

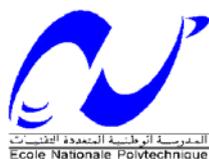
République Algérienne Démocratique et Populaire

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la recherche Scientifique

Ecole Nationale Polytechnique

Département de Génie de l'Environnement

Laboratoire de Biotechnologie Environnementale et Génie
des Procédés



Thèse de Doctorat en Génie de l'Environnement

Option : Biotechnologie et Environnement.

Présenté par : **BEN YUCEF Nabil**

Magister en Gestion et Protection de l'Environnement de l'ENP

Intitulé

Amélioration du procédé de dénitrification biologique par application d'ultrasons et usage d'un nouveau support.

Soutenu publiquement le 03/07/2018 devant le jury composé de:

Président:	GRIB Hocine	Professeur	ENP-Alger
Directeurs de Thèse:	ABDI Nadia	Professeur	ENP-Alger
	PAUSS André	Professeur	UTC-France
Examineurs:	BELLAL M. Mouloud	Professeur	ENSA-Alger
	BAKOUR Rabah	Professeur	USTHB-Alger
	CHIKHI Nassima	Maitre de conférences	ENSV-Alger
	DROUCHE Madani	Professeur	ENP-Alger

ENP 2018

Laboratoire de Biotechnologie Environnementale et Génie des Procédés-Ecole Nationale Polytechnique (ENP)

10, Avenue des Frères Oudek, Hassan Badi , BP.182, 16200 El Harrach, Alger, Algérie

www.enp.edu.dz

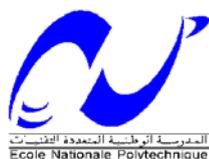
République Algérienne Démocratique et Populaire

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la recherche Scientifique

Ecole Nationale Polytechnique

Département de Génie de l'Environnement

Laboratoire de Biotechnologie Environnementale et Génie
des Procédés



Thèse de Doctorat en Génie de l'Environnement

Option : Biotechnologie et Environnement.

Présenté par : **BEN YUCEF Nabil**

Magister en Gestion et Protection de l'Environnement de l'ENP

Intitulé

Amélioration du procédé de dénitrification biologique par application d'ultrasons et usage d'un nouveau support.

Soutenu publiquement le 03/07/2018 devant le jury composé de:

Président:	GRIB Hocine	Professeur	ENP-Alger
Directeurs de Thèse:	ABDI Nadia	Professeur	ENP-Alger
	PAUSS André	Professeur	UTC-France
Examineurs:	BELLAL M. Mouloud	Professeur	ENSA-Alger
	BAKOUR Rabah	Professeur	USTHB-Alger
	CHIKHI Nassima	Maitre de conférences	ENSV-Alger
	DROUCHE Madani	Professeur	ENP-Alger

ENP 2018

Laboratoire de Biotechnologie Environnementale et Génie des Procédés-Ecole Nationale Polytechnique (ENP)

10, Avenue des Frères Oudek, Hassan Badi , BP.182, 16200 El Harrach, Alger, Algérie

www.enp.edu.dz

REMERCIEMENTS

Les recherches présentées dans cette thèse ont été réalisées au sein de l'unité de recherche TIMR (Transformation Intégrée de la Matière Renouvelable) de l'université de technologie de Compiègne-France ainsi qu'au laboratoire BIOGEP de l'Ecole Nationale Polytechnique (ENP) d'Alger.

Arrivant au terme de ce travail, je tiens à exprimer ma profonde reconnaissance à toutes les personnes qui m'ont apporté leur soutien durant ces quelques années de thèse.

Je remercie grandement le professeur André PAUSS, directeur du TIMR, qui m'a accueilli et dirigé au cours de ce travail. Ses qualités humaines et scientifiques son soutien et ses corrections, m'ont stimulé afin de suivre ce chemin dans la recherche scientifique.

Mes sincères remerciements à ma directrice de thèse professeur Nadia ABDI, qui m'a supporté tout au long de mes études universitaires de post-graduation. Ses nombreux conseils, sa continuelle présence et son implication dans le suivi et la correction de la présente thèse ainsi que la thèse de magister. Qu'elle trouve ici l'expression de ma profonde gratitude.

Je ne pourrais oublier notre référence professeur Nabil Mameri, avec qui j'ai passé des heures à discuter du projet, de notions académiques et d'autres sujets tout aussi pertinents pour mon développement personnel. Sa grande patience, son universelle disponibilité à répondre à mes mille et une questions quotidiennes ont profité à ce projet comme il ne peut l'imaginer. Ses encouragements, ses conseils judicieux et appropriés, son enthousiasme et son aide ne sont que quelques exemples me permettant de dire à quel point j'ai apprécié sa présence.

Mes remerciements vont également à Monsieur Olivier-Claude SARDE maitre de conférences à l'université de technologie de Compiègne pour son aide, ses conseils et sa présence qui a été hautement apprécié.

Je tiens à remercier également professeur Hocine GRIB d'avoir accepté de présider le jury de cette thèse et les professeurs Mohand Mouloud BELLAL (ENSA-Alger), Rabah BAKOUR (USTHB-Alger), Nassima CHIKHI (ENSV-Alger) et Madani

DROUICHE (ENP-Alger) pour l'intérêt qu'ils ont accordé à ce travail en acceptant d'en être les juges.

Pendant ces années de thèse, tous mes séjours à l'Ecole Polytechnique d'Alger et à l'Université de Technologie de Compiègne ont été des moments de réconfort et de revitalisation. J'ai eu beaucoup de plaisir à partager du temps agréable tant sur le plan travail que sur le plan social avec mes enseignants, mes amis et collègues malgré toutes les difficultés que nous avons rencontrées.

Je tiens plus particulièrement à remercier ma famille pour son support. Merci à mes parents qui ont fait de moi ce que je le suis aujourd'hui.

DEDICACES

Je dédie ce modeste travail en signe de respect et de reconnaissance :

- A mes chers parents.
- A mes frères et sœurs.
- A mes neveux et nièces.
- A toute la famille BENYOUCEF.
- A tous mes amis.
- A tous ceux qui me reviennent chère.

الملخص:

لتحسين قدرة محطات تصفية المياه المستعملة من أجل حماية أفضل للموارد المائية، يجب تطوير و بصفة مستمرة طرق المعالجة المتبعة لإيجاد حل لمشكلة الزائد العضوي لبعض المحطات و كذا تحسين طرق معالجة الملوثات الأزوتية و الفوسفاتية. تعد الطرق الفيزيائية الغير ملوثة وسيلة لتحفيز الكائنات الحية الدقيقة المفككة للملوثات. إن حركية نزع النترات في الشروط المثالية تحت تأثير الحقل المغناطيسي و كذا الامواج فوق الصوتية تم مقارنتها بشاهد لتبين اثر هذه العوامل الفيزيائية على مردود نزع النترات.

و قد اثبتت النتائج ان الحقل المغناطيسي و كذا الامواج فوق الصوتية مكنت من رفع سرعة تفكيك النترات ب 6,8 و 3,4 مرة على التوالي مقارنة بالشاهد مع احداث تغيرات عميقة في تشكيلة الكائنات الدقيقة المختصة في تفكيك النترات الى غاز النيتروجين. وقد تبين ايضا من خلال هذه الدراسة ان حبيبات الاجر يمكن استعمالها في ميدان معالجة المياه كأساس لتثبيت البكتيريا و ذلك لتشابه خصائصها الفيزيائية الكيميائية مع الاسس المستعملة في محطات تصفية المياه و كذا لوفرتها و ثمنها المنخفض

الكلمات المفتاحية:الموجات فوق الصوتية؛الحقل المغناطيسي نزع النترات؛التصفية البيولوجية؛المياه المستعملة.

Abstract

In order to improve the capacities of wastewater treatment plant for the water resource protection, the performance of adopted processes must also be improved in a continuous way to solve the problems related to the organic overcharge of some wastewater plant, and to improve nitrogen and phosphorus treatment. The use of new technics combined to a low cost and available biofilter media can be considered as new technology for enhancing bioprocesses.

The aims of this work were to study the effect of ultrasound and magnetic field on the performance of biological denitrification in batch and continuous mode with brick's granules as biofilter media in order to value the possibilities of their integration in wastewater treatment plant.

Denitrification kinetic's at various operational conditions having been compared to a control in term of performance, in order to establish the Improvements that can induce magnetic field and ultrasound in denitrifying activated sludge. The comparison of the brick's granules performance and the result obtained with biolite media indicate that similar abatements were achieved.

Results showed that at optimal conditions, magnetic field and ultrasound enhance the specific denitrification rate by about 6.8 and 3.4 times compared to the control, respectively. Biofiltration rate assisted with 20 mT magnetic field have been also improved compared to the control, with non reversed effect.

The comparison between brick's granules and biolite showed that the new support is of height capacity in biofiltration, to which a particular attention must be granted.

Key words: Ultrasound; Magnetic field; Denitrification; Biofiltration; activated sludge

Résumé

Afin d'améliorer les capacités épuratoires des stations de traitement des eaux pour une meilleure protection des ressources hydriques, les performances épuratoires des procédés adoptés doivent être également améliorées de façon continue pour résoudre les problèmes liés à la surcharge organique de certaines stations, et d'améliorer plus généralement les performances épuratoires vis-à-vis de la pollution azotée et phosphorée. L'utilisation de moyens physiques non polluants peut être envisagée en utilisant des procédés classiques avec des microorganismes fixés sur des supports à moindre coût avec couplage soit à un champ magnétique, soit des ondes ultrason

Des cinétiques de dénitrification à différentes conditions opératoires ont été comparées à un contrôle en terme de performance, afin d'établir les améliorations que peuvent apporter les ondes ultrasons et le champ magnétique sur les populations bactériennes d'une boue activée dénitrifiante, ainsi que la comparaison des capacités épuratoires des granulés de brique en biofiltration par rapport à la biolite: un support potentiellement utilisé à l'échelle industrielle.

Dans les conditions optimales d'utilisation, les résultats ont montré une amélioration de la vitesse spécifique de dénitrification de 3,4 fois et 6,8 fois avec les ondes ultrasons et le champ magnétique, respectivement. Les modifications induites sont profondes et irréversibles avec une sélection au profit des germes les plus dénitrifiants. La configuration biofiltration sur support granulaire plus un champ magnétique statique de 20mT a permis d'améliorer de 4 fois les capacités épuratoires des biofiltres comparativement au contrôle. De plus, cette amélioration reste irréversible en absence du champ magnétique, et même en présence de biomasse n'ayant pas subi un traitement magnétique. L'efficacité du biofiltre demeure inchangée avec des rendements épuratoires de 96%.

La comparaison des granulés de brique à la biolite a montré que le nouveau support choisi dispose d'une grande capacité épuratoire lors de la biofiltration. Il est important de signaler que les caractéristiques physico-chimiques des granulés de brique sont similaires à ceux de la biolite et que ce déchet est disponible localement à faible prix de revient.

Mots clés: Ondes ultrasons; Champ magnétique; Dénitrification; Biofiltration, Boue activée.

SOMMAIRE

Liste des figures

Liste des tableaux

Liste des abréviations

Introduction	1
I. Synthèse bibliographique	4
I. 1. La biofiltration des eaux	4
I.1.1. Historique et développement de la biofiltration	4
I.1.2. Principe de la biofiltration	4
I.1.3. Organisation d'une unité de biofiltration	7
I.1.4. Paramètres de dimensionnement d'un biofiltre	9
I.1.4.1. La charge volumique appliquée	9
I.1.4.2. La charge hydraulique	10
I.1.5. Les biofiltres de traitement de la pollution azotée	11
I.1.5.1. Le traitement d'azote par nitrification-dénitrification simultanées	11
I.1.5.2. Ecologie des communautés microbiennes dénitrifiantes des eaux usées	11
I.1.5.3. Biologie moléculaire de la dénitrification	12
I.1.5.4. Facteurs contrôlant la structure des communautés microbiennes dénitrifiantes	14
I.1.5.4 Evaluation technico-économique de la dénitrification des eaux	15
I.2. La biostimulation électromagnétique des cultures vivantes	17
I.2.1. Introduction	17
I.2.2. Effet du champ magnétique modéré sur les cultures cellulaire	18
I.2.2.1. Effet sur la croissance et la viabilité	18
I.2.2.2. Effet sur la morphologie des cellules	19
I.2.2.3. Effet sur l'activité enzymatique	20
I.2.2.4. Effet du champ magnétique sur l'expression des gènes	22
I. 2.2.5. Effet du champ magnétique sur la biosynthèse des molécules	22
I. 2.2.6. Effet du champ magnétique sur les membranes et les canaux	23
I. 3. La biostimulation ultrasonique des cultures vivantes	25
I.3.1. Introduction	25

I.3.2.Applications de la cavitation en traitement des eaux	25
I.3.2.1.Amélioration de la biodégradabilité des polluants	28
I.3.2.2.Amélioration de la digestion anaérobie	28
I.3.2.3.Amélioration du procédé à boues activées	29
I.3.2.4.Effet sur la lyse de la biomasse	30
II. Matériel et méthodes	33
II.1. Méthodologie expérimentale	33
II.1.1. Introduction	33
II.1.2. Influence du champ magnétique sur la dénitrification en mode batch	33
II.1.3. Influence du champ magnétique sur la dénitrification en mode continu	35
II.1.4. Influence des ultrasons sur la dénitrification en mode batch	36
II.2. Réacteurs et instrumentation.....	37
II.2.1. Influence du champ magnétique sur la dénitrification en mode batch	37
II.2.2. Influence du champ magnétique sur la dénitrification en mode continu	38
II.2.3. Caractérisation du champ magnétique	41
II.2.4.Influence des ultrasons à faible fréquence sur la dénitrification en mode batch ..	43
II.3.Matériel biologique	45
II.3.1.Origine et préparation des boues activées.....	45
II.3.2.Acclimatation des boues activées.....	45
II.3.3.Conservation des boues activées.....	46
II.3.4.Détermination de la relation matière sèche (MS) en fonction de la DO	47
II.4.Méthodes d'analyses	48
II.4.1.Dosage des espèces chimiques	48
II.4.2.Extraction d'ADN et analyse phylogénique des populations	48
II.4.3.Observations microscopiques.....	48
II.4.4. Traitement des résultats	48
III. Résultats et discussions	49

III.1. Effet du champ magnétique sur la dénitrification en mode batch	49
III.1.1. Effet de l'induction magnétique	49
III.1.2 Effet de la variation du volume de la réaction sur la cinétique de dénitrification en présence d'un champ magnétique	51
III.1.3.Effet de la concentration initiale en biomasse	53
III.1.4.Effet de la concentration initiale en nitrates	54
III.2.Effet d'une exposition multiple au champ électromagnétique sur la dénitrification biologique en mode batch	55
III.2.1. Première phase: Exposition au champ magnétique	55
III.2.2.Deuxième phase: Arrêt de l'exposition au champ magnétique.....	59
III.2.3.Troisième phase: réexposition de la boue au champ magnétique	61
III.2.4 Observations microscopiques des boues	68
III.2.5. Effet du champ magnétique sur la composition microbiologique de la boue activée.....	71
III.3. Amélioration de la dénitrification biologique sur nouveau support avec application du champ magnétique.	75
III.3.1. Caractérisation physico-chimique du matériau filtrant.....	75
III.3.1.1. La résistance à l'attrition	75
III.3.1.2. Distribution de la taille des pores	77
III.3.2. Dénitrification par biomasse fixée sur support céramique	79
III.3.2.1 Cinétique de dénitrification sur colonne remplie de Biolite® en présence d'un champ magnétique.....	79
III.3.2.1.1. Effet du champ magnétique sur la vitesse et le rendement de dénitrification.	79
III.3.2.1.2. Influence du champ électromagnétique sur la formation des nitrites.....	82
III.3.2. Cinétique de dénitrification sur colonne remplie de granulés de brique	84
III.3.2.1. Effet du champ magnétique sur la vitesse et le rendement de dénitrification. .	84
III.3.2.2. Influence du champ électromagnétique sur la formation des nitrites.....	87
III.3.2.3. Comparaison entre les supports de dénitrification	88

III.3.3. Durabilité de l'effet magnétique et ajout de biomasse non magnétisée.....	89
III.3.3.1. Cas de la biolite®	90
III.3.3.2. Cas de la brique	90
II.3.4. Observation microscopique des supports et caractérisation du biofilm	94
III.4. Evaluation de l'effet des ultrasons faibles fréquences sur la dénitrification biologique.....	97
III.4.1. Effet de l'intensité des ultrasons	97
III.4.2. Effet du cycle de traitement	100
III.4.3. Effet du pH initial sur les performances de la dénitrification en présence d'ondes ultrasons	103
IV. Conclusion générale	105
Perspectives	107
Références bibliographiques	108

LISTE DES FIGURES

Figure I.1 : Représentation schématique des techniques d'immobilisation pour le traitement des fluides d'après **Cohen et al. (2001)**.

Figure I.2 : Processus fondamentaux appliqués dans les biofiltres

Figure I.3 : Principe d'un biofiltre à courant ascendant et descendant en cycle de filtration (**Vigne, 2007**).

Figure I.4: Répartition phylogénique des bactéries dénitrifiantes des eaux usées (**DeSantis et al., 2006; Letunic et Bork, 2011**).

Figure I.5 : Schéma de la dénitrification complète chez *Paracoccus denitrificans* (**Bothe et al., 2000**).

Figure I.6: Modalités de stimulations électromagnétiques à partir des champs et des ondes d'après **Hunt et al. (2009)**.

Figure I.7: Distribution des effets du champ magnétique rapportés par la littérature sur la croissance cellulaire d'après **Albuquerque et al. (2016)**.

Figure I.8: Génération, croissance et éclatement de bulles résultante du phénomène de cavitation (**Mason et Lorimer, 2002**).

Figure I.9: Système à sonde immergée (**Chand, 2008**)

Figure II.1 : Photo accompagnée d'un schéma du montage expérimental de l'essai d'amélioration de la dénitrification biologique par usage de champ magnétique en mode batch.

Figure II.2 : photo accompagnée d'un schéma du dispositif expérimental des essais d'amélioration de la dénitrification biologique en mode continu.

Figure II.3: Résultats Scilab (représentation 3D vue de dessus).

Figure II.4: Résultat Scilab des données du solénoïde extrapolées grâce à la fonction spline. (Représentation 3D vu de dessus).

Figure II.5 : Dispositif expérimental des essais d'amélioration de la dénitrification biologique par usage d'ultrasons à faible fréquence.

Figure II.6: Courbes étalons $MS = f(DO)$ pour les deux boues utilisées dans la présente étude: (a)-Boue de la SIAAP de Paris; (b)-Boue de SEAAL d'Alger.

Figure III.1 : Cinétiques de dénitrification sous différentes inductions magnétiques.

Figure III.2: Effet de l'induction électromagnétique sur la vitesse de dénitrification.

Figure III.3: Cinétiques de dénitrification à différents volumes de réaction

Figure III.4 : Effet de la variation du volume de la réaction sur la cinétique de dénitrification en présence d'un champ magnétique.

Figure III.5: Effet de la variation de la concentration initiale en biomasse sur la vitesse de dénitrification en mode batch assistée d'un champ magnétique de 20mT.

Figure III.6: Effet de la concentration initiale en nitrates sur la vitesse de dénitrification biologique en présence d'un champ magnétique de 20mT.

Figure III.7: Exposition continue au champ magnétique de 20mT d'une boue dénitrifiante. (A)- cinétique de disparition des nitrates; (B)- Cinétique d'apparition et de disparition des nitrites ; (C)- Evolution de la vitesse spécifique de dénitrification et (D)- Cinétique de consommation du substrat carbonée exprimée en DCO.

Figure III.8: Comportement de la boue préalablement magnétisée en absence du champ magnétique : (A)- cinétique de disparition des nitrates; (B)- Cinétique d'apparition et de disparition des nitrites ; (C)- Evolution de la vitesse spécifique de dénitrification et (D)- Cinétique de consommation du substrat carbonée exprimée en DCO.

Figure III.9:Réexposition de la boue à un champ magnétique de 20mT: (A)- cinétique de disparition des nitrates; (B)- Cinétique d'apparition et de disparition des nitrites ; (C)- Evolution de la vitesse spécifique de dénitrification et (D)- Cinétique de consommation du substrat carbonée exprimée en DCO.

Figure III.10: Photos au microscope électronique environnemental à balayage des boues à la fin de chaque phase de traitement magnétique.

Figure III.11: Affiliation taxonomique et abondance relative des groupes bactériens de la boue activée dénitrifiante. Phylums(A), Classes(B), Ordre(C) Familles(D), Genres(E).

Figure III.12: Résistance à l'attrition des deux supports de biofiltration à un débit de $3\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$.

Figure III.13: Distribution de la taille des pores (Biolite® & Brique).

Figure III.14: Performances épuratoires d'un biofiltre garni de biolite® avec et sans champ magnétique.

Figure III.15: Effet du champ magnétique sur la production de nitrites d'un biofiltre de dénitrification garni de Biolite®.

Figure III.16: Performances épuratoires d'un biofiltre garni de granulés de brique avec et sans champ magnétique.

Figure III.17: Effet du champ magnétique sur la production de nitrites du biofiltre de dénitrification garni de granulés de brique.

Figure III.18: Durabilité de l'effet magnétique et influence de la contamination par une boue native sur les performances de la dénitrification par biofiltre garni de biolite®.

Figure III.19: Durabilité de l'effet magnétique et influence de la contamination par une boue native sur les performances de la dénitrification par biofiltre garni de granulés de brique.

Figure III.20: Photographie au microscope électronique à balayage environnemental du biofiltre remplie de Biolite (A)-Support vierge, (B)-Support colonisé en absence du champ magnétique, C- Support colonisé en présence du champ magnétique).

Figure III.21 : Photographie au microscope électronique à balayage environnemental du biofiltre remplie de granulés de brique (A)-Support vierge, (B)-Support colonisé en absence du champ magnétique, (C)- Support colonisé en présence du champ magnétique).

Figure III.22: Effet de l'intensité ultrasonique sur les performances de la dénitrification biologique (intensité de 60W, fréquence de 20 KHz, pH= 6,7 et une concentration initiale de $20\text{mg NO}_3^- \cdot \text{N}\cdot\text{L}^{-1}$. a. concentration en nitrates versus temps.

Figure III.23: Effet du cycle de traitement ultrasonique sur les performances de la dénitrification biologique (intensité de 60W, fréquence de 20 KHz, pH= 6,7 et une

concentration initiale de $20\text{mg NO}_3^- \cdot \text{N} \cdot \text{L}^{-1}$. a. concentration en nitrates versus temps, b. vitesse de dénitrification versus cycle de traitement, c. concentration en nitrites versus temps.

Figure III.24: Effet du pH initiale du milieu sur les performances de la dénitrification sous une agitation ultrason d'une fréquence de 20 KHz; intensité d'ultrason= 60W ; concentration initiale en $\text{N-NO}_3^- = 20 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$.

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I.1: Estimation du prix de revient de la dénitrification utilisant différentes sources de carbone d'après **Wang et Chu (2016)**.

Tableau I.2: Synthèse des principaux effets du champ magnétique sur l'activité enzymatique.

Tableau I.3: Résumé des effets majeurs que peut causer un champ magnétique sur les cultures cellulaires d'après **Dini et Abbro (2005)**.

Tableau III.1: Comparaison de l'amélioration des performances des bioréactions par effet du champ magnétique

Tableau III.2: Répartition des UTOs ayant une abondance relative supérieure à 1%.

Tableau III.3: Principaux paramètres mesurés d'une porosimétrie à mercure des supports de biofiltration (Biolite® et Brique).

LISTE DES ABREVIATIONS

NT: Azote Total	ADP: Adénosine Di-Phosphate
NTK: Azote Total Kjeldhal	ATP: Adénosine Triphosphate
ONS: Office National des statistiques	BET: Brunauer, Emmett et Teller (Théorie qui a pour but d'expliquer l'adsorption physique des molécules de gaz sur une surface solide)
PHB: Polyhydroxybuturate	
PT: Phosphore Total	
SBR: Sequencing Batch Reactor	C_H : Charge hydraulique
SEAAL: Société des Eaux et de l'Assainissement d'Alger	COT: Carbone Organique Total
SIAAP: Syndicat Interdépartemental de l'assainissement des Agglomérations de la région Parisienne	C_v : Charge volumique
SOD: Super Oxyde Dismutase	DBO₅ : Demande Biologique en Oxygène à 5 jours
SP: Sonicated Proportion	DC: Direct current
ST: Solides Totaux	DCO: Demande Chimique en Oxygène
T: Tesla	DO: Densité Optique
TCE: Trichloréthylène	EE: Energy Efficiency
TRH: Temps de Rétention Hydraulique	EPS: Exopolysacharides
UTO: Unités Taxonomiques Opérationnelles	MBR: Membrane bioreactor
VSS: Volatile Suspended Solid	MES: Matières En Suspension
W: Watts	MS: matière sèche
	mT: milli Tesla
	MVS: Matière Volatile Solide

Introduction générale

Introduction

L'Algérie accuse un important déficit en matière de ressources hydriques ces dernières années surtout avec l'expansion des villes, l'industrialisation et l'évolution des modes de consommation, en sus d'un climat de plus en plus aride que connaît le pays. La question de pollution des eaux par les activités domestiques et industrielles est l'une des causes majeures de l'épuisement rapide de ces réserves hydriques. La préservation de cette ressource précieuse et stratégique nécessite l'emploi de procédés permettant ainsi de traiter efficacement plus 600 millions de mètres cubes d'eaux usées collectés chaque année, dont 550 millions de mètres cubes pour les seules agglomérations du nord. Ce chiffre devrait passer à près de 1150 millions de m³ à l'horizon 2020 (**OMS, 2006**).

Face à cette pénurie d'eau, et dans un souci de préservation des ressources hydriques, de la protection de l'environnement et de la santé publique, un programme d'épuration par la mise en service de différents procédés doit être adopté dans les stations de traitement des eaux implantées à travers le territoire national.

Traditionnellement, un système à culture libre ou un système à culture fixée est choisi pour le traitement biologique des eaux usées avec chacun leurs avantages et inconvénients. Le traitement des eaux résiduaires urbaines est réalisé dans la plupart des cas par un système biologique à culture libre dit système à boues activées. La gestion du procédé est relativement simple, et les coûts d'installation et d'opération sont considérés comme satisfaisants. Cependant, la qualité des eaux produites et la stabilité du système sont très dépendantes des variations de débit et de composition de l'effluent à traiter. Le procédé à culture fixée est considéré comme plus simple à l'usage et donne un traitement plus stable.

Les procédés biologiques utilisés dans la dépollution réalisée par les microorganismes fixés sur matériau granulaire, encore appelés biofiltration sont d'usage très restreint dans les stations d'épuration au niveau local malgré leurs utilisations et les résultats probants obtenus à l'échelle mondiale. C'est la raison pour laquelle nous avons axé notre travail sur la recherche d'un support local de faible prix de revient et de disponibilité importante qui peut concurrencer les supports industriels, ainsi que la recherche des moyens permettant d'améliorer les performances de l'épuration de la biomasse filtrantes afin de développer ce type de procédé.

La biofiltration est une technologie combinant les processus d'épurations physiques et biologiques par l'utilisation d'un matériau filtrant immergé sur lequel se fixent les populations bactériennes qui participent à la dégradation de la pollution. Dans les biofiltres, le matériau support assure à la fois un piégeage des particules en suspension non captées lors des traitements amont, et la rétention des populations bactériennes assurant la dégradation de la pollution des eaux.

L'augmentation de la demande pour le traitement de la pollution azotée et phosphorée, ainsi que les risques que peut causer la pollution des eaux par les nitrates et les phosphates sur la santé humaine et environnementale (phénomène d'eutrophisation, la méthémoglobinémie) ainsi que le manque d'espace pour le développement des stations d'épurations existantes, sont les éléments ayant encouragé l'application ces nouvelles techniques de traitement des eaux usées urbaines.

Les objectifs de ce travail de thèse sont de valoriser un sous-produit de la fabrication des briques à usage de construction bâtiment, qui est une activité qui génère des rebuts de caractéristiques physico-chimiques stables, afin de lui permettre d'être un concurrent des supports industriels utilisés en biofiltration, et d'utiliser le champ électromagnétique et les ondes ultrasons comme moyen pour améliorer efficacement les performances épuratoires de la biomasse filtrante. En effet ces traitements physiques non polluants peuvent stimuler l'activité des microorganismes épurateurs s'ils sont appliqués d'une façon adéquate.

Les résultats attendus de ce travail permettront de valoriser l'utilisation des déchets de la fabrication de la brique à usage de construction bâtiment comme support de biofiltration et aussi mettre à la disposition des stations d'épuration un support de disponibilité locale et un faible prix de revient. De même l'emploi de ces techniques permettant d'améliorer les performances de ce type de procédé permet sans doute une meilleure gestion de la pollution des eaux et par conséquent une meilleure protection des ressources hydriques.

L'amélioration des procédés biologiques de traitement des eaux usées par l'application de nouvelles technologies constitue une solution attrayante et innovante afin d'améliorer la productivité et les performances des stations existantes. L'avantage principal de ces procédés est de permettre des traitements plus efficaces sans nécessiter d'augmenter le volume des installations.

L'ensemble de nos travaux de recherche sont résumés en trois parties :

- La synthèse bibliographique fait le point sur les connaissances actuelles du procédé de traitement des eaux par biofiltration, de l'effet du champ magnétique et des ondes ultrasons sur les systèmes biologiques;
- La deuxième partie présente les montages et les appareillages spécifiques utilisés lors des expérimentations et notamment la configuration des réacteurs utilisés ;
- La dernière partie présente les résultats expérimentaux obtenus aussi bien sur les améliorations que peut apporter un traitement au champ magnétique, que ceux obtenus aux ultrasons sur les performances du procédé de dénitrification biologique. De même, les potentialités des granulés de brique comme support de biofiltration et sa comparaison à un support industriel potentiellement utilisé à l'échelle industrielle sont présentées.

Synthèse bibliographique

I.1 La biofiltration des eaux

I.1.1. Historique et développement de la biofiltration

Les systèmes biologiques immergés en culture fixée, inspirés des filtres de production d'eau appelés « Biofiltres » constituent une alternative aux systèmes des traitements biologiques par biomasse libre. En effet, la simplicité de l'exploitation et la bonne qualité des rejets atteinte sont les principales raisons de l'adoption de ce type de procédé dans les stations de traitement des eaux usées domestiques et industrielles en milieu urbain (**Zidane et al., 2006**). Cependant, il y a encore quelques réserves vis-à-vis de la biofiltration, ceci est particulièrement dû aux difficultés de modéliser le procédé biologique impliqué, en raison de l'hétérogénéité des types de garnissage, de la complexité des phénomènes physiques, chimiques et microbiologiques impliqués ainsi que les interactions susceptibles d'y exister (**Agarwal et Ghoshal, 2008**).

La biofiltration initialement réservée à l'enlèvement du carbone est aujourd'hui également adaptée au traitement de la pollution azotée . En effet de nombreux biofiltres de nitrification et de dénitrification ont été mis en fonctionnement dans les stations d'épurations implantées à travers le monde (**Barjenbruch, 2007**).

L'immobilisation des micro-organismes sur un lit filtrant peut être divisée en deux types de procédés :

- Autoattachement des micro-organismes à leurs matériaux support, défini comme étant « Autocolonisation »
- Immobilisation artificielle des micro-organismes : l'attachement des micro-organismes aux matériaux filtrants se fait par le biais de techniques artificielles. Il existe plusieurs méthodes d'immobilisations, dont les principales sont illustrées dans la figure I.1.

I.1.2. Principe de la biofiltration :

Apparus il y a environ 30 ans à l'échelle industrielle, les biofiltres sont des systèmes biologiques immergés à cultures fixées comprenant trois phases (gazeuse - liquide - solide) dans lesquelles se produisent simultanément deux processus fondamentaux physique et biologique (Figure I.2). Ils permettent ainsi, tout comme le réacteur

biologique du procédé boues activées, une dégradation biologique de la pollution carbonée et/ou azotée. (Rocher et al., 2015).

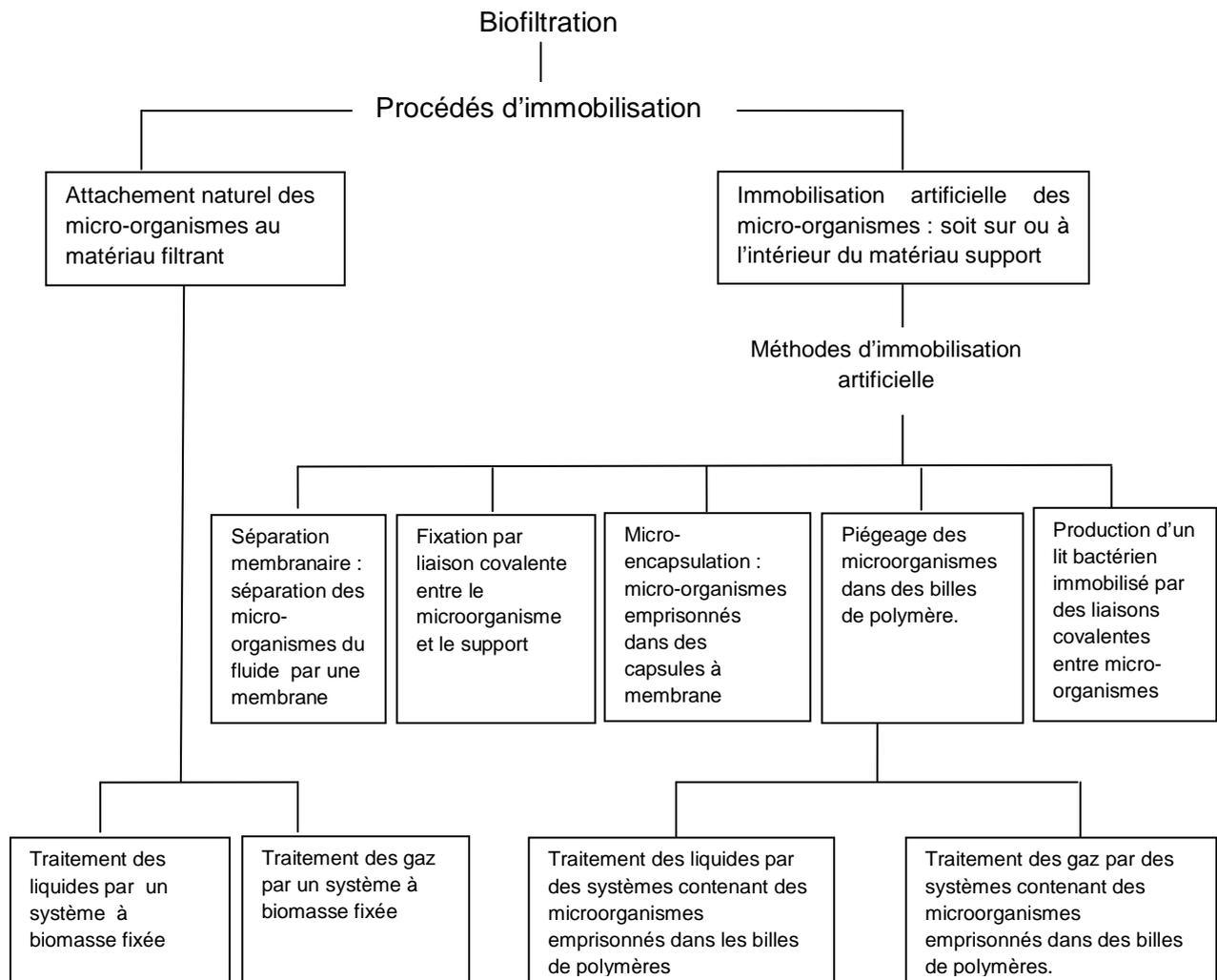


Figure I.1 : Représentation schématique des techniques d'immobilisation pour le traitement des fluides d'après **Cohen et al. (2001)**.

L'originalité concerne la réalisation dans le même réacteur, d'une filtration physique des MES de l'effluent à traiter; alors que dans un procédé boues activées cette opération est réalisée dans un ouvrage séparé. Les flux d'eau d'alimentation peuvent être ascendants et/ou descendants.

Les processus de colonisation entraînent la formation du biofilm autour de la phase solide, l'apport de nutriment pour pouvoir atteindre une concentration de biomasse suffisante est nécessaire. Une fois la colonisation achevée, la croissance des

bactéries devient similaire à celui d'une suspension dans l'eau comme dans le cas d'une boue activée. En effet les populations bactériennes peuvent subir un lessivage lors d'une charge hydraulique importante, tandis que, celles accrochés dans la porosité du biofiltre et/ ou dans les couches du biofilm supportent davantage les charges hydrauliques brutales.

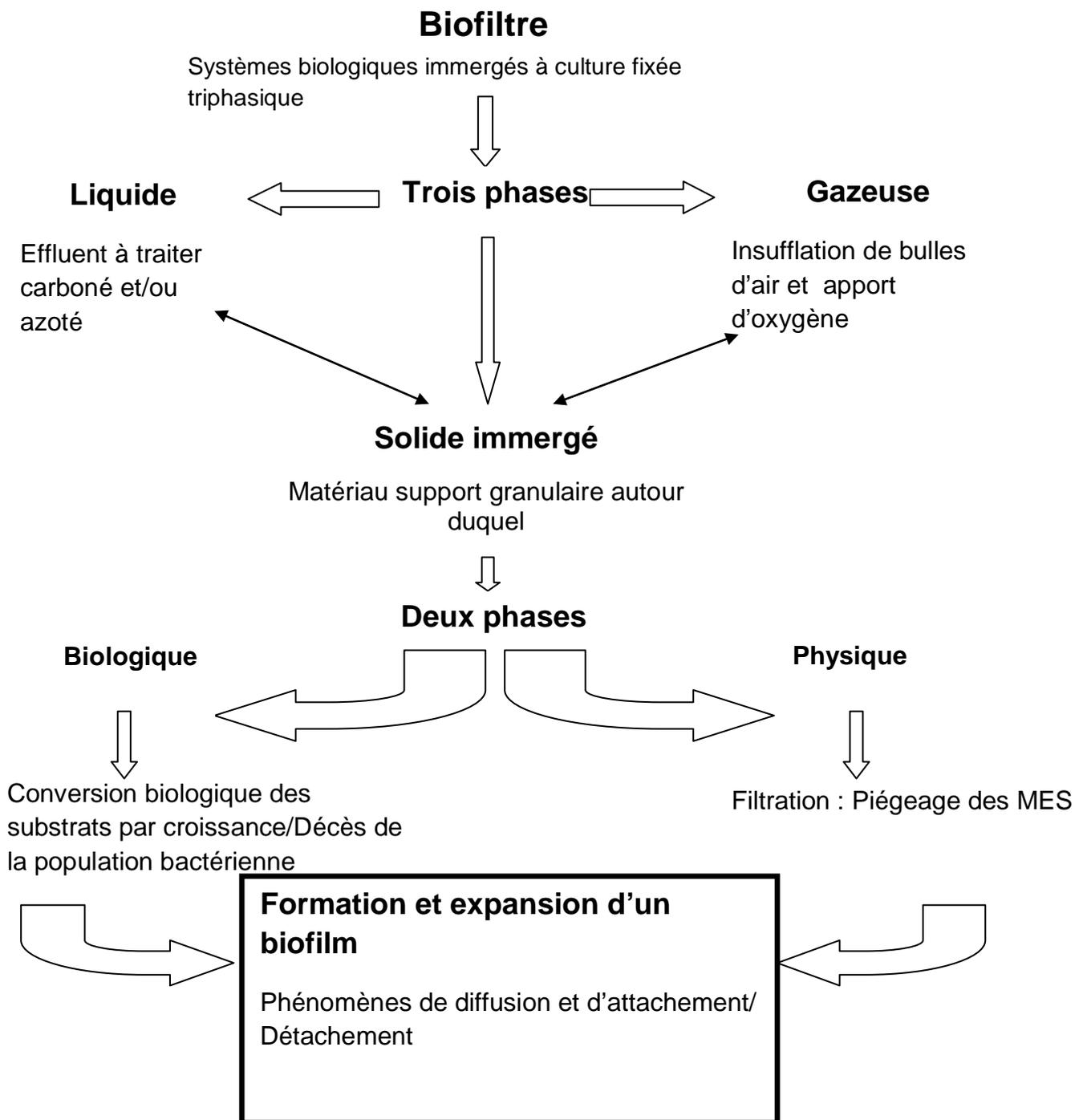


Figure I.2 : Processus fondamentaux appliqués dans les biofiltres

I.1.3. Organisation d'une unité de biofiltration

Une unité de traitement des eaux par biofiltration, se caractérise par le mode d'écoulement de l'effluent à traiter et la présence ou l'absence d'oxygène. En effet l'alimentation en eau de la cellule peut se faire soit par le haut (écoulement descendant) ou par le bas (écoulement ascendant). Selon le traitement recherché, les biofiltres peuvent être aérés (ex. : nitrification) ou non (ex. : dénitrification). Lorsqu'une aération est nécessaire, elle s'effectue soit en bas de l'ouvrage par l'intermédiaire de diffuseurs, on parle de biofiltre de type contre courant. L'eau et l'air peuvent être dirigés dans le même sens, on parle alors de biofiltre à co-courant. Le mode d'alimentation à co-courant faciliterait la circulation et la répartition des fluides, alors que le mode à contre-courant optimiserait le transfert d'oxygène dans le réacteur.

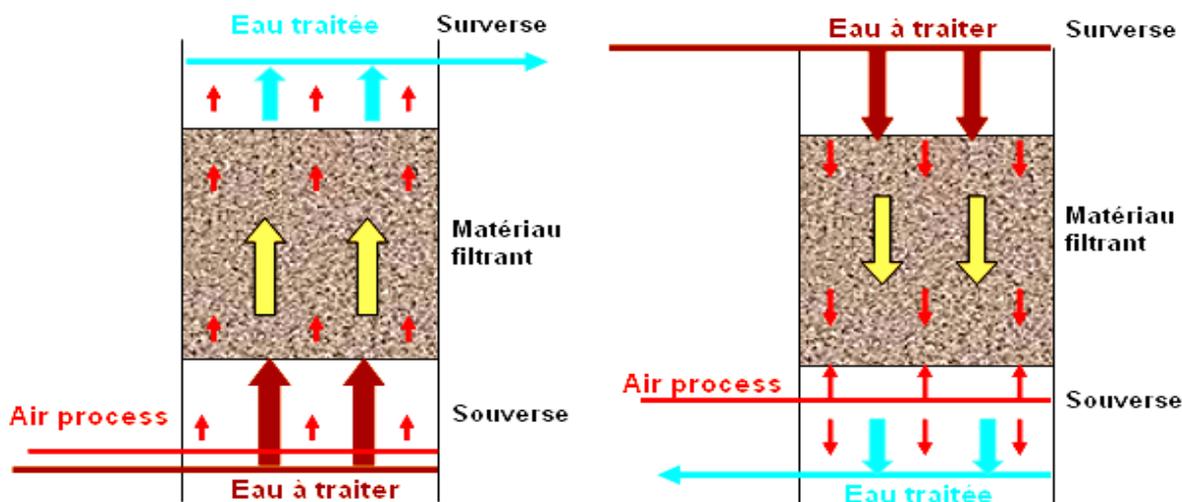


Figure I.3 : Principe d'un biofiltre à courant ascendant et descendant en cycle de filtration (Vigne, 2007).

