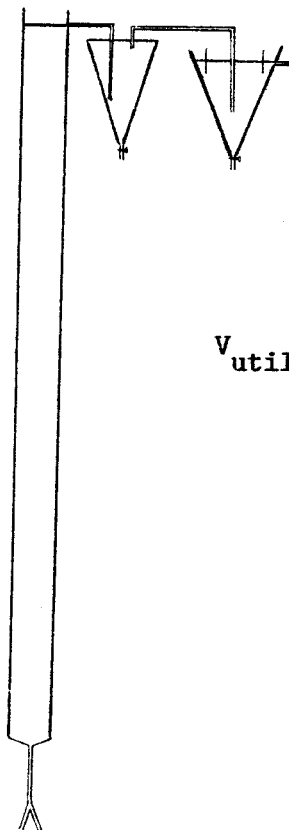


$V_{\text{utile}} = 1 \text{ 650 ml}$



Lit turbulent type 2

Ech 1/4



$V_{\text{utile}} = 10.1 \text{ l}$

Lit turbulent type 3

Ech 1/20



ANNEXE 5

OBSERVATIONS EN MICROSCOPIE ELECTRONIQUE A BALAYAGE

FIGURE 25 : OBSERVATIONS DES BIOFILMS NITRIFIANTS
(M.E.B. JEOL JSM - 35 C F)

a - Matériau granulaire fin : La pierre ponce neuve (au centre de la photo) présente de nombreuses cavités permettant l'adsorption et le piégeage des bactéries. La pierre ponce érodée est recouverte d'une pellicule de carbonate de calcium. L'observation est faite après 2 mois de fonctionnement. La macroporosité du matériau disparaît totalement. Le support peut être assimilé à des billes de carbonate de calcium, sur lequel les bactéries vont devoir se développer (G x 100 - Barre = 100 μm)

b - Détail de porosité : Les cavités du matériau sont colonisées par des amas bactériens. La préparation microscopique entraîne le décollement du biofilm qui se rétracte (photo en haut à droite). Le réseau bactérien est assez profond. La répartition en grappes des micro-organismes localisés à la surface du matériau est assez irrégulière. L'observation est faite après un mois de fonctionnement (G x 1 000 - Barre = 10 μm).

c - Enchevêtrement de bactéries : Les observations sont rendues difficiles par le développement d'une matrice "mucilagineuse" très importante dans un biofilm nitrifiant. Les micro-organismes dominants sont morphologiquement similaires à des bactéries nitrifiantes, ovoïdes, et regroupées en flocons. On remarque très peu de bactéries isolées (G x 6000 - Barre = 1 μm).

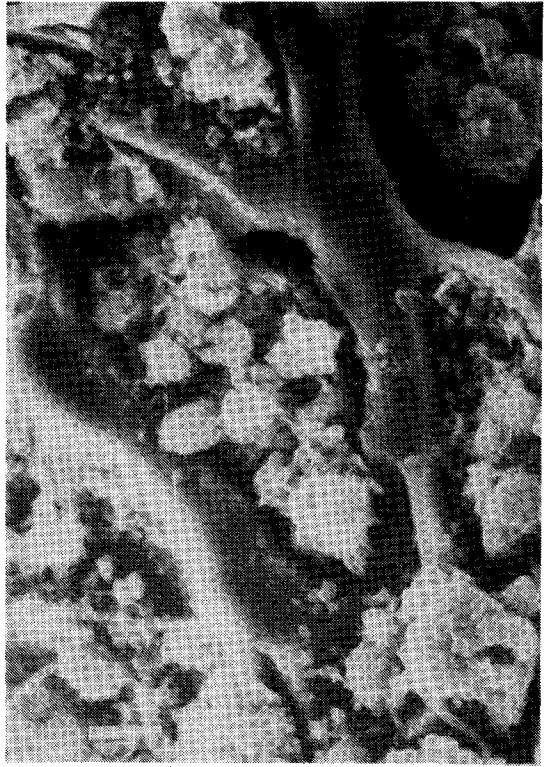
d - Détail de bactéries nitrifiantes : La seule morphologie d'une bactérie ne suffit pas pour assurer son identification certaine. Cependant, compte tenu de la forme caractéristique de ces bactéries et de leur taille, on peut les assimiler à Nitrobacter sp (forme de "poire", 1 μm) (G x 30 000 - Barre = 1 μm).

