

## **NOTE TO USERS**

**This reproduction is the best copy available.**

UMI<sup>®</sup>



BERNARD LAVALLÉE

**VARIATION DU TAUX DE DÉPÉRISSEMENT  
DE LA BIOMASSE ACTIVE HÉTÉROTROPHE  
DU MODÈLE ASM1**

Mémoire présenté à  
la Faculté des Études supérieures  
de l'Université Laval  
pour l'obtention  
du grade de maître ès sciences (M. Sc.)

Département de Génie civil  
Faculté des Sciences et Génie  
Université Laval

Novembre 2000



National Library  
of Canada

Acquisitions and  
Bibliographic Services

395 Wellington Street  
Ottawa ON K1A 0N4  
Canada

Bibliothèque nationale  
du Canada

Acquisitions et  
services bibliographiques

395, rue Wellington  
Ottawa ON K1A 0N4  
Canada

*Your file Votre référence*

*Our file Notre référence*

The author has granted a non-exclusive licence allowing the National Library of Canada to reproduce, loan, distribute or sell copies of this thesis in microform, paper or electronic formats.

The author retains ownership of the copyright in this thesis. Neither the thesis nor substantial extracts from it may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

L'auteur a accordé une licence non exclusive permettant à la Bibliothèque nationale du Canada de reproduire, prêter, distribuer ou vendre des copies de cette thèse sous la forme de microfiche/film, de reproduction sur papier ou sur format électronique.

L'auteur conserve la propriété du droit d'auteur qui protège cette thèse. Ni la thèse ni des extraits substantiels de celle-ci ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans son autorisation.

0-612-57817-8

Canada

## RÉSUMÉ

Par le biais des équations et des méthodes utilisées avec le modèle ASM1 (Activated sludge model no. 1) de l'IAWQ (International Association For Water Quality), l'étude cherchait à vérifier s'il est possible de distinguer le taux de déperissement de la biomasse active hétérotrophe au cours de la phase de croissance ( $b_{Hcrois}$ ), de celui obtenu au cours de la phase de déperissement ( $b_{Hend}$ ).

L'étude visait à vérifier expérimentalement l'influence de la régulation enzymatique sur l'évaluation du taux de déperissement de la biomasse active hétérotrophe, afin de définir la validité de la méthode. Les méthodes respirométriques généralement utilisées pour l'évaluation des coefficients cinétiques du modèle ASM1, ainsi qu'une méthode enzymatique, ont été utilisées pour l'évaluation du taux de déperissement.

Selon les mesures enzymatiques et respirométriques effectuées, nous avons constaté que le taux de respiration spécifique de la biomasse active hétérotrophe varie avec la durée de la carence en substrat. Ainsi, la méthode de mesure en cuve endogène généralement utilisée pour évaluer  $b_{Hend}$ , serait éventuellement peu représentative du taux de déperissement en station ou en pilote. Aussi, la précision de la méthode proposée pour l'évaluation du  $b_{Hcrois}$ , est potentiellement insuffisante pour nous permettre de distinguer  $b_{Hcrois}$  de  $b_{Hend}$ .

## **REMERCIEMENTS**

Je tiens à remercier spécialement M. Paul Lessard pour toute sa sollicitude, toutes les ressources mises à ma disposition, ainsi que pour toute la marge de manœuvre qu'il m'a laissée dans l'orientation que j'ai donnée à ce travail. J'ai apprécié toute l'autonomie qu'il m'a laissée dans l'élaboration de ce travail. Ses interventions se sont avérées à propos, m'ont permis d'utiliser adéquatement le temps dont je disposais, ainsi que de parfaire plusieurs parties de mon travail.

J'aimerais adresser des remerciements particuliers à Yann Le Bihan pour toute l'aide qu'il m'a apportée, que ce soit le soutien au laboratoire ou dans mes recherches bibliographiques. Sans son aide, les connaissances que j'ai acquises en microbiologie et en biochimie seraient moins approfondies.

Je remercie également Mme Marie-Louise Tremblay pour tout le soutien qu'elle m'a apporté au cours de mes expérimentations parfois laborieuses. Les nombreuses conversations que nous avons eues se sont avérées très enrichissantes.

J'aimerais apporter une attention particulière à Vincent Martinage, Stéphane Déléris pour toutes les discussions intéressantes que nous avons eues et les nombreuses heures passées ensemble.

Je ne pourrais terminer sans remercier M. Étienne Paul ainsi que tout le personnel que j'ai côtoyé durant mon stage au LIPE de l'INSAT, spécialement Aldo et Évrard. Au cours de mon séjour à Toulouse, l'accueil a été particulièrement chaleureux et me laisse un souvenir impérissable.

Enfin, je remercie infiniment Manon pour son appui indéfectible, à qui je voue toute mon affection. Je n'oublie pas Vincent et Léandre qui portent un grand intérêt au travail de leur papa.

## **TABLE DES MATIÈRES**

RÉSUMÉ .....	i
REMERCIEMENTS.....	ii
TABLE DES MATIÈRES .....	iii
LISTE DES ANNEXES .....	vi
LISTE DES FIGURES .....	vii
LISTE DES TABLEAUX .....	ix
LISTE DES SYMBOLES.....	x
<b>CHAPITRE 1 INTRODUCTION .....</b>	<b>1</b>
<b>CHAPITRE 2 AJUSTEMENTS MÉTABOLIQUES.....</b>	<b>5</b>
2.1 PHASE DE CROISSANCE .....	5
2.2 PHASE DE CARENCE .....	6
2.3 RÉPONSE STRINGENTE.....	8
2.4 ÉNERGIE DE MAINTIEN .....	14
2.5 MORT CELLULAIRE .....	16
2.6 CONCLUSION.....	19
<b>CHAPITRE 3 MODÈLES MATHÉMATIQUES REPRÉSENTANT LA RESPIRATION</b> <b>    ENDOGENÈ.....</b>	<b>21</b>
3.1 CONCEPT CLASSIQUE DE RESPIRATION ENDOGENÈ.....	22
3.2 FRACTIONNEMENT DE LA BIOMASSE .....	23
3.3 CONCEPT DE MORT-RÉGÉNÉRATION.....	25
3.4 CONCEPT DE MAINTENANCE .....	27
3.5 MODÈLE BASÉ SUR LE BILAN ÉNERGÉTIQUE.....	29
3.6 CONCLUSION.....	31
<b>CHAPITRE 4 MESURE DU TAUX DE DÉPÉRISSEMENT EN PHASE ENDOGENÈ</b> <b>    ET HYPOTHÈSES.....</b>	<b>32</b>
4.1 MÉTHODE DE MESURE DU TAUX DE DÉPÉRISSEMENT DE LA BIOMASSE ACTIVE HÉTÉROTROPHE.....	33

4.2 MÉTHODE ENDOGÈNE .....	33
4.3 MÉTHODE EXOGÈNE.....	35
4.4 CONCLUSION.....	36
<b>CHAPITRE 5 MÉTHODE D'ÉVALUATION PROPOSÉE DU TAUX DE DÉPÉRISSEMENT EN PHASE DE CROISSANCE.....</b>	<b>37</b>
5.1 CROISSANCE EN CUVÉE.....	38
5.2 CROISSANCE EN CHÉMOSTAT .....	39
5.3 CONCLUSION.....	43
<b>CHAPITRE 6 MATÉRIEL ET MÉTHODES .....</b>	<b>45</b>
6.1 DISPOSITIF EXPÉRIMENTAL .....	47
6.1.1 <i>Système de réacteurs</i> .....	47
6.1.2 <i>Cellule respirométrique</i> .....	49
6.2 PROTOCOLE DE MESURE DE LA RESPIRATION .....	51
6.2.1 <i>Cellule respirométrique</i> .....	51
6.2.2 <i>Respiromètres</i> .....	52
6.3 MESURES DE L'ACTIVITÉ ENZYMATIQUE.....	53
6.4 MES ET MVES .....	54
6.5 DÉCOMPTE DE LA MICROFAUNE .....	54
6.6 PRÉLÈVEMENT ET PRÉPARATION DES BOUES .....	55
6.7 PARAMÈTRES CINÉTIQUES PAR DÉFAUT .....	56
<b>CHAPITRE 7 RÉSULTATS.....</b>	<b>57</b>
7.1 ESSAIS EFFECTUÉS À L'UNIVERSITÉ LAVAL .....	57
7.1.1 <i>Déroulement des essais expérimentaux</i> .....	57
7.1.2 <i>Disparition des MVES</i> .....	58
7.1.3 <i>Dépérissement de la microfaune</i> .....	60
7.1.4 <i>Taux de dépérissement de la biomasse active hétérotrophe</i> .....	61
7.1.5 <i>Estimation de la concentration initiale de la biomasse active hétérotrophe</i> .....	64
7.1.6 <i>Mesure de l'activité enzymatique</i> .....	64
7.2 ESSAIS EFFECTUÉS AU LIPE DE L'INSAT.....	66



7.2.1 Déroulement des essais expérimentaux.....	66
7.2.2 Disparition des MVES.....	66
7.2.3 Coefficient de dépérissement de la biomasse active hétérotrophe.....	67
7.2.3.1 Dépérissement en réacteurs.....	68
7.2.3.2 Estimation de la concentration initiale de la biomasse active hétérotrophe.....	70
7.2.3.3 Dépérissement en respiromètres.....	71
7.2.3.4 Dégradation de l'ATU.....	73
<b>CHAPITRE 8 DISCUSSION.....</b>	<b>77</b>
8.1 PRÉCISION DES MESURES.....	77
8.1.1 Dosage des réactifs.....	78
8.1.2 Instrumentation.....	79
8.1.3 Échantillons.....	80
8.2 VALIDITÉ DE LA MÉTHODE.....	82
<b>CHAPITRE 9 CONCLUSION.....</b>	<b>87</b>
<b>RÉFÉRENCES.....</b>	<b>92</b>

## **LISTE DES ANNEXES**

ANNEXE A	Mesures respirométriques .....	100
Annexe A.1	Vérification de la réponse de la sonde .....	101
Annexe A.2	Respiration sur divers substrats.....	103
Annexe A.3	Protocole des mesures respirométriques .....	105
ANNEXE B	Mesure de l'activité DHA .....	108
Annexe B.1	Courbe standard de TF .....	109
Annexe B.2	Activité DHA (Mesures au TTC).....	111
Annexe B.2.1	Activité DHA sur divers substrats (Mesures au TTC) .....	112
Annexe B.2.2	Activité DHA spécifique (Mesures au TTC) .....	115
Annexe B.3	Activité DHA (Mesures au INT).....	118
Annexe B.3.1	Activité DHA pour différents protocoles (Mesures au INT) .....	119
Annexe B.3.2	Activité DHA spécifique (Mesures au INT) .....	123
Annexe B.4	Protocole de la mesure de l'activité DHA.....	126
ANNEXE C	Expériences menées à l'Université Laval – Résultats bruts .....	130
Annexe C.1	Suivi des réacteurs.....	131
Annexe C.2	Décompte de la microfaune.....	135
Annexe C.3	Respiration des boues de Bernières.....	137
Annexe C.4	Activité DHA des boues de Bernières.....	139
ANNEXE D	Expériences menées au LIPE – Résultats bruts .....	141
Annexe D.1	Suivi des MVES des boues de Ginestous .....	142
Annexe D.2	Substrat OCDE.....	144
Annexe D.3	Respiration des boues de Ginestous.....	146
Annexe D.4	Activité DHA des boues de Ginestous.....	149
ANNEXE E	Modèle ASM1 .....	153

## LISTE DES FIGURES

FIGURE 2-1 PHASE D'ÉLONGATION DU PROCESSUS DE SYNTHÈSE D'UNE PROTÉINE (ADAPTÉ DE PRESCOTT ET COLL. 1996) .....	7
FIGURE 2-2 REPRÉSENTATION SCHÉMATIQUE DES STIMULI DE LA RÉPONSE <i>STRINGENTE</i> (ADAPTÉ DE NYSTRÖM, 1998). .....	10
FIGURE 2-3 REPRÉSENTATION SCHÉMATIQUE DES DÉFENSES BACTÉRIENNES CONTRE L'ACTION DES SUPEROXYDANTS (ADAPTÉ DE NYSTRÖM, 1998). .....	11
FIGURE 3-1 CONCEPT CLASSIQUE DE RESPIRATION ENDOGÈNE (ADAPTÉ DE HERBERT, 1958) .	23
FIGURE 3-2 CONCEPT DE MAINTENANCE (ADAPTÉ DE PIRT, 1965).....	27
FIGURE 3-3 SCHÉMA DES VOIES MÉTABOLIQUES (ADAPTÉ DE BEEFTINK ET COLL., 1990).....	31
FIGURE 4-1 TAUX DE DÉPÉRISSEMENT ENDOGÈNE ( $B_{HEND}$ ).....	36
FIGURE 5-1 VARIATION DU TAUX DE RESPIRATION LORS D'UNE ALIMENTATION ÉCHELONNÉE	40
FIGURE 6-1 CELLULE DE RESPIROMÉTRIE UTILISÉE AU LIPE DE L'INSAT .....	50
FIGURE 6-2 CELLULE DE RESPIROMÉTRIE UTILISÉE À L'UNIVERSITÉ LAVAL.....	50
FIGURE 6-3 EXEMPLE DE RESPIROGRAMME OBTENU AU LIPE .....	52
FIGURE 7-1 SUIVI DU PH DANS LES TROIS RÉACTEURS (UNIVERSITÉ LAVAL).....	58
FIGURE 7-2 TAUX DE DISPARITION DES MVES DES BOUES DE BERNIÈRES DANS LES TROIS RÉACTEURS .....	59
FIGURE 7-3 DÉCOMPTÉ DE LA MICROFAUNE DES BOUES DE BERNIÈRES DANS LES TROIS RÉACTEURS .....	61
FIGURE 7-4 TAUX DE DÉPÉRISSEMENT DE LA BIOMASSE ACTIVE HÉTÉROTROPHE DÉTERMINÉ PAR RESPIROMÉTRIE SUR LES BOUES DE BERNIÈRES.....	62
FIGURE 7-5 MESURE DE L'ACTIVITÉ ENZYMATIQUE DES BOUES DE BERNIÈRES .....	65
FIGURE 7-6 TAUX DE DISPARITION DES MVES DES BOUES DE GINESTOUS.....	67
FIGURE 7-7 COEFFICIENT DE DÉPÉRISSEMENT DE LA BIOMASSE ACTIVE HÉTÉROTROPHE DES BOUES DE GINESTOUS. ....	69
FIGURE 7-8 RESPIROGRAMME DU RESPIROMÈTRE NO. 1 .....	72
FIGURE 7-9 RESPIROGRAMME DU RESPIROMÈTRE NO. 2 .....	73
FIGURE 7-10 RESPIROGRAMME NO.2: RESPIRATION SUR L'ATU .....	75
FIGURE 8-1 ÉVOLUTION DU RAPPORT $RO_{2H}/DHA_H$ .....	83

FIGURE 8-2 ÉVOLUTION DU RAPPORT  $RO_{2\text{ENDO}}/RO_{2\text{MAX}}$  DES BOUES DE BERNIÈRES ET DE  
GINESTOUS ..... 85

**LISTE DES TABLEAUX**

TABLEAU 6-1	DESCRIPTION DES SYSTÈMES DE RÉACTEURS .....	48
TABLEAU 6-2	LISTE DE L'INSTRUMENTATION UTILISÉE POUR LA RESPIROMÉTRIE .....	49
TABLEAU 6-3	PROTOCOLE DE MESURE DE LA RESPIRATION .....	51
TABLEAU 6-4	RÉACTIFS UTILISÉS POUR LA MESURE DE L'ACTIVITÉ DHA .....	54
TABLEAU 6-5	MÉTHODE DE MESURE DES MES ET MVES.....	54
TABLEAU 8-1	INCERTITUDES INSTRUMENTALES SUR LES MESURES DE RESPIRATION .....	79
TABLEAU 8-2	DÉVIATIONS (EN VALEUR RELATIVE) ASSOCIÉES AUX VALEURS MESURÉES .....	81
TABLEAU 8-3	INTERVALLES DE CONFIANCE SUR LE TAUX DE DÉPÉRISSEMENT .....	81
TABLEAU 8-4	INTERVALLES DE CONFIANCE SUR $X_{H0}$ CALCULÉ SELON L'ÉQUATION 5-13. ....	82

## LISTE DES SYMBOLES

- $b$  = Taux de déperissement de la biomasse selon Eckenfelder et Watkin (1984) ( $d^{-1}$ )
- $b'_H$  = Taux de déperissement observé de la biomasse hétérotrophe du modèle ASMI ( $d^{-1}$ )
- $b_H = b_{Hend}$  = Taux de déperissement réel de la biomasse hétérotrophe du modèle ASMI ( $d^{-1}$ )
- $b_{Hcrois}$  = Taux de déperissement réel de la biomasse hétérotrophe au cours de la phase de croissance ( $d^{-1}$ )
- $f_i = f_p$  = Fraction inerte observée de la biomasse du modèle ASM
- $f_i = f_p$  = Fraction inerte réelle de la biomasse du modèle ASM
- $m_s = q_m$  = Taux spécifique d'utilisation du substrat pour la maintenance ( $d^{-1}$ )
- $M_0, M_1, M_2$  = Fonctions de saturation
- $q_{obs}$  = Taux spécifique observé d'utilisation du substrat ( $\mu_{obs}/Y$ ) ( $d^{-1}$ )
- $q_{gr} = q_G$  = Taux spécifique d'utilisation du substrat pour la croissance ( $\mu_{vrai}/Y$ ) ( $d^{-1}$ )
- $q_{Send}$  = Taux spécifique d'utilisation des substrats endogènes ( $\mu_e/Y$ ) ( $d^{-1}$ )
- $Q$  = Volume de substrat utilisé (l)
- $rO_{2end}$  = Vitesse de respiration endogène (mg  $O_2$ /l/min ou h)
- $rO_{2Hmax}$  = Vitesse de respiration maximale de la biomasse hétérotrophe (mg  $O_2$ /l/min ou h)
- $rX_H$  = Production de biomasse (mg DCO/l)
- $rS_S$  = Consommation de substrat soluble (mg DCO/l)
- $t$  = temps
- $V_r$  = Volume du réacteur (l)
- $X_d$  = Fraction biodégradable de la biomasse selon Eckenfelder et Watkin (1984)
- $X'_d$  = Fraction biodégradable de la biomasse fraîchement synthétisée selon Eckenfelder et Watkin (1984)
- $X'n$  = Fraction non-biodégradable de la biomasse fraîchement synthétisée selon Eckenfelder et Watkin (1984)
- $X_H$  = Biomasse hétérotrophe du modèle ASMI (DCO/l)
- $X_{He}$  = Biomasse hétérotrophe à l'effluent (DCO/l)
- $X_{H0}$  = Biomasse hétérotrophe initiale lors de l'essai (DCO/l)
- $Y_H$  = Coefficient de rendement de la biomasse hétérotrophe (mg DCO/mg DCO)

$Y_A$  = Coefficient de rendement de la biomasse autotrophe (mg DCO/mg DCO)

$Y_{obs}$  = Coefficient de rendement observé (mg DCO/mg DCO)

$\Delta DCO$  = DCO utilisé par la biomasse

$\Delta rO_2$  = Oxygène consommé par la biomasse entre le temps  $t_i$  et  $t$  (mg/l)

$\Delta S_S$  = Substrat soluble consommé par la biomasse (mg DCO/l)

$\mu_{maxH}$  = Taux de croissance maximal de la biomasse hétérotrophe ( $d^{-1}$ )

$\mu_{maxA}$  = Taux de croissance maximal de la biomasse autotrophe ( $d^{-1}$ )

$\mu_{obs}$  = Taux de croissance observé ( $d^{-1}$ )

$\mu_{vrai}$  = Taux de croissance réel ( $d^{-1}$ )

$\mu_e$  = Taux de dépérissement défini par Herbert (1958) ( $d^{-1}$ )

$\theta_c$  = Âge des boues (d)

## **CHAPITRE 1**

### **INTRODUCTION**

L'épuration des eaux usées urbaines ou industrielles se fait depuis des décennies, entre autres, par voie biologique. Depuis 1942 (Monod, 1949), plusieurs modèles mathématiques ont été proposés pour simuler la cinétique de réaction de la biomasse. Dans le domaine du traitement des eaux usées, des modèles de type macroscopique, c'est à dire basés sur la cinétique globale de la biomasse, ont été utilisés (Tchobanoglous et Burton, 1991; Desjardins, 1986 ; Grady et Roper, 1974; Henze et coll., 1986). En 1986, l'International Association on Water Quality (IAWQ), présentait via un groupe de recherche, un modèle mathématique (ASMI) visant à simuler de façon dynamique le comportement de la biomasse présente dans les systèmes d'épuration des eaux usées (Henze et coll., 1986). Dans tous ces modèles, la cinétique de croissance ou de dépérissement de la biomasse est décrite par une équation du premier ordre, soit par une constante identifiée  $\mu$  et  $k_d$  pour l'ensemble de la biomasse (Tchobanoglous et Burton, 1991; Desjardins, 1986), soit par  $\mu_H$  ou  $\mu_A$  et  $b_H$  ou  $b_A$  pour la biomasse active hétérotrophe ou autotrophe respectivement (Grady et Roper, 1974; Henze et coll., 1986).

Les premiers modèles proposés sont du type statique, et ne peuvent prévoir la réponse d'un système de traitement secondaire, que pour un seul ensemble de conditions données à la fois. Les derniers modèles proposés, grâce à l'avènement de la micro-informatique, visent à simuler de façon dynamique la cinétique de réaction de systèmes de traitement secondaires et tertiaires.



Dans la description du modèle mathématique, le groupe de recherche de l'IAWQ émettait quelques réserves sur la valeur de certains paramètres inclus dans le modèle (Henze et coll., 1986). Le comité s'interrogeait entre autres, sur la valeur constante supposée dans le modèle pour le taux de déperissement de la biomasse ( $b_H$ ). D'ailleurs, selon Gujer et coll. (1999), le modèle ASM1 prédit adéquatement l'efficacité d'un système de traitement mais ne peut prévoir la production de biomasse par le même système. Pour cette raison le présent document s'attarde sur certains mécanismes de respiration endogène impliqués dans la production de solides biologique lors du traitement des eaux usées, plus particulièrement sur le taux de déperissement.

Depuis 1986, quelques auteurs ont démontré que le taux de déperissement peut varier selon que la biomasse est exposée à un milieu aérobie, anoxique ou anaérobie (Siegrist et coll., 1999). D'ailleurs, le modèle ASM1 a été modifié pour inclure la variation du taux de déperissement selon les différentes conditions oxiques (Gujer et coll., 1999)

Certains auteurs s'interrogent d'ailleurs sur la signification des constantes de déperissement mesurées (Van Loosdrecht et Henze, 1999 ; Grady et coll., 1996). Selon ces auteurs, différents ajustements métaboliques se produisent au cours de la respiration endogène, et selon eux, la constante de déperissement mesurée inclut plusieurs phénomènes. Ces derniers ne constituent pas nécessairement une diminution de la quantité de biomasse « vivante », mais incluent potentiellement une réduction du pouvoir respiratoire de la biomasse, et différents processus de sporulation ou de dormance des bactéries.

Par ailleurs, Van Verseveld et coll. (1984) ont démontré que le coefficient de rendement observé de la biomasse variait de façon discontinue. Ces auteurs expliquent ce phénomène par des ajustements métaboliques de la cellule. Plus particulièrement pour des âges de boue supérieurs à 4 ou 5 jours, les ajustements en question, étant donné l'accumulation de régulateurs, induiraient une réponse restrictive (*stringent response*) des processus métaboliques. Cette réponse induirait plusieurs changements métaboliques chez les bactéries (Van Verseveld et coll., 1984).

De plus, récemment, des recherches ont démontré pour la plupart des bactéries, que le décès de la cellule peut être induit par des régulateurs métaboliques (Yarmolinsky, 1995), et varier en présence de substrat (Aizenman et coll., 1996). Selon ces hypothèses, le taux de dépérissement durant la phase endogène ( $b_{\text{Hendogène}}$ ) peut être différent du taux de dépérissement durant la phase de croissance ( $b_{\text{Hcroissance}}$ )

De surcroît, l'expérience démontre que les conditions expérimentales peuvent influencer sur la valeur mesurée de constantes cinétiques caractérisant une biomasse (Sommer et coll., 1998 ; Grady et coll., 1996). De fait, l'évaluation des constantes cinétiques peut être influencée par différents ajustements métaboliques et aussi par les conditions expérimentales.

Cette brève revue de littérature démontre qu'il y a lieu de s'interroger sur la validité de la constante représentant le dépérissement de la biomasse. Il serait donc à propos, de tenter de vérifier si les ajustements métaboliques influent sur la valeur de la constante  $b_H$  et si elle varie en présence de substrat. La question est de savoir si le taux de dépérissement demeure le même en phase de croissance et en phase de dépérissement ( $b_{\text{Hcroissance}} \neq b_{\text{Hendogène}} ?$ ).

L'objectif de ce travail est donc de proposer, de façon préliminaire, une méthode pour évaluer la variation potentielle du taux de dépérissement de la biomasse active hétérotrophe. La problématique considérée ici, consiste à évaluer la variation du taux de dépérissement sur une biomasse en croissance et en dépérissement. Cependant, pour effectuer adéquatement l'évaluation des méthodes de mesure des constantes cinétiques, il faut une bonne connaissance des ajustements métaboliques pouvant se produire au cours du processus expérimental, ainsi qu'une bonne connaissance des conditions pouvant influencer la valeur des constantes. Différentes expérimentations peuvent être requises afin de vérifier l'influence de ces ajustements sur l'évaluation des constantes ciblées. Le mémoire est donc construit comme suit.

Dans un premier temps, le document présente une revue de littérature sur les ajustements métaboliques pouvant se produire chez une biomasse hétérotrophe aérobique facultative au cours d'une période de carence.

Dans un second temps, une méthode expérimentale est proposée pour évaluer le taux de dépérissement de la biomasse au cours de la phase de croissance. Le mémoire présente donc différentes expérimentations qui visent à vérifier si les ajustements métaboliques étudiés exercent une influence significative sur l'évaluation du taux de dépérissement. Cette étape est nécessaire, afin de déterminer si le degré de précision de la méthode proposée est suffisant pour évaluer un différentiel du taux de dépérissement ( $\Delta b_H = b_{Hcroissance} - b_{Hendogène}$ ) statistiquement significatif.

Enfin, le mémoire présente l'analyse des résultats expérimentaux obtenus. Cette analyse cherche donc principalement, à déterminer si la méthode proposée est valable compte tenu des ajustements métaboliques pouvant survenir en phase de carence, et si elle est suffisamment précise pour évaluer un différentiel du taux de dépérissement ( $\Delta b_H = b_{Hcroissance} - b_{Hendogène}$ ).

## **CHAPITRE 2**

### **AJUSTEMENTS MÉTABOLIQUES**

Pour obtenir une bonne compréhension des processus de respiration, nous avons fait une revue de littérature sur les différents ajustements métaboliques. Cette revue vise principalement à bien cerner les variations de paramètres cinétiques pouvant être induites par ces différents ajustements. Les changements qui s'opèrent lors de la croissance et de la respiration endogène vont être étudiés afin de bien cerner la problématique et de bien interpréter les réponses cinétiques associées à la modélisation mathématique et aux essais expérimentaux.

Monod (1949) considérait que le seul moment où l'on peut supposer la proportion des constituants cellulaire dans un état stable, est durant la phase de croissance exponentielle ou l'expression du bagage catalytique est à son maximum. Selon cet auteur, l'étude du dépérissement de la biomasse constitue un problème entièrement différent. Plusieurs modifications dans l'expression du bagage génétique s'opèrent à ce moment, et ainsi les caractéristiques cinétiques de la biomasse changent.

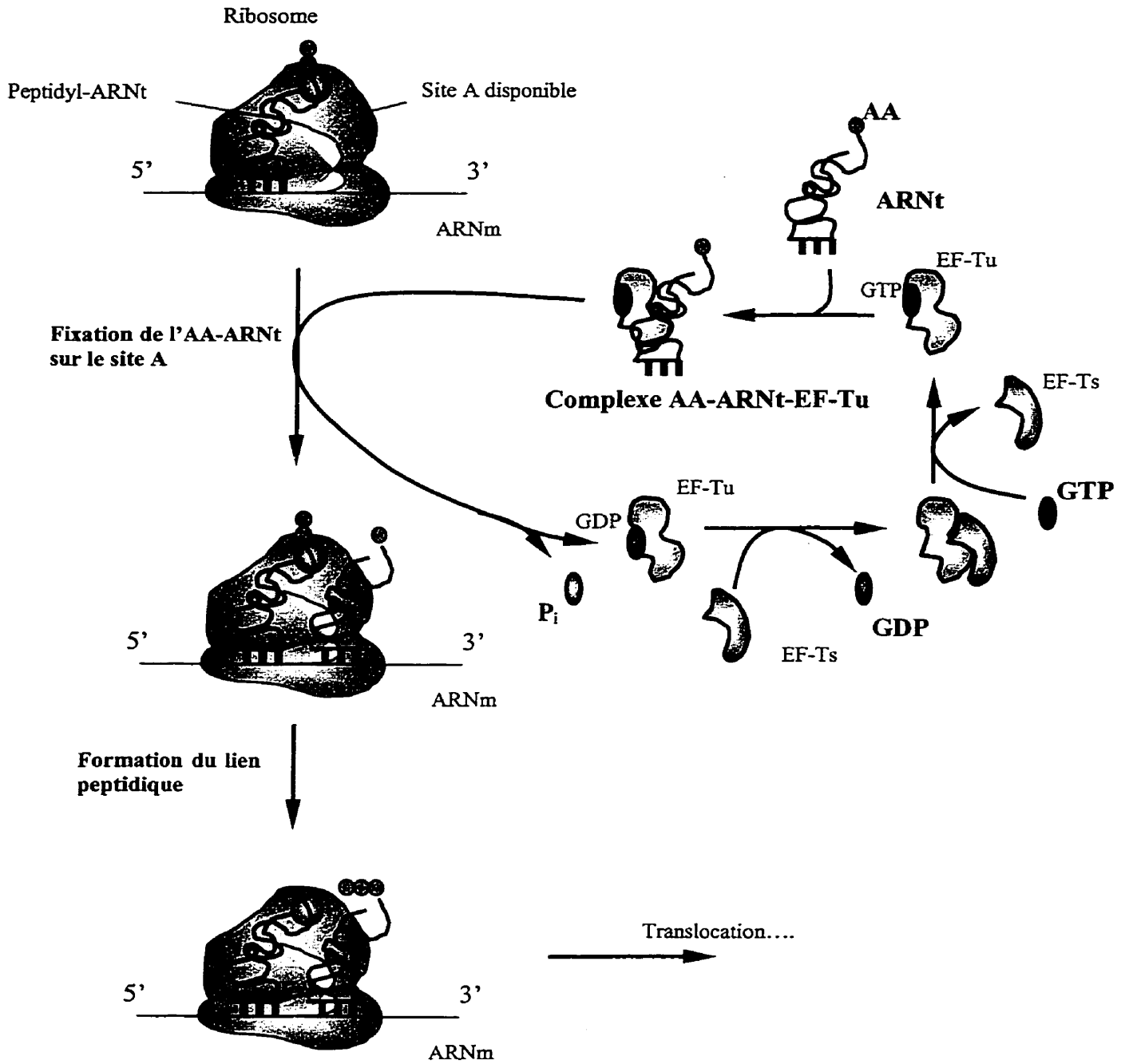
#### **2.1 Phase de croissance**

Au cours de la phase de croissance, la cellule doit produire des enzymes de façon continue pour assurer sa croissance et le maintien de son pouvoir catalytique. Une source de carbone et

d'acides aminés est requise pour la synthèse de nouvelles protéines ( Prescott et coll., 1996). La synthèse de protéines requiert une source d'énergie. Celle-ci est fournie par la guanosine tri-phosphate (GTP). Au cours de la synthèse de protéines, la GTP est transformée en guanosine di-phosphate (GDP) et en phosphore inorganique. L'énergie accumulée dans le lien phosphate est utilisée pour la formation du lien peptidique. Plus spécifiquement, lors de la phase d'élongation, la GTP forme un complexe avec le facteur d'élongation (EF-Tu) et un ARN-transporteur (ARNt) chargé d'un acide aminé (AA) tel qu'on peut le voir sur la Figure 2-1. Le complexe va alors se fixer sur le site actif du ribosome qui effectue la traduction de l'ARN-messager (ARNm). Le facteur d'élongation est libéré et il y a formation du lien peptidique avec la chaîne d'acides aminés. Un phosphore inorganique ainsi qu'une GDP sont libérés par le facteur d'élongation. L'ARNt est libéré par le ribosome après la phase de translocation ( Prescott et coll., 1996).

## **2.2 Phase de carence**

Lors d'une phase de carence en acides aminés ou en carbone, peu d'acides aminés sont disponibles pour la synthèse de protéines. La protéine ppGpp synthétase (RelA) se combine alors avec un ARNt non chargé en acide aminé et se fixe sur le site actif et vacant d'un ribosome. Dès lors, RelA s'active et transfère un phosphore d'une ATP vers une GDP ou une GTP pour former une ppGpp (Cozzone, 1981 ; Arbige et Chesbro, 1982 ; Gerdes, 2000). L'accumulation de ppGpp dans la cellule induit la réponse *stringente* (Gallant, 1979 ; Cozzone, 1981 ; Stouthamer, 1984 ; Östling et coll., 1993 ; Nyström, 1994a ; Gerdes, 2000). Cette réponse à une carence en acide aminé se traduit, entre autre, par un arrêt de la production d'ARN ribosomique (ARNr) et transporteur (Gerdes, 2000). Dans le cas d'une carence en carbone (en énergie), la protéine SpoT semble jouer un rôle prépondérant, mais ce dernier est moins clairement défini dans la littérature consultée (Arbige et Chesbro, 1982 ; Stouthamer, 1984 ; Nyström, 1998 ; Gerdes, 2000). Une carence en carbone résulte de la même façon en une augmentation de la production de ppGpp, et en une altération de la transcription d'un large éventail de gènes (Nyström, 1998 ; Gerdes, 2000).



**Figure 2-1** Phase d'élongation du processus de synthèse d'une protéine (Adapté de Prescott et coll. 1996)

En somme, une carence en substrat entraîne l'accumulation de la ppGpp dans la cellule. Cette molécule semble constituer un régulateur global de l'activité métabolique et déclencher la réponse *stringente* chez la plupart des organismes procaryotes (Arbige et Chesbro, 1982 ; Gerdes, 2000 ; Hochman, 1997).

### **2.3 Réponse stringente**

Comme cela a déjà été mentionné, la réponse *stringente* se traduit par une vaste gamme d'ajustements métaboliques chez la plupart des procaryotes. Pour la bactérie *Vibrio* S14, Östling et coll. (1993) résument la réponse *stringente* en 3 phases.

Dans la première phase (0-20 min.), il se produit une accumulation temporaire de ppGpp. Cette phase est caractérisée par une baisse de la synthèse de macromolécules comme l'ARN, les protéines et le peptidoglycan. Le tout est accompagné d'une augmentation de la protéolyse (Östling et coll., 1993). Au cours d'une carence, le taux de synthèse des protéines tombe à seulement 2-8% du taux de cellules en croissance. Le taux de dégradation des protéines passe de 0-1 à 5%/h (Cozzone, 1981). La bactérie *Vibrio* S14 exprime 38 nouvelles protéines qui entraînent une augmentation de sa résistance aux stress au cours de cette phase (Östling et coll., 1993).

Dans la seconde phase (après 20 min.) le contenu en ppGpp diminue étant donné la baisse de production en protéines et la synthèse de nouveaux acides aminés par la protéolyse et l'utilisation des réserves en PHB. Après 5 heures de carence, le contenu en acides gras diminue d'un facteur 10. Certains auteurs suggèrent que cela entraîne une augmentation de la fluidité de la membrane probablement pour améliorer le transport de nutriments (Östling et coll., 1993). Inversement, la carence induit une augmentation de l'épaisseur de la paroi du peptidoglycan qui passe de 3 couches à 5 couches chez *E. coli* (Mason et Egli, 1993). Quinze nouvelles protéines de survie font leur apparition durant cette période (Östling et coll., 1993).

Dans la troisième phase (6-100 h), le taux de synthèse ainsi que le contenu en protéines diminue. La cellule augmente sa résistance à plusieurs stress. La demi-vie de l'ARNm passe de 1.6 à 10.2 min. et peut atteindre 71 min. dans certains cas. Après 6 heures de carence, seulement 8 nouvelles protéines de survie sont produites par *Vibrio S14* (Östling et coll., 1993).

Plus précisément, *E. coli* réagit à différents stress et à la disette en actionnant un système complexe de régulation global. Celui-ci consiste en un grand nombre de gènes indépendant dont les opérons sont contrôlés de façon coordonnée par un signal ou un gène régulateur commun. Durant la transition entre la phase de croissance et la phase endogène, *E. coli* augmente la synthèse d'un groupe de protéines que Nyström (1994b) a nommé Gsps (Glucose starvation proteins). Celles-ci sont produites de façon séquentielle, et certaines sont essentielles à la survie de la bactérie lors d'une carence en carbone (Nyström, 1994b). Il semble que plusieurs de ces protéines soient produites au début de la période de carence. Celles-ci semblent être absolument nécessaires à la survie à long terme pour *E. coli*. Des études démontrent que 140 différentes protéines (de croissance) sont produites proportionnellement au taux de croissance, et que la production de 33 autres protéines (de carence) est inversement proportionnelle au taux de croissance (Nyström, 1993).

La Figure 2-2 montre schématiquement la réponse d'une bactérie procaryote à différents stress. On y constate que la ppGpp joue un rôle central dans le contrôle de la réponse *stringente*.

De surcroît, certaines des protéines de carence sont des enzymes associés à des voies métaboliques centrales, qui sont normalement induites par l'anaérobiose. La synthèse de certains enzymes du cycle de Krebs normalement réprimés par l'anaérobiose, le sont aussi par une carence en carbone. Selon la littérature, le répresseur ArcA (aerobic respiration control) peut être activé aussi durant une carence en carbone ou en énergie (Nyström, 1994b). Lorsque ArcA devient active, elle réprime l'expression des gènes encodant les DHA de la classe flavoprotéine, et celle de plusieurs enzymes du cycle TCA et les cytochromes *o* oxydase.



