

*Communauté française de Belgique*

**FACULTE UNIVERSITAIRE DES SCIENCES AGRONOMIQUES DE GEMBLoux**

*Etude des variations en oxygène dissous rencontrées dans les systèmes d'aération en épuration des eaux et mise au point d'un réacteur de type scale-down.*

Mémoire de Master complémentaire en génie sanitaire présenté par :

**Jean-Noël Louvet**

Promoteur : **P. Thonart**

Année académique : 2006-2007

## Remerciements

Je tiens à remercier le Professeur P. THONART de m'avoir accueilli dans son unité de bio-industrie et d'avoir veillé au bon déroulement du travail.

Je remercie F. DELVIGNE assistant dans l'unité de bio-industrie d'avoir dirigé le travail, ainsi que pour son aide dans la rédaction du mémoire.

Je remercie également A. LEJEUNE, doctorante dans l'unité de bio-industrie pour avoir veillé au bon déroulement des manipulations, ainsi que pour ses conseils.

Remerciements à tous les étudiants et au personnel du laboratoire.

Qu'il me soit permis de remercier ici les enseignants du master complémentaire en génie sanitaire et en particulier M. Culot, responsable de la formation.

Je remercie mon grand ami et compagnon d'étude L. Ndayambaje.

### **Résumé :**

Les fluctuations en oxygène dissous dans les bassins aérés des stations d'épuration à boues activées ont été étudiées. Un réacteur dont l'aération est programmable a été mis au point de manière à pouvoir reproduire ces fluctuations au laboratoire.

Une souche de *Saccharomyces cerevisiae* dont le gène ROX1, répresseur des gènes hypoxiques, est fusionné avec un gène codant pour la *green fluorescent protein* (GFP) a été cultivée. Les variations rapides et significatives de la fluorescence de cette souche en fonction de la teneur en oxygène de son milieu de culture font d'elle un biocapteur du stress lié au manque d'oxygène.

### **Summary :**

Variations of dissolved oxygen in activated sludge basin were studied. A reactor able to reproduce these variations was designed with programmable aeration. The gene that encodes for green fluorescent protein (GFP) was used as a reporter gene to study the ROX1 gene expression in a *Saccharomyces cerevisiae* strain. The ROX1 gene is a repressor of hypoxic genes. It is expressed when the cell grow in anaerobic condition. The fast and significant fluorescence variations observed made us think this strain could be used as a biosensor.

Introduction	6
<b>I Etude bibliographique</b>	<b>7</b>
<b>I.1 Dispositions des bassins d'aération</b>	<b>7</b>
I.1.1 Rôle et emplacement du bassin aéré dans une station d'épuration:	7
I.1.2 Bassin à flux piston	9
I.1.3 Bassin à mélange intégral	10
I.1.4 Bassins à boucle fermée	11
I.1.5 Bassin à cascades	12
I.1.6 Bassin à alimentation étagée	12
<b>I.2 Les dispositifs d'aération :</b>	<b>13</b>
I.2.1 Aération de surface	13
I.2.2 Insufflation d'air	14
<b>I.3 Techniques d'acquisition de données sur les gradients d'oxygène.</b>	<b>15</b>
I.3.1 Techniques de visualisation des gradients d'oxygène par traitement d'image.	15
I.3.2 Détermination des gradients d'oxygène par mesure directe.	16
I.3.3 Etudes par simulation numérique :	16
<b>I.4 Les besoins en oxygènes</b>	<b>17</b>
I.4.1 Concentrations en oxygène visées dans les systèmes d'épuration.	17
I.4.2 Concentrations d'oxygène effectivement rencontrées par les bactéries :	18
<b>I.5 Causes des fluctuations des concentrations en oxygène</b>	<b>19</b>
I.5.1 Variation de la respiration des boues :	19
I.5.1.1 En fonction de l'activité nitrifiante :	19
I.5.1.2 Variation de la charge massique :	21
I.5.2 Répartition non homogène de l'aération.	22
I.5.2.1 Gradients de concentration dus à la distance par rapport aux aérateurs:	22
I.5.2.2 Effet de la vitesse de circulation	24
<b>I.6 Techniques d'étude de l'effet des fluctuations en oxygène dissous sur l'efficacité de l'épuration.</b>	<b>24</b>
I.6.1 L'apport des modèles	24
I.6.1.1 Intérêt des modèles dynamiques :	24
I.6.1.2 Réseaux neuronaux :	25
I.6.1.3 L'intelligence artificielle et systèmes experts :	25
I.6.1.4 Modèle de l'International Water Association :	25
I.6.2 L'apport d'un biocapteur	26
I.6.2.1 Le gène ROX1	26
I.6.2.2 De la découverte à l'utilisation de la Green Fluorescent Protéine.	26

<b>II</b>	<b>Matériel et méthodes</b>	<b>27</b>
<b>II.1</b>	<b>Conception du réacteur scale down</b>	<b>27</b>
<b>II.2</b>	<b>Culture de <i>Saccharomyces Cerevisiae</i> (souche YPR065W) en bioréacteur</b>	<b>28</b>
II.2.1	Matériels.	28
II.2.2	Méthodes.	29
II.2.2.1	Conservation de la souche	29
II.2.2.2	Milieu de culture	30
II.2.2.3	Conditions de culture	30
<b>II.3</b>	<b>Suivi de la culture</b>	<b>31</b>
II.3.1	Données acquises par le système de régulation	31
II.3.2	Données acquises par mesure sur les échantillons prélevés en cours de culture.	32
II.3.2.1	Mesure de la densité optique des échantillons	32
II.3.2.2	Mesure de la concentration en glucose des échantillons	33
II.3.2.3	Mesure de la matière sèche des échantillons	33
<b>II.4</b>	<b>Détection du stress lié au manque d'oxygène par analyse de la fluorescence</b>	<b>34</b>
II.4.1	Principe de la mesure	34
II.4.2	Préparation des échantillons et acquisition des images	35
II.4.3	Analyse des images	35
<b>III</b>	<b>Résultats et discussions</b>	<b>37</b>
<b>III.1</b>	<b>Estimation d'un profil caractéristique en oxygène dissous rencontré dans un chenal d'oxydation</b>	<b>37</b>
<b>III.2</b>	<b>Etude des fluctuations en oxygène dissous dans le réacteur scale-down.</b>	<b>41</b>
III.2.1	Etude théorique du temps nécessaire au changement d'état d'oxygénation :	41
III.2.2	Temps de réponse de la sonde à oxygène.	43
III.2.3	Etude des fluctuations en oxygène dissous provoquées par l'aération séquencée.	45
<b>III.3</b>	<b>Utilisation d'un biocapteur pour l'étude des fluctuations en oxygène dissous.</b>	<b>47</b>
III.3.1	Culture de la souche YPR065W de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	47
III.3.1.1	Conditions de culture :	47
III.3.1.2	Croissance de biomasse :	48
III.3.2	Analyse de la fluorescence	49
<b>III.4</b>	<b>Utilisation du réacteur scale down et du biocapteur</b>	<b>53</b>
III.4.1	Condition de culture :	53
III.4.2	Croissance microbienne :	53
III.4.3	Variation de la concentration en oxygène induite par les coupures de l'aération :	54
	Conclusion et perspectives:	58

## ***Introduction***

Afin de préserver la santé humaine et les écosystèmes, il est nécessaire d'épurer efficacement les eaux usées domestiques et industrielles. Les procédés d'épuration des eaux reproduisent industriellement l'effet épurateur des rivières où s'effectue la dégradation des matières polluantes (Edeline 1993). La dégradation aérobie est la plus efficace et celle qui effectue la nitrification. L'oxygène étant un gaz peu soluble dans l'eau, il est nécessaire qu'il soit introduit de façon continue pour que s'effectue une dégradation aérobie. L'aération est le poste clef de la qualité de l'épuration. Non seulement elle assure les besoins en oxygène pour la dégradation bactérienne aérobie, mais dans les procédés à biomasse libre, elle joue aussi un rôle dans l'opération de mélange et permet le maintien en suspension de la biomasse.

L'aération peut s'effectuer naturellement ou être effectuée par des aérateurs. Nous étudierons les systèmes intensifs où l'oxygène est apporté par des aérateurs. Dans cette catégorie, nous nous focaliserons sur le procédé d'épuration largement répandu qui est le procédé par boues activées. Il consiste en un réacteur biologique aérobie où les microorganismes flottent librement dans un liquide aéré.

Le poste aération représente, dans une installation normalement chargée, 60 à 80 % de la dépense énergétique totale de fonctionnement. Cette dépense est usuellement considérée comme constituant le tiers du coût total de fonctionnement. Il convient donc d'optimiser le transfert d'oxygène. Or, les rendements de transfert sont limités par l'apparition de courants préférentiels et de « zones mortes » (Duchène et Cotteux 2002). On observe ainsi des gradients de concentrations d'oxygène qui pourraient être la cause d'un stress des populations microbiennes qui les traversent et nuisent ainsi à l'activité épuratoire.

La première partie de ce mémoire est une synthèse bibliographique concernant les gradients d'oxygène dissous présents dans les bassins aérés des stations d'épuration.

Le travail bibliographique a été suivi d'un travail de laboratoire. Le premier objectif était de mettre au point, à l'échelle du laboratoire, un réacteur permettant de reproduire les fluctuations à court terme des concentrations en oxygène dissous observées dans les bassins aérés des stations d'épuration. Le second objectif de cette étude était d'utiliser un micro-organisme servant de biocapteur du stress lié à un manque d'oxygène. Les matériels et méthodes utilisées sont présentés dans la deuxième partie du mémoire. La troisième partie est dédiée à la présentation et à la discussion des résultats.

# I Etude bibliographique

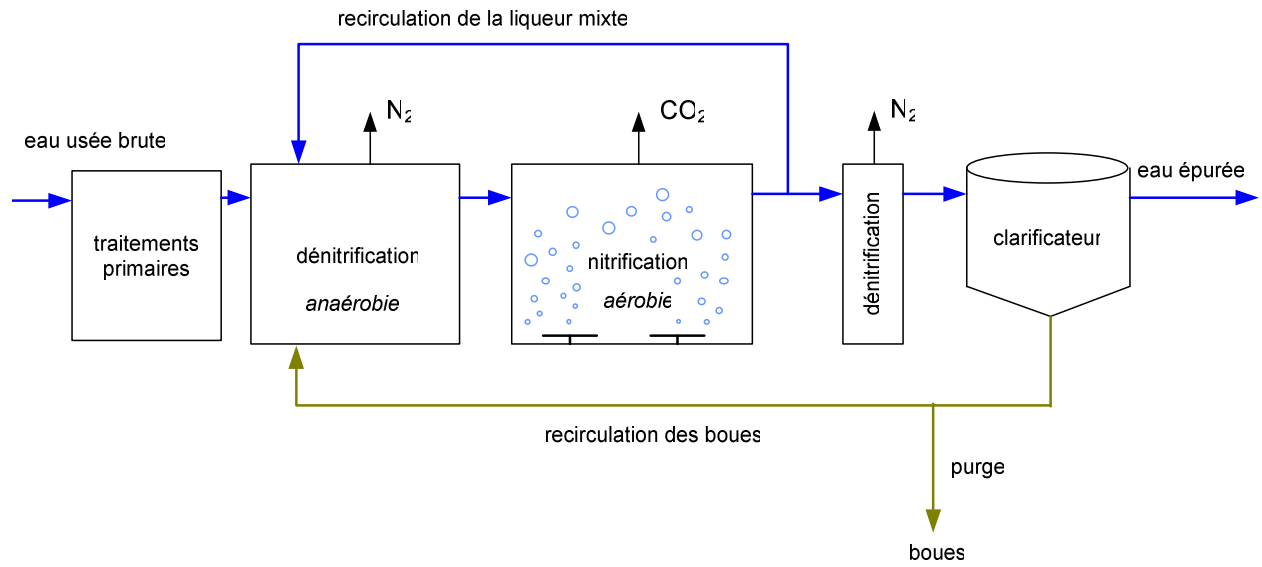
## **I.1 Dispositions des bassins d'aération**

Après une présentation du rôle et l'emplacement du bassin d'aération dans une station d'épuration, nous étudierons ses différentes dispositions.

### **I.1.1 Rôle et emplacement du bassin aéré dans une station d'épuration:**

Le bassin aéré a pour rôle d'effectuer une dégradation intense de la matière organique présente dans les eaux usées et la nitrification. La matière carbonée est oxydée jusqu'à la forme  $\text{CO}_2$ , l'azote qui arrive à la station d'épuration sous forme organique et d'ammonium est oxydé jusqu'à la forme nitrate. Le nitrate sera dans un deuxième temps réduit en  $\text{N}_2$ , pendant une phase d'anoxie. Les flores nitrifiantes et dénitrifiante qui interviennent sont naturellement présentes dans les eaux usées. Les bactéries nitrifiantes sont autotrophes, elles utilisent le carbone minéral et se développent préférentiellement dans les eaux faiblement chargées. Les bactéries dénitrifiantes sont hétérotrophes, elles utilisent le carbone organique.

Le bassin aéré est généralement placé à la suite du bassin anoxique. Les nitrates produits dans le bassin aérobie sont recirculés (avec la liqueur mixte) dans le bassin d'anoxie où s'effectue une dénitrification. Le  $\text{N}_2$  formé s'évacue dans l'atmosphère. Le bassin aéré est placé à la suite du bassin d'anoxie pour que sa charge soit faible, on favorise ainsi le développement des bactéries nitrifiantes. Grâce à cette disposition les bactéries dénitrifiantes du bassin anoxique dispose d'une source de carbone organique suffisante. L'inconvénient de cette disposition est qu'elle oblige à recycler la liqueur mixte (Figure 1). Avant rejet de l'eau dans le milieu aquatique naturel, la biomasse est séparée de l'eau épurée par décantation dans un clarificateur. Une partie de la biomasse est purgée (ce sont les boues de stations d'épuration) et une partie est remise dans le circuit de manière à maintenir une masse suffisante de micro-organismes pour effectuer l'épuration (en général autour de 4g/l de MES) (Figure 2). On cherche à maintenir la biomasse sous forme de floccs de taille supérieure à 50  $\mu\text{m}$  pour faciliter la décantation. Les floccs sont des amas bactériens qui se forment sur un fragment de matière (Figure 3)



**Figure 1 :** schéma montrant l'emplacement du bassin aéré dans le processus d'épuration (d'après Culot 2006)



**Figure 2 :** photographie de la première partie du chenal d'oxydation de la station d'épuration de Gembloux où les boues recirculées (brun foncées) sont mises en contact avec l'eau usée qui a subi le traitement primaire.

L'aération est un des paramètres qui joue sur l'aptitude des boues à décantier (Wilen et Balmer 1999) et un déficit d'aération a pour effet d'augmenter le volume des boues (Abassi et al. 1999).



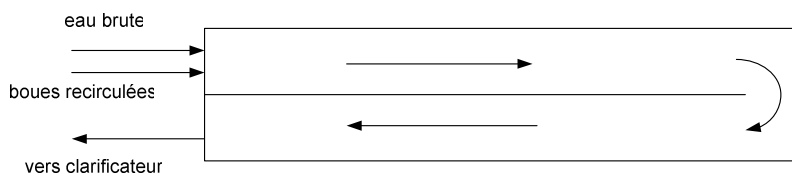


**Figure 3 :** photographie d'un floc, les masses noires sont dues à des concentrations élevées de bactéries. On observe un léger développement de bactéries filamenteuses sur le pourtour du floc qui ne vont pas nuire à sa décantation (Spencer Davies P. 2006).

Le bassin d'aération peut être avoir de nombreuses configurations différentes. Les sous- parties qui suivent présentent les types de configurations fréquemment rencontrées.

### I.1.2 Bassin à flux piston

L'effluent à traiter et les boues recirculées sont admis en tête du bassin qui est aménagé de façon à constituer un canal de grande longueur. Les concentrations en substrat et les besoins en oxygène de la liqueur de boues activées varient tout au long de son parcours. De ce fait, la puissance d'aération est normalement dégressive d'amont en aval (Figure 4).



**Figure 4 :** principe du flux piston (d'après Degrémont 1989)

### I.1.3 Bassin à mélange intégral

Le but recherché est d'obtenir un réacteur totalement homogène qui présente en tout point des concentrations identiques en micro-organismes, oxygène dissous et substrat résiduel. L'avantage de ce dispositif est de limiter les surcharges dues aux pointes de pollution journalières par exemple (Figure 5).

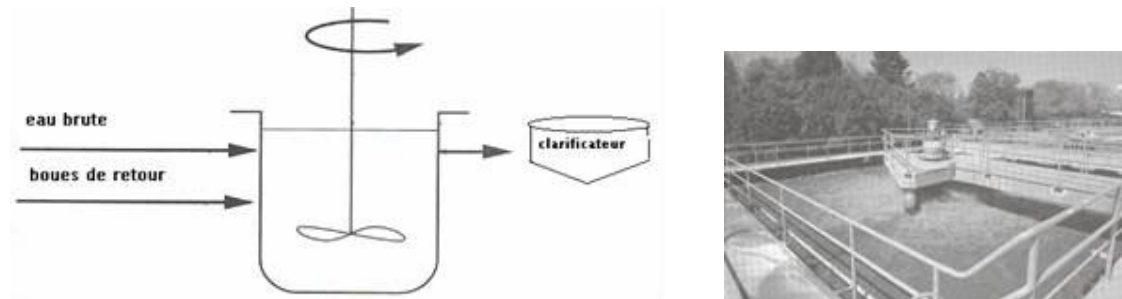


Figure 5 : Principe du mélange intégral et photographie d'un bassin (d'après Thonart 2006)

Le **réacteur biologique séquentiel discontinu** (sequencing batch reactor) est un cas particulier du bassin à mélange intégral. Toutes les étapes, incluant la phase de séparation de la biomasse s'effectuent dans le même bassin. Ce système, bien que peu courant est cité pour information et car il est considéré comme un des meilleurs pour l'élimination des nutriments (Third 2003).

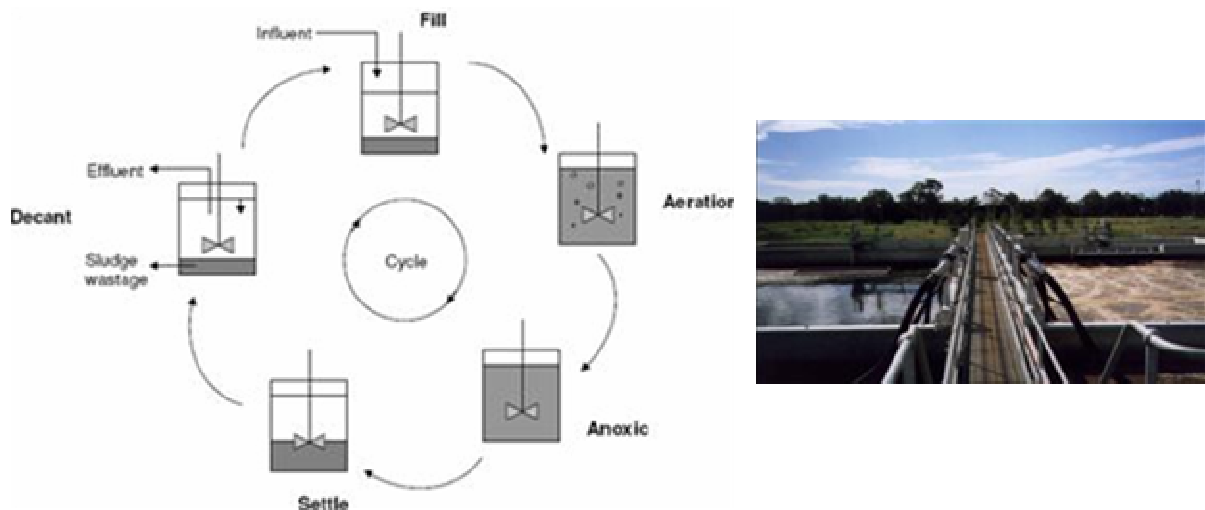


Figure 6 : Schéma du fonctionnement du réacteur biologique séquentiel discontinu et photographie d'un réacteur traitant de l'eau usée domestique, le bassin de gauche était en cours de décantation alors que le bassin de droite était en cours d'aération. Installation située à Busselton en Australie (d'après Third 2003).

## I.1.4 Bassins à boucle fermée

Cette technique se rapproche de celle du mélange intégral. Cependant, la longueur de la boucle et la disposition ponctuelle des aérateurs conduisent à des variations de la teneur en oxygène dissous tout au long du bassin. L'eau est mise en mouvement par des mobiles d'agitation. La mise en rotation de l'eau dans les chenaux entraîne une augmentation de la capacité d'oxygénation standard (Thonart 2006). Il est possible d'associer plusieurs bassins à boucle en série. Lorsque les aérateurs sont à axe vertical, on appelle souvent le système « carrousel », lorsque les aérateurs sont à axe horizontal, le réacteur est souvent dénommé chenal d'oxydation (Figure 7). Pour montrer l'importance du transfert d'oxygène, nous pouvons signaler le cas du réacteur à puits profond utilisé pour accroître le rendement de dissolution de l'oxygène grâce à la pression exercée par la hauteur d'eau. Ce système est en pratique peu utilisé car il est difficilement gérable.

Les chenaux peuvent avoir une forme circulaire. On les appelle chenaux annulaires « vrais » lorsque l'eau, canalisée le long de la paroi extérieure n'a pas accès au centre du bassin, et chenaux annulaires « faux » lorsque l'eau peut occuper pratiquement tout le volume du disque.

