



Université De Constantine 3
Faculté Des Génie Des Procèdes
Département De Génie De L'environnement

ETUDE DE LA DEGRADATION D'UN REJET D'EAU USEE CONTENANT UN PRODUIT DE L'INDUSTRIE PHARMACEUTIQUE

THÈSE

Présentée pour l'Obtention du
Diplôme de Doctorat Troisième Cycle en Génie de l'Environnement.

Par

SAKHRAOUI Mahfoud

Année Universitaire

2023-2024



Université De Constantine 3
Faculté Des Génie Des Procèdes
Département De Génie De L'environnement

N° de Série :
N° d'Ordre :

ETUDE DE LA DEGRADATION D'UN REJET D'EAU USEE CONTENANT UN PRODUIT DE L'INDUSTRIE PHARMACEUTIQUE

THÈSE

Présentée pour l'Obtention du
Diplôme de Doctorat Troisième Cycle en Génie de l'Environnement.

Par

SAKHRAOUI Mahfoud

Devant le jury Composé de :

Pr. ARRIS Sihem	Présidente	Professeur	Université Salah Boubnider Constantine 03
Pr. KHALFAOUI Amel	Examinatrice	Professeur	Université Salah Boubnider Constantine 03
Dr. ZAMOUCHE-ZERDAZI Rania	Rapporteur	MCA	Université Salah Boubnider Constantine 03
Pr. ZAZOUA Ali	Examineur	Professeur	Université Mohammed Seddiki Ben Yahia, Jijel
Pr. CHEBLI Derradji	Examineur	Professeur	Université Ferhat Abbas, Sétif 01
Pr. BOUGUETTOUCHA Abdallah	Examineur	Professeur	Université Ferhat Abbas, Sétif 01
Pr MENIAI Abdeslam-Hassen	Invité	Professeur	Université Salah Boubnider Constantine 03

Année Universitaire

2023-2024

REMERCIEMENTS

Je souhaite exprimer ma profonde gratitude au Professeur **BENCHEIKH LEHOCINE MOSSAAB**, mon directeur de thèse, pour m'avoir accueilli au sein de son équipe de recherche au laboratoire LIPE et pour avoir initié ce sujet de recherche. Au fil des années, il m'a permis de bénéficier de sa sagesse, de sa rigueur et de son intégrité scientifique. Mes vœux les plus sincères de bonne santé et de bien-être l'accompagnent.

Je tiens également à remercier chaleureusement le **Dr. ZAMOUCHE-ZERDAZI RANIA**, Professeur à l'Université de Constantine 03 et ma Co-directrice de thèse, pour son encadrement précieux tout au long de ce projet. Je lui suis reconnaissant pour ses brillantes intuitions, son amabilité, ses conseils éclairés, son écoute attentive, sa disponibilité constante et les encouragements qu'elle m'a prodigués.

Un remerciement spécial au Professeur **MENIAI ABDESALEM HACEN**, Professeur à l'Université de Constantine 03, pour son soutien précieux et ses efforts en vue de faciliter mon parcours, ainsi que pour l'honneur d'être membre du jury de thèse.

Mes remerciements vont également au Professeur **MARC HERAN** et au Professeur **GEOFFROY LESAGE**, tous deux Professeurs à l'Université de Montpellier 02, pour leur sympathie et leur agréable collaboration, ainsi qu'à toute l'équipe de l'IEM en France, avec laquelle j'ai partagé des moments enrichissants. Je leur exprime ma profonde gratitude.

Je suis également reconnaissant envers tous les membres du jury pour avoir accepté d'évaluer notre travail de thèse et pour leur contribution scientifique ainsi que le temps précieux qu'ils y ont consacré.

Un merci spécial au personnel de la station d'épuration **d'IBN ZIAD** à Constantine pour leur accueil chaleureux et leur disponibilité.

Mes remerciements vont également à tous les membres du laboratoire de recherche LIPE, ainsi qu'à tous les enseignants, chercheurs, ingénieurs et techniciens de la Faculté de Génie des Procédés, sans oublier chaque personne qui, de près ou de loin, a contribué à la réalisation de cette thèse.

Je suis conscient que cette liste n'est pas exhaustive, et je tiens à exprimer ma gratitude envers toutes les personnes qui m'ont soutenu et contribué à cette réalisation. Merci à chacun d'entre vous.

*A mes parents, ma famille
et mes amis.*

TABLE DES MATIERES

	Page
TABLE DES MATIERES	<i>iv</i>
LISTE DES FIGURES	<i>viii</i>
LISTE DES TABLES	<i>xiv</i>
LISTE DES ABREVIATIONS	<i>xvi</i>
RESUMES (Fr, Ang et Ar)	<i>xx</i>
INTRODUCTION GENERALE	1
 CHAPITRE I LES MICROPOLLUANTS ET LE TRAITEMENT BIOLOGIQUE 	
1. LES EAUX USEES	7
1.1. Origine des Eaux Usées	7
1.2. Caractéristiques des Eaux Usées	7
1.3. Les eaux usées de l'industrie pharmaceutiques	8
2. PROCEDES DE TRAITEMENT DES EAUX USEES	9
2.1. Traitement biologique	13
2.1.1. Principe de traitement biologique	14
2.1.2. Les mécanismes biologiques	14
2.1.2.1. La transformation des matières organique	14
2.1.2.2. Les MO résiduelles	15
2.1.2.3. Les transformations d'azote et de phosphore	16
2.1.3. Les configurations des installations	18
2.2. Les STEP face aux antibiotiques	20
2.2.1. Elimination par biodégradation	21
2.2.2. Elimination par sorption sur les boues	21
2.3. Inhibition des procédés à boues activées	21
3. LES PRODUITS PHARMACEUTIQUES ET L'ENVIRONNEMENT	22
3.1. Antibiotiques dans l'environnement et développement de la résistance	23
3.1.1. Développement de résistance et actions pour leur limiter	23
3.1.2. L'impact des antibiotiques	24
3.2. Les antibiotiques de la famille β-lactamines	25
3.2.1. Elaboration de l'Amoxicilline (AMX)	26
3.2.2. Structure et propriétés physico-chimiques d'AMX	26
3.2.3. Propriétés biologique de l'AMX	28
3.2.4. Distribution dans l'organisme et élimination de l'AMX	29
CONCLUSION	30

CHAPITRE II

LES BIOREACTEURS A MEMBRANE

1.	TECHNOLOGIE DES MEMBRANES -----	31
1.1.	Membranes et procédés de séparation -----	31
1.2.	Caractéristiques des membranes -----	33
1.3.	Matériaux membranaires -----	34
1.4.	Géométrie des membranes -----	34
1.5.	Catégories de filtration membranaire -----	35
2.	ORIGINE DU <i>MBR</i> EN TRAITEMENT DES EAUX USEE -----	36
3.	INTERET DU <i>MBR</i> EN TRAITEMENT DES EAUX USEES -----	38
4.	CARACTERISTIQUES DE L'EAU TRAITEE PAR <i>MBR</i> -----	41
4.1.	Principe de la séparation -----	41
4.2.	Contraintes liées aux performances de colmatage -----	41
4.3.	Principe et configuration de <i>MBR</i> -----	42
5.	UTILISATION <i>MBR</i> POUR TRAITER LES MEDICAMENTS -----	45
	CONCLUSION -----	48

CHAPITRE III

METHODES D'ANALYSE ET CONDITIONS OPERATOIRES

1.	PARAMETRES DE SUIVI -----	50
1.1.	Dosage de la <i>DCO</i> -----	50
1.2.	Dosage du <i>COT</i> , <i>TC</i> et <i>IC</i> -----	51
1.3.	Dosage de la matière organique <i>MO</i> -----	52
1.4.	Dosage de la fraction azoté : <i>N-NH⁺₄</i> , <i>N-NO⁻₃</i> et <i>NO₂</i> -----	53
1.5.	Dosage de <i>MES</i> , <i>MVS</i> , <i>MS</i> et l'indice des boues -----	54
1.6.	Estimation de l' <i>IB</i> et l' <i>IF</i> -----	55
1.7.	Paramètres de mesure directe -----	56
1.8.	Dosage du micropolluant <i>AMX</i> -----	57
2.	QUALIFICATION ET QUANTIFICATION D'ACTIVITE MICROBIENNE ----	58
3.	L'EFFLUENT SYNTHETIQUE -----	58
3.1.	Substrat utilisé pour le réacteur batch (respiromètre) -----	59
3.2.	Substrat utilisé pour le bioréacteur continu (<i>MBR</i>) -----	59

4. SOURCE DES BOUES D'INOCULATION	60
5. FIXATION DU RAPPORT S_0/X_0	64
CONCLUSION	65

CHAPITRE IV LA RESPIROMETRIE

1. PRINCIPE DE LA RESPIROMETRE	66
2. MISE EN PLACE D'UN RESPIROMETRE <i>LFS</i>	69
3. MISE EN PLACE D'UN RESPIROMETRE <i>LSS</i>	70
4. PREPARATION DE LA LIQUEUR MIXTE ET MISE A L'ENDOGENE	71
5. INTERPRETATION DES RESPIROGRAMMES	76
6. DETERMINATION DU COEFFICIENT K_{La}	79
6.1. Traitement de la réponse respirométrique en endogène	83
6.2. Effet de la Durée d'adaptation sur la réponse en endogène	86
6.3. Interprétation des réponses respirométrique de la biomasse adaptée et hétérotrophes en condition endogène	88
6.4. Influence de l'agitation sur la réponse respirométrique endogène	89
7. LA REPRODUCTIBILITE DES TESTS RESPIROMETRIQUE	92
7.1. Effet des longue durée des tests respirométriques	92
7.2. Le rapport S_0/X_0 sur la réponse respirométriques	93
7.3. Les injections successives	96
CONCLUSION	101

CHAPITRE V LES TESTS D'INHIBITION

1. ESTIMATION DU SEUIL D'INHIBITION	102
2. CINETIQUE DE CONSOMMATION DU SUBSTRAT ET D'AMX	102
3. LES PREMIERS ESSAIS DES TESTS RESPIROMETRIQUES	104
4. ESTIMATION DES SEUILS D'INHIBITION EN UTILISANT LES TECHNIQUES RESPIROMETRIQUES <i>LSS</i>	106

5.	ESTIMATION DES SEUILS D'INHIBITION EN UTILISANT LES TECHNIQUES RESPIROMETRIQUES <i>LFS</i>	111
5.1.	Effet inhibiteur de l'AMX injecté après dissolution sur l'activité microbienne	111
5.2.	Effet inhibiteur de l'AMX injecté sous forme poudre sur l'activité microbienne	117
6.	EFFET INHIBITEUR DE L'AMX SUR L'ACTIVITE MICROBIENNE DES HETEROTROPHES	122
6.1.	Première mise en œuvre	123
6.2.	Deuxième mise en œuvre	126
	CONCLUSION	131

CHAPITRE VI

ETUDE DE L'INHIBITION DANS UN REACTEUR MBRI

1.	MISE EN MARCHÉ DES TESTS EN BATCH	132
1.1.	Observation de la biodégradation dans la phase liquide	134
1.2.	Observation de l'accumulation de l'AMX dans la fraction solide	137
2.	MISE EN MARCHÉ D'UN PILOTE <i>MBRI</i>	139
2.1.	Conditions opératoires initiales	141
2.2.	Détermination des paramètres opératoires	143
2.2.1.	Débit d'alimentation et de perméat	143
2.2.2.	Temps de séjour hydraulique (<i>HRT</i>)	144
2.2.3.	L'âge de boues ou le temps de rétention de la phase solide (<i>SRT</i>)	144
2.2.4.	Concentration initiale du substrat dans le réacteur $C_{S,0}$	145
2.2.5.	Concentration du substrat concentré dans le réservoir d'alimentation C_s	145
2.2.6.	Débit des boues extraites	146
2.2.7.	Concentration en AMX dopés dans l'effluent synthétique	146
2.3.	Caractérisation de la membrane	147
2.4.	Paramètres de suivi du <i>MBRI</i>	147
3.	PERFORMANCES EPURATOIRES DU <i>MBRI</i>	148
3.1.	Caractérisation de la liqueur mixte	149
3.2.	Caractérisation du perméat	152
3.3.	Evolution d'AMX dans le <i>MBRI</i>	155
	CONCLUSION	157
	CONCLUSION GENERALE	159
	REFERENCES	164
	ANNEXES	175

LISTE DES FIGURES

Page

CHAPITRE I LES MICROPOLLUANTS ET LE TRAITEMENT BIOLOGIQUE

Fig. I.01	Les différentes chaînes de traitement possibles pour l'épuration des eaux usées. -----	10
Fig. I.02	Chaîne de traitement avec les diverses alternatives possibles. -----	11
Fig. I.03	Présentation simplifiée d'un système de traitement des eaux usées. --	13
Fig. I.04	Boues activées, Schéma de base. -----	19
Fig. I.05	Boues activées, Schéma avec dénitrification en tête. -----	19
Fig. I.06	Boues activées, Schéma avec déphosphatation. -----	20
Fig. I.07	Histoire chronologique du médicament. -----	25
Fig. I.08	Structure semi-développée de l'AMX identifiant ses groupements ionisables et les cycles du noyau β -lactamines. -----	27
Fig. I.09	Micrographes de microscopie électronique de balayage (<i>SEM</i>) et cristal dimension de l'AMX primitif. -----	27
Fig. I.10	Diffractogramme de (<i>XRD</i>) diffraction de rayon X de l'AMX pure. ----	27
Fig. I.11	Structure du Peptidoglycane. -----	28
Fig. I.12	Structure des Pénicillines et du <i>D-Alanyl-D-Alanine</i> . -----	29
Fig. I.13	Inhibition par l'action des Pénicillines et réaction de polymérisation du peptidoglycane. -----	29

CHAPITRE II LES BIOREACTEURS A MEMBRANE

Fig. II.01	Disposition des opérations de filtration/séparation par membrane par rapport à la taille des pores et des substances retenues. -----	32
Fig. II.02	Membrane tubulaire. -----	35
Fig. II.03	Types de filtration membranaire. -----	36
Fig. II.04	Séparation par filtration sur membrane micro ou ultrafiltration. -----	41
Fig. II.05	Conditions opératoire du modèle <i>MBRI</i> . -----	43
Fig. II.06	Bioréacteur à membrane externe <i>MBRE</i> (recirculé). -----	43
Fig. II.07	Bioréacteur à membrane immergée <i>MBRI</i> . -----	44
Fig. II.08	Bioréacteur à membrane immergée externe <i>MBRIE</i> . -----	45
Fig. II.09	Schéma du mécanisme de filtration sur membrane poreuse. -----	46
Fig. II.10	Recommandations sur les niveaux de traitement pour les diverses utilisations des eaux usées recyclées. -----	46

CHAPITRE III METHODES D'ANALYSE ET CONDITIONS OPERATOIRES

Fig. III.01	Photographie de la chauffe tube et l' <i>UV-Visible JASCO V-630</i> utilisé pour la mesure de <i>DCO</i> . -----	51
Fig. III.02	Analyseur <i>COT Sievers InnovOx-Firmware</i> et <i>TOC-V CSH/CSN</i> de <i>SHIMADZU</i> utilisé pour la mesure de <i>COT</i> . -----	52
Fig. III.03	Photographie d'un Spectrophotomètre <i>HACH DR3900</i> pour les analyses avec des tubes prés dosés. -----	53

Fig. III.04	Moyen de mesure de l'indice de boues et photographie d'un microscope <i>OPTECH</i> Technology-Infinity utilisé pour la visualisation des floes bactériens. -----	56
Fig. III.05	Un Multi-paramètres, Oxi-multi 3430 de <i>WTW</i> utilisé pour les mesures directes de certains paramètres. -----	56
Fig. III.06	Photographie de l'appareil d' <i>HPLC</i> utilisé pour la quantification du micropolluant dans la fraction liquide. -----	57
Fig. III.07	Photographie de l'appareil <i>LCMS-MS</i> utilisé pour la quantification du micropolluant dans la fraction liquide. -----	58
Fig. III.08	Photographie de l'appareil <i>IR</i> utilisé pour la quantification du micropolluant dans la fraction solide. -----	58
Fig. III.09	Station d'épuration de boues activées d' <i>IBN ZIAD</i> , Algérie. -----	61
Fig. III.10	Visualisation microscopique des boues de la station d'épuration conventionnel d' <i>IBN ZIAD</i> , Algérie. -----	62
Fig. III.11	Station d'épuration à membrane de <i>GRANDE MONTE</i> , France. -----	63

CHAPITRE IV LA RESPIROMETRIE

Fig. IV.01	(a) Photographie et (b) Schéma du montage respirométrique de type LFS construit dans le laboratoire <i>LIPE</i> . -----	69
Fig. IV.02	(a) Photographie et (b) Schéma du montage respirométrique de type LSS construit dans le laboratoire. -----	71
Fig. IV.03	Etape de mise à l'endogène avant les tests respirométriques <i>LSS</i> . ----	72
Fig. IV.04	Evolution des paramètres de la liqueur après chaque lavage effectué. -----	73
Fig. IV.05	Evolution de la turbidité et les MES du surnageant en fonction du temps de décantation et le nombre de lavage.-----	73
Fig. IV.06	Evolution de <i>DCOt</i> , <i>DCOs</i> et la <i>DCOp</i> en fonction de l'état de la liqueur mixte. -----	74
Fig. IV.07	Evolution de la <i>DCOt</i> , <i>DCOs</i> et <i>DCOp</i> en fonction d'état de la liqueur mixte, état brute (<i>Raw-MLSS</i>) et après un seul lavage (état endogène). -----	74
Fig. IV.08	Evolution des concentrations de la <i>DCOs</i> de trois échantillons en fonction de l'état de la liqueur mixte mélangé mécaniquement pour les différents lavages effectués. -----	75
Fig. IV.09	Evolution de le <i>COT</i> , le <i>TC</i> , le <i>IC</i> et la <i>MO</i> en fonction de l'état de la liqueur mixte dans les différents lavages effectués et celle obtenue à l'état endogène. -----	75
Fig. IV.10	Respirogramme enregistré lors d'une série de tests respirométriques d'inhibition de type <i>LSS</i> . -----	76
Fig. IV.11	Traitement du respirogramme, (a) sans injection de l'inhibiteur détermination (b) avec injection de l'inhibiteur. -----	76
Fig. IV.12	Respirogramme enregistré lors d'un test d'inhibition de type <i>LFS</i> . ---	77
Fig. IV.13	Traitement de la première partie du respirogramme, détermination de la respiration endogène et du <i>K_{La}</i> . -----	78
Fig. IV.14	La deuxième partie du respirogramme et estimation de la respiration exogène et totale. -----	78
Fig. IV.15	(a) Illustration des parties de régressions pour la courbe de stop/reprise d'aération pour l'estimation du <i>K_{La}</i> . (b) Evolution temporelle de la respiration exogène et total pour les trois <i>K_{La}</i> . -----	82

Fig. IV.16	Évolution temporelle de la concentration en oxygène dissous : (a) de la partie stop-reprise d'aération et (b) la régression linéaire de la partie descendante linéaire. -----	84
Fig. IV.17	Evolution temporelle de la concentration en oxygène dissous : (a) de la partie stop-reprise d'aération et (b) la régression linéaire de la première partie (A-B) descendante la plus linéaire, (c) la régression linéaire de la deuxième partie (A-C) descendante la plus linéaire et (c) la régression linéaire de la troisième partie (A-D) descendante la plus linéaire. -----	84
Fig. IV.18	Evolution temporelle de la concentration en oxygène dissous : (a) de la partie stop-reprise d'aération (b) la régression linéaire de la partie descendante (A-B) (c) la régression linéaire de la partie descendante (A-C) (d) la régression linéaire de la deuxième partie (A-D). -----	85
Fig. IV.19	Evolution temporelle de de la concentration en oxygène dissous : (a) de la partie stop-reprise d'aération et (b) la régression linéaire de la partie descendante (A-B), (c) la régression linéaire de la première partie descendante (A-C). -----	86
Fig. IV.20	Evolution en fonction de la durée d'adaptation du : (a) coefficient K_{La} , (b) coefficient de corrélation (R^2), (c) (OUR_{end}) : la vitesse de chute du point d'arrêt d'aération (A) de l'état endogène jusqu'au (B) le point de reprise d'aération. -----	87
Fig. IV.21	Evolution en fonction de la durée de stop d'aération et la présence ou non de l'ATU. -----	89
Fig. IV.22	Evolution en fonction de la durée d'arrêt d'aération du : (a) coefficient K_{La} , (b) coefficient de corrélation, (c) OUR_{end} . -----	90
Fig. IV.23	Variation des différents paramètres en fonction de la vitesse d'agitation (rpm) : (a) le coefficient K_{La} , (b) le coefficient R^2 , (c) OUR_{end} . -----	91
Fig. IV.24	Evolution en fonction la vitesse d'agitation (rpm) dans les conditions opératoires de la situation G, de la température 10 °C, du : (a) le coefficient K_a , (b) le coefficient R^2 , (c) OUR_{end} . -----	91
Fig. IV.25	Superposition de l'évolution en fonction de la vitesse d'agitation en présence et en absence de l'ATU pour les conditions opératoires de la situation F, du : (a) le coefficient K_{La} , (b) le coefficient R^2 et (c) OUR_{end} . -----	92
Fig. IV.26	Evolution de la concentration en oxygène dissous en fonction du temps. -----	93
Fig. IV.27	Evolution en fonction du temps de : (a) la concentration en oxygène dissous pour les hétérotrophes (présence d'ATU), (c) de la totalité de la biomasse épuratrice (absence d'ATU) ; et du taux de consommation d'oxygène (b) pour les hétérotrophes, (d) pour la totalité de la biomasse épuratrice. -----	94
Fig. IV.28	Effet du rapport S_0/X_0 fixé sur (a) la quantité d'oxygène dissous exogène utilisée (b) le temps de dégradation, pour les hétérotrophes et pour la totalité de la biomasse. -----	95
Fig. IV.29	Effet du rapport S_0/X_0 fixé sur (a) la quantité d'oxygène dissous exogène utilisée (b) le temps de dégradation, pour la totalité de la biomasse (DCO égale à 450 mg/L). -----	96

Fig. IV.30	Evolution de la concentration en oxygène dissous en fonction du temps obtenu pour le rapport $S_0/X_0 = 0.04$, (a) le respirogramme complet, (b) la partie de détermination de K_{La} , et de la respiration endogène (c) la superposition des courbes de consommation d' O_2 en fonction de temps et (d & e) la superposition des courbes de taux d'utilisation d' O_2 exogène et total. -----	97
Fig. IV.31	Evolution de la concentration en oxygène dissous en fonction du temps obtenu pour un rapport $S_0/X_0 = 0.09$, (a) le respirogramme complet, (b) la partie de détermination de K_{La} , et de la respiration endogène (c) la superposition des courbes de consommation d' O_2 en fonction de temps et (d & e) la superposition des courbes du taux d'utilisation d' O_2 exogène et total. -----	99
Fig. IV.32	Evolution de la concentration en oxygène dissous en fonction du temps obtenu pour un rapport $S_0/X_0 = 0.19$, (a) le respirogramme complet, (b) la partie de détermination de K_{La} , et de la respiration (c) la superposition des courbes de consommation d' O_2 en fonction de temps et (d & e) la superposition des courbes de taux d'utilisation d' O_2 exogène et total. -----	100
Fig. IV.33	Evolution en fonction du rapport S_0/X_0 du : (a) le coefficient de transfert K_{La} , (b) OUR_{end} (c) le temps de dégradation lors des différentes injections du substrat. -----	100
Fig. IV.34	Evolution en fonction du rapport S_0/X_0 étudié du : (a) OUR_{exo} , (b) OUR_t et (c) la différence de $OUR_{exo,t}$ entre la première et la deuxième injection. -----	100

CHAPITRE V LES TESTS D'INHIBITIONS

Fig. V.01	(a) Respirogramme obtenu après injection de l'effluent synthétique binaire, et l'évolution temporelle (b) de la charge de la DCO_s dans le respiromètre, (c) la concentration en DCO_s et (d) DCO_t . -----	104
Fig. V.02	Plan d'expérimentation utilisé dans la respirométrie de type LSS pour l'estimation de l'inhibition d' AMX . -----	106
Fig. V.03	Respirogrammes obtenus selon le scénario 01. -----	107
Fig. V.04	Respirogrammes obtenus selon le scénario 02. -----	108
Fig. V.05	Exemples des Respirogrammes obtenus selon le scénario 03. -----	109
Fig. V.06	Activité totale des microorganismes évaluée selon les Scénarios 3,4,5. -----	109
Fig. V.07	Exemples des Respirogrammes obtenus selon le scénario 06. -----	110
Fig. V.08	Exemples des Respirogrammes obtenus selon le scénario 07. -----	110
Fig. V.09	Plan d'expérimentation utilisé dans la respirométrie de type LFS pour l'estimation de l'inhibition d' AMX . -----	111
Fig. V.10	Exemple d'un respirogramme obtenue lors des tests d'inhibition en injectant l' AMX avec le substrat ($30 \mu g/mL$). -----	112
Fig. V.11	Evolution en fonction de la concentration d' AMX injecté du : (a) Pourcentage d'inhibition et (b) Temps de dégradation après injection de l'effluent synthétique seul et l'effluent synthétique contentent l' AMX . -----	113

Fig. V.12	Evolution de la <i>DCOs</i> , <i>DCOt</i> , <i>COT</i> , <i>TC</i> et <i>IC</i> de différentes concentrations d' <i>AMX</i> injecté en fonction des différents états endogènes. -----	115
Fig. V.13	Evolution des pourcentages de réduction ou d'augmentation de : <i>DCOs</i> , <i>DCOt</i> , <i>COT</i> , <i>TC</i> et <i>IC</i> , par rapport au pourcentage d'inhibition en fonction des différentes concentrations en <i>AMX</i> injectées. -----	117
Fig. V.14	Exemple d'un respirogramme obtenue lors des tests d'inhibition en injectant l' <i>AMX</i> poudre (13 mg d' <i>AMX</i> équivalent de 48µg/mL). ----	118
Fig. V.15	Evolution en fonction de la concentration d' <i>AMX</i> injecté du : (a) pourcentage d'inhibition et (b) le temps de dégradation. -----	118
Fig. V.16	Evolution de la <i>DCOs</i> , <i>DCOt</i> , <i>COT</i> , <i>TC</i> , <i>IC</i> et la <i>MO</i> de différentes concentrations d' <i>AMX</i> injecté sous forme de poudre en fonction des deux états endogènes. -----	120
Fig. V.17	Evolution des pourcentages de réduction (<i>signe -</i>) ou d'augmentation (<i>signe +</i>) de la <i>DCOs</i> , <i>DCOt</i> , <i>COT</i> , <i>TC</i> , <i>IC</i> et <i>MO</i> , par rapport au pourcentage d'inhibition <i>I%</i> en fonction des différentes concentrations en <i>AMX</i> injectées sous forme de poudre. -----	121
Fig. V.18	Respirogrammes obtenus durant les tests d'inhibition avec les boues acclimatées (a) la biomasse totale (b) les hétérotrophes. -----	122
Fig. V.19	Evolution de la salinité, <i>pH</i> , conductivité et <i>TDS</i> en fonction de temps pour le réacteur (a) d'adaptation au substrat (b) d'adaptation au substrat contenant l' <i>AMX</i> . -----	123
Fig. V.20	Evolution des pourcentages d'inhibition des boues <i>AS1</i> et une salinité de 0.3% de substrat introduit en fonction de la concentration d' <i>AMX</i> appliquée pour : (a) la biomasse totale (b) les hétérotrophes (c) les deux effets. -----	125
Fig. V.21	Evolution des pourcentages d'inhibition des boues <i>AS1</i> et salinité de 5% en fonction de concentration d' <i>AMX</i> appliquée pour : (a) biomasse totale (b) hétérotrophes. -----	125
Fig. V.22	Evolution des pourcentages d'inhibition des boues <i>AS2</i> en fonction de la concentration d' <i>AMX</i> appliquée pour : (a) biomasse totale (b) hétérotrophes (c) les deux. -----	126
Fig. V.23	Visualisations microscopiques des boues activées utilisées. -----	127
Fig. V.24	Evolution de la salinité et le programme d'acclimatation dans les bioréacteurs d'adaptation. -----	127
Fig. V.25	Les pourcentages d'inhibitions en fonction de concentration en inhibiteur pour (a) les différentes biomasses hétérotrophes (<i>AS1</i> , <i>AS2</i> , <i>AS3</i>) et (b) la totalité de biomasse. -----	130

CHAPITRE VI

ETUDE DE L'INHIBITION DANS UN REACTEUR MBRI

Fig. VI.01	Schéma descriptif des tests de biodégradation effectués. -----	133
Fig. VI.02	Photographie des montages utilisés durant les tests de biodégradation en batch. -----	133

Fig. VI.03	La variation temporelle de la dégradation de la <i>DCO</i> de <i>SUB</i> et d' <i>AMX</i> dans les réacteurs <i>S1R1</i> et <i>S1R2</i> . -----	134
Fig. VI.04	La variation temporelle de la dégradation de la <i>DCO</i> d' <i>AMX</i> dans le réacteur <i>S2R2</i> et la vitesse de dégradation d' <i>AMX</i> correspondante.----	134
Fig. VI.05	La variation temporelle de la dégradation de la <i>DCO</i> de <i>SUB</i> et d' <i>AMX</i> dans les réacteurs <i>S3R1</i> et <i>S3R2</i> . -----	135
Fig. VI.06	La variation temporelle de la dégradation de la <i>DCO</i> de l' <i>AMX</i> pour les différents types de biomasses. -----	135
Fig. VI.07	Chromatogramme d' <i>HPLC</i> (a) du prélèvement <i>P1</i> (b) du prélèvement <i>P2</i> dans le réacteur <i>S1R2</i> . -----	136
Fig. VI.08	Chromatogramme d' <i>HPLC</i> (a) du prélèvement <i>P1</i> (b) du prélèvement <i>P2</i> dans le réacteur <i>S2R2</i> . -----	137
Fig. VI.09	Chromatogramme d' <i>HPLC</i> (a) du prélèvement <i>P1</i> (b) du prélèvement <i>P2</i> dans le réacteur <i>S3R2</i> . -----	137
Fig. VI.10	Superposition des spectres <i>IR</i> de l' <i>AMX</i> dans la biomasse récupérée du réacteur <i>S1R2</i> . -----	138
Fig. VI.11	Superposition des spectres <i>IR</i> de l' <i>AMX</i> dans la biomasse récupérée du réacteur <i>S2R2</i> . -----	138
Fig. VI.12	Superposition des spectres <i>IR</i> de l' <i>AMX</i> dans la biomasse récupérée du réacteur <i>S3R2</i> . -----	138
Fig. VI.13	Photographie et représentation schématique du <i>MBRI</i> . -----	140
Fig. VI.14	(a) Débit de perméation en fonction de la vitesse de rotation de la pompe (b) Le flux de la solution synthétique en fonction de la fréquence de la pompe. -----	144
Fig. VI.15	Evolution de l'aire des pics (a) dans la matrice perméat (b) dans la matrice boues (c) dans la matrice eau ultra-pure (d) les trois matrices précédentes, en fonction de la concentration en <i>AMX</i> pour l'étalonnage de l' <i>HPLC</i> . -----	147
Fig. VI.16	Evolution des (a) <i>MES</i> et des <i>MVS</i> de la liqueur mixte dans le <i>MBRI</i> et (b) le rapport <i>MVS/MES</i> en fonction de la période de fonctionnement du pilote. -----	149
Fig. VI.17	Evolution des valeurs en (a) <i>pH</i> et (b) de la température ainsi l'oxygène dissous en fonction de temps durant la période de fonctionnement du pilote. -----	151
Fig. VI.18	Evolution de la (a) salinité et la conductivité et (b) le taux des sels <i>TDS</i> en fonction de temps dans la liqueur mixte durant la période de fonctionnement du pilote. -----	151
Fig. VI.19	Evolution temporelle de (a) la <i>DCO</i> et (b) le <i>COT</i> dans le perméat durant la période de fonctionnement du pilote. -----	153
Fig. VI.20	Evolution temporelle de la (a) <i>NO₃</i> , (b) <i>NO₂</i> et (c) <i>NH₄</i> dans le perméat durant la période de fonctionnement du pilote. -----	154
Fig. VI.21	Evolution temporelle de la (a) Concentration initiale en <i>AMX</i> théorique, (b) la concentration en <i>AMX</i> mesuré dans le perméat et (c) la superposition des concentrations en <i>AMX</i> initiales et dans le perméat durant la période de fonctionnement du pilote. -----	156
Fig. VI.22	Spectre <i>IR</i> des Boues activées sans <i>AMX</i> et d'autres après l'injection d' <i>AMX</i> . -----	157

LISTE DES TABLES

Page

CHAPITRE I LES MICROPOLLUANTS ET LE TRAITEMENT BIOLOGIQUE

Tab. I.01	Prétraitement exigé pour les procédés biologiques -----	12
Tab. I.02	Propriétés physico-chimique de l'antibiotique <i>AMX</i> -----	27

CHAPITRE II LES BIOREACTEURS A MEMBRANE

Tab. II.01	Comparaison entre <i>MBR</i> et <i>STEP</i> conventionnelle -----	37
Tab. II.02	Exemple d'utilisation du <i>MBR</i> en traitement d'effluent industriels -	37

CHAPITRE III METHODES D'ANALYSE ET CONDITIONS OPERATOIRES

Tab. III.01	Valeurs seuil de l'indice de boue -----	55
Tab. III.02	Les caractéristiques de l'effluent synthétique et de la molécule d' <i>AMX</i> . -----	59
Tab. III.03	Concentrations en chlorure d'ammonium et d' <i>AMX</i> à injecter par un pas dans le <i>MBR</i> . -----	60
Tab. III.04	Les concentrations en acétate et d' <i>AMX</i> à injecter par un pas dans le <i>MBR</i> . -----	60
Tab. III.05	Capacité nominale de traitement et qualité moyen requise des eaux usées. -----	61
Tab. III.06	Caractéristiques physico-chimiques des boues <i>CAS</i> avant acclimatation. -----	62
Tab. III.07	Caractéristiques physico-chimiques des boues <i>MAS</i> . -----	63

CHAPITRE IV LA RESPIROMETRIE

Tab. IV.01	Avantages et inconvénients des différents respirométries en phase liquide. -----	69
Tab. IV.01	Les caractéristiques du réponse respirométriques utilisant le K_{La} déterminé avec les trois approches mathématiques ($S_0/X_0 = 0.04$ $gCOD.gVSS^{-1}$). -----	83

CHAPITRE V

LES TESTS D'INHIBITIONS

Tab. V.01	Caractérisation des solutions mères d'AMX. -----	103
Tab. V.02	Les différents scénarios des tests d'inhibition en utilisant la respirométrie LSS. -----	106
Tab. V.03	Résultats des tests d'inhibition sur l'activité endogène par la respirométrie LSS (Scénario 01). -----	107
Tab. V.04	Résultats des tests d'inhibition sur l'activité endogène par la respirométrie LSS (Scénario 02). -----	108
Tab. V.05	Comparaison entre l'activité totale des microorganismes en injectant S et S+AMX (injection combinée et séparée) évaluée par la respirométrie LSS (scénario 3, 4 et 5). -----	109
Tab. V.06	Résultats des tests d'inhibition sur l'activité endogène par la respirométrie LSS (Scénario 06). -----	110
Tab. V.07	Résultats des tests d'inhibition sur l'activité endogène par la respirométrie LSS (Scénario 07). -----	110
Tab. V.08	Les pourcentages de réduction (<i>signe -</i>) ou d'augmentation (<i>signe +</i>) de la <i>DCOs</i> , <i>DCOt</i> , <i>COT</i> , <i>TC</i> et <i>IC</i> , par rapport au pourcentage d'inhibition <i>I%</i> pour les différentes concentrations en AMX injectées. -----	116
Tab. V.09	Les pourcentages de réduction (<i>signe -</i>) ou d'augmentation (<i>signe +</i>) de la <i>DCOs</i> , <i>DCOt</i> , <i>COT</i> , <i>TC</i> , <i>IC</i> et <i>MO</i> , par rapport au pourcentage d'inhibition <i>I%</i> des différentes concentrations en AMX injectées sous forme de poudre. -----	120
Tab. V.10	Les principales caractéristiques des inocula utilisés dans l'inhibition des hétérotrophes. -----	124
Tab. V.11	Les caractéristiques du réponse respirométriques utilisant le K_{La} déterminé avec les trois approches mathématiques ($S_0/X_0 = 0.04 gCOD.gVSS^{-1}$). -----	127
Tab. V.12	Les pourcentages d'inhibition par rapport à l' <i>OD</i> consommée par les hétérotrophes pour le substrat injecté. -----	129
Tab. V.13	$Y_{O/S}$ estimés avant et après différentes doses d'AMX injectées. -----	129

CHAPITRE VI

ETUDE DE L'INHIBITION DANS UN REACTEUR MBRI

Tab. VI.01	Séries d'expériences pour évaluer la biodégradation de l'AMX en mode batch. -----	133
Tab. VI.02	Les caractéristiques du module membranaire utilisé. -----	140
Tab. VI.03	Les conditions opératoires de fonctionnements de MBRI. -----	142
Tab. VI.04	Les concentrations d'AMX en termes de <i>DCO</i> , <i>DCO</i> théorique et <i>DCO</i> total appliqué. -----	146
Tab. VI.05	Etapes de nettoyage de la membrane. -----	147
Tab. VI.06	Paramètres de suivi du MBRI. -----	148

ABREVIATIONS

Lettres

λ_{max}	Longueur d'onde d'absorbance maximale	nm
% <i>Inb</i>	Pourcentage d'inhibition	%
% <i>Inb_L</i>	Pourcentage d'inhibition Amoxicilline Liquide	%
% <i>Inb_P</i>	Pourcentage d'inhibition Amoxicilline Poudre	%
<i>Abs</i>	Absorbance	nm
<i>C_{acét}</i>	Concentration d'acétate de sodium / substrat	g/L
<i>C_{AMX}</i>	Concentration d'Amoxicilline	g/L
<i>C_F</i>	Facteur de concentration	/
<i>C_m</i>	Charge massique	kg.m ⁻³ .j ⁻¹
<i>C_N</i>	Charge massique azoté	kg _N .m ⁻³ .j ⁻¹
<i>C_N</i>	Concentration d'Azote	g/L
<i>C_p</i>	Concentration de phosphore	g/L
<i>C_v</i>	Charge volumique	kg _{DCO} .m ⁻³ .j ⁻¹
<i>hrs</i>	Heures	/
<i>J_m</i>	Flux massique	kg.h ⁻¹ .m ⁻²
<i>jrs</i>	Jours	/
<i>J_w</i>	Flux de perméat	LMH=L.h ⁻¹ .m ⁻²
<i>K_{La}</i>	Coefficient de transfert d'oxygène	h ⁻¹
<i>k_{ow}</i>	Coefficient de partage octanol-eau	/
<i>m</i>	La masse	g
<i>m_{Acét}</i>	Masse d'acétate de sodium / substrat	g
<i>m_{AMX}</i>	Masse d'Amoxicilline	g
<i>m_N</i>	Masse d'Azote	g
<i>m_p</i>	Masse de phosphore	g
<i>P_{atm}</i>	Pression atmosphérique	atm
<i>P_{cap}</i>	Pression détecté par le capteur	atm
<i>p_{ka}</i>	Constante de dissociation acide-base	/
<i>ppm = mg/L</i>	Partie par million	mg/L
<i>Q</i>	Débit	L.j ⁻¹
<i>Q_{DCO}</i>	La Charge Polluante	kg/j
<i>Q_e</i>	Débit d'entré d'eau	L.h ⁻¹
<i>Q_m</i>	Débit moyen	m ³ /jrs soit L/s
<i>Q_{O2, exo (S)}</i>	Quantité d'oxygène exogène du substrat seul	L/s
<i>Q_{O2, exo (SI)}</i>	Quantité d'oxygène exogène du substrat contenant l'inhibiteur	L/s
<i>Q_p</i>	Débit de perméat	L.h ⁻¹
<i>Q_{pt}</i>	Débit de pointe	m ³ /hrs soit L/s
<i>Q_s</i>	Débit du liquide à la sortie	L.h ⁻¹
<i>Q_{S, O sortant}</i>	Débit de perméation à la sortie	L/s
<i>Q_{SO, entrant}</i>	Débit d'alimentation en substrat à l'entrée	L/s
<i>Q_{Ss}</i>	Débit substrat	L.j ⁻¹
<i>Q_w</i>	Débit de boues axtraite	L.j ⁻¹
<i>R²</i>	Coefficient de corrélation	/

<i>rmp</i> =	Tours par minutes	/
<i>tr/min</i>		
<i>S</i>	Surface	m^2
<i>S₀/X₀</i>	Rapport substrat / biomasse initiale	g_{DCO}/g_{MVS}
<i>S_{NH}</i>	Substrat azoté	$g_N.L^{-1}$
<i>S_O</i>	Concentration de l'oxygène dissous dans la phase liquide	mg/L
<i>S_{O, Sat}</i>	Concentration d'oxygène à la saturation	mg/L
<i>S_{Oe}</i>	Concentration de l'oxygène à l'entrée du respiromètre	mg/L
<i>S_{os}</i>	Concentration de saturation d'oxygène dans la phase liquide	mg/L
<i>S_P</i>	Substrat phosphoré	$mg_P.L^{-1}$
<i>V_b</i>	Volume des boues	mL
<i>VD₃₀</i>	Volume de boue décanté en trente minutes	mL
<i>V_{eff}</i>	Volume d'effluent à injecter	mL
<i>V_f</i>	Volume fonctionnel	L
<i>V_L</i>	Volume de la phase liquide dans le respiromètre	L
<i>V_{O2}</i>	Quantité d'oxygène consommée	m^3
<i>Y</i>	Taux de conversion	Kg_{MVS}/Kg_{DCO}
<i>Y_{Obs}</i>	Taux de conversion observé	g_{MVS}/g_{DCO}

Abréviations En Français Et En Anglais

<i>6-APA</i>	Acide 6-amino-pénicillamique	/
<i>AMX</i>	L'Antibiotique Amoxicilline / Amoxicilline Trihydraté	/
<i>ASM</i>	Activated Sludge Model	/
<i>ATU</i>	Allylthiourée	/
<i>CAS</i>	Les boues activées de <i>STEP</i> classique	/
<i>CONP</i>	Carbone organique non purgeable	mg/L
<i>COP</i>	Carbone organique purgeable	mg/L
<i>COT</i>	Carbone Organique Total	mg/L
<i>DBO</i>	Demande Biochimique en Oxygène	mg/L
<i>DBO/Jrs -</i> <i>DCO/Jrs</i>	Charge moyenne	Kg
<i>DBO₅</i>	Demande Biochimique en Oxygène après 5 jours d'Incubation	mg/L
<i>DBO_{entrant}</i>	Débit d'entrée en Demande biologique d'oxygène	$Kg/hab./jour$
<i>DBO_u</i>	Demande Biochimique en Oxygène Ultime	mg/L
<i>DCO</i>	Demande Chimie en Oxygène / la Pollution	mg/L
<i>DCO_S</i>	Demande Chimie en Oxygène Soluble	mg/L
<i>DCO_T</i>	Demande Chimie en Oxygène Total	mg/L
<i>DCO_{th}</i>	Demande Chimie en Oxygène Théorique	mg/L
<i>DTO</i>	Demande Total en Oxygène	mg/L
<i>EH</i>	Equivalent habitant	/
<i>FBC</i>	Facteur de Bioconcentration	/
<i>HPLC/UV/Flu</i> <i>o</i>	Chromatographique liquide couplée à un détecteur UV-Visible	/
<i>HRT</i>	Temps de séjour hydraulique	h
<i>IAWQ</i>	International Association of Water Quality	/
<i>ICAS</i>	Les boues acclimatées pour l' <i>Amoxicilline</i>	/

IEM	Institut européen des membranes	/
IR	Infra-Rouge	/
IVB	Indice volumique des boues	/
LC/MC/MC	Chromatographie liquide couplée à un triple quadripolaire	/
LFF	Respiromètre injection continu du gaz, alimentation continu en liquide	/
LFS	Respiromètre injection continue du gaz, statique liquide	/
LIPE	Laboratoire d'Ingénierie des Procédés de l'Environnement	/
LSF	Respiromètre statique gaz, alimentation continue en liquide	/
LSS	Respiromètre statique gaz, statique liquide, sans écoulement liquide et sans transfert d'oxygène	/
MAS	Les boues de la station de bioréacteur à membrane	/
MBR	Bioréacteur à membrane	/
MBR_E	Bioréacteur à membrane externe	/
MBR_I	Bioréacteur à membrane immergé	/
MBR_{IE}	Bioréacteur à membrane immergée externe	/
MES	Matières En Suspensions	mg/L
MF	Microfiltration	/
MM	Masse moléculaire / en daltons	Da = g/mol
MO	Matières Organique	mg/L
MP	Point d'éclaire	°C
MS	Matières sèche	mg/L
MVS	Matières Volatiles en Suspensions	mg/L
NAG	Acide N-acétylglycosamique	/
NAM	Acide N-acétylmuramique	/
NDM-1	Bactéries New Delhi Métallo-β-lactamase 1	/
NF	Nano filtration	/
NTK	Azote Kjeldahl	mg/L
OD	Oxygène Dissous	mg/L
OI	Osmose inverse	/
OUR	Oxygen Uptake Rate / taux de consommation d'oxygène	mg.L-1.h-1
OUR_{end}	Vitesse de consommation d'oxygène endogène	mg.L-1.h-1
OUR_{end, réserve}	Consommation en oxygène pour la dégradation des substances de réserves	mg.L-1.h-1
OUR_{end, respiration}	Consommation en oxygène pour la respiration endogène des bactéries	mg.L-1.h-1
OUR_{exo}	Vitesse de consommation d'oxygène exogène	mg.L-1.h-1
OUR_{exo, Ss}	Dégradation des substrats rapidement biodégradables	mg.L-1.h-1
OUR_{exo, Xs}	Dégradation des substrats lentement biodégradables	mg.L-1.h-1
OUR_T	Taux de respiration total	mg.L ⁻¹ .h ⁻¹
pH	Potentiel d'Hydrogène	/
PHB	Polyhydroxybutyrate	/
PLP	Protéines Liant les Pénicillines	/
PTM	Pression transmembranaire	atm
PVC	Polychlorure de Vinyle	/
PVDF	Polyvinylidene difluoride	/
SCAS	Boues activées acclimatées pour le substrat	/
SDT	Solides dissous totaux	mg/L
SEM	Microscopie électronique de balayage	/

SICAS	Les boues acclimatées pour le substrat et l' <i>Amoxicilline</i>	/
SRT	Temps de séjours solide / âge des boues	<i>jrs</i>
SS	Charge de solide en suspension	<i>Kg/hab./jour</i>
S_s	Substrat carboné soluble	<i>gDCO.L⁻¹</i>
SS/Jour	Charge moyenne	<i>mg/L</i>
S_{si}	Concentration de substrat organique	<i>mg/L</i>
STEP	Station d'Epuration Conventionnel	/
T	Température	<i>°C</i>
TDS	Taux des Sels	/
UF	Ultrafiltration	/
V	Volume	<i>m³ soit L</i>
XRD	Diffraction de rayon X	/

RESUME

Le traitement des eaux est effectué dans des stations d'épuration conventionnelles, qui incluent une étape biologique à boues activées. Dans ce bioréacteur, les polluants sont oxydés ou biosorbés, avec une concentration spécifique de biomasse (*MES et MVS*), ainsi qu'une concentration suffisante en oxygène dissous. La présence de substances biologiquement résistantes dans les effluents, telles que les antibiotiques, est considérée comme des inhibiteurs potentiellement préjudiciables pour les systèmes de traitement biologique, car ils diminuent l'activité microbienne. Cependant, les bactéries peuvent développer une résistance aux antibiotiques et surmonter facilement la présence de ces composés.

Dans cette étude, nous avons utilisé un respiromètre aéré en modes *LSS et LFS*, pour évaluer l'effet de la présence d'antibiotiques, *AMX*, dans les effluents contenant la source de carbone et d'azote, ainsi que d'autres nutriments, en utilisant le rapport S_0/X_0 approprié. Cette évaluation a été réalisée en observant la réponse de la biomasse de différentes boues activées conventionnelles, préparées par la technique de lavage. Puis, des essais ont été réalisés avec un bioréacteur à membrane immergée ainsi que des essais d'adaptation pour évaluer l'efficacité de ces deux méthodes pour éliminer l'*AMX*.

Les résultats expérimentaux ont montré l'efficacité de la technique respirométrique pour évaluer l'effet d'*AMX* sur les bactéries épuratrices. De manière inattendue, malgré leur toxicité pour les bactéries, l'*AMX* a présenté un effet non prévu, et le taux d'inhibition s'est avéré indépendant des concentrations appliquées. En ce qui concerne les tests d'élimination et de biodégradation, l'*AMX* a été soit biodégradé soit biosorbé sur les floccs bactériens. Cependant, l'utilisation des bioréacteurs à membrane (*MBRI*) a démontré une efficacité très significative allant jusqu'à une élimination totale.

Mots clés : Traitement Biologique, Respirométrie, Bioréacteur à Membrane, Rejet Pharmaceutique, Amoxicilline.

ABSTRACT

The water treatment is carried out in conventional wastewater treatment plants, which include a biological activated sludge process. In this bioreactor, pollutants are oxidized or biosorbed, with a specific concentration of biomass (measured as *MLSS*: mixed liquor suspended solids) maintained, along with an adequate concentration of dissolved oxygen. The presence of biologically resistant substances in wastewater effluents, such as antibiotics, are considered potentially deteriorating for biological treatment systems, as it reduces microbial activity. However, bacteria can acquire antibiotic resistance genes and easily overcome the presence of such compounds.

In this study, the use of an aerated respirometer in two application modes (*LSS* and *LFS*), was implemented to assess the effect of the presence of *AMX* in effluents containing carbon and nitrogen sources, as well as other nutrients, using the appropriate S_0/X_0 ratio. This evaluation was conducted by observing the response of biomass from various conventional activated sludge samples prepared by the washing technique. Then, trials with a submerged membrane bioreactor and adaptation tests were conducted to evaluate the effectiveness of these two methods in *AMX* removing.

Experimental results demonstrated the efficiency of the respirometric technique in assessing the effect of *AMX* on purifying bacteria. Unexpectedly, despite its toxicity to bacteria, *AMX* exhibited an unforeseen effect, and the inhibition rate proved to be independent of applied concentrations. Regarding elimination and biodegradation tests, *AMX* was either biodegraded or biosorbed onto bacterial flocs, and adaptation trials did not achieve complete removal of this molecule from the liquid medium. However, the use of membrane bioreactors (*MBR*) showed highly significant efficiency, achieving complete elimination.

Key words: Biological Treatment , Respirometry, , Membrane Bioreactor, Pharmaceutical discharge, Amoxicillin.

ملخص

إن وجود بعض الملوثات على شكل أثار أو تركيزات جد صغيره في المياه كبقايا الأدوية والمواد الصيدلانية يشكل خطر كبير على البيئة وخاصة على محطات معالجة المياه الصناعية الملوثة. خاصة أن هذا النوع من الملوثات يسبب تعطيل او تثبيط نشاط المادة الحيوية التي تقوم على أساسها عملية تصفية المياه في المحطات. وعليه فان تواجدها مع المياه الملوثة التي تغذي هذه المحطات يستوجب الكشف المبكر عليها وتحديد الأثر الذي يمكن أن تخلفه ثم إزالتها.

عادة يتم الكشف عن احتمالية تثبيط الحمية النشطة عن طريق تقنية قياس التنفسية واستهلاك الاكسيجين التي تقدم ملخص او فكرة اولية حول سمية المياه الصناعية الملوثة التي قد تدخل الى محطة المعالجة، وإزالة هذه الملوثات قد يكون بعدة طرق لكن فعالية هذه الوسائل تبقى جد محدودة او انها مكلفة كثيرا. لكن استخدام بعض التقنيات الحديثة كالمفاعلات الحيوية التي تستخدم أغشية التصفية والفصل الدقيقة تقدم مردود جد ملحوظ وقوي لإزالة أثار هذه الملوثات لكن تكلفتها هي ما جعلت استعمالها محدودة وتفضيل استعمالها في مجال تصفية مياه الشرب.

من خلال هذه الدراسة. تم اخذ مادة المضاد الحيوي الامكسيسيلين كعينة دراسة وتقييم أعراضه على المادة الحيوية المستعملة عادة في معالجة المياه الصناعية الملوثة، حيث تبين الأثر القوي لتثبيطها والإخلال بنشاطها بنسب مختلفة وغير متوقعة بالنظر الى التراكيز المطبقة. ثم قمنا ببعض تجارب الإزالة والتخلص من هذه المادة باستعمال مياه صناعية ملوثة مصطنعة من خلال تعويد المادة الحيوية على استهلاك واستعمال هذا المضاد الحيوي كمادة مغذية ومن جهة أخرى استعمال التقنيات الحديثة التي أثبتت فعاليتها في إزالة هذه المواد بشكل فعال وكلي.

الكلمات المفتاح:

المعالجة البيولوجية، التقنية التنفسية، المفاعلات الحيوية ذات الأغشية المدمجة، التصريف الصيدلاني، الامكسيسيلين

INTRODUCTION

GENERALE

INTRODUCTION GENERALE

Le problème de l'eau dans le monde ne se limite pas à une question de quantité, mais concerne également la qualité. À mesure que la consommation d'eau augmente, en particulier avec les activités humaines et le développement industriel et socioéconomique, les rejets d'eaux usées et d'effluents augmentent également. Les déversements continus d'effluents complexes, comprenant divers composants variant en qualité et en quantité, peuvent également être contaminés par des composés organiques toxiques et persistants, ou non biodégradables, représentant ainsi une menace sérieuse pour l'environnement, notamment dans les milieux aquatiques [01]. Cela implique le traitement complet des effluents domestiques et industriels. Les méthodes de traitement essentielles pour les pollutions associées au carbone, à l'azote et au phosphore sont maintenant solidement établies dans les stations d'épuration des eaux usées. Dans les régions les plus délicates et en tenant compte de la taille de la population, le processus de traitement impliquera inévitablement une phase biologique pour garantir un niveau élevé de purification, en utilisant des bactéries naturelles présentes dans des boues activées [02]. La gestion des processus de traitement est complexe en raison de la multitude de paramètres qui peuvent influencer leur efficacité. Les stations d'épuration des eaux usées sont confrontées à la nécessité de traiter des produits chimiques résistants, qui ne peuvent être dégradés que progressivement par des bactéries, cependant, la présence de substances chimiques toxiques peut perturber l'activité des bactéries dans les boues activées [03]. À l'heure actuelle, le traitement biologique reste le processus secondaire le plus répandu dans les stations d'épuration des eaux usées [04].

La croissance des préoccupations concerne la présence, même à des concentrations de l'ordre de ng/L à $\mu g/L$ ou mg/L , de certaines substances désignées comme micropolluants ou substances émergentes. Ces composés, détectables à des niveaux de trace, peuvent avoir un impact sur l'environnement aquatique même à des doses minimales [05]. À l'origine, de nombreuses stations d'épuration des eaux usées ont été planifiées pour le traitement des eaux domestiques, sans nécessairement prendre en compte les effets sur les microorganismes impliqués dans les processus biologiques de traitement [04]. La tendance à regrouper les effluents municipaux, hospitaliers et industriels pour les traiter dans une même station d'épuration, bien qu'économiquement avantageuse, accroît le risque de contamination des eaux à traiter par des micropolluants.

Avec les améliorations des techniques d'analyse, la détection quasi systématique de micropolluants, résistants biologiquement ou difficilement dégradables, dans diverses sources d'eau a été signalée. Leurs effets sur le processus des boues activées ont

INTRODUCTION GENERALE

traditionnellement été évalués pour réduire la pollution de l'eau, ce qui pourrait compromettre les performances normales des systèmes de traitement [06]. Ces substances exercent également une action inhibitrice sur la biomasse, altérant de manière significative l'efficacité du processus de traitement [07]. La façon dont les micropolluants évoluent dans le processus de traitement reste peu connue, et les espèces microbiennes réagissent de manière variable aux agents toxiques en fonction de l'espèce bactérienne et de leur statut physiologique [08].

Par conséquent, leurs répercussions sont modulées par divers facteurs tels que la maturité des boues, l'accoutumance de la biomasse à la substance toxique, la concentration des micropolluants, la particularité des microorganismes présents dans les boues activées et la période pendant laquelle la biomasse est exposée à la substance toxique [09]. Parmi les agents émergents, les composés pharmaceutiques destinés à un usage humain et vétérinaire, ainsi que les produits de soins corporels et leurs résidus, forment un nouveau groupe de substances chimiques anthropiques qui pénètrent dans notre environnement. Ils ont été détectés dans diverses sources d'eau [10] et suscitent des préoccupations croissantes sur le plan environnemental [11-12]. Par ailleurs, ces substances, notamment les antibiotiques, peuvent se retrouver dans les stations d'épuration des eaux usées (*STEP*) ainsi que dans la biomasse épuratrice, cette dernière est souvent considérée comme un déchet organique potentiellement dangereux pouvant être recyclé en agriculture, que ce soit après avoir subi ou non un traitement biologique [13]. Les antibiotiques, en tant qu'inhibiteurs, peuvent fréquemment interférer et compromettre l'efficacité des systèmes de traitement biologique [08, 14]. Leur action inhibitrice se traduit par une réduction de la dégradation du carbone organique et de l'azote, une altération de la séparation entre les phases solide et liquide, ainsi qu'une modification des caractéristiques de la biomasse épuratrice. Ces impacts ont donc des répercussions sur la performance globale du traitement épuratoire [15]. Effectivement, l'absence d'inhibition à certaines concentrations ne garantit pas automatiquement des conditions non inhibitrices. En cas de faibles concentrations, ces substances peuvent agir en tant que micronutriments pour la biomasse de boues activées [02].

Bien que les mécanismes par lesquels les antibiotiques affectent les processus biologiques ne soient pas entièrement définis, il est important de noter qu'après administration, les antibiotiques ne sont souvent pas complètement métabolisés dans le corps humain et sont par conséquent excrétés dans les eaux résiduaires [16]. Environ 25 % de ces substances, lorsqu'elles entrent dans les stations d'épuration des eaux usées sont rejetées dans l'environnement aquatique [17]. Si elles ne sont pas éliminées pendant le traitement, elles

INTRODUCTION GENERALE

peuvent atteindre les eaux de surface et encore l'eau potable [18]. Outre le risque de développement de la résistance antibactérienne, encore mal compris, les agents antibactériens ou leurs résidus peuvent compromettre la capacité des boues activées dans les stations d'épuration des eaux usées à décomposer ces composés, ainsi qu'à oxyder le carbone organique ou nitrifier l'ammonium en raison de leur toxicité envers les bactéries responsables de ces processus [17]. Certains antibiotiques peuvent devenir actifs une fois métabolisés, tandis que d'autres agissent sous une première forme active [13].

Parmi les antibiotiques les plus consommés et suscitant une attention particulière, l'Amoxicilline (*AMX*), un antibiotique de la famille des bêta-lactamines, est couramment employé dans les traitements antibiotiques et possède des caractéristiques génotoxiques pour tous les êtres vivants, qu'ils soient individus ou organismes [13]. L'*AMX* a été sélectionné dans cette étude pour deux raisons principales : premièrement, moins de 30 % d'une dose d'*AMX* utilisée n'est pas métabolisée par le corps. Cela signifie que l'*AMX* excrété par le corps est présent sous forme active plutôt que sous forme de produits de transformation, permettant ainsi de simuler les tests expérimentaux avec l'utilisation des principes actifs directs. Deuxièmement, l'*AMX* est utilisé pour traiter une variété d'infections, ce qui en fait un candidat propice à inclure dans les approvisionnements médicaux.

L'essai biologique rapide [08, 19], une méthode simple, économique, mais néanmoins sensible et adaptée à la population de boues activées [20], est employé pour évaluer la toxicité ainsi que son éventuel impact sur la biomasse des stations d'épuration des eaux usées [21]. Plusieurs méthodes ont été proposées dans la littérature spécialisée [15, 22], bien que peu d'études comparatives aient été rapportées récemment [23]. La respirométrie [02, 09], une technique intensivement utilisée, a été proposée comme l'un des tests de caractérisation des effluents [19] et du comportement des boues activées en termes de toxicité [02]. Elle est considérée comme l'une des méthodes les plus sensibles, économiques et efficaces, particulièrement lorsqu'elle est appliquée dans les stations de traitement des rejets [08]. La méthode, habituellement mise en place selon le protocole de l'*OCDE-209* [22, 23] et la norme *ISO 8192* [08], repose sur le principe que la respiration (oxydation du carbone et/ou de l'ammonium) des boues activées, dans des conditions données, est entravée en présence d'inhibiteurs [24]. Par conséquent, le taux de consommation d'oxygène (*OUR*) entre le cas d'addition du substrat seul (*blanc*) suivi par l'ajout du substrat contenant le toxique, à différentes concentrations [07], fournit une indication directe de l'impact sur la dégradation du substrat et donc sur la cinétique microbienne de croissance et/ou d'inhibition [02, 12, 15].

INTRODUCTION GENERALE

Cette méthode est particulièrement sensible à des facteurs tels que la température, l'oxygène dissous, et la matière organique ou le substrat. Elle a été développée pour minimiser le nombre d'expériences, réduire à la fois les coûts et la durée des tests pour obtenir la réaction de la biomasse à divers composés, permettant ainsi une fusion aisée des résultats et permet d'évaluer le degré de toxicité pour protéger le processus biologique aérobie [19], dans les stations d'épuration des eaux usées [08, 21]. Bien que largement utilisée et appliquée dans ces contextes, l'inhibition des activités biologiques de la boue activée peut avoir des conséquences écologiques et financières significatives [02]. Parmi tous les produits toxiques examinés dans la littérature, les analyses respirométriques sont incontestablement les plus couramment utilisées [06], en tant que mesure préventive. Cependant, il convient de noter que des faux résultats ont été signalés à certaines occasions [25].

L'essai d'inhibition par la technique respirométrique semble avoir été appliqué avec succès depuis sa première publication [19], suscitant récemment un intérêt croissant pour l'analyse des caractéristiques des eaux usées et le fonctionnement des boues activées. Les profits d'*OUR* (Oxygen Uptake Rate = Taux de Consommation d'Oxygène) ont été interprétés pour évaluer de nouveaux processus [15], identifier différentes fractions de la *DCO*, pouvant servir de paramètre direct équivalent au substrat carboné [26], et déterminer les coefficients principaux d'*OUR* [15]. Cependant, il est important de noter que certains résultats erronés ont été rapportés dans quelques cas [24]. Un outil parfait pour évaluer la toxicité dans les *STEP* n'existe pas [08]. Cela inclut des respirogrammes parfois présentant une phase bi-phasique, des traces de doses-effets altérées, ainsi que des concentrations inhibitrices (*CI*) parfois bien plus faibles que prévu, comme dans le cas de l'*AMX* [24]. Malheureusement, il existe peu d'études expérimentales sur les effets des antibiotiques [14], plus précisément, l'effet d'*AMX* sur l'activité bactérienne de la biomasse aérobie présente dans les boues, malgré son examen par la respirométrie en tant que polluant secondaire.

En général, l'inefficacité des stations d'épuration des eaux usées, notamment les stations conventionnelles, face à la présence d'antibiotiques, conduit automatiquement à leur rejet dans l'environnement où ils s'accumulent [27]. Ces stations ne sont pas conçues pour éliminer efficacement ces micropolluants pharmacologiquement actifs [28-29], contribuant ainsi à la contamination des environnements aquatiques [13]. L'élimination de ces composés est complexe, coûteuse, et nécessite souvent un cycle spécifique de traitement, englobant une série d'étapes à la fois physico-chimiques et biologiques [30], cette approche est de plus en plus pertinente, notamment avec l'évolution des normes de qualité de l'eau vers plus de strictes. De nombreuses études sont actuellement menées pour comprendre et améliorer

INTRODUCTION GENERALE

l'élimination des produits pharmaceutiques à travers l'utilisation de la technologie des bioréacteurs à membrane (*MBR*). Les *MBR* associent l'épuration biologique, la clarification/désinfection et la séparation solide/liquide par membrane au sein d'une même unité. Bien que les *MBR* soient généralement réputés pour offrir des performances supérieures à celles des *STEP* traditionnelles en ce qui concerne la dégradation biologique de la matière organique [13], leur efficacité par rapport aux micropolluants est moins documentée. Les *MBR* souvent opérationnelles à des âges de boues élevés et à des concentrations biomasse élevées, ces installations encouragent l'intensification des processus biologiques, ce qui peut améliorer l'élimination de contaminants caractérisés par leur faible biodégradabilité et leur faible concentration [31].

Les mécanismes sous-jacents à l'élimination par les bioréacteurs à membrane (*MBR*) restent encore peu élucidés : s'agit-il de dégradation biologique, d'adsorption sur les boues, ou d'une combinaison des deux ? L'éventuelle adsorption de ces composés ne modifie pas seulement la disponibilité du polluant pour la biodégradation, mais représente également une contrainte supplémentaire lors de l'élimination des boues. Malgré que ce processus multifonctionnel offre des résultats prometteurs en ce qui concerne la qualité et l'efficacité du traitement, sa mise en œuvre demande une gestion adéquate de divers outils pour contrôler les processus physiques et biologiques spécifiques. Les coûts élevés des *MBR* et la menace de colmatage de membrane [31], fabriquée à partir de polymères organiques comme le *PVDF*, le *PE* et le *PES*, doivent être pris en compte de manière significative.

Cette recherche, réalisée au Laboratoire d'Ingénierie des Procédés de l'Environnement (*LIPE*) de l'Université Constantine 3 en Algérie et à l'Institut Européen des Membranes (*IEM*) en France dans le cadre d'une thèse de doctorat troisième cycle, examine l'élimination de l'*AMX* et de ses métabolites par un bioréacteur à membrane immergée (*MBRI*). L'application de la technologie *MBR* vise à évaluer son potentiel dans la dégradation de l'*AMX*, précédé par l'établissement d'une méthode respirométrique et de développer une technique dotée d'un protocole unique permettant la détection rapide de l'inhibition du fonctionnement de la biomasse épuratrice. L'objectif est de prévenir les éventuels dysfonctionnements des stations d'épuration des eaux usées et de protéger les milieux aquatiques. Cette thèse, qui comprend une revue bibliographique et tous les résultats obtenus, est structurée en six chapitres :

- **Le premier chapitre** présente une revue bibliographique couvrant les aspects des eaux usées, le problème de la présence des antibiotiques dans l'environnement aquatique, les risques associés, en mettant l'accent sur l'Amoxicilline en tant que

cas d'étude. Il examine également les procédés et mécanismes potentiels de traitement et d'élimination.

- **Dans le deuxième chapitre**, nous examinons les bioréacteurs à membrane, en discutant de la qualité des eaux produites par ce type de réacteur biologique ainsi que de son efficacité dans le traitement des eaux usées contenant des produits pharmaceutiques.
- **Le troisième chapitre** est dédié à la présentation des effluents utilisés, à la préparation des effluents synthétiques, à la description des diverses sources de boues activées employées, ainsi qu'à la méthodologie de leur préparation avant leur utilisation dans les tests. Il expose également en détail les paramètres surveillés au cours de cette étude.
- **Le quatrième chapitre** regroupe la description et la mise en place d'un respiromètre, avec l'établissement d'un protocole unique pour les différentes expérimentations.
- **Le cinquième chapitre** présente les résultats expérimentaux des tests de consommation du substrat et d'inhibition par l'Amoxicilline dans différentes situations.
- **La dernière partie, le sixième chapitre**, aborde l'utilisation de la technologie des bioréacteurs à membrane et leurs performances après leur montage, en fixant les différents paramètres de fonctionnement, pour l'élimination de la molécule d'Amoxicilline.

La conclusion générale de cette étude regroupera tous les résultats et les perspectives, mettant en évidence l'efficacité de la respirométrie en tant qu'outil de contrôle et de caractérisation, ainsi que la capacité du *MBRI* à éliminer l'Amoxicilline et d'autres produits pharmaceutiques.

Chapitre I

Ce premier chapitre se concentre sur une analyse de la littérature portant sur les eaux usées et les différents processus de traitement biologique impliquant les boues activées. L'objectif qui suit est de mettre le point sur les connaissances relatives aux micropolluants dérivant de l'activité pharmaceutique, qu'elle soit industrielle ou domestique. Cela inclut les propriétés physico-chimiques, la dégradation, les voies d'utilisation, les émissions dans l'environnement, les niveaux de contamination, etc. En conclusion de ce chapitre, une synthèse bibliographique est présentée concernant la molécule spécifique étudiée dans notre recherche, l'antibiotique Amoxicilline (*AMX*), ainsi que leurs impacts sur les boues des stations d'épuration traditionnelles (*STEP*).

1. LES EAUX USEES :

1.1. Origine des Eaux Usées :

L'objectif du traitement des eaux usées est de produire de l'eau propre (épuration) qui respecte les normes de rejet établies par la réglementation. Cependant, il est raisonnable de considérer que la pollution de l'eau implique une altération de ses propriétés physico-chimiques et biologiques. La modification dans les niveaux de contaminants est également un autre critère à prendre en considération lors des traitements à envisager ; les niveaux de polluants peuvent varier selon le type de rejet et surtout selon les conditions du processus industriel. De manière habituelle, les eaux usées sont regroupées en trois principales catégories : les eaux usées domestiques (*EUD*), les eaux usées industrielles (*EUI*) et les eaux pluviales et de ruissellement (*EUPR*). Certains polluants, capables de perturber le bon fonctionnement des stations (graisses et huiles, métaux lourds, médicaments, etc.) doivent faire l'objet d'un prétraitement à l'usine. Dans plusieurs cas, les paramètres usuels de la qualité d'eau ne sont pas applicables car ils ne sont pas spécifiques des effets néfastes sur la vie aquatique, par exemple, la Demande Chimique en Oxygène (*DCO*) est un indice global des matières organiques (*MO*) sans distinction des matières toxiques ou non [04].

1.2. Caractéristiques des Eaux Usées :

La quantité et le flux des eaux usées peuvent être évalués à l'aide de différentes méthodes et paramètres, la préoccupation croissante, dans ses multiples usages, concernant la qualité d'eau, a conduit à déterminer pour les eaux usées, tant domestiques qu'industrielles, de nombreuses paramètres spécifiques. Il s'agit de :

- La *DBO* (Demande Biochimique en Oxygène) qui détermine la teneur en matières organiques (*MO*) biodégradable [15-17].

- La *DCO* (Demande Chimique d'Oxygène) évalue les matières organiques dans leur globalité, en distinguant entre les fractions biodégradables et réfractaires.
- Le *COT* (Carbone Organique Total) ainsi que la *DTO* (Demande Totale en Oxygène) fournissent également une indication de la teneur en matières organiques globales [14, 18-19].
- Les *MES* (Matières En Suspension) comprenant les fractions totales et volatiles (*MVS*).
- Le *pH*, la teneur en résidus secs, l'alcalinité, l'acidité, les concentrations d'azote et de phosphore, les métaux lourds.
- Matières minérales, ainsi les micropolluants (à savoir les produits pharmaceutiques) [20-21].

Les eaux usées sont caractérisées par un assemblage complexe de matières non dissoutes dans l'eau, comprenant des matières organiques (*MO*) et minérales, des graisses, des savons, des protéines et des glucides ainsi que leurs produits de dégradation. Elles contiennent également des détergents, des produits pharmaceutiques, des huiles minérales et des résidus de matières cellulosiques [25]. De plus, les eaux usées hébergent tous les microorganismes excrétés avec les matières fécales [26]. On doit souligner que la présence de rejets industriels dans le réseau d'égout municipal peut modifier ces concentrations [27].

1.3. Les Eaux Usées Pharmaceutiques :

Les effluents provenant des activités hospitalières peuvent être considérés comme des eaux usées domestiques, mais présentent des caractéristiques spécifiques en raison de leur potentiel dangereux pour les êtres vivants et l'environnement. Ils ont un impact négatif sur le traitement biologique en station d'épuration (*STEP*) en raison de la nature et de l'importance des substances spécifiques qu'ils contiennent. Ces effluents sont évacués, comme les rejets urbains classiques, vers le réseau d'assainissement communal sans traitement préalable. Les eaux résiduaires des industries pharmaceutiques ainsi que celles des établissements de soins se distinguent des eaux résiduaires domestiques par la présence potentielle de molécules médicamenteuses spécifiques administrées exclusivement en milieu hospitalier, ainsi que des concentrations élevées de médicaments et de leurs métabolites. Du point de vue microbiologique, les concentrations en germes indicateurs sont généralement plus faibles dans les effluents hospitaliers que dans les effluents urbains, en raison probablement de concentrations élevées en désinfectants et en antibiotiques, avec une moyenne entre 104 et 106 germes par millilitre. Les souches bactériennes hospitalières se

caractérisent par leur résistance aux antibiotiques, bien que leur survie dans l'environnement soit encore mal connue. Les risques associés aux effluents hospitaliers peuvent être classés en deux catégories : un risque biologique, notamment infectieux et de contamination, et un risque chimique ou toxique [30].

Selon plusieurs sources [32-34], diverses techniques de dépollution sont décrites pour traiter les eaux industrielles contaminées. Pour ce qui est des polluants émergents présents à des niveaux de traces dans les eaux usées industrielles, les rejets des industries pharmaceutiques ont conduit à des seuils de détection très bas, mettant ainsi en évidence, au cours des dernières années, la présence de nombreuses molécules dans les milieux aquatiques. Malgré leur présence à des concentrations très faibles (allant de ng/L à $\mu g/L$), les composés suscitent des inquiétudes au sein de la communauté scientifique en raison de leur potentiel à perturber les fonctions endocrines des organismes aquatiques [37-38]. Cependant, lorsqu'on évalue l'efficacité d'une *STEP* dans l'élimination des produits pharmaceutiques, il est crucial de prendre en compte la présence de multiples métabolites ainsi que la possible formation de sous-produits de dégradation (ces métabolites), qui sont souvent omis dans les études initiales. Des recherches récentes ont en effet démontré leur présence significative à l'entrée et à la sortie des *STEP* à des concentrations non négligeables [39-42].

2. PROCÉDES DE TRAITEMENT DES EAUX USEES :

Il existe une diversité de procédés de traitement des eaux usées, dont la sélection dépend à la fois des propriétés des eaux à traiter et du niveau d'épuration souhaité. Le choix d'un procédé de traitement, ou même d'une combinaison de plusieurs procédés, est influencée par plusieurs facteurs, notamment :

- Les caractéristiques de l'eau résiduaire ;
- Les exigences de qualité de l'effluent souhaité ;
- Les considérations relatives aux coûts et à la disponibilité des terrains ;
- Les évolutions des normes de rejets.

Il est important de noter qu'un problème d'épuration donné peut avoir plusieurs options de traitement disponibles, *Figure 1.01*, chacune capable de produire l'effluent souhaité. Parmi celles-ci, une seule s'avérera être la plus économique. Le traitement biologique dans les stations d'épuration classiques est généralement considéré comme le plus crucial [41-44].

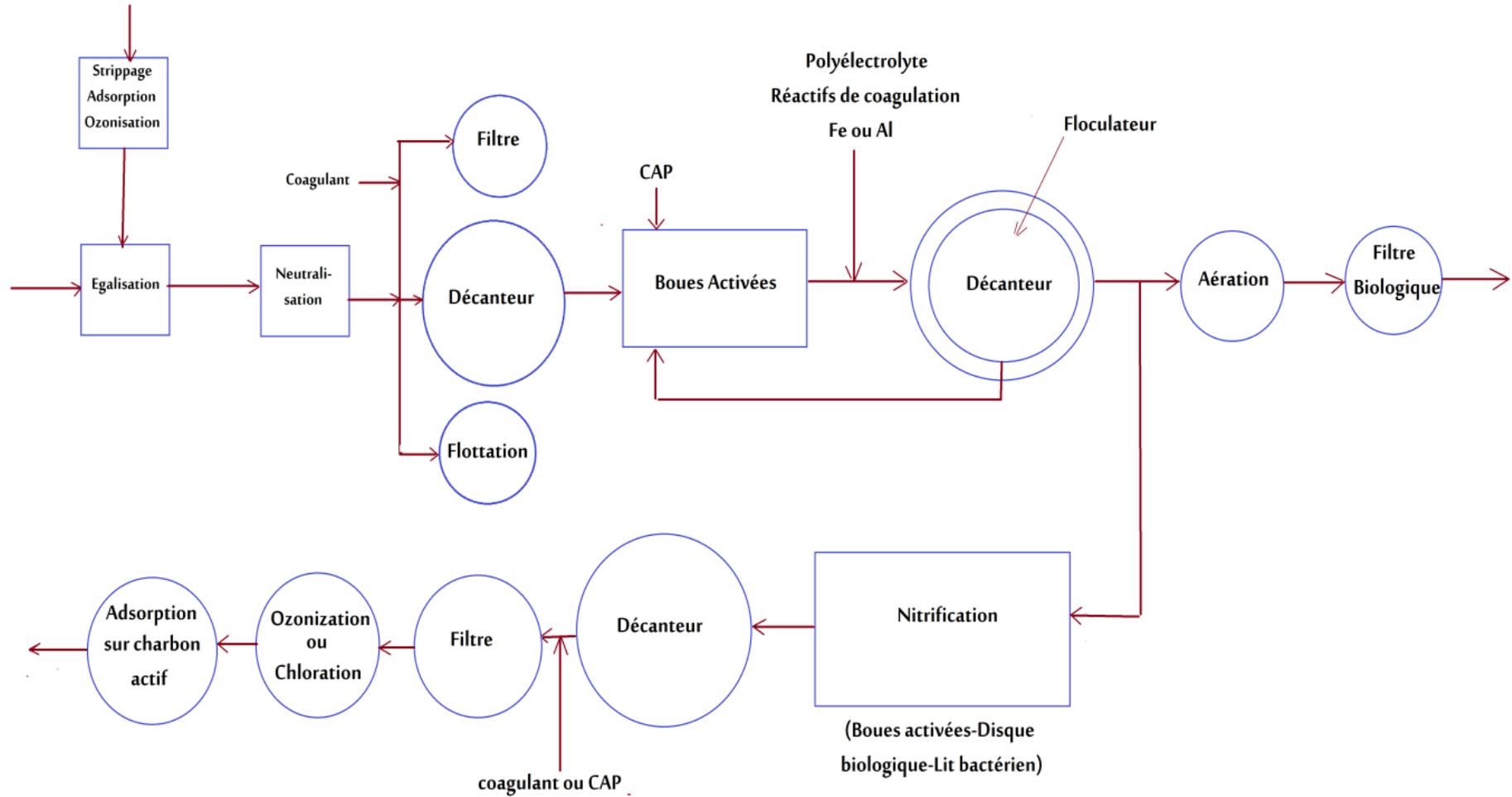


Figure I.01 : Différentes chaîne de traitement possibles pour l'épuration des eaux usées [44].

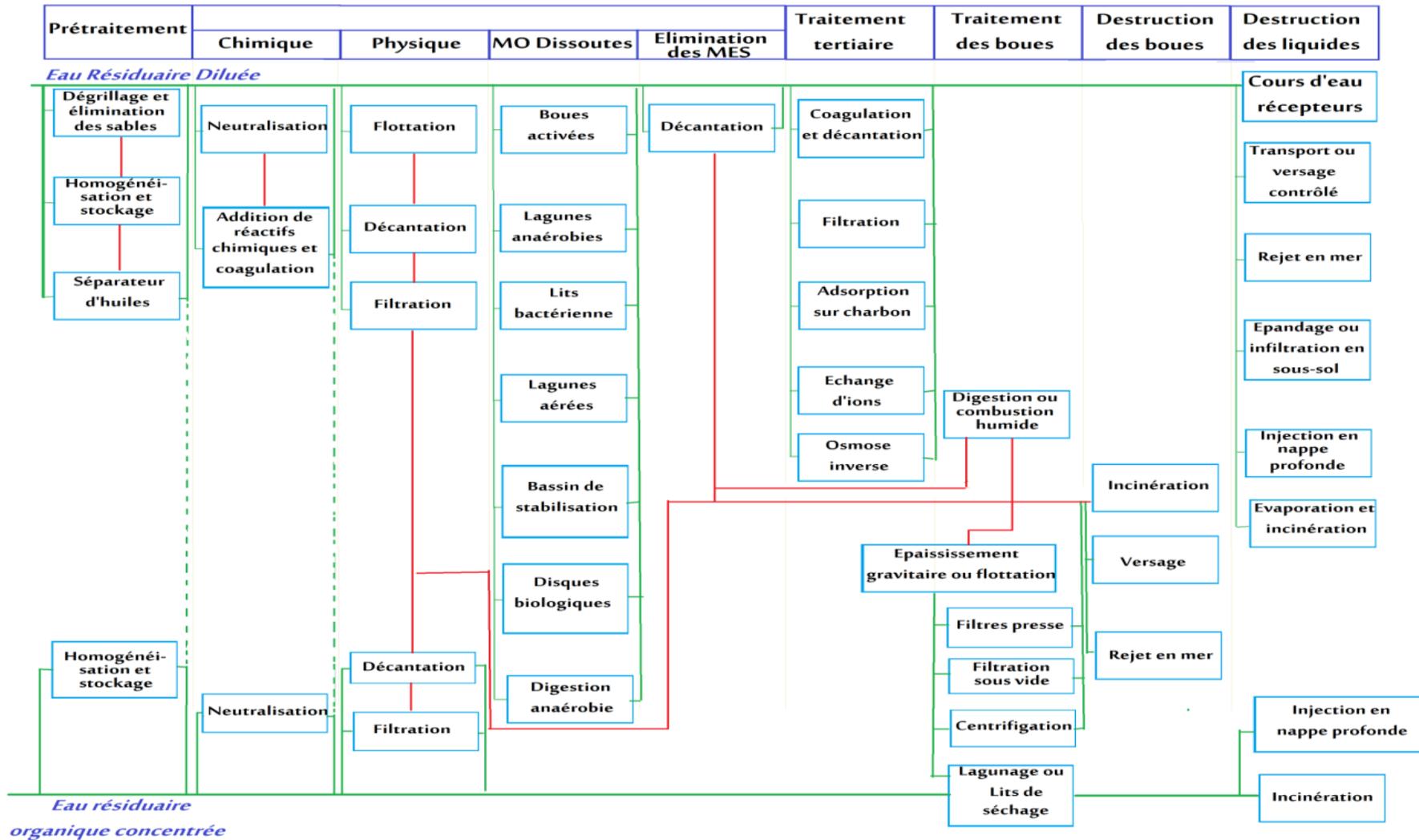


Figure I.02 : Chaîne de traitement avec les diverses alternatives possibles [41].

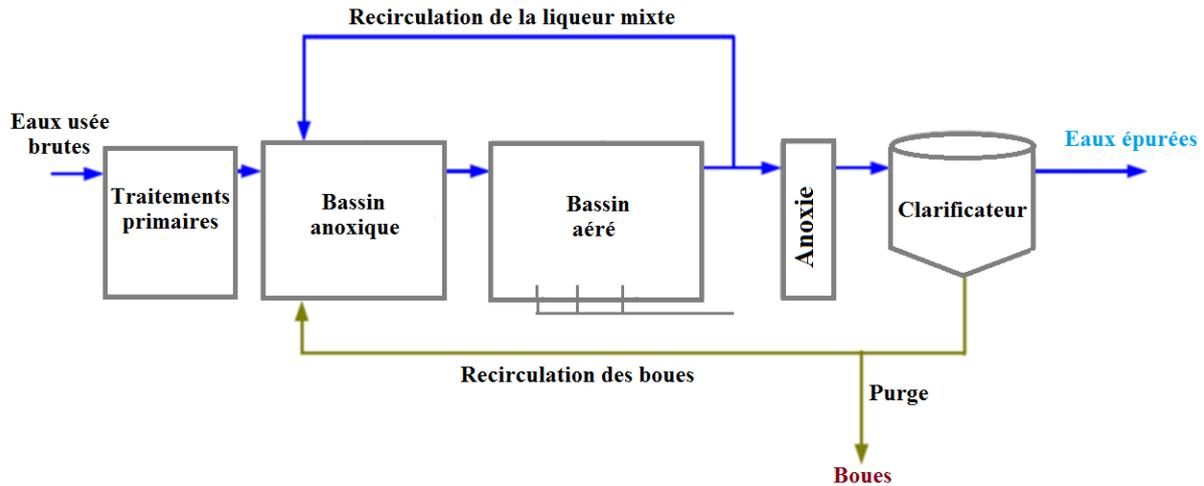
La *Figure I.02* montre une chaîne de traitement des eaux usées avec différentes alternatives possibles [45]. Dans le *Tableau I.01*, les directives générales concernant les prétraitements des eaux usées avant leur traitement biologique ont été regroupées [46-51].

Tableau I.01 : *Prétraitement exigé pour les procédés biologiques* [51].

Polluants	Traitement
Matières en suspension	Lagunage, décantation et flottation.
Huile ou graisse	Ecumage ou séparateur.
Métaux lourds	Précipitation ou échange d'ions.
Alcalinité et acidité	Neutralisation.
Sulfures	Précipitation ou stripage.
Variation de la charge (<i>DBO</i>)	Bassin d'égalisation.

Les *STEP* des eaux usées sont généralement implantées en aval des zones urbaines afin de recevoir les eaux usées par gravité. Le traitement primaire implique l'utilisation de procédés physico-chimiques pour purifier l'eau. Les déchets solides de grande taille sont éliminés par un processus de grillage, suivi d'un dessablage qui élimine les particules de sable par décantation. Ensuite, le déshuilage est effectué pour éliminer les graisses par flottation, généralement dans un bassin aéré avec raclage de surface. Les *STEP* modernes évitent souvent l'utilisation de décanteurs primaires pour minimiser la gestion des boues primaires. Le traitement secondaire, de nature biologique, est réalisé grâce à l'action des bactéries qui dégradent la matière organique, effectuent la nitrification et la dénitrification. La biodégradabilité est optimale lorsque le rapport de la demande chimique en oxygène (*DCO*) à la demande biochimique en oxygène pendant cinq jours (*DBO₅*) est inférieur à 2. En revanche, elle est fortement limitée lorsque ce rapport dépasse 5 [52], et la quantité de composés non dégradables biochimiquement est considérablement élevée lorsque ce rapport tend vers *zéro* [53].

En raison du fait que le carbone est le polluant présent en plus faible proportion par rapport aux besoins nutritionnels des bactéries. Il est nécessaire donc de limiter sa consommation afin que les autres polluants soient également dégradés. C'est pour cet raison que le bassin anoxique de la dénitrification est placé en amont du bassin aéré où s'effectue le processus de nitrification. L'un des inconvénients de ce système est l'importance de recycler la liqueur mixte depuis le bassin aéré vers le bassin anoxique. Afin de poursuivre le traitement, les boues activées sont séparées de l'eau épurée par décantation et transférée en tête de *STEP*. L'eau épurée peut éventuellement soumise à des traitements complémentaires (tertiaires) avant rejet dans les milieux aquatiques naturels *Figure I.03* [54].



SAKHRAOUI M. (2017)

Figure I.03 : Présentation simplifiée d'un système d'épuration des eaux usées [54].

2.1. Procédés de traitement Biologique :

L'application biotechnologique du traitement biologique est une méthode ayant une longue histoire ; les premières réalisations à caractère industriel datent de la fin du *XIX^e siècle* pour les cultures fixées et du début du *XX^e siècle* pour les cultures en suspension. Cette discipline scientifique est caractérisée par un certain nombre de spécificités qui la distinguent d'autres applications biotechnologiques plus nobles, les domaines agroalimentaire et pharmaceutique. Ainsi le substrat, l'eau usée, qui joue le rôle de *MO*, a des caractéristiques quantitatives qui ne sont pas maîtrisées, parce que non maîtrisables, par l'exploitant du fonctionnement de *STEP*. En effet, les différentes origines des eaux usées, fait qu'il s'agit d'un substrat très complexe et hétérogène qui varie dans le temps en terme de flux, de concentration et de sa composition qui n'est pas stérile. Par conséquent, les processus d'épuration biologique à boues activées sont également compliqués ; il s'agit d'une véritable culture mixte. Une autre conséquence du caractère complexe du substrat et de biomasse active est la difficulté de décrire le processus en utilisant des modèles mécanistiques, il est possible de prédire de manière fiable les performances en termes de qualité de l'eau traitée. Cela s'applique notamment au dimensionnement des bioréacteurs et des *STEP* qui s'est fait jusqu'à très récemment sur la base de règles empiriques considérant le contenu du réacteur comme une boîte noire [55-56].

Les mécanismes d'élimination des polluants et micropolluants sont la transformation en matière inoffensive par oxydation aérobie, rendant le processus énergivore, et la conversion, via l'assimilation microbienne, des composés de la phase liquide en composés de la phase solide qui nécessitent une séparation ultérieure. Le processus conduit donc à un sous-produit

encombrant : les boues résiduelles dont la minimalisation et l'évacuation constituent majeur problème du traitement des eaux.

Le traitement biologique, malgré l'absence de valeur marchande des sous-produits et le scepticisme initial des acteurs professionnels envers la biologie, est devenu une biotechnologie à part entière jouant un rôle crucial dans la préservation de l'environnement aquatique. Dans la suite, nous aborderons successivement la composition des eaux, leur impact sur les milieux récepteurs et les objectifs du traitement biologique, les mécanismes biologiques impliqués, ainsi que les différentes configurations de procédés couramment utilisées [57].

2.1.1. Principe du Traitement Biologique :

Le traitement des eaux comprend deux étapes préliminaires réalisées par des opérations physiques : le dégrillage et la sédimentation, dont les objectifs sont l'élimination des objets en suspensions facilement décantables. Cela se traduit par une réduction de la concentration des polluants (50% des matières en suspension, 30% de la demande chimique en oxygène, et 10% d'azote et de phosphore), bien que ces niveaux ne soient souvent pas satisfaisants pour la plupart des cas de rejets. En effet, la *MO* consommatrice d'oxygène, finement dispersée et dissoute, reste présent ainsi que l'ammonium et le phosphore dissous. Pour éliminer ces fractions, on utilise des procédés biologiques dont les objectifs, non limités [58], peuvent inclure :

- ✓ Réduire la teneur en *MO*.
- ✓ Convertir l'ammonium en nitrate pour réduire sa concentration.
- ✓ Transformer l'azote en azote moléculaire pour diminuer sa présence.
- ✓ Réduire la teneur en phosphore.

2.1.2. Les Mécanismes Biologiques :

Les procédés biologiques continus à biomasse bactérienne majoritairement aérobie. On connaît les cultures en suspension, où la biomasse active se trouve en suspension dans les eaux, qui parcourent le bioréacteur. Cette biomasse étant obligatoirement entraînée avec l'eau (épurée) sortant du réacteur, une phase de séparation liquide/solide est indispensable. Une partie de la biomasse ainsi séparée est retournée vers le bioréacteur comme ensemencement. Cette approche permet de distinguer le temps de rétention hydraulique du temps de séjour de la biomasse dans le bioréacteur [58].

2.1.2.1. La conversion des Matières Organique (*MO*) :

La conversion des *MO* consiste en deux phénomènes associés : (i) le transfert des matières finement particulaire et dissoutes vers une phase solide, facilement séparable d'eau ; (ii) l'oxydation d'une partie des *MO* (transférées) avec comme produits finaux essentiellement le

CO_2 et le H_2O inoffensifs [59]. Il en résulte une nouvelle biomasse qui est constituée de *MO* inertes (non hydrolysée) et d'organismes vivants. L'oxydation partielle, d'environ $1/3$ des *MO*, fait que leur quantité formant cette nouvelle biomasse est plus faible que la quantité qui a conduit à sa formation, cependant elle représente environ les $2/3$. Elle doit donc être éliminée d'eau pour éviter qu'elle joue à son tour le rôle de matière polluante.

Sa nouvelle forme (flocs facilement déclinables) permet maintenant effectivement cette séparation. Après cette première étape de transformation et d'oxydation, il s'en suit schématiquement une deuxième.

Effectivement, la durée moyenne de séjour de la biomasse formée dans le réacteur est plutôt élevée et ce variées de plusieurs *jours* à plusieurs *semaines*. Pendant ce séjour, une grande fraction des biomasses meurt et se désintègre par une lyse bactérienne. Les *MO* libérées créent un nouveau substrat biodégradable (en grande partie le parois cellulaires) et une nouvelle biomasse moyennant une oxydation partielle.

La *MO* est donc recyclée par morts et régénérations successives avec une perte sous forme de CO_2 et H_2O . Dans la réalité, la biomasse nette produite se situe entre $0,3$ et $0,45$ kg de matière par kg de *DCO* éliminée. L'avantage d'une production réduite de boues résiduaires réside non seulement en une diminution des problèmes d'évacuation, mais aussi en le caractère peu putrescible, et donc relativement peu offensif, des boues (puisque la majeure partie de fractions biodégradables a déjà été oxydée).

Lorsque la production nette de nouvelles *MO* diminue avec le temps de séjour de la biomasse dans le réacteur, la fraction oxydée, et par conséquent la quantité d'oxygène consommée, est également affectée et augmente avec elle. En effet, une grande partie d'oxygène apportée couvre les besoins d'oxydation des produits de lyse cellulaire. Cette consommation de base, appelée respiration endogène, relativement lente et constante est quasiment indépendante des variations dans l'arrivée de substrats avec les eaux usées. En revanche, ces variations induisent une consommation d'oxygène liée à l'oxydation de composés fortement biodégradables. Cette respiration exogène est rapide et fortement variable [60].

2.1.2.2. Les *MO* Résiduelles :

Le traitement des eaux consistant, quant aux *MO*, pour l'essentiel en le transfert des matières finement particulières et difficilement séparables d'eau et des matières dissoutes vers une phase solide facilement séparable. Le Transfert des fractions solides et colloïdales vers la biomasse présente dans le bioréacteur est rapide et complet. Un temps de séjour *10 min* permet à fixer 70% des *MO* sur la biomasse. Il s'agit d'un processus d'adsorption en grande partie

physique. Le transfert des *MO* dissoutes est très lent et la cinétique de transfert est fonction du type de substrat. Cependant, compte tenu du temps de contact dans le réacteur, le transfert est quasiment complet. Seules échappent au processus de transfert les molécules dissoutes non biodégradables présentes dans les eaux (environ 5%).

La condition pour ce transfert, et c'est là le facteur biologique, est un état de saturation de biomasse avec réserves extra et intra cellulaire limitées. Il est donc nécessaire de respecter un rapport entre le flux de *MO* et la biomasse qui permet à cette dernière de digérer suffisamment les *MO* et notamment de vivre avec une réserve réduite. Le rapport de la charge spécifique en $kg_{DCO}/kg\text{-biomasse}/jour$, lorsqu'il est trop élevé, une diminution des vitesses de transfert, et par conséquent, le rendement d'épuration. Si l'on peut considérer qu'à 5% près, une transformation des *MO* vers la phase solide. Il est peu courant d'obtenir des taux d'épuration de 95% de *DCO*.

Quant aux éléments nutritifs, l'azote et le phosphore, ils sont partiellement intégrés dans la biomasse à des taux d'environ 6% et 2% par rapport aux matières sèches respectivement. Cela conduit, à des rendements d'élimination de 20% et 35%. On observe des résidus dissous d'ordre 10%, soit $50 mg_{DCO}/L$ pour une eau usée moyenne [57]. Cela s'explique par le fait qu'une partie dissoute de *MO* sont des métabolites bactériens produits lors des processus de biosynthèse [61-64].

La concentration des *MO* produites pendant le processus d'épuration est généralement liée à la concentration des eaux usées brutes, mais elle dépend également du taux de recyclage de la biomasse. À chaque cycle, une fraction des substances difficilement biodégradables, à caractère humique est libérée, les *MO* se trouvent, à la suite du passage d'eau dans le réacteur biologique, pour 90% sous forme solide ou gazeuse (CO_2).

L'élimination des particules solides dépendra de l'efficacité de l'étape de séparation physique, qui se déroule lors de la clarification par sédimentation gravitaire. Le rendement de ces dispositifs de séparation n'est pas influencé par la concentration de *MES* dans l'eau, et une concentration de $20 mg/L$ de *MES* peut être atteinte en fonctionnement normal [57-58].

2.1.2.3. Les Transformations d'Azote et de Phosphore :

La fraction d'azote éliminé avec les *MO* était relativement faible, encore environ 80% d'azote restent présents dans les eaux traitées sous forme d'ammonium. Pour beaucoup d'eaux réceptrices cette faible élimination sera insuffisante et il est nécessaire d'aller plus loin, soit par la transformation d'ammonium toxique et consommatrice d'oxygène, en un nitrate moins nocif (la nitrification), soit encore par la transformation à son tour de nitrate en azote moléculaire conduisant à l'élimination réelle de l'azote d'eau (la dénitrification) [57-58].

a. La Nitrification :

La nitrification effectuée à l'aide de l'action de deux types de micro-organismes, *Nitrosomonas* et *Nitrobacter*, respectivement responsables pour la modification de l'ammonium en nitrite et puis transférer en nitrate qui sont absentes des eaux brutes. Leur présence dans le bioréacteur peut être provoquée par le choix d'un rapport réduit entre le débit de *MO* et la masse de biomasse. Les mécanismes de sélection engendrés par cette charge légère sont différents pour les cultures en suspension et les cultures fixées. Toute culture en suspension est caractérisée par un taux de croissance spécifique net, exprimé en *kg biomasse produite par jour* pour chaque *kg* de biomasse présente dans le réacteur, et d'un âge des boues ou un temps de séjour moyen des solides (exprimé en *jours*). Un organisme, dont le taux de croissance maximum est, dans les conditions de fonctionnement du bioréacteur (température, teneur en oxygène, ...) plus faible que le taux de croissance réelle de la culture, ne peut s'y installer ni s'y maintenir durablement. Or, les bactéries nitrifiantes et notamment *Nitrosomonas*, ont un taux de croissance spécifique maximal relativement bas par rapport à celui de la plupart des bactéries hétérotrophes impliquées dans la décomposition des *MO* des eaux usées. Pour assurer la présence durable des bactéries nitrifiantes, l'âge des boues doit être d'environ plusieurs *jours*. Contrôler un âge de boue élevé (> 10 *jours*), qui n'est qu'un rapport entre les microorganismes présents et la fraction de biomasse extraite quotidiennement, est réalisée par l'extraction journalière d'une faible fraction de la biomasse (la 10^e par exemple) [65-69].

b. La Dénitrification :

Le processus de dénitrification, ne nécessite pas la présence des bactéries spécifiques. En l'absence d'oxygène moléculaire, de nombreuses espèces des biomasses hétérotrophes, présentes dans la culture mixte formée à partir du nutriment que contiennent les eaux usées, peuvent utiliser l'oxygène du nitrate à la place d'oxygène moléculaire. La dénitrification est donc provoquée par l'aménagement de zone et/ou de périodes d'anoxies (absence d'oxygène, présence de nitrates), où les *MO* sont oxydées à l'aide d'oxygène du nitrate préalablement formé à partir de l'ammonium par nitrification.

La vitesse de dénitrification est élevée lorsque les *MO* à oxyder correspondent au substrat rapidement dégradé, relativement faibles lorsqu'il s'agit d'oxydation des matériaux cellulaires libérés lors de la lyse des bactéries. Le rapport entre les *MO* rapidement dégradables et d'oxygène nitrique est trop faible pour assurer la dénitrification complète. Celle-ci peut être approchée soit par l'apport d'une source carbonée extérieure facilement dégradable, soit grâce à l'oxydation du matériau cellulaire [70-74].

c. La Déphosphatation :

La déphosphatation biologique dépend d'espèces bactériens qui enrichissent les cultures mixtes en accumulant le phosphore, elle nécessite à nouveau des exigences de sélection spécifique. Une alternance des conditions anaérobie et aérobie permet la sélection. Les organismes, majoritairement aérobies, étant placés dans des conditions anaérobies, sont peu actifs : l'absorption intracellulaire de substrat est faible, seule la lyse a lieu. Cependant, certains groupes bactériens, tels que *Acinetobacter*, sous des conditions anaérobies, elles peuvent assimiler des composés simples tels que l'acide citrique et les accumuler sous forme de matériaux de réserve intracellulaires après leur polymérisation en polyhydroxybutyrate (*PHB*). Le phosphate est donc libéré dans ces conditions anaérobies. Le *PHB* stocké est facilement oxydé lors de l'étape aérobie suivante. Cette oxydation génère un excès d'énergie qui est stocké sous forme de polyphosphate et utilisé pour faciliter l'absorption de l'acide acétique pendant l'étape anaérobie suivante. La formation du polyphosphate nécessite l'absorption de phosphate extracellulaire relargué en phase anaérobie. En phase anaérobie, l'eau présente une concentration élevée en phosphate tandis que la biomasse présente une concentration faible. En phase aérobie, la concentration en phosphate dans l'eau est réduite (1 à 3 mg/L) et la teneur en phosphate dans la biomasse est élevée, (4 à 5% par rapport aux matières sèches) [75-77].

2.1.3. Les Configurations des Installations :

Trois principaux types d'installations sont largement établis dans l'industrie : (i) les systèmes de boues activées ; (ii) les lits bactériens à écoulement ; (iii) les lits filtrants immergés. La configuration de culture en suspension, procédés dits boues activées, réunissent au minimum trois éléments, *Figure 1.04*, le bassin biologique d'aération, clarificateur et la recirculation. Le bassin aéré est alimenté par les effluents à traiter, éventuellement après une première décantation. Grâce à l'aération et à l'agitation, un milieu est créé propice au développement d'une culture bactérienne, les boues activées. Ces boues sont maintenues à une concentration de 3 à 5 kg/m³ moyennant une extraction de la production en excès, qui sont constituées d'agglomérats de matières inertes et de biomasse qui existent grâce aux exo-polysaccharides des bactéries. Laissés au repos ces agglomérats flocculent facilement ce qui permet leur séparation gravitaire dans le clarificateur. Peu de microorganismes dispersés existent dans des boues saines grâce à la présence de protozoaires prédateurs. Après sédimentation dans le clarificateur la concentration des boues double à peu près. Ce flux concentré est renvoyé vers le bassin à un débit équivalent au débit d'effluents, cela permet de maintenir une concentration de boues qui est nettement supérieure à celle qui s'établirait en absence de recirculation.

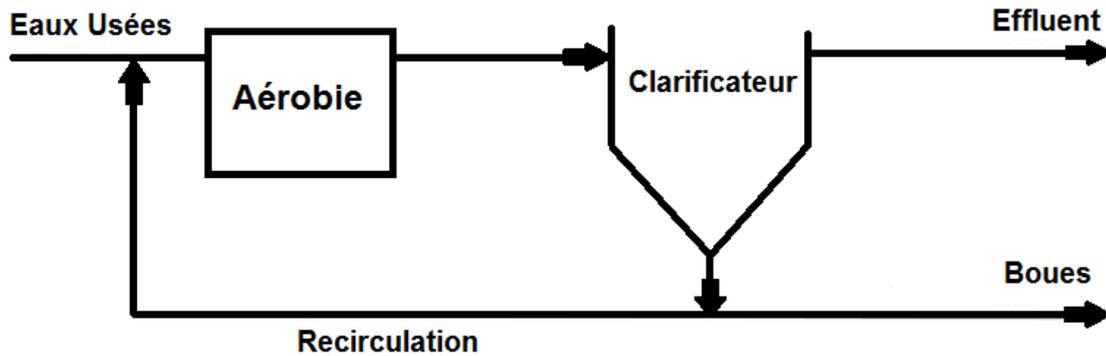


Figure I.04 : Boues activées, Schéma de base [58].

Une DCO de 500 mg/L dans les eaux conduirait, après conversion en biomasse, à une concentration de 200 mg/L de boues. Un volume 15 à 25 fois plus nécessaire pour contenir une même masse de boues sans recirculation [57-58]. Dans *Figure I.04*, en ajustant la charge spécifique et ainsi l'âge moyen des boues à travers un dimensionnement initial approprié suivi d'une gestion éclairée, notamment l'extraction des boues excédentaires, différents objectifs peuvent être atteints. Un âge des boues d'environ 3 jours (procédé à moyenne charge) permet l'élimination des MO. En revanche, un âge des boues d'ordre de 10 à 15 jours (faible charge) permet également la nitrification de l'ammonium tandis qu'un âge de boue de 20 à 30 jours (aération prolongée) résulte en plus à la production relativement faible de boues en excès qui ont un bon degré de stabilisation biologique (matières résiduelles peu dégradables). Une aération discontinue, créant des périodes d'anoxie, permet en outre dans ce simple schéma d'obtenir une dénitrification [78-79]. Un bassin en anoxie individualisée et continuellement sans aération permet une meilleure maîtrise de la dénitrification. Il sera de préférence alimenté avec les eaux usées brutes, *Figure I.05*. Le nitrate est recirculé vers la zone anoxie via le clarificateur et aussi à partir du bassin biologique d'aération. Le degré de dénitrification possible est déterminé par le taux de recirculation effectuée [80].

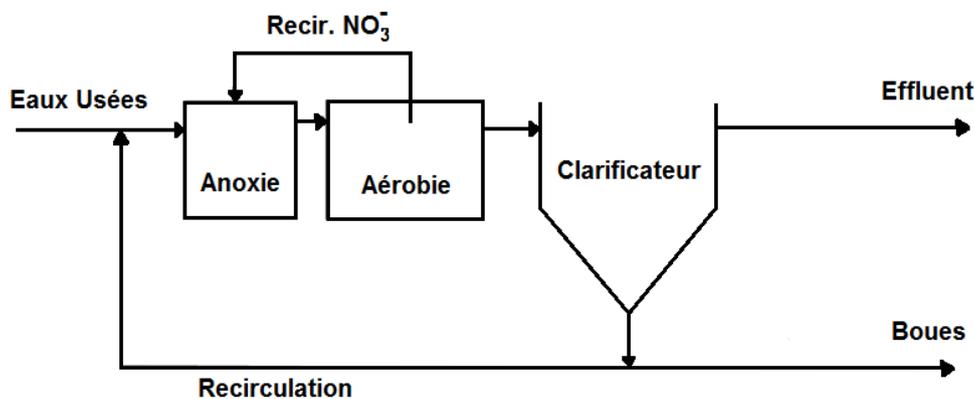


Figure I.05 : Boues activées, Schéma avec dénitrification en tête [80].