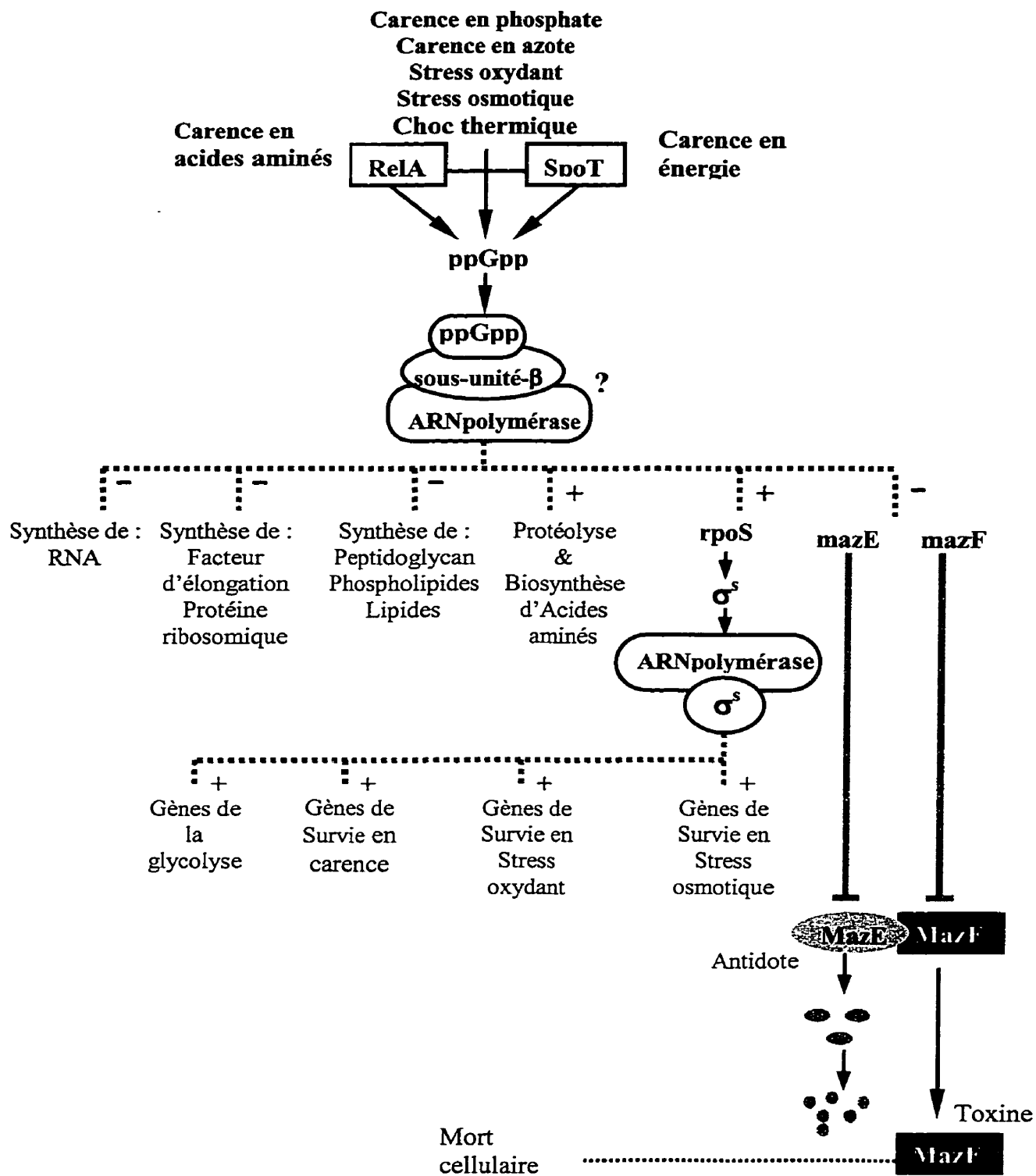
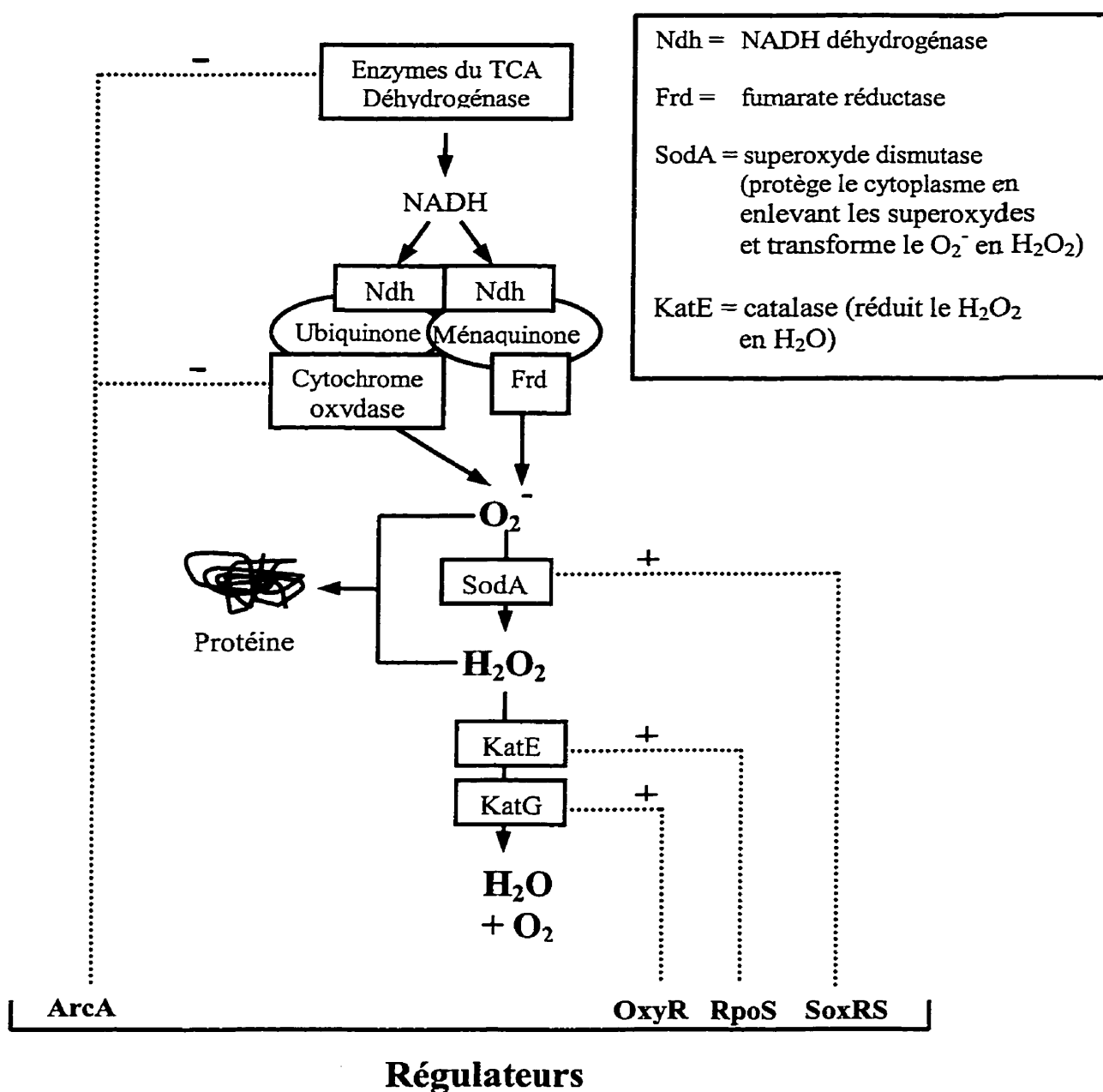


Figure 2-2 Représentation schématique des stimuli de la réponse *stringente* (adapté de Nyström, 1998).



**Figure 2-3** Représentation schématique des défenses bactériennes contre l'action des superoxydants (Adapté de Nyström, 1998).

La Figure 2-3 montre schématiquement l'action de régulateurs sur le métabolisme de la cellule lors d'une carence. Selon Nyström (1998), le transport d'électrons en présence d'oxygène peut être dommageable pour les macromolécules. Les superoxydants ( $O_2^-$ ,  $H_2O_2$ ) produits par la respiration aérobie, peuvent endommager les macromolécules constituant la cellule. Cet auteur ajoute que l'expression de superoxydes dismutases et de catalases est stimulée durant une carence, et que la catalase KatE est exprimée spécifiquement durant une carence. Ainsi en absence de substrat, l'expression de *arcA* et de certains autres gènes peut être une façon pour la cellule de protéger son bagage protéique et d'autres macromolécules contre l'action de superoxydants produits lors de la respiration aérobie (Nyström, 1998).

La similitude entre la réponse de cellules en carence de carbone, et de cellules exposées à un épuisement de l'oxygène, suggère des changements similaires dans les voies d'utilisation du carbone (Nyström, 1994b).

D'ailleurs, certains auteurs présumant qu'un contrôle global s'exerce sur le métabolisme de la cellule et régularise le flot anabolique et catabolique pour prévenir la dégradation de matériel endogène et le gaspillage d'énergie (Östling et coll., 1993). Le réseau de contrôle *stringent* assume un rôle dans le maintien de la précision de la transcription génétique, ce qui confirme l'idée que les changements métaboliques qui surviennent durant une carence visent principalement à maintenir un bagage protéique fonctionnel (Nyström, 1998). En absence de réponse *stringente*, la fréquence des erreurs de traduction augmente de façon importante lors d'une carence (Cozzone, 1981). Or, malgré la faible disponibilité des acides aminés, les bactéries en état de carence maintiennent une excellente précision dans la traduction de l'ARNm grâce à l'action de la protéine RelA (Cozzone, 1981). Selon le modèle proposé par O'Farrel, si l'activité de l'équipement de traduction est ralentie par l'action du ppGpp, l'équilibre entre la production et la consommation d'ARNt-chargé peut être rétablie, et les erreurs de traduction peuvent être ramenées à un niveau normal (Rojas et Ehrenberg, 1991). En effet, la concentration en ribosomes chez *E. coli* présente une forte corrélation avec le taux de croissance. Une importante dégradation et la disparition des ribosomes a été observée à maintes reprises durant des périodes de carence (Östling et coll., 1993). Il semble d'ailleurs que l'ARNt soit plus stable que l'ARNr lorsque le taux de croissance est faible (Mason et Egli,

1993). Ceci peut éventuellement contribuer à l'équilibre proposé par O'Farrel puisque la réponse *stringente* inhibe la synthèse de l'ARN.

De plus, comme l'ont démontré van Verseveld et coll. (1984), la régulation de la réponse *stringente* peut s'exercer sur une biomasse alimentée en substrat. Ces auteurs ont démontré que pour une biomasse soumise à un gradient décroissant du taux de croissance (lorsque  $\mu$  diminue de façon constante), des impulsions de ppGpp se produisaient et généraient des ajustements métaboliques de la biomasse. Stouthamer (1984) pour sa part a constaté que les ajustements métaboliques demeuraient observables pour plusieurs espèces de bactéries procaryotes. Stouthamer (1984) suggère que la production pulsée de ppGpp est causée par une réaction intermittente sur les ribosomes, conséquemment à la limitation grandissante des acides aminés. Il en résulte des variations brusques de la respiration et du coefficient de rendement observé.

Pour leur part, Jensen et Pedersen (1990) formulent des hypothèses concernant les mécanismes de contrôle de la vitesse de croissance, basées sur la synthèse de la ppGpp. Selon ces auteurs, la capacité du système de synthèse de protéines et de l'ARN, excède la capacité du métabolisme de la cellule à fournir suffisamment de matériel pour la polymérisation. En conséquence, le site actif des ribosomes de même que le promoteur (de la transcription de l'ADN) deviennent sous saturés en éléments précurseurs. Selon Jensen et Pedersen (1990), le couplage entre le rythme d'élongation des protéines et de l'ARN est coordonné entre autres par l'ajustement du bagage de ppGpp. Les ribosomes déficients en substrat vont synthétiser davantage de ppGpp. Ce régulateur va en retour, diminuer la vitesse de synthèse de l'ARN et de l'ARNm. Conséquemment, la production de nouveaux ribosomes va arrêter et entraîner une décroissance de la quantité de ribosomes actifs. Ainsi la quantité de ribosomes va s'ajuster à la disponibilité des précurseurs et la vitesse spécifique d'élongation de chacun d'eux va augmenter. Le taux de synthèse de la ppGpp va ainsi diminuer. Donc, l'état stable serait un compromis entre le nombre de ribosomes et leur vitesse spécifique de synthèse (Jensen et Pedersen, 1990).

En résumé, la réponse *stringente* modifie l'expression du bagage génétique et favorise l'expression coordonnée de protéines de survie. Les voies métaboliques du carbone s'en trouvent modifiées. Ces modifications entraînent une réduction de l'activité de la chaîne respiratoire. De plus, la diminution de la quantité de ribosomes, entraîne une chute importante de la synthèse de macromolécules et conséquemment de la vitesse de croissance.

Cette baisse de la synthèse pourrait éventuellement avoir une incidence sur l'énergie requise pour le maintien des fonctions vitales.

## **2.4 Énergie de maintien**

La définition de ce que peut être l'énergie de maintien varie d'un auteur à l'autre. Masson et coll. (1986) incluent dans les fonctions de maintenance, le potentiel osmotique de la cellule, le renouvellement de composants essentiels et le potentiel électrique de la membrane. Nyström et Gustavsson (1998) mentionnent que la respiration endogène implique la synthèse de nouvelles macromolécules comme les protéines, l'ARN, les lipides et le peptidoglycan. Marr et coll. (1963) mentionnent que la mobilité, le maintien d'une pression osmotique dans la cellule, que l'hydrolyse des protéines et de l'acide nucléique impliquent une dépense d'énergie. McGrew et Mallette (1962) ont passé en revue l'opinion de microbiologistes concernant les besoins en énergie de la cellule. Ces auteurs ont défini l'énergie de maintenance comme l'énergie requise pour compenser l'usure et les dommages causés par l'action d'agents physiques et chimiques dans la cellule, c'est à dire pour maintenir le *statu quo*.

Pour maintenir son niveau d'activité, le bagage enzymatique doit se renouveler constamment. Selon les mesures effectuées, ce renouvellement est évalué entre 1 et 3%/h (Cozzone, 1981 ; Mason et Egli, 1993). Cette activité requiert de l'énergie qui constitue une partie de l'énergie de maintien selon certains auteurs (Masson et coll., 1986 ; Nyström et Gustavsson, 1998). La demi-vie de certaines protéines peut être aussi courte que 30 minutes (Aizenman et coll., 1996), tandis que la demi-vie de l'ARNm peut varier entre une et 10 minutes (Östling et coll., 1993).

Il est intéressant de noter ici que les protéines de survie ainsi que l'ARNm, produites au cours de la réponse *stringente*, auraient une demi-vie plus longue que celles qui sont produites au cours de la phase de croissance (Östling et coll., 1993). De plus, il a déjà été mentionné que durant la réponse *stringente*, le taux de synthèse des protéines tombe à seulement 2-8% du taux de production d'une bactérie en croissance. Par ailleurs, il a été démontré que le taux de renouvellement du peptidoglycan passe de 30-50% par heure durant la phase de croissance à un niveau négligeable durant une phase de carence en carbone (Mason et Egli, 1993). On constate donc que le taux de renouvellement des macromolécules chute de façon importante au cours de la réponse *stringente* et que cela pourrait avoir une incidence sur l'énergie de maintien.

Pour leur part, Tempest et Neijssel (1984) ont fait une revue de diverses données expérimentales et de la littérature pour évaluer comment on devrait définir ce paramètre. Ces auteurs considèrent que le renouvellement des diverses composantes macromoléculaires de la cellule ne constitue qu'une faible part de l'énergie requise pour le maintien de l'activité métabolique. Selon eux, le maintien de la force motrice de différents ions à travers la membrane peut constituer une part importante de l'énergie de maintien. De plus ces auteurs démontrent que cette dépense énergétique varie de façon importante en fonction du gradient ionique trans-membrane. Pour la bactérie *E. coli*, 51 à 58% de l'énergie de maintien dépensée, l'est pour maintenir le potentiel énergétique de la membrane (Arbige et Chesbro, 1982). Encore une fois, la réponse *stringente* peut éventuellement exercer une influence sur l'énergie requise pour le maintien du potentiel osmotique et ionique de la cellule, puisque comme cela a déjà été mentionné, plusieurs modifications s'opèrent au niveau de la membrane. Nous avons mentionné, une augmentation de la capacité de transport des nutriments, une diminution de l'activité de la chaîne respiratoire, et un renforcement de la paroi peptidoglycan.

Toutefois, toutes ces constatations ne nous permettent pas d'établir un lien direct entre la réponse *stringente* et des modifications de l'énergie requise pour le maintien de l'activité fonctionnelle de la cellule ou du *statu quo*. Toutefois, certains auteurs mentionnent que des cellules en phase de dormance (résultat de la réponse *stringente*), présentent une activité métabolique largement inférieure à celle de cellules « mortes » (*dead cells*), incapables de se

diviser mais conservant une certaine activité métabolique (Kaprelyants et coll., 1993). De façon générale, il est suggéré dans la littérature qu'au cours de la troisième phase de la réponse *stringente*, le métabolisme de la cellule limite la dépense énergétique (Mason et coll., 1986).

## 2.5 Mort cellulaire

Lorsque les conditions sont favorables à la croissance, *E. coli* semble immortelle. Toutefois lorsque les circonstances stoppent la croissance, les organismes procaryotes meurent effectivement (Nyström, 1998). La recherche a démontrée dans les dernières années, que les organismes procaryotes ont développé des mécanismes d'adaptation dans des conditions de stress environnemental. Ces phénomènes incluent la sporulation, la formation de cysts, la formation de cellules viables mais non cultivables, et la proapoptosis ou mort programmée (Hochman, 1997). Il semble de plus, que les bactéries mutantes incapables de produire la réponse *stringente* meurent prématurément durant une carence (Nyström, 1998). Les mécanismes induisant la mort cellulaire ont donc été étudiés par plusieurs auteurs.

La littérature révèle que les bactéries procaryotes produisent différentes toxines, pouvant en certaines circonstances, entraîner la mort de la cellule. En l'occurrence, Gerdes (2000) a identifié, chez plusieurs espèces de procaryotes, de nombreux gènes codant un couple toxine/antitoxine (TA). Selon le concept proposé, la toxine possède une demi-vie supérieure à celle de l'antitoxine. En l'absence d'expression du gène, une diminution de la concentration de l'antitoxine, laisserait libre cours à l'action de la toxine et causerait la mort de la cellule (Yarmolinsky, 1995). Gerdes (2000) nomme entre autre, les couples CcdA/CcdB, PemI/PemK, RelB/RelE et MazE/MazF. Selon cet auteur, ces couples de TA agissent principalement comme régulateurs de l'expression génétique. La toxine CcdB inhibe l'ADN gyrase (dé-enrouleur de l'ADN), la PemK inhibe la réplication de l'ADN et la RelE inhibe la traduction de l'ARNm. À l'exception du gène *mazEF*, les gènes encodant un couple TA sont autorégulés par le complexe TA. Selon toute vraisemblance, l'expression de *mazE* et *mazF* est régulée directement par la concentration de ppGpp (Aizenman et coll., 1996). D'ailleurs, toutes ces toxines deviennent actives lors de carences en carbone ou acides aminés. Il semble

de plus, que l'effet de ces toxines soit réversible grâce à l'antitoxine (Gerdes, 2000). Gerdes (2000) mentionne que la cible de MazF est mal connue, et que son action pourrait être du même type que les autres toxines. En revanche, les expériences menées par Aizenman et coll. (1996) démontrent l'effet bactéricide de la toxine MazF.

Selon Aizenman et coll. (1996), au cours d'une période de carence, le niveau de ppGpp augmente à cause de l'action de RelA. La ppGpp inhibe l'expression de mazE et mazF. Parce que MazE est une protéine instable, sa concentration diminue plus rapidement que celle de MazF, et alors MazF peut exercer son action toxique et causer la mort de la cellule. Dans les conditions expérimentales, après une augmentation brusque de ppGpp, seulement 15% des cellules ont survécu. MazE est dégradée par une enzyme de type protéase, et sa demi-vie est seulement de 30 minutes. Par contre, MazF est stable durant une période de 4 heures. Ces auteurs proposent que durant des conditions extrêmes, les gènes mazEF servent à déclencher un suicide altruiste, favorisant la survie des autres membres de la communauté. Cette hypothèse semble soutenue par Zambrano et coll. (1993). Selon ces auteurs, les populations de bactéries peuvent bénéficier de la mort programmée des cellules au cours de conditions de carence, si les cellules moribondes sont génétiquement programmées pour relâcher leurs constituants via la lyse et alors fournir du substrat pour la population en santé. Toutefois certains auteurs formulent d'autres hypothèses.

Les deux principaux auteurs sur le sujet considèrent actuellement que les complexes TA visent principalement à protéger la cellule contre les agressions environnementales, sans nécessairement viser directement la mort de la cellule (Nyström, 1998 ; Gerdes, 2000). La mort de la cellule serait le résultat d'une trop grande expression du gène (Gerdes, 2000).

Il est d'ailleurs possible de formuler d'autres hypothèses quant à l'utilité des complexes TA. Par exemple, des bactéries (*E. coli*) maintenues en carence depuis plusieurs jours ont été mélangées à de jeunes cellules et maintenues en carence. Dans ces conditions, les vieilles cellules semblent posséder un avantage sur les jeunes cellules, et les remplacent tandis que les jeunes cellules meurent. Cet avantage semble se maintenir même après plusieurs cycles de croissance exponentielle. Selon Zambrano et coll. (1993), cet avantage découle de mutations



plutôt que d'adaptations physiologiques. Yarmolinsky (1995) mentionne que la carence de *E. coli* induit chez une population moribonde un état d'hypermutation. Plusieurs enzymes de la famille endonucléase et leurs analogues méthylases font partie du groupe toxine/antitoxine. L'enzyme ADNméthylase offre une protection à l'ADN contre les attaques des enzymes endonucléases. Une diminution de la quantité des méthylases laisse libre action aux endonucléases, qui coupent le brin d'ADN et causent la mort de la cellule. Cet auteur ajoute que les dommages causés par les toxines sont éminemment réparables. Il semble donc que plusieurs des toxines mentionnées bloquent le processus de réplication de l'ADN ou lui causent des dommages. Cette situation déclenche la réponse SOS (Gerdes, 2000 ; Walker, 1984), soit la transcription de protéines visant à effectuer des réparations sur les brins endommagés (Walker, 1984). Selon Walker (1984), de simples coupures sur le brin d'ADN ne semblent pas suffisantes pour entraîner des mutations. L'intervention de la réponse SOS semble favoriser les processus de mutations. Il mentionne d'ailleurs que la réponse SOS semble favoriser les processus de mutation sur des bactéries dont l'ADN n'a pas été endommagé. Nyström (1993) mentionne pour sa part que le chevauchement entre l'expression des protéines de survie en phase de carence et des protéines exprimées hors de choc thermique, lors de dommage à l'ADN ou lors de stress oxydant, semble indiquer qu'une carence en substrat entraîne non seulement la réponse *stringente*, mais aussi la réponse SOS.

Ces observations m'amènent à formuler l'hypothèse qu'en phase de carence, une fragmentation (réponse *stringente*) et recombinaison (réponse SOS) répété du génome, favoriserait la formation de mutations. Celles-ci étant le fruit du hasard, seraient souvent non-fonctionnelles et entraîneraient la mort de la cellule. Parfois ces mutations seraient fonctionnelles et il en découlerait éventuellement des adaptations aux conditions environnementales particulières. La survie du patrimoine génétique en serait l'objectif ultime. D'ailleurs, plusieurs études semblent démontrer qu'en phase stationnaire, des mutations surviennent plus souvent, et peuvent donc être une réponse directe à des agressions environnementales (Zambrano et coll., 1993). Par ailleurs, durant la phase endogène, certaines espèces de bactéries photosynthétiques relâchent des particules de nucléoprotéines contenant des échantillons de leur brin d'ADN. Ces agents de transfert génétique (GTA) sont relâchés en une ou deux vagues lorsque la cellule entre en phase stationnaire. Les GTA relâchés par une

espèce peuvent être repris par une espèce différente et contribuer à la formation de mutants. Toutefois ce processus est particulier à quelques espèces de bactéries (Hochman, 1997).

Selon l'hypothèse formulée ci-dessus, la mort de la cellule serait le résultat d'un mécanisme avorté de mutation ou plus spécifiquement d'adaptation de la bactérie. Toutefois cette hypothèse n'est pas formulée directement dans la littérature. Cette hypothèse, comme celle du suicide altruiste, est difficilement vérifiable scientifiquement. Elle peut à certains points de vue relever davantage de la philosophie puisqu'elle tente de définir les objectifs des mécanismes plutôt que d'en faire une analyse basée sur des observations.

Par ailleurs, certaines hypothèses avancent que l'action toxique des couples de TA devrait être arrêtée lorsque la densité de cellules est faible, pour éviter la disparition complète d'une population. Selon les hypothèses formulées, l'expression du gène *mazEF* peut être contrôlé par d'autres régulateurs qui inhibent son action toxique à de faibles densités de cellules. Il semble que les cellules y parviennent en transférant une quantité d'information via l'excrétion de diverses mixtures d'acides aminés, de peptides et de dérivés de l'homosérine lactone (Nyström, 1998). La production d'homosérine lactone (HSL) serait favorisée par l'accumulation de ppGpp. L'HSL semble s'accumuler dans la cellule au cours de la phase de carence. Cette molécule et ses dérivés agiraient comme inducteurs de systèmes sensibles à la densité des cellules. L'HSL stimule l'expression du gène *rpoS*, un inducteur de la production de protéines de survie. Une fois acrylatée, elle pourrait être diffusée au travers de la membrane, et alors servir de signal extra cellulaire. Les cellules auraient ainsi une indication sur la densité de la population (Huisman et Kolter, 1994).

## **2.6 Conclusion**

En résumé, la biomasse présente des caractéristiques variables selon les conditions environnementales. Ainsi en phase de croissance la cellule exprime plus d'une centaine d'enzymes, et doit assurer continuellement le renouvellement de son bagage en macromolécules. En fait, plus de 140 protéines sont exprimées proportionnellement à la

croissance et 33 le sont de façon inversement proportionnelle. Les protéines de survie augmentent la résistance de la cellule aux stress, et favorisent sa survie.

La réponse *stringente* exerce un contrôle global sur le métabolisme de la cellule et régularise le flot anabolique et catabolique pour prévenir la dégradation de matériel endogène et le gaspillage d'énergie. Ce contrôle peut s'exercer aussi durant la croissance tel que démontré par van Verseveld et coll. (1984). Jensen et Pedersen (1990) avancent d'ailleurs que la réponse *stringente* régularise la vitesse du système de synthèse des protéines et de l'ARN, donc la vitesse de croissance de la cellule. Différents régulateurs contrôlent l'expression du bagage génétique et influent sur la cinétique de la catalyse. Entre autres, la quantité de ribosome s'ajuste à la disponibilité des acides aminés ce qui influe sur la cinétique. De façon générale, toute l'expression du matériel génétique peut être modifiée après seulement 20 minutes de carence, et après 6 heures de ce régime, le métabolisme limite la dépense énergétique.

Les enzymes de la chaîne respiratoire sont réprimés par la réponse *stringente* pour protéger les macromolécules de l'effet des hyperoxydants. Ainsi, selon les modèles biochimiques proposés dans la littérature, il semble que le taux de respiration spécifique des cellules actives varie au cours d'une période de carence. Tel qu'exposé dans les chapitres qui suivent, les hypothèses sous-jacentes à la méthode de mesure du taux de dépérissement supposent que le taux de respiration spécifique de la biomasse demeure constant. La variation du taux de respiration spécifique de la biomasse active peut donc avoir une incidence sur l'évaluation de la constante de dépérissement.

D'autre part, en phase de carence, la réponse *stringente* déclenche des processus de mutations qui peuvent déboucher sur la mort de la cellule étant donné une accumulation de toxines. Ainsi, le dépérissement de la biomasse active serait une fonction dépendante de la présence de substrat. Le dépérissement durant la phase de croissance (en présence de substrat) serait donc différent du taux de dépérissement en phase endogène (en absence de substrat) tel que formulé dans les hypothèses du chapitre 1.

## **CHAPITRE 3**

### **MODÈLES MATHÉMATIQUES REPRÉSENTANT LA RESPIRATION**

#### **ENDOGENÈ**

Dans le chapitre 2, divers processus métaboliques ont été passés en revue pour bien comprendre les mécanismes d'adaptation de la cellule. Or, afin de bien comprendre la signification des constantes cinétiques dans le contexte expérimental, les méthodes de mesures ainsi que les modèles mathématiques y étant associés, sont passés en revue dans ce chapitre et dans le chapitre 4.

Dans le domaine du traitement des eaux usées, on peut compter environ quatre modèles utilisés couramment. Ceux-ci décrivent la cinétique de croissance et de respiration endogène de la biomasse d'un point de vue macroscopique. Chacun de ces modèles est une représentation plus ou moins évoluée du concept classique de la respiration endogène. Chacun d'eux décrit l'évolution globale de la biomasse, puisque les mesures utilisées pour faire cette description se réfèrent à la masse d'organismes présents dans un système donné.

### 3.1 Concept classique de respiration endogène

En 1949, Monod (1949) effectuait des études sur la croissance des bactéries en phase exponentielle. Pour fin de simplification, les bactéries présentes dans le système étaient réputées être viables et de dimension uniforme ou standard (Monod, 1949). Ainsi la croissance pouvait être associée à l'augmentation du nombre de cellules et non pas à la croissance de leur masse spécifique. Ainsi, par hypothèse, Monod (1949) supposait que toute la biomasse produite au cours de la phase de croissance était active.

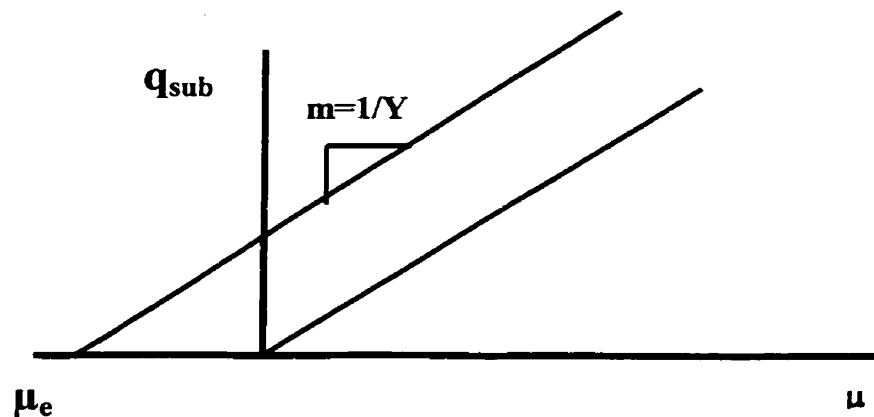
Le concept de respiration endogène n'a pas été introduit initialement par Monod (1949), car il considérait ce problème tout à fait différent de la croissance et insistait sur le fait qu'il devait être analysé de façon indépendante.

Le concept de respiration endogène fut introduit par Herbert (1958). Ce concept tire son origine d'expérimentations effectuées en chémostat. La méthode expérimentale utilisée se réfère aux caractéristiques générales de la biomasse, c'est à dire de l'observation de la concentration de la biomasse et du substrat. Herbert (1958) a établi une relation linéaire entre le taux spécifique d'utilisation du substrat ( $q_{sub} = r(S)/X$ ) et le taux spécifique de croissance ( $\mu$ ) de la biomasse, et a observé que  $q_{sub}$  est différent de zéro lorsque  $\mu$  est nul. Pour expliquer ce phénomène, il fut proposé que les micro-organismes respirent leur propres constituants cellulaires, phénomène qui se traduit mathématiquement par une vitesse de croissance négative ( $K_d$  ou  $\mu_e$ ) tel qu'illustré à la Figure 3-1 (Herbert, 1958). L'Équation 3-1 et l'Équation 3-2 traduisent mathématiquement la Figure 3-1 :

**Équation 3-1** 
$$\mu_{obs}(S) = \mu_{vrai}(S) - \mu_e(S)$$

**Équation 3-2** 
$$q_{obs}(S) = q_{gr}(S) = \frac{\mu_{vrai}(S)}{Y}$$

Pour arriver à cette représentation mathématique, Herbert posait l'hypothèse que le coefficient de rendement demeurerait constant pour toutes les mesures effectuées. Toutefois, une fois l'analyse complétée, il observe sur un bilan du carbone, qu'une plus grande partie du substrat carboné est respiré en  $\text{CO}_2$  lorsque  $\mu$  diminue. Cette observation peut impliquer que  $Y$  diminue avec  $\mu$ .



**Figure 3-1 Concept classique de respiration endogène (Adapté de Herbert, 1958)**

D'autre part, ce concept implique qu'il doit y avoir reproduction des cellules pour qu'il y ait consommation de substrat, et disparition des bactéries pour qu'il y ait respiration endogène. La disparition de bactéries n'implique pas la formation de matériaux inertes. La quantité de biomasse produite est donc hypothétiquement entièrement active pour toutes les vitesses de croissance considérées. Du point de vue mathématique, en phase endogène la biomasse respire ses propres constituants cellulaires en  $\text{CO}_2$ , et toute la biomasse restante demeure entièrement active.

### **3.2 Fractionnement de la biomasse**

Ce concept basé sur le formalisme de Herbert (1958) est relativement semblable au précédent, mais ce modèle implique qu'une fraction de la masse est constituée de particules inertes non-

biodégradables de façon à mieux modéliser l'accumulation de solide dans le réacteur (Eckenfelder et Watkin, 1984). La biomasse fraîchement synthétisée est donc fractionnée en une partie biodégradable ( $X'_d$ ) et une partie inerte ( $X'_n$ ). L'ensemble de la biomasse est alors dégradé ( $X_d$ ) dans des proportions variables tel que l'indique l'Équation 3-3 (Eckenfelder et Watkin, 1984):

**Équation 3-3** 
$$X_d = \frac{X'_d}{1 + b * X'_n * \theta_c}$$

La fraction inerte ( $X'_n$ ) s'accumule donc dans le réacteur avec le dépérissement ( $b$ ) lorsque l'âge des boues ( $\theta_c$ ) augmente.

Ce concept fut largement utilisé au Québec avec BIOBAC (Desjardins, 1986), et est repris dans le modèle ASM3 de l'IAWQ (Gujer et coll., 1999). Tel que proposé par Eckenfelder et Watkin (1984), dans ces modèles, la fraction inerte des boues augmente avec l'âge de celles-ci. Dans ces trois modèles, 20% de la biomasse est transformée en matière inerte lors du dépérissement ( $f_i = X'_n = 0,2$ ) et 80% est respiré en CO<sub>2</sub> (Desjardins, 1986 ; Eckenfelder et Watkin, 1984 ; Gujer et coll., 1999). Selon les méthodes utilisées avant 1986, le taux de dépérissement était mesuré sur différents réacteurs en croissance tel que proposé par Herbert (1958). Depuis l'introduction du modèle ASM1 (Henze et coll., 1986), le taux de dépérissement est évalué sur une boue maintenue en condition de carence, étant donné que des phénomènes de régulation enzymatique, de sélection et de mutations ont été observés sur de la biomasse maintenue à différent taux de croissance dans des chemostats (Dykhuizen et Hartl, 1983; Grady et coll, 1996). Pour l'évaluation des constantes du modèle ASM1, aucune vérification du taux de dépérissement n'est effectuée sur la biomasse en croissance.

Le concept de fractionnement de la biomasse implique lui aussi, diminution de la biomasse pour qu'il y ait respiration endogène.

### 3.3 Concept de mort-régénération

Ce concept se base sur le modèle de biomasse active proposé par Weddle et Jenkins (1971). Encore une fois les équations proposées par Herbert (1958) sont à la base des équations de ce modèle (Henze et coll., 1986). Selon ce concept, la biomasse se subdivise en une fraction inerte et une fraction biodégradable, dont seulement une partie est constituée de biomasse active, c'est à dire de cellules aptes à métaboliser le substrat (Grady et Roper, 1974). La mort des cellules actives produit des matières biodégradables non actives ainsi que des matières inertes.

Le modèle de biomasse active proposé par Grady et Roper (1974) a été adapté dans le modèle proposé par Dold et coll. (1980) qui est à l'origine du modèle ASM1. Ici, la mort de la cellule n'implique pas de respiration. Toutefois les constituants cellulaires biodégradables libérés par le dépérissement constituent un substrat utilisé par les autres membres de la communauté. Ainsi la recroissance sur les substrats "endogènes" implique une respiration (Dold et coll., 1980).

Or, en absence de substrat exogène, la respiration peut être mesurée à l'aide d'un respiromètre et associée à la croissance sur les constituants libérés par la mort des cellules. La mesure respirométrique du taux de dépérissement en phase endogène est donc affectée par cette recroissance. On obtient le taux de dépérissement réel ( $b_H$ ) par la transformation du taux de dépérissement observé ( $b'_H$ ) selon l'équation mathématique suivante (Henze et coll., 1986):

**Équation 3-4** 
$$b_H = \frac{b'_H}{1 - Y_H * (1 - f_p)}$$

où  $f_p$  et  $f'_p$  expriment respectivement la fraction inerte réelle et observée de la biomasse produite tel que défini par l'Équation 3-5:



**Équation 3-5** 
$$f'_p = \frac{f_p}{1 - Y_H(1 - f_p)}$$

Généralement la valeur de  $f_p$  retenue est une valeur théorique de 0,08 (Henze et coll., 1986).

Mathématiquement, selon les paramètres définis dans ASM1, la respiration endogène s'exprime par la relation suivante (adapté de Vanrolleghem et coll., 1999) où  $Y_H$  est le coefficient de rendement de la biomasse sur le substrat, et le terme  $(1 - Y_H)$  est la portion de substrat utilisé pour la production d'énergie, donc associé à la consommation d'oxygène :

**Équation 3-6** 
$$rO_{2\text{end}} = (1 - f'_p) * b'_H * X_H = (1 - Y_H) * (1 - f_p) * b_H * X_H$$

La vitesse de croissance associée à cette respiration peut s'exprimer selon l'équation suivante :

**Équation 3-7** 
$$q_{\text{Send}} * Y_H = \frac{rO_{2\text{end}} * Y_H}{X_H (1 - Y_H)} = Y_H * (1 - f_p) * b_H$$

Dans ce modèle, la respiration endogène implique une croissance et il semble nécessaire de connaître la fraction active de la biomasse ( $X_H$ ) pour déterminer le taux de respiration spécifique.

Toutefois comme la disparition de la biomasse est définie par l'équation du premier ordre suivante (adapté de Kappeler et Gujer, 1992):

**Équation 3-8** 
$$X_H(t) = X_{H0} * e^{-b'_H * t}$$

il est alors possible de définir la respiration endogène au cours du temps en fonction de la biomasse active hétérotrophe présente au moment  $t = 0$  en intégrant l'Équation 3-8 dans l'Équation 3-6 pour obtenir l'équation :

**Équation 3-9** 
$$r_{O_2\text{Hend}}(t) = (1 - f'_p) * b'_H * X_{H0} * e^{-b'_H * t}$$

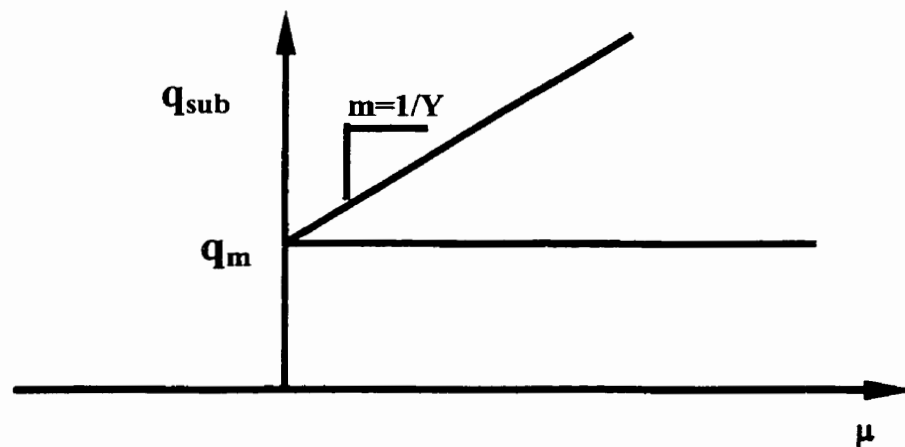
Ainsi lorsqu'on effectue le rapport de la respiration au temps t et de la respiration au temps zéro, la pente de la droite sur le graphique présentant le logarithme de la respiration en fonction du temps, sera équivalente à  $b'_H$  tel que défini par l'équation:

**Équation 3-10** 
$$\ln\left(\frac{r_{O_2\text{end}}(t)}{r_{O_2\text{end}}(0)}\right) = -b'_H * t$$

où  $b'_H$  est défini comme le taux de déperissement apparent de la biomasse active hétérotrophe.

### 3.4 Concept de maintenance

Ce concept tire son origine de la même représentation graphique (Figure 3-1) que le concept classique, mais cette fois, à vitesse de croissance nulle, le substrat consommé est utilisé par la biomasse pour le maintien de ses fonctions vitales (Pirt, 1965) tel qu'illustré à la Figure 3-2.



**Figure 3-2 Concept de maintenance (Adapté de Pirt, 1965)**

Ce concept est relativement différent des précédents en ce sens que la respiration endogène n'implique pas nécessairement la mort des cellules ou leur croissance. Dans le concept de maintenance, le substrat peut être consommé uniquement pour satisfaire les besoins énergétiques de la bactérie sans nécessairement impliquer une croissance (Pirt, 1965; Tempest et Neijssel, 1984 ; Masson et coll., 1986). Toutefois cette analyse fut basée originalement sur une biomasse alimentée par un substrat exogène. Le modèle ne considérait aucune consommation de substrat endogène ou une décroissance de la biomasse. Pirt (1965) rejetait l'hypothèse d'une croissance négative proposée par Herbert (1958).

Mathématiquement ce concept est décrit par les équations (Pirt, 1965):

**Équation 3-11**       $\mu_{obs}(S) = \mu_{vrai}(S)$

**Équation 3-12**       $q_{obs}(S) = q_{gr}(S) + m_s(S)$

**Équation 3-13**       $Y_{obs} = \frac{\mu}{q} = \frac{\mu}{q_G + q_m}$

Ces équations impliquent que les bactéries consomment du substrat pour d'autres fins que la croissance ( $Y$  varie), et que leur mortalité est nulle. Ici toute la biomasse présente est considérée active. Cette approche fut proposée pour sa vraisemblance du point de vue mécaniste, mais ne concorde pas avec les observations effectuées en chemostat puisqu'elle peut conduire à des concentrations de substrat négatives lors de faible croissance (Beefink et coll., 1990). Il est intéressant de souligner que selon ce concept, du moins en période de croissance ou en phase stationnaire, il n'y a pas de mortalité des bactéries ( $b_H = 0$ ). Cette observation semble être confirmée par Siegele et coll. (1993), qui mentionnent que la mortalité des bactéries semble pratiquement nulle en phase de croissance exponentielle.

La respiration des substrats endogènes pour répondre aux besoins en maintenance, est une notion métabolique qui a été appliquée au modèle de Pirt plus tard. Donc en respiration

endogène, la biomasse peut consommer ses propres constituants, subir une perte de masse sans impliquer de mortalité (Van Loosdrecht et Henze, 1999). Dans ce concept, la décroissance de la biomasse n'implique pas nécessairement une décroissance de la population, ce qui constitue une différence importante par rapport aux autres concepts, surtout dans la durée du rétablissement d'un système qui a subi une période de carence (Van Loosdrecht et Henze, 1999).

### **3.5 Modèle basé sur le bilan énergétique**

Dans les faits, le modèle proposé par Herbert (1958), où le taux de dépérissement de la biomasse demeure constant peu importe les conditions abiotiques, implique que les bactéries consomment leur propre protoplasme pour subvenir à leurs besoins en énergie de maintenance, et ce en présence de substrat en excès. Il semble que ce modèle concorde avec les observations expérimentales, mais qu'il n'ait aucune signification du point de vue métabolique. Selon les équations du modèle, il en découle que les paramètres  $\mu_{max}$ ,  $\mu_e$ ,  $Y$  sont considérés constants (Beefink et coll., 1990).