La plus grande capacité de rétention des matières en suspension, ainsi que la possibilité de fonctionner avec une grande vitesse ont été les principales raisons qui ont poussé les chercheurs et les industriels d'accorder plus d'attention à ce type de procédé. En effet une répartition linéaire de la perte de charge au sein du massif filtrant, permet une utilisation optimale de l'activité biologique et une excellente distribution des flux d'eau, d'air et du substrat (Vigne, 2007).

Les performances épuratoires de la biofiltration sont, dans une large part, liées au matériau support, qui peut être de nature minérale (Montalvoa et al., 2014;

Bautista-Toledo et al., 2005; Shi et al., 2015), organique (**Saliling et al., 2007 ; Damaraju et al., 2015**) ou synthétique (**Valverde-Sarmiento et al., 2015 ; Wu et al., 2015**) constituant la base fondamentale pour le fonctionnement des unités de biofiltration. En effet, les rendements de biofiltration dépendent d'une large part des performances du matériau support qui doit répondre à un double impératif à savoir : la fixation de la biomasse et la rétention physique de la matière en suspension.

La granulométrie est le premier paramètre à prendre en considération, sa détermination résulte d'un compromis entre deux exigences contradictoires à savoir : une faible granulométrie pour accroître la surface de fixation de la biomasse en vue d'une amélioration des rendements de biofiltration, et une forte granulométrie pour éviter un colmatage trop rapide pour réduire les contraintes de lavage. Elle est généralement comprise entre 2,2 et 4,5 mm selon la charge en MES de l'eau à traiter (**Vigne, 2007**). Les grains doivent être également homogènes et résistants à l'attrition, assurant ainsi une vie prolongée du biofiltre.

D'après **Pujol et al. (1998)**, le support de biofiltration doit avoir également une grande surface spécifique pour faciliter l'échange de matière nutritive entre l'effluent et les microorganismes fixés sur le support. Cette surface spécifique est comprise entre 200 et 1000 m².m⁻³ suivant le type et la taille du support utilisé (argiles, schistes, pouzzolanes, polystyrène expansé, ...). Ensuite, il doit posséder une haute fraction de vide servant de lieux d'accumulation de la biomasse. En effet le maximum d'accumulation est atteint, lorsque la taille des pores est de 1 à 5 fois la taille des microorganismes épurateurs (**Dumont et al., 2008**). La densité du matériau filtrant est également une caractéristique à laquelle une attention particulière doit être accordée. Elle dépend du type de matériau utilisé (densité supérieure ou inférieure à un), mais doit être suffisante pour résister à l'entraînement, notamment lors des lavages, qui ont pour but d'éliminer l'excès de matière particulaire résultant du développement de la biomasse et la rétention des matières en suspension, afin de maintenir les capacités hydrauliques et épuratoires du biofiltre (**Azimi et al., 2010**) .

I.1.4. Paramètres de dimensionnement d'un biofiltre

Il a été traditionnellement admis dans la littérature que trois paramètres fondamentaux caractérisent le fonctionnement d'une unité de biofiltration à savoir : la charge volumique appliquée (C_v), la charge hydraulique (C_H) et le temps de séjour hydraulique (TRH).

I.1.4.1. La charge volumique appliquée :

Le flux de pollution à l'entrée d'une unité de biofiltration est un facteur clé déterminant ainsi les rendements d'épuration. Elle correspond à la quantité de substrat appliquée par unité de volume du matériau support (m^3) et par unité de temps (j). Elle est exprimée en kg de DCO, DBO_5 , MES. $m^{-3}.j^{-1}$ (pour le traitement de carbone), en kg NTK, $kg\ N-NH_4^+.m^{-3}.j^{-1}$ (pour la nitrification) et en $kg\ N-NO_3^-.m^{-3}.j^{-1}$ (pour la dénitrification).

Charge polluante journalière admise sur le filtre

$$\text{Charge volumique} = \frac{\text{Charge polluante journalière admise sur le filtre}}{\text{Volume du matériau filtrant}} = C_v \text{ en } kg .m^{-3}.j^{-1}$$

Dans le domaine du traitement des eaux usées, la rétention des matières en suspension (MES) des effluents à traiter est la première étape à mettre en œuvre. En effet, **Rocher et al. (2008)** rapportent que la maîtrise des charges appliquées en MES est primordiale pour éviter l'encrassement rapide du matériau support dû aux capacités de ce dernier à capter la pollution particulaire. La décantation physico-chimique doit être gérée de manière subtile afin de limiter le flux de MES introduit et par conséquent une prolongation des cycles de biofiltration.

Selon **Courtemanche (1996)**, la plupart des biofiltres actuels en traitement des eaux usées fonctionnent avec des charges volumiques comprises entre 2 et 5 kg de $DBO_5.m^{-3}.j^{-1}$. Celle-ci est de plus de quatre fois supérieures à celle des boues activées, en moyenne de $0,5\ kg\ de\ DBO_5.m^{-3}.j^{-1}$.

En traitement d'azote, **Damaraju et al. (2015)** indiquent que la performance de dénitrification dans un biofiltre garni de coupons de bois augmente avec l'accroissement de la charge volumique appliquée. Cette corrélation a été expliquée par la raison que, la croissance de la biomasse (VSS) était étroitement associée à la charge volumique (C_v) et au volume du lit filtrant colonisé.

De même **Rocher et al. (2008)** ont montré que l'accroissement des charges appliquées en NH_4^+ sur un prototype Biostyr®, induit une augmentation des charges éliminées. À titre d'exemple, la charge ammoniacale éliminée par un mètre cube de matériau augmente de 80 à 100 % lorsque la charge appliquée passe de 0,5 à 1 kg de $\text{N} \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{j}^{-1}$.

En s'appuyant sur des données recueillies dans les stations d'épuration du SIAAP traitant les eaux usées de la région parisienne, **Rocher et al. (2011b)** ont montré grâce à l'analyse du diagramme C_V éliminée versus C_V appliquée que l'accroissement des charges appliquées en azote nitrique induit une augmentation des charges éliminées, avec un rendement d'élimination de 90% pour l'ensemble des charges appliquées allant jusqu'à 5 kg de $\text{N-NO}_3^- \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{j}^{-1}$.

I.1.4.2. La charge hydraulique :

La charge hydraulique exprimée en $\text{m} \cdot \text{h}^{-1}$ correspond au rapport du débit de l'affluent à traiter par la section transversale du filtre.

$$\text{Charge hydraulique} = \frac{\text{Débit admis sur le filtre}}{\text{Surface du filtre}} = C_H \text{ en } \text{m}^3 \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{h}^{-1} \text{ ou en } \text{m} \cdot \text{h}^{-1}$$

Un régime hydraulique trop faible entraîne l'accumulation des MES à l'entrée du massif filtrant, provoquant ainsi un colmatage prématuré. À l'inverse, l'augmentation des vitesses hydrauliques permet une meilleure répartition des particules dans le massif filtrant et par conséquent une meilleure répartition de la charge à éliminer sur le long du massif filtrant. En effet, le choix de vitesses importantes s'impose qui, d'après **Vigne et al. (2007)**, doivent être supérieures à $1,5 \text{ m} \cdot \text{h}^{-1}$.

En général, un réacteur biologique fonctionne pour une gamme de charges hydrauliques dont les limites sont dictées par un bon fonctionnement du système biologique. La charge inférieure étant celle qui permet de mouiller efficacement le lit filtrant pour l'achèvement et le maintien de la croissance bactérienne. Quant à la charge supérieure, elle représente la limite correspondant à l'engorgement du système (**Zidane et al., 2006**).

Dans une étude portant sur la dynamique de colonisation d'un massif filtrant d'une unité de dénitrification des eaux usées par biofiltration, **Azimi et al. (2010)** indiquent

que la vitesse hydraulique a une forte influence sur les performances épuratoires des bactéries hétérotrophes. Plus les vitesses hydrauliques sont élevées, plus la charge appliquée est forte et donc plus la charge éliminée est importante. Sur le premier mètre de matériau, les rendements épuratoires, compris entre 3 et 5 kg de N.m⁻³.j⁻¹ pour des vitesses de l'ordre de 8 m.h⁻¹ atteignent 6 à 7 kg de N.m⁻³.j⁻¹.

I.1.5. Les biofiltres de traitement de la pollution azotée

I.1.5.1. Le traitement d'azote par nitrification-dénitrification simultanées

Les composés azotés sont parmi les polluants les plus importants des eaux usées en raison de leur rôle dans l'eutrophisation des écosystèmes aqueux (croissance abondante d'algues et de plantes aquatiques), leur effet sur le contenu en oxygène des eaux réceptrices et leur effet toxique pour les animaux et les humains. Le problème de l'enlèvement de l'azote est également rencontré en aquaculture. En effet, des concentrations en ammonium de 0,1 mg.L⁻¹ sont toxiques pour les poissons, ce qui impose son élimination (**Abeyinghe et al., 1996**). Depuis plusieurs années, la méthode traditionnelle afin d'épurer un effluent de composés azotés est la combinaison des processus de nitrification et de dénitrification (**Paredes et al., 2007**).

À l'intérieur d'un biofiltre, le traitement de l'effluent se fait tout d'abord par un processus de nitrification où l'azote ammoniacal (NH₃) est oxydé en azote nitreux (NO₂⁻) et par la suite les NO₂⁻ sont oxydés en NO₃⁻ (azote nitrique). Vient ensuite, de façon simultanée le processus de dénitrification où les NO₃⁻ sont réduits en NO₂⁻, puis en monoxyde d'azote (NO) puis en N₂O (protoxyde d'azote). Cet oxyde nitreux est ensuite réduit en N₂ qui est libéré dans l'atmosphère.

I.1.5.2. Écologie des communautés microbiennes dénitrifiantes des eaux usées

La capacité de dénitrification est répandue dans les deux mondes bactérien et archaeal des eaux usées, ainsi la diversité des communautés dénitrifiantes des autres environnements (ex: le sol) est communément plus grande que celle impliquée dans les processus de traitement des eaux usées (**Throback, 2006**). Les études phylogéniques basées sur le séquençage par amplification des ARN 16S, indiquent que la richesse et la diversité des communautés dénitrifiantes des eaux usées sont relativement grandes (Figure III.3). Les germes isolés à partir des biofiltres de dénitrification sont en rapport avec *Hyphomicrobium*, *Paracoccus*,

Pseudomonas et *Camamonas* des Protéobactéries (**Martineau et al., 2013; Gumaelius et al., 2001; Chakravarthy et al., 2011; Su et al., 2001**). Point de vue taxonomique, les études métagénomiques ont montré que la plupart des bactéries dénitrifiantes sont affiliées aux Protéobactéries (59%) et aux Bacteroides (16%).

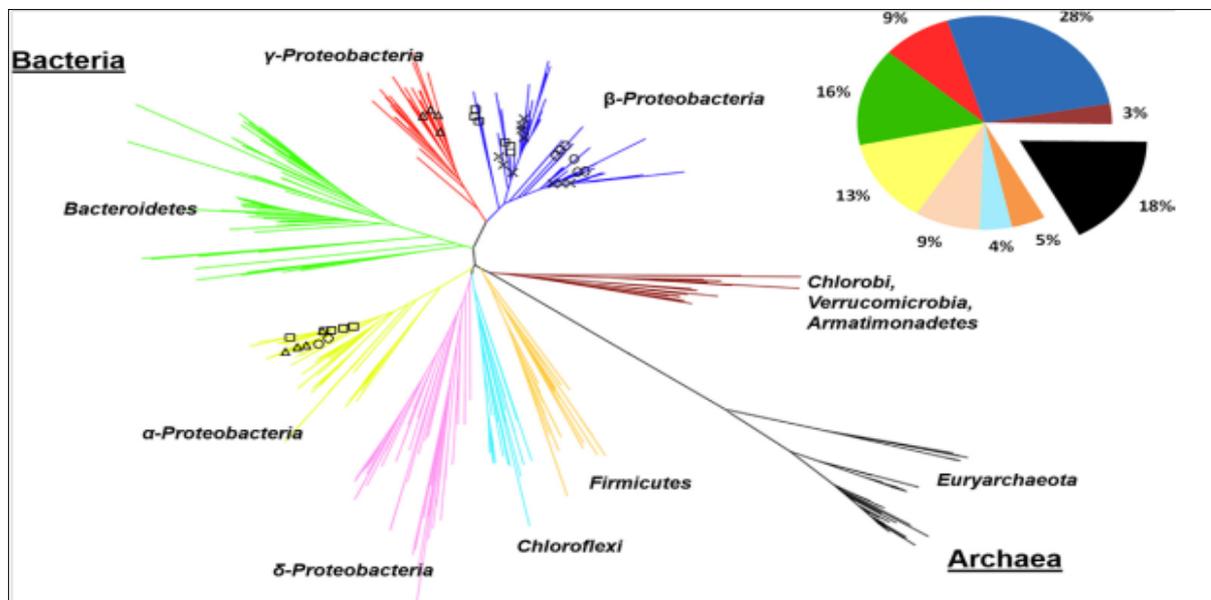


Figure I.4: Répartition phylogénique des bactéries dénitrifiantes des eaux usées (**DeSantis et al., 2006; Letunic et Bork, 2011**).

I.1.5.3. Biologie moléculaire de la dénitrification

Chez toutes les bactéries, les enzymes de la dénitrification reçoivent un électron à partir du système de la chaîne respiratoire qui fait partie de la membrane cytoplasmique. En d'autres termes, la dénitrification est une forme de la respiration et une part des composantes de la chaîne respiratoire avec un système de transport qui délivre des électrons à l'oxygène O_2 par les oxydases terminales (**Einsle et Kroneck, 2004**). La réduction de l'ubiquinone en ubiquinol aura lieu par l'utilisation d'électrons issus des agents réducteurs tels que le NADH, les acides gras, etc. Il existe une structure cristalline de l'enzyme correspondante habituellement connue comme NAR. En résumé l'ubiquinol est oxydé à travers la surface de la membrane périplasmique avec un relargage de H^+ au périplasm, et transfère des électrons à travers la membrane vers le site actif qui est localisé sur un domaine globulaire qui sort dans le cytoplasme. Le point clé à noter durant cette phase est le transfert d'électrons à travers la NAR conjointement avec l'apparition et la disparition de H^+ des deux côtés de la membrane, ce transfert produisant une force motrice à travers cette dernière.

L'emplacement du site de la réduction des nitrates NO_3^- du côté du cytoplasme de la membrane exige un système de transport des nitrates, cela peut être fourni par les protéines NarK. **(Moir et Wood, 2001).**

Chez *Paracoccus denitrificans*, il existe deux protéines identiques, une d'entre elles catalyse les nitrates avec un ou plusieurs H^+ . Cela permet la pénétration des nitrates dans la cellule et par conséquent la respiration. À l'état d'équilibre, l'import des nitrates doit se faire en échange avec le transfert des nitrites vers le périplasma, c'est un processus non affecté par le transfert d'électrons, c'est-à-dire électroniquement neutre. Le transfert des nitrites vers le périplasma est exigé parce que les nitrites réductases de la dénitrification sont localisés dans celui-ci. Chez *Paracoccus denitrificans* les nitrites réductases sont de type cytochrome cd_1 , et les électrons sont délivrés au cytochrome cd_1 par un mono hème cytochrome type-c, cytochrome c_{550} , ou par des protéines appelées pseudoazurin. Ces protéines périplasmiques hydrosolubles sont réduites par un complexe de membranes intégrées appelé complexe cytochrome bc_1 , qui est à son tour réduit par l'ubiquinol. Ce complexe n'est pas spécifique à la dénitrification; il se produit dans divers systèmes de la chaîne respiratoire des bactéries aussi bien que dans la chaîne de transfert des électrons chez les mitochondries. Les NO produites par les nitrites doivent être réduites à des faibles concentrations à cause de leur toxicité potentielle, c'est un produit intermédiaire de la dénitrification. Les NO^- réductases constituent une membrane protéique intégrale dont il n'est pas encore expérimentalement établi qu'elles fournissent des électrons en commun avec les nitrites réductases. L'étape finale de la dénitrification est catalysée par les N_2O réductase, c'est une enzyme périplasmique. Il est encore supposé que les pseudoazurin et les cytochromes c_{550} sont les protéines intermédiaires donatrices d'électrons. Les N_2O -réductases sont des Cu-enzymes **(van Spanning et al., 2007).**

I.1.5.4.Facteurs contrôlant la structure des communautés microbiennes dénitrifiantes

Bien que le méthanol soit le plus largement utilisé comme source de carbone pour la dénitrification biologique des eaux usées, beaucoup d'alternatives (éthanol, acétate, pyruvate, glycérol...etc.) ont été aussi utilisées en se basant sur des considérations technico-économiques telles que le coût, la cinétique et la période d'adaptation. Pour un système de dénitrification, la source de carbone a un impact potentiel sur la structure des communautés bactériennes par rapport aux autres facteurs. **(Lu and**

Chandran, 2010a; Baytshtok et al., 2009; Wan et al., 2011; Hagman et al., 2008; Baytshtok et al., 2008; Xia et al., 2008).

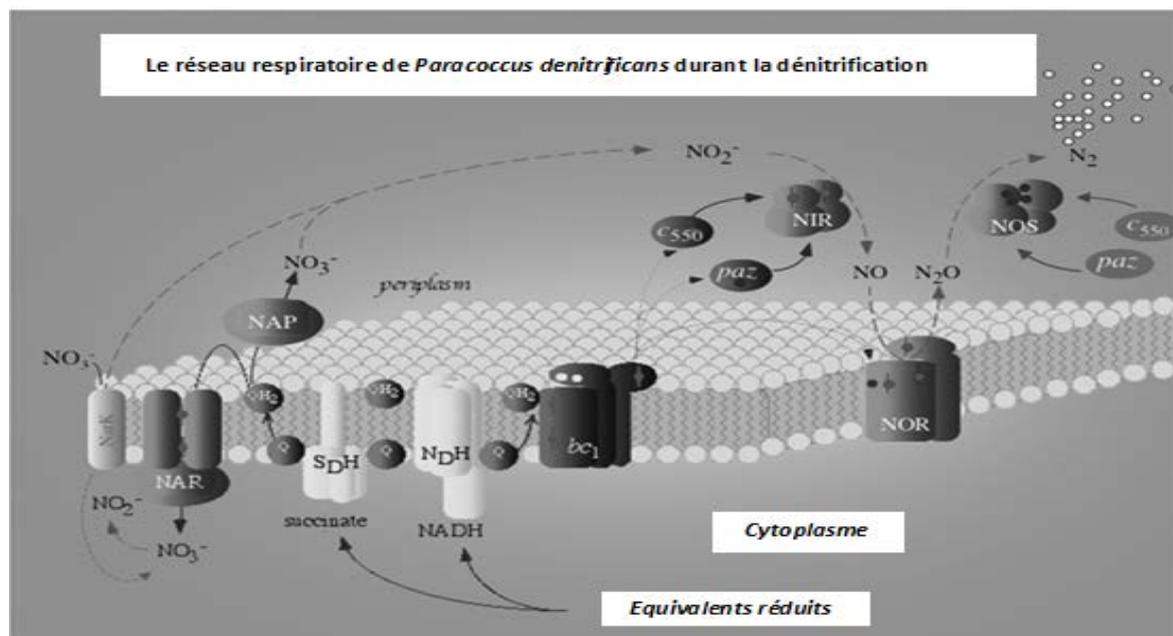


Figure I.5 : Schéma de la dénitrification complète chez *Paracoccus denitrificans*.

SDH: succinate déshydrogénase; NDH, NADH déshydrogénase; Q: Quinone; bc_1 : complexe cytochrome bc_1 ; c_{550} : cytochrome c; paz: pseudoazurin; NAR: NO_3^- réductase; NAP: périplasmique NO_3^- réductase; NIR: NO_2^- réductase; NOR: NO -réductases; NarK: $\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$ clapet anti-retour (Bothe et al., 2000).

Des corrélations positives ont été trouvées entre le rapport DCO/N et la diversité des populations microbiennes en dénitrification (Xia et al., 2010). Dans les conditions d'anoxies, une augmentation des capacités de dénitrification a été observée avec l'augmentation du rapport DCO/N, coïncidant avec la réduction des germes dénitrifiant primaires fonctionnels autotrophes: *Thiobacillus sp* et un enrichissement des hétérotrophes: *Azoarcus sp* (Sun et al., 2012).

Les paramètres opérationnels tels que le pH, la température, le temps de rétention hydraulique et l'oxygène dissous influent non seulement sur l'élimination de l'azote par dénitrification, mais également sur la diversité et la succession des communautés impliquées (Wang et al., 2012; Hai et al., 2014).

Le pH et la température optimale de la dénitrification des eaux usées se situent dans la gamme 7-9 et 20-30°C respectivement, avec une baisse considérable en dehors de ces intervalles (Grady et al., 1999). À des valeurs de pH suboptimales,

l'accumulation des espèces intermédiaires de la dénitrification (les nitrites et l'oxyde nitrique) est fréquemment observée (**Glass and Silverstein, 1998**).

L'oxygène dissous inhibe la dénitrification biologique en fournissant un meilleur accepteur d'électrons aux populations dénitrifiantes. En pratique, la concentration d'inhibition peut être en dessous de $0,1 \text{ mg d'O}_2 \cdot \text{L}^{-1}$ dans les systèmes de dénitrification des eaux usées (**Oh and silverstein, 1999a**). La nitrite réductase est moins sensible à l'action de l'oxygène par rapport à la nitrate réductase, avec un seuil d'inhibition de $2,5 \text{ mg O}_2 \cdot \text{L}^{-1}$ (**Korner et Zumft, 1989**). L'oxyde nitreux réductase est l'enzyme la plus sensible à l'action de l'oxygène dissous comparée aux autres réductases, résultant de l'accumulation du N_2O sous les conditions d'aérobiose (**Lu et Chandran, 2010b**).

I.1.5.4. Évaluation technico-économique de la dénitrification des eaux

Le prix de revient est un paramètre important à considérer pour l'application d'un procédé de dénitrification. Le tableau I.1 illustre les prix estimés rapportés par la littérature en utilisant diverses sources de carbone. Le coût de la dénitrification a été calculé en fonction de la quantité de substrat nécessaire et son prix de revient. Les substrats naturels et les polymères biodégradables sont plus attractifs d'un point de vue application pratique, car ils sont nettement moins chers et permettent des rendements d'épuration meilleurs par rapport aux substrats traditionnellement utilisés. En effet, les polymères biodégradables deviennent de plus en plus des sources de carbones compétitives.

Tableau I.1: Estimation du prix de revient de la dénitrification utilisant différentes sources de carbone d'après **Wang et Chu (2016)**.

Substrat	Prix du substrat(€/kg)	Consommation du substrat (kg/kg NO ₃ -N)	Prix de la dénitrification (€/kg NO ₃ -N)	Références
PCL	4,1-3,0	1,3-1,8	5,4-8,9	Boley et al. (2000); Chu et Wang (2016)
PHBV	4,6	1,49-1,65	6,9-7,6	
PHBV/ Amidon	2,5	2,08-2,60	5,1-6,4	
PHBP/BP	2,4	1,69-1,86	4-4,4	
Liqueurs	8,0	0,29	2,4	Nalcaci et al. (2011)
Méthanol	0,4-1,0	2,08-3,98	1-4,0	Boley et al. (2000); Chu et Wang (2016)
Ethanol	1,2	2	2,4	Boley et al. (2000)
Acide acétique	1,4	3,5	8,0	

I.2. La biostimulation électromagnétique des cultures vivantes

I.2.1. Introduction

Un champ est un phénomène physique d'échange d'énergie et de forces qui s'exercent à distance provoquant des effets induits sur des objets. Il se caractérise par son intensité et sa direction. Communément, il désigne la zone dans laquelle s'exerce le phénomène: on se trouve « dans le champ » ou non (**Raoul, 2010**). Dans le contexte de l'électromagnétisme, le terme « champ » désigne un phénomène susceptible de perturber des objets matériels dans un espace qui, théoriquement, peut être infini, mais qui, dans les faits, est évidemment plus restreint (**Afsset, 2010**). La gamme des ondes, ou rayonnements, électromagnétiques est vaste. Le spectre électromagnétique s'étend de la fréquence nulle avec les champs électriques et magnétiques statiques jusqu'à l'infini (rayonnements cosmiques). Tout en ayant une base physique commune, les ondes transportent des énergies très variables (**Perrin et Souques, 2010**). En se propageant, elles investissent un espace appelé champ électromagnétique, où le terme « champ » renvoie de façon plus générale à une zone où s'exercent des forces sur certains objets, particules, ions, atomes, molécules, etc. Les différentes classes d'expériences électromagnétiques sont regroupées dans la figure I.5.

I.2.2 Effet du champ magnétique modéré sur les cultures cellulaires

Les cellules et les organismes vivants sont capables de répondre à une large gamme de stimulus et de stress environnementaux, conduisant à des changements intra et extracellulaires. Les modifications cellulaires et moléculaires induites par un champ magnétique interagissent réciproquement avec les matières biologiques, qui cependant, dépendent de la durée d'exposition, du degré de pénétration des tissus et de la génération de la chaleur, qui à leur tour dépendent de l'intensité et de la fréquence. De plus, les réponses cellulaires ne dépendent pas uniquement de l'intensité et la fréquence, mais aussi du type de champ (statique ou oscillatoire), de la forme de l'onde (sinusoïdale ou carrée) et du statut biologique (**Torgomyan et al., 2011, 2012; Tadevosyan et al., 2008**).

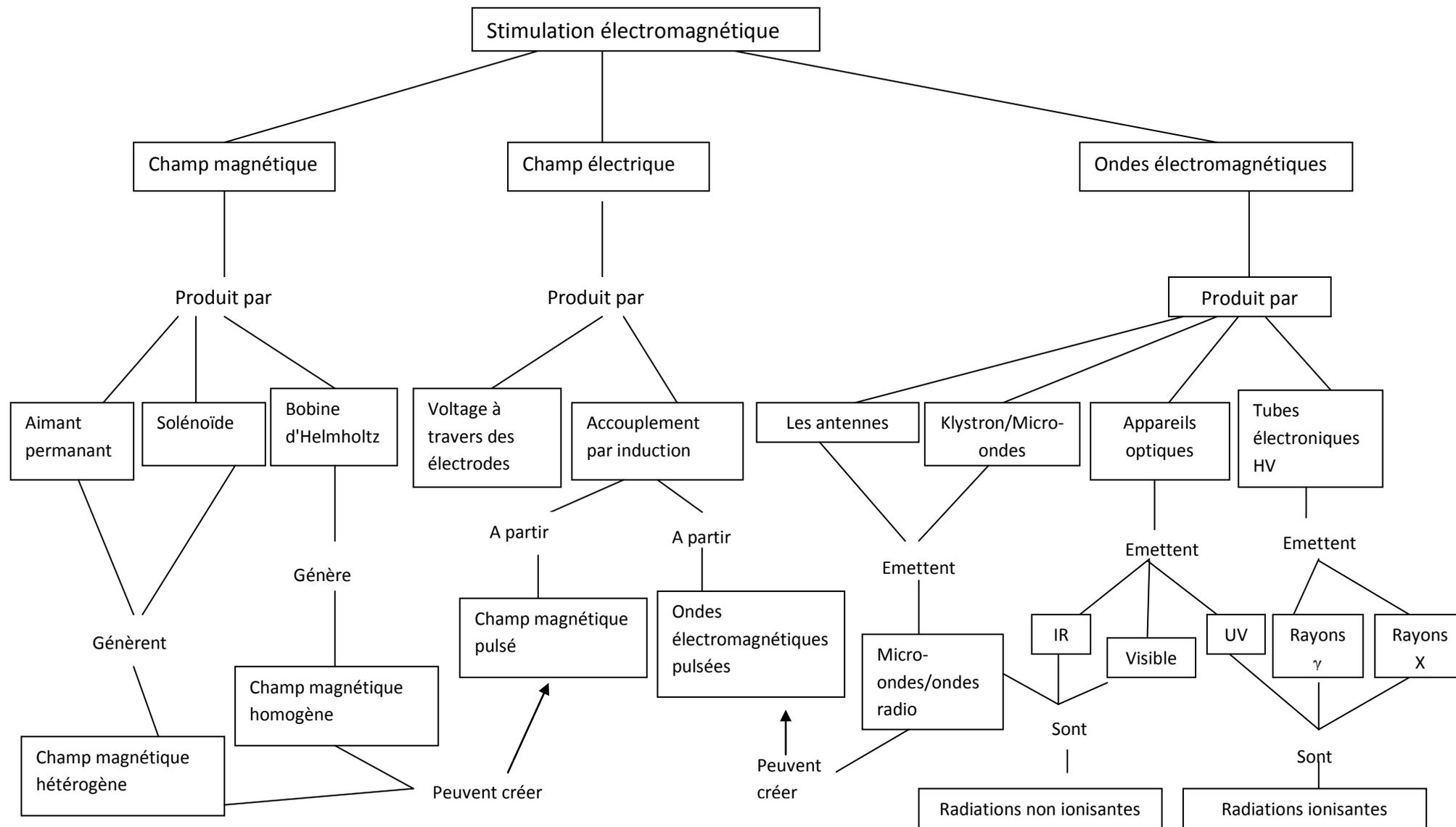


Figure I.6: Modalités de stimulations électromagnétiques à partir des champs et des ondes d'après Hunt et al. (2009).

I.2.2.1. Effet sur la croissance et la viabilité

Dans la littérature, il existe des nombreuses études montrant l'efficacité du champ magnétique sur les paramètres de croissance et la viabilité, tel que l'amélioration de la biomasse (**Muniz et al., 2007; Vanags et al., 2010**), l'augmentation de la production du CO₂ (**Motta et al., 2001**) et la prolifération cellulaire (**Gruchlik et al., 2012**).

Martino et al. (2010a) ont montré qu'un champ magnétique statique de 120 mT permet l'augmentation du nombre de cellules endothéliales de 40% après deux jours d'exposition. Les auteurs signalent également la possibilité de prévenir les dégâts vasculaires et améliorer la guérison de l'endothélium avec le traitement au champ magnétique statique.

Les effets positifs du champ magnétique ont été contrastés par des conclusions qui ont montré des effets inhibiteurs. **Iwasaka et al. (2004)** ont observé une baisse du taux de prolifération des levures exposées à un champ magnétique de 14 T pendant 16 heures. Ils ont proposé un mécanisme par lequel, la densité du gradient magnétique perturbe le transport de l'oxygène et dérive la levure du substrat à travers la flottabilité par les forces diamagnétiques. Des corrélations linéaires intéressantes entre l'intensité du champ magnétique et l'inhibition de la croissance ont été trouvées par **Kohno et al. (2000)** quand ils ont appliqué des intensités de 30, 60, 80 et 100 mT à trois espèces différentes de bactéries (*Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* et *Streptococcus mutans*) et ils ont observé une inhibition proportionnelle de la croissance des cultures à l'intensité du champ.

Büyükuslu et al. (2006) rapportent que la viabilité des cellules et la toxicité sont soumises à l'action du champ magnétique statique à travers les changements dans le métabolisme du Ca²⁺, des phospholipides et l'action sur les enzymes. La figure I.6 illustre la distribution des effets du champ magnétique sur la croissance cellulaire rapportés par la littérature.



Figure 1.7: Distribution des effets du champ magnétique rapportés par la littérature sur la croissance cellulaire d'après **Albuquerque et al. (2016)**.

1.2.2.2. Effet sur la morphologie des cellules

La majorité des travaux ayant étudié l'effet du champ magnétique sur la morphologie des cellules ont montré que les composants intracellulaires peuvent être soumis à des moments de rotation et des changements de leurs alignements et leurs conformations sous une force aimantée.

D'autres parts, des auteurs spéculent que la membrane, le cytosquelette et la distribution des protéines (comme les filaments d'actine) pourraient être affectés directement par un champ magnétique statique et par voie de conséquence, des changements dans la morphologie cellulaire se produisent (**Dinni et Abro, 2005**).

Un rapport entre le métabolisme de l'ion calcium et le format de la cellule est souvent mentionné dans les travaux ayant traité les effets du champ magnétique sur les organismes vivants. Des changements dans la concentration du Ca^{2+} libre peuvent affecter les interactions entre les constituants de la membrane plasmique (**Marhal et al., 2000**).

Prina-Mello et al. (2005) ont rapporté que les kinases de régulation extracellulaire peuvent être modulées par l'intensité du champ, avec un maximum d'activation à 0,75 Tesla. Ces mêmes auteurs signalent également que le flux du Ca^{2+} à travers la membrane plasmique est dû à l'augmentation du voltage des canaux à calcium par un champ aimanté.

I.2.2.3. Effet sur l'activité enzymatique

Des résultats contradictoires ont été rapportés par divers auteurs ayant testé l'effet du champ magnétique sur l'activité et la production d'enzymes.

Çelik et al. (2009) ont démontré que les champs magnétiques dans la gamme des milliTesla peuvent augmenter l'activité de la catalase. De même, **Atak et al. (2014)** ont observé une augmentation de l'activité de la peroxydase sous un flux magnétique de 2,9 à 4,6 mT. Par contre **Amara et al. (2007)** ont montré qu'un champ magnétique de 250 mT n'a causé ni un stress oxydatif ni des altérations de l'ADN des cellules HTP1. Ils ont mentionné également que le magnétisme n'interfère pas avec le stress oxydatif. Les auteurs estiment que les enzymes SOD (Super oxyde dismutase) et la catalase ne sont pas significativement affectées. Par contre, d'autres travaux scientifiques attestent que le champ magnétique statique affecte l'activité de 20 enzymes. Le point commun de ces travaux est les enzymes responsables du stress oxydatif: SOD, la catalase et la glutathion peroxydase. Les discussions au sujet des mécanismes de l'interaction entre le champ magnétique et la catalyse enzymatique sont rares. **Iwasaka et Ueno (2003)** ont défendu l'idée que les composantes diamagnétiques du milieu intracellulaire peuvent être affectées par le gradient du champ magnétique appliqué. En effet, dans les régions où le champ magnétique est faible, les lignes de champ affectent la concentration locale du substrat et de l'enzyme, ce qui engendre des différences d'activité. Les études de **Çelik et al. (2009)** et **Büyüksülu et al. (2006)** suggèrent que le champ magnétique peut orienter les électrons impairs des ions métalliques qui donnent l'énergie cinétique à la molécule enzymatique et transfèrent l'énergie aux autres en intensifiant le rendement de la production des radicaux par la chaîne de la réaction. Le tableau I.3 illustre les principaux effets du champ magnétique sur l'activité enzymatique.

Tableau I.2: Synthèse des principaux effets du champ magnétique sur l'activité enzymatique

Référence	Intensité (mT)	Enzyme	Effets
Manoliu et al. (2006)	80	Cellulase, peroxydase et catalase	Alternance entre la stimulation et l'inhibition qui dépendent du temps d'exposition (entre 7 et 14 jours)
Atak et al. (2014)	2,9-4,6	Peroxydase	Augmentation significative de l'activité enzymatique à tous les traitements magnétiques appliqués
Amara et al. (2007)	250	Malondialdéhyde, Glutathion peroxydase, peroxydase, la catalase et la SOD	Le champ magnétique ne provoque ni stress oxydatif ni dommages à l'ADN
Çelik et al. (2009)	2,9-4,6	Catalase SOD	Les activités de la SOD et la catalase ont été augmentées de 21,15% et 15,20% respectivement
Gemishev et al. (2009)	5-70	Endoglucanase	Sous un prétraitement appliqué sur les spores de l'inoculum, une bonne activité des endoglucanases a été observée
Büyükuslu et al. (2006)	2,9-4,6	SOD	Augmentation significative de l'activité de SOD
Yan et al. (1997)	0 -200	α –amylase, l'ARN Ribonucléase et la succinate-cytochrome C réductase	L'activité a été améliorée de 27%, 34% et 38% respectivement comparés au contrôle

I.2.2.4. Effet du champ magnétique sur l'expression des gènes

L'expression différentielle des gènes joue un rôle essentiel dans la régulation, le métabolisme, la biosynthèse et la réponse cellulaire au stress. Le champ magnétique a été cité comme un agent provoquant des changements dans les processus régissant l'intégrité de l'ADN, des mutations (**Zhang et al., 2003**) ainsi que les processus de la transcription et la traduction de l'ADN (**Paul et al., 2006; Goto et al., 2006**).

Laramee et al. (2014) considèrent que l'induction et le temps d'exposition magnétique sont les facteurs conditionnant l'effet du champ magnétique sur l'expression des gènes hsp 70 avec un maximum entre 10 et 100 mT avec des temps d'exposition supérieurs à 48 heures.

À l'inverse de ce qui a été cité précédemment, **Anton-Leberre et al. (2010)** signalent que le champ magnétique est sans effet sur l'ADN.

I.2.2.5. Effet du champ magnétique sur la biosynthèse des molécules

Beaucoup de chemins métaboliques sont décrits comme étant influencés par le champ magnétique. Des changements dans les processus enzymatiques, l'expression des gènes et les réactions chimiques justifient les changements et les modifications dans les rendements de biosynthèse des molécules. **Gemishev et al. (2009)** ont étudié la synthèse des endoglucanases sous un champ magnétique statique à différents temps d'exposition et à des intensités allant de 5 à 70 mT. Les résultats ont montré qu'un champ de 10 mT permet une amélioration du taux de synthèse des protéines de 11,5 %, 15 % et 18 % pour des temps d'exposition de 10 jours, 24 heures et 1 heure, respectivement.

Da Motta et al. (2004) ont amélioré de 3,4 fois la production d'éthanol par *Saccharomyces cerevisiae* en appliquant un champ magnétique de 250 mT pendant la fermentation. Les effets de l'alcool sur l'organisation de la membrane et l'inactivation des protéines sont éliminés par le champ magnétique, ce qui permet de produire plus d'alcool. Ces résultats ont été vérifiés par **Galonja-Corghill et al. (2009)** lorsqu'ils ont exposé la même levure à un champ magnétique statique de 150 mT et ils ont obtenu un rendement de 15 % meilleur par rapport au contrôle.

La synthèse des glutathions, importante enzyme responsable de la réponse cellulaire contre les dégâts causés par les espèces réactives de l'oxygène, a été augmentée de 32,1 % par rapport au contrôle dans les fermentations par *Saccharomyces cerevisiae* après une exposition à un champ magnétique statique de 20 mT pendant 72 heures (**Dos Santhos et al., 2012**).

Le magnétisme a aussi été mentionné comme ayant un effet sur la synthèse de l'ATP. **Buchachenko et Kuznetsov (2008)** ont étudié la synthèse de l'ATP par une enzyme phosphorylée (la créatine kinase) en utilisant deux formes isotopiques du magnésium: ^{25}Mg et l'isotope non magnétique $^{24,26}\text{Mg}$. Il est connu que l'ion $^{25}\text{Mg}^{+2}$ intègre le site catalytique de l'enzyme dont un électron est mis en jeu dans la réaction provenant de l'ADP et forme donc un radical pair. Dans cette situation, les paires peuvent porter la charge simple ou triple, dont la phosphorylation triple est la plus probable. La conversion charge simple-charge triple peut être modulée par un champ magnétique externe, ce qui peut expliquer les effets expérimentaux observés. Le champ magnétique statique modifie la synthèse de l'ATP en augmentant le rendement des kinases de 50 % à 55 mT et de 70 % à 80 mT avec l'isotope ^{25}Mg .

I.2.2.6. Effet du champ magnétique sur les membranes et les canaux

L'effet du champ magnétique sur les structures et les mécanismes membranaires a été étudié par divers auteurs. En effet, les propriétés biomécaniques (**Wang et al., 2014**); canaux à sodium (**Rosen, 2003**) et canaux à calcium (**Rosen, 1996**) ont été traitées.

La plupart des théories expliquant les mécanismes d'interaction entre les systèmes biologiques et le champ magnétique suggèrent que la membrane plasmique, en raison de ces propriétés bioélectriques, est le site primaire sur lequel le champ magnétique exerce ses effets (**Rosen, 2003**). Il est généralement connu que les changements structuraux et morphologiques de la membrane plasmique, perturbent beaucoup de fonctionnalités cellulaires, par exemple un changement dans la forme cellulaire, modification du flux d'ion, etc. La modification de la forme et la structure de la membrane cellulaire est l'un des effets causés par le champ magnétique le plus rapporté par la littérature (**Lisi et al., 2000; Chionna et al., 2003; Rieti et al., 2004**).

L'anisotropie diamagnétique des molécules lipidiques a été décrite par **Hughes et al. (2005)** comme étant le changement de leurs orientations sous un champ magnétique statique, avec une compression de la membrane et une altération de la fonction de régulation des canaux. Le tableau I.3 résume les effets majeurs causés par un champ magnétique.

Tableau I.3: Résumé des effets majeurs que peut causer un champ magnétique sur les cultures cellulaires d'après **Dini et Abbro (2005)**

Structures et fonctions cellulaires	Effets
Membrane plasmique	-Réorientation des sites diamagnétiques moléculaires -changement des modèles protéiques - Rotation des phospholipides membranaires -Réarrangement des sites de fixation des molécules
[Ca²⁺]	-Flux intracellulaire et extracellulaire -Augmentation du transport à travers la membrane
Forme cellulaire	-Elongation des suspensions cellulaires en croissance -Détachement des cultures cellulaires immobilisées en croissance
Cytosquelette	-Réorganisation des filaments F-actine et les microtubules
Prolifération	-Perturbation de l'index de prolifération
Nécrose	-Absence
Apoptose	-Perturbation du taux d'apoptose
Les gènes liés à l'apoptose	-Modulation
Surface des cellules apoptotiques	-Plus favorable
Phagocytose des cellules apoptotiques	-Diminue
Différenciation des macrophages	-Retardée

I.3. La biostimulation ultrasonique des cultures vivantes

I.3.1. Introduction

Les procédés industriels exigent que les opérations soient exécutées d'une façon effective, avec le respect de la qualité du produit, de la consommation d'énergie et le temps alloué. Des nouvelles technologies cherchent constamment à réduire le coût des procédés en maintenant ou en augmentant la qualité des produits d'une manière écologiquement saine. La cavitation offre d'immenses possibilités pour l'intensification des traitements physico-chimiques dans le respect de l'économie d'énergie.

La cavitation est généralement définie comme la génération, l'augmentation subséquente et l'éclatement des bulles, résultant d'une haute densité énergétique locale. Une pression localisée, en dessous de la pression d'évaporation apparaît à l'interface gaz-liquide **(Guo et al., 2011)**.

Lorsque la cavitation se produit dans un réacteur, elle induit des conditions de très hautes températures et de pression (100 à 5000 atmosphères de pression et 500 à 15000 K de température) à l'échelle de la bulle formée, tandis que l'environnement total reste équivalent aux conditions atmosphériques ambiantes (Figure I.7), cela permet une exécution efficace sous des conditions ambiantes de plusieurs processus physiques ou réactions chimiques qui exigent des conditions strictes.

De plus, des radicaux libres sont produits dans le processus dus à la dissociation des vapeurs piégées dans les bulles, ce qui en résulte soit une intensification des réactions chimiques, soit une altération du mécanisme réactionnel. La cavitation permet également la génération de turbulence locale et la circulation d'un micro-liquide (ruissellement acoustique) dans le réacteur permettant ainsi une augmentation du taux de transport et élimine également la résistance au transfert de masse des systèmes hétérogènes **(Mason et Lorimer, 2002)**.

Sur la base du mode de génération, la cavitation a été divisée en quatre types: acoustique, hydrodynamique, optique et particulaire. Seules les cavitations acoustique et hydrodynamique produisent des changements physico-chimiques désirés, alors que les cavitations optique et particulaire sont typiquement utilisées

pour produire une bulle de cavitation unique, sans aucun changement physico-chimique de la solution (**Mason et Lorimer, 2002**).

