
T H E S E

présentée à

L' UNIVERSITÉ DE NANCY I

U.E.R. ALIMENTATION ET NUTRITION

en vue d'obtenir le titre de

**DOCTEUR INGENIEUR EN NUTRITION
SCIENCES DE L'ALIMENTATION ET BIOCHIMIE APPLIQUÉE**

par

Michel FLORENTZ

Sujet :

**CONTRIBUTION A L'ELIMINATION
DU PHOSPHORE DES EAUX USEES
PAR VOIE BIOLOGIQUE**

Soutenue publiquement le 29 Octobre 1982 devant la Commission d'Examen

Membres du Jury

Président :	Monsieur J. M. FOLIGUET	Professeur à l'Université de Nancy
Juges :	Monsieur G. MARTIN	Professeur à l'Ecole Nationale Supérieure de Chimie de Rennes
	Monsieur M. METCHE	Professeur à l'Institut National Polytechnique de Lorraine
	Monsieur J. H. RENSINK	Professeur à l'Ecole Nationale d'Agriculture de Wageningen
	Monsieur P. SCHULHOF	Directeur du Service Equipement à la Compagnie Générale des Eaux
	Monsieur P. HARTEMANN	Chef de travaux à l'Université de Nancy
	Monsieur P. GILLES	Chef du Service Chimie - Biologie du Centre de Recherche OTV

L'ELIMINATION DU PHOSPHORE DES EAUX USEES PAR VOIE BIOLOGIQUE

RESUME

Des travaux considérables relatifs à l'élimination du phosphore des eaux usées ont été consacré au cours des dernières années, car si ce composé en lui-même n'est pas toxique, lorsqu'il s'accumule dans les eaux stagnantes, il est le principal responsable avec l'azote du phénomène d'eutrophisation.

A l'heure actuelle il existe différents procédés chimiques et physico-chimiques d'élimination du phosphore mais devant le coût relativement élevé de ces procédés, nous nous sommes plus particulièrement tournés sur les possibilités de son élimination par voie biologique, c'est-à-dire par les bactéries des boues activées des stations d'épuration.

Il ressort de l'étude effectuée sur pilote de laboratoire que l'une des conditions primordiales, pour obtenir une consommation biologique ("de luxe") de l'excès de phosphore, est que les micro-organismes soient soumis à un choc anaérobie. Au cours de la période d'anaérobiose les cellules de la boue relâchent le phosphore dans le milieu extérieur pour l'accumuler lors du passage dans la phase aérée ; soumis à ce régime cyclique les boues adaptées parviennent à piéger des quantités importantes de phosphore.

Plusieurs hypothèses relatives à ces conditions nécessaires sont avancées. La phase anaérobie permet la sélection d'espèces spécifiques par fermentation de la pollution carbonée en substrats facilement assimilables tel que l'acétate par exemple, et favorise ainsi la prolifération d'espèces telles que *Acinetobacter* dont le rôle primordial dans le procédé a été démontré. Elle modifie également profondément le métabolisme général de la boue comme l'indiquent les différentes analyses enzymatiques effectuées sur la biomasse du pilote. D'autre part l'utilisation de la microscopie électronique et de la résonance magnétique nucléaire ont permis de démontrer que le stockage du phosphore éliminé se produit à l'intérieur des micro-organismes épurateurs sous forme de Polyphosphates qui servent de réserve énergétique prête à être mobilisée dès que le besoin s'en fait sentir. La présence de nitrates est incompatible avec une surélimination du phosphore.

Enfin, étant donné l'actuelle concentration du phosphore à l'intérieur des boues (110 mg/g boues) il est intéressant de se tourner vers la valorisation de cette biomasse pour l'agriculture.

Mots-clés : Boues activées - Procédé biologique - Phosphore - Aérobiose Anaérobiose - Bactéries - *Acinetobacter* - Résonance Magnétique Nucléaire Microscopie électronique - Enzymes.