Pirt (1965), en se basant sur le même type d'observations que Herbert (1958), fait une interprétation différente des résultats et propose un modèle incluant l'énergie de maintien. Ce concept implique que la mortalité des bactéries est nulle en toute circonstance, et qu'elles consomment du substrat pour d'autres fins que la croissance ( $Y$  varie). Cette approche fut proposée pour sa vraisemblance du point de vue mécaniste, mais ne concorde pas avec certaines observations effectuées en chemostat (Beefink et coll., 1990).

Beefink et coll. (1990) concilient ces deux concepts en suggérant des équations qui incluent des fonctions de saturation ( $M_0$ ,  $M_1$ , et  $M_2$ ) sur les taux de dépérissement de la biomasse de Herbert, et sur la constante représentant l'énergie de maintien ( $M_m$ ) de Pirt. Le modèle proposé par Beefink et coll. (1990) est présenté mathématiquement par l'Équation 3-14 et Équation 3-15.

**Équation 3-14** 
$$\mu_{obs}(S) = \mu_{max}(S) * M_o(S) - \mu_e * (1 - M_1(S))$$

**Équation 3-15** 
$$q_{obs}(S) = \frac{\mu_{max}(S)}{Y_{sx}} * M_o(S) + \frac{M_m}{Y_{sx}} * M_2(S)$$

Si  $M_1$  et  $M_2$  sont égaux à zéro, on obtient le modèle de Herbert. En revanche si ils sont égaux à un, on obtient le modèle de Pirt.

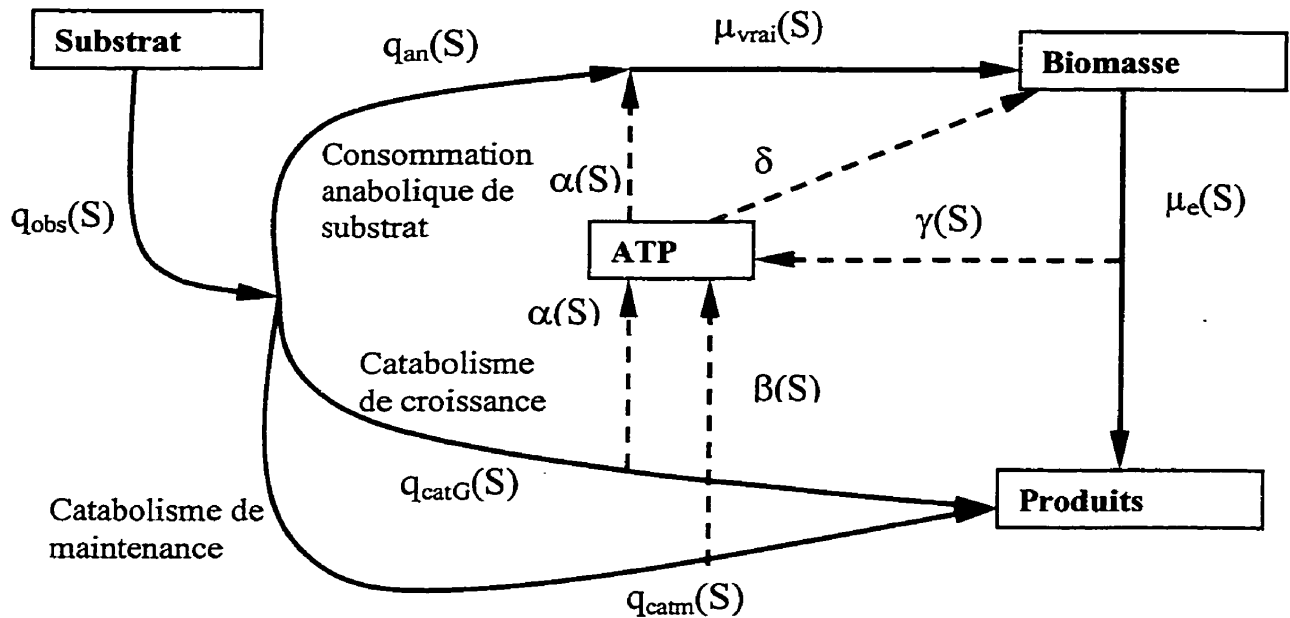
En résumé, ce modèle fait les hypothèses suivantes :

$$\begin{aligned} \mu_{obs}(\infty) &= \mu_{max} \\ \mu_e(\infty) &= 0 \\ \mu_{obs}(0) &= \mu_e \\ q_{obs}(0) &= 0 \end{aligned}$$

Les auteurs considèrent que cette conceptualisation mathématique est davantage représentative du métabolisme de la cellule. En preuve, ils effectuent un bilan énergétique sur la production d'ATP à partir du modèle proposé, tel qu'illustré à la Figure 3-3. Selon la représentation des auteurs, le catabolisme se divise en deux parties, soit le catabolisme de croissance, qui fournit l'énergie nécessaire à la synthèse, soit le catabolisme de maintenance, qui fournit de l'énergie pour le maintien des fonctions vitales. Le flot d'ATP requis pour le maintien des fonctions vitales, représenté par la fonction  $\delta$ , est la somme de l'ATP produit par la fonction de maintenance  $M_2 * M_m$  ( $\beta(S)$ ) et du dépérissement  $(1 - M_1) * \mu_e$  ( $\gamma(S)$ ). La répartition du flot métabolique entre  $\beta(S)$  et  $\gamma(S)$  dépend de la disponibilité du substrat.

Ils soutiennent que l'approche est plus mécaniste, même si les hypothèses sous-tendent que le bagage d'ATP d'une bactérie demeure constant et que les pertes d'énergie dans les processus de transfert sont négligeables. Aucun calage du modèle n'est effectué sur des données expérimentales. Toutefois, étant donné que ce modèle intègre les équations de Herbert, on peut présumer qu'il concorde aux données expérimentales, du moins aussi bien que le modèle proposé par Herbert.

Notons que, dans ce modèle, le taux de déperissement varie en fonction de la disponibilité du substrat, ce qui a une influence directe sur l'évaluation de la quantité de biomasse active présente dans un système donné.



**Figure 3-3 Schéma des voies métaboliques (Adapté de Beeftink et coll., 1990)**

### 3.6 Conclusion

On constate donc qu'il est possible d'élaborer différents modèles en se servant des mêmes observations. En fait, pour chacun des modèles présentés, le formalisme dépend des méthodes de mesure. Celles-ci déterminent les paramètres observables, donc toute la représentation de la cinétique. Ainsi, l'évolution des différents modèles repose principalement sur notre capacité à distinguer les caractéristiques intrinsèques de la biomasse.

L'étude des méthodes expérimentales et analytiques usuelles s'avère donc un outil essentiel pour l'élaboration d'une nouvelle méthode expérimentale.

## **CHAPITRE 4**

### **MESURE DU TAUX DE DÉPÉRISSEMENT EN PHASE ENDOGÈNE**

#### **ET HYPOTHÈSES**

Le chapitre qui suit présente une revue des méthodes de mesures de la constante de déperissement de la biomasse active hétérotrophe. L'étude se limite aux méthodes proposées dans le contexte du modèle mathématique ASM1. Ce modèle est parmi les plus récents, et est largement utilisé dans le domaine de la recherche scientifique pour la modélisation de procédés de boues activées.

Comme cette analyse est effectuée dans le contexte du modèle ASM1, la symbolique et les méthodes d'évaluation des constantes proposées par l'IAWQ seront donc utilisées de façon préférentielle. La description générale de ce modèle est donnée en annexe E. Toutefois dans le but d'alléger le texte, le symbole  $b_{Hend}$  se référera au taux de déperissement de la biomasse active hétérotrophe en absence de substrat exogène, ou en respiration endogène, et  $b_{Hcrois}$  se rapportera au taux de déperissement de la biomasse active hétérotrophe en phase de croissance, en présence de substrat exogène.

#### **4.1 Méthode de mesure du taux de déperissement de la biomasse active hétérotrophe**

Les techniques d'évaluation des constantes cinétiques les plus récentes sont basées sur la mesure de la respiration de la biomasse, et sont dites techniques respirométrique. De plus, pour les modèles dynamiques ASM, différentes méthodes de mesure peuvent être utilisées pour déterminer une même constante (Vanrolleghem et coll., 1999).

Les deux principales méthodes d'évaluation du taux de déperissement de la biomasse hétérotrophe sont basées sur la mesure de la respiration de la biomasse placée en conditions de jeûne, au cours d'une période de plusieurs jours. Plus précisément, la biomasse est placée dans un réacteur en cuvée, et privée de tout substrat exogène durant toute la période de caractérisation du taux de déperissement. Le déperissement de la biomasse active hétérotrophe est alors décrit par l'équation (adapté de Kappeler et Gujer, 1992) :

**Équation 4-1** 
$$X_H(t) = X_{H0} * e^{-b_H * t}$$

Selon les hypothèses formulées dans les modèles ASM, la constante  $b_H$  obtenue sur une biomasse en phase endogène, peut être utilisée pour une biomasse en phase de croissance.

La première méthode d'évaluation du taux de déperissement consiste à mesurer la respiration endogène de la biomasse en carence de substrat carboné, et la seconde méthode consiste à placer en contact la biomasse en carence avec un substrat exogène en excès, et à mesurer la respiration maximale.

#### **4.2 Méthode endogène**

Cette méthode est basée sur la respiration endogène de la biomasse carencée en substrat exogène au cours d'une période de plusieurs jours consécutifs. Or, en absence de substrat



exogène, la respiration peut être mesurée à l'aide d'un respiromètre et associée à la croissance de la biomasse active hétérotrophe sur les constituants cellulaires libérés par la mort des autres cellules. Mathématiquement, selon les paramètres définis dans ASM1, la respiration endogène s'exprime par la relation (Vanrolleghem et al., 1999) :

$$\text{Équation 4-2} \quad r_{O_{2H\text{end}}} = (1 - Y_H) * (1 - f_p) * b_H * X_H = (1 - f'_p) * b'_H * X_H$$

Par hypothèse, on suppose que le taux de respiration spécifique de la biomasse demeure constant durant la phase endogène. Cette hypothèse est formulée par l'Équation 4-2 remaniée de la façon suivante :

$$\text{Équation 4-3} \quad \frac{r_{O_{2H\text{end}}}}{X_H} = (1 - f_p) * (1 - Y_H) * b_H = (1 - f'_p) * b'_H$$

On sait que  $r_{O_{2\text{end}}}/X_H$  demeure constant puisque par hypothèse, les paramètres  $f_p$ ,  $Y_H$  et  $b_H$  demeurent constants au cours du processus de respiration endogène (Dold et coll., 1980). D'ailleurs, Dold et coll. (1980) proposent une valeur de  $r_{O_{2\text{end}}}/X_H$  égale à 0,285 mg O<sub>2</sub>/d/mg DCO<sub>Xactive</sub>.

Ainsi la décroissance de la respiration dans le temps donnera une indication de la diminution de la densité de la population active dans le réacteur. Tel que proposé à la section 3.3, le taux de dépérissement peut être obtenu de la pente de la droite définie par l'équation :

$$\text{Équation 4-4} \quad \ln\left(\frac{r_{O_{2\text{end}}}(t)}{r_{O_{2\text{end}}}(0)}\right) = -b'_H * t$$

Le taux de dépérissement réel est obtenu à partir de l'Équation 3-4 et de l'Équation 3-5.

### 4.3 Méthode exogène

Tel que mentionné à la section 4.2, la respiration est proportionnelle à la biomasse active présente dans le réacteur. D'autre part, en présence de substrat en excès, on sait que la respiration n'est pas limitée par le substrat et devient proportionnelle à la biomasse présente (Vanrolleghem et coll., 1999). À ce moment, la respiration maximale de la biomasse active hétérotrophe peut être décrite par l'équation (Vanrolleghem et coll., 1999):

$$\text{Équation 4-5} \quad rO_{2H \max} = \mu_{H \max} * \frac{(1 - Y_H)}{Y_H} * X_H$$

Le taux de respiration spécifique maximal de la biomasse active hétérotrophe peut donc être défini par l'Équation 4-5 remaniée de la façon suivante :

$$\text{Équation 4-6} \quad \frac{rO_{2H \max}}{X_H} = \mu_{H \max} * \frac{(1 - Y_H)}{Y_H}$$

Encore une fois, par hypothèse, le taux de respiration spécifique maximal de la biomasse demeure constant dans la mesure où  $\mu_{H \max}$  et  $Y_H$  demeurent constants durant la période de jeûne.

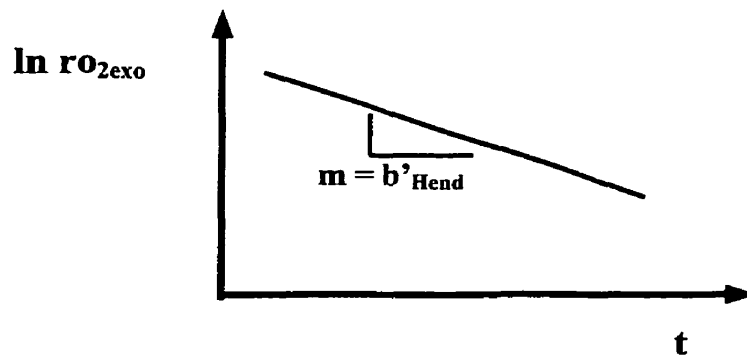
Ainsi, pour des échantillons prélevés quotidiennement dans le réacteur, auxquels on fournit une quantité adéquate de substrat, le taux de respiration peut alors être décrit en combinant l'Équation 4-1 avec l'Équation 4-5 pour donner :

$$\text{Équation 4-7} \quad rO_{2H \max} = \frac{(1 - Y_H)}{Y_H} * \mu_{H \max} * X_{H0} * e^{-b'H * t}$$

et alors le logarithme de l'équation précédente donne :

**Équation 4-8** 
$$\ln(r_{O_{2H\max}}) = \ln\left[\frac{(1-Y_H)}{Y_H} * \mu_{H\max} * X_{H0}\right] - b'_{Hend} * t$$

et tel qu'illustré à la Figure 4-1, la pente de la droite sur la représentation graphique de  $\ln r_{O_{2\max}}$  en fonction du temps, donne  $b'_{Hend}$ . Le taux de dépérissement réel, est obtenu à partir de l'Équation 3-4 et l'Équation 3-5.



**Figure 4-1** Taux de dépérissement endogène ( $b_{Hend}$ )

#### 4.4 Conclusion

La constante  $b_{Hend}$  obtenue sur une biomasse en phase endogène est utilisée dans le modèle pour une biomasse en phase de croissance. On suppose que le taux de respiration spécifique de la biomasse active hétérotrophe demeure constant durant la phase endogène puisque par hypothèse,  $f_p$ ,  $Y_H$ ,  $\mu_{Hmax}$  et  $b_H$  demeurent constants. Ainsi la décroissance de la respiration dans le temps donnera une indication de la diminution de la densité de la population active dans le réacteur.

## CHAPITRE 5

### MÉTHODE D'ÉVALUATION PROPOSÉE DU TAUX DE DÉPÉRISSEMENT EN

#### PHASE DE CROISSANCE

Tel que déjà mentionné, l'expérimentation vise à effectuer une mesure différentielle du taux de déperissement de la biomasse active hétérotrophe. Au chapitre 4, les méthodes et hypothèses associées à la mesure du taux de déperissement de la biomasse active hétérotrophe en phase endogène ( $b_{Hend}$ ) ont été passées en revue.

Selon les hypothèses formulées dans les modèles ASM, la constante  $b_H$  obtenue sur une biomasse en phase endogène, peut être utilisée pour une biomasse en phase de croissance (Henze et coll., 1986). Toutefois selon certains auteurs, les paramètres mesurés incluent différents processus métaboliques qui peuvent varier, mais qui sont, par hypothèse, considérés constants au cours des processus de mesure (Henze et coll., 1995; Grady et coll., 1996 ; Van Loosdrecht et Henze, 1999 ). Or, ces ajustements peuvent avoir une incidence sur l'évaluation des constantes cinétiques. Donc, il est nécessaire d'évaluer si ces ajustements métaboliques ont une influence sur l'évaluation des constantes, et s'il y a lieu, de définir dans quel sens leur influence s'exerce. En fait la question posée ici, est de savoir si le taux de déperissement de la biomasse active hétérotrophe ( $b_H$ ), demeure le même durant la phase de croissance et durant la phase endogène.

Donc, dans ce chapitre, sera effectué un examen des voies potentielles visant à évaluer le taux de déperissement de la biomasse active hétérotrophe en phase de croissance ( $b_{Hcrois}$ ). Pour ce faire, il est nécessaire de construire des équations mathématiques à partir des équations associées aux méthodes de mesures pour isoler la constante  $b_{Hcrois}$ . Les méthodes d'évaluation de  $b_{Hcrois}$  étudiées devraient naturellement être basées sur une biomasse en phase de croissance, c'est à dire alimentée en substrat.

Or, les systèmes alimentés en substrat peuvent être de deux types, soit de type cuvée, impliquant une évolution dynamique de la biomasse et du milieu, soit de type chemostat, impliquant des conditions quasi stationnaires et peu de changements des paramètres biotiques et abiotiques.

### 5.1 Croissance en cuvée

Les systèmes de croissance en cuvée consistent à introduire de la biomasse ( $X_0$ ) dans un bassin de substrat ( $S_0$ ) selon un rapport  $S_0/X_0 > 2$  (Spérandio, 1998). Tous les éléments nutritifs sont présents en excès de même que la concentration en oxygène dissous. Le fort rapport  $S_0/X_0$  favorise alors une croissance importante de la biomasse, et si le rapport est adéquat, il permet de caractériser le taux spécifique de croissance maximal ( $\mu_{max}$ ) de la biomasse. Ainsi, en phase de croissance exponentielle l'évolution de la concentration de la biomasse est évaluée par l'équation (adapté de Kappeler et Gujer, 1992) :

**Équation 5-1** 
$$X_H(t) = X_{H0} * e^{(\mu_{Hmax} - b'_H)t}$$

Comme la respiration dans ce cas n'est limitée ni par le substrat, ni par l'oxygène, l'équation utilisée pour décrire la respiration devient :

**Équation 5-2** 
$$rO_2 = \left[ \frac{(1-Y_H)}{Y_H} * \mu_{H\max} \right] * X_{H0} * e^{(\mu_{H\max} - b'_H) * t}$$

Dans cette équation, on peut associer le taux de dépérissement au taux  $b_{Hcrois}$ , puisque la mesure s'effectue sur une biomasse en croissance. Lorsqu'on tente de simplifier l'équation de la façon suivante :

**Équation 5-3** 
$$\ln \left[ \frac{rO_2(t)}{rO_2(t_0)} \right] = (\mu_{H\max} - b'_{Hcrois}) * t$$

on constate que  $\mu_{H\max}$  et  $b'_{Hcrois}$  sont difficiles à dissocier par la représentation logarithmique de  $rO_2$  en fonction du temps. En effet, il est nécessaire de connaître  $\mu_{\max}$  pour déterminer  $b'_{Hcrois}$  et vice versa.

Alternativement, si l'on tente d'obtenir une culture dont la croissance observée est nulle ( $\mu_H = b'_H$ ), c'est à dire que la culture est alimentée avec un substrat concentré de façon à ce que  $rO_2(t)$  ainsi que le volume du réacteur  $V_r$  demeurent constants, alors l'Équation 5-3 devient égale à zéro. Ainsi,  $\mu_H = b'_{Hcrois}$  et  $\theta_c$  tend vers l'infini. Les paramètres  $\mu_H$  et  $b'_{Hcrois}$  demeurent mathématiquement indissociables ou non identifiables. Cette alternative ne constitue donc pas une solution pour isoler  $b'_{Hcrois}$ .

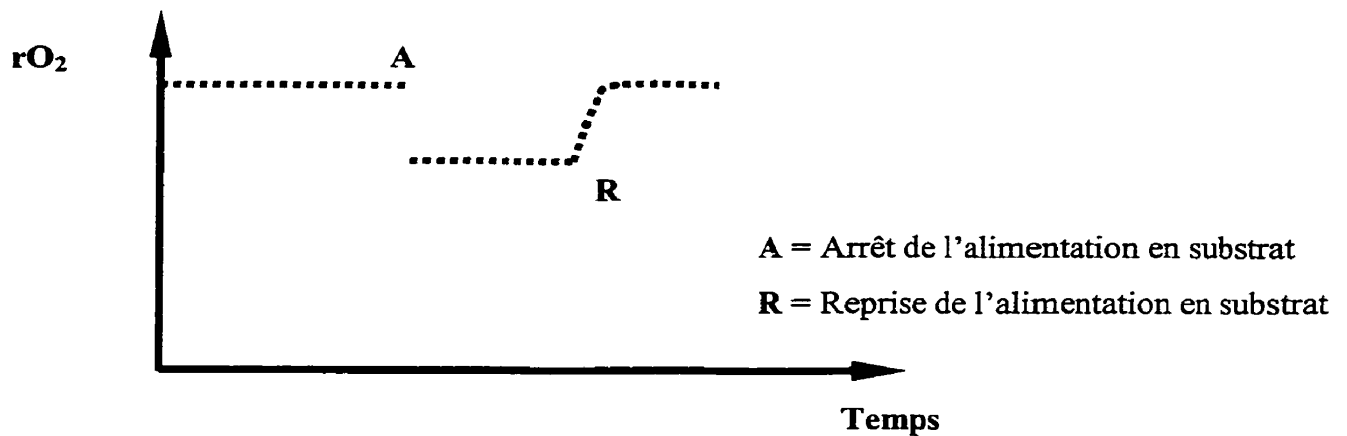
La méthode de croissance en cuvée laisse donc peu de possibilités pour évaluer  $b_{Hcrois}$ .

## 5.2 Croissance en chémostat

Les cultures en chémostat consistent à entretenir une biomasse dans un réacteur en l'alimentant en substrat selon un débit contrôlé et continu. La biomasse produite en excès est évacuée du

réacteur avec l'effluent. Le taux de croissance de la biomasse atteint alors un équilibre et la concentration de micro-organismes demeure constante.

Sur des réacteurs de type chémostat, pour évaluer les constantes cinétiques de la biomasse, plusieurs auteurs ont utilisé la méthode d'alimentation échelonnée (square wave method) (Vanrolleghem et coll., 1999). La Figure 5-1 présente la variation typique du taux de respiration ( $r_{O_2}$ ) lors de l'arrêt de l'alimentation en substrat soluble.



**Figure 5-1** Variation du taux de respiration lors d'une alimentation échelonnée

Pour un système à l'état d'équilibre, la quantité de biomasse active hétérotrophe évacuée à l'effluent donnera le coefficient de rendement observé selon l'équation :

**Équation 5-4** 
$$Y_{Hobs} = \frac{X_{He}}{\Delta DCO} = \frac{Y_H}{(1 + b'_{Hcrois} * \theta_c)}$$

Algébriquement, on peut tenter d'isoler le taux de déperissement et on obtient l'équation :

**Équation 5-5** 
$$b'_{Hcrois} = \left[ \left( \frac{Y_H}{Y_{Hobs}} \right) - 1 \right] * \left( \frac{1}{\theta c} \right)$$

Il est possible aussi de représenter graphiquement  $(Y_{Hobs})^{-1}$  en fonction de  $\theta c/Y_H$  pour obtenir une droite de pente  $b'_{Hcrois}$  en manipulant l'équation de la façon suivante :

**Équation 5-6** 
$$\frac{1}{Y_{Hobs}} = \frac{1}{Y_H} + b'_{Hcrois} * \left( \frac{\theta c}{Y_H} \right)$$

Il faut donc déterminer  $Y_{obs}$  et  $Y_H$  pour obtenir le taux de dépérissement  $b_{Hcrois}$ .

Pour déterminer  $Y_H$ , sur un substrat entièrement soluble, il est possible de déduire à partir de la chute du taux de respiration lors de l'arrêt de l'alimentation, le coefficient de rendement suivant l'équation (Vanrolleghem et coll., 1999) :

**Équation 5-7** 
$$Y_H = 1 - \frac{\Delta r O_2 * V_r}{\Delta S_s * Q}$$

Toutefois  $Y_{obs}$  ne se mesure pas directement car il est nécessaire de connaître la concentration de biomasse active hétérotrophe ( $X_H$ ) à l'effluent du réacteur pour le déterminer. Lorsqu'on effectue un bilan massique sur les micro-organismes pour un réacteur à mélange complet sans recirculation à l'état d'équilibre, on obtient :

$$\text{Accumulation} = \text{Entrée} + \text{Sortie} + \text{Croissance} = 0$$

**Équation 5-8** 
$$\frac{dX_H}{dt} * V_r = Q * X_{H0} - Q_e * X_{He} + V_r * rX_H = 0$$



Si la concentration de biomasse active à l'affluent est nulle alors on peut faire l'égalité suivante :

$$\text{Équation 5-9} \quad Q_e * X_{He} = V_r * rX_H = V_r * (\mu_H - b'_{Hcrois}) * X_H$$

Ainsi à l'équilibre on obtient la relation :

$$\text{Équation 5-10} \quad V_r * (\mu_H - b'_{Hcrois}) * X_H = Q_e * X_{He}$$

Et on sait que  $X_{He} = X_H$  dans le réacteur. Selon l'Équation 5-10, pour connaître  $X_H$ , il est nécessaire de connaître  $b'_{Hcrois}$ .

En combinant le bilan massique avec le bilan sur le substrat on obtient :

$$\text{Équation 5-11} \quad Y_{Hobs} = \frac{rX_H}{rS_s} = \frac{Q_e * X_H}{Q * \Delta DCO} = \frac{X_H}{\Delta DCO}$$

Il faut donc déterminer  $X_H$  pour connaître  $Y_{Hobs}$  et en déduire  $b'_{Hcrois}$ . Comme les équations usuelles définissant  $X_H$  impliquent que  $b_H$  est connu (Kappeler et Gujer, 1992 ; Vanrolleghem et coll, 1999), il faut donc déterminer  $X_H$  par une méthode indirecte.

Comme nous pouvons le déduire de l'Équation 4-2 et de l'Équation 5-1, l'équation définissant la respiration dans un réacteur endogène en cuvée donne :

$$\text{Équation 5-12} \quad rO_{2end} = (1 - f'_p) * b'_{Hend} * X_{H0} * e^{-b'_{Hend} * t}$$

Alors en manipulant l'Équation 5-12 on obtient :

**Équation 5-13** 
$$X_{H0} = \frac{rO_{2end}}{(1 - f'_p) * b'_{Hend} * e^{-b'_{Hend} * t}}$$

Si on fixe  $t$  comme le temps écoulé depuis le transfert des boues du chémostat dans le réacteur en cuvée endogène, alors la biomasse  $X_{H0}$  de l'Équation 5-13 est équivalente à la biomasse  $X_H$  de l'Équation 5-11. Graphiquement l'ordonnée à l'origine  $(\ln rO_{2end})_0$  de la droite de pente  $b'_H$ , pourra donner à l'aide de l'Équation 5-13, la concentration de la biomasse active hétérotrophe ( $X_{H0}$ ) à  $t = 0$ . Ainsi l'évaluation de  $X_H$  nous permet d'évaluer  $Y_{obs}$  et subséquemment  $b_{Hcrois}$ .

Toutefois cette hypothèse n'est valide que dans la mesure où  $\mu_{Hmax}$ ,  $Y_H$  et  $K_h$  ( $K_h$  est éliminée lors de simplifications des équations (Keesman et coll., 1998) ) demeurent inchangés durant la phase de croissance et la phase endogène. En d'autres termes, les ajustements métaboliques qui se produisent lors de la phase endogène ne doivent pas avoir d'influence sur la mesure des différents paramètres. Dans le cas contraire, la concentration de biomasse active hétérotrophe initiale calculée ( $X_{H0}$ ), ne sera pas équivalente à la concentration de la biomasse active hétérotrophe à l'effluent du chémostat ( $X_{He}$ ) et la méthode proposée ne pourra pas être retenue.

### 5.3 Conclusion

Les méthodes de calcul basées sur les systèmes de croissance en cuvées ou à croissance exponentielle, ne semblent pas déboucher sur une méthode expérimentale qui nous permettent d'isoler le taux de dépérissement au cours de la phase de croissance ( $b_{Hcrois}$ ).

Les méthodes de calcul basées sur les systèmes à croissance en chémostat (croissance constante) peuvent éventuellement nous permettre d'isoler la constante du taux de dépérissement de la biomasse active hétérotrophe en phase de croissance seulement par des méthodes indirectes. Il semble nécessaire d'évaluer la concentration de la biomasse active hétérotrophe dans le chémostat ( $X_H$ ) (Équation 5-13), pour ensuite évaluer le coefficient de

rendement observé ( $Y_{Hobs}$ ) (Équation 5-11), et par la suite en déduire le taux de dépérissement au cours de la phase de croissance ( $b_{Hcrois}$ ) (Équation 5-5). Cette méthode devrait donc être retenue pour vérifier si  $b_{Hcrois}$  est différent de  $b_{Hend}$  tel que proposé au début de ce chapitre. Les expérimentations consisteraient à effectuer une culture en chémostat pour déterminer  $Y_{Hobs}$  et  $b_{Hcrois}$ , suivi d'un essai en phase endogène pour déterminer  $X_H$ , valeur préalablement requise au calcul des deux autres constantes.

Toutefois pour que cette avenue soit envisageable, il faut que les ajustements métaboliques qui surviennent durant la phase de respiration endogène n'influent pas sur la mesure des constantes cinétiques. Une étude des ces ajustements métaboliques et une phase d'expérimentation doit donc être effectuée pour vérifier l'influence de ceux-ci sur l'évaluation des constantes cinétiques. Ainsi, préalablement à une expérimentation visant à vérifier la variation du taux de dépérissement, il semble nécessaire d'effectuer une expérience visant simplement à vérifier si les ajustements métaboliques exercent une influence significative sur l'évaluation du taux de dépérissement, ainsi que sur l'évaluation de la concentration de la biomasse active hétérotrophe initiale de l'essai. La description de cette méthode sera effectuée au chapitre 6.

## CHAPITRE 6

### MATÉRIEL ET MÉTHODES

Comme nous l'avons vu, différents ajustements métaboliques se produisent au cours de la respiration endogène, et la constante de déperissement mesurée inclut différents phénomènes. Ces derniers ne contribuent pas nécessairement à la diminution de la quantité de biomasse « vivante », mais incluent potentiellement une diminution du pouvoir respiratoire de la biomasse, ainsi que différents processus de sporulation ou de dormance des bactéries. Considérant ces divers phénomènes, il devient nécessaire d'évaluer leur influence potentielle sur les mesures expérimentales obtenues par respirométrie avant d'envisager une mesure différentielle du taux de déperissement.

L'objectif des essais expérimentaux visera donc à évaluer l'influence des ajustements métaboliques sur les méthodes expérimentales proposées par respirométrie. Ces méthodes cherchent à déterminer le coefficient de déperissement de la biomasse active hétérotrophe, et à évaluer la concentration initiale de la biomasse active hétérotrophe de l'essai, selon l'Équation 5-13. Le taux de déperissement sera donc évalué par les méthodes respirométriques proposées dans le cadre du modèle ASM1, soit par mesure de la respiration endogène ( $rO_{2end}$ ), soit par mesure de la respiration maximale ( $rO_{2max}$ ).

Des essais évaluant l'activité de l'enzyme déshydrogénase (DHA) seront aussi utilisés pour évaluer le taux de déperissement de la biomasse, et ainsi établir une corrélation entre cette méthode et la respirométrie. Cette enzyme a été sélectionnée parce qu'elle présente

généralement une bonne corrélation avec la respiration (Awong et coll., 1985 ; Klapwijk et coll., 1974 ; Trevors, 1984). De plus comme elle présente une bonne corrélation avec l'activité anaérobie (Chung et Neethling, 1989), elle peut représenter l'activité de tout le système de transport d'électron, donc de l'ensemble de l'activité métabolique de la cellule. De plus, durant une carence en carbone, l'augmentation de la quantité de ménaquinones par rapport aux ubiquinones, combinée à la répression de la synthèse des enzymes associés au cycle de Krebs, indique que les DHA autres que les NADH-déhydrogénases augmentent en importance pour les bactéries en carence puisque le transport d'électron du NADH vers l'oxygène ne peut se faire par l'intermédiaire des ménaquinones (Nyström, 1994b). La DHA a donc été sélectionnée comme indicateur d'un déplacement de l'activité enzymatique tel que proposé à la section 2.3, et ainsi vérifier une diminution éventuelle de la respiration de la biomasse sans impliquer le dépérissement de celle-ci.

La mesure de l'activité de la DHA a été largement utilisée pour évaluer l'activité de boues activées (Richards et coll., 1984 ; Ford et coll., 1966 ; Patterson et coll., 1969 ; Teuber et Brodisch, 1977 ; Lenhard et Nourse, 1964 ; Klapwijk et coll., 1974 ; Goel et coll., 1998 ; Nybroe et coll., 1992 ; Awong et coll., 1985). La DHA est constitutive et localisée en amont de la chaîne respiratoire. Elle transfère l'électron associé au proton ( $H^0$ ) du NADH à une flavo-protéine de la chaîne respiratoire (Neidhardt et coll., 1987 ; Patterson et coll., 1969). Le p-iodonitrotétrazolium violet (INT) est un accepteur d'électron qui est utilisé pour mesurer l'activité de l'enzyme DHA. Le INT intercepte l'électron à la place de l'oxygène, et une fois réduit, forme du triphénylformazan (TF) de couleur rouge. L'activité de l'enzyme est mesurée par absorbance du TF, à la longueur d'onde 490  $\mu\text{m}$ , sur un parcours de un centimètre. Un protocole détaillé est donné à l'annexe B.4.

L'écart entre les valeurs de taux de dépérissement de la biomasse active hétérotrophe obtenues par les différentes méthodes, pourra nous donner une indication de l'influence des ajustements métaboliques, à savoir, si ces ajustements ont un effet mesurable dans les processus d'évaluation des constantes. Cette étape préalable à une expérimentation visant à évaluer  $b_{Hcrois}$ , est nécessaire afin de déterminer si le degré de précision de la méthode proposée

s'avère suffisant pour évaluer un différentiel du taux de dépérissement ( $\Delta b_H = b_{Hcroissance} - b_{Hendogène}$ ) statistiquement significatif.

L'analyse des résultats expérimentaux obtenus visera donc principalement à déterminer si la méthode proposée au chapitre 5 est valable, compte tenu des ajustements métaboliques pouvant survenir en phase de carence, et suffisamment précise pour évaluer un différentiel du taux de dépérissement ( $\Delta b_H = b_{Hcroissance} - b_{Hendogène}$ ).

Les vérifications expérimentales visent donc à déterminer la précision de la méthode utilisée pour évaluer la concentration de la biomasse active hétérotrophe ( $X_H$ ). Celle-ci est estimée à partir de l'ordonnée à l'origine de la droite de régression du taux de respiration endogène (Équation 5-13). Si la précision obtenue est suffisante, de nouveaux essais pourront être entrepris pour vérifier si  $b_{Hcrois}$  est différent de  $b_{Hend}$ . La valeur de  $X_H$  obtenue par cette méthode, nous permettra éventuellement de déterminer  $Y_{obs}$  et enfin  $b_{Hcrois}$  dans un chémostat.

Pour effectuer ces vérifications, deux séries d'expériences ont été effectuées. La première série a été réalisée à l'Université Laval avec des boues provenant de la station d'épuration municipale de Bernières. La seconde série d'expériences a été menée au Laboratoire d'Ingénierie des Procédés de l'Environnement (LIPE) à l'Institut National des Sciences Appliquées de Toulouse (INSAT). Les boues utilisées ont été prélevées à la station d'épuration municipale de Ginestous. Un rapport de stage (Lavallée, 2000) a d'ailleurs été déposé et traite des travaux effectués au LIPE. L'information contenue dans ce rapport se trouve en grande partie transcrite dans le présent document.

## **6.1 Dispositif expérimental**

### **6.1.1 Système de réacteurs**

Pour effectuer la mesure du taux de dépérissement de la biomasse active hétérotrophe, celle-ci est maintenue en condition de carence durant toute la période d'expérimentation dans des

réacteurs en cuvée. Plusieurs réacteurs, contenant une fraction de la biomasse prélevée en station, ont été utilisés en parallèle pour former des duplicatas ou triplicatas.

Les réacteurs sont maintenus à 20°C par des cryoplongeurs raccordés en série dans lesquels circule de l'eau thermorégulée par un cryostat. La biomasse est maintenue en suspension soit par l'agitation induite par l'aération, soit des agitateurs mécaniques. La concentration d'oxygène dissous est maintenue entre 5 et 8 mg/l par des diffuseurs perforés alimentés par le réseau d'air pressurisé du laboratoire. Le débit d'air est contrôlé par des régulateurs. Le pH est mesuré et contrôlé durant toute la période d'expérimentation à une valeur de consigne. Le Tableau 6-1 indique quel type de réacteurs ont été utilisés dans chacune des deux expérimentations, ainsi que les particularités de chacun.

**Tableau 6-1 Description des systèmes de réacteurs**

Instrumentation	Université Laval Boues de Bernières	INSAT Boues de Ginestous	
Réacteurs	3 unités cubiques	2 unités cylindriques	2 unités cylindriques type respiromètre
Volume	20 litres	10 litres	Unité-1 : 2,5 litres Unité-2 : 5,0 litres
Mode d'agitation	Aération	Agitateur mécanique Type Rushton 48 TPM	Agitateur mécanique Type Rushton 200 TPM
Contrôle du pH	Manuel Consigne à pH $7 \pm 0,2$	Contrôleur Consort Sans nitrification Consigne à pH 7,6 Avec nitrification Consigne à pH 7,2	Contrôleur Consort Sans nitrification Consigne à pH 7,6 Avec nitrification Consigne à pH 7,2
Solution	$\text{Na}_2\text{CO}_3$ 1,0M	NaOH 0,1M HCl 0,1M	NaOH 0,1M HCl 0,1M
Thermorégulation	Cryoplongeurs raccordés en série $19.9^\circ\text{C} \pm 0.2$	Cryoplongeurs raccordés en série $21^\circ\text{C} \pm 1$	Double enveloppe $21^\circ\text{C} \pm 1$

### 6.1.2 Cellule respirométrique

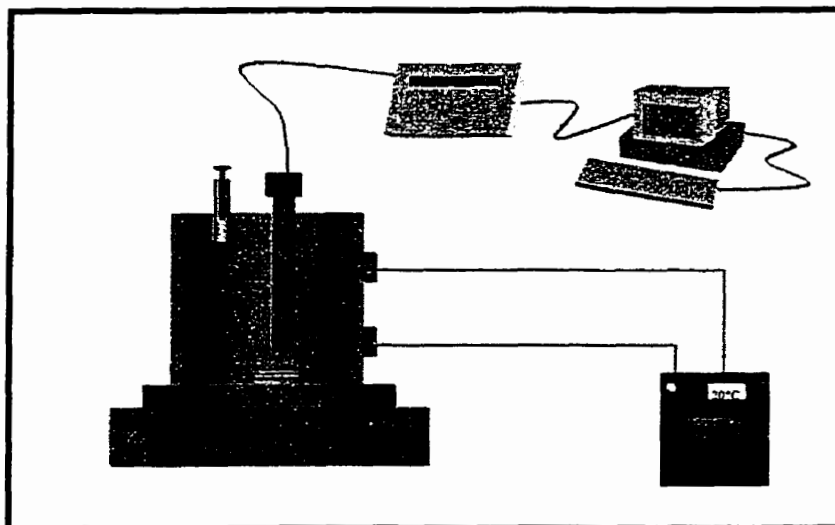
Tous les essais de respirométrie sont effectués en cellule fermée sur les gaz et les liquides. Ce respiromètre est de type LSS tel que décrit par Spanjers et coll. (1998). Dans ce type de respiromètre, la décroissance de la concentration en oxygène est proportionnelle à la respiration des bactéries. Les cellules utilisées ont une capacité de 250 ml et la température y est maintenue à environ 20°C grâce à une double enveloppe alimentée en eau thermostatée par un cryostat. La cellule respirométrique est raccordée en série au système de régulation de température et en amont des réacteurs. La boue à l'intérieur de la cellule est agitée grâce à un barreau aimanté et un agitateur magnétique ajusté à 700 tpm. Une sonde polarographique (YSI-53), ou galvanique (WTW- Cellox 325), selon expérience effectuée, est insérée dans la cellule pour mesurer la concentration en oxygène dissous. La sonde est couplée à un oxymètre.

Le Tableau 6-2 indique la marque et le modèle des équipements utilisés selon le lieu de l'expérimentation. Selon l'installation utilisée, l'oxymètre pouvait être relié ou non à un ordinateur de type 486 SX. L'opérateur ou le PC procédait à l'acquisition des données durant la manipulation. Une valeur de la concentration en oxygène dissous est enregistrée selon l'intervalle indiqué au Tableau 6-2. Le taux de respiration est tiré de la pente de la droite de régression des points enregistrés. Les méthodes proposées par Vanrolleghem et coll. (1999) ont été utilisées pour le calculs des coefficients cinétiques. Les Figure 6-1 et Figure 6-2 présentent les systèmes de respirométrie utilisés.