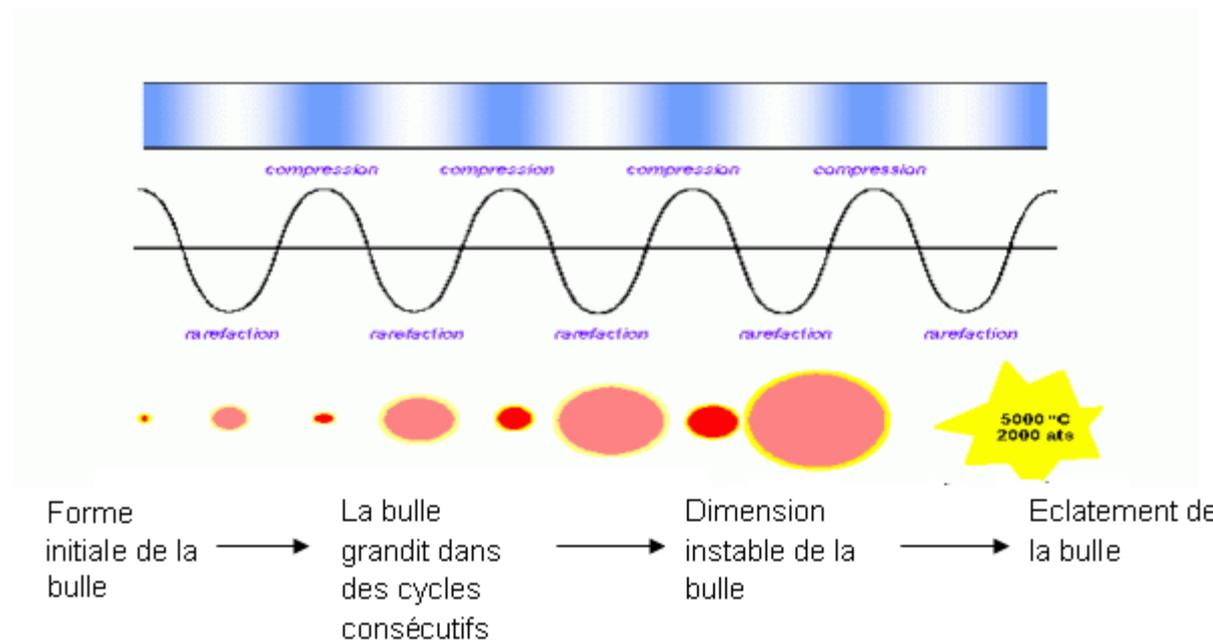


Figure I.8: Génération, croissance et éclatement de bulles résultantes du phénomène de cavitation (**Mason et Lorimer, 2002**).

La génération d'ondes ultrason peut se faire soit par des bains ultrasoniques, soit par une sonde immergée.

Les bains ultrasoniques ont été fabriqués à l'origine à des fins de nettoyage. Le réacteur de nettoyage ultrasonique se trouve à l'intérieur, mais l'on peut directement utiliser l'enceinte de l'appareil tout entier comme réacteur ce qui exigera une agitation mécanique supplémentaire. Le système d'ultrasons à bain présente une intensité inférieure comparée à d'autres systèmes d'ultrasons comme le système à sonde immergée, les résultats peuvent être difficilement reproductibles à cause de l'emplacement de l'échantillon et de la variation de la température dans le réacteur. Un autre inconvénient des systèmes à bain est que le fluide qui entoure le réacteur peut monter en température, et rendre l'entretien des conditions isothermes difficiles.

Les systèmes à sonde immergée, aussi appelés systèmes de la corne, sont utilisés plus fréquemment pour les recherches sonochimiques dans les laboratoires, parce qu'ils peuvent atteindre de plus grandes amplitudes vibratoires. Le système à sonde immergée peut délivrer directement au mélange réactionnel de grandes intensités d'ondes d'ultrasons, et ce en variant l'amplitude au transducteur.

Les transducteurs modernes qui sont utilisés dans les systèmes ultrasoniques sont presque tous basés sur un schéma piézoélectrique accentué.

Les piézoélectriques sont constitués de zirconate de titanate dont le rôle est d'avoir une haute activité associée à des pertes minimales. Ils conviennent parfaitement pour former la base d'un transducteur effectif et accidenté (**Grewell, 2003**).

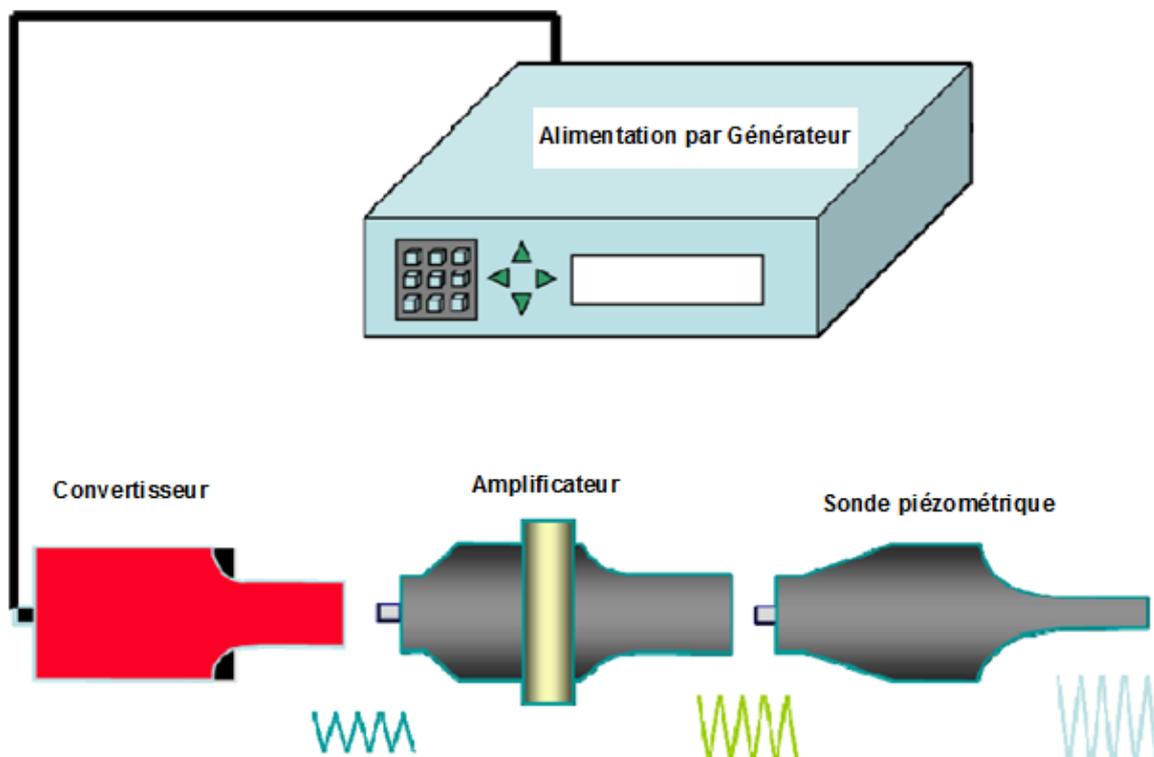


Figure I.9: Système à sonde immergée (**Chand, 2008**)

Utiliser les systèmes d'ultrasons à sonde immergée présente cependant les inconvénients suivants:

- Une érosion et un effritement de la pointe de la sonde, ce qui pourrait occasionner une contamination de la solution en réaction ;
- À cause des pertes géométriques et des problèmes de découplage acoustique, il est impossible de transmettre des intensités de cavitation à une immersion de la sonde à moins de 2-5 centimètres ;
- Les systèmes à sonde immergée ne peuvent pas transmettre des ultrasons à un grand volume réactionnel ;
- Les hautes intensités augmentent la possibilité d'altérer et d'endommager l'appareil et le fait qu'il puisse tomber en panne.

I.3.2. Applications de la cavitation en traitement des eaux

I.3.2.1. Amélioration de la biodégradabilité des polluants

L'efficacité des techniques d'oxydation biologique est souvent gênée par la présence de matériaux bio-réfractaires. La cavitation peut être utilisée comme technique supplémentaire à l'oxydation biologique conventionnelle. Elle permet de réduire la toxicité des effluents en augmentant leurs biodégradabilités. Pour un traitement des hydrocarbures chlorés (Trichloroéthylène et Perchloroéthylène), **Mastin et al. (2001)** ont montré qu'avec un réacteur à cavitation (137 W, 20 kHz, 20°C, 2 L) couplé à un traitement biologique, le rendement de biodégradation de la TCE est de 40 à 80 % selon la concentration initiale. Le plus important est que la concentration résiduelle à la fin du traitement par ultrason était toujours en dessous du niveau de toxicité pour l'oxydation biologique. **Sangave et Pandit (2004)** et **Sangave et al. (2007)** ont aussi rapporté une amélioration de la biodégradabilité des eaux usées en utilisant des réacteurs à ultrason.

I.3.2.2. Amélioration de la digestion anaérobie

En traitement biologique des eaux usées, de grandes quantités de boues sont produites en continu. En effet, la boue doit être stabilisée par digestion anaérobie en vue d'une utilisation écologiquement propre.

Le processus de la digestion anaérobie passe par plusieurs étapes: l'hydrolyse, l'acidogénèse et la méthanogénèse. Dû aux faibles taux d'hydrolyse de la boue biologique, le processus de la digestion anaérobie est lent, ce qui nécessite de grands fermenteurs (digesteurs) avec des temps de séjour allant de 30 à 40 jours. Les réacteurs à ultrasons peuvent être utilisés efficacement pour améliorer l'hydrolyse de la boue, par une réduction considérable du temps de la digestion (**Bougrier et al., 2005; Nickel et Neis, 2007**).

Bougrier et al. (2005) ont montré que les ultrasons induisant une cavitation pendant la digestion anaérobie ont un effet sur la solubilisation de la boue et sur la production du biogaz. Il a été rapporté que la DCO et la solubilité de l'azote augmentent avec l'énergie ultrasonique fournie et une amélioration de la production de biogaz. L'intensification a été attribuée à la réduction de la taille des floccs et la lyse cellulaire.

Nickel et Neis (2007) ont étudié l'impact de la désintégration des biosolides et ces conséquences sur la digestion anaérobie des boues. Ils ont rapporté que les ultrasons améliorent significativement toutes les étapes du process avec une augmentation du taux de dégradation des solides volatils (environ 40 %), une production de biogaz augmentée et une réduction de la matière organique non biodégradable de 60 à 52 %.

I.3.2.3. Amélioration du procédé à boues activées

Le traitement des eaux par boues activées est communément le plus utilisé à travers le monde, avec une efficacité acceptable et une réduction typique de la demande biologique en oxygène (DBO) et la demande chimique en oxygène (DCO) autour de 90 % et 80 % respectivement.

Le procédé à boues activées est en développement continu et beaucoup d'améliorations ont été industrialisées y compris les bioréacteurs à membrane (MBR) et les réacteurs batch séquentiels (SBR).

Récemment, des nouvelles techniques ont été associées au traitement biologique des eaux usées par boues activées, fournissant ainsi des possibilités d'améliorer les performances du procédé en augmentant l'activité microbienne. L'une des approches récemment utilisées pour augmenter l'activité microbienne des boues est de stimuler la biomasse via des méthodes physico-chimiques simples. Il est connu que les radiations UV à faibles doses peuvent stimuler la croissance des bactéries. Les ondes ultrasons de basses fréquences et de faibles énergies permettent d'augmenter la concentration de microorganismes et améliorent la performance des bioréacteurs de fermentation (**Yusuf, 2003**).

Afin d'améliorer les performances de production d'hydrogène, une étude a été réalisée par **Wang et al. (2012)** qui ont utilisé un photo-bioréacteur en continu avec *Rhodospseudomonas palustris* CQK 01 en suspension soumise à un traitement aux ultrasons après une période de start-up, à une fréquence de 20 kHz et la performance de production d'hydrogène a été évaluée. En effet l'agitation par les ultrasons a fait considérablement chuter la concentration de substrat (glucose) dans la suspension de 300 à 50 $\mu\text{mol.L}^{-1}$, et a fait augmenter considérablement le taux de conversion et le rendement de production d'hydrogène comparativement à un photo-

bioréacteur conventionnel. Par ailleurs les effets de l'intensité, du temps d'application des ultrasons, le débit de circulation du substrat et sa concentration ont été étudiés et discutés. La production maximale d'hydrogène dans le photo-bioréacteur en continu avec un traitement aux ultrasons a été obtenue sous les conditions suivantes : une intensité d'ultrasons de 40 W, un rapport agitation/temps de repos de 3/7 s, une concentration en substrat de 75 mmol.L⁻¹ et un débit de circulation du substrat de 40 mL.h⁻¹, conduisant à un taux de production d'hydrogène de 1,12 mmol.L⁻¹.h⁻¹ et un rendement de production d'hydrogène de 0,23 mol-H₂.mol⁻¹ glucose .

Schlafer et al. (2000) ont aussi rapporté que l'irradiation aux ultrasons à 0,3 W.L⁻¹ et 25 kHz permet une augmentation de la biomasse de 230 % après 5 heures de traitement, ainsi qu'une augmentation de l'activité de *S. cerevisiae* de 50 % après 7 heures. Cette méthode a été également utilisée pour améliorer l'efficacité du traitement des eaux usées des unités de production de vin, en réduisant la concentration en glucose de l'effluent. Les études ont montré que les ultrasons de basses fréquences étaient plus efficaces que les hautes fréquences, ce qui indique que les effets mécaniques de la cavitation dominent les effets chimiques.

Zhang et al. (2008) ont intégré une chambre de sonication externe au procédé à boues activées. Les boues activées ont été irradiées dans la chambre de sonication, puis réintroduites au système de traitement des eaux. Le volume de la boue concentrée représente 10 % du volume total de l'eau usée à traiter et donc l'application de l'énergie ultrasonique pourrait être réduite de 90 %.

I.3.2.4. Effet sur la lyse de la biomasse

Les procédés aérobies et anaérobies sont les plus communément utilisés en traitement des eaux usées. Ces procédés génèrent de grandes quantités de boue, qui sont constituées principalement de biomasse, d'exopolysaccharides (EPS) avec une grande quantité d'eau (>95 %) qui représentent 5 à 25 % du volume total d'eau traitée (**Xuan et al., 2004**). Dès lors, toute amélioration pour réduire la quantité des boues est toujours bénéfique pour tous les procédés de traitement des eaux usées.

L'énergie ultrasonique a été rapportée comme efficace pour la réduction de l'excès des boues. **Mohammadi et al. (2011)** ont étudié l'effet des ondes ultrasons sur la lyse des boues et son rendement à l'échelle pilote en utilisant un réacteur batch

séquentiel (SBR). Les résultats ont révélé que la réduction de l'excès des boues est affectée par de multiples facteurs: l'intensité fournie aux micro-organismes de la boue, l'énergie utilisée pour la génération des ondes d'ultrasons, la durée du traitement, et le pourcentage des boues exposées au traitement. L'augmentation de l'intensité fournie aux micro-organismes a montré une réduction de l'excès des boues, mais les énergies supérieures à $35000 \text{ kJ.kg}^{-1} \text{ MVS}$ ne produisent aucun effet significatif. De plus, l'augmentation du temps de rétention combiné à une intensité moindre donne de meilleures performances dans la réduction de l'excès des boues.

L'utilisation d'ondes ultrasons pour la réduction de l'excès de boue détériore la qualité de l'effluent du réacteur et permet aussi d'augmenter le volume de boue lysé par les ultrasons. Ces dernières années, les technologies liées aux ultrasons ont été utilisées également comme une option alternative au traitement par la chaleur comme moyen de conservation de la nourriture, ceci en désactivant les micro-organismes et enzymes. Les traitements thermiques présentent des méfaits qui sont de tuer les micro-organismes végétatifs et de détruire les spores, et font disparaître les propriétés organoleptiques.

Dans le but d'atteindre une meilleure réduction de l'excès de boue en utilisant les ultrasons, **He et al. (2011)** ont utilisé un réacteur batch séquentiel avec un temps de rétention hydraulique de 8 h soumis à des ondes ultrasoniques caractérisées par une énergie spécifique de $20 \text{ kWh.kg}^{-1} \text{ ST}$ pour le traitement des eaux usées urbaines. Un nouvel index, EE, a été défini pour évaluer l'efficacité de l'intensité dans le système de réduction de la boue par les ultrasons. Les résultats ont montré que le paramètre opérationnel le plus important était la proportion de boues traitées par ultrasons (SP : sonicated proportion) sur laquelle l'intensité d'ultrasons a été appliquée. En effet, le paramètre SP a montré un impact direct et considérable sur l'efficacité de l'intensité ainsi appliquée. La limite supérieure de la proportion des boues soumises aux ultrasons SP dans cette étude était de 30 %. Au-delà, la qualité de l'effluent est inacceptable. Augmenter la proportion de boue traitée SP engendre une réduction de l'excès des boues plus importante associée à une consommation supplémentaire d'énergie. Quand cette SP était de 30 %, la réduction de l'excès des boues présentait la plus grande valeur (67,6 %) et la consommation d'énergie était la plus grande ($0,101 \text{ kWh.j}^{-1}$).

Le taux de libération des protéines intercellulaires en provenance des cellules de levures sous l'action d'ultrasons est proposé comme un modèle d'évaluation des effets physiques (mécaniques) causés par les ultrasons. La concentration de la protéine a été quantitativement déterminée en utilisant la spectrophotométrie. Différents paramètres ont été examinés à savoir : l'effet de l'origine des cellules de levure, le prétraitement des cellules, et les longueurs d'ondes pour la détermination par spectrophotométrie du contenu de la protéine. L'efficacité de la méthode d'évaluation proposée a été démontrée expérimentalement en changeant les conditions d'irradiation par ultrasons (la concentration des cellules de levure, la température, l'intensité des ultrasons, les types de sondes d'ultrasons, en plus de l'agitation mécanique). Les résultats ont ainsi confirmé les effets physiques des ultrasons sur la production de protéines qui a augmenté linéairement avec l'augmentation de l'intensité, pour atteindre un maximum de 80 mg par gramme de levure à une intensité de 90 W. **(Lida et al., 2008).**

Matériel et méthodes

II. Matériel et méthodes

II.1. Méthodologie expérimentale

II.1.1 Introduction

L'influence des champs magnétiques et des microondes sur l'activité de dénitrification bactérienne a été testée en laboratoire sur des milieux synthétiques, avec différentes boues provenant de stations d'épuration, en mode batch et continu (pour le champ magnétique).

II.1.2. Influence du champ magnétique sur la dénitrification en mode batch

Les essais ont été menés à l'aide du dispositif expérimental décrit sur la figure II.1, les conditions opératoires de référence ont été les suivantes :

- Un volume total liquide de 500 mL contenant seulement de la biomasse, de l'acétate de sodium et du nitrate de sodium introduits sous forme solide, et du tampon phosphate pH 7,5
- Une concentration initiale en N-NO_3^- de 30 mg.L^{-1} , introduite sous forme de NaNO_3 à 182 mg.L^{-1}
- Une concentration initiale en CH_3COONa de 308 mg.L^{-1} calculée de manière à obtenir un rapport massique de C/N de 3 (**Rocher et al.,2008**)
- 50 mL d'une solution de KH_2PO_4 à $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ + 41,1 mL d'une solution de NaOH à $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ + 8,9 mL d'eau distillée pour obtenir un tampon de pH 7,5
- Une concentration en biomasse initiale exprimée en matière sèche de $312 \text{ mg}_{\text{MS}}.\text{L}^{-1}$ équivalant à une DO (660 nm) de 0,4
- Un volume total de 500 mL
- Une température du milieu maintenue à 30°C pendant toute la durée de l'expérience par circulation d'eau
- Un champ magnétique de 20 mT.

L'influence des différentes conditions opératoires sur l'efficacité de la dénitrification a été étudiée en les modifiant individuellement, les autres conditions demeurant celles de référence :

- Le champ magnétique a été fixé à 10, 20 et 33 mT, et 0 mT pour le contrôle
- Le volume réactionnel a été fixé à 250, 375 et 500 mL
- La concentration initiale en nitrate a été fixée à des valeurs de 10 ; 20 ; 30 et $60 \text{ mg N-NO}_3^-.\text{L}^{-1}$; les concentrations en acétate ont été ajustées à chaque fois de manière à maintenir un ratio C/N de 3

- La concentration initiale en biomasse a été fixée à 78, 89, 101, 156, 258, et 312 mg_{MS}.L⁻¹
- Le milieu de culture a été réalisé dans de l'eau du robinet ; les concentrations de nitrate présentes dans l'eau ont été prises en compte dans le calcul des sources d'azote et de carbone.

Afin de tester l'influence des différents paramètres, les expérimentations ont été menées à l'aide de biomasse bactérienne aliquotée et stockée à -80 °C afin d'éviter une variation de celle-ci et de rendre les résultats comparables.

D'autres essais ont été menés dans les conditions de référence ci-dessus pour tester l'influence d'une exposition multiple du milieu au champ magnétique. Dans ce cas la biomasse a d'abord subi cinq expositions durant cinq jours successifs à raison d'une cinétique de 8 heures par jour correspondant au temps nécessaire pour une dégradation totale de 30 mg.L⁻¹ de N-NO₃⁻.

À la fin de chaque cinétique, le réacteur est placé à 4°C jusqu'au lendemain permettant la décantation de la biomasse. Le lendemain, la phase liquide est retirée et une fraction de la biomasse décantée est ajoutée dans un nouveau milieu pour la cinétique suivante à raison de 312 mg_{MS}.L⁻¹. L'excédent de biomasse a été utilisé pour l'extraction d'ADN et l'analyse phylogénique.

À la fin de la cinquième exposition, le champ magnétique a été arrêté et cinq expérimentations en mode batch successives ont été réalisées tout en maintenant les boues à une température de stockage de 4°C durant la nuit et l'ajustement de la concentration bactérienne à 312 mg_{MS}.L⁻¹ avant chaque essai. Enfin la biomasse dénitrifiante obtenue à la fin de la cinquième cinétique en absence de champ magnétique a été à nouveau soumise à un champ d'une induction de 20 mT, et ce dans les mêmes conditions que les expériences précédentes pour à nouveau cinq cinétiques successives.

L'objectif principal de la présente expérience est de mettre en évidence les modifications que peut causer un champ magnétique sur une boue dénitrifiante, ainsi que de tester leurs persurances.

Dans toutes les expérimentations, les concentrations en nitrate, en nitrites, et en acétate (par une mesure de DCO) ont été analysées périodiquement, les constantes cinétiques de disparition du nitrate ont été modélisées par une cinétique d'ordre 0 au moyen d'une linéarisation des données sous Excel.

L'évolution de la population bactérienne du consortium ponctuellement a été également suivie par l'analyse phylogénique et par l'observation au microscope électronique environnemental à balayage.

II.1.3. Influence du champ magnétique sur la dénitrification en mode continu

Les essais ont été menés à l'aide du dispositif expérimental décrit en figure II.1, deux réacteurs ont été alimentés en parallèle, l'un soumis au champ magnétique, le second servant de contrôle. Deux supports de biofiltration ont été utilisés, de la Biolite® et un sous-produit de la fabrication de la brique à usage de construction bâtiment (argile cuite) concassé et tamisé avec une granulométrie de 1-5 mm de diamètre; ce dernier est très intéressant comme nouveau matériau filtrant de par sa grande disponibilité et son faible prix de revient.

Les conditions opératoires ont été les suivantes :

- Température ambiante
- Différents temps de séjour et différentes charges croissantes, de 86 à 684 mg $\text{N-NO}_3^- \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ pour les réacteurs soumis à un champ magnétique et de 86 à 342 mg $\text{N-NO}_3^- \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ pour le réacteur de référence. Ces charges croissantes ont été obtenues en augmentant le débit de la solution concentrée en nutriments (416 mg.L⁻¹ N-NO_3^- soit 2,53 mg.L⁻¹ NaNO_3 et 1,25 g.L⁻¹ C- CH_3COONa soit 4.27 g.L⁻¹ CH_3COONa)
- Deux débits ont été appliqués à l'entrée des colonnes de dénitrification, soit 667 et 833 mL.h⁻¹. Ils sont obtenus par la somme du débit d'eau de ville et de celui de la solution nutritive concentrée. Par exemple pour une charge à l'entrée du réacteur en N-NO_3^- de 86 mg.L⁻¹.h⁻¹, les débits de la solution concentrée de nitrates et l'eau de robinet ont été de 60 mL.h⁻¹ et 773 mL.h⁻¹ respectivement. Les débits de 667 et 833 mL.h⁻¹ correspondent respectivement à des vitesses ascensionnelles de 0,24 et de 0,29 m.h⁻¹ et à des temps de séjour de 0,46 et 0,37 h.

Avant toute opération en mode continu selon les paramètres discutés ci-dessus, 78 mg de biomasse suspendue dans un litre d'une solution contenant du nitrate de sodium à 30 mg.L⁻¹ N-NO_3^- , de l'acétate sodique à 90 mg.L⁻¹ C- CH_3COONa et un tampon phosphate à pH 7,5 ont été mis en circulation en mode batch à travers le massif filtrant afin de permettre aux microorganismes de se fixer dans la porosité et de former ainsi un biofilm. Une fois que la solution devient transparente, nous supposons que la biomasse s'est correctement fixée.

Dans un premier temps, les bioréacteurs sont mis en fonctionnement dans les mêmes conditions opératoires préalablement citées, et cela jusqu'à l'élimination totale d'une charge de $86 \text{ mg.L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1} \text{ N-NO}_3^-$. Ensuite, la charge a été augmentée afin d'explorer les différences de capacités d'épuration entre le réacteur soumis au champ magnétique et celui servant de contrôle.

Le débit des deux pompes assurant le mélange d'eau de robinet et de la solution d'alimentation concentrée en nitrates est fixé par la charge à appliquer à l'entrée du réacteur. Les deux colonnes de dénitrification sont branchées à la même solution de nutriments pour éviter les écarts dus aux erreurs de dosage.

Lorsqu'un régime stationnaire est atteint, correspondant à un minimum de 10 temps de séjour consécutifs, un prélèvement à la sortie de la colonne est effectué afin d'analyser la concentration en nitrate, nitrite et DCO. Afin d'évaluer la production de biomasse par mesure de la matière sèche et de la matière organique, des prélèvements ont été faits à la fin de chaque cycle : la colonne de dénitrification est arrêtée, complètement vidée et le contenu est homogénéisé avant d'effectuer le prélèvement homogène, car la biomasse est plus dense dans les couches basses du réacteur. Les supports sont aussi examinés par microscopie électronique environnementale à balayage et un échantillon est prélevé pour l'analyse phylogénique.

II.1.4. Influence des ultrasons sur la dénitrification en mode batch

L'influence des ultrasons sur la dénitrification a été évaluée en mode batch pour une fréquence fixe de 20 kHz et en faisant varier les principaux paramètres opératoires, à savoir :

- l'intensité des ultrasons, de 40 W à 600 W
- le temps d'exposition en faisant varier le temps de traitement allant de 1 à 9 secondes et le temps de repos allant de 1 à 5 secondes pour une durée totale de 10 secondes
- le pH initial du milieu réactionnel.

Le milieu de culture contient un milieu salin basal (en mg par litre : K_2HPO_4 , 900; KH_2PO_4 , 450; NH_4Cl , 450; MgSO_4 , 200; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 20; FeCl_3 , 5), $290 \text{ mg}_{\text{MS}} \cdot \text{L}^{-1}$ de biomasse, $22,6 \text{ mg.L}^{-1} \text{ N-NO}_3^-$ et $67,8 \text{ mg.L}^{-1} \text{ C-CH}_3\text{COONa}$.

II.2. Réacteurs et instrumentation

II.2.1. Influence du champ magnétique sur la dénitrification en mode batch

Le dispositif expérimental est schématisé par la figure II.1

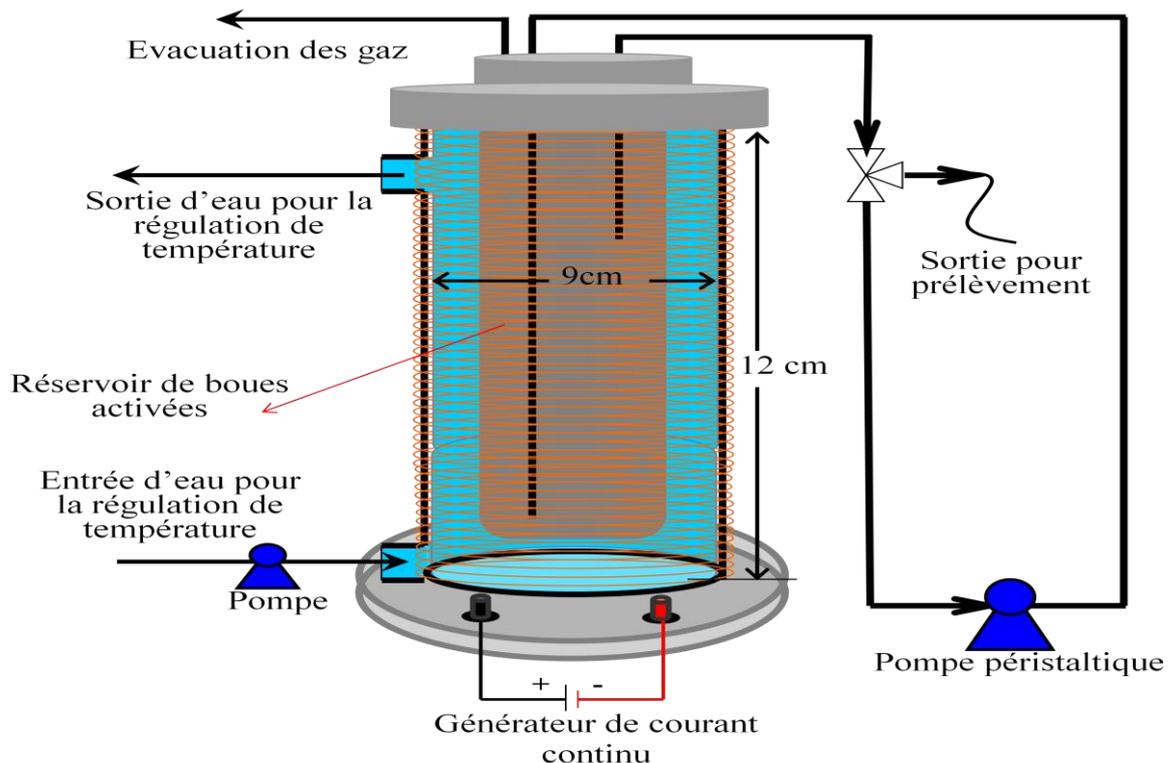


Figure II.1 : Photo accompagnée d'un schéma du montage expérimental de l'essai d'amélioration de la dénitrification biologique par usage de champ magnétique en mode batch

Ce dispositif comprend :

- un solénoïde fabriqué localement à l'aide de 225 m de fil en cuivre de 1,33 mm de diamètre externe (diamètre interne du conducteur est de 1,25mm), enroulé sous forme de spires jointives de 9 cm de diamètre
- un générateur de courant continu (3B scientifique U33020 DC supply 20V/5A-Germany)
- une pompe péristaltique Masterflex 7553-77 (Cole-Parmer instrument CO-Chicago-USA) servant à homogénéiser le milieu réactionnel avec un système de vanne à trois voies pour la prise d'échantillons. Le débit de circulation a été réglé à 200 mL.min⁻¹ afin d'assurer une bonne homogénéisation du milieu
- une colonne en verre d'un diamètre interne de 6 cm et d'un volume total de 600 mL, avec une double paroi afin de pouvoir réguler la température
- un système de circulation d'eau alimenté à l'aide d'un bloc thermorégulateur (Instrulab julabo F10-France) pour maintenir la température égale à 30°C.

II.2.2. Influence du champ magnétique sur la dénitrification en mode continu

Le dispositif expérimental est schématisé par la figure II.2, deux montages décrits ci-dessous ont systématiquement mis en œuvre en parallèle, l'un avec champ magnétique, l'autre sans champ afin de servir de contrôle dont les caractéristiques des colonnes de dénitrification et les paramètres opératoires sont les suivants:

- Les expériences de dénitrification sont réalisées dans une colonne en verre d'une hauteur de 20 cm, d'un diamètre interne de 4,5 cm, donnant un rapport L/D de 4,44 -on considère généralement qu'une valeur L/D ≥ 3 est nécessaire- et un volume total liquide de 500 mL
- Les réacteurs opèrent à température ambiante ($22 \pm 2^\circ\text{C}$), contrairement aux expérimentations réalisées en mode batch.
- 15 cm de colonne ont été remplis par le support, ce qui correspond à la hauteur du solénoïde et à un volume d'environ 200 mL. Ce volume de support est obtenu par 428 g pour la Biolite[®] et 512 g pour la brique. Une grille dont la taille des mailles est inférieure aux dimensions des particules du support a été placée en bas de la colonne permettant ainsi de supporter le matériau filtrant et d'assurer une répartition homogène du flux à dénitrifier. Le volume utile (volume total – volume intrinsèque du support) est alors de 307 et de 292 et

mL pour la Biolite® et pour la brique respectivement. Ces deux volumes utiles sont utilisés pour le calcul des charges et des capacités épuratoires.

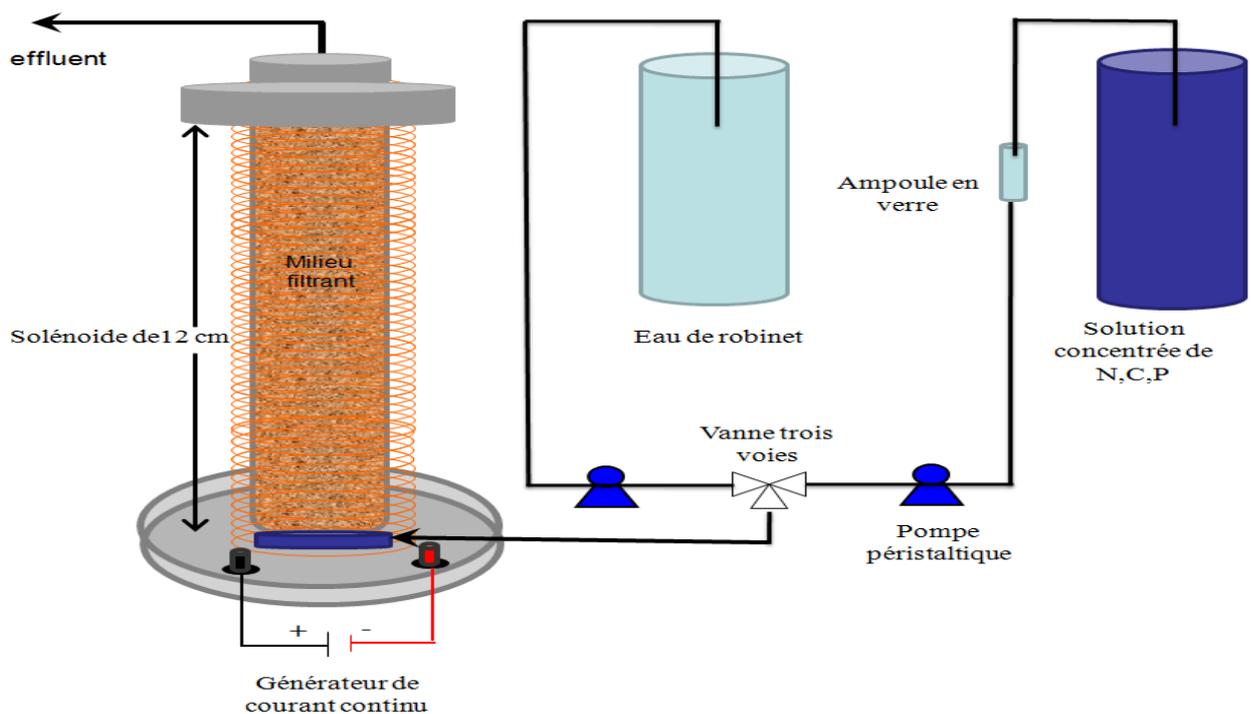


Figure II.2 : photo accompagnée d'un schéma du dispositif expérimental des essais d'amélioration de la dénitrification biologique en mode continu

- L'alimentation est réalisée en continu avec un écoulement ascendant tandis qu'un trop-plein en haut de colonne permet de maintenir le niveau d'eau constant. La colonne demeure par conséquent saturée pendant toute la durée de l'expérience et fonctionne ainsi en absence d'oxygène.
- L'alimentation de la colonne en eau synthétique est assurée par un dispositif composé de deux pompes péristaltiques Masterflex 7553-77 et 7553-87 (Cole-Parmer instrument CO-Chicago-USA) et une vanne trois voies permettant le mélange d'une eau usée synthétique stérile concentrée en nitrates et acétate et tampon avec l'eau de robinet et ainsi de fixer la charge à imposer au réacteur. La solution tamponnée de nitrate est stérilisée à l'autoclave à 121 °C pendant 20 minutes. Pour éviter la dégradation de l'acétate de sodium par la chaleur, il est introduit sous forme solide dans la solution stérile sous hotte à flux laminaire (MSC12, Jouan, France)
- un petit dispositif en verre en forme d'ampoule à décanter a été placé en amont de la pompe péristaltique, afin d'éviter la rétro migration de biomasse dénitrifiante vers les flacons contenant les nitrates
- le solénoïde et le générateur de champ magnétique sont identiques à ceux utilisés pour les essais en mode batch
- la colonisation du massif filtrant a été faite avec la même biomasse utilisée pour les essais en batch dans le but d'écartier toute influence due à la diversité phylogénique des populations de boues activées.

Les deux supports ont été caractérisés à l'UTC dont les principaux paramètres mesurés sont :

- La densité : elle a été mesurée à l'aide d'un pycnomètre à hélium (Micrometrics AccuPYC 1330-USA). L'hélium en raison de son faible diamètre moléculaire permet de fournir une mesure de grande précision. Elle est exprimée en g.cm^{-3}
- La surface spécifique : est l'une des caractéristiques les plus recherchées en biofiltration des eaux sur support granulaire. Elle a été mesurée avec la méthode BET après analyse des isothermes d'adsorption de l'azote liquide sur les deux supports (transformée BET) avec un porosimètre micrometrics ASAP 2010. La transformée BET permet également la détermination de la taille

moyenne des pores. La surface spécifique calculée par la méthode BET est exprimée en $\text{m}^2.\text{g}^{-1}$, tandis que la taille moyenne des pores est en nm.

- La porosité : elle est le siège des premières fixations de la biomasse épuratrice sur le matériau support. Sa détermination permet de prévoir les potentialités de biofiltration, elle est mesurée au moyen d'un porosimètre à mercure (Micrometrics autoPore IV 9500 V1.07-USA). Les valeurs de la porosité des supports utilisés sont exprimées en pourcentage.

-La résistance à l'attrition de ces supports a été également déterminée, car les systèmes à lit fixe ou fluidisé requièrent la présence de particules qui doivent rester dans l'enceinte de la réaction pendant toute la durée considérée. Toute attrition de petites particules peut affecter les conditions opérationnelles du procédé surtout quand le process comporte des opérations de filtration. La résistance à l'attrition correspond d'après **Waldie et Robinson (1980)** à la masse de fines particules libérées par unité de temps (h). Elle a été déterminée par filtration d'une eau mise en circulation en boucle fermée à travers une colonne remplie de support (200 g). Le débit utilisé de $3 \text{ L}.\text{min}^{-1}$ correspond au débit moyen de circulation des eaux à dénitrifier au travers un bassin de dénitrification en station d'épuration. Des mesures régulières du pourcentage d'attrition ont été faites par filtration des eaux mises en contact avec le support à travers un filtre papier d'une porosité de 3 à 6 μm de diamètre. Le filtre humide contenant les fines particules résultantes de l'attrition du support est ensuite séché à l'étuve pendant 24 heures à 105°C . La différence entre la masse du papier filtre après étuvage et avant filtration correspond à la quantité de particules fines résultantes de l'attrition du support. Les résultats de l'attrition sont exprimés en gramme de particules fines par kilogramme de support.

II.2.3. Caractérisation du champ magnétique

Le dispositif expérimental a été conçu pour générer un champ magnétique le plus homogène possible. La distribution du champ magnétique à l'intérieur du solénoïde a été mesurée à l'aide d'un Gaussmètre de laboratoire de type BGM101 (Brockhaus measurement, Germany) doté d'une sonde de 125 x 75 x 25 mm. La précision du système de mesure du champ est de 0,05 %, et la gamme de mesure est de 0,5 à 33 mT.

Les valeurs enregistrées n'étant pas très parlantes à première vue, nous avons donc décidé de modéliser la bobine et le champ magnétique généré, afin de faciliter la lecture. Cela nous permettra d'avoir une cartographie plus visuelle de la répartition du champ magnétique dans la bobine pour un courant de 3 A.

Nous avons donc décidé d'écrire un programme en Scilab qui représente le champ magnétique avec un code couleur généré automatiquement par le logiciel. Pour cela nous avons représenté les données en 2 et 3 dimensions (Figure II.3). Les axes x et y permettent de représenter la bobine en cm (rayon et hauteur) et l'axe z la valeur du champ en mT. Scilab colorie automatiquement la surface en fonction de z. Voici les résultats obtenus avec les données brutes : plus la couleur est claire, plus le champ est intense.

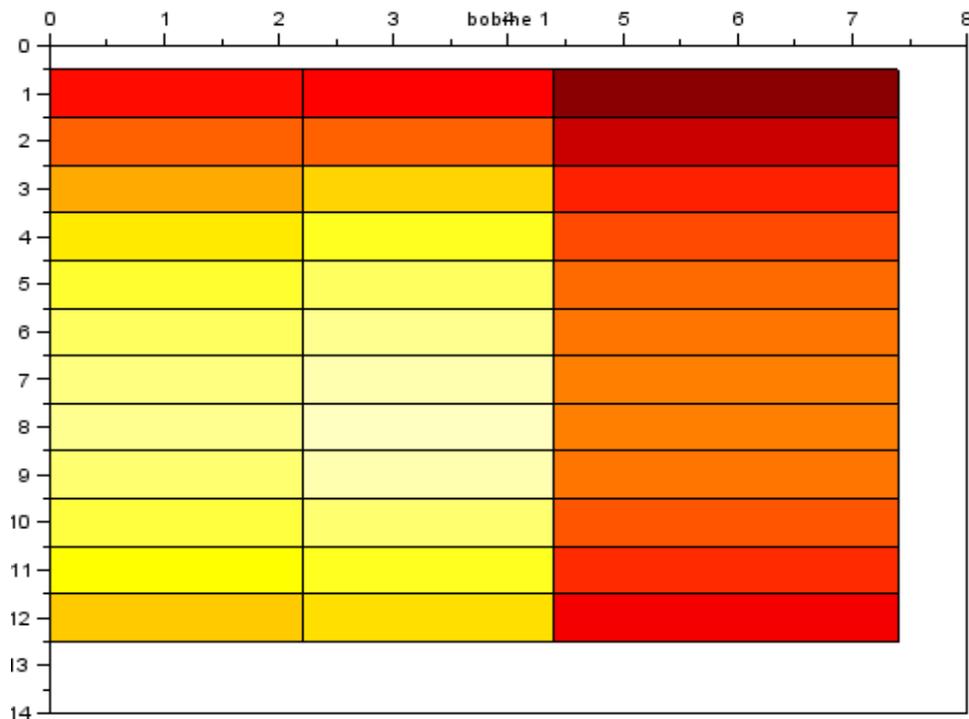


Figure II.3: Résultats Scilab (représentation 3D vue de dessus).