La déphosphatation se réalise grâce à la mise en place d'un bassin anaérobie alimenté avec les eaux usées brutes et les boues du clarificateur, *Figure I.06*. En cas d'installations nitrifiantes dont le nitrite résiduel venant du clarificateur pourrait perturber l'anaérobie, il peut être intéressant de faire transiter ces boues de recirculation par le bassin anoxie [81-84].

Si les phénomènes biologiques de transformation, hormis peut-être la déphosphatation, sont bien maîtrisés et rarement la cause du dysfonctionnement des installations, l'étage de séparation dans le clarificateur, est le point faible du procédé à boues activées. La mise en place d'une zone de contact où les boues recirculées sont mélangées aux eaux usées brutes crée des conditions de concentration élevée propices. Cela permet aux bactéries non filamenteuses, présentes à l'intérieur des agrégats, d'absorber les substrats et de prospérer par rapport à leurs concurrents filamenteux [56, 59].

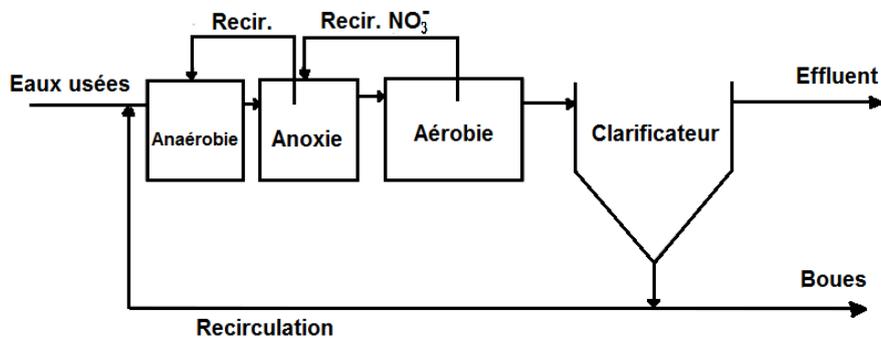


Figure I.06 : Boues activées, Schéma avec déphosphatation [83].

2.2. Les STEP Face aux Produits Pharmaceutiques :

Les systèmes d'assainissement acheminent les eaux usées vers les *STEP* des eaux usées. Cependant, Ces *STEP* classiques n'ont pas été initialement conçues pour éliminer efficacement les composés organiques présents à l'état de traces, tels que les résidus de médicaments. La biodégradation de ces composés dans les *STEP* entraîne des résultats très variables selon les molécules, d'une épuration relativement faible ne serait que 5% [85-86] à plus de 99% d'élimination [87-88]. De plus, le calcul du rapport entre les concentrations moyennes d'affluent et d'effluent de la *STEP* révèle aussi des différences notables dans l'efficacité de l'épuration. Généralement, il existe plusieurs exemples de contamination par les produits pharmaceutiques, à savoir les antibiotiques, qui ont porté une attention assez importante due à son effet sur le dysfonctionnement de *STEP* par rapport aux autres produits pharmaceutiques, ainsi, à son effet inhibiteur sur la biomasse épuratrice des boues activées de *STEP* [10,11]. Les concentrations en produits pharmaceutiques varient du ng/L au $\mu g/L$ avec des teneurs parfois excessives dans les fermes piscicoles, car environ 70 à 80% des antibiotiques donnés dans la nourriture finissent et s'accumulent dans l'environnement [89].

2.2.1. Elimination par Biodégradation :

Les méthodes d'épuration biologique sont largement utilisées dans le traitement des produits pharmaceutiques [90-92]. Cependant, en raison de la difficulté à obtenir des mesures précises, du coût élevé des analyses, des défis liés à l'établissement d'un bilan de matière dans une *STEP* des eaux usées, ainsi que de la variabilité des effluents et des boues, leur efficacité dans l'élimination des antibiotiques demeure largement méconnue. De plus, les rendements et les mécanismes d'élimination varient selon les molécules, bien que la biodégradation semble être le processus prédominant pour la plupart des antibiotiques [93]. Dans certains cas, l'adsorption sur les boues est la principale raison de la diminution de leur concentration dans l'eau [94], ou d'autres systèmes plus efficaces peuvent être utilisés.

2.2.2. Elimination par Sorption sur les Boues :

D'après *Joss et al. (2006) [71]*, les taux de biodégradation des antibiotiques sont nettement plus bas que ceux des autres micropolluants [95-99]. Et ces vitesses d'élimination sont influencées par les concentrations d'antibiotiques. *Drille et al. 2005 [100]*, ont montré que la vitesse à laquelle certains antibiotiques se dégradent dépend du substrat accessible aux bactéries. Par exemple, en l'absence de toute source d'azote dans le milieu et le substrat, et si l'antibiotique contient des atomes d'azote, il se décompose presque aussi rapidement que l'acétate. Cependant, si une source d'azote est présente dans le milieu, même si l'antibiotique contient de l'azote, sa dégradation cesse. De plus, les vitesses de réaction dépendent de nombreux paramètres, et non seulement de la concentration en antibiotique.

2.3. Inhibition des Procédés à Boues Activées :

Selon *Da Silva 2008 [94]*, le risque de dépassement des normes de rejet dans les *STEP* des eaux usées est plus élevé pour les matières azotées que pour la *DCO*, en raison des variations de la composition des effluents. Par conséquent, la nitrification est un processus particulièrement crucial à surveiller dans les systèmes d'épuration à boues activées. La différence entre la vitesse de croissance et la vitesse de mortalité est plus faible pour les bactéries autotrophes que pour les bactéries hétérotrophes.

Ainsi, en cas d'exposition à un toxique à un moment donné (t), la nitrification serait affectée plus longtemps, même en présence d'une inhibition limitée pendant plusieurs semaines, pouvant entraîner un arrêt complet de ce processus. Contrairement à ce que soutient *Henze et al. 1997 [100]*, les données de biotoxicité rapportées par *Eckenfelder 1992 [101]*, indiquent qu'une concentration plus élevée est nécessaire pour inhiber 50% des bactéries hétérotrophes par rapport aux bactéries autotrophes, pour la plupart des 61 molécules organiques toxiques

testées. Malgré cela, l'inhibition des procédés d'épuration à boues activées par les antibiotiques a été peu étudiée, principalement avec l'utilisation d'eaux usées synthétiques dans la majorité des cas. Cependant, compte tenu du faible pourcentage de bactéries cultivables présentes dans les boues activées (seulement 1 à 15%) [102], dû à la non-conservation de l'eau usée et aux volumes nécessaires pour alimenter un réacteur continu, il est justifié d'utiliser des substrats synthétiques dans ces études.

Par exemple, des études menées par *Campos et al. 2001* [76], ont montré que bien que les mesures du carbone organique total (*COT*) n'ont révélé ni dégradation ni accumulation d'antibiotiques dans le réacteur, l'effluent ne contenait plus d'antibiotiques actifs, suggérant que les antibiotiques étaient seulement partiellement dégradés par la biomasse [103].

3. LES PRODUITS PHARMACEUTIQUES ET L'ENVIRONNEMENT :

Afin de préserver l'environnement et la santé des êtres vivants, il est crucial de collecter et de traiter de manière rentable nos eaux usées. Néanmoins, il existe un retard scientifique et des recherches sur les nouvelles technologies qui pourraient efficacement traiter le problème des micropolluants, qui représente l'un des défis prioritaires à relever et ne fait qu'augmenter les préoccupations. Ces micropolluants peuvent être hautement toxiques et moins persistants. Les antibiotiques ont été largement répandus pendant quelques décennies comme des micropolluants plus importants [104-106]. Bien que ces substances soient développées pour exécuter un effet biologique ; peu d'attention a été donnée à leur présence dans l'environnement, à savoir dans les systèmes aquatiques.

Outre leur potentiel toxique, les antibiotiques rejetés, qu'ils proviennent de l'usage humain ou vétérinaire, suscitent des inquiétudes en raison de leur utilisation inadaptée et irréfléchie, ainsi que de leur persistance dans l'environnement. Ceci, combiné à la capacité d'adaptation des microorganismes et aux possibilités de transfert génétique, contribue au maintien, à l'émergence et à la propagation de germes résistants, ainsi qu'au développement de résistances et aux échecs de l'antibiothérapie [107-109]. Néanmoins, le traitement biologique par boues activées est l'un des procédés utilisés pour traiter les eaux, englobant divers processus qui permettent l'élimination totale ou partielle de la pollution biodégradable, y compris celle qui est toxique, grâce à l'action des microorganismes [110].

Ces procédés reproduisent en milieu industriel l'effet épurateur observé dans les rivières, où la dégradation de la *MO* a lieu. Actuellement, les performances d'épuration des antibiotiques sont faibles dans les *STEP* des eaux usées, avec la plupart des antibiotiques quittant les installations pratiquement inchangées [54, 111-114].

3.1. Antibiotiques dans l'Environnement et l'Anti bio-résistantes :

Les antibiotiques, dérivés du grec "anti" signifiant contre, et "bio" pour vie, suscitent une préoccupation significative car ils peuvent inhiber l'activité microbiologique des boues dans les *STEP* des eaux usées. Par conséquent, il est envisageable que le processus de traitement de l'eau soit perturbé, entraînant une augmentation des rejets de polluants dans l'environnement. Des études antérieures [115] ont déjà signalé que la présence d'antibiotiques dans les eaux usées pourrait entraîner une inhibition de la nitrification et du processus de bioremédiation de la pollution carbonée. De plus, il est probable qu'il existe une corrélation entre l'efficacité de dégradation, la résistance et la toxicité, en particulier, après l'absorption des antibiotiques par l'organisme, ces produits peuvent être excrétés inchangés ou partiellement métabolisés. Un des soucis principaux concernant les antibiotiques et leur entrée continue dans l'environnement, ceci qui peut mener à des concentrations élevées et devient un risque aux microorganismes [115]. La dégradation des antibiotiques est influencée par plusieurs facteurs, notamment la structure chimique du micropolluant, le *pH* du milieu, la formation de ligands, la présence de différentes souches bactériennes, ainsi que la photo-dégradation.

L'accumulation d'antibiotiques dans les milieux aquatiques est principalement due aux rejets continus de ces substances et de leurs métabolites. Leur accumulation dépend de leurs propriétés physico-chimiques, de leur hydro-solubilité, de la stabilité des molécules et de leur demi-vie. Initialement développés pour leurs effets biologiques, peu d'attention a été accordée à leur présence dans les milieux aquatiques, plusieurs antibiotiques ont été détectés dans les effluents industriels, certains étant facilement dégradés par les *STEP* des eaux usées, tandis que d'autres ne le sont pas [116-118].

3.1.1. Développement de la Résistance et les Actions pour se Limiter :

La problématique du développement des bactéries résistantes aux antibiotiques est liée à l'existence de gènes qui permettent à ces bactéries d'éviter l'action des antibiotiques. Chaque antibiotique n'affecte qu'une partie du monde microbien : certaines espèces sont sensibles à un antibiotique donné, tandis que d'autres ne le sont pas. Les espèces bactériennes insensibles à un antibiotique spécifique sont considérées comme naturellement résistantes, tandis que celles qui étaient sensibles mais ont acquis une résistance sont appelées espèces résistantes. Les eaux usées [118], les eaux souterraines [120], les eaux de mer [119], les eaux potables [118], et même les eaux embouteillées [121], sont toutes des voies de transfert de bactéries résistantes à l'homme.

À l'origine, l'acquisition de la résistance bactérienne peut résulter d'une mutation aléatoire, d'échanges génétiques entre des gènes existants, ou de l'utilisation d'un gène

préexistant pour résister à l'antibiotique. L'exposition aux antibiotiques et à d'autres agents antimicrobiens, qu'elle se produise dans le corps humain, et corps des animaux ou dans l'environnement aquatique, crée une pression de sélection naturelle qui favorise le développement de la résistance, tant par l'épanouissement des souches naturellement résistantes que par celui des souches acquises [118, 122]. La résistance se propage également par la reproduction des microbes porteurs de gènes de résistance [117].

Certaines bactéries présentent naturellement une résistance à certaines β -lactamines. La résistance des microorganismes aux β -lactamines est le plus souvent due à l'inactivation enzymatique de ces molécules par des β -lactamases bactériennes hydrolyse du cycle β -lactame, ou à l'existence de cibles d'affinité réduite (protéines liant les pénicillines anormales), ces enzymes ont la capacité de rompre le cycle β -lactame, ce qui empêche la liaison des β -lactamines aux protéines qui se lient aux pénicillines [118].

Parmi les mesures pour contrer l'émergence de la résistance bactérienne, la détection rapide et la surveillance sont des outils précieux. Des actions concrètes telles que le traitement des eaux usées pour limiter la dissémination des agents pathogènes et une utilisation responsable des antibiotiques tant en médecine humaine que vétérinaire sont recommandées pour restreindre les utilisations superflues. En effet, les conditions d'hygiène déficientes et la qualité d'eau sont des facteurs favorisant les maladies bactériennes. Bien que, les nouvelles générations d'antibiotiques soient plus efficaces, elles sont également plus coûteuses [123]. Il existe une forte corrélation entre la consommation et le rejet d'antibiotiques, bien que d'autres facteurs influent sur le développement et la persistance de la résistance aux antibiotiques.

3.1.2. L'impact des Antibiotiques :

Les antibiotiques peuvent avoir des effets sur les biomasses bactériennes dans l'environnement, en particulier dans les STEP des eaux usées, lorsqu'ils sont présents à l'état de traces dans un mélange complexe de polluants. Dans de tels cas, les risques éventuels doivent être évalués en termes de toxicité ou de risques allergiques. Ces perturbations peuvent perturber les processus naturels de purification et entraîner des dysfonctionnements dans les systèmes d'assainissement [124]. L'introduction d'antibiotiques dans l'environnement est principalement due à leur large utilisation en médecine humaine et vétérinaire, ce qui entraîne des concentrations variables dans les eaux usées urbaines en fonction de la consommation par la population [125], de la persistance des molécules [126], et du taux d'excrétion après métabolisme [117]. Certains antibiotiques sont excrétés sous forme inchangée et peuvent donc rester actifs, présentant ainsi des risques pour l'environnement. La consommation d'antibiotiques est

généralement plus élevée en hiver [123], et ils peuvent se concentrer dans la chaîne alimentaire. La plupart des antibiotiques ont un facteur de bioconcentration (*FBC*) d'environ 03, comme dans le cas des β -lactamines tandis que certains ont une capacité de bioconcentration plus élevée, atteignant jusqu'à 09 [116]. Les eaux usées des industries pharmaceutiques sont généralement plus concentrées que celles des effluents urbains [127], bien que les effluents hospitaliers soient moins concentrés que ceux des industries pharmaceutiques mais plus que ceux des eaux usées urbaines [125].

3.2. Les Antibiotiques de la Famille β -lactamines :

En 1928-1929, *Figure I.07*, Alexander Fleming a découvert les antibiotiques de la famille des β -lactamines. Il a été le premier à observer l'activité antibactérienne de la souche bactérienne de *Penicillium* sur des colonies de *staphylocoques*. Il a nommé la substance responsable de cette action inhibitrice "*pénicilline*" [128]. En raison de la difficulté à purifier cette molécule naturelle, l'intérêt pour la pénicilline en tant qu'agent antibactérien a été relancé par *Florey et Chain* [55], qui ont observé l'efficacité de la *pénicilline* semi-synthétique contre les infections à streptocoques chez les souris après une injection sous-cutanée de l'antibiotique.

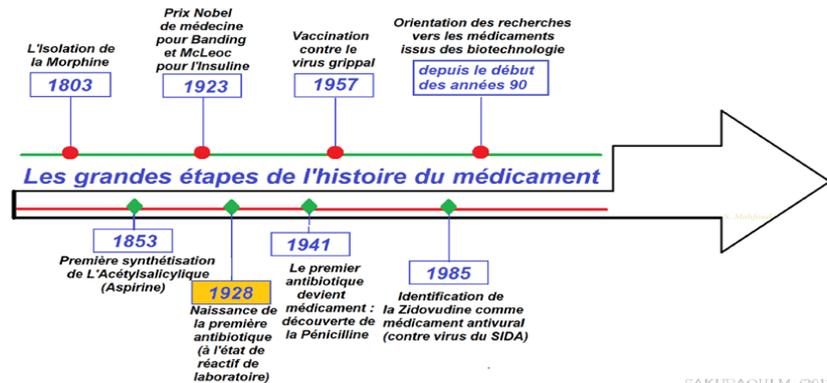


Figure I.07: Histoire chronologique du médicament [129].

À cette époque, la production en quantité suffisante de pénicilline à partir de la souche de *Penicillium notatum* initialement utilisée pour mener des essais cliniques était difficile. Cependant, grâce à une meilleure sélection de la souche de moisissure et à des améliorations du milieu de culture, le rendement a été multiplié par 100 en 2 ans [130]. Pendant cette période, il est devenu évident que différentes molécules de pénicilline pouvaient être obtenues en fonction de la composition du milieu de culture, de la souche et des conditions de fermentation [131]. Vers la fin des années 50, *Batchelor* et son équipe [129] ont démontré que l'acide 6-amino-pénicillamique (6-APA), en particulier l'Amoxicilline (AMX), était la structure conférant à la *pénicilline* son activité antibactérienne. Ils ont montré que cette substance pouvait être obtenue par fermentation en l'absence de précurseurs de la chaîne latérale de la *pénicilline G* [129].

3.2.1. Elaboration de l'Amoxicilline :

La découverte de *Batchelor* a ouvert la voie à la création de nouvelles β -lactamines de semi-synthèse, où la chaîne latérale liée au 6-APA est modifiée [132]. Cette avancée a permis d'élargir le spectre d'activité des pénicillines : d'une part, des molécules résistantes aux β -lactamases ont été développées, telles que la *méthicilline*, et d'autre part, des β -lactamines à spectre élargi ont été développées, comme *l'ampicilline*, active à la fois sur les bactéries *Gram négatif* et *Gram positif*. Cependant, ces premières molécules étaient peu adaptées à l'administration orale. C'est en 1970 que la découverte de *l'Amoxicilline (AMX)* a remédié à ce problème. En plus de son spectre d'activité similaire à celui de l'AMX, cette molécule présente une biodisponibilité orale élevée, ce qui permet d'atteindre des concentrations sanguines deux fois plus élevées après une administration par voie orale [131].

L'AMX est utilisée pour traiter les infections bactériennes de l'oreille, des poumons, du nez, des dents, du système urinaire et de la peau. Elle est également utilisée avant une intervention chirurgicale pour prévenir les infections [133]. L'AMX est une molécule susceptible d'être hydrolysée par de nombreuses β -lactamases, qu'elles soient produites naturellement ou acquises, et qui ont une préférence pour les *pénicillines (pénicillinases)*, les *céphalosporines (céphalosporinases)* ou qui ont un spectre moléculaire plus large (β -lactamases à spectre étendu, *carbapénémases*) [117, 134]. Des effets synergiques ont été observés sur des microorganismes sensibles à l'AMX [135].

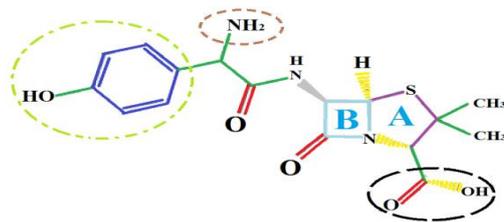
3.2.2. Structure et Propriétés Physico-chimiques d'AMX :

L'AMX, est un antibactérienne peut être administrée par voie orale ou parentérale. Selon sa charge électrique, l'AMX est un *zwitterion* ; se trouver sous plusieurs noms : *Amox*, *Amoxicilline anhydrite*, *Amoxicilline trihydraté* et *p-Hydroxyampicilline*. Et peut-être trouvé sous plusieurs marques de fabricant : *Amoxil®*, *Dispermox®*, *Augmentin®*, *Trimox®* ou *Clavamox®* selon son utilisation. Les caractéristiques clés de l'AMX incluent sa solubilité dans l'eau, sa constante de dissociation acide-base (*pKa*), son point d'ébullition, ses coefficients de partage *Octanol-Eau (Kow)*, ils sont présentés dans le *Tableau I.02*.

L'AMX est une molécule dont la masse moléculaire 365.4 daltons, *Figure I.08*, il s'agit (-)-6-[2-amino-2-(*p*-hydroxyphényl)-acétamido]-3,3-diméthyl-7-oxo-4-thia-1-azabicyclo-[3.2.0]-heptane-2-carboxylique. La molécule contient trois groupes ionisables : un groupe acide carboxyle (*COOH*) sur le cycle *thiazolidine*, un groupe amine primaire sur la chaîne latérale du cycle β -lactame, et un groupe *hydroxyle (OH)* sur le *parahydroxyphényle* [136].

Tableau I.02 : Propriétés physico-chimiques de l'antibiotique AMX [136].

Classe thérapeutique	Antibiotique
Famille	B-lactames
Formule brute	C ₁₆ H ₁₉ N ₃ O ₅ S
Formule brute de la forme orale	C ₁₆ H ₁₉ N ₃ O ₅ S * 3H ₂ O
Masse molaire (g/mol)	365.4
Solubilité dans l'eau (g/L)	3.9 (environ 3430 mg/L) [137]
Solubilité dans dissolvants organiques [138]	
Méthanol	7500 mg/L
Ethanol	3400 mg/L
pKa	2.68 ; 7.49 ; 9.63 [139]
MP (°C)	194
Log K _{ow}	0.87 [140-141]
λ _{max} (nm)	233



SAKHRAOUI M. (2017)

A : cycle thiazolidique.

B : cycle β-lactame.

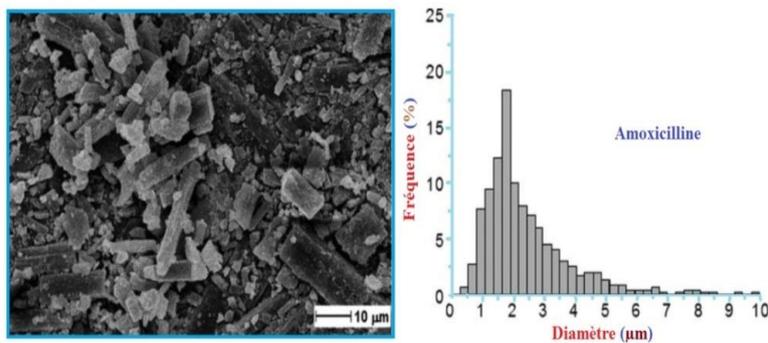
A+B : noyau pénam.

Cercle vert : cycle aromatique, groupement hydroxyphényle

Cercle marron : groupement amine

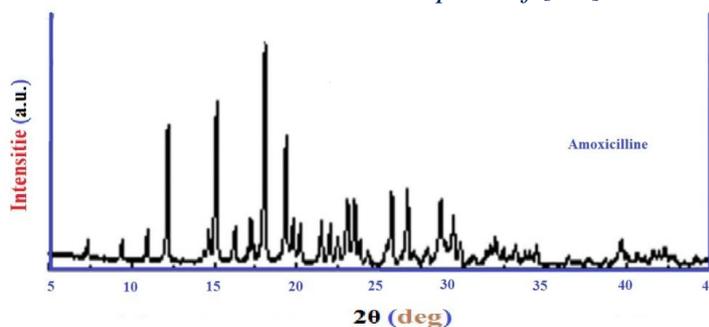
Cercle noir : groupement carboxylique

Figure I.08 : Structure semi-développée de l'AMX identifiant ses groupements ionisables et les cycles du noyau β-lactamines [136].



SAKHRAOUI M.

Figure I.09 : Micrographes de microscopie électronique de balayage (SEM) et cristal dimension de l'AMX primitif [136].



SAKHRAOUI M.

Figure I.10 : Diffractogramme de (XRD) diffraction de rayon X de l'AMX pure [136].

3.2.3. Propriétés Biologique de l'AMX :

En général, pour faciliter leur application thérapeutique, les médicaments sont classés en différentes familles, subdivisées en groupes et sous-groupes. Les critères de classification comprennent [132, 134] (i) l'origine, (ii) le spectre d'action, (iii) la nature chimique, (iv) la modalité d'action, et, en particulier, (v) le mécanisme d'action [142-143].

Le mécanisme d'action antibactérienne repose sur la paroi cellulaire des bactéries, une composante cruciale pour maintenir leur forme et les protéger contre l'osmolyse, qui est en partie constituée de peptidoglycane. Ce polymère est formé par une série de chaînes où l'Acide N-acétylmuramique (NAM) et l'Acide N-acétylglucosamique (NAG) alternent, avec une chaîne de polypeptides greffée sur celles-ci. Ces chaînes sont reliées entre elles par des ponts inter-peptidiques, comme illustré dans la *Figure I.11*. Ces ponts sont créés grâce à l'action d'enzymes situées à la surface de la membrane cytoplasmique, les transpeptidases ou *PLP* (Protéines Liant les Pénicillines), qui catalysent la réaction de réticulation du peptidoglycane [144]. Au cours de cette réaction, une *penta-glycine* est ajoutée et la *D-alanine* du groupement *D-alanyl-D-alanine* de la chaîne peptidique subséquente est libérée.

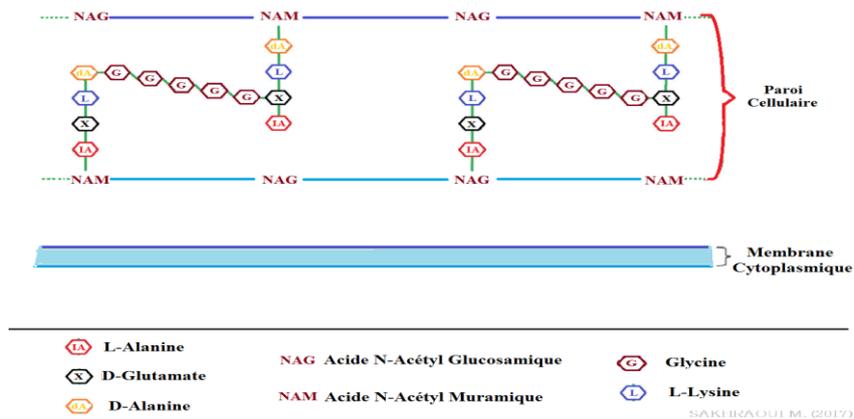


Figure I.11 : Structure du Peptidoglycane [145].

L'AMX, possède une configuration apparente à la *D-alanyl-D-alanine* du précurseur du peptidoglycane, composant essentiel de la paroi cellulaire bactérienne, *Figure I.12* [146]. En se liant aux protéines de liaison des *pénicillines* (*PLP*) présentes à la surface de la membrane cytoplasmique des bactéries, cette substance montre une similitude avec la structure des *PLP*, enzymes essentielles à la construction du peptidoglycane. Cette similitude lui confère une forte affinité pour le site actif des *PLP*. Lorsqu'elle réagit avec la pénicilline, la *PLP* provoque l'ouverture du noyau β -lactame, ce qui entraîne la formation d'une liaison covalente avec le site actif. Ce processus inhibe l'activité enzymatique des *PLP*, perturbant ainsi la synthèse du peptidoglycane *Figure I.13*, ce qui entrave la multiplication bactérienne, fragilise la paroi cellulaire, et finalement conduit à l'autolyse de la bactérie.

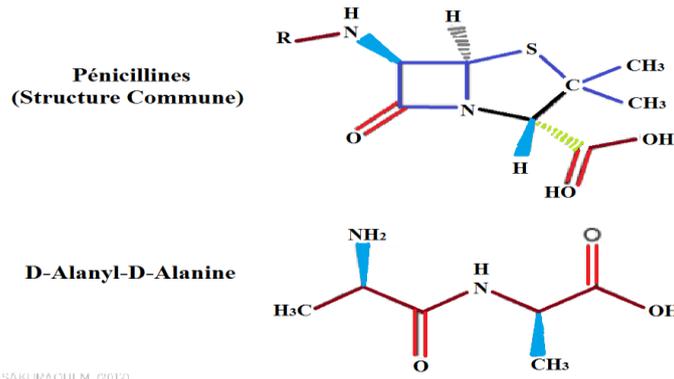


Figure I.12 : Structure des Pénicillines et du D-Alanyl-D-Alanine [145].

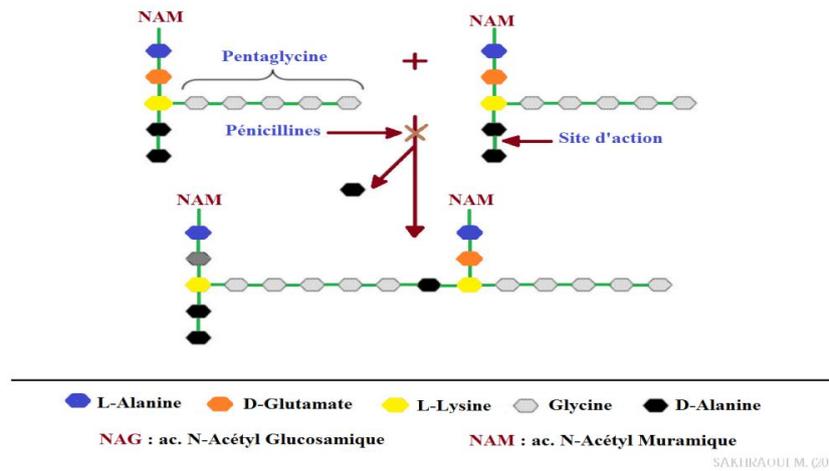


Figure I.13 : Inhibition par l'action des Pénicillines et Réaction de polymérisation du peptidoglycane [145].

3.2.4. Distribution dans l'Organisme et Elimination de l'AMX :

L'AMX présente une bonne diffusion dans tout l'organisme par ce qu'il se lie pour 17% à 20% aux protéines plasmatiques, du fait de sa très faible lipophile, il n'est pas capable de diffuser à l'intérieur des cellules de l'hôte et ne peut donc pas être actif sur les formes bactéries intracellulaires [147-148]. La distribution de l'AMX représente le processus réversible de transfert entre la circulation systémique et les tissus. Dès son administration, l'AMX subit à la fois des phénomènes de distribution et d'élimination. Le gradient de concentration entre les compartiments intra et extravasculaires favorise le déplacement du médicament de son site d'administration vers le reste du système pharmacocinétique, par rapport au processus d'élimination. Cela entraîne une diminution rapide des concentrations plasmatiques du médicament, appelée phase de distribution. Avec le temps, ce gradient de concentration s'atténue pour atteindre un état de pseudo-équilibre, marquant ainsi un ralentissement de la diminution des concentrations plasmatiques (phase d'élimination). Cette dernière phase représente le transfert irréversible du médicament du plasma, où il est mesuré, vers l'extérieur du système pharmacocinétique étudié [149]. L'élimination de l'AMX peut se produire de deux

manières : par excrétion ou par métabolisme. Le métabolisme implique une transformation chimique du médicament par des processus enzymatiques, le rendant ainsi plus facile à excréter. Les organes responsables principalement de l'élimination des médicaments, appelés organes émonctoires, sont les reins et le foie, bien que la peau, les poumons et l'intestin puissent également servir de voies d'élimination [150]. L'AMX est principalement excrétée par les reins via des mécanismes de sécrétion tubulaire [151]. Son excrétion dans la bile a été observée chez l'homme et l'animal, où elle est éliminée sous sa forme administrée [152].

CONCLUSION :

Les résidus d'antibiotiques posent plusieurs défis significatifs. Leur présence dans l'environnement, même à des concentrations faibles, semble encourager la persistance et la propagation de la résistance bactérienne aux antibiotiques [117]. Cette résistance représente un problème de santé publique significatif. Actuellement, on examine le rôle des STEP des Eaux Usées à ce niveau [20], elles représentent le point de convergence où la plupart des flux d'antibiotiques se regroupent avant de se répandre dans l'environnement. Cependant, les rendements d'élimination restent modestes, en particulier pour la famille des *B-lactames* [93]. En comparant les taux d'élimination des antibiotiques à ceux d'autres micropolluants, on constate qu'ils sont sensiblement plus bas [94]. Les auteurs explorent la possibilité d'un lien entre la toxicité des antibiotiques pour les bactéries et leur biodégradation. Des recherches supplémentaires suggèrent que cette toxicité pourrait entraîner des perturbations dans le fonctionnement des STEP [153].

Enfin, la toxicité pourrait également contribuer au maintien des bactéries résistantes. Évaluer l'effet toxique d'une molécule sur les boues activées présente des défis, principalement en raison de la difficulté à maintenir la plupart des bactéries présentes dans les boues activées sur un substrat synthétique. Par conséquent, l'utilisation d'eau usée réelle est impérative. Cependant, la composition en nutriments et en substances toxiques de l'eau usée peut varier. De plus, la composition et la structure des floes de boues activées peuvent évoluer au fil du temps au sein d'une même station d'épuration.

Chapitre **II**

Ce deuxième chapitre a pour objectif de présenter de nouvelles alternatives de réacteurs biologiques, en mettant particulièrement l'accent sur les bioréacteurs à membrane (*MBR*). Ces dispositifs sont conçus pour accomplir à la fois le traitement des eaux usées et l'élimination des micropolluants pouvant affecter l'efficacité des *STEP*. Le chapitre explorera en détail la description de ces réacteurs, leurs évolutions, ainsi que leurs utilisations dans le traitement des eaux usées. Il explorera également les obstacles rencontrés lors de l'élimination des micropolluants pharmaceutiques, dans le but de générer des eaux traitées d'une qualité extrêmement élevée, tout en assurant une gestion optimale de nos ressources.

1. TECHNOLOGIE DES MEMBRANES :

En traitement des eaux usées, le *MBR* présente un intérêt particulier de par la compacité du procédé engendrée mais aussi la qualité d'eau traité qui autorise une possibilité de valorisation directe (irrigation). Les éléments clés du développement de la biomasse comprennent le temps de séjour hydraulique (*HRT*) et l'âge des boues (*SRT*) [154], qui sont dissociés pour offrir aux *MBR* une flexibilité opérationnelle [155], et dans le processus physiologique de la cellule bactérienne [156]. A l'heure actuelle, la majeure partie des progrès réalisés dans le cadre du *MBRI* ont été proposés par *Kazuno Yamamoto* en 1989 [157]. Dans cette configuration, la membrane est immergée directement dans le milieu biologique, tandis que le perméat est aspiré à travers les membranes. Cette approche permet une réduction de la consommation énergétique (facteur 30), donc un coût opératoire réduit [158]. L'augmentation de la biomasse au sein d'un bioréacteur permet de réduire significativement l'encombrement au sol du système mais cette rétention de la biomasse contrôlée par les membranes qui permet aussi le fonctionnement à des charges massiques très faibles et à des âges de boues élevés, ce qui entraîne des changements métaboliques qui font que la culture bactérienne soit maintenue dans un état qui favorise l'orientation du métabolisme vers ses besoins en maintenance, minimisant la synthèse cellulaire et la production de boue [159-167]. Le nombre de publication sur le *MBR* augmente chaque année d'environ 20% [168]. Depuis 2000, des publications ont porté sur l'élimination des micropolluants [169-170].

1.1. Membranes et Procédés de Séparation :

Une membrane appliquée au traitement des eaux usées est tout simplement un matériau qui permet par effet stérique le passage ou le rejet des composants présents dans l'eau. Elle est donc à perméabilité sélective, les composés qui la traversent composent le perméat, et ceux qu'elle rejette forment le rétentat. Les membranes sont généralement composées d'une couche sélective fournissant une meilleure séparation, associée à un support consolidant

mécaniquement la résistance. Afin d'avoir une perméabilité optimale, la membrane doit présenter : (i) une épaisseur de couche sélective la plus fine possible et (ii) une porosité surfacique la plus grande possible. Les membranes de nanofiltration (NF) et d'osmose inverse (OI) sont employées pour la séparation de molécules de faible poids moléculaire (avec un diamètre de coupure inférieur à 4 kDa). Pour la plupart, ces membranes sont composées de trois couches, les deux premières couches, servant de support, sont poreuses, tandis que la troisième couche en contact direct avec la solution à filtrer est semi-perméable, jouant également un rôle actif dans la membrane [171].

Les procédés de microfiltration (MF) (avec un diamètre de coupure > 200 kDa) et d'ultrafiltration (UF) (4 kDa < diamètre de coupure < 200 kDa) sont classés comme des membranes poreuses qui retiennent les matières en suspension (MES), les microorganismes ainsi que certaines protéines. Cependant, les particules fines ainsi que les composés minéraux et organiques ne sont pas retenus. Le niveau de sélectivité dépend de la taille des pores de la membrane, les plus grands étant associés à la MF, capable de rejeter des particules. La membrane la plus sélective est celle de l'OI, qui peut rejeter une seule charge ions (c.-à-d. monovalent), tels que le sodium (Na) et chlore (Cl). Les membranes NF présentent aussi une sélectivité remarquable puisqu'elles permettent de rejeter de petites molécules et ions bivalents. La *Figure II.01* présente les principaux procédés de séparation membranaire dans lesquels l'eau constitue le perméat.

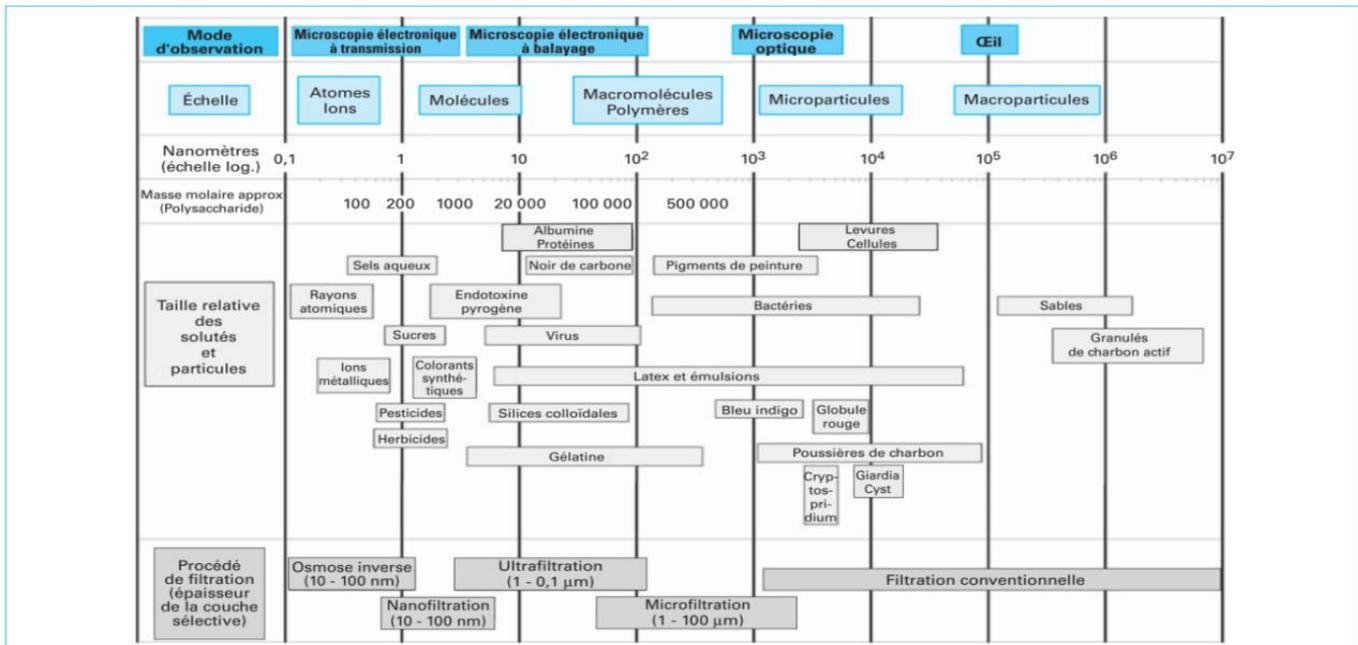


Figure II.01 : Disposition des opérations de filtration/séparation par membrane par rapport à la taille des pores et des substances retenues [159].

L'utilisation des membranes devrait permettre d'arrêter les composés organiques de faible poids moléculaire, qui ne sont pas éliminés par procédés biologiques. La membrane a une très bonne efficacité pour la diminution du carbone organique et de la couleur est un aspect crucial de ce procédé, qui ne peut être négligé. En plus de cela, il offre des avantages supplémentaires tels que la désinfection efficace, une meilleure rétention des micropolluants, tout en maintenant une pression constante et en consommant moins d'énergie que les méthodes d'OI [173]. La réduction des composés pharmaceutiques par des membranes se fait par une combinaison de trois mécanismes : adsorption (affinité membrane/composés), barrière stérique et de répulsion électrostatique (membrane chargée). Leur efficacité peut être très différentes et variées d'un composé à autre et est étroitement corrélée aux [174] :

- Propriétés physicochimiques des micropolluants : taille moléculaire, solubilité diffusivité, la polarité, hydrophobicité, charge, ... etc.
- Propriétés membrane (perméabilité, taille pores, hydrophobicité, charge de surface).
- Les paramètres opérationnels des membranes : débit, pression transmembranaire, taux de conversion et traitement préalable de l'eau d'alimentation.

1.2. Caractéristiques des Membranes :

- *Dimensions des pores* : allant des microns pour la microfiltration aux nanomètres pour la nanofiltration [175].
- *Seuil de coupure* : défini comme la masse molaire critique pour laquelle 90% des solutés sont retenus par la membrane dans des conditions opératoires ; il s'exprime en Dalton ($Da. = g/mole$). C'est une façon pratique de caractériser les membranes et d'estimer si les molécules visées à être éliminées vont être retenues ou non [176].
- *La sélectivité* : c'est une caractéristique complexe à mesurer, définissant la surface de la membrane, qui détermine quels composés de la solution la traversent [175].
- *La perméabilité* : Ce paramètre représente la facilité avec laquelle l'eau traverse la membrane, ce qui dépend à la fois de la taille des pores et de l'épaisseur de la membrane.
- *La densité de flux de perméat* : Il fournit le flux volumique (J_w) ou massique (en $L.h^{-1}.m^{-2}$ ou $kg.h^{-1}.m^{-2}$) qui traverse la membrane pour une surface de $1 m^2$. Pour déterminer la surface à installer, il suffit de diviser le débit de filtrat à produire par ce flux [176].
- *La pression transmembranaire* : correspond à la différence entre la pression du côté d'alimentation (rétenant) et celle du côté filtrat de la membrane. Elle est mesurée en plaçant un capteur de pression à la sortie de la membrane, et la valeur lue par le capteur est ensuite soustraite de la pression atmosphérique ambiante [177].

1.3. Matériaux Membranaires :

Le matériau utilisé pour la fabrication de la membrane doit présenter une résistance chimique, thermique et mécanique appropriée aux exigences du procédé et du fluide traité. Il doit également être facile à former et capable de produire des membranes minces, durables, résistantes, sélectives et perméables. On distingue généralement deux grandes catégories de membranes : les membranes minérales et les membranes organiques.

- ✓ *Membranes organiques* : Ces membranes sont constituées de polymères, comme la cellulose et ses dérivés, le polyamide et le polysulfone, qu'ils soient d'origine synthétique ou naturelle, réticulés ou non. Elles représentent plus de 80 % des parts de marché des membranes de filtration. Généralement moins coûteuses à produire que les membranes minérales, elles sont disponibles dans une gamme étendue de seuils de coupure, allant de la *MF* à l'*OI*. Cependant, elles présentent une résistance thermique et chimique plus faible que les membranes minérales.
- ✓ *Membranes inorganiques* : Divers matériaux minéraux sont utilisés pour la fabrication de membranes filtrantes, tels que le carbone poreux, les métaux, le verre et la céramique. Cependant, seules les membranes en céramique sont utilisées dans les *MBR*. Elles sont composées d'oxydes métalliques tels que l'oxyde d'aluminium, de titane ou de zirconium, et sont constituées de couches successives de particules de taille décroissante. Le support est généralement composé d'alumine (α) avec des pores d'ordre du micromètre ou supérieure. La couche active est constituée d'alumine (Al_2O_3) (α ou γ), de zirconium (ZrO_2) ou d'oxyde de titane (TiO_2). Ces membranes ont l'avantage d'une résistance à températures élevées et qu'une très bonne résistance chimique. Cependant leur coût de production est élevé et elles n'existent que sous tubulaire ou plane avec un seuil de coupure minimal de 600 Da [171].

1.4. Géométrie des Membranes :

On distingue différentes géométries des membranes, parmi eux :

- ❖ *Membranes en fibres creuses* : fabriquées à partir de matériaux organique. En raison de sa souplesse et de la liberté de choisir l'emplacement de la couche active, cette configuration de membrane offre une plus grande latitude dans la conception des modules et des processus de filtration. De plus, cette géométrie permet l'application de pressions transmembranaires élevées en utilisant des diamètres de fibre réduits.
- ❖ *Membranes planes* : Dans une membrane organique plane, le support mécanique est généralement constitué d'un non-tissé en polyester, par exemple. Les membranes

planes minérales sont entièrement composées de composants minéraux. La couche sélective est déposée sur le support de manière à ce que la membrane ne présente aucune résistance mécanique lorsqu'une pression transmembranaire est appliquée en sens inverse. Cela entraîne un gonflement des poches membranaires, par conséquent, il n'est pas possible d'effectuer des rétro-filtrations sur ce type de membrane sans risque de détérioration ou de dommages [171].

- ❖ *Membranes spiralées* : Les feuilles de membranes planes sont superposées et enroulées autour d'un collecteur de perméat. Ce type de configuration est principalement utilisé dans le dessalement de l'eau (*NF* et *OI*). Leur densité est d'environ $900 \text{ m}^2 \cdot \text{m}^{-3}$, mais pour les eaux troubles, un prétraitement est nécessaire pour éviter le colmatage [173].
- ❖ *Membranes tubulaires* : Ces membranes présentent une géométrie cylindrique avec un diamètre externe généralement supérieur à *un centimètre*. Elles peuvent avoir plusieurs canaux, chacun avec un diamètre compris entre *3 et 10 mm*. Il existe des membranes tant minérales qu'organiques. Elles peuvent être monocanal ou multicanaux, *Figure II.02*. Ces membranes se composent d'un support poreux à travers lequel le perméat circule, avec une couche active déposée à la surface interne des canaux. Les modules tubulaires ont l'avantage de pouvoir traiter des fluides contenant des particules de plus grande taille, et sont facilement nettoyable. Cependant ils ont une compacité très faible d'ordre de 10 à $300 \text{ m}^2/\text{m}^3$, la plus faible de tous types de modules, et un coût énergétique important, dû à un débit de circulation élevé [171].

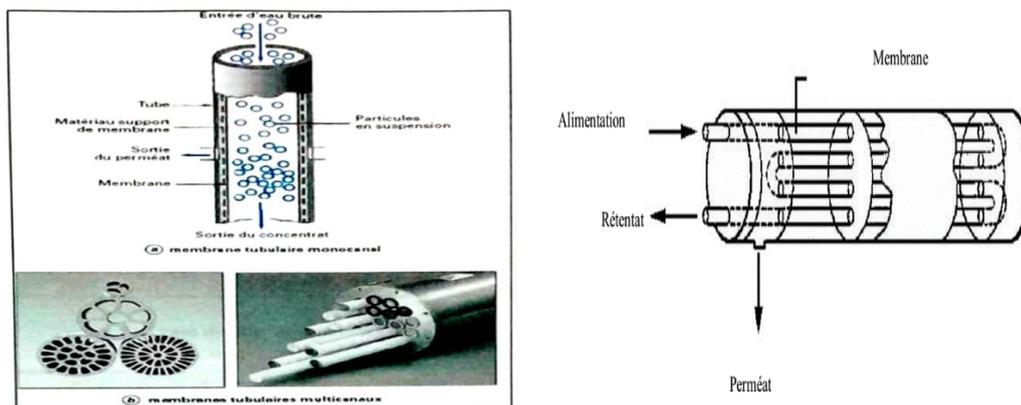


Figure II.02 : Membrane tubulaire [159].

1.5. Catégories de Filtration à Membrane :

Les procédés de séparation membranaire sont effectués en utilisant des gradients de pression, ce qui entraîne le flux de perméat, et elles peuvent être exécutés selon deux modes d'écoulement, choisis en fonction de la qualité de l'effluent à traiter et des objectifs visés : la filtration tangentielle ou la filtration frontale.

- *Filtration tangentielle (cross flow filtration)* : Au cours de ce processus de filtration *Figure II.03*, le fluide circule de manière parallèle à la membrane, créant ainsi une force de cisaillement qui empêche l'accumulation d'espèces à la surface de la membrane et la polarisation de concentration, et favorise une production quasi-continue de perméat.
- *Filtration frontale (Dead end Filtration)* : Dans le mode frontal *Figure II.03*, la filtration se produit perpendiculairement à la surface de la membrane : toute matière qui entre dans le module membranaire est retenue par la membrane et s'accumule à sa surface. Ce mode de fonctionnement est constamment dans un état transitoire et nécessite une mise en œuvre séquentielle (filtration suivie nettoyage) [172-173].

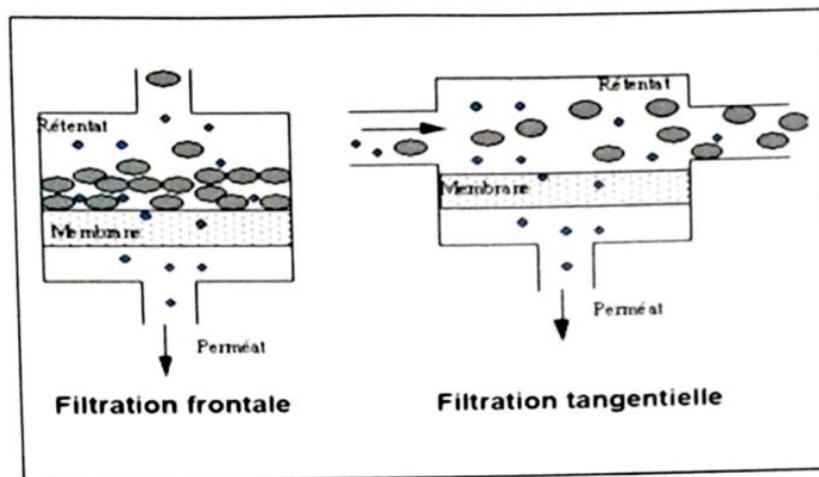


Figure II.03 : Types de filtration membranaire [162].

2. ORIGINE DU MBR DANS LE DOMAINE DU TRAITEMENT DES EAUX

Pour le traitement des eaux usées, les réglementations exigent l'élimination de *MES* et de la *MO* pour les rejets dans des zones normalement autorisées. L'abattement doit porter sur les composés azotés et phosphores en zone sensible. Les procédés classiques répondent correctement à ces exigences en combinant plusieurs opérations unitaires. La *MO* est consommée par des biomasses et l'effluent est ensuite séparé des boues par une décantation. Ces méthodes sont caractérisées par des limitations significatives : (i) en termes de fiabilité, avec des dysfonctionnements liés à une décantation inadéquate des boues dans les procédés à boues activées, un contrôle insuffisant de la biomasse ou des transferts de matière dans les procédés à culture fixée, (ii) en matière de compacité, en raison de la nécessité de structures volumineuses, et (iii) en ce qui concerne la production de boues, biomasses en excès constituent un produit nécessite un traitement et/ou une élimination. Le fonctionnement de *MBR* constitue une alternative technologique très intéressante. L'utilisation d'une membrane

comme procédé de séparation permet (i) d'accroître la concentration en biomasse dans le bioréacteur et (ii) d'améliorer la qualité de l'eau traitée. Il en résulte un procédé fiable, avec des degrés d'épuration sans rapport avec ceux observés dans des procédés classiques et une production moindre de boue. Le *Tableau II.01* compare les performances des procédés classiques à celles du *MBR* au travers de la charge organique volumique (en $kg_{DCO}/m^3.j$), de la valeur de conversion constatée et l'efficacité d'élimination de la pollution (exprimée en pourcentage de *DCO* à l'entrée). La *DCO* et les *MVS* quantifient la *MO* présente dans l'eau à traiter et la biomasse présente dans le bioréacteur.

Tableau II.01 : Comparaison entre *MBR* et *STEP* conventionnelle.

	Charge volumique ($Kg_{DCO}/m^3.j$)	Taux de conversion (Kg_{MVS}/Kg_{DCO})	Elimination de la <i>DCO</i> (%)
<i>STEP</i> conventionnelle (faible charge) [178]	0.04 – 0.08	0.4	$\leq 75 \%$
<i>STEP</i> conventionnelle (forte charge) [178]	0.4 – 0.8	1.5	
<i>MBR</i> [179]	0.06	0.2	$\geq 80 \%$
<i>MBR</i> [180]	1.3	< 0.1	$\geq 95 \%$

Le *MBR* reste cependant pénalisé, en épuration des eaux : l'importance des flux volumiques à traiter (entre 0.1 et 0.4 $m^3/j/hab.$) nécessite en effet de mettre en place des surfaces membranaires élevées. Dans le cas du traitement des effluents industriels biodégradables, qui représentent environ 80% du volume total des effluents, le *MBR* devient par contre une technologie tout à fait compétitive. En effet, ces effluents sont souvent caractérisés par des concentrations élevées en substrat ($> 1 kg_{DCO}/m^3$), des températures assez élevées (20 à 30°C) mais des flux volumiques limités ($< 1000 m^3/j$).

Le *MBR* autorisant des concentrations élevées en biomasse, le volume réactionnel peut être réduit et la surface membranaire à mettre en place, proportionnelle au débit à traiter, reste limitée. Le *MBR* s'avère alors totalement compétitif vis à vis des procédés conventionnels d'autant que la qualité des eaux filtrées permet une réutilisation directe. Il peut être constaté l'excellente qualité des eaux traitées malgré les fortes concentrations en pollution dans l'entrée et les conditions de charge volumique appliquée *Tableau II.02* [181].

Tableau II.02 : Exemple d'utilisation du *MBR* en traitement d'effluent industriel [181].

Activité	Charge volumique ($Kg_{DCO}/m^3.j$)	<i>DCO</i> entrée (Kg/m^3)	<i>DCO</i> sortie (Kg/m^3)
Agroalimentaire (pomme de terre)	3.6	11	0.08
Agroalimentaire (pêche)	1.6	1.1	
Cosmétiques	3	4.2	0.16
Papeteries	2.5	4	0.05

3. INTERET DU MBR EN TRAITEMENT DES EAUX USEES :

La technologie des *MBR* associe un système biologique à un processus physique de séparation par une membrane poreuse. Cette approche constitue une évolution du système biologique traditionnel à boues activées, se distinguant par le remplacement du décanteur secondaire par une unité de filtration membranaire. Cette membrane possède une sélectivité remarquable, agissant comme une barrière infranchissable pour les micro-organismes épurateurs, quelle que soit leur capacité de floculation [182]. Au sein d'un *MBR*, les micro-organismes oxydent et/ou assimilent la pollution organique (et éventuellement azotée) entrante, puis sont complètement séparés de l'eau traitée grâce à la membrane. L'utilisation des *MBR* présente des avantages indéniables [183] par rapport aux systèmes conventionnels, ces avantages sont nombreux justifiant le grand intérêt de la communauté scientifique qu'il suscite depuis toutes ces années [184] :

- ✓ En premier lieu, l'effluent bénéficie de la barrière micro ou ultra-poreuse fournie par les membranes, dont les seuils de coupure peuvent descendre jusqu'à environ $0.04\mu m$ [185], la qualité d'effluent obtenu est inégalée par les systèmes utilisés jusqu'alors : rétention totale de *MES* (donc des germes, parce que les *MES* sont composés de floc contenant les différentes espèces microbiennes), colloïdes (les microorganismes et certains virus) et molécules à fort poids moléculaires pour l'*UF* (ce qui inclut la plupart des virus et des polluants adsorbés sur le matériel particulaire)
- ✓ Les membranes d'ultrafiltration (*UF*), voire de microfiltration (*MF*), caractérisées par la taille de leurs pores, jouent un rôle crucial dans l'élimination des polluants organiques et inorganiques. Par exemple, elles permettent d'atteindre un abattement de 99% de la *DCO* sur une charge organique de $10500 mg_{DCO}.L^{-1}$, une réduction de 93% du *N-NH₄* et une élimination de 90% du *P-PO₄*, ce résultat étant obtenu avec *HRT* de 5 heures et un *SRT* de 7 jours et une concentration en *MES* de $10 g.L^{-1}$ [187]) et d'avoir une qualité d'effluent traité respectueuse des normes, et impose donc la désinfection de l'effluent sans intermédiaire ou d'utilisation d'oxydant comme dans des systèmes conventionnels où des traitements tertiaires sont nécessaires pour obtenir une telle qualité [188-194], ce qui permet d'éviter la production de molécule cancérogènes [184].
- ✓ La clarification ne se faisant plus par décantation, dans de tels systèmes, la qualité de la séparation finale n'est plus liée à l'état de floculation de la biomasse,

contrairement aux systèmes conventionnels intensifs à cultures libres, tels que le procédé à boues activées, la biomasse devait toujours présenter une bonne décantabilité : taille des floccs $> 50 \mu\text{m}$ [183], concentration en *MES* $< 3\text{-}5 \text{ g/L}$, pas de biomasses filamenteux excédentaires, sinon des dysfonctionnements majeurs apparaissaient (mauvaise qualité d'eau secondaire, perte en boues, voire lessivage de l'unité). Dans le cas du *MBR*, la décantabilité n'est plus un paramètre clef (sauf s'il peut être relié à une bonne filtrabilité), le fonctionnement du système en est alors d'autant plus robuste et fiable.

- ✓ En permettant de travailler à des concentrations plus élevées, le *MBR* offre l'avantage de prolonger les temps de rétention de la fraction particulaire active, pouvant même atteindre une rétention totale. Cela a pour conséquences [195] :
 - D'augmenter les vitesses de réaction permettant alors, soit de réduire les volumes de bassins biologiques par rapport aux systèmes conventionnels, soit de réduire la charge massique (kgDCO/kgMVS/j) imposée au système et donc, cela conduit à la production de boues [196], alors que dans les systèmes à boues activées classiques, le conditionnement des boues excédentaires peut représenter 50% à 60% des coûts totaux de fonctionnement [197].
 - D'accroître sa robustesse face aux fluctuations momentanées de charges [160].
 - D'induire une modification de composition de la population bactérienne [183, 198] qui améliore l'élimination d'azote, favorisée par le développement des bactéries nitrifiantes, contribue à réduire les coûts de fonctionnement associés. Les temps de séjour prolongés de la biomasse et la diversité des communautés bactériennes peuvent être bénéfiques pour éliminer des composés vus comme difficiles à biodégrader dans les systèmes classiques. Les micropolluants peuvent être cités comme exemple à cet égard [166].
- ✓ Un autre avantage des *MBR* réside dans la totale indépendance entre l'*HRT* et *SRT*, contrairement aux *STEP* conventionnelles où un faible *HRT* correspond nécessairement à un *SRT* élevé. Alors que ces *STEP* classiques peuvent atteindre un *SRT* jusqu'à 20 jours, le *MBR* offre la possibilité de travailler avec des *SRT* plus longs (de 199 à 201 jours) grâce à la rétention complète de *MES* [199-201] ; ce bénéfice est notable car il favorise le développement de bactéries à croissance plus lente, telles que les bactéries autotrophes de la nitrification, à des *SRT* élevés. Ainsi, il devient possible de travailler avec une biomasse plus diversifiée et plus efficace

pour le traitement de l'ammonium [202], mais aussi de certains micropolluants par co-métabolisme [204-205]. Une autre conséquence directe de cette augmentation du *SRT* est la diminution des volumes de boues à extraire, réduisant ainsi la production de boues. En effet, une augmentation du *SRT* de 10 à 30 *jrs* entraîne une diminution de 0.31 à 0.16 *Kg* de boues produites (*MVS*) par *Kg* de *DCO* éliminé ($K_{gMVS} \cdot Kg_{DCO}^{-1}$). Cela entraînera une diminution du coût de traitement des boues, qui représentent généralement entre 25% et 60% des coûts d'exploitation d'une *STEP* [206-208].

- ✓ Lorsque la concentration de biomasse dans le *STEP* dépasse une valeur critique d'environ 4 à 5 $g \cdot L^{-1}$, la capacité de séparation par décantation gravitaire devient considérablement compromise, voire interrompue dans les systèmes à boues activées [209]. Le *MBR* peut fonctionner avec des concentrations de biomasse de 2 à 5 fois supérieures (entre 8 et 25 $g \cdot L^{-1}$). Cela permet d'obtenir un effluent traité d'une qualité exceptionnelle en termes de réduction de la turbidité, de *MES*, de la *DBO*, de la *DCO*, de la désinfection et des sous-produits de désinfection. Contrairement aux *STEP* classiques, où la qualité du rejet est directement liée aux capacités de décantation de la biomasse, influencées par les caractéristiques de l'effluent à traiter [210].

Néanmoins la maîtrise complète de l'étape de séparation en cours d'opération reste un défi à relever pour que ce procédé puisse prétendre au développement qu'il mérite face aux enjeux environnementaux. Cette maîtrise par les opérateurs est encore limitée par le manque d'outils prédictifs d'évolution de perméabilité membranaire en cours d'opération, cette évolution est en effet liée à un très grand nombre de paramètres dépendants aussi bien de la nature d'eau à traiter que du choix du module membranaire.

En explorant les conditions biologiques de culture et la répartition des flux au sein des unités, il devient évident que travailler avec une concentration élevée en biomasse comporte à la fois des avantages et des inconvénients. Alors, cela peut favoriser la performance globale du système, qui peut entraîner des limitations en termes de transfert de matière, notamment d'oxygène [211]. L'optimisation et la maîtrise des conditions opératoires s'avèrent difficiles à réaliser, sans oublier l'introduction des *MBR* pour le traitement des eaux implique des coûts de maintenance et d'investissement non négligeables. Malgré une tendance à la baisse des prix des membranes [212], le *MBR* demeure un procédé plus onéreux que les systèmes classiques, en raison de l'installation des membranes et de l'utilisation d'air pour prévenir le colmatage.

4. LES CARACTERISTIQUES DE L'EAU TRAITEE PAR MBR :

4.1. Principe de la séparation :

Une membrane poreuse est une barrière sélective composée d'un matériau poreux structuré en couches minces. Elle est caractérisée par une ouverture de pores définissant un seuil de coupure et une perméabilité. La séparation par membrane est basée sur le principe d'exclusion de taille : seuls le solvant et les composés dont la taille inférieure au seuil de coupure peut être traversé la membrane, *Figure II.04*. La fraction de la suspension ainsi récupérée constitue le perméat, celle retenue en amont le rétentat. L'énergie requise pour la séparation est générée par différence de pression appliquée de part et d'autre de la barrière filtrante, avec une pression plus élevée du côté du rétentat par rapport au côté du perméat.

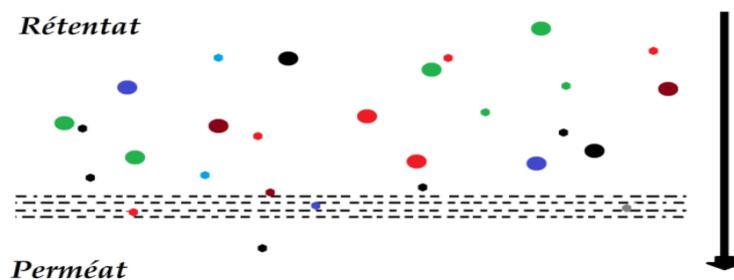


Figure II.04 : Séparation par filtration sur membrane micro ou ultrafiltration.

Dans le MBR, la fonction première de la membrane est de retenir les microorganismes au sein du bioréacteur. Le seuil de coupure est donc choisi soit en MF si seul l'arrêt bactérien est attendu, soit en UF si une désinfection totale intégrant l'arrêt des virus est souhaitée. Le choix de la membrane dépend alors de ses propriétés mécaniques et chimiques, sa perméabilité, mais également de son comportement vis à vis du colmatage au cours d'opération de filtration. Par conséquent, malgré une perméabilité initialement inférieure, les membranes d'UF peuvent être préférées aux membranes de MF en raison de leur meilleure résistance au colmatage. Cette sélectivité permet non seulement de retenir les bactéries, mais aussi les macromolécules qui échappent généralement à la décantation. Le temps passé dans le système correspond au temps de rétention de la phase particulaire (*en jours*) plutôt qu'au temps de séjour hydraulique (*en heures*) [181].

4.2. Contraintes liées aux performances de colmatage :

Le colmatage membranaire représente la principale contrainte pour l'efficacité de la séparation. Il résulte de l'accumulation et/ou de l'adhérence de composés sur la surface de la membrane et/ou dans sa matrice poreuse, altérant ainsi sa perméabilité. Outre l'augmentation de la consommation énergétique due à la filtration, le colmatage contribue au vieillissement

des membranes en raison des contraintes répétées de régénération. Dans le mode de filtration frontale, l'accumulation des particules de suspension à la surface de la membrane est inévitable : aucune force répulsive n'est présente pour empêcher l'accumulation des composés retenus. Un état d'équilibre ne peut être obtenu et un accroissement rapide de la résistance hydraulique globale se produit. Le fonctionnement d'un tel système nécessite alors des cycles de lavages fréquents pour éliminer le dépôt formé. Dans le cas de suspensions bactériennes concentrées, le colmatage du milieu filtrant est extrêmement rapide en raison de la formation quasiment instantanée d'un gâteau de boues : la filtration en mode frontal pourrait alors ne pas constituer une solution technologique acceptable. Pour obtenir des flux de filtration acceptables sans avoir recours à des rétro-lavages trop fréquents, il est nécessaire d'imposer une turbulence pour déstructurer cette zone d'accumulation et améliorer le transfert de masse en surface membranaire (état d'équilibre). Dans les *MBR*, les systèmes de 1^e génération associent le bioréacteur et les modules membranaires externes où circule tangentiellement la suspension bactérienne, *Figure II.06*.

La suspension est alors transportée par pompage de la 1^e unité vers la 2^e par une boucle externe de circulation. La minimisation du colmatage oblige alors à pratiquer une turbulence en surface membranaire obtenue sous des conditions de circulation tangentielles extrêmes (avec des vitesses de 1 à 4 m/s dans les tubulures membranaires et des gradients de vitesse de 10³ à plus de 10⁴ s⁻¹), des flux allant de 100 à 200 L/m².h sont généralement observés, sous des pressions de 1 à 3 bar. Cette solution, coûteuse en énergie, était incontournable dans les premiers temps car la surface membranaire disponible était faible en raison du prix élevé des premières membranes tenues [181]. Avec l'abaissement du coût des membranes, les procédés de 2^e génération sont apparus *Figure II.07*. Les membranes sont alors simplement immergées dans la suspension. Cette configuration offre la possibilité d'augmenter la surface membranaire, permettant ainsi de travailler avec des flux de perméation plus faibles et donc des pressions transmembranaires réduites.

4.3. Principe et Configuration de *MBR* :

Le développement des *MBR* a fait apparaître deux configurations : externe *MBRE*, et immergé *MBRI*, *Figure II.05*, *II.06* et *II.07*. *Le-Clech et al. 2006* [194], rappellent l'histoire du *MBR*, il a été introduit dans l'année 1960 dès que les l'*UF* et *MF* ont été valables [214]. Le procédé est apparu dans l'industrie vers la fin des années 60, il a été introduit par *Dorr-olivier Inc*[®] et *Rhône Poulenc* [215] et il était constitué d'un bassin à boues activées avec une boucle de recyclage externe au bassin, *Figure II.06* [213].

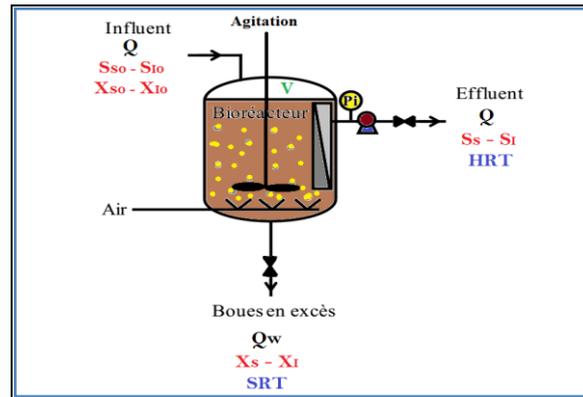


Figure II.05 : Conditions opératoires du modèle MBRI [213].

Grâce à un système de pompage adapté, la boue est réacheminée du bassin vers le module de filtration (de $0,05$ et $0,4 \mu m$) placé à l'extérieur du bioréacteur [210, 215].

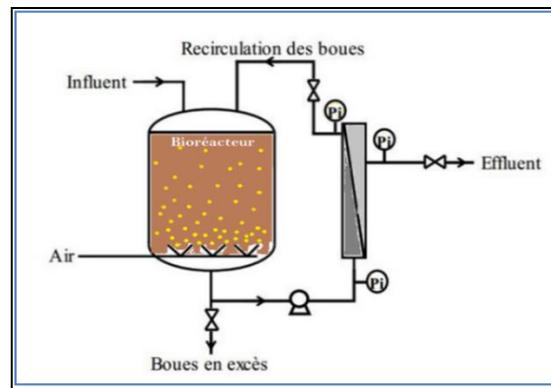


Figure II.06 : Bioréacteur à membrane externe MBRE (recirculé) [213].

La filtration mise en œuvre est de type tangentielle. L'avantage de ces fortes vitesses tangentielles est de permettre une production importante de perméat pouvant atteindre jusqu'à $170 L.h^{-1}.m^{-2}$, tout en luttant contre le colmatage [207, 209, 216]. Pour limiter le colmatage, une forte vitesse tangentielle de recirculation en entrée de module est maintenue entre 2 et $5 m.s^{-1}$ [217]. Les membranes utilisées sont généralement de type tubulaire céramique. Leur avantage réside dans une très bonne résistance aux lavages chimiques intenses, étant donné qu'elles supportent des températures allant jusqu'à $80^{\circ}C$ et des plages de pH de 2 à 13 . Cependant, malgré l'idée attractive et originale de remplacer le décanteur secondaire par une filtration, le procédé restait en marge et était considéré comme non applicable en raison des coûts élevés d'investissement des membranes, de leur perte rapide de perméabilité dans le temps, de la faible valeur économique du produit obtenu, ainsi que de la forte consommation énergétique engendrée par l'utilisation de pompes centrifuges et la recirculation [218] (une contrainte de cisaillement minimum doit être appliquée à la membrane pour limiter le colmatage sur la base de vitesses élevées de recirculation, *Reynolds turbulent*) et la mise sous pression. La consommation énergétique des MBRE (0.7

à 50 kW.m^{-3}) [194, 207] est supérieure à celle des systèmes à boues activées classique (0.3 kW.m^{-3}) [157]. De plus, dans *MBRE*, l'objectif de fonctionnement était de travailler à fort flux de filtration ce qui obligeait la pratique d'un recyclage forcé de la suspension au travers du module membranaire générant des coûts de fonctionnement du *MBR* prohibitifs.

En 1989 Yamamoto et al. [157], après 20 ans de la commercialisation des *MBRE*, et avec l'idée d'immerger l'unité membranaire dans le bioréacteur, *Figure II.07* [213], ouvreraient une nouvelle voie de développement plus extensive (perméation faible), Cependant, la diminution des coûts énergétiques liés à la circulation intense de la suspension dans les *MBRE*, ainsi que la simplification de la configuration des modules membranaires, rendaient ce procédé viable pour le traitement des eaux usées [157].

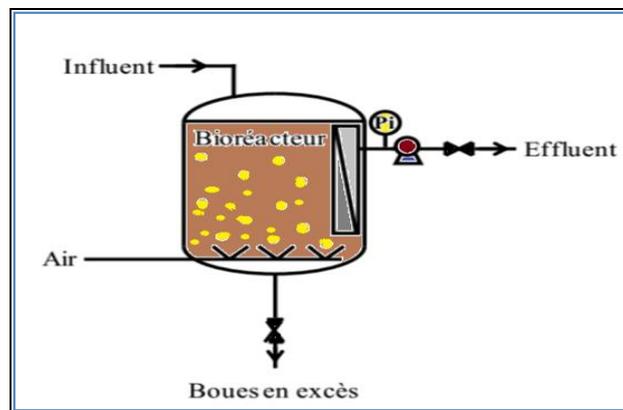


Figure II.07 : Bioréacteur à membrane immergée MBRI [213].

Depuis lors, la baisse significative des coûts des équipements des modules, ainsi que l'amélioration de la maîtrise de l'air par l'utilisation de fines bulles comme outil de turbulence et de fourniture d'oxygène nécessaire au métabolisme bactérien, ont favorisé leur développement. Une aération efficace près des membranes permet de lutter contre le colmatage, tandis que l'augmentation des contraintes environnementales a également contribué à leur expansion. Cette configuration présente l'avantage de conditions plus douces pour la biomasse, et surtout, elle permet des économies sur les coûts de consommation énergétique ($< 1 \text{ kW.m}^{-3}$) [194]. Dans cette configuration aucune pompe n'est utilisée pour circuler la boue. Pour éviter le colmatage, le processus de filtration implique l'application d'une pression négative (dépression) du côté perméat, ainsi que l'injection directe d'air sous et à l'intérieur du module pour maintenir la suspension des particules et induire des turbulences autour de la surface externe de la membrane [182]. Cependant, cet avantage est contrebalancé par une diminution des flux de perméat, qui ne dépassent pas les $50 \text{ L.h}^{-1}.\text{m}^2$ dans certains cas [207, 218]. De plus, pour des fonctionnements à long terme, les flux rencontrés se situent entre 5 et $20 \text{ L.h}^{-1}.\text{m}^2$ [219]. Cette configuration a stimulé le marché des

MBR dans le traitement des effluents urbains en raison de ses coûts énergétiques réduits, mais aussi de la baisse des prix des membranes organiques par rapport à la configuration externe, à savoir les membranes céramiques. Une autre configuration, les *MBR* immergées externes (*MBRIE*), est apparue ces dernières années, *Figure II.08*. Cette nouvelle configuration, classée parmi les configurations internes, représente un compromis entre les *MBRE* et les *MBRI*. Les membranes sont immergées dans un boîtier à l'extérieur du bassin biologique. Cette configuration facilite les opérations de maintenance et limite le colmatage par l'action de grosses bulles d'air à la surface membrane permettant de créer un cisaillement [220]. Les membranes peuvent donc être immergées directement dans le bassin biologique (*MBRI*) ou alors à l'extérieur du bioréacteur, appelé le *MBR* immergé externe, *MBRIE* [193].

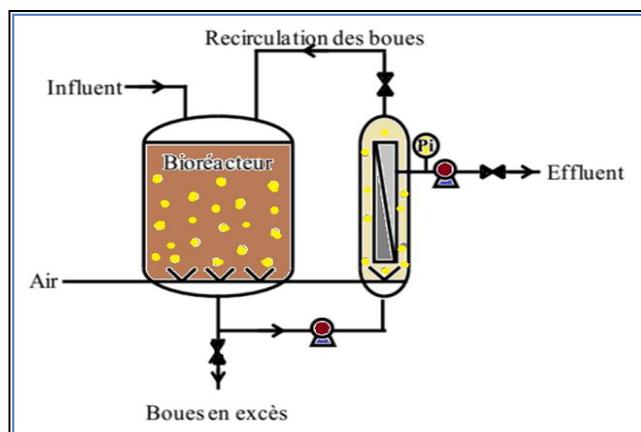
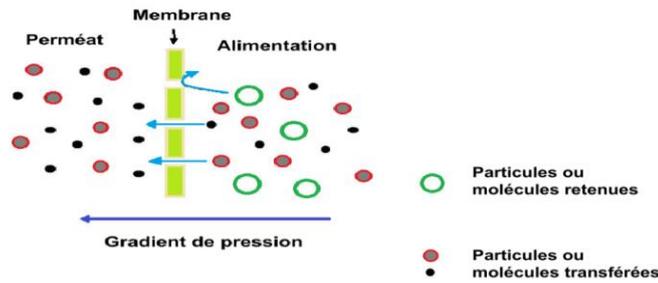


Figure II.08 : Bioréacteur à membrane immergée externe *MBRIE* [213].

5. UTILISATION DES *MBR* POUR TRAITER LES MEDICAMENTS :

Pour répondre aux exigences spécifiques de la réutilisation, différents niveaux de traitement peuvent être nécessaires. La *Figure II.10* illustre les polluants à éliminer en fonction de l'application. Les techniques classiques de traitement des eaux usées par boues activées sont particulièrement adaptées pour produire une eau de haute qualité [221]. Le processus de décantation joue un rôle central dans ce traitement et constitue une étape critique et limitante. En effet, la capacité de décantation des boues activées dépend des caractéristiques physiques, chimiques et biologiques de l'effluent.

Toutes les *MES* ne sont pas entièrement éliminées lors de la clarification, car ce processus ne retient généralement que les floccs biologiques d'une taille supérieure à environ $50 \mu\text{m}$, laissant passer les particules fines et les bactéries libres. Afin d'améliorer la séparation solide/liquide, il a été proposé de remplacer l'étape de décantation par une séparation de type *MF* ou *UF*.



SAKHRAOUI M.

Figure II.09 : Schéma du mécanisme de filtration sur membrane poreuse.

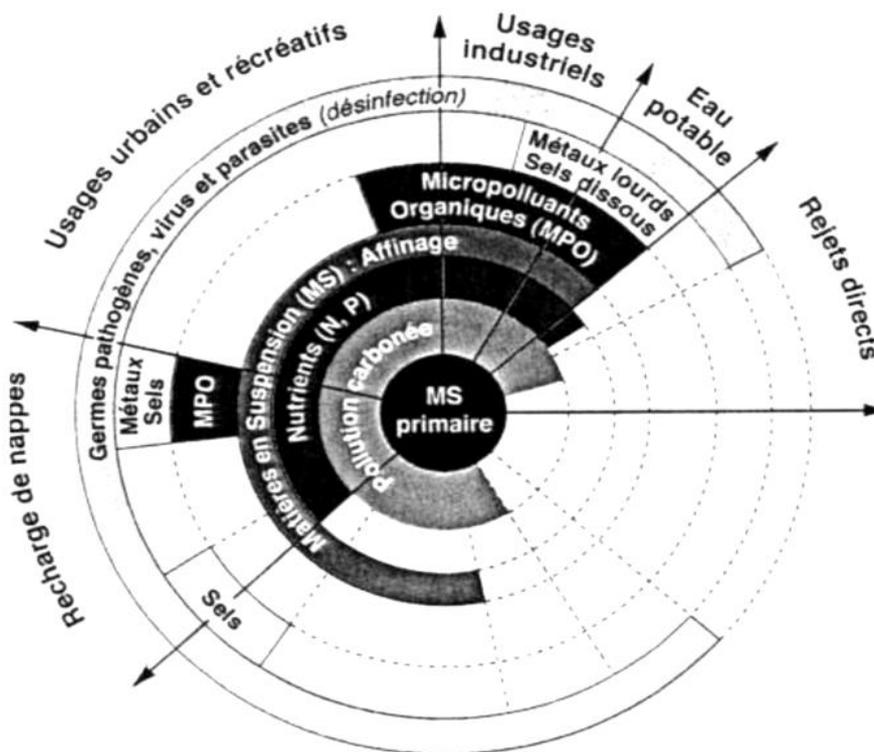


Figure II.10 : Recommandations sur les niveaux de traitement pour les diverses utilisations des eaux usées recyclées [222].

Les performances du système membranaire, qui permet la séparation de particules et/ou de molécules dans la phase liquide (*MF, UF, NF, OI*, dialyse et électrodialyse), dépendent du type de matériau membranaire utilisé ainsi que de ses propriétés structurales et de charge. Elles dépendent également de la nature de la force motrice, telle que le gradient de pression, de concentration, de température, de potentiel électrique ou de pression partielle, ainsi que de la configuration du module.

Sipma et al. (2010) [223] ont effectué une comparaison des performances entre les *STEP* classiques et les systèmes *MBR*. Leur étude, basée sur un ensemble considérable de données concernant 30 médicaments sélectionnés, révèle qu'il est notable que seulement trois molécules (*Solatol, Famotidine et Hydrochlorotiazolde*) sont mieux éliminées par les

STEP classiques que par les systèmes *MBR*. Pour les 27 autres molécules, l'abattement a été soit similaire, soit meilleur avec les *MBR*. L'*AMX* n'a pas été étudiée ; cette molécule et son action sont très étranges, il n'y a pas beaucoup d'études portant sur son élimination. Cependant, cette étude a démontré que cette molécule était éliminée efficacement, à plus de 98%, par les *MBR*. L'étude de *Radjenovic et al. 2009* [224], comparant l'élimination de 22 médicaments par *MBR* et *STEP*, confirme ce constat. L'abattement des molécules modérément éliminées en *STEP* (entre 10 et 60%) est sensiblement amélioré par les *MBR* et peut même dépasser 90% pour certaines. Pour les micropolluants peu biodégradables, polaires et persistants, comme c'est le cas de nombreuses médicaments, *Bernhard et al. (2006)* [183] précisent que de meilleures éliminations sont obtenues par *MBR* pour certaines molécules présentant une structure chimique complexe, non éliminées en *STEP* [225-226].

Le *MBR* améliore l'élimination des molécules modérément biodégradables et hydrophobes [227]. Le *MBR* s'avère plus constant dans l'élimination de micropolluants. Il est remarquable qu'avec des *SRT* des boues identiques, des niveaux d'abattement similaires aient été obtenus par les systèmes *MBR* et *STEP* pour différents micropolluants, ce qui confirme l'importance majeure du *SRT* dans l'élimination des micropolluants [228]. Par conséquent, le principal avantage du *MBR* semble être la possibilité de définir indépendamment le *SRT* et l'*HRT*.

Tambosi et al. (2010) [229] ont confirmé l'importance du *SRT* en constatant une amélioration de l'élimination de six molécules pharmaceutiques suite à une augmentation du *SRT* de 15 à 30 jours dans un *MBR*. Un *SRT* plus long permet de maintenir un potentiel métabolique lorsque certains substrats ne sont plus présents dans l'effluent. Ainsi, le *MBR* conserve une sorte de mémoire, ce qui lui confère une certaine souplesse face aux fluctuations importantes de concentration [227]. Malgré cette évidence quant au rôle de l'âge des boues, il n'a pas été possible d'établir de corrélations nettes entre le *SRT* et l'élimination des composés pharmaceutiques [230-232]. *Clara et al. (2005)* [233] suggèrent néanmoins qu'une valeur critique du *SRT* peut être déterminée si la biodégradation d'un composé dépend du *SRT*. De plus, il semble que les effets positifs du *SRT* sur l'élimination de la plupart des médicaments atteignent leur limite pour un âge des boues dépassant 30 jours [233].

La concentration accrue de biomasse dans les *MBR* entraîne une diminution de la charge massique et, par conséquent, de la quantité de *MO* disponible par unité de microorganismes, ce qui renforce les conditions de substrats limitants. Par conséquent, l'épuisement du carbone et/ou de l'azote augmente la dégradation de certaines molécules

pharmaceutiques, car ces conditions contraignent la biomasse à dégrader les substances faiblement biodégradables. Ce métabolisme oligotrophe favorise ainsi la dégradation de ces composés à des concentrations environnementales [233].

Il est également supposé que la forte concentration de biomasse dans les *MBR* a un effet positif sur l'élimination par sorption des micropolluants en raison de la plus grande quantité disponible de matière absorbante [223]. De plus, une concentration de biomasse plus élevée confère une stabilité et une résistance accrues aux pics de substances toxiques [199, 234]. D'un point de vue plus général, cette concentration de biomasse plus élevée permet de réduire le volume de boues produites, ce qui entraîne une réduction des coûts de traitement. Des abattements similaires à des *SRT* identiques indiquent également que les membranes utilisées dans les *MBR* ne constituent pas une barrière physique efficace pour l'élimination des micropolluants. Les molécules pharmaceutiques sont en effet de petite taille, comprises entre 200 et 300 Da, et sont donc au moins 100 fois plus petites que le seuil de coupure des membranes de *MF* et d'*UF* utilisées en *MBR* [79]. Cependant, la membrane qui permet la rétention quasi complète de *MES* retient également les molécules pharmaceutiques hydrophobes s'adsorbant sur les boues, lesquelles résident plus longtemps dans les *MBR* que dans les *STEP* conventionnelles, ce qui peut augmenter leur élimination [228].

CONCLUSION :

De nombreux nouveaux produits chimiques, notamment ceux utilisés dans le traitement médicamenteux, continuent d'augmenter en nombre et peuvent interagir avec le système endocrinien. Parmi eux, les antibiotiques sont ceux qui présentent le plus fort potentiel d'impact. Les eaux usées urbaines et domestiques sont ainsi les principales sources de contamination. Malheureusement la présence de ces antibiotiques, à savoir l'*AMX*, dans l'environnement aquatique indique que leur épuration en *STEP* n'est pas suffisante pour limiter leur action néfaste. En *STEP*, la pollution organique est majoritairement éliminée par des systèmes de boue activée basés sur une biomasse épuratrice en suspension dans des bioréacteurs aérés, alors que certains de ces antibiotiques sont récalcitrant et résiste à la biodégradation. Des traitements alternatifs tels que des procédés d'oxydation avancés peuvent être proposés pour permettre une élimination satisfaisante de ces micropolluants, mais leurs coûts élevés expliquent qu'ils soient appliqués uniquement pour la potabilisation de l'eau. Effectivement, le traitement des eaux usées est motivé par une préoccupation environnementale, mais il est crucial de prendre en compte l'aspect économique. Ainsi,

privilégier l'amélioration des procédés biologiques et des filières de traitement est préférable. Dans cette optique, le développement d'une technologie de séparation sur membrane poreuse en association à un système biologique (procédé hybride) représente une voie prometteuse, le *MBR* a permis de résoudre plusieurs problèmes concernant les performances en termes de qualité d'eau et de rendement épuratoire. Cette nouvelle sélectivité, qui implique la rétention des germes, virus et bactéries, dépend de plusieurs paramètres, notamment le choix de la membrane et du domaine de filtration. Elle permet de produire une eau répondant aux normes requises pour une utilisation en tant qu'eau de baignade. Quelques recherches portent sur l'application de ce procédé pour le traitement des produits pharmaceutiques ont abouti à un taux d'élimination de plus de 90% à 99% pour certains antibiotiques.

Chapitre **III**

Les études d'inhibition réalisées dans la présente étude seront conduites en deux modes de fonctionnement des réacteurs biologiques, initialement des tests ont été menés en batch (tests respirométriques) puis en continu (bioréacteur *MBRI*), plusieurs paramètres nécessitent une attention particulière afin que les résultats soient reproductibles et les expérimentations soient comparables entre elles. Le présent chapitre résumera toutes les procédures expérimentales conduites dans les études menées en batch et en continue, les paramètres à fixer dans ces deux modes de fonctionnement des réacteurs ainsi que les paramètres de suivi pour caractériser et quantifier l'inhibition par la molécule d'intérêt.

1. LES PARAMETRES DE SUIVI :

Une variété de paramètres de suivi a été effectués, se divisant entre ceux réalisés sur la phase liquide (comme le substrat synthétique, le perméat, etc.) et la phase solide (comprenant les inocula, la liqueur mixte prélevée des réacteurs, etc.). Le choix de ces paramètres s'est basé sur leur pertinence analytique. Les mesures effectuées dans la phase liquide sont entreprises après une filtration à des seuils de 0.45 ou $1.2 \mu m$, afin d'isoler la fraction soluble du contaminant. Les analyses des échantillons non filtrés sont rendues difficiles en raison de la présence de floccs en suspension. La teneur en carbone est quantifiée par la mesure de la *DCO*, ainsi que par le *COT*, le *TC*, l'*IC* et la *MO*. La fraction azotée est évaluée via la mesure de l'azote ammoniacal ($N-NH_4^+$), des nitrates ($N-NO_3^-$) et des nitrites (NO_2^-). Pour ce qui est de la fraction solide, elle est mesurée par la quantification des *MES*, des *MVS* et des matières sèches (*MS*). L'aptitude des boues à la décantation est principalement évaluée à travers l'indice des boues (*IB*) et l'indice filamenteux (*IF*).

1.1. Dosage de la *DCO* [82, 227] :

La *DCO* est une mesure qui évalue la pollution oxydable chimique de manière globale. Elle représente la quantité d'oxygène nécessaire pour oxyder la pollution lors d'une réaction à chaud avec un mélange sulfochromique. Après cette réaction, la quantité de dichromate consommée est mesurée colorimétriquement à l'aide d'un spectrophotomètre. Cette mesure a été effectuée en tenant compte des précautions suivantes :

- L'échantillon doit être dilué pour que la *DCO* soit incluses dans l'une des deux gammes des solutions de digestion pré-préparées ($0-150$ et $10-1500 mgO_2/L$).
- Un volume de $2 mL$ d'échantillon est mélangé à la solution de digestion. Ce mélange réactionnel est composé de dichromate de potassium (oxydant fort), de sulfate de mercure (pour éliminer l'interférence des autres ions, principalement les chlorures) et de la solution acide de sulfate d'argent (catalyseur).

- L'échantillon est ensuite chauffé à reflux pendant deux heures à 148-150 °C dans un bloc de digestion avant de le laisser refroidir.
- Les composés organiques oxydables provoquent la réduction d'ion dichromate Cr^{VI} en ion Chrome Cr^{III} . La quantité de dichromate résiduelle ou la quantité de Chrome trivalent produite est mesurée par spectrophotométrie visible à une longueur d'onde de 440 nm pour la basse gamme de 0-150 et à 620 nm pour la forte gamme de 10-1500. Un blanc est réalisé à chaque fois à partir d'un échantillon d'eau distillée.
- La concentration en DCO s'exprime en mgO_2/L , mais par simplification elle sera notée en mg/L , en utilisant les deux droites d'étalonnage préalablement établies, l'incertitude relative sur ces mesures est de l'ordre de 20%, sauf pour des solutions très diluée elle est inférieure à 20 mg/L.



Figure III.01 : Photographie du bloc de digestion et l'UV-Visible JASCO V-630 utilisés pour la mesure de DCO.

1.2. Dosage du COT, TC et IC [82, 227] :

Les analyseurs *Sievers InnovOx-Firmware Version 3.01* et *TOC-V CSH/CSN* de *SHIMADZU* ont été utilisés dans cette étude. Ces analyseurs, dotés d'une sensibilité élevée, permettent de mesurer la concentration de COT, d'IC et de TC dans les échantillons liquides. Ils utilisent une méthode d'oxydation à l'eau supercritique (SCWO) pour quantifier une large gamme de concentrations de carbone dans des matrices complexes d'échantillons, y compris celles contenant des concentrations élevées de solides dissous totaux (SDT) et de particules. Dans le dispositif d'analyseur COT, les composants organiques sont oxydés en CO_2 à des températures élevées dans un réacteur hermétiquement fermé, à l'aide d'un agent d'oxydation. La concentration de COT dans l'échantillon peut être calculée à partir de la différence entre les concentrations de TC et de IC ($COT = TC - IC$). De plus, un gaz peut être utilisé pour injecter l'échantillon afin d'éliminer le IC sous forme de CO_2 ; une fois cette

opération réalisée, la mesure est appelée carbone organique non purgeable (*CONP*). Les mesures de *CONP* sont appropriées lorsque l'échantillon présente un faible niveau de carbone organique purgeable (*COP*). Ces analyseurs peuvent être utilisés pour surveiller différents échantillons d'eau, allant de l'eau ultra-pure contenant 0.5 ppm ($= \text{mg/L}$) de *COT* à l'eau contenant jusqu'à 50000 ppm de *COT*.



Figure III.02 : Analyseur *COT* Sievers InnovOx–Firmware et TOC-V CSH/CSN de SHIMADZU utilisé pour la mesure de *COT*.

1.3. Dosage de la Matière Organique *MO* [82] :

La concentration de la *MO* a été évaluée en utilisant l'oxydation au permanganate de potassium en milieu acide ; le permanganate fournit en milieu acide l'apport d'oxygène nécessaire à l'oxydation complète des *MO* provenant de diverses sources dans l'échantillon. Le protocole opératoire utilisé pour déterminer ce paramètre est le suivant :

- *Matériels* : burette graduée en *mL* et son support, erlenmeyer de 250 mL , éprouvette de 100 mL et trois pipettes de 10 mL graduées en dixième de *mL*.
- *Réactifs* : Solution de permanganate de potassium *N/80* (Une solution normale, *N*, contient 3.6068 g de KMnO_4 en produit pur par litre ; à partir d'une solution *N/10* contenant 3.1607 g de KMnO_4 pur par litre, on pourra obtenir 1000 mL d'une solution de *N/80* en prenant 125 mL de la solution *N/10* que l'on complète avec 875 mL d'eau distillée.), Solution de sel de *Mohr* (sulfate de fer et d'ammoniaque) à 0.5% (Dissoudre 5 g de sel de *Mohr* en produit pur dans 500 mL d'eau distillée additionnée de 5 mL d'acide sulfurique en produit pur ; compléter à 1000 mL ; On obtient une solution à 0.5% .), Solution d'acide sulfurique au $\frac{1}{2}$ en volume (Diluer 50 mL de H_2SO_4 en produit pur dans 50 mL d'eau distillée. Refroidir pendant la préparation pour éviter l'ébullition par réaction exothermique.).

- *Protocole* : Introduire 100 mL d'échantillon sous analyse dans l'erenmeyer. Ajouter 2.5 mL d'acide sulfurique au 1/2, puis porter à ébullition. Introduire alors 10 mL de permanganate de potassium N/80 et maintenir à ébullition 10 mn très exactement. Refroidir rapidement, puis introduire 10 mL de solution de sel de Mohr. Remplir la burette avec la solution de permanganate N/80 jusqu'au trait zéro. Verser goutte à goutte avec la burette jusqu'à une légère teinte rose.

La teneur en MO dans l'eau analysée exprimée en mg/L d'oxygène est :

$$MO \text{ en mg/L d'O}_2 = 0.5 (A - B) \quad (\text{III.01})$$

NB : Si l'analyse est effectuée à l'aide d'une burette graduée en mL et si A et B sont les volumes de permanganate de potassium utilisés :

$$MO \text{ en mg/L d'O}_2 = A - B \quad (\text{III.02})$$

Les résultats sont généralement exprimés en mg/L d'O₂ mais peuvent l'être parfois en mg/L de KMnO₄ :

$$1 \text{ mg/L d'O}_2 = 3.95 \text{ mg/L de KMnO}_4 \quad (\text{III.03})$$

1.4. Dosage des N-NH₄⁺, N-NO₃⁻ et des NO₂⁻ [82, 227] :

Les mesures de la fraction azotée sont réalisées par les mesures des formes suivantes N-NH₄⁺, N-NO₃⁻ et des NO₂⁻ dans des échantillons de la liqueur mixte filtrée du bioréacteur et dans le perméat. Le dosage est effectué en utilisant des tubes prés dosés et à l'aide du spectrophotomètre HACH DR3900, *Figure III.03*. Après avoir filtré la liqueur mixte issue de bioréacteur et de perméat par un papier filtre glass microfibre filters GF/C Whatman à un seuil de coupure de 1.2 μm, les échantillons obtenus ont été dosés dans les tubes LCK 340 pour le nitrate, les tubes LCK 342 pour nitrites et les tubes LCK 303 pour l'ammonium, la mesure est une lecture directe dans le spectrophotomètre, exprimée en mg/L.



Figure III.03 : Photographie d'un Spectrophotomètre HACH DR3900 pour les analyses avec des tubes prés dosés.

1.5. Dosage de *MES*, *MVS*, *MS* [82, 227] :

- **Les *MES* et les *MVS* :**

Les *MES* et *MVS*, sont considérées comme indicateur important dans la caractérisation des boues activées, l'importance de ces deux paramètres est restée beaucoup plus dans la détermination des *MVS*, qui donne une estimation approximative, non précise, sur la quantité de la biomasse présente dans la liqueur mixte des boues activées. Pour leur détermination, deux techniques sont principalement utilisées, la centrifugation et la filtration sous vide. La technique de centrifugations présente plusieurs inconvénients vis-à-vis la précision de la mesure et la répétabilité ; donc, l'utilisation de la technique de filtration sous vide est recommandée. Le protocole utilisé pour la détermination de *MES* et des *MVS* est le suivant :

- ✓ Utiliser un filtre à fibre de verre de $0.45 \mu m$ de porosité, le séché à $150 \text{ }^\circ C$ à l'étuve pendant 20 min après un simple nettoyage avec de l'eau distillée.
- ✓ Refroidir le filtre dans un dessiccateur et peser, noté m_1 .
- ✓ Prélever un volume V d'échantillon à caractériser, tel que la masse de matières retenues sur le filtre soit au moins de 1 mg/cm^2 , sinon diluer l'échantillon.
- ✓ Placer le filtre sur le support, fixer l'ensemble de filtration et la trompe à vide, verser l'échantillon, mettre sous vide et laisser filtrer jusqu'à écoulement complet.
- ✓ Rincer les parois du système avec de l'eau distillée, couper le vide, retirer le filtre et le séché à l'étuve à $105 \text{ }^\circ C$ au moins 02 heures jusqu'au avoir une masse constante après refroidissement 20 min dans le dessiccateur puis peser, noté m_2 .
- ✓ Le point de matière en suspension en mg/L , donné par :

$$MES = \frac{m_2 - m_1}{V} \quad (III.04)$$

- ✓ La mesure des *MVS* se fait par continuation de procédure de détermination de *MES*. Le taux de *MVS* est obtenu par double pesée après une calcination à $550 \text{ }^\circ C$, pendant 2 heures , on note m_3 . L'incertitude relative sur ces mesures est de 5% , sauf pour des valeurs très faibles (inférieurs à 5 mg/L) pour lesquelles l'incertitude est grande. La valeur de *MVS* sera déterminée comme suit :

$$MVS = \frac{m_2 - m_3}{V} \quad (III.05)$$

Le rapport des *MVS* (%) :

$$\% \text{ MVS} = \frac{[MVS]}{[MES]} * 100 \quad (III.06)$$

- **Les MS :**

La mesure de la masse de matière sèche se réalise en trois étapes :

- ✓ Le prélèvement de l'échantillon à mesurer est une étape assez délicate car les *MES* ont tendance à décanter. Pour avoir une mesure fiable, il est nécessaire de trouver un moyen d'homogénéisation du milieu de prélèvement et de prélever un échantillon suffisamment volumineux pour être représentatif du milieu. Il est aussi recommandé de faire plusieurs prises d'échantillons.
- ✓ L'échantillon prélevé est placé dans un récipient en verre ou/et en aluminium préalablement séché et pesé, puis mis à l'étuve, à 150 °C jusqu'à complète évaporation du liquide.
- ✓ Le récipient est à nouveau pesé et la masse de matières sèches en est déduite par différence de poids

1.6. Estimation d'Indice des Boues (*IB*) et l'Indice Filamenteux (*IF*) [82, 227] :

L'aptitude des boues à décanter a été quantifiée par l'estimation de l'*IB*, qui sera mesurée quantitativement en utilisant une éprouvette graduée de 01 Litre. L'*IB* est mesuré afin de caractériser l'état initial des inocula. Cet indice représente le volume occupé par un gramme de boue après 30 minutes de décantation statistique dans une éprouvette graduée et transparente, il est défini par :

$$IB = \frac{VD_{30}}{MES_{ep}} \quad (III.07)$$

Sachant que : VD_{30} : volume de boue décanté en trente minutes (en mL), MES_{ep} : concentration en *MES* dans l'éprouvette (en g/L). Le test n'est validé que si le volume décanté est entre 100 mL et 300 mL. Lorsque la décantation des boues est médiocre, il devient impératif de faire des dilutions sur les échantillons à tester, et le calcul de l'*IB* tiendra compte du facteur de dilution. Le calcul de l'*IB* exige la mesure de la concentration en *MES*. L'*IB* est un paramètre précieux, qui a de multiple application au niveau de *STEP*. Les valeurs obtenues sont comparées aux valeurs seuils fixées, **Tableau III.01**.

Tableau III.01 : Valeurs seuil de l'indice de boue [198].

$IB < 100 \text{ mL.g}^{-1}$ de <i>MES</i>	Condition idéale : les boues sédimentent facilement et plus souvent bien minéralisées ($MVS < 65\%$)
$100 < IB < 150 \text{ mL.g}^{-1}$ de <i>MES</i>	Condition acceptable pour des installations fonctionnant dans le domaine de faible charge-aération prolongé.
$IB > 150 \text{ mL.g}^{-1}$ de <i>MES</i>	Difficultés possible de décantation liées au développement de bactéries filamenteuses.

L'estimation de l'abondance des filaments dans les boues sera par l'attribution d'*IF* [198, 230], après une visualisation microscopique à plusieurs agrandissements dans un microscope *OPTECH-TECHNOLOGY* menu d'application pilote *INFINITY*, *Figure III.04*.



Figure III.04 : *Moyen de mesure de l'indice de boues et photographie d'un microscope OPTECH Technology-Infinity utilisé pour la visualisation des floccs bactériens.*

1.7. Paramètres de Mesure Directe :

Certains paramètres ont été mesurés directement par l'utilisation d'un seul appareil multi-paramètres, *Oxi-multi 3430* de *WTW*, *Figure III.05*, qui permet de mesurer : la salinité, *TDS*, conductivité, oxygène dissous, potentiel redox, *pH* et la température, par l'utilisation des trois sondes *IDS* de *WTW*, raccordées à ce dispositif.



Figure III.05 : *Un Multi-paramètres, Oxi-multi 3430 de WTW utilisé pour les mesures directes de certains paramètres.*

Afin d'assurer un meilleur suivi des concentrations d' O_2 lors des tests respirométriques et de bien exploiter les résultats de consommation d'oxygène en fonction du temps, la sonde de l'appareil d'oxymètre utilisée doit avoir un temps de réponse assez réduit, cette durée est nécessaire pour que la valeur de l'oxygène passe de 0 à 99% de la concentration de saturation en oxygène. Ceci sera déterminé en relevant le temps nécessaire pour passer d'une eau dépourvu d'oxygène (par barbotage d'azote gazeux), à une solution saturée en oxygène (en barbotant d'air) [228]. Les sondes utilisées dans ce travail, présentent un temps de réponse varie entre 3 et 7s ; ce qui permet la détection rapide de la variation de la mesure d'oxygène dissous, d'une part, et d'autre part d'utiliser un petit pas de temps d'enregistrement.

1.8. Dosage du Micropolluant Amoxicilline (AMX) :

La molécule d'AMX a été analysée dans la liqueur mixte filtrée et le perméat du MBR avec un analyseur chromatographique liquide couplé à un détecteur *UV-Visible*, *HPLC/UV/Fluo*, *Figure III.06*, de la marque *Chaine HPLC 600E*, piloté par un logiciel *EMPOWER-Build1154*, et avec l'utilisation de la colonne *APEX-WP-ODS, 25cm/4.6mm*.

Pour s'assurer de la bonne quantification d'AMX dans les échantillons, d'autres analyses ont été réalisées, utilisant aussi la chromatographie liquide couplée à un triple quadripolaire *LC/MC/MC*, de la marque *Micro API*, *Figure III.07*, menu d'un détecteur *UV/VIS PDA 996* et piloté par un logiciel *Masslynx 4.1.*, avec l'utilisation de la colonne *APEX WP ODS 7 μ , 25 cm/4.6 mm*, en présence d'un générateur d'azote.

Pour la quantification du micropolluant piégé la matrice solide, les boues activées séchées ont été analysées avec un Infra-Rouge à transformée de fourrier, *Figure III.08*, de la marque *Spectrometre IR-TF Nexus (Thermo-Electron)* piloté par un logiciel *OMNIC (5.0.) Analytique ESP* et utilisant un *ATR en Diamant Smart Golden Gate*.



(a)



(c)

Figure III.06 : Photographie de l'appareil d'HPLC utilisé pour la quantification du micropolluant dans la fraction liquide



(a) (c)
Figure III.07 : Photographie de l'appareil LCMS-MS utilisé pour la quantification du micropolluant dans la fraction liquide



(a) (c)
Figure III.08 : Photographie de l'appareil IR utilisé pour la quantification du micropolluant dans la fraction solide

2. QUALIFICATION ET QUANTIFICATION DE L'ACTIVITE :

La quantification et la qualification de l'activité microbienne ont été évaluées par des tests respirométriques appliqués sur des boues activées acclimatées et non au substrat synthétique et aux micropolluants, incubés dans des réacteurs batch, ou des boues activées prélevées au niveau du bioréacteur *MBRI*, ces tests offrent un suivi rapide et simple de l'évolution de la vitesse de la consommation d'oxygène dissous en condition aérobie *OUR* (*Oxygen Uptake Rate*) par les microorganismes. Le principe de la technique, les conditions opératoires, la mise à l'endogène, la discrimination entre l'activité des hétérotrophes et des autotrophes seront bien détaillés dans le *Chapitre IV*.

3. LES EFFLUENTS SYNTHETIQUES UTILISEÉS :

L'effluent qui alimente une *STEP* urbaines, présente un rapport de biodégradabilité d'eau usée brute, noté *DCO/DBO*, d'environ 2, ce qui indique un caractère moyennement biodégradable [225]. Pour utiliser des substrats synthétiques proches aux effluents réels, plusieurs études ont été menées [221, 235- 237] afin de décider des effluents synthétiques les plus proches des effluents réels de point de vue biodégradabilité.