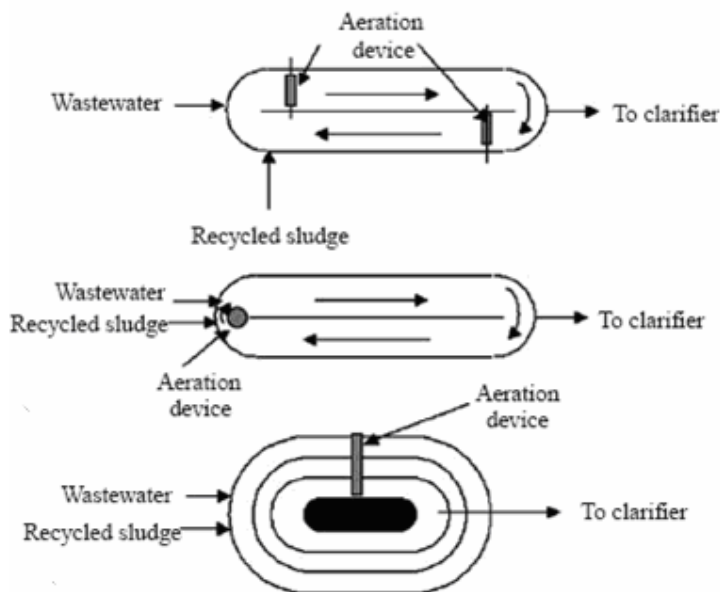
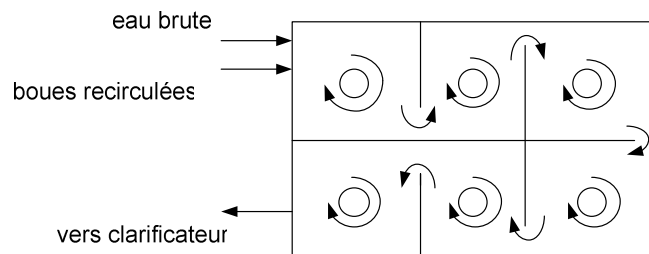


Figure 7 : les bassins à boucle fermées (Potier 2005)

### I.1.5 Bassin à cascades

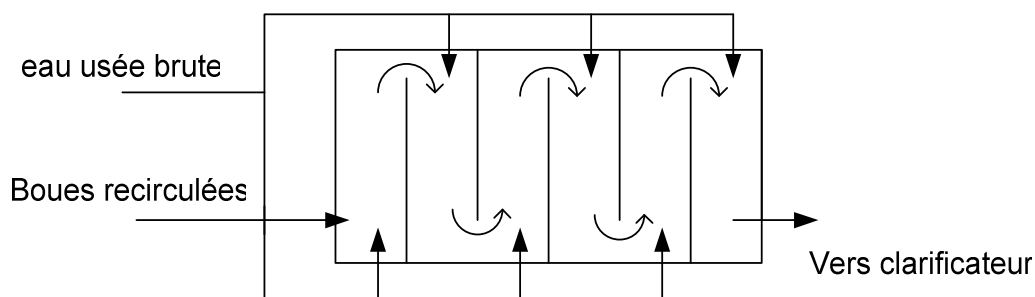
Ce type de bassin est constitué d'une série de bassins à mélange intégral que la liqueur de boues activées traverse successivement. Il permet de se rapprocher de la cinétique des bassins à flux piston, tout en mettant en œuvre des réacteurs compacts de construction simple. Il s'adapte très bien aux traitements associant l'élimination de l'ammonium et du phosphore à celle de la pollution carbonée (Figure 8).



**Figure 8 :** Bassin à cascades, EB BR et C correspondent à eau brute, boue recirculée et clarificateur (d'après Degremont 1989)

### I.1.6 Bassin à alimentation étagée

L'arrivée de l'effluent est organisée de façon étagée dans le bassin d'aération comportant une série de cellules traversées successivement par la liqueur qui avance en zig-zag. La boue recirculée est introduite en tête du bassin. Les besoins en oxygène sont ainsi beaucoup mieux répartis que dans un bassin à flux piston (Figure 9).



**Figure 9 :** Bassin à alimentation étagée EB BR et C correspondent à eau brute, boue recirculée et clarificateur (d'après Degremont 1989)

## **I.2 Les dispositifs d'aération :**

### **I.2.1 Aération de surface**

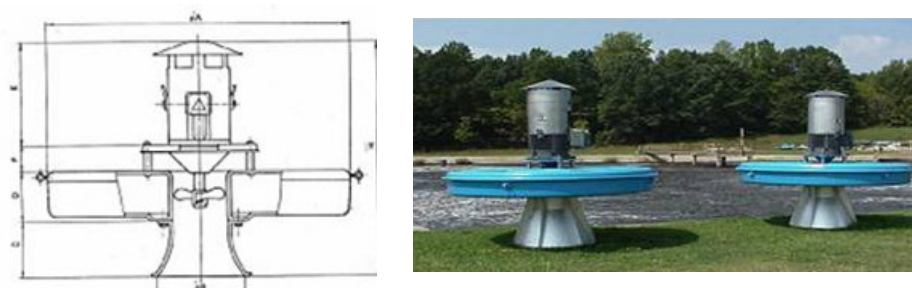
Les aérateurs de surface se divisent en trois groupes. Les deux plus importants sont les aérateurs à *vitesse lente*. Ils sont nommés à *axe vertical* quand ils aspirent l'eau par l'intermédiaire ou non d'une cheminée puis la projettent latéralement dans l'air. Les aérateurs de surface à *axe horizontal* (rouleau d'oxygénation ou brosse) balayent l'eau par une fraction immergée des pales et la projettent en aval (Figure 10 et 11). Le troisième groupe est constitué par les aérateurs à *axe vertical à grande vitesse*, entraînés directement par un moteur électrique à 750 ou 1500 t.min<sup>-1</sup> sans réducteur intermédiaire. L'ensemble mécanique est fréquemment supporté par un ou plusieurs flotteurs, de façon à être simplement posé sur l'eau. Ce type d'aérateur a l'avantage d'être bon marché mais il est gourmand en énergie et présente une faible capacité de brassage (Figure 12).



**Figure 10 :** aérateur de surface a axe vertical a vitesse lente (Thonart 2006)



**Figure 11 :** aérateur de surface à axe horizontal a vitesse lente (Gillot 2003)



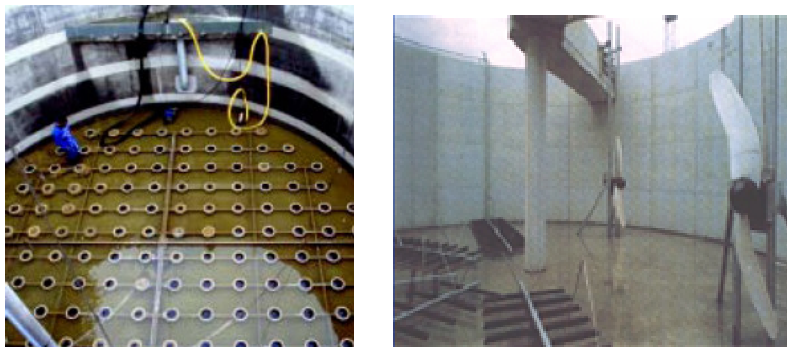
**Figure 12 :** aérateur de surface à axe vertical à vitesse rapide (Thonart 2006)

## I.2.2 Insufflation d'air

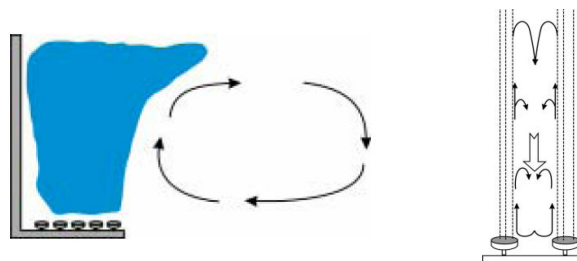
Les dispositifs par insufflation d'air assurent la dissolution d'oxygène par injection d'air dans le liquide (Figure 13). L'insufflation d'air présente plusieurs avantages comparée à l'aération de surface (Duchène et Cotteux 2002) :

- modularité de la fourniture d'oxygène par la mise en place de surpresseurs de puissances différentes ou de vitesses variables.
- élévation de la température des boues
- maîtrise des nuisances sonores
- performances d'oxygénation élevées pour les systèmes de diffusion d'air en fines bulles

Les dispositifs par insufflation d'air ont un effet sur l'hydrodynamique du bassin et brassent le liquide. L'ascension des bulles d'air induit un mouvement ascendant de l'eau. L'eau redescend préférentiellement dans les zones dépourvues de diffuseurs ce qui entraîne une importante mise en rotation du liquide dans le plan vertical et une diminution du temps de passage des bulles d'air dans l'eau (Figure 14).



**Figure 13** : photographie de diffuseurs à fines bulles situés au fond d'un bassin à boues activées (Duchène et Cotteux 2002) et d'hélices marines situées à proximité de diffuseurs.



**Figure 14** : circulation de l'eau dans le plan vertical (spiral flow), diminuant le temps de passage des bulles (Duchène et Cotteux 2002).

Les critères caractéristiques des systèmes d'insufflation d'air sont (Roustan 2003):

- la vitesse superficielle de gaz (débit d'air/surface au radier du bassin d'aération)
- la densité des diffuseurs (surface perforée des diffuseurs/surface du bassin)
- le débit d'air surfacique (débit d'air/surface surface perforée des diffuseurs)
- le débit d'air spécifique (débit d'air/ volume du bassin)
- la profondeur d'immersion des diffuseurs
- la vitesse de circulation du liquide à l'intérieur du bassin et la vitesse horizontale du liquide dans un chenal d'aération.

A partir de ces caractéristiques et d'autres paramètres propres aux bassins et à la disposition des diffuseurs, il est possible de prédire la capacité d'oxygénation. Ce calcul peut servir au dimensionnement des bassins d'aération (Gillot et al 2005, Duchène et Cotteux 2002).

### **I.3 Techniques d'acquisition de données sur les gradients d'oxygène.**

Bien que beaucoup d'études s'intéressent au rendement d'oxygénation, un nombre limité d'études ont été consacrées aux gradients d'oxygène à l'intérieur des bassins aérés. Nous avons distingué quatre types d'études : les études par mesures directes des concentrations d'oxygène, les méthodes par visualisation des panaches gazeux et des concentrations d'oxygène, les méthodes mathématiques, les méthodes faisant appel à la mécanique des fluides numérique.

#### **I.3.1 Techniques de visualisation des gradients d'oxygène par traitement d'image.**

La distribution spatiale des concentrations d'oxygène peut être mesurée par fluorescence avec l'acide pyrenebutyrique. Une calibration peut être établie entre l'intensité de la fluorescence et la concentration d'oxygène (Minhee et Schladow 2000).

Hasanen et al. (2006) et Daniel et al. (2002) ont étudié la taille et la distribution spatiale des bulles d'oxygène émises à partir de différents diffuseurs grâce à une technique de traitement d'image.

Cette technique par traitement d'image est principalement adaptée à la mesure des performances des diffuseurs.

### **I.3.2 Détermination des gradients d'oxygène par mesure directe.**

La mesure directe de la concentration en oxygène par une sonde polarographique ou optique est la technique la plus fiable. Cependant de nombreuses mesures doivent être effectuées pour avoir une bonne résolution spatiale.

### **I.3.3 Etudes par simulation numérique :**

La définition du problème à résoudre s'effectue à l'aide du préprocesseur. Il permet de représenter la géométrie du système, de définir le type de conditions limites aux frontières du domaine, de spécifier le type de matériau (fluide ou solide). Il fournit aussi la possibilité de discrétiser le domaine, en proposant plusieurs algorithmes de maillage suivant sa géométrie.

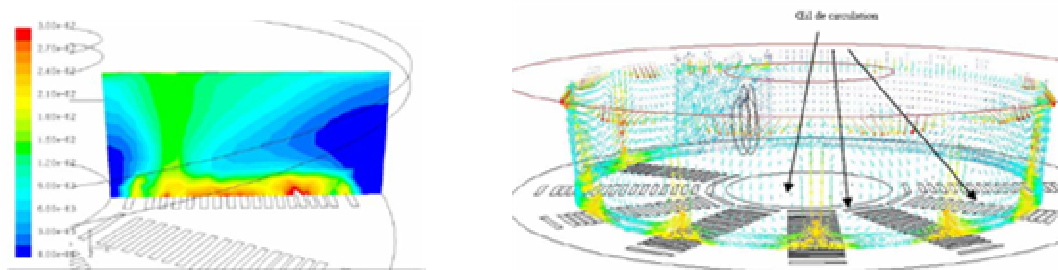
Le solveur permet de définir numériquement les conditions opératoires (gravité, pression) dans lesquelles est effectuée la simulation, ainsi que la spécification des conditions aux limites. Enfin, il permet de choisir le processus itératif, en proposant notamment plusieurs schémas numériques pour la discrétisation spatiale et temporelle, et pour le couplage de la vitesse et de la pression. Il offre également une interface permettant de contrôler à tout moment l'état d'avancement des calculs.

Le postprocesseur est l'élément qui permet de visualiser la géométrie et le maillage du domaine, et surtout d'afficher les résultats obtenus. Il est ainsi possible de visualiser les champs de vecteur vitesse, les champs de pression, de turbulence ainsi que toutes les autres grandeurs calculées sur un segment, une section du domaine ou sur tout le volume. Il offre aussi la possibilité de tracer des courbes et de visualiser les lignes de courant ou la trajectoire de particules (Tanguy 2003).

Pour valider le modèle on peut se servir de la comparaison entre les résultats de vitesse que donne le modèle et des mesures de vitesse effectuées sur un plan perpendiculaire à la



circulation du liquide dans chenal. La validation des résultats obtenus ne peut être que partielle et le problème de la fiabilité des résultats obtenus se pose. La méthode a l'avantage d'offrir des résultats détaillés sur la totalité du bassin et permet leur visualisation efficace (Figure 15).



**Figure 15 :** exemple de résultats obtenus par simulation numérique, panache de bulles et champs de vecteur vitesse dans le plan parallèle aux parois montrant les boucles de circulation (Tanguy 2003).

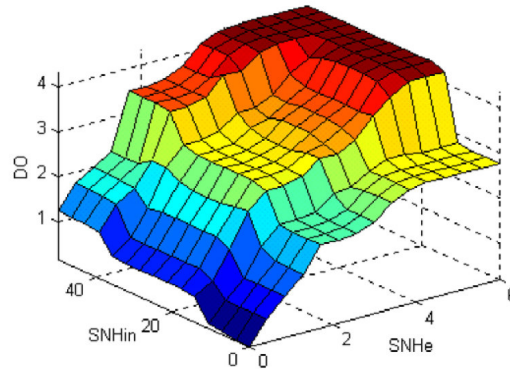
## **1.4 Les besoins en oxygènes**

### **1.4.1 Concentrations en oxygène visées dans les systèmes d'épuration.**

Le besoin en  $O_2$  est calculable en supposant l'oxydation complète de  $C_5H_7NO_2$ , ce qui exige 1,42 kg d' $O_2$  pour détruire 1 kg de matière. Dans un réacteur à mélange complet, on applique l'oxygène de manière homogène, dans un réacteur qui se rapproche du flux piston, on aura intérêt à doser l'aération en fonction de l'avancement de la biodégradation du substrat. Le rendement de dénitrification est largement contrôlé par le rendement de nitrification. Lorsque l'on ne souhaite pas effectuer une dénitrification, une concentration d'1 mg/l dans les bassins aérés est suffisante, lorsque l'on souhaite effectuer une dénitrification on maintiendra une concentration de 2 mg/l d'oxygène (Edeline 1993). A titre d'exemple, la station de Wavre que nous avons visité et qui n'effectue pas de dénitrification maintenait une concentration d'oxygène souvent proche de 1 et comprise entre 0,6 et 1 mg/l.

Une nouvelle stratégie de gestion de l'oxygène est d'adapter les quantités d'oxygène injectées en fonction de la charge à traiter et du rendement d'épuration attendu. Par exemple, Yong M et al. 2006 proposent d'adapter la concentration d'oxygène en fonction de la teneur en azote ammoniacal dans l'influent et de la teneur en azote ammoniacal dans l'effluent. Leurs calculs

indiquent qu'il est nécessaire de faire varier la concentration d'oxygène entre 0 et 4 mg/l, ce qui permet pendant les périodes de faible charge d'économiser de l'énergie et pendant les périodes à forte charge d'améliorer l'épuration (Figure 16).

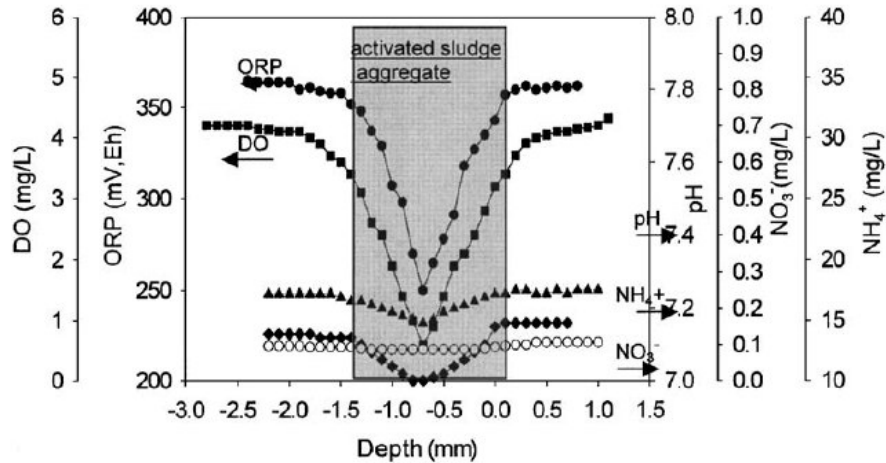


**Figure 16 :** Concentration d'oxygène (mg/l) nécessaire en fonction de la teneur en azote ammoniacal présente dans l'influent et dans l'effluent (Yong M. 2006)

Les concentrations d'oxygène effectivement rencontrées par les bactéries

#### **1.4.2 Concentrations d'oxygène effectivement rencontrées par les bactéries :**

Comme nous l'avons vu précédemment, les bactéries sont sous forme floculées. Les bactéries subissent des concentrations d'oxygène différentes selon qu'elles se situent en périphérie des flocs où proche de leur centre. Li et Bishop (2004) ont mesuré une décroissance de la teneur en oxygène de 4 mg/L en périphérie du floc jusqu'à 0,60 mg/L au centre. Les gradients de concentration qui se maintiennent dans les flocs bactériens de boues activées sont dus à l'équilibre entre la diffusion des éléments provenant de la solution et la consommation de ses éléments par les bactéries (Figure 17).



**Figure 17** : variations de concentration en oxygène au sein d'un floc bactérien de boues activées (Li et Bishop 2004)

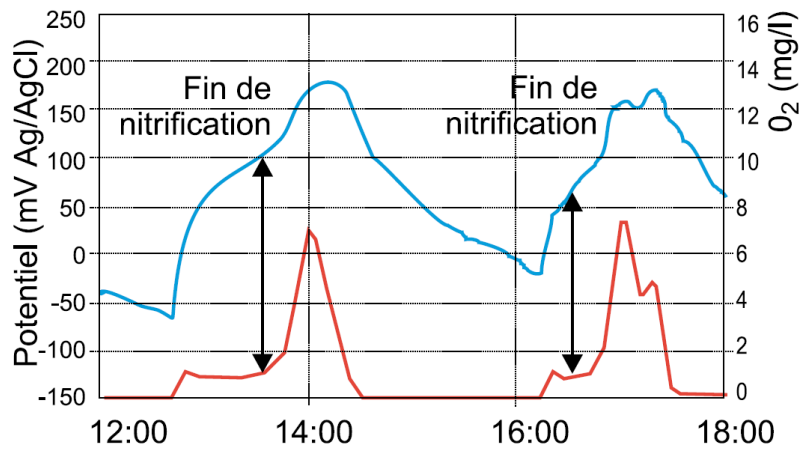
## **I.5 Causes des fluctuations des concentrations en oxygène**

### **I.5.1 Variation de la respiration des boues :**

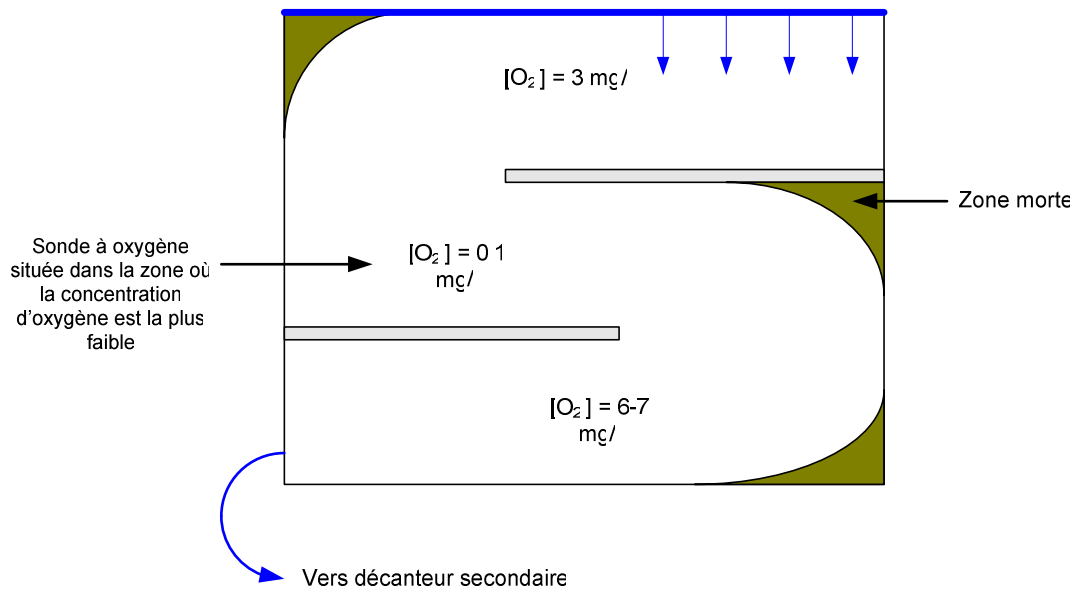
#### **I.5.1.1 En fonction de l'activité nitrifiante :**

La fin de l'activité nitrifiante qui correspond à une concentration d'azote ammoniacal dans les boues de l'ordre de quelques dixièmes de mg/l, s'accompagne d'une chute brutale de la respiration des boues et donc d'une augmentation rapide de la concentration d'oxygène dissous qui peut monter jusqu'à 7mg/l. Cette augmentation rapide de la concentration en oxygène dissous se traduit par un point d'inflexion sur la courbe de potentiel rédox (Figure 18) (Deronzier et al. 2001). Selon Culot 2006, le profil des concentrations en oxygène dissous dans le canal d'oxydation de la station d'épuration Gembloux est comparable à celui rapporté par (Deronzier et al. 2001). A Gembloux, la concentration en oxygène au début du canal où boues recirculées sont mises en contact avec la charge polluante est de 3 mg/l. Cette concentration va descendre jusqu'à 0,1 mg/l à mi parcours du canal. Ceci est dû à l'augmentation de l'activité microbienne dans la première partie du bassin. En effet, il existe un temps nécessaire pour que la biomasse recirculée, qui se trouvait initialement dans des conditions anaérobies et de faible charge massique dans le décanteur secondaire, reprenne

pleinement son activité. A la fin du bassin, la nitrification étant terminée et la charge massique devenue faible, la respiration diminue et la concentration atteint 6-7 mg/l (Figure 19).