La fonction « spline » et la fonction « interp3d » nous ont permis d'obtenir une approximation de la fonction passant par le maximum de points mesurés (Figure II.4)

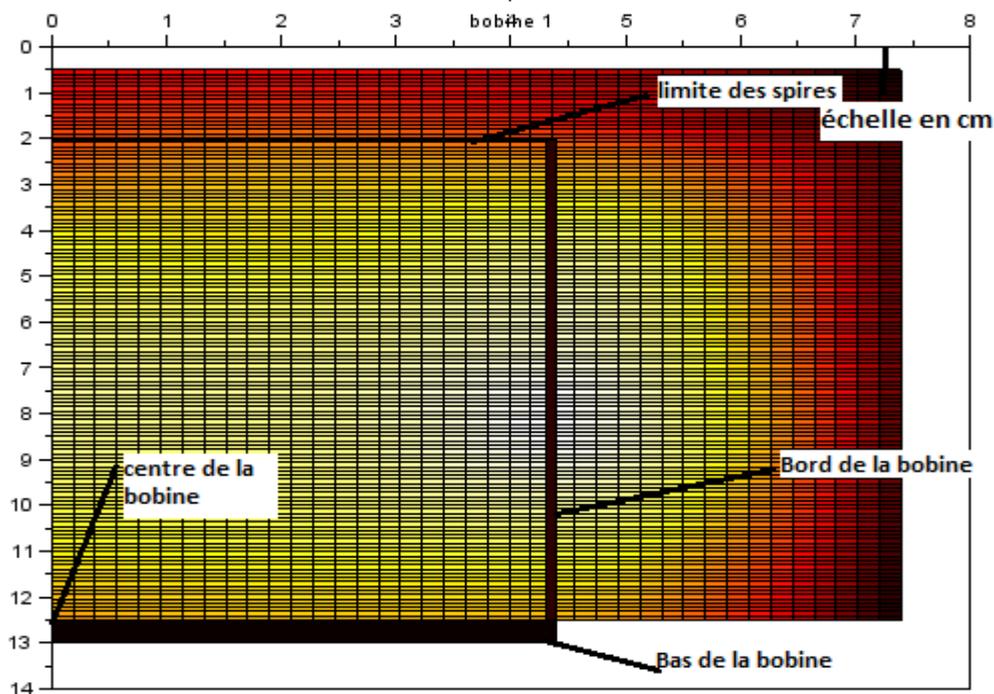


Figure II.4: Résultat Scilab des données du solénoïde extrapolées grâce à la fonction spline. (Représentation 3D vue de dessus).

Il est à noter que cette cartographie a été établie à vide (air) puis testée en présence d'un milieu liquide afin de vérifier la possibilité de variation de la distribution des lignes de champ. Les valeurs enregistrées ont montré que l'induction magnétique et la distribution des lignes de champ restent inchangées, quelle que soit la nature du milieu dont ils traversent.

II.2.4. Influence des ultrasons à faible fréquence sur la dénitrification en mode batch

Les expériences de dénitrification sont réalisées dans deux réacteurs en verre identiques de 500 mL, le premier servant de contrôle et le second étant couplé à un système de production d'ondes ultrasons composé d'une sonde de forme piézométrique se terminant par une tête faisant 6 mm de diamètre et un générateur électrique permettant une régulation de l'intensité ainsi que la fréquence (JY92-IIN, China). La sonde à ultrasons est plongée dans le mélange réactionnel à une profondeur de deux centimètres (Figure II.5).

La température du réacteur est maintenue à 30°C à l'aide d'un système de refroidissement en double paroi permettant ainsi d'exclure l'effet dû aux variations de température. L'alimentation est mélangée à la boue à une concentration en biomasse

bactérienne égale à 290 mg.L^{-1} , le mélange est introduit dans le système fermé à l'atmosphère fonctionnant ainsi en absence d'oxygène. Le réacteur est muni d'un point de prélèvement pour la prise d'échantillons afin de déterminer la concentration en nitrates et en nitrites à divers temps et donc d'évaluer les rendements d'élimination des nitrates en fonction du temps.

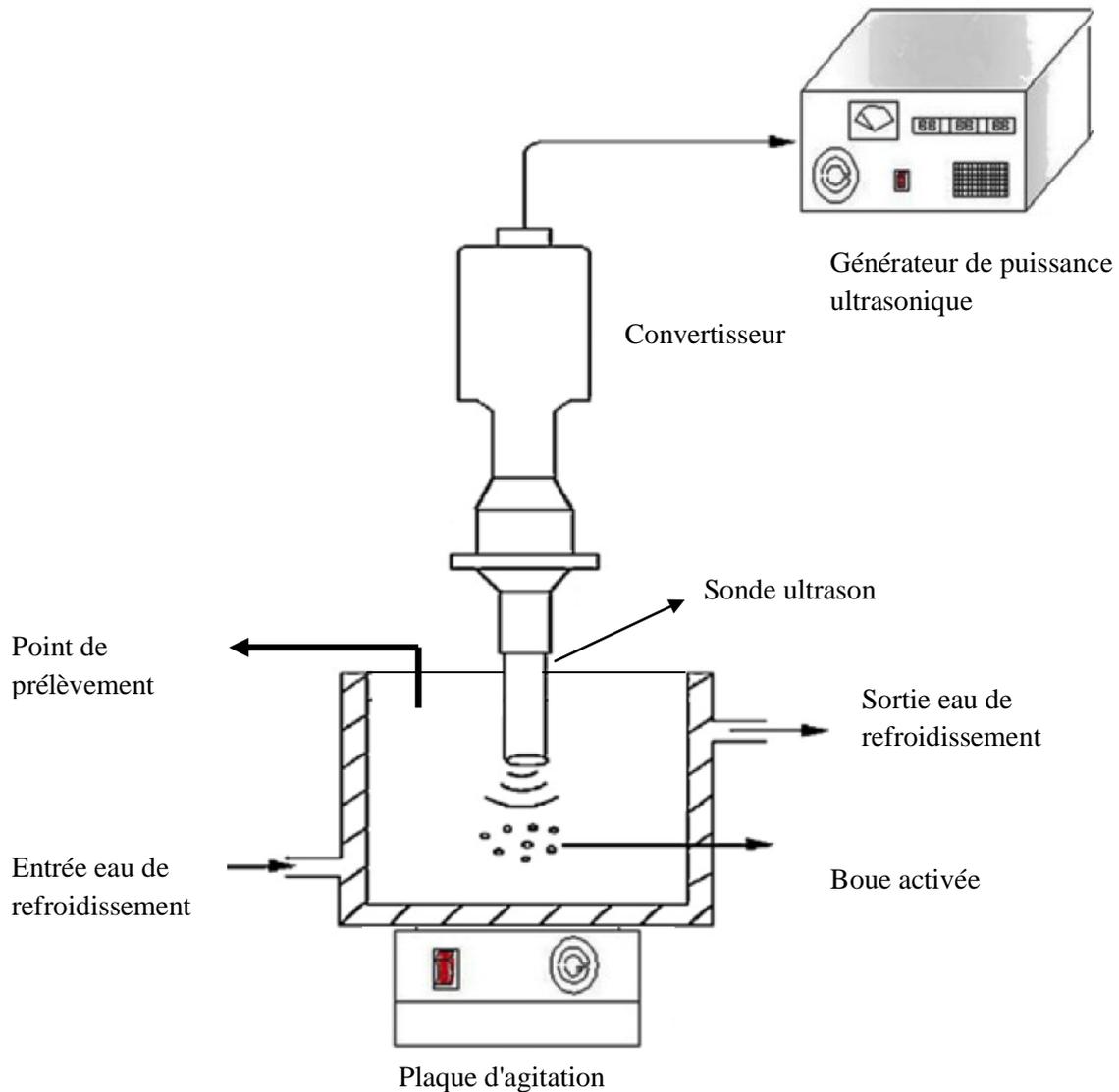


Figure II.5 : Dispositif expérimental des essais d'amélioration de la dénitrification biologique par usage d'ultrasons à faible fréquence.

II.3 Matériel biologique

II.3.1. Origine et préparation des boues activées

Deux boues différentes ont été utilisées dans ce travail. Pour les essais relatifs à l'influence des champs magnétiques, la boue activée a été prélevée du bassin de dénitrification de la station de traitement des eaux usées de Seine-Centre du SIAAP (Syndicat Interdépartemental pour l'Assainissement de l'Agglomération Parisienne), à Colombes, France.

Pour les essais relatifs à l'influence des ultrasons, la boue a été prélevée au niveau de la station d'épuration des eaux usées de Baraki dans la wilaya d'Alger, Algérie. La courbe étalon reliant la biomasse à la densité optique a été préalablement établie afin de pouvoir utiliser la mesure de la densité optique comme moyen d'ajustement de la concentration en biomasse (Figure II.6).

Lors de la mise en place du bioréacteur, il est important d'utiliser une biomasse capable de dégrader le polluant ciblé. Pour cette raison une adaptation au substrat dans les conditions de fonctionnement est parfois nécessaire pour la mise en marche du bioréacteur. Si cela ne pose pas de problème pour les boues prélevées du réacteur de dénitrification du SIAAP, ce n'est pas le cas pour les boues de la station de Baraki, pour lesquels une adaptation des microorganismes a été nécessaire.

II.3.2. Acclimatation des boues activées

La première étape a été de laver la boue puis de l'enrichir afin qu'elle soit à même d'effectuer une cinétique en 8 heures. L'étape de lavage permet d'éliminer les particules inactives en suspension pour ne garder que la partie active. Cette opération se fait par une série de rinçage suivie d'une décantation jusqu'à obtention d'une eau claire après décantation de la boue. Cette étape doit être régulièrement effectuée, car les bactéries présentes dans la boue produisent des impuretés en continu. L'enrichissement consiste en l'introduction de divers éléments chimiques utiles pour les bactéries en particulier pour les bactéries dénitrifiantes anaérobies que nous voulons favoriser. Il s'agit d'un milieu basal auquel on ajoute des nitrates, phosphates et acétates.

Environ 1 litre de boue a été prélevé dans la station d'épuration de Baraki-Alger préalablement lavée et ensuite acclimaté avec une alimentation riche en nitrates afin de favoriser le développement de la biomasse dénitrifiante dans un réacteur de 2 litres agité par un barreau magnétique. La solution est constituée d'un milieu salin

basal (voir section II.1.4), de $0,595 \text{ g.L}^{-1}$ de NaNO_3 soit 98 mg.L^{-1} N-NO_3^- et de $1,171 \text{ g.L}^{-1}$ de CH_3COONa . Le dispositif fonctionne en anoxie à la température du laboratoire ($20\text{-}25 \text{ }^\circ\text{C}$) avec des quantités suffisantes d'acétate de calcium comme source de carbone ainsi qu'une agitation modérée pour homogénéiser le milieu. Le dispositif fonctionne en mode discontinu. Un suivi de la concentration en nitrates et nitrites est effectué régulièrement et la solution d'alimentation est renouvelée quand la concentration en nitrates diminue en dessous de la norme. Une fois que la consommation des nitrates est réalisée au bout d'un temps relativement court (10 heures), nous estimons que les boues sont aptes à dénitrifier.

II.3.3. Conservation des boues activées

Lorsque les bactéries sont capables de faire une cinétique en 8 heures, il ne faut plus que leur population croisse. En effet, elles n'ont plus besoin d'être enrichies et les laisser produire des particules inactives peut nuire aux cinétiques. D'où, si ces particules sont prélevées à la place des bactéries, nous aurons la bonne quantité de matière sèche, mais elle ne sera pas active pour autant. La cinétique ne se fera pas correctement.

La congélation est donc un moyen de figer les populations de bactéries à un moment où elles sont actives et efficaces et de retrouver leur efficacité après décongélation. Avant de les congeler, nous avons réparti la boue dans des tubes Falcon de 50 mL. Dans chaque tube Falcon nous avons mis la quantité de boue nécessaire à une cinétique, afin d'éviter toute évolution de la biomasse, et nous assurer que les cinétiques ont bien été menées dans les mêmes conditions.

Les boues dénitrifiantes ainsi fractionnées ont été conservées à -80°C dans une solution de glycérol de 20 % vol./vol. Avant usage, chaque volume a été dégelé puis lavé plusieurs fois avec la solution tampon pH 7,5 et centrifugé afin d'éliminer le glycérol dans lequel elle a été conservée. La séparation des phases a été réalisée par centrifugation à 6790 g (7500 rpm) pendant 10 min (centrifugeuse Eppendorf 5810R, Germany). Enfin, la biomasse est suspendue dans 500 mL de solution tampon pH 7,5, ce qui correspond à une concentration de $312 \text{ mg}_{\text{MS}}.\text{L}^{-1}$ pour les boues issues du SIAAP et $290 \text{ mg}_{\text{MS}}.\text{L}^{-1}$ pour les boues issues de la station de Baraki.

II.3.4. Détermination de la relation matière sèche (MS) en fonction de la DO

Afin de faciliter les mesures de la quantité de biomasse exprimée en matière sèche ($\text{mg}_{\text{MS}}\cdot\text{L}^{-1}$), nous avons établi une courbe d'étalonnage MS en fonction de la DO. Ainsi en connaissant la DO d'un milieu, nous pourrions remonter à la concentration en matière sèche grâce à cette courbe. Nous utilisons donc le protocole matière sèche en fonction de DO ce qui nous permet d'avoir la relation recherchée. Dans un premier temps nous préparons nos échantillons de façon à obtenir la gamme de DO voulue. La courbe $\text{MS} = f(\text{DO})$ ci-dessous permet de déterminer la matière sèche associée à chaque DO.

Nous pouvons donc remonter à l'aide de la DO à la valeur de la concentration en matière sèche en utilisant les équations suivantes: $\text{MS}=0,7068 \times \text{DO}$ pour la boue de la SIAAP de Paris et $\text{MS}=0,7305 \times \text{DO}$ pour la boue de SEAAL d'Alger.

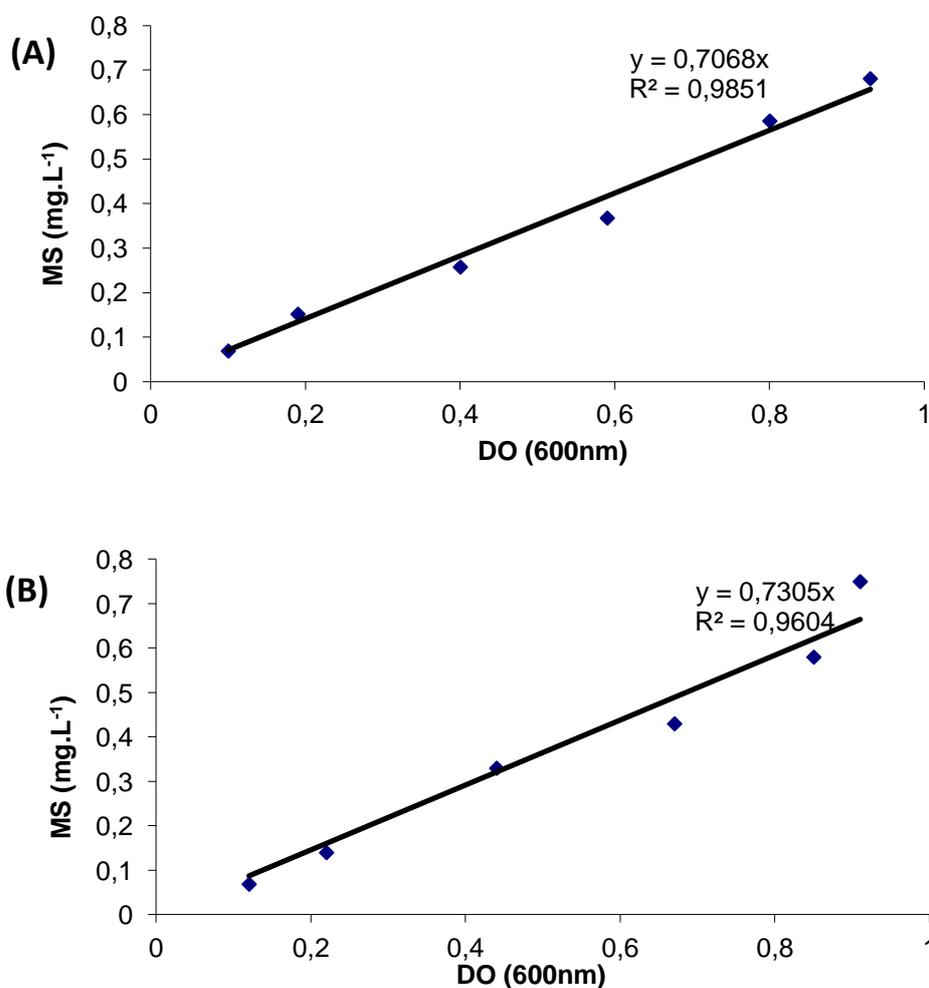


Figure II.6: Courbes étalons $\text{MS} = f(\text{DO})$ pour les deux boues utilisées dans la présente étude: **A**-Boue de la SIAAP de Paris; **B**-Boue de SEAAL d'Alger

II.4. Méthodes d'analyses

II.4.1. Dosage des espèces chimiques

Le dosage des nitrates, nitrites et la détermination de la demande chimique en oxygène a été réalisé par méthodes spectrophotométriques, suivant les normes AFNOR NF 90012, AFNOR NF 90013 et à l'aide de kits commerciaux Spectroquant 114764, 114776.0001 et 114540.001 respectivement (Merck KGaA, Germany)

II.4.2. Extraction d'ADN et analyse phylogénique des populations

Afin de suivre l'évolution des populations bactériennes après exposition au champ magnétique, des échantillons de biomasse ont été prélevés à la fin de chaque cycle pour les deux types d'expérimentations en batch et en continu. Les échantillons ainsi prélevés ont subi une extraction d'ADN par la méthode au phénol-chloroforme qui est un procédé d'extraction liquide-liquide pour séparer les acides nucléiques des protéines (**Serghini et al.,1989**).

Les échantillons d'ADN ainsi obtenu ont subi une deuxième purification avec des kits Powersoil (Mobio) pour éliminer les polysaccharides qui viennent gêner l'amplification de l'ADN par PCR. Un contrôle de qualité est réalisé par mesure de l'absorption à des longueurs d'onde de 260 et 280 nm, et un rapport $\frac{DO(260nm)}{DO(280nm)}$ entre

1.8 et 2 est nécessaire. L'analyse phylogénique et le traitement informatique des résultats ont été sous-traités au laboratoire DNAVision SA (Gosselies, Belgique).

II.4.3. Observations microscopiques

En plus de l'analyse phylogénique des populations, des observations au microscope électronique environnemental à balayage (Philips XL30 ESEM-FEG) ont été réalisées à l'UTC à la fin de chaque manipulation afin d'explorer les modifications susceptibles d'être apportées par une exposition au champ magnétique. Les échantillons de boues activées issus des cinétiques de dénitrification en batch ont été lavés avec de l'eau physiologique à 9 g.L⁻¹ de chlorure de sodium afin d'éliminer l'excès d'EPS (Exo Poly Saccharides) gênant la visualisation des formes bactériennes présentes dans le milieu.

II.4.4. Traitement des résultats

Afin de déterminer l'effet susceptible d'être causé par une exposition au champ magnétique et les ondes ultrasons sur la dénitrification biologique, nous avons utilisé la fonction « DROITEREG » sur Excel permettant d'obtenir une série de données sur la régression linéaire de la cinétique de dénitrification.

Résultats et discussion

III. Résultats et discussions

III.1. Effet du champ magnétique sur la dénitrification en mode Batch.

III.1.1 Effet de l'induction magnétique

Afin de mettre en évidence l'effet que peut causer un champ magnétique sur une boue activée en dénitrification, nous avons supposé que la dénitrification présente une cinétique apparente d'ordre zéro, et donc déterminé constante cinétique de disparition des nitrates « k » qui s'exprime en mg de $N-NO_3^- \cdot L^{-1} \cdot h^{-1}$. La figure III.2 montre que la constante de vitesse augmente avec le champ magnétique. Toutefois le champ magnétique ne semble pas avoir une influence importante sur la vitesse de dégradation des nitrates entre 0 et 10 mT (figure III.1).

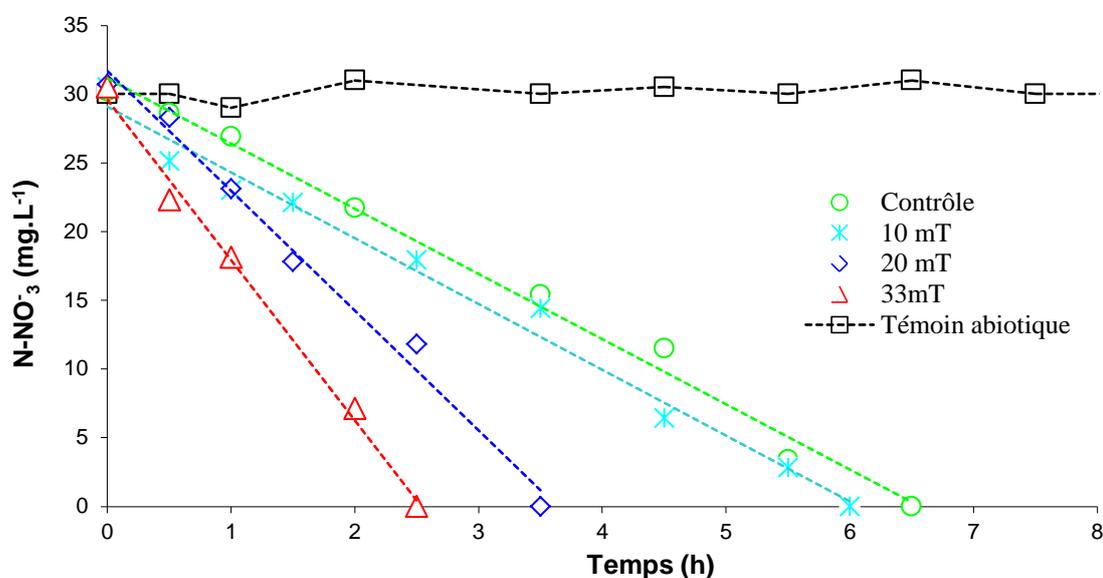


Figure III.1 : Cinétiques de dénitrification sous différentes inductions magnétiques.

La variation de la concentration de nitrate en fonction du temps est affine, ce qui correspond bien à une réaction d'ordre 0 :

$$r = \frac{-d[N - NO_3^-]}{dt} = k$$

Qui s'intègre en

$$[N-NO_3^-] = -kt + cst$$

Avec

- $cst = [N-NO_3^-]_{init}$ en $mol.L^{-1}$.
- k , la constante cinétique, en $mol.L^{-1}.h^{-1}$.

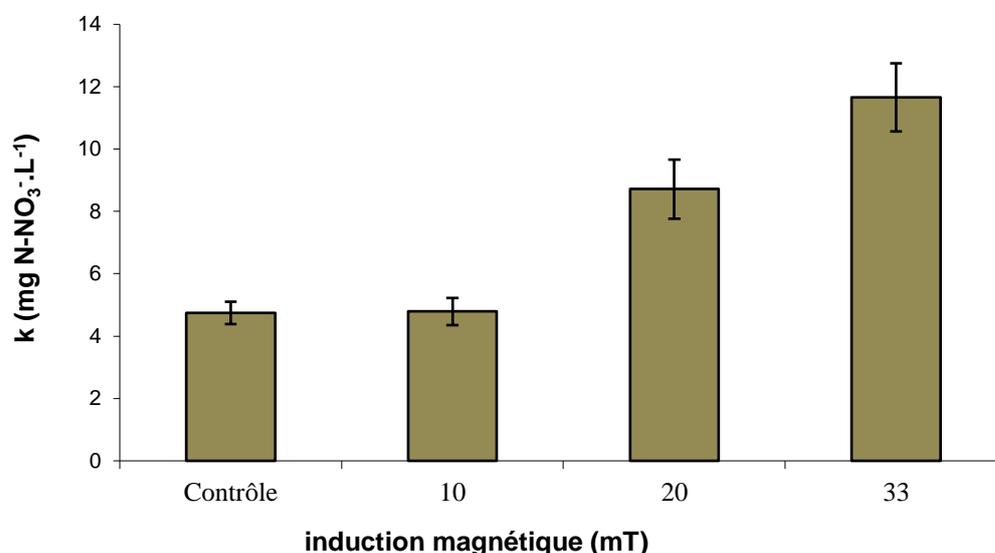


Figure III.2: Effet de l'induction électromagnétique sur la vitesse de dénitrification.

L'analyse de la figure III.2 montre que la constante cinétique de dégradation des nitrates augmente avec le champ magnétique. En effet, des variations notables de la vitesse de dénitrification (k) exprimée en $mg N-NO_3^-.L^{-1}.h^{-1}$ ont été enregistrées, avec des moyennes allant de $4,7 \pm 0,4$; $4,8 \pm 0,4$; $8,7 \pm 0,9$ et $11,6 \pm 1,1$ pour des inductions de 0 mT; 10 mT; 20 mT et 33 mT respectivement, soit une amélioration de 84% et 146% pour des inductions de 20 mT et 33 mT. Nous rappelons que toutes les cinétiques ont été réalisées dans les mêmes conditions opératoires avec un témoin abiotique à une induction de 20 mT qui a montré que les nitrates ne se dégradent pas sous l'effet d'un champ magnétique seul. En effet, les résultats obtenus permettent d'attribuer l'effet observé à l'action du champ électromagnétique imposé aux populations dénitrifiantes.

Pour la suite du travail, nous avons choisi l'induction de 20 mT. Ce choix est fondé sur le fait qu'à cette induction nous avons enregistré une amélioration de 84 % par rapport au contrôle, avec un faible effet Joule, contrairement à ce qui a été observé

pour l'induction de 33 mT pour le quel le solénoïde dégage une quantité de chaleur plus importante.

III.1.2. Effet de la variation du volume de la réaction sur la cinétique de dénitrification en présence d'un champ magnétique.

Comme décrit précédemment (section II.2.3), la nature de la phase dont les lignes de champ se propagent n'influence pas leurs intensités. Cette donnée nous a laissés penser que le volume de la réaction semble avoir un effet sur l'action du champ électromagnétique sur les populations bactériennes en dénitrification. En effet des cinétiques de dénitrification à différents volumes (500 mL; 375 mL et 250 mL) ont été réalisées à une induction de 20 mT, tout en gardant le rapport Quantité de N-NO_3^- par unité de biomasse constant (mêmes conditions expérimentales à l'exception du volume de la réaction).

Les résultats obtenus (Figure III.3) montrent que la diminution du volume de la réaction semble révéler un effet inverse (effet inhibiteur). En effet des vitesses de dénitrification exprimées en $\text{mg N-NO}_3^- \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ ont été enregistrées, avec une moyenne allant de $2,2 \pm 0,1$; $5,7 \pm 0,5$ et $8,7 \pm 0,5$ pour des volumes de 250 mL; 375 mL et 500 mL, respectivement (Figure III.4).

En s'appuyant sur les résultats des mesures du champ dans les deux phases air et eau, qui ont montré que les lignes de champ restent identiques quelque soit la nature des phases dont ils se propagent, les différences observées entre les cinétiques de dénitrification à différents volumes de la réaction est probablement due à la quantité de biomasse initialement présente dans le milieu réactionnel, car c'est l'unique élément faisant la différence entre les cinétiques réalisées. En effet, les résultats de cette section nous ont laissé penser que le champ magnétique modifie la biodiversité des populations dénitrifiantes; hypothèse à vérifier par une analyse phylogénique de l'ADN.

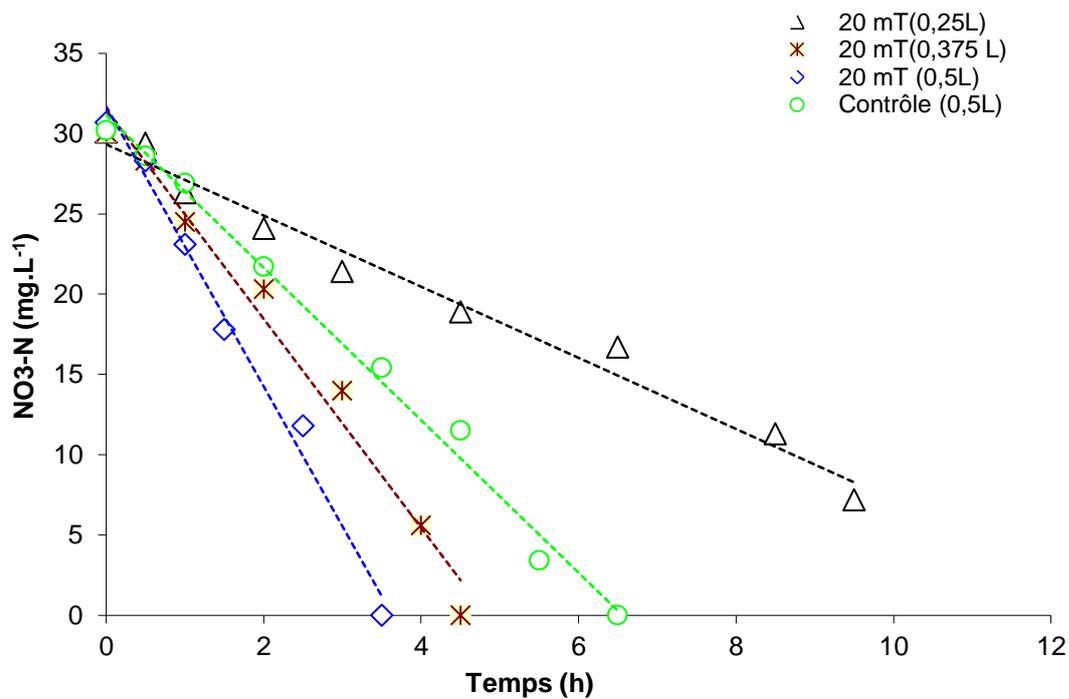


Figure III.3: Cinétiques de dénitrification à différents volumes réactionnels sous un champ magnétique de 20 mT.

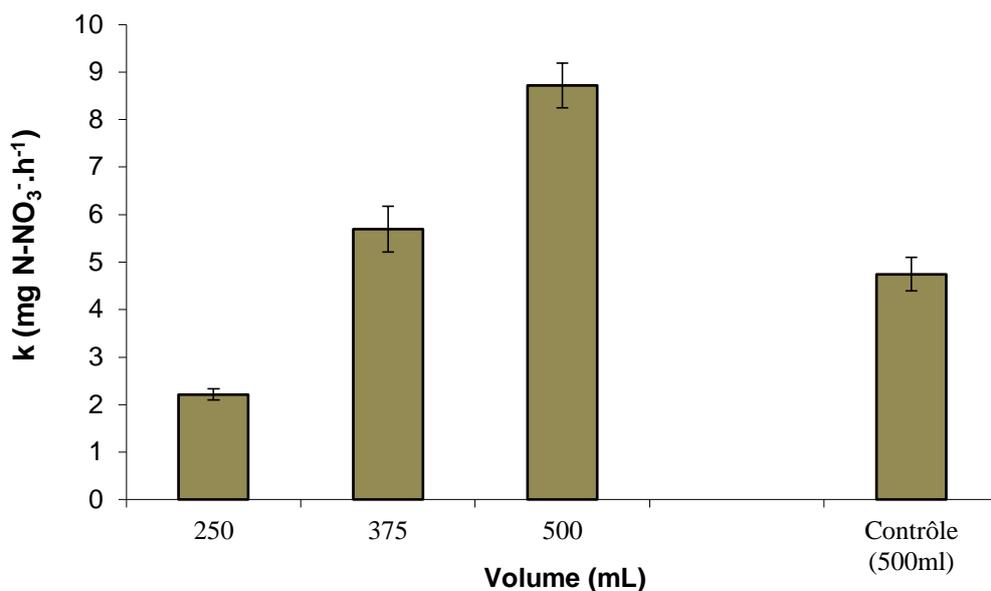


Figure III.4 : Effet de la variation du volume de la réaction sur la cinétique de dénitrification en présence d'un champ magnétique de 20 mT.

III.1.3. Effet de la concentration initiale en biomasse.

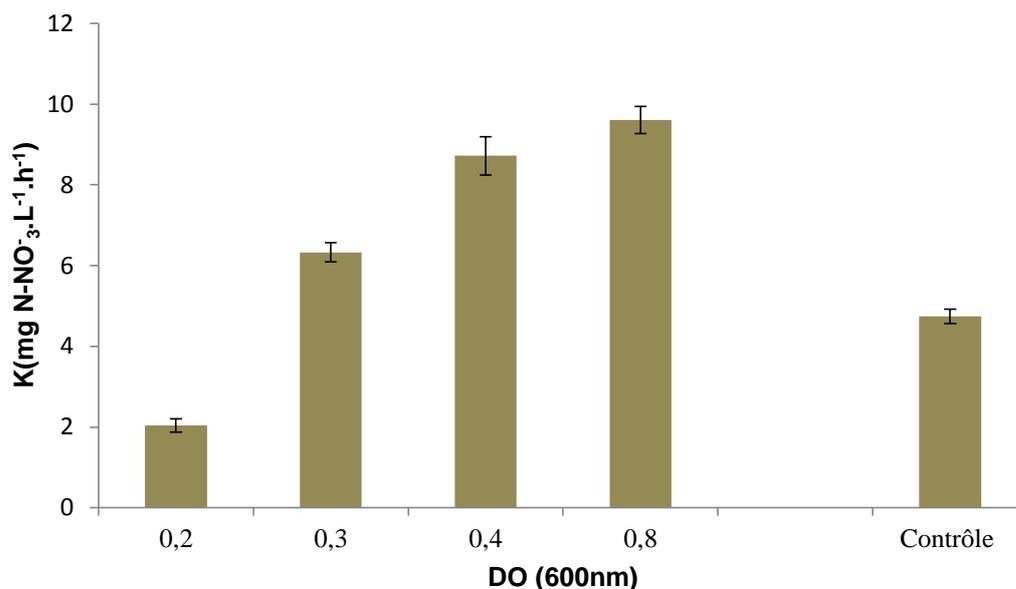


Figure III.5: Effet de la variation de la concentration initiale en biomasse sur la vitesse de dénitrification en mode batch assistée d'un champ magnétique de 20 mT.

Les résultats de la section III.1.2, nous ont laissé penser que la quantité de biomasses dénitrifiantes initialement présentes dans le milieu réactionnel semble un facteur déterminant, pour cela des cinétiques de dénitrification à différentes concentrations en biomasse exprimées en DO (600 nm) ont été réalisées dans les mêmes conditions opératoires et les résultats obtenus sont illustrées dans la figure III.. Les vitesses de dénitrification enregistrées exprimées en $\text{mg N-NO}_3\text{-L}^{-1}\text{.h}^{-1}$ allant de $2,0 \pm 0,2$; $6,3 \pm 0,2$; $8,7 \pm 0,5$ et $9,6 \pm 0,3$ pour des densités optiques de 0,2; 0,3; 0,4 et 0,8 respectivement montrent que la quantité de biomasses initialement présentes dans le milieu réactionnel est un facteur déterminant de l'influence du champ magnétique sur les populations microbiennes en dénitrification biologique.

En effet, ces résultats viennent appuyer ceux de la section précédente, et confirment que l'effet du champ électromagnétique sur les populations microbiennes en dénitrification est en relation avec la quantité de biomasses initialement présentes dans le milieu réactionnel, car c'est l'unique différence entre les cinétiques réalisées sous des conditions expérimentales bien maîtrisées.

III.1.4. Effet de la concentration initiale en nitrates.

Afin d'explorer l'importance de la quantité de nitrates par unité de biomasse initialement présente dans le milieu, des cinétiques de dénitrification sous un champ magnétique et à des concentrations initiales variables allant de 10 à 60 mg.L⁻¹ ont été réalisées à une induction de 20 mT. Les résultats obtenus (Figure III.6) montrent que la concentration initiale en nitrates initialement présente dans le milieu a peu d'influence sur la vitesse de dénitrification assistée par champ magnétique.

En effet des vitesses d'élimination des nitrates du même ordre de grandeur allant de 7,9±0,5; 8,2±0,4; 8,7±0,5 et 9,5±0,1 mg.L⁻¹.h⁻¹ ont été enregistrées pour des concentrations initiales en N-NO₃⁻ de 10; 20; 30 et 60 mg.L⁻¹, respectivement. L'effet du champ électromagnétique semble donc lié à la quantité de biomasses initialement présente dans le milieu réactionnel et non à les concentrations de substrats. Cette conclusion est fortement appuyée par les résultats de la cinétique du témoin abiotique présentés dans la section III.1.1, qui a démontré que le champ électromagnétique n'a aucun effet sur la molécule de nitrate.

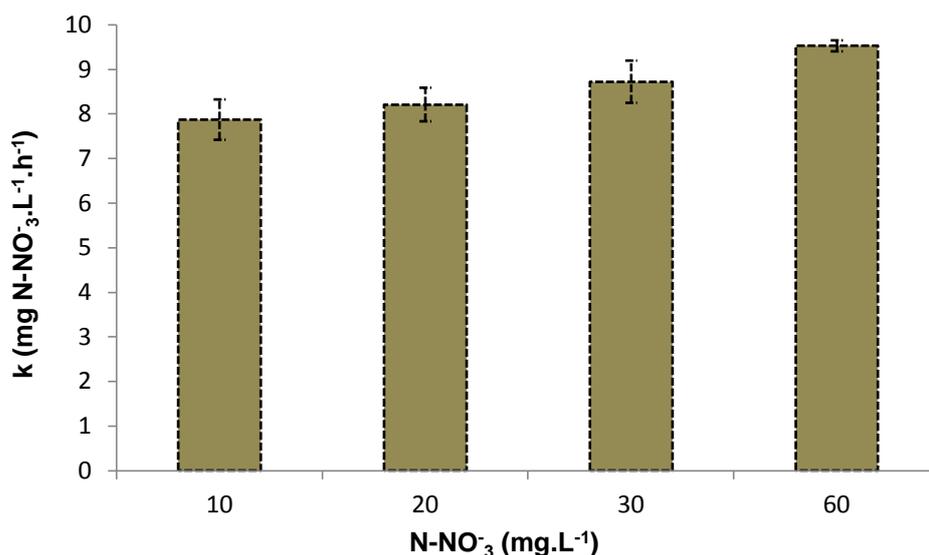


Figure III.6: Effet de la concentration initiale en nitrates sur la vitesse de dénitrification biologique en présence d'un champ magnétique de 20 mT.

L'action du champ électromagnétique sur les populations microbiennes en dénitrification semble donc d'un effet purement biologique, soit par modification des réactions biochimiques et/ou enzymatiques impliquées, soit par modification de la

diversité de la flore initialement présente, en favorisant les germes à haut potentiel dénitrifiant. Cette hypothèse peut être vérifiée par une analyse phylogénique de la population avant et après exposition à un champ électromagnétique.

III.2. Effet d'une exposition multiple au champ électromagnétique sur la dénitrification biologique en mode batch

À l'issue des résultats obtenus dans la section III.1, nous sommes partis sur l'hypothèse que le champ magnétique a une action de sélection des populations bactériennes. Pour cela, des boues identiques à celles qui ont servi aux manipulations précédentes (voir section II.3.3) ont été mises en dénitrification dans les conditions décrites dans la section I.1.2 avec des expositions répétées. L'objectif principal de cette partie de travail est de suivre l'évolution des capacités de dénitrification des boues activées à de multiples expositions en batch, afin de se rapprocher des effets induits par une exposition en continu à un champ magnétique. Les résultats de cette partie du travail permettront donc de bien orienter le mode d'application de ce type de traitement, et de déterminer si les effets induits par des expositions répétées au champ magnétique sont additifs ou non, afin de bien réussir le processus de mise à l'échelle lors du passage d'un bioréacteur de laboratoire vers un bioréacteur pilote avant de l'appliquer à l'échelle industrielle.

En plus du suivi de la vitesse spécifique de disparition des nitrates, nous avons suivi également, la concentration de l'espèce chimique intermédiaire résultant de la dégradation des nitrates par voie biologique, vu son importance capitale. De même, la concentration en substrat carbonée exprimée en DCO dans le milieu réactionnel a été déterminée, afin d'écartier toute possibilité de modification de la cinétique de dénitrification due à une carence en carbone qui est l'accepteur final d'électrons dans une réaction de dénitrification biologique (**Mohan et al., 2016**).

III.2.1 Première phase: Exposition au champ magnétique

La figure III.7 compare les vitesses de dégradation des nitrates, l'évolution de l'apparition et la disparition des nitrites au fil de la cinétique, ainsi que la consommation du substrat carbonée de cinétiques successives de dénitrification par une même boue et dans les mêmes conditions opératoires. De ces résultats nous pouvons émettre les remarques suivantes:

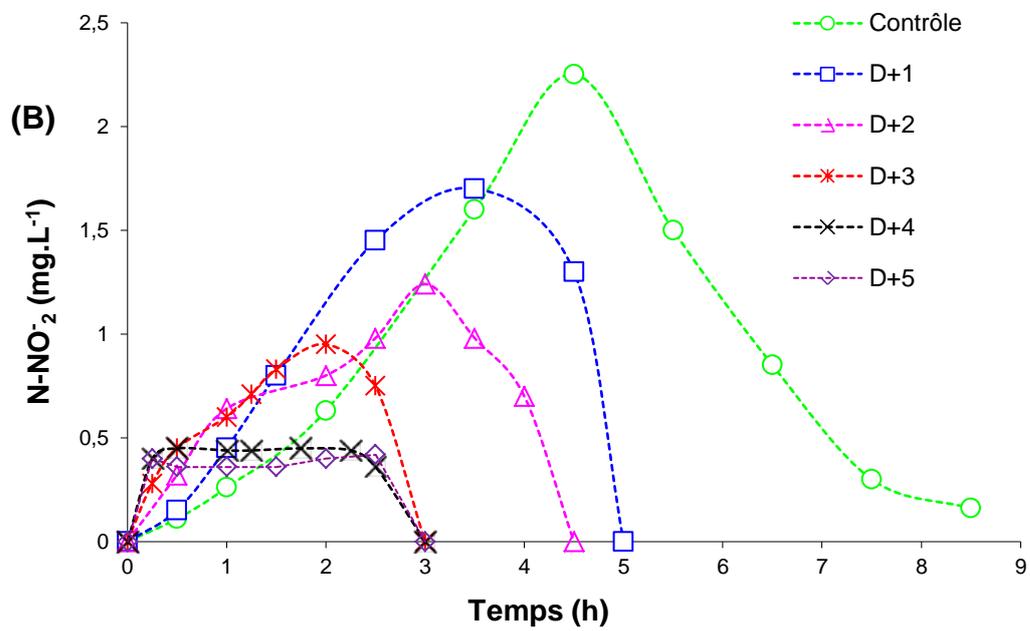
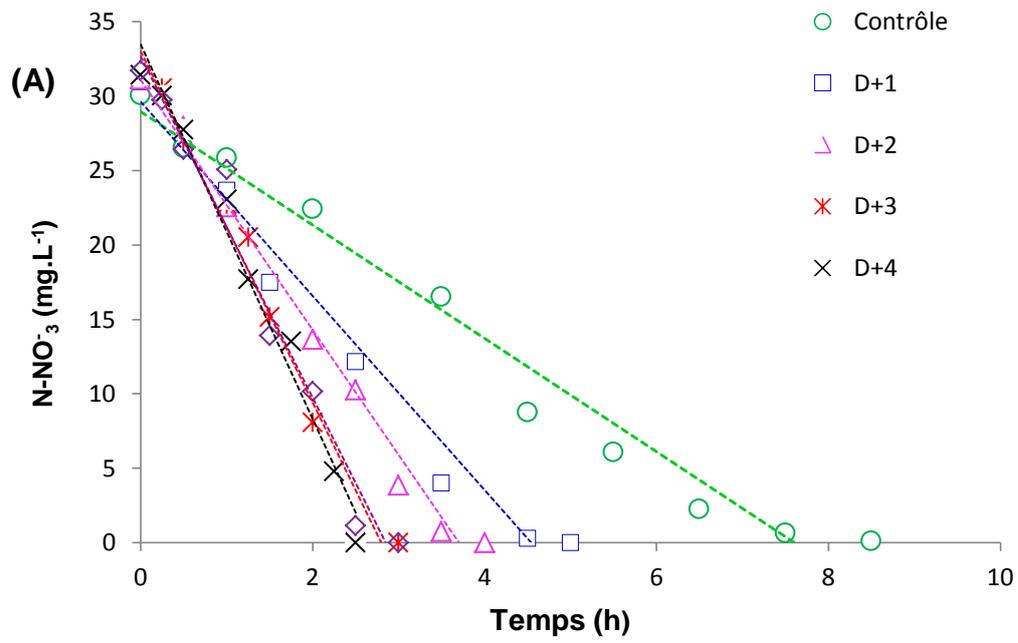
La dégradation des nitrates est devenue de plus en plus rapide au fil des expositions. Ce qui se traduit par des améliorations très nettes de la vitesse spécifique de dénitrification exprimée en $\text{mg N-NO}_3^- \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ qui est passée de 6,5 à 12,7 entre la première et la troisième exposition, soit une amélioration de 2,7 fois par rapport à la cinétique témoin à laquelle nous avons enregistré une vitesse spécifique de $4,74 \text{ mg N-NO}_3^- \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$.