3.1. Substrat Synthétique Utilisé dans les Réacteurs Fonctionnant en Batch :

L'effluent synthétique utilisé dans les études en batch est un substrat binaire contenant une source de carbone et une source d'azote ainsi que certains micronutriments, les produits utilisés sont de nature facilement biodégradable afin de faciliter leur dégradation ainsi que leur rapide acclimatation. Généralement, la *MO* qui est directement assimilable par les microorganismes ne représente généralement qu'environ 11 % en moyenne dans les effluents réels [238], et les autres composés doivent être hydrolysés par les enzymes extracellulaires, avant leur assimilation. L'effluent synthétique utilisé à base de sels de chlorure d'ammonium comme source d'azote à nitrifier et d'acétate de sodium comme source de carbone organique nécessaire à la croissance et l'entretien de la biomasse, présente une phase de latence très réduite qui serait idéal à utiliser et à considérer dans les études en batch [239]. Les nutriments ajoutés permettent principalement à assurer une source de phosphore nécessaire à la croissance bactérienne [240] et offrant ainsi des conditions se rapprochant de l'environnement des eaux usées à traiter. Le **Tableau III.02** regroupe la composition de l'effluent synthétique utilisé dans toutes les études menées en batch.

Tableau III.02 : *Les caractéristiques de l'effluent synthétique et de la molécule d'AMX.*

Constituants	Concentration (mg/L)
Source de carbone : $C_2H_3O_2Na$ (Acétate de sodium)	2564
Source de l'azote : NH_4Cl (Chlorure d'ammonium)	1492
<i>Les nutriments :</i>	
NH_4Cl-N	6.8
$FeCl_3$	2.3
$MgSO_4$	166
$CaCl_2$	412
<i>Phosphate Plug: pH, 7.24</i>	
K_2HPO_4	410
KH_2PO_4	90
<i>Le micropolluant :</i>	
Amoxicillin: $C_{16}H_{19}N_3O_5S$	02 gammes
AMX trihydraté : $C_{16}H_{19}N_3O_5S.3H_2O$	

3.2. Substrat Synthétique Utilisé dans les Réacteurs Fonctionnant en Mode Continu d'Alimentation :

Le réacteur *MBRI*, sera alimenté de façon continu par la solution concentrée en substrat synthétique tertiaire composé d'acétate de sodium tri hydraté ($C_2H_3NaO_2, 3H_2O$), de chlorure d'ammonium (NH_4Cl) et l'Hydrogénophosphate d'ammonium ($N_2H_9PO_4$) comme source de carbone, d'azote et de phosphore respectivement, sachant que la concentration en substrat dans le *MBR* est fixée de sorte qu'on atteigne une charge massique de $0.1 \text{ kg.m}^{-3} \cdot \text{j}^{-1}$. Par ailleurs, quelles que soit les conditions de charge volumique, les boues doivent être

dopées en nutriment avec un rapport $DCO/N/P$ égale à $100/10/1$, afin d'éviter les problèmes de carence en nutriments sans qu'on puisse éliminer la charge azotée et phosphorée.

Tableau III.03 : Concentrations en chlorure et d'AMX à injecter par un pas dans le MBR

	m_{AMX} (g) (N)	m_N (g)
Pas 1 = 0 mg/L	0	33.63
Pas 2 = 25 mg/L	0.0125	33.62
Pas 3 = 50 mg/L	0.025	33.62
Pas 4 = 75 mg/L	0.037	33.61
Pas 5 = 100 mg/L	0.05	33.61
Pas 6 = 125 mg/L	0.06	33.60
Pas 7 = 150 mg/L	0.075	33.60
Pas 8 = 175 mg/L	0.087	33.60
Pas 9 = 200 mg/L	0.1	33.60

L'alimentation du réacteur *MBRI* sera par des pas chaque *09 jour*, le calcul des concentrations à injecter afin d'assurer la fixation des différents rapports sera détaillé dans *l'Annexe A*, les calculs des concentrations à injecter pour le substrat phosphoré, azoté et carboné sont résumés respectivement dans les *Tableaux III.3* et *III.4*, notons qu'un apport en carbone en azote est assuré également par le micropolluant l'AMX ($C_{16}H_{19}N_3O_5S$) et sera considéré dans les différents calcul des doses à injecter.

Tableau III.04 : Les concentrations en acétate et d'AMX à injecter par un pas dans le MBR

Le Pas	m_{AMX} (g) (C)	m_C (g)
Pas 1 = 0 mg/L	0	256.36
Pas 2 = 25 mg/L	0.0125	256.33
Pas 3 = 50 mg/L	0.025	256.30
Pas 4 = 75 mg/L	0.037	256.27
Pas 5 = 100 mg/L	0.05	256.23
Pas 6 = 125 mg/L	0.06	256.21
Pas 7 = 150 mg/L	0.075	256.17
Pas 8 = 175 mg/L	0.087	256.14
Pas 9 = 200 mg/L	0.1	256.10

4. SOURCE DES D'INOCULA UTILISÉS :

Les inocula utilisés dans la présente étude sont collectés au niveau de deux stations traitant des eaux usées urbaines et plus précisément des bassins biologiques. La qualité et la source des boues activées affectent énormément les résultats de la biodégradabilité et principalement les tests respirométriques, car la réponse respirométrique dépendent de l'activité microbienne, qui elle-même dépend de l'état de minéralisation des boues, qui est fonction en grande partie de l'âge des boues et des conditions de fonctionnement de la station [228]. Les sources de boues activées utilisées dans cette étude sont de deux types :

- CAS** : Les premiers inocula utilisés dans les différentes expériences, sont des boues activées récoltés au niveau de la *STEP* des eaux usées d'*IBN ZIAD*, ces boues ont été principalement utilisées pour les différents tests en batch (tests respirométriques), *Figure III.09*, le réseau unitaire de cette *STEP*, récolte les rejets liquides domestiques et les eaux industrielles de la ville de *Constantine* ; elle est située à 12 Km de la ville, dans la daïra de *Hamma Bouziane*, sur la route de *Mila*. Elle s'étend sur une superficie de 12 Hectares. Cette *STEP* est prévue pour 45.000 équivalents habitants (*EH*), pour traiter un débit de 150 L/s avec une capacité de 800 à 1000 L/s, *Tableau III.05*. Les boues *CAS* subiront une étape d'acclimatation avant de les utiliser dans les différents tests : une partie des boues activées est acclimatée au substrat synthétique seulement (*SCAS*), une partie est acclimatée à l'*AMX (ICAS)* et la dernière partie est acclimatée au substrat et l'*AMX (SICAS)*, le détail de cette acclimatation sera présenté dans les prochaines parties de l'étude expérimentale. Les caractéristiques des inocula sont décrites dans le *Tableau III.06*.



Figure III.09 : Station d'épuration de boues activées d'*IBN ZIAD*, Algérie.

Tableau III.05 : Capacité nominale de traitement et qualité moyen requise des eaux usées.

Paramètres	Valeur
Eau brute	
Débit moyen	69.120 m ³ /jour soit 800 L/s
Débit de pointe	8640 m ³ /heure soit 2400 L/s
Demande biologique d'oxygène (<i>DBO</i>)	0.054 Kg/hab./jour
Charge moyenne de <i>DBO/Jour</i>	20736 Kg
Concentration moyenne de <i>DBO</i>	300 mg/L
Charge moyenne de <i>DCO/Jour</i>	49920 Kg
Concentration moyenne de <i>DCO</i>	722 mg/L
Charge de solide en suspension (<i>SS</i>)	0.09 Kg/hab./jour
Charge moyenne de <i>SS/Jour</i>	500 mg/L
Concentration en Ammonium (<i>NH₄</i>)	50 mg/L
Charge de <i>NH₄</i> par Jour	3456 Kg
Charge de boue	0.1 Kg _{DBO} /Kg _{LMSS} /jour
Liqueur mixte <i>SS</i>	3500 mg/L

Eau traitée	
Demande biologique d'oxygène (DBO)	≤ à 10 mg/L
Matières en suspension (MES)	≤ à 10 mg/L
Ammonium (NH ₄)	≤ à 03 mg/L
Total des coliformes	≤ à 100 par 100 mL

Tableau III.06 : Caractéristiques physico-chimiques des boues CAS avant acclimatation

Conductivité ($\mu\text{S/cm}$)	Salinité (%)	pH	% moyen de minéralisation	IB mL/g	IF
1807	0.7	7.53	48.76	30 à 100	4

La morphologie des floccs de CAS, montre la présence en grande quantité des bactéries filamenteuses à des longueurs de squelettes relativement élevées, équivalent à un $IF = 04$ [228], en revanche la majorité des floccs microbiens sont ouverts, il s'agit donc d'une boue partiellement foisonnée *Figure III.10*.

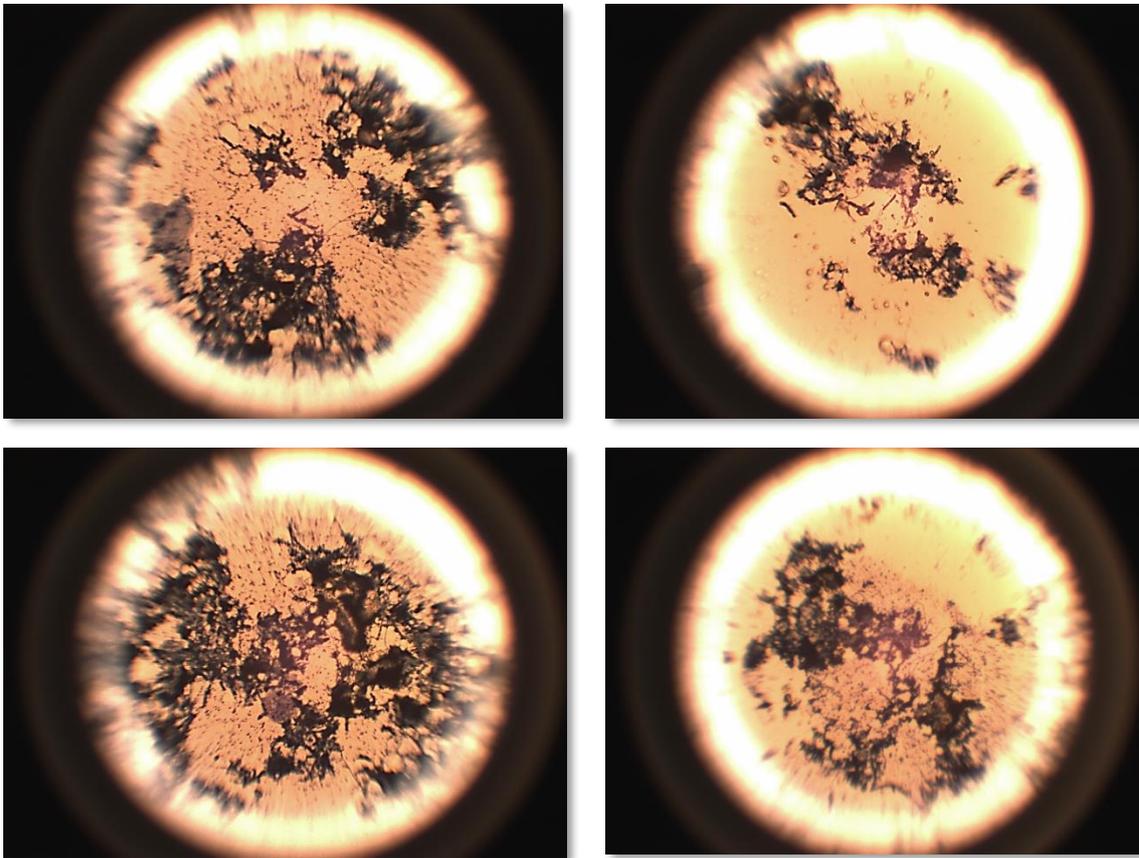


Figure III.10 : Visualisation microscopique des boues de la station d'épuration conventionnel d'IBN ZIAD, Algérie.

- **MAS :** Les boues utilisées pour l'inoculation du bioréacteur MBRI proviennent du bassin d'aération de la station d'épuration à membrane, *Figure III.11*, de Grande-Motte, Montpellier. Cette station est située à proximité du bassin de l'étang d'Or dans l'Agglomération de Montpellier. C'est une ancienne station à boues activées

réhabilitée en *MBR* en 2013, et qui présente une capacité de traitement maximale de 65000 équivalents habitants (*EH*). Afin de respecter les normes des rejets sur les milieux sensibles, un traitement de la charge azoté est réalisé grâce à des passages d'effluent dans la zone anaérobie, anoxie et puis dans le bassin aéré, *Tableau III.07*. La station est équipée de membranes immergées de type planes (*Kubota Submerged Membrane Unit*® - *KUBOTA, Japan*), réparties dans quatre bassin membranaires d'une surface totale de 16240 m² et une taille de pores moyenne de 0.2 µm, assurant une désinfection physique poussée. Cette station connaît des ajustements saisonniers principalement en période estivale. Le débit entrant dans la station peut varier de 25000 m³/J à 5000 m³/J en moyenne selon la saison.



Figure III.11 : Station d'épuration à membrane de GRANDE MONTE, France.

Tableau III.07 : Caractéristiques physico-chimiques des boues MAS.

<i>DCO (mgO₂/L)</i>	<i>MES (mg/L)</i>	<i>MVS (mg/L)</i>	<i>% moyen de minéralisation</i>
140	2210	1610	72.85

L'échantillonnage des liqueurs mixtes pour les deux types de boues activées est effectué à l'aide d'une bouteille à immersion, qui permet d'accéder à différentes profondeurs du bassin, mais en se positionnant dans les mêmes points de prélèvements. Les prélèvements sont effectués après une demi-heure au minimum de fonctionnement des aérateurs superficiels, pour assurer la bonne homogénéisation de la liqueur mixte [228]. Les inocula sont ensuite récupérés après la mesure directe de certains paramètres, comme : la température, du *pH*, la conductivité, la salinité, dans des flacons de 01 litre en verre ombre, puis ces flacons sont réfrigérés à 4°C, grâce à des accumulateurs de froids et une glacière, afin de ralentir l'activité microbienne.

5. FIXATION DU RAPPORT S_0/X_0 DANS LES REACTEURS BATCH :

La qualité du substrat utilisée, la liqueur mixte et les conditions opératoires sont très importants dans ces études, particulièrement, le rapport initial entre le substrat et la biomasse du mélange, noté S_0/X_0 , principalement dans les études qui seront menées en condition batch, ce rapport conditionne fortement la réponse des tests principalement les réponses respirométriques suite à une injection d'un substrat [241].

Ce rapport influence à la fois les processus métaboliques impliqués dans la dégradation, l'identification des paramètres biocinétiques et la dissociation des compartiments de biodégradabilité lente et rapide. L'apport de *MO* assimilables par les microorganismes alimente deux processus distincts : le stockage de matière intracellulaire et la croissance microbienne.

L'intensité de ces deux processus dépend du rapport S_0/X_0 .

- Un faible rapport S_0/X_0 (<0.2 gDCO/gMVS) entraîne des cinétiques rapides au cours desquelles la multiplication microbienne est négligeable par rapport à la quantité de bactéries présentes dans le milieu. Ces conditions favorisent l'obtention de constantes biocinétiques représentatives de la biomasse initiale, similaires à celles obtenues dans les stations d'épuration où le substrat est généralement le facteur limitant [242-244].
- Lors des cinétiques à fort rapport S_0/X_0 (>2 gDCO/gMVS) [245], la reproduction cellulaire devient significative et la vitesse de dégradation augmente de manière exponentielle. Ces cinétiques permettent d'identifier précisément les paramètres caractérisant la croissance [246]. Cependant, ces constantes cinétiques ne représentent pas la majorité de la biomasse initialement présente. En effet, dans le cas des cultures microbiennes mixtes, l'excès de substrat favorise le développement des bactéries à taux de croissance plus élevé [235] et induit des processus métaboliques particuliers. Les constantes cinétiques sont alors des valeurs maximales "intrinsèques" liées à la nature des microorganismes et même du substrat.
- Un équilibre optimal dans le rapport S_0/X_0 est essentiel, car les deux conditions précédentes présentent des avantages et des inconvénients. Il doit être suffisamment élevé pour permettre une oxydation prolongée de la *DCO* facilement biodégradable pendant au moins une *demi-heure*, mais aussi

suffisamment bas pour éviter une croissance significative. Ce rapport varie largement, dépendant de l'activité effective de la boue active utilisée et de la composition de l'effluent. Par conséquent, pour un même rapport, la réponse respirométrique diffère d'une expérience à une autre [228].

Deux modalités expérimentales existent pour initier différents rapports S_0/X_0 , soit en variant la concentration de S_0 et en fixant X_0 , soit l'inverse [247]. Dans cette étude le rapport S_0/X_0 a été obtenue en variant les volumes d'effluent injecté et de la liqueurensemencé dans le réacteur (la cellule respirométrique). Le rapport S_0/X_0 est exprimé en $gDCO/gMVS$, dans les premières études respirométriques réalisées en batch, de faibles rapports ont été imposés, afin de minimiser la durée d'expérience et de réaliser plusieurs injections successives de substrat, ainsi, d'éviter de générer des croissances significatives lors des tests successifs menés dans le même respiromètre [228].

CONCLUSION :

Dans cette étude, deux sources d'inoculation ont été employées, deux configurations distinctes ont été établies (batch et continue), un seul effluent synthétique a été employé pour garantir la cohérence des essais et permettre une comparaison précise de l'efficacité des traitements des effluents qu'ils contiennent ou non la molécule d'amoxicilline. Les prochains chapitres examineront l'impact toxique de l'amoxicilline dans des réacteurs en mode batch, suivi de son élimination dans des conditions spécifiques du bioréacteur mis en place.

Chapitre IV

Un effort particulier a été déployé dans ce chapitre pour expliquer en détail la technique respirométrique, dans le but de faciliter sa compréhension et son utilisation. Cette technique présente plusieurs avantages, notamment sa rapidité pour obtenir des résultats avec peu de manipulations, ainsi que son importance dans le domaine du traitement biologique des eaux usées, la caractérisation de la biodégradation et de l'activité microbienne (dégradation/inhibition). Une attention particulière a été accordée à l'établissement d'un protocole standard, car de nombreuses interprétations erronées peuvent s'infiltrer liées à l'effet de la température, le débit d'aération, la vitesse d'agitation, la source et les caractéristiques des inocula, ainsi que le rapport S_0/X_0 . En effet, le suivi de l'activité de la biomasse, leur réaction aux substances toxiques, ainsi que l'efficacité de l'épuration ont été évalués à l'aide de mesures spécifiques de la consommation de substrat [193] ou de la consommation d'oxygène [194], éliminant ainsi le besoin de réactifs ou d'équipements complexes lors des tests. Ce chapitre utilise deux types de respiromètres, l'un en aération continue et l'autre en aération discontinue, pour caractériser l'effet de la molécule d'AMX. L'accent est surtout mis sur la mesure des *OUR*, qui fournit de nombreuses informations sur les performances des procédés biologiques, ainsi que sur la validation de la technique de mise en condition endogène, la détermination du K_{La} , et l'étude de l'effet du rapport S_0/X_0 , ainsi que la reproductibilité des tests respirométriques.

1. PRINCIPE DE LA RESPIROMETRE :

La respirométrie est basée sur la mesure et l'interprétation, dans des conditions expérimentales bien définies, la vitesse ou le taux de consommation d'oxygène, *OUR* par les microorganismes épuratifs dans un réacteur (cellule respirométrique), afin de quantifier leur activité et déterminer certaines grandeurs biocinétiques. Sous des conditions aérobies, la biomasse consomme l'oxygène en proportion de l'élimination du substrat et de leur croissance. Le taux de respiration est la quantité d'oxygène utilisée par unité de volume et de temps [51, 229-231]. Dès les premières applications de la respirométrie en 1921 puis en 1928 dans le domaine du traitement des eaux, cette technique a connu une multitude d'améliorations, augmentant son application et sa sensibilité [198]. Après 1960, plusieurs recherches ont été menées afin d'améliorer l'acquisition des mesures et sont devenues semi-automatiques [195-197]. A ce jour, la respirométrie a su s'imposer comme une technique robuste et moins coûteuse, qui a une variété d'utilisations [228] :

- Le test de biodégradabilité des effluents industriels et des substances peu solubles, afin d'estimer leur risque sur l'équilibre écologique des milieux récepteurs [199-200].

- L'estimation des coefficients de transfert d'oxygène, K_La , dans les bassins biologiques aérobies, et les performances des systèmes d'aération [229-231].
- La gestion de l'inhibition de certains composés qui pourrait nuire à la biodégradabilité et avoir un effet néfaste sur les procédés de traitement des eaux usées [201-203].
- Le suivi de la nitrification et l'oxydation de l'azote ammoniacal et l'azote nitrique par les microorganismes autotrophes [204].
- La caractérisation des influents des stations d'épuration à boues activées, ainsi que les rendements de dépollution par l'application de certains modèles mathématiques développés par l'IAWQ [205-211, 229-231, 227].
- La détermination des constantes biocinétiques, utilisant le modèle *ASM* pour la modélisation et l'optimisation des procédés biologiques [212, 237, 229-231, 227].
- Suivi de minéralisation des boues en phase solide dans les lits de séchage et du traitement du foisonnement par chloration (prolifération filamenteuses) [248-249, 228].

Deux types de respiromètre en phase liquide existent, la respirométrie aérobie et la respirométrie anoxique. Sachant que pour cette dernière, elle consiste à suivre l'évolution de la consommation des nitrites et des nitrates par les bactéries hétérotrophes en condition anoxie [214-215, 227]. Par contre, la respirométrie liquide aérobie consiste à estimer la quantité d'oxygène consommée ou la quantité de dioxyde de carbone produite par la biomasse. Le bilan massique par rapport à la concentration d'oxygène est exprimé par l'équation :

$$\frac{d(V_L S_O)}{dt} = Q_e S_{Oe} - Q_s S_O + V_L K_L a (S_{Oe} - S_O) - V_L OUR_T \quad (IV.01)$$

Où :

V_L : volume de la phase liquide dans le respiromètre (L).

S_O : concentration de l'oxygène dissous dans la phase liquide ($mg.L^{-1}$)

S_{Oe} : concentration de l'oxygène dissous à l'entrée du respiromètre ($mg.L^{-1}$)

S_{Os} : concentration de saturation de l'oxygène dissous dans la phase liquide ($mg.L^{-1}$)

K_La : coefficient de transfert d'oxygène (h^{-1})

Q_e & Q_s : débit du liquide à l'entrée et à la sortie du respiromètre respectivement ($L.h^{-1}$)

OUR_T : taux de respiration total ($mg.L^{-1}.h^{-1}$)

La respirométrie liquide aérobie est classé en quatre types [228] :

- **Respirométrie LSF** : statique gaz, alimentation continue en liquide, il s'agit de mesurer la concentration en oxygène consommée dans la cellule respirométrique alimentée en continu, mais non aérée [213]. Cette configuration présente l'avantage de la fréquence élevée de la mesure, mais le choix optimal du débit d'alimentation est très difficile. Le bilan massique devient :

$$\frac{dS_O}{dt} = \frac{Q_e S_O}{V} - \frac{Q_s S_O}{V} - OUR_T \quad (IV.02)$$

- **Respirométrie LSS** : statique gaz, statique liquide, elle est réalisée sans écoulement liquide et sans transfert d'oxygène, le taux de respiration déterminé en termes différentiels, en mesurant la diminution d'oxygène dissous en fonction du temps. Le bilan est réduit à :

$$\frac{dS_O}{dt} = - OUR_T \quad (IV.03)$$

- **Respirométrie LFF** : injection continu du gaz, alimentation continu en liquide, afin d'estimer le taux de respiration, les débits d'oxygène à l'entrée et à la sortie doivent être mesurés tout en évaluant le coefficient $K_L a$, le bilan sera :

$$\frac{d(V_L S_O)}{dt} = Q_e S_{Oe} - Q_s S_O + V_L K_L a (S_{Oe} - S_O) - V_L OUR_T \quad (IV.04)$$

- **Respirométrie LFS** : injection continue du gaz, statique liquide, cette technique permet l'estimation de la vitesse de consommation d'oxygène de manière quasi continue, mais nécessite la détermination préalable du coefficient de transfert d'oxygène, $K_L a$. Le bilan sera :

$$\frac{dS_O}{dt} = K_L a (S_{Os} - S_O) - OUR_T \quad (IV.05)$$

La technique *LFS* permet de déterminer le taux *OUR*, par la biomasse hétérotrophe et autotrophe, dans un réacteur batch. Cette technique est préférée, malgré le temps prolongé des expériences, puisqu'elle permet d'une part l'acquisition d'un grand nombre d'informations après une simple interprétation des respirogrammes obtenus, ainsi, l'opportunité de mener plusieurs expériences successives de biodégradation et/ou d'inhibition dans un seul test est faisable [228-231], et d'autre part elle est adaptée à des biomasses de forte activité car l'apport d'oxygène ne sera pas limitant.

La technique *LSS*, malgré le peu d'informations collectées, elle peut aussi être utilisée pour estimer l'inhibition d'une molécule sur l'activité microbienne, mais des précautions doivent être prise lors de ces essais pour effectuer des tests successifs dans un seul essai. Cette technique ne demande pas un équipement complexe et coûteux et l'exploitation des résultats exige l'interprétation des respirogrammes obtenus, les informations extraites des mesures respirométriques sont de deux types [232] :

- Directe : le taux de respiration aérobie qui fournit des informations sur l'activité de la biomasse (et l'enregistrement de respirogramme)
- Indirecte : les variables déduites des mesures respirométriques.

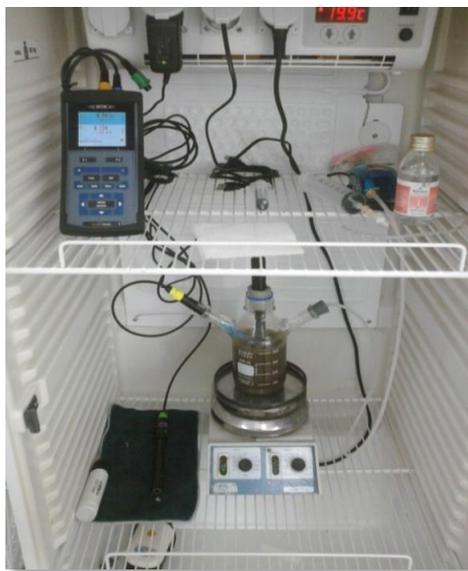
Chaque technique utilisée dans la présente étude présente certains avantages et inconvénients [233]. Ces derniers sont listés dans le tableau ci-après :

Tableau IV.01 : Avantages et inconvénients des différents respirométries en phase liquide

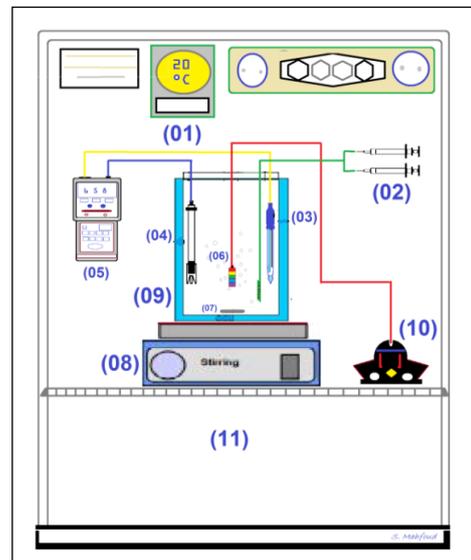
Type de respiromètre	Avantages	Inconvénients
LSS	Mise en œuvre facile	L'oxygène dissous disponible dans le respiromètre peut fausser la mesure des basses valeurs d'OUR
LFS	Fréquence de mesure d'OUR élevée	Nécessite l'estimation du coefficient de transfert d'oxygène K_{La}
LSF	Ne nécessite pas l'estimation du K_{La}	L'oxygène dissous disponible dans le respiromètre peut fausser la mesure des basses valeurs d'OUR
Respiromètre Hybride	Fréquence de mesure d'OUR élevée sans la nécessité de déterminer le K_{La}	La nécessité d'utiliser Deux électrodes d'oxygène

2. MISE EN PLACE D'UN RESPIROMETRE DE TYPE LFS :

Un respiromètre de type LFS (liquide : Flowing Gas, Static Liquid) a été utilisé dans le laboratoire LIPE, Constantine, dans plusieurs études antérieures [229-231], le même montage sera exploité dans la présente étude ; il est bien décrit dans la *Figure IV. 1*.



(a)



(b)

Figure IV.01 : (a) Photographie et (b) Schéma du montage respirométrique de type LFS construit dans le laboratoire LIPE

Le montage est composé d'un réacteur verre de capacité de 0.5 L (9), l'apport d'air est assuré par une pompe d'aquarium de la marque SHARK-RS-510 (10), avec un débit d'air d'environ 150 L/h, relié à un diffuseur en plastique (6). La phase liquide est mélangée par

barreau aimanté (7) et agitateur magnétique de la marque *AGIMATIC-N* (8). Les injections sont assurées par seringues (2). La sonde *IDS-WTW* (3) est utilisée pour les paramètres : *pH*, *T*, *TDS* et salinité, l'oxygène dissous sont mesurés par une sonde *FDO-925* de *WTW* (4), ces sondes sont connectées à un Oxymètre *Multi-3430* de *WTW* (5). Le système est maintenu à une température de $20\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ (1) dans une enceinte thermostatique de *WTW* (11).

Des boues activées fraîches sont placées dans le respiromètre *LFS*. Un bullage d'air assure l'apport d'oxygène nécessaire à un fonctionnement aérobie. La concentration d'oxygène est suivie dans le temps. Une fois celle-ci est stable, état d'endogène, un volume défini de substrat, selon le rapport S_0/X_0 fixé, est injecté dans le respiromètre, une fois le substrat oxydé, la concentration en oxygène dissous tend à revenir à l'état initial sous l'effet de l'aération continue. L'évolution de la concentration d' O_2 en fonction du temps permet de déduire des informations sur le substrat et la biomasse. Dans ce type de respiromètre, il est nécessaire de déterminer le coefficient de transfert d'oxygène K_{La} avant l'exploitation des résultats (le détail de détermination est développé dans les prochaines parties) [229-231].

3. MISE EN PLACE D'UN RESPIROMETRE DE TYPE LSS :

Un respiromètre *LSS* (liquide : Static Gaz-Static Liquid) a également été exploité dans les études d'inhibition dans le laboratoire, cette mise en œuvre peut être considérée comme la plus simple, car l'absence d'écoulement de gaz ou de liquide implique qu'aucun matériel supplémentaire tel que des pompes ou des équipements d'aération, n'est nécessaire.

Deux vitesses de consommation d'oxygène caractérisent l'activité bactérienne qui sont la vitesse obtenue en absence totale de substrat désignant une respiration endogène : OUR_{end} et celle observée en présence du substrat correspondant à une respiration exogène : OUR_{exo} . Pour réaliser ces mesures in-situ, le dispositif expérimental représenté dans la *Figure IV.02* est composé d'une cellule hermétique de 250 mL , parfaitement mélangée grâce à un agitateur magnétique. Dans celle-ci est placée la sonde à oxygène (*Oxi 330i*, *WTW*) reliée à un ordinateur qui enregistre l'évolution de la concentration en oxygène dissous dans les boues.

Le réacteur est rempli de manière cyclique avec des boues mis à l'endogène et aucun échange gazeux n'est assuré avec l'extérieur ce qui entraîne une diminution au cours du temps de la teneur en oxygène dissous dans la cellule due à la respiration des espèces actives. L'évolution de l'activité des populations autotrophes et hétérotrophes est régulièrement suivie. Pour ce faire, les réponses en OUR à l'injection de substrats et d'inhibiteurs spécifiques aux espèces présentes sont enregistrées.

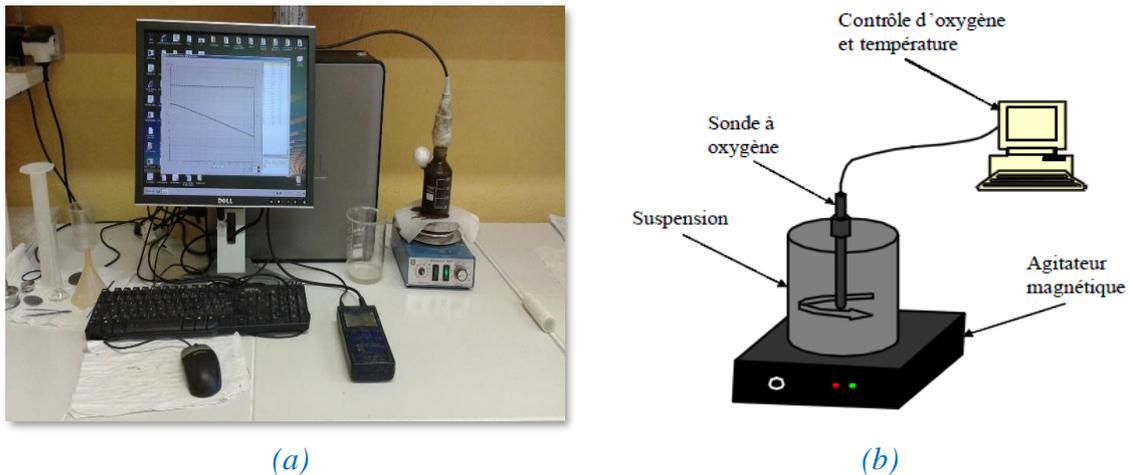


Figure IV.02 : (a) Photographie et (b) Schéma du montage respirométrique de type LSS construit dans le laboratoire

4. PREPARATION DE LA LIQUEUR MIXTE ET MISE A L'ENDOGENE :

Il est important de souligner que lors des essais respirométriques en batch, il faut s'assurer que les boues activées utilisées, prélevées du bassin biologique d'une *STEP* conventionnelle, sont libres du carbone organique et de tout substrat résiduel. À cet effet, la préparation de la liqueur mixte par la mise à l'endogène pour les tests respirométriques varie selon plusieurs études [229-231]. Cependant, pour la majorité des études, la technique d'aération continue et/ou aération agitation continue [250-257] de l'échantillon de boue activée pendant au moins *24 heures*, est préconisée, afin de s'assurer que le substrat résiduel exogène est totalement consommé. En revanche, la technique de lavage des boues activées à l'eau peut être utilisée pour atteindre une réduction de *95%* de la *DCO* résiduelle [258-259].

Pour les essais en condition endogène dans le respiromètre LSS, les boues prélevées du réacteur doivent être aérées pendant *24 heures* dans un réacteur d'aération, *Figure. IV.03*, afin de s'assurer que tout le substrat présent est consommé et que les boues sont passées à la respiration endogène. Ensuite, ces boues sont introduites dans la cellule fermée et la consommation d'oxygène est suivie. Ce mode de mise à l'endogène a été préconisé dans ce type de respirométrie car la durée des tests est limitée, ce qui n'est pas le cas dans la respirométrie de type LFS ; où la durée des tests est beaucoup plus importante nécessitant une étape de mise à l'endogène plus rapide mais bien maîtrisée.

Le protocole de mise à l'endogène dans le cas de respirométrie LFS sera établi puis validé pour l'utiliser dans l'ensemble des expériences réalisées. Ce protocole consiste à bien harmoniser manuellement l'échantillon de boues activées, sans défaire ses floccs, prélevées précédemment du bassin biologique, puis déverser l'équivalent d'un litre dans une éprouvette et laisser décanter pendant *30 min* à *2 h 30 min*.



Figure IV.03 : *Etape de mise à l'endogène avant les tests respirométriques de type LSS*

Le volume du surnageant obtenu est éliminé, afin de l'analyser par rapport à la *MO* soluble, puis remplacer par l'eau distillée. La solution boue-eau est homogénéisée de nouveau, manuellement, avec une mise en suspension de la boue avant sa décantation. L'opération peut être répétée en fonction du nombre de lavages souhaité. Deux types d'eau ont été utilisés dans cette étude, l'eau distillée et l'eau du robinet laissée au repos *24 heures* pour éviter la présence du chlore résiduel qui peut nuire à l'activité de la boue activée. Les résultats des tests montrent que la différence était difficilement décelable mais l'eau distillée a été préférée à l'eau du robinet afin d'éviter la présence de chlore ou de la turbidité résiduelle ainsi que les possibles variations de sa qualité. La technique de lavage à l'eau distillée a été utilisée afin de réduire la concentration de la *MO* soluble de 85 à 95%.

Lors des lavages, des mesures de la turbidité, de *MES*, du *COT*, du *TC*, du *IC*, de la *DCOt*, de la *DCOs* et de la *MO* ont été effectuées sur le surnageant ainsi que la liqueur mixte, pour évaluer le pourcentage de variation, en fonction du nombre de lavages. Ce lavage a été effectué trois fois selon différents pas de temps de décantation, afin d'optimiser le temps et le nombre de lavage à effectuer. Les résultats de la *Figure IV.04*, montrent une diminution de *MES* de la liqueur mixte mélangée avant décantation pour les trois lavages, soit la forme volatile ou la forme minérale. Cependant pour la turbidité on peut constater une diminution après le premier lavage suivi toutefois par une augmentation assez importante après le deuxième lavage et un changement presque nul après le troisième lavage, cette augmentation est probablement due à la possible défloculation ou désintégration du floc. Il faut souligner qu'après le premier lavage la fraction de matière volatile s'est vu augmenter en passant de 54.1% à 63.2%, en revanche la fraction minérale en suspension a diminué conséquemment en passant de 45.9% à 36.8%. Par conséquent, il peut être souligné que la fraction minérale est beaucoup plus influencée par le lavage que la fraction volatile. En effet après le

deuxième, lavage la turbidité de la liqueur mixte non décantée a augmenté de 30.3% par rapport au premier lavage comme illustré dans la *Figure IV.04*, et a légèrement réduit après ce dernier et une coloration brunâtre apparaît et se concentre, indiquant une dé-plasmolyse.

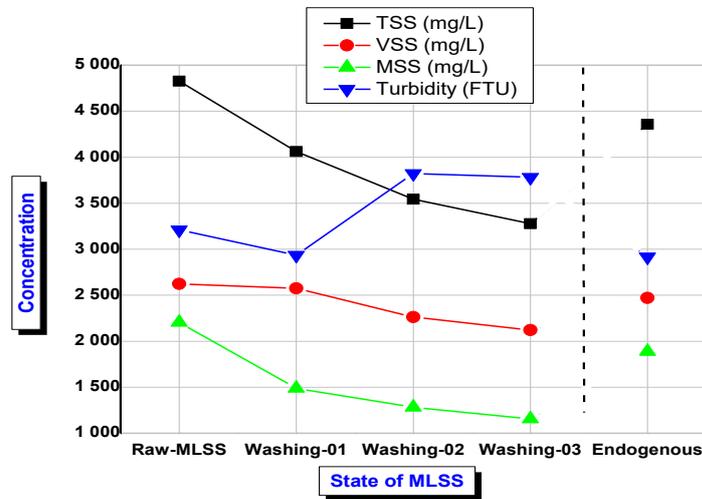


Figure IV.04 : Evolution des paramètres de la liqueur après chaque lavage effectué.

Les résultats de l'évolution temporelle de la turbidité et de *MES* du surnageant pour les différents lavages montrent que la grande majorité de la turbidité et de *MES* se sont décantés dans les 30 premières minutes, pour le premier lavage par exemple, 85.5% de *MES* et 89.9% de turbidité se sont réduites, *Figure IV.05*. Pour l'évolution de ces deux paramètres après 30 min ; il peut être remarqué que le surnageant résultant du premier lavage est le plus clair avec moins de turbidité et de particules en suspension signifiant qu'elles décantent mieux, même par rapport à la liqueur mixte à l'état brut.

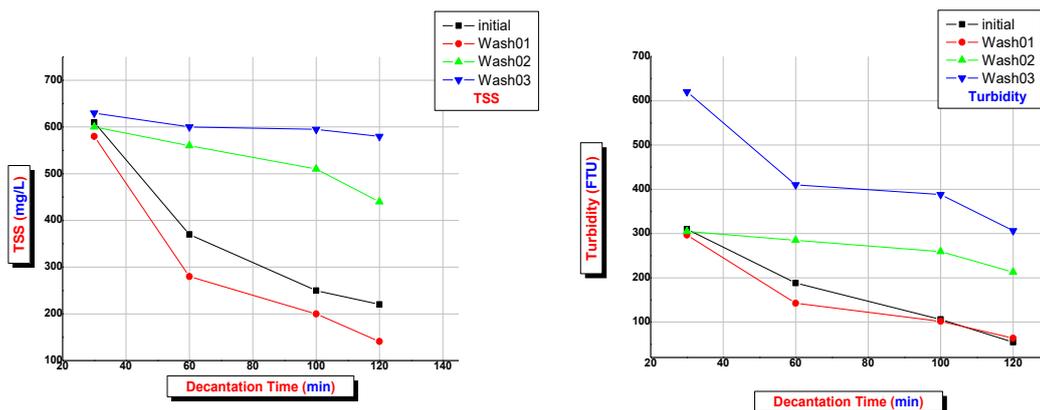


Figure IV.05 : Evolution de la turbidité et les MES du surnageant en fonction du temps de décantation et le nombre de lavage.

(0 : État initial sans aucun lavage, 1 : après le premier lavage, 2 : après le deuxième lavage, 3 : après le troisième lavage).

La *Figure IV.06*, montre l'évolution de la concentration de *DCOt*, *DCOs* et *DCOp* de la liqueur mixte à leur état brut et après la décantation et les protocoles de lavage effectués. Sachant que, *Raw (0)* et *Raw (1)* : représente les valeurs des concentrations mesurées pour

la liqueur mixte brute et le surnageant de la liqueur mixte brute après 120 min de décantation et avant tout processus de lavage respectivement ; 120 min (1), 120 min (2) et 120 min (3) représentent les valeurs des concentrations mesurées du surnageant après le premier, le deuxième et le troisième lavage et une décantation d'environ 120 min respectivement, Endogenous (1) : les valeurs des concentrations de ces trois paramètres enregistrés dans le surnageant après une décantation de plus de 120 min de l'échantillon de la liqueur mixte après un premier lavage et une aération-agitation sous une température constante de 20°C pendant 35 min, les réductions relatives sont illustrées dans la *Figure IV.07*.

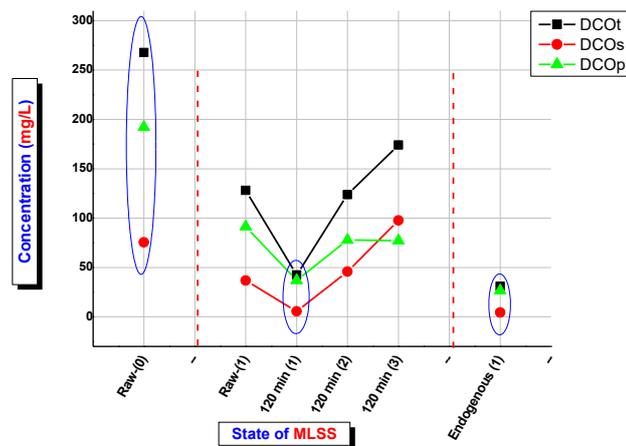


Figure IV.06 : Evolution de DCOt, DCOs et la DCOp en fonction d'état de la liqueur mixte.

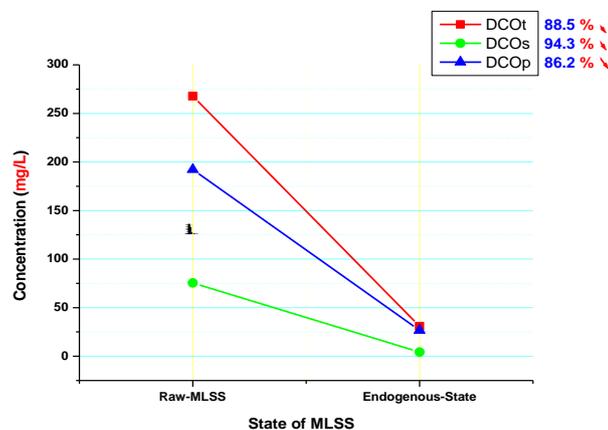


Figure IV.07 : Evolution de la DCOt, DCOs et DCOp en fonction d'état de la liqueur mixte, état brute (Raw-MLSS) et après un seul lavage (état endogène).

Selon les résultats obtenus et illustrés dans la *Figure IV.06* et *IV.07*, la technique de lavage, selon le protocole établi permet d'atteindre des réductions de 94.3% et 88.5% de DCOs et DCOt respectivement, ce protocole permet de réduire le temps préconisé pour la mise à l'endogène. Dans des tests séparés, l'utilisation de l'agitation mécanique au lieu de l'agitation manuelle lors du lavage de la liqueur mixte a entraîné une difficulté de réduire les concentrations exogènes, ceci est clair dans la *Figure IV.08*, ou la DCOs ne s'est réduite

qu'au quatrième lavage, encourageant l'utilisation d'une homogénéisation manuelle avec un faible nombre de lavage et un fort rendement de diminution de la *MO* dissoute.

Pour se fixer définitivement sur le protocole établi du lavage, d'autres paramètres ont été pris en considération dans cette étude : la *MO*, le *COT*, le *TC* et l'*IC*. La *Figure IV.09*, illustre l'évolution de ces paramètres dans le cas étudié relatif au temps de décantation, le nombre de lavage et la mise à l'endogène. Solon *Figure IV.09*, ces paramètres ont été réduits de 34%, 84%, 88% et de 72% pour le *COT*, le *TC*, le *IC* et pour la *MO* successivement, de l'état initial brute de la liqueur après un seul lavage et la mise à l'endogène.

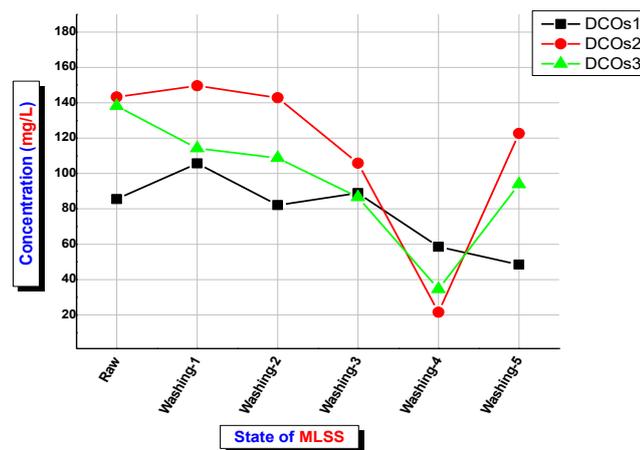


Figure IV.08 : Evolution des concentrations de la DCOs de trois échantillons en fonction de l'état de la liqueur mixte mélangé mécaniquement pour les différents lavages effectués.

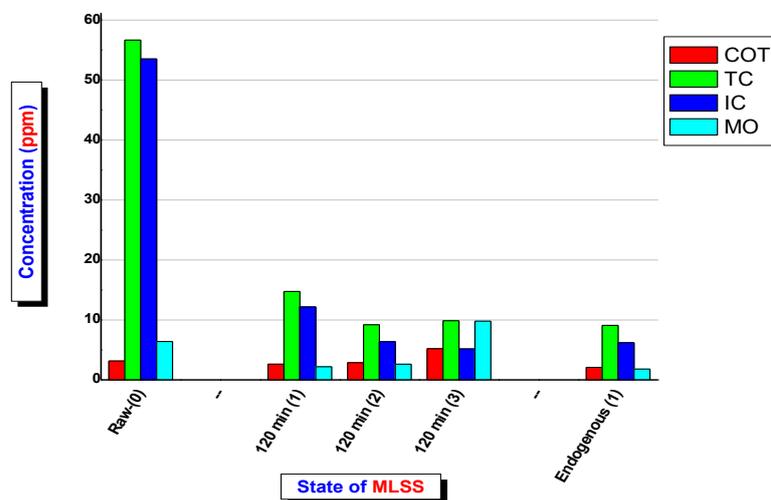


Figure IV.09 : Evolution de le *COT*, le *TC*, le *IC* et la *MO* en fonction de l'état de la liqueur mixte dans les différents lavages effectués et celle obtenue à l'état endogène.

En conclusion, un seul lavage de la liqueur mixte, après un temps de décantation entre 100 min à 120 min, suivi par une aération continue dans le respiromètre durant 30 min à une 50 min maximum, est suffisant pour réduire les différentes concentrations exogènes initialement présentes sans nuire à la qualité des floccs microbiens constituant la liqueur.

5. INTERPRETATION DES RESPIROGRAMMES :

a) *Interprétation des respirogrammes (respirométrie type LSS)*

La respirométrie LSS a été utilisée afin d'évaluer l'activité potentielle des organismes en condition endogène ou exogène [194]. Dans ce type de respirométrie, la respiration est évaluée par le taux de décroissance de la concentration d'oxygène dissous dans le milieu. L'équation permettant l'estimation de la respiration est présentée par l'Equation IV.06.

$$\frac{dS_o}{dt} = - OUR \quad (IV.06)$$

Après l'étape de la mise à l'endogène, le taux de la respiration des microorganismes ($mg O_2 \cdot h^{-1}$) est suivi pendant une durée de temps avec ou sans injection du substrat et après stop de l'aération.

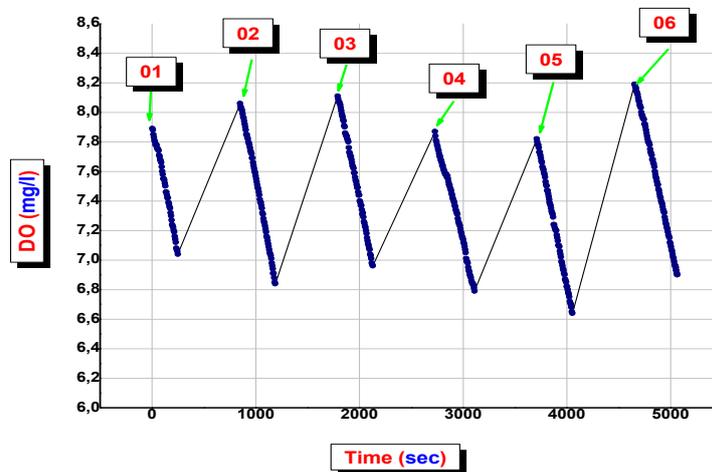


Figure IV.10 : Respirogramme enregistré lors d'une série de tests respirométriques d'inhibition de type LSS.

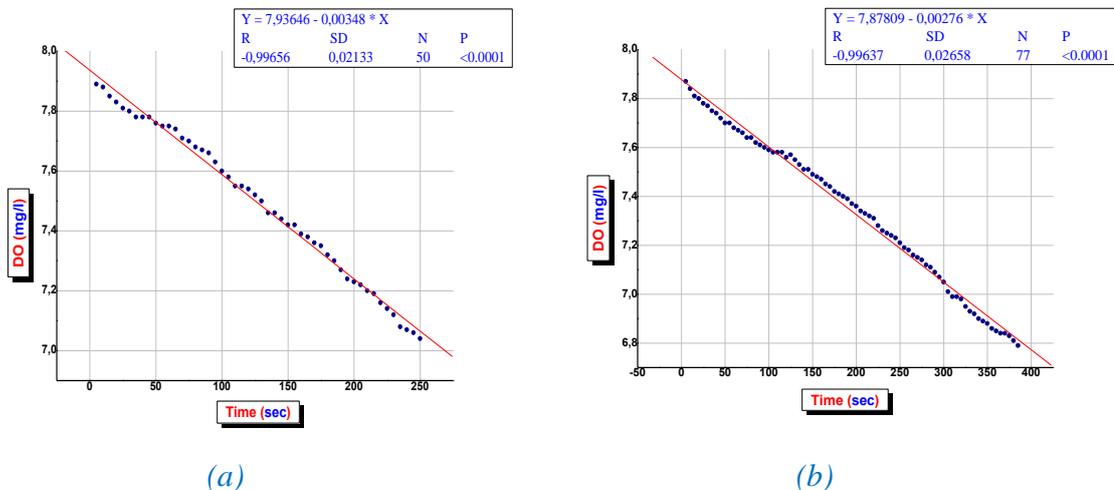


Figure IV.11 : Traitement du respirogramme, (a) sans injection de l'inhibiteur détermination (b) avec injection de l'inhibiteur .

La pente du graphique ainsi obtenu permet d'évaluer l'activité potentielle de la biomasse, la quantité de solides totaux (ST) lors du test respirométrique peut être évaluée de manière à obtenir l'activité spécifique de la biomasse de boue sur une base commune ($mg\ O_2 \cdot g^{-1} \cdot h^{-1}$). Une comparaison entre les pentes enregistrées permet d'estimer l'introduction instantanée de l'inhibiteur sur l'activité microbienne, *Figure IV.10*, *Figure IV.11*. Plusieurs scénarios de l'application de cette technique afin d'évaluer le degré de l'inhibition par la molécule inhibitrice seront testés.

b) Interprétation des respirogrammes (respirométrie type LFS)

Les respirogrammes enregistrés dans les tests respirométriques de type LFS en conditions endogène ou exogène doivent subir des traitements mathématiques bien précis afin de retirer le maximum d'informations, la *Figure IV.12* illustre un exemple d'un respirogramme, obtenu lors d'un test d'inhibition pour une durée d'enregistrement d'environ 18 heures consécutives (à faible rapport S_0/X_0).

La *Figure IV.13*, montre la première partie endogène de A à C, qui présente la phase de stop-reprise d'aération où le coefficient de transfert d'oxygène K_{La} et la respiration endogène (OUR_{end}), seront évalués en utilisant différents développements mathématiques, et la deuxième partie concerne l'estimation de la respiration exogène et la détermination de certains paramètres caractérisant l'activité, à savoir l' OUR_{exo} , l' OUR_t et la quantité d'oxygène consommée Q_{O_2} , *Figure IV.14*, après les différentes injections effectuées soit du substrat seul et/ou du substrat contenant la molécule inhibitrice AMX, *Figure IV.12*, (partie de D à F, et de G à H).

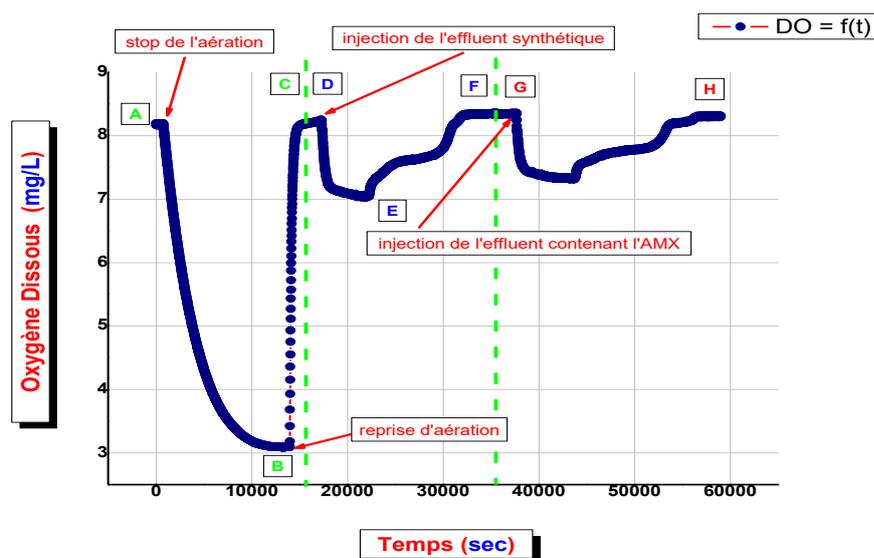


Figure IV.12 : Respirogramme enregistré lors d'un test d'inhibition de type LFS.

La vitesse de consommation d'oxygène dissous (OUR) peut être répartie en deux composantes chacune décomposée en plusieurs parties :

- Vitesse de consommation d' O_2 exogène (OUR_{exo}) correspondant à la dégradation du substrat facilement ($OUR_{exo, Ss}$) et lentement biodégradables ($OUR_{exo, Xs}$).
- Une vitesse de consommation d'oxygène endogène (OUR_{end}) correspondant à la consommation en oxygène utilisé pour la dégradation des substances de réserves ($OUR_{end, réserve}$) et pour la respiration endogène des microorganismes ($OUR_{end, respiration}$).

$$OUR_T = OUR_{exo} + OUR_{end} \quad (IV.07)$$

On peut estimer la vitesse de consommation de l'oxygène (OUR_{end}) lorsque les boues sont seules dans le respiromètre, *Figure IV.13*, en absence de substrat, la variation de l' OUR_{end} étant due à l'épuisement des substances de réserve et au décès des microorganismes (ce qui réduit la respiration microbienne totale). Il est assez délicat de différencier l' $OUR_{exo, Xs}$ et l' $OUR_{end, réserve}$. En effet le substrat rapidement biodégradable est partiellement transformé en substrat de réserve qui est ensuite lentement consommées. De son côté, le substrat lentement biodégradable est lentement hydrolysé en substrat facilement biodégradable avant d'être partiellement transformé en substances de réserve.

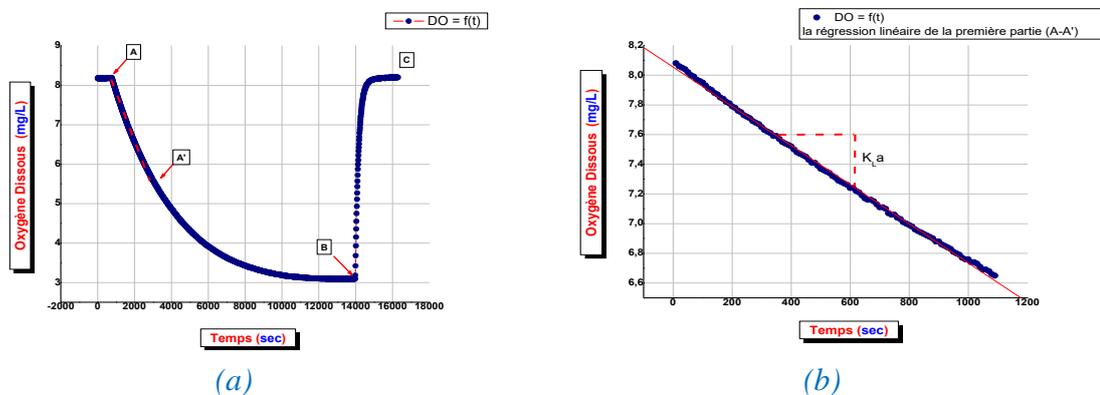


Figure IV.13 : Traitement de la première partie du respirogramme, détermination de la respiration endogène et du K_{La} .

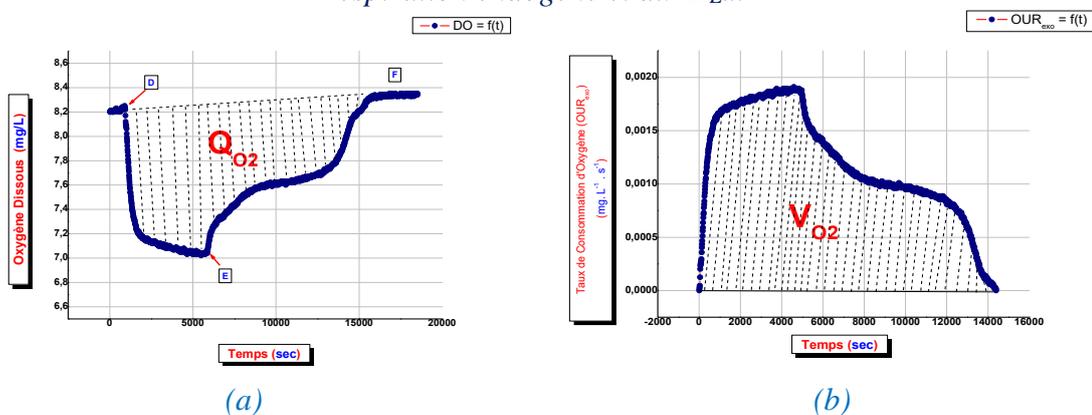


Figure IV.14 : La deuxième partie du respirogramme et estimation de la respiration exogène et totale

Les deux phénomènes (hydrolyse et stockage puis consommation) ayant des temps caractéristiques assez proches, il est difficile de les différencier. Un respirogramme permet d'estimer la biodégradabilité d'un effluent. La masse d' O_2 consommée, appelé V_{O_2} (volume d' O_2 consommé = la quantité d' O_2 consommée par les microorganismes pendant une période de temps donnée, jusqu'à ce que la concentration d'oxygène redevienne stable, correspondant à la DCO effectivement consommée par les microorganismes.

$$V_{O_2} = V \left| \int_{t_i}^{t_f} (OUR_{exo} + OUR_{end,r\acute{e}serve}) dt \right| \quad (IV.08)$$

Avec : t_i et t_f sont les temps, respectivement, d'injection du substrat et de retour de la concentration d'oxygène à sa valeur initiale.

Le volume d'oxygène consommé n'est représentatif que de la fraction de substrat biodégradable par les microorganismes présents dans le respiromètre. Pour avoir une mesure relativement fiable de la biodégradabilité par une méthode respirométrique, il est essentiel d'adapter la biomasse au substrat. Cette étape peut être longue et peut atteindre de 1 à 4 semaines [217].

6. DETERMINATION DU COEFFICIENT K_{La} :

Le coefficient de transfert d'oxygène K_{La} (en $temps^{-1}$), est le coefficient de transfert volumétrique entre deux phases. C'est le produit de (K_L) le coefficient de transfert de matière côté liquide et (a) l'aire interfacial volumique. (K_L) dépend, entre autre, du coefficient moléculaire de diffusion du composé transféré et de l'intensité de l'agitation. (a) dépend surtout de la taille de l'interface : de la taille et de la forme des bulles d'oxygène.

La mesure du K_{La} dans un respiromètre ou d'autres types de réacteur fermé peut s'effectuer de plusieurs méthodes. Le K_{La} est influencé par de nombreux paramètres à citer, la composition de la liqueur mixte, l'activité de la biomasse, la géométrie du réacteur, le volume de vide et de liquide dans le réacteur, le système d'aération et le débit d'air, le système et la vitesse d'agitation [228-231], ce paramètre doit être déterminé, avec minutie, en fonction des conditions opératoires imposées et à chaque test effectué car sa valeur influence directement la détermination des autres paramètres [229-231].

Le coefficient K_{La} sera déterminé uniquement dans le cas où la respirométrie de type LFS sera utilisée, et conditionne les réponses respirométriques en aération continue pour les différentes injections. La méthode de stop-reprise d'aération a été utilisée en présence de la biomasse active. Cette méthode consiste à établir un bilan de matière en O_2 sur une zone que l'on suppose parfaitement agitée où les concentrations sont constantes. On considère que les

débites molaires entrants et sortants d'oxygène sont égaux et que la variation temporelle de la concentration d'oxygène est nulle.

La relation qui lie le K_{La} à la vitesse de consommation d' O_2 par la biomasse, à la concentration d' O_2 à saturation ($S_{O,sat}$) est la suivante :

$$\frac{dS_O}{dt} = K_{La} (S_{O,sat} - S_{O,end}) - OUR + QS_{O,entrant} - QS_{O,sortant} \quad (IV.09)$$

La réalisation d'une mesure de K_{La} par cette méthode se fait en deux temps, avec une sonde à oxygène étalonnée, raccordée à un oxymètre, ayant un temps de réponse inférieur à 05 *secs* et la concentration d'oxygène à saturation supposée connue :

- Initialement, une mise à l'endogène de la liqueur mixte dans le respiromètre jusqu'à l'obtention d'un palier endogène qui se traduit par une concentration constante en O_2 en fonction de temps, afin de déterminer $S_{O,end}$.
- Secondement, après avoir le palier constant, dans le respiromètre parfaitement agitée et étanche munie de la sonde à O_2 sous température contrôlée, un arrêt brutal d'aération aura lieu, la consommation temporelle d' O_2 est suivie et permet l'estimation de OUR_{end} et d'en déduire le K_{La} .

Cette méthode présente certains inconvénients, car il est nécessaire de connaître la concentration d'oxygène à saturation de la liqueur mixte. Elle est souvent estimée par les valeurs tabulées pour l'eau claire, mais peut être mesurée par une sonde à oxygène par aération à saturation de la liqueur mixte filtrée [228]. Ainsi la présence du vide dans la cellule soit lors de l'aération ou durant le stop d'aération induit à des transferts d'oxygène avec ce vide ce qui influence la détermination de K_{La} . Par conséquent, l'homogénéisation, l'oxygénation de la liqueur avant le stop d'aération, ainsi que l'étanchéité de la cellule respirométrique durant cette phase, permet de minimiser l'erreur dans l'estimation du K_{La} et de l' OUR_{end} . Sachant que les débits ont été considérés comme égaux :

$$QS_{O,entrant} - QS_{O,sortant} = 0$$

L'*Equation IV.09* devient l'*Equation IV.10* :

$$\frac{dS_O}{dt} = K_{La} (S_{O,sat} - S_{O,end}) - OUR \quad (IV.10)$$

La détermination du coefficient de transfert d'oxygène peut être effectuée en exploitant les pentes de désaération et d'aération enregistrées dans la première phase du test respirométrique, *Figure IV.13*. Trois développements mathématiques ont été établis dans la littérature pour l'estimation de ce coefficient, considéré, un paramètre clés dans la respirométrie de type *LFS* [261, 266].

- **1^{er} développement :**

Lorsqu'il n'y a pas de substrat dans le respiromètre, seul l' OUR_{end} subsiste. La concentration en O_2 atteint une valeur constante (à cause de la consommation des substances de réserve, du décès bactériens et broutage, prédation).

$$\frac{dS_O}{dt} = K_L a (S_{O,sat} - S_{O,end}) - OUR_{end} \quad (IV.11)$$

Connaissant la concentration d'oxygène à saturation $S_{O,sat}$ et en suivant la pente 01 de décroissance (dS_O/dt), il est donc possible d'estimer OUR_{end} et $K_L a$.

Alors l'*Equation IV.11* devient

$$\frac{dS_O}{dt} = - OUR_{end} \quad (IV.12)$$

Et à l'équilibre

$$K_L a (S_{O,sat} - S_{O,end}) - OUR_{end} = 0 \quad (IV.13)$$

Et donc

$$K_L a = \frac{OUR_{end}}{S_{O,sat} - S_{O,end}} \quad (IV.14)$$

Ou bien de tracer la droite exprimée par l'équation suivante :

$$\frac{dS_O}{dt} = \alpha \cdot S_{O,end} + \beta \quad (IV.15)$$

Avec : $\alpha = -K_L a$ et $\beta = K_L a \cdot S_{O,sat} - OUR_{end}$.

- **2^{ème} développement :**

Un deuxième développement mathématique consiste à exploiter les données de la première et de la deuxième phase (phase descendante et ascendante) du test en condition endogène lors de l'arrêt et de la reprise de l'aération respectivement. Pour ce deuxième développement mathématique le coefficient $K_L a$ peut s'estimer par l'*Equation IV.16*:

$$\begin{aligned} \text{Pente 02} - \text{Pente 01} &= K_L a (S_{O,sat} - S_{O,end}) \\ K_L a &= \frac{\text{Pente 02} - \text{Pente 01}}{S_{O,sat} - S_{O,end}} \quad (IV.16) \end{aligned}$$

- **3^{ème} développement :**

Un troisième développement mathématique consiste à exploiter les données de la deuxième phase du test en condition endogène lors de la reprise d'aération seulement, selon l'*Equation IV.17* :

$$\frac{dS_O}{dt} = K_L a (S_{end} - S_O) - OUR_{exo} \quad (IV.17)$$

Et puisque on est en condition endogène, la respiration exogène est nulle et donc on peut écrire l'*Equation IV.18*:

$$\frac{dS_O}{dt} = K_L a (S_{end} - S_O) \quad (IV.18)$$

L'intégration de l'Equation IV.18, conduit à l'Equation IV.19, En traçant la partie de : $\ln((S_{O,end} - S_O)/(S_{O,end} - S_{O(t=0)}))$ en fonction de temps, en aura une droite de pente $(-K_L a)$.

$$\int_{S_O}^S \frac{dS_O}{(S_{O,end} - S_O)} = \int_0^t K_L a dt$$

$$\ln \left[\frac{S_{O,end} - S_O}{S_{O,end} - S_{O(t=0)}} \right] = -K_L a t \quad (IV.19)$$

Ces trois approches de détermination de K_{LA} ont été appliquées à une expérience réalisée pour un rapport S_0/X_0 égal à $0.04 \text{ gCOD.gVSS}^{-1}$, Figure IV.15. Selon les résultats obtenus et regroupés dans le Tableau IV.02, la première approche semble sous-estimer K_{LA} (valeurs basses par rapport aux deux autres), car elle ne considérait que la phase de désaération dans la détermination du transfert d'oxygène. Dans cette phase, la consommation de DO était très rapide et uniquement due à la respiration endogène des micro-organismes. En revanche, la deuxième approche prend en compte les deux phases de la réponse respirométrique (désaération et aération), où tout le transfert d'oxygène consommé est pris en compte. Le transfert d'oxygène de la phase gazeuse à la phase liquide était conditionné par le débit d'aération et la vitesse de brassage appliqués dans la respirométrie (conditions opératoires), et de la phase liquide à la phase solide conditionné par l'activité microbienne. Enfin, la troisième approche ne considérait que la phase d'aération, masquant l'activité microbienne endogène. Cette approche ne peut être exacte que dans le cas de la détermination de K_{LA} dans de l'eau claire. Les résultats considérés dans la présente étude seront ceux permettant la détermination de K_{LA} en utilisant la deuxième approche.

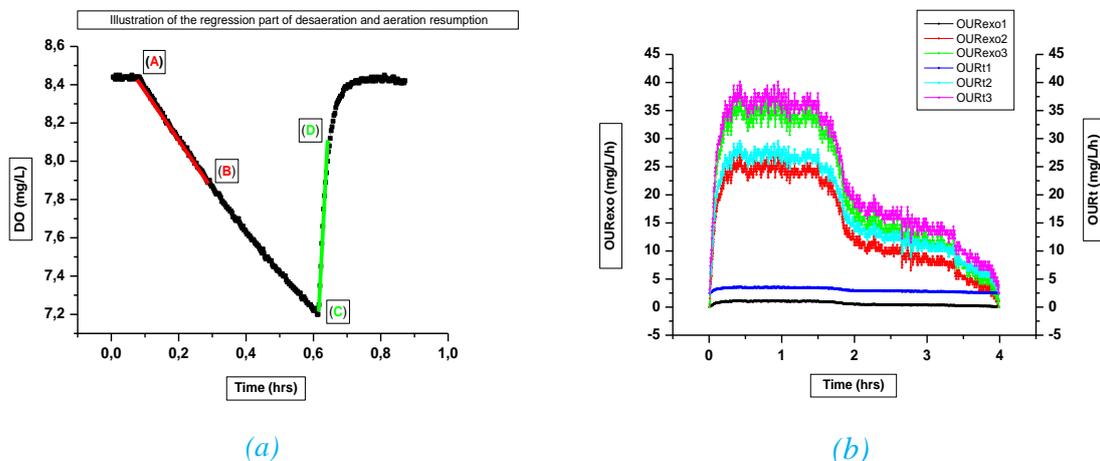


Figure IV.15 : (a) Illustration des parties de régressions pour la courbe de stop/reprise d'aération pour l'estimation du K_{LA} . (b) Evolution temporelle de la respiration exogène et total pour les trois K_{LA} .

Tableau IV.02 : Les caractéristiques du réponse respirométriques utilisant le K_{La} déterminé avec les trois approches mathématiques ($S_0/X_0 = 0.04 \text{ gCOD.gVSS}^{-1}$).

$S_0/X_0 : 0.04$ gCOD/gVSS	OURend ($\text{mg.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$)	K_{La} (h^{-1})	OURexom ax ($\text{mg.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$)	Q_{exo} (mg.L^{-1} du volume réactionnel)	Q_{r} (mg.L^{-1} du volume réactionnel)	T_s (h)
Réponse linéaire descendante		2.153	1.163	2.547	12.409	
Réponse linéaire descendante et ascendante	2.475	50.197	27.106	59.376	69.237	3.983
Réponse linéaire ascendante		69.776	37.679	82.535	92.397	

Selon les études antérieures [228], la reproductibilité de la détermination de K_{La} n'est pas très bonne, raison pour laquelle ce coefficient doit être déterminé pour chaque expérience, ce dernier peut varier au cours d'une même expérience. Ce paramètre comme énoncé précédemment est très influencé par les conditions opératoires imposées dans les tests respirométrique, mais aussi par les régressions linéaires effectuées pour la détermination des pentes dans la phase de désaération et d'aération en absence de substrat, dans le même contexte, dans une étude antérieure [216], il a été souligné l'effet des régressions linéaires sur la détermination des paramètres caractérisant un respirogramme et même sur certaines constantes biocinétiques principalement le taux de dégradation des hétérotrophes (Y_H), le travail a souligné que la régression linéaire doit être estimée dans la première partie descendante de la courbe de désaération.

L'influence des autres paramètres à fixer dans les tests respirométriques sera étudiée, en variant la vitesse d'agitation de 40 à 300 rpm, la température de 10 à 20 °C et le temps d'arrêt d'aération de 10 min à 150 min.

Les tests seront conduits en utilisant une boue qui a été adaptée au substrat, ainsi qu'une boue non adaptée, les données expérimentales issues des respirogrammes ont été analysées en fragmentant ces respirogrammes (courbe de désaération) en intervalles de temps réguliers (environ toutes les 15 minutes) ou en segments spécifiques, de manière à traiter les réponses linéaires de manière appropriée.

6.1. Traitement de la réponse respirométrique en condition endogène :

En examinant les résultats des figures *Figure IV.16* et *IV.17*, qui illustrent deux exemples de respirogrammes issus de boues non adaptées pour déterminer le coefficient K_{La} et la respiration endogène (OURend), la conclusion la plus significative qui se dégage est que, dans ces boues, quelle que soit leur activité, la phase d'arrêt de l'aération affiche une

courbe non linéaire, en particulier après une période d'arrêt d'aération de plus de 40 minutes. Cette phase nécessite un laps de temps considérable pour atteindre des concentrations minimales d'oxygène dissous. Il est important de mentionner que le coefficient de transfert d'oxygène et la respiration endogène ont été calculés en utilisant la première approche mathématique expliquée dans la section précédente.

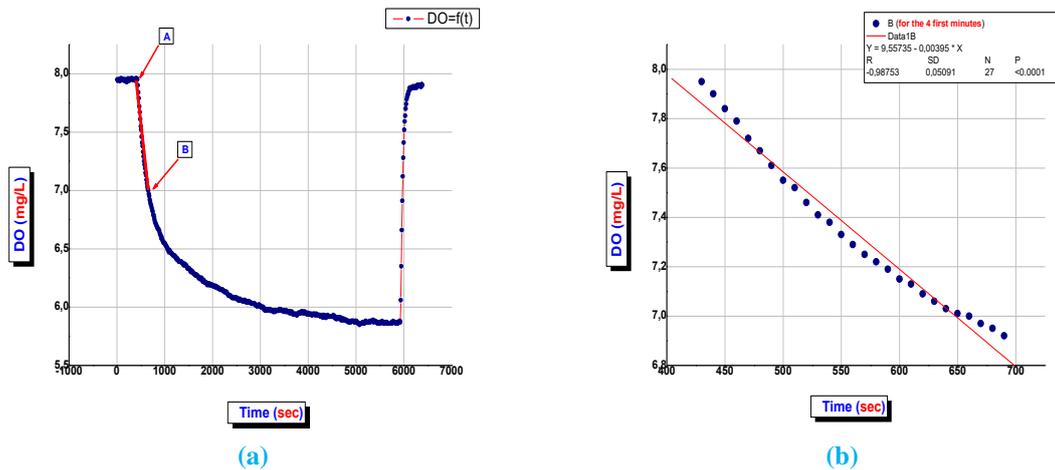


Figure IV.16 : évolution temporelle de la concentration en oxygène dissous : (a) de la partie stop-reprise d'aération et (b) la régression linéaire de la partie descendante linéaire.

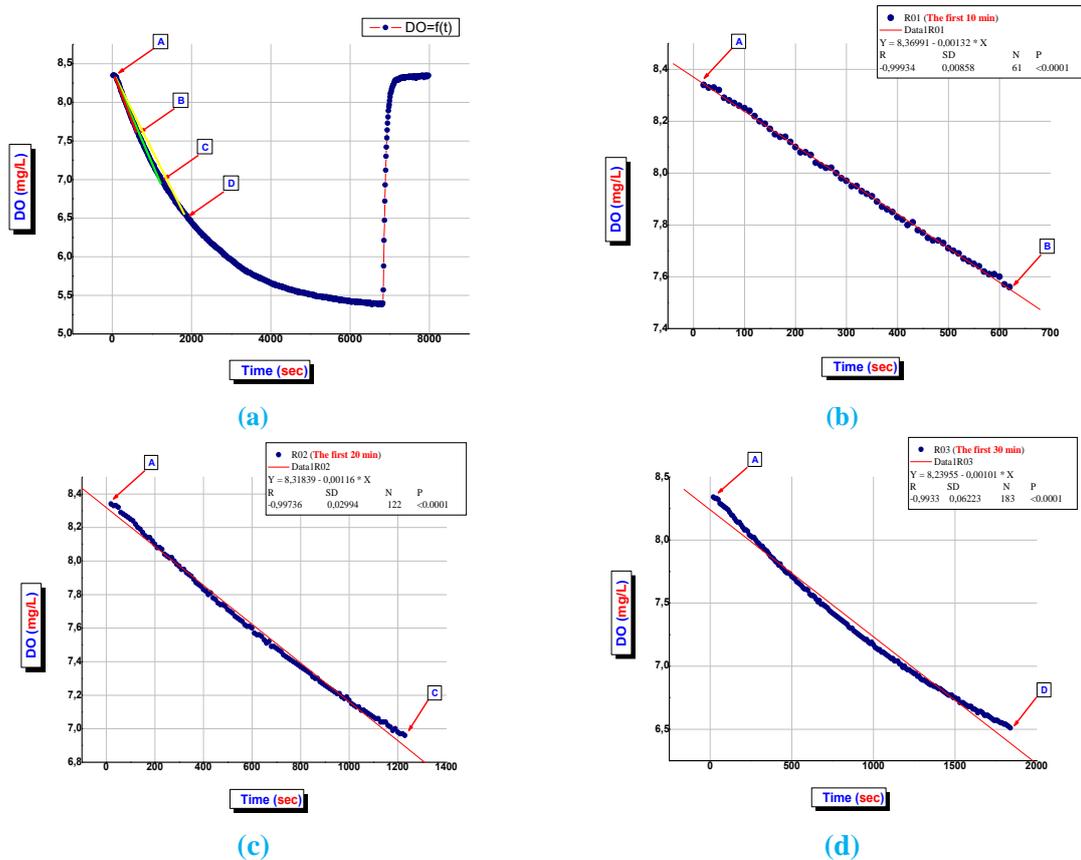


Figure IV.17 : Evolution temporelle de la concentration en oxygène dissous : (a) de la partie stop-reprise d'aération et (b) la régression linéaire de la première partie (A-B) descendante la plus linéaire, (c) la régression linéaire de la deuxième partie (A-C) descendante la plus linéaire et (d) la régression linéaire de la troisième partie (A-D) descendante la plus linéaire.

Pour estimer le coefficient K_{La} et la respiration endogène (OUR_{end}), il est impératif d'effectuer une régression linéaire de la première partie descendante de la courbe, *Figure IV.16*, qui est plus linéaire et représentative. Cependant, bien que la courbe montre une certaine linéarité au cours des premières minutes, comme le montre la *Figure IV.17*, la meilleure estimation de ces paramètres se situe dans les 30 premières minutes. Au-delà de cette période, la courbe se divise en trois sous-parties descendantes, devenant non linéaires, ce qui entraîne une estimation moins précise du K_{La} . Il est important de noter que le choix de cette approche, basée sur la partie la plus linéaire de la courbe, est influencé par les contraintes et les problèmes rencontrés lors de l'acclimatation des boues, ainsi que par les différences de qualité entre les courbes obtenues pour les boues adaptées et non adaptées.

La même méthode de traitement des réponses respirométriques a été appliquée à deux boues préalablement adaptées au substrat, et les respirogrammes enregistrés, ainsi que leur traitement, sont présentés dans les *Figures IV.18 et IV.19*. Dans ces cas, les courbes affichent une plus grande linéarité, et l'oxygène diminue plus rapidement pendant la phase de désaération. Pour estimer le coefficient K_{La} et OUR_{end} de manière représentative, on peut considérer les données de la première partie de la courbe ou toutes les données enregistrées pendant la phase de désaération.

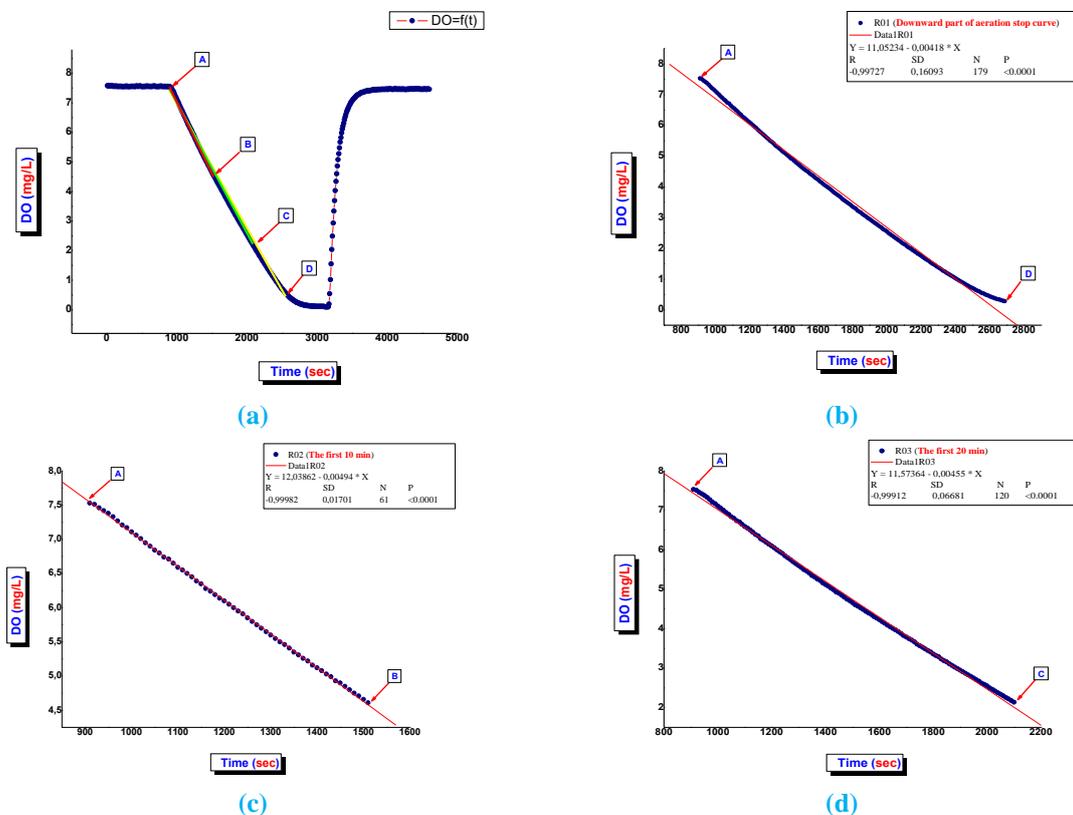


Figure IV.18 : Evolution temporelle de la concentration en oxygène dissous (a) de la partie stop-reprise d'aération (b) la régression linéaire de la partie descendante(A-B) (c) la régression linéaire de la partie descendante (A-C) (d) la régression linéaire de la deuxième partie (A-D).

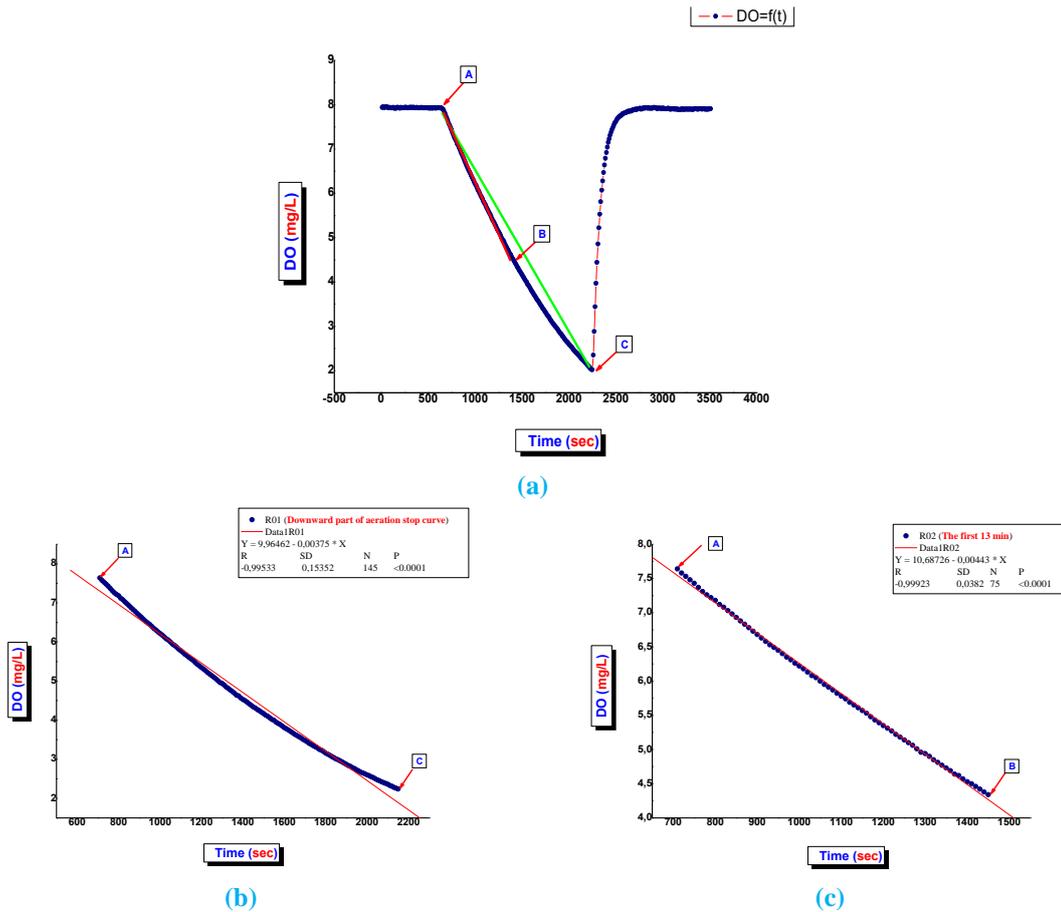


Figure IV.19 : Evolution temporelle de de la concentration en oxygène dissous (a) de la partie stop-reprise d'aération et (b) la régression linéaire de la partie descendante (A-B), (c) la régression linéaire de la première partie descendante(A-C).

Sur la base de ces résultats expérimentaux, quelle que soit l'activité et la qualité des boues activées utilisées, pour obtenir des estimations plus précises du coefficient K_{La} et de l' OUR_{end} , il est recommandé de se concentrer sur la première partie descendante de la courbe pendant une période d'arrêt d'aération comprise entre 10 et 35 minutes. Idéalement, il est préférable de maintenir la phase de désaération dans cette plage de temps, ce qui facilite l'estimation de ces paramètres en utilisant des valeurs plus représentatives, grâce à une courbe plus linéaire.

6.2. Effet de la durée d'adaptation sur les réponses respirométriques en condition endogène, *Annexe B, C* :

Dans cette section de l'étude, l'objectif était d'évaluer comment la qualité et l'activité des boues activées utilisées influence la détermination du coefficient K_{La} et de l' OUR_{end} . Les boues activées utilisées ont été prélevées à partir d'une *STEP* conventionnelle, puis incubées dans un réacteur pendant une période de 20 jours. Les tests ont été réalisés sur des échantillons prélevés à différents intervalles de temps à partir du réacteur d'adaptation ($s1$: au jour 0 de l'adaptation, $s2$: au 2^{ème} jour d'adaptation, ..., $s11$: au 20^{ème} jour d'adaptation).

Les données recueillies et analysées conformément aux recommandations précédemment mentionnées sont illustrées dans la *Figure IV.20*. Les résultats indiquent que les boues s'adaptent bien après *14 jours*. Cela est démontré par l'évolution de la vitesse de consommation d'oxygène, où à ce stade, l'oxygène est rapidement consommé en seulement environ *25 minutes* en raison de l'activité vigoureuse des boues. La valeur de K_{La} est maximale, avec une excellente linéarité de la partie descendante du respirogramme, ce qui facilite la détermination précise de la respiration endogène (OUR_{end}). Le coefficient de corrélation se rapproche de la valeur $R^2 = 0.9$.

En revanche, pour les boues à activité réduite, on observe une faible vitesse de consommation d'oxygène, des coefficients de corrélation éloignés de $R^2 = 0.9$, une linéarité médiocre de la partie descendante du respirogramme, en particulier après les *30 premières minutes*, comme précédemment mentionné. La chute dure plus longtemps, environ *2 heures*, et le K_{La} est très faible et instable. Par conséquent, l'amélioration de l'activité microbienne par son adaptation aux conditions expérimentales et aux conditions d'alimentation facilite la détermination des paramètres caractérisant les respirogrammes enregistrés.

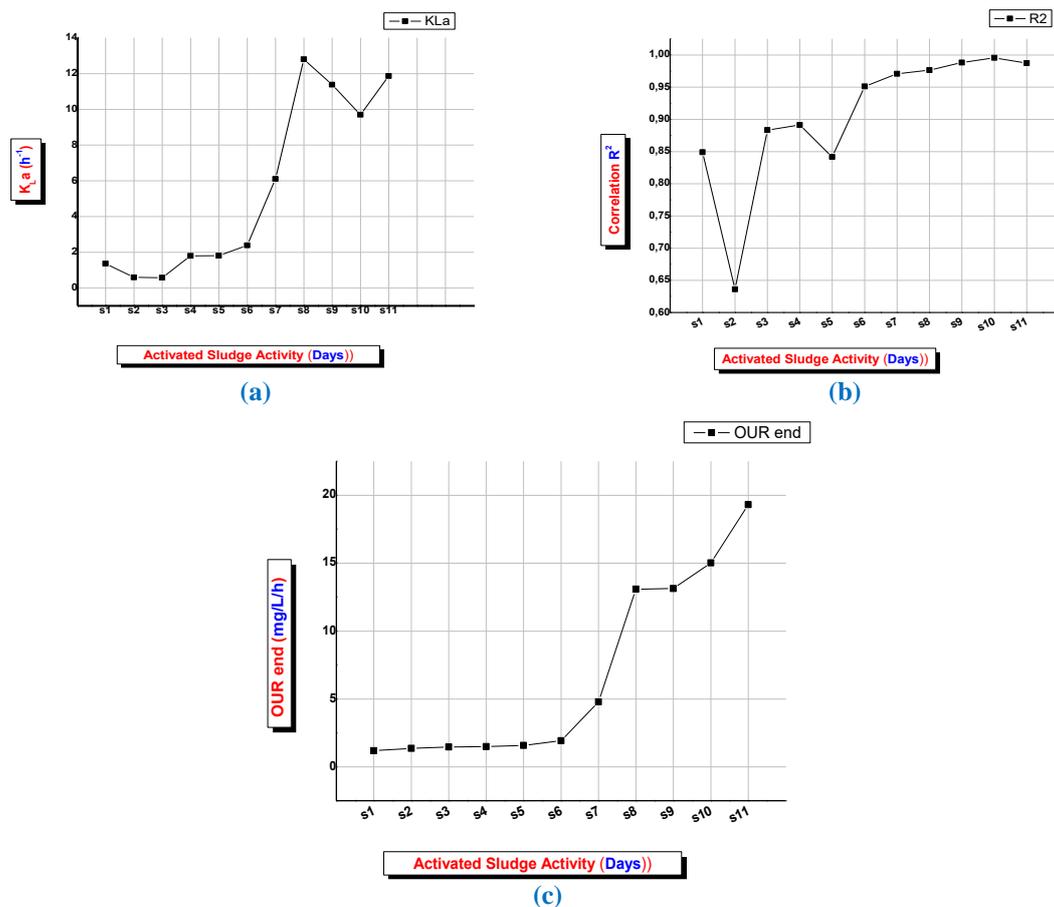


Figure IV.20 : Evolution en fonction de la durée d'adaptation du :
 (a) coefficient K_{La} , (b) coefficient de corrélation (R^2), (c) (OUR_{end}) : la vitesse de chute du point d'arrêt d'aération (A) de l'état endogène jusqu'au (B) le point de reprise d'aération.

6.3. Interprétation des réponses respirométriques de la biomasse autotrophe et hétérotrophe en condition endogène :

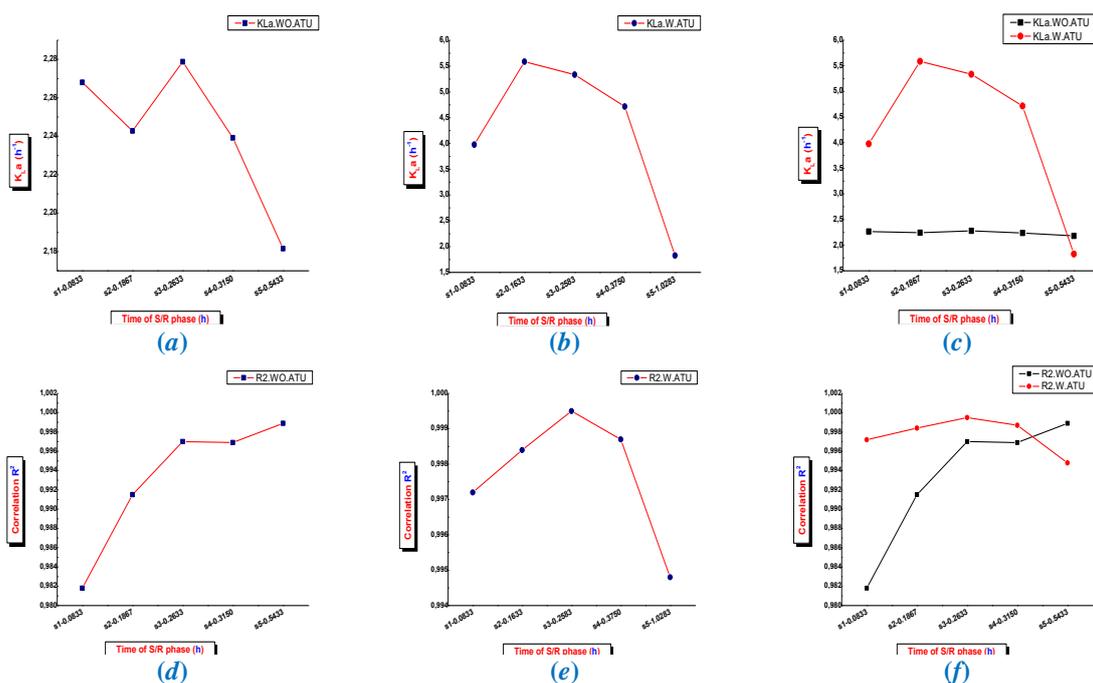
Les mêmes tests ont été répétés pour évaluer l'impact de la durée de désaération sur la détermination du coefficient K_{La} et de l' OUR_{end} , à la fois pour la biomasse de boue activée (autotrophes et hétérotrophes) et uniquement pour les hétérotrophes (en inhibant les autotrophes avec l'inhibiteur de nitrification, ATU).

Il est essentiel de rappeler que la respiration endogène, déterminée par la pente de la courbe de désaération lors du test respirométrique en condition endogène (en absence de substrat exogène), englobe la respiration endogène à la fois des hétérotrophes et des autotrophes en l'absence de l'inhibiteur de nitrification, ainsi que celle des hétérotrophes uniquement en sa présence, *Equation IV.20*.

$$OUR_{end} = OUR_{endHét} + OUR_{endaut} \quad (IV.20)$$

Le K_{La} , OUR_{end} , et le coefficient de corrélation ont été examinés en conditions de présence et d'absence de l'inhibiteur de nitrification, à différents intervalles de désaération, à savoir, $S1, S2, S3, S4, S5$ l'*Annexe B* et *C*.

Dans l'ensemble, il est essentiel de souligner que la durée de désaération a un impact sur ces paramètres dans les deux situations. Le K_{La} , OUR_{end} , ainsi que le coefficient R^2 ont été évalués en présence et en l'absence de l'inhibiteur de nitrification, à divers moments de désaération. Dans l'ensemble, il est important de noter que la durée de désaération exerce une influence sur ces paramètres dans les deux situations.



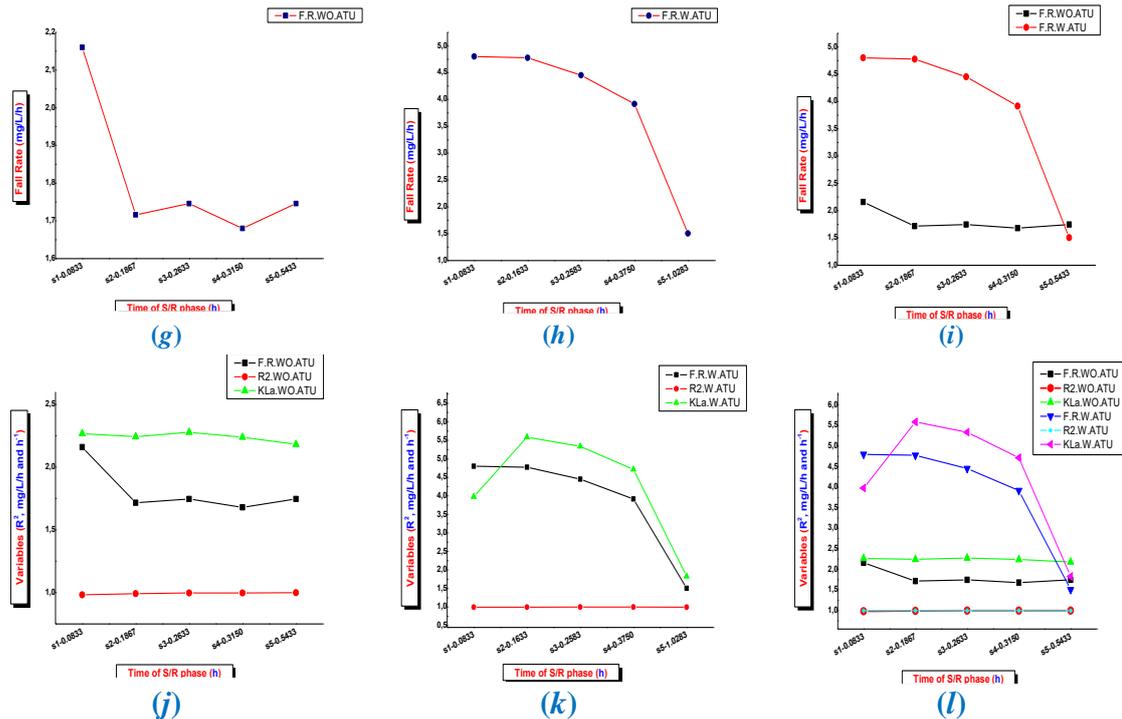


Figure IV.21 : Evolution en fonction de la durée de stop d'aération et la présence ou non de l'ATU du : le coefficient K_{La} , le coefficient de corrélation (R^2), OUR_{end} et la superposition des trois variables, dans le cas biomasse totale : (a), (d), (g) et (j), et pour les hétérotrophes (b), (e), (h) et (k), et la superposition de ces variables en présence et en absence d'ATU dans les cas : (c), (f), (i) et (l)

6.4. Influence de l'agitation sur la respirométrie endogène :

L'objectif de cette partie est d'étudier l'impact de l'arrêt d'agitation pendant l'étape de désaération sur la détermination du K_{La} et sur l' OUR_{end} à différents moments de désaération. En règle générale, pour que le K_{La} soit considéré comme représentatif, il est nécessaire d'obtenir des coefficients de corrélation R^2 supérieurs ou égaux à environ 0.99. Cependant, dans ce scénario, l'arrêt de l'agitation simultanément avec l'arrêt de l'aération entraîne des fluctuations dans les courbes respirométriques obtenues, qui présentent une linéarité médiocre, *Figure. IV.22*.

De plus, les vitesses de consommation d'oxygène sont considérablement plus faibles par rapport à la situation où seule l'aération est interrompue. Par conséquent, l'arrêt de l'agitation pendant la désaération n'améliore pas la précision de la détermination de OUR_{end} et du coefficient K_{La} . Au contraire, cette pratique a un impact sur la qualité des courbes et des valeurs de K_{La} et de OUR_{end} , ce qui la rend non recommandée dans ce protocole.

Dans la seconde partie de cette étude, nous avons examiné l'impact de la vitesse d'agitation sur la détermination de l' OUR_{end} et du K_{La} , tout en maintenant les conditions opératoires précédemment optimisées. Il est clair que le coefficient de transfert d'oxygène est fortement influencé par la vitesse d'agitation définie dans le respiromètre.

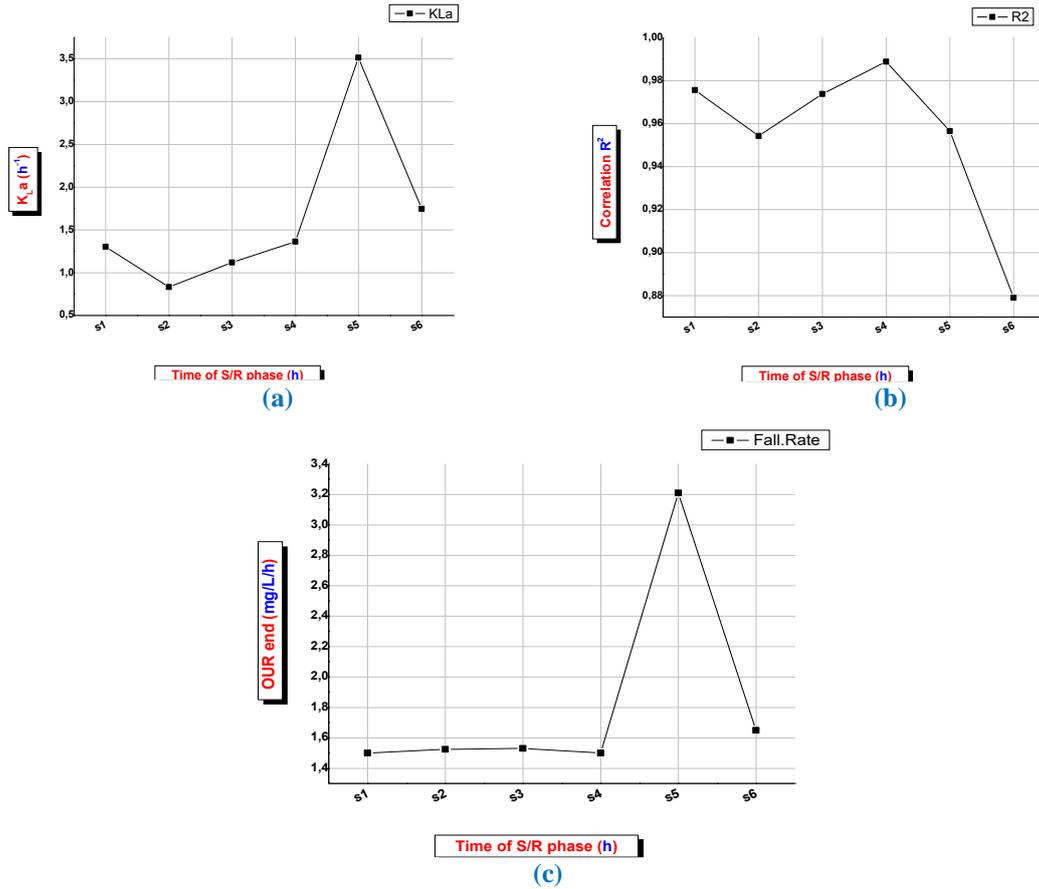
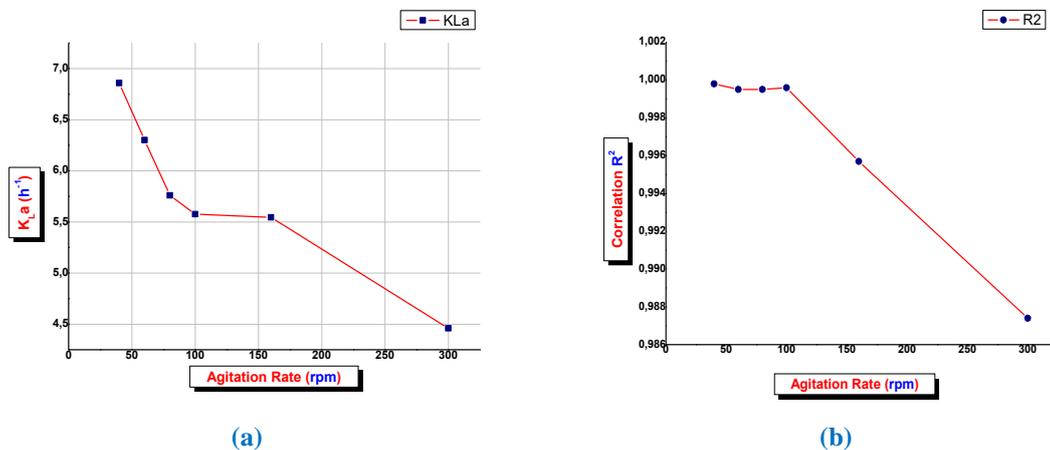
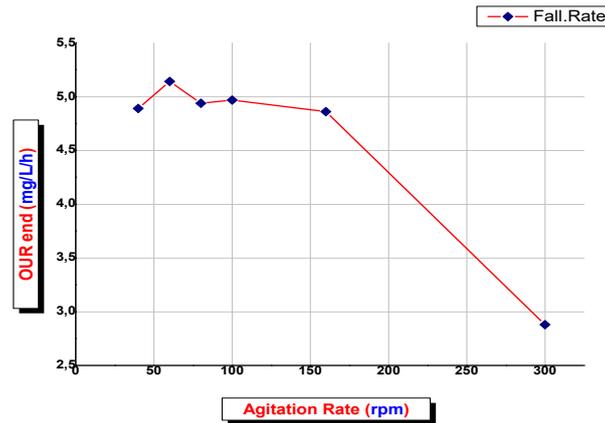


Figure IV.22 : Evolution en fonction de la durée d'arrêt d'aération du : (a) coefficient K_{La} , (b) coefficient de corrélation, (c) OUR_{end} .