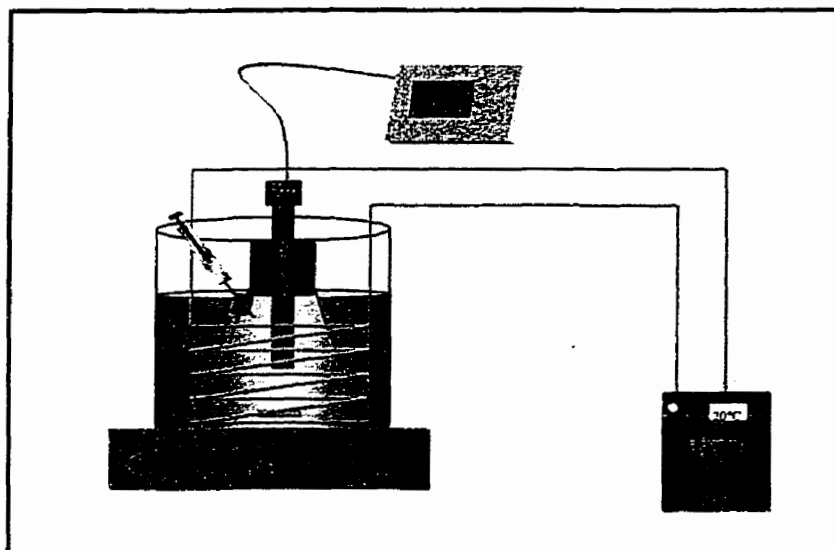
**Tableau 6-2 Liste de l'instrumentation utilisée pour la respirométrie**

Instrumentation	Université Laval Boues de Bernières	INSAT Boues de Ginestous
Sonde	YSI-53	WTW Cellox 325
Oxymètre	YSI-53	WTW OXY 538
Lecture	Analogique	Numérique
Enregistrement des données	Manuel	PC-486 SX
Intervalle d'enregistrement	2 minutes	10 ou 20 secondes





**Figure 6-1** Cellule de respirométrie utilisée au LIPE de l'INSAT



**Figure 6-2** Cellule de respirométrie utilisée à l'université Laval

## 6.2 Protocole de mesure de la respiration

### 6.2.1 Cellule respirométrique

Quotidiennement, un essai respirométrique est effectué sur un échantillon de 300 ml de liqueur mixte pour chaque réacteur. Tel qu'illustré à la Figure 6-3, successivement on effectue la mesure de la respiration endogène totale (pente 1), de la respiration autotrophe maximale après injection dans la cellule de 5 mg  $\text{NH}_4$  (pente 2-pente 3), de la respiration endogène hétérotrophe après injection de 5 mg de allylthiourée (ATU ; produit 9500-Merk Index, Budavari et coll., 1996) (pente 3) et de la respiration hétérotrophe maximale après injection de 1 ml d'un substrat carboné (pente 4).

Dans le cas des essais effectués à l'Université Laval sur les boues de Bernières, seulement les pentes 3 et 4 ont été mesurées tel qu'indiqué au Tableau 6-3. La réponse de cette biomasse sur divers substrat a été vérifiée préalablement à l'établissement du protocole. La réponse de la biomasse et le protocole utilisé sont donnés à l'annexe A.2 et A.3.

L'acquisition des données se fait suivant la période indiquée au Tableau 6-3, ou jusqu'à l'occurrence d'une chute en  $\text{O}_2$  de 4 mg/l pour chaque pente.

**Tableau 6-3 Protocole de mesure de la respiration**

Instrumentation	Université Laval Boues de Bernières	INSAT Boues de Ginestous (Réacteurs)
Respiration mesurée	Endogène hétérotrophe (3) Maximale hétérotrophe (4)	Endogène totale (1) Maximale autotrophe (2) Endogène hétérotrophe (3) Maximale hétérotrophe (4)
Substrat autotrophe	$\text{NH}_4\text{Cl}$	$\text{NH}_4\text{Cl}$
Substrat hétérotrophe	Extrait de levure (1 ml à 30%)	OCDE (1 ml 140 mg DCO) (Ochoa Chaves, 1998)
Intervalle d'enregistrement	2 minutes	10 ou 20 secondes
Période d'acquisition	10 à 14 minutes	30 minutes
Méthode de saturation en $\text{O}_2$	Air	Oxygène pur (max de 25 mg/l)

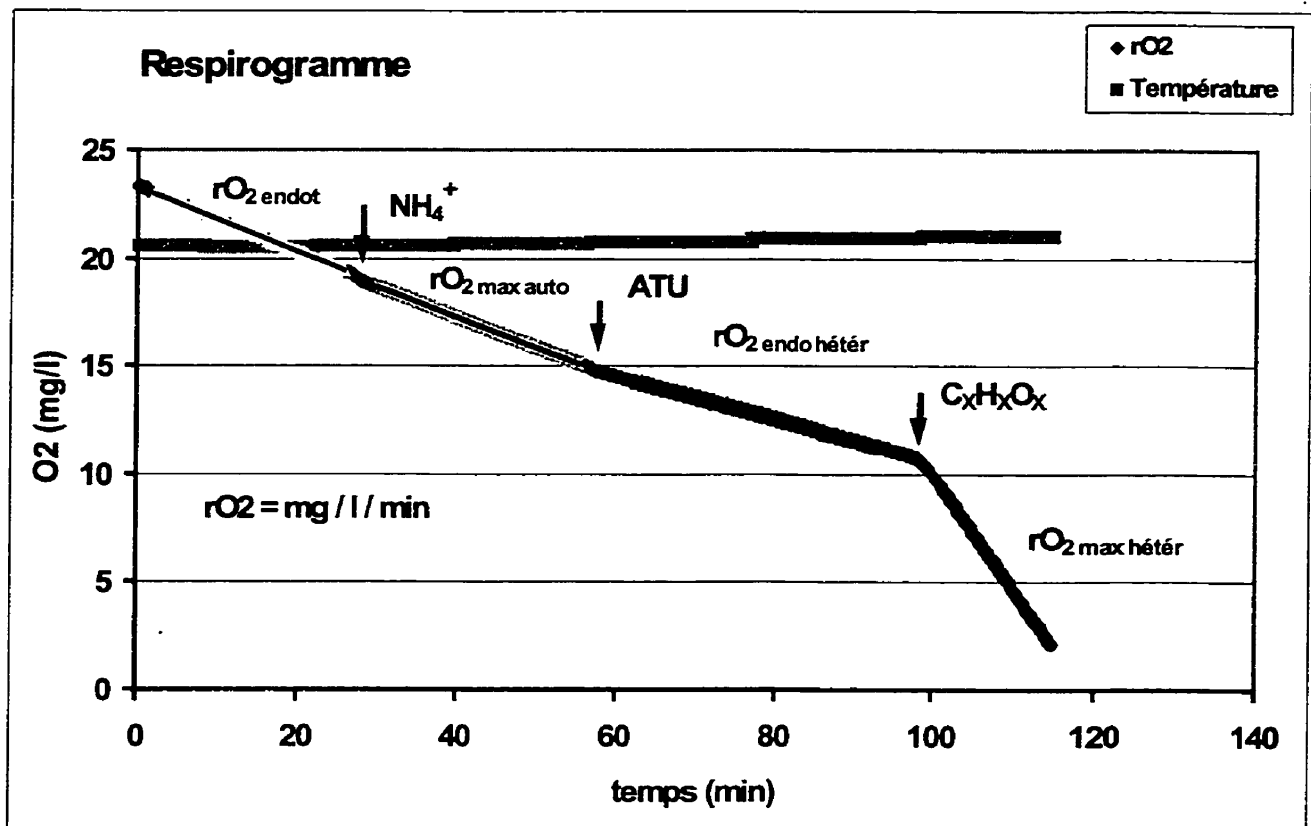


Figure 6-3 Exemple de respirogramme obtenu au LIPE

### 6.2.2 Respiromètres

Dans les laboratoires du LIPE de l'INSAT, pour faire la comparaison de différentes méthodes de mesure, deux réacteurs de type respiromètre ont été installés en parallèle des réacteurs conventionnels. Les réacteurs de type respiromètre sont constitués d'un réacteur couplé avec une cellule respirométrique. La cellule est alimentée en biomasse à partir du réacteur par une pompe péristaltique à toutes les 8 min. 30 sec., selon une séquence prédéterminée. La biomasse est retournée simultanément au réacteur via un système de tuyauterie. La pompe est activée durant environ 4 minutes pour renouveler entièrement le liquide dans la cellule. Un délai de 30 secondes est programmé avant le début de la procédure d'acquisition.

L'acquisition se fait durant 4.01 minutes à toutes les 20 secondes. Une valeur de  $r_{O_2}$  est déduite de la régression linéaire établie sur les 12 points obtenus selon un logiciel programmé par le LIPE.

Pour inhiber la nitrification, une dose initiale (à  $t = 0$  jours) de 20 mg/l de ATU est ajoutée au réacteur. Une dose supplémentaire de 10 mg de ATU/l est ajoutée quotidiennement. Cette méthode donne un respirogramme continu couvrant toute la période de caractérisation. Seule la respiration endogène hétérotrophe (pente 3) peut être mesurée par cette méthode.

### **6.3 Mesures de l'activité enzymatique**

Des essais visant à évaluer l'activité de l'enzyme déshydrogénase (DHA) ont été utilisés pour déterminer le taux de dépérissement de la biomasse active hétérotrophe. La mesure de l'activité enzymatique a été effectuée quotidiennement sur la biomasse des réacteurs selon le protocole détaillé en annexe B.4. Chaque analyse a été effectuée en triplicata. Afin d'obtenir une réponse présentant une tendance similaire à celle de la respiration, l'activité de cette enzyme a été mesurée en présence du substrat carboné utilisé pour la mesure de la respiration, tel qu'indiqué au Tableau 6-4. Plusieurs substrats ont été utilisés pour calibrer la méthode. Une courbe d'étalonnage a été effectuée en début et en fin d'expérimentation pour vérifier la linéarité de la réaction en fonction de la concentration de la biomasse. Deux indicateurs de l'activité DHA ont été testés lors de l'élaboration du protocole. Les résultats obtenus lors de l'établissement du protocole sont joints à l'annexe B. Le INT a été retenu pour les mesures. Le INT semble produire moins d'effets inhibiteurs et semble moins sensible à la présence d'oxygène que le chlorure de tetrazolium (TTC) (Awong et coll., 1985 ; Chung et Neethling, 1989 ).

**Tableau 6-4 Réactifs utilisés pour la mesure de l'activité DHA**

Instrumentation	Université Laval Boues de Bernières	INSAT Boues de Ginestous (Réacteurs)
Indicateur	INT	INT
Substrat carboné	Extrait de levure	OCDE (Ochoa Chaves,1998) avec supplément azoté et phosphate (100 :5 :1)

#### 6.4 MES et MVES

Les MVES ont été suivies au cours de l'expérimentation. Une mesure a été effectuée périodiquement sur chaque réacteur. Un échantillon était prélevé et une séparation solide-liquide était effectuée selon la méthode indiquée au Tableau 6-5. La biomasse recueillie était séchée à 110°C et pesée puis brûlée à 550°C et pesée de nouveau (APHA, AWWA, WPCF, 1998).

**Tableau 6-5 Méthode de mesure des MES et MVES**

Instrumentation	Université Laval Boues de Bernières	INSAT Boues de Ginestous
Volume de l'échantillon	5 ml	50 ml
Mode de séparation	Filtration sur 1,5µm	Centrifugation à 4500 tpm
Nombre de duplicata	3	1

#### 6.5 Décompte de la microfaune

Le décompte de la microfaune a été effectué quotidiennement sur les trois réacteurs utilisés à l'Université Laval, suivant le protocole utilisé par Le Bihan (1999b). Comme le décompte est

une manipulation qui requiert beaucoup de temps, le dénombrement n'a pas été effectué en duplicata. Un décompte est effectué en dénombrant les protozoaires et organismes supérieurs dans 16 champs visuels d'une même lamelle à un grossissement de 100X. La densité en nombre/litre est obtenue par la conversion selon le nombre de champs visuels total par lamelle et le volume utilisé de 25  $\mu$ l.

### **6.6 Prélèvement et préparation des boues**

La station d'épuration de Bernières traite les eaux résiduaires urbaines dans un système de traitement par boues activées de type réacteurs biologiques séquentiels (RBS). Cette station n'est pas munie de décanteurs primaires. Les boues provenant de cette station sont âgées de 10 à 12 jours, et l'activité de la biomasse nitrifiante y est significative. Les boues prélevées étaient de type mixte, soit en partie composées de boues primaires et en partie de boues secondaire. Le bassin de transfert des boues en excès accumule temporairement les boues décantées en excès des RBS avant leur transfert vers un flottateur. Un échantillon de 30 litres de boues concentrées à 4500 mg MVES/l a été prélevé dans le bassin de transfert des boues en excès. Chacun des réacteurs installés à l'Université Laval a été rempli avec 9,4 litres de boues mixtes et 10,6 litres d'eau du robinet.

La station d'épuration de Ginestous traite les eaux résiduaires urbaine dans un système de traitement par boues activées et à écoulement en piston. Les boues provenant de cette station sont relativement jeunes, soit âgée de 5 à 7 jours et aucune nitrification n'était effectuée en station. Dans cette station, la chaîne de traitement inclut des décanteurs primaires. Cette fois, les boues étaient donc de type secondaire uniquement. Un échantillon de 40 litres de liqueur mixte concentrée à environ 2200 mg/l a été prélevé à mi-longueur du canal d'aération. L'échantillon de boues secondaires a été fractionné puis réparti dans les réacteurs et les respiromètres.

### **6.7 Paramètres cinétiques par défaut**

Pour le calcul du taux de déperissement réel de la biomasse active hétérotrophe, certains paramètres ont été fixés selon les valeurs généralement retrouvées dans la littérature. Ainsi le coefficient de rendement ( $Y_H$ ) a été fixé à 0.67 et la fraction particulaire inerte (fp) à 0.08 (Henze et coll., 1986).

## **CHAPITRE 7**

### **RÉSULTATS**

#### **7.1 Essais effectués à l'université Laval**

##### **7.1.1 Déroulement des essais expérimentaux**

Dès le début de l'expérience, la concentration en O<sub>2</sub> dissous dans les réacteurs avoisinait la saturation. Les besoins en oxygène de la biomasse étaient inférieurs à la capacité du système de transfert puisque le débit d'air était ajusté en fonction du degré de mélange requis dans les réacteurs.

Étant donné la consommation d'alcalinité associée à l'activité nitrifiante, le pH variait généralement entre 6,8 et 7,3 (Figure 7-1). Tel qu'indiqué au Tableau 6-1, le pH était ajusté à l'aide d'une dose quotidienne de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>. Les valeurs basses étaient enregistrées immédiatement avant la correction de pH et les valeurs hautes immédiatement après la correction. Les mesures de respiration et d'activité DHA étaient effectuées environ 12 heures après la correction de pH, qui se situait alors à une valeur médiane. Lors de ces mesures, une valeur basse de 6,6 a été enregistrée à la troisième journée de carence dans le réacteur 1, et des valeurs de 7,6 ont été enregistrées lors de la 15<sup>ème</sup> journée dans les réacteurs 2 et 3.



Au cours de l'expérience, l'évaporation s'est révélée être un facteur important dans l'évaluation des paramètres. Le volume liquide diminuait avec l'évaporation, ce qui augmentait la concentration de la biomasse et les mesures de l'activité métabolique. Pour diminuer l'effet de cette source d'erreur, le volume de boues initial et final ont été mesurés. Une correction a été apportée sur les volumes résiduels quotidiens (en considérant les volumes prélevés) dans chaque réacteur selon une approximation linéaire de la fonction d'évaporation. Une autre méthode de correction serait sans doute préférable pour minimiser cette source d'erreur.

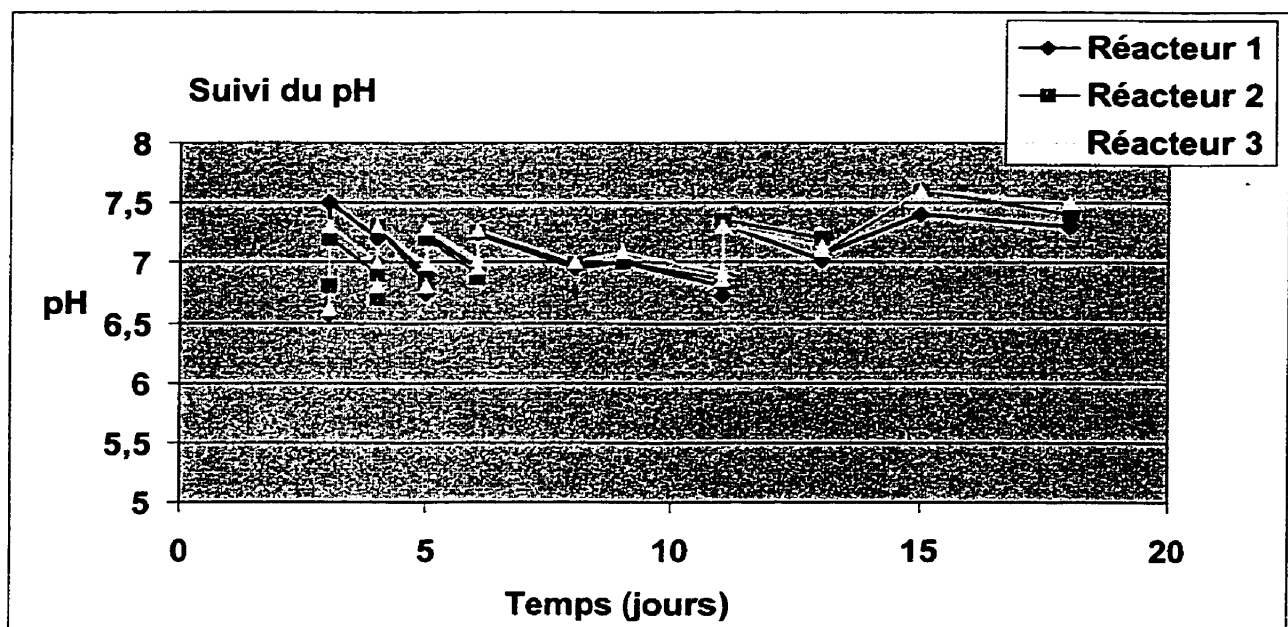


Figure 7-1 Suivi du pH dans les trois réacteurs (Université Laval)

### 7.1.2 Disparition des MVES

La concentration des matières volatiles en suspension a été mesurée périodiquement au cours de l'expérimentation. Chacune des mesures a été effectuée en triplicata. Ces valeurs sont données à l'annexe C.1. La moyenne de ces triplicata est présentée sur la Figure 7-2 pour chacun des trois réacteurs. La disparition des MVES est généralement gouvernée par une

réaction du premier ordre. L'équation de la droite de régression pour les trois réacteurs est donnée sur la figure.

La pente de la droite de régression représente la valeur du taux de disparition, et la valeur obtenue est de  $0,025 \text{ d}^{-1}$ . L'intervalle de confiance de 95% sur cette valeur est de  $0,006 \text{ d}^{-1}$ , et de  $0,08$  sur l'ordonnée à l'origine tel qu'indiqué dans l'équation donnée à la Figure 7-2. Le taux de disparition des MVES obtenu est inférieur à la valeur généralement retrouvée dans la littérature pour des boues secondaires, qui est d'environ  $0,05$  ou  $0,06 \text{ d}^{-1}$  (Tchobanoglous et Burton, 1991). Comme la boue utilisée est de type mixte, il est possible que la présence de boues primaires réduise significativement le taux de disparition obtenu, puisque la dégradation de ce type de boue implique entre autres, l'hydrolyse de la cellulose, qui est un processus relativement lent (Hamer et Zwiefelhofer, 1986). De plus, la correction apportée sur la concentration de la biomasse en fonction de l'évaporation peut impliquer une erreur potentiellement significative, ce qui peut influencer sur la mesure du taux de disparition.

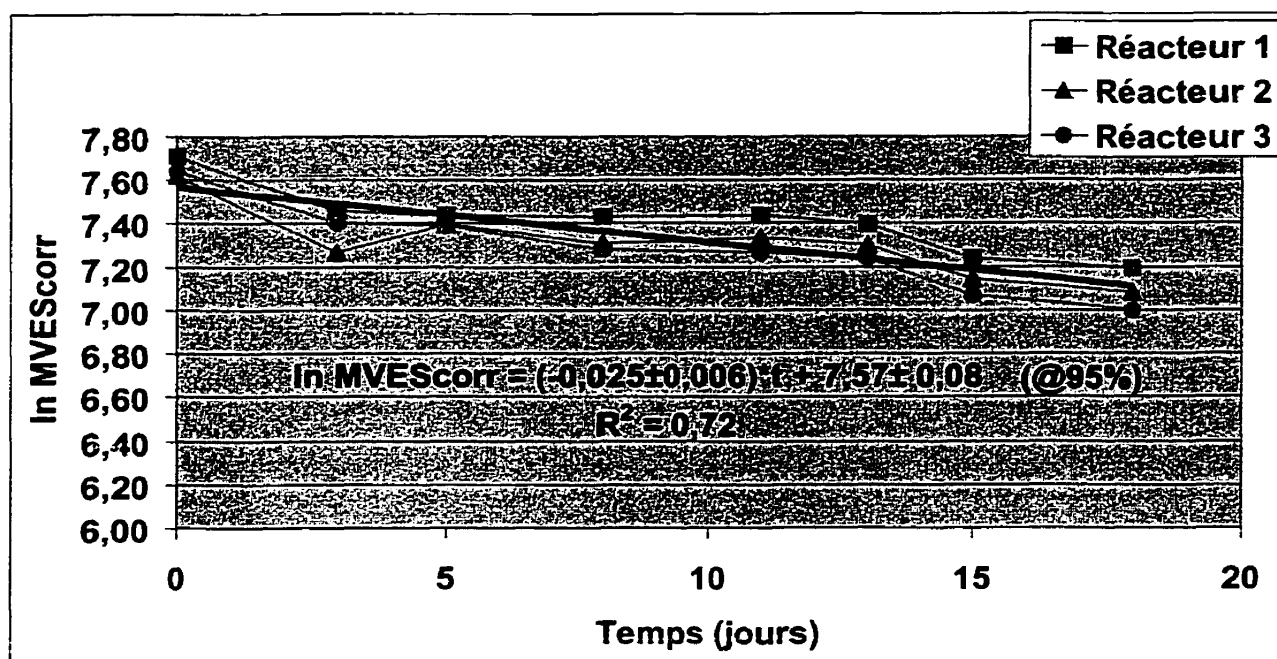


Figure 7-2 Taux de disparition des MVES des boues de Bernières dans les trois réacteurs

Le taux de disparition des MVES obtenu est plus faible que le taux de déperissement de la biomasse active hétérotrophe obtenu à l'aide des mesures respirométriques (section 7.1.4). Cette observation semble confirmer les hypothèses du modèle ASM1 sur le fractionnement de la biomasse lors du déperissement. Dans ce modèle, lors de la lyse, la cellule se divise en particules biodégradable et en matière inerte de façon à mieux modéliser l'accumulation de solides dans le réacteur.

### 7.1.3 Déperissement de la microfaune

Dans la littérature consultée, la cinétique de disparition de la microfaune (protozoaires et organismes supérieurs) n'est pas identifiée lorsque la biomasse est placée en carence de carbone. Par hypothèse, la droite de régression donnée à la Figure 7-3 est basée sur une cinétique du premier ordre. La pente de la droite de régression donne donc le taux de déperissement de la microfaune. Les trois réacteurs constituent un triplicata. Les décomptes sont donnés à l'annexe C.2. Le taux de déperissement observé de la microfaune pour les trois réacteurs est de  $0,1 \text{ d}^{-1}$ . Cette valeur est relativement semblable au taux de déperissement de la biomasse active hétérotrophe mesuré au cours de ces expérimentations. L'activité de prédation exercée par la microfaune semble concorder avec le taux de déperissement de la biomasse active hétérotrophe. Cependant aucune variation du taux de déperissement de la biomasse active hétérotrophe ou de la microfaune n'a été observée. L'analyse qu'on peut effectuer est donc limitée.

De plus cette méthode de mesure est peu précise car le volume prélevé pour effectuer la mesure est très faible. Il ne représente qu'une infime partie de la population, et donc statistiquement peu représentatif de l'ensemble de la biomasse. Les observations sont donc plutôt qualitatives que quantitatives. D'ailleurs, comme on peut le constater sur l'équation de la droite donnée à la Figure 7-3, l'intervalle de confiance de  $\pm 0,5$  obtenu sur le taux de déperissement de  $0,1$ , est largement supérieur à la mesure elle-même.

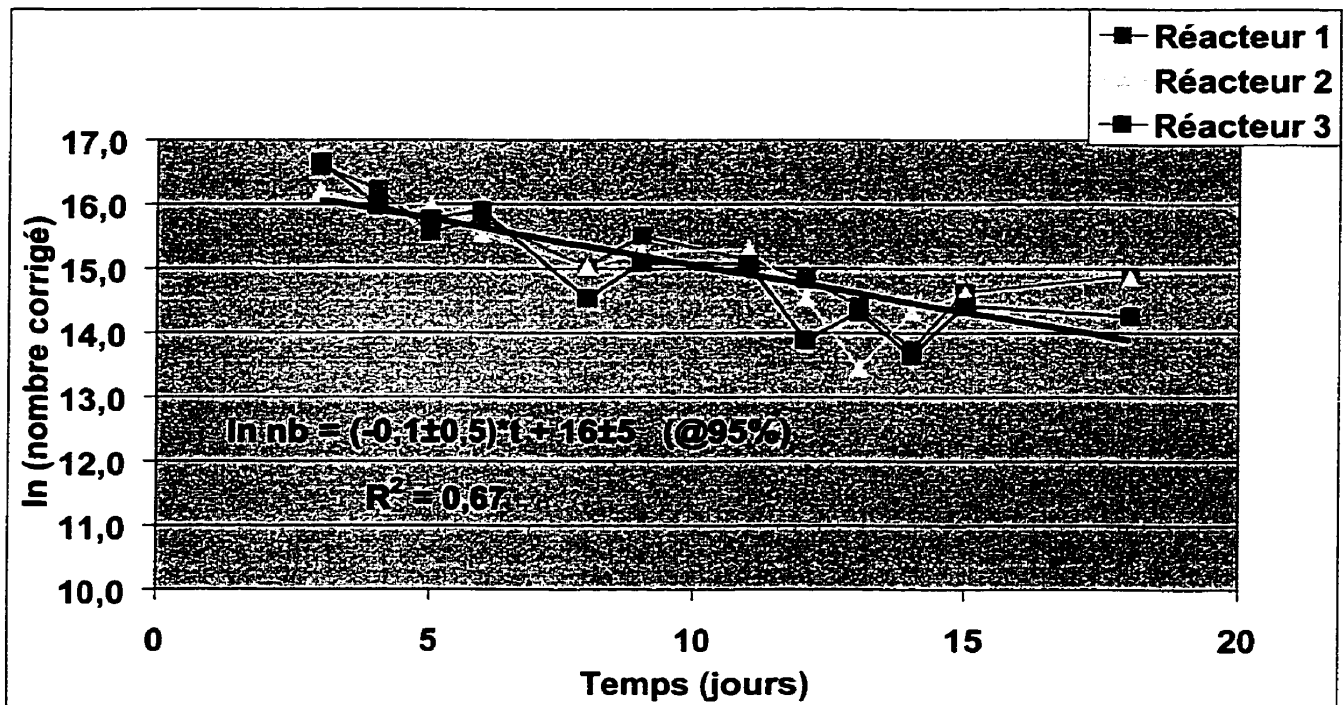


Figure 7-3 Décompte de la microfaune des boues de Bernières dans les trois réacteurs

#### 7.1.4 Taux de dépérissement de la biomasse active hétérotrophe

Le coefficient de dépérissement de la biomasse active hétérotrophe a été évalué selon les deux méthodes proposées par Vanrolleghem (1999), soit en se basant sur la mesure de la respiration endogène, soit en se basant sur la mesure de la respiration maximale d'une biomasse en phase endogène. La seconde méthode requiert l'addition de substrat à la biomasse au cours de la mesure.

Les mesures de respiration de la biomasse obtenues à l'aide de ces deux méthodes sont données à l'annexe C.3. La Figure 7-4 présente les résultats obtenus par les deux méthodes de mesure sur les trois réacteurs. La cinétique gouvernant le dépérissement de la biomasse active est du premier ordre, tel que défini dans le modèle ASM1. La pente de la droite de régression

sur les mesures des trois réacteurs donne donc le taux de dépérissement. L'équation de la droite de régression est donnée sur la Figure 7-4. L'intervalle de confiance (de 95%) sur le  $b_H$  mesuré constitue 10 à 20% de la mesure selon la méthode utilisée. La méthode basée sur la respiration maximale semble donner un intervalle de confiance plus serré, tel qu'observé par Avcioglu et coll. (1998). Le coefficient de détermination est toujours supérieur à 0,8, ce qui indique, compte tenu du nombre de mesures effectuées, une corrélation excellente selon les tables de Student (Walpole et Myers, 1985). Il apparaît que les valeurs de  $b_H$  obtenues par les méthodes respirométriques sont relativement semblables, et varient entre 0,09 et 0,10  $d^{-1}$ . Statistiquement, ces deux valeurs sont semblables compte tenu du nombre de mesures. Les tests de similarité des taux de dépérissement ont été basés sur l'hypothèse «  $H_0$  » posant les deux valeurs semblables, avec un intervalle de confiance de 95%. La valeur du « t test » a été comparée à la valeur critique des tables de Student, selon le degré de liberté défini par le nombre de mesures (Walpole et Myers, 1985).

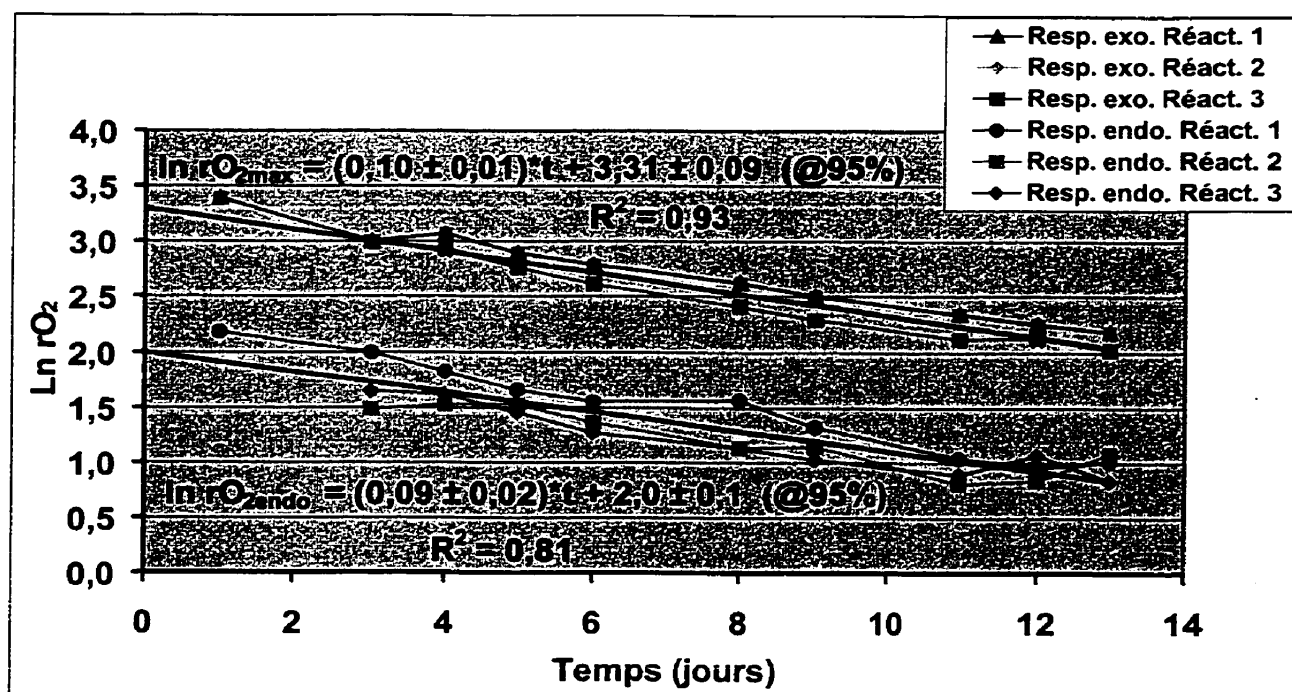


Figure 7-4 Taux de dépérissement de la biomasse active hétérotrophe déterminé par respirométrie sur les boues de Bernières

Les valeurs de  $b_H$  réel obtenues par respirométrie varient entre 0,21 et 0,26  $d^{-1}$ , et sont du même ordre que les valeurs obtenues dans certaines publications (Avcioglu et coll., 1998 ; Brands et coll., 1994). Toutefois d'autres valeurs trouvées dans la littérature pour des boues provenant de systèmes traitant une eau usée urbaine, sont largement différentes (Sollfrank et Gujer, 1991 ; Kappeler et Guyer, 1992 ), et s'approchent de la valeur recommandée dans le modèle ASM1 de 0,62  $d^{-1}$  (Henze et coll., 1986).

Pour nous assurer que les écarts entre les valeurs mesurées et les valeurs théoriques n'étaient pas imputables à des limitations de l'instrumentation, une vérification de la sensibilité de la sonde utilisée a été effectuée. La sonde immergée dans l'eau saturée en oxygène dissous, fut plongée dans une solution déoxygénée au  $Na_2SO_3$ . Ainsi, la vitesse de chute de la sonde fut évaluée à 90% de la valeur de saturation en 20 secondes, soit une vitesse de environ 23  $mg/l/min$ . Cette valeur est largement supérieure à la vitesse maximale de respiration mesurée de 0,5  $mg/l/min$ . Pour éviter de limiter la mesure par la diffusion à travers la couche limite à la surface de la membrane de la sonde, un barreau aimanté agitait le liquide à une vitesse de rotation près de 800 rpm. Les résultats de ces expérimentations sont donnés à l'annexe A.1.

Il est possible que les valeurs de  $Y_H$  et  $f_p$  retenues par défaut ne correspondent pas aux valeurs caractéristiques de la biomasse utilisée. D'autre part, tel que mentionné au chapitre 7.1.2, la boue utilisée est de type mixte. Il est possible que la présence de boues primaires réduise significativement le taux de dépérissement obtenu, puisque l'hydrolyse de la matière particulaire génère des substrats qui peuvent induire une croissance et influencer sur la respiration (Spérandio, 1998), donc sur le taux de dépérissement observé. De plus, la correction apportée sur la concentration de la biomasse en fonction de l'évaporation implique une erreur potentiellement significative, qui peut influencer sur la mesure. Les écarts mesurés ne peuvent être attribués au type de substrat utilisé dans la méthode basée sur la respiration maximale, puisque la méthode basée sur la respiration endogène donne la même valeur.

On peut donc supposer de façon préliminaire, que les faibles taux de dépérissement mesurés sont caractéristiques de la boue utilisée.

### 7.1.5 Estimation de la concentration initiale de la biomasse active hétérotrophe

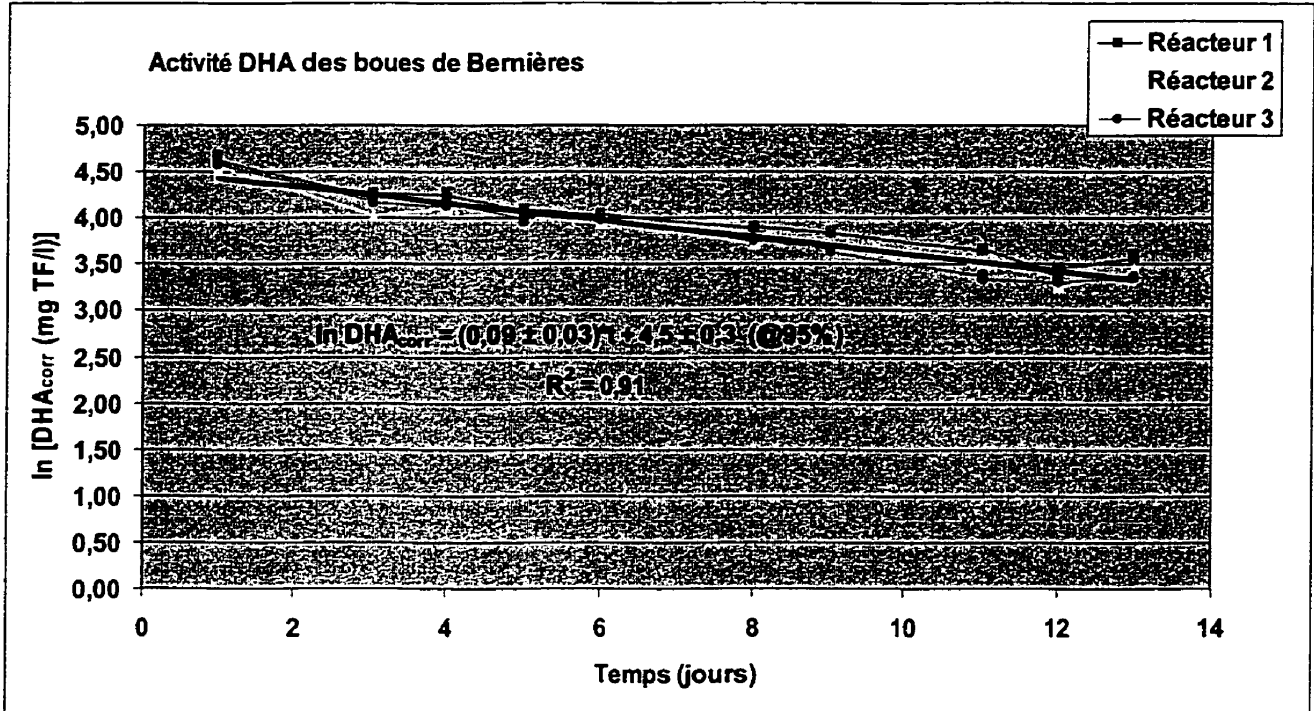
Selon la méthode proposée pour déterminer  $b_{Hcrois}$ , il est nécessaire d'évaluer la concentration initiale de biomasse active hétérotrophe dans le réacteur lors de l'essai de respiration endogène. La valeur  $X_{H0}$  doit être estimée à partir de la respiration endogène initiale de la biomasse tel que proposé par l'Équation 5-13. Or, la mesure de la respiration initiale présente une déviation expérimentale par rapport à la droite de régression obtenue lors de l'évaluation du taux de dépérissement. Ainsi afin d'éliminer cette déviation par rapport au modèle mathématique, l'ordonné à l'origine de la droite de régression doit être utilisée pour évaluer la respiration initiale et  $X_{H0}$ . De plus il est nécessaire de déterminer un intervalle de confiance sur cette mesure afin d'évaluer la précision de la méthode. L'intervalle de confiance sur l'ordonné à l'origine de la droite peut être obtenu par calculs statistiques et est donné sur l'équation de la droite de régression à la Figure 7-4. Ainsi, selon l'Équation 5-13 et la valeur de l'ordonnée à l'origine de la droite de régression de la respiration endogène, on peut estimer la concentration initiale de la biomasse active hétérotrophe à 2500 mg DCO/l. L'intervalle de confiance (de 95%) sur cette valeur est de 800 mg DCO/l, soit environ 30% de  $X_{H0}$ .

### 7.1.6 Mesure de l'activité enzymatique

L'activité DHA a été mesurée parallèlement à la respiration de la biomasse active hétérotrophe. Cette activité a été traduite en mg/l de triphényl formazan formé durant la réaction en fonction de l'absorbance selon la courbe standard présentée en annexe B.1.

Au cours de la période de carence, l'activité DHA diminue suivant une décroissance exponentielle en fonction du temps, comme la respiration et tel que prédit par l'Équation 3-8 pour le dépérissement de la biomasse active. Tel qu'on peut le constater à la Figure 7-5, la cinétique de la réaction est bien du premier ordre, puisque le logarithme de l'activité DHA représenté en fonction du temps, donne une droite de régression dont le coefficient de détermination est supérieur à 0,9. L'excellente corrélation démontre la validité de l'hypothèse.

Le taux de dépérissement observé ( $b'_H$ ) mesuré par cette méthode est  $0,09 \text{ d}^{-1}$ . La valeur réelle du taux de dépérissement obtenue de  $0,24 \text{ d}^{-1}$ , est égale ou supérieure à différents taux de dépérissement obtenus par Brands et coll. (1994) via la mesure de la concentration de l'ADN d'une biomasse tirée d'un pilote opérant à faible et à forte charge. Comme le taux de dépérissement obtenu par respirométrie, cette valeur est inférieure à la valeur « par défaut » de  $0,62 \text{ d}^{-1}$  du modèle ASM1 (Henze et coll., 1986),.



**Figure 7-5** Mesure de l'activité enzymatique des boues de Bernières

Cette valeur est statistiquement la même que celle obtenue par les méthodes respirométriques. La comparaison statistique de cette valeur à celle obtenue par les techniques respirométriques, a été effectuée selon la méthode mentionnée à la section 7.1.4.

Cette méthode semble donc adéquate pour évaluer la quantité de biomasse active hétérotrophe et en déterminer le taux de dépérissement. L'hypothèse formulée au chapitre 6, voulant que l'activité DHA soit représentative de la biomasse active hétérotrophe semble donc correcte.