De même, l'accumulation des nitrites dans le milieu réactionnel est de moins en moins importante au fil des expositions, cela signifie que même la vitesse d'élimination des nitrites a subi une augmentation sous l'effet des ondes électromagnétiques, qui ont non seulement favorisé l'assimilation des nitrates et leurs transformations en nitrites, mais également la réduction des nitrites en oxyde nitrique puis en oxyde nitreux et enfin en azote gazeux **(Bothe et al., 2000)**. En effet, dans une cinétique témoin, l'élimination totale des nitrites avait duré 9 heures de temps qui après quatre expositions, cette durée avait été réduite à 3 heures.

L'utilisation du substrat carbonée par la population dénitrifiante a été accélérée, afin de suivre le rythme de dégradation des nitrates, car le carbone est un élément indispensable à la dénitrification biologique et joue le rôle d'accepteur final d'électrons **(Mohan et al., 2016)**.

Le graphique D de la figure III.7 indique que les écarts entre le témoin et les différentes cinétiques réalisées sous le champ magnétique sont dus à l'action du champ électromagnétique et non à un manque de substrat carboné. En effet, une DCO résiduelle non nulle a été enregistrée à la fin de toutes les cinétiques réalisées.

L'action du champ magnétique sur les microorganismes au cours d'une dénitrification est due probablement soit à l'augmentation des flux d'échanges membranaires **(Wang et al., 2014; Rosen, 2003)** suite à la stimulation des enzymes impliquées dans la réaction de biodénitrification à savoir: la nitrate et la nitrite réductase **(Dos Santos et al., 2012; Gemishev et al., 2009)**, ou bien une modification de la diversité phylogénique des populations microbiennes présentes dans le milieu. À cet effet, une extraction d'ADN a été effectuée sur la boue finale et la boue témoin afin de réaliser une analyse phylogénique permettant de déterminer d'éventuelles modifications susceptibles d'être causées par le champ magnétique.



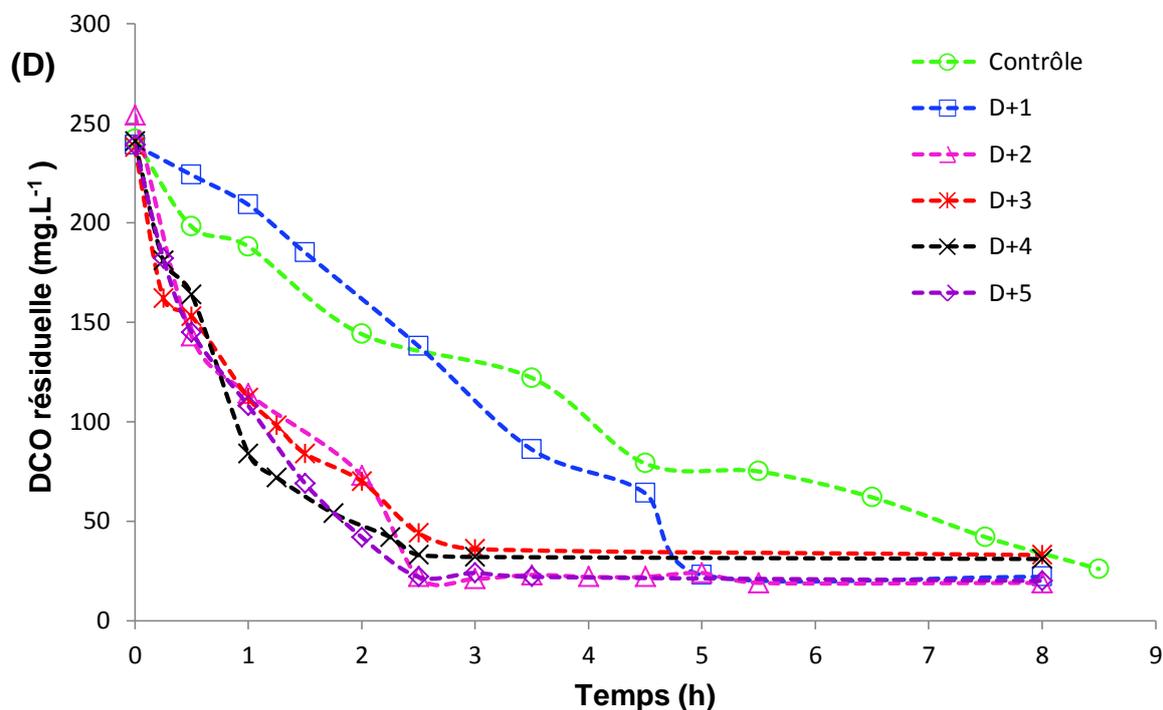
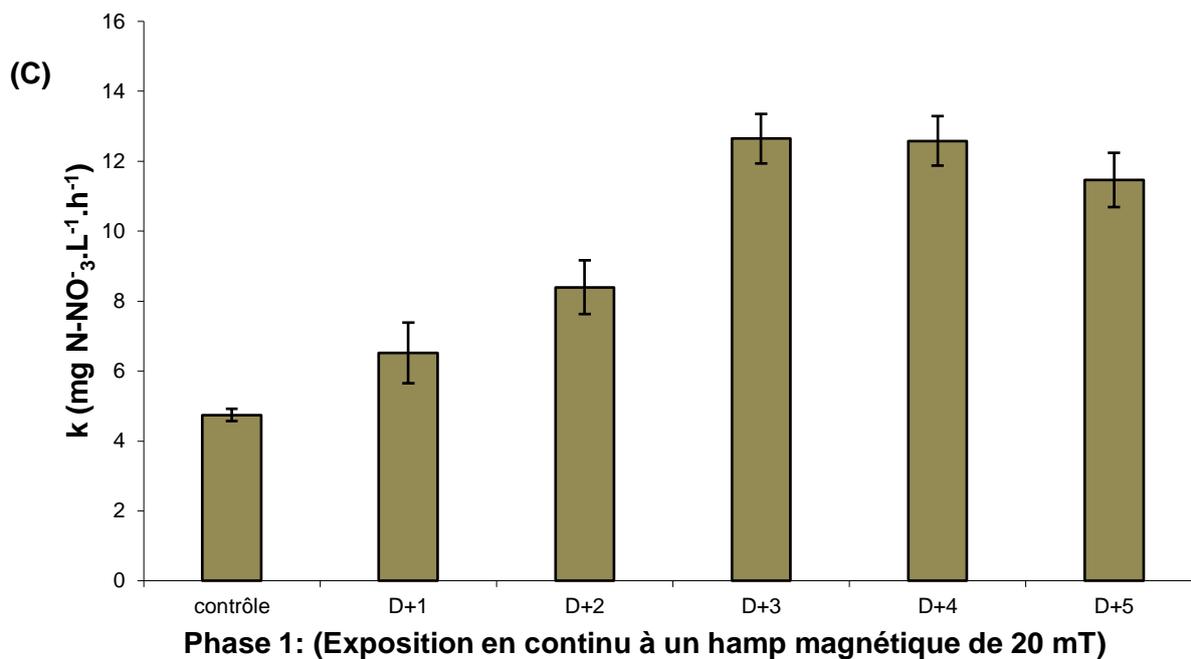
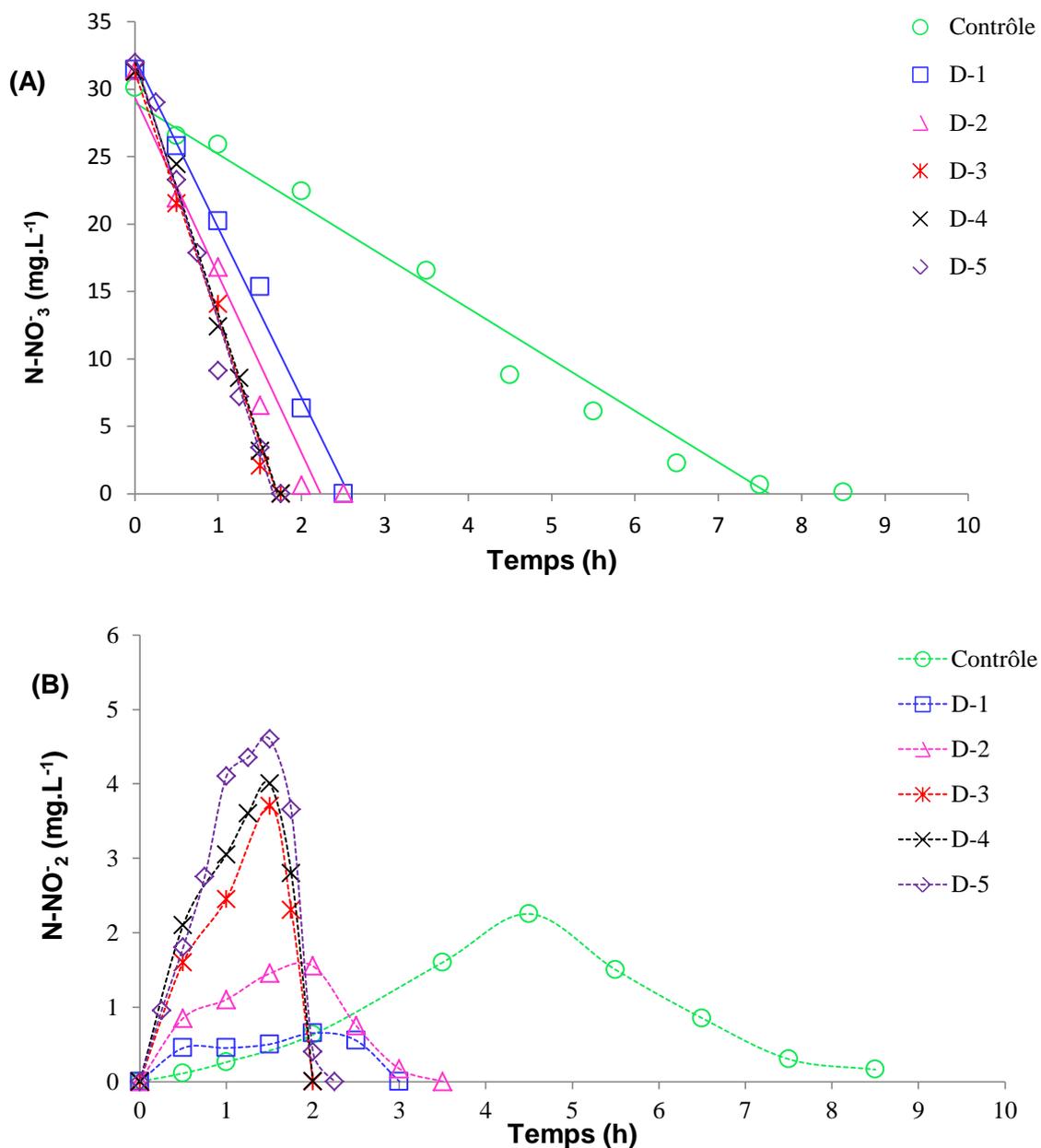


Figure III.7: Exposition continue au champ magnétique de 20 mT d'une boue dénitrifiante. **(A)**- cinétique de disparition des nitrates; **(B)**- Cinétique d'apparition et de disparition des nitrites ; **(C)**- Évolution de la vitesse spécifique de dénitrification et **(D)**- Cinétique de consommation du substrat carbonée exprimée en DCO.

III.2.2. Deuxième phase: Arrêt de l'exposition au champ magnétique

Si l'on considère que l'effet du champ magnétique sur les populations microbiennes en dénitrification observé durant les expériences de la section III.2.1 est dû essentiellement à une simple stimulation des mécanismes régissant le processus de dénitrification, l'absence du champ permettra théoriquement aux microorganismes de retrouver leur activité initiale. Dans un souci de vérifier cette hypothèse, la biomasse issue du premier cycle a été mise en dénitrification dans les mêmes conditions précédentes sans exposition au champ magnétique. Les résultats obtenus sont rassemblés sur la figure III.8.



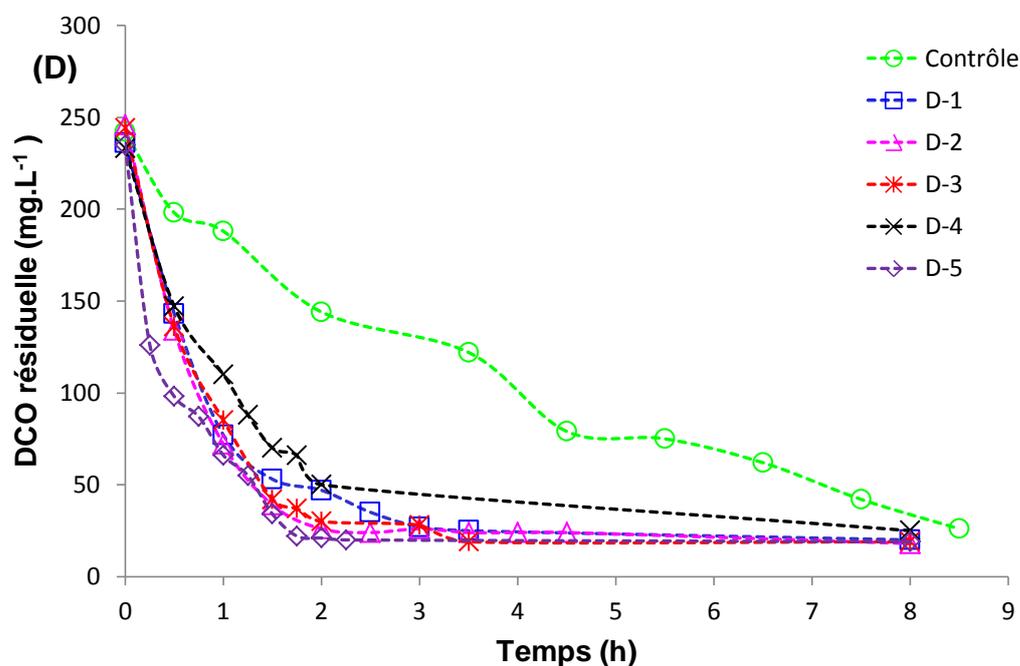
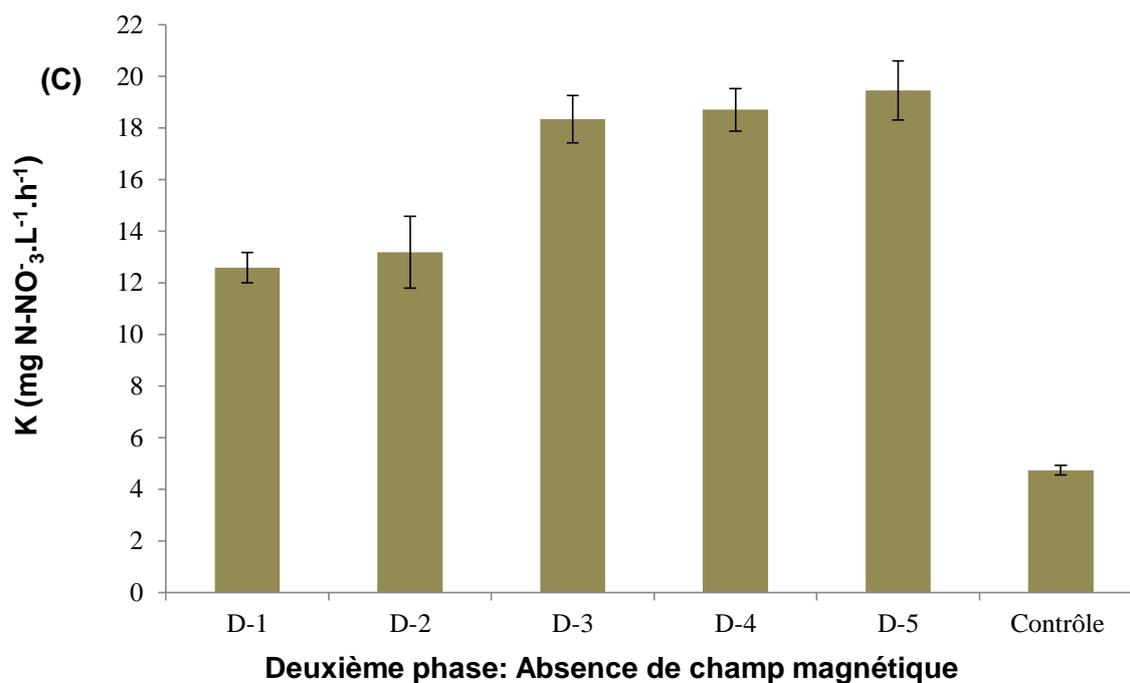


Figure III.8: Comportement de la boue préalablement magnétisée en absence du champ magnétique : **(A)**- Cinétique de disparition des nitrates; **(B)**- Cinétique d'apparition et de disparition des nitrites ; **(C)**- Évolution de la vitesse spécifique de dénitrification et **(D)**- Cinétique de consommation du substrat carbonée exprimée en DCO.

La comparaison des résultats de la figure III.8 à ceux de la figure III.7, montre que les effets du champ magnétique observés durant la première phase persistent malgré son absence durant cette phase, avec des améliorations des performances de dénitrification à partir du troisième jour qui suit l'arrêt de l'exposition au champ magnétique. En effet, des vitesses de dénitrification exprimées en $\text{mg N-NO}_3^- \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ de $12,6 \pm 0,6$; $13,2 \pm 1,4$ $18,3 \pm 0,9$ $18,7 \pm 0,8$ et $19,5 \pm 1,1$ ont été enregistrées entre le premier et cinquième jour respectivement, soit une amélioration moyenne de 45,7 % par rapport aux vitesses enregistrées lors de la première phase et de 4,1 fois par rapport au contrôle. De plus, les vitesses de production et d'élimination des nitrites ont été améliorées, traduites par leurs apparitions très rapides en fortes concentrations suivies par leurs éliminations avec célérité du milieu réactionnel. L'hypothèse la plus probable est la présence d'une concentration plus élevée en biomasse active durant cette phase, résultant de l'enrichissement de la boue en germes dénitrifiants sous l'effet du champ magnétique. Il est probable également que les bactéries provenant des expériences de la section III.2.1 ont un métabolisme "habitué" à la dégradation des nitrates, ce métabolisme a été acquis sous l'action du champ magnétique induisant des modifications irréversibles du métabolisme dénitrifiant.

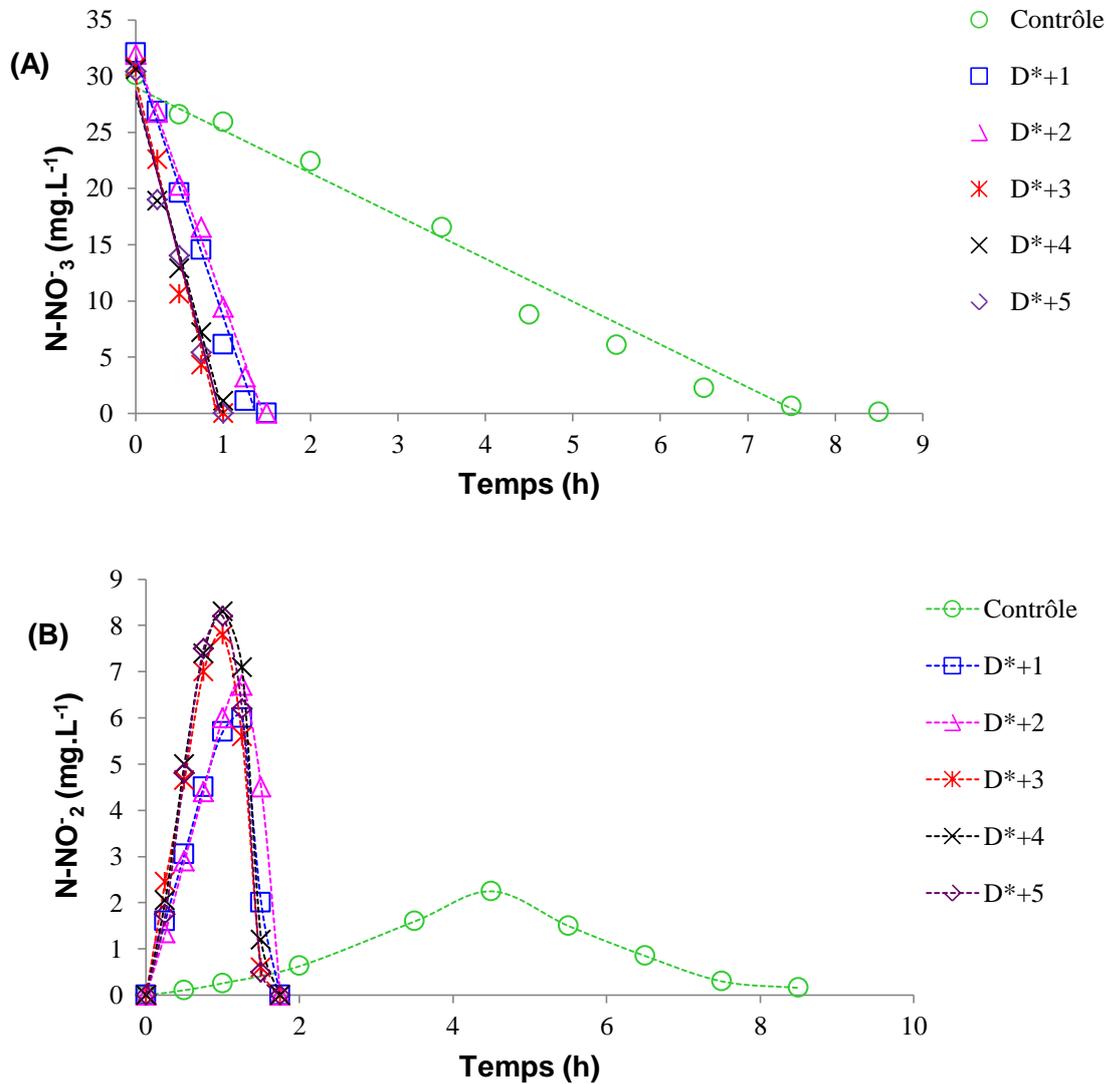
Comme nous l'avons décrit précédemment, le suivi de la consommation du substrat carboné nous a permis d'écartier toute possibilité de modification des constantes cinétiques dues à un déficit en substrat carboné.

Les résultats de cette partie nous permettent d'affirmer que les modifications biologiques induites par un champ magnétique sur le métabolisme dénitrifiant sont acquises. La boue ainsi obtenue dispose d'un grand potentiel dénitrifiant comparée à la boue primaire. En effet, suite à cinq expositions successives à un champ magnétique de 20 mT, une amélioration de 4 fois a été enregistrée sur la vitesse spécifique de dénitrification comparativement à la boue primaire provenant des biofiltres de traitement d'azote de la station Seine-Centre du SIAAP.

III.2.3 Troisième phase: Réexposition de la boue au champ magnétique

Pour confronter les résultats précédents et s'assurer de l'action du champ électromagnétique sur la boue en dénitrification, une expérience similaire à celle du premier cycle a été effectuée sur la boue récupérée à la fin du deuxième cycle. Les

mesures ont été effectuées dans les mêmes conditions que les cycles précédents. Ce même échantillon de boue a été caractérisé par sa vitesse spécifique de dégradation des nitrates, la cinétique de production et d'élimination des nitrites et la cinétique de consommation du substrat carbonée. Les résultats sont représentés sur la figure III.9.



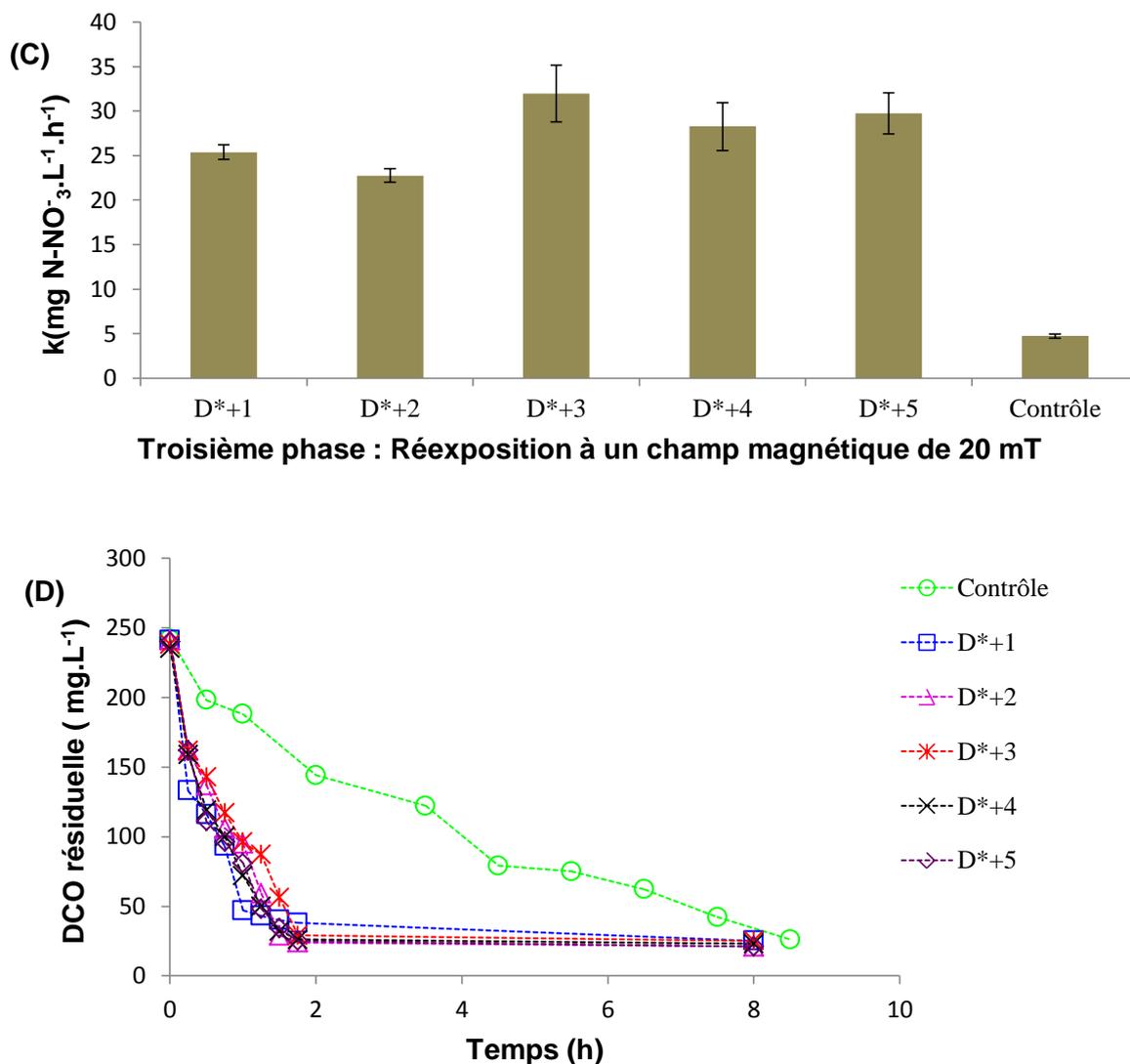


Figure III.9: Réexposition de la boue à un champ magnétique de 20 mT: **(A)**- cinétique de disparition des nitrates; **(B)**- Cinétique d'apparition et de disparition des nitrites ; **(C)**- Évolution de la vitesse spécifique de dénitrification et **(D)**- Cinétique de consommation du substrat carbonée exprimée en DCO.

On peut observer sur cette figure que dans un premier temps, la vitesse spécifique de dégradation des nitrates tend à augmenter jusqu'à atteindre une valeur maximale de $32 \pm 3,2$ mg N-NO₃⁻.L⁻¹.h⁻¹ au deuxième jour de réexposition magnétique, soit une amélioration de 1,6 fois par rapport à celle enregistrée à la fin de la deuxième phase et 6,8 par rapport au contrôle.

Si l'on regarde maintenant la répercussion que peut avoir cette réexposition de la biomasse dénitrifiante au champ magnétique sur les performances épuratoires de la boue, on peut s'apercevoir que l'exposition en continu, permet d'améliorer davantage

la dénitrification biologique tant sur le plan dégradation des nitrates que sur la formation des espèces intermédiaires. En effet, les nitrates sont rapidement transformés en nitrites, ce qui explique leur augmentation rapide dans le milieu réactionnel, avec des concentrations avoisinant les 9 mg.L^{-1} . De même, leur vitesse d'élimination a été nettement améliorée comparativement à celle d'une cinétique témoin ou la concentration des nitrites dans le milieu ne dépasse pas les $2,5 \text{ mg.L}^{-1}$ et nécessitent un temps avoisinant les 9 heures pour qu'ils soient totalement éliminés. Par contre, seulement 2 heures sont nécessaires pour l'élimination totale des nitrites par la biomasse réexposée au champ magnétique.

À l'issue de ces résultats, nous pouvons affirmer que le champ magnétique est un agent stimulant les mécanismes physiologiques et biochimiques de la dénitrification. En effet, l'amélioration continue de la vitesse spécifique de dénitrification même en absence du champ magnétique nous a permis de nous assurer davantage que l'effet induit est non réversible et que le champ magnétique est un excellent agent de stimulation des systèmes biologique.

Nous présentons dans ce qui suit, une comparaison des résultats obtenus par la présente étude aux résultats signalés par la bibliographie (Tableau III.1), malgré que l'action du champ magnétique sur l'activité des populations microbiennes (boue activée) intervenant dans le traitement biologique des eaux usées ait été timidement étudiée.

Tableau III.1: Comparaison de l'amélioration des performances des bioréactions par effet du champ magnétique

Type de bioréaction	Nature du produit	Valeur et nature du champ	Amélioration des performances	Auteurs
Dénitrification biologique (Boue activée)	Eaux usées	Champ magnétique statique de 20 mT	-Amélioration de la vitesse spécifique de dénitrification de 6,8 fois comparée au contrôle -L'effet induit est irréversible	Le présent travail
Traitement de la pollution (système symbiotique Algue-Bactérie: <i>Scenedesmus obliquus</i>)	Eaux usées	Champ magnétique statique de 1000 Gauss (100 mT)	-Amélioration de la phase de croissance logarithmique de 0,5 h et une augmentation de la production de la chlorophylle A de 11,5 % par rapport au contrôle après 6 jours de croissance -Augmentation du rendement de production d'oxygène de 24,6 % par rapport au contrôle -Réduction de la consommation d'énergie nécessaire pour l'aération durant la dégradation de la matière organique	Tu et al. (2015)
Traitement du phénol par <i>Rhodococcus erythropolis</i>	Eaux usées	Champ magnétique statique de 370 mT	-Amélioration du rendement d'oxydation du substrat de 34 % -Amélioration de la croissance cellulaire de 28 % (raccourcissement de la phase exponentielle et une augmentation de l'activité respiratoire de 10 %)	Kriklavova et al. (2014)

Dégradation du formaldéhyde-urée par boue activée.	Eaux usées	Champ magnétique statique de 7 mT	-Augmentation du rendement d'élimination du formaldéhyde de 20 % -Effet positif sur la réduction de la demande chimique en oxygène et la croissance de la biomasse	Lebkowska et al. (2013)
Amélioration de l'activité des boues activées	Eaux usées	Champ magnétique de 10 à 50 mT	-Meilleure activité du TTC-hydrogénase est maximale à 40 mT -Une augmentation de l'induction magnétique de 20 à 40 mT permet aux microorganismes de produire plus d'acides gras insaturés -À 30 mT la composition de la boue en bactéries gram négatif est enrichie	Niu et al. (2014)
Dégradation de la matière organique	Eaux usées	Champ magnétique homopolaire et hétéropolaire (fortes inductions)	-l'intensification du champ magnétique hétéropolaire améliore l'activité des TTC-hydrogénases avec un taux d'abattement de la DCO de 94,9 % -Augmentation de la proportion des bactéries gram négatif.	Niu et al. (2013)
Production de biomasse algale dans un photobioréacteur	Milieu synthétique	24 h d'exposition à un champ magnétique statique de 60 mT	-Augmentation de la concentration en biomasse et en hydrates de carbone de 20,5 % et 24,8 % par rapport au contrôle respectivement	Deamici et al. (2016)

Synthèse de poly-3-hydroxybuturate par boue activée	Milieu synthétique à base d'acétates.	Champ magnétique statique de 7 mT	-Réduction de la vitesse spécifique d'assimilation des acétates de 29% par rapport au contrôle -Augmentation de la concentration maximale en PHB et amélioration du rendement de bioconversion des acétates en PHB de 32 % et 28 % respectivement	Xu et al. (2010) ; Chen et Li (2008)
Production d'invertases par <i>Aspergillus niger</i> OZ-3	Milieu synthétique PSBM	144 h d'exposition des spores à un Champ magnétique statique de 5 mT	-Augmentation significative de la production de biomasse et de l'activité des invertases	Taskin et al. (2013)
Biodégradation des polluants organiques des eaux usées par: <i>Bacillus</i> , <i>Pseudomonas</i> et les levures du genre <i>Candida</i> , <i>Issatchenkia</i> et <i>Rhodotorula</i>	Eaux usées	18 h d'exposition à un champ magnétique statique de 300 Gauss (30 mT)	-Augmentation de la croissance des bactéries et des levures de 400 à 600 %. -une réduction de la DCO, COT, NT et PT de 88, 85, 90 et 98,5 % respectivement -Les intensités de 200 Gauss (20 mT) et 400 Gauss (40 mT) n'ont aucun effet sur la croissance des microorganismes et la réduction des polluants organiques	Hassan et al.(2016)

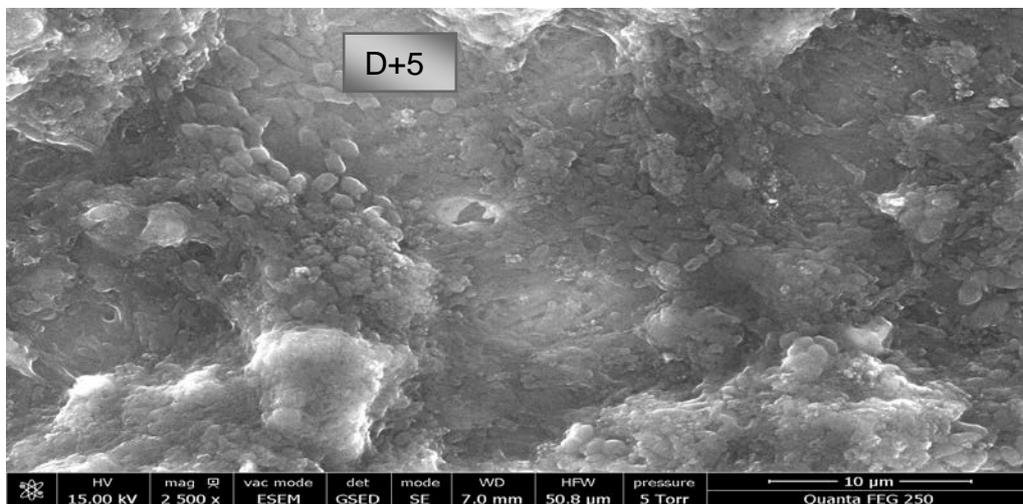
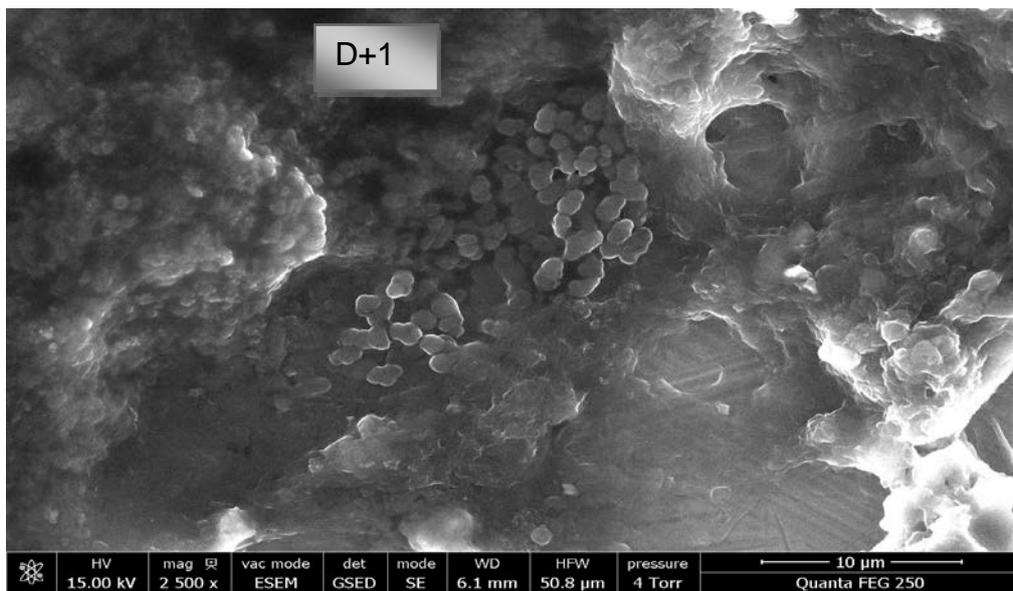
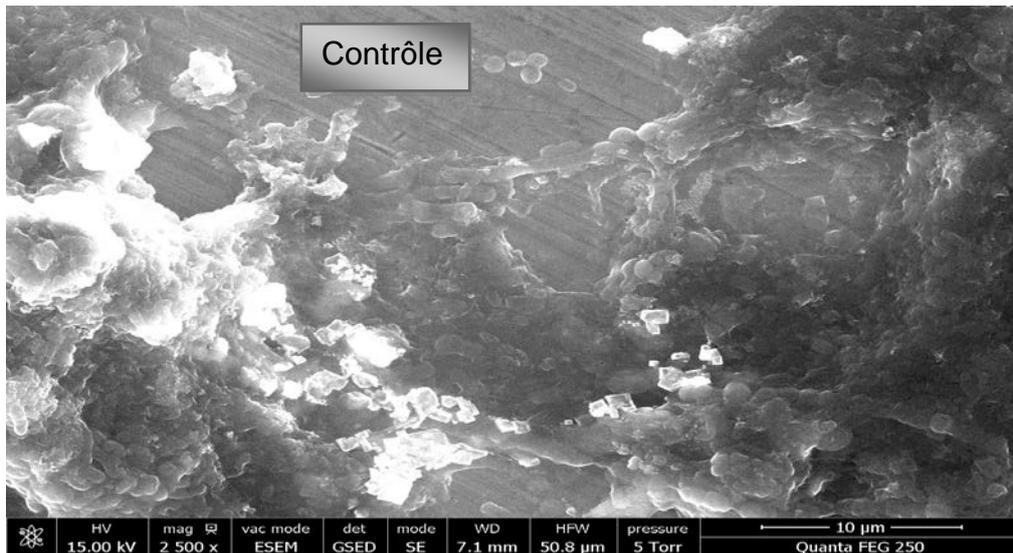
III.2.4 Observations microscopiques des boues

Les composants intracellulaires peuvent être soumis aux moments de rotation et changent leurs conformations sous une force aimantée. La membrane, le cytosquelette et la distribution des protéines pourraient être affectés directement par un champ magnétique statique et cela veut par conséquent, encourager des changements dans la morphologie cellulaire (**Dini et Abro, 2005**). À cet effet, nous avons réalisé des observations des boues au microscope électronique environnemental à balayage à la fin de chaque phase de traitement. Les images obtenues sont rassemblées dans la figure III.10.

L'analyse des images montre que la population microbienne constituant la boue de départ (contrôle) avait subi des modifications au fil des expositions au champ magnétique. En effet, la forte concentration des EPS (substances polymériques extracellulaires) dans le témoin a rendu l'observation de toutes les formes microbiennes très difficile. En effet, la photo (contrôle) témoigne d'une composition phylogénique très diversifiée.

Au fil du traitement magnétique, la quantité d'EPS de la boue a considérablement diminué, ce qui a rendu la prise de photos et la visualisation des formes cellulaires très facile. La boue issue de la dernière phase de traitement à un champ magnétique de 20 mT est constituée de microorganismes presque de même forme.

Les observations notées sur les images obtenues par photographie au microscope électronique nous ont permis de constater que le traitement des boues en dénitrification avec un champ magnétique statique modifie la composition de la boue, par une réduction de la sécrétion d'EPS et une modification de la diversité des formes cellulaires. Ces observations nous ont laissé penser que le traitement par un champ magnétique affecte la diversité phylogénique des populations bactériennes, qui d'après **Niu et al. (2013)** le traitement au champ magnétique permet un enrichissement de la boue activée en bactéries gram négatif.