Une augmentation de la vitesse d'agitation de plus de 120 tr/min ou une réduction à moins de 70 tr/min conduit à des estimations peu fiables de l' OUR_{end} et du K_{La} . Cependant, une plage de la vitesse d'agitation située entre 80 et 100 tr/min , avec une marge d'erreur de $\pm 20 \text{ tr/min}$, présente une meilleure reproductibilité de ces paramètres, *Figure IV.23*. Il est important de noter que des vitesses d'agitation trop faibles limitent le transfert d'oxygène de la phase gazeuse vers la phase liquide, tandis que des vitesses d'agitation trop élevées peuvent perturber la lecture au niveau de la sonde d'oxygène.

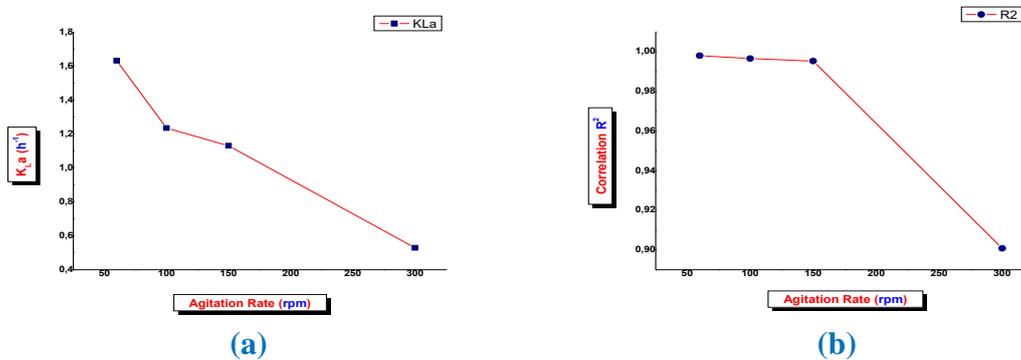




(c)

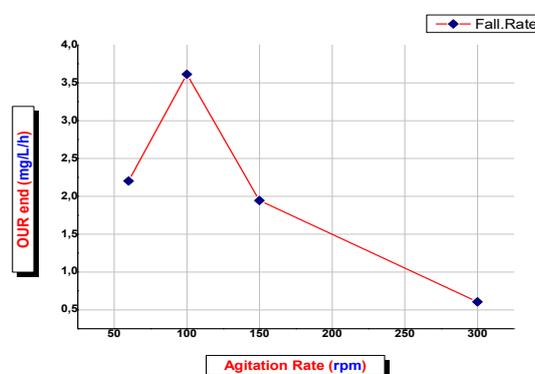
Figure IV.23 : Variation des différents paramètres en fonction de la vitesse d'agitation (rpm) : (a) le coefficient K_{La} , (b) le coefficient R^2 , (c) OUR_{end} .

La dernière phase de cette partie d'étude vise à évaluer l'influence de la température sur l'optimisation de la vitesse d'agitation. Pour ce faire, nous avons répété l'expérience à une température plus basse, soit $10^{\circ}C$, tout en variant la vitesse d'agitation dans la même plage. Les résultats expérimentaux obtenus montrent des améliorations significatives en termes de coefficient de corrélation et de taux de consommation d'oxygène à une vitesse d'agitation de 100 tr/min , avec une marge de $\pm 20 \text{ tr/min}$. À cette valeur de vitesse, *Figure IV.24*, le coefficient K_{La} offre la représentation la plus précise.



(a)

(b)



(c)

Figure IV.24 : Evolution en fonction de la vitesse d'agitation (rpm), à la température $10^{\circ}C$, du : (a) coefficient K_{La} , (b) coefficient R^2 , (c) OUR_{end} .

Nous avons également repris le processus d'optimisation pour l'ensemble de la biomasse (auto et hétéro) ainsi que pour les hétérotrophes seuls. Cette étude a été menée en utilisant trois vitesses d'agitation différentes, soit 80, 100 et 160 *tr/min*, à une température de 20°C. Les résultats, présentés dans *Figure IV.25*, ont montré que la meilleure corrélation, lors d'analyse des données de désaération en condition endogène, a été obtenue avec vitesse d'agitation 100 *tr/min*, à laquelle les paramètres estimés ont atteint leurs valeurs maximales.

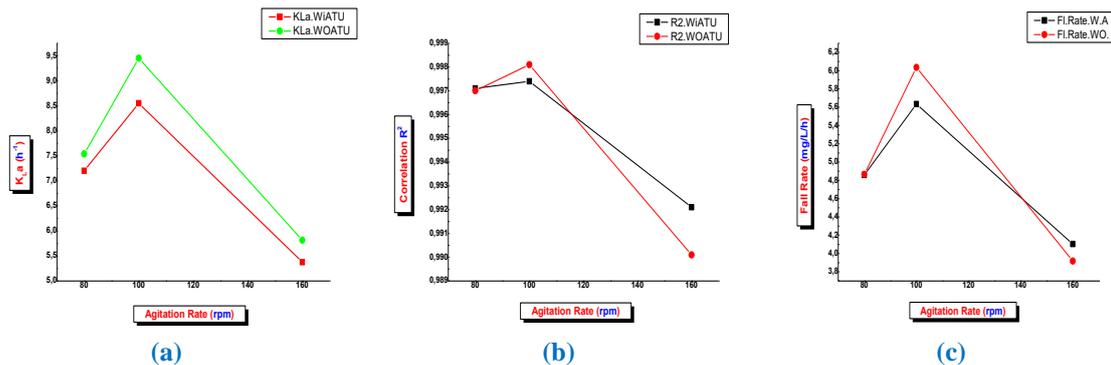


Figure IV.25 : Superposition de l'évolution en fonction de la vitesse d'agitation en présence et en absence de l'ATU du : (a) le coefficient K_{La} , (b) le coefficient R^2 et (c) OU_{Rend}

7. LA REPRODUCTIBILITE DES TESTS RESPIROMETRIQUE

7.1. Effet des longues durées des tests respirométriques

Dans ce test, l'objectif était d'observer l'impact de la durée de l'aération continue sur la qualité des respirogrammes obtenus. Pour ce faire, un volume de liqueur mixte, préparé selon le protocole de mise en condition endogène, a été introduit dans le respiromètre. Après avoir réglé le débit d'aération et la vitesse d'agitation, le système a été maintenu en aération et agitation à une température constante de 20 °C pendant environ 62 heures (équivalent à 2 jours et 14 heures). Cette durée a été choisie en fonction des recommandations pour des tests respirométriques successifs, en tenant compte du rapport S_0/X_0 le plus élevé (comme expliqué plus en détail dans la section suivante).

Conformément à ce qui est illustré dans la *Figure IV.26*, l'aération continue des boues activées en vue de les homogénéiser montre un respirogramme presque stable sur une période de test prolongée. La diminution des valeurs de l'OD est d'environ 0.07 mg/L, ce qui s'avère pratiquement négligeable par rapport à la valeur de S_{end} , établie à 8.46 mg/L. L'objectif de ce test est de démontrer que, pendant cette période d'aération continue, aucune lyse microbienne n'a été observée, caractérisée par une augmentation de S_{end} , et que des tests successifs d'inhibition peuvent être réalisés sur cette durée prolongée sans que la lyse microbienne puisse influencer les résultats enregistrés.

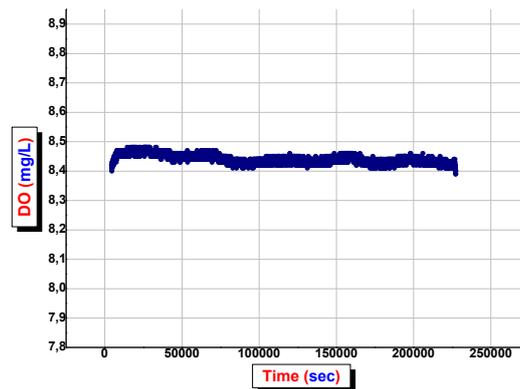
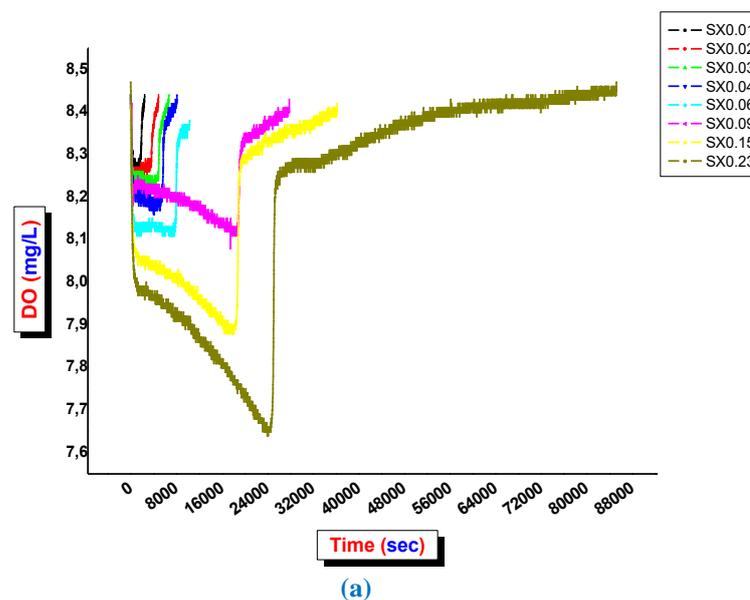


Figure IV.26 : Evolution de la concentration en oxygène dissous en fonction du temps.

7.2. Effet du rapport S_0/X_0 sur les réponses respirométriques

Dans cette section, une étude a été menée pour évaluer l'impact de la variation du rapport S_0/X_0 sur la consommation d'oxygène et sur certains paramètres biocinétiques de la biomasse épuratrice, à la fois pour les autotrophes et les hétérotrophes, ainsi que spécifiquement pour les hétérotrophes (en tenant compte de l'inhibition des autotrophes). Pour ce faire, une méthode a été mise en place pour calculer les volumes à injecter dans le respiromètre, à savoir le volume d'effluent (V_{eff}) et le volume de boues (V_b), en les variant selon le rapport S_0/X_0 souhaité, en fonction des valeurs mesurées de la MVS dans la liqueur mixte. Ces tests ont été réalisés à une charge carbonée constante de $300 \text{ mg}_{DCO}/L$. Pour évaluer l'impact de la variation de ce rapport sur l'activité des hétérotrophes, une concentration de $20 \text{ mg}/L$ d'un inhibiteur de nitrification, l'Allylthiourée (ATU) [260-261], a été introduite. Les résultats de ces expériences sont présentés dans les figures suivantes.



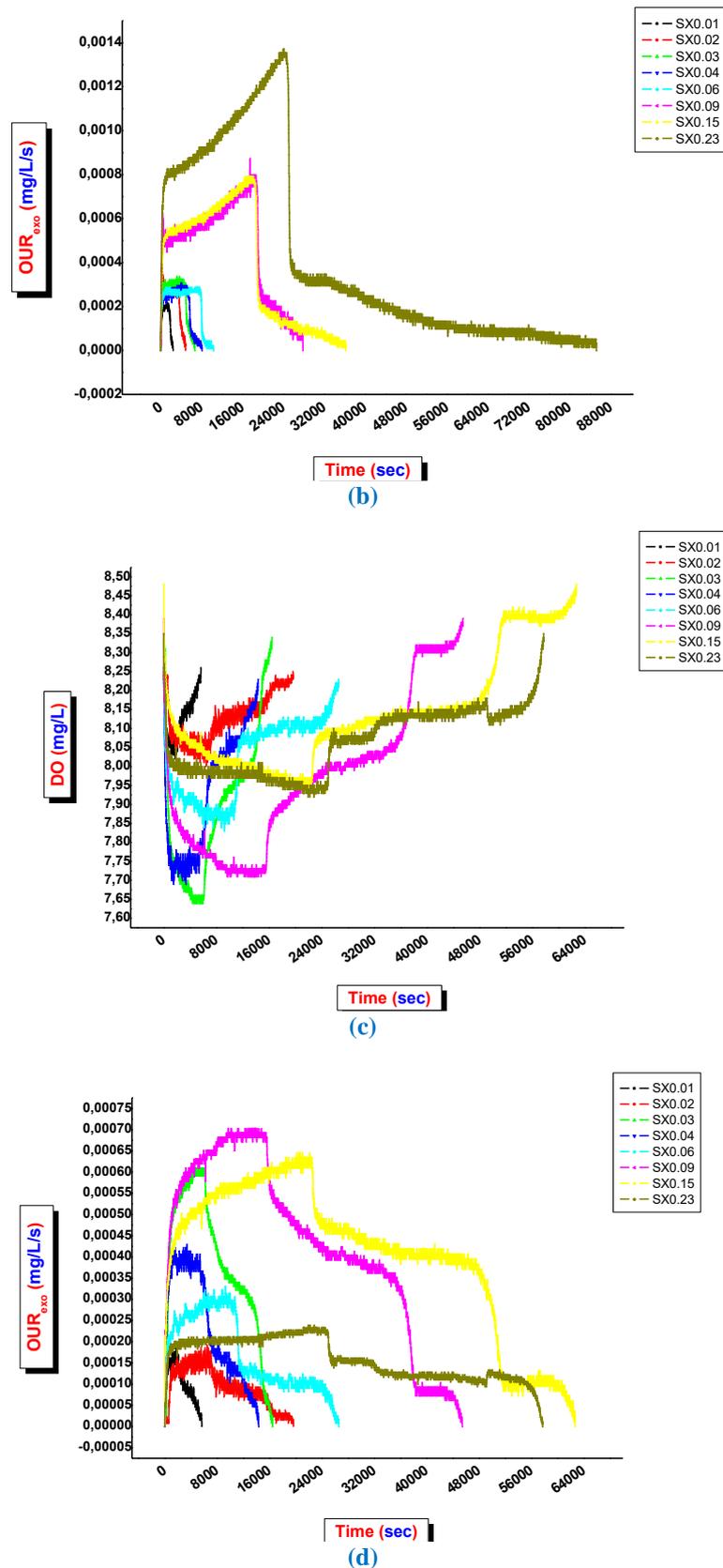


Figure IV.27 : Evolution en fonction du temps de: (a) la concentration en oxygène dissous pour les hétérotrophes), (c) de la totalité de la biomasse épuratrice; et du taux de consommation d'oxygène (b) pour les hétérotrophes, (d) pour la totalité de la biomasse épuratrice.

La variation de la concentration d'oxygène dissous a été enregistrée au cours des tests respirométriques, tant en l'absence qu'en présence de l'inhibiteur de nitrification (ATU). Comme illustré dans la *Figure IV.27*, les différents respirogrammes obtenus lors des tests pour les différents rapports S_0/X_0 ont été superposés. Cette figure met en évidence la variation de l'OD pendant l'élimination de la charge carbonée et la nitrification, impliquant la biomasse autotrophe et hétérotrophe, ainsi que la dégradation exclusive de la charge carbonée impliquant la biomasse hétérotrophe. Il est important de noter que, conformément à la classification de [261] les rapports S_0/X_0 testés dans ces expérimentations sont considérés comme faibles ($\leq 0.2 \text{ g}_{DCO}/\text{g}_{MVS}$). Pour de tels rapports, la cinétique de dégradation est rapide, ce qui permet de définir les constantes cinétiques représentatives de la biomasse initialement présente et d'évaluer l'inhibition sur cette fraction. En revanche, pour des rapports plus élevés ($\geq 2 \text{ g}_{DCO}/\text{g}_{MVS}$), la multiplication microbienne est plus significative, ce qui limite la possibilité d'évaluer précisément l'inhibition en raison de la production de nouvelles cellules microbiennes saines non inhibées. Dans un premier temps, l'impact de l'augmentation du S_0/X_0 sur la quantité d' O_2 utilisée, notée Q_{O_2ex} (mg/L), ainsi que sur les temps de dégradation nécessaires pour que le substrat soit entièrement consommé, marquant le retour à l'état endogène, a été clairement mis en évidence. Ces résultats sont synthétisés dans *Figure IV.28*.

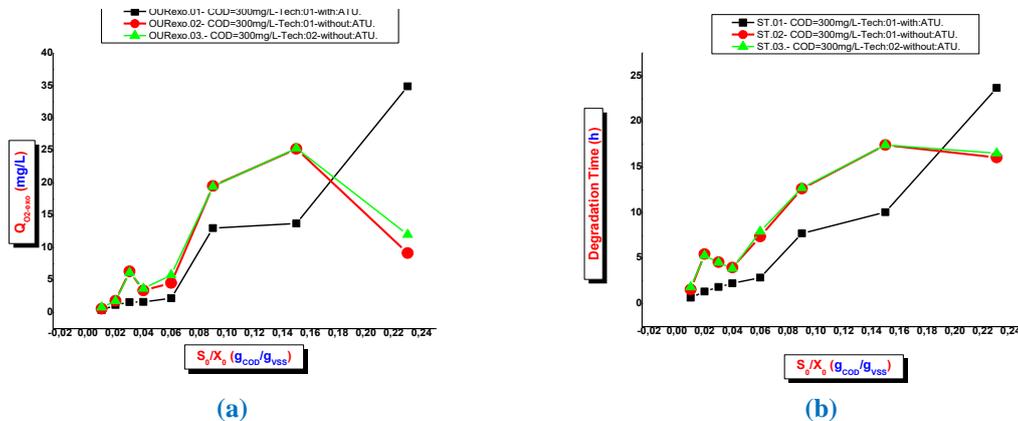


Figure IV.28 : Effet du rapport S_0/X_0 fixé sur (a) la quantité d'oxygène dissous exogène utilisée (b) le temps de dégradation, pour les hétérotrophes et pour la totalité de la biomasse.

Il est à noter que la respiration exogène maximale des hétérotrophes est notablement plus élevée que celle observée pour l'ensemble de la biomasse, y compris les autotrophes. En revanche, la quantité d'oxygène nécessaire pour cette respiration est moindre. Cela indique que la cinétique de dégradation de la charge carbonée est nettement plus rapide, se déroulant en une seule phase, comme illustré dans la deuxième partie de la *Figure IV.27(b)*. En contraste, la nitrification est un processus plus lent, caractérisé par une dégradation en plusieurs phases, comme illustré dans la deuxième partie de la *Figure IV.27(d)*. Les résultats

mettent en évidence de manière très claire que les quantités d'oxygène utilisées ainsi que les temps de dégradation augmentent de manière proportionnelle à l'augmentation du rapport S_0/X_0 , que ce soit pour les hétérotrophes ou pour l'ensemble de la biomasse, incluant les autotrophes. Cette augmentation est plus prononcée dans le cas des hétérotrophes. Cependant, pour un rapport S_0/X_0 de $0.23 \text{ g}_{DCO}/\text{g}_{MVS}$, une multiplication microbienne a été clairement observée, principalement pour l'ensemble de la biomasse. Cela se traduit par l'absence de retour à l'état endogène et une réduction de la quantité d'oxygène utilisée ainsi que du temps de dégradation. Cette réduction est due à l'utilisation de l'oxygène pour la synthèse de nouveaux matériaux cellulaires, en plus de la production d'énergie.

Les temps de dégradation les plus courts ont été observés pour les rapports S_0/X_0 faibles, allant de 0.03 à 0.06 , avec un rapport de 0.03 pour les hétérotrophes et de 0.04 pour l'ensemble de la biomasse. Ces durées plus courtes permettent non seulement d'éviter les changements morphologiques de la biomasse et la multiplication cellulaire, mais également de réaliser des injections successives au sein d'un seul test, ce qui est essentiel pour des études de comparaison, que ce soit en présence ou en l'absence de la molécule pharmaceutique. En augmentant la concentration de substrat injectée dans le respiromètre de 300 à 450 mg/L , on observe une augmentation proportionnelle de la consommation d'oxygène pour les différents rapports S_0/X_0 , comme illustré dans la *Figure IV.29*. Cependant, une exception se produit pour le rapport de $0.23 \text{ g}_{DCO}/\text{g}_{MVS}$, où une réduction de la quantité d'oxygène consommée et du temps de dégradation est enregistrée.

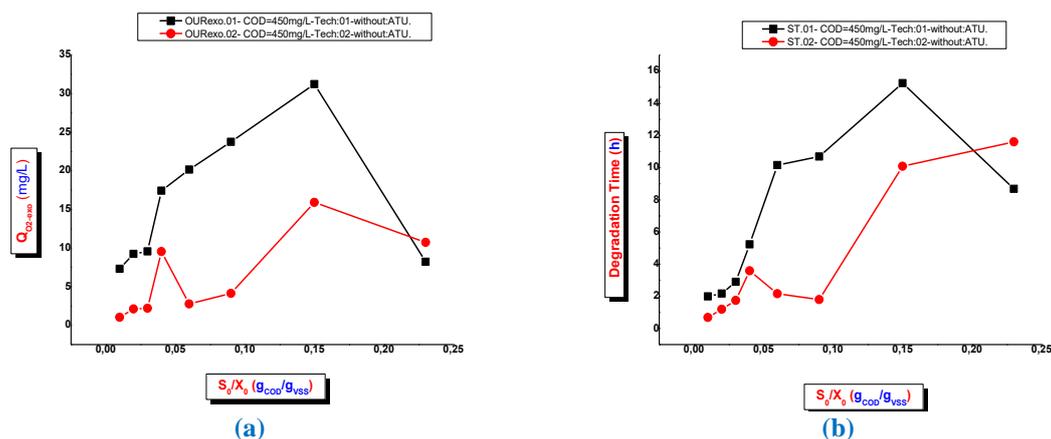


Figure IV.29 : Effet du rapport S_0/X_0 fixé sur (a) la quantité d'oxygène dissous exogène utilisée (b) le temps de dégradation, pour la totalité de la biomasse (DCO égale à 450mg/L).

Sur la base de ces constatations, et en prévision des prochains tests visant à évaluer l'activité des hétéro et autotrophes en présence ou en l'absence du rejet pharmaceutique, il est recommandé d'utiliser un rapport $S_0/X_0 = 0.04 \text{ g}_{DCO}/\text{g}_{MVS}$, avec une DCO de 300 mg/L . Cette configuration permettra d'obtenir des tests d'inhibition les plus informatifs possibles.

7.3. Les injections successives

Afin d'observer l'impact des injections successives sur les réponses respirométriques et d'évaluer la reproductibilité d'un même test à un rapport S_0/X_0 donné, des expériences ont été menées dans le respiromètre, en suivant les protocoles et modes opératoires établis, avec rapports S_0/X_0 fixés à 0.04, 0.09 et 0.19 g_{DCO}/g_{MVS} . Les résultats présentés dans *Figure IV.30* montrent l'évolution temporelle de la concentration en oxygène dissous (OD) lors de la phase de stop-reprise d'aération pour trois injections successives d'un même substrat ayant une concentration de 300 mg/L en DCO et un rapport S_0/X_0 égal à 0.04 g_{DCO}/g_{MVS} .

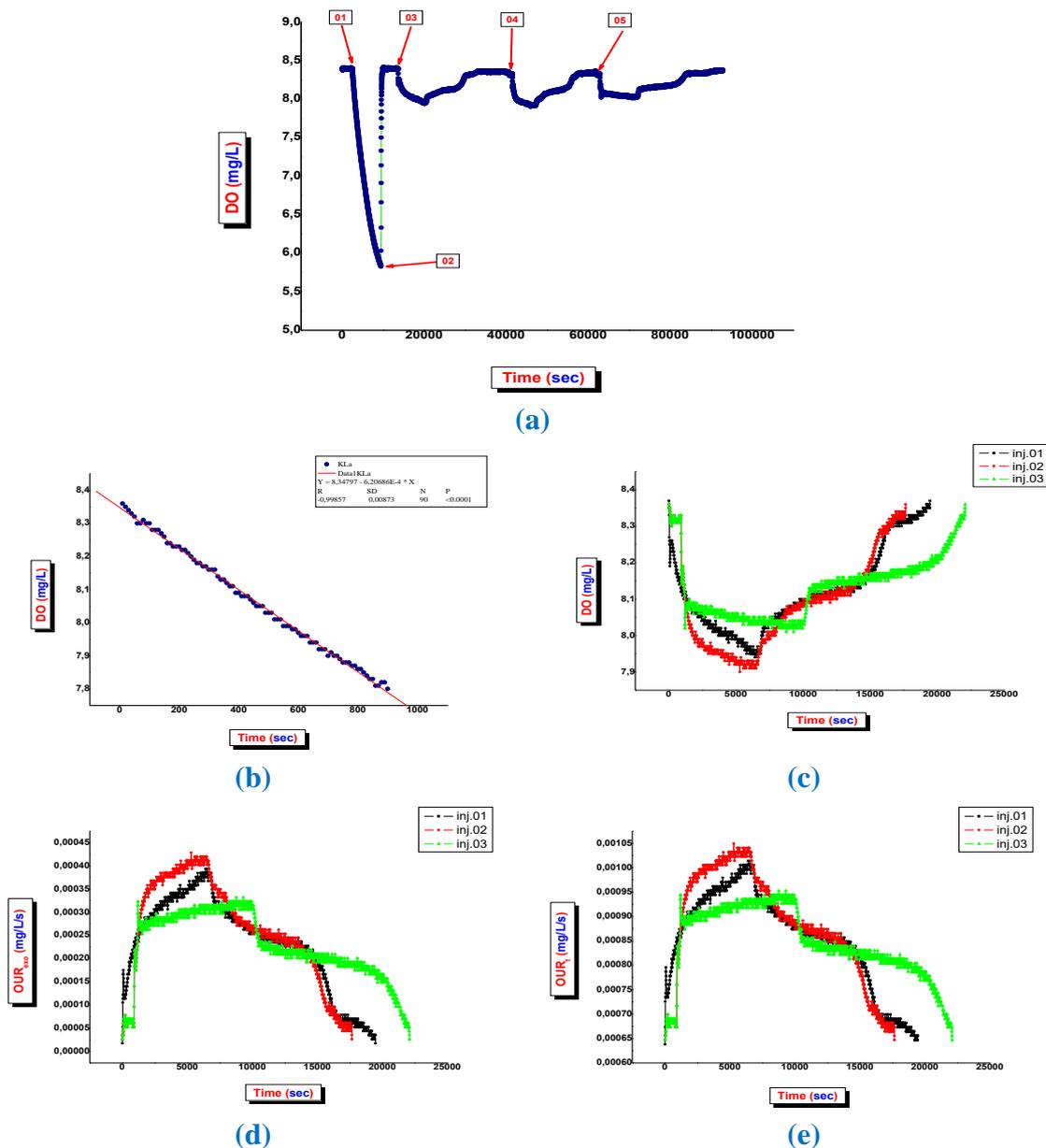
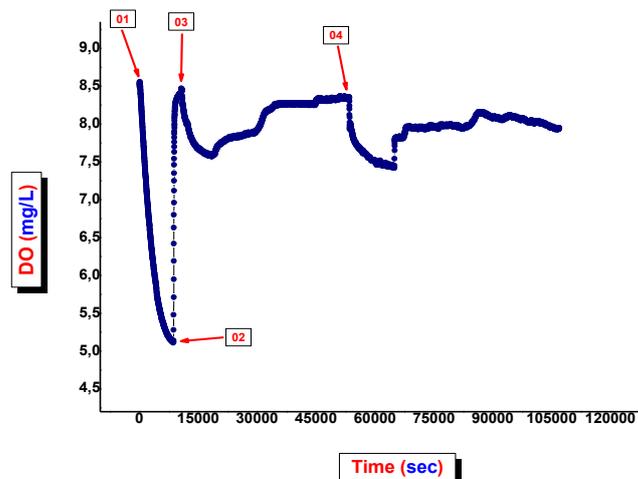
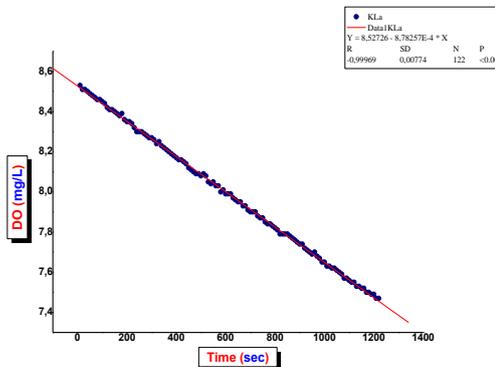


Figure IV.30 : Evolution de la concentration en oxygène dissous en fonction du temps obtenu pour le rapport $S_0/X_0 = 0.04$, (a) le respirogramme complet, (b) la partie de détermination de K_{LA} , et de la respiration endogène(c) la superposition des courbes de consommation d'O₂ en fonction de temps et (d & e) la superposition des courbes de taux d'utilisation d'O₂ exogène et total.

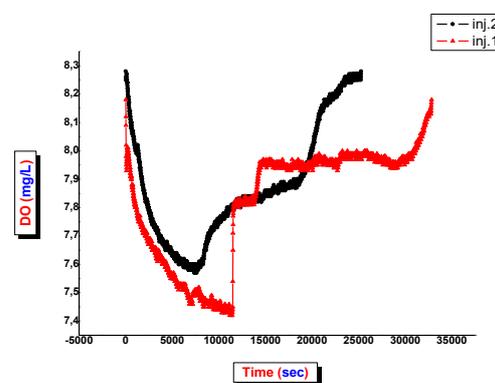
Selon les premières constatations, il semble que la forme des respirogrammes enregistrés ne soit pas affectée par la répétition des injections. Cependant, une diminution de la respiration maximale et une prolongation du temps ont été constatées lors de la troisième injection, nécessitant plus de temps pour revenir à l'état endogène. La *Figures IV.31* et *Figures IV.32* présentent les respirogrammes de deux injections successives enregistrées pour deux rapports S_0/X_0 plus élevés, soit 0.09 et 0.19 g_{DCO}/g_{MVS} . Le nombre d'injections a été réduit en raison de la durée nécessaire pour atteindre l'état endogène, qui s'est avérée nettement plus longue que celle observée pour le rapport de 0.04 g_{DCO}/g_{MVS} . Pour ces deux rapports, la forme générale des respirogrammes a subi des changements significatifs lors de la deuxième injection, *Figure IV.31*, *Figure IV.32*. La respiration maximale, exprimée en OUR_{exo} , a connu une nette augmentation lors de la deuxième injection par rapport à la première. Cela s'est accompagné d'un allongement de la durée nécessaire pour dégrader la même quantité de substrat injectée, ce qui se traduit par un temps plus long pour atteindre l'état endogène. Ces observations ont été notées pour les deux rapports S_0/X_0 considérés comme faibles, à savoir 0.09 et 0.19 g_{DCO}/g_{MVS} .



(a)



(b)



(c)

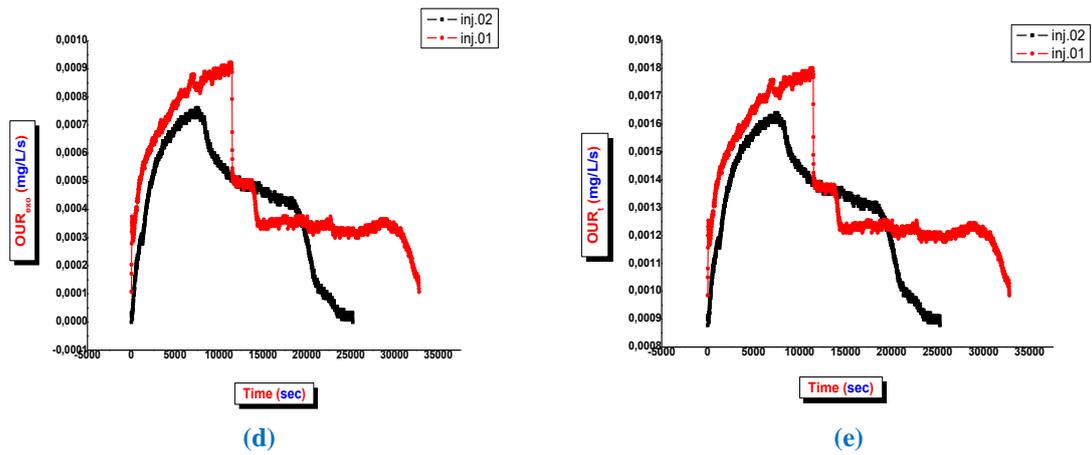
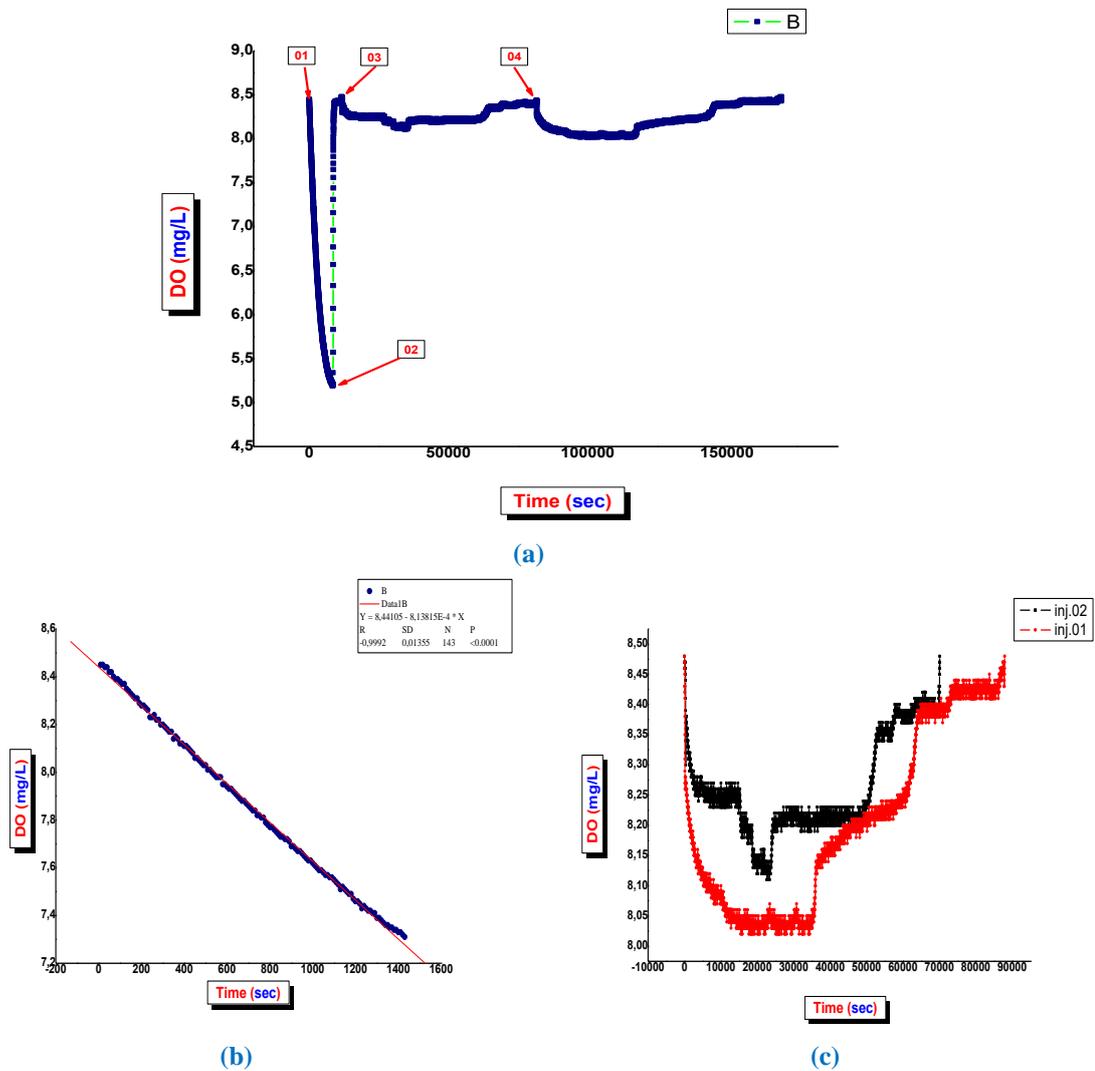


Figure IV.31 : Evolution de la concentration en oxygène dissous en fonction du temps obtenu pour un rapport $S_0/X_0 = 0.09$, (a) le respirogramme complet, (b) la partie de détermination de K_{LA} , et de la respiration endogène (c) la superposition des courbes de consommation d'O₂ en fonction de temps et (d & e) la superposition des courbes du taux d'utilisation d'O₂ exogène et total.



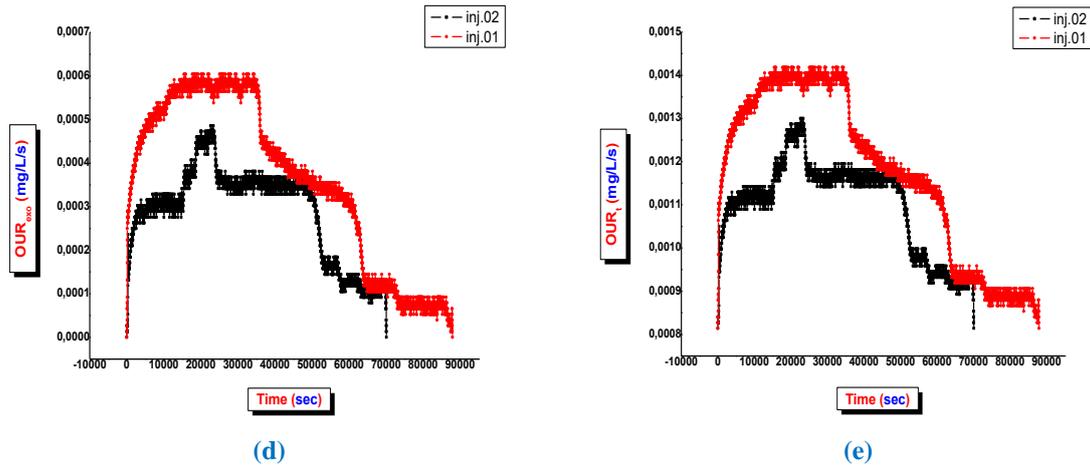


Figure IV.32 : Evolution de la concentration en oxygène dissous en fonction du temps obtenu pour un rapport $S_0/X_0 = 0.19$, (a) le respirogramme complet, (b) la partie de détermination de K_{LA} , et de la respiration (c) la superposition des courbes de consommation d' O_2 en fonction de temps et (d & e) la superposition des courbes de taux d'utilisation d' O_2 exogène et total.

Pour plus d'exactitude dans les conclusions, une comparaison a été effectuée entre les coefficients de transfert d'oxygène, K_{LA} , les respirations endogènes, les temps de dégradation, les respirations totales, les respirations exogènes, ainsi que la différence entre ces dernières, comme indiqué dans les *Figures IV.33* et *Figures IV.24*.

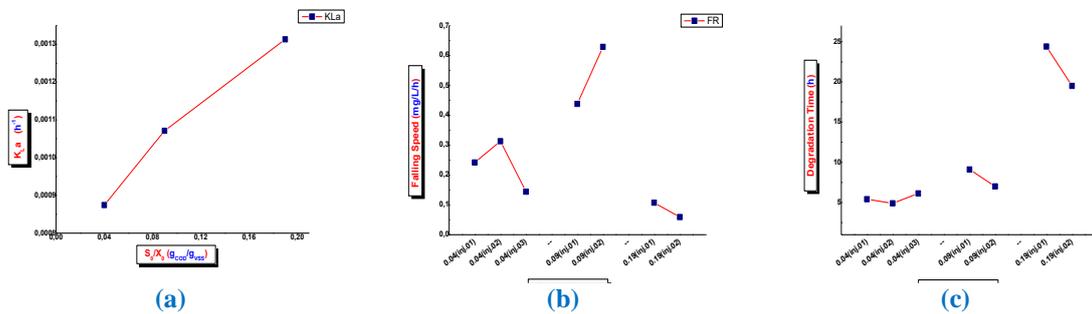


Figure IV.33 : Evolution en fonction du rapport S_0/X_0 du : (a) le coefficient de transfert K_{La} , (b) OUR_{end} (c) le temps de dégradation lors des différentes injections du substrat.

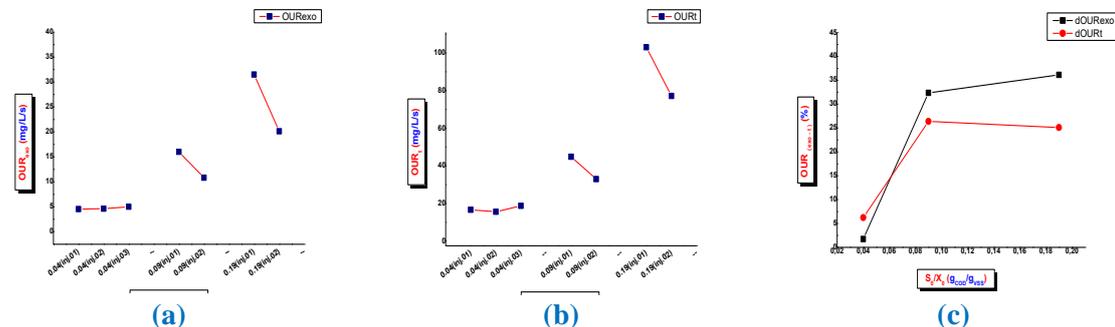


Figure IV.34 : Evolution en fonction du rapport S_0/X_0 étudié du : (a) OUR_{exo} , (b) OUR_t (c) la différence de $OUR_{exo,1}$ entre la première et la deuxième injection.

Il convient de noter que les variations entre les paramètres estimés lors des injections successives sont plus marquées pour les rapports de 0.09 et 0.19 que pour le rapport de 0.04.

Par exemple, pour $S_0/X_0 = 0.04 \text{ g}_{DCO}/\text{g}_{MVS}$, la variation dans l' OUR_{exo} est très faible, de l'ordre de 1.7 %. Il est important de souligner que l'augmentation du rapport S_0/X_0 peut entraîner l'activation d'autres métabolismes, en particulier l'accumulation ou la mise en réserve, ce qui est susceptible d'avoir un impact sur les réponses respirométriques successives.

À la lumière de ces résultats, il est observé que les injections successives de substrats pour un faible rapport S_0/X_0 compris entre 0.03 et 0.07 n'induisent aucun changement significatif dans les taux d'utilisation d'oxygène. Ces rapports sont donc les plus adaptés pour l'évaluation de l'inhibition dans un même test. En revanche, pour des rapports plus élevés, il est recommandé d'éviter les tests successifs et de privilégier des tests séparés.

CONCLUSION :

Les résultats expérimentaux présentés dans ce chapitre nous ont permis de définir les conditions essentielles pour mener à bien les tests de respirométrie afin d'évaluer l'inhibition induite par les rejets pharmaceutiques. Ces conditions incluent :

- L'interprétation des respirogrammes de type *LSS* et *LFS*.
- La procédure de mise à l'endogène et la préparation de la liqueur mixte pour les deux types de respirométries, *LFS* et *LSS*.
- Les rapports S_0/X_0 à fixer dans les différents tests.
- Les méthodes de détermination du coefficient de transfert d'oxygène dans la respirométrie de type *LFS*.
- Le nombre de tests successifs de respirométrie à réaliser au sein d'un même test.
- L'évaluation de l'activité de la biomasse autotrophe et hétérotrophe

L'application de la respirométrie pour évaluer l'impact des rejets pharmaceutiques sera réalisée en respectant les conditions opératoires optimisées antérieurement.

Chapitre V

La présence d'antibiotiques, en particulier l'*AMX*, connu pour sa résistance biologique, dans les eaux usées, constitue une complication significative. En effet, ces substances ont tendance à agir comme des inhibiteurs, perturbant le bon fonctionnement des systèmes de traitement biologique. Cela se traduit par une diminution de la consommation des diverses charges organiques dans les eaux usées, entraînant ainsi une réduction de l'efficacité du processus de dépollution des eaux et de la séparation solide-liquide par la suite. Après avoir mis en place un respiromètre batch selon un mode opératoire uniforme et bien défini, notre but est de conduire une série d'expériences pour évaluer l'effet inhibiteur de la présence de la molécule d'*AMX* dans les effluents sur l'activité de la biomasse microbienne. Cela a été réalisé en utilisant deux techniques de respirométrie, à savoir *LSS* et *LFS*, avec comme objectif principal la détermination des seuils d'inhibition. Les seuils d'inhibition évalués ont été sélectionnés en fonction d'une analyse préliminaire des données recueillies sur le terrain.

1. ESTIMATION DU SEUIL D'INHIBITION

La quantification de l'effet de la présence de l'inhibiteur sur l'activité microbienne sera réalisée par l'estimation du pourcentage d'inhibition (% *I*), qui définit la concentration de l'inhibiteur induisant la réduction de l'activité à différents seuils. Ce pourcentage sera évalué en utilisant l'*Equation V.01*, dans le cas où une augmentation a été notée.

$$\% I = \left(1 - \frac{Q_{O_2-exo(SI)}}{Q_{O_2-exo(S)}} \right) * 100 \quad (V.01)$$

D'où :

% *I* : pourcentage d'inhibition

$Q_{O_2-exo(SI)}$: quantité d'oxygène exogène utilisée après l'injection du substrat contenant l'inhibiteur.

$Q_{O_2-exo(S)}$: quantité d'oxygène exogène utilisée après l'injection du substrat.

La mesure de la consommation d'oxygène lors de la dégradation du substrat, en présence ou en absence de l'inhibiteur, sera substituée par la respiration endogène, exogène ou totale dans le cas de la respirométrie de type *LSS*.

2. LA CINÉTIQUE DE CONSOMMATION DU SUBSTRAT ET D'*AMX*

Le substrat synthétique utilisé dans cette étude consiste en un mélange binaire comprenant une source de carbone, une source d'azote, ainsi que d'autres nutriments, présentant une demande chimique en oxygène (*DCO*) théorique de 300 mg/L. Pour préparer ce substrat, une solution mère de 2000 mg/L a été diluée. Les mesures de la *DCO* pendant les tests ont été réalisées au moyen d'un spectrophotomètre *UV-visible*, avec une longueur d'onde de 620 nm. L'*Equation V.02* a été employée pour la faible gamme [1 – 150 mg/L] en

vue de calculer la $DCOs$, tandis que *L'Equation V.03* a été appliquée pour la grande gamme [10 – 1000 mg/L] afin de calculer la $DCOt$.

$$[DCO]_s = \frac{Abs (nm) - 0.01494}{3.78503 \cdot 10^{-4}} \quad (V.02)$$

$$[DCO]_t = \frac{Abs (nm) + 0.00445}{2.3256 \cdot 10^{-4}} \quad (V.03)$$

En ce qui concerne l'établissement de la courbe d'étalonnage de l'AMX, les tests réalisés dans le surnageant de la liqueur mixte ont démontré une faible fiabilité en raison de la complexité de la matrice de surnageant avec l'AMX. Par conséquent, des courbes d'étalonnage pour l'AMX à la longueur d'onde de 273 nm ont été élaborées pour différentes matrices, à savoir l'eau du robinet, *Equation V.04*, pour la plage basse [1 – 150 mg/L], une autre équation, *Equation V.05*, pour la plage élevée [10 – 1000 mg/L], et enfin une troisième équation, *Equation V.06*, pour les effluents avec une DCO de 300 mg/L, pour la plage basse [1 – 150 mg/L]. Ces courbes ont été élaborées dans le but d'être utilisées dans le suivi de la biodégradation (biosorption) de la molécule après son injection dans les respiromètres.

$$[AMX] = \frac{Abs (nm) - 7.53333 \cdot 10^{-4}}{0.00303} \quad (V.04)$$

$$[AMX] = \frac{Abs (nm) - 0.09307}{0.00267} \quad (V.05)$$

$$[AMX] = \frac{Abs (nm) + 0.01049}{0.00271} \quad (V.06)$$

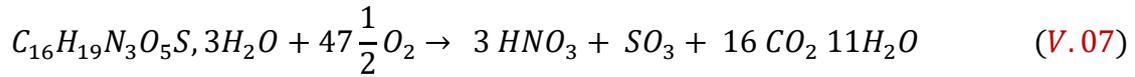
Au cours de ces préparations, des mesures de certains paramètres sur les solutions mères de la faible et grande gamme d'AMX ont été effectuées, le *Tableau V.01*.

Tab. V.01 : *Caractérisation des solutions mères d'AMX.*

	Eau distillée		Eau de robinet	
	100 µg/mL	1000 µg/mL	100 µg/mL	1000 µg/mL
pH	6.722	6.342	6.687	6.234
Temp. °C	18.3	18.7	18.9	18.8
DCOs (mg/L)	112.3	705.1	110.6	742.7
DCOt (mg/L)	203	1456.1	201.6	1655.6
TOC (mg/L)	34.87	322.33	36.2	324.67
TC (mg/L)	36.07	323.67	62.57	349.33
IC (mg/L)	1.16	1.15	26.37	25.07

En se basant sur ces données, l'AMX présente des concentrations significatives en termes de DCO , indépendamment de son mode de préparation, que ce soit dans de l'eau distillée ou dans de l'eau du robinet. Selon *l'Equation V.07*, l'oxydation de l'AMX révèle une valeur de 1.793 mg_{O2}/mg_{AMX}, correspondant à une concentration théorique en terme $DCOt$ de 179.3 mg/L pour la plage basse, qui est presque similaire à la valeur calculée de DCO de

201.6 mg/L, et de 1792.9 mg/L pour la plage élevée, alors que la valeur calculée est de 1655.6 mg/L, présentant une différence d'environ 11.1% pour la plage basse et d'environ 7.7% pour la plage élevée.



3. LES PREMIERS ESSAIS DES TESTS RESPIROMETRIQUES

Un essai de la cinétique de dégradation de l'effluent synthétique a été réalisé pour observer l'évolution de la consommation du substrat binaire (contenant la source de carbone et d'azote) au fil du temps. Cela a été effectué dans un respiromètre de type LFS, en maintenant les conditions opératoires prés définies ($DCO = 300mg/L$, $S_0/X_0 = 0.04$, ...).

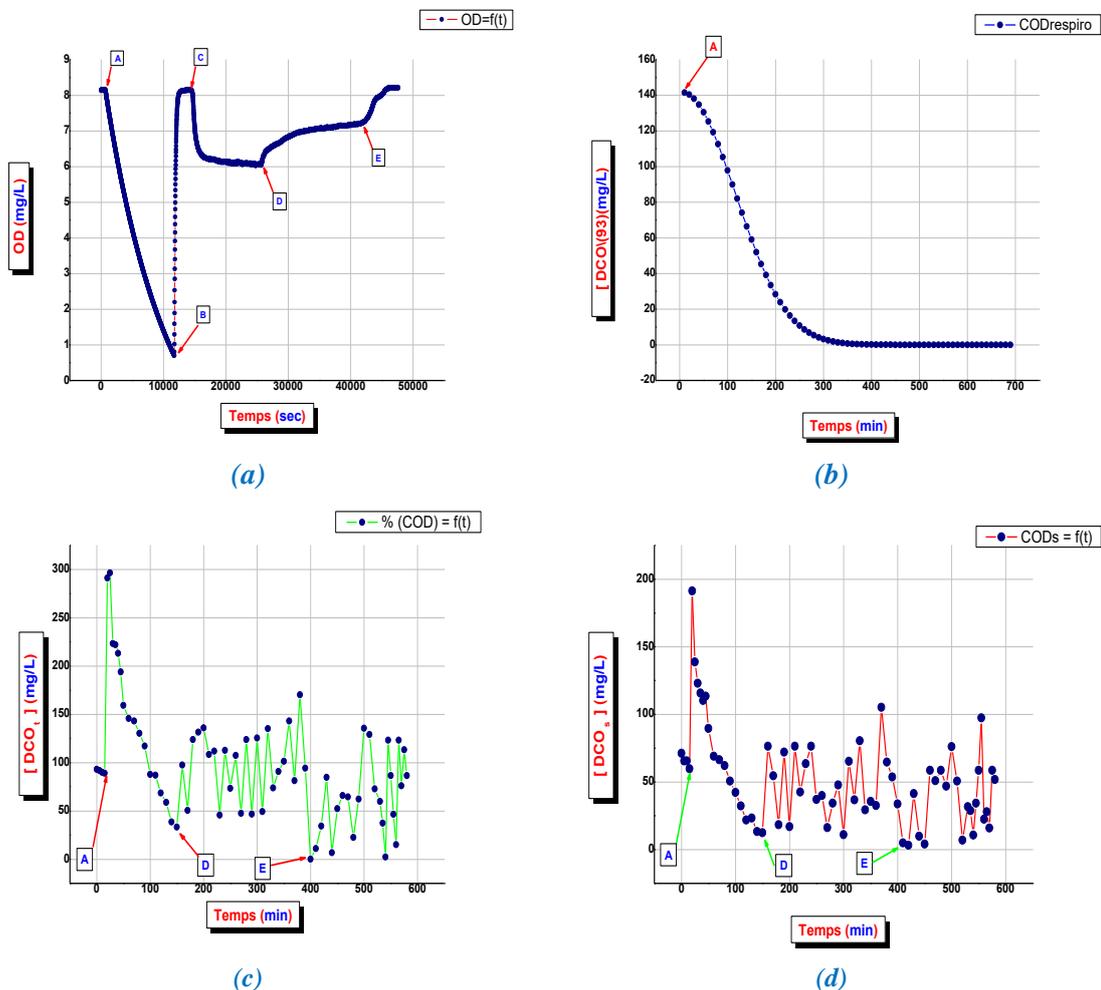


Figure V.01 : (a) Respirogramme obtenu après injection de l'effluent synthétique binaire, et l'évolution temporelle (b) de la charge de la DCOs dans le respiromètre, (c) la concentration en DCOs et (d) DCOt.

La *Figure V.01* présente un respirogramme obtenu lors du suivi de l'évolution temporelle de la charge carbonée, mesurée en termes de *DCO soluble* et *totale*. Lors d'injection d'effluent synthétique, on observe une diminution de la concentration en oxygène

dissous dans le respirogramme, *Figure V.01-a*, suivie d'une augmentation de la *DCO*, *Figure V.01-c* et *V.01-d*, mesurée dans le milieu. La concentration en *DCO* continue de diminuer jusqu'au point (*D*) dans le respirogramme et les courbes *DCO*, atteignant des concentrations minimales ($DCOs = 12.4 \text{ mg/L}$, $DCOt = 33.2 \text{ mg/L}$ et $O_2 \text{ dissous} = 6.02 \text{ mg/L}$), puis des fluctuations des concentrations de la *DCO* commencent.

Cette phase de dégradation de la charge carbonée est celle mentionnée dans le respirogramme entre les points (*C* et *D*). Après le point (*D*), une fois la source de carbone épuisée, la nitrification commence dans le cas où la charge azotée dépasse les besoins des hétérotrophes. Les variations constatées dans la courbe de *DCO* résultent potentiellement de la lyse microbienne ainsi que des erreurs de mesure attribuables à la diminution du volume réactionnel dans le respiromètre. Cependant, la *Figure V.01-b*, obtenue à partir de *l'Equation V.08*, montre que les résidus de la *DCO* sont nuls après le déroulement de la nitrification et après un certain temps (*point E*), car la courbe de *DCO* enregistre à ce moment une concentration de *DCO* nulle.

$$DCO_{S-respi} = \frac{([DCO]_{injecté} * V_{injecté}) + ([DCO]_{mesurée} * V_{boues})}{V_{total}} \quad (V.08)$$

Ainsi, en se basant sur les résultats de cette cinétique, on peut conclure que la charge carbonée a été initialement biodégradée, simultanément au métabolite de nitrification présentant une cinétique plus lente.

L'utilisation d'inhibiteur de nitrification, *ATU*, permet de distinguer entre le métabolite de dégradation du substrat carboné et la nitrification. Par conséquent, l'analyse des respirogrammes offre l'avantage de détailler plus précisément les différents métabolites impliqués.

Le respirogramme peut présenter plusieurs phases lorsqu'un substrat injecté présente différents niveaux de biodégradabilité, allant de facilement à difficilement biodégradable. Toutefois, dans notre cas, les produits reconstituant le substrat synthétique sont considérés comme facilement biodégradables.

Il est important de souligner que cette sélection a été faite dans le but de visualiser spécifiquement l'effet inhibiteur de la molécule d'*AMX* principalement sur la perméation du substrat et sur la métabolisation regroupant l'anabolisme et le catabolisme, sans prendre en considération les autres métabolites tels que la prédigestion ou l'hydrolyse, le stockage, la lyse, ... etc.

4. ESTIMATION DES SEUILS D'INHIBITION EN UTILISANT LES TECHNIQUES RESPIROMETRIQUES LSS

L'estimation des seuils d'inhibition en utilisant la respirométrie LSS, a été effectuée en suivant le plan d'expérimentation démontré dans la *Figure V.02*, ce mode d'évaluation a été réalisée en considérant plusieurs scénarios résumés dans le *Tableau V.02* et en utilisant l'inoculum MAS, les détails d'exécution de chaque scénario sont regroupés dans *Annexe F*.

Tableau V.02 : Les différents scénarios des tests d'inhibition utilisant la respirométrie LSS.

Type de LSS	Les scénarios	Type d'effet ciblé	Injection du substrat	Injection d'AMX	Concentration d'AMX	Temps de Contact
LSS Cumulative	Scénario 01	Effet sur l'activité endogène des microorganismes	-	+	10 -30 mg/L	5 min
	Scénario 02	Effet sur l'activité endogène des microorganismes	-	+	30 -70 mg/L	5min
	Scénario 03	Activité totale des microorganismes	+	-	-	0-65 min
	Scénario 04	Effet sur l'activité totale des microorganismes (injection combinée)	+	+	2.5 g/L	0-65 min
LSS Non Cumulative	Scénario 05	Effet sur l'activité totale des microorganismes (injection séparée)	+	+	2.5 g/L	0-65 min
	Scénario 06	Effet sur l'activité totale des microorganismes (injection combinée)	+	+	0 -35 mg/L	15 min
	Scénario 07	Effet sur l'activité totale des microorganismes (injection combinée)	+	+	40-80 mg/L	15 min

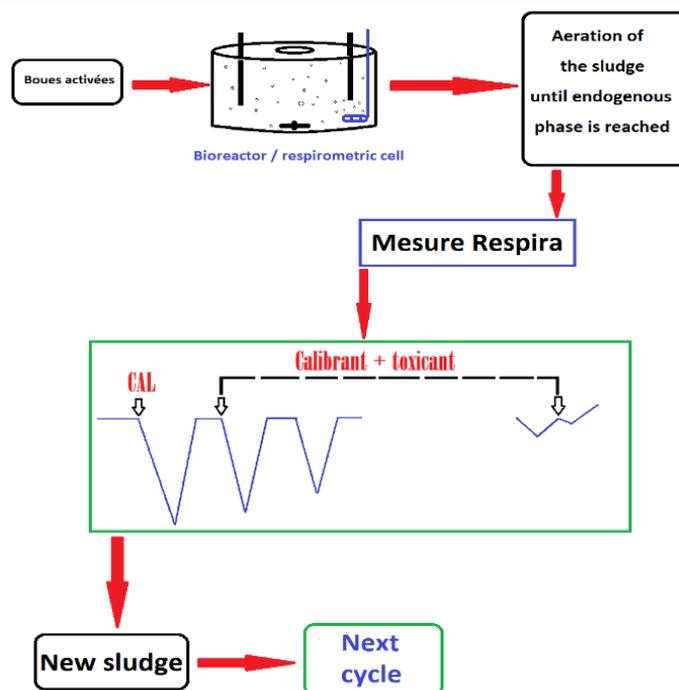


Figure V.02 : Plan d'expérimentation utilisé dans la respirométrie de type LSS pour l'estimation de l'inhibition d'AMX.

Les différents résultats obtenus sont regroupés dans les *Tableaux* et les *Figures* suivantes :

- **Scénario 01**

Dans cette expérience, nous avons observé l'effet cumulatif de l'injection de concentrations graduelles d'AMX sur la respiration endogène. Les concentrations testées variaient de 0 à 30 mg/L. À une dose de 10 mg/L, aucun effet n'a été observé sur la respiration endogène. Cependant, nous avons constaté une augmentation de l'activité endogène. À partir de cette dose, un effet inhibiteur sur les métabolites impliqués dans la respiration endogène a été observé, notamment l'utilisation des réserves et de certains constituants cellulaires pour la production d'énergie nécessaire au maintien et à la resynthèse des composants cellulaires. Cet effet n'était pas régulier, *Tableau V.03, Figure V.03*.

Tableau V.03 : Résultats des tests d'inhibition sur l'activité endogène par la respirométrie LSS (Scénario 01)

[AMX] (mg/L)	0	10	15	20	25	30
OURend (mg/L.H)	12.528	13.032	12.312	9.936	12.348	11.556
I %	/	- 4	+ 1.7	+ 20.7	+ 1.4	+ 7.7

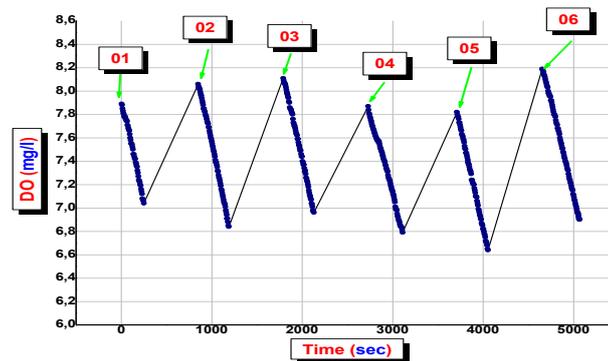


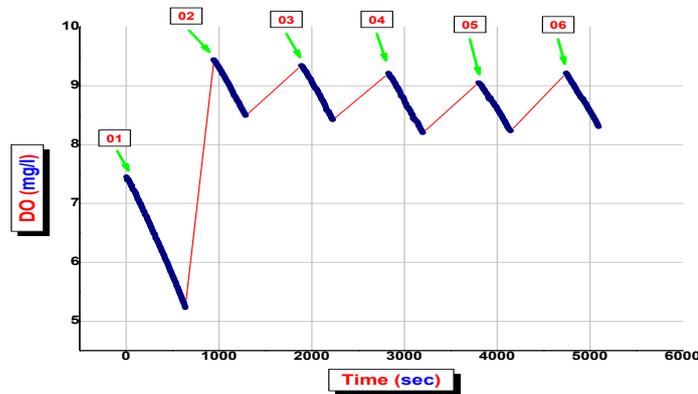
Figure V.03 : Respirogrammes obtenus selon le scénario 01.

- **Scénario 2**

Une augmentation progressive des concentrations cumulatives d'AMX a été effectuée, allant de 30 à 70 mg/L. L'effet inhibiteur s'est avéré plus régulier et a augmenté presque de manière proportionnelle à l'augmentation de la dose cumulative d'AMX. Cependant, lorsqu'on compare les effets observés à la dose de 30 mg/L, mesurée à deux reprises, l'effet est nettement distinct. À ce stade, il est important de noter que l'effet n'a pas été clairement défini sur la respiration endogène, puisque cet état où les microorganismes sont privés de substrat est généralement considéré comme un état de stress. Il convient également de souligner que les doses administrées n'ont pas entraîné de lyse complète, ce qui aurait été indiqué par l'arrêt complet de la respiration endogène, *Tableau V.04 et Figure V.04*.

Tableau V.04 : Résultats des tests d'inhibition sur l'activité endogène par la respirométrie LSS (Scénario 02)

[AMX] (mg/L)	0	30	40	50	60	70
OUR _{end} (mg/L.H)	12.564	10.116	9.972	10.008	8.676	9.18
I %	/	+19.48	+20.63	+20.34	+30.95	+26.93

**Figure V.04 :** Respirogrammes obtenus selon le scénario 02.

- **Scénario 3, 4 et 5**

Dans les scénarios 3, 4 et 5, une analyse comparative a été effectuée en injectant soit du substrat seul, puis du substrat en combinaison avec l'AMX, soit du substrat et de l'AMX séparément. Il est important de rappeler que les injections sont effectuées dans le réacteur qui alimente le respiromètre, et non directement dans le respiromètre lui-même. De plus, il est essentiel de souligner que la biomasse microbienne utilisée pour ces tests est utilisée telle quelle, sans aucun processus d'adaptation ou d'amélioration de son activité. La seule étape réalisée est la mise à l'endogène avant les tests.

D'après les résultats présentés dans le *Tableau V.05* et illustrés dans les *Figures V.05* et *V.06*, aucune variation significative n'a été observée. La biomasse a réagi de manière similaire, que ce soit à l'injection du substrat seul, en présence d'AMX injecté conjointement avec le substrat, ou lorsque l'AMX a été injecté séparément. Il est important de rappeler que les injections combinées et séparées ont été réalisées dans le but de visualiser les effets sur différents métabolites. L'injection conjointe du substrat avec l'AMX permet d'observer l'impact sur les métabolites de dégradation, tandis que l'injection séparée du substrat puis de l'AMX vise à étudier l'effet sur la fonction des exo-enzymes hydrolytiques, et l'inverse permet de suivre l'effet de l'AMX sur la perméation du substrat après la prédigestion par laquelle peut suivre plusieurs voies. Quel que soit le mode d'introduction de l'AMX, son effet inhibiteur reste minimal et même négligeable.

Tableau V.05 : Comparaison entre l'activité totale des microorganismes en injectant S et S+AMX (injection combinée et séparée) évaluée par LSS (scénario 3, 4 et 5)

Temps (min)	0	5	20	35	50	65
$OUR_T(S)$ (mg/L.H)	8.172	58.392	11.268	8.424	8.928	8.892
$OUR_T(S+AMX)$ injection combinée (mg/L.H)	8.316	56.232	11.736	9.72	8.676	8.352
$OUR_T(S+AMX)$ injection séparée (mg/L.H)	7.668	48.744	11.088	8.676	8.568	8.244

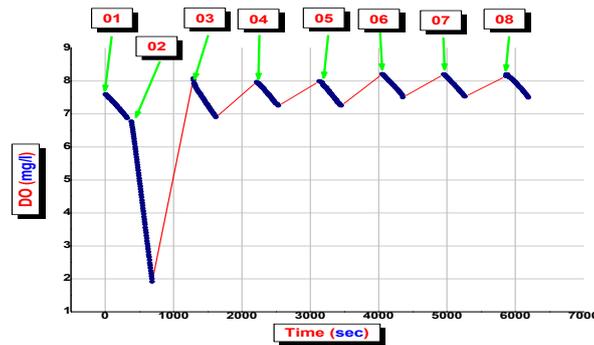


Figure V.05 : Exemples des Respirogrammes obtenus selon le scénario 03

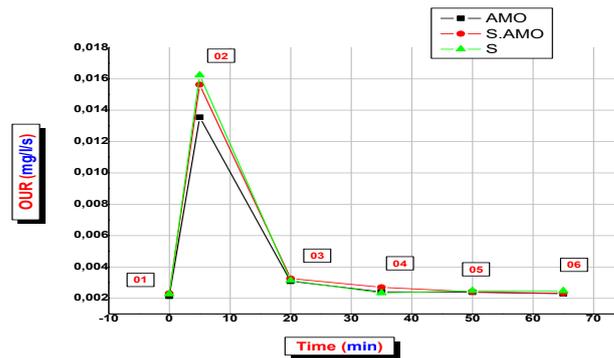


Figure V.06 : Activité totale des microorganismes évaluée selon les Scénarios 3,4,5

- **Scénario 06 et 07**

Étant donné que les scénarios précédemment appliqués n'ont pas conduit à des conclusions significatives, cela peut être attribué au protocole de test utilisé. Dans les scénarios antérieurs, les doses cumulatives d'AMX ont été injectées dans le réacteur de mise à l'endogène et non directement dans le respiromètre. Dans les scénarios 6 et 7, l'effet de l'injection instantanée d'AMX, avec des concentrations variant de 0 à 35 mg/L et 40 à 80 mg/L respectivement, a été évalué. Pour la plupart des doses injectées, aucune inhibition n'a été observée, mais plutôt une augmentation de la respiration totale. Cela suggère que l'AMX n'a pas un effet immédiat sur l'activité microbienne. Il est possible que la durée relativement courte de l'enregistrement dans ce type de respirométrie n'a pas permis de visualiser pleinement l'effet inhibiteur.

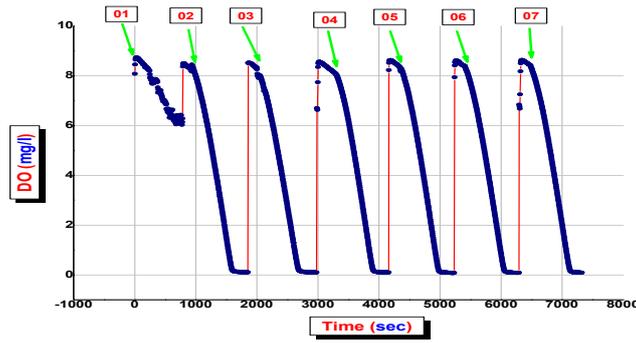


Figure V.07 : Exemples des Respirogrammes obtenus selon le scénario 06

Tableau V.06 Résultats des tests d'inhibition sur l'activité totale par LSS (Scénario 06)

[AMX] (mg/L)	0	10	15	20	25	35
OUR _T (mg/L.H)	47.376	46.548	50.688	50.004	48.204	48.276
I %	/	1.748	- 7.481	- 5.547	- 1.748	- 1.899

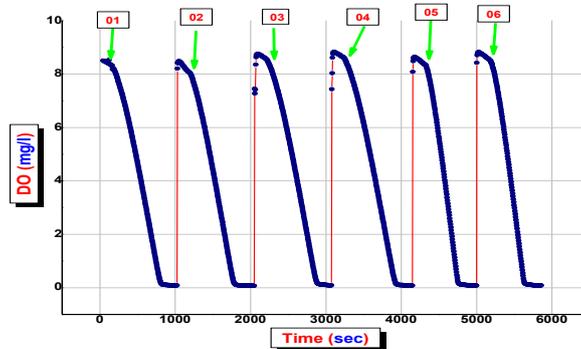


Figure V.08 : Exemples des Respirogrammes obtenus selon le scénario 07

Tableau V.07 : Résultats des tests d'inhibition sur l'activité exogène par LSS (Scénario 07)

[AMX] (mg/L)	0	40	50	60	70	80
OUR _T (mg/L.H)	48.492	51.372	49.356	47.268	73.224	71.388
I %	/	- 5.94	- 1.78	+2.52	- 51	- 47.22

Il est essentiel de noter que l'effet inhibiteur de l'AMX n'a pas pu être clairement identifié par le biais de cette méthode de respirométrie (LSS). Explorer une autre technique respirométrique, telle que la LFS, semble être nécessaire. De plus, la caractérisation morphologique de la biomasse épuratrice n'a pas été réalisée. Cette dernière peut fortement influencer la réponse de la biomasse aux inhibiteurs, comme cela a été souligné dans des travaux antérieurs [228]. Par exemple, un floc microbien bien compact et fermé peut mieux résister à ce type de stress, préservant ainsi l'activité microbienne. En revanche, un floc microbien ouvert facilitera l'infiltration totale de l'inhibiteur, entraînant une réduction significative de l'activité microbienne. La morphologie de la boue épuratrice sera soigneusement prise en compte dans les prochaines parties de l'étude.

5. ESTIMATION DES SEUILS D'INHIBITION EN UTILISANT LES TECHNIQUES RESPIROMETRIQUES LFS :

Les seuils d'inhibition ont également été évalués en utilisant la respirométrie de type LFS, conformément au plan d'expérimentation illustré dans la *Figure V.09*. L'évaluation de l'inhibition a été effectuée en injectant de l'AMX sous forme de poudre ou après sa dissolution, et en examinant l'effet inhibiteur sur l'ensemble de la biomasse épuratrice ou sur une fraction spécifique, à savoir les hétérotrophes. Ces expérimentations ont été menées en utilisant l'inoculum CAS, la caractérisation morphologique et l'état de compaction de cette biomasse épuratrice a été effectuée.

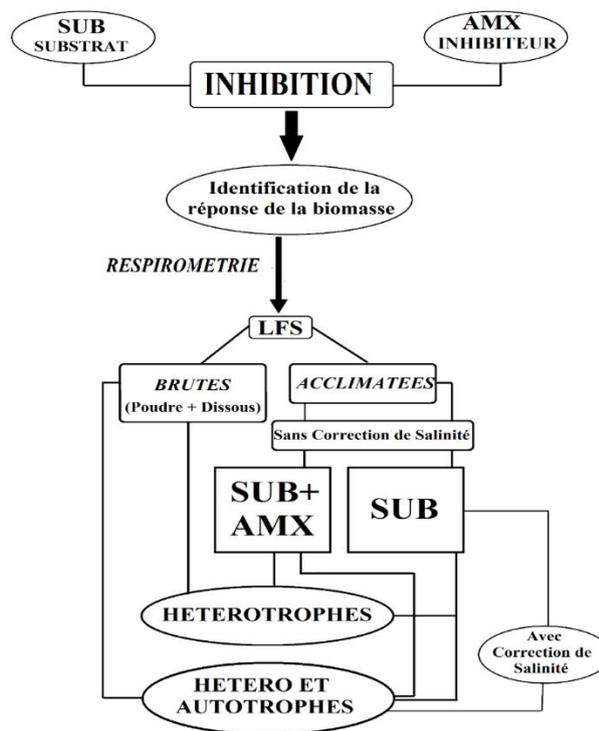


Figure V.09 : Plan d'expérimentation utilisé dans la respirométrie de type LFS pour l'estimation de l'inhibition d'AMX.

5.1. Effet inhibiteur d'AMX injecté après dissolution sur l'activité microbienne

L'évaluation de l'effet inhibiteur de l'AMX a été réalisée sur les boues CAS non acclimatées en utilisant le respiromètre construit selon les protocoles préalablement établis (lavage, aération, $DCO = 300 \text{ mg/L}$, $S_0/X_0 = 0.04$, durée d'environ 30 minutes d'interruption de l'aération, et autres). Cette évaluation s'appuie sur la technique d'injection d'un effluent synthétique contenant l'AMX dans le respiromètre, à différentes gammes de concentrations. Après l'injection initiale de cet effluent sans inhibiteur pour établir l'état endogène, des injections successives ont été réalisées. Avant la deuxième injection, une élimination d'un volume déterminé de surnageant (équivalent au volume d'effluent à injecter) a été effectuée

après une pause d'aération et d'agitation du respiromètre pendant 30 à 45 minutes. Ensuite, l'aération et l'agitation ont repris jusqu'au retour à l'état endogène, moment où la deuxième injection a été effectuée. Tout au long de ces essais, des observations microscopiques des floccs bactériens ainsi que des analyses chimiques du surnageant de la liqueur mixte (*DCO totale et soluble, COT, TC, IC et MO*) ont été réalisées à différents états endogènes de l'essai respirométrique. De plus, pour chaque essai, le coefficient K_{La} a été déterminé séparément.

La *Figure V.10* illustre un exemple de respirogramme obtenu lors des tests d'inhibition par l'AMX injecté avec l'effluent synthétique. Les points (A - B) représentent la phase d'interruption/reprise de l'aération, l'effluent synthétique contenant uniquement le substrat a été injecté au point (C), et enfin, au point (D), l'effluent synthétique contenant l'AMX à une concentration donnée a été injecté.

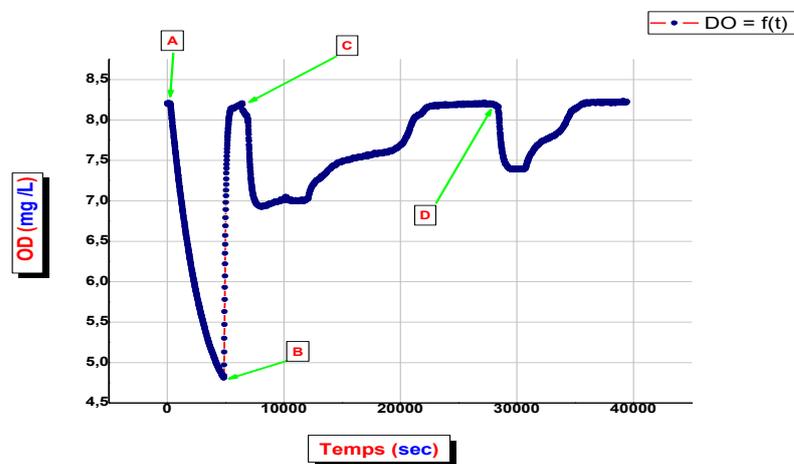


Figure V.10 : Exemple d'un respirogramme obtenue lors des tests d'inhibition en injectant l'AMX avec le substrat (30 $\mu\text{g}/\text{mL}$).

Les essais d'inhibition, suivis par le taux de consommation d'oxygène, révèlent une diminution de la quantité d'oxygène consommée après l'injection d'effluent synthétique contenant l'AMX, comme le montre la *Figure V.10*. Ceci est attribuable au mode d'action de cette molécule, qui, lorsqu'elle est introduite avec un autre substrat, se solubilise efficacement, inhibant ainsi la synthèse du peptidoglycane, composant essentiel de la paroi cellulaire. Cela a un impact direct sur les bactéries en fragilisant leur paroi, entravant ainsi le transfert d'oxygène et compromettant la dépollution de la charge carbonée et azotée. Ceci est conditionné par le contact possible entre la paroi et l'AMX qui est conditionnée par l'état morphologique des agrégats microbiens.

Cependant, les phénomènes d'inhibition, comme indiqué dans la *Figure V.11-a*, varient considérablement en fonction des concentrations d'AMX allant de 0 à 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$. La molécule présente un comportement irrégulier, provoquant des effets très variables en termes

de pourcentage d'inhibition. Elle induit immédiatement un effet d'inhibition de 16.6% pour une dose de 5 $\mu\text{g/mL}$, mais seulement 1.7% pour une dose de 15 $\mu\text{g/mL}$. Par contre, des effets d'inhibition très prononcés de 83.2% et 74.6% sont observés pour les doses de 25 $\mu\text{g/mL}$ et 30 $\mu\text{g/mL}$ respectivement. En revanche, l'effet d'inhibition n'est que de 37.4% pour la dose la plus élevée, soit 100 $\mu\text{g/mL}$. Ces variations s'expliquent par le comportement et l'activité de la biomasse utilisée d'une part, et d'autre part, par la réaction des boues activées au mode d'action spécifique de la molécule AMX.

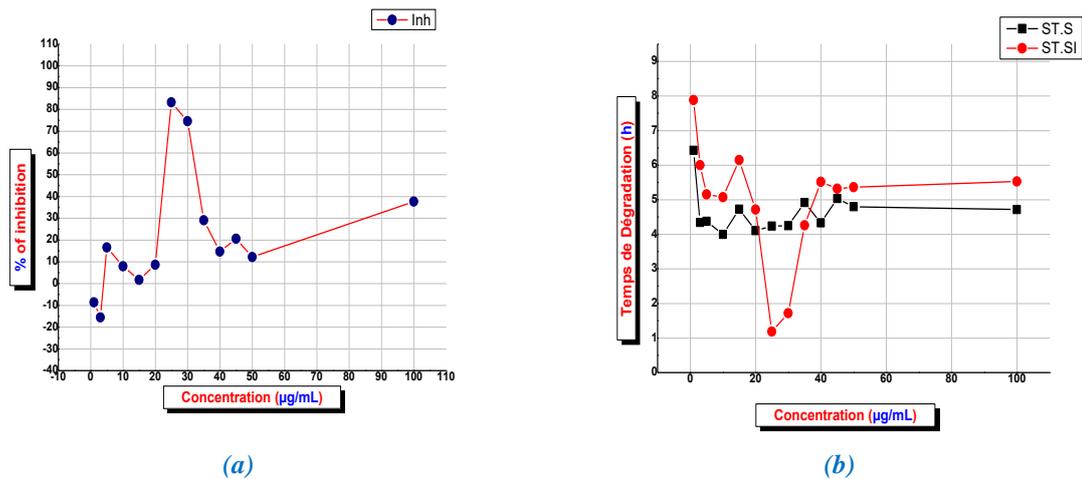
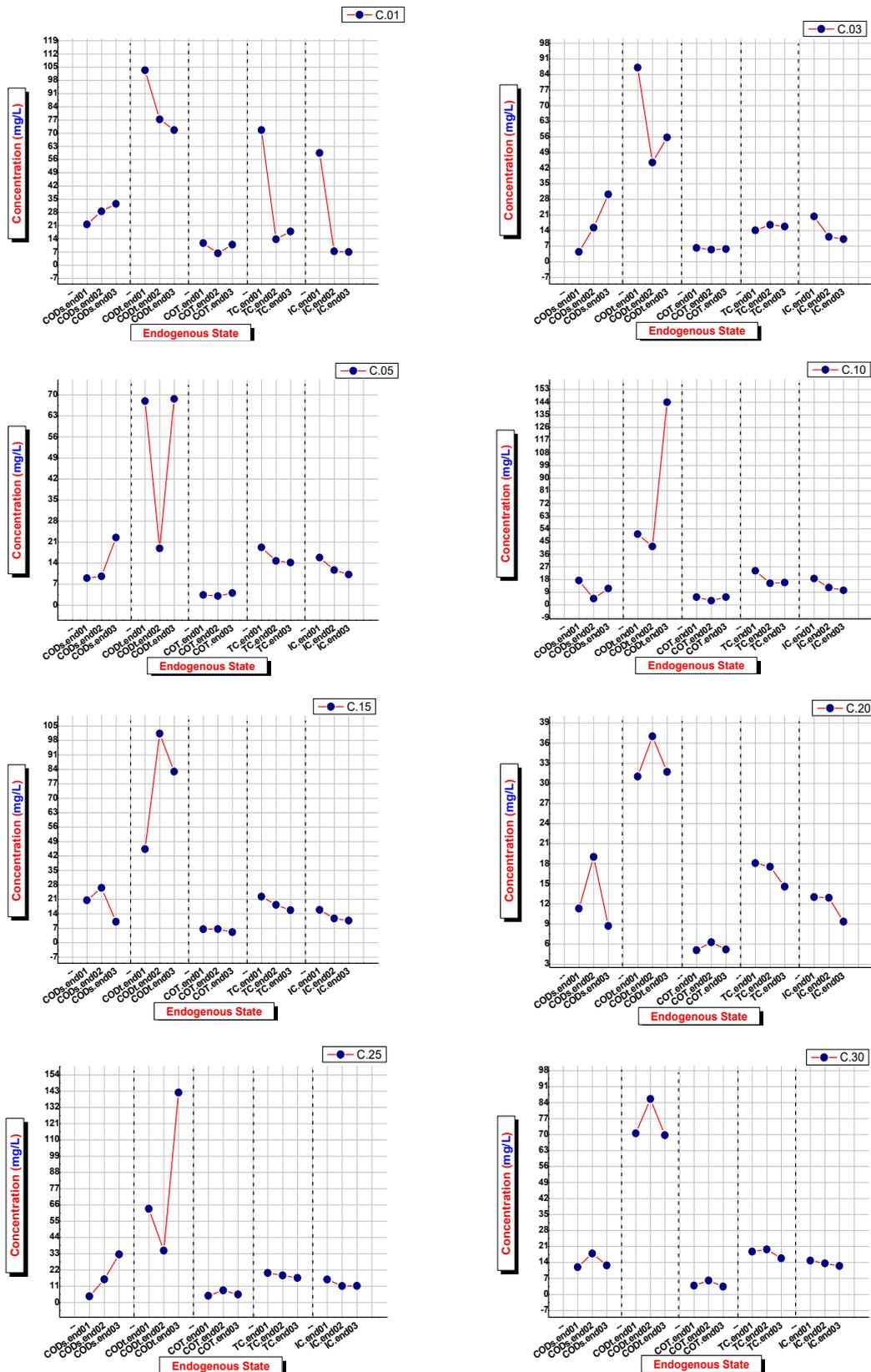


Figure V.11 : Evolution en fonction de la concentration d'AMX injecté du : (a) Pourcentage d'inhibition et (b) Temps de dégradation après injection de l'effluent synthétique seul et l'effluent synthétique contenant l'AMX.

La *Figure V.11b*, illustre les variations du temps de dégradation du substrat, exprimé par la consommation d'oxygène dans le milieu, tant pour l'effluent synthétique seul que pour l'effluent synthétique contenant de l'AMX. L'écart observé pour les temps de dégradation du substrat seul est de l'ordre de 37.8%, mais cela est considéré comme négligeable en comparaison de la variation constatée dans le temps de dégradation du substrat contenant de l'AMX, qui est de 85%. On note une diminution significative, notamment pour les doses de 25 $\mu\text{g/mL}$ et 30 $\mu\text{g/mL}$. Ainsi, l'inhibition de l'activité microbienne par un effluent contenant de l'AMX entraîne une réduction des taux de consommation d'oxygène avec des impacts directs sur les temps de dégradation.

Soulignant que la boue CAS utilisée dans les tests en cours est une boue partiellement foisonnée caractérisée par la présence de floccs microbiens ouverts et un indice de filament atteignant 4, *Figure III.10*, présentant ainsi une morphologie favorisant l'infiltration de l'inhibiteur dans le floc, entraînant une inhibition plus marquée. De plus, la présence de filaments offre une surface d'échange accrue, ce qui renforce l'inhibition. Cela explique les niveaux d'inhibition atteints même si la relation entre la dose et l'inhibition n'est pas claire.

D'autres paramètres, *Figure V.12*, ont été analysés afin de suivre la consommation de la charge carbonée et azotée, durant les différents états d'endogène observé dans les respirogrammes et pour les différentes doses d'AMX.



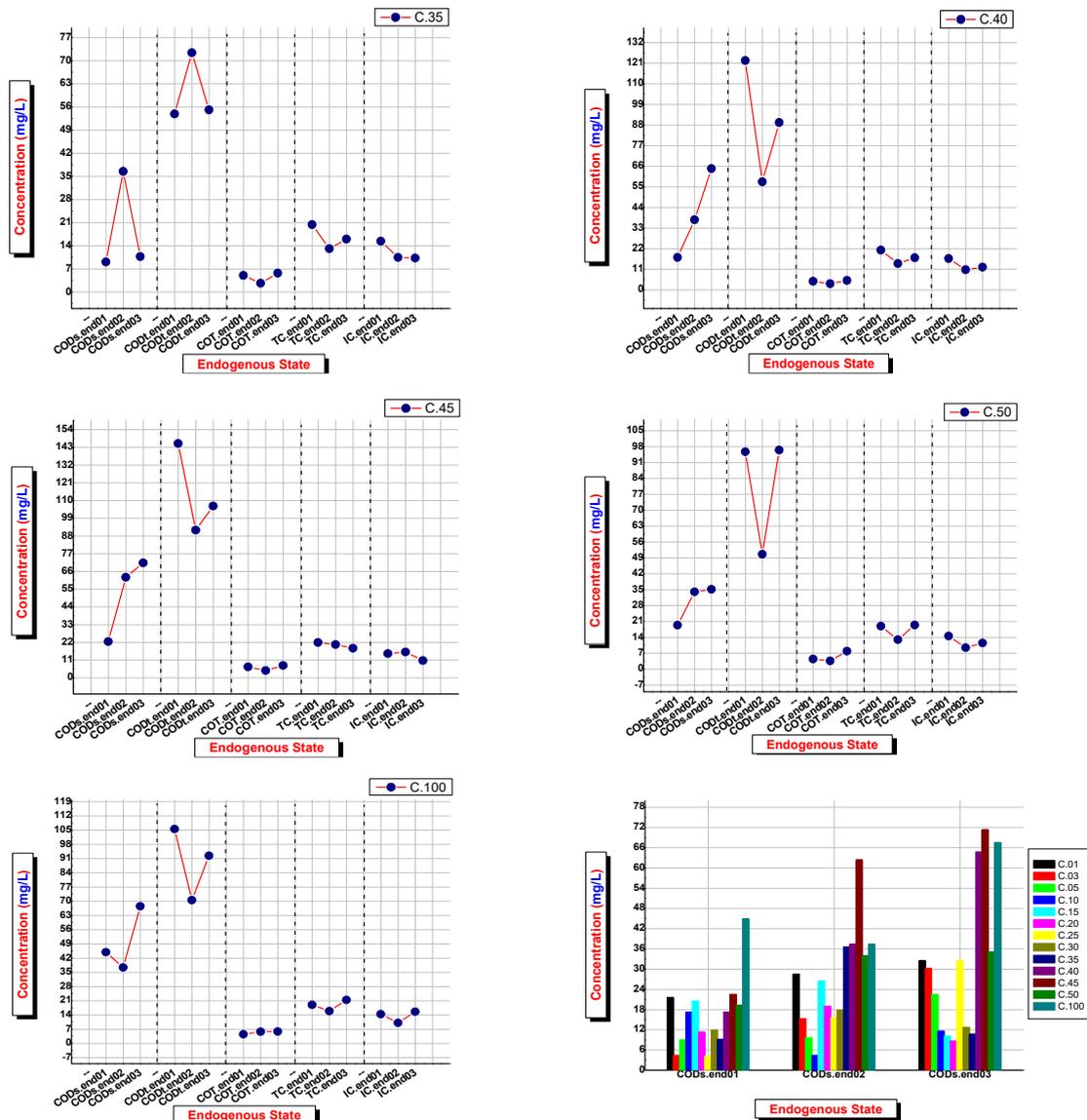


Figure V.12 : Evolution de la DCOs, DCOt, COT, TC et IC de différentes concentrations d'Amoxicilline injecté en fonction des différents états endogènes.

Les pourcentages de l'évolution de ces paramètres en fonction des concentrations en AMX injecté, ont été présentés dans le *Tableau V.08*.

Le *Tableau V.08*, présente les pourcentages d'augmentation, indiqués par le signe positif (+), et les pourcentages de réduction, indiqués par le signe (-), des différents paramètres tels que DCOs, DCOt, COT, TC et IC. Ces pourcentages sont calculés entre l'état endogène initial avant l'injection d'un effluent contenant de l'AMX et l'état endogène final après le retour à l'état endogène, suivi de l'injection de l'effluent contenant de l'AMX.

Selon ces résultats, aucune corrélation n'est observée entre l'inhibition par l'AMX et la consommation du substrat carboné résiduel. Par exemple, les doses de 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ et 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$, présentant des pourcentages d'inhibition élevés de 83.2% et 74.6% respectivement,

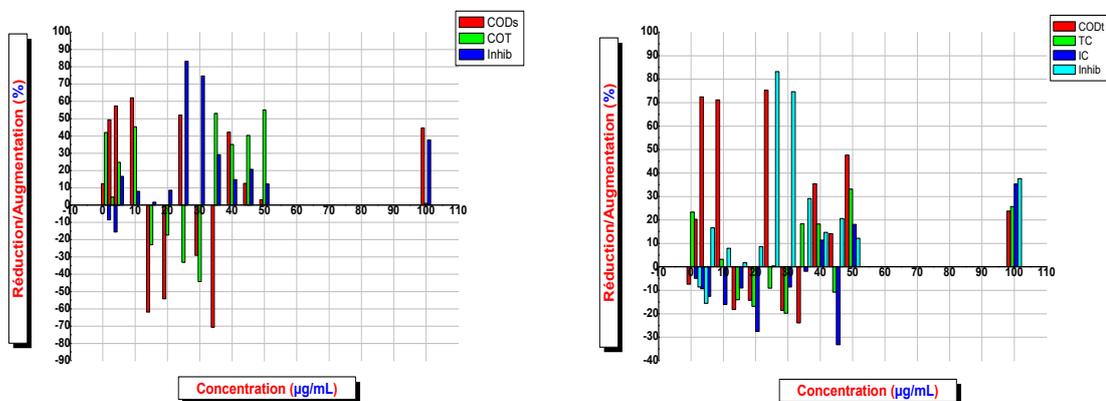
montrent une augmentation de 52% en *DCOs* et de 75.3% en *DCOt* pour la dose de 25 $\mu\text{g/mL}$. En revanche, la dose de 30 $\mu\text{g/mL}$ montre une diminution de 29% en *DCOs* et de 18.6% en *DCOt*, représentant des réductions plus modestes.

Tableau V.08 : Les pourcentages de réduction (signe -) ou d'augmentation (signe +) de la *DCOs*, *DCOt*, *COT*, *TC* et *IC*, par rapport au pourcentage d'inhibition I% pour les différentes concentrations en *AMX* injectées.

Concentration ($\mu\text{g/mL}$)	<i>DCOs</i> (%)	<i>DCOt</i> (%)	<i>COT</i> (%)	<i>TC</i> (%)	<i>IC</i> (%)	<i>I</i> (%)
1	12.31	-7.37	41.93	23.34	-4.91	-8.6
3	49.34	20.25	4.57	-4.47	-9.31	-15.6
5	57.33	72.45	24.69	-3.6	-12.6	16.6
10	62.07	71.16	45.27	3.16	-16.02	7.9
15	-61.89	-18.16	-22.95	-14.07	-9,04	1.7
20	-54.21	-14.32	-17.36	-16.89	-27.52	8.6
25	52	75.28	-33.17	-9.13	0.36	83.2
30	-29.05	-18.57	-44.26	-19.8	-8,6	74.6
35	-70.68	-23.89	52.98	18.3	-1.91	29.1
40	42.19	35.39	34.99	18.27	11.32	14.7
45	12.48	14.07	40.34	-10.81	-33.23	20.6
50	3.13	47.56	55.05	33.14	18.05	12.2
100	44.59	23.7	1.03	25.7	35.26	37.6

Cela est dû à l'effet de l'inhibition sur la cellule microbienne, où une inhibition peut entraîner une réduction de toutes les activités microbiennes, qu'elles soient endogènes ou exogènes, sans toutefois atteindre la lyse. D'autre part, une inhibition plus prononcée peut conduire à la lyse cellulaire, entraînant ainsi le relargage des constituants cellulaires et une augmentation des concentrations après le retour à l'état endogène, ou encore, ce dernier peut afficher d'autres seuils en raison de ces effets locaux.

Les pourcentages d'évolution de ces paramètres en fonction des concentrations d'*AMX* injectées sont présentés dans la *Figure V.13*.



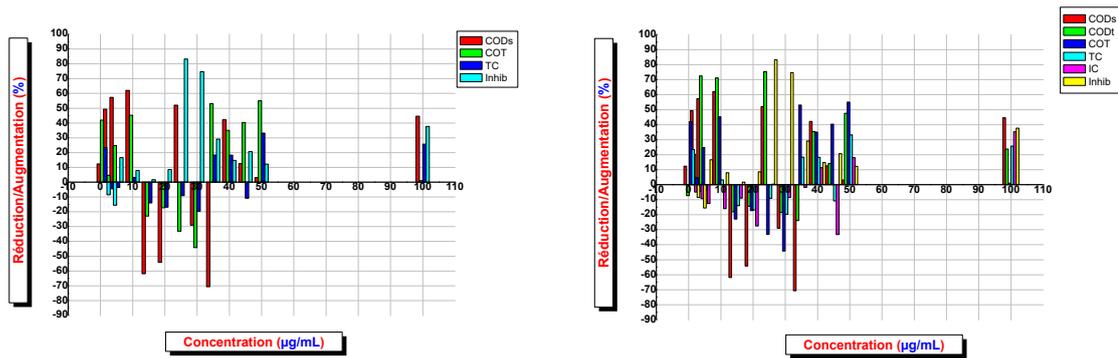


Figure V.13 : Pourcentages de réduction ou d'augmentation de : DCOs, DCOt, COT, TC et IC, par rapport au pourcentage d'inhibition en fonction des différentes concentrations en AMX injectées.

5.2. Effet inhibiteur d'AMX injecté en forme poudre sur l'activité microbienne

Dans cette section, l'AMX est utilisée sous forme de poudre afin d'évaluer son effet inhibiteur sur l'activité des microorganismes non adaptés, tout en maintenant les mêmes conditions opératoires précédemment établies. Cette poudre a été injectée entre les deux phases d'injection du substrat synthétique sans AMX, après avoir atteint l'état endogène, avec un temps de contact variant de 40 à 90 min avant la seconde injection. La masse de poudre d'AMX a été ajustée de 1 à 30 mg dans un volume réactionnel total de 0.4 L. L'AMX, comme d'autres β -lactamines, agit en tant qu'inhibiteur de la synthèse du peptidoglycane, un composant essentiel de la paroi bactérienne. Ces antibiotiques se fixent sur les protéines de liaison des pénicillines (PLP) présentes à la surface de la membrane cytoplasmique des microorganismes, inhibant ainsi l'activité enzymatique des PLP nécessaires à l'assemblage du peptidoglycane. La fixation d'AMX aux PLP entraîne l'arrêt de la synthèse pariétale, inhibant ainsi la croissance bactérienne. La fragilisation de la paroi et l'action d'auto-lysines conduisent ensuite à une lyse, expliquant l'activité bactéricide de cet antibiotique [01]. Ces processus peuvent prendre du temps, et la demi-vie d'AMX est variable, avec une faible métabolisation (acide pénicilloïque) et une moyenne d'une heure [02-05]. Les tests de solubilité d'AMX montrent sa solubilité dans l'eau après un temps de contact plus de 35 min.

La *Figure V.14*, illustre un exemple de respirogramme obtenu lors des tests d'inhibition par l'AMX injecté sous forme de poudre, intervenant entre les deux injections d'un effluent synthétique non altéré, présentant la même concentration. Un temps de contact entre la poudre d'AMX et les boues activées a été appliqué, variant de 90 à 120 minutes avant la deuxième injection. Les points (A-B) marquent la phase d'arrêt/reprise d'aération, l'effluent synthétique a été injecté aux points (C) et (E), et le point (D) correspond à l'injection de l'AMX sous forme de poudre.

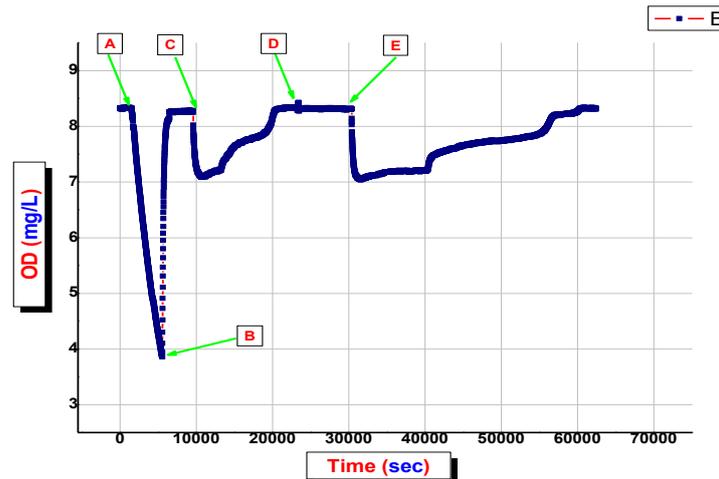


Figure V.14 : Exemple d'un respirogramme obtenue lors des tests d'inhibition en injectant l'AMX poudre (13 mg d'AMX équivalent de 48µg/mL).

L'utilisation de l'AMX sous forme de poudre entraîne une augmentation significative des taux de consommation d'oxygène et des temps de dégradation pour la deuxième injection. Contrairement au cas de l'injection d'AMX avec l'effluent synthétique, où la molécule a été bien solubilisée avant l'injection, dans ce scénario, l'AMX s'est fixé sur certaines protéines de liaison des pénicillines (PLP) lors de sa solubilisation dans la liqueur mixte, avant la deuxième injection de l'effluent.

Pendant ce temps de contact, l'AMX agit en tant qu'inhibiteur de l'activité enzymatique des PLP, inhibant ainsi l'activité microbienne. Ces phénomènes se manifestent par une augmentation du temps de dégradation et, par conséquent, de la quantité d'oxygène consommée. Cette situation diffère du cas d'acclimatation des boues, où une activité microbienne accrue est observée, indiquant ici une décélération microbienne.

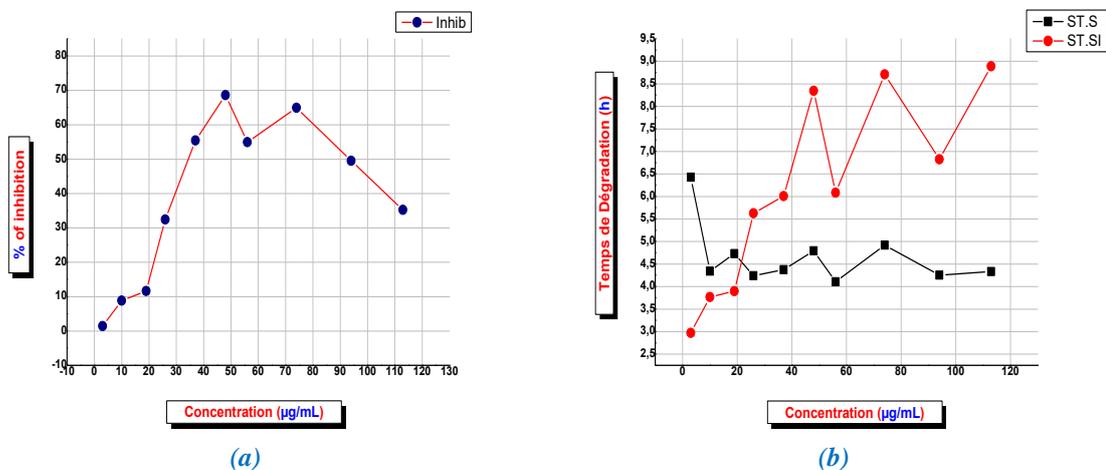
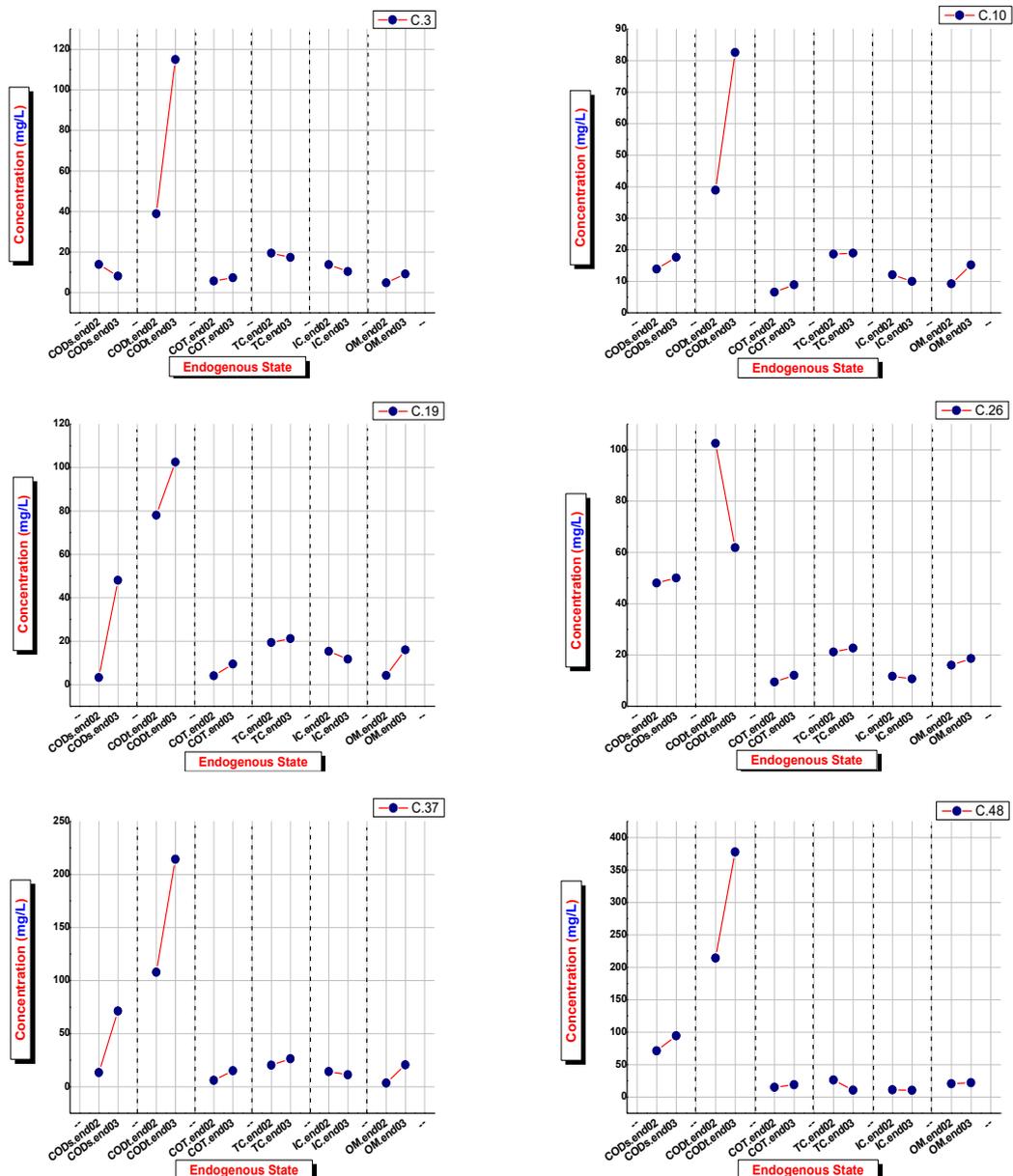


Figure V.15 : Evolution en fonction de la concentration d'AMX injecté du : (a) pourcentage d'inhibition et (b) le temps de dégradation.