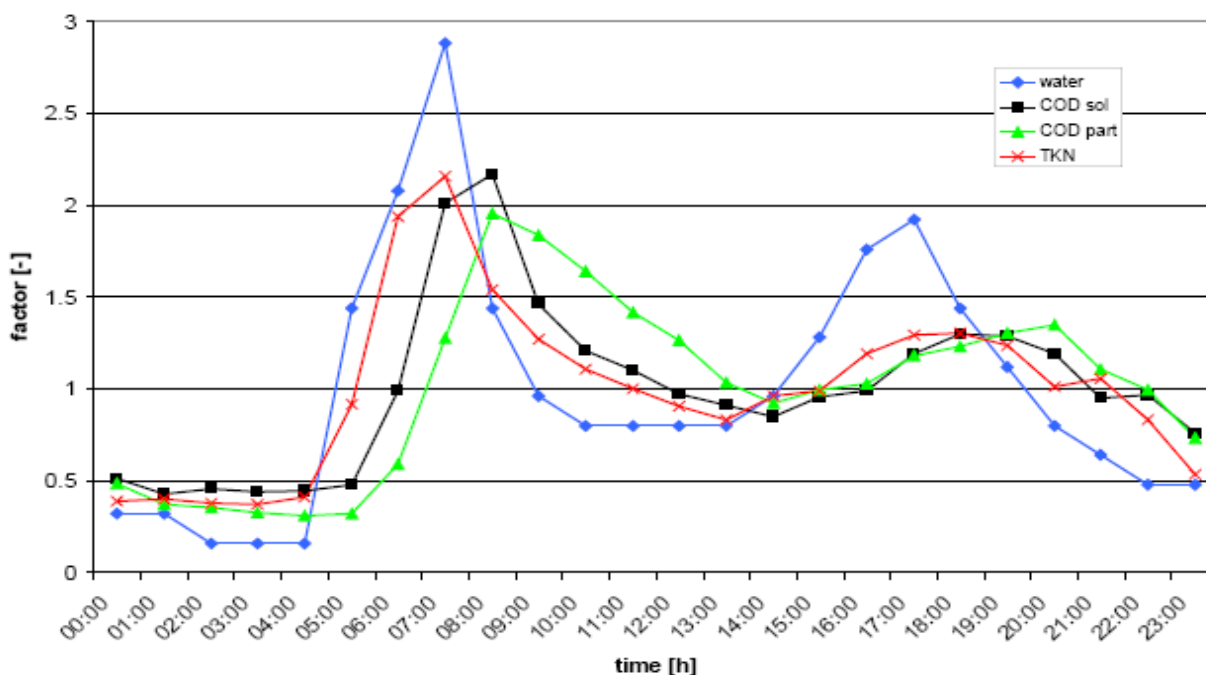
**Figure 18 :** exemple d'évolution du potentiel rédox (mV en bleu) et de l'oxygène dissous (mg/l en rouge) dissous pendant l'aération dans un bassin à 20°C (Deronzier et al. 2001).



**Figure 19 :** schéma du chenal d'aération de la station d'épuration de Gembloux (3326 m<sup>3</sup>, 22000 E.H.) présentant l'évolution des concentrations d'oxygène d'après (Culot M. 2006).

### I.5.1.2 Variation de la charge massique :

Ce qui caractérise une station d'épuration par rapport à un autre processus industriel est l'absence de contrôle possible des entrées. En effet la station d'épuration va subir au cours d'une journée des variations de la charge hydraulique et de la charge polluante. Il faut distinguer ces deux types de variations car la dilution de la charge polluante varie au cours de la journée. Classiquement, les stations d'épurations des eaux résiduaires urbaines ont deux pics de pollution journaliers à épurer. L'un survient le matin en général vers 8 heure l'autre vers 18 heure. Les pics peuvent être plus ou moins prononcés et décalés dans le temps en fonction de la longueur du réseau d'égouttage (Figure 20). En plus de ces variations au cours de la journée, se superposent les variations dues au climat. Pendant les périodes où la charge organique est élevée, la respiration des boues sera elle aussi élevée et la concentration en oxygène sera faible. Ces variations affectent la concentration en oxygène si l'on se place en un point du bassin mais ne sont pas à prendre en compte si l'on considère le stress subi par un microorganisme qui est en suspension dans l'eau et qui avance donc au même rythme que la charge polluante.



**Figure 20** : pollutogramme couramment observé pour les eaux résiduaires urbaines (COD sol, demande biochimique en oxygène soluble, part particulaire, TKN azote méthode Kjeldah (Benedetti L. 2006))

## **I.5.2 Répartition non homogène de l'aération.**

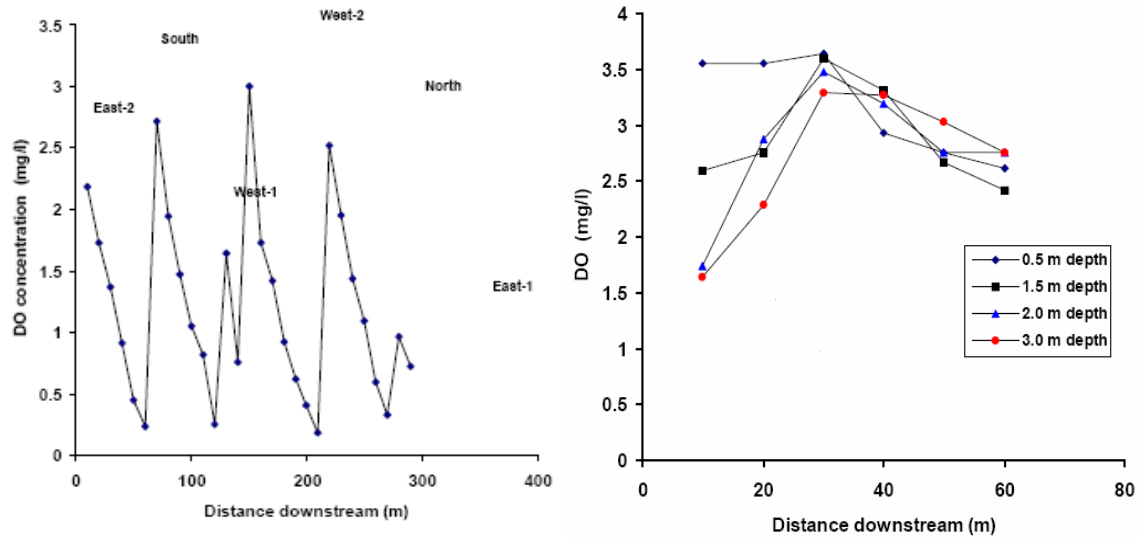
### **I.5.2.1 Gradients de concentration dus à la distance par rapport aux aérateurs:**

Dans les chenaux à aération de surface, généralement appelés carrousel, les parties les moins bien aérées se situent entre les aérateurs et en profondeur, (Abusam A. 2002).

Burrows et al 2001 ont étudié les gradients en oxygène dissous dans un carrousel à chenaux annulaires concentriques. Dans le réacteur étudié, la liqueur mixte circule dans un premier temps dans le chenal externe puis est dirigée vers l'anneau du milieu, passe par l'anneau central avant d'être dirigée vers le clarificateur. L'aération et la circulation de la liqueur mixte sont effectuées par quatre aérateurs de surface à axe horizontal à vitesse lente munis de disques.

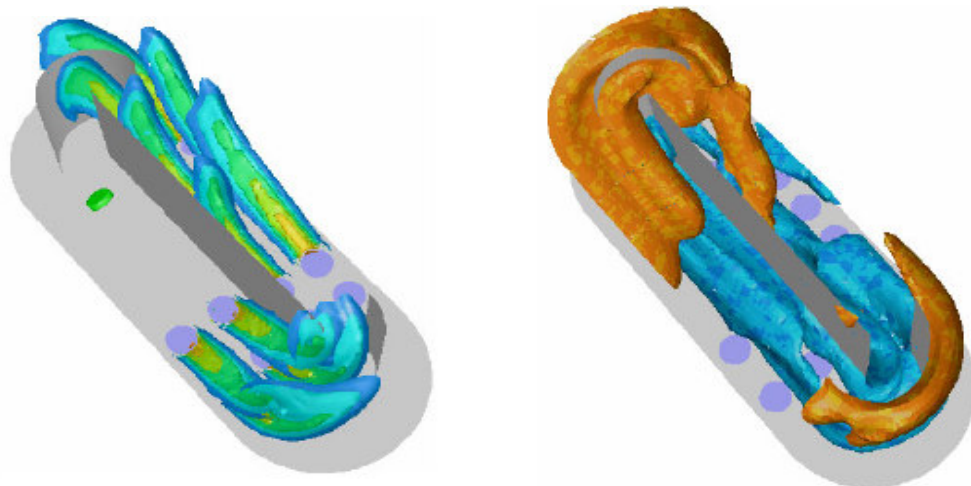
Les auteurs ont étudié la variation des concentrations d'oxygène en fonction de la distance par rapport aux aérateurs. Les mesures de concentration d'oxygène ont été effectuées en surface (10 cm de profondeur) tous les 10m en aval de l'aérateur «East-1 ». Les résultats des mesures sont présentés Figure 21. Au niveau des aérateurs, ils ont systématiquement observé un pic de concentration d'oxygène, supérieur à 2 mg d'O<sub>2</sub>/l dissous. Entre deux aérateurs s'est effectuée une rapide diminution de la concentration d'oxygène qui est passée sous 0,5 mg d'O<sub>2</sub>/l ce qui est considéré comme une concentration de zones où peuvent se produire une dénitrification.

Les auteurs se sont ensuite intéressés aux variations de la concentration en oxygène en fonction de la profondeur. Deux essais ont été effectués à deux dates alors que le réacteur fonctionnait avec des volumes d'eau très différents (variation du simple au double). Ils ont mis en évidence la composante verticale du gradient d'oxygène au niveau de l'aérateur. Au niveau de l'aérateur (aérateur de surface muni de disque), à faible profondeur la concentration d'oxygène dissous est bien plus élevée qu'elle ne l'est en profondeur. Cette composante verticale du gradient d'oxygène s'estompe lorsque l'on s'éloigne en aval de l'aérateur. Au-delà de 30 m en aval de l'aérateur, l'influence de la profondeur sur la concentration d'oxygène a été faible.



**Figure 21 :** à gauche, effet de la distance en aval d'un aérateur de surface sur la concentration en oxygène dissous mesuré à 10 cm de profondeur (les quatre pics correspondent à l'emplacement des quatre agitateurs de surface) à gauche, effet de la distance en aval et de la profondeur par rapport à un aérateur de surface (Burrows L.J. 2001)

Dans les systèmes d'insufflation d'air, les parties les moins bien aérées se situent dans les zones où les planchés de diffuseurs sont absents et dans les zones proches de la surface (Cartland Glover G., J. et al. 2006). Toutefois, les maxima de concentration d'oxygène ne se trouvent juste en aval du planché de diffuseurs (Lesage N. 2003).



**Figure 22 :** à gauche, simulation des iso surfaces de teneur en gaz dans un bassin pilote à boues activées à insufflation d'air. A droite, simulation des Iso surfaces de concentration d'oxygène élevées (3,4 mg/l) en bleu et de concentration d'oxygène faibles (2,9 mg/l) en orange (Cartland Glover G., J. et al. 2006)

### **I.5.2.2 Effet de la vitesse de circulation**

Dans les chenaux d'oxydation, la vitesse horizontale peut varier entre 0,25 et 0,60 m/s avec des valeurs typiques situées entre 0,25 et 0,35 m/s. Une vitesse minimale de 0,25 m/s est généralement requise pour prévenir la sédimentation des particules. La vitesse est de plus limitée à 0,60 m/s pour éviter une érosion excessive et des coups de bélier hydrauliques.

Dans les chenaux d'oxydation la vitesse horizontale est décroissante de la surface, où elle est maximale vers le fond du bassin où elle est minimale (Tanguy P. 2003). La concentration et la vitesse de circulation varient en fonction de la profondeur

## **I.6 Techniques d'étude de l'effet des fluctuations en oxygène dissous sur l'efficacité de l'épuration.**

### **I.6.1 L'apport des modèles**

Les modèles peuvent être « mécanistes », basés sur des règles de conservation (masse, impulsion, énergie), théoriquement bien fondés et donc aisément interpolables. Les modèles empiriques ou semi empiriques sont basés sur des règles de bonne pratique. Il existe des modèles déterministes, d'autres modèles dits stochastiques font intervenir des probabilités. Les modèles présentent l'avantage de donner une vue simplifiée de la réalité et peuvent être un outil de communication efficace entre scientifiques.

#### **I.6.1.1 Intérêt des modèles dynamiques :**

Les modèles dynamiques permettent, contrairement aux modèles statiques, de tenir compte de la variation des flux (débit et concentration) en amplitude et en fréquence. Plusieurs échelles de temps interviennent. On doit tenir compte de variations très rapides comme par exemple du déclenchement des pompes de relevage, jusqu'à des variations saisonnières. Les modèles dynamiques permettent un processus de contrôle (feedback, feedforward)



### I.6.1.2 Réseaux neuronaux :

Les réseaux neuronaux sont des systèmes auto-adaptatifs. Après une période d'apprentissage, le modèle est capable de prédire certains paramètres. Dans le cadre de l'épuration de l'eau par boues activées, ces modèles sont utilisés pour prévoir le sludge volume index et prévenir du bulking.

### I.6.1.3 L'intelligence artificielle et systèmes experts :

Ces systèmes sont basés sur des langages informatiques « orientés objets » (Exemple : si le débit important alors actionner la pompe). Dans le cadre de la gestion de l'aération, la *logique floue* (fuzzy control) ne régule pas l'aération à partir d'une valeur limite de concentration d'oxygène à ne pas dépasser mais à partir de calculs effectués sur des classes de valeurs.

### I.6.1.4 Modèle de l'International Water Association :

Le modèle Activated Sludge Model (ASM) de l'International Water Association fait référence pour décrire la dynamique des polluants et des populations bactériennes dans les stations d'épuration à boues activées. La croissance des différentes populations de microorganismes est modélisée en se basant sur les équations de type équation de Monod. La charge polluante est caractérisée en Demande Chimique en Oxygène. La DCO totale est subdivisée selon sa biodégradabilité et selon son état physique (Figure 23). Une présentation des équations et des paramètres du modèle ASM se trouve en annexe.

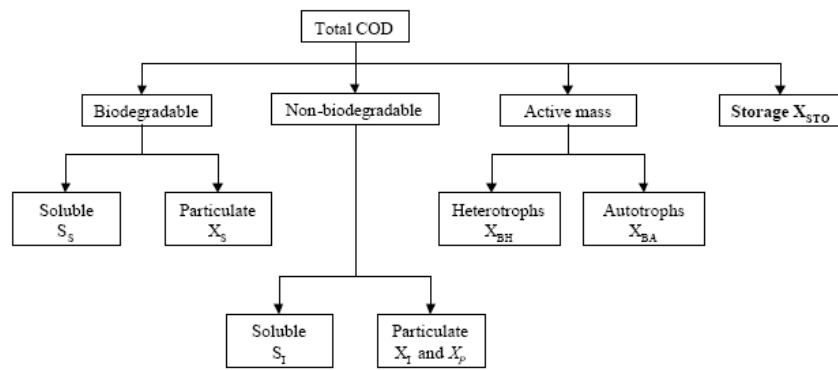


Figure 23 : caractérisation de la charge polluante dans les modèles ASM (Benedetti L. 2006).

## **I.6.2 L'apport d'un biocapteur**

### **I.6.2.1 Le gène ROX1**

Pour la levure *Saccharomyces Cerevisiae* l'expression de nombreux gènes est régulée par le niveau d'oxygène. Ainsi la transcription de plusieurs gènes est induite par la présence d'oxygène. La plus part de ces gènes codent pour des cytochromes où des enzymes servant à la respiration. La plupart des gènes hypoxiques servent à une utilisation optimale de l'oxygène dans des conditions où l'oxygène est présent en faibles quantités. L'effet de l'oxygène sur l'expression de ces gènes se fait par l'intermédiaire de l'hème. Chez les levures, l'hème est synthétisé seulement en présence d'oxygène. Ainsi la concentration intercellulaire d'hème peut servir d'indicateur du niveau d'oxygène dans l'environnement (Deckert et al.1995). Le produit de ROX1 est nécessaire à la répression des gènes hypoxiques réprimés par l'hème. Il lie une séquence dans la première partie de ces gènes et réprime leur transcription. La transcription de ROX1 est dépendante de l'hème et de l'oxygène. Le produit du gène ROX1 est seulement présent dans les cellules qui se développent dans des conditions aérobies et sert à réprimer l'expression des gènes hypoxiques (Keng 1992).

### **I.6.2.2 De la découverte à l'utilisation de la Green Fluorescent Protein.**

En quelques années la protéine fluorescente dans le vert découverte sur la méduse *Aequorea victoria* est devenue la protéine la plus largement étudiée et exploitée en biochimie et biologie cellulaire.

La GFP est une protéine auto fluorescente capable d'absorber de l'énergie à 400 nm et, en moindre mesure, à 475 nm (dans le bleu). Elle cède ensuite cette énergie en émettant à 509 nm (dans le vert).

Son gène peut être fusionné au gène d'une protéine que l'on souhaite étudier. Le gène recombinant est ensuite réintroduit dans des cellules qui vont alors synthétiser la protéine fluorescente en même temps que la protéine étudiée. On pourra alors observer le GFP à l'aide d'un microscope à fluorescence. Cette méthode permet d'étudier les protéines dans leur environnement naturel : la cellule vivante. Elle permet de visualiser la localisation intracellulaire de certaines protéines, la régulation de leur synthèse, etc. La GFP est un

excellent indicateur physiologique et permet de créer de nouveaux bioindicateurs (Roger Y. Tsien 1998)



Figure 24 : Aquorea victoria (source : <http://www.ulb.ac.be/infosciences>)

## II Matériel et méthodes

### II.1 Conception du réacteur scale down

On entend par réacteur scale-down un réacteur qui permet de reproduire à l'échelle du laboratoire les conditions présentes dans les réacteurs de taille industrielles.

Dans les bassins aérés des stations d'épuration, les micro-organismes rencontrent des fluctuations de concentration en oxygène variables en fonction :

- des gradients d'oxygène présents dans les bassins
- de leur parcours dans le bassin à travers ces gradients (figure25)

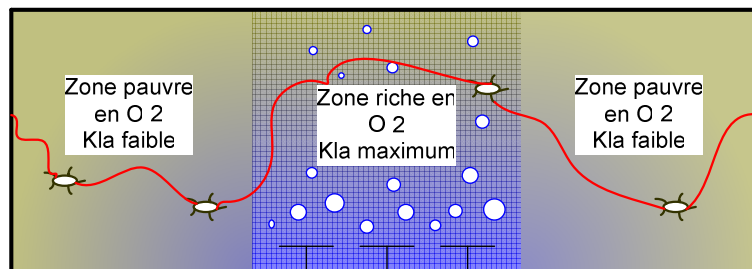
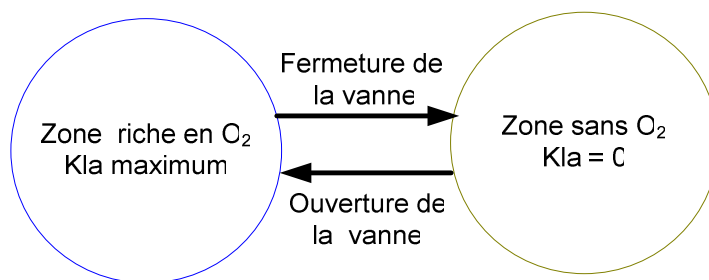


Figure 25 : schéma d'un parcours d'un microorganisme au sein d'un bassin aéré

La complexité des différentes situations peut se simplifier en considérant que lors du parcours d'un micro-organisme au travers des gradients d'oxygène celui-ci n'occupe de façon alternée que deux états ; un état riche en oxygène et un état pauvre en oxygène. En faisant varier la fréquence et la

répartition des changements d'état il est ainsi possible de décrire les fluctuations en oxygène dissous que rencontre n'importe quel micro-organisme dans n'importe quel contacteur gaz-liquide.

Pour reproduire cette alternance d'états au laboratoire dans un fermenteur, on peut admettre que pendant une période où l'aération est en marche la culture se trouve dans un état où le milieu est riche en oxygène et qu'en l'absence d'aération la culture se trouve dans un état où le milieu est pauvre en oxygène. Le passage d'un état à l'autre est déclenché par l'ouverture ou la fermeture d'une vanne tout ou rien (complètement ouverte ou complètement fermée). Cette vanne est située sur le tuyau d'admission d'air. Ses temps d'ouverture et de fermeture sont programmables sur ordinateur (Figure 26).



**Figure 26** : représentation schématique des états dans lequel peut se trouver la culture en fermenteur.

## **II.2 Culture de *Saccharomyces cerevisiae* (souche YPR065W) en bioréacteur**

### **II.2.1 Matériels.**

Les cultures de *Saccharomyces cerevisiae* ont été réalisées dans un fermenteur de marque Biolaffite-France, en acier inoxydable d'un diamètre de 0,22m et d'une capacité de 20 litres. Il est construit avec une double enveloppe afin de réguler la température par transfert de chaleur en utilisant l'eau.