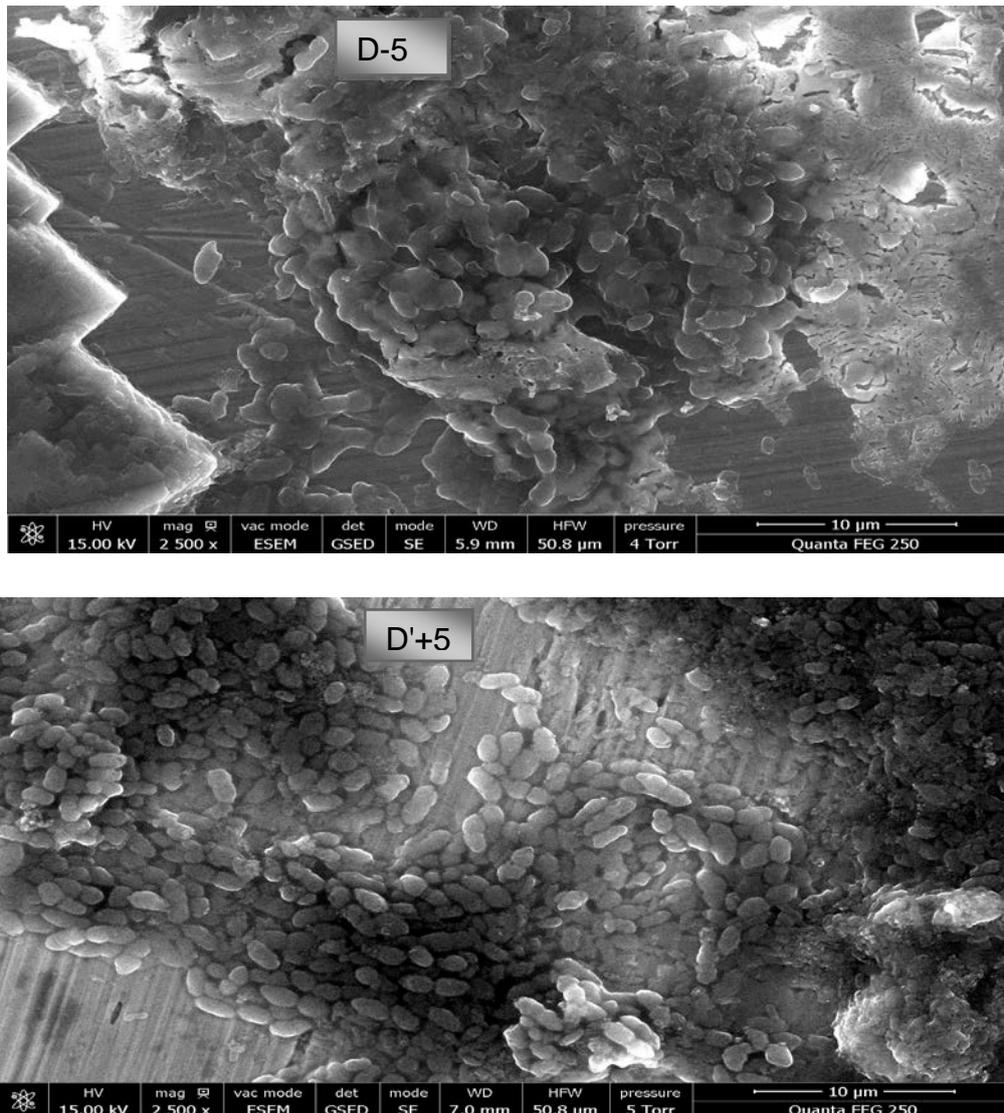


Figure III.10: Photos au microscope électronique environnemental à balayage des boues à la fin de chaque phase de traitement magnétique.

Les résultats de cette partie de travail sont d'ordre visuel (observations) ne permettent pas de tirer des conclusions claires, mais ils constituent un élément d'appui aux résultats des sections précédentes. Contrairement à ce qui a été observé durant la présente étude, ou la sécrétion d'EPS est de moins en moins importante rendant la prise de photos par microscopie électronique à balayage et la détermination des formes bactériennes existante plus facile. **Wang et al. (2012)** ont montré que le traitement d'une boue activée en nitrification par un champ magnétique statique de 48 mT permet de stimuler la sécrétion des EPS.

III.2.5. Effet du champ magnétique sur la composition microbiologique de la boue activée

L'expression différentielle des gènes joue un rôle essentiel dans la régulation du métabolisme, la biosynthèse et la réponse cellulaire au stress. D'après la littérature, le champ magnétique statique est cité comme un agent affectant l'intégrité, les mutations, la transcription et la translation de l'ADN (**Amara et al., 2007; Paul et al., 2006; Goto et al., 2006; Zhang et al., 2003**).

Nous essayons dans cette partie du travail de déterminer la relation entre le champ magnétique statique et l'évolution des populations d'une boue activée en dénitrification. L'extraction de l'ADN génomique de la boue à la fin de chaque phase de traitement a été réalisée à l'UTC tandis que l'amplification et le séquençage ont été sous traités chez DNA-vision, Belgique afin d'évaluer la succession microbiologique des communautés bactériennes.

Les résultats de l'analyse phylogénique des populations ont montré un changement des communautés microbiennes sous l'effet d'un champ magnétique comme le décrit la figure III.11. La caractérisation des phylums, des classes, des ordres, des familles et des genres avec un pourcentage des séquences >1% (au moins un des quatre échantillons), montre que les *Protéobactéries* et les *Bactéroidetes* sont prédominants, avec une abondance relative de 81,90% et 16,60% respectivement, et les deux ont été rapportés largement comme phylums majeurs des bactéries dénitrifiantes (**Kondaveeti et al., 2014; Lu et al., 2014; Li et al., 2016**).

L'exposition au champ magnétique de 20 mT a permis donc l'enrichissement de l'inoculum en *Protéobactéries* de 19,3 % par rapport au contrôle, tandis que l'abondance des *Bactéroidetes* avait chuté de 9,2 %. Les autres phylums observés dans l'inoculum témoin ont complètement disparu sous l'effet du traitement magnétique. Comme le montre la figure III.11 (B), les unités taxonomiques opérationnelles (UTOs) appartenant au phylum des *Protéobactéries* sont affiliées aux *Bétaprotéobactéries*, *Gammaprotéobactéries*, et *Alphaprotéobactéries*, avec une abondance relative de 20,9 %, 23,6 % 25,9 % respectivement pour la boue témoin n'ayant pas subi de traitement magnétique, tandis que la boue à la fin du traitement magnétique était composée essentiellement d'UTOs appartenant aux mêmes classes décrites précédemment avec une abondance relative de 40,5 %, 34,6 % et

16,1 % respectivement, soit un enrichissement de 19,6 % pour les *Bétaprotéobactéries* et 11% pour les *Gammaprotéobactéries*, alors que l'abondance relative des *Alphaprotéobactéries* a été réduite de 9,8 %.

L'enrichissement des *Protéobactéries*, particulièrement la sous-classe des *Bétaprotéobactéries*, indique que la croissance et la prolifération des groupes appartenant aux *Bétaprotéobactéries* ont été stimulées à l'aide d'un champ magnétique de 20 mT.

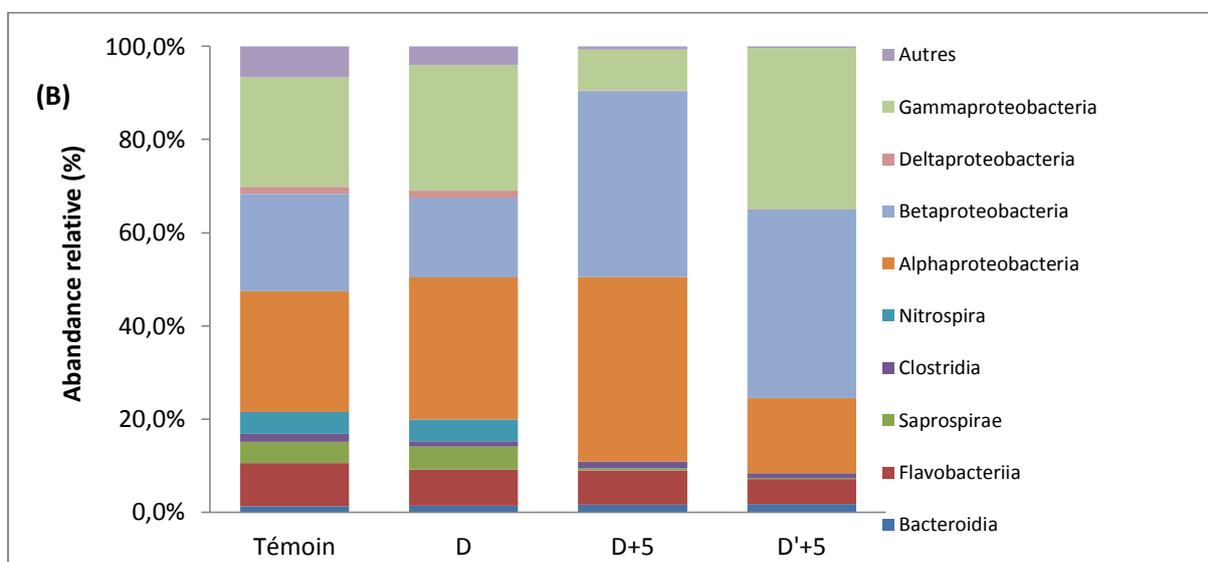
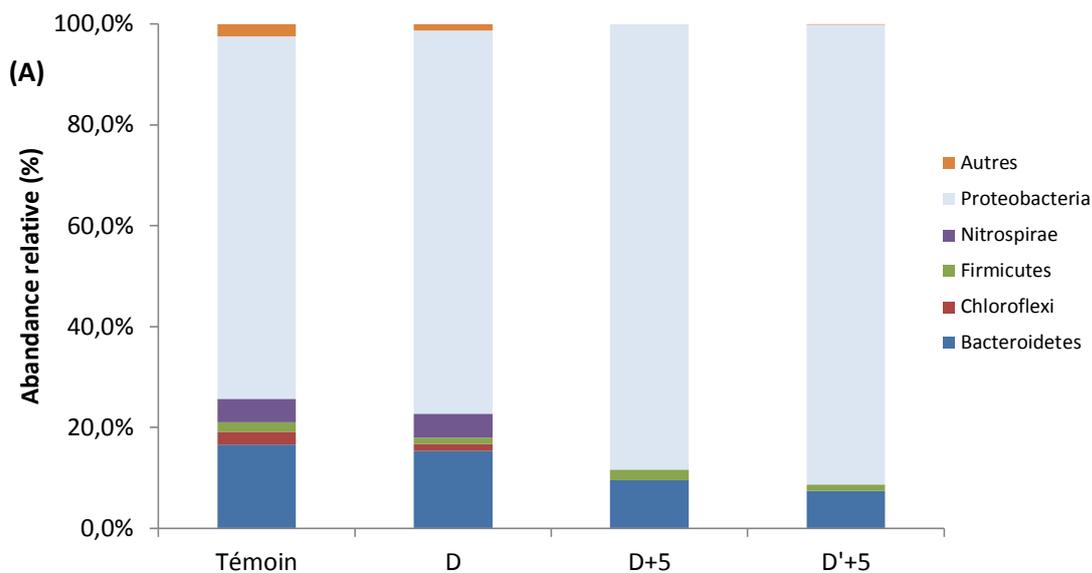
D'après les figures III.11 (C), (D), (E), les séquences non classées au niveau des familles est de 15,7 % pour l'échantillon témoin, alors que pour l'échantillon après traitement magnétique prolongé (D'+5) est uniquement de 3,1 %. Les familles des *Pseudomonaceae*, des *ASSO-13;f*, des *Rhizobiales;f* sont les plus abondantes pour la boue témoin, alors que pour la boue traitée au champ magnétique, s'ajoutent les *Rhodocyclaceae* avec une abondance relative de 10,8 %. Les UTOs ayant une abondance relative supérieure à 1% sont regroupés dans le tableau III.2.

Tableau III.2: Répartition des UTOs ayant une abondance relative supérieure à 1%.

Genres	Total	Témoin	D	D+5	D'+5
<u>Flavobacterium</u>	7,1%	8,5%	7,2%	7,4%	5,4%
<u>Chitinophagaceae;g</u>	1,9%	3,2%	3,9%	0,3%	0,2%
<u>Nitrospira</u>	2,4%	4,7%	4,7%	00%	00%
<u>Rhizobiales;f ;g</u>	22,9%	15,4%	22,9%	38,1%	15,3%
<u>Rhodobacteraceae;g</u>	0,9%	2,1%	1,4%	00%	00%
<u>Rhodobacter</u>	0,8%	2,0%	1,1%	00%	00%
<u>Betaproteobacteria;Other;Other;Other</u>	2,0%	0,3%	0,3%	3,9%	3,5%
<u>ASSO-13;f ;g</u>	15,2%	3,4%	3,0%	29%	25,3%
<u>Comamonadaceae;g</u>	2,7%	5,8%	3,9%	0,3%	0,6%
<u>Hydrogenophaga</u>	0,8%	1,5%	1,3%	0,1%	0,1%
<u>Ramlibacter</u>	1,6%	3,6%	2,7%	0,1%	0,1%
<u>Dechloromonas</u>	0,7%	1,3%	1,2%	0,2%	0,3%
<u>Thauera</u>	4,2%	0,5%	0,6%	5,7%	10%
<u>Bdellovibrio</u>	0,7%	1,2%	1,3%	0,1%	0,1%
<u>Enterobacteriaceae;g</u>	0,9%	1,8%	1,6%	00%	0,1%
<u>Klebsiella</u>	0,9%	1,8%	1,7%	00%	00%
<u>Pseudomonadaceae;g</u>	17,0%	9,9%	16%	8,3%	33,7%
<u>Pseudoxanthomonas</u>	0,6%	1,2%	1%	0,1%	00%
<u>Stenotrophomonas</u>	2,5%	5,8%	4%	0,1%	0,1%
Total	85,8%	74%	79,8%	93,7%	94,8%
Autres	14,2%	26%	20,2%	6,3%	5,2%

La majorité des séquences sont concentrées dans 17 UTOs pour la boue témoin, qui, suite au traitement magnétique, le nombre des unités taxonomiques opérationnelles a été réduit à 6 UTOs.

Il a été démontré auparavant, que les groupes bactériens dominants pour la boue témoin et après traitement au champ magnétique étaient différents quant aux UTOs. Ce résultat indique que la communauté microbienne était considérablement affectée par un champ magnétique de 20 mT. Pendant le traitement quelques phylums ont complètement disparu laissant la place aux phylums à fort potentiel dénitrifiant (les *Protéobactéries*).



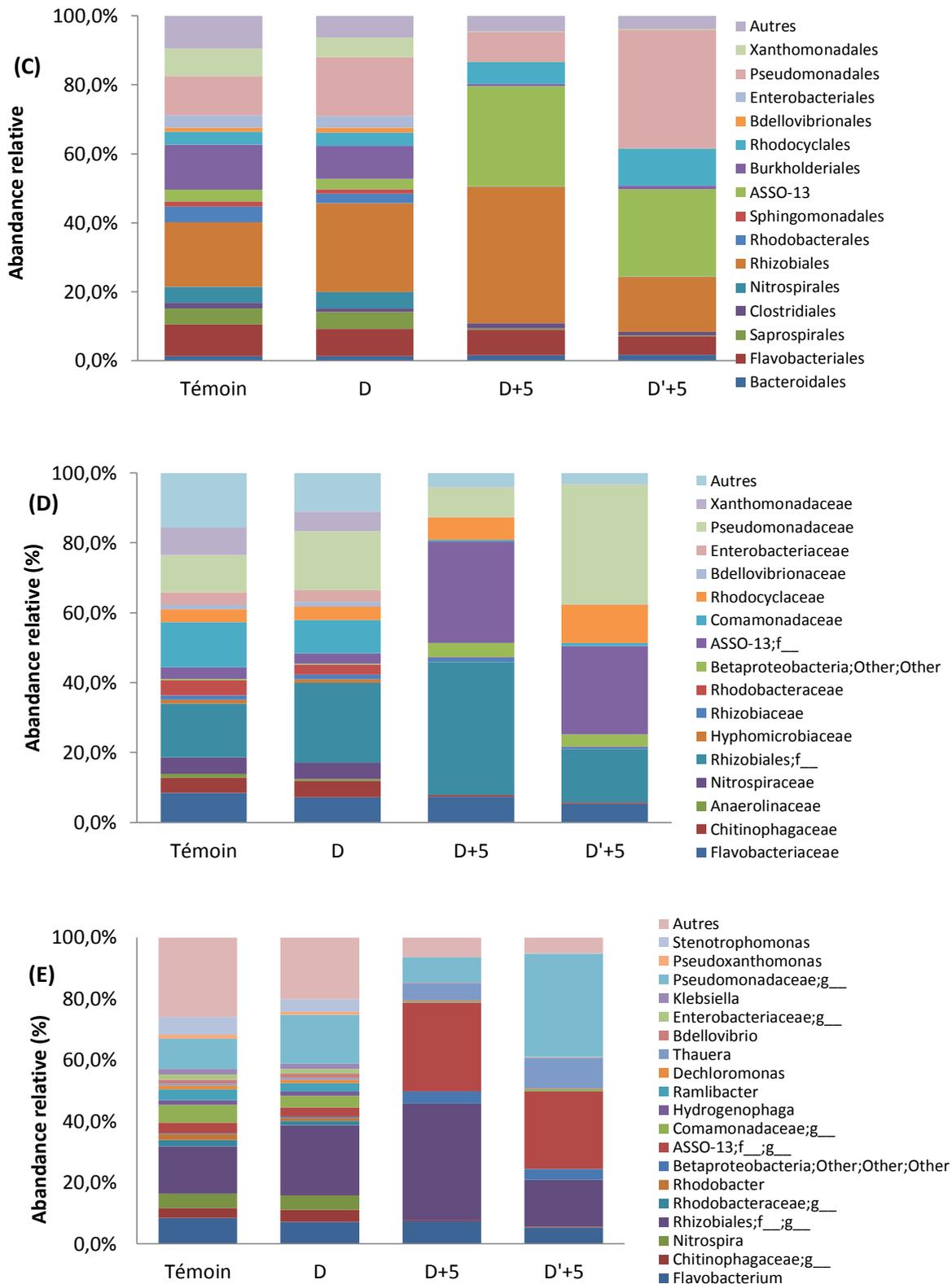


Figure III.11: Affiliation taxonomique et abondance relative des groupes bactériens de la boue activée dénitrifiante. Phylums(A), Classes(B), Ordre(C) Familles(D), Genres(E).

III.3. Amélioration de la dénitrification biologique sur nouveau support avec application du champ magnétique.

Le traitement de l'azote au sein des stations d'épurations des eaux usées devient l'un des principaux enjeux actuels du fait de son impact particulièrement néfaste sur le milieu naturel. En aval des traitements secondaires, la dénitrification par biofiltration est un procédé intensif capable d'éliminer de très fortes charges dans un espace restreint par sa capacité à accumuler une quantité importante de biomasse active autour du matériau filtrant. Les performances de ce type de procédé dépendent essentiellement des caractéristiques physicochimiques du matériau filtrant, la qualité de l'eau à traiter et la vitesse de filtration. Cette partie du travail a pour objectifs:

- L'utilisation d'un matériau local, tel que la casse de la brique à usage de construction bâtiment, comme filtre biologique est une technique prometteuse pour le traitement des eaux usées de par sa grande disponibilité et son faible prix de revient. Cette partie du travail permettra de mettre en exergue le pouvoir filtrant de ce nouveau matériau et de le comparer à un support industriel potentiellement utilisé.
- Les résultats de l'effet du champ magnétique sur la dénitrification biologique en batch, nous a poussé à tester ce type de traitement sur les populations microbiennes dénitrifiantes fixées et de déterminer sa contribution dans le traitement des eaux usées par biofiltration en prenant la dénitrification biologique comme modèle.

III.3.1. Caractérisation physico-chimique du matériau filtrant

Comme décrit précédemment dans la section II.2.2, deux supports de biofiltration ont été utilisés. Le premier est un sous-produit de la fabrication de la brique à usage de construction bâtiment provenant de la briqueterie "Terre Cuite" de Boudouaou objet de cette étude, et un deuxième (Biolite[®]) fourni par la station Seine-centre du SIAAP (Syndicat Interdépartemental pour l'Assainissement de l'Agglomération Parisienne) servant de référence.

III.3.1.1. La résistance à l'attrition

Dans toute fabrication, usage ou mouvement de matières, l'usure est inévitable et elle a été rapportée dans une grande gamme de processus et industries. La

détermination de la résistance à l'attrition s'avère donc importante lors du choix du matériau support, surtout lorsque le procédé comporte des opérations de filtration.

La détermination de la résistance à l'attrition a été réalisée sur les deux supports en parallèle et dans les mêmes conditions, afin de pouvoir comparer le support choisi aux supports de référence. Les résultats sont regroupés dans la figure III.12.

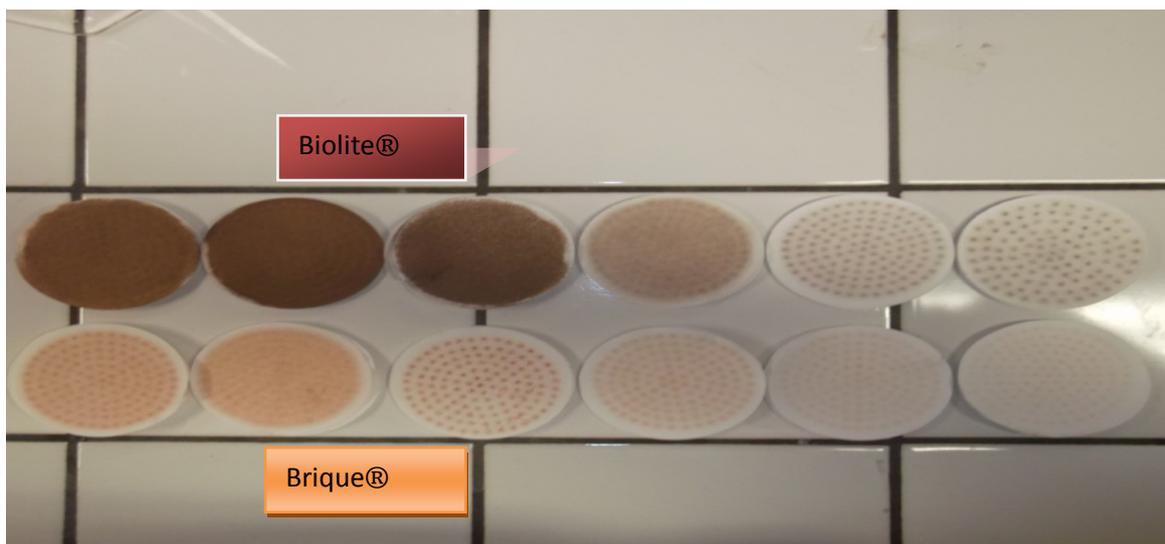
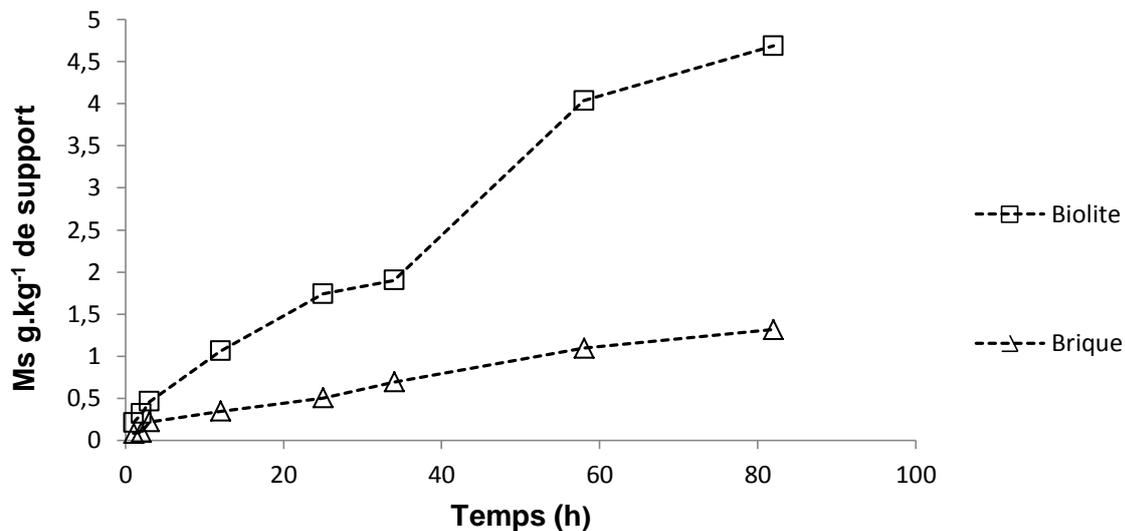


Figure III.12: Résistance à l'attrition des deux supports de biofiltration à un débit de 3L.min⁻¹.

L'analyse de la figure III.12 montre que la brique est un matériau plus résistant à l'attrition que la Biolite®. En effet, à 80 h d'exposition à un courant d'eau de 3 L.min⁻¹, la résistance à l'attrition exprimée en g_{MS}.kg⁻¹ de support était de 1,31 et 4,68 soit 0,13 % et 0,46 % pour la brique et pour la Biolite®, respectivement.

Dans n'importe quelle industrie, l'utilisation de matériaux particulaires engendre systématiquement une attrition plus au moins importante suivant les propriétés du matériau utilisé et les conditions de l'environnement (temps, la pression, la température... etc.). Les valeurs de la résistance à l'attrition obtenues peuvent donc subir des variations suivant les conditions opératoires de la biofiltration.

III.3.1.2. Distribution de la taille des pores

La porosité d'un matériau utilisé en biofiltration est d'une grande importance, car cette porosité contribue à la fois à la formation de biofilm, ainsi qu'au piégeage de la matière en suspension contenu dans l'eau à traiter.

La porosimétrie au mercure est une technique permettant d'analyser les diamètres d'entrée de pores allant de quelques nanomètres jusqu'à quelques centaines de micromètres. Elle permet de déterminer de manière quantitative, la structure poreuse des matériaux.

La mesure du volume de mercure pénétré dans les pores en fonction de la pression donne une courbe d'intrusion-extrusion qui présente un phénomène hystérétique dû à la forme des pores, à leur interconnectivité et à la variation de l'angle de contact d'avancée à l'intrusion et de reculée à l'extrusion.

La distribution de la taille des pores donnés sur la figure III.13 est la dérivée du volume de mercure par gramme de matériau à la pression d'intrusion. Les résultats des principaux paramètres mesurés sont rassemblés dans le tableau III.3.

Tableau III.3: Principaux paramètres mesurés d'une porosimétrie à mercure des supports de biofiltration (Biolite® et Brique).

	Biolite®	Brique
Volume d'intrusion (mL.g ⁻¹)	0,3365	0,1449
Surface totale des pores (m ² .g ⁻¹)	17,545	4,881
Diamètre moyen des pores (nm)	76,7	118,7
Densité apparente (g.mL ⁻¹)	2,33	2,56
Porosité (%)	44	27,06

Les résultats obtenus avec la porosimétrie à mercure sont très encourageants, les deux supports présentent des caractéristiques porosimétriques très rapprochées à l'exception de la surface totale des pores ou nous avons enregistré un écart de $12,66 \text{ m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$ de matériau.

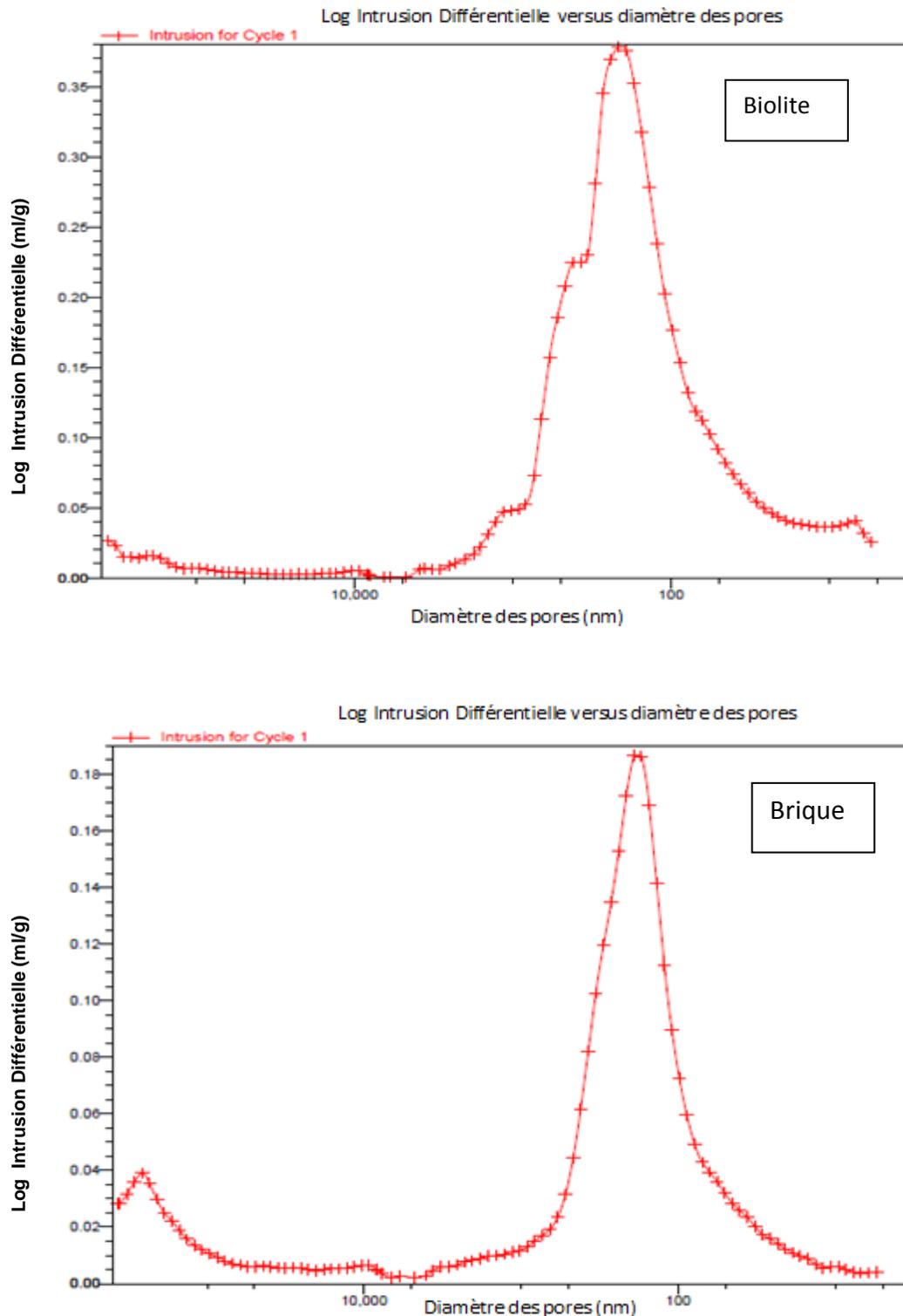


Figure III.13: Distribution de la taille des pores (Biolite® & Brique).

En considérant les différents paramètres mesurés cités précédemment, l'adoption de ce nouveau support (casse de brique) est justifiée par le fait qu'il présente des caractéristiques physiques proches de ceux de la Biolite®.

Rocher et al. (2008) signalent que les performances épuratoires sont susceptibles de varier légèrement en fonction des caractéristiques du matériau filtrant. En effet la géométrie du massif influence la structure du biofilm présent à la surface du matériau support et, par conséquent, sur la surface d'échange biomasse-substrat. Les mécanismes de diffusion et de transport des substrats présents dans l'effluent (carbone, azote, oxygène) vers la biomasse épuratrice constituent donc les principaux facteurs limitant le métabolisme bactérien.

III.3.2. Dénitrification par biomasse fixée sur support céramique

Cette partie du travail a un double objectif. Le but premier est de coupler le traitement de la pollution azotée par biofiltration avec un champ magnétique statique. Le second objectif est d'étudier les performances épuratoires en biofiltration d'un nouveau support choisi (casse de brique à usage de construction bâtiment) et de le comparer à un support industriel (Biolite®).

Afin d'étudier l'impact du champ magnétique sur les performances épuratoires de la biofiltration, deux colonnes de dénitrification ont été mises en fonctionnement dans les mêmes conditions, une exposée à un champ magnétique de 20 mT et l'autre servant de contrôle. Les deux bioréacteurs ont été alimentés en continu à des charges volumiques appliquées croissantes. Les conditions de fonctionnement des deux biofiltres (avec et sans champ magnétique) pour les deux supports (Biolite® et Brique) sont détaillées au paragraphe II.1.3.

III.3.2.1 Cinétique de dénitrification sur colonne remplie de Biolite® en présence d'un champ magnétique.

III.3.2.1.1. Effet du champ magnétique sur la vitesse et le rendement de dénitrification.

La lecture des graphiques de la figure III.14 permet de tirer les observations suivantes:

Les deux biofiltres ont démontré des efficacités épuratoires similaires, lorsqu'ils étaient soumis aux mêmes conditions entre 0 et 264 h de fonctionnement, avec une élimination totale d'une charge appliquée de $81,3 \text{ mg N-NO}_3^- \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$.

Cependant, après exposition au champ magnétique, la performance du biofiltre a légèrement augmenté par rapport au biofiltre témoin entre 263 et 292 h de fonctionnement avec un rendement maximal de dénitrification de 95,1 % pour le réacteur exposé au champ magnétique et 86,6 % pour le biofiltre témoin à une charge appliquée de $163 \text{ mg N-NO}_3^- \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$.

Suite à ces résultats, nous avons doublé la charge à l'entrée du réacteur soumis au champ magnétique durant la période allant de 294 à 335 heures, tandis que le biofiltre témoin a été maintenu à une charge de $163 \text{ mg N-NO}_3^- \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$. À l'équilibre (établissement du régime stationnaire), nous avons enregistré un rendement maximal de 82 % sur le réacteur soumis au champ magnétique avec une charge éliminée de $266 \text{ mg N-NO}_3^- \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$, alors que celle enregistrée sur le biofiltre témoin était de $144 \text{ mg N-NO}_3^- \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$. Cette différence des capacités épuratoires entre les deux biofiltres est certainement due à l'action du champ magnétique sur les populations bactériennes, car les deux biofiltres ont été mis en fonctionnement dans les mêmes conditions.

Afin de tester la réversibilité de l'effet induit par le champ magnétique sur les performances du biofiltre dénitrifiant, nous avons arrêté le champ durant la période allant de 335 à 408 h. Les résultats obtenus ont montré que l'effet induit par le champ magnétique est acquis, car nous avons enregistré un rendement et une vitesse de dénitrification maximale de 88% et $285 \text{ mg N-NO}_3^- \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ respectivement pour une charge à l'entrée de $325 \text{ mg N-NO}_3^- \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ tandis que le biofiltre témoin est resté stable pendant toute la période considérée.

Par la suite, nous avons remis le biofiltre en fonctionnement en présence du champ magnétique à la même induction utilisée auparavant (20 mT) durant la période allant de 408 à 434 heures, et les résultats ont montré que le rendement de dénitrification est resté stable (89 %) tandis que sur le biofiltre témoin, nous avons enregistré une baisse des capacités épuratoires avec un rendement maximal enregistré de 68 % avec une vitesse de dénitrification maximale de $107 \text{ mg N-NO}_3^- \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$.

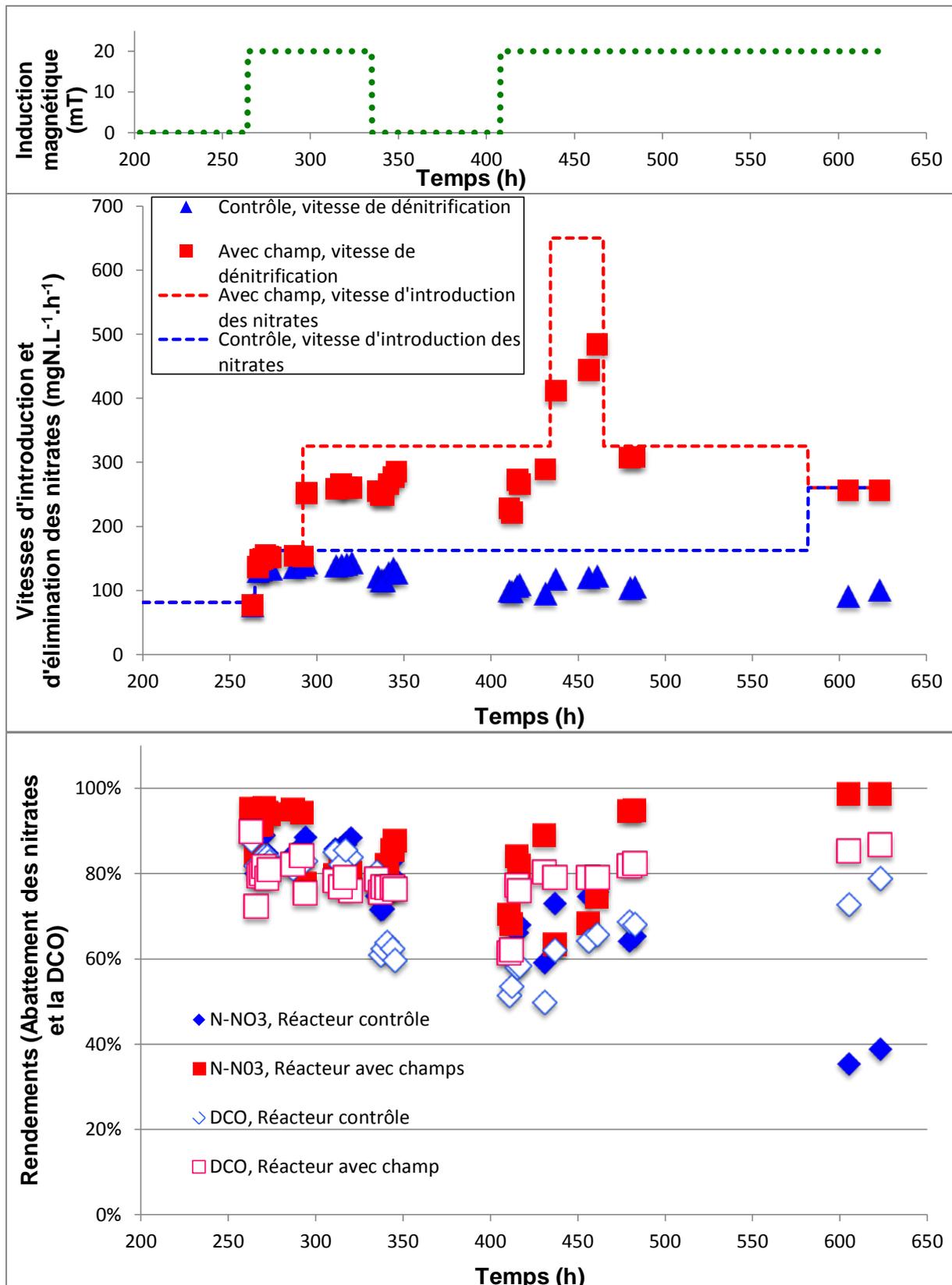


Figure III.14: Performances épuratoires d'un biofiltre garni de Biolite® avec et sans champ magnétique

Cette baisse des capacités épuratoires du réacteur contrôle est due probablement à la saturation de la colonne en biofilm et la formation de passages préférentiels.

La stabilité des performances du réacteur exposé au champ magnétique a des rendements avoisinants les 90 % avec une capacité de $325 \text{ mg N-NO}_3^- \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$, nous a poussés à doubler davantage la charge appliquée durant la période allant de 434 à 464 heures. Les résultats ont montré que le biofiltre exposé au champ magnétique permet malgré la charge appliquée, un rendement de dénitrification de 74 % avec une charge éliminée de $484 \text{ mg N-NO}_3^- \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$. En comparaison au réacteur contrôle, le champ magnétique a permis d'améliorer les capacités de dénitrification de 4,5 fois.

Afin d'écartier la possibilité que la différence observée entre les deux biofiltres puisse être liée en partie à la différence de charge appliquée, cette dernière a été réduite de moitié pour le biofiltre exposé au champ magnétique durant la période allant de 434 à 464 heures, soit une charge à l'entrée de $325 \text{ mg N-NO}_3^- \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$. Cette réduction de charge appliquée a permis de remettre le biofiltre à ses capacités maximales. Par la suite, nous avons soumis les deux biofiltres à une charge à l'entrée de $260 \text{ mg N-NO}_3^- \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ afin de nous assurer que le biofiltre témoin était à ses capacités maximales et que la différence observée est due à l'action du champ magnétique sur les populations bactériennes en dénitrification. Les résultats obtenus ont confirmé cette hypothèse et ont montré que le réacteur exposé au champ magnétique permet une élimination totale des nitrates (99 %) tandis que le rendement enregistré avec le biofiltre témoin était de 39 %, soit une différence de 60 %.

III.3.2.1.2. Influence du champ électromagnétique sur la formation des nitrites

Le problème posé par les nitrites dans les eaux de surface est actuellement reconnu par l'ensemble des acteurs de l'eau. Les stations d'épurations, et en particulier ceux traitant la pollution azotée par biofiltration sont des sources potentielles de cette espèce azotée. Dans ce contexte, la concentration des nitrites est un élément à prendre en considération lors de la conception et le dimensionnement des biofiltres de dénitrification.

La figure III.15 montre l'évolution des charges azotées (nitrates et nitrites) à l'entrée et à la sortie des biofiltres. L'analyse de la figure III.15 montre que la charge azotée exprimée en $\text{N-NO}_2^- \cdot \text{h}^{-1}$ à la sortie du biofiltre a été également influencée par une

exposition au champ magnétique avec une différence de $3,34 \text{ mg}\cdot\text{h}^{-1}$ par rapport au contrôle, lorsque les deux bioréacteurs étaient soumis à la même charge en nitrates à l'entrée. En appui à notre affirmation, la charge résiduelle à la sortie du biofiltre exposé au champ magnétique est pratiquement nulle, soit une épuration totale et cela, quelle que soit la charge initiale. Par contre, à la sortie du biofiltre témoin, nous avons enregistré une charge de $45,5 \text{ mg N-NO}_3^- \cdot \text{h}^{-1}$ pour une charge appliquée de $80 \text{ mg N-NO}_3^- \cdot \text{h}^{-1}$. Ces résultats montrent que le champ magnétique a permis d'influencer les performances des boues activées en dénitrification. En effet, l'action des radiations magnétiques sur l'amélioration des performances épuratoires est constatée jusqu'à des charges élevées de l'ordre de $200 \text{ mg N-NO}_3^- \cdot \text{h}^{-1}$.