La *Figure V.15*, présente l'évolution du pourcentage d'inhibition (a) et (b) les temps de dégradation de l'effluent synthétique lors des deux injections en fonction de la concentration en AMX appliquée. Selon les *Figures V.15-a* et *V.15-b*, l'évolution du pourcentage d'inhibition et du temps de dégradation est proportionnelle aux doses d'AMX injecté jusqu'à la dose de $48 \mu\text{g/mL}$, où l'inhibition atteint environ 68.6%. Ensuite, le pourcentage et le temps de dégradation diminuent avec une simple augmentation de la concentration à la valeur de $74 \mu\text{g/mL}$, suivie de fluctuations entre augmentation et diminution pour le temps de dégradation. On peut conclure que, pour les fortes concentrations d'AMX sous forme de poudre, la solubilisation dans la liqueur mixte est limitée. Ainsi, dans ces cas, l'AMX est probablement biosorbé dans les flocs bactériens avant d'être complètement solubilisé, ce qui entraîne son effet inhibiteur sur la biomasse microbienne.



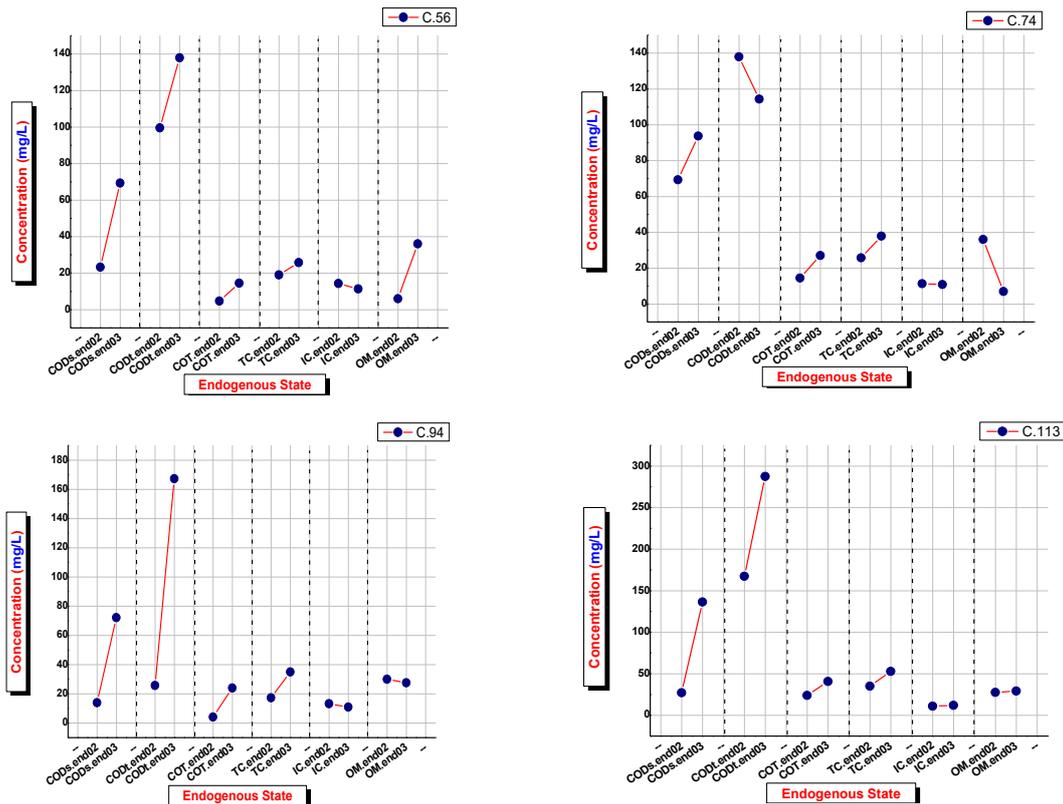


Figure V.16: Evolution de DCOs, DCOt, COT, TC, IC et la MO de différentes concentrations d'Amoxicilline injecté sous forme de poudre en fonction des deux états endogènes.

La *Figure V.16*, présente l'évolution de certains paramètres mesurés à l'état endogène avant l'injection de l'AMX sous forme de poudre et du substrat synthétique (noté end.02), ainsi qu'après l'injection d'AMX et de l'effluent, atteignant de nouveau l'état endogène (noté end.03). Peu importe la dose appliquée, les concentrations en DCO soluble (DCOs) et en Carbone Organique Total (COT) ont toujours augmenté à l'état endogène final par rapport à l'état endogène initial, de même que les concentrations en Carbone Total (TC) et en Matières Organiques (MO), à l'exception des doses de $48 \mu\text{g/mL}$ pour TC et des doses de $74 \mu\text{g/mL}$ et $94 \mu\text{g/mL}$ pour les MO, où de légères diminutions ont été observées. Cette augmentation de la charge carbonée est attribuable à l'accumulation potentielle des apports en carbone provenant du substrat binaire contenant la source de carbone et d'azote, ainsi qu'à l'effet de l'AMX qui entrave leur dégradation. Malgré la dégradation ou la consommation de certaines concentrations de charges polluantes, cela se produit avec une activité bactérienne réduite, se manifestant par une augmentation du temps de dégradation et une forte quantité d'oxygène consommée. Ainsi, dans les deux cas d'inhibition par l'AMX, cette molécule entraîne des variations dans les taux de consommation d'oxygène, principalement limitant la dépollution de la charge polluante avec des pourcentages différents selon le comportement de la boue activée et/ou le mode d'action de l'AMX sur la biomasse microbienne.

Tableau V.09 : Les pourcentages de réduction (signe -) ou d'augmentation (signe +) de la DCOs, DCOt, COT, TC, IC et MO, par rapport au pourcentage d'inhibition I% des différentes concentrations en AMX injectées sous forme de poudre.

Concentration (µg/mL)	CO _D s(%)	CO _D t(%)	CO _T (%)	TC(%)	IC(%)	OM(%)	I (%)
3	-41.46	66.17	22.07	-10.94	-24.47	47.83	1.4
10	21.25	52.9	26.71	1.59	-17.22	39.47	8.8
19	93.34	23.86	57.19	8.23	-23.92	73.75	11.6
26	4.02	-39.67	21.62	6.87	-8.57	13.98	32.4
37	81.36	49.71	59.99	22.64	-21.4	83.49	55.4
48	24.37	43.26	21.33	-59.6	-8.81	6.36	68.6
56	66.38	27.85	67.27	26.36	-20.63	83.33	54.9
74	26.04	-17.11	46.58	31.93	-4.4	-80.56	64.9
94	80.72	84.63	83	50.57	-17.05	-8	49.5
113	80.13	41.8	41.03	33.65	9.13	5.48	35.2

La *Figure V.17*, illustre graphiquement, sous forme d'histogramme, les pourcentages d'augmentation et/ou de diminution des DCO soluble (DCOs), du Carbone Organique Total (DCOt), du Carbone Organique Total (COT), du Carbone Total (TC), de l'Indice de Carbone (IC) et de la Matière Organique (MO), par rapport aux pourcentages d'inhibition obtenus en fonction des différentes doses d'AMX injectées sous forme de poudre.

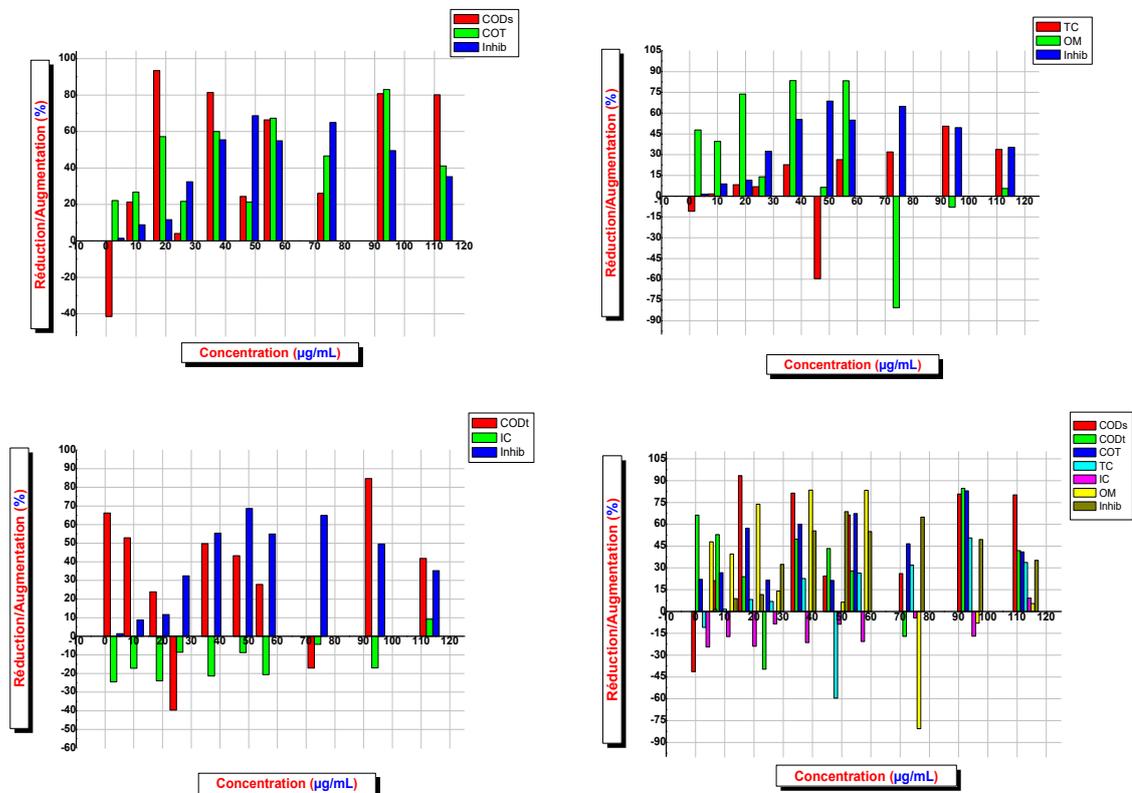


Figure V.17 : Evolution des pourcentages de réduction (signe -) ou d'augmentation (signe +) de DCOs, DCOt, COT, TC, IC et MO, par rapport au pourcentage d'inhibition I% en fonction des différentes concentrations en AMX injectées sous forme de poudre.

6. EFFET DE L'ACCLIMATATION SUR L'ACTIVITE DE LA BIOMASSE TOTALE ET DES HETEROTROPHES

L'objectif de cette partie de l'étude est de déterminer l'impact de l'acclimatation à une molécule inhibitrice sur la réponse respirométrique de la biomasse totale et des hétérotrophes, afin d'évaluer si l'acclimatation peut être considérée comme une méthode efficace pour éliminer ce type de micropolluants.

Peu d'informations sont disponibles sur l'effet de l'AMX sur la biomasse hétérotrophe des *STEP* des eaux usées, qui ne sont pas spécifiquement conçues pour dégrader ces substances. Dans cette section, des tests d'inhibition ont été réalisés en utilisant la technique respirométrique *LFS* sur la biomasse totale et sur la biomasse hétérotrophe en présence d'un inhibiteur de nitrification, afin d'évaluer l'influence de différentes concentrations d'AMX ajoutées au substrat sur la réponse microbienne. Des tests respirométriques, menés dans des conditions opératoires similaires, ont été effectués pendant les tests d'adaptation. Au cours de ces tests d'adaptation, la salinité de la liqueur mixte a augmenté en raison des substrats utilisés sous forme de sels. L'utilisation d'un effluent synthétique préparé dans de l'eau distillée, sans salinité, a entraîné une absence de variation dans les taux de consommation d'oxygène dans les respirogrammes, *Figure V.18-a* et *V.18-b*.

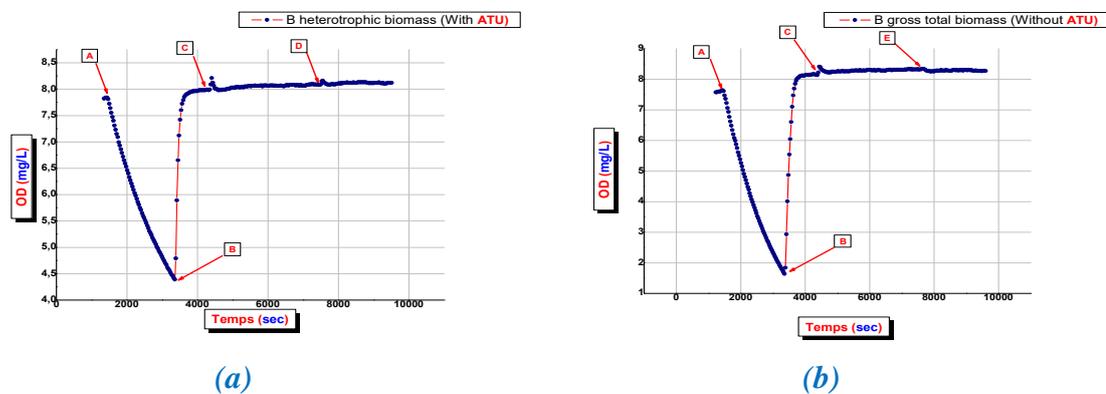


Fig. V.18 : Respirogrammes obtenus durant les tests d'inhibition avec les boues acclimatées (a) la biomasse totale (b) les hétérotrophes.

La *Figure V.18*, présente deux respirogrammes obtenus après l'utilisation de boues acclimatées sans ajustement de leur salinité et l'utilisation d'effluents synthétiques préparés dans de l'eau distillée. La phase de stop-reprise d'aération est indiquée entre les points (A et B) dans les deux respirogrammes. Le point (C) correspond à l'injection du substrat seul, le point (D) à l'injection du substrat contenant l'AMX à une concentration de 20 mg/L sans l'inhibiteur de nitrification, et enfin, le point (E) correspond à l'injection d'effluent synthétique contenant l'inhibiteur de nitrification et l'AMX à une dose de 20 mg/L. Les boues activées ne montrent aucune réponse ni pour l'effluent seul ni pour les effluents contenant

les inhibiteurs. Cela est dû au fait que ces boues ont été adaptées pour être actives dans des milieux salins, et l'utilisation d'un effluent non salin provoque une dilution du milieu et donc stressent la biomasse, ce qui se traduit par l'absence de consommation. Pour surmonter cette problématique, deux techniques peuvent être mises en œuvre.

6.1. Première mise en œuvre

Deux types de boues activées sont utilisés dans cette partie d'étude : (AS1) boues prélevées du bioréacteur d'acclimatation au substrat binaire synthétique et (AS2) boues prélevées du bioréacteur d'acclimatation au substrat synthétique contenant de l'AMX.

La *Figure V.19* présente l'évolution temporelle de la salinité et de certains autres paramètres lors des processus d'adaptation des boues aux substrats binaires seuls et aux substrats contenant de l'AMX. Cette augmentation de la salinité observée est due à l'apport significatif de sel avec le substrat utilisé, malgré les corrections effectuées. Les concentrations élevées de substrat, parfois utilisé sous forme de poudre, ont un impact direct sur la salinité de la liqueur. Ainsi, la liqueur a été utilisée après ajustement de sa salinité sans altérer son activité. De même, l'effluent synthétique a été préparé dans des solutions présentant des salinités corrigées conformément à celles de la liqueur mixte. Les corrections de la salinité de la liqueur mixte pour les deux réacteurs d'adaptation ont été réalisées par des processus de lavage, suivis d'aération. Le surnageant obtenu après environ 02 hs de décantation a été remplacé par de l'eau distillée et a également été récupéré pour être utilisé, après quelques dilutions, dans la préparation d'effluents synthétiques, *Tableau V.10*.

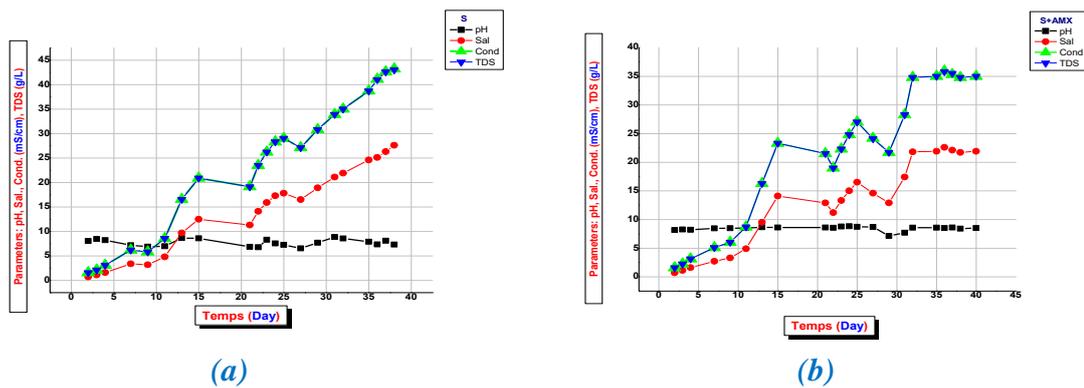


Figure V.19 : Evolution de la salinité, pH, conductivité et TDS en fonction de temps pour le réacteur (a) d'adaptation au substrat (b) d'adaptation au substrat et l'AMX.

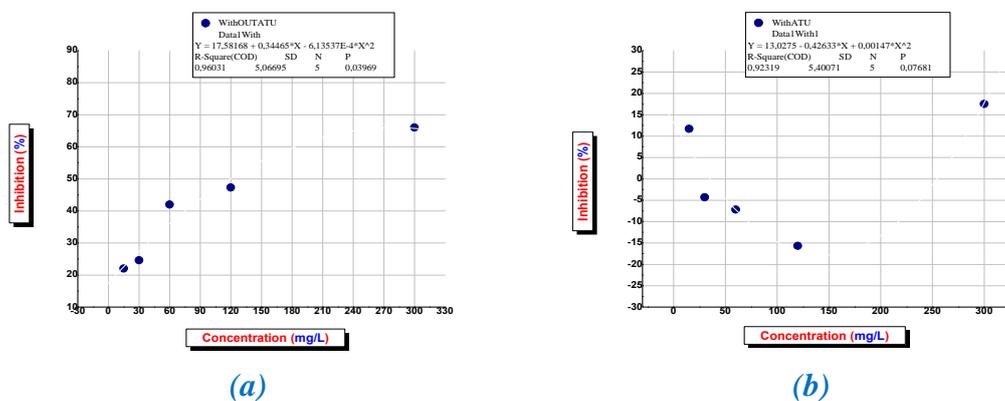
Lors des essais, il est probable qu'il y ait une influence sur la réponse en raison du niveau de salinité de la boue ainsi que celui du substrat préparé dans le surnageant dilué afin d'atteindre le même niveau de salinité. Cela vise à éviter toute inhibition potentielle causée par ces fluctuations. Il convient de noter que le niveau de salinité de l'effluent synthétique n'a pas été strictement contrôlé et a fluctué entre 0.2 % et 5 %.

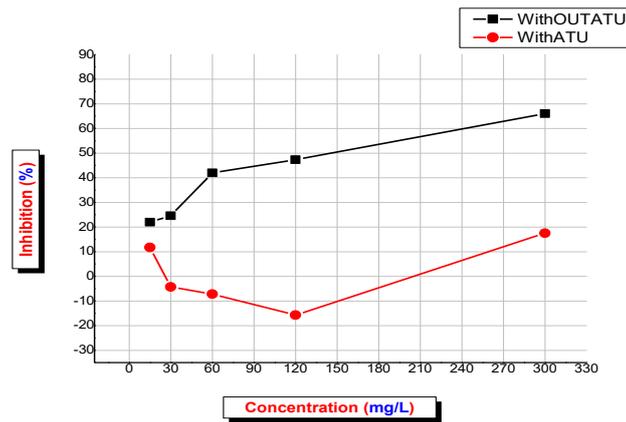
Tableau V.10: Résultats des tests de correction de la salinité de la liqueur mixte et l'effluent.

Paramètres	AS1			AS2			Surnageant	
	Etat initial	Après le 1 ^{er} lavage	Après le 2 ^{ème} lavage	Etat initial	Après le 1 ^{er} lavage	Après le 2 ^{ème} lavage	Etat initial	Après 5 fois de dilution
Température (°C)	20	21.2	20.6	20.6	21.6	21	19.4	21.9
Salinité (%)	24.8	8.4	4.9	19.65	4.5	1.2	19	0.2 - 4.8
TDS (ppm)	39.1	14.56	8.81	31.65	8.17	2.49	31.75	9.03
pH	7.47	7.99	8.53	8.84	8.9	8.5	7.73	7.355
Conductivité (µS/cm)	39	14.5	8.8	31.8	8.11	2.48	31.7	9.03
P-Redox (V)	-17.2	-43.6	-75	-94.4	-95.7	-74.1	-54.15	-47.2

➤ **Effet d'inhibition sur la boue AS1**

Au départ, l'impact de l'introduction de diverses doses d'AMX sur des boues adaptées au substrat a été étudié. Cette analyse a été menée en examinant les effets sur la biomasse totale et sur les hétérotrophes. Les résultats de ces études sont respectivement présentés dans les *Figures V.20* et *V.21*, qui prennent en compte deux niveaux de salinité du substrat synthétique introduit (0.3 et 5 %). La *Figure V.20* présente l'évolution des pourcentages d'inhibition en fonction des doses d'AMX appliquées sur la biomasse totale et sur les hétérotrophes acclimatées au substrat, avec un niveau de salinité de 0.3 %. Pour la biomasse totale, le pourcentage d'inhibition a dépassé les 60 %, tandis que pour les hétérotrophes, l'inhibition était très limitée, ne dépassant pas les 20 % même pour une concentration de 300 mg/l d'AMX. À certaines concentrations, aucune inhibition n'a été observée pour les hétérotrophes, se manifestant par des pourcentages négatifs. À ce stade, il est important de noter que les autotrophes ont montré des effets d'inhibition assez significatifs et proportionnels aux doses appliquées. Ainsi, l'adaptation des boues les rend plus actives, favorisant une élimination très efficace de l'AMX, même en l'absence d'une adaptation spécifique à ce micropolluant. Cette observation suggère également que les autotrophes sont plus sensibles aux effets de stress et d'inhibition par rapport aux hétérotrophes.

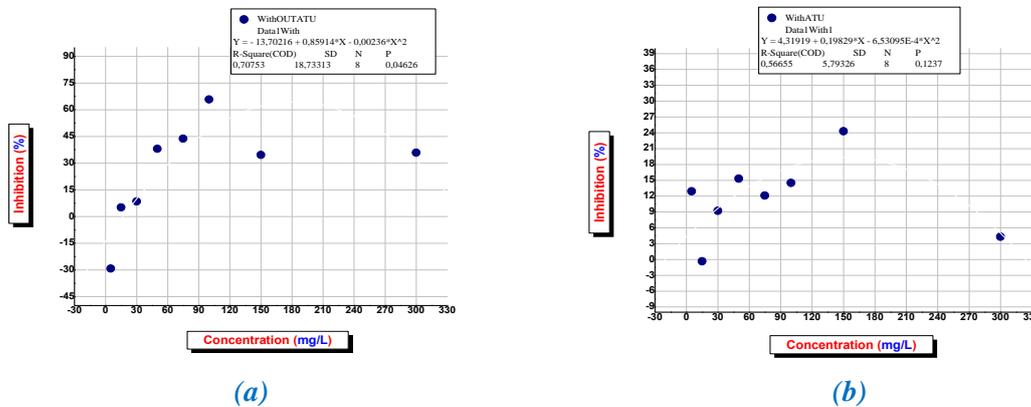




(c)

Figure V.20: Evolution des pourcentages d'inhibition des boues AS1 et une salinité de 0.3% de substrat introduit en fonction de la concentration d'AMX appliquée pour : (a) la biomasse totale (b) les hétérotrophes (c) les deux effets.

Dans cet essai, la salinité du substrat introduit est de 5 %. Les mêmes tests ont été répétés en tenant compte des concentrations d'AMX et de leur impact sur la biomasse totale ainsi que sur les hétérotrophes. Les résultats présentés dans la *Figure V.21* confirment les observations précédentes, mettant en évidence la sensibilité accrue des autotrophes à l'AMX par rapport aux hétérotrophes. Cependant, on note une augmentation significative du niveau d'inhibition, principalement pour les hétérotrophes, avec une salinité de 5 %.



(a)

(b)

Figure V.21: Evolution des pourcentages d'inhibition des boues AS1 et salinité 5% en fonction de concentration d'AMX appliquée pour : (a) biomasse totale (b) hétérotrophes.

➤ **Effet d'inhibition sur la boue AS2**

La *Figure V.22*, illustre la variation des pourcentages d'inhibition par l'AMX sur les boues AS2, à la fois pour les hétérotrophes seuls et pour la biomasse totale. Une observation importante est que l'AMX semble avoir un impact plus marqué sur les autotrophes que sur les hétérotrophes, comme en témoignent les pourcentages d'inhibition relativement faibles observés pour les hétérotrophes. En effet, l'effet le plus notable n'est que de 10%, constaté pour une dose de 75 mg/L, ce qui demeure insignifiant compte tenu de la concentration

élevée utilisée et des fluctuations potentielles observées lors des injections successives du même effluent, pouvant atteindre jusqu'à 12%. L'inhibition constatée en l'absence d'ATU est attribuée à l'inhibition des autotrophes. On peut conclure que l'absence d'inhibition est due à l'adaptation rapide des hétérotrophes, tandis que les autotrophes ne présentent aucune résistance et ne s'adaptent pas. L'adaptation peut être préliminairement considérée comme une méthode d'élimination potentielle de ce micropolluant avec l'aide des hétérotrophes.

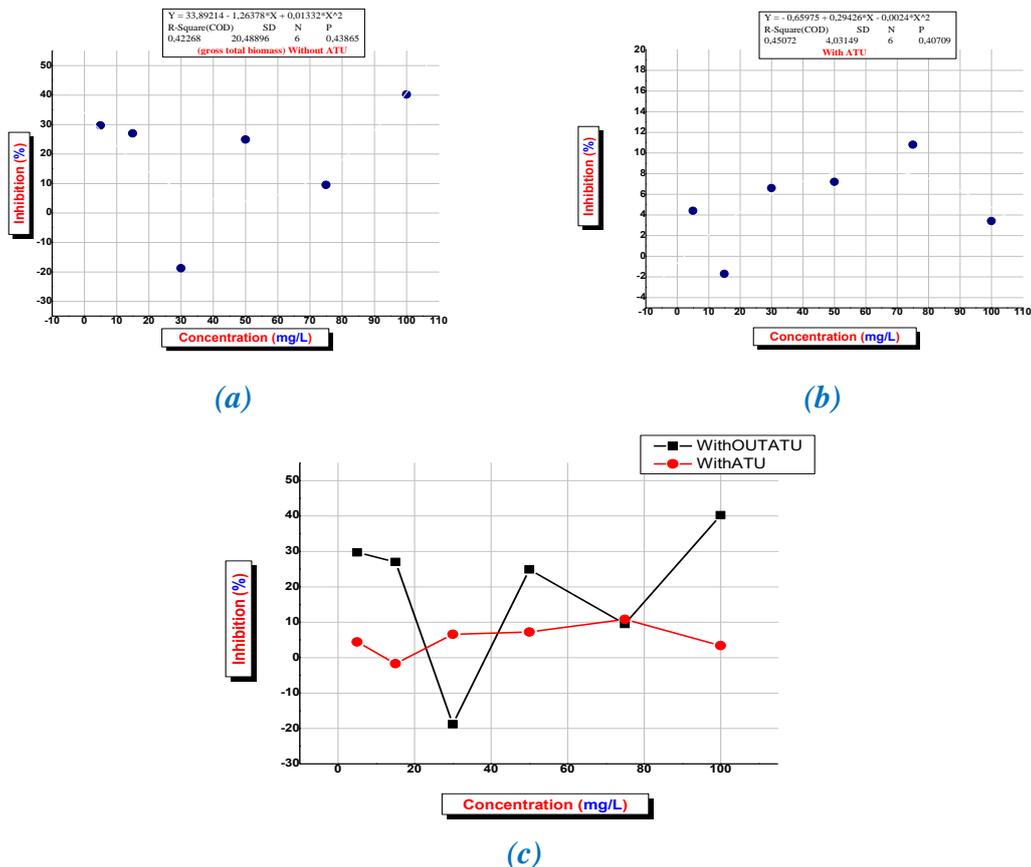


Figure V.22 : Evolution des pourcentages d'inhibition des boues AS2 en fonction de la concentration d'AMX appliquée pour : (a) biomasse totale (b) hétérotrophes (c) les deux.

6.2. Deuxième mise en œuvre

Pour atténuer l'effet de l'augmentation de la salinité, des expériences ont été menées en effectuant un lavage poussé des boues récupérées des différents réacteurs, et en introduisant le substrat préparé dans l'eau distillée et non dans le surnageant. Trois types de boues activées : (AS1) boues activées brutes du bassin biologique d'une STEP classique (CAS), (AS2) boues prélevées du bioréacteur d'acclimatation au substrat binaire synthétique et (AS3) boues prélevées du bioréacteur d'acclimatation au substrat synthétique contenant de l'AMX ont été utilisés. Les caractéristiques des boues activées utilisées dans cette partie sont présentées dans le *Tableau V.11*. Les expériences menées dans cette section seront menées

en prenant en compte l'état morphologique de la biomasse et en évaluant son impact sur les taux de dégradation des microorganismes hétérotrophes.

Tableau V.11 : Les principales caractéristiques des inocula utilisés dans l'inhibition des hétérotrophes.

	pH	Salinité (%)	Conductivité ($\mu S.cm^{-1}$)	DO (mg.L ⁻¹)	Tem (°C)	Taux de Mineralisation (%)	Adaptation au substrat	Adaptation à l'AMX
AS1	7.41 ± 0.10	0.65 ± 0.05	1408.5 ± 55.5	4.22 ± 0.09	-	41-45	(-)	(-)
AS2	6.89-8.84	0.7-27.6	1569-43200	3.04-8.20	13.1-22.6	30-39	(+)	(-)
AS3	7.13-8.80	0.7-22.6	1567-35900	0.11-8.07	13.6-23.7	36-40	(+)	(+)

Il est important de remarquer que l'état d'agrégation des floccs varie considérablement entre les trois types de boues. La tendance à la compaction de la boue varie en fonction de son adaptation au substrat et à l'AMX. Cette différence d'état aura probablement un impact direct sur la réaction des boues face à l'inhibiteur, *Figure V.23*.

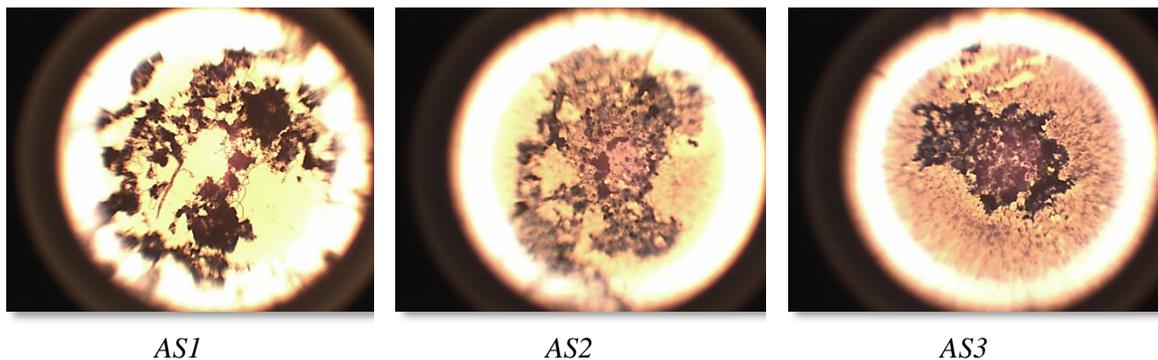


Fig. V.23: Visualisations microscopiques des boues activées utilisées

Une augmentation de la salinité a été observée dans les deux bioréacteurs d'adaptation causée surtout par la nature du substrat carboné synthétique utilisé. L'adaptation a été réalisée progressivement avec un pas de temps variant entre 5 et 8 jours et des concentrations croissantes de substrat et d'AMX atteignant respectivement 11 et 1.5 g/L, *Figure V.24*.

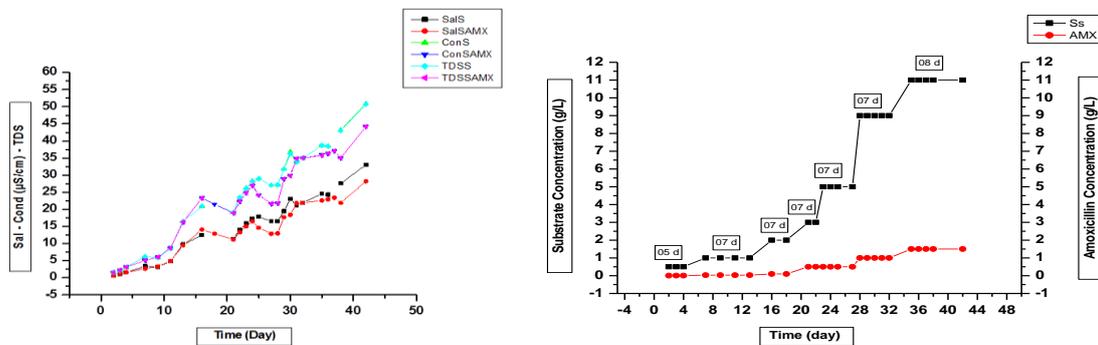


Figure V.24 : Evolution de la salinité et le programme d'acclimation dans les bioréacteurs d'adaptation.

L'effet de l'AMX sur l'activité des hétérotrophes en conditions aérobies a été principalement évalué en estimant le taux de conversion des hétérotrophes notée (Y_H). Il convient de rappeler que, dans les cultures discontinues, de manière similaire aux cultures continues, une partie du substrat (S) était convertie en nouvelles cellules (X) caractérisées par la fraction Y_H , tandis qu'une partie était oxydée pour fournir l'énergie caractérisée par la fraction ($1 - Y_H$) notée $Y_{O/S}$ [228]. Y_H a été déterminé à l'aide de l'équation suivante :

$$Y_H = 1 - Y_{O/S} = 1 - \frac{Q_{TH}}{\Delta S_S} \quad (V.09)$$

Q_{TH} : La quantité de d'oxygène consommée par les hétérotrophes (calculée par l'intégration du profil de taux de respiration)

ΔS_S : La quantité de substrat carboné éliminée, exprimée en DCO

La respiration endogène pour $AS1$ variait entre 3.166 et $11.741 \text{ mg L}^{-1} \text{ h}^{-1}$, dépendant principalement de l'état d'activité de l'inoculum $AS1$, qui était principalement conditionné par le fonctionnement de la $STEP$ locale, mais était en moyenne égale à 4.659 et $16.80 \text{ mg L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ pour les inocula $AS2$ et $AS3$ respectivement. Cela influençait le transfert d'oxygène dans la phase liquide, qui était contrôlé comme mentionné précédemment par les conditions opératoires fixées dans les tests respirométriques et l'activité microbienne des inocula.

L'introduction de l'effet de l'AMX sur l'activité microbienne pouvait se manifester sous différents aspects, soit en ralentissant l'activité microbienne et augmentant ainsi le temps recommandé pour la dégradation du substrat exogène injecté dans le réacteur de respirométrie (T_s), soit par un arrêt de l'activité de certains microorganismes, réduisant la respiration maximale des hétérotrophes exogènes, ou par des effets simultanés et par conséquent, une réduction significative synchronisée du temps et de la respiration maximale serait enregistrée. Une multitude d'expériences a été réalisée, en ajoutant différentes quantités d'AMX et la même concentration de substrat préparé dans l'eau distillée.

Néanmoins, les inocula $AS2$ et $AS3$ ont été soigneusement lavés avant de réaliser les tests respirométriques, non seulement pour atteindre l'état endogène, mais aussi afin de réduire la salinité du milieu réactionnel causée par l'utilisation du substrat sous forme de sel. Les effets inhibiteurs d'AMX sur l'activité des trois boues activées sont résumés dans **Tableau V.12**. Les paramètres, définis à l'aide d'un respiromètre, ont été utilisés pour obtenir des informations sur les effets sur deux des processus biochimiques les plus importants qui se produisent dans une station d'épuration des eaux usées, la croissance de la biomasse hétérotrophe (Y_H) et la consommation du substrat énergétique par les hétérotrophes ($Y_{O/S}$).

Comme on peut le constater, la fraction du substrat utilisée pour la consommation d'énergie était très disparate pour les différents types d'inocula, elle était moins faible pour

l'inoculum *AS1* et *AS2* et plus significative pour l'inoculum *AS3*. L'effet de l'introduction d'*AMX* sur ces différents types de biomasse n'était pas très régulier, *Tableau V.13*.

Tableau V.12 : Les pourcentages d'inhibition par rapport à l'OD consommée par les hétérotrophes pour le substrat injecté.

Dose ($mg_{AMX} \cdot L^{-1}$)	I%								
	5	15	30	50	60	75	100	120	150
<i>AS1</i>	2.167	-	-	17.467	-	30.646	0.775	-	-
<i>AS2</i>	-	-8.339	-0.764	-	12.380	-	-	21.746	-
<i>AS3</i>	18.03 9	16.017	9.229	-5.093	-	-1.362	15.244	-	19.934

Tableau V.13 : $Y_{O/S}$ estimés avant et après différentes doses d'*AMX* injectées.

Dose ($mg \cdot L^{-1}$)		5	15	30	50	60	75	100	120	150
<i>AS1</i>	$Y_{O/S}$	0.181	0.190	0.167	1.164	-	1.126	0.996	-	-
	$Y'_{O/S}$	0.177	0.211	0.199	0.960	-	0.781	0.988	-	-
<i>AS2</i>	$Y_{O/S}$	-	0.272	0.295	-	0.267	-	-	0.234	-
	$Y'_{O/S}$	-	0.295	0.297	-	0.233	-	-	0.183	-
<i>AS3</i>	$Y_{O/S}$	1.225	0.861	0.975	1.223	-	1.077	0.842	-	1.044
	$Y'_{O/S}$	1.004	0.723	0.885	1.286	-	1.091	0.714	-	0.836

Les réductions maximales du taux $Y_{O/S}$ exprimant la fraction du substrat utilisée pour la consommation d'énergie étaient de 30.639, 21.794 et 19.923% pour les doses de 75, 120 et 150 mg/L d'*AMX* et les boues *AS1*, *AS2* et *AS3* respectivement. L'effet de l'introduction de l'*AMX* semblait parfois ralentir les activités microbiennes, car le temps pour la dégradation du substrat injecté augmentait sans atténuation de la respiration maximale dans certaines expériences, et parfois réduire l'activité, car la respiration maximale exogène et le temps de dégradation diminuaient significativement, atteignant 29.883, 36.844 et 25.243% pour les doses : 75, 120 et 100 $mg \cdot L^{-1}$ d'*AMX* et les inocula *AS1*, *AS2* et *AS3*, respectivement.

D'après la *Figure V.25*, qui montre les pourcentages d'inhibitions de (a) les hétérotrophes pour les trois boues activées et (b) pour la totalité de la biomasse épuratrice ; les hétérotrophes adaptées au substrat et au substrat contenant l'*AMX* présentent une résistance remarquable même à une concentration allant jusqu'à 150 mg_{AMX}/L et qui ne dépasse pas 20% d'inhibition, les hétérotrophes non acclimatées ont été inhibés à 35% pour les 75 mg_{AMX}/L , ce qui montre que les hétérotrophes sont moins sensibles à l'inhibition et ont une capacité d'adaptation rapide, puisque la liqueur mixte, qui contient les hétérotrophes et les autotrophes est plus sensibles et moins adaptable.

Les autotrophes présents dans la liqueur mixte n'ont montré aucune inhibition à 40 $mg_{AMX} \cdot L^{-1}$, tandis qu'une inhibition de 35 % à 25 $mg_{AMX} \cdot L^{-1}$ a été observée, et ce pourcentage a été trouvé pour les hétérotrophes non adaptés à 75 $mg_{AMX} \cdot L^{-1}$. En général, l'effet de l'*AMX* était vraiment inattendu, sans fonction logarithmique exprimant la cinétique d'inhibition. Les

hétérotrophes étaient plus résistants à l'inhibition et s'adaptent rapidement à leur élimination. Selon la littérature, il existe encore un vide sur l'effet de toxicité de l'AMX dans la biomasse nitrifiante. L'AMX peut présenter une toxicité chez les bactéries nitrifiantes à des concentrations allant de $0.75 \mu\text{g/L}$ et leur élimination par des processus biologiques est de l'ordre de 80% à partir d'une concentration de 100 ng/L dans le processus de boues activées. Une inhibition complète de la nitrification s'est produite à une concentration de 200 mg/L , montrant que les bactéries nitrifiantes étaient plus sensibles à l'AMX ou à de nombreux autres micropolluants (comme les métaux lourds) que les micro-organismes responsables de l'oxydation de la matière carbonée (hétérotrophes) [136].

Cela a montré une grande capacité d'acclimatation et une sensibilité moindre à différentes inhibitions [137-139] et est connu pour régir l'élimination de la DCO et est également suggéré pour l'élimination des produits pharmaceutiques et de l'AMX en présence d'un grand nombre de biomasse hétérotrophe active [140]. Cependant, d'autres recherches [141] ont montré que l'ajout d'AMX n'affectait pas l'efficacité d'élimination de la DCO et du DOC (carbone organique dissous) et n'inhibait pas le métabolisme des hétérotrophes à certaines doses.

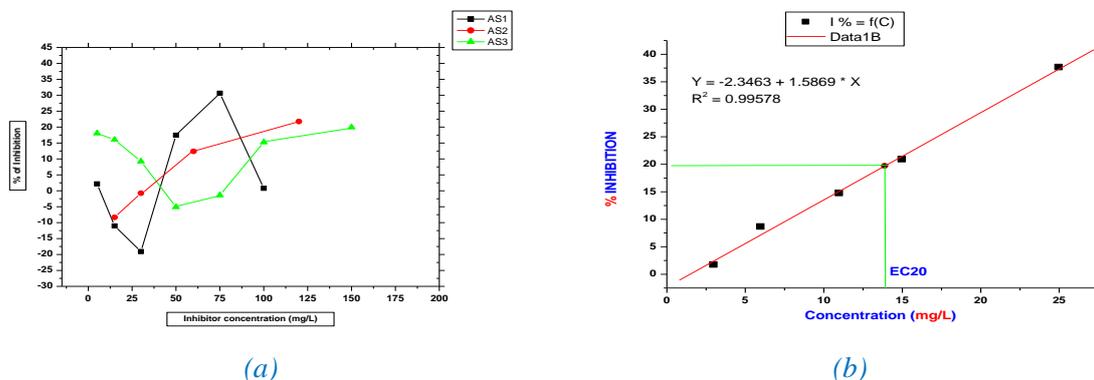


Figure V.25 : Pourcentages d'inhibitions en fonction de concentration en inhibiteur pour (a) les différentes biomasses hétérotrophes (AS1, AS2, AS3) et (b) la totalité de biomasse.

Généralement l'effet de l'AMX est vraiment inattendu et n'a aucune fonction logarithmique avec la cinétique d'inhibition, les hétérotrophes sont plus résistants à l'inhibition et s'adaptent rapidement à leur élimination. La respirométrie, qui fournit des informations immédiates et directes, montre des taux d'inhibition des hétérotrophes assez différents et faibles, la réduction maximale du taux de $Y_{O/S}$ était de 30.6% pour la concentration en AMX de 75 mg/L et de 22% pour 120 mg/L et de 20% pour 150 mg/L , ce qui explique que les hétérotrophes adaptés au substrat et à l'AMX présente une résistance à

l'inhibition assez importante par rapport aux non adapté. Ce qui montre que la biomasse hétérotrophe est moins sensible à l'inhibition et possèdent un pouvoir d'adaptation rapide.

Il convient également de souligner l'importance de l'état morphologique des agrégats biologiques dans la réponse aux molécules inhibitrices. Comme mentionné précédemment, les trois boues activées ont présenté des états morphologiques distincts. La compaction des floccs au sein de ces agrégats biologiques empêche la pénétration des molécules inhibitrices, préservant ainsi l'activité microbienne à l'intérieur des agrégats. D'une part, cela explique la variation de l'effet inhibiteur observé entre les trois boues activées, et d'autre part, la disparité dans l'impact des inhibiteurs sur les activités microbiennes.

CONCLUSION :

Les évaluations de l'inhibition des boues activées révèlent des résultats significatifs et très distincts entre une inhibition avec l'*AMX* liquide et sous forme de poudre, ainsi qu'entre la sensibilité des autotrophes par rapport aux hétérotrophes. À la lumière de ces résultats, on peut conclure que la molécule d'amoxicilline peut être considérée comme une molécule très singulière, son mode d'action dépendant de son état dans le milieu et surtout du comportement des boues activées et sa présentation morphologique. Les autotrophes et leur concentration dans les boues prélevées de la Station d'épuration par rapport aux hétérotrophes sont les principaux facteurs provoquant des fluctuations dans les pourcentages d'inhibition. Leur réaction à la présence de l'*AMX* dans le milieu est imprévisible.

En revanche, les hétérotrophes présentent des effets plus clairs, que les boues aient été adaptées ou non. Même s'il y a des fluctuations dans les pourcentages, elles sont généralement liées à l'activité des autotrophes, ainsi qu'à l'inhibiteur de ces derniers, l'*ATU*, qui parfois ne remplit pas son rôle ou est présenté à des concentrations inefficaces pour entraîner une inhibition totale des autotrophes [228]. De plus, il est possible que ces microorganismes s'adaptent à ce type d'inhibiteur [228]. D'un point de vue global, l'*AMX* peut être considéré comme un inhibiteur de l'activité microbienne, provoquant un blocage de la consommation de la pollution apportée et réduisant l'activité respiratoire de transfert d'oxygène. Sa présence avec l'effluent domestique a un impact sérieux sur le fonctionnement et le comportement de la station d'épuration. Il est crucial de se poser une dernière question à ce stade de l'investigation : existe-t-il une possibilité de biodégradation de l'*AMX* par la biomasse épuratrice, ce qui pourrait expliquer la fluctuation des résultats d'inhibition ? Afin de répondre à cette interrogation, des tests de biodégradation de l'*AMX* seront effectués avant de procéder à la mise en œuvre du bioréacteur *MBRI*.

Chapitre **VI**

Après avoir compris le comportement de la biomasse épuratrice dans les réacteurs biologiques vis-à-vis de la molécule inhibitrice *AMX*, à l'aide de la respirométrie comme technique d'investigation, il a été nécessaire d'aborder le traitement des eaux usées contenant cette molécule. Ce chapitre présente la synthèse des résultats de l'étude expérimentale sur le traitement des eaux usées synthétiques contenant l'antibiotique *AMX* dans un bioréacteur à membrane d'ultrafiltration immergée, *MBRI*.

Ce dernier est constitué d'une membrane immergée dans un bassin biologique aérobie. Le chapitre examine les différentes réponses et le comportement de la biomasse pendant la durée de contact avec l'effluent contenant l'*AMX*, en fonction des conditions opératoires et des performances épuratoires du *MBRI*. Il explore également le potentiel du *MBRI* en tant que post-traitement, en utilisant la technologie d'ultrafiltration pour la rétention des molécules d'*AMX* et leur élimination, afin de permettre une réutilisation efficace de l'eau. Dans cette configuration, l'adaptation possible et/ou la biosorption de la molécule d'*AMX* par les flocs bactériens ont également été évaluées.

L'adaptation à une résistance à cette molécule peut entraîner le développement de souches bactériennes résistantes, avec des émissions potentielles dans l'environnement via les déchets solides des boues activées. Par conséquent, l'utilisation d'une barrière d'ultrafiltration (*UF*) ou de nano-filtration (*NF*) s'est avérée nécessaire pour retenir les flocs bactériens et les souches résistantes dans un même bassin. Ces éléments peuvent ensuite être traités dans d'autres conditions et moyens, notamment l'incinération.

Avant de commencer cette section d'étude, il était nécessaire d'explorer la biodégradation de l'*AMX*. À cette fin, une série d'expériences a été menée en suivant la biodégradation de l'*AMX* comme charge principale et en la comparant avec un substrat binaire de même charge.

1. MISE EN MARCHÉ DES TESTS EN BATCH

Dans cette section de l'étude, trois ensembles de réacteurs ont été installés, chacun comprenant deux réacteurs batch identiques aérés/mélangés d'un volume total de deux litres, avec un volume utile d'un litre.

Ces réacteurs ont été mis en place, *Figure VI.01* et *VI.02*, pour des tests évaluant la capacité des différents types de boues activées à dégrader les effluents synthétiques contenant de l'acétate de sodium ou de l'*AMX*. Les détails de ces réacteurs sont résumés dans le *Tableau VI.01*.

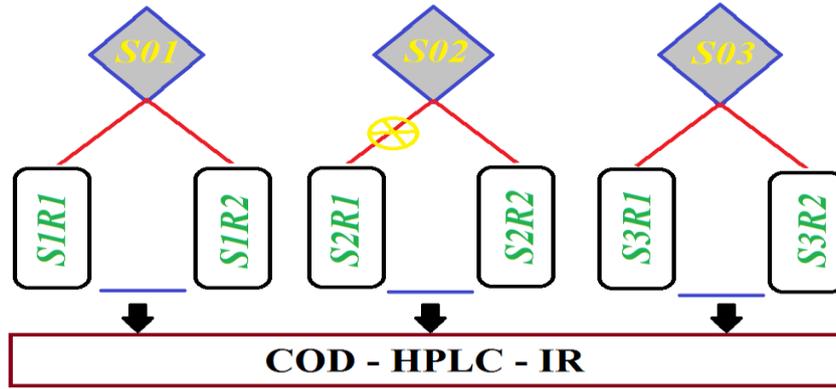


Figure VI.01 : Schéma descriptif des tests de biodégradation effectués.



Figure VI.02 : Photographie des montages utilisés pendant tests de biodégradation en batch.

Tableau VI.01 : Séries d'expériences pour évaluer la biodégradation d'AMX en mode batch

Séries d'expériences	Source de la biomasse	Réacteur batch	Substrat	Charge injectée	Le pas de suivie
S01	Les boues activées d'une STEP conventionnelle	S1R1	Substrat binaire (acétate de sodium et chlorure d'ammonium)	100 mg/L de DCO	15min
		S1R2	Amoxicilline tri-hydraté		
S02	Les boues activées d'une STEP conventionnelle acclimatées au substrat et à l'AMX	S2R1	Substrat binaire (acétate de sodium et chlorure d'ammonium		15min
		S2R2	Amoxicilline tri-hydraté		
S03	Les boues activées d'une STEP à membrane (MBR)	S3R1	Substrat binaire (acétate de sodium et chlorure d'ammonium		15min
		S3R2	Amoxicilline tri-hydraté		

Les diverses variétés de boues activées, utilisées dans ces essais de biodégradation avec un volume de 80 mL, ont été aérées pendant plus de 18 heures pour atteindre un état endogène avant leur utilisation. La fraction liquide récupérée à différentes étapes a été caractérisée après une filtration à 0,45 µm, en mesurant la DCO et en réalisant une analyse par HPLC. La fraction solide a été caractérisée par une analyse par IR.

1.1. Observation de la biodégradation dans la phase liquide

Les cinétiques de biodégradation du substrat et de l'AMX dans les différents réacteurs sont représentés dans les *Figures VI.03, VI.04 et VI.05*. En observant l'évolution temporelle de la dégradation du substrat et de l'AMX, il est constaté que l'AMX présente une cinétique de biodégradation spécifique lorsqu'elle est utilisée avec différentes biomasses. La vitesse de dégradation de l'AMX est inférieure à celle du substrat, comme observé lors de la comparaison entre les boues activées de la *STEP* conventionnelle et celles de la station d'épuration *MBR*. Cependant, il n'a pas été possible de comparer la biodégradation de l'AMX avec les boues activées de la *STEP* conventionnelle acclimatées au substrat et à l'AMX en raison de certaines contraintes expérimentales, *Figures VI.03, VI.04 et VI.05*. Dès l'introduction d'AMX dans les réacteurs, les différentes biomasses ont commencé à dégrader cet effluent à différentes vitesses, ces vitesses changent en fonction de la biomasse utilisée.

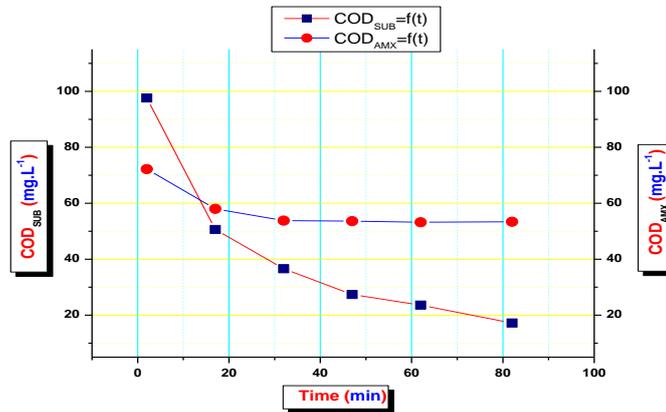


Figure VI.03 : La variation temporelle de la dégradation de la DCO de SUB et d'AMX dans les réacteurs SIR1 et SIR2.

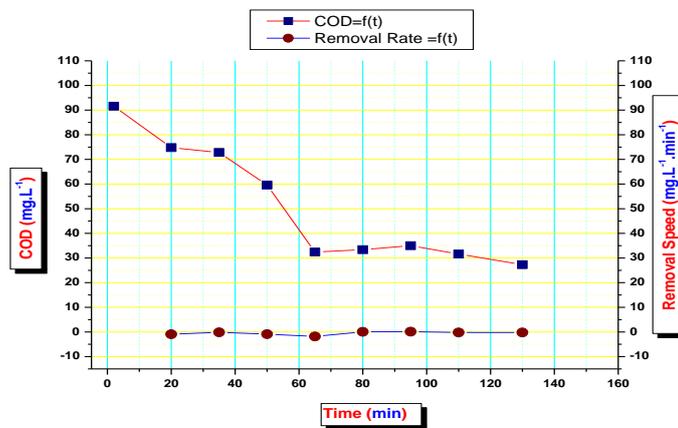


Figure VI.04 : La variation temporelle de la dégradation de la DCO d'AMX dans le réacteur S2R2 et la vitesse de dégradation d'AMX correspondante.

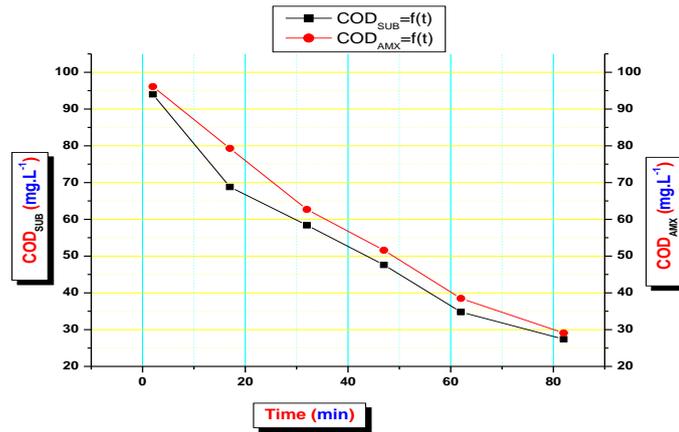


Figure VI.05 : La variation temporelle de la dégradation de la DCO de SUB et d'AMX dans les réacteurs S3R1 et S3R2.

Les résultats de ces expériences mettent en évidence deux conclusions principales : premièrement, la molécule d'AMX peut être biodégradée et entre en compétition avec la biodégradation du substrat lorsqu'ils seront introduits simultanément dans les réacteurs; deuxièmement, la vitesse de dégradation augmente et se rapproche de celle du substrat lors de l'acclimatation de la biomasse ou lors de l'utilisation de biomasses provenant de réacteurs fonctionnant à des âges de boues élevés, *Figure VI.06*.

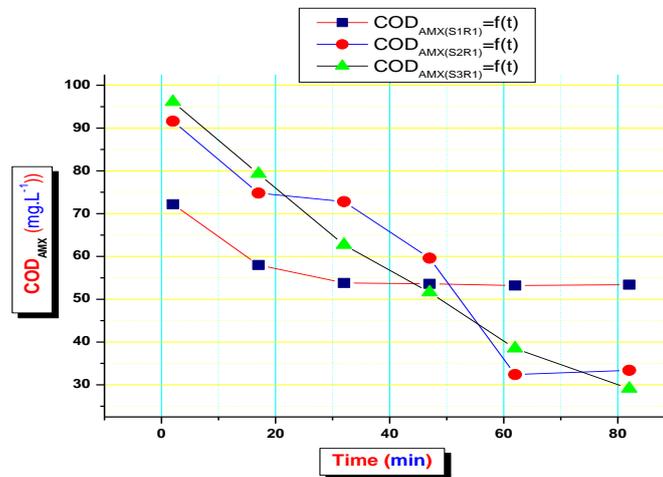


Figure VI.06 : La variation temporelle de la dégradation de la DCO de l'AMX pour les différents types de biomasses.

Pour valider ces conclusions, en particulier la biodégradation de l'AMX, une analyse par HPLC a été réalisée sur des échantillons prélevés dans les différents réacteurs. Un échantillon a été prélevé après 2 minutes d'injection d'AMX dans le réacteur (P1), tandis qu'un autre a été prélevé à la fin de chaque test (P2).

Les chromatogrammes *HPLC* obtenus pour les différentes biomasses utilisées sont présentés dans les *Figures VI.07, VI.08 et VI.09*.

En analysant les chromatogrammes *HPLC* enregistrés entre les prélèvements *P1* et *P2*, et en calculant l'aire sous les courbes, une diminution de l'*AMX* de *16.16%* a été observée dans le réacteur *SIR2*, tandis qu'une réduction complète a été constatée dans les réacteurs *S2R2* et *S3R2*.

A ce stade, se pose la question de savoir si la molécule d'*AMX* pourrait être adsorbée dans la biomasse. Pour répondre à cette interrogation, il a été nécessaire de confirmer ou non cette hypothèse en analysant la matrice solide avant et après le test.

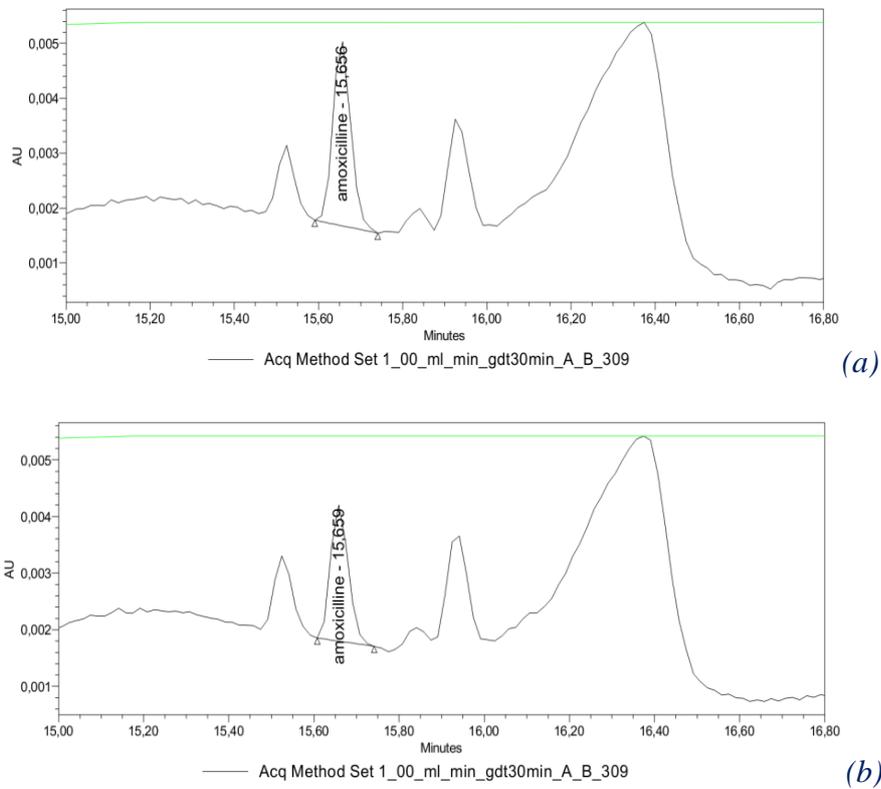
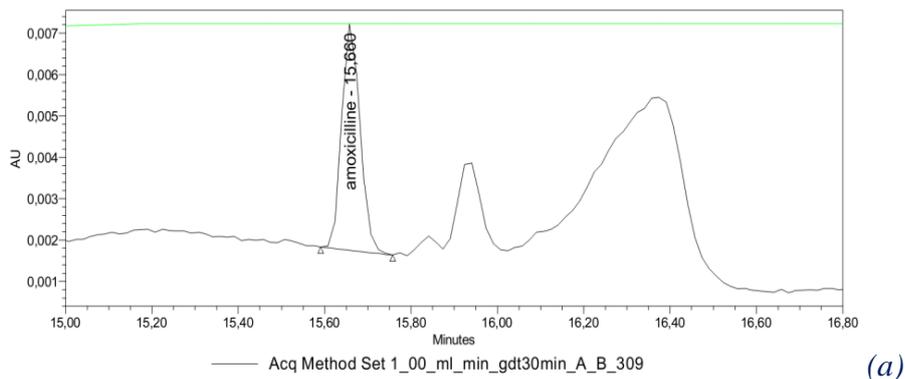


Figure VI.07 : Chromatogramme d'*HPLC* (a) du prélèvement *P1* (b) du prélèvement *P2* dans le réacteur *SIR2*



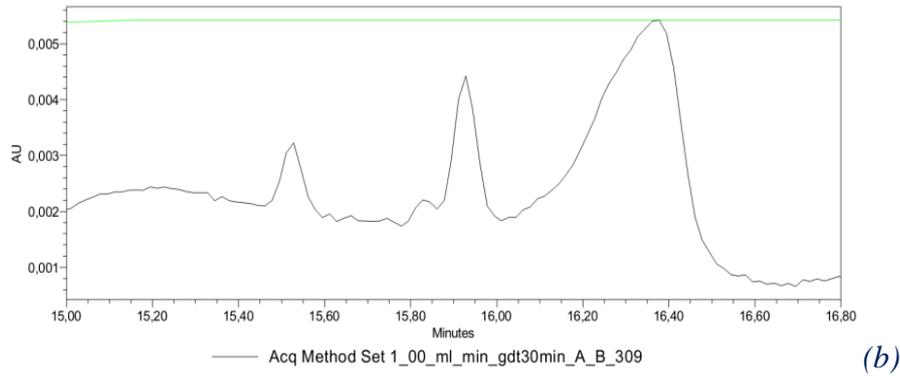


Figure VI.08 : Chromatogramme d'HPLC (a) du prélèvement P1 (b) du prélèvement P2 dans le réacteur S2R2.

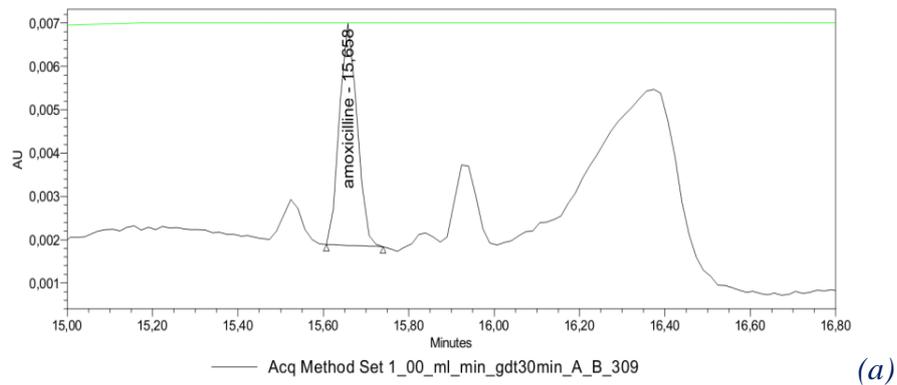


Figure VI.09 : Chromatogramme d'HPLC (a) du prélèvement P1 (b) du prélèvement P2 dans le réacteur S3R2

1.2. Observation de l'accumulation de l'AMX dans la fraction solide

Les boues récupérées des différents réacteurs ont été aussi séchées à l'étuve à une température de $105\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 15^{\circ}\text{C}$, avant et après les tests, pour une analyse par spectroscopie (IR), les spectres de comparaison enregistrés sont regroupés dans, *Figures VI.10, VI.11 et VI.12*. Après avoir superposé les différents spectres, il apparaît qu'il n'y a pas eu d'accumulation notable de l'AMX dans la fraction solide. On observe une quasi-similitude

entre les spectres de la biomasse à la fin de l'expérience, quel que soit le type de biomasse utilisé dans les différents bioréacteurs.

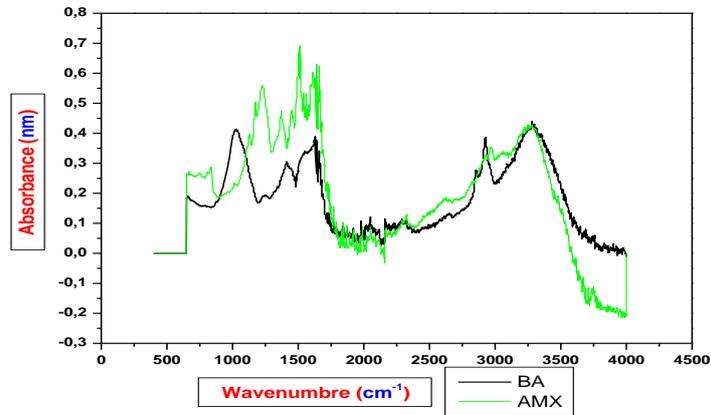


Figure VI.10 : Superposition des spectres IR de l'AMX dans la biomasse récupérée du réacteur S1R2

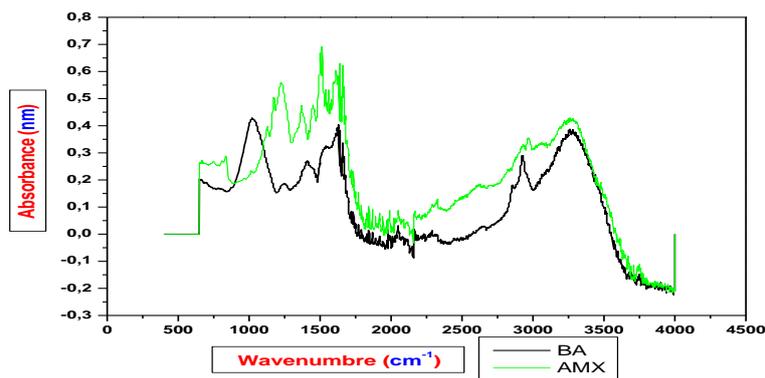


Figure VI.11 : Superposition des spectres IR de l'AMX dans la biomasse récupérée du réacteur S2R2

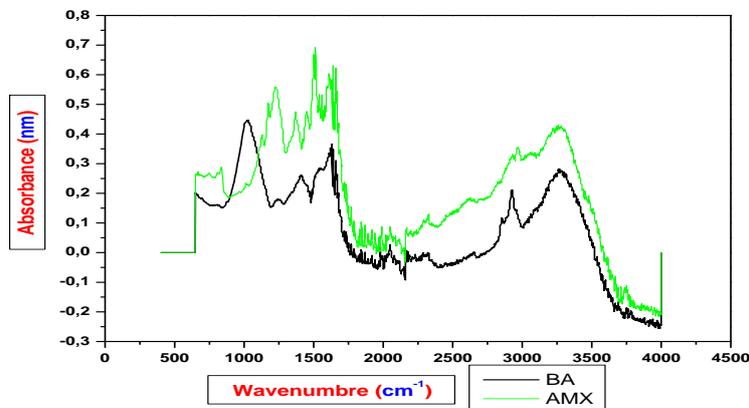
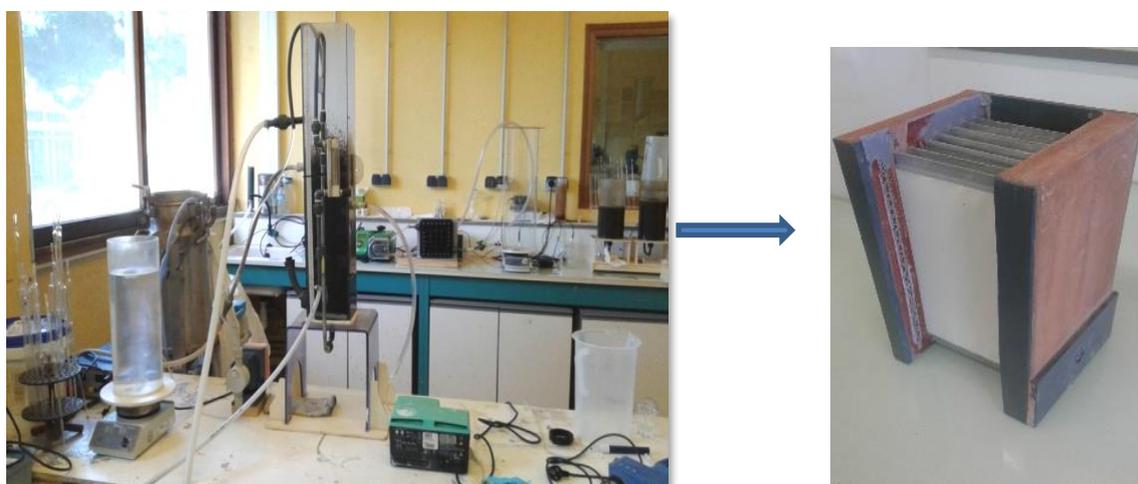


Figure VI.12 : Superposition des spectres IR de l'AMX dans la biomasse récupérée du réacteur S3R2

Les expériences menées ont clairement indiqué que la molécule d'AMX peut être efficacement biodégradée. La variation du degré d'inhibition enregistré par les tests respirométriques est attribuable non seulement au blocage de la consommation de la pollution introduite, ce qui réduit l'activité respiratoire de transfert d'oxygène, mais aussi à la possibilité d'inhibition lorsqu'elle entre en compétition avec le substrat, ce qui ralentit sa biodégradation, mais pourquoi les autotrophes étaient-ils plus sensibles que les hétérotrophes ? Cette question pourrait être mieux élucidée en évaluant la biodégradation d'une pollution azotée en présence et en absence de la molécule d'AMX, et plus spécifiquement en examinant l'utilisation du carbone minéral par les autotrophes dans ces deux contextes. Pour surmonter cette contrainte, travailler avec des âges de boues élevés semble être la solution la plus adéquate pour atteindre une biodégradation complète du substrat, même en présence de différentes concentrations de la molécule d'AMX.

2. MISE EN MARCHÉ D'UN PILOTE MBRI

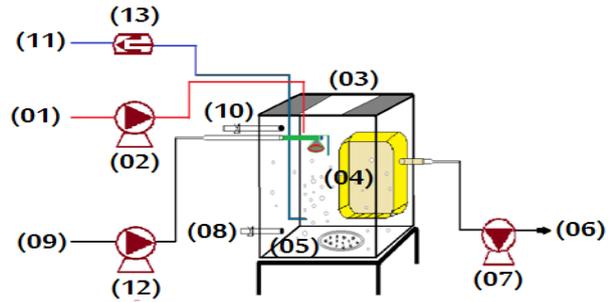
Le dispositif pilote, situé au laboratoire IEM de l'université Montpellier, est un bioréacteur à flux continu ou un bassin biologique aérobie en PVC transparent. Cette transparence facilite l'observation visuelle du milieu réactionnel. Le pilote, de forme rectangulaire, est équipé d'une membrane de configuration immergée spécifiquement utilisée dans le cadre de cette étude. Son objectif principal est d'évaluer la capacité du système à traiter de manière continue, dans des conditions aérobies un effluent synthétique contenant l'antibiotique AMX. La *Figure VI.13* illustre le fonctionnement simple de ce système, composé d'un bassin aéré d'une capacité totale de 8.5 litres, dont le volume réactionnel est de 6 litres (± 0.5 L). Le module membranaire est une combinaison de 08 membranes planes d'UF à plusieurs plaques en polyvinylidène difluoride (PVDF), de type tangentiel.



(a)



(b)



(c)

Figure VI.13 : Photographie et représentation schématique du MBRI.

01. Colonne d'alimentation en effluent synthétique, 02. Pompe d'alimentation de substrat, 03. Bioréacteur biologique aéré, 04. Module membranaire, 05. Système d'aération, 06. Perméat, 07. Pompe de perméation, 08. Vidange, 09. Alimentation en eau de robinet, 10. Sèche d'eau, 11. Système de prélèvement manuel, 12. Pompe d'alimentation en eau de robinet, 13. Seringues.

La géométrie plane à plusieurs plaques a été sélectionnée pour atteindre un seuil de coupure très bas (400-500 Da). Cela permet d'augmenter la surface de filtration et d'éviter le colmatage dû au contact avec les boues. Le module agit comme une barrière physique, positionnée au-dessus du système d'injection d'air, et retient les bactéries et virus à l'intérieur du bioréacteur. Les caractéristiques détaillées sont répertoriées dans le *Tableau VI.02*.

Tableau VI.02 : Les caractéristiques du module membranaire utilisé.

Seuil de coupure (µm)	0.14
Géométrie (type)	Plane
Nature (Matériel)	PVDF
Perméabilité (m ⁻¹)	6.12 * 10 ¹⁰
Surface totale filtrante (m ²)	0.2
Nombre de feuille membranaire	8
Longueur de chaque feuille (m)	0.21
Flux théorique (L.h ⁻¹ .m ⁻²)	2.3 – 7.5
Résistance à la température °C	40 – 50
Intervalle de pH	2 – 12
Compacité de module (m ² .m ³)	84

Le bioréacteur,ensemencé avec les boues provenant de la station de *Grande Monte (MAS)*, est continuellement alimenté par un effluent synthétique concentré, principalement composé d'acétate facilement biodégradable. Ce mélange est enrichi en *AMX*. En parallèle, l'alimentation du bioréacteur comprend de l'eau du robinet, jouant un rôle crucial dans la dilution de la solution synthétique concentrée. Le débit d'eau du robinet est régulé par un dispositif de contrôle de niveau situé dans la partie supérieure du pilote, complétant ainsi l'alimentation globale du système. La solution concentrée est acheminée par une pompe péristaltique de type *Pr@Minent*, réglée à un débit constant de 0.5 L/jour pour fixer la charge volumique *C_v* souhaitée.

Les expériences ont été conduites dans des conditions d'oxygène non limitant. Le système d'aération, positionné au fond du bioréacteur et à travers un diffuseur d'air, injecte un débit d'aération de 300 L/heure . Cela assure à la fois un apport adéquat en oxygène nécessaire à la culture biologique, avec une concentration minimale moyenne d'oxygène dissous dans le réacteur de $6\text{ mgO}_2/\text{L}$, et crée une turbulence favorisant le brassage et une homogénéisation efficace des boues dans le milieu.

Cela permet de maintenir le mélange réactionnel en suspension, évitant ainsi toute décantation des floccs au fond du réacteur. L'injection d'air sous le module, à travers des bulles d'air de taille comprise entre $0.3\text{ et }1.5\text{ cm}$, empêche également le colmatage de la membrane en induisant un effet de cisaillement pariétal. Ces bulles d'air contribuent à limiter le risque de macro-colmatage sur la surface membranaire.

Le perméat, qui est l'effluent traité et est séparé de la biomasse épuratrice après la filtration membranaire, est aspiré en continu à l'aide d'une pompe péristaltique de type *WATSON-MARLOW 505S* positionnée en aval du module membranaire. Le débit de filtration est maintenu pour garantir le temps de séjour hydraulique, tandis que le temps de séjour des boues est régulé par une extraction quotidienne d'un volume prédéterminé de boues. Un capteur de pression, situé avant la pompe d'extraction du perméat, permet un suivi en temps réel de la pression transmembranaire.

Des analyses de suivi sont réalisées sur différents échantillons prélevés du *MBRI*, portant sur des paramètres tels que le potentiel redox, la température, l'oxygène dissous, la concentration de la fraction azotée ($N\text{-NH}_4^+$ et $N\text{-NO}_3^-$), le *pH* (ajusté quotidiennement pour le maintenir entre 7.5 et 9 à l'aide d'une solution tampon en cas de besoin). Afin de surveiller les performances du réacteur et son contrôle par rapport au colmatage, la pression transmembranaire est mesurée en continu à flux constant. Une augmentation du colmatage est associée à une augmentation de la pression transmembranaire. Le nettoyage du module membranaire est effectué en utilisant des solutions d'hydroxyde de sodium (*NaOH*), d'acide nitrique (*HNO₃*), et de chlore actif. Une phase de rinçage prolongé avec de l'eau distillée est réalisée pour assurer une purification complète de la membrane.

2.1. Conditions opératoires initiales :

Après fixation des flux de substrat et de perméat, le *Tableau VI.03* synthétise toutes les conditions opératoires nécessaires pour assurer le bon fonctionnement du système. Certains paramètres ont été imposés, tandis que d'autres ont été calculés. Dans le *MBRI*, aucune extraction n'a été réalisée au cours des premiers jours, permettant ainsi une adaptation

optimale et une accélération de la croissance de la biomasse. Ensuite, l'âge des boues *SRT* (*jours*) a été fixé par une extraction quotidienne d'un volume de boues calculé, et le temps de rétention hydraulique *HRT* (*heures*) a été déterminé en ajustant le flux de la membrane. Le *MBRI* a fonctionné à température ambiante (18 à 26 °C) tout au long de l'étude.

Afin de confirmer les conditions de fonctionnement dans le contexte climatique, le pilote a opéré à température ambiante. Le manque de régulation de la température et du *pH* a des répercussions négatives sur le développement des microorganismes. À des températures élevées, le réacteur tend à se comporter comme un milieu anaérobie en raison d'une insuffisance d'oxygène dissous, entraînant une production réduite de boues et une diminution de l'activité de la biomasse [219-220]. En effet, un *pH* inférieur à 6.5 favorise la prédominance de l'acide nitreux (*HNO₂*) du couple (*HNO₂/NO₂*), inhibant la nitrification.

En revanche, un *pH* supérieur à 9 crée un milieu fortement alcalin avec un effet bactéricide sur les microorganismes [220, 262], où prédomine l'ammoniac *NH₃* du couple acide-base *NH₄⁺/NH₃*, un toxique inhibant l'aération.

Tableau VI.03 : Les conditions opératoires de fonctionnements de *MBRI*.

	Paramètres	Valeurs
Le Réacteur	Cv : charge volumique (kg _{DCO} .m ⁻³ .j ⁻¹)	0.8
	Cm : charge massique azoté (kg _N .m ⁻³ .j ⁻¹)	0.08
	Vf : volume fonctionnel (L)	6
	Débit d'entrée d'eau (L.h ⁻¹)	0.23
	HRT (h)	24
	SRT (j)	40
	Qw (L.j ⁻¹)	0.15
	S _S influent (g _{DCO} .L ⁻¹)	0.800
	S _{NH} influent (g _N .L ⁻¹)	0.080
Membrane	S _P influent (mg _P .L ⁻¹)	0.3
	Jw net : flux de perméat (LMH)	0.83333
	Nombre membrane	8
	Surface (m ²)	0.3
	Qp net (L.h ⁻¹)	0.25
Concentrations	Débit (L.j ⁻¹)	6
	Débit substrat (L.j ⁻¹)	0.5
	DCO _S (g.L ⁻¹)	9.60
	CH ₃ COONa ₃ H ₂ O (g.L ⁻¹)	20.40
	N (g.L ⁻¹)	0.96
	P (g.L ⁻¹)	0.096
Pesées	DCO/N/P	100/10/1
	C ₂ H ₃ NaO ₂ (g)	102.0
	NH ₄ Cl (g)	16.686
	(NH ₄) ₂ HPO ₄ (g)	2.044
	C ₁₆ H ₁₉ N ₃ O ₅ S (g)	0.75 chaque 9 jours

Une solution synthétique entièrement biodégradable a été utilisée pour alimenter le MBRI et augmenter la teneur en MES. Cette solution concentrée est stockée dans une cuve d'alimentation distincte et alimente en continu le MBRI afin de limiter les réactions et de se diluer dans le réacteur biologique par l'eau du robinet, conformément à la charge volumique imposée. L'activité et la croissance des microorganismes sont influencées par les variations des conditions opérationnelles [263-264].

Il est à noter que l'activité de la biomasse augmente de manière linéaire avec la charge organique appliquée, malgré l'augmentation de la teneur en sel de sodium. De plus, la densité, la structure et la morphologie des boues dans le réacteur biologique subissent des modifications au cours de leur croissance et en fonction des conditions opératoires [264], ce qui a un impact sur la filtrabilité de la suspension.

2.2. Détermination des paramètres opératoires :

Afin de réguler les paramètres opératoires du MBRI, il a été nécessaire d'imposer les paramètres ci-joints, les autres paramètres étant calculés en fonction de ces derniers :

- Le flux du perméat a été fixé à $J_w = 0.83333 \text{ L.h}^{-1}.\text{m}^{-2}$.
- La charge volumique du réacteur biologique est fixée à $C_v = 0.8 \text{ kg}_{\text{DCO}}.\text{m}^{-3}.\text{j}^{-1}$.
- Le débit de la solution synthétique est fixé à : $Q_s = 0.5 \text{ L/j}$.
- Un âge de boue fixé à $SRT = 40 \text{ j}$.
- Un volume de boue : $V_b = 5 \text{ L}$.
- Un volume de la solution synthétique concentré : $V_s = 5 \text{ L}$.

2.2.1. Débit d'alimentation et de perméat :

Afin d'atteindre le flux (J_w) souhaité, il a fallu régler la pompe d'alimentation à un débit Q_p calculé selon l'Equation VI.01 :

$$Q_p = J_w * S \quad (\text{VI.01})$$

La surface filtrante du module membranaire, notée S , est de 0.3 m^2 par membrane, entraînant ainsi une surface filtrante totale de 2.4 m^2 .

En considérant la surface de la membrane comme étant de 2.4 m^2 , le débit de perméat (Q_p) est égal à $0.048 \text{ m}^3/\text{jour}$. En conséquence, la pompe péristaltique du perméat fonctionnera avec un débit de 6 L/jour . Pour atteindre ce débit, et en se référant à la Figure VI.14-(a) qui représente le débit de perméation en fonction de la vitesse de rotation de la

pompe, la pompe doit être réglée à une vitesse de 4 rpm/min. La vérification du débit effectuée pendant 24 heures avec cette fréquence montre un volume final de 6 litres et 239 millilitres, qui est presque équivalent à notre volume réactionnel initial.

Le flux d'alimentation avec la solution synthétique (Q_s) a été fixé à 0.5 L/jour pour des raisons de simplicité. Cela permet une autonomie de 9 jours, compte tenu du réservoir de substrat de 6 litres. La pompe a été étalonnée pour cette valeur avec des variations de la fréquence de la pompe en fonction des volumes et/ou des débits donnés (Figure VI.14-(b)). On obtient une fréquence de 0.5 Hz nécessaire pour obtenir un débit de 0.5 L/jour, et les tests de vérification à cette fréquence pendant 24 heures donnent un volume d'environ 527 millilitres, correspondant au volume souhaité par jour.

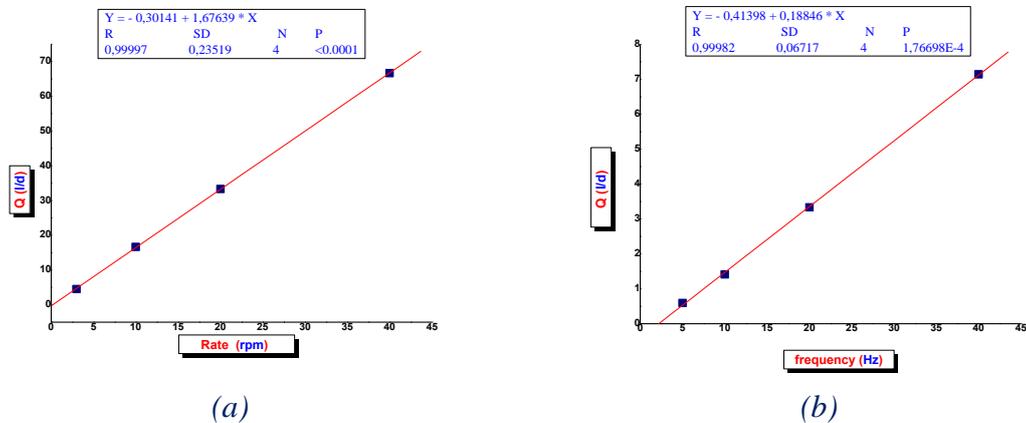


Figure VI.14 : (a) Débit de perméation en fonction de la vitesse de rotation de la pompe
(b) Le flux de la solution synthétique en fonction de la fréquence de la pompe.

2.2.2. Temps de séjour hydraulique (HRT) :

Le temps de rétention hydraulique (HRT - *Hydraulic Retention Time*) est défini comme le rapport du volume réactionnel utile du réacteur sur le débit de perméat (généralement le flux volumique d'alimentation ou celui d'extraction, sachant que le flux volumique d'extraction est la somme des débits volumiques de perméat et d'extraction de boues). Le HRT était déterminé par les conditions de travail imposées et estimés selon l'équation ci-jointe :

$$HRT = V / Q_p \quad (VI.02)$$

2.2.3. L'âge de boues ou le temps de rétention de la phase solide (SRT) :

Le SRT (Solid Retention Time) correspond au rapport de la masse biologique présente dans le volume réactionnel par la masse biologique extraite journallement du réacteur. La valeur de ce paramètre était imposée par une extraction journalière d'un volume donné de

suspension biologique du système. Les *MVS* sont supposées atteindre une valeur constante lorsque la production de boues est égale à son extraction, le taux de conversion observé (Y_{Obs}) est calculé selon la relation suivante :

$$MVS = Y_{Obs} \frac{SRT}{HRT} S_{Si} = Y_{Obs} C_F S_{Si} \quad (VI.03)$$

$$Y_{Obs} = \frac{MVS}{C_F S_{Si}} \quad (VI.04)$$

Y_{Obs} : taux de conversion observé (g_{MVS}/g_{DCO})

S_{Si} : concentration de substrat organique (mg DCO /L)

C_F : facteur de concentration = SRT/HRT .

2.2.4. Concentration initiale du substrat dans le réacteur $C_{S,0}$:

Connaissant Q_p et ayant fixé la charge volumique à $0.8 \text{ kg}_{DCO}.m^{-3}.j^{-1}$, on calcule la concentration du substrat qui alimente le *MBRI* comme suit :

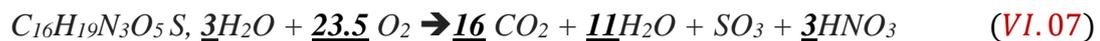
$$C_{S,0} = \frac{Q_P * C_V}{V} \quad (VI.05)$$

2.2.5. Concentration du substrat concentré dans le réservoir d'alimentation C_S :

Une solution concentrée est préparée dans un volume de *5 litres*, destinée à alimenter le *MBRI* pendant *9 jours*. La détermination de la concentration du substrat dans cette solution concentrée sera selon l'équation suivante :

$$(Q_P + Q_S) * C_{S,0} = Q_S * C_S \quad \rightarrow \quad C_S = \frac{(Q_P + Q_S) * C_{S,0}}{Q_S} \quad (VI.06)$$

Cette concentration est introduite dans le réacteur qui contient un volume de boue de *4 L* et est diluée avec *6 L* d'eau du robinet. L'alimentation en l'effluent synthétique est effectué avec un intervalle de temps de *9 jours*, une quantité progressive d'*AMX* a été injectée, ayant une concentration théorique en *DCO* de *112.05 mg_{DCO}/L* pour *1 g* d'*AMX*, ceci est calculé en considérant l'équation suivante :



Pour l'*AMX*, nous avons commencé avec des concentrations allant de *0* à *180 mg/L*, avec un intervalle de *25 mg/L* tous les *9 jours*. La sélection des concentrations d'*AMX* a été basée sur les résultats des études d'inhibition réalisées par respirométrie. Les concentrations choisies ont été doublées par rapport à celles évaluées en batch, en raison des niveaux d'inhibition variables observés lors de ces dernières.

Tableau VI.04 : Concentrations d'AMX en termes DCO, DCO_{théorique} et DCO_{total} appliqué.

Le Pas	DCO _{AMX}	DCO _{ACT}	DCO _{tot}
Pas 1 = 0 mg/L	0	800	800
Pas 2 = 25 mg/L	2.80125	800	802.80125
Pas 3 = 50 mg/L	5.6025	800	805.6025
Pas 4 = 75 mg/L	8.40375	800	808.40375
Pas 5 = 100 mg/L	11.205	800	811.205
Pas 6 = 125 mg/L	12.5	800	812.5
Pas 7 = 150 mg/L	16.8075	800	816.8075
Pas 8 = 175 mg/L	19.60875	800	819.60875
Pas 9 = 200 mg/L	22.41	800	822.41

Le *Tableau VI.04* regroupe les concentrations en AMX, DCO_{théorique}, ainsi qu'en DCO_{totale} théorique (DCO théorique fournie par l'AMX et l'acétate) dans le bioréacteur. La variation de la DCO due à l'ajout de l'AMX se situait entre 3 et 22 mg/L, soit environ 2.72 %, ce que l'on peut considérer comme négligeable par rapport à la concentration d'acétate utilisée, de 800 mg/L. L'AMX présente un pourcentage 10.02 % azote et 45.8 % en carbone.

2.2.6. Débit des boues extraites :

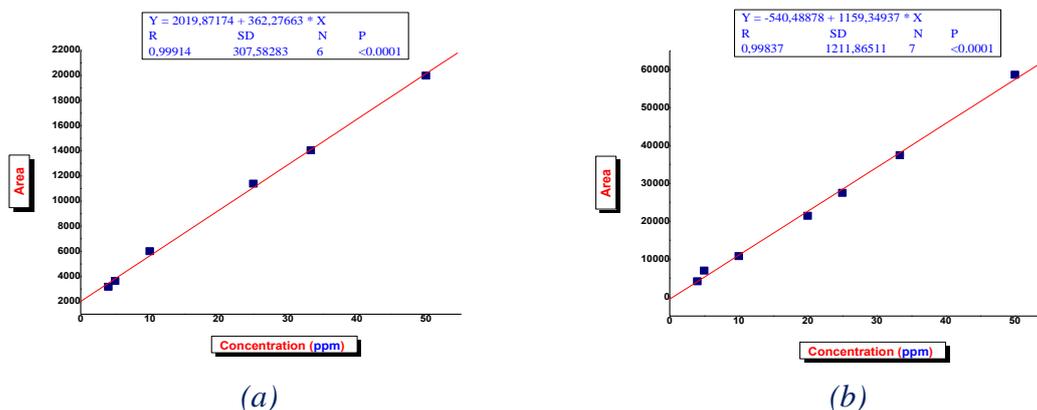
Le débit des boues extraites ne dépend que du volume et de l'âge des boues imposé, il est calculé selon l'équation suivante :

$$Q_w = \frac{V}{SRT} \quad (VI.08)$$

Les boues, extraites manuellement chaque jour, seront caractérisées.

2.2.7. Concentration en AMX dopés dans l'effluent synthétique :

L'AMX présente une grande solubilité dans l'eau distillée et également dans l'eau du robinet. Ainsi, la préparation des solutions concentrées d'AMX est réalisée dans la solution de l'effluent synthétique concentré. Pour obtenir des concentrations variant de 0 à 180 mg/L tous les 9 jours, avec un incrément de 25 mg/L dans le bioréacteur, la dilution est effectuée à l'aide de l'eau du robinet, de la même manière que pour l'effluent synthétique concentré. Le suivi de l'AMX est assuré par la technique de chromatographie HPLC dans différentes matrices (liqueur mixte, perméat et eau distillée) afin de détecter leur présence et/ou absence après les procédés de traitement effectués *Figure VI.15*.



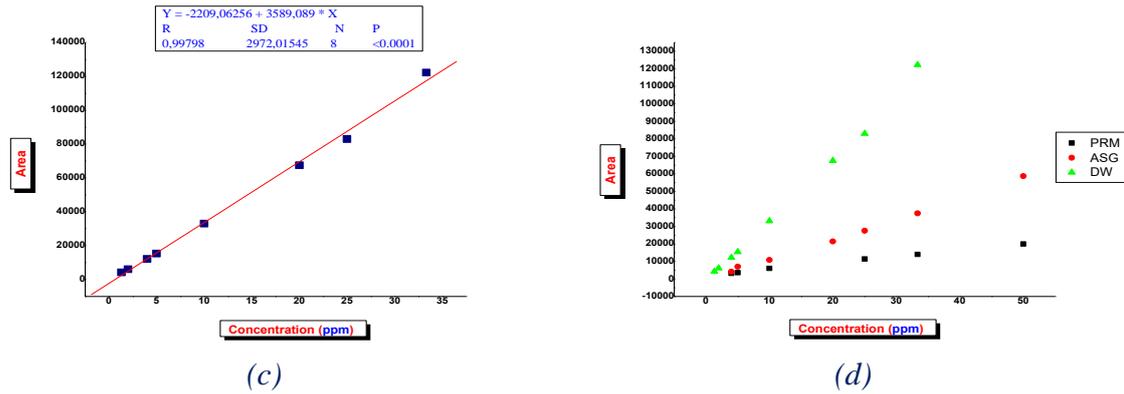


Figure VI.15 : Evolution de l'aire des pics (a) dans la matrice perméat (b) dans la matrice boues (c) dans la matrice eau ultra-pure (d) les trois matrices précédentes, en fonction de la concentration en AMX pour l'étalonnage de l'HPLC.

2.3. Caractérisation de la membrane :

La membrane d'ultrafiltration actuellement utilisée n'est pas neuve, ce qui rend nécessaire un traitement de régénération, c'est-à-dire un nettoyage de la membrane, ainsi qu'un suivi de la perméabilité. Les opérations de régénération de la membrane sont réalisées à l'extérieur du réacteur. Le *Tableau VI.05* détaille le protocole de lavage. Dès que l'on n'observe plus de plateau, cela signifie que le flux critique a été atteint. Cependant, les conditions n'ont pas été poussées jusqu'à atteindre ce flux critique. La méthode utilisée pour évaluer le taux de régénération consiste à appliquer des flux croissants sur la membrane nettoyée en ajustant le débit de la pompe du perméat et en filtrant de l'eau distillée. À chaque flux imposé, on détecte une pression transmembranaire qui sera égale à :

$$PTM = P_{atm} - P_{cap} \tag{VI.09}$$

Avec :

P_{atm} : pression atmosphérique.

P_{cap} : pression détecté par le capteur.

Tableau VI.05 : Etapes de nettoyage de la membrane.

Etape de lavage	Concentration des solutions	Durée de l'étape
Rinçage à l'eau de robinet	/	/
Rétro-lavage avec de l'eau distillée	/	2 h
Rétro-lavage avec de la soude	4 g/L	3 h
Retro-lavage avec l'acide citrique	22 g/L	3 h

2.4. Paramètres de suivi du MBRI :

L'objectif de cette partie de l'étude est de mettre en évidence le potentiel du MBRI pour l'épuration efficace des eaux usées contenant des micropolluants. Les performances du bioréacteur biologique, MBRI, sont étroitement liées à l'activité de la biomasse épuratrice, en particulier à sa capacité à oxyder les matières organiques (MO) et minérales [265], en

présence de la molécule d'AMX en tant que micropolluant à diverses concentrations. Plusieurs paramètres influencent l'activité des microorganismes et donc leur capacité à dégrader cette molécule inhibitrice. Le rapport *MVS/MES* peut varier dans le processus biologique en raison de l'absence de *MO* particulière dans l'influent synthétique [265]. C'est pourquoi le suivi de certains paramètres tout au long de la mise en œuvre du *MBRI* permet de maintenir et de bien contrôler l'activité de la biomasse épuratrice utilisée dans le *MBR* d'*UF* immergée. Le suivi des capacités épuratoires est réalisé par plusieurs paramètres en utilisant plusieurs méthodes analytiques et instrumentation, résumées dans le *Tableau VI.06*.

Tableau VI.06 : Paramètres de suivi du MBRI

Paramètres mesurés	Méthodes analytique/instrumentation	Bioréacteur	
		Boues	Perméat
Paramètres physico-chimique et Paramètres Biologiques			
Oxygène dissous (mg/L)	Potentiomètre oxygène probe Oxi-340 WTW	X	
pH	Potentiomètre pH-mètre instrument	X	
U (mV)	Potentiomètre pH-mètre instrument	X	
Cond (mS/cm)	Potentiometer conductivity meter LF-323 de WTW	X	
Sal (%)	Potentiometer conductivity meter LF-323 de WTW	X	
TDS (mg/L)	Potentiometer conductivity meter LF-323 de WTW	X	
MES (mg/L)	Standard method 2540 D (ALPHA, 1992)	X	
MVS (mg/L)	Standard method 2540 E (ALPHA, 1992)	X	
NH₄(mg/L)		X	X
NO₃(mg/L)		X	X
NO₂(mg/L)		X	X
COT(mg/L)	TOC-VSCN analyzer SHIMADZU	X	X
DCO (mg/L)	Method de digestion, colorimétrique HACH-DR3900	X	X
Respirométrie	Mesure manuelle on utilisant d'une cellule batch équipé d'une sonde à oxygène d'oxymétrie Oxi 340 de WTW	X	
Amoxicilline	HPLC-MS + LCMS-MS	X	X

3. PERFORMANCES EPURATOIRES DU MBRI :

Les résultats du suivi de l'élimination de la molécule inhibitrice d'AMX au fil du temps par un *MBRI* ont été évalués après une étude de l'effet de cette molécule sur la biomasse épuratrice à l'aide de la technique respirométrique. Cette méthode révèle un effet inhibiteur *SRT = 40 jours* potentiel mais pas régulier de l'AMX sur l'activité microbienne impliquée dans la dégradation de la pollution. La performance du système continu *MBRI* en condition aérobie a été évaluée grâce à un contrôle quotidien efficace des différents paramètres sur la liqueur mixte, le substrat d'alimentation et le perméat.

3.1. Caractérisation de la liqueur mixte :

La liqueur mixte (*MAS*) utilisée pour l'inoculation du pilote *MBRI* provient d'une station *MBR* traitant l'équivalent d'environ 65000 équivalents habitants (*EH*), se caractérisant par une forte concentration en *MES* et en *MVS* de la liqueur mixte. La biomasse a été suivie chaque jour en quantifiant les *MES* et *MVS*, comme illustré dans la *Figure VI.16*, dans la liqueur mixte en fonction du temps pendant la période d'étude en *MBRI*.

Au cours des dix premiers jours, on observe des concentrations initialement élevées au début du fonctionnement du pilote, qui diminuent progressivement. Cela s'explique par l'absence d'extraction des boues après leur ensemencement, permettant ainsi l'augmentation des *MES* et accélérant l'acclimatation de la biomasse aux nouvelles conditions opératoires. Ensuite, l'âge des boues a été fixé par une extraction quotidienne d'un volume de 150 mL par jour en liqueur mixte (ce volume étant destiné aux différentes analyses effectuées).

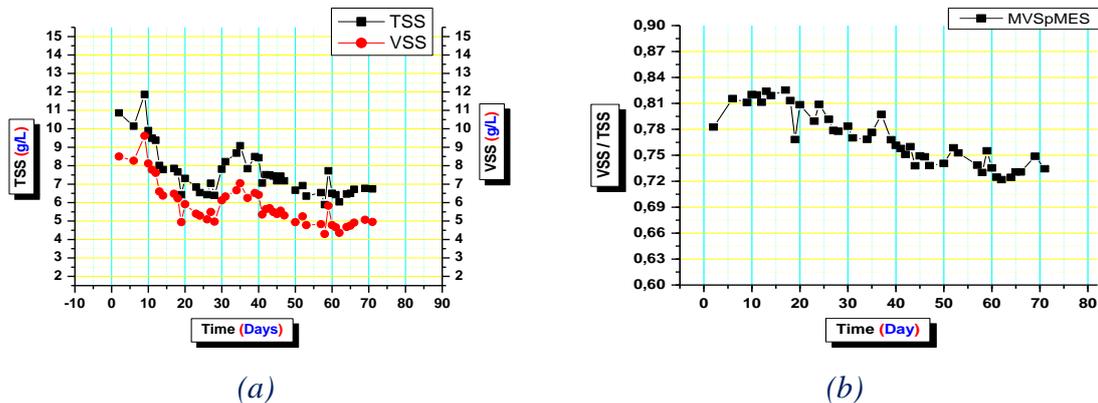


Figure VI.16 : Evolution des (a) *MES* et des *MVS* de la liqueur mixte dans le *MBRI* et (b) le rapport *MVS/MES* en fonction de la période de fonctionnement du pilote.

Après les dix premiers jours de fonctionnement, les quantités de *MES* et de *MVS*, comme illustré dans la *Figure VI.16-a*, ont connu des variations comprises entre 5.89 et 9.08 g/L pour les *MES* et entre 4.3 et 4.61 g/L pour les *MVS*. Le rapport *MVS/MES*, présenté dans la *Figure VI.16-b*, a maintenu une constance remarquable, oscillant entre 0.72 et 0.82 tout au long de la période d'étude. Cette stabilité reflète un état d'équilibre, indiquant d'une part que les conditions opératoires du *MBRI* ont favorisé une production microbienne équilibrée, notamment grâce au temps *HRT*, au temps *SRT* imposé, ainsi qu'aux conditions d'agitation et d'aération, et d'autre part que l'effet inhibiteur n'a pas eu une influence significative sur la multiplication microbienne.

Il est important de noter qu'après 20 jours de fonctionnement, et suite à l'augmentation de la concentration en *AMX* dans le milieu à 50 mg/L, les variations observées dans les *MES* et les *MVS* restent presque constantes, avec de légères fluctuations au fil des jours de

prélèvement, similaires aux autres paramètres étudiés. Les variations des *MVS* sont reliées à la charge volumique et massique, comme exprimé par l'Equation VI.10. Cette évolution se caractérise par un taux de conversion de biomasse *Y* (en g_{MES} produite/ g_{DCO} consommé), calculé par l'Equation VI.11.

Ces paramètres évoluent en accord avec les conditions opératoires fixées, maintenant ainsi un comportement constant des microorganismes en fonction de la concentration constante du substrat d'alimentation malgré les variations de la concentration en *AMX*.

$$MVS = Y_{obs} \frac{SRT}{HRT} S_{Si} \quad (VI.10)$$

Y_{obs} : taux de conversion observé (gMVS/gDCO)

S_{Si} : concentration du substrat organique (DCO)

$$Y = \frac{V_{MES}}{C_V} \quad (VI.11)$$

V_{MES} : vitesse d'évolution des *MES* = la pente de la droite d'augmentation en *MES*.

C_V : la charge volumique.

La diminution constatée dans la tendance générale de *MES* et des *MVS* pourrait être attribuée au piégeage de *MES* entre les plaques de la membrane et les parois du pilote ainsi que du module membranaire, créant des zones mortes. Malheureusement, cette hypothèse n'a pas pu être confirmée par la mesure quotidienne de la pression transmembranaire, en particulier pour les derniers jours de l'étude.

Étant donné l'importance de surveiller les paramètres tels que le *pH*, l'oxygène dissous et la température dans le milieu réactionnel de la liqueur mixte, comme précédemment expliqué en détail, afin d'assurer le bon fonctionnement du pilote et d'optimiser le processus de dépollution, la Figure VI.17 illustre l'évolution de ces paramètres au fil du temps au cours de la période de fonctionnement

Dans l'ensemble, en respectant les conditions opératoires préalablement définies, telles qu'un *pH* maintenu entre 8 et 9 et un apport d'air de 300 mg/L correspondant à une concentration moyenne minimale de 6 mgO₂/L dans la liqueur mixte, le *pH* et la concentration en *OD* du milieu sont restés constants sans régulation ou régulation partielle. Les valeurs enregistrées pour le *pH* se situent entre 8.3 et 8.5, légèrement alcalines avec une moyenne de 8.4, présentant des fluctuations mineures au début, comme observé pour d'autres paramètres, Figure VI.17-a.

L'OD a été maintenu à des niveaux non limitants, variant entre 7.4 et 8.7 mg_{O2}/L, sans aucun changement significatif tout au long de la période de marche. Quelques légères variations de température ont été notées après le 40^{ème} jour de marche, car le système opère à une température ambiante non contrôlée, *Figure VI.17-b*.

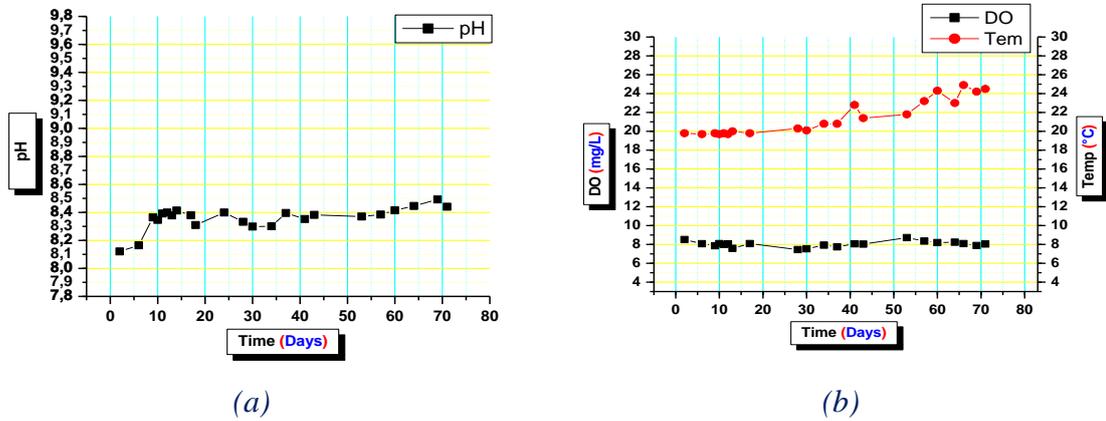


Figure VI.17 : Evolution des valeurs en (a) pH et (b) de la température ainsi l'oxygène dissous en fonction de temps durant la période de fonctionnement du pilote.