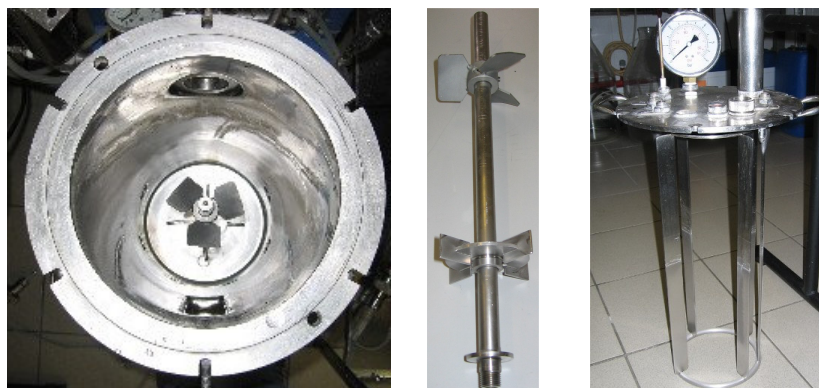
Le système d'agitation comprend deux mobiles situés sur le même axe :

- un mobile TD4, turbine à disques à 4 pales droites ayant un effet radial et de cisaillement favorisant le transfert d'oxygène.
- un mobile à 3 pales inclinées ayant une action de pompage et favorisant l'opération de mélange.

Le diffuseur d'oxygène est également situé sur l'axe d'agitation.

Afin d'éviter la formation de vortex et augmenter la turbulence, le fermenteur est muni de 4 contrepales (Figure 27).

Le fermenteur est équipé d'une sonde pH, d'une sonde à oxygène et d'une sonde à température qui sont reliées à un ordinateur qui collecte les données. La vitesse d'agitation, la température, le pH, l'ajout de milieu nutritif peuvent être réglés à partir de cet ordinateur.



**Figure 27** : photographie de l'intérieur du fermenteur, de l'axe et des mobiles d'agitation, des contrepales.

## II.2.2 Méthodes.

### II.2.2.1 Conservation de la souche

Le micro-organisme utilisé est la souche YPR065W de *Saccharomyces cerevisiae* dont le gène codant pour la GFP est fusionné avec le gène ROX1. Les souches ont été repiquées sur boîte (milieu 869 : 20 g/l glucose, 10 g/l extrait de levure et 15 g/l agar-agar) pour préparer des working seeds. Celles-ci sont des cupules contenant une aliquote de préculture maintenue dans une solution de glycérol stérile. Les working seeds servent à inoculer les précultures faites dans des fioles de 100 ml.

## **II.2.2.2 Milieu de culture**

### **a) précultures**

Les working seeds servent à inoculer les précultures. Celles-ci contiennent 20 g/l de glucose, 10g/l de peptone de caséine et 10 g/l d'extrait de levure. La première préculture d'un volume de 100 ml qui reçoit le contenu d'un working seed est laissée 24h sur une table agitante à une température de 30°C. La seconde préculture d'un volume initial de 400 ml doit être équipée d'un tuyau et d'une aiguille car c'est elle qui sert à inoculer le fermenteur. Elle reçoit le contenu de la première préculture, ce qui porte le volume d'inoculum à 500 ml. Le temps d'incubation à 30°C sur table agitante de la seconde préculture est de 16 heures.

### **b) Fermenteur**

Le milieu de culture est stérilisé en même temps que le fermenteur. Il est composé de 10 g/l de glucose, 20 g/l de peptone de caséine et de 10 g/l d'extrait de levure. On utilise généralement une concentration de 10 g/l de peptone de caséine lors de la culture de *Saccharomyces cerevisiae*, cependant nous avons constaté que la souche YPR065W a besoin de plus d'azote pour son développement. Ceci est dû à la synthèse de la GFP qui constitue une consommation d'azote supplémentaire..

Le volume initial du milieu du fermenteur est de 12l. Dans le cas d'une fermentation fed batch, deux fioles d'ajout sont préparées séparément afin d'éviter les réactions de Maillard au moment du passage à l'autoclave. Elles sont par la suite mélangées. Une des deux fioles contient 150g d'extrait de levure et 400 g de peptone de caséine et un volume de 1,5 litre d'eau distillée. L'autre contient 1200 g de glucose et un volume de 1,5 l.

## **II.2.2.3 Conditions de culture**

Pour permettre un bon développement du micro-organisme et une répétabilité des résultats, les conditions de cultures, mis à part l'aération, sont les mêmes pour tous les fermenteurs et constantes en cours de culture. Elles sont présentées dans le tableau 1

**Tableau 1:** conditions de culture en fermenteur

Paramètre	Valeur	Mode de régulation
pH	5,5	Ajout d'acide ou de base
Température	30°C	Circulation de vapeur dans la double enveloppe
pO <sub>2</sub>	30%	Modification de la vitesse d'agitation
Aération	1,5 vvm	

### **II.3 Suivi de la culture**

Pendant la fermentation, des échantillons sont prélevés de manière stérile au niveau de la vanne de prise d'échantillons de la cuve. Nous pouvons distinguer deux types de données récoltées :

- les données enregistrées au niveau du PC connecté au fermenteur. Il s'agit des données concernant le pH, la température, le volume ajouté.
- Les données mesurées sur l'échantillon. Il s'agit de la densité optique, la matière sèche, et la concentration en glucose.

#### **II.3.1 Données acquises par le système de régulation**

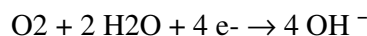
##### **a) la température**

La sonde permettant de suivre l'évolution de la température en cours de culture est constituée d'un pont de Wheatstone. Le principe de la mesure est basé sur la dépendance de la résistance électrique à la température. Elle sert au suivi de la température pendant la culture ainsi que pendant la stérilisation. La sonde est reliée à un régulateur qui commande l'ouverture et la fermeture des vannes d'eau chaude, d'eau froide et de vapeur.

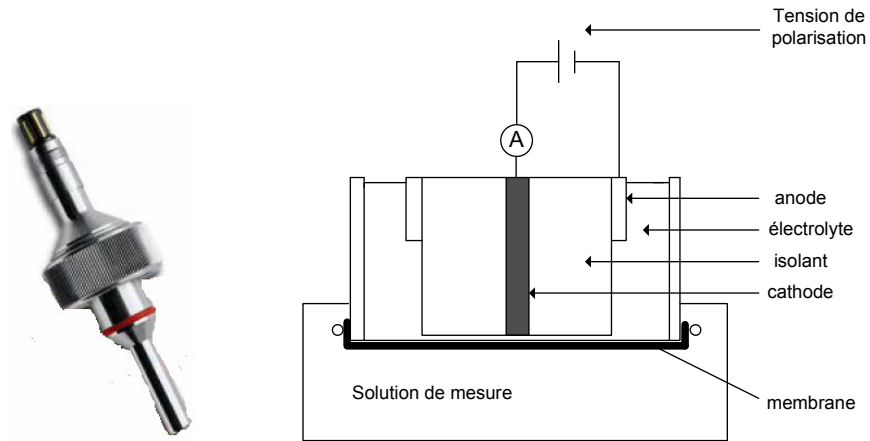
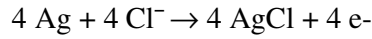
##### **b) la pO<sub>2</sub>**

La pO<sub>2</sub> est la mesure de l'oxygène dissous dans le milieu liquide par rapport à la saturation, exprimée en pourcentage. La sonde à oxygène se compose d'une cathode et d'une anode connectées par un électrolyte. La tension de polarisation entre l'anode et la cathode réduit de manière sélective l'oxygène au niveau de la cathode (Figure 28).

Réaction cathodique :



Réaction anodique :



**Figure 28** : photographie de la sonde à oxygène inPro 6800 Mettler Toledo utilisée et schéma de conception d'une sonde à oxygène selon le principe de l'électrode de Clark.

Ces réactions chimiques génèrent un courant électrique qui est proportionnel à la pression partielle d'oxygène ( $pO_2$ ). La sonde à oxygène consomme l'oxygène qui est continuellement extrait de la solution.

Elle est reliée à un régulateur qui agit sur la vitesse d'agitation afin de faire varier le  $kla$  en fonction de la consommation d'oxygène et de pouvoir obtenir une  $pO_2$  constante.

## II.3.2 Données acquises par mesure sur les échantillons prélevés en cours de culture.

### II.3.2.1 Mesure de la densité optique des échantillons

La croissance microbienne est suivie par mesure de la densité optique (DO) pour une longueur d'onde de 540 nm. Ces données sont mises en relation avec la mesure de la matière sèche et le comptage des unités formant colonie pour connaître la biomasse de la culture et le nombre de cellules vivantes.

La gamme de mesure s'étend de 0,1 à 0,8 unité d'absorbance. Au-delà de 0,8, les échantillons sont dilués avec de l'eau distillée. La DO doit alors être corrigée pour prendre en compte la DO du milieu et celle de l'eau qui sert à la dilution :



$$DO_{\text{corrigée}} = DO_{\text{mesurée de l'échantillon}} * Dilution - \frac{DO_{\text{milieu}}}{Dilution} - DO_{\text{eau distillée}}$$

### II.3.2.2 Mesure de la concentration en glucose des échantillons

La concentration de glucose (g/l) dans le milieu est mesurée grâce à l'YSI MODEL 2700 SELECT. Cet appareil utilise la technologie des senseurs enzymatiques. L'enzyme est la glucose oxydase. Elle est immobilisée sur une membrane et catalyse une réaction qui produit du peroxyde d'hydrogène :



Le peroxyde d'hydrogène est oxydé à l'anode de platine de la sonde électrochimique. Cette oxydation produit un signal électrique qui est proportionnel à la concentration en glucose. L'échantillon peut éventuellement être dilué avec de l'eau distillée pour que la concentration de glucose mesurée soit dans la gamme de mesure de l'appareil, c'est-à-dire inférieure à 2,5 g/l.

### II.3.2.3 Mesure de la matière sèche des échantillons

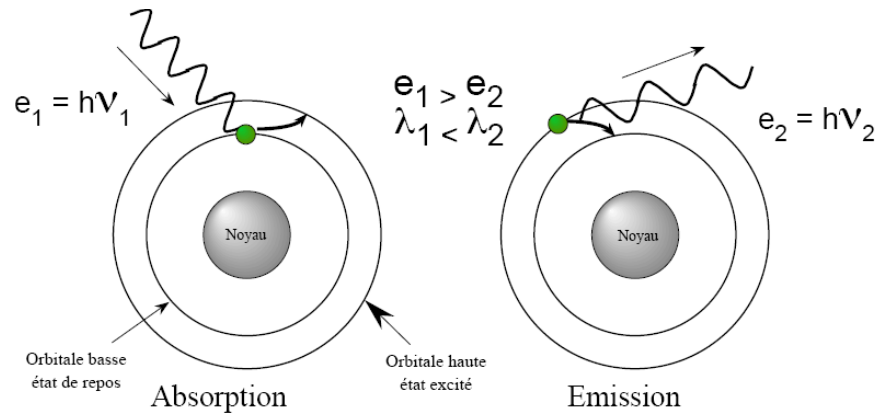
La détermination de la matière sèche est réalisée par filtration sous vide. Un volume de 8 ml d'échantillon est passé sur un filtre (0,45 µm) préalablement séché pendant 48 h à 105°C. Après filtration, les filtres sont remis à l'étuve pendant 48 heures à la même température. La différence entre la pesée réalisée après filtration et séchage et la tare du filtre sec donne, en ramenant au volume filtré, la concentration en matière sèche de l'échantillon.

## **II.4 Détection du stress lié au manque d'oxygène par analyse de la fluorescence**

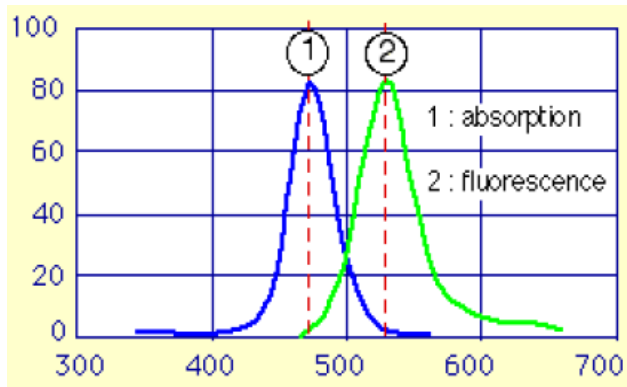
Comme nous l'avons vu dans la partie bibliographique, le gène ROX1 s'exprime lorsque le micro-organisme est face à un manque d'oxygène. Chez la souche YPR065W ce gène a été fusionné au gène codant pour la GFP. Il est donc possible de détecter le stress lié au manque d'oxygène par analyse de la fluorescence des cellules.

### **II.4.1 Principe de la mesure**

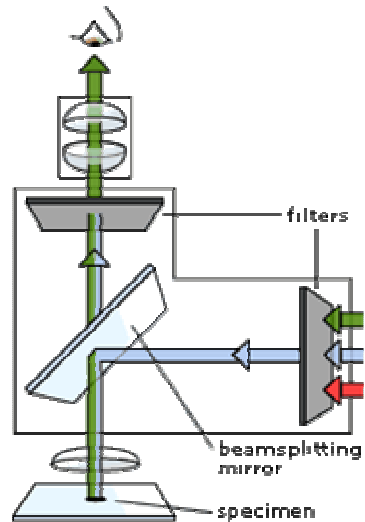
De la lumière est émise par une source de forte intensité sur un large spectre de longueurs d'ondes (lampe à vapeur de mercure). Celle-ci est alors filtrée (filtre d'excitation) pour en isoler la longueur d'onde qui va exciter de manière spécifique la préparation. Suite à l'excitation, on a émission d'un rayonnement de la part de l'échantillon sous forme de fluorescence (Figure 29 et 30). Ce rayonnement est alors filtré (filtre d'émission) en vue de l'élimination des longueurs d'ondes non utilisables (ondes qui pourraient masquer le signal à observer) (Figure 31).



**Figure 29** : principe de la fluorescence (www.ulb.be/infoscience)



**Figure 30** : Spectre d'absorption et de fluorescence de la GFP.  
([www.ulb.be/infoscience](http://www.ulb.be/infoscience))



**Figure 31** Schéma d'un microscope à fluorescence (<http://nobelprize.org>)

## II.4.2 Préparation des échantillons et acquisition des images

Pour chaque échantillon un volume de 1 ml est prélevé du fermenteur dans un eppendorf contenant 30  $\mu$ l de cycloheximide ( $C_{15}H_{23}NO_4$ ). Le cycloheximide est un inhibiteur de la synthèse protéique chez les organismes eucaryotes. Les échantillons sont mis à agiter pendant 45 min à température ambiante. Ils sont ensuite centrifugés (5 min à 4000 tours/min). Le surnageant est éliminé et le culot est lavé au PBS (solution physiologique tamponnée au phosphate) de manière à ce que seules les cellules apparaissent fluorescente. Enfin les cellules sont observées au microscope à fluorescence sur une lame dans une goutte de glycérol. Cinq photographies situées à des localisations différentes sur la lame sont prises par échantillon grâce à une caméra digitale.

## II.4.3 Analyse des images

La technique numérique d'analyse d'image employée se décompose en deux étapes, le processus de segmentation et l'analyse des pixels (Delvigne 2006).

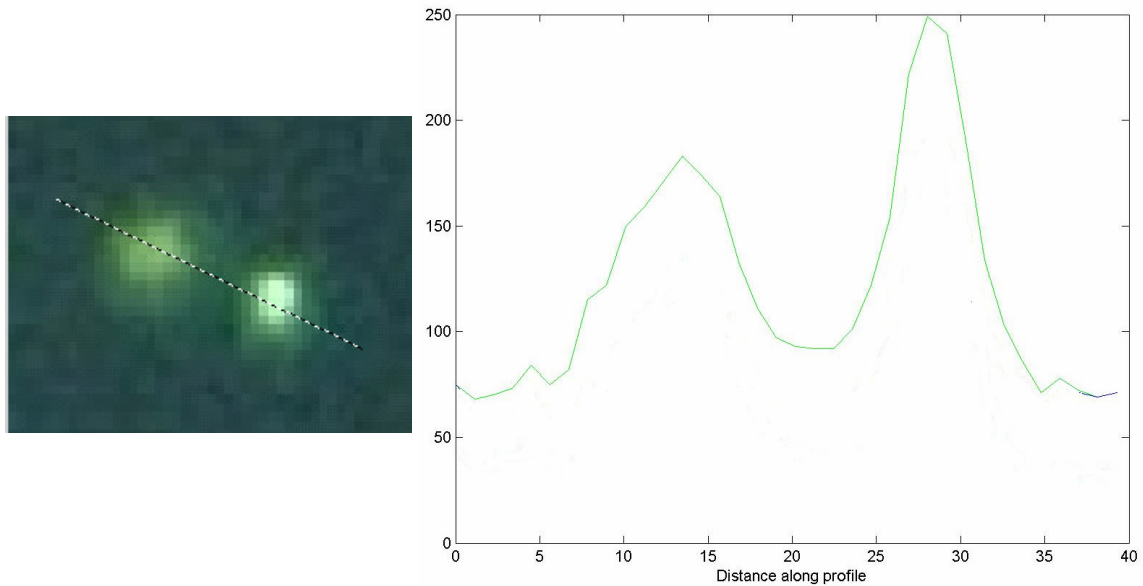
### ▪ *Processus de segmentation*

Avant d'analyser les caractéristiques cellulaires proprement dites, il est nécessaire de séparer les cellules de levure du fond de l'image. Cette séparation est effectuée grâce à des techniques numériques dites de « segmentation ». La segmentation est l'étape cruciale d'une procédure d'analyse d'image. L'image est en niveau de vert allant de 0 (noir) à 255 (vert intense). Comme le fond de l'image est sombre on peut attribuer une valeur limite de pixel qui caractérise le fond. De cette manière, un masque est attribué à l'image et permet de classer les pixels en deux catégories : les pixels dont la valeur est supérieure à la limite et les pixels dont la valeur est inférieure à cette même limite. Ce seuil a été fixé à une valeur d'intensité de vert égale à 80. On obtient donc une image binaire pour laquelle les contours des cellules ressortent. Cependant les contours des cellules obtenus sont interrompus et manquent de netteté. De manière à compléter ces contours, une étape de dilatation est nécessaire. Cette technique consiste à ajouter des pixels selon un schéma de structure bien défini. La surface de pixels de chacune des cellules est ensuite rendue uniforme par une étape de remplissage. L'ensemble du processus de segmentation est effectué de manière automatique grâce à une fonction de Matlab®. Après l'étape de segmentation et de délimitation des pixels, ceux-ci peuvent être analysés.

### ▪ *Analyse des pixels*

La figure 32 présente une partie d'une photographie où l'on peut observer deux cellules de la souche YPR065W de *Saccharomyces cerevisiae* observées au microscope à fluorescence. La cellule à gauche de la photographie est considérée comme non fluorescente, la cellule de droite est considérée comme fluorescente. Le graphique de la figure 32 montre l'intensité de la fluorescence de ces deux cellules et du milieu qui les entoure. A partir de tels profils de fluorescence il a été établi que :

- la valeur limite entre la fluorescence du fond et celle des cellules est de 80.
- Les objets présents dans les pixels dont l'intensité de vert est supérieure à 170 sont considérés comme fluorescents.



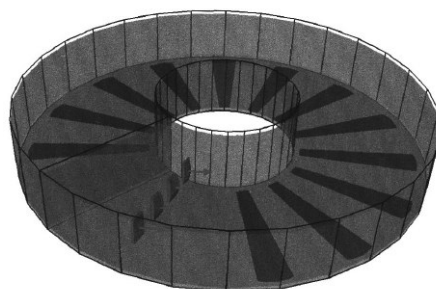
**Figure 32 :** à gauche, photographie de deux cellules de la souche YPR065W de *Saccharomyces cerevisiae* observées au microscope à fluorescence. Le segment représente la zone analysée sur le graphique présenté à droite. Ce graphique présente l'intensité de la fluorescence dans le vert le long du segment.

## III Résultats et discussions

### **III.1 Estimation d'un profil caractéristique en oxygène dissous rencontré dans un chenal d'oxydation**

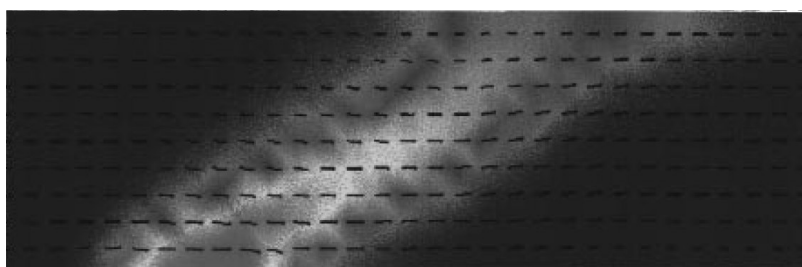
Il est nécessaire de connaître les fluctuations des concentrations en oxygène dissous pour mettre en place par la suite un dispositif expérimental permettant de les reproduire et ainsi étudier leurs impacts. Nous avons utilisé la description d'un bassin aéré effectuée par Cockx et al (2001) afin d'évaluer les temps de passage des floes bactériens dans les zones du bassin riches en oxygène et dans les zones pauvre en oxygène.

Cockx et al (2001) ont utilisé la mécanique des fluides numériques pour décrire la dispersion de l'oxygène dans un chenal d'oxydation circulaire utilisé dans une station d'épuration à boues activée. Ce chenal présentait présenté figure avait un diamètre interne de 18 mètres et un diamètre externe de 52m. La profondeur était de 8 mètres. L'air était injecté par 1152 diffuseurs poreux situés dans 12 raquettes. Quatre hélices marines servaient à donner une vitesse de  $0,5 \text{ m.s}^{-1}$  au liquide. Cette vitesse horizontale est nécessaire pour maintenir les boues en suspension et augmenter le  $K_{la}$  en évitant la formation de zones mortes (spiral flows) entre les raquettes de diffuseurs. Les hélices marines étaient situées dans une zone non aérés afin d'éviter leur engorgement. Le débit de gaz injecté était de  $6912 \text{ m}^3 \text{ h}^{-1}$ .