SOMMAIRE

	Pages
INTRODUCTION	1
CHAPITRE I : LE PROBLEME DU PHOSPHORE DANS LES EAUX USEES	
1. LES SOURCES DE PHOSPHORE	4
2. LES FORMES HABITUELLES DE REJET DU PHOSPHORE	5
3. LES METHODES D'ELIMINATION DU PHOSPHORE	6
4. ETUDE DES DIFFERENTS PROCEDES D'EPURATION BIOLOGIQUE DU PHOSPHORE	7
4.1 Théorie du "luxury uptake"	
4.2 Théorie de la précipitation chimique	
4.3 Etude des différents "process"	
5. BUT DU TRAVAIL	14
CHAPITRE II : ETUDE SUR PILOTE DE LABORATOIRE	
1. MATERIEL ET METHODES	15
1.1 Principe et fonctionnement de l'unité pilote	15
1.2 Analyses physico-chimiques	20
1.2.1 pH	
1.2.2 Matières en suspension	
1.2.3 Demande chimique en oxygène	
1.2.4 Demande biochimique en oxygène	
1.2.5 Dosage du carbone total	
1.2.6 Dosage de l'azote	
1.2.6.1 Dosage de l'azote ammoniacal	
1.2.6.2 Dosage de l'azote nitrique	
1.2.6.3 Dosage de l'azote total	

1.2.7	Dosage du phosphore	
1.2.7.1	Dosage des orthophosphates	
1.2.7.2	Dosage des polyphosphates	
1.2.7.3	Dosage du phosphore total	
1.3	Etude du phénomène de relargage du phosphore par une boue activée dans un système statique	22
1.4	Teneur en phosphore des boues	23
2.	RESULTATS ET DISCUSSION	23
2.1	Pilote en aération continue	23
2.2	Pilote avec alternance aérobie-anaérobie et alimentation discontinue	24
2.3	Estimation de la quantité de phosphore piégée	28
2.3.1	Calcul des flux de phosphore entrant et sortant du réacteur biologique	
2.3.2	Calcul des flux de phosphore entrant et sortant du décanteur secondaire	
2.3.3	Remarque	
2.4	Comparaison des rendements d'élimination du phosphore de 2 pilotes travaillant à une même charge constante, l'un placé en aération continue, l'autre subissant un cycle anaérobie-aérobie	37
2.5	Etude du phénomène de relargage en "batch"	41
2.6	Concentration en phosphore total des boues	41
3.	CONCLUSION	43

CHAPITRE III : ASPECTS MICROBIOLOGIQUES DE L'ELIMINATION DU PHOSPHORE

1.	INTRODUCTION	45
1.1	Rappels sur l'assimilation du phosphore	45

1.2	Rôle d' <i>Acinetobacter</i> dans l'assimilation du phosphore à l'intérieur d'une boue activée	47
1.3	Mouvements du phosphore à l'intérieur de la biomasse	48
1.4	Présentation du travail	49
2.	MATERIEL ET METHODES	50
2.1	Analyses bactériologiques	
2.1.1	Détermination qualitative des microorganismes des boues activées	
2.1.2	Numération quantitative en fermenteur	
2.2	Cultures en fermenteur	
2.2.1	En phase de croissance	
2.2.2	En phase stationnaire	
2.3	Résonance Magnétique Nucléaire (RMN) du phosphore 31 des boues activées	52
2.4	Localisation des granules de polyphosphates	54
2.4.1	Caractérisations cytologiques	
2.4.2	Microscopie électronique	
3.	RESULTATS ET DISCUSSION	55
3.1	Analyse bactériologique des boues du pilote	55
3.2	Mesure des possibilités d'assimilation du phosphore par les différents germes isolés	56
3.2.1	Mesures en phase de croissance dans l'eau d'alimentation du pilote	
3.2.2	Mesures en phase stationnaire avec alternance aérobie-anaérobie	
3.3	Résonance Magnétique Nucléaire (RMN) du phosphore 31 des boues activées	66
3.3.1	Spectre RMN ³¹ P d'une boue activée	
3.3.2	Evolution du spectre au cours d'une phase anaérobie de 4 jours	

3.3.3	Evolution du spectre au cours d'une phase aérée	
3.3.4	Influence de différents facteurs sur le déplacement du phosphore à l'intérieur de la boue	
3.3.4.1	Etude du phénomène de relargage en présence ou non de pollution carbonée	
3.3.4.2	Influence des nitrates en période anoxique en présence de pollution carbonée.	
3.3.4.3	Influence du 2-4 Dinitrophénol	
3.3.4.4	Influence du pH	
3.4	Visualisation des granules métachromatiques	77
3.4.1	Localisation cytologique	
3.4.2	Observations au microscope électronique	
3.4.2.1	Microscopie à balayage	
3.4.2.2	Microscopie en transmission	
4.	CONCLUSION	82
-		
CHAPITRE IV : ASPECTS BIOCHIMIQUES DE L'ELIMINATION DU PHOSPHORE		
1.	INTRODUCTION	83
1.1	Influence de l'Acétate	87
1.2	Influence de Glucose	87
1.3	Facteurs influençant l'assimilation du poly- β -Hydroxybutyrate	88
1.4	Rôle de l'ATP dans le métabolisme du phosphore	91
1.5	Présentation du travail	92
2.	MATERIEL ET METHODES	93
2.1	Dosage de l'ATP	93
2.2	Dosages enzymatiques	94