Les valeurs enregistrées du pH et de l'oxygène dissous sont, dans l'ensemble, propices à une efficacité épuratoire optimale de la biomasse, en particulier en ce qui concerne la production microbienne. Il est important de noter qu'aucune formation de mousse ni de présence de bactéries filamenteuses n'a été observée dans le pilote, comme confirmé par des visualisations microscopiques de la biomasse microbienne tout au long de la période d'étude.

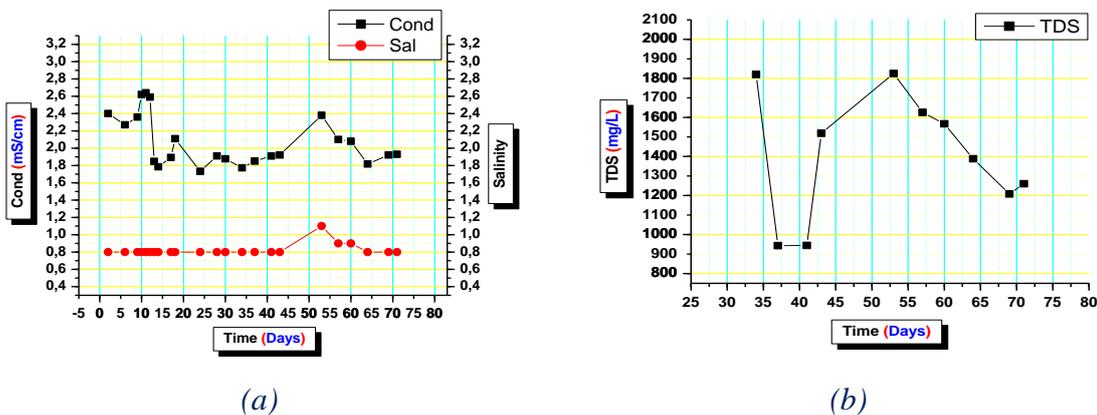


Figure VI.18 : Evolution de la (a) salinité et la conductivité et (b) le taux des sels TDS en fonction de temps dans la liqueur mixte durant la période de fonctionnement du pilote.

Le suivi du taux de consommation d'oxygène dissous permet de vérifier la vitalité de la biomasse à travers des tests respirométriques et de confirmer l'activité bactérienne. Il est également essentiel de contrôler la température, car une augmentation au-delà de 28°C pourrait entraîner un comportement anaérobie du pilote, entraînant une insuffisance en oxygène dissous dans le milieu et des effets bactéricides sur les microorganismes.

Parmi les paramètres surveillés pour la liqueur mixte pendant la période de fonctionnement, on inclut la conductivité, la salinité et le taux de sels totaux (*TDS*). La *Figure VI.18* illustre la variation de ces paramètres au fil du temps. La conductivité a fluctué entre 1.73 et 2.64 $\mu S/cm$, atteignant des valeurs maximales au cours des 10 premiers jours de fonctionnement. Par la suite, la conductivité est demeurée relativement stable, oscillant entre 1.7 et 1.9 $\mu S/cm$, à l'exception des jours 53 à 60 où une augmentation notable a été enregistrée. La salinité du milieu est restée constante, sauf pour les jours 53 et 60, où une légère hausse a été observée, atteignant 1.1 %, comme représenté dans la *Figure VI.18-a*. À noter que lors de ces jours, la dose d'AMX a été augmentée à plus de 150 mg/L, tout en maintenant la même concentration en substrat d'alimentation. Cependant, après le 60^e jour, bien que la concentration d'AMX ait été portée à 170 mg/L, la salinité est demeurée constante, initialement à 0.8%.

Le *TDS* a été surveillé au cours des 30 derniers jours pour évaluer l'impact des mesures de salinité sur l'accumulation des sels par l'effluent synthétique dans le réacteur, comme illustré dans la *Figure VI.18-b*. Le graphique révèle des valeurs maximales pour les mêmes jours où la conductivité et la salinité ont connu une augmentation, suivie d'une diminution progressive au fil du temps. La stabilité des mesures de ces paramètres est attribuable à la nature du substrat utilisé qui n'a induit aucun enrichissement significatif de la suspension en sels dans le milieu. Dans l'ensemble, les résultats des mesures de différents paramètres indiquent que les conditions opératoires étaient favorables à un fonctionnement optimal et à une élimination efficace de la pollution tout au long de la période d'étude.

3.2. Caractérisation du perméat :

Les performances de dépollution des eaux dans le *MBRI* ont été évaluées en surveillant les caractéristiques du perméat et en comparant la réduction des concentrations de certains paramètres de pollution au fil du temps. La *Figure VI.19* illustre la variation de la *DCO* et du *COT* du perméat au cours de la période d'étude. Il est à noter que la mesure de la *DCO* a été réalisée sur trois types d'échantillons :

- La solution du substrat concentré ainsi que celle diluée sont analysées à chaque nouvelle préparation de la solution, tous les 5 jours, dans le but de comparer les valeurs obtenues avec celles initialement imposées. Les résultats des contrôles effectués à chaque mesure sont très proches, voire parfois identiques, à la concentration initialement imposée.

- La fraction soluble et filtrée de la boue est prélevée avant chaque alimentation et dilution, correspondant à la durée d'extraction de la liqueur. Cependant, en raison de l'augmentation des colloïdes dans les suspensions, certaines valeurs obtenues ne sont pas significatives. Les valeurs de *DCO* dans cette fraction sont proches de celles du perméat, principalement attribuables à la production de composés microbiens solubles liés à l'activité microbienne, ce qui peut être associé à l'équation globale

Equation VI.12 :



Les produits résultant du processus d'épuration biologique peuvent être catégorisés sous le terme de *PMS*, abréviation pour Produits Microbiens Solubles, principalement évalués à travers les polysaccharides et les protéines solubles.

- Le perméat, les résultats de la *DCO* du perméat seront les plus représentatives.

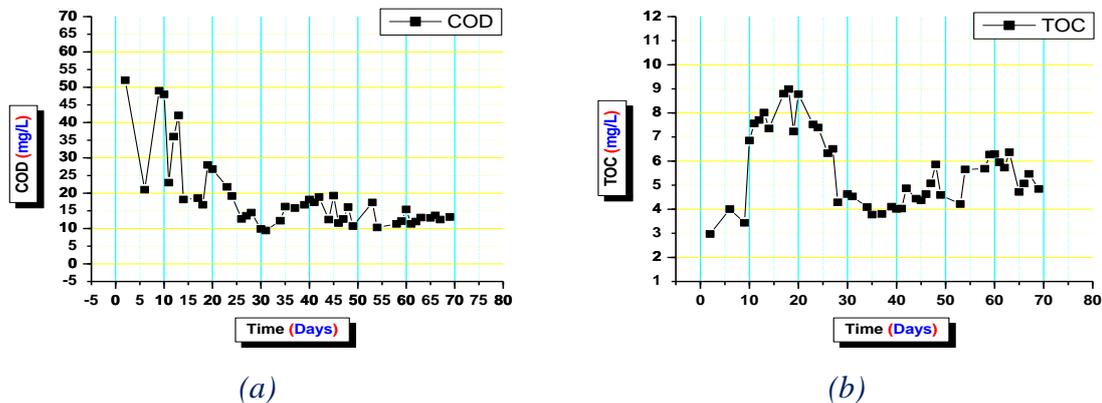


Figure VI.19 : Evolution temporelle de (a) la *DCO* et (b) le *COT* dans le perméat durant la période de fonctionnement du pilote.

Pour évaluer la réduction de la pollution dans les eaux synthétiques utilisées dans cette étude, l'évolution de la pollution organique au fil du temps a fait l'objet d'un suivi minutieux, comme illustré dans la *Figure VI.19*. Les concentrations de *DCO* et de *COT* dans le perméat ont présenté des fluctuations au cours des 20 premiers jours de fonctionnement, avec des concentrations variant de 15 à 50 mg/L, indiquant un taux d'élimination de plus de 94 à 98%. Quant au *COT*, il était compris entre 3 et 9 mg/L, démontrant que le *MBRI* s'adaptait pour éliminer ce type de pollution carbonée. Après les 20 premiers jours jusqu'à la fin du fonctionnement du pilote, les concentrations en *DCO* et *COT* ont atteint des valeurs minimales d'environ 13 mg/L en *DCO*, avec un taux d'élimination dépassant les 98.5%, et 4.5 mg/L en *COT*, avec un rapport moyen de *DCO/COT* de 3. Ces résultats soulignent l'efficacité exceptionnelle du *MBRI* dans l'élimination de la pollution carbonée.

Ces taux d'élimination élevés ont été atteints dès le démarrage du pilote, témoignant de bonnes conditions opératoires. Les microorganismes ont rapidement évolué en raison d'une acclimatation rapide. Les fluctuations observées dans le processus d'épuration pendant la phase de démarrage du MBRI ont également été notées dans d'autres études [265].

Bien que la charge organique de l'influent soit substantielle, atteignant 800 mg/L, les concentrations observées dans le perméat demeurent assez faibles, soulignant que l'activité de la biomasse et plus particulièrement des hétérotrophes est demeurée constante. Cela atteste des performances exceptionnelles du pilote dans l'élimination de la charge organique appliquée, même en présence d'une concentration élevée en AMX.

Les formes azotées ont également été suivies dans le perméat. La *Figure VI.20* illustre l'évolution temporelle du NH_4 , du NO_2 et du NO_3 dans le perméat. Les résultats démontrent clairement l'efficacité du système dans la dégradation de la pollution azotée. Les formes azotées détectées dans le perméat se limitent aux nitrates NO_3 , qui représentent la forme finale de la dégradation de l'azote. Les concentrations de nitrites et d'ammonium ont été quasiment nulles, sauf de légères concentrations observées lors de la phase d'acclimatation au démarrage du pilote, comme cela a été le cas pour les autres paramètres.

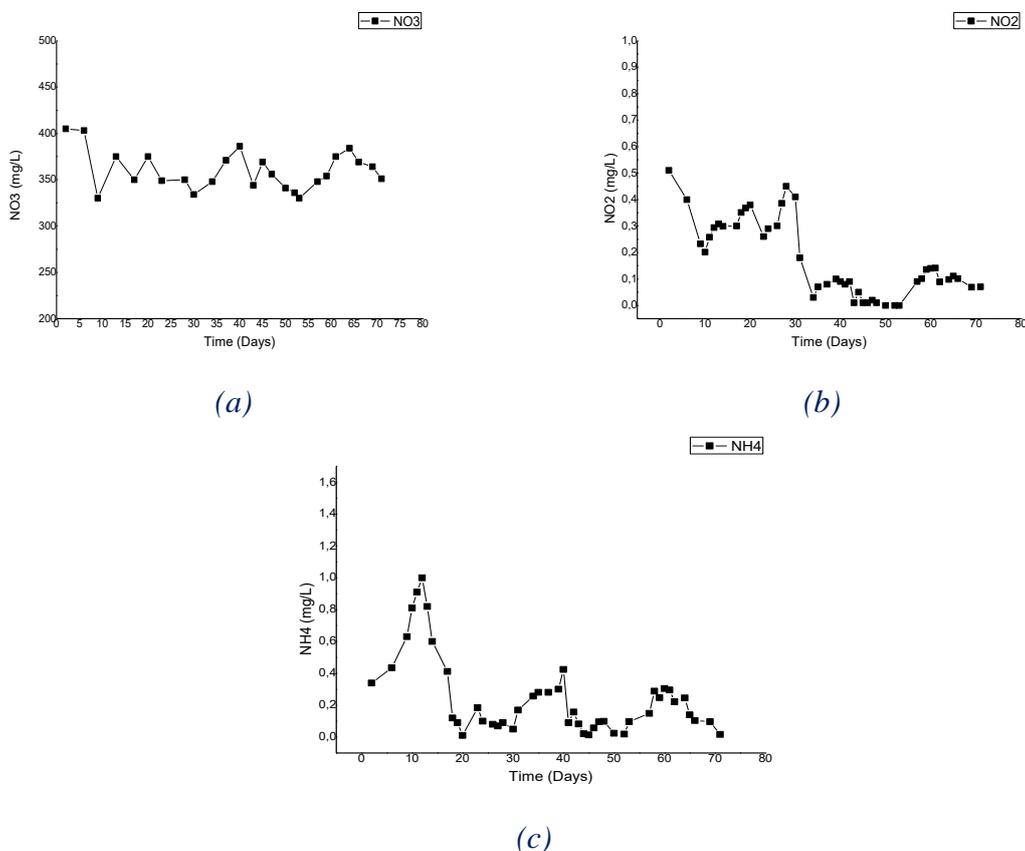


Figure VI.20 : Evolution temporelle de la (a) NO_3 , (b) NO_2 et (c) NH_4 dans le perméat durant la période de fonctionnement du pilote.

L'activité des hétérotrophes a été clairement observée à travers la dégradation du substrat carboné, de même que pour les autotrophes, où aucun effet inhibiteur n'a été détecté. En effet, une conversion quasiment complète de la forme ammoniacale à la forme oxydée a été enregistrée, avec des concentrations relativement élevées de nitrates dans le perméat.

Cela s'explique par la diversité des formes et sources d'azote présentes dans le milieu réactionnel, même avec l'apport d'AMX. Aucune accumulation de nitrites n'a été enregistrée dans le perméat, toutes les concentrations quantifiées étant inférieures à 1 mg/L , comme illustré dans la *Figure VI.20-b*.

Cela confirme que la présence d'AMX, même à des concentrations relativement élevées, n'a en aucun cas inhibé les autotrophes, et les étapes de nitrification et de dénitrification ont eu lieu sans aucune perturbation.

La présence d'AMX dans les rejets synthétiques à différents seuils semble ne pas avoir d'effet inhibiteur sur les activités des hétérotrophes et des autotrophes responsables de la dégradation du substrat carboné et de la nitrification dans le MBRI.

3.3. Evolution d'AMX dans le MBRI :

Le MBRI présente un potentiel prometteur pour l'élimination de l'AMX, contribuant ainsi à une épuration efficace des eaux usées contenant des micropolluants. Les performances de ce procédé biologique aérobie sont intimement liées à l'activité de la biomasse épuratrice, en particulier sa capacité à oxyder les matières organiques et minérales en présence des micropolluants concernés.

Cependant, il est important de noter que le transfert des microorganismes d'un milieu à un autre peut influencer leur activité, et la présence de micropolluants peut également perturber leur fonction épuratrice, inhibant ainsi leur capacité à dégrader la pollution.

La *Figure VI.21* illustre la trajectoire de l'AMX dans le perméat, mesurée par chromatographie en phase liquide via HPLC couplé à la spectrométrie de masse en tendances MS/MS, sur la période d'étude.

La *Figure VI.21-a* met en lumière l'évolution des concentrations d'AMX, introduit progressivement avec l'effluent synthétique toutes les neuf jours à des concentrations variées par incréments de 25 mg/L . Quant à la *Figure VI.21-b*, elle présente les concentrations de l'AMX mesurées dans le perméat, oscillant en moyenne entre 0.9 et $1.7 \text{ mg}_{AMX}/\text{L}$, avec un taux de réduction compris entre 97% et 100% .

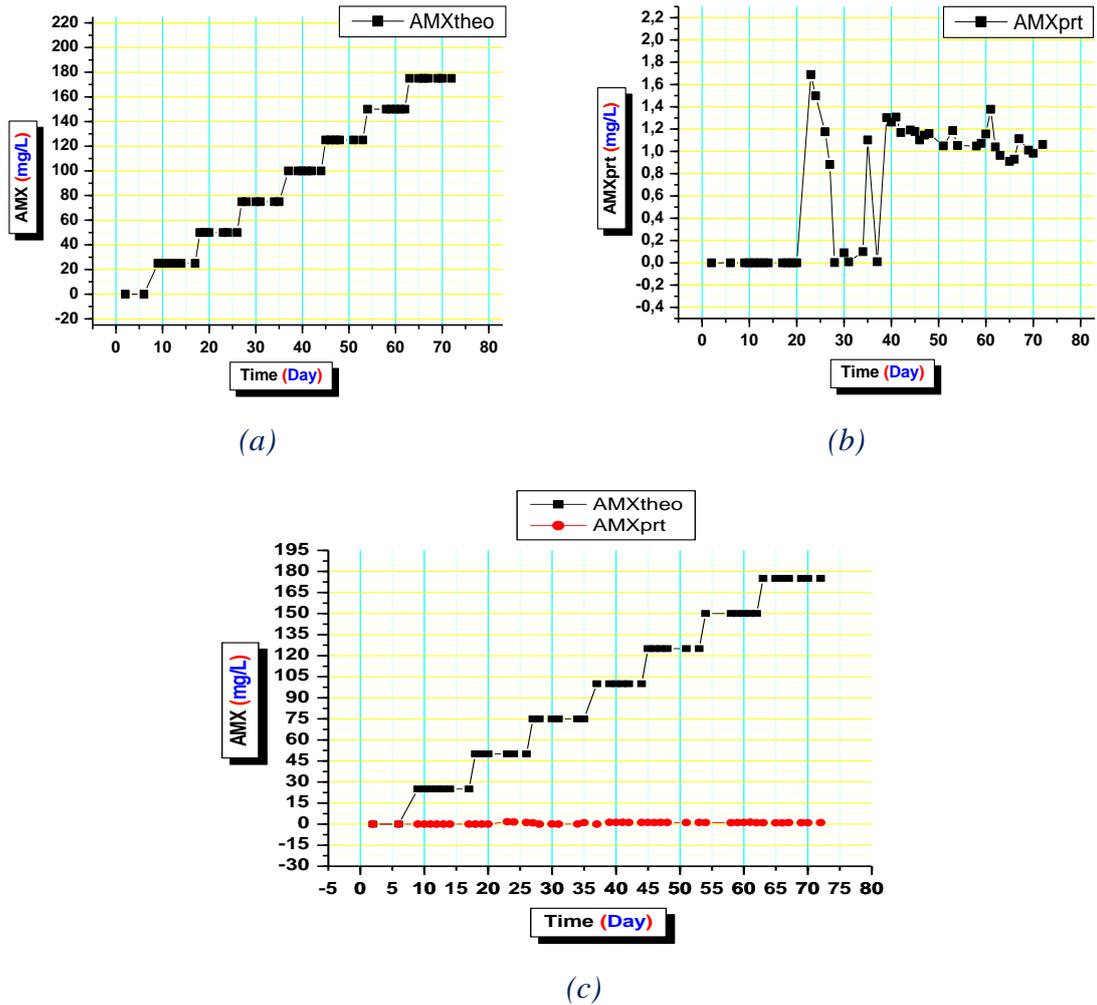


Figure VI.21 : Evolution temporelle de la (a) Concentration initiale en AMX théorique, (b) la concentration en AMX mesuré dans le perméat et (c) la superposition des concentrations en AMX initiales et dans le perméat durant la période de fonctionnement du pilote.

L'absence quasi totale d'AMX dans le perméat, en comparaison avec les concentrations appliquées dans l'influent, ne suit généralement pas les prévisions théoriques.

Plusieurs possibilités et hypothèses peuvent expliquer ce phénomène : la biosorption d'AMX dans les floccs bactériens et les biofilms formés, la rapide acclimatation des boues activées à la dégradation de cette molécule en se référant à la forte production en MVS dans le pilote et les rendements de dépollution enregistrés, ou encore la considération de l'AMX comme source de DCO et sa biodégradation avec la pollution ce qui a été initialement confirmé dans les tests en batch.

Afin de valider l'hypothèse d'une possible biosorption du micropolluant AMX dans la boue activée, une analyse de la fraction solide des boues s'avère nécessaire. Plusieurs tests par infrarouge (IR) ont été réalisés, et un exemple est présenté dans la *Figure VI.22*.

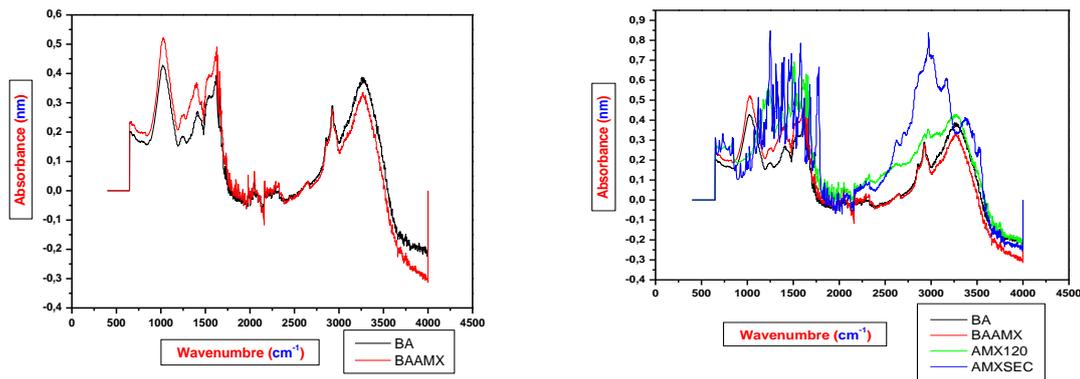


Figure VI. 22 : Spectre IR des Boues sans AMX et d'autres après l'injection d'AMX.

BA : Spectre des boues sans présence d'Amoxicilline (avant les tests) / BAAMX : Spectre obtenue après les injections d'Amoxicilline / AMX120 : Spectre d'amoxicilline (l'amoxicilline séché à 120 °C) / AMXSEC : Spectre d'amoxicilline (l'amoxicilline séché à l'air sec)

Après la superposition des spectres d'IR des différentes boues récupérées à divers seuils d'inhibition avec l'AMX et leur comparaison avec le spectre de l'AMX séché à température ambiante ou à 120 °C, les résultats indiquent qu'aucune biosorption de la molécule d'AMX n'a eu lieu. Plusieurs comparaisons ont été effectuées et elles aboutissent aux mêmes conclusions, *Annexe F*.

Le MBRI démontre des performances exceptionnelles dans l'élimination de la pollution et des micropolluants. Cela confère à ce système l'avantage d'être considéré comme un moyen efficace et robuste pour éliminer les micropolluants ayant des effets néfastes sur la biomasse épuratrice, grâce à la rapide acclimatation des boues et à la flexibilité de contrôle des paramètres de fonctionnement.

CONCLUSION :

L'étude s'est étendue sur une période totale de 75 jours, au cours de laquelle le suivi du réacteur a été effectué. Dès les premiers jours de démarrage du pilote, des fluctuations simples ont été observées dans certains paramètres mesurés, s'intensifiant au fil du temps, ce qui a été interprété comme l'acclimatation des boues aux nouvelles conditions opératoires. Les valeurs initiales de *MES* et de *MVS* étaient déjà relativement élevées, attribuables au fait que les boues d'inoculation provenaient d'une station à membrane présentant des concentrations élevées de ces deux paramètres. En raison de ces conditions opératoires, une période de latence peut se manifester dans l'évolution de la charge jusqu'à la stabilisation du système [310]. Le MBRI montre une adaptation rapide aux conditions de fonctionnement appliquées. Il semble donc que les conditions analytiques imposées au réacteur aient été

favorables à une dépollution efficace sans accumulation notable d'AMX dans le réacteur et les floccs bactériens. Le maintien d'une charge organique constante tout au long de la période d'étude permet un contrôle précis de la production de boues, qui est soutirée quotidiennement selon un volume préalablement calculé.

L'activité de la biomasse a été observée comme étant très performante et stable au fil du temps, même en présence de variations de la concentration d'AMX injectée, tout en maintenant une charge organique constante avec l'influent. Notamment, la salinité n'a montré aucune augmentation, ni dans le réacteur ni dans le perméat. Cela pourrait justifier les pourcentages élevés d'élimination de la DCO et de l'AMX enregistrés au fil du temps, particulièrement le dernier jour de l'étude. Il est à noter que les taux d'abattement ont progressé au cours de l'étude malgré le maintien constant des conditions opératoires initiales et de la charge organique d'alimentation. En maintenant les paramètres *pH*, *OD*, et température de la liqueur mixte à des niveaux optimaux, le taux d'élimination a atteint plus de 98% pour la DCO et l'AMX. Ces résultats démontrent le fort potentiel du MBRI pour le traitement des eaux usées synthétiques contenant des micropolluants.

Le rôle crucial de la membrane en tant qu'étape finale de séparation est clairement mis en évidence. La membrane démontre une efficacité totale, indépendamment de l'état de floculation de la biomasse, assurant ainsi une haute qualité d'eau traitée, surtout pendant des périodes de concentration accrue en micropolluants. En plus de la robustesse offerte par la rétention membranaire, les concentrations élevées en MES et en MVS contribuent également à la robustesse des procédés de bioréacteurs à membrane, permettant d'atténuer les variations significatives de la concentration en AMX tout en assurant une élimination efficace avec la charge organique. Ceci souligne que les eaux usées traitées par le MBRI peuvent être utilisées à diverses fins. Bien que les résultats obtenus aient été très encourageants, le mécanisme d'élimination du micropolluant AMX n'a pas été entièrement confirmé en raison d'une convergence observée entre les études menées en mode batch (tests respirométriques/ tests de biodégradation) et en continu. Cela nécessite peut-être des investigations supplémentaires sur le mode d'élimination spécifique du micropolluant en question.

CONCLUSION

GENERALE

CONCLUSION GENERALE

Depuis de nombreuses décennies, la problématique associée à la présence et aux risques potentiels des antibiotiques tels que l'amoxicilline (*AMX*) dans l'environnement est devenue une préoccupation majeure. Cette question fait l'objet de nombreuses études scientifiques, car la présence de ces substances, même à de faibles concentrations, engendre plusieurs problèmes [123]. Cette recherche se distingue en se focalisant sur la détection des résidus d'antibiotiques dans les eaux usées et leur impact sur la biomasse épuratrice.

L'objectif principal de cette thèse était d'approfondir la compréhension de l'impact des résidus d'antibiotiques présents dans les rejets d'eaux usées sur le fonctionnement des stations d'épuration. Pour ce faire, il s'agissait d'identifier l'effet de ces molécules sur la biomasse microbienne à l'aide d'un moyen robuste et rapidement accessible, pouvant être mis en œuvre *in situ* ou au laboratoire, afin d'envisager un contrôle précoce des dysfonctionnements ou des inhibitions de l'activité de la biomasse épuratrice des stations d'épuration. La mise en place d'un respiromètre répondant aux exigences d'identification des effets des antibiotiques sur la biomasse, l'analyse de la biodégradation de ces antibiotiques dans des réacteurs fonctionnant en mode discontinu (*batch*), ainsi que l'utilisation d'un procédé efficace de traitement des micropolluants, à savoir le bioréacteur à membrane, ont démontré une excellente performance dans le traitement des eaux contenant des produits pharmaceutiques. L'étude a été conduite en utilisant des effluents synthétiques ainsi que des boues activées provenant de stations d'épuration conventionnelles et à membrane.

La complexité de cette étude réside dans la variabilité de la composition et de la structure des floccs microbiens, qui peuvent différer d'une station à l'autre et évoluer au fil du temps au sein d'une même station d'épuration et plus précisément d'un même réacteur biologique influençant par la suite l'inhibition, il a été donc impératif de déterminer une méthode d'extraction et d'exploitation des résultats acquis, en ce qui concerne l'identification de l'effet inhibiteur de l'amoxicilline [94].

Actuellement, l'impact positif ou négatif des stations d'épuration sur ces micropolluants est en cours d'investigation [37]. Cependant, les résultats d'élimination sont modestes [252] par rapport à d'autres polluants [253], car les antibiotiques peuvent induire des perturbations dans le fonctionnement des stations d'épuration [91] et favoriser le maintien des bactéries résistantes [94]. Les progrès dans les techniques hybrides, notamment les *MBR*, ont

CONCLUSION GENERALE

largement contribué à résoudre plusieurs problèmes liés aux performances en termes de qualité et d'efficacité de l'épuration.

L'évaluation de l'inhibition par l'*AMX* de la biomasse a été effectuée en considérant divers scénarios de mise en œuvre. L'inhibition se manifeste de manière distincte dans les pourcentages de la réponse dose/inhibition, que ce soit à l'état liquide ou en poudre, sans distinction claire entre la réponse des hétérotrophes et des autotrophes. L'*AMX* entraîne un blocage de la consommation de la pollution apportée et réduit l'activité respiratoire, induisant ainsi un effet significatif sur l'activité microbienne. Malgré tous les efforts déployés dans les expérimentations, il n'était pas possible d'identifier un effet inhibiteur basé uniquement sur la valeur de la dose appliquée, ni d'extraire des données quantitatives et logiques. En effet, l'activité microbienne, l'état morphologique initial et la composition de la biomasse épuratrice étudiée semblent influencer le pourcentage d'inhibition et le mode d'action de la molécule d'*AMX*. Néanmoins, à ce stade, il n'est pas possible de tirer des conclusions définitives sur l'effet inhibiteur et la relation dose/inhibition dans tous les cas étudiés.

L'outil d'investigation utilisé dans cette étude présente un intérêt particulier pour la surveillance et le contrôle de la présence d'antibiotiques ou d'autres substances toxiques dans les eaux usées. Toutefois, pour établir un lien clair entre la dose et l'inhibition, des investigations supplémentaires doivent être menées dans le cadre des tests respirométriques. Ces investigations pourraient inclure l'augmentation du rapport substrat/biomasse noté S_0/X_0 , imposé dans les tests respirométriques, ainsi que l'utilisation de substrats synthétiques plus complexes. Cela permettrait de révéler l'effet inhibiteur sur divers métabolismes des décomposeurs microbiens, tels que l'hydrolyse, la prédigestion par des exoenzymes ou des enzymes de surfaces pour réduire les dimensions de la molécule de substrat, le stockage microbien, la perméation ou franchissement de la membrane cellulaire, la lyse microbienne, etc. Ces modes d'action au sein de la cellule microbienne devraient être suivis de manière quantitative en utilisant la même technique respirométrique. Il est important de noter que, dans cette étude, les rapports imposés sont considérés comme faibles, et le substrat utilisé est considéré comme facilement biodégradable, l'étude se concentre principalement sur l'effet inhibiteur, en particulier sur la combustion immédiate ou différée des substrats introduits, sans atteindre le développement de nouvelles cellules (multiplication microbienne), ce qui pourrait brouiller l'effet d'inhibition.

Les recherches menées dans des réacteurs discontinus, en utilisant différentes biomasses et en surveillant la présence de la molécule inhibitrice dans les phases liquide et solide, ont mis en évidence une compétition potentielle entre l'utilisation du substrat et de

l'*AMX*. Cette compétition a montré que la vitesse de dégradation de l'*AMX* était moins intense que celle d'un substrat binaire facilement biodégradable. Cette rivalité peut ralentir la biodégradation du substrat, ce qui réduit les performances des bioréacteurs.

Au sein de cette problématique, bien que l'acclimatation de la boue activée soit une étape cruciale pour la dégradation des micropolluants, nous avons entrepris d'évaluer ce qui semble être un avantage intrinsèque des *MBR* dans la promotion de la biodégradation des composés pharmaceutiques présents à de faibles concentrations : le fonctionnement à des âges de boues élevés et à des concentrations élevées en biomasse. Pour objectif de mieux appréhender le processus d'élimination et la réponse du pilote *MBRI* à la présence de la molécule d'*AMX* dans les eaux usées, tout en améliorant la qualité des effluents traités. Une fois de plus, la capacité du *MBRI* à éliminer l'*AMX* sans générer de boues ou de bactéries résistantes dans le milieu récepteur a été soulignée. En effet, cette technique permet de retenir les boues dans leur bioréacteur, pouvant ensuite être soumises à d'autres traitements tels que l'incinération. L'étude sur le *MBRI* a duré 75 jours au total, au cours desquels des activités de suivi du réacteur ont été effectuées. Dès les premiers jours de fonctionnement du pilote, des fluctuations simples de certains paramètres mesurés ont été observées, démontrant une adaptation rapide aux conditions de travail imposées. Les taux d'abattement ont été améliorés au fil du temps, dépassant les 98% pour la *DCO* et l'*AMX*, même si les conditions initiales sont restées constantes et les concentrations d'inhibiteur sont progressivement augmentées.

La membrane affiche une efficacité totale, indépendamment de l'état de floculation de la biomasse, assurant ainsi une qualité élevée des eaux traitées, surtout pendant les périodes d'augmentation de la dose d'*AMX*. La robustesse résultant de la rétention membranaire et la concentration élevée en *MES* et *MVS* ajoutent un élément supplémentaire à la performance du pilote, permettant d'atténuer les variations importantes d'*AMX* et garantissant une élimination très efficace. Enfin, les analyses par *HPLC*, *LC-MS-MS*, *UV-visible* et *IR* ont révélé une diminution significative grâce au *MBRI*, contribuant à la durabilité et à la valorisation de l'eau obtenue. Des eaux de meilleure qualité favoriseraient la réutilisation agricole et/ou industrielle des effluents traités sans risque pour l'environnement. Bien que l'absence presque totale d'*AMX* dans le perméat ne puisse être confirmée, faute de temps pour suivre les analyses sur la fraction solide et/ou liquide, le *MBR* en condition aérée a permis de recueillir des données supplémentaires sur l'élimination de l'*AMX*. Le couplage potentiel de cette technologie avec les énergies renouvelables ouvre la voie à une réduction significative des coûts d'exploitation et de l'empreinte écologique.

CONCLUSION GENERALE

Les résultats obtenus dans cette étude démontrent d'une part que la technique respirométrique peut être considérée comme un moyen efficace, rapide et robuste pour détecter la toxicité, principalement responsable des dysfonctionnements des *STEP*. Son utilisation dans diverses conditions opératoires permet de mettre en évidence de manière plus précise les effets inhibiteurs. D'autre part, le procédé de *MBR* répond aux exigences d'adaptation de la biomasse à la présence de composés pharmaceutiques, notamment l'*AMX*. L'évaluation à long terme de cette technologie, en conditions réelles, sur des effluents hospitaliers, de préférence en sortie des différents services hospitaliers à citer le service d'oncologie, ou sur des effluents de l'industrie pharmaceutique, permettra d'évaluer le potentiel à l'échelle industrielle des bioréacteurs à membrane dans l'élimination biologique des composés pharmaceutiques et de leur toxicité associée.

Cette étude ouvre la voie à plusieurs perspectives, notamment l'utilisation de substrats synthétiques plus complexes, ainsi que l'évaluation ultérieure des effets inhibiteurs sur différents métabolites microbiens tels que l'hydrolyse, le stockage intracellulaire, la lyse microbienne, etc. De plus, il serait intéressant de mener des expérimentations avec des rapports S_0/X_0 plus importants. En outre, il convient d'envisager des expérimentations sur des biomasses présentant des morphologies distinctes afin de mieux comprendre les réponses aux tests d'inhibition en fonction de ces caractéristiques, permettant ainsi de tirer des conclusions définitives et concluantes.

Approfondir l'étude de l'impact de cette molécule sur les bactéries autotrophes en tenant compte de son effet sur la respiration exogène et endogène. En parallèle, envisager des études sur l'effet inhibiteur d'autres molécules pharmaceutiques. Une modélisation de tous les phénomènes observés et soulignés, incluant le blocage, la compétition, etc., pourrait permettre de prédire le comportement du traitement des effluents contaminés par ces rejets spécifiques dans différents réacteurs biologiques.

BIBLIOGRAPHIE

- [01] B. Cēbere et al., 2009, « Toxicity Tests For Ensuring Successful Industrial Wastewater Treatment Plant Operation », *Environmental And Climate Technologies*, Issn 1691-5208.
- [02] V. Surerusl et al., 2014, « Activated Sludge Inhibition Capacity Index », *Bra. J. Che. Eng.* vol.31 no.2 São Paulo, <http://dx.doi.org/10.1590/0104-6632.20140312s00002516>
- [03] S. Hartmann et al., 2013, « Inhibition Of Activated Sludge Respiration By Heavy Metals », *Proceedings of International Conference on Environment, Energy, Ecosystems and Development*
- [04] N. Christofi et al., 2002, « A Comparison Of Five Rapid Direct Toxicity Assessment Methods To Determine Toxicity Of Pollutants To Activated Sludge », *Chemosphere* 47, 535–545
- [05] V. O. Herrera et al., 2011, « Toxicity Of Copper(Ii) Ions To Microorganisms In Biological Wastewater Treatment Systems », *Science of the Total Environment* 412-413, 380–385, doi:10.1016/j.scitotenv.2011.09.072
- [06] L. Mrafkova et al., 2003, « Preliminary Evaluation Of Inhibitory Effects Of Some Substances On Aerobic And Anaerobic Treatment Plant Biomasses », *Chem. Biochem. Eng. Q.*17(3) 243–247
- [07] G. Insel et al., 2006, « Unified Basis For The Respirometric Evaluation Of Inhibition For Activated Sludge », *Journal of Environmental Science and Health Part A*, 41:1763–1780, DOI: 10.1080/10934520600778895
- [08] P. Foladori et al., 2014, « Toxicant Inhibition In Activated Sludge: Fractionation Of The Physiological Status Of Bacteria », *Journal of Hazardous Materials* 280,758–766,<http://dx.doi.org/10.1016/j.jhazmat.2014.09.003>
- [09] A. S. Stasinakis et al., 2002, « Effect Of Chromium (Vi) On Bacterial Kinetics Of Heterotrophic Biomass Of Activated Sludge », *Water Research* 36, 3341–3349
- [10] A. N. Morse et al., 2003, « Fate And Effect Of Amoxicillin In Space And Terrestrial Water Reclamation Systems », These de doctorat, Civil Engineering Graduate Faculty of Texas Tech University
- [11] M. N. Mater et al., 2014, « Evaluation De L'impact (Eco) Toxicologique De Résidus Médicamenteux Présents Dans Les Effluents Hospitaliers, Urbains Et Dans L'environnement A L'aide D'une Batterie De Bio-Essais Et De Biomarqueurs », These de doctorat, Institut National Polytechnique de Toulouse (INP Toulouse)
- [12] B. Pabitra et al., 2010, « Evaluation Of Toxicity Of Pharmaceuticals To The Activated Sludge Treatment Plant », Master of Science Thesis, Faculty of Science and Environmental Engineering
- [13] L. F. D. Zambrano et al., 2009, « Bioréacteur A Membrane Externe Pour Le Traitement D'effluents Contenant Des Médicaments Anticancéreux: Elimination Et Influence Du Cyclophosphamide Et De Ses Principaux Métabolites Sur Le Procédé », Thèse de doctorat, Génie des Procédés et de l'environnement, L'institut National Polytechnique de Toulouse.
- [14] A. Lallai et al., 2002, « The Effects Of Certain Antibiotics On Biogas Production In Anaerobic Digestion Of Pig Waste Slurry », *Bioresource Technology* 82, 205-208
- [15] E. Ubay-Cokgor et al., 2007, « Critical Appraisal Of Respirometric Methods For Metal Inhibition On Activated Sludge », *Journal of Hazardous Materials B*139, 332–339
- [16] S. Gartiser et al., 2007, « Anaerobic Inhibition And Biodegradation Of Antibiotics In Iso Test Schemes », *Chemosphere* 66, 1839–1848
- [17] B. Halling-Sørensen et al., 2001, « Inhibition Of Aerobic Growth And Nitrification Of Bacteria In Sewage Sludge By Antibacterial Agents », *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 40, 451– 460. DOI: 10.1007/s002440010197
- [18] A. Al-Ahmad et al., 1999, « Biodegradability Of Cefotiam, Ciprofloxacin, Meropenem, Penicillin G, And Sulfamethoxazole And Inhibition Of Waste Water Bacteria », *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 37, 158–163
- [19] W. Verstraete et al., 1996, « Simultaneous Determination Of Inhibition Kinetics Of Carbon Oxidation And Nitrification With A Respirometer », *Wat. Res.* Vol. 30. No. 4. pp. 825-836.

- [20] M. Farre et al., 2003, « Toxicity Testing Of Wastewater And Sewage Sludge By Biosensors, Bioassays And Chemical Analysis », *Trends Anal Chem*, 22(5):299 – 310.
- [21] N. Christofi et al., 2002, « An Atp Luminescence Method For Direct Toxicity Assessment Of Pollutants Impacting On The Activated Sewage Sludge Process », *Water Research* 36, 1493–1502
- [22] K. Y. Wong et al., 1997, « A Luminescent-Based Scanning Respirometer For Heavy Metal Toxicity Monitoring », *Biosensors & Bioelectronics* Vol. 12, No. 2, pp. 125-133,
- [23] C. Tomei et al., 2004, « Toxicity Assessment Of Common Xenobiotic Compounds On Municipal Activated Sludge: Comparison Between Respirometry And Microtox », *Water Research* 38, 2103–2110
- [24] D. Brown, et al., 1981, « The Assessment Of The Possible Inhibitory Effect Of Dyestuffs On Aerobic Waste-Water Bacteria, Experience With A Screening Test », *Chemosphere* 10 (3): 245-261.
- [25] D. J. Bealing et al., 2003, « Document Iso/Tc147/Wgi/N.183 », International Organization for Standardization.
- [26] M. Henze et al., 1992, « Characterization Of Wastewater For Modelling Of Activated Sludge Processes », *Water Sci. Technol.* 25(6) 1-15.
- [27] G. Cormier et al., 2014, « Dégradation Chimique Et Biologique De Neuf Contaminants Emergents Dans Les Eaux De Surfaces Et Les Effluents Primaires D'eaux Usées Municipales », Thèse de Maître des sciences, Faculté des Arts et des Sciences, Université de Montréal, France
- [28] S. Ségolène et al., 2012, « Prise En Compte Dans La Prescription Du Devenir Environnemental Des Résidus Médicamenteux », Thèse de Doctorat en Médecine, Faculté de Médecine de Nancy, Université de Lorraine, France
- [29] O. Gonzalez et al., 2007, « Sulfamethoxazole Abatement By Photo-Fenton Toxicity, Inhibition And Biodegradability Assessment Of Intermediates », *Journal of Hazardous Materials* 146 459–464,doi:10.1016/j.jhazmat.2007.04.055
- [30] T. A. Ternes et al., 2007, « The Occurrence Of Micropollutants In The Aquatic Environment: A New Challenge For Water Management », *Water Science & Technology*, 55(12), 327-332.
- [31] Z. Z. Noor et al., 2013, « Membrane Bioreactor: Applications And Limitations In Treating High Strength Industrial Wastewater », *Chemical Engineering Journal* 225, 109–119
- [32] J. V. Hunter et al., 1965, « The Composition Of Domestic Sewage Fractions », *J. Water Pollution Control Federation*, 37, 1142
- [33] L. Walter et al., 1961, « Composition Of Sewage And Sewage Effluents », Parts 1 and 2, *Water Sewage Works*, 108, n°s 11 et 12, 428-478
- [34] D. A. Rickert et al., 1971, « General Nature Of Soluble And Particulate Organics In Sewage And Secondary Effluent », *Water Research*, 5, 421
- [35] K. Ligman et al., 1974, « Household Wastewater Characterization », *J. Envi. Eng. Div., ASCE*, 100, 201
- [36] N. Tambo et al., 1976, « Application Of Gel Chromatography To The Evaluation Of Removal Efficiency Of Organic Impurities In Wastewater Treatment Processes », *Advanced Wastewater Treatment JRGWP Seminar*, Tokyo
- [37] G. Man et al., 1969, « Notes On Activated Sludge », *Smith and Loveless Co., Lenexa, Kans.*, 2ème édition.
- [38] W. E. Dobbins et al., 1961, « Advances In Sewage Treatment Design, Sanitary Engineering Division, Metropolitan Section », *Manhattan College*
- [39] W. W. Eckenfelder et al., 1961, « Biological Waste Treatment », *Pergamum Press, Oxford*
- [40] W. W. Eckenfelder et al., 1969, « Laboratory And Design Procedures For Waste Treatment Processes Design », *CRWR Rep. 31, University of Texas, Austin, Texas*
- [41] A. Alighardashi et al., 2009, « Acute Sensitivity Of Activated Sludge Bacteria To Erythromycin », *Journal of Hazardous Materials* 172 (2-3), 685-692.
- [42] S. Pepin et al., 2006, « La Consommation D'antibiotiques : Situation En France Au Regard Des Autres Pays Européens », *Points de repère* n°6. Issn : 1777-7674.
- [43] J. Davies et al., 2006, « The World Of Subinhibitory Antibiotic Concentrations », *Current opinion in microbiology* 9, 445-453.

- [44] F. Baquero et al., 2008, « Antibiotics And Antibiotic Resistance In Water Environments », Current opinion in biotechnology 19, 260-265.
- [45] M. Henze et al., 1987, « Activited Sludge Model N° 1 », IAWPRC, London.
- [46] M. Henze et al., 1987, « Theories For Estimation Of The Fraction Of Denitrifies In Combined Nitrifying Treatment Plants », Water Res., 21, 1521.
- [47] M. Henze et al., 1989, « The Influence Of Rax Wastewater Biomass On Activated Sludge Oxygen Respiration Rates And Denitrification Rates », Wat. Sci. Tech., 21. 603.
- [48] S. E. Jepsen et al., 1992, « Denitrification In Submerged Filters Of Nitrified Wastewater And Chemical Pre-Precipitated Wastewater », In: Chemical water and wastewater treatment II. Nice Springer Verlag.
- [49] D. L. Nelson et al., 2005, « Amino Acids, Peptides, And Proteins Lehninger Principles Of Biochemistry », 4th edition. Ch.3: pp. 75-115. New York, NY, États-Unis. W.H. Freeman and Company.
- [50] L. Shargel et al., 2004, « Applied Biopharmaceutics And Pharmacokinetics », 5th edition. États-Unis, McGraw-Hill Medical.
- [51] M. Mahendraker et al., 1995, « Respirometry In The Environmental Engineering », Envi sci healt 30 (04), 713-734
- [52] E. Nakashima et al., 1984, « Kinetics And Mechanism Of In Vitro Uptake Of Amino-B-Lactam Antibiotics By Rat Small Intestine And Relation To The Intact-Peptide Transport System », Biochemical pharmacology, 33: 3345-3355.
- [53] P. J. Sinko et al., 1988, « Characterization Of The Oral Absorption Of B-Lactam Antibiotics II: Competitive Absorption And Peptide Carrier Specificity », Journal of pharmaceutical sciences. 78: 723-727.
- [54] D. N. Lyons et al., 1971, « Optimizing A Kraft Mill Water Reuse System », Water-1970, AICHE, Chem. Eng. Progress Syst. Series, 67, n°: 107,381
- [55] L. Ferrando-Climont et al., 2012, « Comprehensive Study Of Ibuprofen And Its Metabolites In Activated Sludge Batch Experiments And Aquatic Environment », Science of The Total Environment 438: 404-413
- [56] P. Hartemann et al., 2005, « La Problématique Des Effluents Liquides Hospitaliers », Revue générale. Hygiènes, 8
- [57] J. Lienert et al., 2007, « Screening Method For Ecotoxicological Hazard Assessment Of 42 Pharmaceuticals Considering Human Metabolism And Excretory Routes », Environ. Sci. Technol. 41, 4471-4478.
- [58] D. G. J. Larsson et al., 2007, « Effluent From Drug Manufactures Contains Extremely High Levels Of Pharmaceuticals », Journal of Hazardous Materials 148:751-5.
- [59] M. H. Gerardi et al., (2006), « Wastewater Bacteria, Wastewater Microbiology Series », WileyInterscience. ISBN-10: 0-471-20691-1, 255 p.
- [60] M. C. L. Da-Silva et al., 2008, « Effet De La Variabilité Du Fractionnement De La Pollution Carbonnée Sur Le Comportement Des Systèmes De Traitement Des Eaux Usées Par Boues Activées », Thèse de doctorat, Institut National Polytechnique, Lorraine 182 p.
- [61] M. Wagner et al., 2002, « Bacterial Community Composition And Function In Sewage Treatment Systems », Current Opinion in Biotechnology 13, 218-227.
- [62] P. D'Abzac et al., 2010, « Characterization Of The Mineral Fraction Associated To Extracellular Polymeric Substances (Eps) In Anaerobic Granular Sludge », Environ Sci Technol 44, 412-8.
- [63] J. Wingender et al., 1999, « Microbial Extracellular Polymeric Substances: Characterization, Structures And Function », Berlin Heidelberg: SpringerVerlag, p. 1-18.
- [64] Z. H. Li et al., 2006, « The Influence Of Starvation Phase On The Properties And The Development Of Aerobic Granules », Enzyme and Microbial Technology 38, 670-674.
- [65] I. D. S. Henriques et al., 2007, « The Role Of Extracellular Polymeric Substances In The Toxicity Response Of Activated Sludge Bacteria To Chemical Toxins », Water Research 41, 4177-4185.
- [66] M. N. Pons et al., 1999, « Particle Morphology: From Visualisation To Measurement », Powder Technology 103, 44-57.

- [67] C. P. Chu et al., 2004a, « Multiscale Structures Of Biological Flocs », *Chemical Engineering Science* 59, 1875-1883.
- [68] C. P. Chu et al., 2005, « Floc Model And Intrafloc Flow », *Chemical Engineering Science* 60, 565-575.
- [69] C. P. Chu et al., 2004b, « Advective Flow In A Sludge Floc », *Journal of Colloid and Interface Science* 277, 387-395.
- [70] N. Le-Minh et al., 2010, « Fate Of Antibiotics During Municipal Water Recycling Treatment Processes », *Water Research* 44(15), 4295-4323.
- [71] A. Joss et al., 2006, « Biological Degradation Of Pharmaceuticals In Municipal Wastewater Treatment: Proposing A Classification Scheme », *Water Research* 40, 1686-1696.
- [72] P. Drillia et al., 2005, « On The Occasional Biodegradation Of Pharmaceuticals In The Activated Sludge Process: The Example Of The Antibiotic Sulfamethoxazole », *Journal of Hazardous Materials* 122(3), 259-265.
- [73] W. Eckenfelder et al., 1992, « Activated Sludge Process Design And Control : Theory And Practice », Volume 1. Technomic 268p. ISBN No. 87762-889-0
- [74] M. N. Pons et al., 2009, « Implementation Of Micropollutant Fate In Wastewater Treatment Plant Benchmark Simulation Models », *Proceedings, International Conference Xenowac*. 11-13, Chypre.
- [75] M. Wagner et al., 1993, « Probing Activated Sludge With Oligonucleotides Specific For Proteobacteria: Inadequacy Of Culture-Dependent Methods For Describing Microbial Community Structure », *Appl. Environ. Microbiol.* 59, 1520- 1525.
- [76] J. L. Campos et al., 2001, « Effect Of Two Broadpectrum Antibiotics On Activity And Stability Of Continuous Nitrifying System », *Applied Biochemistry and Biotechnology - Part A Enzyme Engineering and Biotechnology* 95(1), 1-10.
- [77] P. L. Toutain et al., 2004, « Bioavailability And Its Assessment », *Journal of veterinary pharmacology and therapeutics*, 27: 455-466.
- [78] K. E. Thummel et al., 2005, « Design And Optimization Of Dosage Regimens: Pharmacokinetics Data. Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis Of Therapeutics », Burton, L., Lazo, J., H., Parker, K.L. McGraw-Hill Professionnal: 1798.
- [79] P. G. Welling et al., 1977, « Bioavailability Of Ampicillin And Amoxicillin In Fasted And Nonfasted Subjects », *Journal of pharmaceutical sciences*, 66: 549-552.
- [80] J. R. E. Castillo et al., 1996, « Biodisponibilité Orale Et Parentérale Des Pénicillines Naturelles Utilisées En Prophylaxie De La Streptococcie Chez Le Porcelet Sevré », *Sciences cliniques vétérinaires*, Saint-Hyacinthe, Université de Montréal. Mémoire de maîtrise : 100
- [81] M. Spérandio et al., 1998, « Développement D'une Procédure De Compartimentation D'une Eau Résiduaire Urbaine Et Application A La Modélisation Dynamique De Procédés A Boues Activées », *Thèse de doctorat, Génie des Procédés*, INSA, Toulouse
- [82] APHA, AWWA and WPCF, 1976, « Standard Methods For The Examination Of Water And Wastewater », 14th ed., Amer. Public Health Assoc.
- [83] A. D. Watson et al., 1987, « Effect Of Different Intervals Between Dosing And Feeding On Systemic Availability Of Penicillin V In Dogs », *Journal of veterinary pharmacology and therapeutics*, 10: 90-95.
- [84] A. Tsuji et al., 1995, « Intestinal Absorption Of Beta-Lactam Antibiotics. Peptidebased Drug Design. Amidon, G.L. Et Taylor, M.D », Washington DC É.U., American Chemical Society: 101-134.
- [85] E. B. Muller et al., 1995, « Aérobie Domestic Wastewater Treatment In A Pilot Plant With Complete Sludge Retention By Cross-Flow Filtration », *Wal Res* 28(4), 1179-1189.
- [86] A. Santos et al., 2011, « Membrane Bioreactors: Two Decades Of Research And Implementation », *Desalination*, 273, 148-154.
- [87] L. H. M. L. M. Santos et al., 2010, « Ecotoxicological Aspects Related To The Presence Of Pharmaceuticals In The Aquatic Environment », *Journal of Hazardous Materials* 175, 45-95.

- [88] L. Santos et al., 2013, « Contribution Of Hospital Effluents To The Load Of Pharmaceuticals In Urban Wastewaters: Identification Of Ecologically Relevant Pharmaceuticals », *Science of the Total Environment* 461-462, 302-316.
- [89] J. C. Remigy et al., 2010, « Filtration Membranaire (01, Nf, Uf), Présentati Membranes Et Modules », *Technique de l'Ingénieur*
- [90] D. A. Spyker et al., 1977, « Pharmacokinetics Of Amoxicillin : Dose Dependence After Intravenous, Oral And Intramuscular Administration », *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 11: 132-141.
- [91] B. Bretschneider et al., 1998, « Intestinal Transport Of B-Lactam Antibiotics: Analysis Of The Affinity At The H+/Peptide Symporter (Pept1), The Uptake Into Caco-2 Cell Monolayers And The Transepithelial Flux », *Pharmaceutical Research*, 16: 55-61
- [92] A. Massé et al., 2002, « Bioréacteur A Membrane Immergées Pour Le Traitement Des Eaux Résiduaire Urbaines : Spécificités Physico-Chimique Du Milieu Biologique Et Colmatage », Thèse de doctorat, Institut National des Sciences Appliquées de Toulouse, France.
- [93] K. Yamamoto et al., 1989, « Direct Solid-Liquid Séparation Using Hollow Fiber Membrane In An Activate Sludge Aération Tank », *Water Science Technology*, 21, pp.43-54.
- [94] M. Rowland et al., 1995, « Clinical Pharmacokinetics: Concepts And Applications », 3rd edition. Media, PA, É.-U., Williams & Wilkins.
- [95] A. Fane et al., 2004, « Membrane Technology - The Key To Water Reuse », IWA Specialized conférence on Water environment membrane technology (WEMT), Séoul, IWA.
- [96] Y. Lee et al., 2003, « Effects Of Predation And Orp Conditions On The Performance Of Nitrifiers In Activated Sludge Systems », *Water Research*, 37, (17), 4202-4210.
- [97] S. Rosenberger et al., 2002, « Filterability Of Activated Sludge In Membrane Bioreactors », *Desalination*, 146, (1-3), 373-379.
- [98] T. Stephenson et al., 2000, « Membrane Bioreactors For Wastewater Treatment », London, IWA.
- [99] J. Wagner et al., 2000, « Sludge Production In Membrane Bioreactors Under Different Conditions », *Water Science Technol.* 41(10-11), 251-258.
- [100] S. Holles et al., 2001, « Treatment Of Urban Wastewater In A Membrane Bioreactor At A High Organic Loading Rates », *Biotechnol.* 92, 95-101.
- [101] H. Yasui et al., 1996, « A Full-Scale Opération Of A Novel Activated Sludge Process Without Excess Sludge Production », *Water Science Technol.* 34 (3-4), 395-404.
- [102] J. Lobos et al., 2006, « Dynamique De Populations Epuratives En Réacteur Fermé Et En Bioréacteur A Membrane Continu Et Séquence », Thèse pour l'obtention du grade de docteur de l'Université de Montpellier II, France
- [103] M. Ogoshi et al., 2000, « Application Of Mbr To An Easily Installed Mbr Wastewater Treatment Plant », *Water Science and Technology*, Volume 41, n° 10-11 287-293.
- [104] W. K. Lewis et al., 1924, « Principles Of Gas Absorption », *Ind. Eng. Chem.* 16, 1215.
- [105] P. V. Danckwerts et al., 1951, « Significance Of Liquid Film Coefficients In Gas Absorption », *Ind. Eng. Chem.* 43, 1460.
- [106] W. E. Dobbins et al., 1964, « Mechanism Of Gas Absorption By Turbulent Liquid In Advances In Water Pollution Research », Vol. 2. Oxford, Pergamon Press.
- [107] F. L. Schmit et al., 1975, « Diffused Air In Deep Tank Aeration », *Proc. 30th Ind. Waste Conf. Lafayette, Ind. Purdue Univ.*
- [108] K. R. Imhoff et al., 1972, « Influence Of Temperature And Turbulence On The Oxygen Transfer In Water », *Proc. 6th Int'l Conf. Water Poll. Res. Oxford, England, Pergamon Press, Jerusalem.*
- [109] J. Metzger et al., 1967, « Role Of Fluid Properties In Gas Transfer », *Environ. Sci. Tech.* 1, 57.
- [110] J. D. Borkowski et al., 1967, « Experimental Evaluation Of Liquid Film Resistance In Oxygen Transfer To Microbial Cells », *Applied Microbiology*. 15, 1483.
- [111] R. Kormanik et al., 1976, « How Does Tank Geometry Affect The Oxygen Transfer Rate Of Mechanical Surface Aerators », *Water Sew. Works.* 123, 1, 64.
- [112] K. H. Kalbaskopf et al., 1972, « Flow Velocities In Aeration Tanks With Mechanical Aerators », *Water Research*. 6, 413.

- [113] T. R. Camp et al., 1946, « Sedimentation And The Design Of Settling Tanks », *Trans. ASCE*, 111, 895
- [114] D. M. Ditro et al., 1975, « Statistical Design Of Equalization Basin », *J. Environ. Eng. Div., ASCE*, 1, 101, 917
- [115] A. C. Epstein et al., 1971, « Full Scale Aeration Studies Of Static Aeration Systems », Permutit Co., report of kenics Co. Houston, TX
- [116] G. Heari et al., 1978, « Les Eaux Usées Dans L'agglomérations Urbaines Ou Rurales », Edition Eyrolles, p : 243
- [117] B. Colette et al., 1999, « Elimination Des Effluents Liquides Des Etablissements Hospitaliers », Centre de coordination de la lutte contre les infections nosocomiales Interrégional Paris-Nord.
- [118] J. Pascal et al., 1999, « Caractérisation Et Gestion Des Rejets Liquides Hospitaliers – Etude Particulière De La Situation Du C.H. De Hyères (Var) », Mémoire de fin d'études. Ecole Nationale de la Santé publique, France
- [119] S. Khaoulani et al., 2003, « Traitement D'eaux Usées Par Adsorption Sur Des Polymères De Cyclodextrine Et Développement De Capteurs Chimiques A Base De Membranes De Verres De Chalcogénures Destinées A La Détection Des Ions Hg²⁺ », Université du Littoral Côte d'Opale, 2015. Français. ffNNT : 2015DUNK0386ff. fftel-02137940f
- [120] M. Henza et al., 2002, « Wastewater Treatment Biological And Chemical Processes », 3eme ed, Springer-verlag Berlin
- [121] H. Singer et al., 2010, « Determination Of Biocides And Pesticides By On-Line Solid Phase Extraction Coupled With Mass Spectrometry And Their Behaviour In Wastewater And Surface Water », *Environmental Pollution* 158 (10): 3054-3064
- [122] R. Loos et al., 2009, « Eu-Wide Survey Of Polar Organic Persistent Pollutants In European River Waters », *Environmental Pollution* 157 (2): 561-568
- [123] K. Fent et al., 2006, « Ecotoxicology Of Human Pharmaceuticals », *Aquatic Toxicology* 76 (2): 122-159.
- [124] M. J. Capdeville et al., 2011, « Etudes Des Cycles Biogéochimiques Des Contaminants Organiques Dits "Emergents" Dans Les Systèmes Aquatiques », Thèse de l'université Bordeaux 1 - numéro d'ordre 4303
- [125] J. Heidler et al., 2008, « Meta-Analysis Of Mass Balances Examining Chemical Fate During Wastewater Treatment », *Environmental Science & Technology* 42 (17): 6324-6332.
- [126] S. Tavazzi et al., 2012, « Occurrence And Levels Of Selected Compounds In European Sewage Sludge Samples », [http://ec.europa.eu/dgs/jrc/downloads/jrc-76111_lb_na_25598_en_n .pdf](http://ec.europa.eu/dgs/jrc/downloads/jrc-76111_lb_na_25598_en_n.pdf). (consulté le 4 septembre 2013).
- [127] J. F. Yang et al., 2010, « Simultaneous Determination Of Four Classes Of Antibiotics In Sediments Of The Pearl Rivers Using Rrlc–Ms/Ms », *Science of The Total Environment* 408 (16): 3424-3432
- [128] P. Vazquez-Roig et al., 2012, « Risk Assessment On The Presence Of Pharmaceuticals In Sediments, Soils And Waters Of The Pego–Oliva Marshlands (Valencia, Eastern Spain) », *Science of the Total Environment* 440: 24-32
- [129] G. N. Jawecki et al., 2008, « Evaluation Of In Vitro Biotransformation Of Ropranolol With Hplc, Ms/Ms, And Two Bioassays », *Environmental Toxicology* 23 (1): 52-58
- [130] A. Jelić et al., 2009, « Multi-Residue Method For Trace Level Determination Of Pharmaceuticals In Solid Samples Using Pressurized Liquid Extraction Followed By Liquid Chromatography/Quadrupole-Linear Ion Trap Mass Spectrometry », *Talanta* 80 (1): 363-371
- [131] A. Hartmann et al., 1998, « Identification Of Fluoroquinolone Antibiotics As The Main Source Of Umu C Genotoxicity In Native Hospital Wastewater », *Environmental Toxicology and Chemistry* 17 (3): 377-382
- [132] B. I. Escher et al., 2010, « Mixture Toxicity Of The Antiviral Rug Tamiflu (Oseltamivir Ethylester) And Its Active Metabolite Oseltamivir Acid », *Aquatic Toxicology* 96 (3): 194-202
- [133] D. F. Feldmann et al., 2008, « Occurence, Fate And Assessment Of Polar Metamizole (Dipyrone) Residues In Hospital And Municipal Wastewater », *Chemosphere*, 71, 1754-64 doi:10.1016/j.chemosphere.11.032.

- [134] D. W. Kolpin et al., 2002, « Pharmaceuticals, Hormones, And Other Organic Wastewater Contaminants In U.S. Streams, 1999-2000: A National Reconnaissance », *Environmental Science & Technology* 36 (6): 1202-1211
- [135] M. J. Focazio et al., 2008, « A National Reconnaissance For Pharmaceuticals And Other Organic Wastewater Contaminants In The United States, Untreated Drinking Water Sources », *Science of the Total Environment* 402 (2-3): 201-216
- [136] T. A. Ternes et al., 2001, « Analytical Methods For The Determination Of Pharmaceuticals In Aqueous Environmental Samples », *Trends Anal Chem*, 20, 419-434.
- [137] A. Joss et al., 2005, « Removal Of Pharmaceuticals And Fragrances In Biological Wastewater Treatment », *Water Res*, 2005, 39, 3139-3152.
- [138] M. Stumpf et al., 1999, « Polar Drug Residues In Sewage And Natural Waters In The State Of Rio De Janeiro, Brazil », *Sci. Total. Environ.*, 1999, 225, 135-141.
- [139] D. Bendz et al., 2005, « Occurrence And Fate Of Pharmaceutically Active Compounds In The Environment, A Case Study: Høje River In Sweden », *J. Hazard. Mater.*, 122, 195-204.
- [140] M. Carballa et al., 2004, « Behaviour Of Pharmaceuticals, Cosmetics And Hormones In A Sewage Treatment Plant », *Water Res.*, 38, 2918-2926.
- [141] T. Heberer et al., 2002a, « Tracking Persistent Pharmaceutical Residues From Municipal Sewage To Drinking Water », *J. Hydrol*, 266, 175-189.
- [142] P. Behra et al., 2013, « Chimie Et Environnement », EDITEUR DE SAVOIRS. Ed. DUNOD, Paris
- [143] B. Weiss et al., 1998, « Apport Des Mesures Respirométriques A La Gestion D'une Station D'épuration A Boues Activées », *Can. J. Civ. Eng.*, 25:353-359
- [144] K. Direcks et al., 1999, « Yield Determination By Respirometry - The Possible Influence Of Storage Under Aerobic Condition In Activated Sludge », *X Water SA vol 25N°1*
- [145] C. S. Oliveira et al., 2012, « In Situ Pulse Respirometric Methods For The Estimation Of Kinetic And Stoichiometric Parameters In Aerobic Microbial Communities », *Biochemical engineering* 58-59 12-19
- [146] K. Y. Tugee et al., 2012, « Is Ammonification The Rate Limiting Step For Nitrification Kinetics », *Bioresource technology*, 114:117-25
- [147] M. L. Janex-Habibi et al., 2004, « Effets Des Traitements D'eau Potable Et D'épuration Des Eaux Usées Sur Les Résidus Médicamenteux », *Résultats du projet Poséidon, TSM*, 2004, 11, 59-67.
- [148] J. T. Novak et al., 1983, « Activated Sludge Processes And Effluent Standards », *Journal WPCF*, 55, 1983.
- [149] D. S. Parker et al., 1986, « Flocculor-Clarifier Performance », *Journal Water Pollution Control Federation*, 58, 214.
- [150] C. F. Parkin et al., 1981, « Production Of Soluble Organic Nitrogen During Activated Sludge Treatment », *Journal WPCF*, 53, 99.
- [151] R. A. Poduska et al., 1975, « Dynamics Of Nitrification In The Activated Sludge Process », *Journal WCPF*, 11, 1599.
- [152] K. Kümmerer et al., 1997, « Biodegradability Of The Antitumor Agent If Osfamide And Its Occurrence In Hospital Effluents And Sewage », *Water Res*, 31, 2705-2710.
- [153] H. R. Rogers et al., 1996, « Sources, Behaviour And Fate Of Organic Contaminants Durino Sewage Treatment And In Sewage Sludges », *Sci. Total Environ.* 185, 3-26. doi:10.1016/0048-9697(96)05039-5
- [154] V. F. Rowsell et al., 2009, « Estimating Levels Of Micropollutants Municipal Wastewater », *Wat. Air. Soi. Pol.* 206,357-368. doi:IO.I007/sl 1270-009-0112-y.
- [155] B. Lesjean et al., 2002, « Process Configuration Adapted To Membrane Bioreactors For Enhance Biological Phosphorous And Nitrogen Removal », *Destination*, 149, pp. 217- 224.
- [156] P. Le-Clech et al., 2006, « Fouling In Membrane Bioreactor Used In Wastewater Traitment », *Journal of Membrane Sc.ence*, 284, pp.17-53.
- [157] J. Orantes et al., 2008, « Measurement Of Kinetic Parameters In A Submerged Aerobic Membrane Bioreactor Fed On Acetate And Operated Without Biomass Discharge », *Biochemical Engineering Journal*, 38, 70-77.

- [158] R. Witzing et al., 2002, « Microbiological Aspect Of A Bioreactor With Submerged Membrane For Aerobic Treatment Of Municipal Wastewater », *Water Research*, 36, 394-402.
- [159] D. D. Sunet al., 2005, « Characterization And Reduction Of Membrane Fouling During Nanofiltration Of Semiconductor Indium Phosphide (Inp) Wastewater », *Journal of Membrane Science*, 259, 135-144.
- [160] W. Lee et al., 2003, « Sludge Characteristics And Their Contribution To Microfiltration In Submerged Membrane Bioreactors », *Journal of Membrane Science*, 216, (1- 2), 217-227.
- [161] S. S. Han et al., 2005, « Influence Of Sludge Retention Time On Membrane Fouling And Bioactivities In Membrane Bioreactor System », *Process Biochemistry*, 40, (7), 2393-2400.
- [162] R. V. D. Broeck et al., 2012, « The Influence Of Solids Retention Time On Activated Sludge Biofloculation And Membrane Fouling In A Membrane Bioreactor (Mbr) », *Journal of Membrane Science*, 401-402, 48-55.
- [163] W. Khongnakorn et al., 2007, « Physical Properties Of Activated Sludge In A Submerged Membrane Bioreactor And Relation With Membrane Fouling », *Separation and Purification Technology*, 55, (1), 125-131.
- [164] K. Ouyang et al., 2009, « Effect Of Sludge Retention Time On Sludge Characteristics And Membrane Fouling Of Membrane Bioreactor », *Journal of Environmental Sciences*, 21, (10), 1329-1335.
- [165] L. Clouzot et al., 2010, « Membrane Bioreactors For 17 [Alpha]-Ethinylestradiol Removal », *Journal of Membrane Science*, 362, (1-2), 81-85.
- [166] M. Villain et al., 2012, « Bioréacteur A Membrane Pour Le Traitement D'eaux Usées Domestiques : Influence Des Conditions Environnementales Et Opératoires Sur L'activité Des Biomasse Et Le Transfert De Matière », Thèse de doctorat, Université Aix Marseille
- [167] M. Grander et al., 2000, « Aerobic Mbrs For Domestic Wastewater Treatment: A Review With Coast Considération », *Séparation and Purification Technology*, 18 ,pp. 119-130.
- [168] N. J. Horan et al., 1990, « Biological Wastewater Treatment Systems », Ed, Wiley, Chichester. UK.
- [169] C. H. Xing et al., 2000, « Ultra Filtration Membrane Bioreactor For Urban Wastewater Reclamation », *Journal of Membrane Science*, 177, pp 73-82.
- [170] L. Clouzot et al., 2009, « Etude Du Bioréacteur A Membrane Pour L'élimination De L'hormone Synthétique 17a-Ethinylestradiol », Thèse de doctorat, université Paul Cézanne Aix Marseille. Faculté des Sciences et Techniques, pp.41 -49.
- [171] B. Özbek et al., 2002, « The Studies On The Oxygen Mass Transfer Coefncient In A Bioreactor », *Process Biochemistry*, 36, pp. 729-741.
- [172] S. Churchouse et al., 1999, « Membrane Bioreactor Progress From The Laboratory To Full-Scale Use », *Membrane Technology*, pp. 4-8.
- [173] N. Bolong et al., 2009, « A Review Of The Effects Of Emerging Contaminants In Wastewaters And Options For Their Removal », *Desalination* 239. pp. 229-246.
- [174] C. V. Smith et al., 1969, « The Use Of Ultrafiltration Membranes For Activated Sludge Separation », *Proceeding of the 24'h Annual Purdue Industria. Waste Conférence*.
- [175] L. Clouzot et al., 2011, « Effect Of Membrane Bioreactor Configurations On Sludge Structure And Microbial Activity », *Bioresource Technology* 102 (2), 975-981.
- [176] E. Tardieu et al., 1999, « Influence Of Hydrodynamics On Fouling Velocity In A Recirculated Mbr For Wastewater Treatmen », *Journal of Membrane Science*, 156, (1), 131-140.
- [177] A. Grasmick et al., 2007, « Bioréacteurs A Membranes Et Traitement Des Eaux Usées », *Les techniques de l'ingénieur*, W4140.
- [178] I. Chang et al., 2002, « Membrane Fouling In Membrane Bioreactors For Wastewater Treatment », *Journal of Environmental Engineering*, 128, 1018-1029.
- [179] J. Kim et al., 2001, « Effect Of Pump Shear On The Performance Of A Crossflow Membrane Bioreactor », *Water Research* 35, 2137-2144.
- [180] L. Defrance et al., 1999, « Comparison Between Filtration Et Fixed Transmembrane Pressure And Fixed Permeate Flux : Application To A Membrane Bioreactor Used For Wastewater Treatment », *Journal of membrane science*, 152, 203-210.

- [181] J. Sipma et al., 2010, « Comparison Of Removal Of Pharmaceuticals In Mbr And Activated Sludge Systems », *Desalination* 250 (2), 653-659.
- [182] J. Radjenovic et al., 2009, « Fate And Distribution Of Pharmaceuticals In Wastewater And Sewage Sludge Of The Conventional Activated Sludge (Cas) And Advanced Membrane Bioreactor (Mbr) Treatment », *Water Research* 43, 831-841.
- [183] M. Bernhard et al., 2006, « Biodegradation Of Persistent Polar Pollutants In Wastewater: Comparison Of An Optimised Lab-Scale Membrane Bioreactor And Activated Sludge Treatment », *Water Research* 40, 3419– 3428.
- [184] K. Kimura et al., 2005, « Removal Of Pharmaceutical Compounds By Submerged Membrane Bioreactors (Mbrs) », *Desalination* 178, 135– 140.
- [185] H. D. Wever et al., 2007, « Comparison Of Sulfonated And Other Micropollutants Removal In Membrane Bioreactor And Conventional Wastewater Treatment », *Water Research* 41, 935-945.
- [186] M. Clara et al., 2004, « Adsorption Of Bisphenol-A, 17 Estradiol And 17 α -Ethinylestradiol To Sewage Sludge », *Chemosphere* 56, 843-851.
- [187] J. Tambosi et al., 2010, « Removal Of Pharmaceutical Compounds In Membrane Bioreactors (Mbr) Applying Submerged Membranes », *Desalination* 261, 148-156.
- [188] Z. Zhang et al., 2008, « Analysis Of Emerging Contaminants In Sewage Effluent And River Water: Comparison Between Spot And Passive Sampling », *Analytica Chimica Acta* 607, 37-44.
- [189] N. Vieno et al., 2007, « Elimination Of Pharmaceuticals In Sewage Treatment Plants In Finland », *Water Research* 41, 1001 – 1012.
- [190] L. Lishman et al., 2006, « Occurrence And Reductions Of Pharmaceuticals And Personal Care Products And Estrogens By Municipal Wastewater Treatment Plants In Ontario, Canada », *Science of the Total Environment* 367, 544 –558.
- [191] M. Clara et al., 2005, « The Solids Retention Time - A Suitable Design Parameter To Evaluate The Capacity Of Wastewater Treatment Plants To Remove Micropollutants », *Water Research* 39, 97-106.
- [192] S. Suarez et al., 2008, « How Are Pharmaceutical And Personal Care Products (Pcpcs) Removed From Urban Wastewater », *Environ Sci Biotechnol* 7, 125-138.
- [193] J. C. Block et al., 1988, « Fixed Biomass Activity In Aerobic Biological Reactors Used For Wastewater Treatment », *Water sci Technol* 20:489-491
- [194] H. Spanjers et al., 1998, « Respirometry In Control Of The Activated Sludge Process: Principales », Scientific and technical report N°7 IAWQ London ISBN : 1-900222-04-3
- [195] R. M. Arthur et al., 1964, « An Automated Bod Respirometre », *Proceeding of 19th Purdue Industrial waste conference w lafayette indiana* 628-638
- [196] J. W. Abson et al., 1967, « Development Of The Simcar Respirometer And Its Application To Waste Treatment », *Water Pollution Contrôle* 607-621
- [197] A. I. Mytelka et al., 1970, « An Automatic Recording Respirometre », *ISA transactions* 9 (01) 17-21
- [198] D. Jenkins et al., 1960, « The Use Of Manometric Methods In The Study Of Sewage And Trade Wastes », *Waste treatment proceedings of the Second symposium of wastewaters* ED Issac P C G Pergamon Press 97-125
- [199] J. Hoffman et al., 1997, « Manometric Determination Of Biological Degradability Of Substances Poorly Soluble In Aqueous Environments », *International biodeterioration and biodegradation* 39:327-332
- [200] R. L. Shogren et al., 2004, « Biodegradation Behavior Of Some Vegetable Oil-Based Polymers », *Journal of Polymers and the Environment* 12:173-178
- [201] M. Berkun et al., 2004, « Effect Of Inorganic Metals On Respirometric Oxygen Uptake And Sag Curve Formations In Streams », *Water. S. A.* 30: 273-278
- [202] A. Kungolos et al., 2005, « Evaluation Of Toxic Properties Of Industrial Wastewater Using Online Respirometry », *Journal of Environmental science and health , Part A* 40: 869-880
- [203] E. U. Cokgor et al., 2008, « The Effect Of Mixing Pharmaceutical And Tannery Wastewater On The Biodegradation Characteristics Of The Effluents », *Journal of Hazardous Materials* 156: 292-299

- [204] J. Surmacz-Gorska et al., 1996, « Nitrification Monitoring In Activated Sludge By Oxygen Uptake Rate Our Measurement », *Water reaserch* 30: 1228-1236
- [205] G. Ekama et al., 1986, « Procedures For Determining Influent Cod Fractions And The Maximum Specific Growth Rate Of Heterotrophs In Activated Sludge Systems », *Water science and technology* 18: 91-114
- [206] S. E. Lee et al., 1995, « Biochemical Characterization Of Wastewater By Electrolytic Respirometer », *Water science and technology* 31: 91-100
- [207] H. Spanjers et al., 1995, « Respirometry As A Tool For Rapid Characterization Of Wastewater And Activated Sludge », *Water Science and Technologie* 31: 105-114
- [208] X. U. Shulan et al., 1996, « A Simple Biological Method To Estimate The Readily Biodegradable Organic Matter In Wastewater », *Water Reasearch* 30:1023-1025.
- [209] D. Orhan et al., 1999a, « Characterization And Modeling Of Activated Sludge For Tannery Wastewater », *Water Environmental Research* 71:50-63
- [210] S. Mathieu et al., 2000, « Estimation Of Wastewater Biodegradable Cod Fraction By Combinig Respirometric Experiments In Various S0/X0 Ratios », *Water Research* 34: 1233-1246
- [211] E. H. Choi et al., 2005, « Evaluation Of Wastewater Charactérisation Methods », *Water Science and technology* 52: 61-68
- [212] M. Ros et al., 1988, « Measureent Of Respiration Of Activated Sludge », *Water Research* 22 (11), 1405-1411
- [213] U. Sollfrank et al., 1992, « Temperature Effect On The Wastewater Characterization The Release Of Soluble Inert Organic Material », *Wat sci tech* 25 (6) p: 33-41
- [214] M. Henze et al., 1986, « Nitrate Versus Oxygen Utilization Rates In Wastewater And Activated Sludge Systems », *Water sci tech* 18p : 115-122
- [215] V. Naidoo et al., 1998, « Characterization Of Wastewater And Activated Suldge From Europeen Municipal Wastewater Treatment Plats Using The Nur Test », *IAWQ 19th biennial conf vancouver Canada*
- [216] Sakhraoui-Mahfoud et al., 2017, « Respirometric Evaluation Of S0/X0 Ratio Effect On The Kinetic And Stoichiometric Parameters Of Activated Sludge », *International Journal of Hydrogen Energy – IJHE*, <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijhydene.2017.01.097>
- [217] R. O. Sylvester et al., 1960, « Nutrient Content Of Drainage Water From Forested, Urban And Agricultural Areas », *Trans. Sem. Algae Metropolitan Water, U.S Public Health Service, R.A. Taft Center, Cincinnati, Ohio*
- [218] Water Quality Criteria 1972, « Report Of The Committee On Water Quality Criteria », U.S. EPA, Washington, D.C.
- [219] G. Tchobanoglous et al., 2003a, « Wastewater Engineering, Treatment And Reuse », Metcalf & Eddy, Inc. ed. McGraraw-Hill, Inc., New York.
- [220] F. Meng et al., 2013, « A Novel Nearly Plug-Flow Membrane Bioreactor For Enhanced Biological Nutrient Removal », *AICHe J.* 59, 46–54. doi :10.1002/aic.13799
- [221] Y. Liu et al., 1996, « Bioenergetics Interpretation On The S0/X0 Ratio In Substrate-Sufficient Batch Culture », *Water Research Vol 30 N° 11*, pp 2766-2770
- [222] A. Cadoret et al., 2003, « Activités Enzymatiques Extracellulaires Des Agrégats Bactériens De Station D'épuration D'eaux Usées Urbaines », *Thèse de doctorat, ecole doctorale biologie santé environnement, Nancy, France*
- [223] H. Spanjers et al., 1990, « On Line Meter For Respiration Rate And Short Term Biochemical Oxygen Demand In The Control Of The Activated Sludge Process In Advance In Water Pollution Control », *Proc 5 th IAWPRC workshop 26 july -3 august yokohama and tokyo japon*
- [224] U. J. Strotmann et al., 1997, « Kinetics Of Ammonium Removal With Suspended And Immobilized Nitrifying Bacteria In Different Reactr Systems », *Chemosphere* 35 (12) 2939-2952
- [225] J. Dispan et al., 2003, « Développement D'une Méthodologie Pour Le Fractionnement De La Matière Organique En Classes De Biodégradabilité », *These de doctorat, ecole nationale des ponts et chaussées*

- [226] A. Bandouin et al., 2004, « Etude Bibliographique, Economique Et Essais Sur Différentes Méthodes De Fractionnement De La Demand Chimique En Oxygène D'un Effluent Urbain », Ecole des mines d'ALBI, France
- [227] M Bouteraa et al., 2022, « Experimental Study And Modeling Of Denitrification In An Mbbbr Reactor », International Journal of Chemical Reactor Engineering
- [228] R. Zamouche-Zerdazi et al., 2017, « Etude et Modélisation des dysfonctionnement dans les système d'épuration biologique », thèse de doctorat de l'université de Constantine 03, Algérie.
- [229] R. Zamouche-Zerdazi et al., 2019, « Remediation Of Microbial Deflocculation Of Activated Sludge By Addition Of Metal Cations (Case Of Salt Stress) », Conference: International Conference on Sustainable Water Treatment Technologies And Environment
- [230] R. Zamouche-Zerdazi et al., 2021, « Impact Of Clear Waters Parasites On The Biological Wastewater Treatment », Desalination and Water Treatment 213(2021):106–116
- [231] R. Zamouche-Zerdazi et al., 2014, « Influence Of Our Endogenous Determination On The K_{La} , Our Exogenous, Total Oxygen Consumption And Heterotrophic Yield In A Continuous Respirometric Test », 5th International Renewable Energy Congress (IREC)
- [232] Henri Spanjers et al., 2016, « Respirometry », IWA Publishing, London, UK.
- [233] Patikorn Saensing et al., 2009, « Development Of Combined Ultimate Hybrid Respirometer-Titrate Meter To Estimate Kinetic Parameters Of Activated Sludge », Suranaree J. Sci. Technol. 16(3):221-233
- [234] K. P. Raev et al., 2010, « Développement D'une Méthode Respirométrique Visant A Mesurer L'activité Biologique Sur Du Charbon Actif En Poudre », Thèse de doctorat, département de génie civil, école polytechnique géologique et des mines de montréal
- [235] G. T. Daigger et al., 1982, « The Dynamics Of Microbial Growth On Soluble Substrate », Water Res., 16, 365.
- [236] E. R. Hall et al., 1985, « Sludge Age And Substrate Effects On Nitrification Kinetics », Journal WPCF, 57,413.
- [237] D. Orhan et al., 1999b, « Experimental Basis For The Hydrolysis Of Slowly Biodegradable Substrate In Different Wastewaters », Water sci technol 39 (1), 87-95
- [238] W. W. Eckenfelder et al., 1966, « Industrial Water Pollution Control », McGraw-Hill, New York
- [239] V. Novonty et al., 1974, « Equalization Design Techniques For Conservation Substances In Wastewater Treatment System », Water Research, 8, 325
- [240] P. H. MCGAUHEY et al., 1968, « Engineering Management Of Water Quality », McGraw-Hill, New York.
- [241] R. Andreozi et al., 2003, « Pharmaceuticals In Setp Effluents And Their Solar Photodegradation In Aquatic Environment », Chemosphere, 2003, 50, 1319-1330.
- [242] D. B. Huggett et al., 2003, « A Theoretical Model For Utilizing Mammalian Pharmacology And Safety Data To Prioritize Potential Impacts Of Human Pharmaceuticals To Fish », Hum Ecol Risk Assesment, 9, 1789-1799.
- [243] K. Carlson et al., 2004, « Antibiotics In Animal Waste Lagoons And Manure Stockpiles », Colorado State Univ Agronomy News, 24, 3.
- [244] E. M. Golet et al., 2001, Trace Determination Of Fluoroquinolone Antibacterial Agents In Solid-Phase Extraction Urban Wastewater By And Liquid Chromatography With Fluorescence Detection », Anal Chem, 2001, 73, 3632-3638.
- [245] A. Göbel et al., 2007, « Fate Of Sulfonamide, Macrolides, And Trimethoprim In Different Wastewater Treatment Technologies », Sci Total Environ, 372, 361-371.
- [246] G. T. Daigger et al., 1977, « A Model For The Bio-Oxidation Process Based On Product Formation Concept », Water Res., 11, 1049.
- [247] G. T. Daigger et al., 1987, « Factors Affecting Biological Phosphorus Removal For The Vip Process », A high Rate University of Capetown Type Process. In: Biological Phosphate Removal Front Wastewaters. Rome, Pergamon Press.

- [248] C. W. Kim et al., 1994, « Int-Dehydrogenase Activity Test For Assessing Chlorine And Hydroge Peroxide Inhibition Of Filamentous Pure Cultures And Activated Sludge », *Water Res*, 28 (05) : 1117-21
- [249] A. Caravelli et al., 2004, « Effect Of Chlorine On Filamentous Microorganisms Present In Activated Sludge As Evaluated By Respirometry And Int-Dehydrogenase Activity », *Water research* 38: 2395-2405
- [250] P. Anfossi et al., 2002, « Relative Oral Bioavailability Of Microgranulated Amoxicillin In Pigs », *Journal of veterinary pharmacology and therapeutics*, 25: 329-334.
- [251] M. Rowland et al., 2006, « Introduction To Pharmacokinetics And Pharmaodynamics: The Quantitative Basis Of Drug Therapy », Baltimore, MD, É.-U., Lippincott Williams & Wilkins.
- [252] D. M. Ohet al., 1993, « Characterization Of The Oral Absorption Of Some B-Lactams: Effect Of The Alpha-Amino Side Chain Group », *Journal of pharmaceutical sciences* 82: 897-900.
- [253] D. L. Nelson et al., 2008, « Enzymes Lehninger Principles Of Biochemistry », 5th edition. Ch.4:pp. 183-233. New York, NY, États-Unis. W.H. Freeman and Compagny.
- [254] K. Inui et al., 1992, « Transepithelial Transport Of Oral Cephalosporine By Monolayers Of Intestinal Epithelial Cell Line Caco-2 », *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*. 261: 195-201.
- [255] S. Matsumoto et al., 1994, « Transcellular Transport Of Oral Cephalosporins In Human Intestinal Epithelial Cells, Caco-2: Interaction With Dipeptide Transport Systems In Apical And Basolateral Membranes », *The journal of Pharmacology and experimental therapeutics*, 270 : 498-504.
- [256] T. Terada et al., 2004, « Peptide Transporters: Structure, Function, Regulation And Application For Drug Delivery », *Current drug metabolism*, 5: 85-94.
- [257] J. F. Quay et al., 1972, « Transport Interaction Of Glycine And Cephalexine In Rat Jejunum », *The physiologist*, 15: 241.
- [258] P. L. Dold et al., 1980, « A General Model For The Activated Sludge Process », *Prog. Wat. Tech.*, 12, 47.
- [259] P. L. Dold et al., 1987, « Benefits Of Including Unaerated Zones In Nitrifying Activated Sludge Plants », *Wat. Sci. Tech.*, 19, 195.
- [260] D. Orhan et al., 1997, « Cod Fractionation In Wastewater Characterization - The State Of The Art », *J. Chem. Tech. Biotechnol.* 68, 283-293
- [261] P. Chudoba et al., 1992, « Explanation Of Biological Meaning Of The S0/X0 Ratio In Batch Cultivation », *Wat Sci Tech* 26(3-4) 743-751
- [262] L. Zhidong et al., 2009, « Study On Anaerobic/Aerobic Membrane Bioreactor Treatment For Domestic Wastewater », *Pol. J. Environ. Stud.* 18, 1-7.
- [263] A. Alvarado-Lassman et al., 2008b, « Brewery Wastewater Treatment Using Anaerobic Inverse Fluidized Bed Reactors », *Bioresour. Technol.* 99, 3009-3015. doi : 10.1016/j.biortech.2007.06.022
- [264] D. P. Mesquita et al., 2013, « Activated Sludge Characterization Through Microscopy : A Review On Quantitative Image Analysis And Chemometric Techniques », *Anal. Chim. Acta* 802, 14-28. doi : 10.1016/j.
- [265] H. Chen et al., 2016b, « Brewery Wastewater Treatment Using An Anaerobic Membrane Bioreactor », *Biochem. Eng. J.* 105, 321-331. doi : 10.1016/j.bej.2015.10.006
- [266] Kappeler .J et Gujer .W (1992) Estimation of kinetic parameters of heterotrophic biomass under aerobic conditions and characterization of waste water for activated sludge modeling .*water.Sci.Technol.*25(6) ,125-139

ANNEXE A

Explication du calcul des concentrations à introduire à chaque pas d'injection dans le MBRI.

1- La quantité du phosphore :

La concentration du phosphore dans le MBRI est assurée par un apport de l'Hydrogénophosphate de di-ammonium ($N_2H_9PO_4$) qui donne un pourcentage de P de 23.5 % et l'AMX ne contient pas de P :

(P) : 132 → 100% et 31 → X_1 donc : $X_1 = 23.5 \%$

$$C_P = 0.192 \frac{g}{L}$$

$$m_P = 4.08 g$$

2- La quantité d'Azote :

La concentration de l'azote dans le MBRI est :

$$C_N = 1.92 \frac{g}{L}$$

L'apport d'azote sera assuré non seulement par le chlorure d'ammonium (NH_4Cl) de pourcentage en N de :

(N) : 53 → 100% et 14 → X_2 donc : $X_2 = 26.4 \%$

Mais aussi par l'Hydrogénophosphate de di-ammonium ($N_2H_9PO_4$) qui a été déjà utilisé comme apport de phosphore et qui donne un pourcentage en N de :

(N) : 132 → 100% et 28 → X_3 donc : $X_3 = 21.21 \%$.

Et la quantité en masse de m_p égale à 4.08 g.

Et dans la présente étude, l'AMX ($C_{16}H_{19}N_3O_5S$) comme micropolluant, contient un apport d'azote important dans l'effluent, sachant que le pourcentage en N dans l'AMX est de :

(N) : 419 → 100% et 42 → X_4 donc : $X_4 = 10.02 \%$.

Donc la quantité de chlorure d'ammonium à ajouter est donnée par l'équation :

$$C_{AMX,i} = \frac{C_{AMX} * 5}{10}$$

$$m_N = \frac{((C_N * V_S) - (m_P * 0.21) - (m_{AMX(i)} * 0.10))}{0.26}$$

Étant donné que la quantité d'AMX dans l'effluent varie tous les 9 jours avec un incrément de 25 mg/L, les concentrations en DCO et en azote (N) évoluent en fonction des concentrations d'AMX présentes dans l'effluent synthétique. Par conséquent, la quantité de

chlorure d'ammonium à ajouter varie tous les 9 jours (de même que la quantité d'acétate de sodium), cependant, dans cette étude, une quantité constante de chlorure d'ammonium a été fixée dans la solution d'effluent synthétique, comme indiqué dans le *Tableau AN.01*.

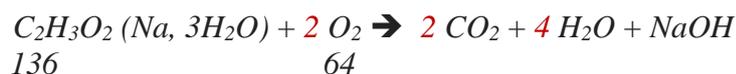
En tenant compte de ces résultats et en considérant le pas et la quantité d'AMX ajoutée avec le substrat synthétique, la variation dans la quantité d'azote ajoutée est de l'ordre de 0,01, représentant 0,09 %. Ainsi, cette variation peut être considérée comme négligeable.

Tab. AN.01 : *Calcul de la concentration en chlorure d'ammonium par pas :*

Le Pas	m_{AMX} (N)	(g) m_N (g)
Pas 1 = 0 mg/L	0	33.63
Pas 2 = 25 mg/L	0.0125	33.62
Pas 3 = 50 mg/L	0.025	33.62
Pas 4 = 75 mg/L	0.037	33.61
Pas 5 = 100 mg/L	0.05	33.61
Pas 6 = 125 mg/L	0.06	33.60
Pas 7 = 150 mg/L	0.075	33.60
Pas 8 = 175 mg/L	0.087	33.60
Pas 9 = 200 mg/L	0.1	33.60

3- La quantité de carbone :

La source unique de carbone utilisée dans cette étude est l'acétate de sodium trihydraté ($C_2H_3NaO_2, 3H_2O$), et pour déterminer la quantité en acétate ajouté, il faut connaître son équivalent en gramme de DCO , par un bilan chimique, le nombre de moles d' O_2 nécessaire pour décomposer l'acétate en eau et en gaz carbonique.



Car il n'y a pas de l'acétate pure on utilise, un sel, l'acétate de sodium trihydraté de masse molaire de 136 g/mol . D'après cette équation 2 moles de dioxygène se décomposent en 1 mole d'acétate, donc :

$$\Leftrightarrow 1 \text{ g d'Acétate de sodium} \rightarrow 470 \text{ mg}_{DCO}/L$$

Comme en est tenu par une concentration en substrat concentré $C_s = 19.2 \text{ g}_{DCO}/L$, on peut donc conclure que la concentration de l'acétate dans la solution concentrée, est de :

$$C_{Acét} = 9.024 \frac{g}{L}$$

Étant donné le réservoir d'alimentation en substrat concentré, dont le volume est de 5 litres, la quantité d'acétate de sodium trihydraté à ajouter est : $m_{Acét} = 45.12 \text{ g}$

On note aussi ici, que l'apport de carbone sera aussi assuré non seulement par l'acétate de sodium qui représente un pourcentage de :

$$(C) : 136 \rightarrow 100\% \text{ et } 24 \rightarrow X_5 \text{ donc : } X_5 = 17.65 \%$$

$$(C) : 419 \rightarrow 100\% \text{ et } 192 \rightarrow X_6 \text{ donc : } X_6 = 45.82 \%$$

L'AMX est entré en considération aussi dans le calcul de la masse et du pourcentage d'apport en carbone, il représente un pourcentage de 45.82 % de carbone, comme on a déjà détaillé ce dans les parties précédentes on conclure :

$$\Leftrightarrow 1 \text{ g d'AMX} \rightarrow 102.6 \text{ mg}_{DCO}/L$$

$$m_{Acét} = \frac{((C_C * V_S) - (m_{AMX(i)} * 0.46))}{0.176}$$

Tab AN.02 : *La concentration en source de carbone, acétate et AMX, par pas*

Le Pas	m_{AMX} (C)	m_C (g)
Pas 1 = 0 mg/L	0	256.36
Pas 2 = 25 mg/L	0.0125	256.33
Pas 3 = 50 mg/L	0.025	256.30
Pas 4 = 75 mg/L	0.037	256.27
Pas 5 = 100 mg/L	0.05	256.23
Pas 6 = 125 mg/L	0.06	256.21
Pas 7 = 150 mg/L	0.075	256.17
Pas 8 = 175 mg/L	0.087	256.14
Pas 9 = 200 mg/L	0.1	256.10

Il n'y a pas de variation significative dans l'apport en carbone entre l'utilisation de l'acétate seul et la source de carbone avec l'AMX. L'AMX présente une excellente solubilité dans l'eau distillée ainsi que dans l'eau du robinet. Par conséquent, la préparation des solutions mères concentrées en AMX a été réalisée en utilisant l'effluent synthétique concentré. Afin d'obtenir des concentrations variant de 0 mg/L à 200 mg/L tous les 9 jours, avec un pas de 25 mg/L dans le bioréacteur, la dilution est effectuée en utilisant de l'eau du robinet, de la même manière que pour l'effluent synthétique concentré.

ANNEXES B

Les Résultats de la Détermination de K_{La} dans différentes situations :

a- Variation de la Vitesse d'Agitation (Sans Partition de la courbe descendante) :

Situation	Temp (°C)	DAA (min)	Durée Réel Min	ATU	Lavage	VA (tr/min)	V chute mg/L/h	C minim mg/L	C end	OUR end	Y	R ²	K _{La} (h ⁻¹)	
A	01	20	15	14.6	-	+	40	4.891	7.07	8.26	0.0016	8.29918-0.001905*X	-0.99988	6.858
	02	20	15	15.4	-	+	60	5.142	6.94	8.26	0.00147	8.40252-0.001750*X	-0.99976	6.300
	03	20	15	15.3	-	+	80	4.938	6.94	8.20	0.00144	8.30631-0.001600*X	-0.99973	5.760
	04	20	15	15.7	-	+	100	4.968	6.89	8.19	0.00141	8.33172-0.001549*X	-0.99981	5.576
	05	20	15	15.8	-	+	160	4.860	6.95	8.23	0.00134	8.2681-0.001540*X	-0.99784	5.544
	06	20	15	15.2	-	+	300	2.880	7.45	8.18	0.00114	8.43857-0.001239*X	-0.99367	4.460

pH (01) min = 8.408 - pH (01) max = 8.553

pH (02) min = 8.506 - pH (02) max = 8.457

b- Variation de la Vitesse d'Agitation avec la variation de la température (Sans Partition de la courbe descendante) :

Situation	Temp (°C)	DAA (min)	Durée Réel Min	ATU	Lavage	VA (tr/min)	V chute mg/L/h	C minim mg/L	C end	OUR end	Y	R ²	K _{La} (h ⁻¹)	
B	01	10	15	15.8	-	+	60	2.202	9.28	9.86	0.00063	9.89018-0.000453*X	-0.99904	1.6308
	02	10	15	16.1	-	+	100	3.612	7.89	8.86	0.00082	8.85505-0.000343*X	-0.99832	1.2348
	03	10	15	14.8	-	+	150	1.944	9.05	9.53	0.00054	9.51771-0.000314*X	-0.99772	1.1304
	04	10	15	14.8	-	+	300	0.606	9.96	10.11	0.00019	10.09833-0.000147*X	-0.94912	0.5292

pH (01) min = 8.543 - pH (01) max = 8.572

pH (02) min = 8.509 - pH (02) max = 8.522

c- Variation du temps de stop d'Aération dans les cas des Hétérotrophes et Hétéro avec Autotrophes (utilisation et/ou non d'ATU, Sans Partition de la courbe descendante) :

Situation	Temp (°C)	DAA (min)	Durée Réel Min	ATU	Lavage	VA (tr/min)	V chute mg/L/h	C minim Mg/L	C end	OUR end	Y	R ²	K _{La} (h ⁻¹)	
C	01	20	15	15.8	-	+	100	6.036	6.87	8.46	0.00168	8.349496-0.002625*X	-0.99906	9.45
	02	20	15	16.3	+	+	100	5.634	6.93	8.46	0.00152	8.3991-0.002375*X	-0.99868	8.55
	03	20	15	30	-	+	160	3.918	6.49	8.45	0.00105	8.26556-0.001615*X	-0.99506	5.814
	04	20	15	26.6	+	+	160	4.104	6.57	8.39	0.00106	8.18592-0.001493*X	-0.99602	5.375
	05	20	15	14.8	-	+	80	4.866	7.26	8.46	0.00134	8.35119-0.002094*X	-0.99848	7.538
	06	20	15	15.8	+	+	80	4.86	7.17	8.45	0.00130	8.3173-0.00200*X	-0.99854	7.20

pH (01) min = 8.377 - pH (01) max = 8.479

pH (02) min = 8.238 - pH (02) max = 8.394

d- L'Arrêt de l'agitation avec l'arrêt de l'aération en variant aussi la durée d'arrêt (Sans Partition de la courbe descendante) :

Situation	Temp (°C)	DAA (min)	Durée Réel Min	ATU	Lavage	VA (tr/min)	V chute mg/L/h	C minim mg/L	C end	OUR end	Y	R ²	K _{La} (h ⁻¹)	
D	01	20	10 (a)	9.2	-	+	0	1.5	8.04	8.27	0.00030	8.25779-0.000362*X	-0.98773	1.3032
	01 <i>répét é</i>	20	10 (b)	11	-	+	0	1.524	8.02	8.30	0.00026	8.30228-0.000321*X	-0.9769	0.8316
	02	20	20 (a)	20	-	+	0	1.53	7.75	8.26	0.00026	8.24707-0.000311*X	-0.98684	1.1196
	02 <i>répét é</i>	20	20 (b)	20	-	+	0	1.5	7.83	8.33	0.00029	8.33714-0.000379*X	-0.99437	1.3644
	02 <i>répét é</i>	20	20 (c)	20	-	+	0	3.21	7.33	8.40	0.00025	8.4392-0.000976*X	-0.98637	3.5136
	03	20	40	40	-	+	0	1.65	7.25	8.35	0.00036	8.15044-0.000485*X	-0.93753	1.746

pH (01) min = 8.257 - pH (01) max = 8.630

pH (02) min = 8.167 - pH (02) max = 8.564

e- Variation du durée d'arrêt d'aération pour les boues lavées et autres non lavées (Sans Partition de la courbe descendante) :

Situation	Temp (°C)	DAA (min)	Durée Réel Min Heure	ATU	Lavage	VA (tr/min)	V chute mg/L/h	C minim mg/L	C end	OUR end	Y	R ²	K _{La} (h ⁻¹)	
E	01	20	05	5	-	-	100	2.16	8.16	8.34	0.00048	8.35658-0.000630*X	-0.99088	2.268
	02	20	10	5	-	+	100	4.8	7.86	8.26	0.00137	8.34399-0.001105*X	-0.99572	3.978
	03	20	15	11.2	-	-	100	1.716	8.00	8.32	0.00049	8.29259-0.000623*X	-0.99852	2.2428
	04	20	20	9.8	-	+	100	4.776	7.45	8.23	0.00135	8.31213-0.001552*X	-0.99844	5.5872
	05	20	30	15.8	-	-	100	1.746	7.84	8.30	0.00051	8.29848-0.000633*X	-0.99945	2.2788
	06	20	60	15.5	-	+	100	4.452	7.10	8.25	0.00126	8.19896-0.001482*X	-0.99738	5.3352
	07	20	05	18.9	-	-	100	1.68	7.76	8.29	0.00050	8.29044-0.000622*X	-0.99861	2.2392
	08	20	10	22.5	-	+	100	3.918	6.76	8.23	0.00114	8.28935-0.001310*X	-0.99922	4.716
	09	20	15	32.6	-	-	100	1.746	7.34	8.29	0.00049	8.28692-0.000606*X	-0.99977	2.1816
	10	20	25	61.7	-	+	100	1.506	6.71	8.26	0.00043	8.23297-0.000508*X	-0.99933	1.8288

pH (01) min = 8.237 - pH (01) max = 8.340

pH (02) min = 8.035 - pH (02) max = 8.282

f- Variation du durée d'arrêt d'aération pour les boues lavées après différents temps d'adaptation (Sans Partition de la courbe descendante) :

Situation	Temp (°C)	DAA (min)	Durée Réel Min	ATU	Lavage	VA (tr/min)	V chute mg/L/h	C minim mg/L	C end	OUR end	Y	R ²	K _{La} (h ⁻¹)	
F	01	20	Adap 10 J	119	-	+	100	1.188	5.98	8.34	0.00029	7.59211-0.000380*X	-0.98526	1.368
	02	20	Adap 08 J	92	-	+	100	1.362	5.87	7.96	0.00019	7.40958-0.000165*X	-0.91737	0.594
	03	20	Adap 04 J	93	-	+	100	1.458	5.96	8.22	0.00036	7.6376-0.000161*X	-0.93984	0.5796
	04	20	Adap 00 J	124	-	+	100	1.482	5.29	8.35	0.00037	7.64411-0.000499*X	-0.92136	1.7964
	05	20	Adap 06 J	113	-	+	100	1.566	5.40	8.35	0.00038	7.57894-0.000503*X	-0.94406	1.8108
	06	20	Adap 18 J	115	-	+	100	1.914	4.62	8.29	0.00054	7.80104-0.000663*X	-0.97524	2.3868
	07	20	Adap 02 J	75	-	+	100	4.782	2.36	8.34	0.00129	6.65789-0.001697*X	-0.79754	6.1092
	08	20	Adap 19 J	25	-	+	100	13.08	2.68	8.13	0.00345	3.53699-0.003557*X	-0.72787	12.8052
	09	20	Adap 16 J	27	-	+	100	13.134	2.02	7.93	0.00370	6.89467-0.003162*X	-0.98096	11.3832
	10	20	Adap 14 J	28.5	-	+	100	15.012	0.4	7.53	0.00423	7.63343-0.002694*X	-0.99405	9.6984
	11	20	Adap 12 J	22	-	+	100	19.308	0.4	7.48	0.00534	7.62197-0.003296*X	-0.98815	11.8656

pH (01) min = 7.147 - pH (01) max = 8.841

pH (02) min = 6.969 - pH (02) max = 8.800

g- Variation dans la durée de stop d'aération avec la partition de la courbe descendante :

Situation	Temp (°C)	Durée Réel Min	ATU	Lavage	VA (tr/min)	V chute mg/L/h	C minim mg/L	C end	OUR end	Partition	R ²	K _{La} (h ⁻¹)	
G	1-1 A-B	20	4.33	-	+	100	14.268	7.95	6.92	0.00395	+	0.9752	12.366
	2-1 A-B	20	10	-	+	100	4.68	8.34	7.56	0.00132	+	0.9987	6.2532
	2-2 A-C	20	20.2	-	+	100	4.098	8.34	6.96	0.00116	+	0.9947	5.4936
	2-3 A-D	20	30.3	-	+	100	3.624	8.34	6.51	0.00101	+	0.9866	4.7844
	3-1 A-B	20	10	-	+	100	17.52	7.53	4.61	0.00494	+	0.9996	11.3256
	3-2 A-C	20	19.8	-	+	100	16.332	7.53	2.14	0.00455	+	0.9982	10.4328
	3-3 A-D	20	29.7	-	+	100	14.646	7.53	0.28	0.00418	+	0.9945	9.5832
	4-1 A-B	20	12.3	-	+	100	16.098	7.64	4.34	0.0443	+	0.9985	10.9224
	4-2 A-C	20	24	-	+	100	13.5	7.64	2.24	0.00375	+	0.9907	9.2448

DAA : Durée d'arrêt d'aération.