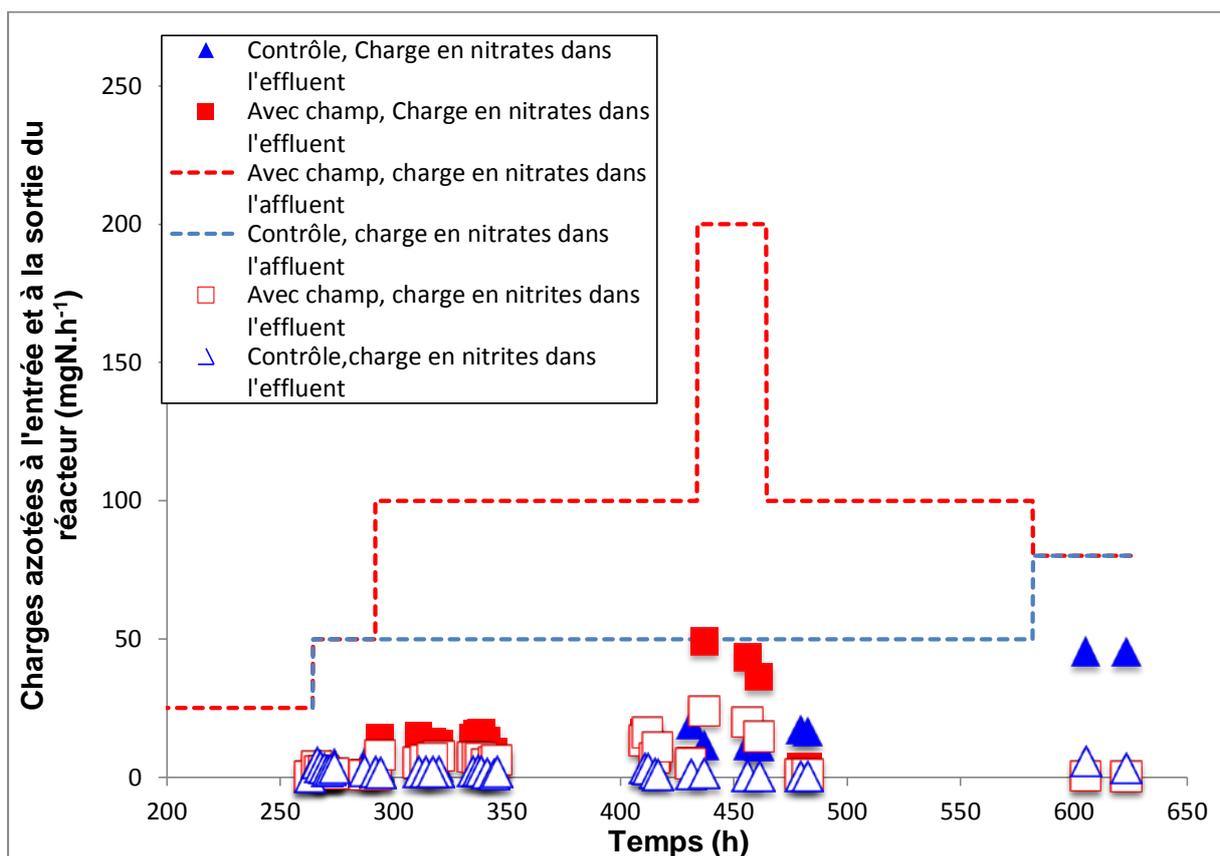


Figure III.15: Effet du champ magnétique sur la production de nitrites d'un biofiltre de dénitrification garni de Biolite®.

III.3.2. Cinétique de dénitrification sur colonne remplie de granulés de brique

III.3.2.1. Effet du champ magnétique sur la vitesse et le rendement de dénitrification.

Comme biotechnologie nouvelle, les biofiltres fournissent une option aux différentes étapes de traitement des eaux usées. En effet, le dimensionnement du volume des réacteurs requis est non seulement déterminé par le type de polluant à traiter, mais aussi par le type de support adopté (**Qiu et al., 2010**).

Afin d'avoir des points de comparaison entre la Biolite® et le nouveau support proposé, deux biofiltres remplis de granules de brique de 1 à 5mm de diamètre ont été mis en fonctionnement traitant une eau usée synthétique chargée en nitrates, dans les mêmes conditions que les manipulations de la section III.3.1. Le premier a été exposé à un champ magnétique de 20 mT et le second servant de contrôle. Les résultats obtenus sont rassemblés sur la figure III.16.

La vitesse de dénitrification a été sensiblement influencée suite à l'exposition au champ magnétique de 20 mT, avec une vitesse de dénitrification de $337 \text{ mg N-NO}_3^- \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ pour une charge à l'entrée de $342 \text{ mg N-NO}_3^- \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$, soit un rendement de 99%, alors que pour la colonne témoin le rendement maximal n'a pas excédé 69%, avec une vitesse de dénitrification de $168 \text{ mg N-NO}_3^- \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ pour une vitesse d'alimentation de $171 \text{ mg N-NO}_3^- \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$.

L'exposition au champ magnétique a permis une plus grande stabilité du rendement de dénitrification. En effet, à une intensité nulle entre 196 et 243 heures et même lorsque la vitesse d'alimentation de la colonne en nitrates était augmentée à $684 \text{ mg N-NO}_3^- \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$, soit quatre fois la charge appliquée au biofiltre témoin, le rendement de dénitrification a été maintenu.

La stabilité du rendement de dénitrification du biofiltre traité au champ magnétique durant toute la période de l'étude, et même pendant la phase où le biofiltre fonctionnait en son absence, montre que l'effet induit est irréversible.

Les résultats ci-dessus nous laissent à penser que le champ magnétique améliore l'activité des bactéries dénitrifiantes. Des résultats similaires ont été signalés par **Wang et al. (2012)** et **Tomska et Wonly (2008)** qui ont trouvé que le rendement de

nitrification d'une boue activée exposée à un champ magnétique est plus élevé que celui obtenu avec la boue témoin. Ils ont également mis en évidence que le taux de consommation d'oxygène par les bactéries nitrifiantes a été considérablement intensifié. Bien qu'il y ait beaucoup de rapport au sujet de l'influence du champ magnétique sur les bactéries, le mécanisme d'action du champ magnétique sur les systèmes biologiques n'est pas encore clair. Les études antérieures ont montré que l'eau magnétisée avait un pH, une conductivité électrique et une pression osmotique généralement plus élevés que l'eau normale et par conséquent une perméabilité plus forte à travers la membrane cellulaire (**Hughes et al., 2005**). Ces changements causés par un champ magnétique peuvent influencer les activités métaboliques des bactéries, telles que l'activité enzymatique, la respiration et autres processus métaboliques. Ceci peut être la raison que les bactéries dénitrifiantes dans le réacteur exposé au champ magnétique étaient plus performantes.

Les résultats du présent travail permettent de déduire que le champ magnétique peut être un moyen fiable pour accélérer le start-up des procédés de traitement d'azote des eaux usées via l'amélioration de l'activité biologique des populations bactériennes impliquées dans le processus de dénitrification.

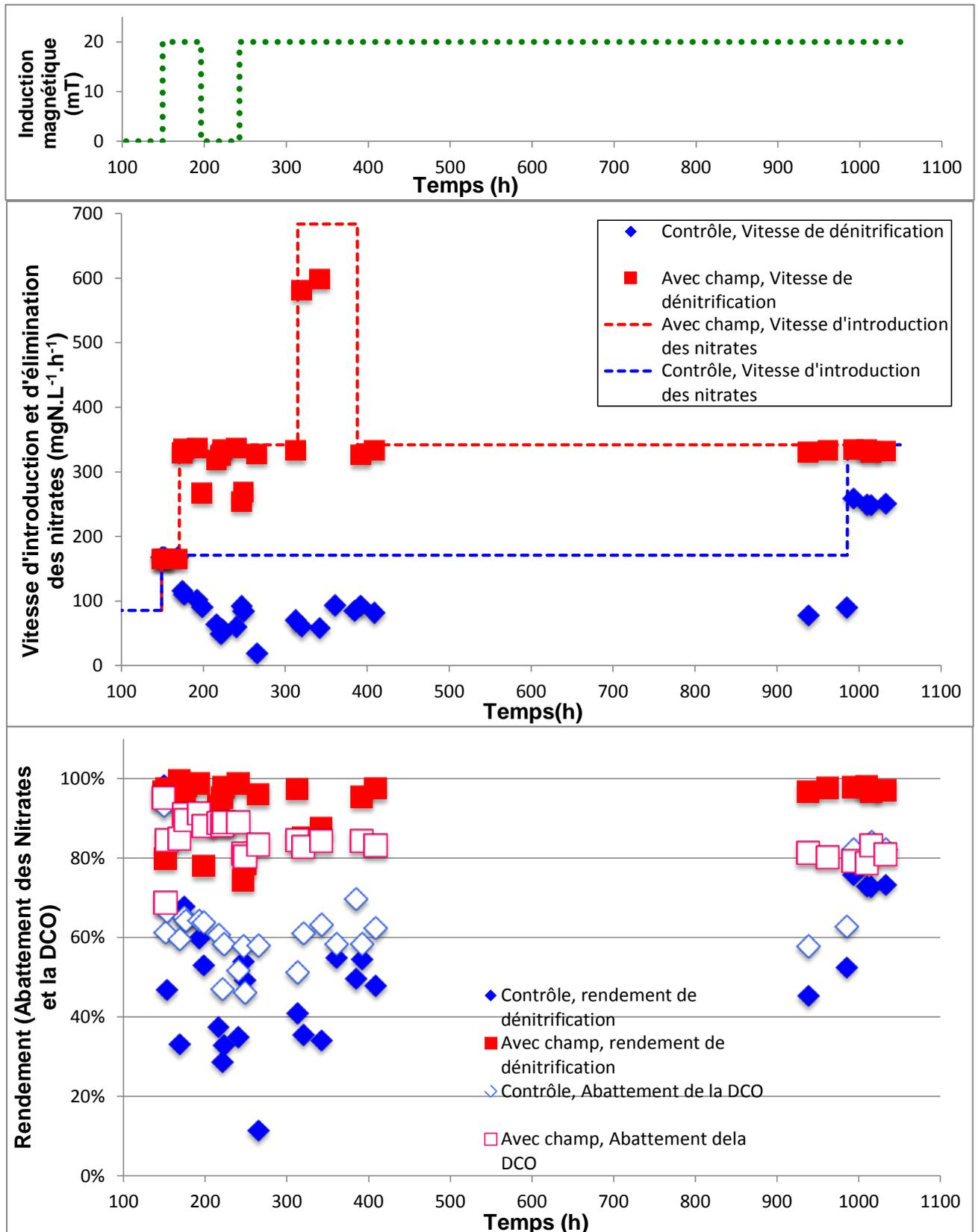


Figure III.16: Performances épuratoires d'un biofiltre garni de granulés de brique avec et sans champ magnétique

III.3.2.2. Influence du champ électromagnétique sur la formation des nitrites

Dans le but de valider la possibilité d'utiliser les granules de brique en dénitrification des eaux usées par biofiltre à lit fixe, ainsi que l'application du champ magnétique pour améliorer les performances du biofiltre, les charges en nitrates et en nitrites à la sortie des colonnes ont été suivies et les résultats sont regroupés sur la figure III.17.

La stratégie opérationnelle des réacteurs consiste en une augmentation de la charge en nitrate à l'entrée quand la charge résiduelle est en dessous des normes de rejet afin de déterminer les potentialités du support. Les résultats obtenus montrent que la charge résiduelle en nitrates et en nitrites du bioréacteur soumis au champ magnétique était en dessous des valeurs limites durant toute la durée de l'expérience avec un maximum de $24,9 \text{ mg.h}^{-1}$ et $5,2 \text{ mg.h}^{-1}$ respectivement pour une charge à l'entrée de $199,9 \text{ mg.h}^{-1}$.

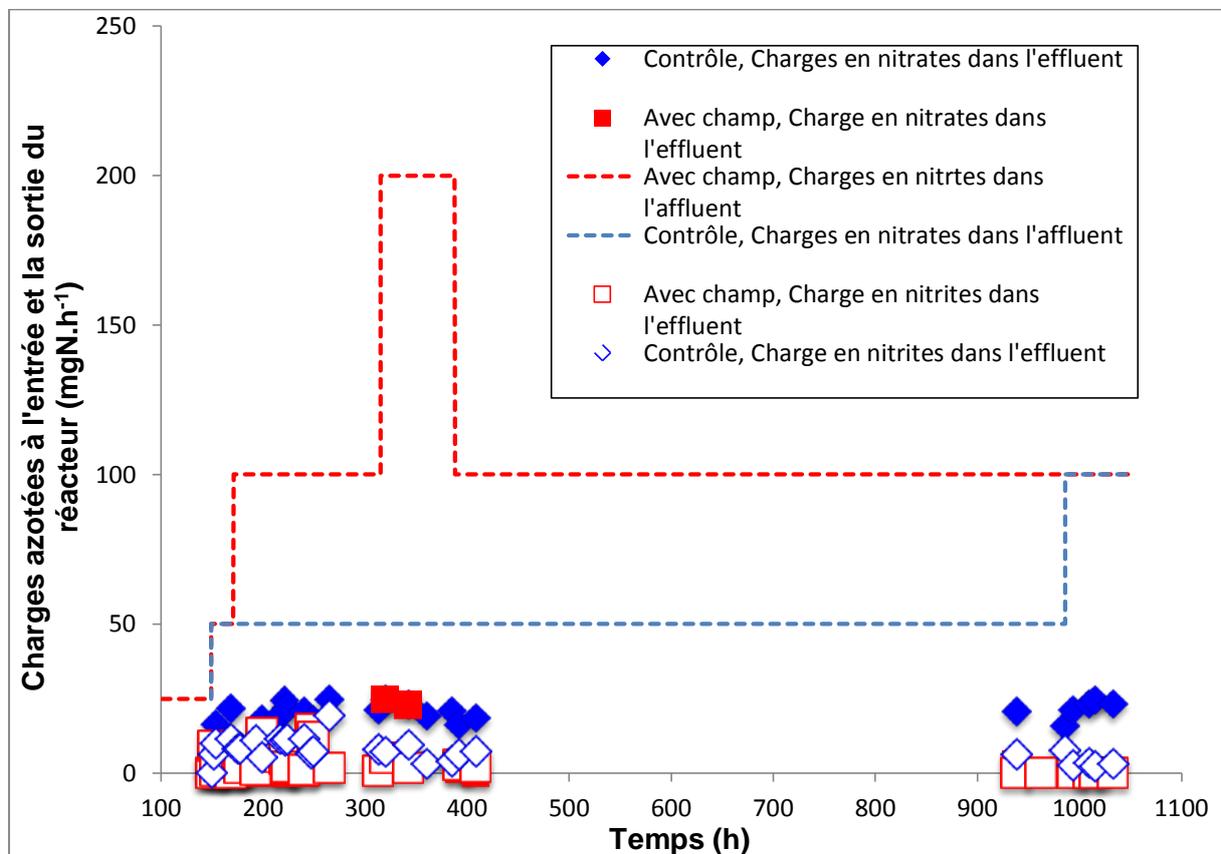


Figure III.17: Effet du champ magnétique sur la production de nitrites du biofiltre de dénitrification garni de granulés de brique.

À la fin de l'expérience (à partir de 993,5 heures), les deux colonnes ont été soumises à la même charge en nitrates à l'entrée afin de pouvoir comparer les performances des deux colonnes. Les résultats ont montré que la charge en nitrates résiduelle était comprise entre 2 et 3,2 mg.h⁻¹ pour le bioréacteur traité au champ magnétique, et de 21,5 à 24,7 mg.h⁻¹ pour le contrôle, tandis que les charges en nitrites étaient de 0,13 à 0,2 mg.h⁻¹ et de 2,5 à 3,7 mg.h⁻¹, respectivement. L'amélioration des performances de traitement peut être expliquée par le fait que le consortium dénitrifiant devient plus actif sous l'effet positif du champ magnétique.

III.3.2.3. Comparaison entre les supports de dénitrification

L'un des objectifs de la présente étude est de tester la possibilité d'utiliser la casse de brique à usage de construction bâtiment comme support de biofiltration. Avant de qualifier le support en question, une comparaison à un support industriel s'avère très nécessaire.

Les figures III.14, III.15, III.16 et III.17 présentant l'efficacité de dénitrification des deux supports en présence et en absence du champ magnétique, illustrent que les deux médias ont des potentiels très prometteurs pour l'enlèvement des nitrates et la réduction de la DCO des eaux usées.

En absence du champ électromagnétique, aucune différence remarquable n'a été enregistrée lorsque les deux biofiltres étaient soumis à une charge à l'entrée de 25 mg.h⁻¹, avec un rendement de dénitrification moyen de 95,2 % et 98,4 % pour la Biolite[®] et la brique, respectivement. Lorsque la charge appliquée a été doublée (50 mg.h⁻¹), le rendement du bioréacteur à base de Biolite[®] a oscillé entre 59 % et 89 %, tandis que le rendement du biofiltre à base de brique était compris entre 45 % et 68 %.

Il existe également une autre observation importante qui mérite d'être signalée. L'augmentation de la vitesse de dénitrification du biofiltre à base de brique lorsque la vitesse d'introduction des nitrates a été doublée durant la phase finale qui s'étale de 993,5 heures jusqu'à la fin de l'expérience. En effet, le rendement de dénitrification durant la période considérée était compris entre 72,8 et 75,8 % pour une vitesse à l'entrée de 342 mg N-NO₃⁻.L⁻¹.h⁻¹, soit une charge en nitrates à l'entrée de 80 mg.h⁻¹, alors qu'il n'a pas excédé 68 % durant toute la phase précédente ou la charge

appliquée en nitrate était de 50 mg.h^{-1} . À l'inverse de la brique, le rendement de dénitrification du biofiltre garni de Biolite® a considérablement chuté lorsque la charge appliquée a été augmentée de 50 mg.h^{-1} à 80 mg.h^{-1} , avec un rendement maximal n'excédant pas 38,8 %.

Cette différence entre les deux médias est probablement due à la différence de porosité, des capacités d'adsorption et d'échanges d'ions.

La présence du champ magnétique autour des biofiltres (Biolite® et Brique) a permis de maintenir les biofiltres de dénitrification à un rendement proche de 90% quelle que soit la charge appliquée.

À l'issue des résultats obtenus, il devient clair que les granulés de brique peuvent être utilisés comme support au traitement des nitrates des eaux usées par biofiltration. De même, l'application du champ magnétique est une méthode effective pour améliorer les performances des biofiltres de dénitrification et de diminuer le temps de la start-up.

III.3.3. Durabilité de l'effet magnétique et ajout de biomasse non magnétisée.

L'objectif principal de cette partie du travail est d'étudier la capacité des boues magnétisées à garder les mêmes performances de dénitrification en absence du champ magnétique et en présence d'une boue native au sein de la même colonne de dénitrification, afin de simuler les conditions réelles de mise en fonctionnement de la boue ainsi obtenue.

À cet effet, l'ensemble biomasse-support des biofiltres ayant subi un traitement au champ magnétique a été réparti équitablement sur deux nouvelles colonnes. Le volume total de ces derniers a été ajusté à 500 mL avec du support vierge, afin de retrouver les conditions des expériences précédentes.

Les nouvelles colonnes dénitrifiantes ainsi obtenues fonctionnent dans les mêmes conditions de charges, la première a été mise sous un champ magnétique de 20 mT, tandis que la deuxième fonctionnant en absence du champ magnétique. Les résultats de cette partie du travail permettront de mettre en évidence l'irréversibilité ou non de l'effet induit par une exposition au champ magnétique statique et de confirmer les résultats obtenus en mode batch.

Nous avons donc injecté aux réacteurs une quantité de biomasse native n'ayant subi aucun traitement. L'objectif principal de cette manipulation est de simuler les conditions d'une station d'épuration et de déterminer l'effet d'une boue étrangère sur les performances du biofiltre préalablement inoculé avec la biomasse à fort potentiel dénitrifiant obtenue sous l'effet des radiations magnétiques.

III.3.3.1. Cas de la Biolite®

À l'équilibre, le suivi de l'évolution de la charge éliminée et le rendement de dénitrification en sortie des colonnes (Figure III.18) montrent que les performances des deux biofiltres sont identiques. En effet, un rendement de dénitrification avoisinant les 99% a été obtenu en sortie des deux colonnes entre 0 et 164,5 heures. Ce résultat montre clairement que l'effet induit par le champ magnétique est acquis. Suite à ces résultats, nous avons injecté à l'entrée des colonnes une boue native d'une masse 0,078 g de MS et nous avons suivi l'évolution des concentrations en nitrates, en nitrites et la demande chimique en oxygène à la sortie des colonnes. À l'équilibre, le rendement de dénitrification était de 99 % pour le biofiltre soumis au champ magnétique et 97 % pour le témoin. De même, le rendement de dénitrification est resté stable après l'injection de deux autres doses (0,156 g de MS et 0,312 g de MS) et ceci durant la période allant de 171 heures à 239 heures. Ces résultats montrent que l'injection de biomasse étrangère ne modifie pas les performances du biofilm déjà en place.

Durant la période allant de 239 heures à 320 heures, nous avons doublé la charge appliquée et les résultats ont montré que les deux biofiltres permettent une élimination de 93 % et 92,5 % des nitrates avec et sans champ magnétique, respectivement.

III.3.3.2. Cas de la brique

De manière analogue à la Biolite®, la biomasse ayant subi un traitement magnétique à l'état fixe sur les granules de brique avait montré des performances de dénitrification stables dans le temps et similaires à ceux de la boue demeurant toujours sous un champ magnétique de 20 mT (Figure III.19).

En effet, pendant toute la durée de l'expérience, et quelque soit la quantité de biomasse native injectée à l'entrée des colonnes, le rendement de dénitrification est

resté stable avec des valeurs de 96 %, 99 %, 97 % et 98 % sans injection de boue à l'entrée, avec 0,078 g de boue, 0,156 g de boue et 0,312 g de boue, respectivement.

Cette démarche expérimentale et les résultats obtenus ont permis de conclure que le champ magnétique statique est un outil efficace pour la constitution de start-up de boue activée à forts potentiels dénitrifiants permettant l'amélioration des performances et les capacités des biofiltres de traitement de la pollution azotée.

La comparaison des deux supports utilisés dans la présente étude permet de constater que les performances de dénitrification sur la brique sont légèrement meilleures par rapport à celle sur la Biolite[®] qui est industriellement utilisée dans les stations de traitement des eaux des grandes agglomérations (**Rocher et al., 2008**). Ce résultat nous permet de qualifier la casse de brique à usage de construction bâtiment comme bon support pour la biofiltration des eaux et particulièrement pour la dénitrification biologique.

Les hautes efficacités d'enlèvement des nitrates enregistrées sur le réacteur à base de granulés de brique sous un flux continu peuvent être expliquées par la faible limitation de transfert vers les germes dénitrifiants localisés dans les agrégats de biomasse supportés sur les granules de brique (**Kalyuzhnyi, 2007**).

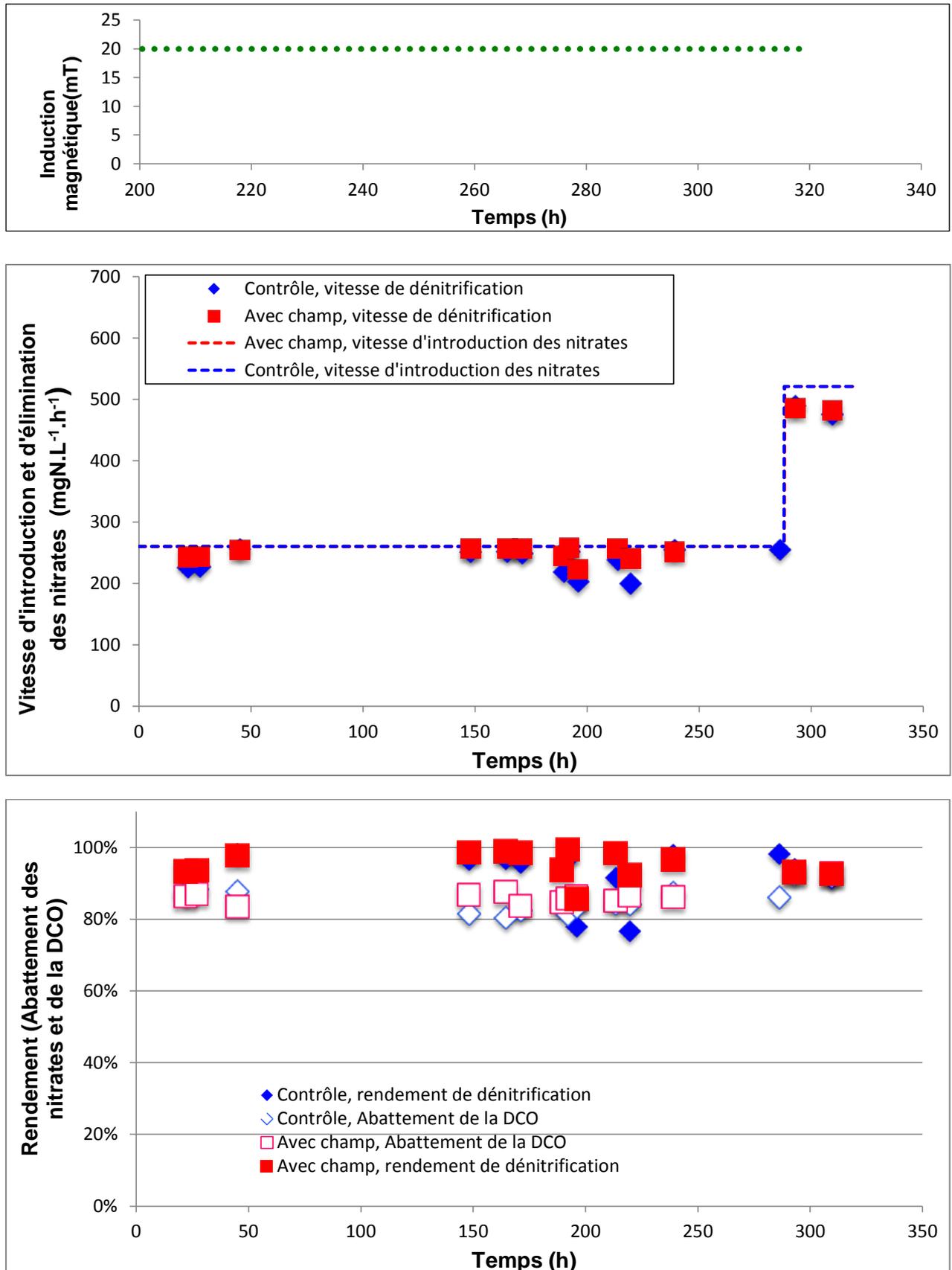


Figure III.18: Durabilité de l'effet magnétique et influence de la contamination par une boue native sur les performances de la dénitrification par biofiltre garni de Biolite®.

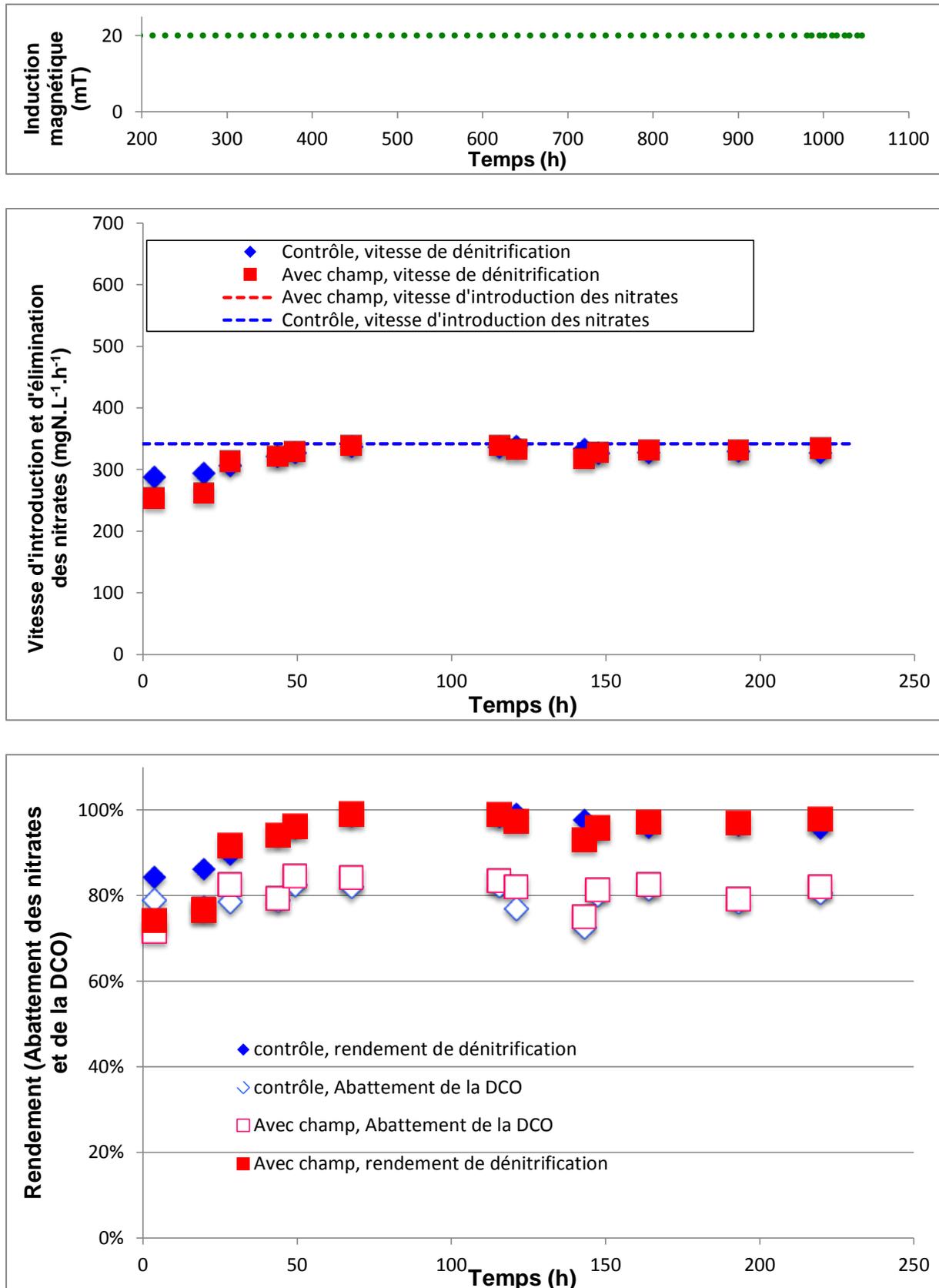


Figure III.19: Durabilité de l'effet magnétique et influence de la contamination par une boue native sur les performances de la dénitrification par biofiltre garni de granulés de brique.

II.3.4. Observation microscopique des supports et caractérisation du biofilm.

Des échantillons de la surface et de l'intérieur des deux bioréacteurs ont été analysés à l'aide du microscope électronique à balayage environnemental. Les substances extracellulaires sont très abondantes à l'intérieur et à l'extérieur de la surface de Biolite[®] et de la brique. La grande surface spécifique fournie associée à la grande capacité du biofilm facilite l'élimination des contaminants de l'eau avec une augmentation considérable de la charge hydraulique par rapport à une dénitrification conventionnelle.

Probablement, le champ magnétique avait contribué donc à la production des polymères extracellulaires, ils sont généralement constitués de polysaccharides, de protéines, d'acides nucléiques et de lipides. Pour les microorganismes, cette matrice sert d'habitat et de protection contre les prédateurs, les agents antimicrobiens et les conditions de vie défavorables (**Lewis, 2007**), ce qui explique en partie la stabilité de la performance des réacteurs en présence d'une contamination par une boue native n'ayant pas subi de traitement magnétique. Les microorganismes constituant le biofilm peuvent communiquer entre eux par l'excrétion de molécules régulatrices, et de s'adapter en échangeant du matériel génétique (**Lewis, 2007; Mah et al., 2003; Sedgely et al., 2008**).

Les biofilms issus des réacteurs exposés au champ magnétique ont montré des différences de formes et d'arrangement des cellules de surface par rapport à ceux des réacteurs témoins. En effet, la forme cellulaire est plus homogène chez les réacteurs traités au champ magnétique ainsi que la densité du biofilm (Figure III.20 & Figure III.21).

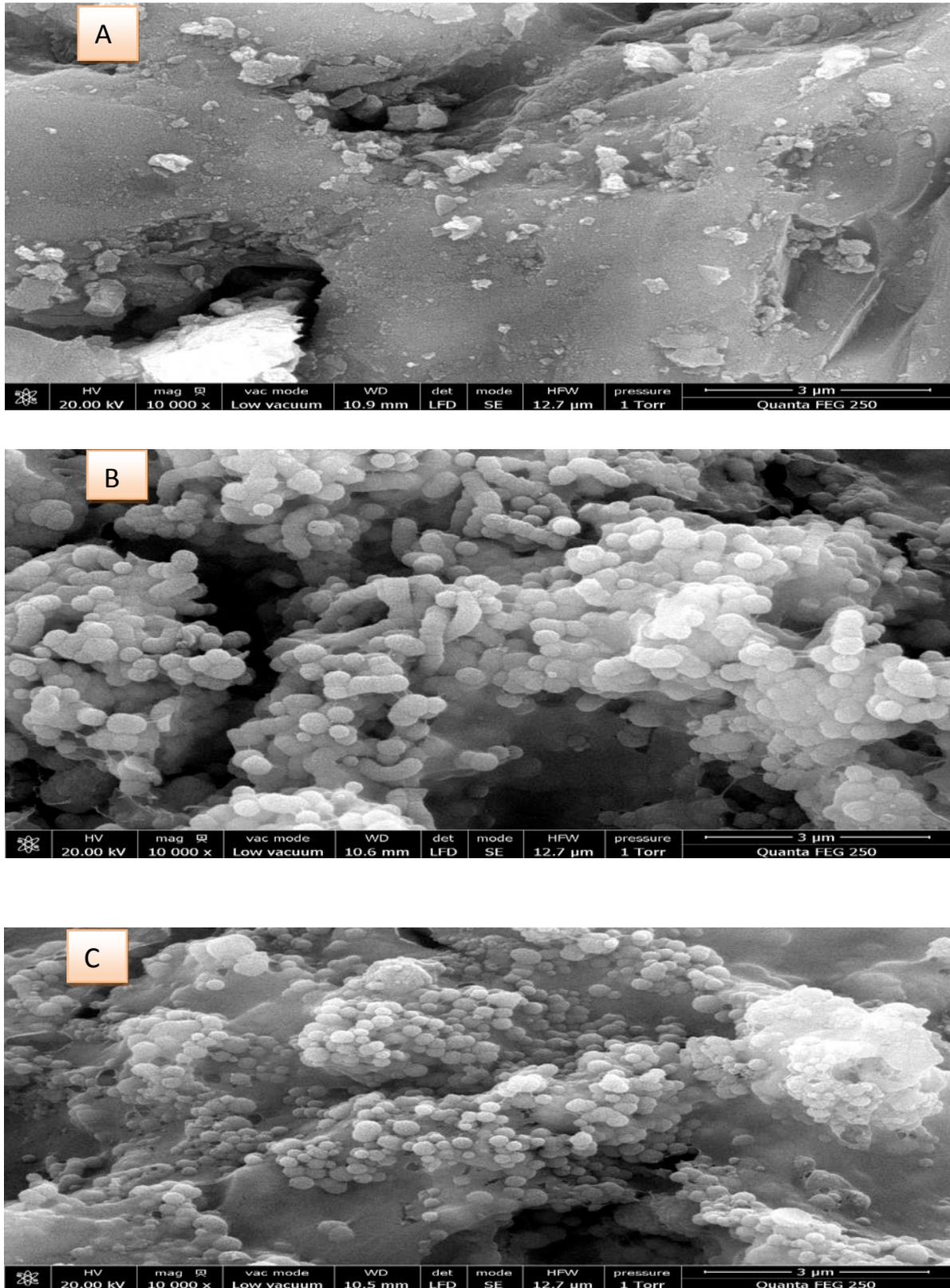


Figure III.20: Photographie au microscope électronique à balayage environnemental du biofiltre rempli de Biolite (A)-Support vierge, (B)-Support colonisé en absence du champ magnétique, (C)- Support colonisé en présence du champ magnétique).

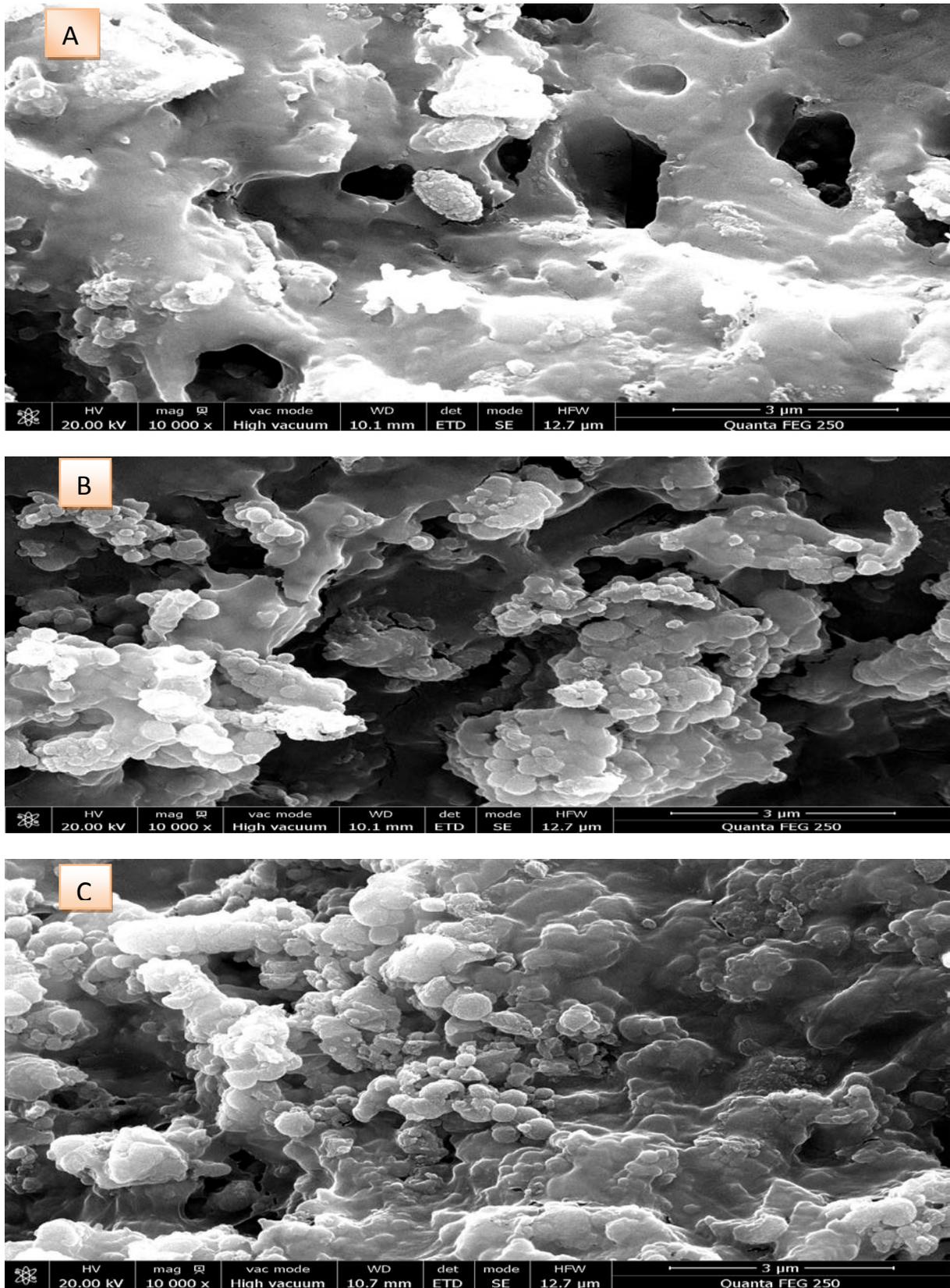


Figure III.21: Photographie au microscope électronique à balayage environnemental du biofiltre rempli de granulés de Brique (A)-Support vierge, (B)-Support colonisé en

absence du champ magnétique, (C)- Support colonisé en présence du champ magnétique).

III.4. Évaluation de l'effet des ultrasons faibles fréquences sur la dénitrification biologique

La présente partie a pour objectif de tester la possibilité d'utiliser les ondes ultrasonores de faibles fréquences comme agent stimulant de l'activité biologique des boues activées dénitrifiantes. Il est admis que les ultrasons hautes fréquences sont des agents bactéricides par excellence, ce qui justifie leurs utilisations à des fins de stérilisation surtout dans le domaine médical, tandis que les ultrasons faibles fréquences ont été utilisées à des fins de stimulation de l'activité biologique dans divers procédés.

III.4.1. Effet de l'intensité des ultrasons

Dans un premier temps, l'effet de l'intensité des ultrasons a été évalué en fixant les autres facteurs: le cycle d'agitation a été fixé à 20 % et le pH à 7,6.

Comme le montre la figure III.22-a, pour une dénitrification conventionnelle, la concentration en nitrates décroît lentement de 24,1 à $11,6 \pm 0,01$ mg N-NO₃⁻.L⁻¹ durant les trois premières heures, tandis que des concentrations de $4,1 \pm 0,12$, $0,6 \pm 0,04$, $0,4 \pm 0,02$, $0,8 \pm 0,04$ et $6,3 \pm 0,2$ ont été observées au même moment de la cinétique en présence d'ondes ultrasons à des intensités de 20, 40, 60 80 et 160 Watts, respectivement. Dans cette figure, la barre d'erreur correspond à l'erreur standard calculée à partir des résultats de trois essais. Pour la plupart des données, les expériences sont hautement reproductibles et l'erreur standard est de 2 à 5 % à l'exception des hautes intensités ultrasoniques.

Ces résultats montrent que les ondes ultrasons améliorent largement la dénitrification biologique. Les coefficients cinétiques et leurs erreurs standards ont été identifiés en utilisant la fonction "Droite de régression" d'Excel avec un coefficient de détermination $R^2 > 0,9$.

Pour toutes les conditions, la dénitrification biologique suit un modèle cinétique d'ordre zéro. Ces résultats sont en accord avec ceux rapportés par **Moore et Shroeder (1971)**; **Foglar et al. (2005)**; **Dhamole et al. (2007)**.

La dégradation des nitrates aura lieu en quatre étapes consécutives, mais il est généralement considéré que les nitrates sont convertis en premier lieu en nitrites (facteur limitant) puis en azote gazeux par une cinétique d'ordre zéro pour la première réaction. La figure III.22b, montre que la constante cinétique de dénitrification augmente avec l'intensité des ultrasons de $4,85 \text{ mg N-NO}_3^- \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ pour le témoin à $8,5 \text{ mg N-NO}_3^- \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ pour une intensité de 60 W puis la constante cinétique décroît lentement. Statistiquement, la constante de vitesse de dénitrification reste inchangée entre 40 et 80 W. À l'intensité de 60 Watts, le rendement de dénitrification a été amélioré de 73 % comparativement au contrôle. Il a été démontré que les ultrasons faibles fréquences provoquent des changements sur la membrane et le métabolisme cellulaire, probablement, en améliorant le transfert de masse de réactifs et de produits chimiques à travers la paroi et la membrane cellulaire, et potentiellement par la stimulation de l'activité des enzymes en augmentant le transfert des réactifs vers le site actif (**Sinisterra, 1992**). **Lin et al. (2001)** et **Wu et Ge (2004)** suggèrent également que les mécanismes de défense cellulaire peuvent contribuer à l'augmentation de l'activité enzymatique, le métabolisme et la croissance cellulaire. En effet, lorsque l'intensité des ultrasons est excessivement augmentée, au-delà de 200 Watts, la vitesse de dénitrification décroît rapidement, ce qui nous laisse penser que les hautes intensités ultrasoniques provoquent une surstimulation conduisant à la mort cellulaire, cela pourrait expliquer pourquoi la vitesse de dénitrification est plus faible aux intensités allant de 500 à 900 Watts par rapport au contrôle.

Il est généralement admis que la réduction des nitrites passe par trois phases (**Karanasios et al., 2010**). Les microorganismes réduisent les nitrites (NO_2^-) en oxyde nitrique, puis en oxyde nitreux qui sera transformé en azote gazeux (N_2). L'évolution de la concentration en nitrites est représentée sur la figure III.22c.

La concentration initiale en nitrites était en dessous de $0,02 \text{ mg NO}_2^- \cdot \text{L}^{-1}$ dans toutes les cinétiques réalisées. Pour toutes les intensités appliquées, la concentration des nitrites au début de la cinétique augmente, puis elle décroît jusqu'à atteindre des valeurs en dessous de la valeur limite ($<0,02 \text{ mg NO}_2^- \cdot \text{L}^{-1}$) avec un maximum d'accumulation de $0,21 \pm 0,01 \text{ mg NO}_2^- \cdot \text{L}^{-1}$ pour la cinétique témoin sans ultrasons et $0,21 \pm 0,01$; $0,22 \pm 0,01$; $0,26 \pm 0,01$; $0,26 \pm 0,01$ et $0,30 \pm 0,01 \text{ mg NO}_2^- \cdot \text{L}^{-1}$ pour les intensités de 20, 40, 60, 80 et 160 watts respectivement. Comme pour les nitrates,

les hautes intensités ultrasoniques affectent négativement le processus d'élimination des nitrites, qui ont persisté dans le milieu réactionnel même après sept heures.