2.2.1	Méthode d'extraction des enzymes bactériennes	
2.2.2	Production des ultrasons	
2.2.3	Préparation de l'homogénat cellulaire	
2.2.4	Méthodes de dosage des activités enzymatiques	
2.2.5	Principe de calcul de l'activité enzymatique	
3.	RESULTATS ET DISCUSSION	98
3.1	Concentration en ATP à l'intérieur des boues activées	98
3.2	Activité enzymatique des boues activées	100
3.2.1	Influence du temps de sonification sur l'activité enzymatique	
3.2.2	Influence de la vitesse de centrifugation sur l'activité enzymatique	
3.2.3	Etude comparative des activités enzymatiques dans une boue de station urbaine et dans celle du pilote soumis à une alternance aérobiose-anaérobiose	
3.2.4	Etude des variations de l'activité enzymatique de la boue activée du pilote au cours d'une phase anaérobie	
4.	CONCLUSION	106
	CHAPITRE VI : CONCLUSION GENERALE ET DISCUSSION	107
	ANNEXE	112
	BIBLIOGRAPHIE	116

INTRODUCTION

La pollution des lacs et des cours d'eau à laquelle l'opinion est, à juste titre, sensibilisée, est due aux rejets d'eaux d'égouts ou d'effluents industriels, non ou insuffisamment traités. Les progrès de la technologie, la croissance de la population urbaine et l'utilisation immodérée d'engrais en agriculture sont les principaux facteurs de cette nuisance.

Cette pollution peut présenter deux aspects :

- ou bien elle est le fait du rejet de substances toxiques en concentration suffisante et la faune et la flore sont détruites, l'eau devient "abiotique" ;
- ou bien la pollution est le fait de résidus organiques et minéraux non toxiques qui jouent un rôle bénéfique au profit de certains organismes végétaux qui s'en nourrissent, les algues en particulier : c'est le phénomène d'eutrophisation.

L'eutrophisation est donc l'état défini par l'abondance excessive dans les eaux de surface d'éléments nutritifs qui provoquent une croissance exagérée des algues et des plantes aquatiques : ces végétaux prélèvent alors dans l'eau des quantités importantes d'oxygène, au détriment de la faune et spécialement des poissons qui régressent progressivement, puis disparaissent. Ce phénomène peut affecter la plupart des eaux de surface, courantes ou non, et en particulier les lacs et les réservoirs servant au stockage.

Outre la disparition des poissons, l'invasion des algues souvent gluantes et colorées s'accompagne parfois d'odeurs désagréables dues à leur putréfaction : lacs et rivières perdent alors l'attrait qu'ils exerçaient sur les habitants ou les touristes qui désertent leurs rives. Enfin, les qualités de l'eau sont modifiées par les processus biologiques ou physico-chimiques dont elle est le siège (mauvais goût, bactéries, sels métalliques solubilisés en milieu réducteur) et malgré les filtrations, sa valeur pour l'alimentation des agglomérations en est du même coup amoindrie.

L'eutrophisation a été particulièrement étudiée dans les pays à forte densité de lacs : Suisse, Etats-Unis, Suède, Italie, mais bien souvent après que les lacs ou étangs soient devenus eutrophes, ce qui compliquait énormément la solution du problème.

On a principalement attribué la responsabilité de l'eutrophisation aux éléments azote et phosphore. Le cycle du phosphore, figuré très schématiquement ci-dessous (Figure 1) montre comment le phosphore organique des rejets est réutilisé après hydrolyse et minéralisation pour reconstituer de la matière vivante.