ATU : Allylthiourée.

VA: Vitesse d'agitation

Y: l'équation Y de la régression linéaire de la partie descendante de stop reprise d'aération.

R² : coefficient e corrélation.

K_{La} dans les différentes situations :

		T°C	VA	Durée min	ATU	Lavage	V chute	C mini	C end	OUR end	R ²	K _{La}	Partition	pH 01	pH 02
A	A1	20	40	14.6	-	+	0.0815	7.07	8.26	0.0016	0.9998	0.001905	-	8.506	8.416
	A2	20	60	15.4	-	+	0.0857	6.94	8.26	0.00147	0.9995	0.001750	-	8.551	8.454
	A3	20	80	15.3	-	+	0.0823	6.94	8.20	0.00144	0.9995	0.001600	-	8.546	8.454
	A4	20	100	15.7	-	+	0.0828	6.89	8.19	0.00141	0.9996	0.001549	-	8.553	8.457
	A5	20	160	15.8	-	+	0.0810	6.95	8.23	0.00134	0.9957	0.001540	-	8.542	8.451
	A6	20	300	15.2	-	+	0.0480	7.45	8.18	0.00114	0.9874	0.001239	-	8.547	8.408
B	B1	10	60	15.8	-	+	0.0367	9.28	9.86	0.00063	0.9981	0.000453	-	8.543	8.511
	B2	10	100	16.1	-	+	0.0602	7.89	8.86	0.00082	0.9966	0.000343	-	8.572	8.512
	B3	10	150	14.8	-	+	0.0324	9.05	9.53	0.00054	0.9954	0.000314	-	8.549	8.509
	B4	10	300	14.8	-	+	0.0101	9.96	10.11	0.00019	0.9008	0.000147	-	8.547	8.522
C	C1S	20	100	15.8	-	+	0.1006	6.87	8.46	0.00168	0.9981	0.002625	-	8.377	8.283
	C2A	20	100	16.3	+	+	0.0939	6.93	8.46	0.00152	0.9974	0.002375	-	8.406	8.314
	C3S	20	160	30	-	+	0.0653	6.49	8.45	0.00105	0.9901	0.001615	-	8.378	8.238
	C4A	20	160	26.6	+	+	0.0684	6.57	8.39	0.00106	0.9921	0.001493	-	8.385	8.24
	C5S	20	80	14.8	-	+	0.0811	7.26	8.46	0.00134	0.9970	0.002094	-	8.479	8.394
	C6A	20	80	15.8	+	+	0.0810	7.17	8.45	0.00130	0.9971	0.002000	-	8.457	8.363
D	D1	20	00	9.2	-	+	0.0250	8.04	8.27	0.00030	0.9756	0.000362	-	8.328	8.280
	D2	20	00	11	-	+	0.0254	8.02	8.30	0.00026	0.9543	0.000321	-	8.257	8.188
	D3	20	00	20	-	+	0.0255	7.75	8.26	0.00026	0.9738	0.000311	-	8.310	8.203
	D4	20	00	20	-	+	0.0250	7.83	8.33	0.00029	0.9888	0.000379	-	8.264	8.167
	D5	20	00	20	-	+	0.0535	7.33	8.40	0.00025	0.9565	0.000976	-	7.431	5.53
	D6	20	00	40	-	+	0.0275	7.25	8.35	0.00036	0.8790	0.000485	-	8.630	8.564
E	E1	20	100	5	-	-	0.0360	8.16	8.34	0.00048	0.9818	0.000630	-	8.340	8.282
	E2	20	100	5	-	+	0.0800	7.86	8.26	0.00137	0.9972	0.001105	-	8.290	8.084
	E3	20	100	11.2	-	-	0.0286	8.00	8.32	0.00049	0.9915	0.000623	-	8.245	8.195

ANNEXES

	E4	20	100	9.8	-	+	0.0796	7.45	8.23	0.00135	0.9984	0.001552	-	8.237	8.146
	E5	20	100	15.8	-	-	0.0291	7.84	8.30	0.00051	0.9970	0.000633	-	8.289	8.212
	E6	20	100	15.5	-	+	0.0742	7.10	8.25	0.00126	0.9995	0.001482	-	8.277	8.201
	E7	20	100	18.9	-	-	0.0280	7.76	8.29	0.00050	0.9969	0.000622	-	8.308	8.212
	E8	20	100	22.5	-	+	0.0653	6.76	8.23	0.00114	0.9987	0.001310	-	8.237	8.151
	E9	20	100	32.6	-	-	0.0291	7.34	8.29	0.00049	0.9989	0.000606	-	8.294	8.144
	E10	20	100	61.7	-	-	0.0251	6.71	8.26	0.00043	0.9948	0.000508	-	8.267	8.035
F	F1	20	100	119	-	+	0.0198	5.98	8.34	0.00029	0.8489	0.000380	-	7.672	7.462
	F2	20	100	92	-	+	0.0227	5.87	7.96	0.00019	0.6361	0.000165	-	7.534	6.969
	F3	20	100	93	-	+	0.0243	5.96	8.22	0.00036	0.8833	0.000161	-	7.561	7.143
	F4	20	100	124	-	+	0.0247	5.29	8.35	0.00037	0.8912	0.000499	-	7.771	7.470
	F5	20	100	113	-	+	0.0261	5.40	8.35	0.00038	0.8416	0.000503	-	7.712	7.216
	F6	20	100	115	-	+	0.0319	4.62	8.29	0.00054	0.9511	0.000663	-	7.720	7.380
	F7	20	100	75	-	+	0.0797	2.36	8.34	0.00129	0.9707	0.001697	-	7.530	7.131
	F8	20	100	25	-	+	0.2180	2.68	8.13	0.00345	0.9764	0.003557	-	8.841	8.800
	F9	20	100	27	-	+	0.2189	2.02	7.93	0.00370	0.9881	0.003162	-	8.555	8.409
	F10	20	100	28.5	-	+	0.2502	0.4	7.53	0.00423	0.9955	0.002694	-	7.147	7.961
	F11	20	100	22	-	+	0.3218	0.4	7.48	0.00534	0.9872	0.003296	-	7.804	7.000
G	G1	20	100	4.33	-	+	0.2378	7.95	6.92	0.00395	0.9752	0.003435	+	/	/
	G2	20	100	10	-	+	0.078	8.34	7.56	0.00132	0.9987	0.001737	+	/	/
	G3	20	100	20.2	-	+	0.0683	8.34	6.96	0.00116	0.9947	0.001526	+	/	/
	G4	20	100	30.3	-	+	0.0604	8.34	6.51	0.00101	0.9866	0.001329	+	/	/
	G5	20	100	10	-	+	0.292	7.53	4.61	0.00494	0.9996	0.003146	+	/	/
	G6	20	100	19.8	-	+	0.2722	7.53	2.14	0.00455	0.9982	0.002898	+	/	/
	G7	20	100	29.7	-	+	0.2441	7.53	0.28	0.00418	0.9945	0.002662	+	/	/
	G8	20	100	12.3	-	+	0.2683	7.64	4.34	0.00443	0.9985	0.003034	+	/	/
	G9	20	100	24	-	+	0.225	7.64	2.24	0.00375	0.9907	0.002568	+	/	/

ANNEXE C

Paramètres mesurés lors des tests de décantabilité en fonction du nombre de lavage effectués :

		Temps min	FTU surnageant	VBD mL/ L	VEC mL/ L	MES mg/ L	MVS mg/ L	MM S mg/L	IB mL/g	DCO t mg/L	DCO s mg/L	DCO p mg/L	DCOp/ MES	COT	TC	IC	MO	
Etat initiale	Brute	/	3210	118	882	4826	2622	2204	/	267.7	75.5	192.2	0.0398	3.15	56.65	53.5	6.4	
	Surnageant t après le :	30	310	118	882	610	/	/	24.45	/	/	/	/	/	/	/	/	/
		60	188	117	883	370	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
		100	106	115	885	250	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
		120	54.5	115	885	220	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
1 ^{er} lavage	Brute	/	2935	97	903	4061	2574	1487	/	128.1	36.8	91.3	0.0225	/	/	/	/	
	Surnageant t après le :	30	296.5	97	903	580	/	/	31.69	/	/	/	/	/	/	/	/	/
		60	142.4	97	903	280	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
		100	101.6	96	904	200	/	/	/	/	/	/	/	/	2.61	16.4	13.75	2.8
		120	63.8	96	904	141	/	/	/	42.5	5.48	37.02	0.009	2.61	14.75	12.15	2.2	
2 ^{eme} lavages	Brute	/	3824	98	902	3544	2263	1281	/	123.7	31.0	92.7	0.0261	/	/	/	/	
	Surnageant t après le :	30	305	100	900	600	/	/	32.85	/	/	/	/	/	/	/	/	/
		60	284.6	100	900	560	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
		100	259.2	100	900	510	/	/	/	/	/	/	/	/	3.21	9.86	6.65	3.6
		120	212.7	100	900	440	/	/	/	130.7	75.4	55.3	0.0156	2.85	9.19	6.36	2.6	
3 ^{eme} lavages	Brute	/	3781	102	898	3278	2122	1156	/	159.1	72.6	86.5	0.0264	/	/	/	/	
	Surnageant t après le :	30	620.4	102	898	630	/	/	36.69	/	/	/	/	/	/	/	/	/
		60	410	105	895	600	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
		100	388	105	895	595	/	/	/	/	/	/	/	/	5.54	10.63	5.07	2.75
		120	306.4	105	895	580	/	/	/	174.8	97.6	77.2	0.0235	5.18	9.85	5.17	9.8	
A l'état endogène			2917	/	/	4358	2471	1887	/	30.9	4.3	26.6	0.0061	2.08	9.07	6.2	1.8	

VBD : Vvolume des boues décantées

VEC : Volume d'eau claire (surnageant)

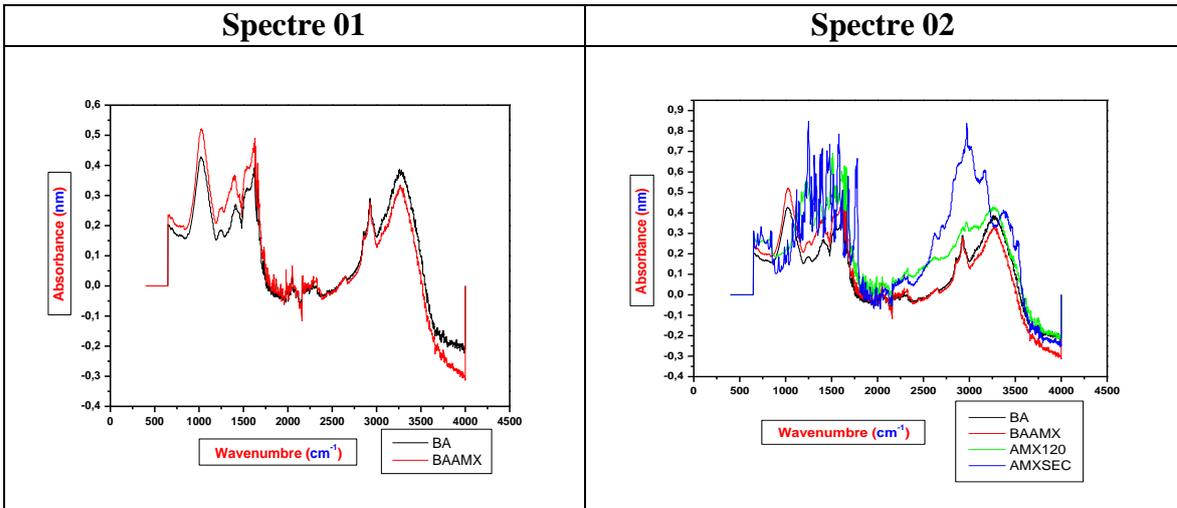
ANNEXE D

Evaluation de l'effet du Rapport S_0/X_0 pour un DCO = 300 mg/L dans les deux cas des Boues Brutes (autotrophes avec hétérotrophes) et les Hétérotrophes (Présence et non d'inhibiteur de nitrification) avec la technique de lavage et l'aération continue de la liqueur mixte.

S	S_0/X_0	K_{La} (h ⁻¹)	Q_{O_2} exo (mg/L/s)	T_s (h)	Q_{O_2} Tot (mg/L/s)	OUR_{end}	C_{end}	C_{min}	T (h)	V chute
<i>DCO = 300 mg/L Pour les Hétérotrophes : (préparation des boues avec Lavage, En présence d'ATU)</i>										
01	0.01	0.0011902	0.35895	0.68	2.28342	0.000786	8.44	8.26	0.31	0.581
02	0.02	0.0016212	1.14960	1.35	6.3712	0.00107	8.44	8.20	0.717	0.335
03	0.03	0.0015303	1.59488	1.85	8.34168	0.00101	8.44	8.22	0.892	0.247
04	0.04	0.0010961	1.61822	2.25	7.485	0.000723	8.44	8.16	1.108	0.253
05	0.06	0.0010621	2.17829	2.87	10.07784	0.000765	8.38	8.11	0.297	0.909
06	0.09	0.0024925	13.02376	7.73	59.48316	0.00167	8.43	8.08	4.864	0.072
07	0.15	0.0014639	13.71777	10.05	49.73322	0.000996	8.42	7.88	4.558	0.118
08	0.23	0.0016508	34.90224	23.67	123.5311	0.00104	8.47	7.64	6.656	0.125
<i>DCO = 300 mg/L Pour la Boue Brute : (préparation des boues avec Lavage, En absence d'ATU)</i>										
01	0.01	0.0007668	0.57525	1.57	4.22092	0.000644	8.26	8.02	0.31	0.774
02	0.02	0.0007713	1.80547	5.46	14.7073	0.000656	8.25	8.00	1.79	0.140
03	0.03	0.0008700	6.33493	4.57	17.21155	0.000661	8.34	7.64	1.22	0.574
04	0.04	0.0007962	3.39044	3.98	13.32361	0.000693	8.23	7.69	0.42	1.286
05	0.06	0.0008266	4.54122	7.38	23.65516	0.000711	8.23	7.83	2.56	0.156
06	0.09	0.0010329	19.51843	12.63	52.84842	0.000733	8.39	7.71	2.69	0.253
07	0.15	0.0011961	25.24899	17.41	71.72941	0.000742	8.48	7.94	5.59	0.097
08	0.23	0.0005550	9.17164	16.04	33.20273	0.000416	8.35	7.92	6.09	0.071
<i>DCO = 300 mg/L Pour la Boue Brute : (préparation des boues avec L'aération continue de 48 h, En absence d'ATU)</i>										
01	0.01	0.0008100	0.77898	1.83	5.10174	0.000656	8.29	8.02	0.36	0.750
02	0.02	0.0007630	1.78051	5.30	14.16951	0.000649	8.25	8.00	1.63	0.153
03	0.03	0.0008642	6.14939	4.53	16.98433	0.000666	8.33	7.64	1.22	0.566
04	0.04	0.0008728	3.6779	3.87	14.26572	0.000759	8.23	7.69	0.42	1.286
05	0.06	0.0008713	5.76531	7.94	26.4295	0.000723	8.27	7.83	2.56	0.172
06	0.09	0.0010271	19.41333	12.71	52.78873	0.000729	8.39	7.71	2.69	0.253
07	0.15	0.0011996	25.33236	17.41	71.96228	0.000744	8.48	7.94	5.59	0.097
08	0.23	0.0006612	12.00727	16.52	40.71544	0.000483	8.37	7.92	6.36	0.071

ANNEXE E

Les résultats d'analyse IR des boues :



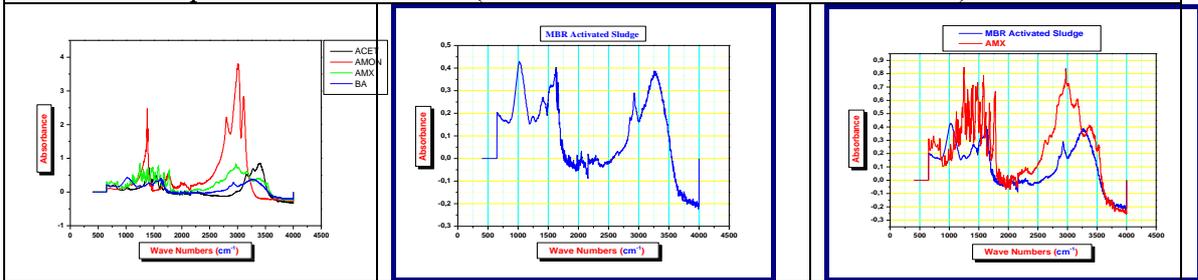
La superposition des spectres avant les tests avec l'Amoxicilline et le spectre obtenu après les tests.

BA : spectre des boues sans présence d'Amoxicilline (avant les tests)

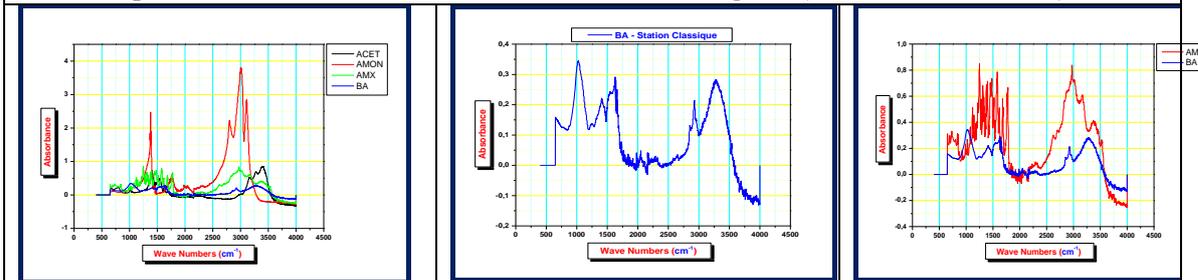
BAAMX : spectre obtenue après les injections d'Amoxicilline.

AMX120 : spectre d'amoxicilline (l'amoxicilline ici est séché à 120 °C)

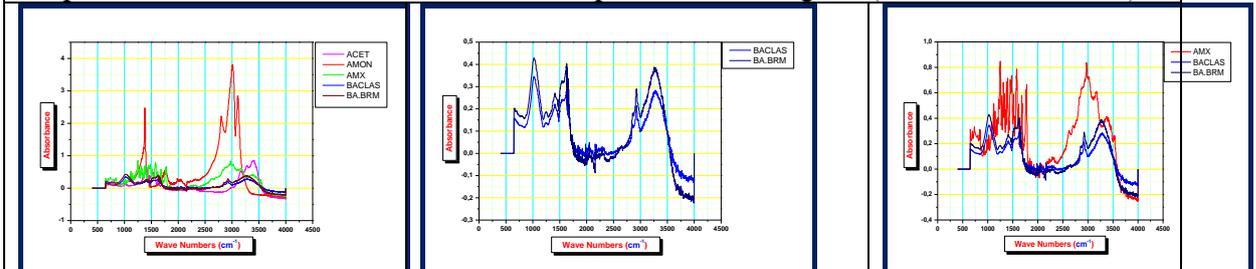
AMXSEC : spectre d'amoxicilline (l'amoxicilline ici est séché à l'air sec)



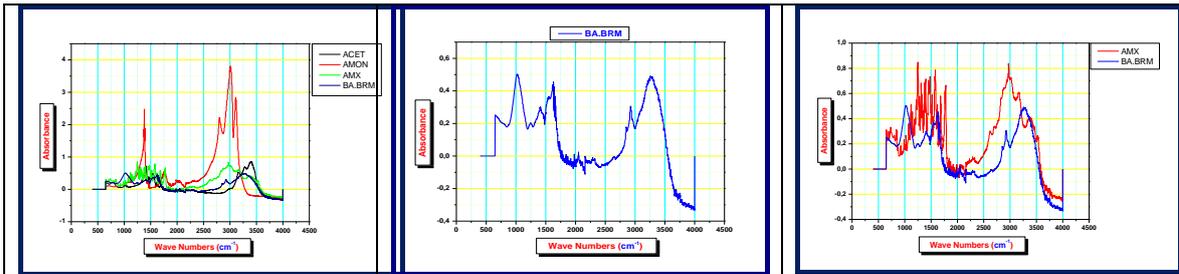
Spectre de boues activées de MBR à l'état endogène (ni substrat ni AMX)



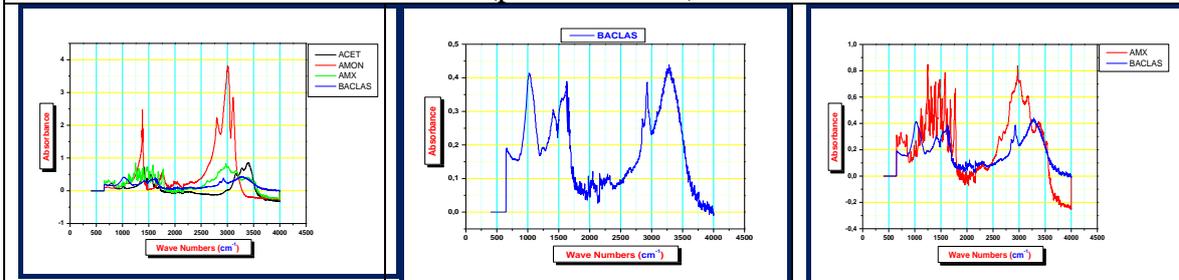
Spectre de boues activées de station classique à l'état endogène (ni substrat ni AMX)



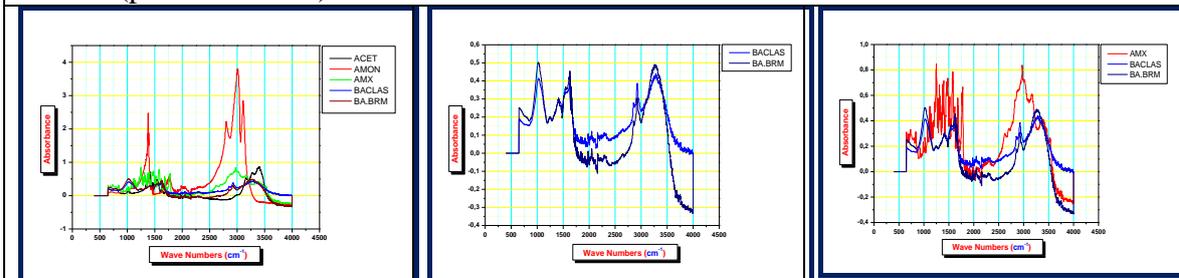
Superposition du Spectre de boues de MBR et spectre de BA de station classique (ni substrat ni AMX)



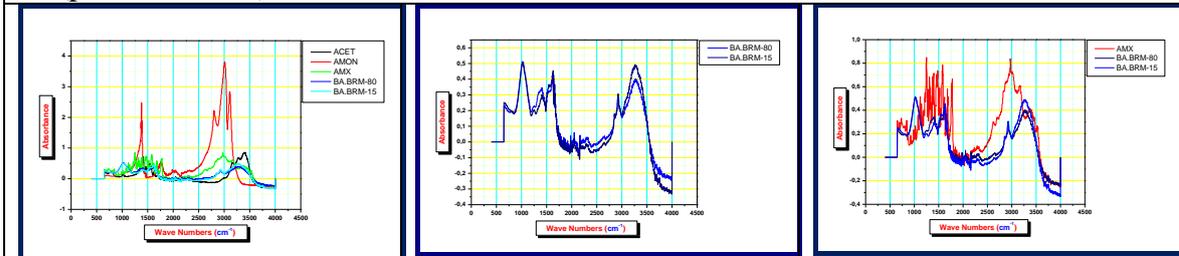
Spectre de boues de MBR après injection de 15 mg/l d'AMX et aération de 2 heures.
(pas de substrat)



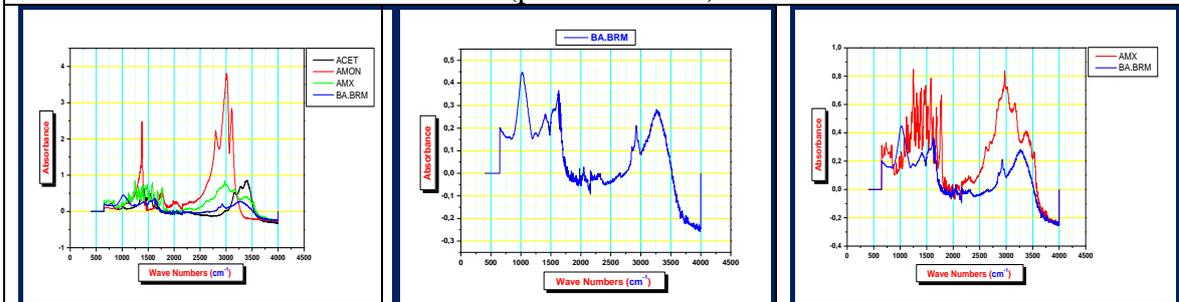
Spectre de BA de station classique après injection de 75 mg/l d'AMX et aération de 2 heures.
(pas de substrat)



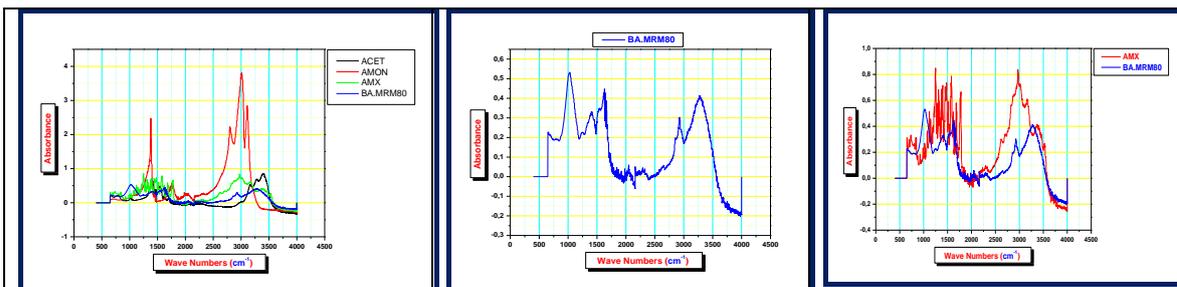
Superposition Spectre BA-MBR et station classique après l'injection d'AMX et aération 2h
(pas de substrat)



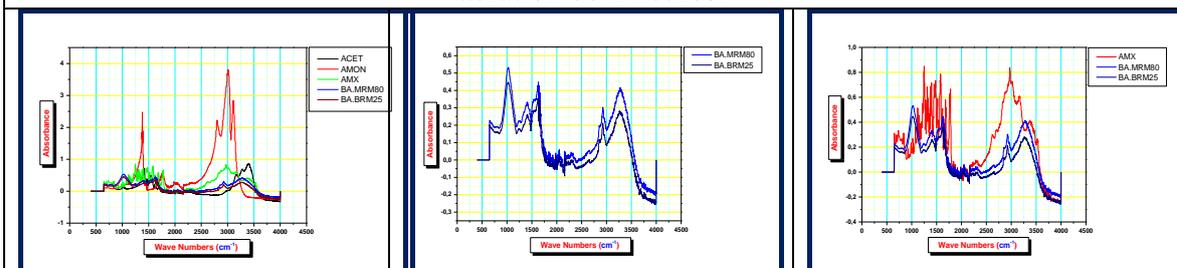
Superposition de deux Spectre BA-MBR d'injection de 15 et 80 mg/l d'AMX et aération 2h
(pas de substrat)



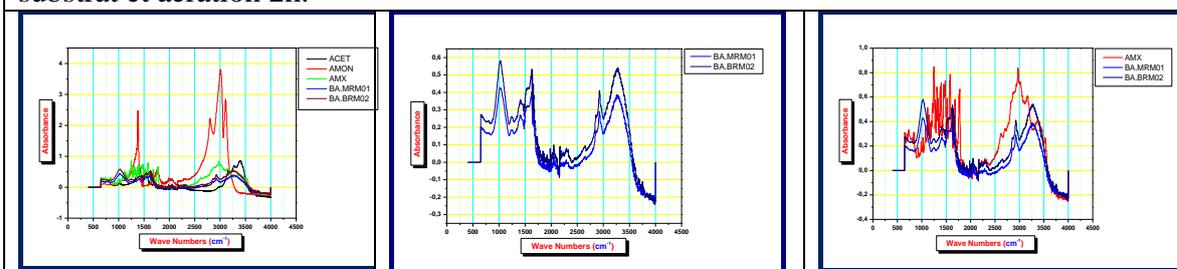
Spectre de BA-MBR après injection de 50 mg/l de substrat contenant 25 mg/l d'AMX et aération de 2 heures.



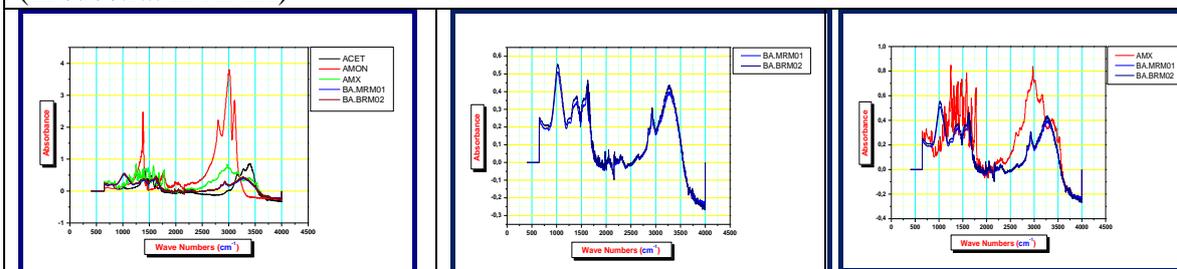
Spectre de BA-MBR après injection de 50 mg/l de substrat suivi par 80 mg/l d'AMX et aération de 2 heures.



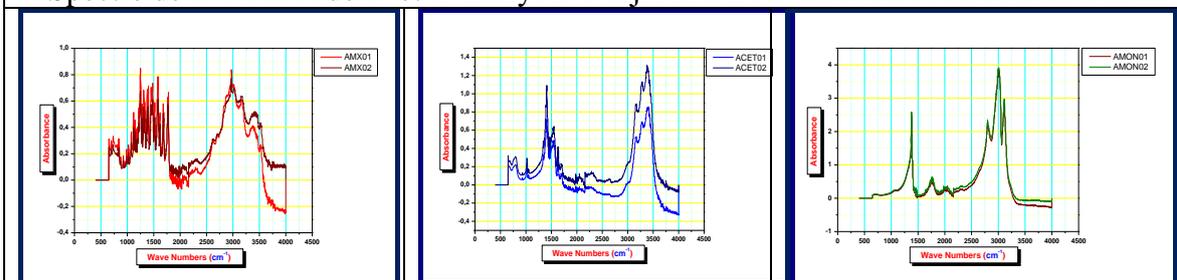
Superposition de spectre BA-MBR 25 et 80 mg/l d'AMX après injection 50 mg/l de substrat et aération 2h.



Superposition du Spectre BA de MBR après 1^e et 2^e analyse de même échantillon boues (ni substrat ni AMX)



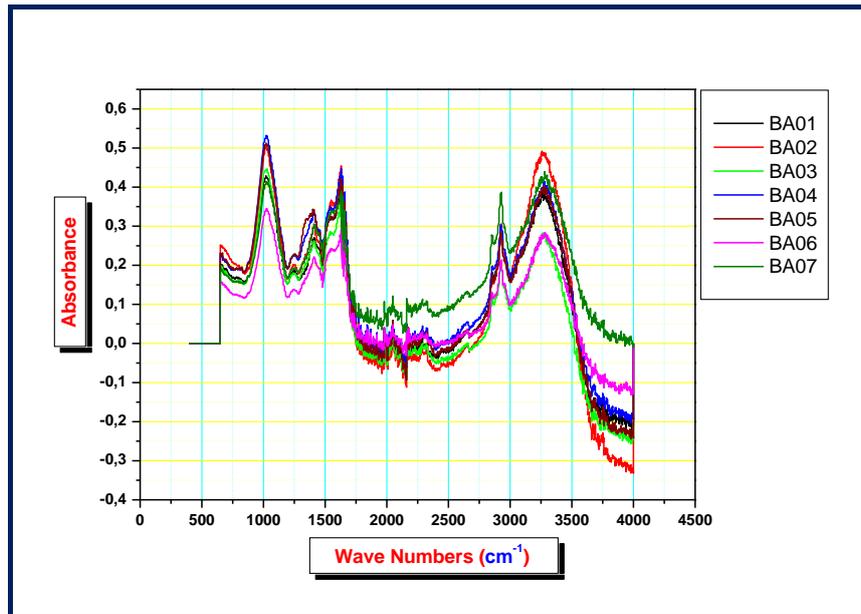
Spectre de BA-MBR de 1^e et 2^e analyses d'injection d'AMX et aération de 2 heures.



AMX 1^e et 2^e analyse

Acétate 1^e et 2^e analyse

Ammonium 1^e et 2^e analyse



Superposition de tous les spectres de boues activées soit de station classique ou de BRM :

ANNEXE F

Les tests de la respirométrie endogène (10-30 mg/L) :

BOUES ACTIVEES	Test respirométrique	1 ^e récupération	Test respirométrique	2 ^e récupération	Test respirométrique	3 ^e récupération	Test respirométrique	4 ^e récupération	Test respirométrique	5 ^e récupération
Sans Aucune injection	Test respirométrique	(4 ml) 1 ^e Injection (10 mg/l)	Test respirométrique	(2 ml) 2 ^e Injection (15 mg/l)	Test respirométrique	(2 ml) 3 ^e Injection (20 mg/l)	Test respirométrique	(2 ml) 4 ^e Injection (25 mg/l)	Test respirométrique	(2 ml) 5 ^e Injection (30 mg/l)
bioréacteur agiter et aérer		bioréacteur agiter et aérer		bioréacteur agiter et aérer		bioréacteur agiter et aérer		bioréacteur agiter et aérer		bioréacteur agiter et aérer
15 min	5 min	15 min	5 min	15 min	5 min	15 min	5 min	15 min	5 min	15 min

Les tests de la respirométrie exogène (Sub) :

BOUES ACTIVEES	Test respirométrique	1 ^e récupération	Test respirométrique	2 ^e récupération	Test respirométrique	3 ^e récupération	Test respirométrique	4 ^e récupération	Test respirométrique	5 ^e récupération
Sans Aucune injection	Test respirométrique	1,6 ml du substrat synthétique	Test respirométrique	bioréacteur agiter et aérer						
bioréacteur agiter et aérer		bioréacteur agiter et aérer								
15 min	5 min	1 min	5 min	10 min	5 min	10 min	5 min	10 min	5 min	10 min

Les tests de la respirométrie exogène (Sub + Inb) :

BOUES ACTIVEES	Test respirométrique	1 ^e récupération	Test respirométrique	2 ^e récupération	Test respirométrique	3 ^e récupération	Test respirométrique	4 ^e récupération	Test respirométrique	5 ^e récupération
Sans Aucune injection	Test respirométrique	1,6 ml du substrat + toxique	Test respirométrique	bioréacteur agiter et aérer						
bioréacteur agiter et aérer		bioréacteur agiter et aérer								
15 min	5 min	1 min	5 min	10 min	5 min	10 min	5 min	10 min	5 min	10 min

Les tests de la respirométrie endogène (Sub + Inb) :

BOUES ACTIVEES	Test respirométrique	1 ^e récupération	Test respirométrique	2 ^e récupération	Test respirométrique	3 ^e récupération	Test respirométrique	4 ^e récupération	Test respirométrique	5 ^e récupération
Sans Aucune injection	Test respirométrique	Injection de (4 ml → 10 mg/l) + injection de 1,6 ml de substrat	Test respirométrique	Injection de (2 ml → 15 mg/l)	Test respirométrique	Injection de (2 ml → 20 mg/l)	Test respirométrique	Injection de (2 ml → 25 mg/l)	Test respirométrique	Injection de (2 ml → 30 mg/l)
bioréacteur agiter et aérer		bioréacteur agiter et aérer		bioréacteur agiter et aérer		bioréacteur agiter et aérer		bioréacteur agiter et aérer		bioréacteur agiter et aérer
10 min	5 min	1 min	5 min	10 min	5 min	10 min	5 min	10 min	5 min	10 min

Les tests de la respirométrie endogène (Inb) :

BOUES ACTIVEES	Test respirométrique	1 ^e récupération	Test respirométrique	2 ^e récupération	Test respirométrique	3 ^e récupération	Test respirométrique	4 ^e récupération	Test respirométrique	5 ^e récupération	Test respirométrique
Sans Aucune injection	Test respirométrique	(12 ml) 1 ^e Injection (30 mg/l)	Test respirométrique	(4 ml) 2 ^e Injection (40 mg/l)	Test respirométrique	(4 ml) 3 ^e Injection (50 mg/l)	Test respirométrique	(4 ml) 4 ^e Injection (60 mg/l)	Test respirométrique	(4 ml) 5 ^e Injection (70 mg/l)	Test respirométrique
bioréacteur agiter et aérer		bioréacteur agiter et aérer		bioréacteur agiter et aérer		bioréacteur agiter et aérer		bioréacteur agiter et aérer		bioréacteur agiter et aérer	
15 min	5 min	15 min	5 min	15 min	5 min	15 min	5 min	15 min	5 min	15 min	5 min

Les tests de la respirométrie exogène pour la détermination d'EC20 :

BOUES ACTIVEES DE BIOREACTEUR DE 3 L	→	(250 ml) Cellule respirométrique	→	Agitation	/	Sans injection (boues activées seul)
					10 ml	Substrat seul (0 mg/l Amoxicilline)
					10 ml	Substrat contenant 10 mg/l Amoxicilline
					10 ml	Substrat contenant 15 mg/l Amoxicilline
					10 ml	Substrat contenant 20 mg/l Amoxicilline
					10 ml	Substrat contenant 25 mg/l Amoxicilline
				10 ml	Substrat contenant 35 mg/l Amoxicilline	
2 min	Soutirer / injecter	15 min				

Les tests de la respirométrie exogène pour la détermination d'EC50 :

BOUES ACTIVEES DE BIOREACTEUR DE 3 L	→	(250 ml) Cellule respirométrique	→	Agitation	10 ml	Substrat seul (0 mg/l Amoxicilline)
					10 ml	Substrat contenant 40 mg/l Amoxicilline
					10 ml	Substrat contenant 50 mg/l Amoxicilline
					10 ml	Substrat contenant 60 mg/l Amoxicilline
					10 ml	Substrat contenant 70 mg/l Amoxicilline
					10 ml	Substrat contenant 80 mg/l Amoxicilline
				2 min	Soutirer / injecter	15 min

Les tests de la respirométrie endogène en injectant l'AMOX seul :

BOUES ACTIVEES DE BIOREACTEUR DE 3 L	→	(250 ml) Cellule respirométrique	→	Agitation	10 ml	Amoxicilline seul (100 mg/l)
				2 min	Soutirer / injecter	15 min

Les tests de la respirométrie endogène en injectant l'AMOX seul :

BOUES ACTIVEES DE BIOREACTEUR DE 3 L	→	(250 ml) Cellule respirométrique	→	Agitation	10 ml	Substrat seul (100 mg/l)
				2 min	Soutirer / injecter	15 min

Les Articles :



(2022) 1–13

Effect of amoxicillin releases on the aerobic activity of heterotrophic biomass

Mahfoud Sakhraoui*, R. Zamouche-Zerdazi, M. Bencheikh-Lehocine, A.-H. Meniai

Laboratoire de l'Ingénierie des Procédés de l'Environnement (LIPE), Faculté de Génie de Procédés, Université Salah Boubnider Constantine 3, Ville Universitaire Ali Mendjli 25100 Constantine, Algérie, Tel. +213773223089; emails: mahfoudsakh@yahoo.com (M. Sakhraoui), docran16@yahoo.com (R. Zamouche-Zerdazi), mossaab@yahoo.fr (M. Bencheikh-Lehocine), meniai@yahoo.fr (A.-H. Meniai)

Received 15 February 2022; Accepted 12 October 2022

ABSTRACT

Due to its high use, amoxicillin (AMX) contributes in a large measure to the pollution of aquatic environment. Unfortunately this emerging pollutant has not been covered by the release standards. There is little information regarding the AMX effect on heterotrophic biomass of the wastewater treatment plant (WWTP), which are not designed to degrade them, causing possible dysfunction. The novelty in this study is the application of LFS respirometer as a fast, efficient and robust means to evaluate the AMX effect on heterotrophs response, allowing the determination of inhibition rates by simulating the biological processes taking place in conventional WWTP. Three types of activated sludge and an easily biodegradable synthetic substrate based on sodium acetate at 300 mg_{B-COD}/L considering the ratio $S_0/X_0 = 0.04 \text{ g}_{\text{COD}}/\text{g}_{\text{VSS}}$ were used. Respirometry showed quite different and low inhibition rates of heterotrophic where the maximum reduction in $Y_{O_2/S}$ rate was 30.6%, 22% and 20% for 75, 120 and 150 mg_{AMX}/L, respectively explaining that the heterotrophic biomass adapted to the substrate and to AMX showed a fairly significant resistance to inhibition compared to non-acclimated one. Heterotrophs biomasses are less sensitive and quick to adapt because they were inhibited by 35% at 150 mg_{AMX}/L, on other, biomass contained autotrophes, which were inhibited up to 35% in 25 mg_{AMX}/L.

Keywords: Amoxicillin antibiotic; Inhibition; Respirometry; Heterotrophic biomass activity; Activated sludge

1. Introduction

Currently, the challenge of providing safe drinking water is increasing with the growing population [1]. The pollution induced by antibiotics and their by-products originating from domestic, hospital and industrial activities, has been recognized as one of the most serious threats to public health in the 21st century, mainly due to a continuous release into aquatic environments and ecosystems where they accumulate. Currently they are not covered by regulation or environment limits unlike other micropollutants. Therefore they are considered as emerging pollutants [1–4]. This increases the risks of development, maintenance, transfer, spreading and transmission of antibiotic resistance genes (ARGs) to treatment and drug over the long

term, hence an irreversible effect favored by low concentrations and having serious impacts on the ecosystem where the physiological function of wastewater treatment plant (WWTP) microbiota [5–8] may be disrupted. There is evidence that these ARGs can be transmitted to humans [9–11]. However, up to now, it is difficult to completely remove antibiotics by conventional biological system where during such treatment, resistant genes can spread via the activated sludge process [12,13]. Despite this, biological treatment systems remain the most promising for the treatment of wastewater containing pharmaceuticals compounds, due to their cost effectiveness while being friendly to the environment [14]. Among the antibiotics, β -lactams are the most popular and represent more than 65% of the global antibiotic market, with annual use reaching 100–200.000 tons

* Corresponding author.

worldwide [15]. Mainly developed to achieve a biological effect, these antibiotics, are often recalcitrant, toxic [16] and have a high wastewater concentration in pharmaceutically active compounds (PhACs), often exceeding 100 mg/L [17]. Amoxicillin (AMX) is among the β -lactams, widely spread for several decades as more important micro-pollutants [18]. It is a broad-spectrum amino-penicillin antibiotic, effective against many gram-positive and gram-negative microorganisms [19–23] and is widely used as an inhibitor in modern human and veterinary medicine, due to its chemical structure, polarity, activity level, antibiotic specifications and environmental sustainability.

The massive production of AMX is the reason of its presence in different water types and in wastewater treatment plant (WWTP) [24–28]. AMX, like other biologically active substances, influences the bacterial biomass, can disrupt penicillin binding proteins and interferes with cell wall biosynthesis during reproduction, ultimately leading to microbial osmotic rupture [29], causing disruptions and this may occur within purifying dysfunctions cycles. The AMX was selected for this purpose for two reasons: (a) less than 30% of the used dose are not metabolized by the body, meaning that this molecule excreted by the body is present in an active form rather than a by-product. This allows to simulate experimental tests with the use of direct active ingredients; b) AMX is used to treat a variety of infection, which makes it a candidate to be included in the medical supplies [30,31]. Various methods are known for the evaluation of inhibition in activated sludge, like enzymatic inhibition, respiratory rate inhibition, inhibition of the activated sludge process efficiency, activated sludge micro-fauna inhibition, influence on bacterial kinetics of activated sludge, inhibition of cell viability by plate counting. The response of the viable heterotrophic biomass was carried out by combining batch experiments with respirometry under normal and inhibition conditions to determine the AMX attenuation to heterotrophic activity. Currently, respirometry is considered as the most rapid, sensitive, and economical dominant technique for evaluating AMX toxicity to heterotrophic biomass activity before and after their use [32,33]. Oxygen uptake rate (OUR) profiles per unit time and volume were used to assess and identify the chemical oxygen demand (COD) fraction and inhibition percentage [34–36].

Many physical and chemical methods have been suggested for the AMX removal from aquatic environments. Biodegradation and adsorption have been the main removal routes, but several studies [37] have shown that the removal of these molecules in conventional WWTP is often incomplete and hence may inhibit the biological activity [38–43], so that they are discharged into surface waters and then enter different aquatic compartments, thus biodegradation leads to variable transformations depending to the molecules of a relatively weak purification would be only 5% [44] to more 99% of elimination. Usually they leave the WWTPs almost unchanged. Effective methods are very expensive and present many performance problems such as a membrane bioreactor (MBR) [24]. However, AMX has been almost completely removed by simple and inexpensive activated sludge processes such as SBR process (sequencing batch reactor) at the end of each cycle [45]. The AMX removal was not the objective of this study,

but focus was on the inhibitory effect identification and the heterotrophic biomass response in the case of their presence in WWTP. Although antibiotic toxicity could inhibit the functional microbial community to varying degrees, the damage could be controlled by complex factors [46] that influence the degree of inhibition: VSS and TSS concentration, pH, solubility and inhibitor concentration, properties and bioavailability of inhibitor, the inhibitor form (dissolved or particulate, free or complex, sorbed or not on sludge) [47–49], the species present in the effluent and the liquor, SRT and hydraulic retention time (HRT), acclimation or not of the biomass, the biomass/toxic exposure time, the initial S_0/X_0 ratio which influences the AS biocenosis [50–52]. The releases of this antibiotic are of a concern because they would contribute to the maintenance and phenomenon of the emergence and dissemination of resistant germs, as well as to antibiotic therapy failures, due to this inappropriate and inconsiderate use and to the residence time in the environment coupled with the adaptive capacity of microorganisms and the possibilities of genetic transfer. Although the activated sludge processes favor the total or partial antibiotics biodegradation generally provide an ideal medium for the ARGs presence, as well as for their transfer [53]. An easily biodegradable substrate, acting as an energy source and electron donor, could enhance the biotransformation and refractory organic pollutants mineralization, including antibiotics [54–56]. The appropriate easily biodegradable substrate can promote the antibiotics detoxification such as AMX [57] by optimizing bacterial community structures and altering functional gene abundance [58–60]. In addition, an easily biodegradable substrate strategy has been used to activate functional enzymes and to accelerate the refractory organic matter biodegradation [61–64]. But it is important to know how an easily biodegradable substrate affect the ARGs production and understand their role in the micro-pollutants biodegradation. An easily biodegradable substrate like sodium acetate, may add a positive role in shortening the microbial acclimation period and stabilize the effluent quality. If sodium acetate reaches 100 mg/L in influent, the AMX removal will be almost 100% (after a long contact time).

The present study, investigated the AMX effect, on the active heterotrophic biomass response fraction in non-acclimated AS (substrate oxidation inhibition) and on others acclimated AS (anabolic pathways inhibition). Since the shock produced by AMX was different, this biomass was generally approximated by the viable fraction responsible for the biological process by the amount of TSS or VSS which could be easily determined [65,66]. However, little research had been carried out on AMX effect on heterotrophic biomass response and on the biodegradation. Adsorption of this molecule on bacterial activated sludge flocs, was generally not significant and therefore it was not considered, being out of the scope of the present study.

2. Materials and methods

2.1. Respirometry setup

The respirometry built for the present study is simple and based on a batch reactor; the installation is an assembly

of measuring and sampling instruments (Fig. 1). The respirometric experiments were carried out on an applied flow-gas/static-liquid type (LFS respirometry). The device is an open vessel, which facilitates the addition of synthetic substrate or the targeted inhibitor, so that the oxygen supplied to the respirometry is not a limiting factor. However for this case, it was applied for the number of injections introduced in the same experiment requiring a fairly long time to complete a single test.

A mass balance for oxygen in the respirometry can then be rewritten as [82]:

$$\frac{d(V_L S_O)}{dt} = Q_e S_{Oe} - Q_s S_{Os} + V_L K_L a (S_{Ose} - S_O) - V_L OUR_T \quad (1)$$

where V_L : volume of liquid phase in the respirometer (L); S_O : concentration of dissolved oxygen (DO) in the liquid phase (mg/L); S_{Oe} : DO concentration at the inlet of the respirometer; S_{Ose} : Saturation concentration of dissolved oxygen in the liquid phase (mg/L); $K_L a$: oxygen transfer coefficient in the liquid phase (h^{-1}); Q_e and Q_s : liquid flow at the inlet and outlet of the respirometer respectively (L/h); OUR_T : total oxygen uptake rate (mg/L·h)

In an LFS respirometry, [Eq. (1)] is reduced to both Eqs. (2) and (3) [73,82]:

$$OUR_{\text{exo}} = K_L a (S_{\text{end}} - S_O) - \frac{d(S_O)}{dt} \quad (2)$$

$$OUR_T = K_L a (S_{Ose} - S_O) - \frac{d(S_O)}{dt} \quad (3)$$

$$OUR_T = OUR_{\text{exo}} + OUR_{\text{end}} \quad (4)$$

2.2. Pharmaceutical synthetic effluent

Amoxicillin is worldwide the most commonly used antibiotic of the β -lactam family. It was discovered by Alexander Flemming in 1928–1929 [67], and was obtained by fermentation in the absence of penicillin G-specific side chain precursors [68]. AMX is used to treat various infections caused by bacteria in the ear, lung, nose, teeth, urinary tract and skin infections. It is also used before surgery to prevent infections [69]. AMX has a good diffusion throughout the organism because it binds 17%–20% to plasma proteins. Due to its very low lipophilicity, it is not able to diffuse inside the host cells and therefore cannot be active on intracellular bacterial forms.

From the moment of its administration, AMX undergoes simultaneous distribution and elimination phenomena. The gradient concentration between the intra- and extravascular medium favors the movement of this molecule from the administration space to the rest of the pharmacokinetic system in comparison to the elimination process. This results in a rapid drop in plasma drug concentrations, known as the distribution phase. Gradually, this gradient concentration cancels itself out and reaches a state of pseudo-equilibrium. This results in a slowing of the drop in plasma concentrations (elimination phase), which is the process of irreversible transfer of the PhACs from the measurement site, the plasma, to the outside of the pharmacokinetic system under study. It can be achieved in two ways, either by excretion or by metabolism, which is elimination by an enzymatic process that will chemically transform the PhACs into a substance that can be more easily excreted. The organs responsible for the elimination of a PhACs are called emunctory organs (kidneys and liver). The skin, lungs and intestine are other possible routes of elimination. AMX is mainly excreted from the kidney using tubular secretion mechanisms. Its excretion in the bile has been

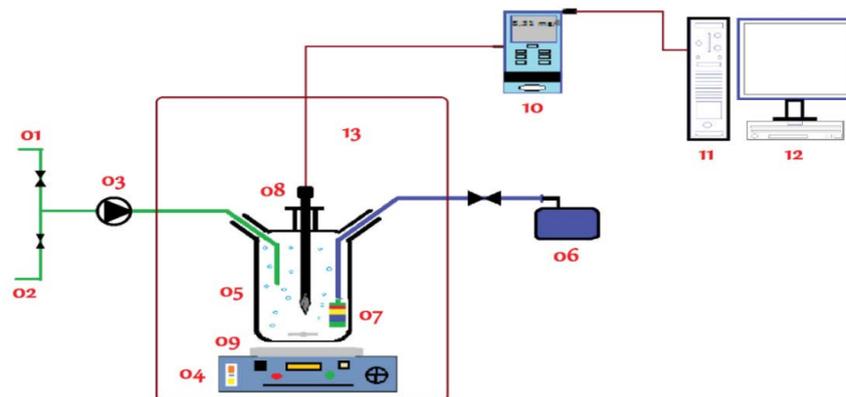


Fig. 1. Scheme of LFS respirometric cell. 1-Supply system for different injections (substrate, inhibitor). 2-Racking system for sampling (emptying, samples). 3-Control system (Valves). 4-Agitation system (agitator plate). 5-Bioreactor (transparent glass batch reactor with a volume of 0.6 L). 6-Aeration system (air injection with a constant flow rate of 150 L/h·min). 7-Air diffusion system (fine air bubble diffuser made of plastic and/or ceramic). 8-Multi-use probe (for different measurements: DO, pH, TDS, T° , salinity, conductivity). 9-Homogenization system (magnetic stirring bar). 10-Multi-parameter measuring system. 11-Data acquisition and recording system. 12-Data processing system. 13-Incubation medium of installation (thermostatic chamber set at $20^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$).

Table 1
Physical–chemical properties of the AMX antibiotic [71,72]

Therapeutic class	Antibiotic
Family	β -lactams
IUPAC name ^a	α -amino-p-hydroxybenzyl penicillin
Synonyms	Amox; AMC; AMX; Amoxicillin trihydrate; Amoxicillin anhydrous; D-amoxicillin; p-hydroxyAMP
Gross formula	$C_{16}H_{19}N_3O_5S$
Raw formula of the oral form	$C_{16}H_{19}N_3O_5S \cdot 3H_2O$
No. CASRN ^b	26787-78-0
Molar mass (g/mol)	Amoxicillin: 365.40; Amoxicillin trihydrate: 419.41
Physical characteristics	Solid or liquid, white to off-white crystalline powder, penicillin-type odor
Solubility in water (g/L)	3.9 (around 3.43 g/L)
Solubility in organic solvents	
Methanol	7,500 mg/L
Ethanol	3,400 mg/L
Melting point	194°C
Boiling point	743.2°C at 760 mmHg
Flash point	403.3°C
$\log K_{ow}$ ^d	0.87
pKa ^c	3.39, 6.71, 9.41
λ_{max} (nm)	233

^aInternational Union of Pure and Applied Chemistry;

^bChemical Abstract Services Registry Number;

^cAcid dissociation constants;

^dOctanol/water partition coefficient.

demonstrated in humans and animals where it is eliminated in the same administered form [70].

AMX is a semisynthetic drug with a broad spectrum of activity. It inhibits the interactions between the linear peptidoglycans chains which act by disturbing the cell walls synthesis of bacteria during reproduction, it is a β -lactam antibiotic, having a very short residence time in the stomach and it degrades in gastric acid.

2.3. Synthetic wastewater substrate

The synthetic effluent used in this study contained the substrate sodium acetate as a carbon source and ammonium chloride as a nitrogen source as well as other necessary micronutrients for bacterial growth (Table 3). The products used are easily biodegradable by nature in order to ease their degradation and rapid acclimation since they have a very low latency phase. The established injections will be performed, while the COD concentration was 300 mg/L.

Sufficient easily biodegradable substrate could be attributed to the functional genes development that maintained microbial activity and developed an optimized microbial community to enhance the micro-pollutants

Table 2
Results of some previous studies on AMX removal [21,22]

Operational condition	HRT (h)	AMX removal efficiency %
Up-flow anaerobic sludge blanket (UASB)	23.2	21.6
Up-flow anaerobic sludge blanket (UASB)	23.5	20.2
Novel micro-aerobic hydrolysis acidification reactor (NHAR)	9.3	20.4
Cyclic activated sludge system (CASS)	14.9	68.2
Biological contact oxidation tank (BCOT)	14.9	80.6

Table 3
Composition of the synthetic substrate used in the current study [73,74]

Constituents	Concentration (mg/L)
Carbon source: $C_2H_3O_2Na$ (sodium acetate)	2.564
Nitrogen source: NH_4Cl (ammonium chloride)	1.492
Micronutrients	
NH_4Cl-N	0.0068
$FeCl_3$	0.0023
$MgSO_4$	0.166
$CaCl_2$	0.412

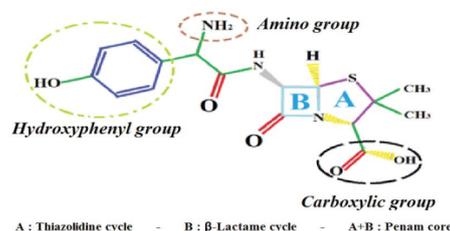


Fig. 2. AMX semi-developed structure identifying its ionizable groups, nucleus β -lactams cycles [70].

biodegradation [56,75]. The easily biodegradable substrates use had developed optimized microbial community structures that enhanced and stabilized AMX biodegradation. Consequently, the microbial cell walls appeared cloudy and severely decomposed. Such cell wall decomposition was significantly mitigated when the easily biodegradable substrate had optimized functional microorganisms. Indeed, the integrity of cell morphology with the easily biodegradable substrate was contributed by the increased coding genes expression, penicillin-binding proteins and up-regulation of β -lactamases as well as down-regulation of enzymes that inhibited peptidoglycan biosynthesis. Sodium acetate had an up-regulates β -lactam damaging enzymes [60] within the first hour. The sodium acetate addition contributed to the abundant ARG removal and resistant pathogenic bacteria. Such ARG might cause a serious public health challenge,

worldwide [76,77]. The microbial community structure was affected by environmental factors and this could determine the ARGs production and could promote or mitigate bacteria harboring ARGs as well as modify ARG profiles [78,79]. AMX removal efficiency increased significantly with increasing supplementation of easily biodegradable substrate. These improvements were attributed to the microbial activity promotion and functional microorganism enrichment [56]. Overall, information on the removal and the fate of antibiotics in WWTPs was still limited.

2.4. Sludge inoculum

In order to evaluate the effect of the introduction of AMX on a variety of activated sludge (AS), three types of sludge were used. The first inoculum was an AS in its raw state taken from the aeration tank of the local urban WWTPs. The two other inocula used in the different experiments carried out were taken from the two adaptation bioreactors previously started up for 38 d where the first one aimed to adapt the microorganisms to the synthetic substrate and the second-one to the synthetic substrate with AMX (Fig. 3). The different characteristics of inocula taken from the treatment plant or the adaptation bioreactors are grouped in (Table 4).

An increase in the salinity of inocula was observed in the two adaptation bioreactors caused mainly by the nature of the used synthetic carbonaceous substrate, which was in the salt form. The adaptation phase was carried out gradually with a time step varying between 5 and 8 d and increasing substrate concentrations and AMX reaching 11 and 1.5 g/L, respectively (Fig. 4). Several parameters were carried out to monitor the operating status of the two adaptation

bioreactors using the Multi-parameter measuring system allowing the following of temperature (°C), pH, DO (mg/L), salinity (%), conductivity ($\mu\text{S}/\text{cm}$) and total salts (mg/L) as well as microscopic visualizations in fresh or stained state using a microscope with variable magnification (Infinity, Optech) (Fig. 3). The sludge adapted to the substrate and the inhibitor, presented a more visual state of compaction than the other two sludges, where the flocs were more open, with an irregular shape.

2.5. Sludge preparation for the various respirometric tests

Two main techniques designated by the endogenisation process had been developed for the preparation of AS in respirometric tests. These sludges taken from the different compartments of the WWTP biological line, mainly from biological basins, were either subjected to continuous aeration [80,81] or are washed. The importance of these preparations was to get rid of the exogenous substrate recovered with the AS during sampling without considerably disturbing the initial state of sludge activity. It is important to note that the sludge washing technique was mainly used for sludge with good settling capacities, presenting an SVI (sludge volume Index) ranging from 100 and 150 mL/g, otherwise sludge loss might occur during washing and if the sludge had SVI higher than 150 mL/g, the technique of continuous aeration was more recommended. Zamouche-Zerdazi et al. [82] used the washing technique for a healthy sludge with a filamentous index (FI) varying between 1 and 3 and the technique of continuous aeration for 24 h, for a bulking sludge with very poor settling capacities and an FI varying between 4–5. Endogenous aeration requires a fairly long period of time, especially for those using the continuous aeration technique, where the time can

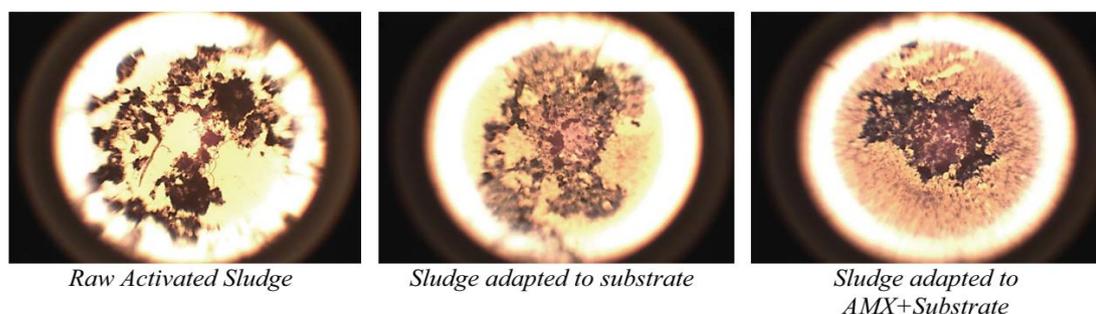


Fig. 3. Microscopic visualization of the different activated sludge used. (a) Raw activated sludge, (b) sludge adapted to substrate, and (c) sludge adapted to AMX + substrate.

Table 4
Main characteristics of the inocula used in the current study

	pH	Salinity (%)	Conductivity ($\mu\text{S}/\text{cm}$)	DO (mg/L)	Temp. (°C)	Mineralization ratio (%)	Substrate adaptation	AMX adaptation
AS1	7.41 \pm 0.10	0.65 \pm 0.05	1,408.5 \pm 55.5	4.22 \pm 0.09	–	41–45	(–)	(–)
AS2	6.89–8.84	0.7–27.6	1,569–43,200	3.04–8.20	13.1–22.6	30–39	(+)	(–)
AS3	7.13–8.80	0.7–22.6	1,567–35,900	0.11–8.07	13.6–23.7	36–40	(+)	(+)

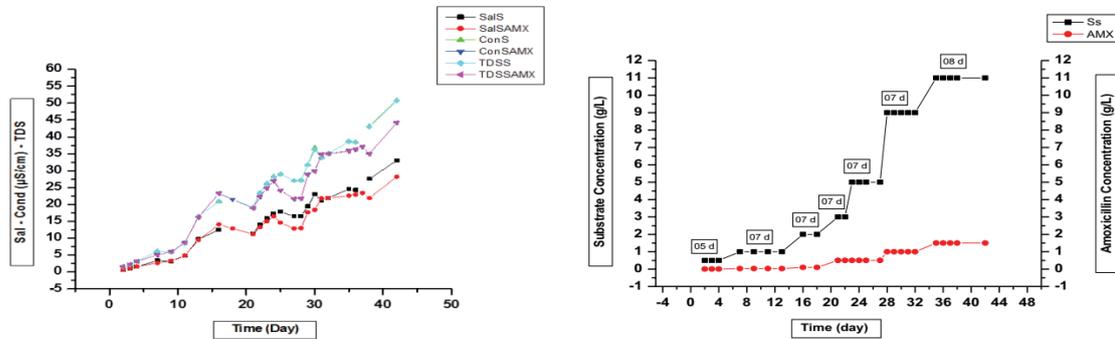


Fig. 4. Salinity evolution and the program improved in the adapted reactors.

vary from a few hours to 5 d. In order to carry out this preliminary preparation of the AS, an optimization of the operating conditions of the washing technique had been carried out in previous studies, to mention the time and number of washes. The various inocula would undergo a single washing and then continuous aeration at 20°C for a period not exceeding 3 h, in order to reach an endogenous state characterized by a plateau in the temporal DO measurements [73].

3. Results and discussion

3.1. Determination of the oxygen transfer coefficient ($K_L a$)

The $K_L a$ must be evaluated according to the operating conditions imposed in the respirometric tests (flow rate, aeration mode, stirring speed, reactor geometry). The estimation methodology is based on the exploitation of the aeration and/or deaeration curve obtained after a disturbance imposed on the DO concentration in endogenous condition (the disturbance is imposed after reaching the apparent endogenous state as a baseline when monitoring the oxygen concentration) [83]. Linear regressions for the different slopes estimation will be performed in the first part of the evolution of the oxygen concentration of the aeration or deaeration curve and the liquid phase $K_L a$ can be estimated using the equations obtained by establishing mathematical developments in each considered situation.

By exploiting only, the deaeration curve (part B/slope 1), the $K_L a$ will be estimated by Eq. (5), on the other hand by exploiting the deaeration and aeration curves (part B and D/slope 1 and 2), $K_L a$ will be determined by Eq. (6) and finally by exploiting the aeration curve (part D/slope 2) $K_L a$ will be estimated by Eq. (7), (Fig. 5) [73,82].

$$K_L a = \frac{OUR_{end}}{S_{OS} - S_{end}} \quad (5)$$

$$K_L a = \frac{\text{Slope 02} - \text{Slope 01}}{S_{OS} - S_{end}} \quad (6)$$

$$\ln \left[\frac{S_{end} - S_O}{S_{end} - S_O(t=0)} \right] = K_L a t \quad (7)$$

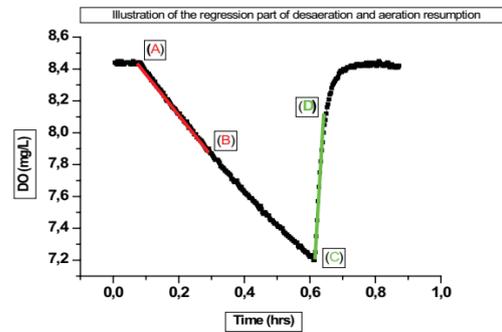


Fig. 5. Regression part illustration of deaeration and aeration resumption for the $K_L a$ estimation.

The $K_L a$ determination must be meticulously carried out since this parameter conditions the respirometric responses in continuous aeration for the different injections. These three $K_L a$ determination approaches will be applied to an experiment carried out for a S_0/X_0 ratio equal to 0.04 g_{COD}/g_{VSS} (Fig. 6). According to the obtained results and grouped in (Table 5), the first development seems to underestimate $K_L a$ (low values compared to the two others) (Fig. 7), because it only considered the deaeration phase in oxygen transfer determination. In this phase, the DO consumption were very fast and only due to the microorganisms endogenous respiration. However, the second development considers the two phases of the respirometric response (deaeration and aeration) where all the consumption oxygen transfer was considered. The oxygen transfer from the gaseous to the liquid phase was conditioned by the aeration rate and the stirring speed applied in the respirometry (operating conditions) and from the liquid to the solid phase conditioned by the microbial activity. Finally the third development only considered the aeration phase, masking the endogenous microbial activity. This development can only be exact in the determination case of $K_L a$ in clear water. The results considered in the present study will be those allowing the $K_L a$ determination using the second development.

It is important to note that the maximum exogenous respiration after the substrate injection is sometimes lower

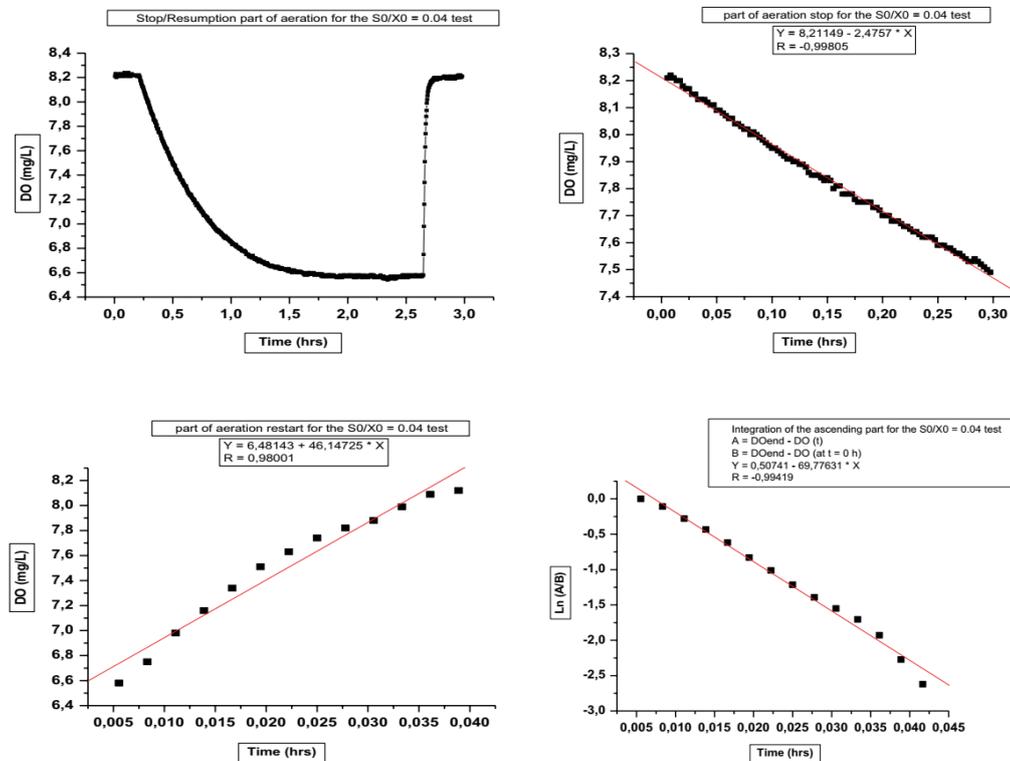


Fig. 6. Application of the three mathematical developments for the $K_L a$ determination and for a S_0/X_0 ratio = $0.04 \text{ g}_{\text{COD}}/\text{g}_{\text{VSS}}$.

Table 5

Respirometric responses characteristics using $K_L a$ determined with the three mathematical approaches ($S_0/X_0 = 0.04 \text{ g}_{\text{COD}}/\text{g}_{\text{VSS}}$)

$S_0/X_0: 0.04 \text{ g}_{\text{COD}}/\text{g}_{\text{VSS}}$	OUR_{end} (mg/L·h)	$K_L a$ (h^{-1})	$\text{OUR}_{\text{exomax}}$ (mg/L·h)	Q_{exo} (mg/L of reactor volume)	Q_T (mg/L of reactor volume)	T_s (h)
Linear descending response		2,153	1,163	2,547	12,409	
Linear descending and ascending response	2,475	50,197	27,106	59,376	69,237	3,983
Linear ascending response		69,776	37,679	82,535	92,397	

than the endogenous respiration (Table 5), in the case where only the deaeration phase is considered. This confirms that the first approaches for $K_L a$ determination underestimates it.

3.2. S_0/X_0 ratio fixing in respirometric tests

In order to determine the heterotrophs oxygen consumption rate " OUR_{exoH} ", it is necessary to block the autotrophs respiration by using nitrification inhibitors such as allylthiourea (ATU) and 2-chloro-6-(trichloromethyl) pyridine (TCMP). The applied dose depends on the autotrophs concentration in the AS. For a mixed population, the fraction of nitrifying organisms in the AS culture increases with the N/COD ratio of the wastewater, since heterotrophic

bacteria can be competitive for the nitrogen substrate they consume for their anabolic requirement. In the present study a dose of 20 mg/L of ATU was used in the respirometric tests to an estimated carbonaceous substrate oxidation [82] and the inhibitor was introduced after the endogenous respiration and the $K_L a$ determining step, for all established tests, using the inocula AS1, AS2 and AS3.

A contact time of 20 min between the nitrification inhibitor and the biomass was fixed before any further introduction of AMX and the synthetic substrate into the batch respirometry. The used substrate quality, the inocula and the operating conditions were very important to set in the respirometric tests, particularly the initial ratio, between the substrate and the biomass of the mixture, S_0/X_0 .

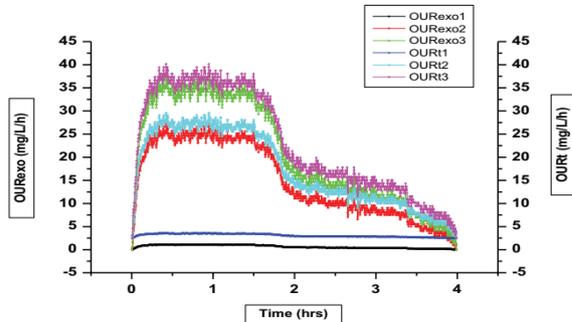


Fig. 7. Exogenous and total respiration obtained using the three $K_t a$ determined using the three mathematical developments for the S_0/X_0 ratio = $0.04 g_{COD}/g_{VSS}$.

This ratio determined the respirometric response, influenced the metabolic processes involved in the degradation, the kinetic parameters identification and the easily and slowly biodegradable compartments dissociation.

In this study, the S_0/X_0 ratios was obtained by varying the injected synthetic substrate and the AS pre-treated volumes in the respirometric cell and is expressed in g_{COD}/g_{VSS} . In the batch respirometric studies, a low S_0/X_0 ratio less than $0.2 g_{COD}/g_{VSS}$ was used, in order to minimize the experiment duration and to carry out several successive substrate injections, thus avoiding the significant growths generation during successive experiments carried out in the same respirometric test, which could confuse the inhibition study, since the production of a healthy biomass (uninhibited) would take place.

Many authors consider that these low ratios allow the obtention of the kinetic constants representative of the initial biomass [82]. Experiments were carried out on heterotrophic biomass and for different S_0/X_0 ratio using the AS1 inoculum. The different experiments results are summarized in the (Table 6); the (Fig. 8) illustrates the variation in maximum heterotrophs exogenous respiration as a function of the degradation time for each S_0/X_0 ratio tested.

Above S_0/X_0 equal to $0.06 g_{COD}/g_{VSS}$, the experiment seemed to be very cumbersome since the recommended time for the degradation of the synthetic substrate (T_s) was very extended, limiting the performance of successive injections and allowing to quantify the effect of PhACs waste at different concentrations on the heterotrophs activity, bearing in mind that each inhibition test would be preceded by its control test (without inhibition). So these experiments were carried out for not adapted sludge to the substrate or to AMX (AS1) and times would certainly be reduced for the inocula AS2 and AS3 after adaptation. By varying the S_0/X_0 ratio from 0.01 to $0.23 g_{COD}/g_{VSS}$, the maximum heterotrophs respiration reached $53.1133 \text{ mg/L}\cdot\text{h}$ (Fig. 7).

An S_0/X_0 ratio of $0.04 g_{COD}/g_{VSS}$ would be set in all heterotrophs inhibition tests of AS1, AS2 and AS3 inocula, although the heterotrophs maximum respiration ($OUR_{exo,maxH}$) without inhibition did not reach the encountered values for AS, ranging between $30\text{--}40 \text{ mg/L}\cdot\text{h}$ (Table 6), but many researches have been established in close reports for the

Table 6
Parameters characterizing respirometric responses for different S_0/X_0 ratios

	S_0/X_0 (g_{COD}/g_{VSS})	$K_t a$ (h^{-1})	Q_{exoH} (mg/L)	T_s (h)	$OUR_{exo,maxH}$ ($mg/L\cdot h$)
COD = 300 mg/L	0.01	19.274	1.614	0.681	3.469
	0.02	63.426	12.493	1.356	15.222
	0.03	67.154	19.441	1.856	14.773
	0.04	36.164	14.831	2.253	10.125
	0.06	28.220	16.076	2.869	7.6195
	0.09	56.992	82.720	7.728	19.947
	0.15	28.423	73.984	10.050	15.348
	0.23	64.016	375.967	23.672	53.133

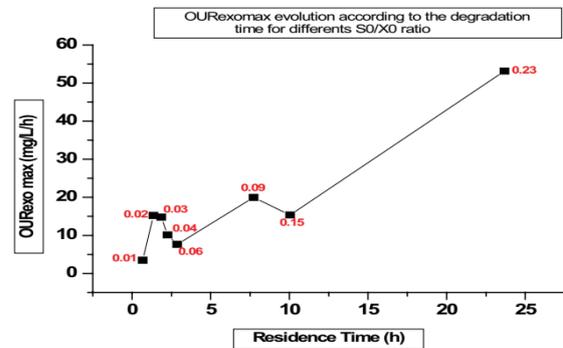


Fig. 8. Maximum exogenous respiration of heterotrophs according to the degradation time for different S_0/X_0 ratios (AS1).

estimation of biokinetic constants, for instance, Daniele et al. [84] evaluated the heterotrophic biokinetic constants using LFS respirometric batch tests established at a ratio S_0/X_0 of $0.05 g_{COD}/g_{VSS}$ to study the contribution of the supports in the treatment by MBBR (moving bed biofilm reactor).

3.3. AMX effect on heterotrophs microbial activity in aerobic conditions

The AMX effect on the heterotrophs activity in aerobic conditions was mainly evaluated by estimating the conversion efficiency of heterotrophs noted (Y_H). It should be remembered that in discontinuous cultures, similarly to continuous ones, a portion of the substrate (S) was converted into new cells (X) characterized by the fraction Y_H and a portion was oxidized to provide the energy characterized by the fraction $(1-Y_H)$ noted $Y_{O/S}$ [84]. Y_H was determined using the following equation [84]:

$$Y_H = 1 - Y_{O/S} = 1 - \frac{Q_{TH}}{\Delta S_S} \quad (8)$$

where Q_{TH} : The amount of DO consumed by the heterotrophs (calculated by integration of respiration rate profile); ΔS_S : The amount of carbonaceous substrate removed, expressed in CODs.

This parameter could only be assessed by inhibiting the autotrophs activity as mentioned above; the effect was quantified on the three different inocula. The effect on activity could be evaluated by estimating either the slopes percentage reduction (P) (the parameter that can be measured most rapidly) of the respirometric peaks, in the presence and absence of the PhACs [Eq. (9)], the reduction percentage in the total oxygen consumed quantity (Q_T) [Eq. (10)] [84], or autotrophs (Q_{TA}) and heterotrophs (Q_{TH}) oxygen consumed quantity in the presence and absence of inhibitors.

$$P = \frac{(\text{pente})_0 - (\text{pente})_1}{(\text{pente})_0} \times 100 \quad (9)$$

$$R_T = \frac{Q_{T0} - Q_{T1}}{Q_T} \times 100 \quad (10)$$

Endogenous respiration for AS1 varied between 3.166 and 11.741 mg/L·h, depending mainly on the state of activity of the AS1 inoculum, which was mainly conditioned by the operation of the local treatment plant, but was on average equal to 4.659 and 16.80 mg/L·h for the inocula AS2 and AS3 respectively. This influenced the transfer of oxygen in the liquid phase which was controlled as previously mentioned by the operating conditions set in the respirometric tests and the inocula microbial activity. The AMX effect introduction on microbial activity could be manifested under different aspects either by slowing down the microbial activity and therefore increasing the time recommended for the degradation of the exogenous substrate injected into the respirometry reactor (T_d), or by a stopped activity of some microorganisms, reducing the exogenous heterotrophs maximum respiration, or by simultaneous effects and consequently a synchronized significant reduction in time and maximum respiration would be recorded.

A multitude of experiments was performed, adding different quantities of AMX and the same concentration of synthetic substrate. Nevertheless inocula AS2 and AS3 were carefully washed before carrying out the respirometric tests not only to reach the endogenous state, but also in order to reduce the salinity of the reaction medium caused by the use of the substrate in salt form. Inhibitory effects of AMX on the three activated sludge activity are summarized in (Table 7), The parameters, defined by using a respirometer were used to obtain information about the effects on the two of the most important biochemical processes that take place in a wastewater treatment plant, heterotroph biomass growth (Y_H) and heterotroph energy substrate consumption ($Y_{O/S}$). As can be seen, the fraction of the substrate use for the energy consumption was very dissimilar for the different types of inocula, in general it was less weak for the AS1 and AS2 inoculum and more significant for the AS3 inoculum. The effect of the introduction of AMX on these different types of biomass was not very regular (Table 8).

Maximum reductions in the $Y_{O/S}$ rate expressing the fraction of the substrate used for the energy consumption were 30.639%, 21.79% and 19.923% for the 75, 120 and 150 mg/L AMX doses and inocula AS1, AS2 and AS3, respectively (Fig. 9) [74]. The effect of the AMX introduction seemed at times to slow down microbial activities since the recommended time (T_d) for the degradation of the injected substrate increased without attenuation of the maximum respiration in some experiments and at times reduced the activity since the maximum exogenous respiration and the degradation time decreased significantly, reaching 29.883%, 36.844% and 25.243% for the doses 75, 120 and 100 mg/L of AMX and the inocula AS1, AS2 and AS3, respectively.

According to Fig. 9 showing the percentages inhibition of (a) heterotrophs for the three different activated sludge used and (b) for the mixed liquor without nitrification inhibitor. The heterotrophs adapted to the substrate and substrate containing AMX showed remarkable resistance

Table 7
Inhibition percentage relative to DO consumed by heterotrophs for substrate injected

Dose (mg _{AMX} /L) inhibition%	5	15	30	50	60	75	100	120	150
AS1	2.167	-11.039	-19.067	17.467	-	30.646	0.775	-	-
AS2	-	-8.339	-0.764	-	12.380	-	-	21.746	-
AS3	18.039	16.017	9.229	-5.093	-	-1.362	15.244	-	19.934

Table 8
Estimated $Y_{O/S}$ before and after different doses of AMX injection

		5	15	30	50	60	75	100	120	150
AS1	$Y_{O/S}$	0.181	0.190	0.167	1.164	-	1.126	0.996	-	-
	$Y'_{O/S}$	0.177	0.211	0.199	0.960	-	0.781	0.988	-	-
AS2	$Y_{O/S}$	-	0.272	0.295	-	0.267	-	-	0.234	-
	$Y'_{O/S}$	-	0.295	0.297	-	0.233	-	-	0.183	-
AS3	$Y_{O/S}$	1.225	0.861	0.975	1.223	-	1.077	0.842	-	1.044
	$Y'_{O/S}$	1.004	0.723	0.885	1.286	-	1.091	0.714	-	0.836

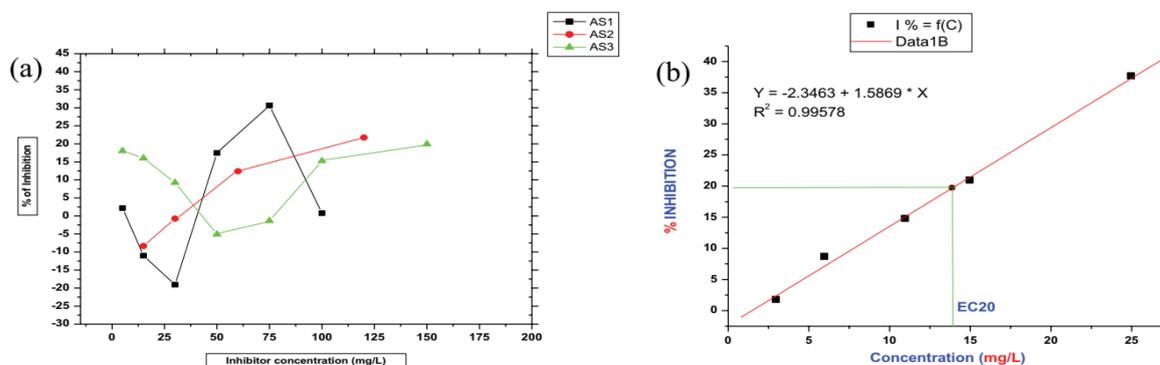


Fig. 9. Inhibition percentage curve according to inhibitor concentration for (a) the different heterotrophic biomasses (AS1, AS2, AS3) and (b) the mixed liquor (heterotrophic and autotrophic).

even at concentration up to $150 \text{ mg}_{\text{AMX}}/\text{L}$ and that did not exceed 20% inhibition, the un-acclimated heterotrophs were inhibited at 35% for the $75 \text{ mg}_{\text{AMX}}/\text{L}$, which shows that heterotrophs were less sensitive to the inhibition and had a rapid adaptive capacity, since the mixed liquor, which contained the heterotrophs and autotrophs, was more sensitive and less adaptable. The autotrophs present in mixed liquor, exhibited no inhibition at $40 \text{ mg}_{\text{AMX}}/\text{L}$, whereas a 35% inhibition at $25 \text{ mg}_{\text{AMX}}/\text{L}$ was shown, and this percentage was found for not adapted heterotrophs at $75 \text{ mg}_{\text{AMX}}/\text{L}$. Generally, AMX effect was really unexpected with no logarithmic function expressing the inhibition kinetics. The heterotrophs were more resistant to inhibition and adapt quickly to their removal. According to the literature, there is still a gap on AMX toxicity effect in nitrifying biomass. AMX can exhibit toxicity in nitrifying bacteria at concentrations ranging from $0.75 \text{ }\mu\text{g}/\text{L}$ and their removal by biological processes is in the order of 80% from a $100 \text{ ng}/\text{L}$ concentration in AS process. Complete nitrification inhibition has occurred at a $200 \text{ mg}/\text{L}$ concentration, showing that the nitrifying bacteria were more sensitive to AMX or to many other micro-pollutants (such as heavy metals) than microorganisms responsible for the carbonaceous material oxidation (heterotrophs) [85]. This showed a great acclimation capacity and less sensitivity to different inhibitions [86–88] and is known to govern COD removal and is also suggested for PhACs and AMX removal at the presence of a high number of active heterotrophic biomass [89]. However, other research [90] showed that the AMX addition did not affect the COD and DOC (dissolved organic carbon) removal efficiency and did not inhibit the heterotrophs metabolism at certain rates.

4. Conclusion

The respirometry use in this study provides important immediate and direct information to protect aquatic ecosystems upstream and downstream of WWTP. The operating conditions of this technique are well defined in terms of the mixed liquor preparation by washing and the operating conditions imposed for $K_{\text{t}}a$ determination, as well as the initial ratio S_0/X_0 which makes it possible to reduce the

experiments times and to make successive injections avoiding bacterial reproduction or growth. AMX has unexpected effects on the biomass of activated sludge, but heterotrophs show resistance capacity at fairly large AMX doses, especially in the presence of sodium acetate which improves the ability of microorganisms to resist the stress provided by the AMX. This study is part of the research to know the effects caused by emerging micropollutants on the purifying biomass of conventional WWTP in order to avoid malfunctions, and allows exploiting these results with previous results to identify and develop an elimination pathway by natural and inexpensive methods based on the respirometric technique or coupling of processes.

References

- [1] S. Alizadeh, H. Sadeghi, M. Vosoughi, A. Dargahi, S.A. Mokhtari, Removal of humic acid from aqueous media using sono-persulphate process: optimization and modelling with response surface methodology (RSM), *Int. J. Environ. Anal. Chem.*, (2020), doi: 10.1080/03067319.2020.1772777.
- [2] P.M. Motesaker, S.E. Rokni, N. Farnoodian, N.M. Akhlaghi, S. Saadi, G. Ahmadidoust, A. Yousefi, Application of response surface methodology for optimization of electrochemical process in metronidazole (MNZ) removal from aqueous solutions using stainless steel 316 (SS316) and lead (Pb) anodes, *Int. J. Chem. React. Eng.* (2020), doi: 10.1515/ijcre-2020-0055.
- [3] A. Seid-Mohammadi, Z. Ghorbanian, G. Asgari, A. Dargahi, Degradation of CEX antibiotic from aqueous environment by $\text{US}/\text{S}_2\text{O}_8^{2-}/\text{NiO}$ process: optimization using Taguchi method and kinetic studies, *Desal. Water Treat.*, 171 (2019) 444–455.
- [4] K. Hasani, M. Moradi, A. Dargahi, M. Vosoughi, Evaluation of cefixime toxicity treated with sono-electro-fenton process by bioassay using microorganisms, *Avicenna J. Environ. Health Eng.*, 8 (2021) 22–27.
- [5] A.B.A. Boxall, D.W. Kolpin, B. Halling-Sørensen, J. Tolls, Are veterinary medicines causing environmental risks, *Environ. Sci. Technol.*, 37 (2003) 286A–294A.
- [6] A. Göbel, A. Thomsen, C.S. McArdell, A. Joss, W. Giger, Occurrence and sorption behavior of sulfonamides, macrolides, and trimethoprim in activated sludge treatment, *Environ. Sci. Technol.*, 39 (2005) 3981–3989.
- [7] K. Hasani, A. Peyghami, A. Moharrami, M. Vosoughi, A. Dargahi, The efficacy of sono-electro-Fenton process for removal of cefixime antibiotic from aqueous solutions by response surface methodology (RSM) and evaluation of toxicity

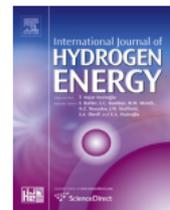
- of effluent by microorganisms, *Arabian J. Chem.*, 13 (2020) 6122–6139.
- [8] J.L. Martínez, Antibiotics and antibiotic resistance genes in natural environments, *Science*, 321 (2008) 365–367.
- [9] A.A. Inyinbor, O.S. Bello, A.E. Fadiji, H.E. Inyinbor, Threats from antibiotics: a serious environmental concern, *J. Environ. Chem. Eng.*, 6 (2018) 784–793.
- [10] C. Bouki, D. Venieri, E. Diamadopoulos, Detection and fate of antibiotic resistant bacteria in wastewater treatment plants: a review, *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 91 (2013) 1–9.
- [11] G. Rhodes, G. Huys, J. Swings, P. McGann, M. Hiney, P. Smith, R.W. Pickup, Distribution of oxytetracycline resistance plasmids between aeromonads in hospital and aquaculture environments: implication of Tn1721 in dissemination of the tetracycline resistance determinant tet A, *Appl. Environ. Microbiol.*, 66 (2000) 3883–3890.
- [12] E.D. Brown, G.D. Wright, Antibacterial drug discovery in the resistance era, *Nature*, 529 (2016) 336–343.
- [13] M.C. Danner, A. Robertson, V. Behrends, J. Reiss, Antibiotic pollution in surface fresh waters: occurrence and effects, *Sci. Total Environ.*, 664 (2019) 793–804.
- [14] J. Liang, W. Li, H. Zhang, X. Jiang, L. Wang, X. Liu, J. Shen, Coaggregation mechanism of pyridine-degrading strains for the acceleration of the aerobic granulation process, *Chem. Eng. J.*, 338 (2018) 176–183.
- [15] U. Szymańska, M. Wiergowski, I. Sołtyszewski, J. Kuzemko, G. Wiergowska, M.K. Woźniak, Presence of antibiotics in the aquatic environment in Europe and their analytical monitoring: recent trends and perspectives, *Microchem. J.*, 147 (2019) 729–740.
- [16] A. Joss, E. Keller, A.C. Alder, A. Göbel, C.S. McArdell, T. Ternes, H. Siegrist, Removal of pharmaceuticals and fragrances in biological wastewater treatment, *Water Res.*, 39 (2005) 3139–3152.
- [17] J. Yin, Z. Meng, M. Du, C. Liu, M. Song, H. Wang, Pseudo-template molecularly imprinted polymer for selective screening of trace β -lactam antibiotics in river and tap water, *J. Chromatogr. A*, 1217 (2010) 5420–5426.
- [18] D.E. Vidal-Dorsch, S.M. Bay, K. Maruya, S.A. Snyder, R.A. Trenholm, B.J. Vanderford, Contaminants of emerging concern in municipal wastewater effluents and marine receiving water, *Environ. Toxicol. Chem.*, 31 (2012) 2674–2682.
- [19] E.S. Elmolla, M. Chaudhuri, Improvement of biodegradability of synthetic amoxicillin wastewater by photo-Fenton process, *World Appl. Sci. J.*, 5 (2009) 53–58.
- [20] E.S. Elmolla, M. Chaudhuri, Degradation of the antibiotics amoxicillin, ampicillin and cloxacillin in aqueous solution by the photo-Fenton process, *J. Hazard. Mater.*, 172 (2009) 1476–1481.
- [21] Z. Chen, H. Wang, Z. Chen, N. Ren, A. Wang, Y. Shi, X. Li, Performance and model of a full-scale up-flow anaerobic sludge blanket (UASB) to treat the pharmaceutical wastewater containing 6-APA and AMX, *J. Hazard. Mater.*, 185 (2011) 905–913.
- [22] Z. Chen, H. Wang, N. Ren, M. Cui, S. Nie, D. Hu, Simultaneous removal and evaluation of organic substrates and $\text{NH}_3\text{-N}$ by a novel combined process in treating chemical synthesis-based pharmaceutical wastewater, *J. Hazard. Mater.*, 197 (2011) 49–59.
- [23] H.V.D. Berghe, X. Garric, M. Vert, J. Coudane, New amoxicillin-poly(lactic acid)-based conjugates: synthesis and in vitro release of amoxicillin, *Polym. Int.*, 60 (2011) 398–404.
- [24] M.A. Baghapoura, M.R. Shirdarreh, M. Faramarziyan, Amoxicillin removal from aqueous solutions using submerged biological aerated filter, *Desal. Water Treat.*, 54 (2015) 790–801.
- [25] T. Heberer, Occurrence, fate, and removal of pharmaceutical residues in the aquatic environment: a review of recent research data, *Toxicol. Lett.*, 131 (2002) 5–17.
- [26] E. Zuccato, D. Calamari, M. Natangelo, R. Fanelli, Presence of the reapeutic drugs in the environment, *LANCET*, 355 (2000) 1789–1790.
- [27] R. Andreozzi, M. Raffaele, P. Nicklas, Pharmaceuticals in STP effluents and their solar photodegradation in aquatic environment, *Chemosphere*, 50 (2003) 1319–1330.
- [28] D. Calamari, E. Zuccato, S. Castiglioni, R. Bagnati, R. Fanelli, Strategic survey of therapeutic drugs in the rivers Po and Lambro in northern Italy, *Environ. Sci. Technol.*, 37 (2003) 1241–1248.
- [29] H. Cho, T. Uehara, T.G. Bernhardt, Beta-lactam antibiotics induce a lethal malfunctioning of the bacterial cell wall synthesis machinery, *Cellulose*, 159 (2014) 1300–1311.
- [30] M. Panizza, A. Dirany, I. Sirés, M. Haidar, N. Oturan, M.A. Oturan, Complete mineralization of the antibiotic amoxicillin by electro-Fenton with a BDD anode, *J. Appl. Electrochem.*, 44 (2014) 1327–1335.
- [31] E. Elmolla, M. Chaudhuri, Optimization of Fenton process for treatment of amoxicillin, ampicillin and cloxacillin antibiotics in aqueous solution, *J. Hazard. Mater.*, 170 (2009) 666–672.
- [32] S. Ren, Assessing wastewater toxicity to activated sludge: recent research and developments, *Environ. Int.*, 30 (2004) 1151–1164.
- [33] I.R. Esquivel, I. González, F. Thalasso, Micro-respirometric characterization of active sludge inhibition by copper and zinc, *Biodegradation*, 25 (2014) 867–879.
- [34] G. Insel, D. Orhon, P.A. Vanrolleghem, Identification and modelling of aerobic hydrolysis-application of optimal experimental design, *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, 78 (2003) 437–455.
- [35] E.U. Cokgor, S. Ozdemir, O. Karahan, G. Insel, D. Orhon, Critical appraisal of respirometric methods for metal inhibition on activated sludge, *J. Hazard. Mater.*, 139 (2007) 332–339.
- [36] V. Torretta, M. Ragazzi, E. Trulli, G.D. Feo, G. Urbini, M. Raboni, E.C. Rada, Assessment of biological kinetics in a conventional municipal WWTP by means of the oxygen uptake rate method, *Sustainability*, 6 (2014) 1833–1847.
- [37] E.M. Golet, A.C. Alder, A. Hartmann, T.A. Ternes, W. Giger, Trace determination of fluoroquinolone antibacterial agents in urban wastewater by solid-phase extraction and liquid chromatography with fluorescence detection, *Anal. Chem.*, 73 (2001) 3632–3638.
- [38] E.M. Golet, A.C. Alder, W. Giger, Environmental exposure and risk assessment of fluoroquinolone antibacterial agents in wastewater and river water of the Glatt Valley Watershed, Switzerland, *Environ. Sci. Technol.*, 36 (2002) 3645–3651.
- [39] K. Kümmerer, Significance of antibiotics in the environment, *J. Antimicrob. Chemother.*, 52 (2003) 5–7.
- [40] C.S. McArdell, E. Molnar, M.J.F. Suter, W. Giger, Occurrence and fate of macrolide antibiotics in wastewater treatment plants and in the Glatt Valley Watershed, Switzerland, *Environ. Sci. Technol.*, 37 (2003) 5479–5486.
- [41] X.S. Miao, F. Bishay, M. Chen, C.D. Metcalfe, Occurrence of antimicrobials in the final effluents of wastewater treatment plants in Canada, *Environ. Sci. Technol.*, 38 (2004) 3533–3541.
- [42] A. Göbel, A. Thomsen, C.S. McArdell, A.C. Alder, W. Giger, N. Theiss, D. Löffler, T.A. Ternes, Extraction and determination of sulfonamides, macrolides, and trimethoprim in sewage sludge, *J. Chromatogr. A*, 1085 (2005) 179–189.
- [43] W. Xu, G. Zhang, X. Li, S. Zou, P. Li, Z. Hu, J. Li, Occurrence and elimination of antibiotics at four sewage treatment plants in the Pearl River Delta (PRD), South China, *Water Res.*, 41 (2007) 4526–4534.
- [44] P.L. Toutain, A.M. Bousquet, Bioavailability and its assessment, *J. Vet. Pharmacol. Ther.*, 27 (2004) 455–466.
- [45] Z. Frontistis, M. Antonopoulou, D. Venieri, I. Konstantinou, D. Mantzavinos, Boron-doped diamond oxidation of amoxicillin pharmaceutical formulation: statistical evaluation of operating parameters, reaction pathways and antibacterial activity, *J. Environ. Manage.*, 195 (2017) 100–109.
- [46] M.L. Wei, L.X. Kun, W. Ke, M.K. Li, Z. Jie, Influence of the amoxicillin concentration on organics removal and microbial community structure in an anaerobic EGSB reactor treating with antibiotic wastewater, *Chem. Eng. J.*, 274 (2015) 94–101.
- [47] D. Ziolkow, O.V. Martin, M.D. Scrimshaw, J.N. Lester, An evaluation of metal removal during wastewater treatment: the potential to achieve more stringent final effluent standards, *Crit. Rev. Env. Sci. Technol.*, 41 (2011) 733–769.
- [48] Z. Hu, K. Chandran, D. Grasso, B.F. Smets, Impact of metal sorption and internalization on nitrification inhibition, *Environ. Sci. Technol.*, 37 (2003) 728–734.

- [49] A.S. Stasinakis, D. Mamais, N.S. Thomaidis, T.D. Lekkas, Effect of chromium(VI) on bacterial kinetics of heterotrophic biomass of activated sludge, *Water Res.*, 36 (2002) 3341–3349.
- [50] P. Gikas, Single and combined effects of nickel (Ni(II)) and cobalt (Co(II)) ions on activated sludge and on other aerobic microorganisms: a review, *J. Hazard. Mater.*, 159 (2008) 187–203.
- [51] M.R. Zare, M.M. Amin, M. Nikaeen, B. Bina, A. Rahmani, S.B. Hemmati, H. Rahmani, Acute toxicity of Hg, Cd, and Pb towards dominant bacterial strains of sequencing batch reactor (SBR), *Environ. Monit. Assess.*, 187 (2015) 263, doi: 10.1007/s10661-015-4457-y.
- [52] G.R.M. Hernandez, D.A. Ortiz, M.R. Perez, N.A.S. Urbina, F. Thalasso, Multi-parameter analysis of activated sludge inhibition by nickel, cadmium, and cobalt, *J. Hazard. Mater.*, 351 (2018) 63–70.
- [53] L. Rizzo, C. Manai, C. Merlin, T. Schwartz, C. Dagot, M.C. Ploy, I. Michael, D.K. Fatta, Urban wastewater treatment plants as hotspots for antibiotic resistant bacteria and genes spread into the environment: a review, *Sci. Total Environ.*, 447 (2013) 345–360.
- [54] N.H. Tran, T. Urase, H.H. Ngo, J. Hu, S.L. Ong, Insight into metabolic and cometabolic activities of autotrophic and heterotrophic microorganisms in the biodegradation of emerging trace organic contaminants, *Bioresour. Technol.*, 146 (2013) 721–731.
- [55] Y. Tang, Y. Zhang, N. Yan, R. Liu, B.E. Rittmann, The role of electron donors generated from UV photolysis for accelerating pyridine biodegradation, *Biotechnol. Bioeng.*, 112 (2015) 1792–1800.
- [56] H. Xiong, S. Dong, J. Zhang, D. Zhou, B.E. Rittmann, Roles of an easily biodegradable co-substrate in enhancing tetracycline treatment in an intimately coupled photocatalytic-biological reactor, *Water Res.*, 136 (2018) 75–83.
- [57] Y. Wang, C. Chen, D. Zhou, H. Xiong, Y. Zhou, S. Dong, B.E. Rittmann, Eliminating partial-transformation products and mitigating residual toxicity of amoxicillin through intimately coupled photocatalysis and biodegradation, *Chemosphere*, 237 (2019) 124491, doi: 10.1016/j.chemosphere.2019.124491.
- [58] S. Zhang, Z. Hu, H. Wang, Metagenomic analysis exhibited the co-metabolism of polycyclic aromatic hydrocarbons by bacterial community from estuarine sediment, *Environ. Int.*, 129 (2019a) 308–319.
- [59] J. Zhang, J. Liu, T. Lu, P. Shen, H. Zhong, J. Tong, Y. Wei, Fate of antibiotic resistance genes during anaerobic digestion of sewage sludge: roles of solids retention times in different configurations, *Bioresour. Technol.*, 274 (2019b) 488–495.
- [60] C. Zhang, S. Dong, C. Chen, Q. Zhang, D. Zhou, Co-substrate addition accelerated amoxicillin degradation and detoxification by up-regulating degradation related enzymes and promoting cell resistance, *J. Hazard. Mater.*, 394 (2020) 122574, doi: 10.1016/j.jhazmat.2020.122574.
- [61] W. Luo, Y. Zhao, H. Ding, X. Lin, H. Zheng, Co-metabolic degradation of bensulfuron-methyl in laboratory conditions, *J. Hazard. Mater.*, 158 (2008) 208–214.
- [62] M.Z. Khan, P.K. Mondal, S. Sabir, V. Tare, Degradation pathway, toxicity and kinetics of 2,4,6-trichlorophenol with different co-substrate by aerobic granules in SBR, *Bioresour. Technol.*, 102 (2011) 7016–7021.
- [63] Y. Yu, F. Ndayisenga, Z. Yu, Z. Mingyue, C.H. Lay, D. Zhou, Co-substrate strategy for improved power production and chlorophenol degradation in a microbial fuel cell, *Int. J. Hydrogen Energy*, 44 (2019) 20312–20322.
- [64] M. Fan, N. Zhou, P. Li, L. Chen, Y. Chen, S. Shen, S. Zhu, Anaerobic co-metabolic biodegradation of tetrabromobisphenol A using a bioelectrochemical system, *J. Hazard. Mater.*, 321 (2017) 791–800.
- [65] G.L. Cronje, A.O. Beeharry, M.C. Wentzel, G.A. Ekama, Active biomass in activated sludge mixed liquor, *Water Res.*, 36 (2002) 439–444.
- [66] T.A. Ternes, N. Herrmann, M. Bonerz, T. Knacker, H. Siegrist, A. Joss, A rapid method to measure the solid-water distribution coefficient (K_d) for pharmaceuticals and musk fragrances in sewage sludge, *Water Res.*, 38 (2004) 4075–4084.
- [67] T.A. Ternes, Analytical methods for the determination of pharmaceuticals in aqueous environmental samples, *TrAC, Trends Anal. Chem.*, 20 (2001) 419–434.
- [68] A.S. Stasinakis, D. Mamais, P.A. Paraskevas, T.D. Lekkas, Evaluation of different methods for the determination of maximum heterotrophic growth rates, *Water Environ. Res.*, 75 (2003) 549–552.
- [69] T. Heberer, Tracking persistent pharmaceutical residues from municipal sewage to drinking water, *J. Hydraul.*, 266 (2002a) 175–189.
- [70] M.L. Janex-Habibi, Effets des Traitements d'Eau Potable et d'Épuration des Eaux Usées sur les Résidus Médicamenteux, Résultats du projet Poséidon, TSM, Techniques sciences méthodes, génie urbain génie rural, 11 (2004) 59–67.
- [71] C.S. Oliveira, O. Alberto, F.C. Eugénio, A. Madalena, In situ pulse respirometric methods for the estimation of kinetic and stoichiometric parameters in aerobic microbial communities, *Biochem. Eng.*, 58–59 (2012) 12–19.
- [72] T.Y. Katipoglu, E.U. Cokgor, G. Insel, D. Orhon, Is ammonification the rate limiting step for nitrification kinetics, *Bioresour. Technol.*, 114 (2012) 117–125.
- [73] M. Sakhraoui, R. Zamouche-Zerdazi, M. Bencheikh-Lehocine, A.-H. Meniai, Respirometric evaluation of S₀/X₀ ratio effect on the kinetic and stoichiometric parameters of activated sludge, *Int. J. Hydrogen Energy*, 42 (2017) 12933–12942.
- [74] M. Sakhraoui, B.L. Mossaab, R. Zamouche-Zerdazi, A.H. Meniai, Experimental evaluation of pharmaceutical products effect on activated sludge activity: case of amoxicillin, *AJER*, 1 (2017) 14–23.
- [75] L. Meng, X. Li, X. Wang, K. Ma, G. Liu, J. Zhang, Amoxicillin effects on functional microbial community and spread of antibiotic resistance genes in amoxicillin manufacture wastewater treatment system, *J. Environ. Sci. (China)*, 61 (2017) 110–117.
- [76] E. Peterson, P. Kaur, Antibiotic resistance mechanisms in bacteria: relationships between resistance determinants of antibiotic producers, environmental bacteria, and clinical pathogens, *Front. Microbiol.*, 9 (2018) 2928, doi: 10.3389/fmicb.2018.02928.
- [77] J. Jang, Y.S. Suh, D.Y.W. Di, T. Unno, M.J. Sadowsky, H.G. Hur, Pathogenic *Escherichia coli* strains producing extended-spectrum β-lactamases in the Yeongsan River basin of South Korea, *Environ. Sci. Technol.*, 47 (2013) 1128–1136.
- [78] J.H. Wang, J. Lu, Y.X. Zhang, J. Wu, Y. Luo, H. Liu, Metagenomic analysis of antibiotic resistance genes in coastal industrial mariculture systems, *Bioresour. Technol.*, 253 (2018) 235–243.
- [79] R. Zhao, J. Feng, X. Yin, J. Liu, W. Fu, T.U. Berendonk, T. Zhang, X. Li, B. Li, Antibiotic resistome in landfill leachate from different cities of China deciphered by metagenomics analysis, *Water Res.*, 134 (2018) 126–139.
- [80] C.A. Oliveira, C.V.M. Araújo, R.B. Nascimento, U.J. Strotmann, E.M. da-Silva, Utilization of respirometry to assess organic matter reduction of effluents from the camaçari industrial complex Brazil, *Braz. Arch. Biol. Technol.*, 50 (2007) 311–319.
- [81] A. Alinsafi, N. Adouani, F. Béline, T. Lendormi, L. Limousy, O. Sire, Nitrite effect on nitrous oxide emission from denitrifying activated sludge, *Process Biochem.*, 43 (2008) 683–689.
- [82] R. Zamouche-Zerdazi, M. Bouteraa, S. Hallel, M.E.A. Bouhamla, B.L. Mossaab, A.H. Meniai, Impact of clear waters parasites on the biological wastewater treatment, *Desal. Water Treat.*, 213 (2021) 106–116.
- [83] R. Zamouche-Zerdazi, B.L. Mossaab, A.H. Meniai, Influence of endogenous OUR determination on the K_a, exogenous OUR, total oxygen consumption and heterotrophic yield in a completely mixed batch reactor, *Int. J. React. Eng.*, 12 (2014) 695–704.
- [84] D.D. Trapani, G. Mannina, M. Torregrossa, G. Viviani, Comparison between hybrid moving bed biofilm reactor and activated sludge system: a pilot plant experiment, *Water Sci. Technol.*, 61 (2010) 891–902.
- [85] L. Migliore, S. Cozzolino, M. Fiori, Phytotoxicity to and uptake of enrofloxacin in crop plants, *Chemosphere*, 52 (2003) 1233–1244.