## **7.2 Essais effectués au LIPE de l'INSAT**

### **7.2.1 Déroulement des essais expérimentaux**

Au cours des essais en réacteur, la faible activité nitrifiante a progressivement augmenté jusqu'à la huitième journée pour ensuite décroître à partir de la dixième ou douzième journée, et ce dans les deux réacteurs. Ces fluctuations de l'activité nitrifiante ont entraîné des modifications de la variation du pH. En début d'expérimentation, le pH avait tendance à augmenter. Le contrôle s'effectuait donc avec un acide. À partir de la septième journée, le pH a suivi une tendance à la baisse. Le système de contrôle de pH a dû être modifié pour exercer un contrôle à l'aide d'une base. Le transfert d'un mode de contrôle à l'autre ne s'est pas fait sans heurt, et des perturbations de pH se sont produites durant environ 4 jours. Les périodes d'exposition à de faibles valeurs de pH ont été relativement courtes (de quelques heures par jour) mais se sont généralement produites avant les mesures respirométriques. Cette exposition de la biomasse à de faibles valeurs de pH, a induit une diminution du taux de respiration mesuré au cours des jours 7 à 10. Une part de la diminution de respiration notée durant ces journées, n'est donc pas associée à une diminution de la biomasse active hétérotrophe mais donc plutôt à des problèmes expérimentaux.

### **7.2.2 Disparition des MVES**

Le suivi de la concentration des matières volatiles en suspension a été effectué périodiquement au cours de l'expérimentation. Les valeurs mesurées sont données à l'annexe D.1. Les mesures effectuées sur les respiromètres ne sont pas présentées ici, puisque le nombre de points obtenus sur chacune des boues n'est pas suffisant pour donner une tendance.

Les droites de régression des points obtenus pour les réacteur 1 et 2, donnent des taux de disparition d'environ  $0,04 \text{ d}^{-1}$  et  $0,05 \text{ d}^{-1}$  respectivement. L'examen de la Figure 7-6 semble indiquer une cinétique de disparition légèrement différente pour les réacteurs 1 et 2. Toutefois compte tenu de la précision des mesures, on peut considérer que le dépérissement de la

biomasse est équivalent pour les deux réacteurs. La concentration de la biomasse n'a pas été corrigée pour tenir compte de l'addition de solution tampon. Au cours de certaines journées, il fallait plus de 500 ml/jour de solution tampon par réacteur pour contrôler le pH, ce qui a pu avoir une influence sur la concentration de la biomasse. D'autre part, du point de vue statistique, les deux taux de disparition obtenus ne peuvent être distingués compte tenu du nombre de mesures.

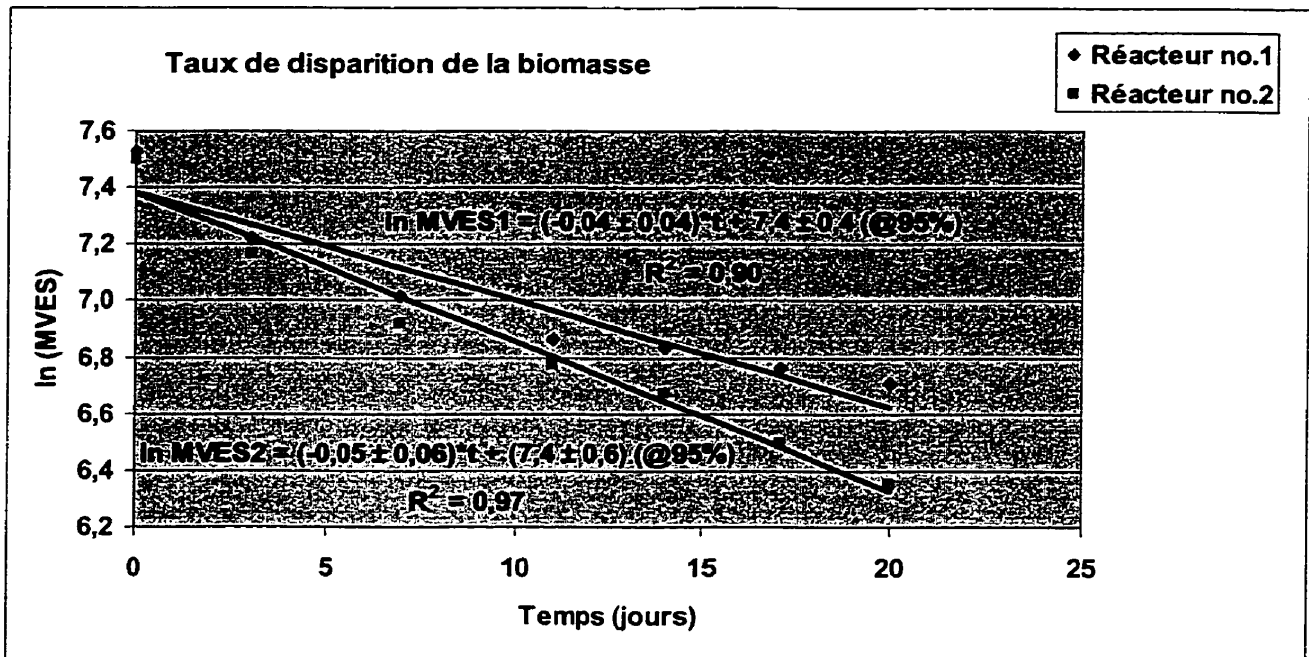


Figure 7-6 Taux de disparition des MVES des boues de Ginestous

### 7.2.3 Coefficient de dépérissement de la biomasse active hétérotrophe

Le coefficient de dépérissement de la biomasse active hétérotrophe a été évalué selon deux méthodes proposées par Vanrolleghem et coll. (1999), soit en se basant sur la mesure de la respiration endogène, soit en se basant sur la mesure de la respiration maximale d'une biomasse en phase endogène. La méthode basée sur la respiration endogène a été utilisée pour évaluer le taux de dépérissement dans les réacteurs ainsi que dans les respiromètres. La méthode basée sur la respiration maximale a été utilisée seulement pour les réacteurs. La

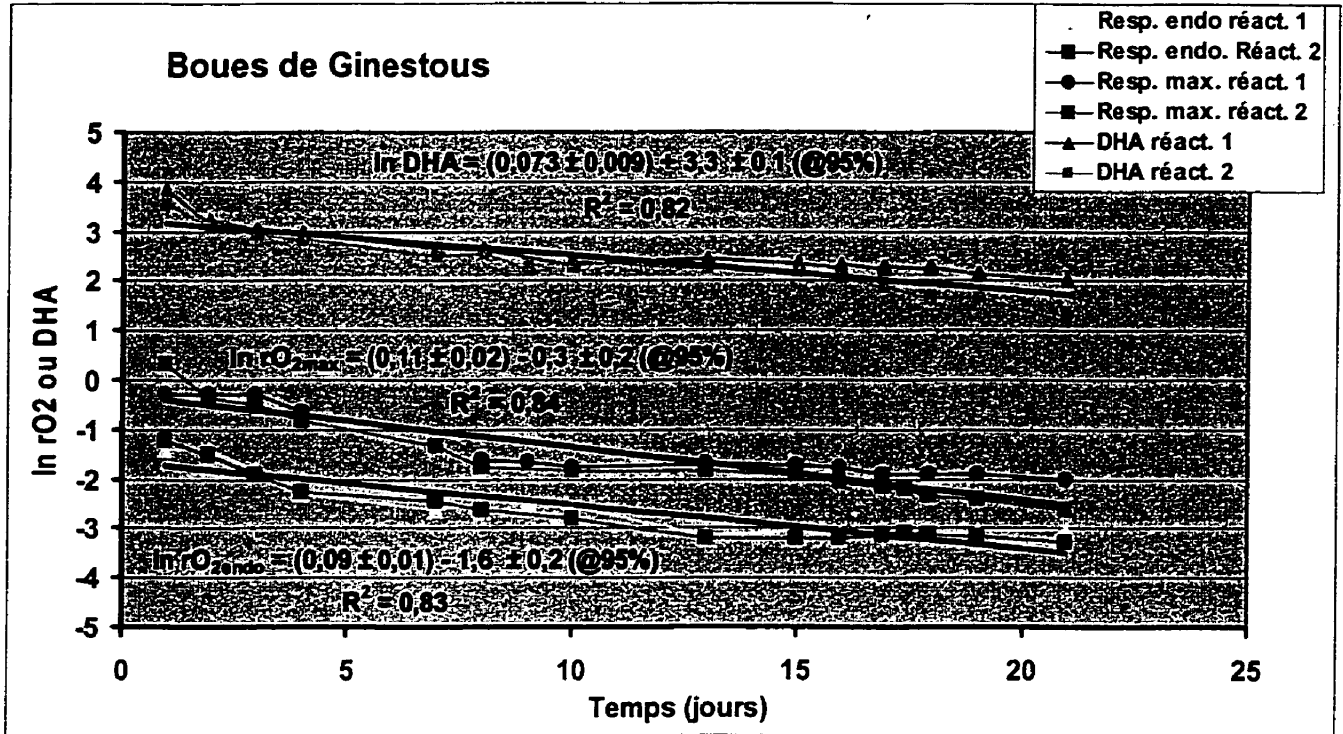
seconde méthode requiert l'addition de substrat à la biomasse au cours de la mesure et ne peut être utilisée avec les respiromètres, puisque la biomasse mélangée au substrat est recirculée automatiquement au réservoir de biomasse après la mesure. En se basant sur les mêmes principes, le taux observé de déperissement de l'activité enzymatique DHA peut être représentatif du taux de déperissement de la biomasse active hétérotrophe. Cette méthode a donc été utilisée pour faire une évaluation comparative avec le taux de déperissement obtenu par la respiration maximale.

### 7.2.3.1 Déperissement en réacteurs

La Figure 7-7 présente les résultats obtenus par les trois méthodes de mesure sur les boues des réacteurs. Les valeurs numériques de l'activité de la biomasse obtenues sont données à l'annexe D.3 et D.4. Compte tenu des conditions expérimentales (voir chapitre 7.2.2), il apparaît que les valeurs de  $b'_H$  obtenues par les méthodes respirométriques sont relativement semblables, et varient entre 0,09 et 0,11  $d^{-1}$ . Statistiquement, ces deux valeurs sont semblables compte tenu du nombre de mesures. Les valeurs de  $b_H$  réel obtenues par respirométrie varient donc entre 0,23 et 0,29, et sont encore une fois, inférieures à la valeur « par défaut » de 0,62  $d^{-1}$  du modèle ASM1 (Henze, 1986) mais du même ordre que certaines valeurs trouvées dans la littérature pour une ERU (Avcioglu et coll., 1998 ; Brands et coll., 1994).

Par ailleurs, à partir de 13<sup>ième</sup> journée, la méthode basée sur la respiration endogène donne un taux de déperissement proche de zéro. D'ailleurs Avcioglu et coll., (1998) ont obtenu des résultats similaires avec cette méthode. Il est possible d'expliquer ce phénomène par la prépondérance de l'hydrolyse sur le déperissement de la biomasse active hétérotrophe, tel que proposé par Lishman et Murphy (1994). Ces auteurs expliquent que l'hydrolyse est un phénomène relativement lent, ce qui limite la respiration hétérotrophe durant une phase de carence prolongée. Ainsi, la vitesse d'hydrolyse peut contrôler la vitesse de la respiration. Une mesure de cette dernière donnerait davantage une indication de la vitesse d'hydrolyse que du taux de déperissement de la biomasse active (Lishman et Murphy, 1994). La méthode basée sur la respiration maximale semble présenter un taux de déperissement plus stable tout au long

de l'expérimentation. Toutefois les perturbations de pH survenues durant les jours 7 à 10 ont eu un effet négatif sur le taux maximal de respiration, ce qui diminue le coefficient de régression.



**Figure 7-7** Coefficient de dépérissement de la biomasse active hétérotrophe des boues de Ginestous.

Pour les deux réacteurs, le taux de dépérissement obtenu avec les DHA est 22 et 36% plus faible pour la méthode endogène et maximale respectivement. Les écarts obtenus entre les mesures respirométriques et les mesures enzymatiques sont statistiquement significatifs compte tenu du nombre de mesures effectuées. Ces écarts, constatés sur les boues de Ginestous, montrent une plus forte baisse de l'activité respiratoire aérobie que de l'activité DHA au cours de la carence.

Or, comme cela a été mentionné au chapitre 2, diverses modifications du bagage enzymatique s'opèrent durant le processus de respiration endogène. Selon les mesures effectuées au LIPE,

on peut formuler l'hypothèse que l'activité DHA associée aux voies métaboliques de fermentation prend de plus en plus d'importance au cours de la respiration endogène, tel que proposé par Nyström (1994b). De plus, voyant les résultats obtenus au LIPE, d'autres expérimentations ont été effectuées par un étudiant stagiaire (Besser, 2000). Lorsque les mesures de respiration maximum étaient effectuées avec de l'acétate, des écarts entre les mesures respirométriques et enzymatique ont aussi été obtenus par Besser (2000).

Toutefois on ne constate pas la même tendance sur les boues de Bernières. On sait que le substrat utilisé à l'université Laval était de l'extrait de levures, et au LIPE le substrat était principalement constitué d'acétate. On peut donc supposer, préliminairement, que le substrat a eu une influence significative sur l'évolution du rapport  $r_{O_2}/DHA$ . Selon l'information recueillie au cours de ce travail, il est difficile d'expliquer formellement pourquoi l'évolution de ce rapport diffère sur ce substrat. Toutefois, on sait que l'assimilation de l'extrait de levure implique des étapes d'hydrolyse et de transformation plus complexes que celles impliquées avec l'acétate. Il est possible de formuler une hypothèse voulant que des enzymes situées en amont de la chaîne respiratoire de la cellule limitent la cinétique de la catalyse. Par conséquent, selon cette hypothèse, les mesures ne pourraient refléter les ajustements qui s'opèrent au niveau de la chaîne respiratoire. Aussi, il est possible que la présence de boues primaires dans les boues de Bernières ait une incidence sur les ajustements métaboliques. Toutefois dans le cadre de la présente étude, ces hypothèses sont trop spéculatives pour être retenues.

### **7.2.3.2 Estimation de la concentration initiale de la biomasse active hétérotrophe**

Selon la méthode proposée pour déterminer  $b_{H_{crois}}$ , il est nécessaire d'évaluer la concentration initiale de biomasse active hétérotrophe dans le réacteur lors de l'essai de respiration endogène. La valeur  $X_{H0}$  doit être estimée à partir de la respiration endogène initiale de la biomasse tel que proposé par l'Équation 5-13. Or, la mesure de la respiration initiale présente une déviation expérimentale par rapport à la droite de régression obtenue lors de l'évaluation

du taux de dépérissement. Ainsi afin d'éliminer cette déviation par rapport au modèle mathématique, l'ordonnée à l'origine de la droite de régression doit être utilisée pour évaluer la respiration initiale et  $X_{H0}$ . De plus il est nécessaire de déterminer un intervalle de confiance sur cette mesure afin d'évaluer la précision de la méthode. L'intervalle de confiance sur l'ordonnée à l'origine de la droite peut être obtenu par calculs statistiques et est donné sur l'équation de la droite de régression à la Figure 7-7. Ainsi, selon l'Équation 5-13 et l'ordonnée à l'origine de la droite de régression de la respiration endogène, on peut estimer la concentration initiale de la biomasse active hétérotrophe à 4000 mg DCO/l. L'intervalle de confiance (de 95%) sur cette valeur est de 1300 mg DCO/l, soit environ 30% de la valeur.

On constate d'ailleurs que la valeur  $X_{H0}$  calculée est supérieure à celle obtenue à l'université Laval sur les boues de Bernières. Puisque la boue de Bernières est de type mixte, et que celle de Ginestous est composée uniquement de boues secondaires, pour une même concentration de MVES, celle de Ginestous comportera naturellement plus de biomasse active.

### 7.2.3.3 Dépérissement en respiromètres

Rappelons que les respiromètres sont constitués d'un réacteur couplé avec une cellule respirométrique. La cellule est alimentée en biomasse à partir du réacteur par une pompe péristaltique selon une séquence prédéterminée. Une valeur de  $rO_2$  est obtenue à toutes les 8 minutes. Pour inhiber la nitrification, une dose initiale d'ATU est ajoutée au réacteur, et une dose supplémentaire est ajoutée quotidiennement. Cette méthode donne un respirogramme quasi continu couvrant toute la période de caractérisation. Seule la respiration endogène hétérotrophe (pente 3) peut être mesurée par cette méthode (consulter le chapitre 6). Ici, seules les figures représentant les respirogrammes sont donnés puisque les tableaux de données sont très imposants.

Le taux de dépérissement de la biomasse active hétérotrophe a été évalué dans les respiromètres. Sur la Figure 7-8 et la Figure 7-9, si on analyse les données recueillies par les respiromètres avant la 150<sup>ième</sup> heure, la méthode endogène donne une valeur de  $b'_H$  de  $0,01 \text{ d}^{-1}$ .

Cette dernière valeur est véritablement différente des valeurs obtenues dans les réacteurs. Il est possible que l'ATU, un inhibiteur de la population autotrophe nitrifiante, soit utilisé comme substrat par les hétérotrophes dans les respiromètres (voir les lignes qui suivent). Ce substrat influencerait sur la croissance et fausserait la valeur de  $b'_H$  obtenue. Le taux de dépérissement obtenu dans les respiromètres ne peut donc être retenu pour l'analyse comparative.

De plus, des augmentations de respiration de la biomasse maintenue en carence se sont produites entre la 100<sup>ième</sup> et la 150<sup>ième</sup> heure, tel qu'illustré sur la Figure 7-8 et la Figure 7-9. Les données au delà ces périodes ne sont donc pas utilisables pour l'évaluation du  $b'_H$ .

Les hausses de respiration observées étaient significatives et difficilement explicables en vertu des principes sous-jacents à la respiration endogène. En fait, dans les respiromètres du LIPE, la respiration de la biomasse maintenue en carence a augmenté de façon significative après environ six ou sept jours d'expérimentations, et ce pour trois des quatre essais effectués.

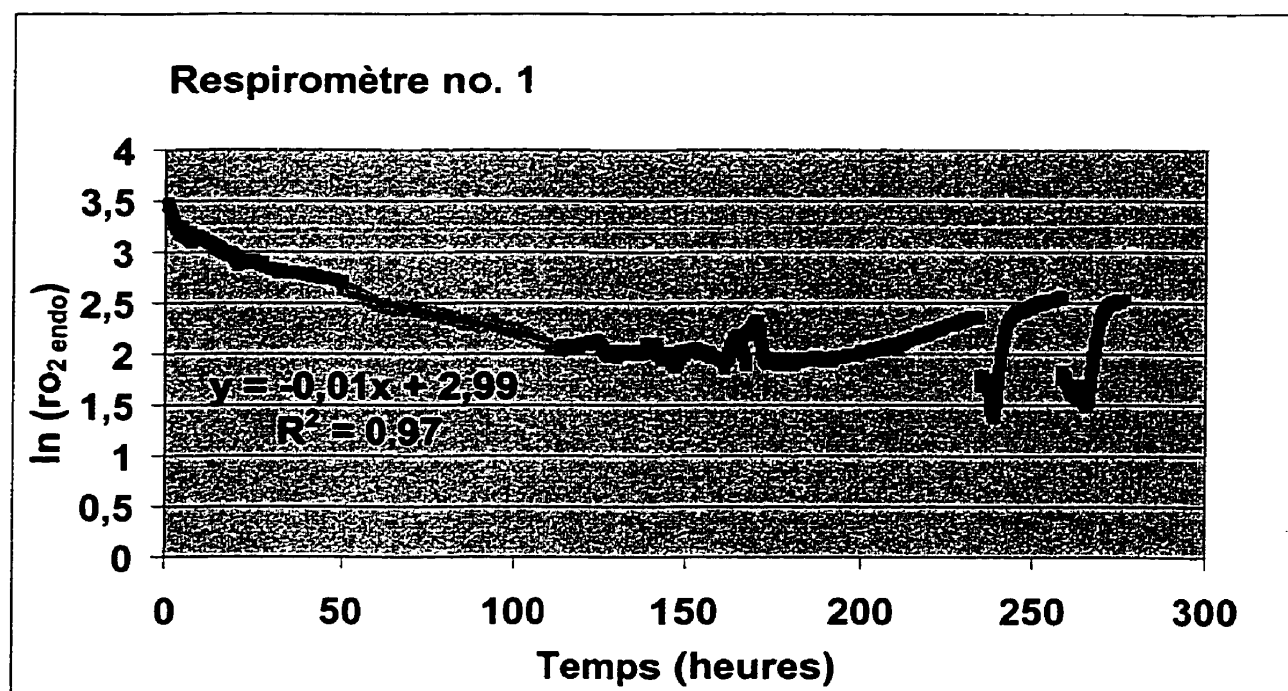
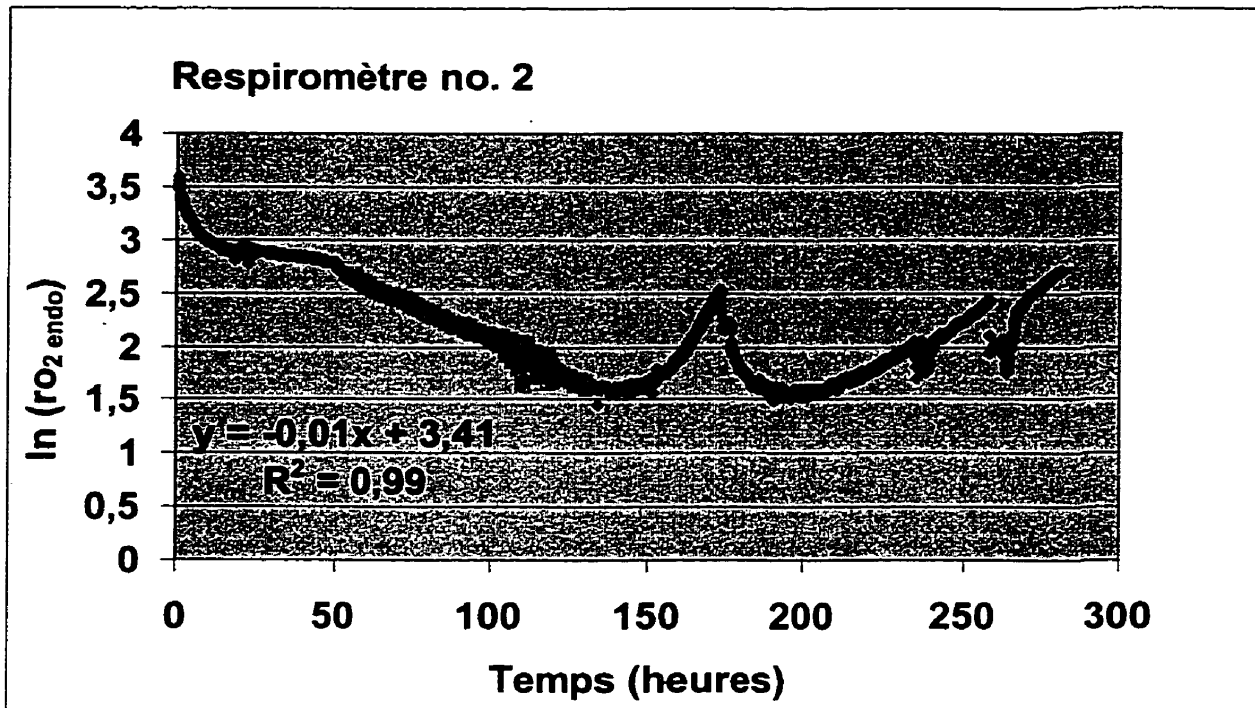


Figure 7-8 Respirogramme du respiromètre no. 1



**Figure 7-9** Respirogramme du respiromètre no. 2

Différentes possibilités ont été envisagées pour expliquer ces augmentations du taux de respiration. Lors des deux premiers essais, une contamination des respiromètres par un substrat a été suspectée. Les résultats de ces deux essais n'ont donc pas été conservés. Lors des deux essais subséquents, les hausses de respiration se produisant de nouveau, la dégradation de l'ATU semblait l'hypothèse la plus plausible. Différents tests ont donc été effectués pour vérifier cette hypothèse.

#### 7.2.3.4 Dégradation de l'ATU

Des injections d'ATU ont été planifiées afin de vérifier la réponse de la biomasse à l'ATU. La présence de NO<sub>x</sub> a été vérifiée à l'aide des bandelettes témoins Nitra-Test de MERCK afin de déterminer comment les bactéries autotrophes réagissaient à la présence de l'ATU.

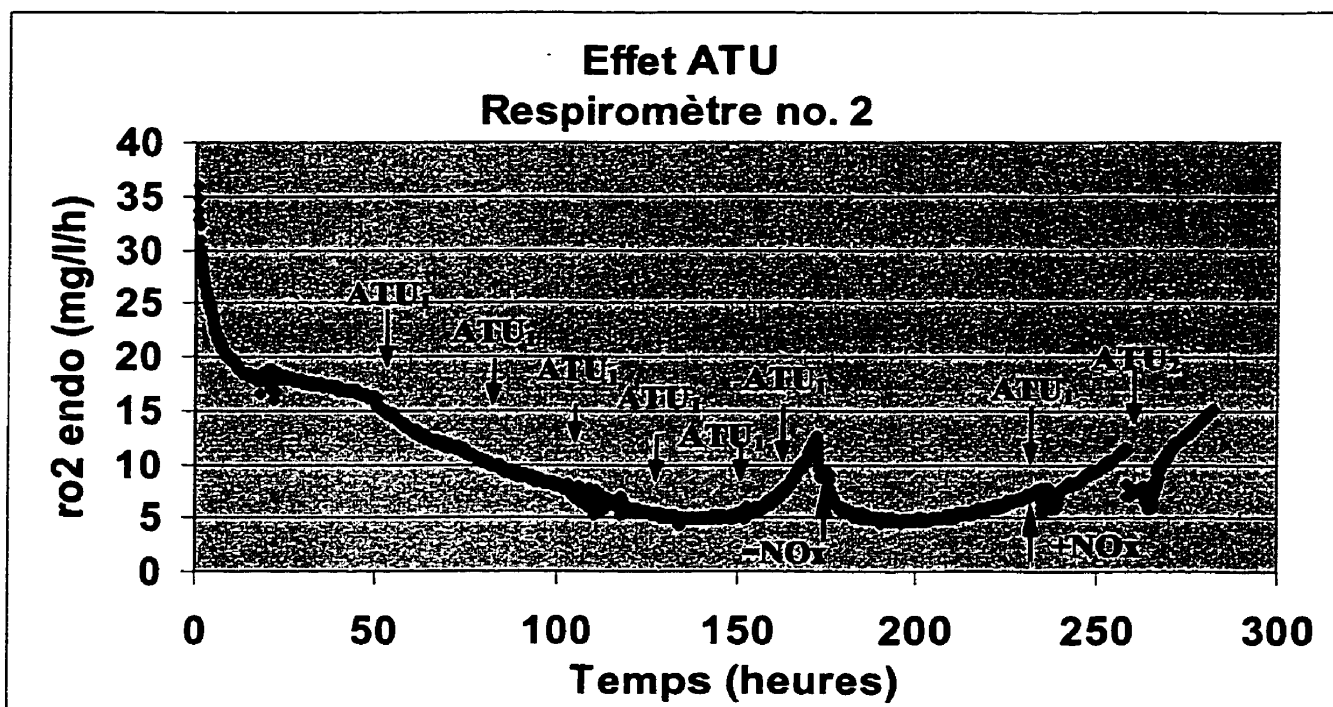


L'ATU semble inhiber la respiration autotrophe puisque la concentration en NOx dans le respiromètre est faible (moins de 10 mg/l) avant la 175<sup>ième</sup> heure du respirogramme no.2 (Figure 7-10). L'augmentation de respiration entre la 150<sup>ième</sup> et la 170<sup>ième</sup> heure ne peut donc être causée par la respiration autotrophe.

L'augmentation de respiration survenant entre la 150<sup>ième</sup> et la 170<sup>ième</sup> heure semble donc due à la respiration hétérotrophe sur le substrat que constitue l'ATU. Pour vérifier cette hypothèse, l'addition quotidienne d'ATU fut cessée aux environs de la 160<sup>ième</sup> heure et la respiration a diminué sensiblement après la 170<sup>ième</sup> heure.

Cependant, on constate une reprise de la respiration vers la 210<sup>ième</sup> heure. Selon toute vraisemblance, l'ATU étant probablement entièrement dégradé, cette reprise de la respiration peut être associée à l'activité autotrophique. La présence marquée de NO<sub>3</sub> (plus de 150 mg/l) dans la liqueur mixte à la 236<sup>ième</sup> heure confirme cette hypothèse. En effet, entre la 175<sup>ième</sup> et la 236<sup>ième</sup> heure, la concentration des NO<sub>3</sub> a augmentée de façon significative. Pour contrevérifier cette hypothèse, de l'ATU a été ajouté à la biomasse à la 236<sup>ième</sup> et à la 256<sup>ième</sup> heure. Ces injections d'ATU engendrent une chute marquée de la respiration, qui selon les hypothèses formulées, serait causée par l'inhibition de la respiration autotrophique. La respiration suivant la chute marquée (dans les 5 heures suivantes), serait associée à la dégradation de l'ATU par la population hétérotrophe. L'épuisement de l'ATU entraîne un point bas de la respiration, suivit par une reprise de la respiration qui serait causée par une reprise de l'activité autotrophe.

Afin de s'assurer de la qualité de l'ATU utilisée, de l'ATU provenant d'un lot de production différent (mais de la même compagnie de fabrication) a été testée. Cet essai est indiqué par la marque ATU<sub>2</sub> sur la Figure 7-10. La biomasse semble répondre de façon similaire aux deux sources d'ATU utilisées. La qualité de l'inhibiteur ne peut donc être mise en cause. L'ATU semble donc bien inhiber la respiration autotrophe, mais est dégradée par la population hétérotrophe après une période d'adaptation. Cette analyse semble concorder avec l'information disponible dans la littérature.



-NO<sub>x</sub> = faible concentration de NO<sub>2</sub> et NO<sub>3</sub>

+NO<sub>x</sub> = forte concentration de NO<sub>2</sub> et NO<sub>3</sub>

ATU<sub>1</sub> et ATU<sub>2</sub> = Injection d'ATU dans le respiromètre

**Figure 7-10 Respirogramme no.2: Respiration sur l'ATU**

La dégradation de l'ATU par les hétérotrophes après une période d'adaptation, est d'ailleurs documentée dans la littérature depuis plusieurs années (Tomlinson et coll., 1966). Toutefois il semble que la biomasse autotrophe ne présente pas d'adaptation métabolique causée par la présence d'ATU, puisque l'azote n'est pas oxydé lors d'une exposition prolongée à ce produit. En effet l'ATU intervient directement sur un cytochrome complexé avec un Cu<sup>+1</sup> de la souche *Nitrosomonas*. L'ATU bloque la respiration en occupant le site actif de l'enzyme en formant ainsi un complexe cytochrome-Cu-ATU (Wood et coll., 1981 ; Bédard et Knowles, 1989). Par ailleurs, l'ATU n'a aucun effet sur la population hétérotrophe puisque leurs cytochromes sont complexés avec du Fe<sup>+2</sup> (Wood et coll., 1981).

L'utilisation de l'ATU semble donc appropriée pour inhiber la respiration autotrophique, mais une exposition prolongée de la biomasse hétérotrophe à ce produit semble induire une adaptation métabolique qui débouche sur la dégradation de l'ATU par la biomasse hétérotrophe. Au cours des expériences effectuées au LIPE, la respiration associée à la dégradation de l'ATU apparaissait après une période d'exposition de 4 à 6 jours.

L'utilisation d'un produit inhibiteur non biodégradable semble plus indiqué pour des essais respirométriques prolongés. Une recherche devrait être entreprise pour trouver un produit inhibiteur équivalent. La 2-chloro-6-trichlorométhyl-pyridine est un inhibiteur qui intervient sur le même site du cytochrome que l'ATU (Campel et Aleem, 1965; Bédard et Knowles, 1989). Celle-ci est recommandée dans la dernière version du Standard Methods (APHA, AWWA, WPCF, 1998) et est utilisée par la compagnie Hach pour inhiber la nitrification dans les essais de mesure de  $DBO_5$ . Toutefois, les doses requises pour inhiber entièrement la respiration autotrophe semblent de l'ordre de 100 à 175 mg/l (Campel et Aleem, 1965). Des essais pourraient être entrepris afin de vérifier la stabilité de ce produit.

## **CHAPITRE 8**

### **DISCUSSION**

Selon la conclusion du chapitre 5, l'objectif de la manipulation était d'évaluer l'influence des ajustements métaboliques sur l'évaluation du taux de dépérissement, ainsi que sur le calcul de la concentration de la biomasse active hétérotrophe initiale ( $X_{H0}$ ) dans un réacteur en cuvée maintenu en phase endogène.

On visait ainsi à vérifier si il est possible de transposer la valeur obtenue à l'effluent d'un chémostat, pour ensuite évaluer le coefficient de rendement observé ( $Y_{Hobs}$ ) dans le chémostat, et par la suite en déduire le taux de dépérissement au cours de la phase de croissance ( $b_{Hcrois}$ ), tel que proposé par la méthode présentée au chapitre 5.

Toutefois pour évaluer un différentiel du taux de dépérissement, il est nécessaire au préalable d'évaluer si la précision de la méthode est suffisante.

#### **8.1 Précision des mesures**

Ainsi, dans un premier temps, il est nécessaire d'évaluer la précision des mesures. En première analyse, on peut croire que les mesures sont entachées par plusieurs types d'erreurs, dont entre autres les erreurs associées à l'instrumentation, les erreurs associées au dosage des réactifs, et les erreurs associées à la représentativité de l'échantillon.

### 8.1.1 Dosage des réactifs

Les erreurs associées au dosage des réactifs sont en général relativement faibles car ceux-ci sont dosés de façon à saturer le bagage enzymatique de la biomasse. Ainsi la concentration exacte des réactifs a plus ou moins d'importance puisque les enzymes deviennent le réactif limitant de la réaction.

Plus particulièrement, toutes les mesures de respiration ont été effectuées à des concentrations d'oxygène dissous supérieures à 2 mg/l. Il est généralement admis que des concentrations supérieures d'oxygène dissous ne limitent pas la respiration de la biomasse.

La concentration initiale de substrat carboné utilisée lors des essais respirométriques a toujours été supérieure à 560 mg DCO/l afin qu'il ne soit pas limitant, puisque la sensibilité de la méthode par rapport à l'indépendance de la constante de demi-saturation importe peu ici (Vanrolleghem et Coen, 1995). Pour les essais effectués à l'Université Laval, la concentration de substrat utilisée était de 0,1% (dans la cellule respirométrique) en extrait de levure car selon les observations effectuées, la respiration ne demeurait pas linéaire sur toute la période de mesure lorsque celui-ci était concentré à 0,05%.

L'azote et le phosphore ont été dosés dans un rapport 100 :5 :1 pour satisfaire les besoins de la synthèse. Ainsi tous les réactifs requis à la synthèse, ou à la respiration étaient présents en excès.

Pour les mesures de l'activité DHA, une vérification de la linéarité de la réaction en fonction de la concentration de la biomasse a été effectuée. Les résultats de ces analyses sont joints à l'annexe B.2.2 et B.3.2. Le protocole a été ajusté en fonction de la réponse de la biomasse utilisée. Cette manipulation avait justement pour but de vérifier que tous les réactifs soient présents en excès. De façon générale, lors des essais de calibration, le INT constituait le substrat limitant, ce qui entraînait une chute d'activité inversement proportionnelle à la

concentration de la biomasse. Toutes les mesures ont donc été effectuées dans le domaine linéaire défini par la droite de régression plaçant en relation l'activité DHA avec la concentration de la biomasse.

### 8.1.2 Instrumentation

Les marges d'erreurs associées à la précision de l'instrumentation varient de façon appréciable selon l'appareillage utilisé. Évidemment, le nombre de lectures enregistrées durant la période d'acquisition influe largement sur l'intervalle de confiance de la pente de la droite de régression obtenue. La combinaison des erreurs associées à l'instrumentation et à la régression montre des écarts importants entre les incertitudes sur les mesures effectuées à l'Université Laval et le LIPE. Le Tableau 8-1 présente les erreurs maximales associées aux instruments et à la méthode de calcul. L'incertitude associée à l'erreur sur la lecture induit une erreur potentielle sur la pente (1). L'incertitude découlant de la régression de la droite sur la décroissance de la concentration en O<sub>2</sub> dans le respiromètre est définie par  $\sigma/(n)^{0,5}$  (2).

Toutefois de façon générale, les marges d'erreur indiquées sur les figures sont définies par les intervalles de confiance de 95% ( $\pm 2\sigma$ ).

**Tableau 8-1 Incertitudes instrumentales sur les mesures de respiration**

Instrumentation	Université Laval Boues de Bernières	INSAT Boues de Ginestous
Sonde	YSI-53	WTW Cellox 325
Lecture	Analogique	Numérique
Intervalle d'enregistrement	2 minutes	10 ou 20 secondes
Erreur sur la lecture	1% de la valeur de saturation ( $\pm 0,1$ mg/l)	$\pm 0,01$ mg/l
Incertitude sur la pente (1)	7%	0,4%
Incertitude sur la régression (2)	4%	0,1%
Incertitude relative sur la mesure	11%	0,5%

Comme on pouvait s'y attendre, on constate d'ores et déjà qu'il est avantageux de multiplier le nombre de mesures et d'augmenter la précision des équipements pour obtenir une erreur relative la plus faible possible.

Pour les DHA, l'erreur sur la lecture devrait être définie par l'erreur associée à la déviation des points utilisés pour établir la courbe standard. L'erreur sur la mesure en TF sera donc de  $\pm 0,3$  mg/l, ou  $\pm 0,3\%$  à  $3\%$  en erreur relative. Ici, on a avantage à construire une courbe standard avec des points présentant une faible déviations afin de diminuer l'erreur sur les DHA.

### 8.1.3 Échantillons

Lors de l'analyse d'échantillons de boues activées, il est souvent admis que les essais effectués pour l'évaluation de constantes cinétiques sont difficilement reproductibles (Sommer et coll., 1998). Cet énoncé implique que les constantes cinétiques peuvent varier de façon aléatoire, et qu'une valeur singulière peut être non représentative des caractéristiques de la biomasse. Donc, afin de vérifier la représentativité des essais, ceux-ci ont été effectués en triplicatas.

Naturellement, comme on peut le constater au Tableau 8-2, les valeurs obtenues sur chaque triplicata diffèrent. On constate à l'examen de ce tableau, que la déviation moyenne est supérieure à l'incertitude sur la mesure indiquée au Tableau 8-1. Ces écarts induisent une incertitude sur la valeur obtenue par régression linéaire, tel qu'indiqué au Tableau 8-3. De plus comme les valeurs sont obtenues par régression linéaire, et que la validité de cette régression dépend du degré de corrélation, on parle davantage d'intervalle de confiance que d'incertitude pour le taux de dépérissement (la pente de la droite) et pour la vitesse de respiration initiale (l'ordonnée à l'origine).

Lorsque les mesures sont précises, l'erreur sur le taux de dépérissement de la biomasse active hétérotrophe est davantage fonction de l'écart type calculé que de l'erreur induite par l'instrumentation.

**Tableau 8-2 Déviations (en valeur relative) associées aux valeurs mesurées**

Instrumentation	Université Laval	INSAT
	Boues de Bernières	Boues de Ginestous
Nombre de duplicatas	3	2
Respiration endogène		
Déviations	1 à 28%	0,2% à 31%
Déviation moyenne	11%	10%
Respiration exogène		
Déviations	0 à 7%	0,3% à 58%
Déviation moyenne	3%	19%
Activité DHA		
Déviations	0 à 8%	0 à 49%
Déviation moyenne	2%	8%

**Tableau 8-3 Intervalles de confiance sur le taux de déperissement**

Instrumentation	Université Laval	INSAT
	Boues de Bernières	Boues de Ginestous
Nombre de duplicatas	3	2
Respiration endogène		
$b'_H$	0,09 d <sup>-1</sup>	0,09 d <sup>-1</sup>
Intervalle de confiance	0,02 (22%)	0,01 (11%)
Respiration exogène		
$b'_H$	0,10 d <sup>-1</sup>	0,11 d <sup>-1</sup>
Intervalle de confiance	0,01 (10%)	0,02 (18%)
Activité DHA		
$b'_H$	0,09 d <sup>-1</sup>	0,073 d <sup>-1</sup>
Intervalle de confiance	0,03 (33%)	0,009 (12%)

D'autre part, tel qu'indiqué au Tableau 8-4, l'intervalle de confiance sur la concentration initiale de biomasse ( $X_{H0}$ ) est relativement large, et selon les résultats obtenus dans les expérimentations effectuées, la précision de cette mesure peut être suffisante pour évaluer un taux différentiel de déperissement de la biomasse seulement si le différentiel qu'on cherche à caractériser est important.



**Tableau 8-4 Intervalles de confiance sur  $X_{H0}$  calculé selon l'Équation 5-13.**

Instrumentation	Université Laval Boues de Bernières	INSAT Boues de Ginestous
Nombre de duplicatas	3	2
Concentration initiale de la biomasse active hétérotrophe $X_{H0}$ Intervalle de confiance	2500 mgDCO/l 800 (30%)	4000 mgDCO/l 1300 (30%)

Notons ici que des perturbations de pH sont survenues au cours de l'expérience menée au LIPE sur les boues de Ginestous. Ces perturbations ont induit des déviations importantes sur certaines valeurs de respiration mesurées, ce qui augmente l'intervalle de confiance sur les valeurs obtenues. Une expérimentation plus stable, donc éventuellement un intervalle de confiance plus étroit, pourrait peut-être mener à une estimation suffisamment précise de la quantité de biomasse active hétérotrophe initiale lors de l'essai en cuvée endogène.