Document Fédération Nationale de l'Industrie des Engrais

cycle du phosphore

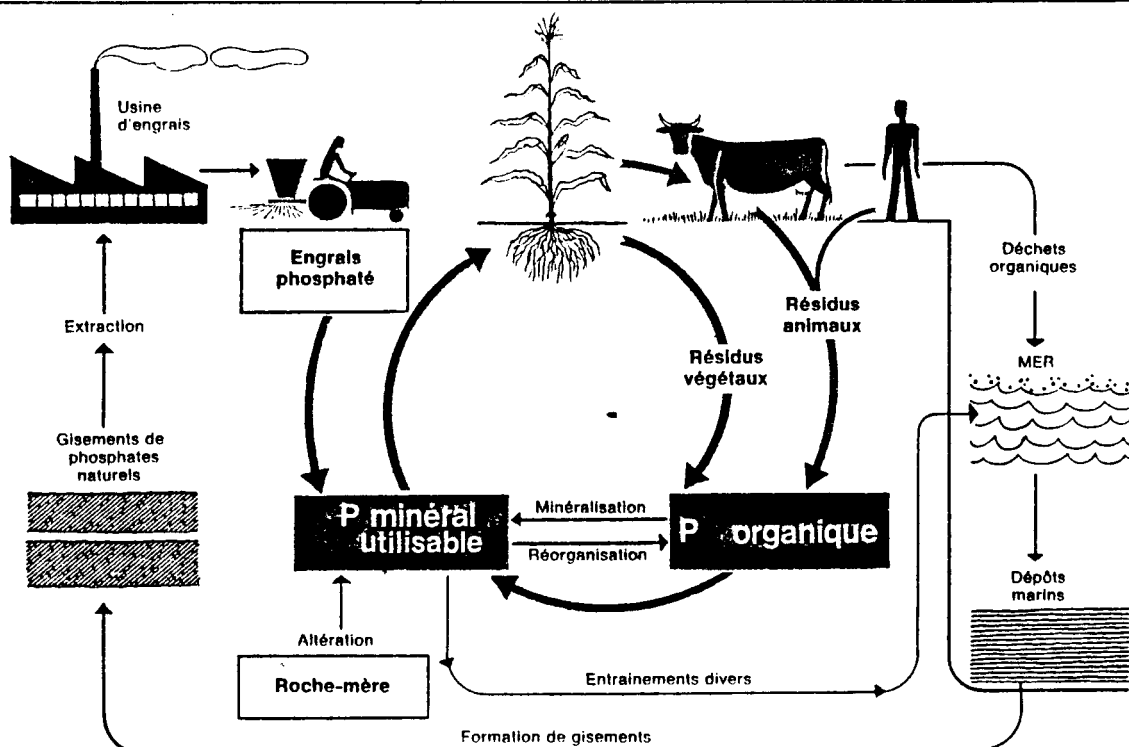


Fig. 1 - Cycle du phosphore

En ce qui concerne le Lac Léman, les experts considèrent qu'il y a début d'eutrophisation si la teneur des eaux, atteint ou dépasse 0,01 mg/l en phosphate inorganique et 0,3 mg/l en azote inorganique. Par contre, DRYNEN et STERN (1) considèrent que les teneurs en phosphore au-dessous de 0,5 mg/l en P permettent de contrôler la croissance des algues, et que les teneurs inférieures à 0,05 mg/l correspondent à un quasi-arrêt de la croissance.

Cependant, il est probable que dans le phénomène d'eutrophisation, d'autres substances telles que le potassium, le soufre ou les oligo-éléments, en provenance des sources les plus diverses de l'activité humaine, jouent un rôle, mais l'on est en droit de supposer que azote et phosphore constituent les facteurs essentiels, à côté desquels ces autres facteurs sont relégués à l'arrière plan.

Aussi, devant ce problème complexe d'eutrophisation, il devient de plus en plus urgent d'explorer les voies et moyens qui peuvent mettre fin à cette évolution car l'on peut redouter que toutes les eaux en soient affectées à brève échéance. C'est pourquoi les possibilités d'une élimination pratique des eaux résiduaires du phosphore et de l'azote, ont en effet été poussées assez loin au cours de ces dix dernières années.

Pour notre part, nous nous sommes tournés vers l'étude du phénomène d'élimination du phosphore par voie biologique, procédé encore peu étudié jusqu'à présent.

CONCLUSION GENERALE ET DISCUSSION

Cette étude concernant les possibilités d'assimilation biologique du phosphore par boues activées nous aura donc permis de mettre en évidence, sur pilote de laboratoire ou à l'aide de culture bactérienne, de nombreuses observations dont il convient maintenant de faire la synthèse.