- [86] A.S. Stasinakis, C.I. Kordoutis, V.C. Tsiouma, G. Gatidou, N.S. Thomaidis, Removal of selected endocrine disrupters in activated sludge systems: effect of sludge retention time on their sorption and biodegradation, *Bioresour. Technol.*, 101 (2010) 2090–2095.
- [87] L.S. Gaulke, S.E. Strand, T.F. Kalhorn, H.D. Stensel, Estrogen biodegradation kinetics and estrogenic activity reduction for two biological wastewater treatment methods, *Environ. Sci. Technol.*, 43 (2009) 7111–7116.
- [88] M. Majewsky, T. Gallé, L. Zwank, K. Fischer, Influence of microbial activity on polar xenobiotic degradation in activated sludge systems, *Water Sci. Technol.*, 62 (2010) 701–707.
- [89] M. Maurer, B.I. Escher, P. Richle, C. Schaffner, A.C. Alder, Elimination of beta-blockers in sewage treatment plants, *Water Res.*, 41 (2007) 1614–1622.
- [90] A. Wick, G. Fink, A. Joss, H. Siegrist, T.A. Ternes, Fate of beta blockers and psycho-active drugs in conventional wastewater treatment, *Water Res.*, 43 (2009) 1060–1074.

Available online at www.sciencedirect.com

ScienceDirect

journal homepage: www.elsevier.com/locate/hydro

Respirometric evaluation of S_0/X_0 ratio effect on the kinetic and stoichiometric parameters of activated sludge

Mahfoud Sakhraoui*, R. Zamouche-Zerdazi, M. Bencheikh-Lehocine, A.-H. Meniai

Laboratoire de l'Ingénierie des Procédés d'Environnement (LIPE), Faculté de Génie des Procédés, Université Constantine 3, Constantine 25000, Algeria

ARTICLE INFO

Article history:

Received 2 August 2016
Received in revised form
1 January 2017
Accepted 16 January 2017
Available online xxx

Keywords:

Respirometry
 S_0/X_0 ratios
Stoichiometric-kinetic parameters
Activated sludge

ABSTRACT

Respirometry has been used in this work to assess the effect of S_0/X_0 ratio, knowing that this ratio is a very important operational parameter in the conduct of wastewater treatment plant. It affects its design and operation; part of the respirometry calculations, dissolved oxygen transfer coefficient $K_L a$ is calculate for each respirometric experiment, due to the fact that operational condition change. Under endogenous conditions OUR_{end} is calculated using the linear portion of the variation of DO concentration under no aeration conditions. Then the OUR_{end} is used in the endogenous phase at a no oxygen concretion variation to calculate the $K_L a$. Samples of wastewater, with different S_0/X_0 ratios in the range between 0.01 and 0.23, containing sometimes ATU, a nitrification inhibitor, were injected in the respirometer with DO concentration variation recording. Exogenous OUR_{exo} were calculated from the DO data and they show that as S_0/X_0 ratio increased total OUR_t increased too as well as total oxidation time. However when, COD is present alone the removal kinetics is more rapid than when both substrates (nitrogen and carbonaceous) are present. It has been shown that the use of respirometry in biomass activation assessment is a sound approach because of the celerity, the reliability and the limited cost. Consequently it has been extended in to the assessment of biomass activation when it is exposed to antibiotics.

© 2017 Hydrogen Energy Publications LLC. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.

Introduction

Activated sludge biomass activity has been studied in a batch respirometer [1–4] through DO consumption. This method is one of the most frequently used to optimize biological reactions and to evaluate kinetic and stoichiometric parameters [5–10] such as the substrate affinity constant (K_s), the

maximum specific growth rate (μ_{max}), the yield ($Y_{X/S}$) [11] etc. This technique consists of measuring biological oxygen consumption rate under well-defined conditions [12]. Particular thought has been paid to the influence of the initial substrate to biomass ratio S_0/X_0 [13] on wastewater treatment performance [14–18]. This S_0/X_0 ratio is an important [10,11] parameter in batch experiments because it reflects the initial energy level, to investigate the consumption of

* Corresponding author. LIPE, Constantine 3 University, 25000, Algeria.

E-mail address: mahfoudsakh@yahoo.com (M. Sakhraoui).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijhydene.2017.01.097>

0360-3199/© 2017 Hydrogen Energy Publications LLC. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.

Please cite this article in press as: Sakhraoui M, et al., Respirometric evaluation of S_0/X_0 ratio effect on the kinetic and stoichiometric parameters of activated sludge, International Journal of Hydrogen Energy (2017), <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijhydene.2017.01.097>

Symbols used

COD	Chemical Oxygen Demand, mg L ⁻¹
BOD	Bio-Chemical Oxygen Demand, mg L ⁻¹
DO	Dissolved Oxygen concentration, mg L ⁻¹
OUR	Oxygen Uptake Rate, mg _{O₂} L ⁻¹ s ⁻¹
TSS	Total Suspended Solids, mg L ⁻¹
VSS	Volatile Suspended Solids, mg L ⁻¹
V	Volume, L
SVI	Sludge Volume Index, mg L ⁻¹
K ₁ a	Oxygen Transfer Coefficient, h ⁻¹
K _s	Substrate Affinity Constant, mg L ⁻¹
μ	Growth Rate, d ⁻¹
Y _{x/s}	Yield, mg _{VSS} L ⁻¹
S ₀ /X ₀	Initial Substrate to Biomass Ratio, g _{COD} /g _{VSS}
ATU	AlluThioUrea
WWTP	Waste Water Treatment Plant

Index

eff	Effluent
b	Sludge
t	Total
s	Soluble
end	Endogenous
exo	Exogenous
max	Maximum
30	After thirty minutes
5	After five days

substrate compounds [19,20] and it allows knowing of whether or not cell duplication can take place during the exogenous substrate removal, under given conditions, or if it is inhibited by a lack of substrate [21]. Many authors [2] were highlighted the importance of S₀/X₀ ratio, this ratio key to affect the analysis and the respirometric response [10], first aerobic batch biodegradation testing and also on the relationship between preliminary acclimatization and biodegradation of different compounds (organic or refractory such as inhibitors) [14]. Moreover, S₀/X₀ ratio, could also influence the OUR shape curve reliability and other kinetics parameters [9,39].

The initial substrate-to-biomass ratio will directly affect the growth patterns of microorganisms and the values of the kinetics and stoichiometric parameters [14,22]. However, there is no common agreement on this S₀/X₀ ratio and the experimental procedures. Generally, testing at low ratios S₀/X₀ (<0.2 g_{COD}/g_{VSS}) demonstrate the existence of a threshold below which the reactor performance is seriously affected. The stressed biomass can survive under lack of substrate condition better than unstressed biomass which cell duplication is strongly inhibited [7]. In addition, working under low ratio prevents possible variations in the composition and the physiological form of biomass population due to the different growth velocities of the various microorganisms present in the consortium [10,33]. Besides, several authors ascertain that it seems that only the kinetic parameters obtained at low S₀/X₀ ratios, can be correctly used in the design and the study of activated sludge plants. Furthermore, it should be taken into account that in actual municipal wastewater treatment plants

S₀/X₀ ratio is always kept very low: 0.01 for aerobic completely mixed systems and 0.13 for plug-flow systems [15]. When the ratio is sufficiently high (S₀/X₀ > 2 mg_{COD}/mg_{VSS}), biomass conditions itself to limitless growth, since it will be on the exponential growth phase, and the measured kinetic parameters can be independent of the retrospective feeding of the biomass [35–38]. Kinetic parameters obtained at these conditions show maximum activity [9].

This work aims at studying the influence of various S₀/X₀ ratios (= 0.01, 0.02, 0.03, 0.04, 0.06, 0.09, 0.15 and 0.23) on the response of non acclimated biomass growth and synthetic COD substrate composed of sodium acetate removal [23,24] in a batch aerated respirometer [3–6]. Short-term Oxygen Uptake Rate, OUR, can provided much information about the treatment process, their determination is detailed in several studies [27–33]; it requires the Volumetric Oxygen Transfer Coefficient K₁a determination in the solution which is necessary for the interpretation of respirometric data [34]. OUR experiments can be successfully used to measure the activated sludge response [25] and the determination of biological removal performance for Heterotrophic and Autotrophic biomass on the one hand; and on the other hand, the Heterotrophic biomass only.

Two series of batch experiments were carried out, using sodium acetate as a single source of carbon, in the presence or not of the nitrification inhibitor Allyl-Thio-Urea (ATU, in order to determine the optimal) S₀/X₀ ratio to be used in the assessment of inhibitory effect of pharmaceutical products [24,26–29].

Materials and methods

The respirometer

The respirometer used in this experimental work is an open and aerated 0.5 L volume glass reactor (09). The air is supplied by an aquarium pump 'SHARK-RS-510' (10), with a maximum air flow of 150 L/h connected to a plastic air diffuser (06). The liquid phase is mixed by a magnetic bar (07) and a magnetic stirrer 'AGIMATIC-N' (08). A syringe is used to inject the substrate (02). The pH, DO and temperature were measured using a pH probe 'IDS-WTW' (03) and a WTW oxygen probe 'FDO-925 IDS' (04), which was connected to a WTW Oxymeter 'Multi-3430' (05). The system was maintained at a fixed temperature (20 °C ± 0.5 °C) (01) in a thermostatic enclosure of WTW (11). Fig. 1 represents the set up used during the test.

Synthetic effluent (substrate)

The composition of the synthetic wastewater used in this work is reproduced in Table 1.

The compositions of the synthetic wastewater was chosen so that its theoretical COD is of 2000 mg/L, stored at a temperature of 4 °C and allowed to reach 20 °C ± 1 °C before use.

Analytical methods

All analyses were done according to standard methods [24,27,40]. Soluble Chemical Oxygen Demand, COD_s, was

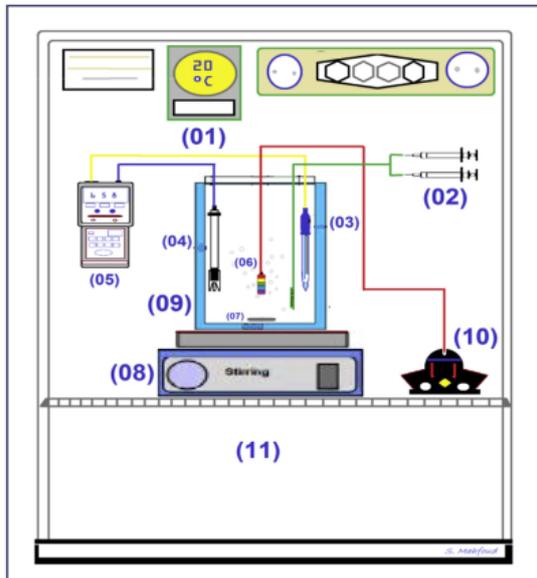


Fig. 1 – Illustration of batch Respirometer experimental apparatus used for S_0/X_0 ratios tests.

Table 1 – Composition of the synthetic effluent [8].

Constituents	Concentration (mg/L)
Carbon source: $C_2H_3O_2Na$	2.570
Nitrogen source: NH_4Cl	1.485
Nutrients:	
NH_4Cl-N	6.8
$FeCl_3$	2.3
$MgSO_4$	166
$CaCl_2$	412
Phosphate Plug: pH, 7.24	
K_2HPO_4	410
KH_2PO_4	90

measured on the filtrate through a 0.45 μm membrane filter (Millipore) and the Total Chemical Oxygen Demand, COD_t, filtered on 1.2 μm filters. Mixed Liquor Total and Volatile Suspended Solids TSS and VSS were determined by centrifugation; pH and DO were continuously controlled by pH and DO electrodes respectively.

Sources and preparation of activated sludge

The biomass used in the different respirometric tests originated from IBN ZIAD municipal WWTP which treats Constantine municipal wastewaters. It is designed with treatment capacity of 800 L/s (450 000 Eq.-Inhabitants). Sludge samples were collected manually from the aeration basin, transported to the laboratory in shaded glass bottles at a temperature of 4 °C. To prepare the samples in the laboratory prior to respirometric testing, a 400 mL of the activated sludge were washed thoroughly with distilled water then maintained under continuous aeration during 3 h maximum at a

temperature of 20 °C to be sure that all external substrate has been consumed and the endogenous respiration is the only process.

Theoretical

Oxygen Uptake Rate

OUR can be calculated from the dissolved oxygen data as shown in Equation (1):

$$OUR = \frac{-dS_0}{dt} \quad (1)$$

Effluent (V_{eff}) and mixed liquor volume (V_b) added into the respirometer

S_0/X_0 represents the COD to the VSS ratio of the mixture [10]. Thus, the following Equation (2):

$$S_0/X_0 = \frac{COD_{eff} * V_{eff}}{\frac{V_t}{VSS_{eff} * V_{eff}} + \frac{VSS_b * V_b}{V_t}} \quad (2)$$

With (*eff*) index represents the effluent, (*b*) mixed liquor.

Generally, the term ($VSS_{eff} * V_{eff}$) is negligible compared to ($VSS_b * V_b$) because the VSS of the effluent is weak in comparison to the mixed liquor. Thus, Equation (2) can be simplified to Equation (3):

$$S_0/X_0 = \frac{COD_{eff} * V_{eff}}{VSS_b * V_b} \quad (3)$$

With $V_t = V_{eff} + V_b$, then Equation (3) can be written as Equation (4) in order to find the volume of the effluent to be added:

$$V_{eff} = S_0/X_0 * (V_t - V_{eff}) * \frac{VSS_b}{COD_{eff}} \quad (4)$$

Then, Equation (5):

$$V_{eff} * \left(1 - \frac{VSS_b * S_0/X_0}{COD_{eff}}\right) = S_0/X_0 * \frac{VSS_b}{COD_{eff}} * V_t \quad (5)$$

Finally, Equation (6):

$$V_{eff} = \frac{S_0/X_0 * \frac{VSS_b}{COD_{eff}}}{1 + \left(S_0/X_0 * \frac{VSS_b}{COD_{eff}}\right)} * V_t \quad (6)$$

While posing,

$$\alpha = S_0/X_0 * \frac{VSS_b}{COD_{eff}} \quad (7)$$

There is Equation (8):

$$V_{eff} = \frac{\alpha}{1 + \alpha} * V_t \quad (8)$$

Thus, knowing the total volume (V_t) of the reactor and the desired S_0/X_0 ratio, one can determine the volumes of the effluent and of the mixed liquor to be added in the respiromètre.

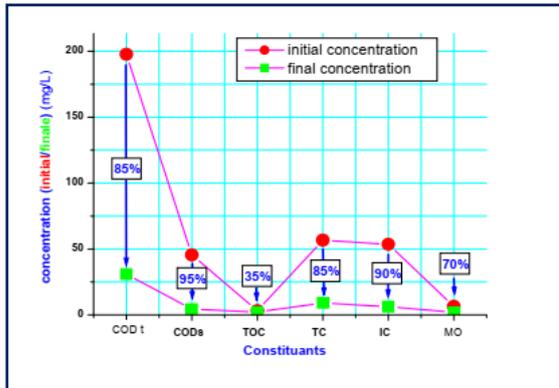


Fig. 2 – Percents reductions of different parameters after washing.

Table 2 – Characteristics of MLSS of IBN ZIAD WWTP.

Parameters	Concentration	Mean
TSS (mg/L) ^a	[5095–8305]	6700
VSS (mg/L) ^a	[2374–3610]	2992
V ₃₀ (ml/L) ^a	[164.5–219.5]	192
SVI (ml/g) ^a	[0.012–0.046]	0.029
pH ^a	[7.313–7.525]	7.419
DO (mg/L) ^a	[4.13–4.31]	4.22
COD _t (mg/L) ^b	[175.03–220.19]	197.61
COD _s (mg/L) ^b	[31.28–49.25]	40.28
BOD ₅ (mg/L) ^a	[380–410]	395
TOC (mg/L) ^b	[3.15–4.34]	3.745
TC (mg/L) ^b	[56.65–57.13]	56.89
IC (mg/L) ^b	[52.77–53.5]	53.135
Conductivity ^a	[1353–1464]	1408.5
Salinity ^a	[0.6–0.7]	0.65

^a MLSS analysis.

^b Supernatant of MLSS analysis.

K_La determination

In continuous aeration, the Total Oxygen Uptake Rate, *OUR_t* (in mg/l/s) of the microorganisms is expressed according to Equation (9):

$$OUR_t = -\frac{dS_o}{dt} + K_L a^* (S_o^* - S_o) \tag{9}$$

Thus, it is necessary to determine the Oxygen Transfer Coefficient, *K_La*, for each experiment prior to the injection of synthetic COD. The activated sludge sample, after distilled water washing and continuous aeration for 3 h, is supposed to be free of any remnant substrate, therefore it is considered in an endogenous phase, named in Fig. 4a ‘endogenous stage’, corresponding to a constant dissolved oxygen concentration named *S_{O,end}*. At point (A), aeration is stopped, thus, DO of the solution is consumed by microorganisms due to endogenous respiration, and therefore it can be formulated in Equation (10) as:

$$OUR_{end} = \frac{dS_o}{dt} = -\beta \tag{10}$$

Endogenous, *OUR_{end}*, is calculated as the slope (β) of the best linear portion of the DO concentration variation curve (A–A’, Fig. 4b) [41].

To determine *K_La*, the value of *OUR_{end}* is replaced in Equation (9) and noting that the DO concentration during the endogenous phase is constant and equals to *S_{O,end}*. Therefore its variation is nil and Equation (9) becomes as in Equation (11) from which *K_La* can be calculated since *OUR_{end}*, *S_O^{*}* and *S_{O,end}* are known as Equations (12) and (13):

$$OUR_{end} = K_L a^* (S_o^* - S_{O,end}) \tag{11}$$

$$-\beta = K_L a^* (S_o^* - S_{O,end}) \tag{12}$$

$$K_L a = \frac{\beta}{S_o^* - S_{O,end}} \tag{13}$$

Results and discussions

Before presenting the results concerning the effect of *S_O/X₀* ratio on the Heterotrophic and Autotrophic bacteria responses; the effect of samples washing on the remnant substrates of different components present in solution was assessed and the results are represented in Fig. 2. It shows

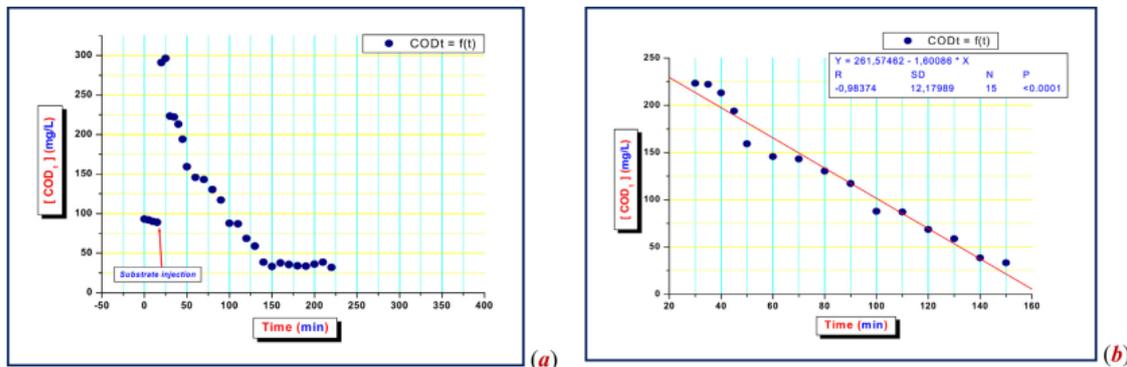


Fig. 3 – (a) COD concentration removal versus time. (b) Linear par of COD removal curve versus time.

Please cite this article in press as: Sakhraoui M, et al., Respirometric evaluation of *S_O/X₀* ratio effect on the kinetic and stoichiometric parameters of activated sludge, International Journal of Hydrogen Energy (2017), <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijhydene.2017.01.097>

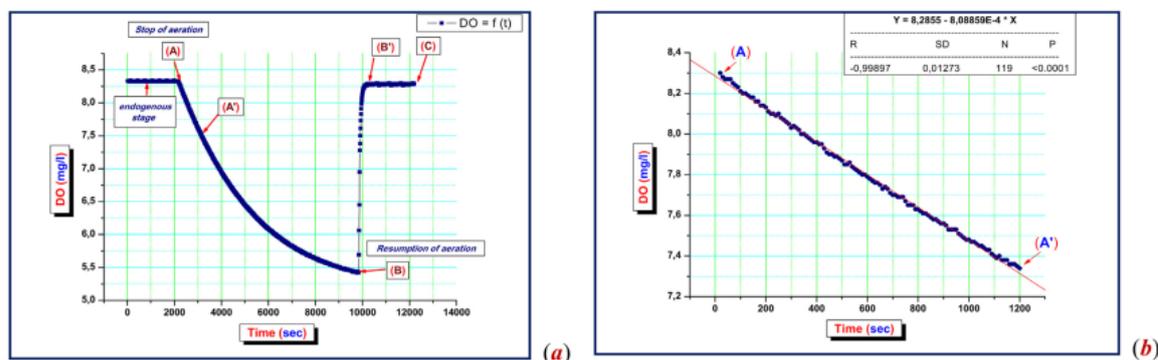


Fig. 4 – (a) DO versus time curve of stop-resumption of aeration phase for K_La determination. (b) The downward linear part of respirogramme of DO concentration versus time.

that up to 95% of soluble COD, for instance, can be eliminated by washing.

Table 2 shows analysis results of the MLSS sampled from the aeration basin of IBN ZIAD wastewater treatment plant. The values of VSS are in the range of usual values of aeration basin. It seems, however, that there are a high percentage of mineral suspended solids since the VSS represent a low percentage of the TSS (44%). Moreover, V_{30} is quit high indicating a kind of sludge bulking. The soluble COD and the TOC represent the results of the supernatant; whereas the other results are those of the MLSS.

In Fig. 3a and b represent the kinetics of COD removal during a 1 L sample volume test with an S_0/X_0 ratio of 0.04 in order to evaluate the time span, the initial and final COD concentrations. This experiment led us to choose an initial COD concentration of 300 mg/L.

Fig. 4a represents a portion of respirogramme showing the endogenous phase during the stop-resumption of the aeration; at point (A) and its resumption at point (B). The variation of the DO concentration from (A to B) is due to the endogenous oxygen consumption of microorganisms.

At point (B), aeration is restarted and the DO concentration increased to (B'), then its value should equal to $S_{O,end}$. Otherwise, growth or disappearance would be happening depending on the value of DO concentration. From (B' to C) aeration is on. Fig. 4b represents an enlargement of the (A–A') portion of DO curve of Fig. 4a, which shows a linear shape.

Variation of pH in K_La and OUR_{exo} determination step

Fig. 5a shows a full respirogramme as well as the variation of pH during the respirometry experiment. The DO variation curve shows firstly the endogenous phase with stopping and resumption of aeration (A-B'). At point (C) substrate is injected, the portion of DO variation from (C to D) corresponds to COD bacterial degradation, from (D to E) ammonia nitrogen is oxidized to nitrates. Generally, the pH not to be sensitive to the S_0/X_0 ratios variation; There is a small reduction of pH at stop-resumption of aeration (A-B') and the reduction of pH at point (D) could be corroborated with the nitrification process.

Moreover, Fig. 5b shows the variation of DO and pH during respirometric experiments in the presence of ATU which is almost constant. In these experiments, during stop-resumption of aeration phase, the pH variation is similar to (A-B) in tests without ATU; after substrate injection at point

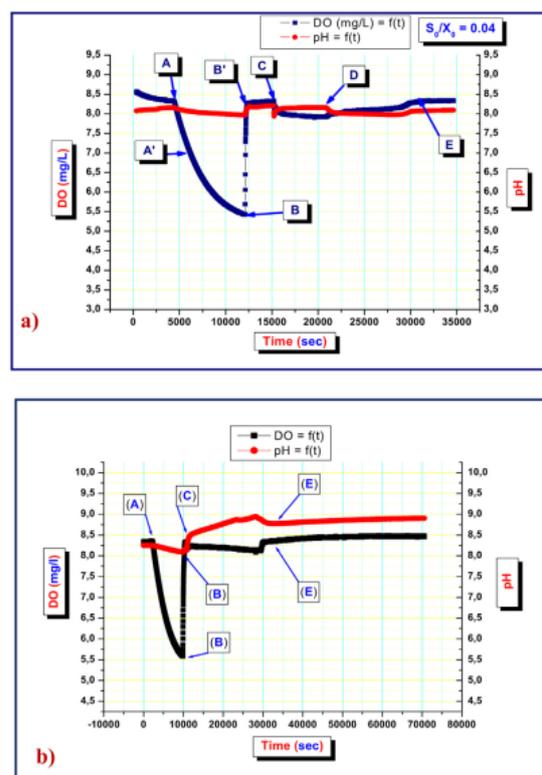


Fig. 5 – (a) A respirogramme of DO and pH, obtained after injection of the Substrate for $S_0/X_0 = 0.04$. (b): a respirogramme of DO and pH, obtained after injection of Substrate with ATU for $S_0/X_0 = 0.04$.

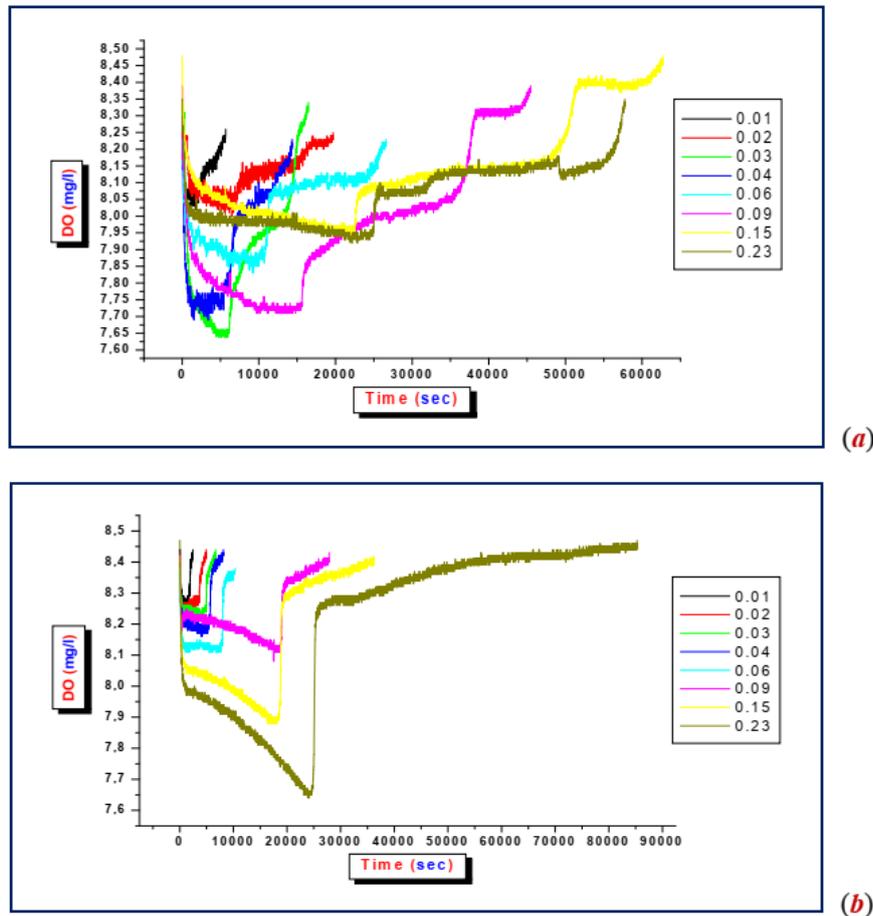


Fig. 6 – (a) Evaluation of DO concentration versus time for different values of S_0/X_0 ratio, without a nitrification inhibitor and (b) With a nitrification inhibitor.

Table 3 – Values calculate of the $K_L a$, OUR and the quantity of oxygen consumes in the tests without nitrification inhibitor.

S_0/X_0	$K_L a$ (s^{-1})	OUR_{end} (mg/l/s)	OUR_{exo} (mg/l/s)	OUR_t (mg/l/s)	$Q_{O_2}^a$ (mg/l/s)	DO_{min}^b (mg/l)	R-Cons ^c (mg/l/s)	R-Time ^d (min)	mg d'O ₂ consumed
0.01	7.66798×10^{-4}	6.4411×10^{-4}	$6,3 \times 10^{-4}$	0,00127411	0.57525	8,02	2143×10^{-4}	94,3	2,88356575
0.02	7.712753×10^{-4}	6.55584×10^{-4}	$2,72 \times 10^{-4}$	0,00092758	1.80548	8,00	$3,87 \times 10^{-5}$	327,8	7,29745738
0.03	8.69991×10^{-4}	6.61193×10^{-4}	4267×10^{-4}	0,00108789	6.33493	7,64	$1,59 \times 10^{-4}$	274,2	7,15918651
0.04	7.96195×10^{-4}	6.9269×10^{-4}	6923×10^{-4}	0,00138499	3.39044	7,69	0,00036	239	7,94430264
0.06	8.17139×10^{-4}	7.10911×10^{-4}	5184×10^{-4}	0,00122931	4.48944	7,83	4343×10^{-5}	443	13,0700239
0.09	0.0010329	7.33333×10^{-4}	2092×10^{-4}	0,00094253	19.51912	7,71	$6,7194 \times 10^{-5}$	757,5	17,1351954
0.15	0.00119605	7.415510×10^{-4}	1994×10^{-4}	0,00094095	25.24899	7,94	$2,44 \times 10^{-5}$	1044,7	23,5922512
0.23	5.55023×10^{-4}	4.16267×10^{-4}	4501×10^{-4}	0,00285208	9.17165	7,93	1977×10^{-5}	962,2	65,862513

Shaded entry signifies OUR_{exo} key values obtained which gives an $S_0/X_0 = 0.04$ optimal ratio in tests without ATU.

^a The amount of DO consumed after substrate injection (mgO₂).

^b The minimal DO concentration (mg/L).

^c Falling speed of DO concentration after substrate injection (mg/L/s).

^d Residence time necessary for the removal of total substrate (min).

Please cite this article in press as: Sakhraoui M, et al., Respirometric evaluation of S_0/X_0 ratio effect on the kinetic and stoichiometric parameters of activated sludge, International Journal of Hydrogen Energy (2017), <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijhydene.2017.01.097>

Table 4 – Values calculate of the $K_L a$, OUR and the quantity of oxygen consumes in the tests with nitrification inhibitor.

S_0/X_0	$K_L a$ (s^{-1})	OUR_{end} (mg/l/s)	OUR_{exo} (mg/l/s)	OUR_t (mg/l/s)	$Q_{O_2}^a$ (mg/l/s)	DO_{min}^b (mg/l)	R-Cons ^c (mg/l/s)	R-Time (min) ^d	mg d'O ₂ consumed
0.01	0.00119014	7.85492×10^{-4}	3565×10^{-4}	0,00114199	0.35875	8,26	$1,61 \times 10^{-4}$	40,8	1,11823661
0.02	0.00162121	0.00107	0,00131	0,00238	1.1496	8,20	0,001	81,33	4,6455696
0.03	0.0015305	0.00101	6338×10^{-4}	0,0016438	1.59509	8,23	2561×10^{-4}	111,33	4,3921021
0.04	0.0011485	7.23539×10^{-4}	8446×10^{-4}	0,00156814	1.69565	8,17	8232×10^{-5}	135,17	5,08717161
0.06	0.0010621	7.64723×10^{-4}	7689×10^{-4}	0,00153452	2.1783	8,11	2523×10^{-4}	172,17	6,3407594
0.09	0.002492	0.00167	6167×10^{-6}	0,00167617	13.02095	8,12	$1,76 \times 10^{-5}$	463,67	18,6525539
0.15	0.001464	9.95452×10^{-4}	9667×10^{-4}	0,00196215	13.7187	7,88	$3,04 \times 10^{-5}$	603	28,3962348
0.23	0.001651	0.00104	2011×10^{-5}	0,00106011	34.9066	7,64	$3,41 \times 10^{-5}$	1420,33	36,1369449

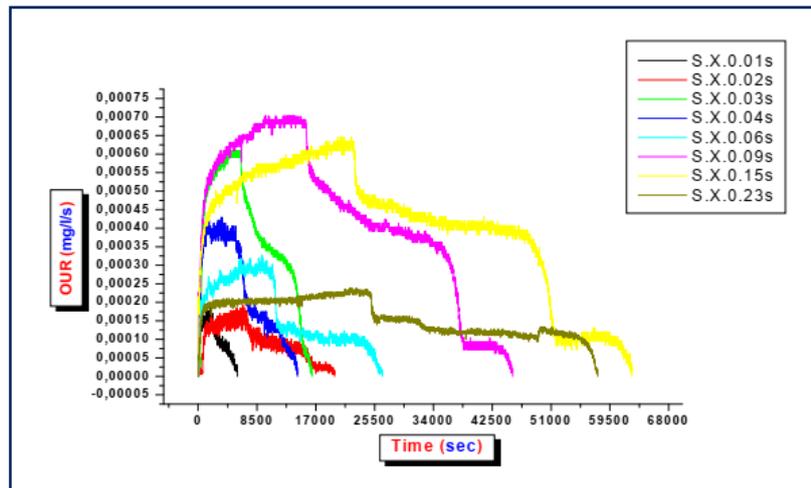
Shaded entries signify OUR_{exo} key values obtained which gives an $S_0/X_0 = 0.04$ and $= 0.15$ as a optimal ratio in tests with ATU.

^a The amount of DO consumed after substrate injection (mg_{O₂}).

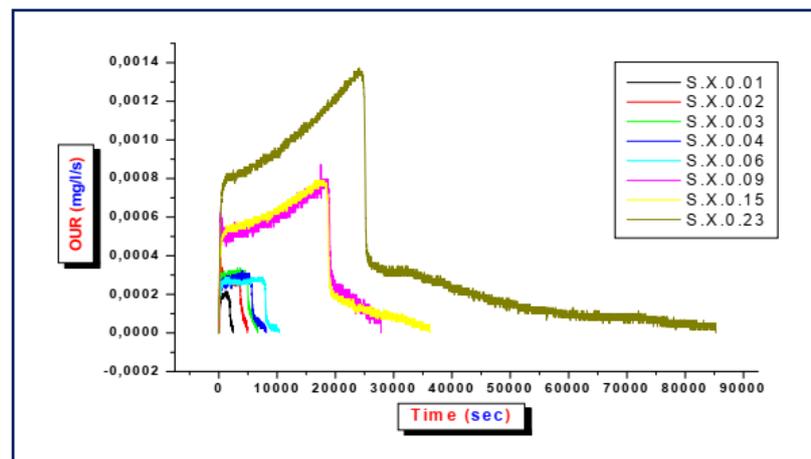
^b The minimal DO concentration (mg/L).

^c Falling speed of DO concentration after substrate injection (mg/L/s).

^d Residence time necessary for the removal of total substrate (min).



(a)



(b)

Fig. 7 – (a) Evaluation of OUR_{exo} , versus time for different values of S_0/X_0 ratio, without a nitrification inhibitor and (b) With a nitrification inhibitor.

Please cite this article in press as: Sakhraoui M, et al., Respirometric evaluation of S_0/X_0 ratio effect on the kinetic and stoichiometric parameters of activated sludge, International Journal of Hydrogen Energy (2017), <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijhydene.2017.01.097>

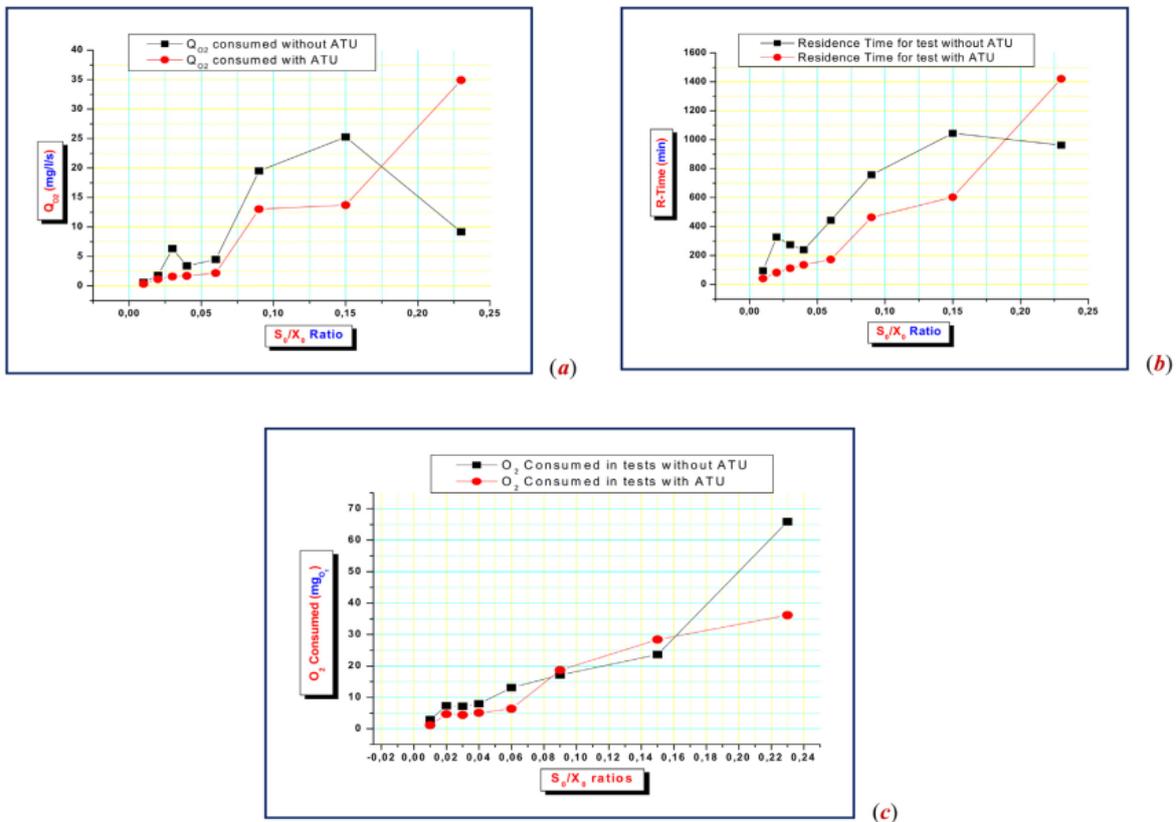


Fig. 8 – (a) variation of DO consumed, (b) residence time for total substrate degradation and (c) total DO quantity consumed after substrate injection with and without ATU for various S_0/X_0 ratios.

(C) there is an increase in the pH value with absence of the point (D) and return to initial pH value at point (E).

Dissolved oxygen

Dissolved oxygen concentration variation was recorded during respirometric tests in the absence and in the presence of ATU, for different S_0/X_0 ratios, in Fig. 6a and b respectively. Fig. 6a shows the variation of DO during COD removal and nitrification. It can be noticed as the S_0/X_0 ratio increases the overall oxygen consumption increases too, as can be seen in Tables 3 and 4 for both cases. Since the increase of S_0/X_0 is accompanied by adding more substrate. Moreover the necessary time for total oxidation of COD and nitrogen increases as well as S_0/X_0 ratio increases too. Furthermore, the OUR_{exo} of Table 4 (presence of ATU) is relatively higher than the ones in Table 3; corresponding to higher oxygen consumption rate meaning that when COD is present alone the removal kinetics of COD is much higher. Owing to the fact that the data of Table 3 are the results of COD and nitrogen oxidation, where nitrification is a slow process and the data of OUR_{exo} are averaged data.

OUR and DO amount consumed in various S_0/X_0 ratios

Fig. 7a and b shows the variation of exogenous OUR_{exo} with time. The shape of the curve is similar to the inverse of DO variation curve. It can be seen clearly that the OUR_{exo} values of COD removal are more important than the ones for COD removal and nitrification. Moreover, as S_0/X_0 increases OUR_{exo} increase too, especially for COD removal only, then it decreases as the substrate is depleting. This is probably due to the fact that the presence of high concentration of substrate favors microbial activity to attain its maximum. Moreover, Tables 3 and 4 suggest that the best results concerning microbial activity, expressed through OUR_{exo} , correspond to an S_0/X_0 ratio equals to 0.04. However for the case of the presence of both COD and nitrogen Fig. 7a the second part of the curve shows a predominant nitrification as COD is depleted.

Fig. 8a–c shows the total DO quantity consumed for various S_0/X_0 ratios, this consumption is of ascending order; in way that if the S_0/X_0 ratios increase, the DO quantity consumed increase due to the microorganisms respiration to degrade the substrate which increase too.

Conclusion

Respirometry as a technique has been used in the assessment of the influence of S_0/X_0 ratio. Different respirometric tests were undertaken with different values of S_0/X_0 , where the variation of DO concentration data was gathered under different operating conditions. During the endogenous phase, DO variations under no aeration condition was used to calculate the $K_L a$ (volumetric oxygen transfer coefficient); this procedure is applied to all the respirometric experiments. The obtained results concerning the $K_L a$ are quite similar. Moreover, following the endogenous phase, wastewater samples are injected into the respirometer under aeration while recording DO concentration data. Two cases were considered. The first one consisted of injecting the wastewater samples with ATU (nitrification inhibitor) while for the second case wastewater was injected without ATU. The obtained data was used to calculate OUR_{exo} and total oxygen consumption. It was found that as S_0/X_0 ratio increased, an increase in total oxygen consumption increased too, owing to the presence of more substrate. Moreover it seems that the OUR_{exo} increases as S_0/X_0 increased too. Owing to the fact that at high substrate concentrations microbial activity approaches its maximum. However, the OUR_{exo} data suggest that S_0/X_0 ratio of 0.04 is an optimum value.

REFERENCES

- [1] Wuhrman K. Effect of oxygen tension on biochemical reaction in sewage purification plants. In: Manhaman College conf. on biological waste treatment. Paper N°: 3; 1960. p. 10.
- [2] Chudoba P, Chevalier JJ, Chang J, Capdeville B. Effect of anaerobic stabilization of activated sludge on its productions under batch conditions at various S_0/X_0 ratios. *Water Sci Tech (Kyoto)* 1991;23:917–26.
- [3] Kavaroova-Kovar K, Egli T. Growth kinetics of suspended microbial cells: from single substrate controlled growth to mixed substrate kinetics microbial. *Mol Biol Res* 1998;62(3):646–66.
- [4] Gupthan AS, Bhattacharya S, Basu TK. Evaluation of the maximum specific growth rate of a yeast indicating non-linear growth trends in batch culture. *World J Micro Biotech* 2000;16(7):613–6.
- [5] Muller-Feug A, Le Guedes R, Le Dean L. Cell weight kinetics simulation in chemostat and batch culture of the rhodophyte *Porphyridium cruentum*. *Biotechnol Bioenergy* 2004;88(6):759–66.
- [6] Liu Y, Liu QS, Tay JH. Initial condition dependent growth kinetics in microbial batch culture. *Process Biochem* 2005;40(1):155–60.
- [7] Chudoba J. Quantitative estimation in COD unit of refractory compounds produced by activated sludge microorganisms. *Water Res* 1985;19:37–43.
- [8] Grady CPL, Smets BF, Barbeau DS. Variability in kinetic parameter estimates: a review of possible causes and a proposed terminology. *Water Res* 1996;30:742–8.
- [9] Pitter P, Chudoba J. Biodegradability of organic substances in the aquatic environment. Boca Raton: CRC Press; 1990. U.S.A.
- [10] Chudoba P, Capdeville B, Chudoba J. Explanation of biological meaning of the S_0/X_0 ratio in batch cultivation. *Water Sci Tech* 1992;23(3/4):743–51.
- [11] Gaudy AF, Ramanathan M. Variability in cell yield for heterogenous microbial populations of sewage origin growth on glucose. *Biotechnol Bioenergy* 1971;13:113–23.
- [12] Wang JP, Yu J. Kinetic analysis on formation of poly (3-hydroxybutyrate) from acetic acid by *Ralstonia eutropha* under chemically defined conditions. *J Ind Microbiol Biotechnol* 2001;26(3):121–6.
- [13] Ellis TG, Barbeau DS, Smets BF, Grady Jr CPL. Respirometric techniques for determination of extant kinetic parameters describing biodegradation. *Water Environ Res* 1996;68:917–26.
- [14] Liu Y. Bioenergetic interpretation on the S_0/X_0 ratio in substrate-sufficient batch culture. *Water Res* 1996;30:2766–70.
- [15] Dang JS, Havey DM, Jobbagy A, Grady Jr CPL. Evaluation of biodegradation kinetics with respirometric data. *J Water Poll Control Fed* 1989;61:1711–21.
- [16] Chang J. Etude cinétique et modélisation de la croissance d'une population mixte sur substrat complexe par couplage d'un réacteur discontinu à un spectromètre de masse. Doctoral Thesis. Toulouse: INSA; 1988. France.
- [17] Chudoba J. Discussion of: effect of culture history on the determination of biodegradation kinetics by batch and fed-batch techniques. *J Water Pollut Control Fed* 1989;61(3):367–9.
- [18] Speece RE, Engelbrecht RS, Aukamp DR. Cell replication and biomass in the activated-sludge process. *Water Res* 1973;7:361–74.
- [19] Pollard PC, Steffens MA, Biggs CA. Bacterial growth dynamics in activated sludge batch assay. *Water Res* 1998;32:587–96.
- [20] Lay JJ. Biohydrogen generation by mesophilic anaerobic fermentation of microcrystalline cellulose. *Biotechnol Bioenergy* 2001;74:280–7.
- [21] Lay JJ, Lee YJ, Noike T. Feasibility of biological hydrogen production from organic fraction of municipal solid waste. *Water Res* 1999;33:2579–86.
- [22] Grau P, Dohanyos M, Chudoba J. Kinetics of multicomponent substrate removal by activated sludge. *Water Res* 1975;9:637–42.
- [23] Ekama GA, Marais GvR. Dynamic behavior of the activated sludge process. *J WPCF* 1979;51:534–56.
- [24] Ekama GA, Dold PL, Marais GvR. Procedures for determining influent COD fractions and the maximum specific growth rate of heterotrophs in activated sludge systems. *Water Sci Tech* 1986;18:91–114.
- [25] Buitron G, Capdeville B. Uptake rate and mineralization of hexadecane and naphthalene by a mixed aerobic culture. *Water Res (GB)* 1993;27:847.
- [26] Dold PL, Marais GvR. Evaluation of the general activated sludge model proposed by the IAWPRC task group. *Water Sci Tech* 1986b;18:63–89.
- [27] Kappeler J, Gujer W. Estimation of kinetic parameters of heterotrophic biomass under aerobic conditions and characterization of wastewater for activated sludge modelling. *Water Sci Tech* 1992;25:125–39.
- [28] Sollfrank U, Gujer W. Characterisation of domestic wastewater for modelling of the activated sludge process. *Water Sci Tech* 1991;23:1057–66.
- [29] Xu S, Hasselblad S. A simple biological method to estimate the readily biodegradable organic matter in wastewater. *Water Res* 1996;30:1023–5.
- [30] Saensing P, Kanchanatawee S. Development of combined ultimate hybrid respirometer-titrate meter to estimate kinetic parameters of activated sludge. *J Sci Tech* 2009;16(03):221–33.
- [31] Gerneay AK, Petersen B, Ottøy J, Vanrolleghem P. Activated sludge monitoring with combined respirometer-titrimetric measurement. *Water Res* 2001;35(05):1280–94.

- [32] Liu Y, Chen GH, Paul E. Effect of the S_0/X_0 ratio on energy uncoupling in substrate -sufficient batch culture of activated sludge. *Water Res* 1998;32(10):2883–8.
- [33] Spanjers H, Vanrolleghem P. Respirometry as a tool for rapid characterization of wastewater and activated sludge. *Water Sci Tech* 1995;31(2):105–14.
- [34] Esquivel RI, Ramirez VR, Gabriel R, Hernandez M, Miguel VJ, Alberto O, et al. A micro-respirometric method for the determination of stoichiometric and kinetic parameters of heterotrophic and autotrophic culture. *Biochem Eng J* 2014;83:70–8.
- [35] Simkins S, Alexander M. Models for mineralization kinetics with variables of substrate concentration and population density. *Appl Environ Microbiol* 1984;47:1299–306.
- [36] Yu HQ, Wang J, Fang F. Substrate consumption and biomass growth of *Ralstonia eutropha* at various S_0/X_0 levels in batch cultures. *Bioresour Technol* 2007;98:2599–604.
- [37] Aktas Ö. Effect of S_0/X_0 ratio and acclimation on respirometry of activated sludge in the cometabolic biodegradation of phenolic compounds. *Bioresour Technol* 2012;111:98–104.
- [38] Ghigliazza R, Lodi A, Converti A, Nicoletta C, Rovatti M. Influence of the ratio of the initial substrate concentration to biomass concentration on the performance of a sequencing batch reactor. *Bioprocess Eng* 1996;14:131–7.
- [39] Valerie N. Municipal wastewater characterization application of denitrification batch tests. Doctor of Philosophy Thesis of University of Natal. 1999. Durban.
- [40] Rozich AF, Gaudy Jr AF. Response of phenol-acclimated activated sludge process to quantitative shock loading. *J Water Pollut Control Fed* 1985;57:795.
- [41] Zamouche ZR, Bencheikh LM, Meniai AH. Influence of endogenous OUR determination on the K_La , exogenous OUR, total oxygen consumption and heterotrophic yield in a completely mixed batch reactor. *Int J Chem Reactor Eng* 2014;12(2):695–704.

Experimental evaluation of pharmaceutical products effect on activated sludge activity: Case of Amoxicillin

SAKHRAOUI Mahfoud, BENCHEIKH-LEHOCINE Mossaab, ZERDAZI-ZAMOUCHE Rania, MENIAI Abdeslam-Hassen

Laboratoire de l'Ingénierie des Procédés d'Environnement (LIPE), Faculté de Génie de Procédés, Université Constantine 3.
Email: mossaabbb@yahoo.fr

Abstract

The presence of biologically resistant substances, such as antibiotics which are considered inhibitors, in wastewater deteriorates biological treatment systems (activated sludge) by reducing microbial activity which in turn impacts negatively carbonaceous treatment, solid-liquid separation etc. In this work, activated sludge under different conditions were used to evaluate experimentally the Amoxicillin effect and they were as follows: not adapted biomasses of conventional WWTP, adapted biomasses to the binary substrate (acetate and ammonium), adapted biomasses to the Amoxicillin and binary substrate, finely the biomasses adapted to another organic substrate (other than acetate). The experiments were undertaken using continuous aeration respirometric technique. This is based on monitoring oxygen uptake rate, of samples containing Amoxicillin and others free of it, as well as soluble COD and Amoxicillin, consumption kinetics using UV-VISIBLE absorbance measurements.

The inhibition level was evaluated using the effective concentration index (EC index). Two ranges of Amoxicillin concentrations of 3 mg/l to 26 mg/l and 5 mg/l to 150 mg/l were used. Inhibition starts to appear at a low concentration of less than 3 mg/l in non adapted biomasses and in activated sludge adapted to organic substrate other than acetate, EC attains 14.71 % at a concentration of 11.5 mg/l for, however, a low S_0/X_0 ratio. Furthermore, the adapted activated sludge appeared to resist to Amoxicillin with a high concentration. It should be underlined that the results can be considered as preliminary, because, the antibiotic Amoxicillin trihydrate remains a very complex molecule and represents a different stress effect on the purifying bacteria. Further work is needed in order to evaluate the exact concentration in the low concentration range, and to determine the resistant germs through their insulation as well as the application of these protocols to higher S_0/X_0 ratios.

Keywords: Activated Sludge, Adaptation, Amoxicillin, Inhibition, Respirometry.

I. Introduction

Currently, the domestic wastewater processing is carried out in wastewater treatment plants (WWTP) based, for the majority, on biological process of activated sludge. The presence of various types of natural occurring bacteria (heterotrophic and autotrophic) in the aeration tank insures organic matter degradation (C, N and P)^[03] accompanied

with its growth. However, problems concerning the presence of micropollutants, toxic and resistant to biodegradation, can exert an inhibiting effect on the activated sludge^[04]. Consequently, the effectiveness of biological treatment^[05-07] of the effluent deteriorates significantly even at low concentrations ($\mu\text{g/L}$, ng/L).

Among the micropollutants present in WWTP, reported in several studies^[08-13], antibiotics and

active pharmacological products [14-16] used in veterinary and human medicine [17-18]. The world consumption of antibiotics is estimated between 100,000 and 2,000,000 t/year, with β -lactam accounting for 50-70% of the total antibiotic usage [19]. Trihydrate Amoxicillin is a β -lactam antibiotic. It is considered as the drug of choice because of its better absorptive characteristics after oral administration. The physicochemical properties and chemical structure of Amoxicillin are represented in Table 01 and Figure 02 respectively. The perfect tool to evaluate toxicity (or inhibition) in WWTP does not exist [20] yet. However, the respirometric method is largely used in the assessment of the inhibiting effect of Amoxicillin on the microbial activity because of its simplicity, speed and profitability [21-22]. This method is designed on the basis of standardized method of inhibition tests (ISO-8192). It is based on activated sludge oxygen uptake rate (OUR) measurements [05] which decreases when wastewater contains the inhibitor [24-25]. A significant parameter in the assessment of inhibition is the EC_{20} value defined as the effective concentration of the inhibitor inducing 20% reduction of oxygen uptake rate [05]. Details on the pharmaceutical product used in this study (Amoxicillin), the respirometric setup and the different protocols used are detailed in the materials and methods.

In this context, the experimental procedure employed in this work to analyze the inhibition of biomass enables us to determine to a certain extent the instantaneous effect of Amoxicillin and do not consider the potential adaptability of the biomasses after a proportioned time of acclimatization. The obtained results provide a preliminary data on the inhibiting effect of Amoxicillin on activated sludge. An increase in the inhibitor concentration resulted in a partial or total weakening of the performance of the biological system.

II. MATERIALS AND METHODS

The respirometer:

The assembled respirometer used in the experimental work of this study, is an open and aerated reactor, developed in a preceding work [44] and does not require any reagent or complex apparatus during the test. In this installation which contains a reactor made of glass of 0.5 L (04), the air is supplied by an aquarium pump of SHARK-RS-510 (02), which delivers a maximum air flow of 150 L O₂/h approximately through plastic diffuser. The liquid phase was mixed in the batch reactor using a bar magnet and a magnetic stirrer AGIMATIC-N (05). The pH, DO and temperature were measured in liquid phase using respectively a pH probe IDS-WTW (07), an oxygen probe FDO-925 IDS of WTW (03), which were connected to a Multi-Oxymeter -3430 of WTW (08) and a

thermometer. The system was maintained at a constant temperature of $20 \text{ }^\circ\text{C} \pm 0.5 \text{ }^\circ\text{C}$ (01) in a thermostatic enclosure of WTW (06). Figure 01 shows a picture of the experimental setup used in respirometric tests.

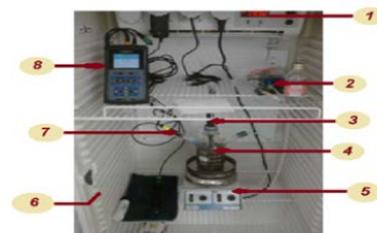


Fig. 01: Picture of the respirometric setup used in this study.

Chemicals:

Trihydrate Amoxicillin:

Amoxicillin prevents the synthesis of bacterium cellular wall, they prevent the reticulation between the linear chains peptidoglycane of polymer which is a significant component in the composition of the cellular wall. Indeed, Amoxicillin, while being fixed on proteins of penicillin connections (PLP), present at the surface of the cytoplasmic membrane of the bacteria, therefore inhibit the enzymatic activity of the PLP, enzyme necessary to the assembly of peptidoglycane. The fixing of Amoxicillin with PLP entrained the stop of partial synthesis and this fact inhibits the bacterial growth due to the embrittlement of the wall which leads then to bacterial lyses [45-47]. Amoxicillin in this study was selected on the basis of several criterions, among them, their raised consumption, their effect on environment and microorganisms. In order to evaluate the impact of Amoxicillin on the activated sludge wastewater treatment operation, various experimental procedures were proposed in the literature [49-50].

Tab. 01: Amoxicillin physicochemical properties of Amoxicillin. [19, 47, 51-52].

IUPAC ⁽¹⁾ Name	α -amino-hydroxybenzylpenicillin
Synonyms	Amox ; AMC ; Amoxicillin trihydrate ; Amoxicillin anhydrous ; DAmoxicillin ; p-Hydroxyampicillin
Molecular formula	Amoxicillin: C ₁₆ H ₁₉ N ₃ O ₅ S; Amoxicillin trihydrate: C ₁₆ H ₁₉ N ₃ O ₅ S*3H ₂ O
No. CASRN ⁽²⁾	26787-78-0
Molecular Weight	Amoxicillin: 365.40 gm/mol; Amoxicillin trihydrate: 419.41 gm/mol.
Molecular Width	1.32 nm
Physical characteristics	Solid or liquid, white to off-white crystalline powder, Penicillin-type odor, slightly soluble out water and alcohol such as ethanol-methanol
Solubility in water	3430 mg/L water
Melting point	194 °C
Boiling point	743.2 °C at 760 mmHg
Flash point	403.3 °C

$pK_a^{(3)}$	3.39, 6.71, 9.41
$\log KOW^{(4)}$	0.87

- (1). International Union of Pure and Applied Chemistry;
 (2). Chemical Abstract Services Registry Number;
 (3). Acid dissociation constants;
 (4). Octanol/water partition coefficient.

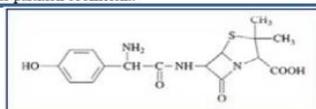


Fig. 02: Amoxicillin structure [19].

Synthetic effluent (binary substrate):

In order to ensure constancy in wastewater quality during the different tests, an easily biodegradable binary synthetic effluent was used in this work. It comprises a carbon source, a nitrogen source and micronutrients. Mixed in distilled water, the solution *pH* was adjusted to a 7.5 value using either *HCL* or *NaOH*. The synthetic wastewater composition is represented below in *Table 02*[53-54].

Tab. 02: Composition of the synthetic wastewater solution used in the respirometric tests [55].

Constituents	Concentration (mg/L)
Carbon source: $C_2H_3O_2Na$	2.570
Nitrogen source: NH_4Cl	1.485
Les nutriments:	
NH_4Cl-N	6.8
$FeCl_3$	2.3
$MgSO_4$	166
$CaCl_2$	412
Phosphate Plug: <i>pH</i> , 7.24	
K_2HPO_4	410
KH_2PO_4	90

The synthetic wastewater prepared with a theoretical *COD* concentration of 2000 mg/l was stored at a temperature of 4 °C.

Sources and preparation of activated sludge:

The biomass used in the different respirometric tests originated from *IBN ZIAD* municipal *WWTP* which treats Constantine wastewaters. It is designed with treatment capacity of 800 l/s (450 000 Eq-inhabitants). The sludge samples were collected manually from the aeration basin, transported to the laboratory in shaded glass bottles at a temperature of 4°C. To prepare the samples in the laboratory prior to respirometric testing, a 400 ml of the activated sludge were washed thoroughly with distilled water then maintained under continuous aeration during 3 hours maximum at a temperature of 20 °C to be sure that all external substrate has been consumed and the endogenous respiratory is the only process.

The sludge washing process can remove 85 to 95 % of the initial substrate concentration; *Figure 03* gives additional information on the reduction effectiveness and percentages of this technique

obtained on sludge samples of a substrate/biomass ratio $S_0/X_0 = 0.04$.

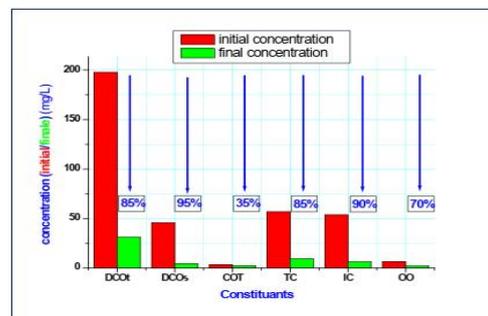


Fig. 03: histogram represents the reduction percentages of substrate concentration of activated sludge after washing.

Toxicity evaluation:

Generally, the effect of an inhibitor on activated sludge system is usually expressed like a repressive action on the growth of the microorganisms. Various models of inhibition were developed up to now, the methods of respiration *ISO-8192 (1986)* and *OECD-L133/118 (1988)* based on breathing, describe the inhibiting effects of a substance on the activated sludge by measuring the respiratory rate under defined conditions in the presence of an easily biodegradable substrate like acetate and different concentrations of the toxic elements.

A significant parameter in this method is the value of % inhibition defining the effective concentration of inhibitor inducing a reduction of oxygen uptake rate:

$$\% \text{ Inhibition} = \left(1 - \frac{OUR_{inhibited}}{OUR_{control}} \right) * 100 \quad (02)$$

The respirometric tests for the detection of inhibition is very useful since the results are obtained quickly, but for a more quantitative description of the toxic effect it is preferably employed in combination with the measurements of *EC20* value. The effective concentration, even for *EC50* and *EC80*, which represent respectively the concentration of a compound where 20 %, 50% and 80% of its maximum effect are observed. This value was derived by a linear interpolation on the plot of the curve of inhibition percentage versus concentration of the inhibitor by *Equation 03*:

$$EC20 = \frac{OUR_{control} - OUR_{inhibited}}{OUR_{control}} * 100 = 20 \% \quad (03)$$

Experimental procedure:

Examined inhibition with the respirometric test should simulate the true inhibition in the WWTP. To check this, several methods are cited in the literature, which consisted of comparing *OURs* obtained through a successive injection of synthetic effluent without inhibitor followed by the injection of the synthetic effluent with the inhibitor, after the return to the endogenous state (depletion of the external substrate). The experiment is repeated for different concentrations of the inhibitor.

Analyzed parameters:

The characterization of the activated sludge was carried out by the determination of *TSS*, *VSS*, *COD*, *BOD₅*, *V₃₀*, *SVI*, *TOC*, *TC* and *IC* according to standards methods [56-57]. *Table 03* shows the activated sludge characterization for the different collected samples for all this study.

Tab. 03: Characteristics of activated sludge used during the probation period.

Paramètres	Concentration*
TSS (mg/L)	6700 ± 1605
VSS (mg/L)	2992 ± 618
VSS/TSS	0.447 ± 0.38
V ₃₀ (ml/L)	192 ± 27.5
SVI (ml/g)	0.029 ± 0.017
pH	7.419 ± 0.106
DO (mg/L)	4.22 ± 0.09
COD _t (mg/L)	197.61 ± 22.58
COD ₅ (mg/L)	40.28 ± 8.97
BOD ₅ (mg/L)	395 ± 15
TOC (mg/L)	3.745 ± 0.595
TC (mg/L)	56.89 ± 0.24
IC (mg/L)	53.135 ± 0.365
BOD ₅ /COD	1.999 ± 0.664
COD/BOD ₅	0.500 ± 1.50
COD/ TOC	52.77 ± 37.95
BOD/TOC	105.47 ± 25.21
Conductivity	1408.5 ± 55.5
Salinity	0.65 ± 0.05

*: results concern all collected samples used in this study

III. RESULTS AND DISCUSSION

Oxygen Uptake Rate

The oxygen uptake rate *OUR*, was determined by measurements of dissolved oxygen concentration variation in the reactor, when the aeration is stopped, according *Equation 04*:

$$OUR = - \frac{dS_o(t)}{dt} \quad (04)$$

Determination of *K_La* and *OUR_{end}*

Equation 05 describes the variation of dissolved oxygen concentration at the endogenous state under continuous aeration, whereas *Equation 06* describes this variation under no aeration with

endogenous respiration only. Consequently, the slope of the linear portion of the descending curve is equal to *OUR_{end}*.

$$\frac{dS_o}{dt} = K_L a * (S_o^* - S_{end}) - OUR_{end} = 0 \quad (05)$$

$$\frac{dS_o}{dt} = - OUR_{end} = - \alpha \quad (06)$$

With α , the downward line slope of dissolved oxygen versus to time;

Therefore, *OUR_{end}* in *Equation 05* can be replaced with its value " α " and knowing that *S_O* is constant (*dS_O/dt = 0*) therefore *K_La* can be calculated with *Equation 07*. *Table 04* shows the calculated *K_La* values during the inhibition tests.

$$K_L a = - \frac{\alpha}{(S_o^* - S_{end})} \quad (07)$$

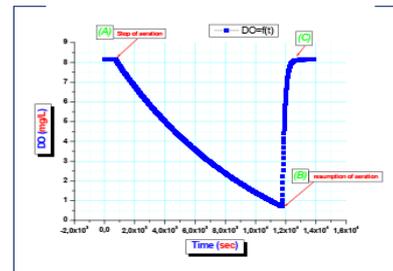


Fig. 04: an example of *DO* concentration variation curve versus time during the phase of stop/resume aeration under endogenous conditions.

Respirogrammes obtained after various injections

Figure 05 represents a respirogramme describing the endogenous respiration with external aeration at the beginning of the experiment (at *A*), then an endogenous respiration without external aeration showing the descending curve (*A-B*), this part of the curve will be used to calculate the volumetric oxygen transfer coefficient *K_La*. After resuming aeration (*B*) the curve returned to the endogenous respiration state with external aeration (*C*), the level of oxygen in the solution is similar to the initial state (*C-D*). After injecting the binary substrate, carbonaceous and nitrogen sources, (*D*), with maintaining external aeration, the *DO* concentration diminishes, due to its consumption by the bacteria. In fact the first portion of this part represents the carbonaceous consumption (*D-E*) and the second part represents the nitrogen consumption (*E-F-G*). To differentiate between the two oxidation processes, the value of the *pH* can be used as an indicator. In fact, from point (*E*) to (*F*)

the pH is lower than from (D-E) indicating that there is an acidity production due to nitrification. Moreover, the consumption kinetics of Oxygen during nitrification is lower than the carbonaceous one.

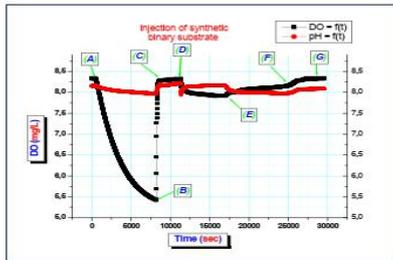


Fig. 05: example of a respirogramme of DO and pH versus time after the injection of synthetic effluent.

Consecutive injection of the binary substrate without and with antibiotics

Figure 06 represents a consecutive injection of a binary substrate, showing the first injection, the return to the endogenous respiration then the second injection. The form of DO variation for both injections is similar. Figure 7 and Figure 8 show respectively a superposition of DO variation and OUR variation curves of both injections, indicating that the oxygen consumption of the second injection is different with a 15% variation in the consumption.

Figure 9 represents a respirogramme of consecutive injections of the binary substrate. The first injection consisted of the substrate free of any antibiotics whereas the second one with the antibiotics. Similarly Figure 10 and Figure 11 shows respectively a superposition of DO variation and OUR variation curves of both injections, indicating that the oxygen consumption in the presence of the antibiotic is low representing 20% of the consumption without antibiotics therefore a reduction of 80% resulted.

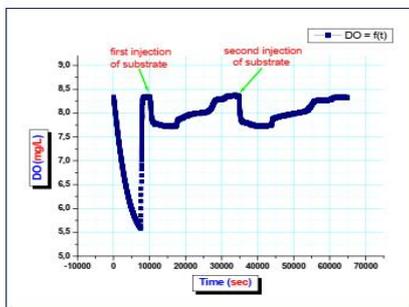


Fig. 06: example of a respirogramme obtained after successive injection of same substrate without inhibitor.

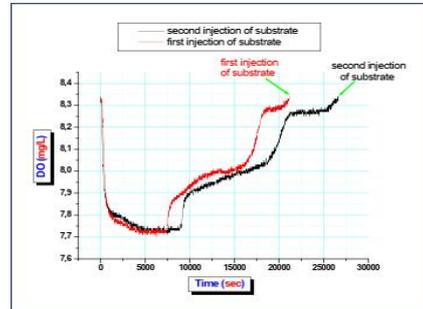


Fig. 07: example of a respirogramme of DO concentration versus time for two successive injections of same substrate without inhibitor.

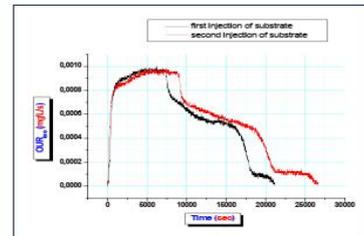


Fig. 08: example of a respirogramme of OUR versus time obtained after integration of DO curve for successive injection of same substrate.

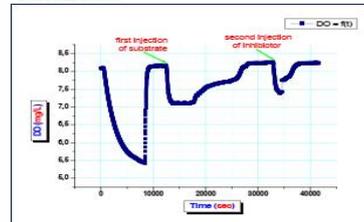


Fig. 09: example of a respirogramme of successive injection of binary substrate followed by injection of binary substrate containing certain concentration in Amoxicillin.

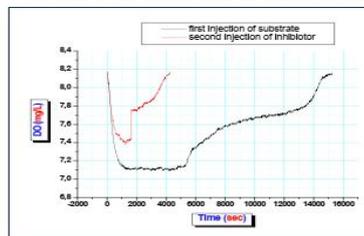


Fig. 10: example of a respirogramme obtained after successive injection of substrate and that of substrate containing the inhibitor.

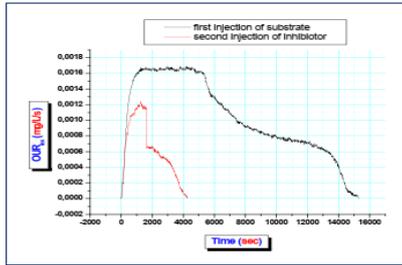


Fig. 11: The OUR, versus time for the successive injection of substrate free of Amoxicillin followed by the substrate containing the antibiotic.

Tab. 04: Calculated OUR, from Figure 8 and Figure 11.

OURex	Area
OURex S1	12,69019
OURex S2	15,04099
OURex S1	15,8961
OURex S+I	2,66437

Inhibition variation with the various antibiotics concentrations

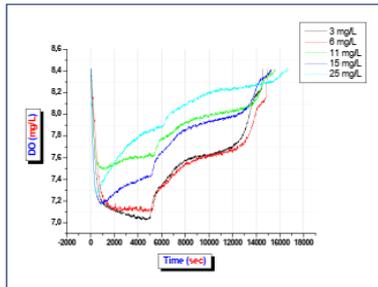


Fig. 12: respirogramme of the various injections testing of substrates only.

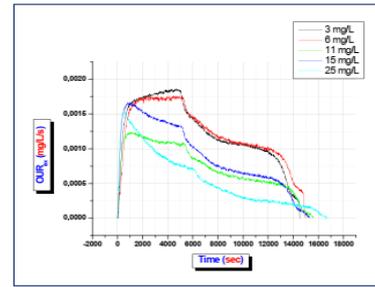


Fig. 13: The variations of OUR versus time of various injections tests of substrates only.

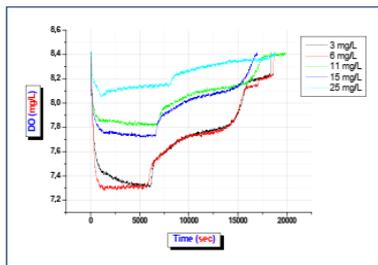


Fig. 14: respirogramme of the injections of various substrates containing the different concentrations of Amoxicillin.

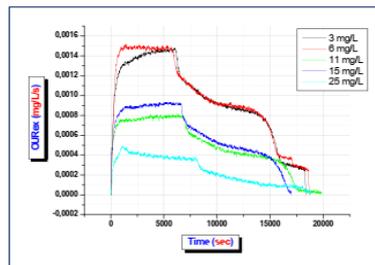


Fig. 15: OUR consumption versus time of the injections of various substrates tests containing the different concentrations of Amoxicillin.

In order to assess the variation of the biomass activity inhibition due to the presence of antibiotics, different concentrations 3, 6, 11, 15 and 25 mg/l were tested. The results of DO and OUR variations for the dual substrate alone are represented respectively in Figure 12 and Figure 13. The variations in the results are due to the fact that the biomass has not been acclimated and the collect date of activated sludge from the WWTP is different as well. Moreover, Figures 14 and Figure 15 represent respectively the results of DO and OUR variations of the dual substrate with the presence of the antibiotics. To evaluate the level of inhibition, the OUR for substrate alone is calculated from Figure 13 and compared to the OUR of the substrate mixed with the antibiotics, calculated from Figure 15. The overall results are recapitulated in Table 5, with the calculation of the EC index, and the OUR results are represented in Figure 16.

Tab. 05: table shows the results obtained in the experiments of inhibition.

COD _{eff}	S ₀ /X ₀	S ₀ /X ₀ Reality*	[Inhib] (mg/L)	% inhibition	V _{eff} mL	V _b mL	OUR _{ind} ** (S et S+I)	K _{L,a} (s ⁻¹)	OUR _{exo} S***	OUR _{exo} S + I****
300	0,04	0,039	3	1.7	120	280	0,00107	0,00137	11,1192	10,9309
300	0,04	0,041	5.5	8.61	110	290	0,00107	0,00115	11,5845	10,5874
300	0,04	0,039	11.5	14.71	115	285	0,00091	0,00133	11,4340	9,7519
300	0,04	0,039	16	20.86	115	285	0,00104	0,00160	17,2752	13,6712
300	0,04	0,039	26	37.6	105	295	0,00071	0,00120	10,0645	6,2767

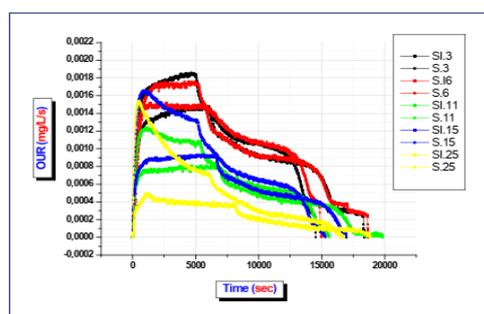
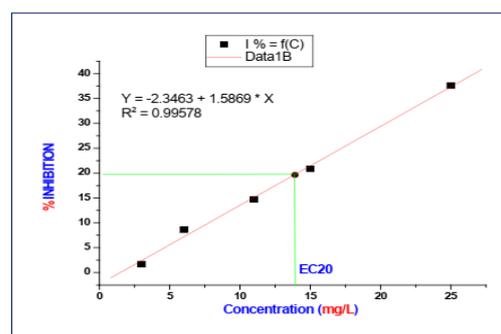
*: real value of S₀/X₀ in reactor**: value of OUR_{ind} obtained in curves of the successive injection of substrate only (S) and substrate with inhibitor (S+I).***: value of OUR_{exo} calculated for curves after the injection of substrate only (S).****: value of OUR_{exo} calculated for curves of the injection of substrate with inhibitor (S+I).

Fig. 16: variation of OUR consumption versus time of the different samples of binary substrate without and with different concentrations of Amoxicillin.

Figure 16 shows clearly the effect of inhibition on oxygen consumption where an overall reduction of oxygen consumption can be noticed on the curves, indicating a reduction of biomass activity. This can be seen on the curves corresponding to 25, 15 and 11 mg/l of Amoxicillin, where biomass activity has been inhibited almost completely resulting in a lowering of the maximum OUR (plateau), contrarily the residence time necessary to consume the total binary substrate is increased. Furthermore the presence of the inhibitor did not alter the form of the OUR curves, indicating probably that the processes in presence did not change in nature but have changed in their celerity.

Data from Table 5 concerning inhibition Percentage and inhibition concentration were plotted in Figure 17 in orders to interpolate the EC₂₀ value. The obtained curve has a good linear form in the studied interval.

Fig. 17: curve of percentage of inhibition according to concentration in inhibitor for the evaluation of EC₂₀.

The study shows the inhibiting effect of Amoxicillin on a synthetic binary substrate effluent biodegradation. At a concentration of 3 mg/l of Amoxicillin, inhibition starts to appear (1.7%) and increased thereafter to attain 37.6% for an Amoxicillin concentration of 26 mg/l. It should be underline that the antibiotics concentrations in wastewater effluents vary considerably, from 720 µg/l in a hospital effluent to a level of 31 mg/l in an industrial one^[63]. Furthermore Table 5 shows a decrease of OUR for the different Amoxicillin concentrations which is equal to the respective values of inhibition percent.

IV. CONCLUSION

The discharge of antibiotics and their residues can disturb the watery ecosystems^[64-65], and bacterial activity in nature or in wastewater treatment plant. The majority of the WWTP are not designed to face the antibiotics which can be toxic to the biomass in aeration basin. The presence of Amoxicillin has been found to start to inhibit bacterial activity from a concentration less than 3 mg/l and attain 37.6% for a concentration of 26 mg/l. Moreover, inhibition is expressed through a reduction in the celerity of the kinetics of the processes present but not by changing their nature.

The *EC20* of the studied Amoxicillin was found to correspond to a concentration of *14.53 mg/l*.

This study has led us to apply the *EC* determination procedure, which is quite easy to implement in a laboratory if respirometric equipment are available. Moreover, it would be interesting to assess the influence of Amoxicillin at low concentration and to verify the removal process is of a biological nature alone.

Nomenclature:

EC: (%) effective concentration index.
S₀/X₀: (*mg COD/mg VSS*) initial substrate-to-biomass ratio.
OUR: (*mg/l/h*) Oxygen Uptake Rate
OUR_{end}: (*mg/l/h*) Endogenous Oxygen Uptake Rate
OUR_{exo}: (*mg/l/h*) Exogenous Oxygen Uptake Rate.
OUR_{control}: (*mg/l/h*) the maximum specific respiratory rate detected before the addition of toxicant.
OUR_{inhibited}: (*mg/l/h*) the maximum specific respiratory rate detected after the addition of toxicant.
K_La: (*h⁻¹*) Oxygen Transfer Coefficient
S₀: (*mg/l*) dissolved oxygen concentration.
*S₀**: (*mg/l*) dissolved oxygen concentration in saturation.
COD: (*mg/l*) chemical oxygen demand.
COD_s: (*mg/l*) soluble chemical oxygen demand.
COD_t: (*mg/l*) total chemical oxygen demand.
COD_{eff}: (*mg/l*) chemical oxygen demand of synthetic effluent.
TSS: (*mg/l*) total suspended solid.
VSS: (*mg/l*) volatile suspended solid
BOD₅: (*mg/l*) biological oxygen demand after 5 days
V₃₀: (*ml*) elutriated volume of sludge after 30 minutes.
SVI: (*ml/l*) Sludge volume index
TOC: (*mg/l*) total organic carbon
TC: (*mg/l*) total carbon
IC: (*mg/l*) inorganic carbon
V_{eff}: (*ml*) volume of effluent injected in reactor
V₉: (*ml*) sludge volume in reactor
 α : downward line slope.
WWTP: wastewater treatment plant.
C, N, P: carbon, nitrogen and phosphor
PLP: proteins of penicillin
DO: dissolved oxygen.

REFERENCES

- Silvie H., Hana S., Jarmila D., Inhibition of activated sludge respiration by heavy metals. Proc. Inter. Conf. Envir. Ener.Ecosy. Devel. (2013) .231-235.
- Lobos J., Heran M., Wisniwiski Ch., Grasmick A., biomass production reduction in a submerged membrane bioreactor working with a complex substrate. LGPEB UMR-CIRAD 016, UM II (2005)- CC005, 34095, Mont. France.
- Marinette H., Jansen J.L.C., Oxygen uptake rate measurements for application at wastewater treatment plants. Wat. Envir. Engi., Dep. Chem. Engi. Lund Uun. VATTEN (2007) 63: 131–138.
- Alisi C.S., Nwaogu L.A., Ibegbulem C.O., Ujowundu C.U., Antimicrobial action of methanol extract of *Chromolaena odorata*-Linn is logistic and exerted by Inhibition of Dehydrogenase Enzymes. Jour. Res. Bio. (2011) 3: 209-216. JRB.Vol-01. No 03.
- Ubay E.C., Ozdemir S., Karahan O., Insel G., Orhon D., Critical appraisal of respirometric methods for metal inhibition on activated sludge. Jou.. Haz. Mat. B139 (2007). 332–339.
- Insel G., Karahan O., Ozdemir S., Pala L., Katipoglu T., Ubay E.C., Orhon D., Unified Basis for the Respirometric Evaluation of Inhibition for Activated Sludge. Jou. Env. Sci. Heal. Part A, (2006) 41:1763–1780.
- Bott C.B., Love N.G., The immunochemical detection of stress proteins in activated sludge exposed to toxic chemicals. Wat. Res. 35,1-(2001), 91–100.
- Hartmann S.T., Kümmerer K., Hartmann A., Biological degradation of cyclophosphamide and its occurrence in sewage Water. Eco. Env. Saf. (1997) 36, 174-179.
- Fernando L., Zambrano,D. Albasi C., Bioréacteur à membrane externe pour le traitement d'effluents contenant des médicaments anticancéreux: élimination et influence du cyclophosphamide et de ses principaux métabolites sur le procédé. thèse de doctorat, L'Ins. Nat. Poly. Toulouse, (2009) 02-17.
- Joss A., Keller E., Alder A.C., Göbel A., McArdell C.S., Ternes T., Siegrist H., Removal of pharmaceuticals and fragrances in biological wastewater treatment. Wat. Res. (2005) 39, 3139-3152.
- Spanjers, H. and Vanrolleghem, P.A. Respirometry as a tool for rapid characterisation of wastewater and activated sludge. Water Sci. Technol., (1995) 31(2):105-114.
- Bernhard M., Müller J., Knepper T.P., Biodegradation of persistent polar pollutants in wastewater: Comparison of an optimized lab-scale membrane bioreactor and activated sludge treatment. Wat. Res. (2006) 40, 3419-3428.
- Wever D.H., Van R.S., Dotremont C., Müller J., Knepper T., Comparison of linear Alkylbenzene sulfonates removal in conventional activated sludge systems and membrane bioreactor. Wat. Sci. Tech. (2004) 50, 219-225.
- Jung S.C., Establishment of control system of antibiotics for livestock. A. Rep. Korea Food Drug Admin. 7, (2003)1113–1114.
- Chee S.J.C., Aminov R.I., Krapac I.J., Garrigues J.N., Mackie R.I., Occurrence and diversity of tetracycline resistance genes in lagoons and ground-water underlying two swine production facilities. Appl. Env. Mic. (2001) 67, 1494–1502.
- Castiglioni S., Bagnati R., Calamari D., Fanelli R., Zuccato E., A multiresidue analytical method Using solid/phase extraction and HPLC-MS-MS to measure pharmaceuticals of different therapeutic classes in urban waste waters. Jou. Chroma. (2005) 1092, 206-215.
- Le M.N., Khan S.J., Drewes J.E., Stuetz R.M., Fate of antibiotics during municipal water recycling treatment processes. Wat. Res. (2010) 44, 4295-4323.
- Fuoco D., Classification framework and chemical biology of tetracycline structure-based drugs. Jou. Antibio.(2012)-1,1-13.
- Längin A., Alexy R., König A., Kümmerer K., Deactivation and transformation products in biodegradability testing of β -lactams amoxicillin and piperacillin. Jou. Chemos. Elsevier (2008) 0045-6535. Doi: 10.1016, 2008.12.032
- Chapman P.M., Whole effluent toxicity testing-usefulness, level of protection, and risk assessment. Env. Tox. Chem. (2000) 19, 3–13.
- Talinli I., Tokta S., Environ. Technol. 15-979 (1994) Et Madoni, P., Davoli, D., Guglielmi, L., Water Res. 33, (1999) 2459. Et Dalzell, D. J. B., Alte, S., Aspichueta, E., de la Sota, A., Extebarria, J., Gutierrez, M., Hoffmann, C. C., Sales, D. Obst, U., Christofi, N., Chemosphere 47, (2002) 535.
- Kong Z., Vanrolleghem P., Willems P. Verstraete W., Simultaneous Determination of Inhibition Kinetics of Carbon Oxidation and Nitrification With a Respirometer. Wat. Res. (1996) Vol. 30, No. 4, pp. 825-836,
- Saensing P., Kanchanatawee S., Development of combined ultimate hybrid respirometer-titrate meter to estimate kinetic parameters of activated sludge. Jou. Sci. Tech. (2009) 16 (3):221-233.

- [24] Albek M., Yetis U., Gokcay C.F., Effects of Ni (II) on respirometric oxygen uptake. *Appl. Micr. Bio.* (1997) 48, 636–641.
- [25] Kelly C.J., Tumsaroj N., Lajoie C.A., Assessing wastewater metal toxicity with bacterial bioluminescence in a bench-scale wastewater treatment system. *Wat. Res.* (1997) (38) : 423–431.
- [26] Spanjers H., Takacs I., Brouwer H., Direct parameter extraction from respirometry for wastewater and biomass characterization. *Wat. Sci. Tech.* (1999) 39, 137–145.
- [27] Meiklejohn J., The oxygen uptake of suspensions and cultures of a free-living bacterium. *Jou. Exp. Bio.* (1937) 14:158–170.
- [28] Gernaey A.K., Petersen B., Ottoy J., Vanrolleghem P., Activated sludge monitoring with combined respirometric-titrimetric measurements. *Wat. Res.* (2001) Vol. 35, No. 5, pp. 1280–1294.
- [29] Kappeler J., Gujer W., Estimation of kinetic parameters of heterotrophic biomass under aerobic conditions and characterization of wastewater for activated sludge modeling. *Wat. Sci. Tech.* (1992) 25(6), 125–139.
- [30] Kristensen, G. H., Jansen, J. la C. and Jørgensen, P. E., Batch test procedures as tools for calibration of the activated sludge model a pilot scale demonstration. *Wat. Sci. Tech.* (1998) 37(4–5), 235–242.
- [31] Kristensen H.G., Jansen J.L.C., Jørgensen E.P., Christensen W.H., Simulating till steering of resealing, Laboratories forcing, parameter estimating of modulation proving. Vand kvalitets institute, (1991) ATV. VKI-S. 655024.
- [32] Kristensen H.G., Jørgensen P.E., Henze M., Characterization of functional microorganism groups and substrate in activated sludge and wastewater by AUR, NUR and OUR. *Wat. Sci. Tech.* (1992) 25(6), 43–57.
- [33] Roš M., Respirometry of activated sludge. Techn. Pub. Com. Inc. (1993) U.S.A. ISBN: 1-56676-029-1.
- [34] Spanjers, H., Vanrolleghem P.A., Olsson G. And Dold P.L., Respirometry in control of the activated sludge process: Principales”. *Sci. Tech.* (1998) Rep. no.7. IAWQ, London. ISBN: 1-900222-04-3.
- [35] Spanjers H., Vanrolleghem P., Respirometry as a tool for rapid characterization of wastewater and activated sludge. *Wat. Sci. Tech.* (1995) 31(2), 105–114.
- [36] Esquivel R.I., Ramirez V.R., Gabriel R. Hernandez M., Miguel V.J., Alberto O., Frederic T., A microrespirometric method for the determination of stoichiometric and kinetic parameters of heterotrophic and autotrophic cultures. *Bio. Eng. Jou.* (2014) 83, 70–78
- [37] Trapani D.D., Capodici M., Cosenza A., Di B.G., Mannina G., Torregrossa M., Viviani G., Evaluation of biomass activity and wastewater characterization in a UCT-MBR pilot plant by means of respirometric techniques. *Des.* (2011) 269, 190–197.
- [38] Gernaey A.K., Petersen B., Ottoy J.P., Vanrolleghem P., Activated sludge monitoring with combined respirometric-titrimetric measurements. *Water Res.* (2001) 35, 1280–1294.
- [39] Riefleer R.G., Ahlfeld D.P., Smets B.F., Respirometric assay for biofilm kinetics estimation: parameter identifiability and retrievability. *Bio. Bio.* (1998) 57, 35–45.
- [40] Cokgör E.U., Sözen S., Respirometric analysis of activated sludge behaviour-I. Assessment of the readily biodegradable substrate. *Wat. Res.* (1998) 32 (2), 461-475
- [41] Marc A.L., Réduction de la production de boues activées. thèse de doctorat, université de Montréal, département des génies civil, géologique et des mines. (2013) France.
- [42] Spanjers, H., Vanrolleghem, P.A., Respirometry as a tool for rapid characterization of wastewater and activated sludge. *Water Sci. Technol.* (1995) 31(2):105-114.
- [43] Spanjers, H., Vanrolleghem, P.A., Olsson, G., and Dold, P.L., Respirometry in control of the activated sludge process: Principles. IWA Scientific and Technical Report No. 7. (1998) London, IWA, 48p.
- [44] Mahfoud-SAKHRAOUI, Zamouche Z.R., Bencheikh L.M., Meniai A.H., Respirometric evaluation of S0/X0 ratio effect on the kinetic and stoichiometric parameters of activated sludge. *Inter. Jou. Hydr. Energ.* (2017) 01(10): <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijhydene.2017.01.097>.
- [45] Bojaraju V., Sireesha D., Prasad V.V.L.N., Prakash. V.D., Reverse Phase High Performance Liquid Chromatography Method for the Simultaneous Estimation of Amoxicillin Trihydrate and Tinidazole in the Tablet Dosage Form. *Wor. Jou. Che.* (2012) 7 (2): 47-52, 1817-3128.
- [46] Pasha I.S., Mohammed T., kumar S.A., Nikhila V., New visible spectrophotometric methods for the determination of amoxicillin trihydrate in bulk drug & their formulations. *Inter. Jou. Phar. Ind. Res.* (2011) G.C.P., M-R.R.Dist, A.P, 504501: 106-109.
- [47] Bisson B.C., Lozniewski A., kedzierewicz F., *Desulfobrio* spp. dans la maladie parodontale : Interactions avec les cellules épithéliales KB et activité de l'Amoxicillin libre ou complexée sur ses formes extracellulaires et intracellulaires. thèse de doctorat, U.F.R. d'odontologie, école doctorale Biologie, Santé et Environnement (BioSE), Université Henri Poincaré, Nancy-1, 5. (2009) France.
- [48] Alighardashi A., Dagot M.C., Roche M.N., Composés pharmaceutiques et eaux usées urbaines. thèse de doctorat, Laboratoire des Sciences du Génie Chimique - CNRS-LPR 6811. (2007) France
- [49] Ricco G., Tomeib M.C., Ramadori R., Laera G., Toxicity assessment of common xenobiotic compounds on municipal activated sludge: comparison between respirometry and Microtox. *Wat. Res.* (2004) 38, 2103–2110
- [50] Xiao H.Z., Tong Y., Han -C.S., Hui M.S., Temporal and spatial inhibitory effects of zinc and copper on wastewater biofilms from oxygen concentration profiles determined by microelectrodes. *Wat. Res.* (2010) 0043-1354, 09.035
- [51] Mouayed Q. Al-Abachi, Subhi S., Flow injection Spectrophotometric Determination of Phenylephrine Hydrochloride and Amoxicillin Trihydrate in Pharmaceutical Preparations. *Jou. Al-Nahrain, Uni. Sci.* (2013) Vol.16(1), pp. 42-52.
- [52] May M.J. Al-Mudhafar., Spectroscopic Study for Determination of Amoxicillin Using Cobalt (II) as Complexing Metal. *Iraqi Jou. Pharm. Sci.* (2009) Vol.18 (1).
- [53] Mouayed Q. Al-Abachi, Jwan A., Abdul S., kinetic spectrophotometric methods for the determination of amoxicillin in pharmaceutical preparation. *Iraqi Jou. Sci.* (2012) Vol. 53, No 1, pp. 8-16.
- [54] Baquero F., Martinez J.L., Canton R., Antibiotics and antibiotic resistance in water environments. *Ener. Bio.* (2008) 16, 260–265.
- [55] Dircks K., Pind P.F., Mosbæk H., Henze M., Yield determination by respirometry - The possible influence of storage under aerobic conditions in activated sludge. *Wat. Sci* (1999) 0378-4738, Vol. 25 No. 1.
- [56] Pourtedal H.R., Sadegh N., Effective removal of Amoxicillin, Cephalexin, Tetracycline and Penicillin G from aqueous solutions using activated carbon nanoparticles prepared from vine wood. *Jou. Wat. Proc. Eng* (2014) 1, 64-73.
- [57] Bojaraju V., Sireesha D., Prasad V.V.L.N., Prakash. V.D., Reverse Phase High Performance Liquid Chromatography Method for the Simultaneous Estimation of Amoxicillin Trihydrate and Tinidazole in the Tablet Dosage Form. *Wor. Jou. Chem.* (2012) 7 (2): 47-52.
- [58] Benes, O., Spanjers, H., Holba, M., Respirometry techniques and activated sludge models. *Wat. Sci. Tech.* (2002) 46 (4-5), 1-6.
- [59] Melcer, H., Dold, P.L., Jones, R., Bye, C.M., Takács, I., Stensel, H.D., Wilson, A.W., Sun, P., Bury, S., Methods

- for Wastewater Characterization in Activated Sludge Modeling. *Wat. Envi. Res.* (2003) Foun. IWA Pub. U.K., 575 pp.
- [60] Spanjers, H., Vanrolleghem, P.A., Olsson, G., Dold, P.L.. *Respirometry in control of the activated sludge process: Principles. Sci. Tech.*(1998) report No.7. IAWQ, London, UK.
- [61] Stephanopoulos G., *An Introduction to Theory and Practice. Chem. Pro. Cont.* Prentice-Hall, Englewood Cliffs, New Jersey. (1984) USA.
- [62] Spanjers, H., Vanrolleghem, P.A.. *Respirometry as a tool for rapid characterization of wastewater and activated sludge. Wat. Sci. Techn.* (1995) 31 (2), 105-114.
- [63] Jean N.L., *Effets des antibiotiques sur le procédé d'épuration par boues activées. Etude du cas de l'érythromycine, du floc bactérien au réacteur biologique.* These de doctorat.
- [64] Lee Y.J., Lee S.E., Lee D.S., Kim Y.H., *Risk assessment of human antibiotics in Korean aquatic environment. Envi. Toxi. Pharma.*; (2008) 26:216-221.
- [65] Isidori M, Lavorgna M, Nardelli A, Pascarella L, Parrella A., *Toxic and genotoxic evaluation of six antibiotics on non-target organisms. Sci. Total Envi.*; (2005) 346:87-98.
- [66] Baquero F, Martinez J.L., Canton R., *Antibiotics and antibiotic resistance in water environments. Current Opinion in Biotechnology*; (2008) 19:260-265.
- [67] Amann R, Lemmer H, Wagner M., *Monitoring the community structure of wastewater treatment plants: a comparison of old and new techniques. FEMS Microbiology Ecology*, (1998) 25:205-215.

PRODUCTIONS SCIENTIFIQUES

Participation à des conférences internationales :

- **SAKHRAOUI Mahfoud., et al., :** « Cinétique de la dégradation d'un effluent synthétique et de l'Amoxicilline par les boues activées d'une station classique et autre à membrane dans un réacteur batch », communication **poster**, the 2nd **international** conference on water resources (ICWR-2016), université KASDI MERBAH, Ouargla - Algérie.
- **SAKHRAOUI Mahfoud., et al., :** « Etude d'un Bioréacteur à Membrane pour l'Elimination de l'Amoxicilline dans les Effluents Synthétique », Communication **Poster**, le 1e Congrès **International** sur l'Environnement, la Biodiversité et le Développement Durable (CIEBDD'2016), Université des Sciences et de la Technologie d'Oran, Algérie.
- **SAKHRAOUI Mahfoud., et al., :** « Respirometric Evaluation of S0/X0 Ratio Effect on the Kinetic and Stoichiometric Parameters of Activated Sludge », Communication Poster, The 7 International Renewable Energy Congress 'IREC-2016', Hammamet, Tunisia.
- **SAKHRAOUI Mahfoud., et al., :** « Study of Amoxicillin Inhibitory Effect on Biomass Activity Using Continuous Aeration Respirometry », Communication **Poster**, 5th **Maghreb** Conference on desalination and Water Treatment 'CMTDE-2015', Faculté des Science, Campus Universitaire 2092 Manar II, l'Association Tunisienne de Dessalement, Tunisie.
- **SAKHRAOUI Mahfoud., et al., :** « Etude de l'Inhibition du Systèmes de Traitement Biologique à Boues Activées des Eaux Usées par les Antibiotique, Injection Poudre », Communication **Poster**, 3em Colloque **international** sur Géologie du Sahara, **2015**, Faculté des Hydrocarbures et des Energies Renouvelables et Sciences de Terre et d'Univers, Université d'Ouargla, Algérie.
- **SAKHRAOUI Mahfoud., et al., :** « Analyse Les Polluants Métalliques Issus de Retombées Atmosphériques et d'Origine Industriels dans les Sols d'une Zone d'Activité Industrielle », Communication Poster, 3em Colloque international sur Géologie du Sahara, Faculté des Hydrocarbures et des Energies Renouvelables et des Sciences de la Terre et de l'Univers, Université de Ouargla, Algérie.
- **SAKHRAOUI Mahfoud., et al., :** « La Mise En Place d'une Nouvelle Technique de Préparation des Boues Activées pour les Essais Respirométriques », Communication **Poster**, 1e Séminaire **International** en Biologie "Bio-Ressources et Sécurité des Aliments", **2015**, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Université de Bechar, Algérie.
- **SAKHRAOUI Mahfoud., et al., :** « Etude de Suivre la Consommation d'Effluent Synthétique Injecté dans un Bioréacteur par la Biomasse Epuratrice Autotrophes et Hétérotrophes », Communication **Poster**, 1e Séminaire **International** en Biologie, **2015**, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Université de Bechar, Algérie.

Participation à des conférences nationales :

- **SAKHRAOUI Mahfoud., et al., :** « Impact des micropolluants pharmaceutiques fabriqués sur l'environnement aquatique », communication **poster**, 1^{ère} école d'hiver de formation, l'Analyse de cycle de vie et l'éco-conception (L.R.T.A-2018), université de Boumerdess, Algérie.
- **SAKHRAOUI Mahfoud., et al., :** « The use of aerobic respirometry to evaluate the inhibitory effect of a pharmaceutical product. Case of Amoxicilline antibiotic », Communication **Poster**, Les 5^{em} **journées** du jeune chercheur, **2018**, Faculté de Génie des Procédés, Université Salah Boubnider, Constantine 3.
- **SAKHRAOUI Mahfoud., et al., :** « Immersed membrane bioreactor effectiveness for the pharmaceutical product elimination in wastewater. », Communication **Poster**, Les 5^{em} **journées** du jeune chercheur, **2018**, Faculté de Génie des Procédés, Université Salah Boubnider, Constantine 3.
- **SAKHRAOUI Mahfoud., et al., :** « Experimental Evaluation of Pharmaceuticals Products Effect on Activated Sludge Activity, Case of Study : Amoxicillin », Communication **Orale**, Les 4^{em} **journées** du jeune chercheur, **2017**, Faculté de Génie des Procédés, Université Salah Boubnider, Constantine 3.
- **SAKHRAOUI Mahfoud., et al., :** « Développement d'un Respiromètre de Laboratoire », Communication **Poster**, Les 3^{em} **journées** du jeune chercheur, **2016**, Faculté de Génie des Procédés, Université Salah Boubnider, Constantine 3.
- **SAKHRAOUI Mahfoud., et al., :** « Study of the Effect of Different S_0/X_0 Ratio on the Determination of Constant of Transfer of Oxygen, the Endogenous, Exogenous and Total Oxygen Uptake Rate in a Respirometre With Continuous Aeration », Communication **Poster**, les 2^{em} **journées** du jeune chercheur, **2015**, Faculté de Génie des Procédés Pharmaceutiques, Université Salah Boubnider, Constantine 3.
- **SAKHRAOUI Mahfoud., et al., :** « Les Solvants », Communication **Poster**, 1^e **jour**née de l'hygiène et de la sécurité au sein des laboratoires, **2014**, Université Constantine 3, faculté de génie des procédés pharmaceutiques.
- **SAKHRAOUI Mahfoud., et al., :** « Les Produits Chimiques, Stockage et Gestion », Communication **Poster**, 1^e **jour**née de l'hygiène et de la sécurité au sein des laboratoires, **2014**, Faculté de Génie des Procédés Pharmaceutiques, Université Constantine 3.
- **SAKHRAOUI Mahfoud., et al., :** « Etude de la biodégradabilité des eaux usées contenant un ou plusieurs produits pharmaceutiques », Communication **Poster**, 1^e **jour**née du jeune chercheur, **2014**, Faculté de Génie des Procédés Pharmaceutiques, Université Constantine 3.

Publication dans des revues nationales :

- **SAKHRAOUI Mahfoud., et al.,** : « Experimental evaluation of Pharmaceutical products Effect on The bacterial activity, case of Amoxicillin ». Algerian Journal of Engineering Researches **AJER**; Constantine (2017).

Publication dans des revues internationales :

- **SAKHRAOUI Mahfoud., et al.,** : « Respirometric evaluation of S0/X0 ratio effect on the kinetic and stoichiometric parameters of activated sludge ». International Journal of Hydrogen Energy **IJHE**, (2017), <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijhydene.2017.01.097>.
- **SAKHRAOUI Mahfoud., et al.,** : « Effect of amoxicillin releases on the aerobic activity of heterotrophic biomass ». Journal of Desalination and Water Treatment **JDWT**, (2022), DOI: 10.5004/dwt.2022.29058.



Nom et Prénom : SAKHRAOUI Mahfoud
Titre : Etude de la Dégradation d'un Rejet d'Eau Usée Contenant un Produit de
l'Industrie Pharmaceutique
Thèse en Vue de l'Obtention du Diplôme de Doctorat Troisième Cycle en Génie de
l'Environnement.

RESUME

Le traitement des eaux est effectué dans des stations d'épuration conventionnelles, qui incluent une étape biologique à boues activées. Dans ce bioréacteur, les polluants sont oxydés ou biosorbés, avec une concentration spécifique de biomasse (*MES et MVS*), ainsi qu'une concentration suffisante en oxygène dissous. La présence de substances biologiquement résistantes dans les effluents, telles que les antibiotiques, est considérée comme des inhibiteurs potentiellement préjudiciables pour les systèmes de traitement biologique, car ils diminuent l'activité microbienne. Cependant, les bactéries peuvent développer une résistance aux antibiotiques et surmonter facilement la présence de ces composés.

Dans cette étude, nous avons utilisé un respiromètre aéré en modes *LSS et LFS*, pour évaluer l'effet de la présence d'antibiotiques, *AMX*, dans les effluents contenant la source de carbone et d'azote, ainsi que d'autres nutriments, en utilisant le rapport S_0/X_0 approprié. Cette évaluation a été réalisée en observant la réponse de la biomasse de différentes boues activées conventionnelles, préparées par la technique de lavage. Puis, des essais ont été réalisés avec un bioréacteur à membrane immergée ainsi que des essais d'adaptation pour évaluer l'efficacité de ces deux méthodes pour éliminer l'*AMX*.

Les résultats expérimentaux ont montré l'efficacité de la technique respirométrique pour évaluer l'effet d'*AMX* sur les bactéries épuratrices. De manière inattendue, malgré leur toxicité pour les bactéries, l'*AMX* a présenté un effet non prévu, et le taux d'inhibition s'est avéré indépendant des concentrations appliquées. En ce qui concerne les tests d'élimination et de biodégradation, l'*AMX* a été soit biodégradé soit biosorbé sur les floccs bactériens. Cependant, l'utilisation des bioréacteurs à membrane (*MBRI*) a démontré une efficacité très significative allant jusqu'à une élimination totale.

Mots clés : Traitement Biologique, Respirométrie, Bioréacteur à Membrane, Rejet Pharmaceutique, Amoxicilline.

Directrice de Thèse : Dr. Zamouche –Zerdazi Rania - Université Constantine 03

Année Universitaire : 2023-2024