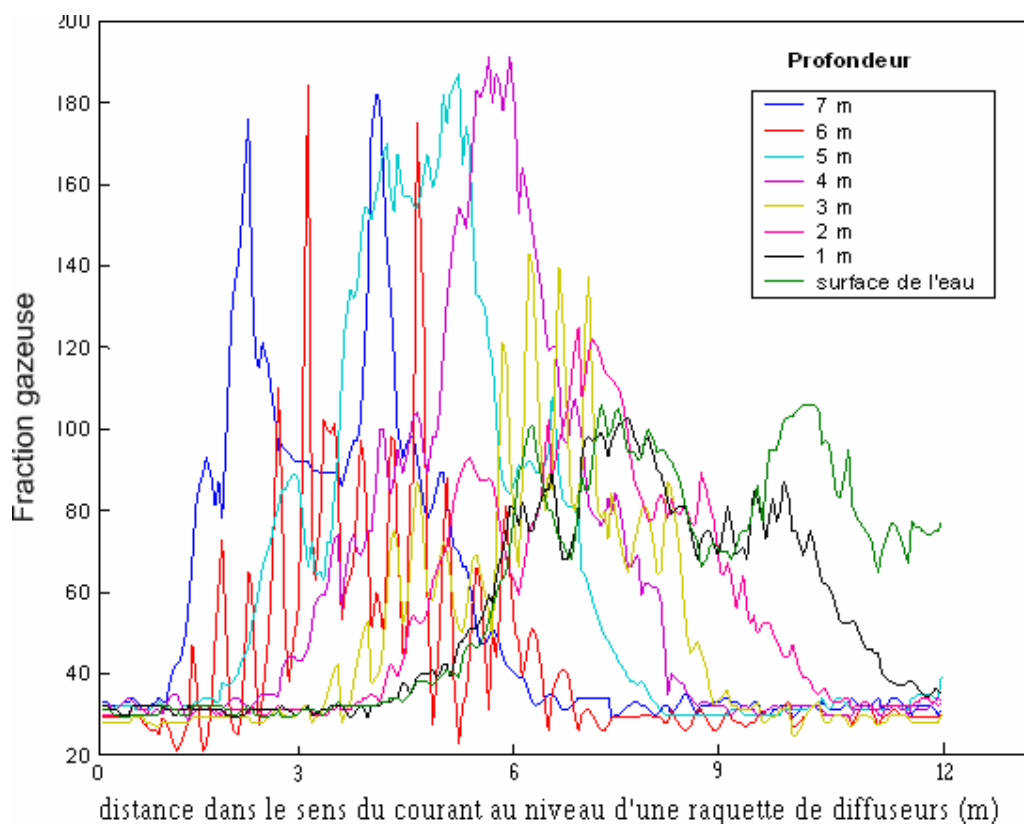
**Figure 33** : schéma du chenal d'oxydation circulaire étudié par Cocks 2001

Leurs résultats indiquent que l'hydrodynamique du système était la résultante de deux forces opposées ; le panache gazeux vertical au niveau des diffuseurs constituait un flux opposé au mouvement horizontal du liquide généré par les hélices marines. Cependant, pour une vitesse de  $0,5 \text{ m.s}^{-1}$ , la composante verticale du vecteur vitesse est très faible. A cette vitesse, le panache gazeux, qui serait vertical en l'absence de vitesse horizontale est incliné dans le sens du courant (figure). On définit par fraction gazeuse comme le rapport entre le volume de gaz et le volume total du liquide.



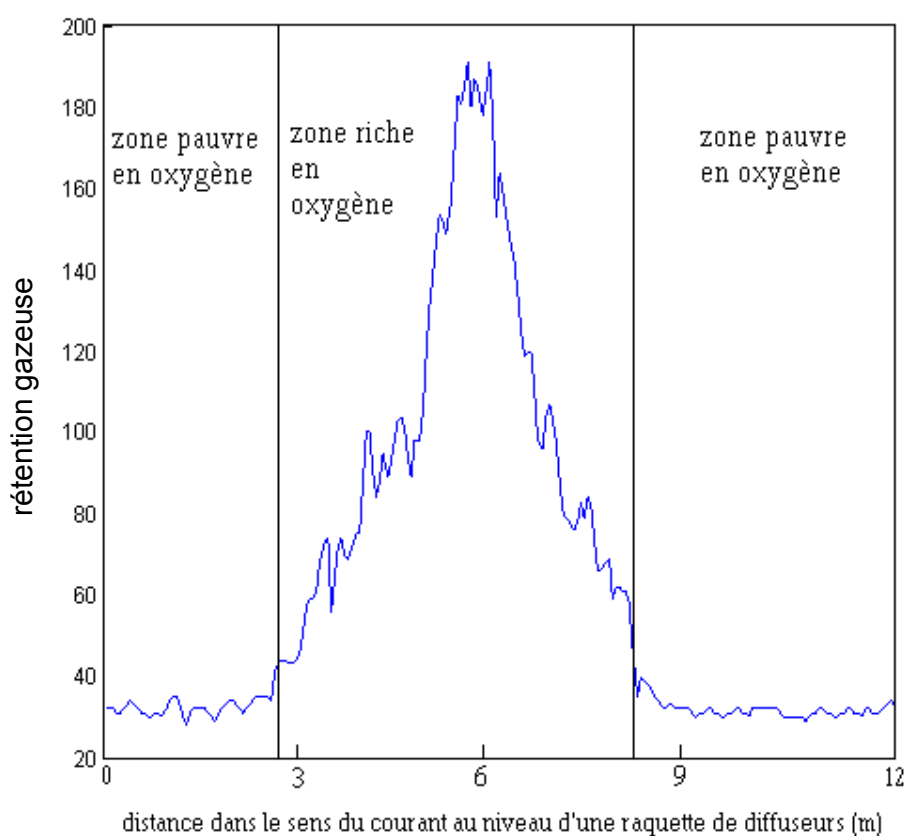
**Figure 34** : schéma représentant en 2D la fraction gazeuse et vitesse du liquide (vecteur vitesse) au niveau d'une raquette de diffuseurs (Cocks 2001).

L'analyse de l'image présentée à la figure 2 avec le logiciel Matlab® a permis de donner une valeur aux nuances de gris représentant la fraction gazeuse. Il a ainsi été possible de créer un graphique représentant la fraction gazeuse que rencontrent les microorganismes lorsqu'ils passent au niveau d'une raquette de diffuseur en fonction de leur profondeur dans le bassin. On observe une variabilité relativement forte des fluctuations de l'oxygène dissous rencontrées par les flocs bactériens en fonction de leur profondeur. Lors du passage au niveau d'une raquette de diffuseurs les flocs bactériens dans le fond du bassin passent à proximité des diffuseurs et reçoivent à cet instant des quantités importantes d'oxygène. Par contre, les flocs bactériens qui se situent proche de la surface de l'eau rencontrent le panache gazeux ultérieurement à leur passage au dessus des diffuseurs et reçoivent moins d'oxygène que les flocs bactériens se situant dans le fond du bassin. En effet, le panache gazeux s'est estompé avant de les atteindre du fait de la dissolution et de la consommation de l'oxygène dans la partie inférieure du bassin (figure 35).



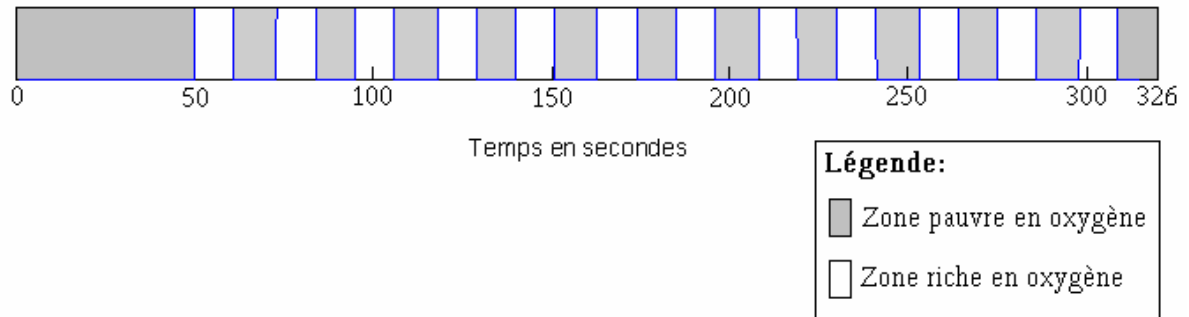
**Figure 35 :** fraction gazeuse (unités) rencontrées par les flocs bactériens lors du passage au niveau d'une raquette de diffuseurs pour différentes profondeurs de passage

Le nombre d'expérience en fermenteur étant limité, nous avons focalisé notre attention sur un profil moyen, celui qui représente le passage au niveau d'une raquette de diffuseurs des flocs bactériens situés à 4 m de profondeur. Ce profil peut être modélisé suivant la technique présentée dans la partie matériels et méthodes, comme étant la traversée d'une zone pauvre en oxygène durant 5 secondes puis la traversée d'une zone riche en oxygène durant 10 secondes et enfin le retour à un état pauvre en oxygène de 9 secondes (figure 36). Le profil qui représente un tour complet du chenal correspond à 12 passages au niveau d'une raquette de (secondes 288 secondes) et un passage au niveau de la zone non aérée des agitateurs (48 secondes). Le résultat de la modélisation du profil total a été illustré Figure 37.



**Figure 36 :** fraction gazeuse (unités) rencontrées par les flocs bactériens lors du passage au niveau d'une raquette de diffuseurs à 4 m de profondeur.





**Figure 37 :** schéma de la succession des temps de séjours dans les zones riches en oxygène et pauvre en oxygène traversées par les floccs bactériens lors d'un tour du chenal.

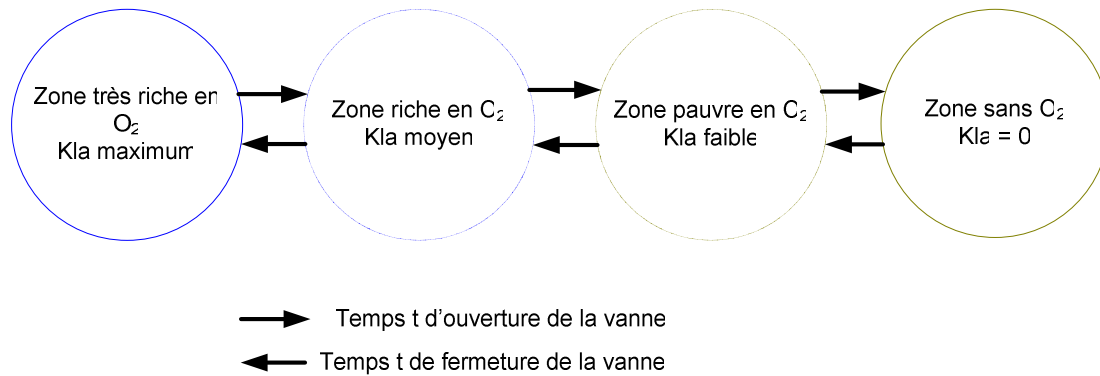
La fréquence de changement d'état dans notre modélisation est très élevée. Des intervalles de temps si courts ne permettent pas l'oxygénation ou la désoxygénation du milieu du fermenteur. Afin de tenir compte du temps d'inertie du système et d'observer de fortes variations du niveau d'oxygénation, nous avons décidé d'amplifier les temps de séjours. Le temps de fermeture de la vanne correspondant au temps de séjour au niveau des agitateurs a été fixé à 137 secondes. Le temps de fermeture de la vanne correspondant au temps de séjour dans la partie non aérée entre deux raquettes de diffuseurs a été fixé à 91 secondes. Le temps d'ouverture de la vanne d'aération correspondant au temps de séjour dans la partie aérée au niveau des diffuseurs a été fixé à 91 secondes.

### **III.2 Etude des fluctuations en oxygène dissous dans le réacteur scale-down.**

#### **III.2.1 Etude théorique du temps nécessaire au changement d'état d'oxygénation :**

Selon la modélisation que nous avons effectuée, le micro-organisme peut n'être que dans deux situations ; une situation riche en oxygène où une situation sans oxygène. Cependant, dans la pratique, le passage d'un état à l'autre, provoqué par l'ouverture ou la fermeture de la

vanne sur l'arrivée d'air n'est pas immédiat. Il existe un temps nécessaire pour passer de l'état très riche en oxygène à l'état sans oxygène et un temps nécessaire pour passer de l'état pauvre en oxygène à l'état riche en oxygène (figure 38).



**Figure 38 :** schéma montrant l'évolution de l'état dans lequel se trouve la culture en fonction du temps d'ouverture ou de fermeture de la vanne située sur l'arrivée d'air.

Nous allons étudier le temps nécessaire entre l'instant où l'ouverture ou la fermeture de la vanne est programmée et l'instant où le changement d'état a effectivement lieu. Le temps de changement d'état peut se décomposer en plusieurs temps :

- le temps d'ouverture ou de fermeture de la vanne d'aération
- le temps d'oxygénation ou de désoxygénation du milieu
- le temps d'établissement de l'équilibre physique pour la dispersion gaz-liquide.

Il est également nécessaire de connaître le temps de réponse de la sonde à oxygène pour étudier le temps d'oxygénation et le temps de désoxygénation ou encore la valeur de la concentration en oxygène au moment précis d'une prise d'échantillon (Figure 39).

Le temps d'ouverture ou de fermeture de la vanne d'aération, commandée électriquement, est négligeable.

Les temps d'oxygénation ou de désoxygénation du milieu dépendent du  $kla$  du système et de la consommation d'oxygène par la biomasse :

$$\frac{dC}{dt} = kla \times (C^* - C) - OUR$$

Avec  $C$  la concentration en oxygène dissous

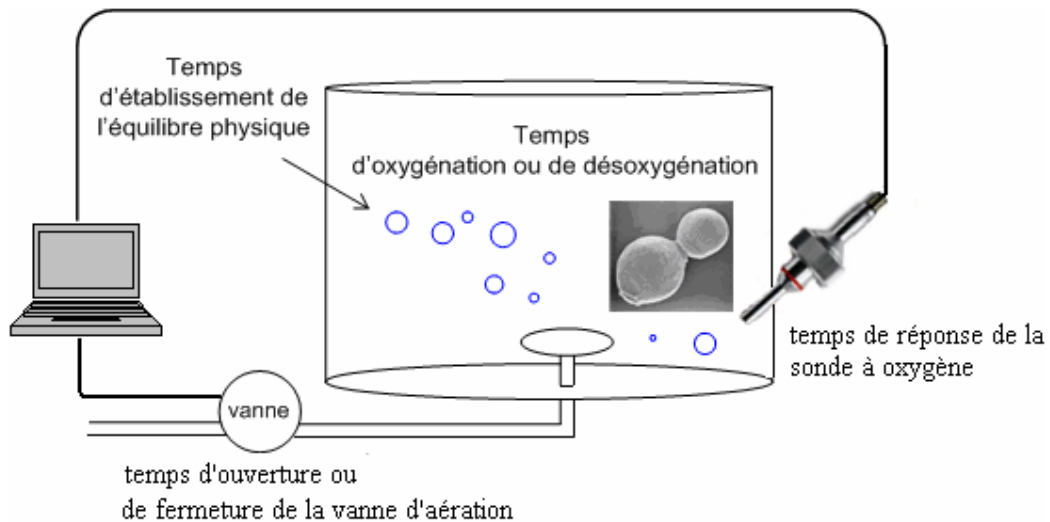
$C^*$  la concentration en oxygène dissous à la saturation

$kla$  le coefficient de transfert d'oxygène

$OUR$  la consommation d'oxygène par la biomasse

Ces temps sont donc variables au cours de la culture en fermenteur. Au début de la culture, lorsque la biomasse est peu importante, le temps de désoxygénation sera long et le temps d'oxygénation sera court. En fin de culture, lorsque la biomasse est importante, le temps d'oxygénation sera long et le temps de désoxygénation sera court. Pour un même temps de coupure de l'aération, le stress induit sur la biomasse sera plus élevé si la celle-ci est importante.

On entend par temps d'équilibre physique le temps nécessaire pour que l'oxygène injecté dans le milieu se dissolve.



**Figure 39** : schéma des temps à prendre en considération pour connaître le temps de passage d'un état très riche en oxygène à un état pauvre sans oxygène.

### III.2.2 Temps de réponse de la sonde à oxygène.

#### Méthode :

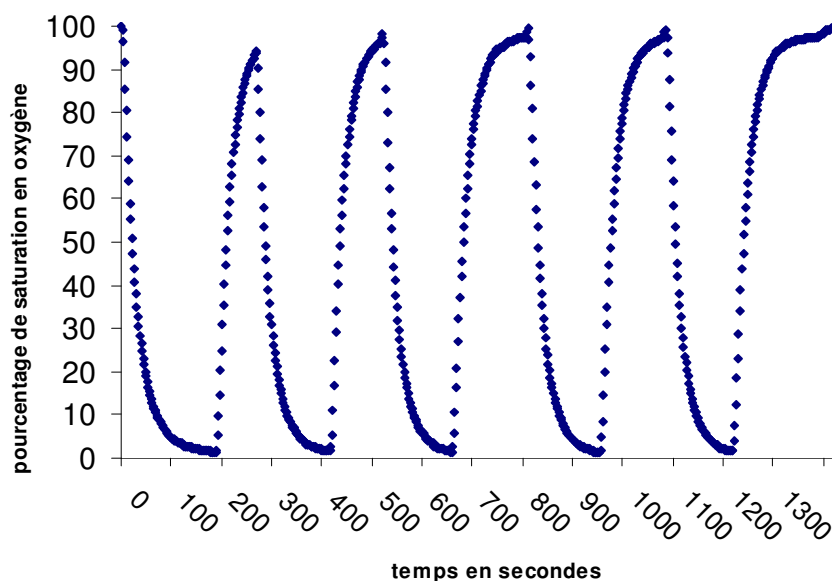
N. D. P. Dang et al. 1977 proposent de définir le temps de réponse d'une sonde à oxygène comme le temps nécessaire pour qu'elle indique 63,2% de saturation en oxygène lors du

passage instantané d'une solution anaérobie à une solution saturée en oxygène dans des conditions où la turbulence de la solution est élevée.

Pour connaître ce temps, la sonde à oxygène inPro 6800 Mettler Toledo a été placée de façon alternée dans une solution saturée en oxygène et une solution sans oxygène dissous. La solution saturée en oxygène a été obtenue en aérant fortement une fiole remplie d'eau. Dans une autre fiole, la solution sans oxygène dissous contenait 10g/l de sulfite de sodium. La solution était agitée par une puce magnétique pour créer de la turbulence et favoriser la consommation de l'oxygène par le sulfite. Le passage de la sonde d'une fiole à l'autre a été effectué manuellement de façon rapide.

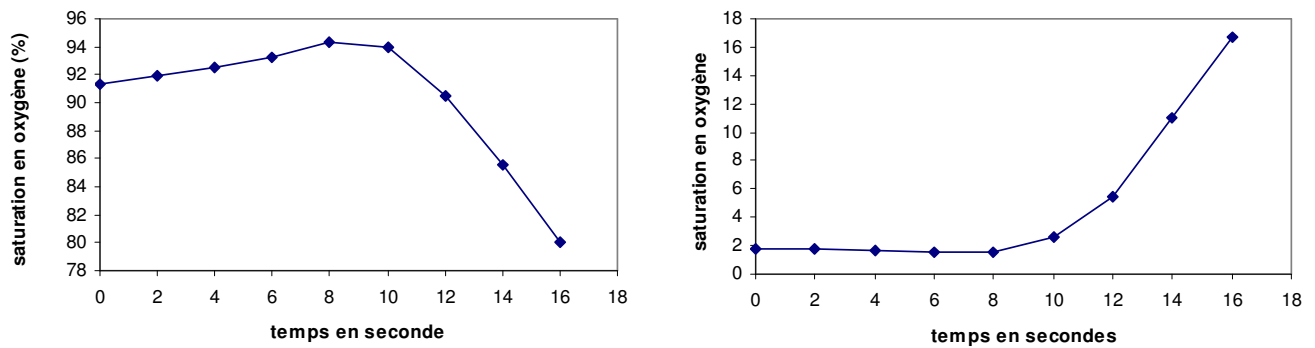
## Résultats

Le temps de réponse de la sonde, temps d'affichage de 63,2 % en partant de 0% de saturation en oxygène à été de 63 secondes. Plusieurs répétitions effectuées ont donné le même résultat (figure 40). On remarque que le temps que met la sonde pour détecter l'augmentation de la concentration en oxygène est le même que celui qu'elle met pour détecter une diminution de la concentration en oxygène. Ce temps de réponse est élevé relativement aux temps d'ouverture et de fermeture de l'aération que nous avons mis en œuvre et n'est donc pas négligeable. Le temps de passage d'un état bien oxygéné à un état sans oxygène est plus faible que ce que pourrait laisser croire les enregistrements de la sonde.



**Figure 40** : mesures enregistrées par la sonde lors du test visant à connaître son temps de réponse.

En plus du temps de réponse de la sonde, on peut s'intéresser à son temps de détection d'une augmentation ou d'une diminution de la concentration en oxygène. Si l'on observe la réponse de la sonde au moment du passage du milieu saturé en oxygène au milieu sans oxygène dissous, on constate que la valeur affichée par la sonde diminue dans les 2 secondes qui suivent ce passage. Si l'on considère que le passage manuel d'une solution à l'autre a pris une demie seconde, on peut en déduire que le temps de réaction de la sonde a été au maximum de 1,5 seconde. La même déduction peut être faite si l'on observe le moment de passage de la sonde du milieu sans oxygène au milieu saturé en oxygène.



**Figure 41** : mesures enregistrées par la sonde lors du test visant à connaître son temps de réponse. Le moment du changement de solution a lieu entre 8 et 10 secondes.