Il apparaît clairement que l'élimination biologique du phosphore des eaux usées par un système de boues activées est possible sans aucun additif chimique ; pour cela une alternance anaérobiose - aérobiose de la biomasse est nécessaire. Les essais effectués sur pilote de laboratoire, dont le fonctionnement est basé sur le procédé PHOREDOX (14, 26) ont permis d'obtenir un taux d'élimination du phosphore pouvant atteindre 75 % avec un effluent synthétique contenant 57 mg/l de phosphore, ce qui correspond à 7 % de la DBO éliminée, soit 7 fois plus que la quantité nécessaire aux besoins nutritionnels des microorganismes épurateurs.

D'autre part, le stockage du phosphore, éliminé de l'eau, se fait à l'intérieur de la biomasse. Les résultats d'analyse concernant le phosphore total des boues (110 mg-P/g boues) indiquent des valeurs plus de 4 fois supérieures à celles d'une boue activée classique.

Enfin, les observations au microscope électronique et à l'aide de la Résonance Magnétique Nucléaire montrent clairement la présence de granules de polyphosphates à l'intérieur du cytoplasme bactérien et non l'accumulation de phosphore, par liaisons covalentes, le long de la membrane des microorganismes comme auraient pu le laisser supposer les teneurs considérables de phosphore éliminé.

En ce qui concerne le relargage du phosphore dans le milieu extérieur, nous avons remarqué, au contraire de DAVELAAR (30), une corrélation étroite entre la quantité de phosphore excrétée en période anaérobie et la quantité piégée en période d'aérobiose. Si la littérature depuis les travaux de LEVIN et coll. (12), BARNARD (14) et NICHOLLS (29) indique un taux important de phosphore dans le milieu extérieur lors du passage de la boue dans le compartiment non aéré, nous avons pu mettre en évidence, dans ce présent travail, que la présence de pollution carbonée était indispensable pour obtenir un relargage rapide dans le milieu (compatible avec les limites de temps de séjour dans le système).

Le choix d'un effluent synthétique pour alimenter notre pilote a été entrepris, afin de fixer un certain nombre de paramètres physico-chimiques et d'obtenir ainsi des conditions de fonctionnement très stables. Une biomasse spécifique s'est donc développée à l'intérieur du réacteur biologique, à partir de laquelle, dans une seconde partie de l'étude, nous avons pu étudier les mécanismes biochimiques fondamentaux engendrant les phénomènes de captation du phosphore.

Il a été confirmé, en utilisant le modèle de FUHS et CHEN (27), c'est-à-dire un système statique avec cycles anaérobie-aérobie que pour un germe aérobie strict comme *Acinetobacter Lwoffii*, la phase d'anaérobiose stoppe l'élimination des phosphates mais contrairement aux affirmations des auteurs, le relargage de phosphate dans le milieu extérieur est minime. De plus, par rapport à la culture témoin, la phase d'anaérobiose retarde simplement la consommation de phosphates. Sur une période aussi courte que celle de cette expérimentation (54 heures), la notion de stress inducteur préalable d'une surconsommation de phosphore est donc inexacte.

Les résultats concernant les possibilités d'accumulation de phosphore par chaque souche bactérienne soulèvent le problème du type de substrat d'alimentation utilisé et surtout mettent en garde sur le comportement d'un microorganisme placé en culture pure au laboratoire ; ce dernier est bien différent de celui qu'il peut présenter à l'intérieur de la biomasse d'une boue activée au milieu d'autres espèces.

Parmi les résultats biochimiques obtenus à partir de la boue activée du pilote, les différentes analyses enzymatiques effectuées font état de modifications importantes provoquées par l'alternance de phases sur le métabolisme des bactéries en comparaison à une boue aérée de façon continue. L'activité de certaines enzymes de la glycolyse aérobie, telle que la Fumase est 4 fois plus importante. Il apparaît également que l'ATP joue un rôle dans le stockage de phosphore mais comme l'écrit RENSINK (53) la concentration varie peu lors du passage d'un état aéré à un état non aéré.

Enfin, la Résonance magnétique nucléaire qui n'avait jamais encore été utilisée dans le domaine des boues activées, nous aura permis de localiser de façon précise les différentes formes de phosphore présentes à l'intérieur des cellules bactériennes de la biomasse et de suivre leurs évolutions au cours de l'alternance de phases. Il est clair que le déplacement se fait du stock de polyphosphates vers la forme orthophosphate en période non aérée, de façon très rapide en présence de pollution carbonée,

beaucoup plus lentement en son absence. Dès la réaération du milieu, le transfert se fait dans le sens opposé. Par ailleurs, cette technique confirme l'effet inhibiteur des nitrates sur le relargage du phosphore comme l'indique les travaux de BARNARD (26), SIMPKINS et coll. (31) et MARAIS ((32), (34)). A ce sujet, il est important de remarquer qu'ils ne perturbent en aucun cas le phénomène d'assimilation du phosphore par les bactéries mais par contre ils ont un rôle néfaste sur le procédé d'épuration en annulant l'effet "stress" sur lequel repose le procédé.