## 8.2 Validité de la méthode

La validité de la méthode basée sur la respiration maximale repose sur l'hypothèse formulée par Dold et coll. (1980), voulant que le coefficient de rendement ( $Y_H$ ) et la vitesse maximale de croissance ( $\mu_{Hmax}$ ) demeurent constants durant la respiration endogène. Le fait que ces deux paramètres demeurent constants implique que le taux de respiration spécifique maximal des bactéries demeure constant durant la respiration endogène étant donné la relation (adapté de Vanrolleghem et coll, 1999) :

$$\text{Équation 8-1} \quad \frac{rO_{2max}}{X_H} = \left[ \frac{(1 - Y_H)}{Y_H} * \mu_{Hmax} \right]$$

Or, comme cela a été mentionné au chapitre 2, diverses modifications du bagage enzymatique s'opèrent durant le processus de respiration endogène. Et comme on peut le constater sur la Figure 8-1, le rapport  $rO_{2maxH}/DHA$  des boues de Ginestou varie avec le temps de carence. L'activité DHA ne diminue pas au même rythme que la respiration.

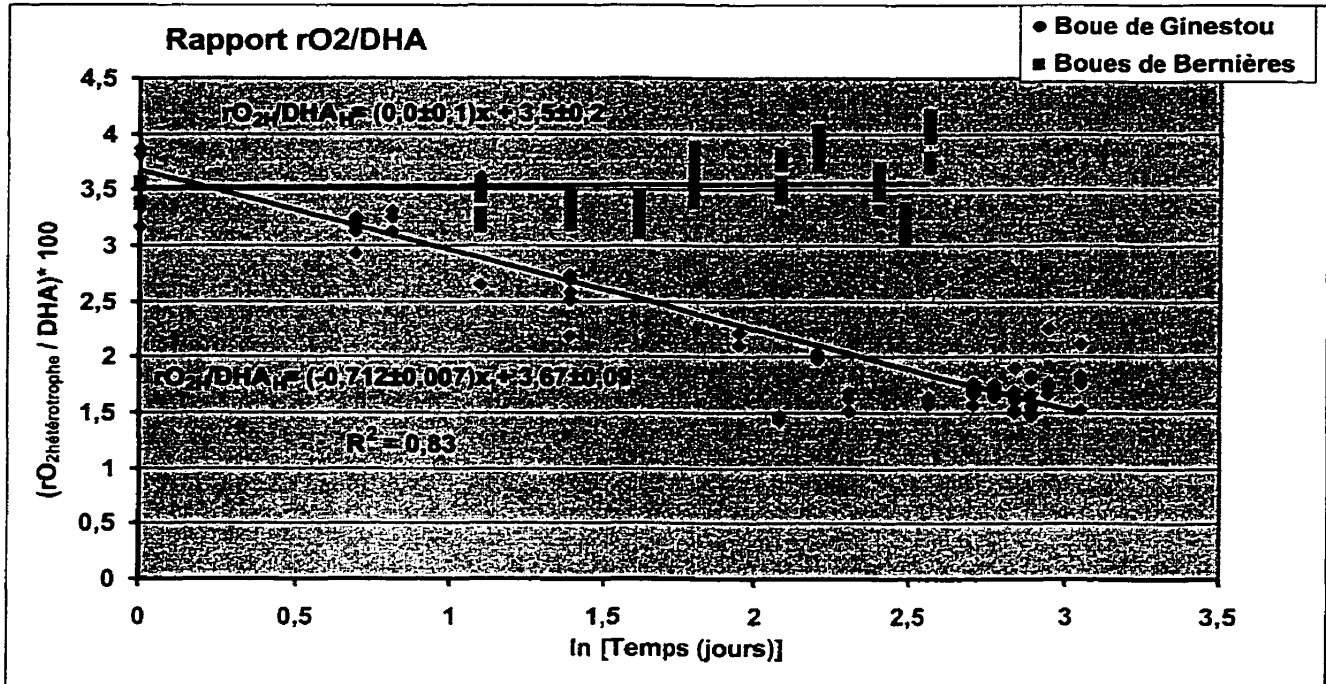


Figure 8-1 Évolution du rapport  $rO_{2H}/DHA_H$

L'analyse de la variance sur la droite de régression des points  $rO_{2maxH}/DHA$  obtenus avec les boues de Ginestou indique que la pente de la droite est non nulle. Pour l'hypothèse nulle ou la pente de la droite est égale à zéro, la variance des données ne peut être expliquée par le modèle à l'intérieur d'un intervalle de confiance de 95% (Walpole et Myers, 1995). D'autre part, la variance des données ne peut être entièrement expliquée (*lack of fit contribution*) par le modèle linéaire choisit, à l'intérieur d'un intervalle de confiance de 95% (Walpole et Myers, 1995). Donc la pente de la droite est statistiquement non nulle, mais un autre modèle que la régression linéaire correspondrait davantage aux données expérimentales.

La variation du rapport  $rO_{2maxH}/DHA$  illustre pourquoi la valeur du  $b'_H$  obtenue par la mesure de l'activité enzymatique DHA est inférieure à la valeur obtenue par respirométrie sur les deux réacteurs du LIPE. D'ailleurs, l'évaluation comparative des taux de dépérissement, révèle que les écarts obtenus entre les mesures respirométriques ( $rO_{2maxH}$ ) et les mesures enzymatiques sont statistiquement significatifs compte tenu du nombre de mesures effectuées. L'écart entre les deux valeurs du  $b_H$  mesuré est de 36%, ce qui est significatif.

On constate donc, que l'activité respiratoire spécifique des bactéries diminue au cours du processus de respiration endogène. Ces dernières observations impliquent que  $Y_H$  ou  $\mu_{Hmax}$  varient avec la réponse *stringente*, ce qui est à l'encontre de l'hypothèse formulée par l'Équation 8-1.

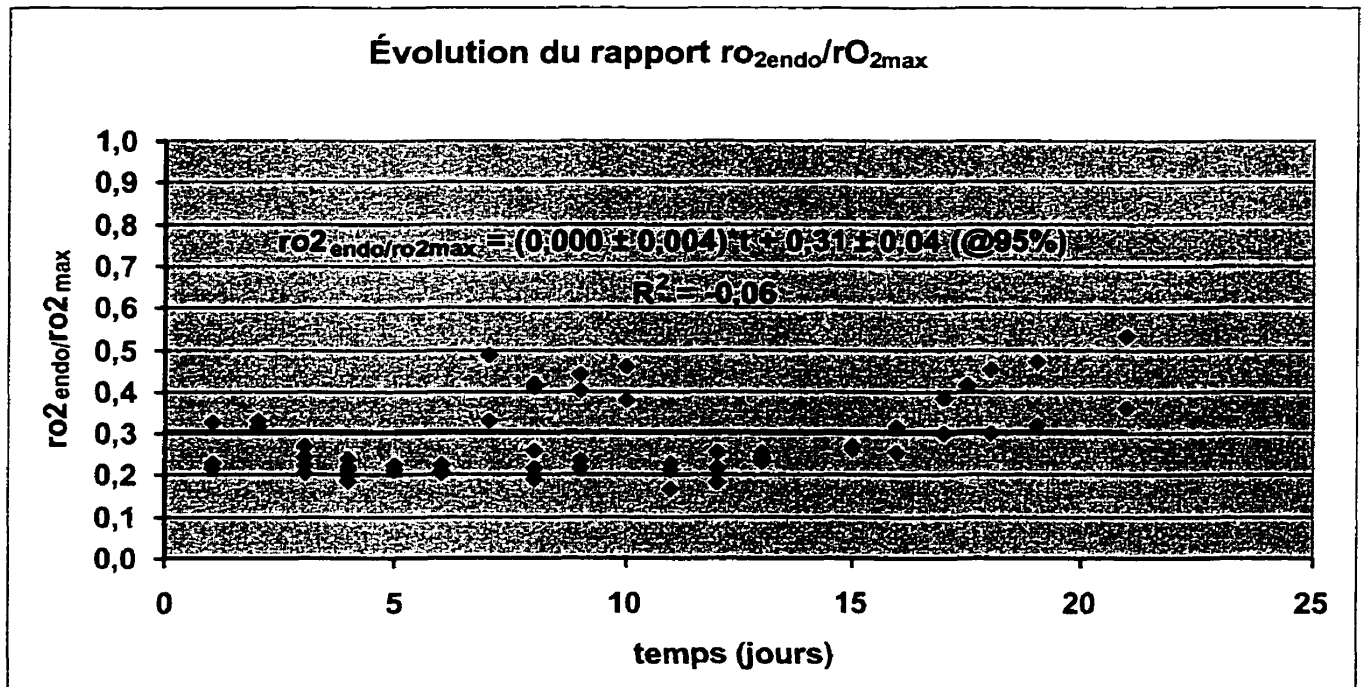
Si on se réfère aux observations de Nyström et Gustavsson (1998), il est possible qu'il se produise une diminution de l'activité NADH-DHA associée à la respiration, parallèlement à une augmentation de l'activité du système de transport d'électron (ETS) associée aux voies métaboliques de fermentation.

Selon les mesures effectuées au LIPE, on peut formuler l'hypothèse que l'activité DHA associée aux voies métaboliques de fermentation prend de plus en plus d'importance au cours de la respiration endogène, tel que proposé par Nyström (1994b). Les observations de Nyström (1994) sur *E. coli* concernant la répression de la chaîne respiratoire s'appliqueraient donc à l'ensemble d'une biomasse facultative, et les hypothèses avancées par Van Loosdrecht et Henze (1999) concernant la diminution de l'activité spécifique de la biomasse (internal decay), seraient en partie vérifiées.

La répression de l'activité au niveau de la chaîne respiratoire est donc un phénomène mesurable qui influe sur les mesures respirométriques. L'évaluation du taux de dépérissement s'en trouverait donc entachée d'une erreur expérimentale, puisque la répression des enzymes de la chaîne respiratoire se produit simultanément au dépérissement de la biomasse.

De plus, lorsque les mesures de respiration maximum étaient effectuées avec de l'acétate, la baisse du rapport  $rO_{2maxH}/DHA$  au cours de la carence a été confirmée par Besser (2000). Comme l'acétate semble un substrat représentatif de la fraction soluble d'une eau usée urbaine (Henze, 1992), les conclusions tirées de ces expérimentations pourraient être étendues à la biomasse de la plupart des stations de traitement municipales.

La Figure 8-2 montre l'évolution du rapport  $rO_{2endo}/rO_{2max}$  des boues de Bernières et de Ginestous. On constate que la pente de la droite et le coefficient de détermination sont nuls, ce qui indique qu'il n'existe pas de corrélation entre les variations de ce rapport et le temps. Ainsi, le rapport  $rO_{2endo}/rO_{2max}$  ne change pas au cours de la période de carence. Ceci implique par surcroît, que les ajustements métaboliques constatés à partir du rapport  $rO_{2Hmax}/DHA$ , influenceraient aussi la respiration endogène. Donc le taux de dépérissement évalué avec cette méthode serait entaché de la même erreur expérimentale.



**Figure 8-2** Évolution du rapport  $rO_{2endo}/rO_{2max}$  des boues de Bernières et de Ginestou (toutes valeurs confondues)

L'évaluation de la vitesse initiale de respiration endogène ( $rO_{2endi}$ ), définie par l'ordonnée à l'origine de la droite de régression de la respiration endogène, se trouve donc entachée d'une erreur significative de la même façon que le taux de dépérissement. Par conséquent, puisque le taux de respiration spécifique de la biomasse active hétérotrophe varie, la valeur  $X_{H0}$  calculée à partir de  $rO_{2endi}$ , serait entachée d'une erreur expérimentale significative non définie. On ne peut donc supposer que cette valeur soit représentative de la concentration de biomasse active hétérotrophe dans le chemostat duquel elle aurait été prélevée, tel que suggéré au chapitre 5. Il devient donc impossible selon la méthode proposée, d'évaluer le taux de dépérissement de la biomasse active hétérotrophe au cours de la phase de croissance ( $b_{Hcrois}$ ).

## CHAPITRE 9

### CONCLUSION

L'objectif de ce travail visait de façon préliminaire, à proposer une méthode pour évaluer la variation potentielle du taux de déperissement de la biomasse active hétérotrophe ( $\Delta b_H = b_{Hcroissance} - b_{Hendogène}$ ). Dans un deuxième temps, il visait à vérifier par différentes expérimentations, si les ajustements métaboliques relatés dans la littérature, exercent une influence significative lors de l'évaluation du taux de déperissement de la biomasse active hétérotrophe. Cette étape était nécessaire, afin de déterminer si le degré de précision de la méthode proposée s'avérerait suffisant pour évaluer un différentiel du taux de déperissement ( $\Delta b_H = b_{Hcroissance} - b_{Hendogène}$ ) statistiquement significatif.

La méthode proposée visait à déterminer le taux de déperissement de la biomasse active hétérotrophe sur une biomasse alimentée en substrat ( $b_{Hcrois}$ ). Les manipulations des équations mathématiques du modèle ASM1 montrent que selon les hypothèses du modèle, il semble possible de déterminer la quantité de biomasse active hétérotrophe initiale dans un réacteur placé en phase endogène. La valeur peut être déduite de l'ordonnée à l'origine ( $rO_{2endi}$ ) de la droite de pente  $b_{Hend}$  (Équation 5-13). Selon les hypothèses avancées, si le temps zéro de cette droite, correspond au moment où la biomasse a été prélevée d'un réacteur alimenté en substrat, la valeur  $X_{H0}$  correspondrait alors à la concentration de biomasse active hétérotrophe  $X_H$  du réacteur alimenté en substrat. Connaissant  $X_H$ , il est alors possible de déterminer  $Y_{obs}$  (Équation 5-11) et avec le rapport  $Y_{obs}/Y$  de déterminer  $b_{Hcrois}$  (Équation 5-5).

Or, selon la revue de littérature effectuée, la biomasse présente des caractéristiques variables en fonction des conditions environnementales. Différents régulateurs contrôlent l'expression du bagage génétique et influent sur la cinétique de la catalyse. La réponse *stringente*, induite par la production de ppGpp lors d'une carence en substrat, exerce un contrôle global sur le métabolisme de la cellule et régularise le flot anabolique et catabolique pour prévenir la dégradation de matériel endogène et le gaspillage d'énergie. Il en résulte que les enzymes de la chaîne respiratoire sont réprimés par la réponse *stringente* pour protéger les macromolécules de l'effet des hyperoxydants (Nysröm, 1998). Cette dernière remarque est en contradiction avec les hypothèses du modèle ASM1, puisqu'elle implique que la respiration maximale spécifique de la biomasse active hétérotrophe ( $rO_{2Hmax}/X_H$ ) varie.

D'ailleurs les résultats obtenus démontrent, lorsque les mesure de respiration maximale sont effectuées avec de l'acétate, que le rapport  $rO_{2maxH}/DHA$  de la biomasse active hétérotrophe varie avec le temps de carence. Selon l'analyse effectuée, cette variation du rapport  $rO_{2maxH}/DHA$  serait causée par une répression de l'expression des enzymes de la chaîne respiratoire lors de la réponse *stringente*. La répression de l'activité au niveau de la chaîne respiratoire est donc un phénomène mesurable qui influe sur les mesures respirométriques. Les observations de Nyström (1994a) sur *E. coli* concernant la répression de la chaîne respiratoire s'appliqueraient donc à l'ensemble d'une biomasse facultative, et les hypothèses avancées par Van Loosdrecht et Henze (1999) concernant la diminution de l'activité spécifique de la biomasse (internal decay) s'en trouvent vérifiées. L'évaluation du taux de dépérissement ( $b_H$ ) s'en trouve donc entachée d'une erreur expérimentale, puisque la répression des enzymes de la chaîne respiratoire se produit simultanément au dépérissement de la biomasse.

D'autre part, on sait maintenant depuis peu, que le dépérissement de la biomasse active varie avec la synthèse de complexes TA conditionnée par la présence de substrat. Le décès de la cellule peut être induit par des régulateurs métaboliques (Yarmolinsky, 1995), et varier en présence de substrat (Aizeman et coll., 1996). En phase de carence, la réponse *stringente* déclenche différents ajustements métaboliques pouvant déboucher sur la mort de la cellule, qui est causée par l'activation de toxines. Le taux de dépérissement réel de la biomasse serait donc une fonction de la concentration ou de la présence du substrat.

Le taux de déperissement de la biomasse active hétérotrophe ( $b_H$ ) serait donc une variable contrairement aux hypothèses formulées dans les modèles ASM (Henze et coll., 1986 ; Henze et coll., 1995 ; Henze et coll., 1999). Conséquemment, la méthode de mesure en cuinée endogène généralement utilisée pour évaluer le taux de déperissement de la biomasse active hétérotrophe ( $b_{Hend}$ ), serait éventuellement peu représentative du taux de déperissement en station ou en pilote, puisque dans ces situations, la biomasse est alimentée en substrat et le taux de déperissement correspondrait alors à  $b_{Hcrois}$ .

Puisque la théorie d'activation des toxines par la réponse *stringente* s'applique à la plupart des procaryotes (Gerdes, 2000 ; Hochman, 1997), on peut présumer que le taux de déperissement est variable aussi chez les autotrophes et les bactéries déphosphatantes. D'ailleurs, l'identification d'un gène du type *mazEF* a été effectuée sur au moins une espèce autotrophe (*Thiobacillus ferrooxidans*) (Gerdes, 2000), mais celui-ci reste cependant à identifier chez les populations nitrifiantes.

De plus, certaines expérimentations effectuées par Martinage (1999), démontrent que pour une biomasse nitrifiante soumise à une période de carence,  $\mu_{Amax}$  et  $Y_A$  peuvent varier. Les expériences menées par Martinage (1999) tendent donc à démontrer que le taux de respiration spécifique de la biomasse nitrifiante peut varier lors d'une carence. Il faut noter cependant, que la répression de l'expression de la chaîne respiratoire ne s'opérera pas, à tout le moins de la même façon, chez les autotrophes nitrifiants et chez les hétérotrophes, puisque les autotrophes nitrifiants ne sont pas facultatifs. On ne peut donc étendre les conclusions de cette étude sur la diminution du taux de respiration spécifique des bactéries hétérotrophes à une population autotrophe. Une revue de littérature sur la régulation du métabolisme de la biomasse autotrophe devrait être effectuée, pour vérifier de quelle façon cette biomasse module éventuellement son taux de respiration spécifique.

Selon les expérimentations effectuées, nous avons constaté d'une part, que la précision de la méthode proposée pour l'évaluation du  $b_{Hcrois}$  est potentiellement insuffisante pour nous permettre de distinguer  $b_{Hcrois}$  de  $b_{Hend}$  si l'écart entre les deux valeurs est peu important. Des expérimentations très stables seraient requises pour obtenir un degré de précision suffisant.



Aussi d'autre part, nous avons constaté à l'aide du rapport  $rO_{2max}/DHA$ , que l'activité de la chaîne respiratoire est réprimée par la réponse *stringente*. À posteriori de la discussion effectuée dans le présent document, à cause des ajustements métaboliques induits par la réponse *stringente*, il semble impossible avec les méthodes analytiques utilisées d'évaluer la concentration de biomasse active hétérotrophe ( $X_H$ ) dans un réacteur en cuvée ou dans un chimostat (Équation 5-13), et par conséquent de déterminer  $Y_{obs}$  (Équation 5-11), puis le taux de déperissement de la biomasse durant la phase de croissance (Équation 5-5). De fait, le formalisme de Herbert (1958) ne prévoit pas que le taux de déperissement soit variable. L'évaluation d'un taux de déperissement variable en se basant sur le formalisme de Herbert devient très difficile sans modifier les équations proposées par cet auteur. Donc, l'introduction d'un  $b_H$  variable ne peut se faire adéquatement sans revoir les équations à la base des modèles ASM. En ce sens, le formalisme proposé par Beefink (1990) semble, a priori, une représentation adéquate d'une cinétique incluant un taux de déperissement variable.

Donc, à l'heure actuelle, puisque le taux de déperissement ainsi que le taux de respiration spécifique de la biomasse active hétérotrophe varient avec la disponibilité du substrat, selon le formalisme à la base des modèles, et avec les méthodes respirométriques généralement utilisées, nous ne pouvons évaluer le taux de déperissement  $b_{Hcrois}$  ni le distinguer du taux de croissance. Nous sommes donc en mesure d'évaluer seulement le taux de croissance observé ( $\mu_{Hobs}$ ) de la biomasse active hétérotrophe. Les constantes  $\mu_{Hmax}$  et  $b_H$  utilisées dans le modèle ASM sont donc indissociables ou non identifiables, et  $b_H$  ne peut qu'être une estimation utilisée pour que la réponse du modèle colle aux résultats obtenus expérimentalement.

Puisque les complexes TA semblent communs aux organismes procaryotes (Arbidge et Chesbro, 1982 ; Gerdes, 2000 ; Hochman, 1997), et comme l'acétate utilisé lors des mesures, semble un substrat représentatif de la fraction soluble d'une eau usée urbaine (Henze, 1992), les conclusions tirées de ces expérimentations pourraient être étendues à la biomasse de la plupart des stations de traitement municipales.

En conclusion, sur la base de la revue de littérature et des observations expérimentales effectuées au cours de cette étude, on peut croire que le taux de déperissement de la biomasse

active hétérotrophe mesuré par respirométrie serait constitué d'une part, du taux de dépérissement réel de la biomasse, celui-ci variant en fonction du substrat, et d'autre part de l'effet de la régulation enzymatique tel que représenté par l'équation suivante :

**Équation 9-1**  $b_{HrO_2} = b_H(S) + \text{régulation enzymatique}$

Conséquemment, pour évaluer le taux de dépérissement réel de la biomasse, il serait nécessaire d'évaluer la quantité de biomasse active présente dans un système donné par le biais d'une méthode peu influencée par la régulation enzymatique. Pour ce faire, la méthode basée sur l'extraction de l'ADN proposée par Brands et coll. (1994), nous permettrait éventuellement d'atteindre cet objectif.

D'autre part, l'action des toxines entraînant la mort des cellules varie selon l'historique de la biomasse (selon les modèles biochimiques présentés, la quantité de toxine présente dans la cellule est fonction de son taux de croissance) et de l'ampleur ou de la durée de la carence (intensité de la réponse *stringente*). Pour évaluer l'action des toxines, un modèle incorporant la modélisation dynamique de la croissance des toxines (c.i.e. de certaines chaînes enzymatiques) serait donc requis. Le modèle cybernétique présenté par Baloo et Ramkrishna (1991), inclut des fonctions de régulation enzymatique, mais néglige le taux de dépérissement. En y incorporant le dépérissement, le modèle cybernétique de Baloo et Ramkrishna (1991) constitue une avenue intéressante pour évaluer de façon dynamique le taux de dépérissement réel de la biomasse active.

Une étude effectuée dans le cadre d'un doctorat serait donc envisageable pour évaluer, à l'aide d'un modèle cybernétique, le taux de dépérissement réel de la biomasse active au cours de la phase de croissance.

## RÉFÉRENCES

- Aizenman E., Engelberg-Kula H. et Glaser G., 1996. An *Escherichia coli* chromosomal « addiction module » regulated by 3',5'-bispyrophosphate : A model for programmed bacterial cell death, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, vol. 93, p. 6059-6063.
- Arbidge M. et Chesbro W. R., 1982. Very slow growth of *Bacillus polymyxa* : Stringent response and maintenance energy, Arch. Microbiol., vol. 132, p. 338-344.
- Avcioglu E., Orhon D. et Sösen S., 1998. A new method for the assessment of heterotrophic endogenous respiration rate under aerobic and anoxic conditions, Wat. Sci. Tech., vol. 38, no. 8-9, 95-103.
- Awong J., Bitton G. et Koopman B., 1985. ATP, oxygen uptake rate and INT-dehydrogenase activity of actinomycete foams, Water Res., vol 19, no 7, 917-921.
- Baloo S. et Ramkrishna D., 1991. Metabolic regulation in bacterial continuous cultures :1, Biotechnol. et Bioeng., vol. 38, p. 1337-1352.
- Beefink H. H., van der Heijden R. T. J. M. et Heijnen J. J., 1990. Maintenance requirements : energy supply from simultaneous endogenous respiration and substrate consumption, FEMS Microbiology Ecology, vol. 73, p. 203-210.
- Bédard C. et Knowles R., 1989. Physiology, Biochemistry, and Specific inhibitors of CH<sub>4</sub>, NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, and CO oxydation by methanotrophs and nitrifiers, Microbiol. Rev., vol 53, no 1, 68-84.
- Besser, C. (2000). Evaluation of the degree of correlation of experimental respiratory methods to determine the decay coefficient  $b_H$  of heterotrophic biomass and the activity of the enzyme Dehydrogenase (DHA). Thesis (Diploma), Institute of Environmental Technology, School of Process Sciences and Engineering, Technical University of Berlin.
- Brands E., Liebeskind M. et Dohmann M., 1994. Parameters for dynamic simulation of wastewater treatment plants with high-rate and low-rate activated sludge tanks, Wat. Sci. Tech., vol. 30, no. 4, p. 211-214.

- Budavari S., O'Neil M. J., Smith A., Heckelman P. E. et Kinneary J. F., 1996. *Merk Index*  
An encyclopedia of chemicals, drugs and biological, Merk research laboratory, Merk &  
Co. Inc., Whitehouse Station, N. J., U.S.A.
- Campel N. E. R. et Aleem M. I. H., 1965. The effect of 2-chloro, 6-(trichloromethyl)  
pyridine on the chemoautotrophic metabolism of nitrifying bacteria, *Antonie van  
Leeuwenhoek*, 31, 124-136.
- Chung Y.-C. et Neethling J. B., 1989. Microbial activity measurement for anaerobic sludge  
digestion, *J. Water Pollut. Control Fed.*, 61, 343-349.
- Cozzone A. J., 1981. How do bacteria synthesize proteins during amino acid starvation ?,  
*TIBS*, Elsevier/North-Holland Biomedical Press, Avril, p. 108-110.
- Dold P. L., Ekama G. A. et Marais G. vR., 1980. A general model for the activated sludge  
process, *Prog. Wat. Tech.*, vol. 12, p. 47-77.
- Dejardins M. A., 1986. *BIOBAC: logiciel de simulation de bioréacteur à boues activées*  
manuel d'utilisation, École polytechnique, Département de génie civil, Montréal.
- Dykhuisen et Hartl, 1983, Selection in chemostats, *Microbiology Reviews*, vol. 47, no. 2, p.  
150-168.
- Eckenfelder W. W. et Watkin A. T., 1984. A new design procedure for activated sludge  
based on active mass, 7<sup>th</sup> Symposium on wastewater treatment, Montréal, Canada, p.  
287-296.
- Elliott A., Dorica J. et Brousseau Y., 1999. Pilot scale evaluation of sludge reduction  
techniques at a TMP/newsprint mill, *Pulp & Paper Canada*, 100 :1, 59-63.
- Ford D. L., Yang J. T. et Eckenfelder W. W., 1966. Dehydrogenase enzyme as a parameter  
of activated sludge activities, Dans *Proceedings of the 21<sup>th</sup> Industrial Waste Conference*,  
Purdue University, West Lafayette, N.J., 534-543.
- Gallant J. A., 1979. Stringent control in *E. coli*, *Ann. Rev. Genet.*, vol. 13, p. 393-415.
- Gerdes K., 2000, Toxin-Antitoxin module may regulate synthesis of macromolecules  
during nutritional stress, *Journal of Bacteriology*, vol. 182, no. 3, p. 561-572.
- Goel R., Mino T., Satoh H. et Matsuo T., 1998. Enzyme activities under anaerobic and  
aerobic conditions in activated sludge sequencing batch reactor, *Water Res.*, vol 32, no  
7, p. 2081-2088.

- Grady C. P. L. et Roper R. E. Jr., 1974. A model for the bio-oxidation process which incorporates the viability concept, *Wat. Research*, vol. 8, p 471-483.
- Grady C. P. L. Jr., Smets B. F. et Barbeau D. S., 1996. Variability in kinetic parameter estimates : a review of possible causes and a proposed terminology, *Water Research*, vol. 30, no. 3, p. 742-748.
- Gujer W., Henze M., Takahashi M. et Van Loosdrecht M., 1999. Activated sludge model no. 3, *Wat. Sci. Tech.*, vol. 39, no. 1, p. 183-193.
- Hamer G. et Zwiefelhofer H. P., 1986. Aerobic thermophilic hygienisation - A supplement to anaerobic mesophilic waste sludge digestion, *Chem. Eng. Res. Des.*, vol. 64, p. 417-424.
- Henze M., 1992. Characterization of wastewater for modelling of activated sludge processes, *Wat. Sci. Tech.*, vol. 25, no. 6, p. 1-15.
- Henze M., Grady C. L. P. Jr, Gujer W., Marais G. v. R. et Matsuo T., 1986. Activated sludge model no. 1, *Scientific and technical reports no. 1, IAWPRC*.
- Henze M., Gujer W., Takahashi M., Tomonori M., Wentzel M. C., Marais G. v. R., 1995. Activated sludge model no. 2, , *Scientific and technical reports no. 3, IAWQ*.
- Henze M., Gujer W., Takahashi M., Tomonori M., Wentzel M. C., Marais G. v. R., et Van Loosdrecht M. C. M.. 1999. Activated sludge model no. 2D, ASM 2D, *Wat. Sci. Tech.*, vol. 39, no. 1, p. 165-182.
- Herbert D., 1958. Some principles of continuous culture, *Symp. 7<sup>th</sup> Intern. Congr. Microbiol.*, p. 381-396.
- Hochman A., 1997. Programmed cell death in prokaryotes, *Critical reviews in Microbiology*, vol. 23, no. 3, p. 207-214.
- Huisman G. W. et Kolter R., 1994. Sensing starvation : A homoserine lactone-dependent signaling pathway in *Escherichia coli*, *Science*, vol. 265, p. 537-539.
- Iuchi S. et Lin E. C. C., 1988. *arcA* (*dye*), a global regulatory gene in *Escherichia coli* mediating repression of enzymes in aerobic pathways, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85, 1888-1892.
- Jensen K. F. et Pedersen S., 1990. Metabolic growth rate control in *Escherichia coli* may be a consequence of subsaturation of the macromolecular biosynthetic apparatus with substrates and catalytic components, *Microbiological Reviews* vol. 54, no. 2, p. 89-100.

- Kappeler J. et Guyer W., 1992. Estimation of kinetic parameters of heterotrophic biomass under aerobic conditions and characterisation of wastewater for activated sludge modelling, *Wat. Sci. Tech.*, vol. 25, no. 6, 125-139.
- Kaprelyants A. S., Gottschal J. C. et Douglas B. K., 1993. Dormancy in non-sporulating bacteria, *FEMS Microbiology Reviews*, vol. 104, p. 271-286.
- Keesman K. J., Spanjers H. et van Straten G., 1998. Analysis of endogenous process behaviour, *Wat. Sci. Tech.*, vol. 37, no. 12, p. 227-235.
- Klapwijk A., Drent J. et Steenvoorden J. H. A. M., 1974, A modified procedure for the TTC-dehydrogenase test in activated-sludge, *Water Res.*, vol. 8, 121-125.
- Lavallée B., 2000. Étude comparative de différentes méthodes d'évaluation du taux de décès des bactéries hétérotrophes et influence de traitements physico-chimiques. Rapport scientifique, Coopération scientifique franco-qubécoise : Optimisation et automation par l'utilisation de modèles dynamiques de procédés biologiques d'épuration des eaux, Département de génie civil, Université Laval, Canada.
- Le Bihan Y., 1999a. Utilisation d'essais biochimiques pour le suivi opérationnel des procédés par biofiltration, Thèse de doctorat, Département de génie civil, Faculté des sciences et de génie, Université Laval, Québec, Canada.
- Le Bihan Y., 1999b. Influence des protozoaires sur le taux de décès des bactéries autotrophes nitrifiantes, Rapport de stage, Coopération scientifique franco-qubécoise : Optimisation et automatiser par l'utilisation de modèle dynamiques de procédés biologiques d'épuration des eaux, Département de Génie des procédés industriels, LIPE, INSA, Toulouse, France.
- Lenhard G. et Nourse L. D., 1964. The measurement of dehydrogenase activity of activated sludges, *Advance in Water Pollution Reaserch*, Ed. by BAARS, vol 2, 105-119.
- Lishman L. A. et Murphy K. L., 1994. The significance of hydrolysis in microbial death and decay, *Wat. Sci. Tech.*, vol. 28, no. 11, 2417-2419.
- Low E. W. et Chase H. A., 1999. Reducing production of excess biomass during wastewater treatment, *Wat. Sci. Tech.*, vol 33, no 5, 1119-1132.
- Marr A. G., Nilson E. H. et Clark D. J., 1963. The maintenance requirement of *Escherichia coli*, *Annals New York Academy of Sciences*, vol. 102, p. 536-548.

- Matinage V., 1999. Traitement biologique d'eaux résiduaires engendrant des variations du rapport C/N : analyse de la nitrification, Thèse de doctorat, Génie des Procédés, INSA, Toulouse, France.
- Mason C. A. et Egli T., 1993. Dynamics of microbial growth in the decelerating and stationary phase of batch culture, in Starvation in bacteria, Édition de S. Kjelleberg, Plenum Press, New York et London, p. 81-102.
- Masson C. A., Hamer G. et Bryers J. D., 1986. The death and lysis of microorganisms in environmental processes, FEMS Microbiology Reviews, vol. 39, p. 373-401.
- McGrew S. B. et Mallette M. F., 1962. Energy of maintenance in *Escherichia coli*, J. Bacteriol., vol. 83, p. 844-850.
- Monod J., 1949. The growth of bacterial cultures, Ann. Rev. Microbiol., 3, 371-394.
- Neidhardt F. C., Ingraham J. L., Low K. B., Magasanik B., Schaechter M. et Umberger H. E., 1987. *Escherichia coli* and *salmonella typhimurium*, cellular and molecular biology, volume 1, American society for Microbiology, Washington, 1987.
- Nybroe O., Jorgensen P. E. et Henze M., 1992. Enzyme activities in waste water and activated sludge, Water Res., vol. 26, no 5, 579-584.
- Nyström T., 1993. Global systems approach to the physiology of the starved cell, in Starvation in bacteria, Édition de S. Kjelleberg, Plenum Press, New York et London, p. 129-150.
- Nyström T., 1994a. Role of guanosine tetraphosphate in gene expression and survival of glucose or seryl-tRNA starved cells of *Escherichia coli* K12, Mol. Gen. Genet., vol. 245, p. 355-362.
- Nyström T., 1994b. The glucose-starvation stimulon of *Escherichia coli* : induced and repressed synthesis of enzymes of central metabolic pathways and role of acetyl phosphate in gene expression and starvation survival, Mol. Microbiol., 12, 5, 833-843.
- Nyström T., 1998. To be or not to be : the ultimate decision of the growth-arrested bacteria cell, FEMS Microbiology Reviews, vol. 21, p. 283-290.
- Nyström T. et Gustavsson N., 1998. Maintenance energy requirement : what is required for stasis survival of *Escherichia coli* ?, Biochimica et Biophysica Acta, 1365, 225-231.

- Ochoa Chaves J. C., 1998. Performances épuratoires d'un réacteur type lit fluidisé inverse pour l'élimination du carbone et de l'azote d'une eau résiduaire urbaine, Diplôme d'études approfondies, LIPE, INSA, Toulouse, France.
- Östling J., Holmquist L., Flärdh K., Svenblad B., Jouper-Jaan A. et Kjelleberg S., 1993. Starvation and recovery of *Vibrio*, in Starvation in bacteria, Édition de S. Kjelleberg, Plenum Press, New York et London, p. 103-127.
- Patterson J. W., Brezonik P. L. et Putnam H. D., 1969. Sludge activity parameters and their application to toxicity measurements and activated sludge, 24<sup>th</sup> Ind. Waste Conf., Purdue Univ., 127-154.
- Pirt S. J., 1965. The maintenance energy of bacteria in growing cultures, Proc. Roy. Soc., vol. 163 B, p. 224-231
- Prescott L. M., Harley J. P. et Klein D. A., 1996. Microbiology, Wm. C. Brown Publishers, Dubuque, IA, 1990
- Richards S. R., Hastwell C. et Davies M., 1984. The comparative examination of 14 activated-sludge plants using enzymatic techniques, Wat Pollut Control, North Eastern Branch, 83, 3, 300-313.
- Rocher M., Goma G., Pilas Begue A., Louvel L. et Rols J. L., 1999. Toward a reduction in excess sludge production in activated sludge processes : biomass physicochemical treatment and biodegradation, Appl. Microbiol. Biotech., 51, 883-890.
- Rojas A. M. et Ehrenberg M., 1991. How does ppGpp affect translational accuracy in the stringent response ?, Biochimie, vol. 73, 599-605.
- Siegele D. A., Almiron M. et Kolter R., 1993. Approches to the study of survival and death in stationary-phase *Escherichia coli*, in Starvation in bacteria, Édition de S. Kjelleberg, Plenum Press, New York et London, p. 129-150.
- Siegrist H., Brunner I., Koch G., Linh Con Phan et Van Chieu Le, 1999. Reduction of biomass decay rate under anoxic and anaerobic conditions, Wat. Sci. Tech., vol. 39, no. 1, p. 129-137.
- Sollfrank U. et Gujer W., 1991. Characterisation of domestic wastewater for mathematical modeling of the activated sludge process, Wat. Sci. Tech., vol. 23, 1057-1066.
- Sommer H. M., Spliid H., Holst H. et Arvin E., 1998. Examination of reproductibility in microbial degradation experiments, Biodegradation, 9, 65-82.



- Spanjers H., Vanrolleghem P., Olsson G. et Dold P.L., 1998. *Respirometry in control of the activated sludge process : Principles*, Scientific and technical report no. 7, IAWQ.
- Spérandio M., 1998. *Développement d'une procédure de compartimentation d'une eau résiduaire urbaine et application à la modélisation dynamique de procédés à boues activées*, Thèse de doctorat, Génie des Procédés, INSA, Toulouse, France.
- Springer A. M., Dietrich-Velazquez G., Higby C. M. et Digiacommo D., 1996. Feasibility study of sludge lysis and recycle in the activated-sludge process, *TAPPI Journal*, vol 79, no 5, 162-170.
- APHA, AWWA, WPCF, 1998. *Standard Methods for the examination of water and wastewater*, American Public Health Association.
- Stouthamer A. H., 1984. The relation between biomass production and substrate consumption at very low growth rates, in *Innovations in Biotechnology*, édition de Houwink et van der Meer, Elsevier Science Publisher, p. 517-529.
- Tchobanoglous G. et Burton F., 1991. *Wastewater engineering, Treatment disposal and reuse*, Metcalf & Eddy, Mc Graw-Hill.
- Tempest D. W. et Neijssel O. M., 1984. The status of  $Y_{ATP}$  and maintenance energy as biologically interpretable phenomena, *Ann. Rev. Microbiol.*, vol. 38, p. 459-486.
- Teuber M. et Brodisch K. E. U., 1977. Enzymatic activities of activated sludge, *European J. Appl. Microbiol.*, 4, 185-194.
- Tomlinson T. G., Boon A. G. et Trotman C. N. A., 1966. Inhibition of nitrification in activated sludge process of sewage disposal, *J. Appl. Bact.*, 29, (2), 266-291.
- Trevors J. T., 1984. The measurement of electron transport system (ETS) activity in freshwater sediment, *Water Research*, vol. 18, no. 5, p. 581-584.
- Van Loosdrecht M. C. M. et Henze M., 1999. Maintenance, endogenous respiration, lysis, decay and predation, *Wat. Sci Tech*, vol. 39, no. 1, 107-117.
- Vanrolleghem P. et Coen F., 1995. Optimal design of in-sensor-experiment for on-line modelling of nitrogen removal processes, *Wat. Sci. Tech.*, vol. 31, no. 2, p. 149-160.
- Vanrolleghem P. A., Spanjers H., Petersen B., Ginestet P., et Takacs I., 1999. Estimating (combinations of) activated sludge model no. 1 parameters and components by respirometry, *Wat. Sci. Tech.*, vol. 39, no. 1, 195-214.

- Van Verseveld H. W., Chesbro W. R., Braster M. et Stouthamer A. H., 1984. Eubacteria have 3 growth modes keyed to nutrient flow Consequences for the concept of maintenance and maximal growth yield, Arch. Microbiol, vol. 137, p. 176-184.
- Walker G. C., 1984. Mutagenesis and inducible responses to dexoyribonucleic acid damage in *Escherichia coli*, Microbiological Reviews, vol. 48, no. 1, p. 60-93.
- Walpole R. E. et Myers R. H., 1985. Probability and Statistics for Engineers and Scientists, Macmillan Publishing Compagny, New York, 639 p..
- Weddle C. L. et Jenkins D., 1971. The viability and activity of activated sludge, Water Research, vol. 5, p. 621-640.
- Wood L. B., Hurley B. J. E. et Matthews P. J., 1981. Some observations on the biochemistry and inhibition of nitrification, Water Res., vol 15, 543-551.
- Yarmolinsky M. B., 1995. Programmed cell Death in Bacterial populations, Science, vol. 267, p. 836-837.
- Zambrano M. M., Siegele D. A., Almiron M., Tormo A. et Kolter R., 1993. Microbial competition : *Escherichia coli* mutants that take over stationary phase cultures, Science, vol. 259, p. 1757-1760.