### III.2.3 Etude des fluctuations en oxygène dissous provoquées par l'aération séquentielle.

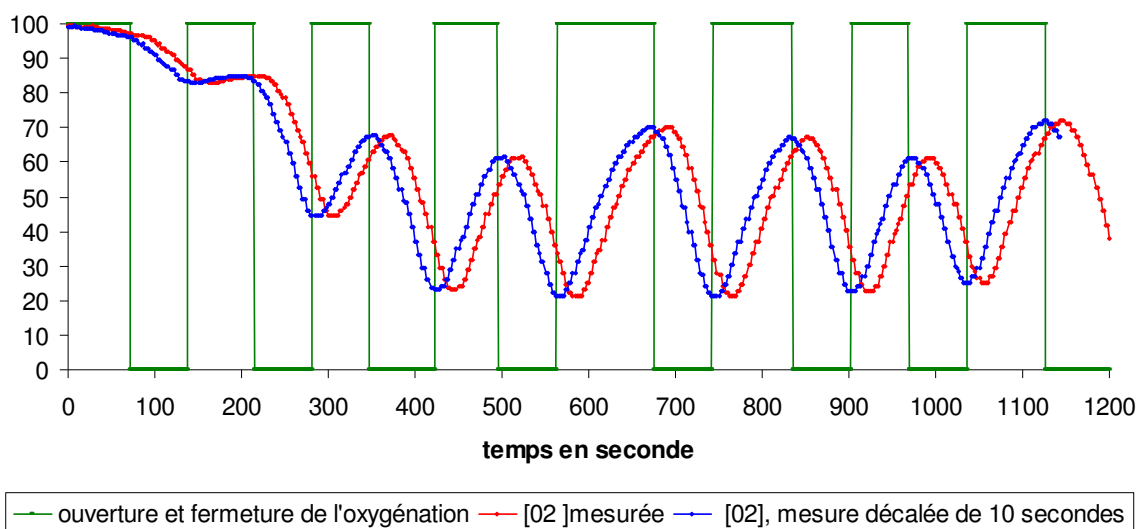
Afin de créer dans le fermenteur des variations de concentrations d'oxygène représentatives des conditions réelles à l'aide de la vanne d'injection d'oxygène, nous avons effectué des essais préliminaires pour connaître l'ordre de grandeur des temps d'oxygénation et de coupure de l'oxygénation à appliquer. Pour ces essais la consommation d'oxygène de la

culture en fermenteur a été simulée par ajout de sulfite à dose constante. Le sulfite réagit avec l'oxygène pour former du sulfate ce qui fait diminuer la concentration d'oxygène dans le milieu du fermenteur.

Dans les premiers essais nous n'avons obtenu que de faibles variations de concentrations en oxygène soit à cause d'une trop forte consommation de l'oxygène par le sulfite, soit à cause de temps de coupure et d'ouverture de l'oxygénation trop faibles. L'ajustement de ces deux paramètres a permis de créer dans le fermenteur les variations de concentration d'oxygène que nous désirions.

Pour un ajout de 0,9 g de sulfite de sodium par minute, des temps de coupure et de reprise de l'aération de l'ordre de 100 secondes provoquent de fortes variations de la concentration en oxygène. Ce laps de temps permet des variations du pourcentage de saturation en oxygène de l'ordre de 40 points (Figure 42).

Ces essais ont également servi à estimer d'inertie du système. Sur la figure 42, nous observons qu'en décalant la courbe du pourcentage de saturation en oxygène mesurée (courbe rouge) de 10 secondes (courbe bleu), l'augmentation de la teneur en oxygène mesurée correspond à l'ouverture de l'oxygénation et la diminution correspond à la coupure de l'oxygénation. Nous avons vu précédemment que le temps que met la sonde à oxygène pour détecter une augmentation ou une diminution de la concentration en oxygène est proche de 2 secondes. Nous pouvons en déduire que le temps d'établissement de l'équilibre chimique est de l'ordre de 8 secondes.



**Figure 42 :** représentation de la réponse de la sonde à oxygène et des périodes d'oxygénation et de non oxygénation en fonction du temps.

### **III.3 Utilisation d'un biocapteur pour l'étude des fluctuations en oxygène dissous.**

La souche YPR065W peut servir de biocapteur s'il est possible de mettre en relation une décroissance de sa fluorescence avec un stress lié à un manque d'oxygène.

Afin d'éprouver cette hypothèse, une coupure de l'aération d'un fermenteur a été effectuée et des échantillons ont été prélevés de manière rapprochée dans le temps pendant la décroissance de la concentration en oxygène dissous. La fluorescence de ces échantillons a été analysée et a permis de mettre en évidence une diminution progressive de la fluorescence simultanée à la décroissance de la concentration en oxygène dissous. Ces résultats confirment la possibilité d'utiliser la souche YPR065W comme biocapteur du stress des levures lié à un manque d'oxygène.

#### **III.3.1 Culture de la souche YPR065W de *Saccharomyces cerevisiae***

##### **III.3.1.1 Conditions de culture :**

La culture a été réalisée en suivant les techniques et les conditions de régulation indiquées dans la partie matériels et méthodes. Cependant, des modifications ont été apportées au protocole concernant les précultures et le milieu de culture en fermenteur. En effet, l'inoculum a été porté à 1,1 litre au lieu de 0,5 litre. La deuxième préculture a été faite dans un volume de milieu de 1 litre au lieu de 0,4 litre comme c'est le cas généralement. Le temps de préculture dans cette fiole a été de 24 heures au lieu de 16 heures comme on le fait avec les précultures de 0,4 litre. Le milieu du fermenteur a également été modifié. Son volume total a été porté à 15 litre (1,1 litre d'inoculum et 13,9 litre de milieu). La concentration de glucose du milieu du fermenteur a été portée à 20 g/l au lieu de 10 g/l. Ces modifications avaient pour but :

- d'accroître la biomasse et donc la consommation d'oxygène dans le fermenteur
- d'augmenter le temps de culture qui est limité par le manque de glucose en l'absence de fiole d'ajout.

### III.3.1.2 Croissance de biomasse :

Les modifications du protocole de culture n'ont pas eu les résultats escomptés. En effet, la croissance microbienne a été moins rapide que celle que l'on observe généralement en suivant le protocole classique. Cependant au moment de la coupure de l'aération effectuée après 28,6 heures de fermentation la concentration en biomasse était de 4,4 g/l (figure 43) ce qui a permis une décroissance très rapide de la concentration en oxygène dissous. En effet la  $pO_2$  est passée de 59 % à 3% en 125 secondes. Cinq échantillons ont été pris pendant les 6 minutes qui ont suivi la coupure de l'aération. L'analyse de la fluorescence de ces échantillons a été effectuée.

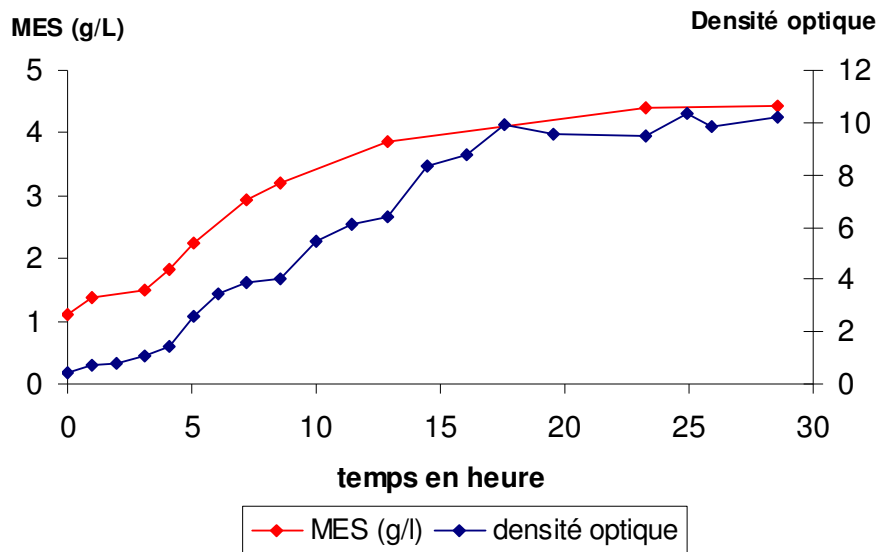


Figure 43 : croissance de la biomasse en fonction du temps de fermentation

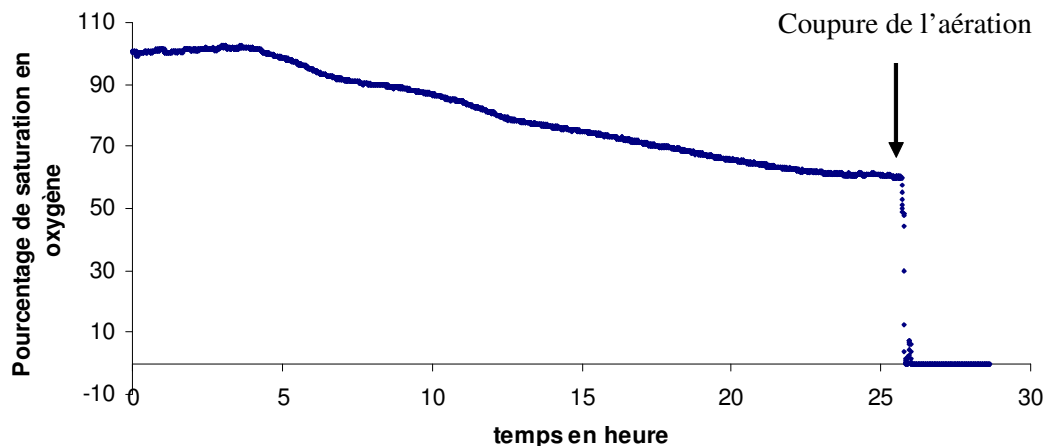


Figure 44 : évolution de la concentration en oxygène dissous en fonction du temps de fermentation.



### III.3.2 Analyse de la fluorescence

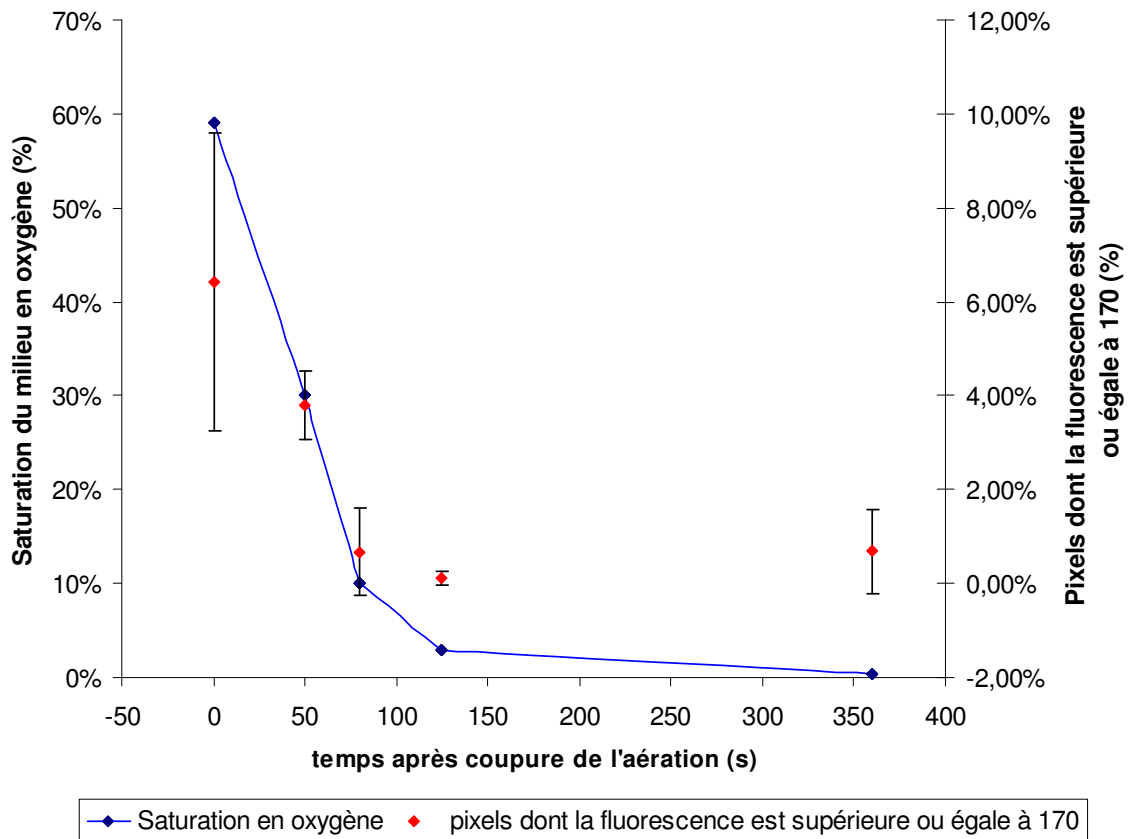
Les échantillons ont été préparés et analysés selon le protocole décrit dans la partie matériels et méthodes. Le seuil de fond a été fixé à une intensité de fluorescence de 80 à l'exception de l'échantillon B pour lequel ce seuil a été fixé à 100. En effet pour cet échantillon le lavage au PBS ayant sans doute été moins performant, l'intensité de vert du fond était plus élevée. Sur les cinq photographies prises pour chaque échantillon certaines ont pu être éliminées pour trois raisons :

- photographie trop floue
- nombre trop faible de cellules
- présence d'un amas de pixels ayant une grande intensité de vert qui rend la photographie non représentative de la fluorescence de l'échantillon

Les résultats obtenus sont présentés tableau 2. On observe une décroissance rapide et significative du pourcentage de pixel dont l'intensité de vert est supérieure à 170. Cette décroissance est due à l'arrêt de l'expression du gène ROX1 et donc l'arrêt de la synthèse de GFP qui a pour conséquence une décroissance de la fluorescence de l'échantillon. Cette diminution de la fluorescence est observable dès le premier échantillon pris seulement 50 secondes après la coupure de l'aération. Le pourcentage de pixels supérieur à 170 passe en effet de 6,42% à 3,79% pendant les 50 secondes qui suivent la coupure de l'aération. Ceci montre à quel point le système de régulation de la levure est rapide. Le pourcentage de pixels supérieur à 170 continue à décroître dans les secondes qui suivent et se stabilise autour 0,6%.

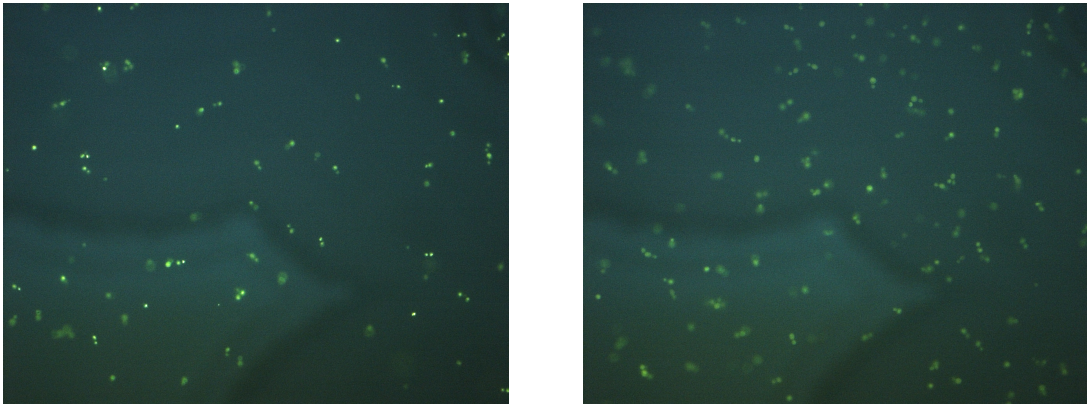
**Tableau 2** : résultats de l'analyse de la fluorescence sur les échantillons pris après coupure de l'aération

échantillon	répétition	P02	temps sans aération (sec)	seuil de fond	% de pixels > ou = à 170	moyenne %	écartype (points)
A	1	59%	0	80	7,32%	6,42%	3,16
A	2	59%	0	80	10,15%		
A	3	59%	0	80	5,63%		
A	4	59%	0	80	2,59%		
B	1	30%	50	100	4,22%	3,79%	0,72
B	2	30%	50	100	2,96%		
B	3	30%	50	100	4,19%		
C	1	10%	80	80	0,00%	0,68%	0,92
C	2	10%	80	80	0,00%		
C	3	10%	80	80	1,01%		
C	4	10%	80	80	0,24%		
C	5	10%	80	80	2,14%		
D	1	3%	125	80	0,10%	0,10%	0,15
D	2	3%	125	80	0,32%		
D	3	3%	125	80	0,00%		
D	4	3%	125	80	0,00%		
E	1	0%	360	80	0	0,70%	0,89
E	2	0%	360	80	1,70%		
E	3	0%	360	80	0,39%		



**Figure 45 :** évolution de la saturation en oxygène et de la fluorescence en fonction du temps après coupure de l'aération.

La figure 46 présente une photographie effectuée sur l'échantillon pris au moment de la coupure de l'oxygénation et une photographie effectuée sur l'échantillon pris 6 minutes après la coupure de l'aération. La décroissance de la fluorescence est observable à l'œil nu.

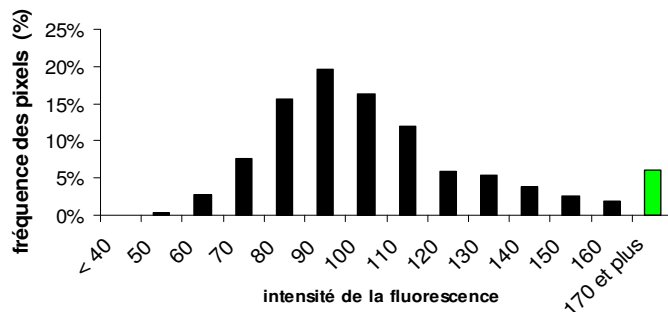


**Figure 46 :** photographies prises avec la caméra digitale du microscope à fluorescence. A gauche échantillon pris au moment de la coupure de l'aération, à droite échantillon pris 6 minutes après la coupure de l'aération.

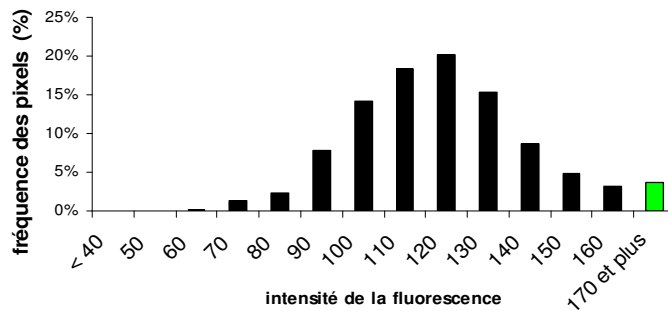
Si l'on observe la distribution des pixels selon leur classe d'intensité on constate que cette distribution est sensiblement égale pour les échantillons A, C, D, E. Par contre pour l'échantillon B la distribution est différente, les pixels ont des intensités de vert plus élevées. Le seuil de fond pour l'échantillon B a été fixé à 100 au lieu de 80 pour les autres échantillons. Cette modification a dû avoir pour conséquence la « perte » de pixels appartenant aux cellules et dont l'intensité de vert se trouvait entre 80 et 100.

L'analyse de la distribution de l'ensemble des pixels montre l'importance du choix du seuil de fond et confirme le choix des intensités de vert supérieures à 170 comme indicateur de l'absence de stress lié à un manque d'oxygène.

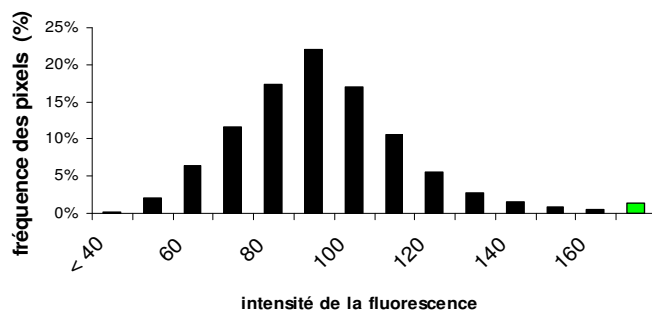
Echantillon A,  
pris au moment de la coupure de  
l'aération



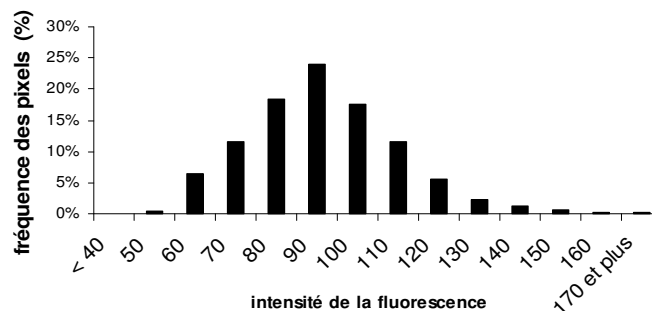
Echantillon B,  
50s sans aération



Echantillon C,  
80s sans aération



Echantillon D,  
125s sans aération



Echantillon E,  
360s sans aération

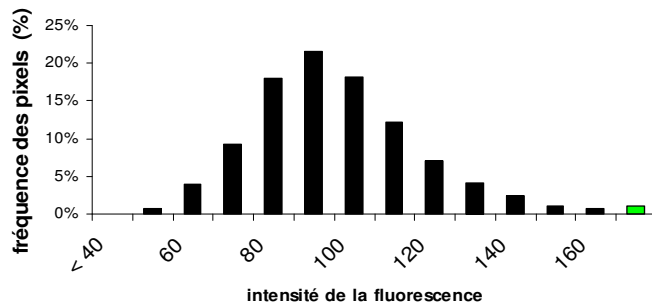


Figure 47 : distribution des pixels par classe d'intensité pour les 5 échantillons pris après coupure de l'aération

### **III.4 Utilisation du réacteur scale down et du biocapteur**

#### **III.4.1 Condition de culture :**

La culture s'est effectuée selon le protocole expliqué dans la partie matériel et méthodes. Une fiole d'ajout avait été préparée et l'alimentation à partir de cette fiole a commencé trois heures après l'inoculation. A cause d'un problème technique, la régulation de la température s'est arrêtée pendant 8 heures et la température, qui devait être maintenue à 30°C est descendue à 18.9°C.

#### **III.4.2 Croissance microbienne :**

Au moment de l'inoculation, la biomasse, estimée par la matière sèche, était de 1,1 g/l. Une phase de faible croissance a duré deux heures. Pendant cette période la matière sèche n'a augmenté que de 30% par heure et la concentration de glucose est passée de 6,7 g/l à 5,8 g/l. Le milieu est resté saturé en oxygène.