Ces observations ont été faites à l'INRA grâce au concours précieux de D. VERRIER.

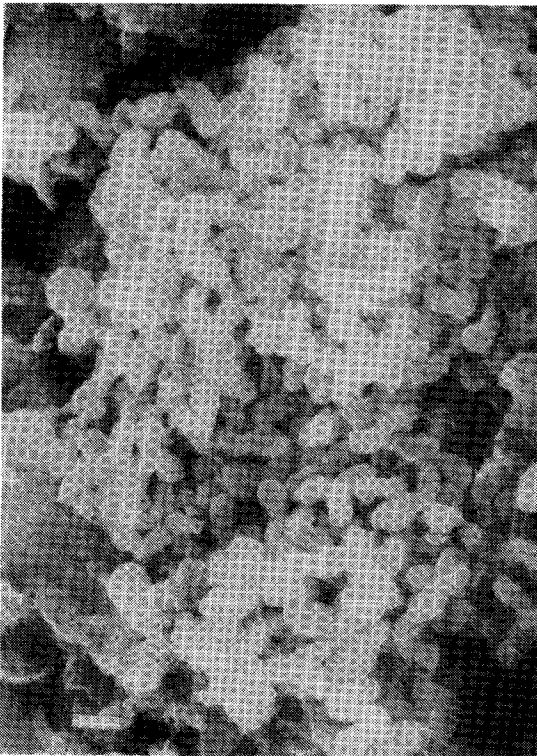
a



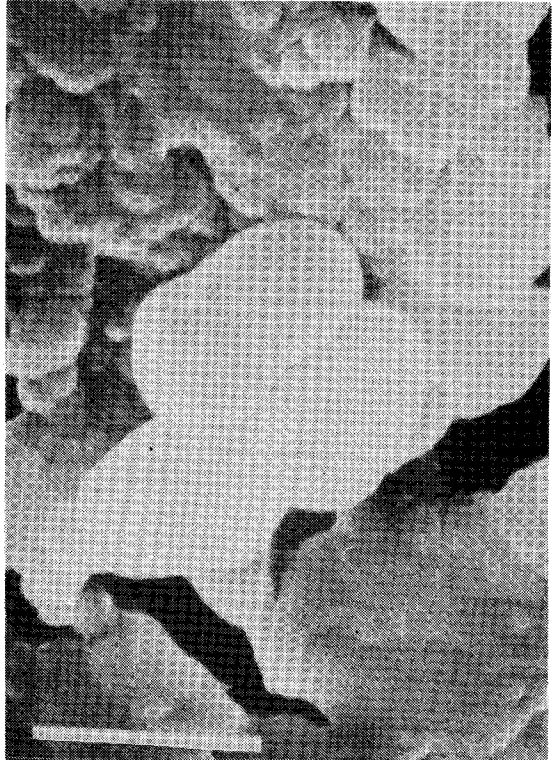
b



c



d



ANNEXE 6

PUBLICATIONS

- LESCURE J.P., DELANNOY B., 1984 - Démarrage des fermentations méthaniques - Etude comparative de deux techniques à l'échelle industrielle

Sucrerie Française 82 pp. 141-147

- VERRIER D., LESCURE J.P., DELANNOY B., ALBAGNAC G., 1985 - Full-scale methanization of sugary waste-waters in a down flow anaerobic filter

Energy from Biomass - 3rd Conference pp. 547-551

- LESCURE J.P., DELANNOY B., VERRIER D., HONORE S., VASSEUR Ch., 1985 - Traitement des eaux

Sucrerie Française 93 pp. 157-164

- DELANNOY B., DUBOURGUIER H.C., LESCURE J.P., 1986 - Biological nitrification as a post treatment of anaerobic effluents - Application on sugary waste-waters

AQUATECH' 86 - Amsterdam - EWCPA Conference -
pp. 399-411