**ANNEXE A**    *Mesures respirométriques*

***Annexe A.1 Vérification de la réponse de la sonde***

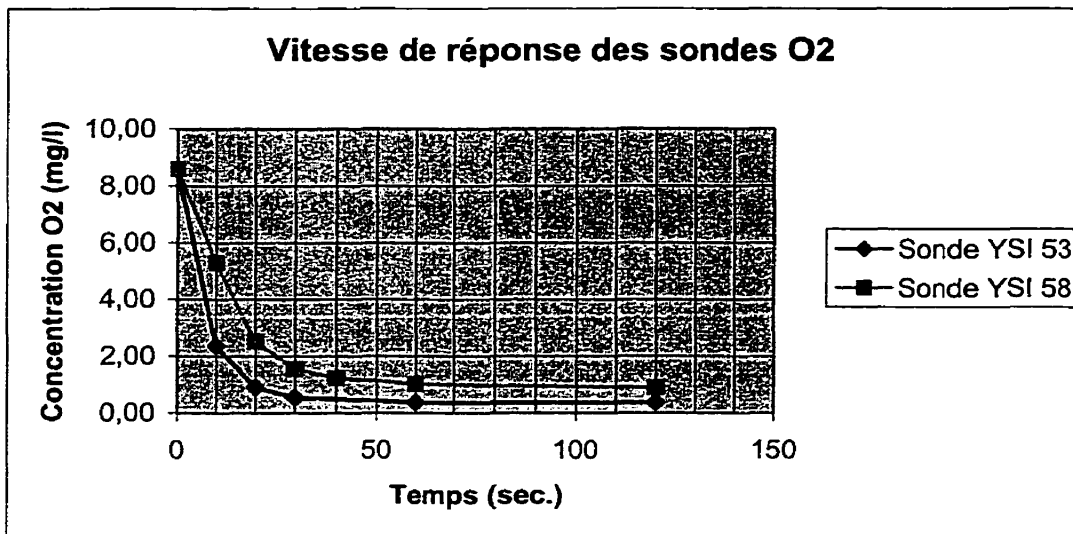
### Vérification de la vitesse de réponse de la sonde

**sonde YSI 53**

T sec.	%	O <sub>2</sub> mg/l
0	94%	8,54
10	26%	2,36
20	10%	0,91
30	6%	0,55
60	4%	0,36
120	4%	0,36

**sonde YSI 58 (témoin)**

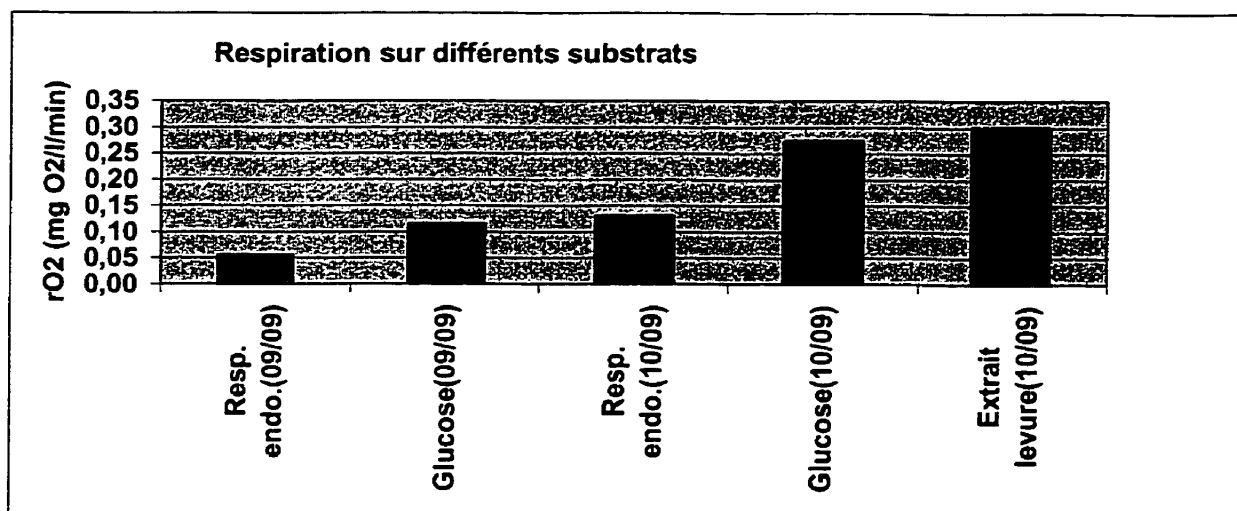
T sec.	O <sub>2</sub> mg/l
0	8,58
10	5,29
20	2,52
30	1,56
40	1,23
60	1,02
120	0,88



***Annexe A.2 Respiration sur divers substrats***

### Respiration sur différents substrats

Date	Substrat	rO2 mg/l/min
09/09/99	Resp. endo.(09/09)	0,0538
09/09/99	Glucose(09/09)	0,1136
10/09/99	Resp. endo.(10/09)	0,1298
10/09/99	Glucose(10/09)	0,2728
10/09/99	Extrait levure(10/09)	0,2991



***Annexe A.3 Protocole des mesures respirométriques***



## **PROTOCOLE D'ÉVALUATION DE LA RESPIRATION**

**(Protocole utilisé à l'université Laval sur les boues de Bernières)**

*Précision de la méthode :  $\pm 0.008 @ 0.02 \text{ mg/l/min}$*

*Gamme :  $0.008 @ 23 \text{ mg/l/min}$*

L'évaluation de la respiration est effectuée selon une adaptation de la méthode proposée par Oron (1998). Le substrat retenu est l'extrait de levure puisque la réponse obtenue était plus forte que celle donnée par l'acétate recommandé par Spanjers et Vanrolleghem (1995). La concentration du substrat dans la biomasse est supérieure à 400 mg/l afin qu'il ne soit pas limitant, puisque la sensibilité de la méthode par rapport à l'indépendance de la constante de demi-saturation importe peu ici (Vanrolleghem et Coen, 1995).

La solution tampon et le complément azoté sont ajoutés dans un rapport excédant 100 :5 :1. De l'allylthiouré est ajoutée dans un rapport de 4 mg/ 100 mg de MVES (25 mg/l) aux échantillons de biomasse prélevés avant la mesure respirométrique pour inhiber la respiration de la population autotrophe.

### **Réactifs**

- $\text{NH}_4\text{Cl}$  (0.8 M)
- Tampon  $\text{PO}_4$  (0.1 M) pH 7.3
- Acétate de sodium ( $\text{CH}_3\text{COONa}$ ) (3.1 M)
- Glucose ( $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$ ) (30.0 %)
- Extrait de levure (30%)
- ATU (0.4 %)

### **Calibration de la sonde**

Thermostater de l'eau à 20°C et mesurer la concentration d'oxygène dissous avec la sonde YSI 58.

Remplir le respiromètre avec l'eau à 20°C. Insérer la sonde dans le respiromètre jusqu'à la marque pour ajuster la profondeur d'insertion. Ajuster le mouvement de la barre aimantée à environ 1200 trm. Calibrer la sonde YSI 53 selon la mesure obtenue avec la sonde YSI 58.

### **Évaluation de la respiration**

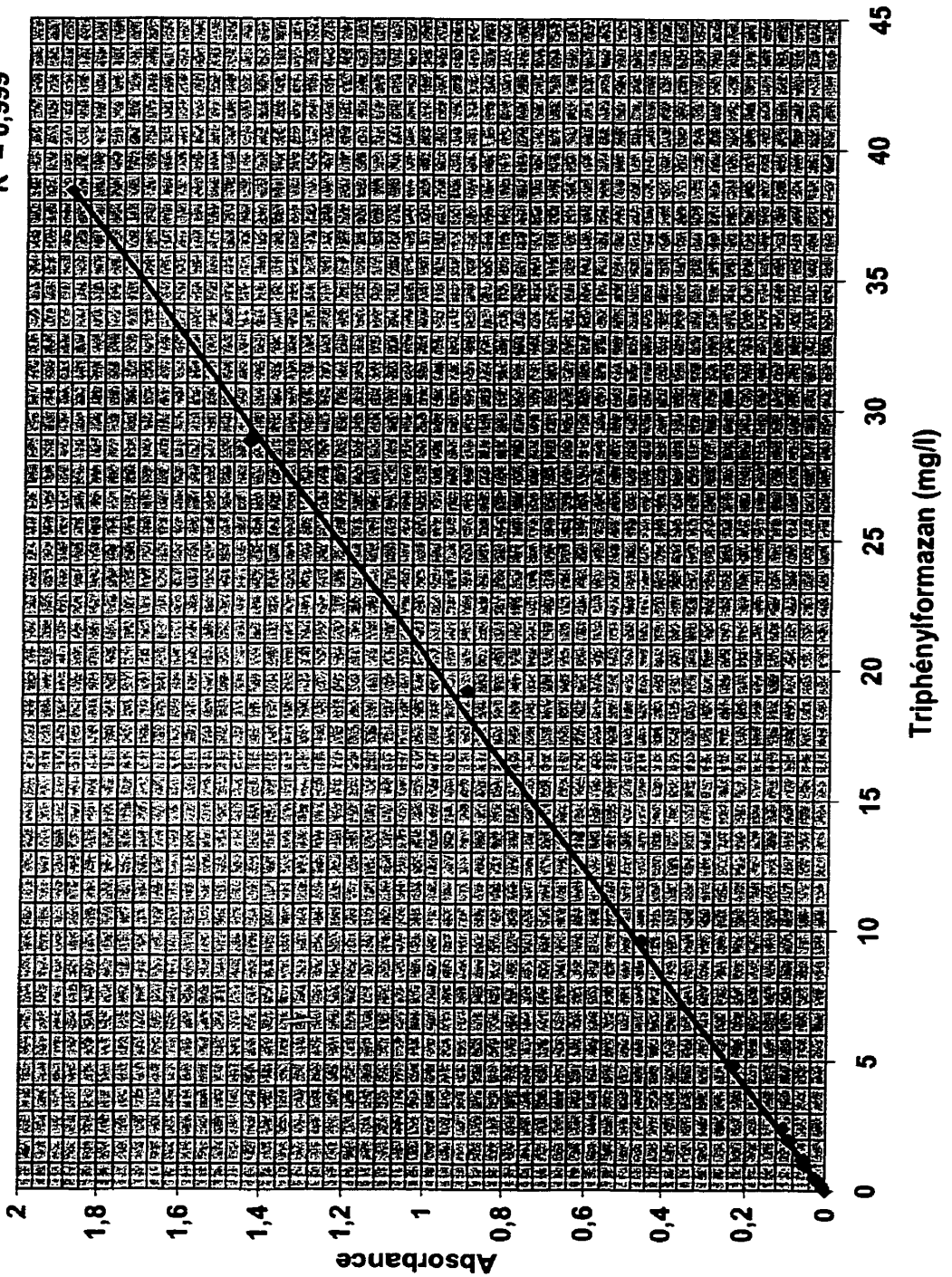
1. Prélever environ 350 ml de biomasse dans le réacteur.
2. Ajouter 1.75 ml de ATU (thermostaté à 20°C) et oxygéner à saturation par agitation.
3. Placer la boue dans le respiromètre et fermer de façon étanche.
4. À toutes les 2 minutes, mesurer la concentration en O<sub>2</sub>, et ceci au cours d'une période de 10 minutes (pour obtenir environ 5 points).
5. Injecter 1.0 ml de substrat (thermostaté à 20°C) dans le respiromètre.
6. À toutes les 2 minutes, mesurer la concentration en O<sub>2</sub>, jusqu'à ce que la concentration atteigne 2 mg/l ( 25 %) ou durant une période de 10 minutes (5 points).

**ANNEXE B** *Mesure de l'activité DHA*

***Annexe B.1 Courbe standard de TF***

Courbe TF standard

$y = 0,049x$   
 $R^2 = 0,999$



***Annexe B.2 Activité DHA (Mesures au TTC)***

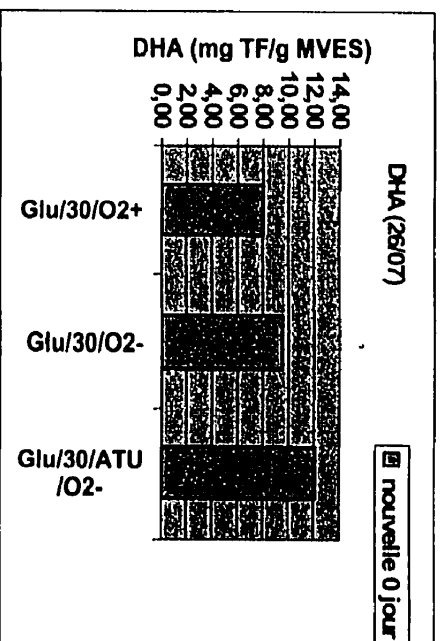
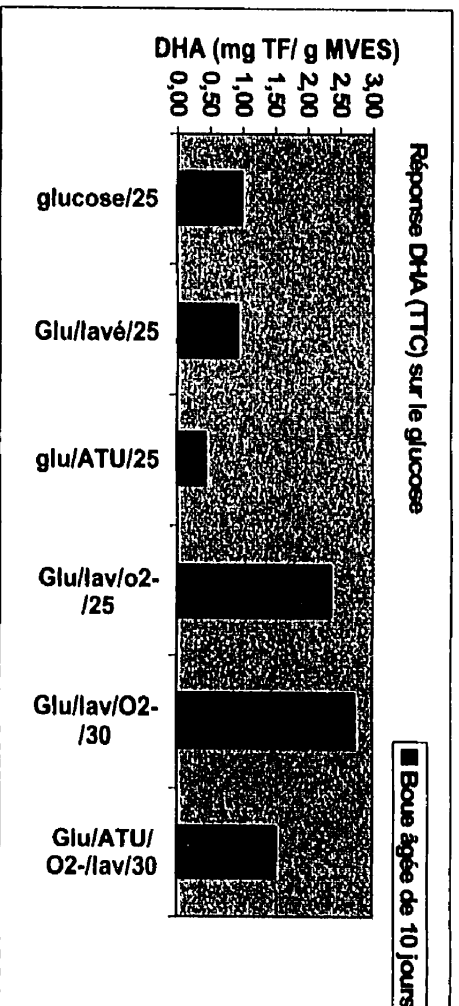
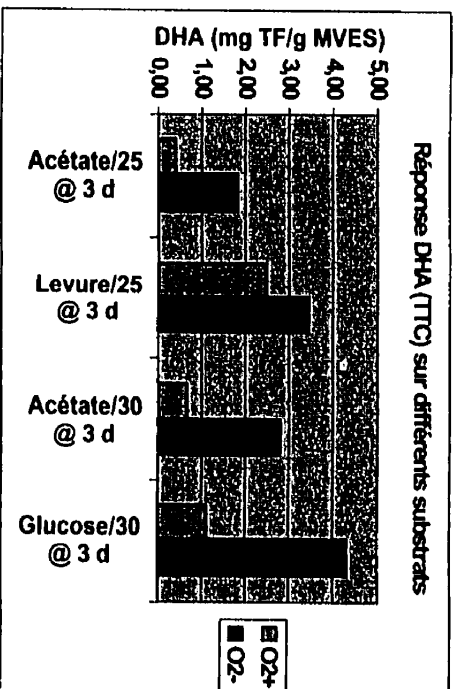
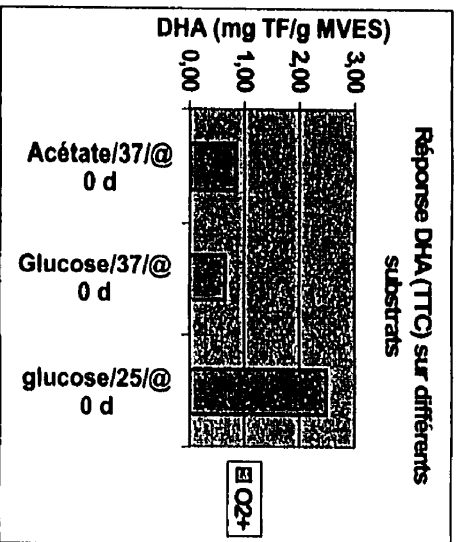
***Annexe B.2.1 Activité DHA sur divers substrats (Mesures au TTC)***

**ÉVALUATION DE L'ACTIVITÉ DHA**  
**ACTIVITÉ VS SUBSTRAT**  
 Réactif: TTC

Date	Substrat	Absorbance	MVES	DHA	Age de boue	T°	O <sub>2</sub>	Lavée
			mg/l	mg TF/ g MVES	d	° C		
13/07/99	Acétate/37/@ 0 d	0,032	780	0,84	1	37	+	-
14/07/99	Glucose/37/@ 0 d	0,016	500	0,65	2	37	+	-
14/07/99	glucose/25/@ 0 d	0,223	4575	2,49	2	25	+	-
16/07/99	Acétate/25 @ 3 d	0,026	1333	0,40	3	25	+	-
16/07/99	Levure/25 @ 3 d	0,161	1333	2,46	3	25	+	-
16/07/99	Acétate/30 @ 3 d	0,043	1333	0,66	3	30	+	-
16/07/99	Glucose/30 @ 3 d	0,072	1333	1,10	3	30	+	-
16/07/99	Acétate25 @ 3 d	0,118	1333	1,81	3	25	-	-
16/07/99	Levure/25 @ 3 d	0,224	1333	3,43	3	25	-	-
16/07/99	Acétate/30 @ 3 d	0,182	1333	2,79	3	30	-	-
16/07/99	Glucose/30 @ 3 d	0,281	1333	4,30	3	30	-	-
23/07/99	glucose/25	0,071	1470	0,99	10	25	-	-
23/07/99	Glu/lavé/25	0,066	1470	0,92	10	25	-	+
23/07/99	glu/ATU/25	0,031	1470	0,43	10	25	-	-
23/07/99	Glu/lav/o2- /25	0,169	1470	2,35	10	25	-	+
23/07/99	Glu/lav/O2- /30	0,196	1470	2,72	10	30	-	+
23/07/99	Glu/ATU/ O2-/lav/30	0,109	1470	1,51	10	30	-	+
26/07/99	Glu/30/O2+	0,683	1747	7,98	1	30	+	-
26/07/99	Glu/30/O2-	0,815	1747	9,52	1	30	-	-
26/07/99	Glu/30/ATU /O2-	1,033	1747	12,06	1	30	-	-



**ÉVALUATION DE L'ACTIVITÉ DHA  
ACTIVITÉ VS SUBSTRAT**  
Réactif: TTC

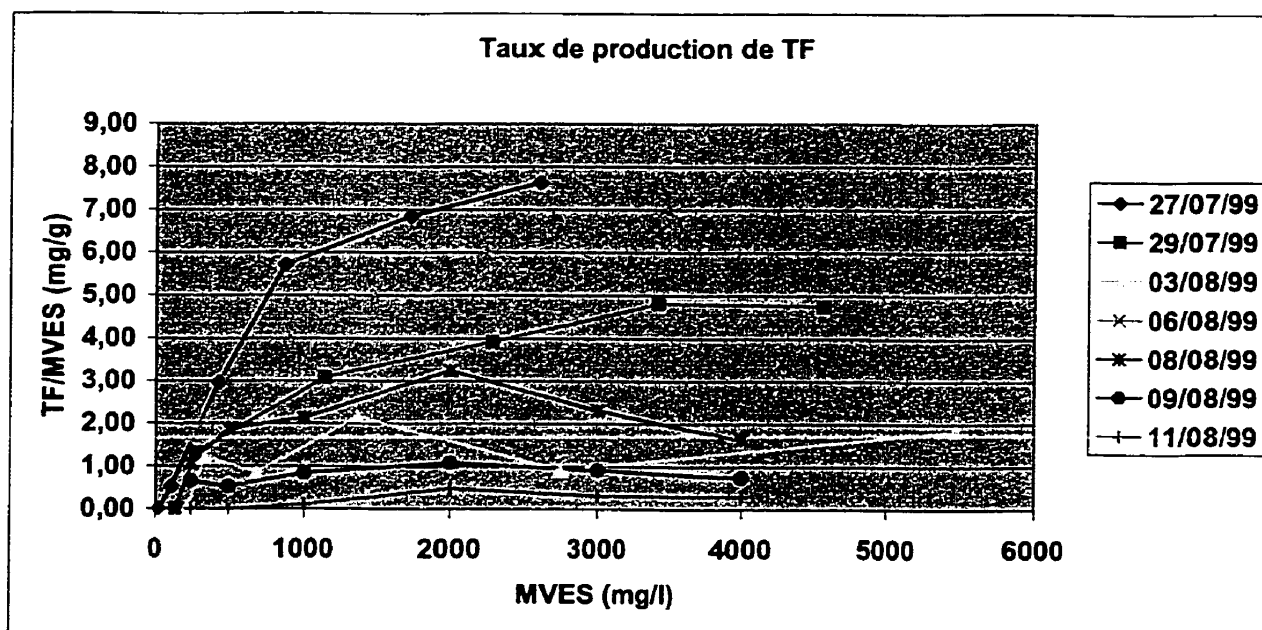
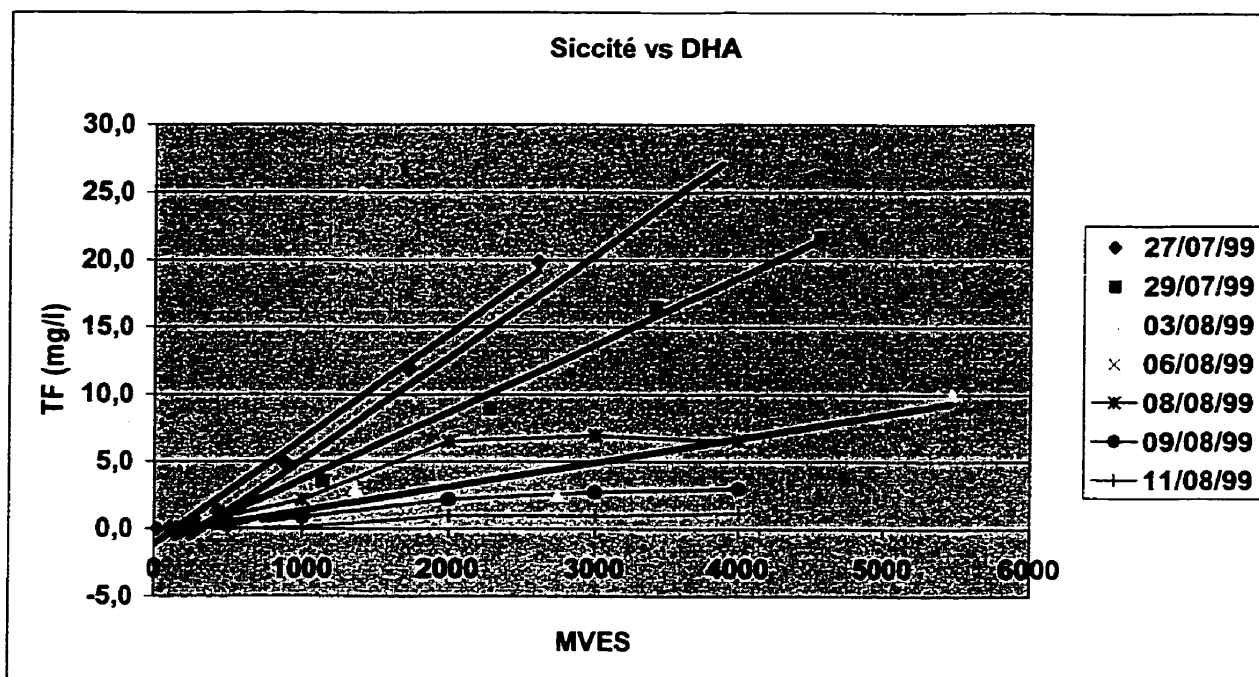


***Annexe B.2.2 Activité DHA spécifique (Mesures au TTC)***

**ÉVALUATION DES DHA**  
**ACTIVITÉ VS CONCENTRATION DES BOUES**  
 Vérification de la linéarité de la relation DHA-MVES  
 Réactif: TTC

ESSAI DU :	27/07/99								
Protocole:	Glucose		MVES	DHA (Abs)	Abs spéc.	TF mg/l	TF/MVES	TTC/MVES	Abs spéc. Rel.
	30°		mg/L	unités	unités/g mves	mg/l	mg/g	mg/mg	unités/unités
	ATU		2600	0,972	0,07	19,8	7,63	0,15	1,00
	O2+		1736	0,583	0,07	11,9	6,85	0,23	0,90
	Non lavée		868	0,243	0,06	5,0	5,71	0,46	0,75
			434	0,063	0,03	1,3	2,96	0,92	0,39
			116	0,003	0,01	0,1	0,53	3,45	0,07
			22	0,000	0,00	0,0	0,00	18,18	0,00
ESSAI DU :	29/07/99								
Protocole:	Glucose								
	30°								
	ATU		4560	1,062	0,05	21,7	4,75	0,09	1,00
	O2-		3429	0,809	0,05	16,5	4,81	0,12	1,01
	non lavée		2280	0,437	0,04	8,9	3,91	0,18	0,82
			1140	0,172	0,03	3,5	3,08	0,35	0,65
			285	0,019	0,01	0,4	1,32	1,40	0,28
			143	0,000	0,00	0,0	0,00	2,80	0,00
ESSAI DU :	03/08/99								
Protocole:	Glucose								
	30°		5480	0,492	0,02	10,04	1,83	0,07	1,00
	ATU		2740	0,122	0,01	2,49	0,91	0,15	0,50
	O2-		1370	0,145	0,02	2,96	2,16	0,29	1,18
	lavée		685	0,029	0,01	0,59	0,86	0,58	0,47
			343	0,020	0,01	0,41	1,21	1,17	0,66
			228	0,001	0,00	0,02	0,09	1,75	0,05
ESSAI DU :	06/08/99								
Protocole:	Glucose								
	30°		243	0,019	0,02	0,39	1,60	1,65	0,22
	ATU		485	0,072	0,03	1,47	3,03	0,82	0,42
	O2-		970	0,198	0,04	4,04	4,17	0,41	0,57
	lavée		1940	0,547	0,06	11,16	5,75	0,21	0,79
	Ordre de mesure inversé		2910	0,933	0,06	19,04	6,54	0,14	0,90
			3880	1,384	0,07	28,24	7,28	0,10	1,00
ESSAI DU :	08/08/99								
Protocole:	Glucose								
	30°		4000	0,319	0,02	6,51	1,63	0,10	1,00
	O2-		3000	0,338	0,02	6,90	2,30	0,13	1,41
	lavée		2000	0,317	0,03	6,47	3,23	0,20	1,99
	Azote ajouté (C:100 : N:17)		1000	0,104	0,02	2,12	2,12	0,40	1,30
			500	0,046	0,02	0,94	1,88	0,80	1,15
			250	0,013	0,01	0,27	1,06	1,60	0,65
ESSAI DU :	09/08/99								
Protocole:	Glucose								
	30°		4000	0,145	0,01	2,96	0,74	0,10	1,00
	O2-		3000	0,133	0,01	2,71	0,90	0,13	1,22
	lavée		2000	0,106	0,01	2,16	1,08	0,20	1,46
	TTC à 0,01%		1000	0,041	0,01	0,84	0,84	0,40	1,13
			500	0,013	0,01	0,27	0,53	0,80	0,72
			250	0,008	0,01	0,16	0,65	1,60	0,88
ESSAI DU :	11/08/99								
Protocole:	Glucose								
	30°		4000	0,057	0,00	1,16	0,29	0,10	1,00
	O2-		3000	0,046	0,00	0,94	0,31	0,13	1,08
	dilution au sumageant		2000	0,047	0,00	0,96	0,48	0,20	1,65
	Na2SO3		1000	0,005	0,00	0,10	0,10	0,40	0,35
			500	0,000	0,00	0,00	0,00	0,80	0,00
			250	0,000	0,00	0,00	0,00	1,60	0,00

**ÉVALUATION DE L'ACTIVITÉ DHA**  
**ACTIVITÉ VS CONCENTRATION DES BOUES**  
 Vérification de la linéarité de la relation DHA-MVES  
 Réactif: TTC



***Annexe B.3 Activité DHA (Mesures au INT)***

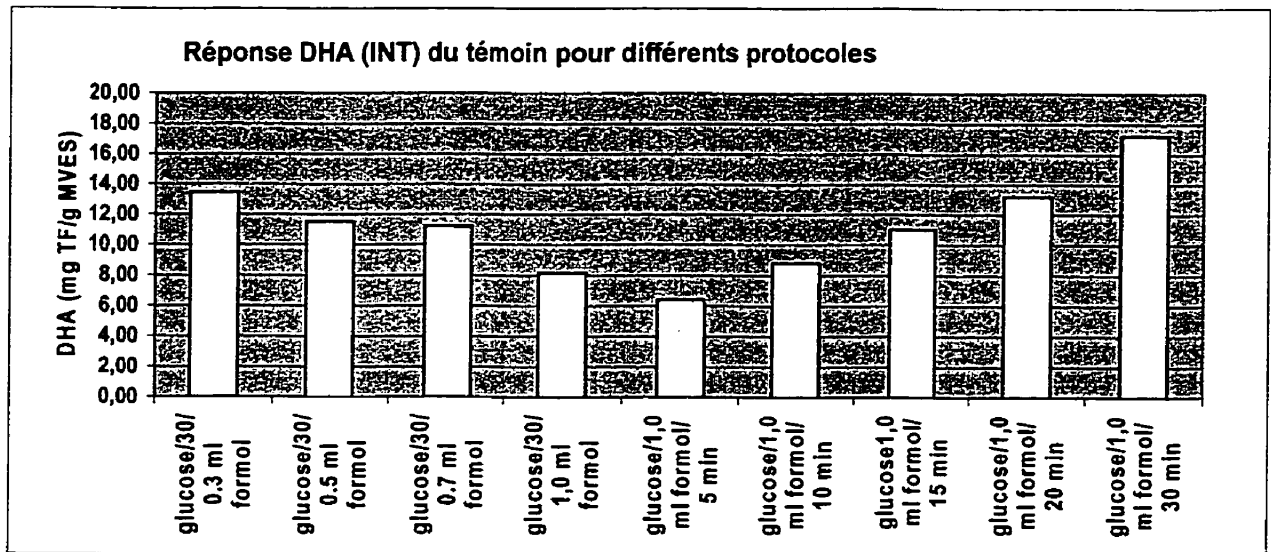
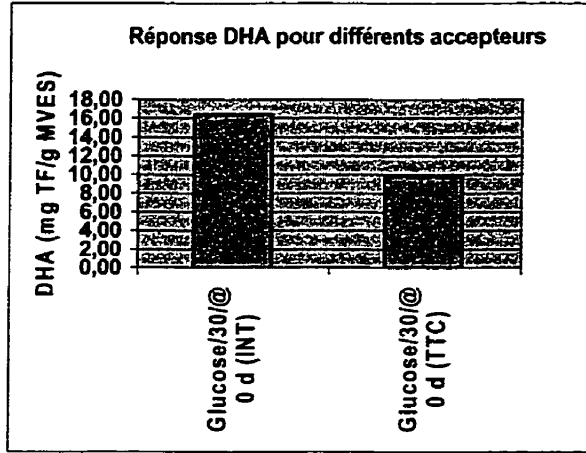
**Annexe B.3.1** *Activité DHA pour différents protocoles (Mesures au INT)*

**EVALUATION DE L'ACTIVITÉ DHA  
ACTIVITÉ VS SUBSTRAT**

Réactif: INT

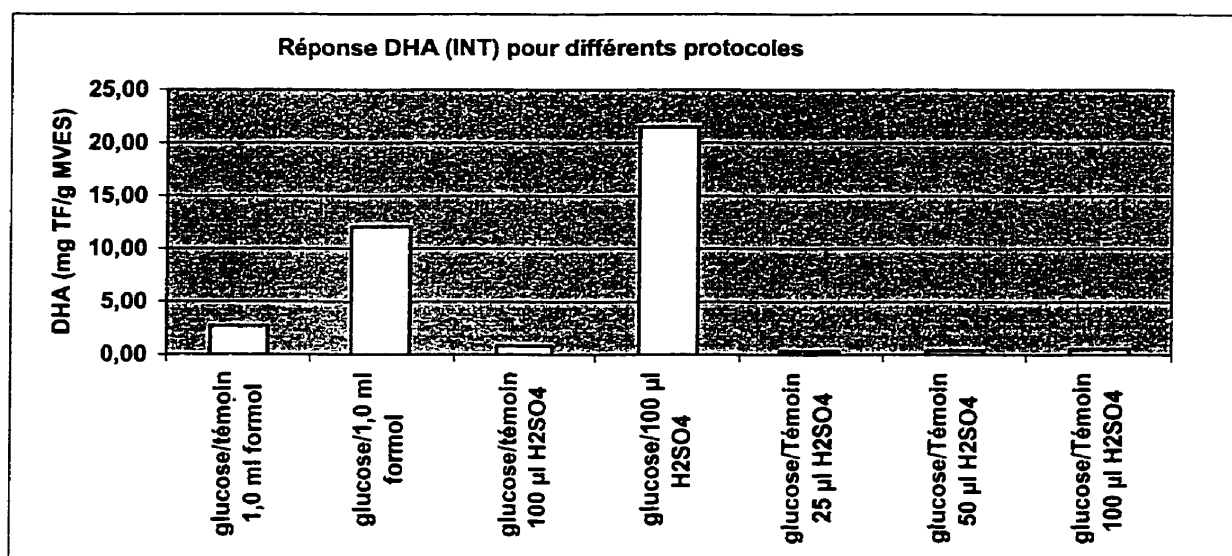
Date	Substrat	Absorbance	MVES	DHA	Age de boue	T°	O <sub>2</sub>	Lavée
		unités	mg/l	mg TF/ g MVES	d	° C		
30/08/99	Glucose/30/@ 0 d (INT)	1,607	2000	16,39	0	30	-	+
30/08/99	Glucose/30/@ 0 d (TTC)	0,965	2000	9,84	0	30	-	+
31/08/99	glucose/30/ 0,3 ml formol	1,241	1880	13,47	1	30	-	+
31/08/99	glucose/30/ 0,5 ml formol	1,06	1880	11,50	1	30	-	+
31/08/99	glucose/30/ 0,7 ml formol	1,031	1880	11,19	1	30	-	+
31/08/99	glucose/30/ 1,0 ml formol	0,75	1880	8,14	1	30	-	+
31/08/99	glucose/1,0 ml formol/ 5 min	0,588	1880	6,38	1	30	-	+
31/08/99	glucose/1,0 ml formol/ 10 min	0,81	1880	8,79	1	30	-	+
31/08/99	glucose 1,0 ml formol/ 15 min	1,014	1880	11,00	1	30	-	+
31/08/99	glucose/1,0 ml formol/ 20 min	1,218	1880	13,22	1	30	-	+
31/08/99	glucose/1,0 ml formol/ 30 min	1,587	1880	17,22	1	30	-	+
01/09/99	glucose/témoin 1,0 ml formol	0,247	1880	2,68	2	30	-	+
01/09/99	glucose/1,0 ml formol	1,113	1880	12,08	2	30	-	+
01/09/99	glucose/témoin 100 µl H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0,076	1880	0,82	2	30	-	+
01/09/99	glucose/100 µl H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1,981	1880	21,50	2	30	-	+
02/09/99	glucose/témoin 25 µl H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0,028	1700	0,34	3	30	-	+
02/09/99	glucose/témoin 50 µl H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0,035	1700	0,42	3	30	-	+
02/09/99	glucose/témoin 100 µl H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0,042	1700	0,50	3	30	-	+
02/09/99	glucose/25 µl H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> O <sub>2</sub> -	0,503	1700	6,04	3	30	-	+
02/09/99	glucose/25 µl H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> O <sub>2</sub> -/ATU	0,521	1700	6,25	3	30	-	+
02/09/99	glucose/25 µl H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> O <sub>2</sub>	0,644	1700	7,73	3	30	+	+

**EVALUATION DE L'ACTIVITÉ DHA**  
**ACTIVITÉ VS SUBSTRAT**  
 Réactif: INT





**ÉVALUATION DE L'ACTIVITÉ DHA**  
**ACTIVITÉ VS SUBSTRAT**  
Réactif: INT

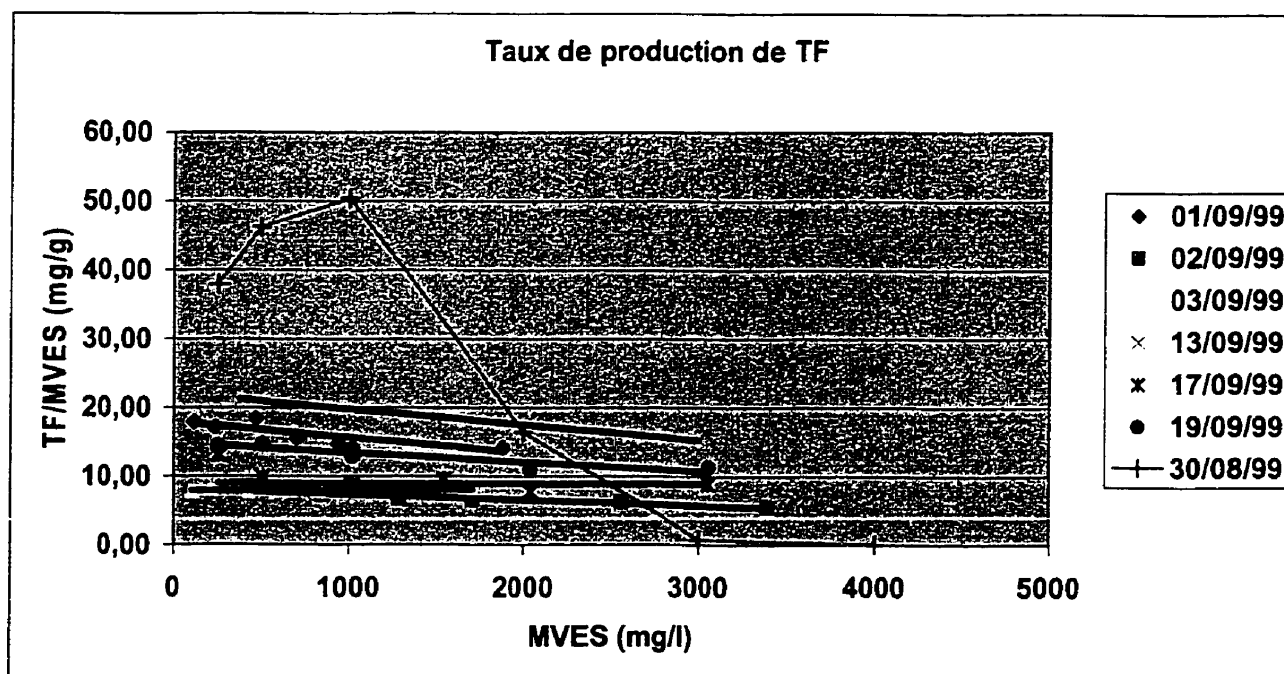
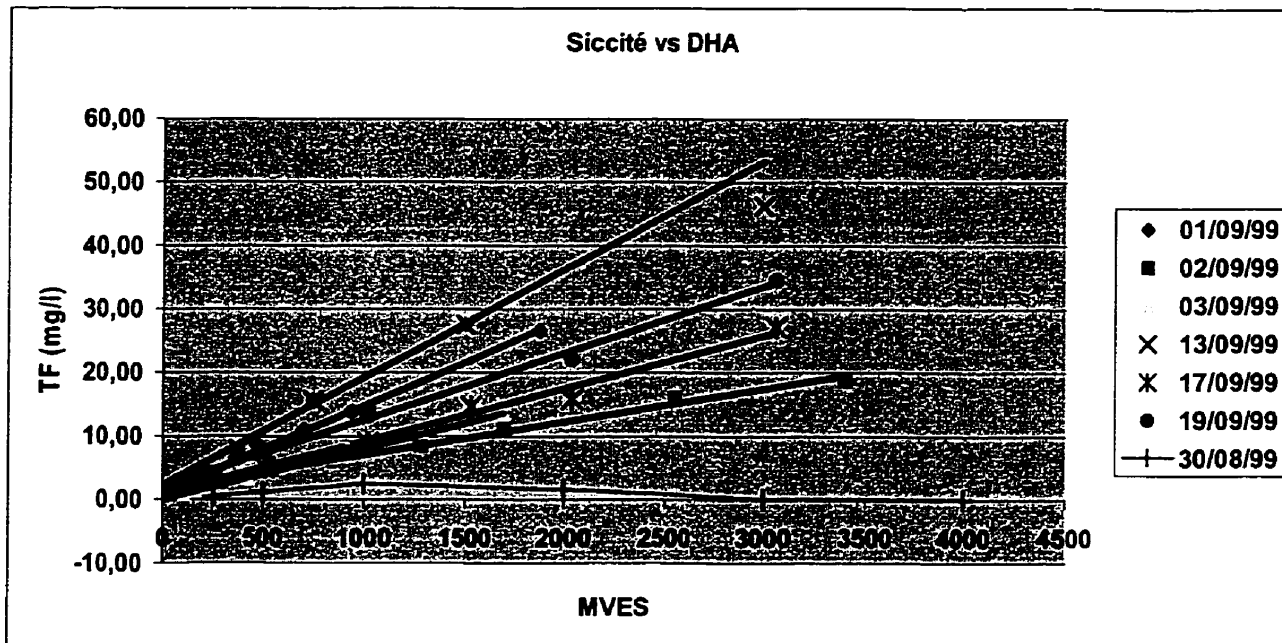


***Annexe B.3.2 Activité DHA spécifique (Mesures au INT)***

**ÉVALUATION DE L'ACTIVITÉ DHA  
ACTIVITÉ VS CONCENTRATION DES BOUES**  
Vérification de la linéarité de la relation  
Réactif: INT

		MVES	Abs	Abs spéc.	TF mg/l	TF/MVES	INT/MVES	Abs spéc. Rel
		mg/L	unités	unités/g	mg/l	mg /g	mg/mg	unités/unités
<b>ESSAI DU :</b>	30/08/99							
<b>Protocole:</b>	Glucose							
	30°	4000	0,000	0,00	0,00	0,00	0,10	0,00
	O <sub>2</sub> -	3000	0,108	0,04	2,20	0,73	0,13	0,02
	dilution saline	2000	1,607	0,80	32,80	16,40	0,20	0,43
	2 mg INT/fiole	1000	2,469	2,47	50,39	50,39	0,40	1,33
	0,2 ml formol	500	1,132	2,26	23,10	46,20	0,80	1,22
	5 ml boue	250	0,464	1,86	9,47	37,88	1,60	1,00
<b>ESSAI DU :</b>	01/09/99							
<b>Protocole:</b>	Glucose							
	30°	1880	1,303	0,69	26,59	14,14	0,21	1,00
	O <sub>2</sub> -	940	0,676	0,72	13,80	14,68	0,43	1,04
	dilution saline	705	0,535	0,76	10,92	15,49	0,57	1,09
	2 mg INT/fiole	470	0,422	0,90	8,61	18,32	0,85	1,30
	1,0 ml formol	235	0,197	0,84	4,02	17,11	1,70	1,21
	5 ml boue	117,5	0,103	0,88	2,10	17,89	3,40	1,26
<b>ESSAI DU :</b>	02/09/99							
<b>Protocole:</b>	Glucose							
	30°	3400	0,917	0,27	18,71	5,50	0,29	1,00
	O <sub>2</sub> +	2550	0,783	0,31	15,98	6,27	0,39	1,14
	dilution saline	1700	0,544	0,32	11,10	6,53	0,59	1,19
	2 mg INT/fiole	1275	0,418	0,33	8,53	6,69	0,78	1,22
	25 µl H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	850	0,300	0,35	6,12	7,20	1,18	1,31
	2 ml boue	425	0,175	0,41	3,57	8,40	2,35	1,53
<b>ESSAI DU :</b>	03/09/99							
<b>Protocole:</b>	Glucose							
	30°	1700	0,657	0,39	13,41	7,89	2,35	1,00
	O <sub>2</sub> +	1275	0,520	0,41	10,61	8,32	3,14	1,06
	dilution saline	850	0,325	0,38	6,63	7,80	4,71	0,99
	8 mg INT/fiole	425	0,161	0,38	3,29	7,73	9,41	0,98
	25 µl H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	213	0,084	0,40	1,71	8,07	18,82	1,02
	2 ml boue	106	0,040	0,38	0,82	7,68	37,65	0,97
<b>ESSAI DU :</b>	13/09/99							
<b>Protocole:</b>	Extrait de levure							
	30°	3000	2,262	0,75	46,16	15,39	1,00	1,00
	O <sub>2</sub> +	1500	1,348	0,90	27,51	18,34	2,00	1,19
	dilution saline	750	0,766	1,02	15,63	20,84	4,00	1,35
	6 mg INT/fiole	1500	1,351	0,90	27,57	18,38	2,00	1,19
	25 µl H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	750	0,760	1,01	15,51	20,68	4,00	1,34
	2 ml boue	375	0,384	1,02	7,84	20,90	8,00	1,36
<b>ESSAI DU :</b>	17/09/99							
<b>Protocole:</b>	Extrait de levure							
	30°	3060	1,330	0,43	27,14	8,87	2,61	1,00
	O <sub>2</sub> +	2040	0,774	0,38	15,80	7,74	3,92	0,87
	dilution saline	1530	0,718	0,47	14,65	9,58	5,23	1,08
	8 mg INT/fiole	1020	0,437	0,43	8,92	8,74	7,84	0,99
	25 µl H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	510	0,247	0,48	5,04	9,88	15,69	1,11
	1 ml boue	255	0,163	0,64	3,33	13,05	31,37	1,47
<b>ESSAI DU :</b>	19/09/99							
<b>Protocole:</b>	Extrait de levure							
	30°	3060	1,692	0,55	34,53	11,28	2,61	1,00
	O <sub>2</sub> +	2040	1,082	0,53	22,08	10,82	3,92	0,96
	dilution saline	1020	0,645	0,63	13,16	12,91	7,84	1,14
	16 mg INT/fiole	1020	0,696	0,68	14,20	13,93	7,84	1,23
	25 µl H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	510	0,367	0,72	7,49	14,69	15,69	1,30
	2 ml boue	255	0,180	0,71	3,67	14,41	31,37	1,28

**ÉVALUATION DE L'ACTIVITÉ DHA**  
**ACTIVITÉ VS CONCENTRATION DES BOUES**  
 Vérification de la linéarité de la relation  
 Réactif: INT



***Annexe B.4 Protocole de la mesure de l'activité DHA***

## **PROCOLE D'ÉVALUATION DE L'ACTIVITÉ DÉHYDROGÉNASE**

(Adapté de Le Bihan, 1999a)

*Précision de la méthode : 0.1 mg TF/l*

*Sensibilité : 0.3 mg TF/l*

*Gamme : 0.3 à 92 mg TF/l*

Chaque modification apportée à la méthode proposée par Le Bihan (1999a), l'a été en fonction des caractéristiques de la vaisselle ou dans le but de maximiser la réponse des DHA face au INT/substrat. Le INT a été retenu plutôt que le TTC car le INT semble moins sensible à la présence d'oxygène et présenter moins d'effets inhibiteurs. La réaction est arrêtée par l'ajout de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 98% (Richard et coll., 1984) plutôt que de formalin car cet inhibiteur s'est avéré plus efficace avec le INT.