Entre la seconde et la septième heure après inoculation la culture est passée dans une phase croissance exponentielle. Pendant les deux premières heures de cette phase la densité optique a quasi triplée, pendant les deux heures suivantes la densité optique a été multipliée par 5,3. Deux autres paramètres permettent d'affirmer que cette période correspond à une phase de croissance exponentielle. Il s'agit de la diminution du pourcentage de saturation en oxygène et de la concentration en glucose qui se sont effectuées de manières plus que proportionnelles par rapport au temps. La fin de la phase de croissance exponentielle correspond avec la consommation totale du glucose qui était présent initialement dans le milieu de culture. La matière sèche était alors de 3,4 g/l. Par la suite la biomasse a augmenté de façon plus modérée.

Pendant la période où la température est passée à 18.9 ° C la croissance de la population de levure a continué sur le même rythme modéré. On observe cependant que la pression partielle en oxygène a fortement augmenté durant cette période ce qui révèle un ralentissement de l'activité microbienne. Ce ralentissement de l'activité a eu aussi pour

conséquence l'augmentation de la concentration en glucose qui est passée de 0 à 1,46 g/l. La consommation de glucose sur la période a été moins importante que l'ajout.

Lors de la reprise de la régulation de température à 30°C, la population a repris une activité importante, consommant le glucose accumulé pendant la période précédente. Cette reprise d'activité microbienne a également eu pour conséquence la diminution de la concentration en oxygène dissous qui s'est effectuée dès que le milieu du fermenteur est revenu à une température de 30°C. Après 33,5 heures de culture en fermenteur, la biomasse était de 10,1 g/l. Le temps de génération de la levure sur la durée du fermenteur a donc été de 10,6 heures (Figure 48).

### **III.4.3 Variation de la concentration en oxygène induite par les coupures de l'aération :**

La mise en place des coupures de l'aération a été effectuée à partir de la 3<sup>ème</sup> heure de culture en fermenteur. On peut distinguer trois périodes différentes en ce qui concerne les variations des concentrations en oxygène induites par les coupures de l'aération :

- Période d'augmentation des variations :

Cette période se déroule pendant les 7 heures qui ont suivi le commencement des coupures de l'aération. Les diminutions de la concentration en oxygène pendant les périodes non aérées sont de plus en plus marquées. Pendant les périodes aérées l'augmentation de la concentration en oxygène est elle aussi de plus en plus marquée. Cela s'explique car le transfert d'oxygène est plus facile car le milieu est moins riche en oxygène. Il résulte de ces deux phénomènes des variations des concentrations en oxygène croissantes.

Le temps de coupure de l'aération plus long qui selon notre modélisation au passage des micro-organisme dans la zone des agitateurs provoque durant cette période des variations de concentration beaucoup plus importantes que le temps de coupure de l'aération qui correspond, toujours selon notre modélisation, au passage des micro-organismes entre les raquettes de diffuseurs. Cependant cet écart, si l'on considère les valeurs relatives, s'atténue au cours du temps. En effet, initialement les coupures de 137 secondes de

l'aération ont provoqué une diminution du pourcentage de saturation en oxygène de 10 points et les coupures de 91 secondes ont provoqué une diminution de 5 points. En fin de période les coupures longues de l'aération ont provoqué une diminution du pourcentage de saturation en oxygène de 40 points alors que les coupures courtes ont provoqué une diminution de 30 points.

Globalement sur la période la concentration en oxygène du milieu a diminuée. En effet, les pourcentages maximaux atteints étaient de 95% en début de période alors qu'en fin de période le pourcentage de saturation en oxygène maximal atteint est de 45%.

- Période de faibles variations pendant la période à 18,9°C

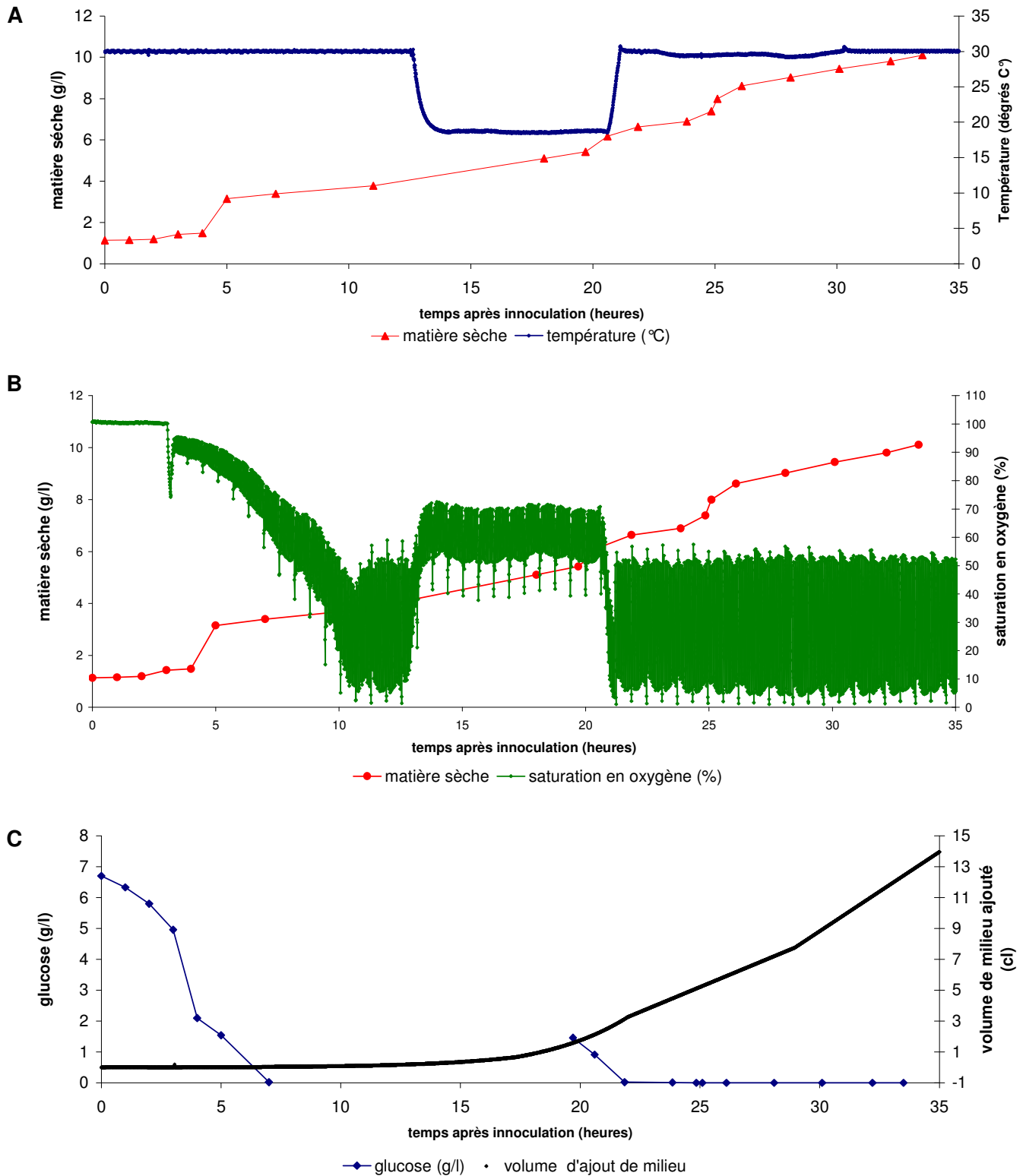
Pendant les huit heures d'arrêt de la régulation de température, qui a commencé après 12 heures de culture, le pourcentage de saturation en oxygène a augmenté. Il avait une valeur moyenne de 63 % et les pourcentages maximaux atteints étaient de 70%. Ceci est la conséquence d'une baisse de l'activité microbienne. Les coupures longues de l'aération ont provoqués une diminution du pourcentage de saturation en oxygène de 30 points. Pour les coupures courtes, cette diminution a été de 20 points.

- Période de variations importantes :

Dès le rétablissement de la régulation de la température à 30°C, après 21 heures de cultures le pourcentage de saturation en oxygène a baissé. Il présentait une valeur moyenne de 30%, les pourcentages maximaux atteints étaient de 53%. Les pourcentages minimaux, atteints après les coupures longues de l'aération étaient de 1 %. Les coupures courtes quant à elle ont provoqué des chutes légèrement moins importantes du pourcentage de saturation en oxygène qui ont atteints des valeurs minimales de 5%.

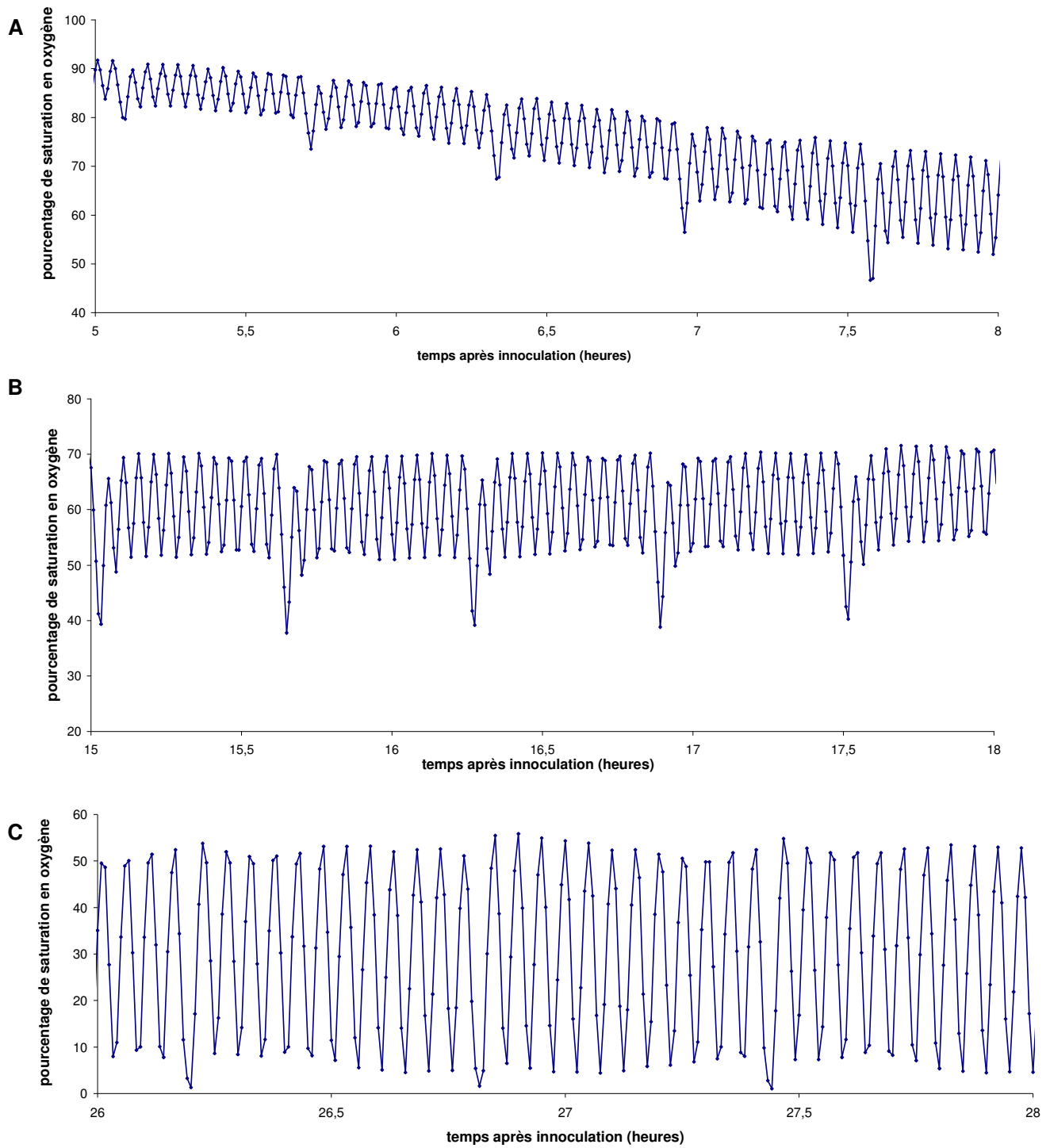
L'amplitude des variations est donc sur la période de l'ordre de 50 points.

Le réacteur scale-down mis au point permet donc, une fois que la culture est suffisamment développée, de reproduire les fluctuations en oxygène dissous que nous avons modélisées. L'aération permet le passage à l'état riche en oxygène et lors des coupures de l'aération la consommation importante de l'oxygène par la culture permet un passage rapide à un état très pauvre en oxygène.



**Figure 48** : évolution des paramètres caractérisant la culture de la culture de YPR065W dans le réacteur scale down. Graphique A, évolution de la matière sèche et de la température en fonction du temps, **graphique B**, évolution de la matière sèche et du pourcentage de saturation en oxygène en fonction du temps, graphique C évolution de la concentration du milieu en glucose et du volume de milieu ajouté.





**Figure 49** : évolution du pourcentage de saturation en oxygène en fonction du temps.

A : période d'augmentation des variations

B : période de faibles variations pendant la période à 18,9°C

C : période de variations importantes

## ***Conclusion et perspectives:***

Dans les bassins aérés des stations d'épuration, les micro-organismes sont soumis à trois types de fluctuations de concentrations en oxygène dissous :

- le passage contrôlé de zones aérobies à des zones anoxiques servant à la dénitrification et la déphosphatation.
- les fluctuations dues aux variations de la consommation d'oxygène des boues.
- les fluctuations à court terme et non désirées dues à la dispersion non homogène de l'oxygène.

Nous avons étudié ce dernier type de fluctuations. Nous avons modélisé le parcours des microorganismes à travers les gradients d'oxygène comme étant la succession de temps de séjours dans des zones sans oxygène et des zones riches en oxygène. Cependant de cette simplification naît également l'éloignement de notre modèle à la réalité. Nous avons étudié un profil de fluctuation en oxygène pour une profondeur moyenne de passage des microorganismes dans le bassin. Il serait bon d'améliorer la modélisation en intégrant les probabilités de passage à différentes profondeurs. Il faudrait également étudier les deux autres types de fluctuations des concentrations en oxygène.

Pour poursuivre cette étude il serait également judicieux d'augmenter le nombre d'état d'oxygénations possibles dans le modèle. Il faudrait pour reproduire de nombreux états d'oxygénations remplacer la vanne d'injection tout ou rien par une vanne d'injection d'air modulable.

Le réacteur scale down mis au point a permis de reproduire les fluctuations en oxygène modélisées. Cependant il existe des temps d'oxygénation et de désoxygénation du milieu du fermenteur qui ne sont pas négligeables et qui empêchent les essais en fermenteur de reproduire le passage immédiat d'un état d'oxygénation à un autre tel que décrit par le modèle.

La souche YPR065W de *Saccharomyces cerevisiae* dont la fluorescence a décliné en parallèle avec la désoxygénation du milieu s'est avérée être un biocapteur efficace du stress lié à un manque d'oxygène. Ceci confirme qu'utiliser un biocapteur est un choix judicieux pour l'étude des stress environnementaux. Cependant, les floccs bactériens étant constitués de communautés bactériennes très variées et en interactions les unes avec les autres il semble illusoire de trouver un microorganisme dont la réponse aux fluctuations en oxygène soit comparable à celle d'un flocc bactérien de boues activées. Il faudrait donc étudier l'impact des fluctuations en oxygène sur différents microorganismes (bactéries hétérotrophes et bactéries nitrifiantes). Les techniques d'hybridation in situ sur des floccs bactériens permettraient de suivre la dynamique des différentes populations bactériennes et d'appuyer les résultats obtenus sur les microorganismes étudiés séparément.

Les aérateurs et les diffuseurs des bassins aérés de stations d'épuration sont habituellement positionnés de manière à maximiser le coefficient de transfert d'oxygène pour réduire la dépense énergétique. L'opération de mélange est rarement intégrée alors qu'il a été montré dans d'autres processus industriels impliquant des microorganismes qu'elle est une des composantes essentielle du rendement.

## Table des illustrations

<i>Figure 1 : schéma montrant l'emplacement du bassin aéré dans le processus d'épuration.....</i>	<i>8</i>
<i>Figure 2 : photographie de la première partie du chenal d'oxydation de la station d'épuration de Gembloux où les boues recirculées (brun foncées) sont mises en contact avec l'eau usée qui a subi le traitement primaire. ....</i>	<i>8</i>
<i>Figure 3 : photographie d'un floc, les masses noires sont dues à des concentrations élevées de bactéries. On observe un léger développement de bactéries filamenteuses sur le pourtour du floc qui ne vont pas nuire à sa décantation (Spencer Davies P. 2006). ....</i>	<i>9</i>
<i>Figure 4 : principe du flux piston (d'après Degrémont 1989).....</i>	<i>9</i>
<i>Figure 5 : Principe du mélange intégral et photographie d'un bassin (d'après Thonart 2006).....</i>	<i>10</i>
<i>Figure 6 : Schéma du fonctionnement du réacteur biologique séquentiel discontinu et photographie d'un réacteur traitant de l'eau usée domestique, le bassin de gauche était en cours de décantation alors que le bassin de droite était en cours d'aération. Installation située à Busselton en Australie (d'après Third 2003). ....</i>	<i>10</i>
<i>Figure 7 : les bassins à boucle fermées (Poitier 2005).....</i>	<i>11</i>
<i>Figure 8 : Bassin à cascades, EB BR et C correspondent à eau brute, boue recirculée et clarificateur .....</i>	<i>12</i>
<i>Figure 9 : Bassin à alimentation étagée EB BR et C correspondent à eau brute, boue recirculée et clarificateur (d'après Degrémont 1989).....</i>	<i>12</i>
<i>Figure 10 : aérateur de surface a axe vertical a vitesse lente (Thonart 2006).....</i>	<i>13</i>
<i>Figure 11 : aérateur de surface à axe horizontal a vitesse lente (Gillot 2003) .....</i>	<i>13</i>
<i>Figure 12 : aérateur de surface à axe vertical à vitesse rapide (Thonart 2006) .....</i>	<i>13</i>
<i>Figure 13 : photographie de diffuseurs à fines bulles situés au fond d'un bassin à boues activées (Duchène et Cotteux 2002) et d'hélices marines situées à proximité de diffuseurs.....</i>	<i>14</i>
<i>Figure 14 : circulation de l'eau dans le plan vertical (spiral flow), diminuant le temps de passage des bulles (Duchène et Cotteux 2002).....</i>	<i>14</i>
<i>Figure 15 : exemple de résultats obtenus par simulation numérique, panache de bulles et champs de vecteur vitesse dans le plan parallèle aux parois montrant les boucles de circulation (Tanguy 2003).....</i>	<i>17</i>
<i>Figure 16 : Concentration d'oxygène (mg/l) nécessaire en fonction de la teneur en azote ammoniacal présente dans l'influent et dans l'effluent (Yong M. 2006).....</i>	<i>18</i>
<i>Figure 17 : variations de concentration en oxygène au sein d'un floc bactérien de boues activées (Li et Bishop 2004) .....</i>	<i>19</i>
<i>Figure 18 : exemple d'évolution du potentiel rédox (mV en bleu) et de l'oxygène dissous (mg/l en rouge) dissous pendant l'aération dans un bassin à 20°C (Deronzier et al. 2001). ....</i>	<i>20</i>
<i>Figure 19 : schéma du chenal d'aération de la station d'épuration de Gembloux (3326 m<sup>3</sup>, 22000 E.H.) présentant l'évolution des concentrations d'oxygène d'après (Culot M. 2006).....</i>	<i>20</i>
<i>Figure 20 : pollutogramme couramment observé pour les eaux résiduelles urbaines (COD sol, demande biochimique en oxygène soluble, part particulaire, TKN azote méthode Kjeldah (Benedetti L. 2006)) .....</i>	<i>21</i>
<i>Figure 21 : à gauche, effet de la distance en aval d'un aérateur de surface sur la concentration en oxygène dissous mesuré à 10 cm de profondeur (les quatre pics correspondent à l'emplacement des quatre agitateurs de surface) à gauche, effet de la distance en aval et de la profondeur par rapport à un aérateur de surface (Burrows L.J. 2001) .....</i>	<i>23</i>