Cependant si les différents points précédemment cités ont été clairement démontrés au cours de ce présent travail, d'autres, par contre, méritent encore une étude plus approfondie.

- Le rôle exact de la zone anaérobie, dans ce process d'épuration du phosphore, est encore mal défini et plusieurs hypothèses peuvent être avancées. Outre une sélection bactérienne évidente, puisque certaines bactéries aérobies strictes qui ne peuvent supporter un état d'anaérobiose de quelques heures, sont irrémédiablement éliminées ; l'alternance de phases pourrait avoir un double rôle :
 - . une modification profonde du métabolisme des microorganismes de la biomasse comme l'indiquent nos résultats d'enzymologie.
 - . un déplacement de l'équilibre des populations bactériennes de la boue en faveur de celles dont les exigences nutritionnelles sont basées sur des substrats à courte chaîne carbonée, tel que Acinetobacter, par exemple.
- Si la majeure partie des travaux microbiologiques portant sur la biomasse de boues activées assimilant le phosphore par "luxury uptake", font état de la présence d'Acinetobacter en tant que germe dominant ; de nombreuses questions restent posées. Cette bactérie, qui ne peut métaboliser les sucres ou les polysaccharides lorsqu'elle se trouve placée dans un système classique en aération continue, est "défavorisée" par rapport aux

autres microorganismes présents. Elle ne peut donc devenir prépondérante à l'intérieur d'une telle biomasse et il est donc logique de penser que la phase d'anaérobiose permette à une microflore anaérobie facultative de se développer afin de produire certains substrats tel que acétate, éthanol ou succinate. Cependant, au cours de notre étude, en alimentant notre pilote durant une période de 4 semaines avec un effluent synthétique fermenté (donc renfermant des substrats à courte chaîne carbonée en concentration plus importante), nous n'avons pas constaté une augmentation sensible du nombre d'*Acinetobacter*, c'est donc que d'autres facteurs entrent en jeu. Par ailleurs, les travaux de FUHS (27) et SLADKA (51) confirment que cette bactérie croit préférentiellement dans un système à alternance de zone plutôt que dans un système classique dopé.

En fait, il est probable que d'autres germes soient également responsables de l'élimination pléthorique du phosphore par boue activée et il serait important de les identifier afin de permettre leur prolifération et leur maintien dans une installation d'épuration.

Enfin, si le phénomène biologique est évident, ceci n'exclut pas la possibilité d'une précipitation chimique parallèle pouvant arriver à la suite de changement chimique dans le milieu dû à l'action biologique tel que alcalinisation, acidification ou modification de la concentration en calcium. C'est pourquoi comme ARVIN (20), nous pensons que les controverses entre les deux types de mécanismes mis en jeu (chimique ou biologique) sont fondées. Nous pouvons raisonnablement supposer à cause des variations de pH pouvant se produire dans une eau usée que la "surélimination" résultant de la précipitation de composés organiques et l'accumulation intracellulaire sont quelquefois concomittant.

En conclusion générale de ce travail, l'examen des résultats obtenus à l'aide des différents pilotes permet de confirmer et d'approfondir les travaux de la littérature des principales équipes Sud-africaines ((14), (29), (32)) ou Néerlandaises ((30), (47)). Bien que les résultats biochimiques et microbiologiques soient encore rudimentaires, ils peuvent tout de même permettre une meilleure approche du phénomène. Etant donné, l'importance majeure du phosphore dans le phénomène d'eutrophisation des lacs et des cours d'eaux et en vue de la législation concernant les normes de rejet

de phosphore des stations d'épuration ($< 1 \text{ mg/l}$), il est souhaitable de continuer à effectuer des recherches dans ce domaine, à l'échelle de la station de traitement afin de pouvoir optimiser au maximum le phénomène ; l'objectif des futures recherches devant être une collaboration très intime entre les études fondamentales au laboratoire et la recherche appliquée sur le terrain. De plus, compte tenu de la teneur importante de phosphore piégée par les microorganismes des boues activées, il convient de se tourner vers la valorisation des boues produites en vue d'une utilisation en agriculture dans la mesure où elles remplissent toutes les garanties sanitaires ; des études sont actuellement menées dans ce but.