### **Réactifs :**

- Tampon phosphate pH 7.4
- H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 98%
- Saline 0.14 M (8.1819 g de NaCl dans 1 litre d'eau distillée).
- Solution de INT (SIGMA I-8377) 0.2% (m/v) dans l'eau distillée. Conserver au frais à l'obscurité.
- Méthanol
- ATU (0.4 % m/v) dans l'eau distillée
- Substrats (Si nécessaire ajuster le pH à 7.4)
  - Acétate de sodium 2% (m/v) Tampon PO<sub>4</sub> (0.1 M)
  - Glucose 1.5% (m/v) Tampon PO<sub>4</sub> (0.1 M)
  - Extrait de levure 1.5 % (m/v) Tampon PO<sub>4</sub> (0.1 M)

**Préparation :****Tampon PO<sub>4</sub> (0.1 M)**

Peser 13.62 gr. de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> et dissoudre dans 1 litre d'eau distillée (solution A). Peser 17.81 gr. de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> et dissoudre dans 1 litre d'eau distillée (solution B). Mélanger 200 ml de la solution A avec 800 ml de la solution B.

**Solution de Substrat-INT**

Mélanger 30 ml de substrat avec 30 ml de la solution de INT dans des bouteilles stériles de 60 ml (concentration en INT de 0.01 %). Chaque flacon de 60 ml constitue la quantité journalière de solution. Incuber à 30°C avant l'utilisation.

**Préparation de la biomasse**

Le but de cette manipulation est d'éliminer les fractions de substrats solubles ou d'agents inhibiteurs contenus dans la phase liquide. Ce lavage est effectué par centrifugation suivi du remplacement du surnageant par la solution NaCl 0.14 M et d'une remise en suspension par agitation.

- 1) Verser 50 ml de biomasse dans un tube à centrifuger de 50 ml et centrifuger à 2600 g pendant 10 minutes.
- 2) Éliminer le surnageant et remplacer par la solution de NaCl (0.14M) à volume identique.
- 3) Introduire quelques billes de verre (au besoin) et agiter au vortex 2 x 10 sec.

## Évaluation des DHA

1. Prélever 3 x 1 ml de la préparation de biomasse dans 3 des 4 des tubes à centrifuger. Ajouter 0.045 ml (0.18 mg) d'ATU à la biomasse dans chaque tube (la concentration en ATU dans la fiole de réaction sera de 20 mg/l).
2. Ajouter 8 ml de la solution de substrat-INT dans chaque tube. Bien fermer et incuber 10 minutes dans le noir à 30°C. Agiter au 5 minutes.
3. Arrêter la réaction par l'ajout de 30 µl de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 98%. Faire un blanc en mélangeant la biomasse avec le INT-substrat en dernier, après l'ajout du H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.
4. Bien agiter chaque tube et centrifuger à 2600 g pendant 10 min.
5. Éliminer le surnageant et ajouter 5 ml de méthanol. Agiter au vortex durant 20 sec. Laisser reposer durant 30 min. Extraire le TF formé en agitant au vortex pendant deux fois 20 sec de façon intermittente. Centrifuger à 1500 g pendant 5 min.
6. Lire la densité optique (absorbance) du surnageant à 490 nm.
7. Multiplier la densité optique par 5 pour tenir compte des quantités relatives de biomasse et de méthanol utilisées.

Note : Lors des expériences menées à l'université Laval, la biomasse était ajoutée dans le tube après la période d'incubation pour former le blanc.

Lors des expériences au LIPE de l'INSAT, le blanc était préparé au même moment que les autres tubes.



**ANNEXE C**    *Expériences menées à l'Université Laval – Résultats bruts*

***Annexe C.1 Suivi des réacteurs***



Université Laval  
Boues de Bernières  
Suivi des réacteurs

Date	Jour	Réacteur 2					
		pH	O <sub>2</sub> mg/l	T °C	MVES mg/l	Volume <sup>(1)</sup> L	MVEScor mg/l
16/09/99	0				2040	20	2040
17/09/99	1						
19/09/99	3	6,80	8,70		1480	19,40	1436
	3	7,20					
20/09/99	4	6,90	8,70	19,80			
	4	6,70					
	4	7,30					
21/09/99	5	6,84	8,81	19,80	1720	19,00	1634
	5	6,77					
	5	7,20					
22/09/99	6	6,90	8,85	19,80			
	6	6,88					
	6	7,25					
24/09/99	8	6,99	9,08	19,80	1620	18,40	1490
25/09/99	9	7,00	9,09	19,70			
27/09/99	11	6,85	9,12	19,80	1720	17,80	1531
	11	6,84					
	11	7,36					
29/09/99	13	7,20	9,13	19,80	1700	17,40	1479
	13	7,08					
01/10/99	15	7,60		20,00	1490	17,00	1267
04/10/99	18	7,40		20,00	1450	16,40	1189

Volume<sup>(1)</sup> = Volume corrigé pour l'évaporation

**Université Laval**  
**Boues de Bernières**  
**Suivi des réacteurs**

Date	Jour	Réacteur 3					
		pH	O <sub>2</sub> mg/l	T °C	MVES mg/l	Volume <sup>(1)</sup> L	MVEScor mg/l
16/09/99	0				2080	20	2080
17/09/99	1						
19/09/99	3	6,60	8,80		1720	19,04	1637
	3	7,30					
20/09/99	4	7,00	8,75	20,00			
	4	6,80					
	4	7,30					
21/09/99	5	6,99	8,90	19,90	1760	18,40	1619
	5	6,80					
	5	7,28					
22/09/99	6	7,03	8,95	19,80			
	6	6,95					
	6	7,27					
24/09/99	8	7,01	9,12	19,80	1660	17,44	1448
25/09/99	9	7,09	9,09	19,80			
27/09/99	11	6,92			1740	16,48	1434
	11	6,86					
	11	7,30					
29/09/99	13	7,14	9,08	19,70	1760	15,84	1394
	13	7,10					
01/10/99	15	7,60		20,00	1540	15,20	1170
04/10/99	18	7,50		20,00	1540	14,24	1096

Volume<sup>(1)</sup> = Volume corrigé pour l'évaporation

***Annexe C.2 Décompte de la microfaune***

**Université Laval**  
**Boues de Bernières**  
**Décompte de la microfaune**

Date	19/09/99	20/09/99	21/09/99	22/09/99	23/09/99	24/09/99	25/09/99	26/09/99	27/09/99	28/09/99	29/09/99	30/09/99	01/10/99	02/10/99	03/10/99	04/10/99
Jours	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
R1	1,6E+07	1,2E+07	5,9E+06	7,5E+06		3,6E+06	5,9E+06		4,1E+06	3,1E+06	2,1E+06	1,1E+06	2,6E+06			3,4E+06
R2	1,1E+07	9,0E+06	9,3E+06	5,9E+06		3,6E+06	4,6E+06		4,9E+06	2,3E+06	7,7E+05	1,9E+06	2,6E+06			3,4E+06
R3	1,8E+07	9,0E+06	7,5E+06	8,8E+06		2,3E+06	4,1E+06		4,1E+06	1,3E+06	2,1E+06	1,1E+06	2,4E+06			2,1E+06

***Annexe C.3 Respiration des boues de Bernières***





***Annexe C.4 Activité DHA des boues de Bernières***

**Université Laval**  
**Boues de Bernières**  
**Activité DHA corrigée en fonction de l'évaporation**

Date	Jours	R1			R2			R3		
		Abs	TFcorr (mg/l)	In DHACorr	Abs	TFcorr (mg/l)	In DHACorr	Abs	TFcorr (mg/l)	In DHACorr
17/09/99	1	1,054	107	4,67	0,856	86	4,46	0,732		
	1	0,992	100	4,61	0,884	89	4,49	0,945	95	4,55
	1	1,003	101	4,62	0,931	94	4,54	0,97	97	4,58
19/09/99	3	0,667	66	4,19	0,557	55	4,01	0,658	64	4,16
	3	0,695	69	4,23	0,562	56	4,02	0,659	64	4,16
	3	0,703	70	4,25	0,559	55	4,01	0,645	63	4,14
20/09/99	4	0,705	69	4,24	0,618	61	4,10	0,638	61	4,11
	4	0,725	71	4,27	0,63	62	4,12	0,635	61	4,11
	4	0,703	69	4,24	0,645	63	4,15	0,673	64	4,16
21/09/99	5	0,597	58	4,06	0,57	55	4,01	0,564	53	3,97
	5	0,578	56	4,03	0,566	55	4,00	0,542	51	3,93
	5	0,608	59	4,08	0,57	55	4,01	0,582	55	4,00
22/09/99	6	0,575	56	4,02	0,532	51	3,93	0,566	52	3,96
	6	0,571	55	4,01	0,545	52	3,96	0,573	53	3,97
	6	0,583	56	4,03	0,563	54	3,99	0,576	53	3,97
24/09/99	8	0,509	48	3,88	0,433	41	3,70	0,464	41	3,72
	8	0,504	48	3,87	0,451	42	3,75	0,476	42	3,75
	8	0,514	49	3,89	0,451	42	3,75	0,478	43	3,75
25/09/99	9	0,486	46	3,82	0,421	39	3,67	0,436	38	3,64
	9	0,496	47	3,84	0,425	39	3,68	0,42	37	3,60
	9	0,489	46	3,83	0,432	40	3,69	0,425	37	3,61
27/09/99	11	0,412	38	3,63	0,356	32	3,48	0,34	29	3,35
	11	0,416	38	3,64	0,364	33	3,50	0,343	29	3,36
	11	0,418	38	3,65				0,328	28	3,32
28/09/99	12	0,316	29	3,36	0,286	26	3,25	0,321	26	3,28
	12	0,336	31	3,42	0,296	27	3,28	0,33	27	3,30
	12	0,345	31	3,45	0,284	26	3,24	0,32	26	3,27
29/09/99	13	0,388	35	3,55	0,341	30	3,41	0,354	29	3,35
	13	0,4	36	3,58	0,354	31	3,45	0,344	28	3,33
	13	0,408	37	3,60	0,342	30	3,41	0,354	29	3,35
30/10/99	14	0,432	39	3,65	0,345	30	3,41	0,395	31	3,44
	14	0,44	39	3,67	0,38	33	3,51	0,37	29	3,38
	14	0,431	38	3,65	0,365	32	3,47	0,395	31	3,44
01/10/99	15	0,4	35	3,56	0,323	28	3,33	0,343	27	3,28
	15	0,377	33	3,50	0,331	29	3,36	0,349	27	3,30
	15	0,381	34	3,52	0,316	27	3,31	0,349	27	3,30
04/10/99	18	0,267	23	3,13	0,232	19	2,97	0,237	17	2,85
	18	0,257	22	3,09	0,249	21	3,04	0,241	18	2,86
	18	0,27	23	3,14	0,241	20	3,00	0,235	17	2,84

**ANNEXE D    *Expériences menées au LIPE – Résultats bruts***

***Annexe D.1 Suivi des MVES des boues de Ginestous***



***Annexe D.2 Substrat OCDE***

**SUBSTRAT OCDE** (Adapté de Ochoa Chaves, 1998)

Le substrat a été préparé selon la concentration requise pour effectuer les essais respirométriques ou les essais enzymatiques. Tel que suggéré dans le Standard Method (1998), la solution minérale n'a pas été ajoutée au substrat puisque la boue contient tous les minéraux requis.

**Préparation :**

Peser	4.8 g de peptone
	3.3 g d'extrait de viande (VIANDOX <sup>(MC)</sup> )
	1.38 g d'acétate de sodium
	0.99 g d'éthanol
	4.2 g de NaCl

et dissoudre dans la solution tampon PO<sub>4</sub> et compléter à 1 litre (1,4% m/v pour les essais enzymatiques) ou 100 ml (14% m/v pour les essais respirométriques). Ajuster le pH à 7,4 avec du NaOK au besoin. La DCO mesurée du substrat concentré à 14% est de 140 000 mg/l.

Un supplément azoté est ajouté à la solution utilisée pour les essais enzymatiques dans un rapport DCO:N = 100 :5 (2590 mgNH<sub>4</sub>Cl/l).



***Annexe D.3 Respiration des boues de Ginestous***

**LIPE - INSAT**

**Boues de Ginestous**

**Respiration des boues réacteur no. 1**

Jour	date	endogene tot	ro2 NH4	endo hetero	ro2 Carbone	endo auto	ro2 max NH4	ro2 max carb	In endo hetero	In endo auto	In ro2max NH4	In ro2max carb
		mg O2/l/min	mg O2/l/min	mg O2/l/min	mg O2/l/min	mg O2/l/min	mg O2/l/min	mg O2/l/min				
1	19/10/99	0,2942	0,2604	0,2471	0,7572	0,0471	0,0133	0,7572	-1,3980	-3,0555	-4,3200	-0,2781
2	20/10/99	0,2898	0,2661	0,2477	0,7523	0,0421	0,0184	0,7523	-1,3955	-3,1677	-3,9954	-0,2846
3	21/10/99	0,2162	0,1916	0,1677	0,7455	0,0485	0,0239	0,7455	-1,7856	-3,0262	-3,7339	-0,2937
4	22/10/99	0,1513	0,1394	0,0994	0,5297	0,0519	0,04	0,5297	-2,3086	-2,9584	-3,2189	-0,6354
7	25/10/99	0,1448	0,1245	0,0725	0,1484	0,0723	0,052	0,1484	-2,6242	-2,6269	-2,9565	-1,9078
8	26/10/99	0,175	0,2254	0,0822	0,2006	0,0928	0,1432	0,2006	-2,4986	-2,3773	-1,9435	-1,6064
9	27/10/99	0,1328	0,1407	0,0834	0,189	0,0494	0,0573	0,189	-2,4841	-3,0078	-2,8595	-1,6660
10	28/10/99	0,1097	0,1165	0,0782	0,1696	0,0315	0,0383	0,1696	-2,5485	-3,4578	-3,2623	-1,7743
13	31/10/99	0,0634	0,1128	0,0433	0,1841	0,0201	0,0695	0,1841	-3,1396	-3,9070	-2,6664	-1,6923
15	02/11/99	0,0547	0,1116	0,0463	0,1776	0,0084	0,0653	0,1776	-3,0726	-4,7795	-2,7288	-1,7282
16	03/11/99	0,0626	0,1043	0,0432	0,1705	0,0194	0,0611	0,1705	-3,1419	-3,9425	-2,7952	-1,7690
17	04/11/99	0,0627	0,094	0,0452	0,1499	0,0175	0,0488	0,1499	-3,0967	-4,0456	-3,0200	-1,8978
18	05/11/99	0,0649	0,0864	0,044	0,1463	0,0209	0,0424	0,1463	-3,1236	-3,8680	-3,1606	-1,9221
19	06/11/99	0,0714	0,0848	0,0474	0,1481	0,024	0,0374	0,1481	-3,0491	-3,7297	-3,2861	-1,9099
21	08/11/99	0,0618	0,0773	0,0481	0,1337	0,0137	0,0292	0,1337	-3,0345	-4,2904	-3,5336	-2,0122

LIFE - INSAT

Boues de Giestous

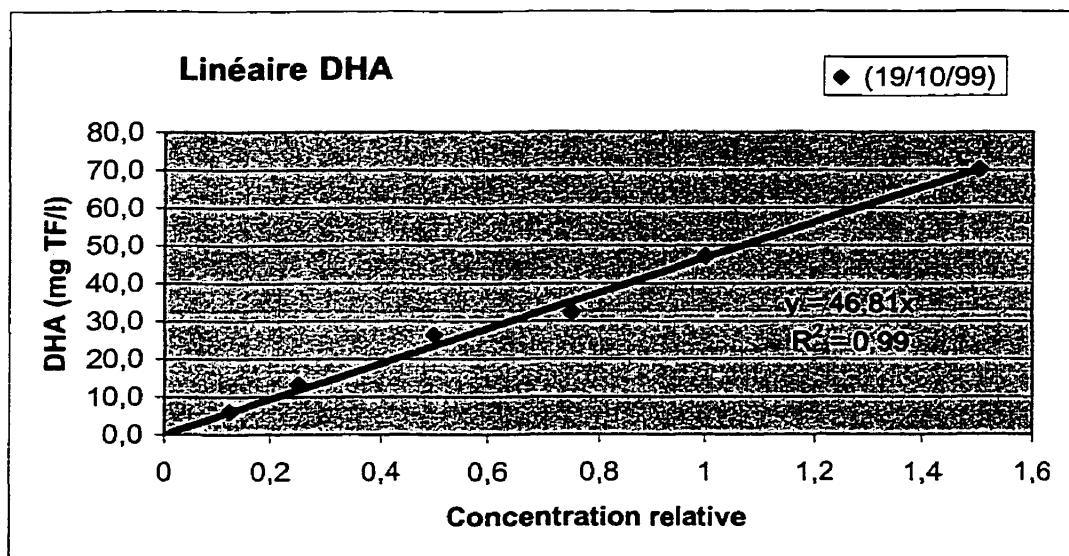
Respiration des boues réacteur no. 2

Jour	date	endogene tot	mg O2/l/min	ro2 NH4	mg O2/l/min	endo hetero	mg O2/l/min	ro2 Carbone	mg O2/l/min	endo auto	mg O2/l/min	ro2 max NH4	mg O2/l/min	ro2 max carb	mg O2/l/min	endo hetero	in endo auto	in ro2max NH4	in ro2max carb
1	19/10/99	0,3255	0,3083	0,297	1,3601	0,0285	0,0113	1,3601	-1,2140	-3,5579	-4,4830	0,3076							
2	20/10/99	0,2222	0,2399	0,2204	0,7008	0,0018	0,0195	0,7008	-1,5123	-6,3200	-3,9373	-0,3555							
3	21/10/99	0,1917	0,1666	0,1491	0,6145	0,0426	0,0175	0,6145	-1,9031	-3,1559	-4,0456	-0,4869							
4	22/10/99	0,1457	0,1573	0,1045	0,4373	0,0412	0,0275	0,4373	-2,2586	-3,1893	-3,5936	-0,8271							
7	25/10/99	0,1708	0,1573	0,0876	0,2663	0,0832	0,0697	0,2663	-2,4350	-2,4865	-2,6636	-1,3231							
8	26/10/99	0,1979	0,1773	0,0711	0,1695	0,1268	0,1062	0,1695	-2,6437	-2,0651	-2,2424	-1,7749							
9	27/10/99	0,1651	0,1407	0,0392	0,0977	0,1259	0,1015	0,0977	-3,2391	-2,0723	-2,2877	-2,3259							
10	28/10/99	0,0901	0,1173	0,0613	0,161	0,0288	0,056	0,161	-2,7920	-3,5474	-2,8824	-1,8264							
13	31/10/99	0,0549	0,1165	0,0408	0,1593	0,0141	0,0757	0,1593	-3,1991	-4,2616	-2,5810	-1,8370							
15	02/10/99	0,0509	0,111	0,0407	0,151	0,0102	0,0703	0,151	-3,2015	-4,5854	-2,6550	-1,8905							
16	03/11/99	0,0696	0,1023	0,0401	0,1269	0,0295	0,0622	0,1269	-3,2164	-3,5234	-2,7774	-2,0644							
17	04/11/99	0,058	0,0993	0,0441	0,1147	0,0139	0,0552	0,1147	-3,1213	-4,2759	-2,8968	-2,1654							
17,5		0,0634	0,0957	0,0461	0,1116	0,0173	0,0496	0,1116	-3,0769	-4,0570	-3,0038	-2,1928							
18	05/11/99	0,0636	0,0911	0,0443	0,0976	0,0193	0,0468	0,0976	-3,1168	-3,9477	-3,0619	-2,3269							
19	06/11/99	0,0518	0,0777	0,0417	0,0886	0,0101	0,036	0,0886	-3,1773	-4,5952	-3,3242	-2,4236							
21	08/11/99	0,0481	0,0624	0,0379	0,0713	0,0102	0,0245	0,0713	-3,2728	-4,5854	-3,7091	-2,6409							

***Annexe D.4 Activité DHA des boues de Ginestous***

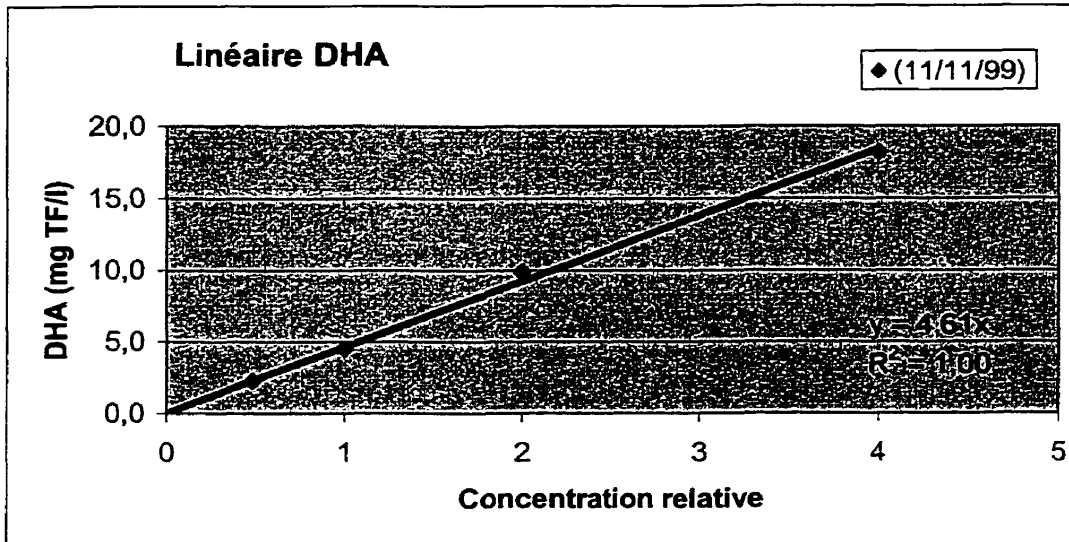
**LIPE - INSAT**  
**Boues de Ginestous**  
**LINEAIRE DHA**

Concentration	Absorbance	DHA
	unité	mg TF / l
1,5	0,688	70,2
1	0,462	47,1
0,75	0,316	32,2
0,5	0,258	26,3
0,25	0,129	13,2
0,125	0,058	5,9



**LIPE - INSAT**  
**Boues de Ginestous**  
**LINEAIRE DHA**

Concentration	Absorbance	DHA
	unité	mg TF / l
4	0,178	18,2
2	0,097	9,9
1	0,044	4,5
0,5	0,022	2,2



**LIPE - INSAT**  
**Boues de Ginestous**  
**ACTIVITÉ DHA**

		Boues agitées			Boues témoin		
Date	jour	Abs	mg TF/l	ln TF	Abs	mg TF/l	ln TF
19/10/99	1	0,462	47,142	3,853	0,335	34,183	3,532
	1				0,350	35,714	3,576
	1				0,344	35,102	3,558
20/10/99	2	0,228	23,265	3,147	0,217	22,143	3,098
	2	0,230	23,469	3,156	0,211	21,530	3,069
	2	0,252	25,714	3,247	0,220	22,449	3,111
20/10/99	2,25				0,217	22,143	3,098
	2,25				0,211	21,530	3,069
	2,25				0,220	22,449	3,111
21/10/99	3	0,202	20,612	3,026	0,182	18,571	2,922
	3	0,208	21,224	3,055	0,185	18,877	2,938
	3	0,204	20,816	3,036	0,185	18,877	2,938
22/10/99	4	0,193	19,694	2,980	0,162	16,530	2,805
	4	0,190	19,388	2,965	0,166	16,939	2,830
	4	0,190	19,388	2,965	0,171	17,449	2,859
25/10/99	7	0,141	14,388	2,666	0,119	12,143	2,497
	7	0,141	14,388	2,666	0,124	12,653	2,538
	7				0,118	12,041	2,488
26/10/99	8	0,135	13,775	2,623	0,124	12,653	2,538
	8	0,138	14,082	2,645	0,122	12,449	2,522
	8	0,133	13,571	2,608	0,127	12,959	2,562
27/10/99	9	0,091	9,286		0,088	8,980	2,195
	9	0,094	9,592		0,101	10,306	2,333
	9	0,091	9,286		0,097	9,898	2,292
28/10/99	10	0,099	10,102	2,313	0,105	10,714	2,372
	10	0,110	11,224	2,418	0,100	10,204	2,323
	10	0,102	10,408	2,343	0,109	11,122	2,409
31/10/99	13	0,112	11,428	2,436	0,091	9,286	2,228
	13	0,115	11,735	2,463	0,095	9,694	2,271
02/11/99	15	0,101	10,306	2,333	0,088	8,980	2,195
	15	0,104	10,612	2,362	0,084	8,571	2,148
	15	0,103	10,510	2,352	0,089	9,082	2,206
03/11/99	16	0,096	9,796	2,282	0,079	8,061	2,087
	16	0,098	10,000	2,303	0,075	7,653	2,035
	16	0,100	10,204	2,323	0,076	7,755	2,048
04/11/99	17	0,091	9,286	2,228	0,064	6,531	1,876
	17	0,096	9,796	2,282	0,066	6,735	1,907
	17	0,098	10,000	2,303	0,066	6,735	1,907
05/11/99	18	0,092	9,388	2,239	0,050	5,102	1,630
	18	0,097	9,898	2,292	0,053	5,408	1,688
	18	0,096	9,796	2,282	0,052	5,306	1,669
06/11/99	19	0,082	8,367	2,124	0,052	5,306	1,669
	19	0,084	8,571	2,148	0,052	5,306	1,669
	19	0,083	8,469	2,136	0,052	5,306	1,669
08/11/99	21	0,073	7,449	2,008	0,031	3,163	1,152
	21	0,074	7,551	2,022	0,038	3,878	1,355
	21	0,086	8,775	2,172	0,033	3,367	1,214

***ANNEXE E Modèle ASM1***



## Modèle ASM1

Le modèle ASM1 (Henze et coll., 1986) a été conçu pour effectuer des simulations numériques de procédés d'épuration biologiques des eaux usées. Les équations du modèle décrivent quelques processus de dégradation du carbone et de l'azote se produisant dans les systèmes de traitement, incluant la croissance et le dépérissement de la biomasse active, la croissance *cryptique*, et l'hydrolyse des matières particulaires.

Les tables 3 et 4 (tirées de Henze et coll., 1986) donnent la signification des symboles et la table 5 (tirée de Henze et coll., 1986) les valeurs usuelles des paramètres. La table 2 (tirée de Henze et coll., 1986) est présentée en dernier et donne les équations cinétiques pour l'ensemble des processus modélisés sous forme de matrice.

Les composants solubles sont indiqués sous la notation  $S$ , et les composants particulaires sous la notation  $X$ . Les composants ( $i$ ) impliqués dans les réactions sont identifiés sur la première ligne de la table 2. Les équations décrivant la cinétique de chacun des processus ( $\rho_j$ ) sont indiquées dans la colonne de droite, sur les lignes ( $j$ ) appropriées. Les coefficients stœchiométriques ( $\nu_{ij}$ ) sont donnés à la case correspondant à la cinétique associée au composé impliqué. La variation globale de chaque composé ( $r_i$ ) correspond au produit des vecteurs « coefficient stœchiométrique » ( $\nu_i$ ) et « cinétique » (colonne *Process rate*  $\rho$ ).

**Table 3** Parameters and characteristics which may be assumed

Symbol	Name
$Y_A$	Yield for autotrophic biomass
$b_A$	Decay coefficient for autotrophic biomass
$f_P$	Fraction of biomass leading to particulate products
$i_{XB}$	Mass of nitrogen per mass of COD in biomass
$i_{XP}$	Mass of nitrogen per mass of COD in products from biomass
$K_{O,II}$	Oxygen half-saturation coefficient for heterotrophic biomass
$K_{NO}$	Nitrate half-saturation coefficient for denitrifying heterotrophic biomass
$K_{O,A}$	Oxygen half-saturation coefficient for autotrophic biomass

**Table 4** Parameters and characteristics which must be evaluated and information needed

Symbol	Name	Prior information needed
$S_{NOI}$	Soluble nitrate nitrogen concentration in wastewater	
$S_{NHI}$	Soluble 'ammonia' nitrogen concentration in wastewater	
$S_{II}$	Soluble inert COD concentration in wastewater	
$S_{NII}$	Soluble inert organic nitrogen concentration in wastewater	
$S_{NDI}$	Soluble biodegradable organic nitrogen concentration in wastewater	$S_{NII}$
$Y_H$	Yield for heterotrophic biomass	
$S_{SI}$	Concentration of readily biodegradable COD in wastewater	$Y_H$
$\mu_A$	Maximum specific growth rate for autotrophic biomass	$b_A$
$K_{NH}$	Ammonia half-saturation coefficient for autotrophic biomass	
$b_H$	Decay coefficient for heterotrophic biomass	$Y_H, f_P$
$X_{II}$	Inert suspended organic matter concentration in wastewater	$f_P, b_H, S_{SI}, S_{II}$
$X_{SI}$	Slowly biodegradable organic matter concentration in wastewater	$X_{II}, S_{SI}, S_{II}$
$X_{NDI}$	Slowly biodegradable organic nitrogen concentration in wastewater	$S_{SI}, X_{SI}, S_{NDI}$
$\eta_g$	Correction factor for $\mu_H$ under anoxic conditions	
$\eta_h$	Correction factor for hydrolysis under anoxic conditions	
$\mu_H$	Maximum specific growth rate for heterotrophic biomass	$Y_H, X_{SI}, X_{II}, S_{SI}, f_P$
$K_S$	Half-saturation coefficient for heterotrophic biomass	$Y_H, X_{SI}, X_{II}, X_{SI}, f_P$
$k_b$	Maximum specific hydrolysis rate	
$K_X$	Half-saturation coefficient for hydrolysis of slowly biodegradable substrate	
$k_a$	Ammonification rate	

**Table 5** Typical parameter values at neutral pH

Symbol	Unit	Value at 20 °C	Value at 10 °C
<i>Stoichiometric parameters</i>			
$Y_A$	g cell COD formed (g N oxidized) <sup>-1</sup>	0.24	0.24
$Y_H$	g cell COD formed (g COD oxidized) <sup>-1</sup>	0.67	0.67
$f_P$	dimensionless	0.08	0.08
$i_{XB}$	g N(g COD) <sup>-1</sup> in biomass	0.086	0.086
$i_{XE}$	g N(g COD) <sup>-1</sup> in endogenous mass	0.06	0.06
<i>Kinetic parameters</i>			
$\hat{\mu}_H$	day <sup>-1</sup>	6.0	3.0
$K_S$	g COD m <sup>-3</sup>	20.0	20.0
$K_{O,H}$	g O <sub>2</sub> m <sup>-3</sup>	0.20	0.20
$K_{NO}$	g NO <sub>3</sub> -N m <sup>-3</sup>	0.50	0.50
$b_H$	day <sup>-1</sup>	0.62	0.20
$\eta_g$	dimensionless	0.8	0.8
$\eta_h$		0.4	0.4
$k_h$	g slowly biodegradable COD (g cell COD · day) <sup>-1</sup>	3.0	1.0
$K_X$	g slowly biodegradable COD (g cell COD) <sup>-1</sup>	0.03	0.01
$\hat{\mu}_A$	day <sup>-1</sup>	0.80	0.3
$K_{NH}$	g NH <sub>3</sub> -N m <sup>-3</sup>	1.0	1.0
$K_{O,A}$	g O <sub>2</sub> m <sup>-3</sup>	0.4	0.4
$k_a$	m <sup>3</sup> · COD (g · day) <sup>-1</sup>	0.08	0.04

**Table 2 Process Kinetics and stoichiometry for carbon oxidation, nitrification, and denitrification**

Component	Process	Observed Conversion Rates [ML <sup>-1</sup> T <sup>-1</sup> ]													Process Rate, $\rho$ [ML <sup>-1</sup> T <sup>-1</sup> ]
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	
1	Aerobic growth of heterotrophs	$S_1$	$S_2$	$X_1$	$X_4$	$X_{aII}$	$X_{aA}$	$X_p$	$S_8$	$S_{NO}$	$S_{NH}$	$S_{NO}$	$X_{NO}$	$S_{aII}$	$\mu_H \left( \frac{S_2}{K_2 + S_2} \right) \left( \frac{S_8}{K_{OH} + S_8} \right) X_{aII}$
2	Anoxic growth of heterotrophs		$-\frac{1}{Y_H}$			1			$-\frac{1-Y_H}{Y_H}$	$-\frac{1-Y_H}{2.86 Y_H}$	$-i_{NH}$			$-\frac{i_{NH}}{14}$	$\mu_H \left( \frac{S_2}{K_2 + S_2} \right) \left( \frac{K_{OH}}{K_{OH} + S_8} \right) \times \left( \frac{S_{NO}}{K_{NO} + S_{NO}} \right) \eta_H X_{aII}$
3	Aerobic growth of autotrophs					1			$-\frac{4.57 - Y_A}{Y_A}$	$\frac{1}{Y_A}$	$-i_{NH} - \frac{1}{Y_A}$			$\frac{i_{NH}}{14} - \frac{1}{14 - 7 Y_A}$	$\mu_A \left( \frac{S_{NH}}{K_{NH} + S_{NH}} \right) \left( \frac{S_8}{K_{O_2} + S_8} \right) X_{aA}$
4	'Decay' of heterotrophs				$1 - f_p$	$-1$									$b_H X_{aII}$
5	'Decay' of autotrophs				$1 - f_p$	$-1$									$b_A X_{aA}$
6	Ammonification of soluble organic nitrogen									1		$-1$		$\frac{1}{14}$	$A_2 S_{NO} X_{aII}$
7	Hydrolysis of entrapped organics		1		$-1$										$\frac{A_2}{K_A + (X_H/X_{aII})} \left[ \left( \frac{S_8}{K_{OH} + S_8} \right) + \eta_H \left( \frac{K_{OH}}{K_{OH} + S_8} \right) \left( \frac{S_{NO}}{K_{NO} + S_{NO}} \right) \right] X_{aII}$
8	Hydrolysis of entrapped organic nitrogen											1	$-1$		$P_H (X_{NO}/X_2)$
Stoichiometric Parameters:		Soluble inert organic matter [M(COD)L <sup>-3</sup> ]													Kinetic Parameters: Heterotrophic growth and decay: $\mu_H, K_1, K_2, K_{OH}, K_{NO}, b_H$ Autotrophic growth and decay: $\mu_A, K_A, K_{NH}, K_{O_2}, b_A$ Correction factor for anoxic growth of heterotrophs: $\eta_H$ Ammonification: $A_2$ Hydrolysis: $A_1, K_A$ Correction factor for anoxic hydrolysis: $\eta_H$
Heterotrophic yield: $f_H$		Readily biodegradable substrate [M(COD)L <sup>-3</sup> ]													
Autotrophic yield: $f_A$		Particulate inert organic matter [M(COD)L <sup>-3</sup> ]													
Fraction of biomass yielding particulate products: $f_p$		Slowly biodegradable substrate [M(COD)L <sup>-3</sup> ]													
Mass N/Mass COD in biomass: $i_{NH}$		Active heterotrophic biomass [M(COD)L <sup>-3</sup> ]													
Mass N/Mass COD in products from biomass: $i_{NH}$		Active autotrophic biomass [M(COD)L <sup>-3</sup> ]													
		Particulate products arising from biomass decay [M(COD)L <sup>-3</sup> ]													
		Oxygen (negative COD) [M(-COD)L <sup>-3</sup> ]													
		Nitrate and nitrite nitrogen [M(N)L <sup>-3</sup> ]													
		NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> + NH <sub>3</sub> nitrogen [M(N)L <sup>-3</sup> ]													
		Soluble biodegradable organic nitrogen [M(N)L <sup>-3</sup> ]													
		Particulate biodegradable organic nitrogen [M(N)L <sup>-3</sup> ]													
		Alkalinity - Molar units													