<i>Figure 22 : à gauche, simulation des iso surfaces de teneur en gaz dans un bassin pilote à boues activées à insufflation d'air. A droite, simulation des Iso surfaces de concentration d'oxygène élevées (3,4 mg/l) en bleu et de concentration d'oxygène faibles (2,9 mg/l) en orange (Cartland Glover G., J. et al. 2006).....</i>	<i>23</i>
<i>Figure 23 : caractérisation de la charge polluante dans les modèles ASM (Benedetti L. 2006).....</i>	<i>25</i>
<i>Figure 24 : Aquorea victoria (source : <a href="http://www.ulb.ac.be/inforsciences">http://www.ulb.ac.be/inforsciences</a>).....</i>	<i>27</i>
<i>Figure 25 : schéma d'un parcours d'un microorganisme au sein d'un bassin aéré.....</i>	<i>27</i>
<i>Figure 26 : représentation schématique des états dans lequel peut se trouver la culture en fermenteur. ....</i>	<i>28</i>
<i>Figure 27 : photographie de l'intérieur du fermenteur, de l'axe et des mobiles d'agitation, des contre pales. ....</i>	<i>29</i>
<i>Figure 28 : photographie de la sonde à oxygène inPro 6800 Mettler Toledo utilisée et schéma de conception d'une sonde à oxygène selon le principe de l'électrode de Clark. ....</i>	<i>32</i>
<i>Figure 29 : principe de la fluorescence (<a href="http://www.ulb.be/infoscience">www.ulb.be/infoscience</a>).....</i>	<i>34</i>
<i>Figure 30 : Spectre d'absorption et de fluorescence de la GFP. Figure 31 :.....</i>	<i>35</i>
<i>Figure 32 : à gauche, photographie de deux cellules de la souche YPR065W de Saccharomyces cerevisiae observées au microscope à fluorescence. Le segment représente la zone analysée sur le graphique présenté à droite. Ce graphique présente l'intensité de la fluorescence dans le vert le long du segment.....</i>	<i>37</i>
<i>Figure 33 : schéma du chenal d'oxydation circulaire étudié par Cocks 2001.....</i>	<i>38</i>
<i>Figure 34 : schéma représentant en 2D la fraction gazeuse et vitesse du liquide (vecteur vitesse) au niveau d'une raquette de diffuseurs.....</i>	<i>38</i>
<i>Figure 35 fraction gazeuse (unités) rencontrées par les floccs bactériens lors du passage au niveau d'une raquette de diffuseurs pour différentes profondeur de passage.....</i>	<i>39</i>
<i>Figure 36 : fraction gazeuse (unités) rencontrées par les floccs bactériens lors du passage au niveau d'une raquette de diffuseurs à 4 m de profondeur. ....</i>	<i>40</i>
<i>Figure 37 : schéma de la succession des temps de séjours dans les zones riches en oxygène et pauvre en oxygène traversées par les floccs bactériens lors d'un tour du chenal.....</i>	<i>41</i>
<i>Figure 38 : schéma montrant l'évolution de l'état dans lequel se trouve la culture en fonction du temps d'ouverture ou de fermeture de la vanne située sur l'arrivée d'air. ....</i>	<i>42</i>
<i>Figure 39 : schéma des temps à prendre en considération pour connaître le temps de passage d'un état très riche en oxygène à un état pauvre sans oxygène.....</i>	<i>43</i>
<i>Figure 40 : mesures enregistrées par la sonde lors du test visant à connaître son temps de réponse.....</i>	<i>45</i>
<i>Figure 41 : mesures enregistrées par la sonde lors du test visant à connaître son temps de réponse. Le moment du changement de solution a lieu entre 8 et 10 secondes.....</i>	<i>45</i>
<i>Figure 42 : représentation de la réponse de la sonde à oxygène et des périodes d'oxygénation et de non oxygénation en fonction du temps. ....</i>	<i>46</i>
<i>Figure 43 : croissance de la biomasse en fonction du temps de fermentation.....</i>	<i>48</i>
<i>Figure 44 : évolution de la concentration en oxygène dissous en fonction du temps de fermentation. ....</i>	<i>48</i>
<i>Figure 45 : évolution de la saturation en oxygène et de la fluorescence en fonction du temps après coupure de l'aération.....</i>	<i>50</i>
<i>Figure 46 : photographies prises avec la caméra digitale du microscope à fluorescence. A gauche échantillon pris au moment de la coupure de l'aération, à droite échantillon pris 6 minutes après la coupure de l'aération. ....</i>	<i>51</i>

*Figure 47 : distribution des pixels par classe d'intensité pour les 5 échantillons pris après coupure de l'aération*  
.....52

*Figure 48 : évolution des paramètres caractérisant la culture de la culture de YPR065W dans le réacteur scale down. Graphique A, évolution de la matière sèche et de la température en fonction du temps, graphique B, évolution de la matière sèche et du pourcentage de saturation en oxygène en fonction du temps, graphique C évolution de la concentration du milieu en glucose et du volume de milieu ajouté.....56*

*Figure 49 : évolution du pourcentage de saturation en oxygène en fonction du temps. ....57*

## Annexes

### Paramètres et équations du modèle ASM. (activated sludge model) (source Benedetti L. 2006)

#### Symbols

$b_{A,NO_x}$ Anoxic endogenous respiration rate of $X_A$ ( $d^{-1}$ )	$\mu_{nb}$ Max. growth rate of $X_{nb}$ ( $d^{-1}$ )
$b_{A,O_2}$ Aerobic endogenous respiration rate of $X_A$ ( $d^{-1}$ )	$\mu_{ns}$ Max. growth rate of $X_{ns}$ ( $d^{-1}$ )
$b_{H,NO_x}$ Anoxic endogenous respiration rate of $X_H$ ( $d^{-1}$ )	$Q_e$ Effluent flow ( $m^3 d^{-1}$ )
$b_{H,O_2}$ Aerobic endogenous respiration rate of $X_H$ ( $d^{-1}$ )	$Q_w$ Sludge waste flow ( $m^3 d^{-1}$ )
$b_{nb,NO_3}$ Aerobic endogenous respiration rate of $X_{nb}$ ( $d^{-1}$ )	$S_{ALK}$ Alkalinity ( $mol HCO_3^- m^{-3}$ )
$b_{nb,O_2}$ Aerobic endogenous respiration rate of $X_{nb}$ ( $d^{-1}$ )	$S_I$ Soluble inert organics ( $g COD m^{-3}$ )
$b_{ns,NO_2}$ Aerobic endogenous respiration rate of $X_{ns}$ ( $d^{-1}$ )	$S_{N_2}^{sat}$ Saturation concentration of dinitrogen in water ( $g N m^{-3}$ )
$b_{ns,O_2}$ Aerobic endogenous respiration rate of $X_{ns}$ ( $d^{-1}$ )	$S_{N_2g}$ Dinitrogen released by denitrification ( $g N m^{-3}$ )
$b_{STO,NO_x}$ Anoxic respiration rate of $X_{STO}$ ( $d^{-1}$ )	$S_{NH_4}$ Ammonium ( $g N m^{-3}$ )
$b_{STO,O_2}$ Aerobic respiration rate of $X_{STO}$ ( $d^{-1}$ )	$S_{NO_x}$ Total oxidized nitrogen in the ASM3 model ( $g N m^{-3}$ )
$BOD_{5,e}$ Biochemical Oxygen Demand in the effluent ( $g O_2 m^{-3}$ )	$S_{NO_2}$ Nitrite nitrogen ( $g N m^{-3}$ )
$COD_e$ Chemical Oxygen Demand in the effluent ( $g O_2 m^{-3}$ )	$S_{NO_3}$ Nitrate nitrogen ( $g N m^{-3}$ )
$EQ$ Effluent quality ( $kg d^{-1}$ )	$S_{O_2}$ Dissolved oxygen ( $g O_2 m^{-3}$ )
$f_{S_i}$ Production of $S_i$ in hydrolysis ( $g COD_{S_i} g COD_{X_s}^{-1}$ )	$S_S$ Readily biodegradable substrates ( $g COD m^{-3}$ )
$f_{X_i}$ Production of $X_i$ in endogenous respiration ( $g COD_{X_i} g COD_{X_{sm}}^{-1}$ )	$T_c$ Total cost
$\eta_{NO_x}$ Anoxic reduction factor (-)	$TKN_e$ Total Kjeldhal Nitrogen in the effluent ( $g N m^{-3}$ )
$K_{A,ALK}$ Saturation constant for alkalinity for autotrophs ( $mol HCO_3^- m^{-3}$ )	$TSS_e$ Total Suspended Solids in the effluent ( $kg d^{-1}$ )
$K_{ALK}$ Saturation constant for alkalinity for $X_H$ ( $mol HCO_3^- m^{-3}$ )	$V_x$ Amount of discharge in excess of the output limit
$K_{A,NH_4}$ Saturation constant for $S_{NH_4}$ for autotrophs ( $g N m^{-3}$ )	$X_H$ Heterotrophic biomass ( $g COD m^{-3}$ )
$K_{A,NO_x}$ Saturation constant for $S_{NO_x}$ for autotrophs ( $g NO_3^- N m^{-3}$ )	$X_I$ Inert particulate organics ( $g COD m^{-3}$ )
$K_{A,O_2}$ Saturation constant for $S_{O_2}$ for autotrophs ( $g O_2 m^{-3}$ )	$X_{nb}$ Nitrite-oxidizing autotrophs ( $g COD m^{-3}$ )
$K_{I,NH_4}$ Ammonia inhibition of nitrite oxidation ( $g NH_4^- N m^{-3}$ )	$X_{ns}$ Ammonia-oxidizing autotrophs ( $g COD m^{-3}$ )
$k_H$ Hydrolysis rate constant ( $g COD_{X_s} g COD_{X_H}^{-1} d^{-1}$ )	$X_S$ Slowly biodegradable substrates ( $g COD m^{-3}$ )
$K_{L,a}$ Oxygen mass transfer coefficient ( $h^{-1}$ )	$X_{STO}$ Organics stored by heterotrophs ( $g COD m^{-3}$ )
$K_{NH_4}$ Saturation constant for $S_{NH_4}$ ( $g N m^{-3}$ )	$Y_A$ Aerobic yield of $X_A$ ( $g COD_{X_A} g N_{NO_x}^{-1}$ )
$K_{NO_2}$ Saturation constant for $S_{NO_2}$ of $X_{ns}$ ( $g NO_2^- N m^{-3}$ )	$Y_{H,NO_x}$ Anoxic yield of heterotrophic biomass ( $g COD_{X_H} g COD_{X_{STO}}^{-1}$ )
$K_{NO_3}$ Saturation constant for $S_{NO_3}$ of $X_{nb}$ ( $g NO_3^- N m^{-3}$ )	$Y_{H,O_2}$ Aerobic yield of heterotrophic biomass ( $g COD_{X_H} g COD_{X_{STO}}^{-1}$ )
$K_{NO_x}$ Saturation constant for $S_{NO_x}$ ( $g NO_3^- N m^{-3}$ )	$Y_{nb}$ Aerobic yield of $X_{nb}$ ( $g COD_{X_{nb}} g N_{NO_3}^{-1}$ )
$K_{O_2}$ Saturation constant for $S_{O_2}$ ( $g O_2 m^{-3}$ )	$Y_{ns}$ Aerobic yield of $X_{ns}$ ( $g COD_{X_{ns}} g N_{NO_2}^{-1}$ )
$K_S$ Saturation constant for $S_S$ ( $g COD_S m^{-3}$ )	$Y_{STO,O_2}$ Aerobic yield of stored product for $S_S$ ( $g COD_{X_{STO}} g COD_S^{-1}$ )
$K_{STO}$ Saturation constant for $X_{STO}$ ( $g COD_{X_{STO}} g COD_{X_H}^{-1}$ )	$Y_{STO,NO_x}$ Anoxic yield of stored product for $S_S$ ( $g COD_{X_{STO}} g COD_S^{-1}$ )
$k_{STO}$ Storage rate constant ( $g COD_{X_S} g COD_{X_H}^{-1} d^{-1}$ )	$\Delta V$ Volume increase with respect to the benchmark sizing
$K_X$ Hydrolysis saturation constant ( $g COD_{X_S} g COD_{X_H}^{-1}$ )	$\alpha$ Weighting coefficient in cost functional $T_c$
$\mu_A$ Autotrophic max. growth rate of $X_A$ ( $d^{-1}$ )	<b>Abbreviations</b>
$\mu_H$ Heterotrophic max. growth rate of $X_H$ ( $d^{-1}$ )	ASM Activated sludge model published by IWA
	ASM3_2N Present modification of the ASM3 IWA model
	WWTP Wastewater treatment plant

j	Process	Process rate equation $\rho_j$
1	Hydrolysis	$k_H \frac{X_S/X_H}{K_X + (X_S/X_H)} X_H$
<i>Heterotrophic organisms, aerobic and denitrifying activity</i>		
2	Aerobic storage of $S_S$	$k_{STO} \frac{S_{O_2}}{K_{O_2} + S_{O_2}} \frac{S_S}{K_S + S_S} X_H$
3	Anoxic storage of $S_S$	$k_{STO} \eta_{NO_x} \frac{K_{O_2}}{K_{O_2} + S_{O_2}} \frac{S_{NO_2} + S_{NO_3}}{K_{NO_x} + S_{NO_2} + S_{NO_3}} \frac{S_S}{K_S + S_S} X_H$
4	Aerobic growth	$\mu_H \frac{S_{O_2}}{K_{O_2} + S_{O_2}} \frac{S_{NH_4}}{K_{NH_4} + S_{NH_4}} \frac{S_{ALK}}{K_{ALK} + S_{ALK}} \frac{X_{STO}/X_H}{K_{STO} + (X_{STO}/X_H)} X_H$
5	Anoxic growth on nitrite (denitrification on $S_{NO_2}$ )	$\mu_H \eta_{NO_x} \frac{K_{O_2}}{K_{O_2} + S_{O_2}} \frac{S_{NO_2}}{K_{NO_2} + S_{NO_2}} \frac{S_{NH_4}}{K_{NH_4} + S_{NH_4}} \frac{S_{ALK}}{K_{ALK} + S_{ALK}} \frac{X_{STO}/X_H}{K_{STO} + (X_{STO}/X_H)} X_H$
6	Anoxic growth on nitrate (denitrification on $S_{NO_3}$ )	$\mu_H \eta_{NO_x} \frac{K_{O_2}}{K_{O_2} + S_{O_2}} \frac{S_{NO_3}}{K_{NO_3} + S_{NO_3}} \frac{S_{NH_4}}{K_{NH_4} + S_{NH_4}} \frac{S_{ALK}}{K_{ALK} + S_{ALK}} \frac{X_{STO}/X_H}{K_{STO} + (X_{STO}/X_H)} X_H$
7	Aerobic endogenous respiration	$b_{H,O_2} \frac{S_{O_2}}{K_{O_2} + S_{O_2}} X_H$
8	Anoxic endogenous respiration	$b_{H,NO_x} \frac{K_{O_2}}{K_{O_2} + S_{O_2}} \frac{S_{NO_2} + S_{NO_3}}{K_{NO_x} + S_{NO_2} + S_{NO_3}} X_H$
9	Aerobic respiration of $X_{STO}$	$b_{STO,O_2} \frac{S_{O_2}}{K_{O_2} + S_{O_2}} X_{STO}$
10	Anoxic respiration of $X_{STO}$	$b_{H,NO_x} \frac{K_{O_2}}{K_{O_2} + S_{O_2}} \frac{S_{NO_2} + S_{NO_3}}{K_{NO_x} + S_{NO_2} + S_{NO_3}} X_{STO}$
<i>Autotrophic organisms, nitrifying activity</i>		
11	Aerobic growth of $X_{ns}$	$\mu_{ns} \frac{S_{O_2}}{K_{A,O_2} + S_{O_2}} \frac{S_{NH_4}}{K_{A,NH_4} + S_{NH_4}} \frac{S_{ALK}}{K_{A,ALK} + S_{ALK}} X_{ns}$
12	Aerobic growth of $X_{nb}$	$\mu_{nb} \frac{S_{O_2}}{K_{A,O_2} + S_{O_2}} \frac{K_{I,NH_4}}{K_{I,NH_4} + S_{NH_4}} \frac{S_{ALK}}{K_{A,ALK} + S_{ALK}} \frac{S_{NO_2}}{K_{NO_2} + S_{NO_2}} X_{nb}$
13	Aerobic endogenous respiration of $X_{ns}$	$b_{ns,O_2} \frac{S_{O_2}}{K_{A,O_2} + S_{O_2}} X_{ns}$
14	Aerobic endogenous respiration of $X_{nb}$	$b_{nb,O_2} \frac{S_{O_2}}{K_{A,O_2} + S_{O_2}} X_{nb}$
15	Anoxic endogenous respiration of $X_{ns}$	$b_{ns,NO_2} \frac{K_{A,O_2}}{K_{A,O_2} + S_{O_2}} \frac{S_{NO_2}}{K_{NO_2} + S_{NO_2}} X_{ns}$
16	Anoxic endogenous respiration of $X_{nb}$	$b_{nb,NO_3} \frac{K_{A,O_2}}{K_{A,O_2} + S_{O_2}} \frac{S_{NO_3}}{K_{NO_3} + S_{NO_3}} X_{nb}$



## **Bibliographie:**

Abbassi B., Dullstein S., Rabiger N. 1999. Minimization of excess sludge production by increase of oxygen concentration in activated sludge flocs; experimental and theoretical approach. *Wat res.* Vol. 34, No. 1, pp. 139-146.

Benedetti L. 2006. Probabilistic design and upgrade of wastewater treatment plants in the EU Water Framework Directive context. PhD thesis, Ghent University, Belgium, pp. 304.

Burrows LJ, West JR, Forster CF, Martin A, 2001. Mixing studies in an orbital activated sludge system, *Water SA* Vol. 27 No. 1 January 2001 pp79-83. ISSN 0378-4738.

Cockx A., Do-Quang Z., Audic J.M., Liné A., Roustan M. 2001, Global and local mass transfer coefficients process by computational fluid dynamics *Chemical Engineering and Processing* 40 (2001) 187-194.

Culot M. 2006. Principes de base de l'épuration des eaux. Cours de la Faculté des Sciences Agronomiques de Gembloux.

Degremont 1989. *Mémento technique de l'eau*, 1460 p.

Delvigne F. 2006. L'analyse d'image est une solution performante pour la caractérisation des populations microbiennes. Thèse annexe à la thèse de doctorat 21p.

Deronzier G., Schétrite S., Racault Y, J.P Canler, Duchène P. 2001 *Traitement de l'azote dans les stations d'épuration biologiques des petites collectivités*, ministère de l'agriculture et de la pêche, FNDAE n° 25, 79p.

Duchène P., Cotteux E., 2002 *Insufflation d'air fines bulles, application aux stations d'épuration en boues activées des petites collectivités*, ministère de l'agriculture et de la pêche, FNDAE n° 26, 54p.

Daniel F. McGinnis, John C. Little. 2002. Predicting diffused-bubble oxygen transfer rate using the discrete-bubble model. *Water Research* 36 (2002) 4627-4635.

Deckert J, Toresse R., Simon J., Zitomer R., 1995. Mutational Analysis of Rox1, a DNA-Bending Repressor of Hypoxic Genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and Cellular Biology* p 6109-6117. Vol. 15, No.11.

Edeline 1993. L'épuration biologique des eaux, théorie et technologie des réacteurs 4<sup>ème</sup> édition revue et complétée, coéditions Cebedoc Liège et Lavoisier TEC et DOC Paris, 303p.

Fluent News 2006 Activated sludge basins get on track.

Fluent News 2005 Wastewater treatment get an oxygen boost.

Gillot S., Capela-Maesal S., Roustan M., Héduit A. 2005. Predicting oxygen transfer of fine bubble diffused aeration systems- model issued from dimensional analysis. *Water research* 39 (2005) 1379-1387.

Gillot S. 2003. Mesure du coefficient de transfert d'oxygène (kla) en stations d'épuration à boues activées, présentation PowerPoint du Cemagref 47p.

Hasanen A. Orivuori P. Aittamaa J 2006. Measurement of local bubble size distribution from various flexible membrane diffusers. *Chemical Engineering and Processin* 45 (2006) 291-302.

Henze, M., Grady, C.P.L. Jr, Gujer, W., Marais, G.v.R. and Matsuo, T. (1987). *Activated Sludge Model No. 1*. Scientific and Technical Report No.1, IAWPRC, London.

Jeppsson U. 1996. Modelling aspects of wastewater treatment processes. Ph.D. thesis: Department of Industrial Electrical Engineering and Automation, Lund Institute of Technology, Sweden. pp. 428.

Keng T. 1992. HAP1 and ROX1 From a Regulatory Pathway in the Repression of HEM13 Transcription in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and Cellular Biology*, p 2616-2623 Vol.12,No, 6

Li Baikun, Bishop 2004. Micro-profiles of activated sludge floc determined using microelectrodes, *Water Research* 38 (2004) 1248-1258.

Minhee L. Schladow G. 2000. Visualization of oxygen concentration in water bodies using a fluorescence technique. *Wat. Res.* Vol. 34. No. 10, pp 2842-2845, 2000.

Potier O., Leclerc J-P., Pons M-N., 2005. Influence of geometrical and operational parameters on axial dispersion in an aerated channel reactor. *Water research* 39 (2005) 4454-4462.

Roger Y. Tsien 1998. The green fluorescent protein *Annu. Rev. Biochem.* 1998. 67:509-44

Roustan M. (coordonnateur) 2003. Transfert gaz-liquide dans les procédés de traitement des eaux et des effluents gazeux. Collection génie des procédés de l'environnement sous la direction de Pierre Le Cloirec. ISBN : 2-7430-0605-6, 797p.

Spencer Davies P. 2006. *The biological basis of wastewater treatment*, 20p.

Tanguy P. 2003. Simulation de l'hydrodynamique des réacteurs biologiques à culture libre. Mémoire réalisé et présenté pour l'obtention du diplôme d'ingénieur des travaux ruraux de l'ENGEES, le DEA « Mécanique et Ingénieries », option « sciences de l'eau » 77p.

Third K. 2003. Oxygen management for optimisation of nitrogen removal in Sequencing Batch Reactor these de doctorat présentée pour obtenir le grade de docteur en biotechnologies, School of biological Sciences and biotechnology, Murdoch University, Western Australia, 225p.

Thonart P. 2006. Processus fondamentaux de l'épuration physico-chimique, cours de Faculté des Science Agronomique de Gembloux.

Vandevenne et Henry 2006. Le cycle du carbone de l'azote et du phosphore en station d'épuration CEBEDEAU, présentation effectuée par L. Vandevenne le 26 Octobre 2006 à l'Aquapole, Liège (Belgique).

Wilén B. M., Balmer P. 1999. The effect of dissolved oxygen concentration on the structure, size and size distribution of activated sludge flocs. *Wat Res.* Vol. 33, No. 2, pp. 391-400.

Burrows L.J., W. J. R., Forster C.F., Martin A. (2001). "Mixing studies in an orbital activated sludge system." *Water SA* **27**(1): 79-84.

Cartland Glover G., V. S., Essemiani K. , M. J., et al. (2006) Predicting the effect of mixing on oxygen transfer and nutrient removal in Activated Sludge Basins. **Volume**, DOI:

Culot M. (2006). "Principes de base de l'épuration des eaux." Cours de la Faculté des Sciences Agronomiques de Gembloux.

Edeline, Ed. (1993). L'épuration biologique des eaux, théories et technologie des réacteurs 4ème édition revue et complétée. Liège Paris.

Lesage N., S. M., Lafforgue C., Cockx A., (2003). "Calibration and application of 1-D Model for oxidation ditches." *Trans IChemE* **81**.

Tanguy P. (2003). "Simulation de l'hydrodynamique des réacteurs biologiques à culture libre, mémoire d'ingénieur." 77.

Yong M., Y.-z. P., Xiao-lian W., Shu-ying W. (2006). "Intelligent control aeration and external carbon addition improving nitrogen removal." *Environmental Modelling and Software* **21**: 821-828.