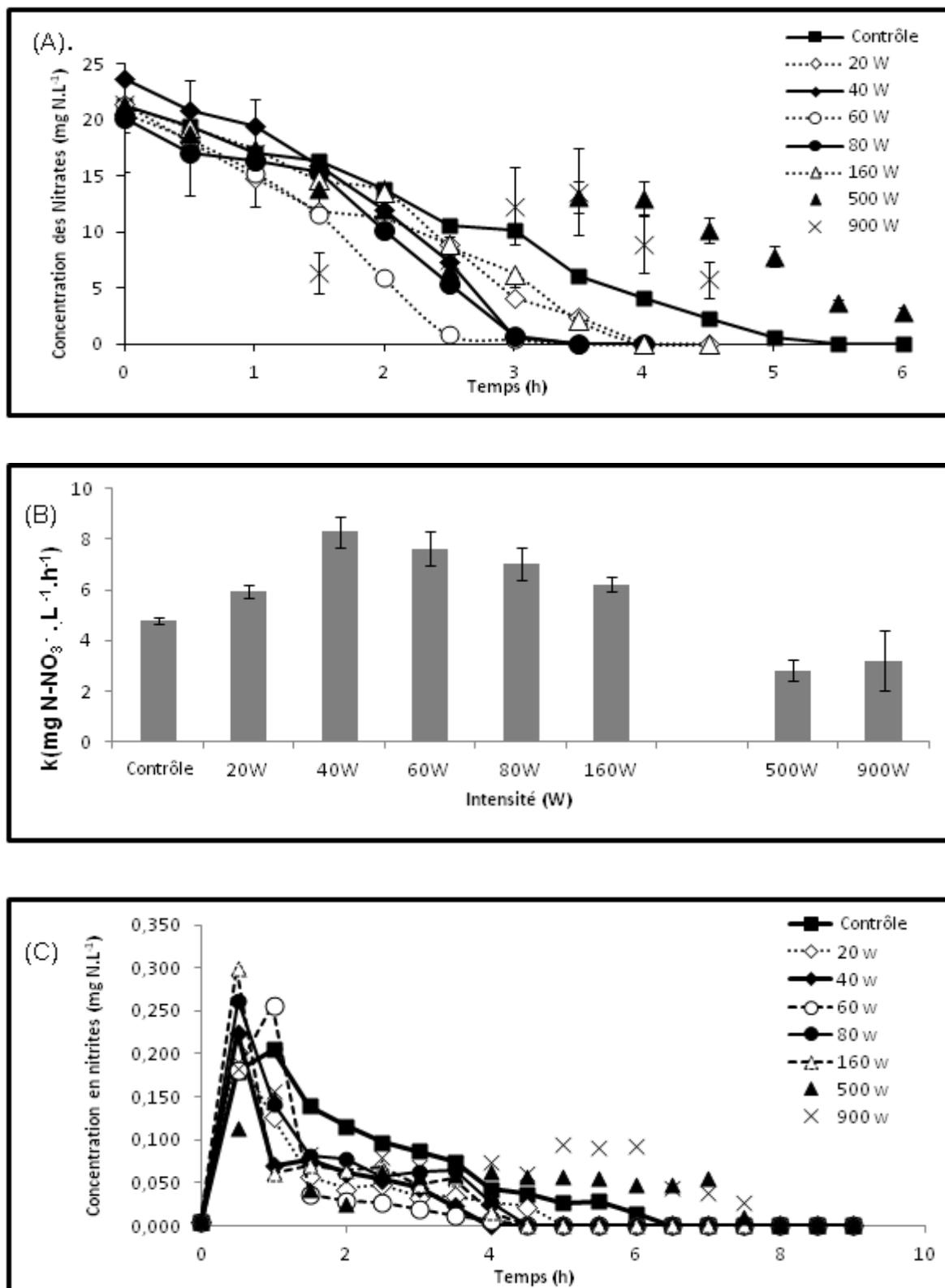


Figure III.22: Effet de l'intensité ultrasonique sur les performances de la dénitrification biologique (intensité de 60W, fréquence de 20 kHz, pH= 6,7 et une

concentration initiale de 20 mg NO_3^- -N.L⁻¹. A. concentration en nitrates versus temps, B. vitesse de dénitrification versus cycle de traitement, C. concentration en nitrites versus temps.

À la lumière des résultats obtenus dans cette section, le traitement aux ultrasons a une variante d'effets sur la boue activée dénitrifiante, par exemple, l'accumulation des nitrites était maximale à 160 watts par rapport aux faibles intensités. Ces effets peuvent être attribués à l'action des ondes ultrasons sur l'enzyme nitrate réductase, ce qui affecte ses capacités de réduire d'importantes quantités de nitrates en nitrites. L'accumulation des nitrites pendant la première heure est en grande partie due à l'activité des nitrates réductases. Semblablement aux observations de **Rivett et al. (2008)**, les nitrites décroissent plus tard probablement dû à la réduction des nitrites qui apparaît tardivement par rapport à la réduction des nitrates.

Subhedar et al. (2005) avaient établi que les faibles intensités d'ultrasons ont un effet positif sur l'activité des cellulases. Le maximum d'activité de ces cellulases a été observé lorsque l'enzyme a été traité avec une intensité de 60 Watts et un cycle de traitement de 70 % sous lesquels l'activité de l'enzyme augmente de 2,4 fois par rapport aux échantillons témoins.

Zheng et al. (2013) indiquent que les ultrasons de faibles fréquences et de faibles densités avec un temps de radiation de 2 heures stimulent réellement la nitrification partielle et la nitrification-dénitrification simultanées aux conditions d'aérobies dans un réacteur séquentiel en batch avec une accumulation de nitrites et un rendement de nitrification et de dénitrification 73,9 % et 72,8 % respectivement.

Les résultats de cette partie suggèrent que les radiations ultrasons contribuent à l'ouverture des pores de la membrane cellulaire, et par conséquent la réduction de quantités importantes de nitrates en nitrites à travers la chaîne de respiration et stimule également l'activité de la nitrite réductase: enzyme responsable de la réduction des nitrites via la chaîne de respiration.

III.4.2. Effet du cycle de traitement

En relation avec la période de traitement, le cycle d'exposition aux ultrasons est l'un des paramètres de fonctionnement les plus importants d'un procédé de biodénitrification par boue activée (**Zhong et al., 2011**). Le cycle de traitement est la

fraction entre le temps d'émission et d'arrêt de l'injection d'ondes ultrasons par la sonde piézométrique dans le milieu réactionnel. Par exemple, un cycle de traitement de 10 % correspond à une radiation d'une seconde suivie d'une période de non sonication de 9 secondes. L'effet des différents cycles de traitement (10, 20, 40 et 50 %) sur les performances de la dénitrification a été étudié en variant le temps d'émission et d'arrêt de l'injection d'ondes ultrasons. L'intensité ultrasonique a été fixée à 60 Watts et le pH initial à 7,6.

Les résultats de la figure III.23 montrent que le taux d'enlèvement des nitrates augmente avec l'augmentation du cycle de traitement. Après 1,5 heure d'opération, la concentration résiduelle en nitrates était de $16,4 \pm 0,3$ mg $\text{NO}_3^- \text{-N} \cdot \text{L}^{-1}$ pour le contrôle sans ultrasons, et $12,3 \pm 0,6$, $0,5 \pm 0,04$, $1,3 \pm 0,1$ et $2,3 \pm 0,14$ mg $\text{NO}_3^- \text{-N} \cdot \text{L}^{-1}$ à des cycles de traitement de 10, 20, 40 et 50 %, respectivement.

Comme décrit précédemment, la détermination des constantes cinétiques d'ordre zéro et l'erreur standard a été effectuée en utilisant la fonction "Droite de régression" d'Excel. La figure III.23b montre que le maximum du taux d'enlèvement des nitrates a été obtenu à un cycle d'exposition aux ultrasons de 40 %, avec une augmentation de la constante cinétique de 192 % comparée à celle de la cinétique témoin. Un tel résultat a aussi été observé par **Zhong et al. (2011)** qui ont mis au point la relation entre le temps d'exposition aux ultrasons et l'efficacité du processus. L'irradiation ultrasonique peut être utilisée en mode continu pulsé. L'application d'ultrasons en mode pulsé peut générer des problèmes, tels que l'érosion des sondes et l'augmentation de la température. En outre, aucune différence statistique n'a été observée entre les cycles de traitement (de 10 à 50 %) avec, cependant, un cycle de 40 % a été choisi comme optimal, correspondant à un maximum d'activité dénitrifiante avec un minimum d'énergie injectée dans le milieu réactionnel.

En ce qui concerne les nitrites, les résultats de la figure III.23c indiquent que la concentration augmente avec l'augmentation du pourcentage du cycle de traitement. La concentration maximale des nitrites était de $0,205 \pm 0,001$ mg $\text{NO}_2^- \text{-N} \cdot \text{L}^{-1}$ sans traitement aux ultrasons. Lorsque le temps d'exposition aux ultrasons était de 1, 2, 4 et 5 secondes pour une durée totale de 10 secondes, la concentration des nitrites augmente de $0,19 \pm 0,01$, $0,38 \pm 0,03$, $0,26 \pm 0,01$ et $0,29 \pm 0,01$ mg $\text{NO}_2^- \text{-N} \cdot \text{L}^{-1}$ respectivement, puis elle décroît de la même façon. Cette cinétique peut être

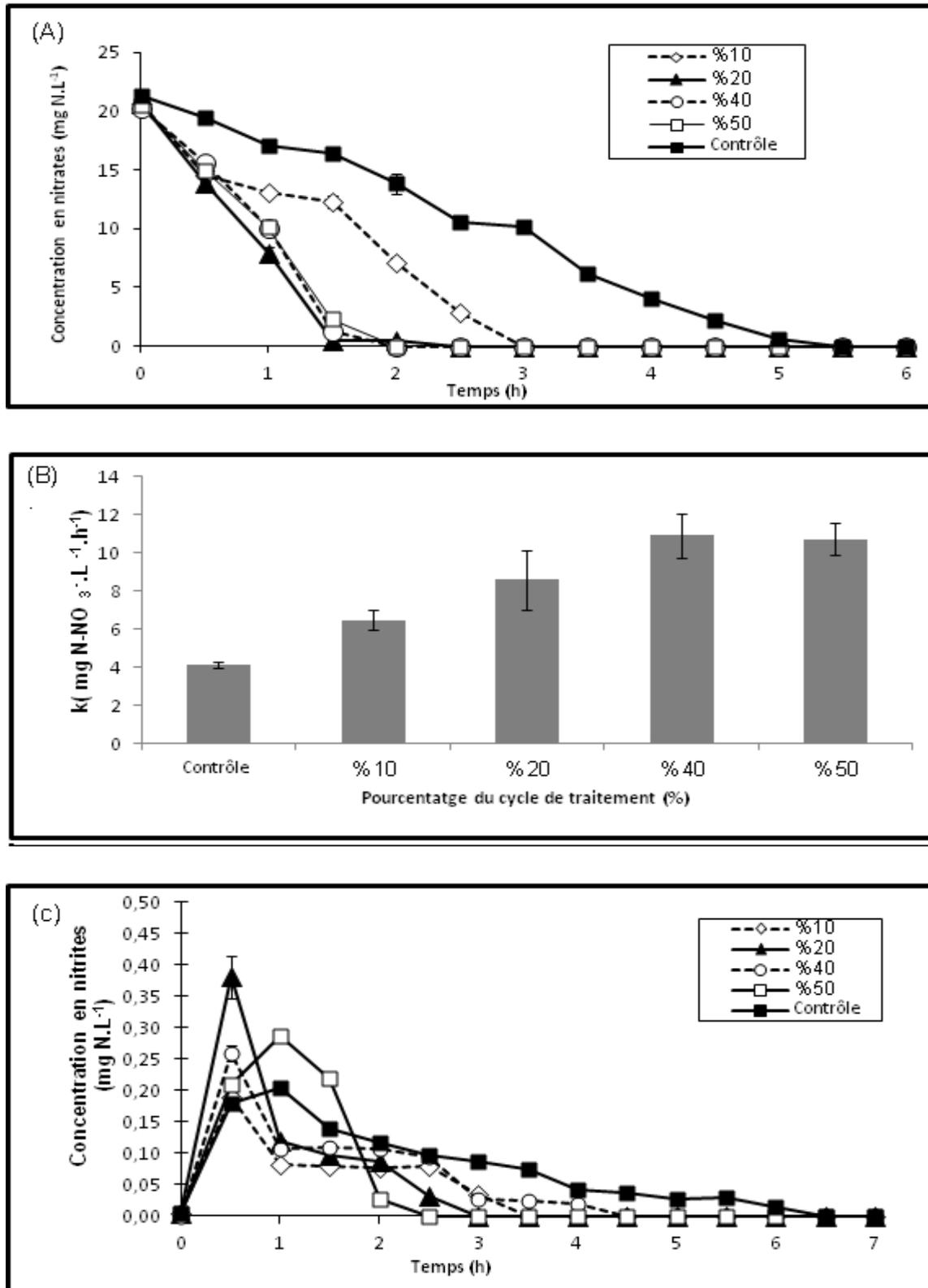


Figure III.23: Effet du cycle de traitement ultrasonique sur les performances de la dénitrification biologique (intensité de 60 W, fréquence de 20 kHz, pH= 6,7 et une concentration initiale de 20 mg NO₃⁻ · N.L⁻¹). A. concentration en nitrates versus temps, B. vitesse de dénitrification versus cycle de traitement, C. concentration en nitrites versus temps.

expliquée par la sensibilité de la nitrate réductase à des fortes charges en nitrates comme mis en évidence par **Korner et Zumft (1989)**.

III.4.3. Effet du pH initial sur les performances de la dénitrification en présence d'ondes ultrasons

Afin d'explorer l'effet du pH sur la dénitrification biologique assistée d'ondes ultrasons, différents pH initiaux ont été testés en se basant sur la variation du pH observé durant les cinétiques d'optimisation de l'intensité. Les résultats obtenus sont illustrés sur la figure III.24.

Les nitrates ont été rapidement éliminés à un pH de 9 avec une constante cinétique de $14,2 \text{ mg NO}_3^- \cdot \text{N} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ qui est nettement plus élevée par rapport à celles enregistrées à un pH de 5 et 6,4. Ces résultats sont similaires à ceux rapportés par la littérature; le pH optimal pour la dénitrification des eaux usées se situe dans une gamme allant de 7 à 9 (**Grady et al., 1999; Qambrani et al., 2013**). Comparativement à une dénitrification conventionnelle (sans stimulation ultrasonique), la vitesse de dénitrification dans les conditions optimales (intensité de 60 W, un cycle d'injection de 60 % et un pH de 9) a été améliorée de 3,4 fois (Figure III.24.b) et les microorganismes impliqués ont une bonne activité, la vitesse de réduction des nitrates en nitrites est nettement meilleure par rapport à celles obtenues à des pH de 5 et 6,4 (Figure III.24c).

Nos résultats ont montré que sans stimulation ultrasonique, la production aussi bien que l'élimination des nitrites sont généralement inférieures par rapport à ceux obtenus avec les ultrasons.

L'augmentation du pH des réacteurs soumis aux ultrasons est due probablement à la production de radicaux OH résultant du phénomène de cavitation, induit par les ultrasons (**Fang et al., 1996**). Ces radicaux sont également produits au cours de la dénitrification biologique, ce qui provoque une augmentation du pH (**Zhao et al., 2011**).

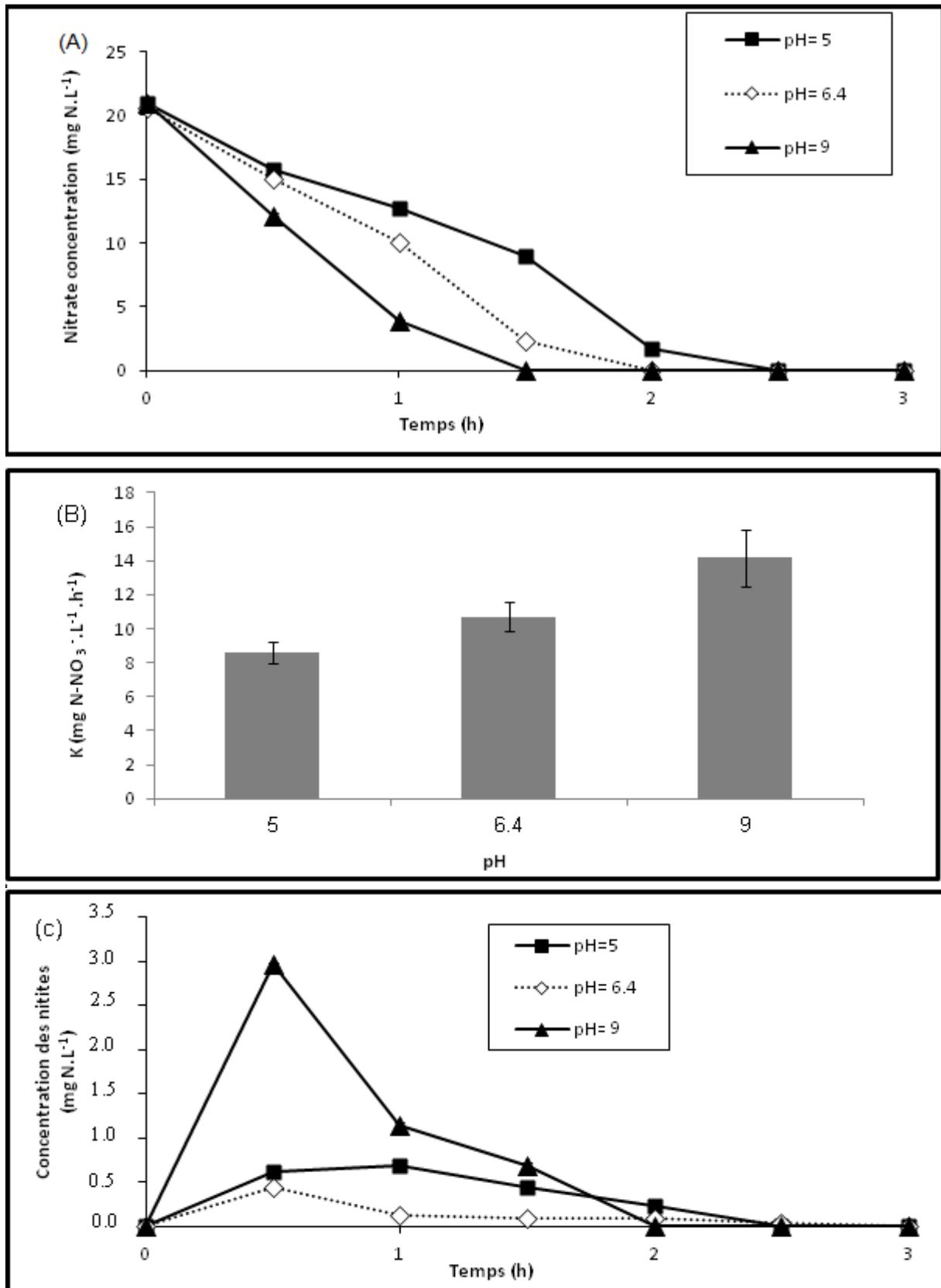


Figure III.24: Effet du pH initial du milieu sur les performances de la dénitrification sous une agitation ultrason d'une fréquence de 20 kHz; intensité d'ultrason= 60 W ; concentration initiale en N-NO₃⁻ = 20 mg.L⁻¹.

Conclusion générale

IV. Conclusion générale

L'étude présentée a pour objectif de proposer les moyens de développement et d'amélioration des performances du procédé de traitement biologique des eaux usées, à savoir la dénitrification biologique. La combinaison d'un système à culture libre ou à culture fixée à un traitement physique stimulant l'activité biologique (ondes ultrasons et champ magnétique) serait une alternative aux procédés classiques afin d'améliorer la productivité d'une station d'épuration et la qualité des eaux rejetées.

Un tel procédé présente plusieurs avantages; il permet entre autres de satisfaire aux normes de rejets de manière constante, quelle que soit la charge reçue à l'entrée de la station d'épuration. Dans ce contexte, nous avons focalisé notre travail sur la compréhension de l'action des ondes ultrasons et du champ magnétique sur les populations microbiennes, ainsi que les paramètres régissant l'action de ces stimulants.

Pour améliorer l'efficacité des performances épuratoires des réacteurs biologiques, un nouveau support de biofiltration a été proposé et testé, afin de mettre à la disposition des stations de traitement des eaux usées un support local de grande disponibilité et de faible coût.

Dans un premier temps, l'étude de l'effet du champ électromagnétique et des ondes ultrasons à faibles fréquences a montré que:

- En mode batch, un champ magnétique de 20 mT a permis d'améliorer de manière significative la vitesse spécifique de dénitrification de 6,8 fois comparativement au contrôle. En effet, la synthèse des résultats obtenus a permis de montrer que le rapport induction magnétique par mg de biomasse initialement présente dans le milieu réactionnel est d'importance capitale, et que l'optimum se situe aux alentours de 0,2 avec un effet inhibiteur au-delà, ce qui pourrait expliquer les effets contradictoires rapportés par la bibliographie. Une succession de phases d'exposition et d'arrêt au champ magnétique a montré que l'effet induit reste irréversible.
- Les observations au microscope électronique à balayage, ainsi que l'analyse phylogénique des populations dénitrifiantes ont montré des modifications

profondes tant sur la forme que sur la diversité, avec une évolution sélective au profit des Entérobactéries.

- Les ultrasons à faibles fréquences de 60 Watts ont permis d'améliorer la vitesse spécifique de dénitrification de 3,4 fois comparativement au contrôle dont l'optimum se situe à un cycle d'injection d'ondes ultrasons de 40 % et à pH= 9.

Dans un second temps, nous avons cherché à appliquer le champ magnétique au procédé de biofiltration (mode continu) sur des granulés de brique à usage de construction bâtiment comme nouveau support proposé et sur la Biolite®, un support industriel servant de référence.

Les expériences réalisées ont confirmé:

- un effet du champ magnétique observé en mode batch quel que soit le support utilisé. Les bioréacteurs exposés au champ magnétique statique permettent une élimination de plus 90 % d'une charge azotée à l'entrée de 640 mg N.L⁻¹.h⁻¹, tandis que les bioréacteurs contrôles permettent une élimination d'une charge à l'entrée ne dépassant pas 160 mg N.L⁻¹.h⁻¹.
- Par injection d'une boue native à l'entrée des bioréacteurs ayant été soumis au champ magnétique afin de simuler les conditions réelles de mise en fonctionnement, nous avons mis en évidence que la stimulation magnétique est irréversible, et le rendement d'épuration demeure toujours supérieur à 95 %, quelle que soit la quantité de biomasse injectée.

L'étude comparative des deux supports de biofiltration a montré que les granulés de brique sont d'un grand potentiel en traitement des eaux par biofiltration, de par les caractéristiques physico-chimiques et les rendements épuratoires proches de ceux de la Biolite®.

Perspectives

Ce travail a montré que le champ magnétique et les ultrasons de faibles fréquences améliorent les performances épuratoires des procédés biologiques de dénitrification des eaux usées dont l'efficacité dépendrait très largement des conditions d'utilisation.

Les recherches doivent être poursuivies afin d'établir le mode d'action de ces stimulants et de réaliser des essais à l'échelle pilote pour confirmer les résultats obtenus avant le passage à l'échelle industrielle.

Références bibliographiques

Abeysinghe D. H., Shanableh A. Rigden B. (1996) Biofilters for water reuse in aquaculture. *Water Science and Technology*, **34**(11), 253-260.

Agarwal G. K., Ghoshal A.K. (2008) Packed bed dynamics during microbial treatment of wastewater: Modelling and simulation. *Bioresource Technology*, **99**(9), 3765-3773.

Albuquerque W. W. C., Costa R. M. P. B., Fernandes T. S., Porto A. L. F. (2016) Evidences of the static magnetic field influence on cellular systems. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, **121**, 16-28.

Amara S., Douki T., Ravanat J.-L., Garrel C., Guiraud P., Favier A., Sakly M., Ben Rhouma K., Abdelmelek H. (2007) Influence of a static magnetic field (250 mT) on the antioxidant response and DNA integrity in THP1 cells. *Physics in Medicine & Bioogy.*, **52**, 889-898.

Anton-leberre V., Haanappel E., Marsaud N., Trouilh L., Benbadis L., Boucherie H., Massou S., Franc J.M. (2010) Exposure to high static or pulsed magnetic fields does not affect cellular processes in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Bioelectromagnetics*, **38**, 28-38.

Atak Ç., Çelik, O., Olgun A., Alikamano_glu S., Rzakoulieva A. (2014) Effect of magnetic field on peroxidase activities of soybean tissue culture. *Biotechnology Equipment*, **21**, 166-171.

Azimi S., Rocher V., Paffoni C., Goncalves A. et Gousailles M. (2010) Dynamique de la colonisation du massif filtrant d'une unité de dénitrification des eaux usées par biofiltration. *La Houille Blanche*, **1**, 97-105.

Barjenbruch. (2007) Benchmarking of BAF plants : operational experience on 40 full-scale installations in germany. *Water Science and Technology*, **55**(8-9), 91-98.

Bautista-Toledo, I., Ferro-García, M.A., Rivera-Utrilla, J., Moreno-Castilla, C. Vegas Fernández, F.J. (2005) Bisphenol A Removal from Water by Activated Carbon. Effects of Carbon Characteristics and Solution Chemistry. *Environmental Science and Technology* **39**(16), 6246-6250.

Baytshtok V., Kim S., Yu R., Park H., Chandran K. (2008) Molecular and biokinetic characterization of methylotrophic denitrification using nitrate and nitrite as terminal electron acceptors. *Water Science and Technology*, **58** (2), 359-365.

- Baytshtok V., Lu H., Park H., Kim S., Yu R., Chandran K. (2009)** Impact of varying electron donors on the molecular microbial ecology and biokinetics of methylotrophic denitrifying bacteria. *Biotechnology and Bioengineering*, **102** (6), 1527-1536.
- Boley A., Muller W.R., Haider G. (2000)** Biodegradable polymers as solid substrate and biofilm carrier for denitrification in recirculated aquaculture systems. *Aquaculture Engineering*, **22** (1–2), 75–85.
- Bothe H., Jost G., Schloter M., Ward B.B., Witzel, K.P. (2000)** Molecular analysis of ammonia oxidation and denitrification in natural environments. *FEMS Microbiology Reviews*, **24**, 673-690.
- Bougrier C., Carrère H., Delgenès J.P. (2005)** Solubilisation of waste-activated sludge by ultrasonic treatment. *The Chemical Engineering Journal*, **106**, 163-169.
- Buchachenko A.L., Kuznetsov D.A. (2008)** Magnetic field affects enzymatic ATPn synthesis. *Journal of the American Chemical Society*, **130**, 12868-12869.
- Büyüksulu N., Çelik O., Atak Ç. (2006)** The effect of magnetic field on the activity of superoxide dismutase. *Journal of Cell and Molecular Biology*, **500**, 57-62.
- Çelik O., Büyüksulu N., Atak Ç., Rzakoulieva A. (2009)** Effects of magnetic field on activity of superoxide dismutase and catalase in glycine max (L.) Merr. Roots. *Polish Journal of Environmental Studies*, **18**, 175-182.
- Chakravarthy S.S., Pande S., Kapoor A., Nerurkar A.S. (2011)** Comparison of denitrification between *Paracoccus* sp. And *Diaphorobacter* sp. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, **165** (1), 260-269.
- Chand P. (2008)** Enhancing biodiesel production from soybean oil using ultrasonics. Agricultural And Biosystems Engineering Iowa State University, Ames, Iowa.
- Chen H., Li X. (2008)** Effect of static magnetic field on synthesis of polyhydroxyalkanoates from different short-chain fatty acids by activated sludge. *Bioresource Technology*, **99**, 5538–5544.
- Chionna A., Dwikat M., Panzarini E., Tenuzzo B., Carla` E.C., Verri T., Pagliara P., Abbro L., Dini L. (2003)** Cell shape and plasma membrane alterations after static magnetic fields exposure. *European Journal of Histochemistry*, **47**, 299–308.
- Chu L.B., Wang J.L. (2016)** Denitrification of groundwater using PHBV blends in packed bed reactors and the microbial diversity. *Chemosphere*, **155** (3), 463–470.
- Cohen Y. (2001)** Biofiltration - The treatment of fluids by microorganism immobilized into the filter bedding material: a review. *Bioresource Technology*, **77**, 257-274.

- Courtemanche M. (1996)** Traitement des eaux usées d'une usine de pâtes à papiers par le procédé de biofiltration CTICONTA®. Mémoire ès science appliquée, Université de Sherbrooke, 126 p.
- Da Motta M.A., Muniz J.B.F., Schuler A., Da Motta M. (2004)** Static magnetic fields enhancement of *Saccharomyces cerevisiae* ethanolic fermentation. *Biotechnology Progress*, **20**, 393-396.
- Damaraju S., Singh U.K, Sreekanth D., Bhandari A. (2015)** Denitrification in biofilm configured horizontal flow woodchip bioreactor: effet of hydraulic retention time and biomass growth. *Ecohydrology & Hydrobiology*, **15** (1) 39-48.
- Deamici K.M., Cardias B.B., Costa J.A.V., L. O. Santos (2013).** Static magnetic fields in culture of *Chlorella fusca*: Bioeffects on growth and biomass composition. *Process Biochemistry*, **51** (7), 912-916.
- DeSantis Jr., T.Z., Hugenholtz, P., Keller, K., Brodie, E.L., Larsen, N., Piceno, Y.M., Phan, R., Andersen, G.L. (2006)** NAST: a multiple sequence alignment server for comparative analysis of 16S rRNA genes. *Nucleic Acids Research*, **34**, 394-399.
- Dhamole P.B., Nair R.R., D'souza S.F., Lele S.S. (2007)** Denitrification of High Strength Nitrate Waste. *Bioresource Technology*, **98**, 247–252.
- Dini L., Abbro L. (2005)** Bioeffects of moderate-intensity static magnetic fields on cell cultures. *Micron*, **36**, 195-217.
- Dos Santos L.O., Gonzales T.A., Úbeda B.T., Alegre R.M. (2012)** Glutathione production using magnetic fields generated by magnets. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, **55**, 921-926.
- Dumont E., Andres Y., Le Cloirec P. Gaudin F. (2008)** Evaluation of a new packing material for H₂ S removed by biofiltration. *Biochemical Engineering Journal*, **42** (2), 120-127.
- Einsle O., Kroneck P.M. (2004)** Structural basis of denitrification. *Biological Chemistry*, **385**, 875–883.
- Fang X., Mark G., von Sonntag C. (1996)** OH radical formation by ultrasound in aqueous solutions part I: the chemistry underlying the terephthalate dosimeter, *Ultrasonics Sonochemistry*, **3** 57–63.
- Foglar L., Briski F., Sipos L., Vukovic M. (2005)** High nitrate removal from synthetic wastewater with the mixed bacterial culture. *Bioresource Technology*, **96**, 879–888.

- Galonja-Corghill T., Kostadinovic L., Bojat N. (2009)** Magnetically altered ethanol fermentation capacity of *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Nat. Sci, Matica Srpska Novi Sad.*, **117**, 119-123.
- Gemishev O., Dimova P., Panova N., Evstatieva Y. (2009)** Effect of static magnetic field on synthesis of endoglucanase by *Trichoderma reesei* M7. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, **23**, 848-851.
- Glass C., Silverstein J. (1998)** Denitrification kinetics of high nitrate concentration water: pH effect on inhibition and nitrite accumulation. *Water Research*, **32** (3), 831-839.
- Goto Y., Taniura H., Yamada K., Hirai T., Sanada N., Nakamichi N., Yoneda Y. (2006)** The magnetism responsive gene *Ntan1* in mouse brain. *Neurochemistry International*, **49**, 334-341.
- Grady C.P.L., Daigger G.T., Lim H.C. (1999)** Biological Wastewater Treatment. Marcel Dekker, New York.
- Grewell D. A, Benatar A., Park. J. B. (2003)** Plastics and Composites Welding Handbook, Hanser Gardner Publications New York.
- Gruchlik A., Wilczok A., Chodurek E., Polecho_nski W., Wolny D., Dzierzewicz Z. (2012)** Effects of 300 mT static magnetic field on IL-6 secretion in normal human colon myofibroblasts. *Acta Poloniae Pharmaceutica*, **69**, 1320-1324.
- Gumaelius L., Magnusson G., Pettersson B., Dalhammar G., (2001)** *Comamonas denitrificans* sp. nov., an efficient denitrifying bacterium isolated from activated sludge. *International Journal of Systematic and Evolutionary. Microbiology*, **51** (3), 999-1006.
- Guo W.Q., Ding J., Cao G.L., Ren N.Q., Cui, F.Y. (2011)** Treatability study of using low frequency ultrasonic pretreatment to augment continues biohydrogen production. *International Journal of Hydrogen Energy*, **36**, 14180–14185.
- Hagman M., Nielsen J.L., Nielsen P.H., Jansen J.I.C. (2008)** Mixed carbon sources for nitrate reduction in activated sludge identification of bacteria and process activity studies. *Water Research*, **42** (6-7), 1539-1546.
- Hai R., Wang Y., Wang X., Li Y., Du Z. (2014)** Bacterial community dynamics and taxa-time relationships within two activated sludge bioreactors. *PLoS One* **9** (3), e90175.

- Hassan K. F., Kadhim S. A., Baqer N. N., Hassan E. S. A. (2016)** Using Magnetic Technique to Increase Efficiency of Organic Pollutants Biodegradation in Wastewater. *Journal of Life Sciences*, **10**, 21-32.
- He J., Wan T., Zhan G., Yang J. (2011)** Ultrasonic reduction of excess sludge from activated sludge system: Energy efficiency improvement via operation optimization. *Ultrasonics Sonochemistry*, **18** (1), 99–103.
- Hughes S., El Haj A.J., Dobson J., Martinac B. (2005)** The influence of static magnetic fields on mechanosensitive ion channel activity in artificial liposomes. *European Biophysics Journal*, **34**, 461-468.
- Hunt R. W., Zavalin A., Bhatnagar A., Chinnasamy S., Das K., C. (2009)** Electromagnetic Biostimulation of Living Cultures for Biotechnology, Biofuel and Bioenergy Applications. *International Journal of Molecular Sciences*, **10**, 4515-4558.
- Iwasaka M., Ikehata M., Miyakoshi J., Ueno S. (2004)** Strong static magnetic field effects on yeast proliferation and distribution. *Bioelectrochemistry*, **65**, 59-68.
- Iwasaka M., Ueno S. (2003)** Detection of intracellular macromolecule behavior under strong magnetic fields by linearly polarized light. *Bioelectromagnetics*, **24**, 564-570.
- Kalyuzhnyi S., Gladchenko M., Mulder A., Versprille B. (2007)** Comparison of quasi steady-state performance of the DEAMOX process under intermittent and continuous feeding and different nitrogen loading rates. *Biotechnology Journal*, **2**, 894–900.
- Karanasios K., Vasiliadou I., Pavlou S., Vayenas D. (2010)** Hydrogenotrophic Denitrification of Potable Water: A Review. *Journal of Hazardous Material*, **180**, 1–3.
- Kohno M., Yamazaki M., Kimura I., Wada M. (2000)** Effect of static magnetic fields on bacteria: *Streptococcus mutans*, *Staphylococcus aureus*, and *Escherichia coli*. *Pathophysiology*, **7**, 143-148.
- Kondaveeti S., Lee S.H., Park H.D., Min B. (2014)** Bacterial communities in a bioelectrochemical denitrification system: the effects of supplemental electron acceptors. *Water Research*, **51**, 25-36.
- Korner H., Zumft W.G. (1989)** Expression of denitrification enzymes in response to the dissolved oxygen level and respiratory substrate in continuous culture of *Pseudomonas stutzeri*. *Applied and Environmental Microbiology* **55** (7), 1670-1676.
- Kriklavová L., Truhlár M., Škodová P., Lederer T., Jirku V. (2014)** Effects of a static magnetic field on phenol degradation effectiveness and *Rhodococcus*

erythropolis growth and respiration in a fed-batch reactor. *Bioresource Technology*, **167**,510- 513.

Krishna Mohan T.V., Nancharaiah Y.V., Venugopalan V.P., Satya Sai P.M. (2016) Effect of C/N ratio on denitrification of high-strength nitratewastewater in anoxic granular sludge sequencing batch reactors, *Ecological Engineering*, **91**, 441–448.

Laramee C.B., Frisch P., McLeod K., Li G.C. (2014) Elevation of heat shock gene expression from static magnetic field exposure in vitro. *Bioelectromagnetics*, **35**, 406-413.

Łebkowska M., zniak-Rutkowska A. N., E. Pajor. (2013) Effect of a static magnetic field of 7 mT on formaldehyde biodegradation in industrial wastewater from urea–formaldehyde resin production by activated sludge. *Bioresource Technology*, **132**, 78–83.

Letunic I., Bork P. (2011) Interactive Tree of Life v2: online annotation and display of phylogenetic trees made easy. *Nucleic Acids Research*, **39**, W475-8.

Lewis A., Felberbaum R., Hochstrasser M., (2007) A nuclear envelope protein linking nuclear pore basket assembly, SUMO protease regulation, and mRNA surveillance. *Journal Cell Biology*, **178** (5), 813-827.

Li P., Zuo J., Wang Y., Zhao J., Tang L., Li Z. (2016) Tertiary nitrogen removal for municipal wastewater using a solidphase denitrifying biofilter with polycaprolactone as the carbon source and filtration medium. *Water Research* ,**93**, 74-83.

Lida Y., Tuziuti T., Yasui K., Kozuka T., Towata A.(2008) Protein release from yeast cells as an evaluation method of physical effects in ultrasonic field. *Ultrasonics Sonochemistry*, **15**(6) 995–1000.

Lin L.D., Wu J.Y., Ho K.P., Qi S.Y. (2001) Ultrasound Induced Physiological Effects and Secondary Metabolite (saponin) Production in Panax Ginseng Cell Cultures. *Ultrasound in Medicine & Biology*, **27**, 1147–1152.

Lisi A., Pozzi D., Pasquali E., Rieti S., Girasole M., Cricenti A., Generosi R., Serafino A.L., Congiu-Castellano A., Ravagnan G., Giuliani L., Grimaldi S. (2000) Three dimensional (3D) analysis of the morphological changes induced by 50 Hz magnetic field exposure on human lymphoblastoid cells (Raji). *Bioelectromagnetics*, **21**, 46–51.

- Lu H., Chandran K. (2010a)** Factors promoting emissions of nitrous oxide and nitric oxide from denitrifying sequencing batch reactors operated with methanol and ethanol as electron donors. *Biotechnology and Bioengineering*, **106**(3), 390-398.
- Lu H.J., Chandran K., Stensel D. (2014)** Microbial ecology of denitrification in biological wastewater treatment. *Water Research*, **64**, 237-254.
- Mah TF., Pitts B., Pellock B., walker GC., Stewart PS., O'Toole GA., (2003)** A genetic basis for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm antibiotic resistance. *Nature*, **426** (6964) 306-310.
- Manoliu A., Oprick L., Creanga D. (2006)** The influence of the static magnetic field (SMF) on some biochemical parameters in cellulolytic fungi *Chaetomium globosum* and *Trichoderma viride* cultivated on media supplemented with panification industrial wastes. *Romanian Journal of.Biology - Plant Biology*, **51-52**, 25-37.
- Marhl M., Haberichter T., Brumen M., Heinrich R. (2000)** Complex calcium oscillations and the role of mitochondria and cytosolic proteins. *Biosystems*, **57**, 75-86.
- Martineau C., Villeneuve C., Mauffrey F., Villemur R. (2013)** *Hyphomicrobium nitratorans* sp. nov., isolated from the biofilm of a methanol-fed denitrification system treating seawater at the Montreal Biodome (Canada). *International Journal of Systematic and Evolutionary. Microbiology*. **63** (10), 3777-3781.
- Martino C.F., Perea H., Hopfner U., Ferguson V.L., Wintermantel E. (2010a)** Effects of weak static magnetic fields on endothelial cells. *Bioelectromagnetics*, **31**, 296-301.
- Mason T., Lorimer J. (2002)** Applied Sonochemistry: Uses of Power Ultrasound in Chemistry and Processing. Wiley-VCH, p-293.
- Mastin B.J., Sherrard R.M., Rodgers Jr. J.H., Shah Y.T. (2001)** Hybrid cavitation /constructed wetland reactors for treatment of chlorinated and non-chlorinated organic. *Engineering in Life Sciences*, **1**, 97-105.
- Mohammadi A.R., Mehrdadi N., Bidhendi G.N., Torabian A. (2011)** Excess sludge reduction using ultrasonic waves in biological wastewater treatment. *Desalination*, **275**, 67–73.
- Moir J.W., Wood N.J. (2001)** Nitrate and nitrite transport in bacteria. *Cellular and Molecular Life Sciences*, **58**, 215–224.

- Montalvoa S., Guerrerob L., Roblesa M., Meryb C., Huilindir C., Borja R. (2014)** Start-up and performance of UASB reactors using zeolite for improvement of nitrate removal process. *Ecological Engineering*, **70**, 437–445.
- Moore S., Schroeder E. (1971)** The Effect of Nitrate Feed Rate on Denitrification. *Water Research*, **5**, 445–452.
- Motta M., Montenegro E.J., Stamford T.L., Silva R., Silva F.R. (2001)** Changes in *Saccharomyces cerevisiae* development induced by magnetic fields. *Biotechnology Progress*, **17**, 970-973.
- Muniz J.B., Marcelino M., Motta M., Schuler A., Motta M.A. (2007)** Influence of static magnetic fields on *S. cerevisiae* biomass growth. *Brazilian Archives of Biology and Technology.*, **50**, 515-520.
- Nalcaci O.O., Boke N., Ovez B. (2011)** Potential of the bacterial strain *Acidovorax avenae* subsp. *avenae* LMG 17238 and macro algae *Gracilaria verrucosa* for denitrification. *Desalination*, **274**, 44–53.
- Nickel K., Neis U. (2007)** Ultrasonic disintegration of biosolids for improved biodegradation. *Ultrasonics Sonochemistry*, **14**, 450-455.
- Niu C., Geng J., Ren H., Ding L., Xu K., Liang W. (2013)** The strengthening effect of a static magnetic field on activated sludge activity at low temperature. *Bioresource Technology*, **150**, 156–162.
- Niu C., Liang W., Ren H., Geng J., Ding L., Xu K. (2014)** Enhancement of activated sludge activity by 10–50 mT static magnetic field intensity at low temperature. *Bioresource Technology*, **159**, 48–54.
- Noredal Throbäck N. (2006)** Exploring denitrifying communities in the environment. Thèse de Doctorat, université suédoise des sciences agronomiques, p 39.
- Office National des statistiques-ONS (2006)** Compendium national sur les statistiques de l'Environnement, Alger, p-89
- Oh J., Silverstein J. (1999a)** Oxygen inhibition of activated sludge denitrification. *Water Research*, **33** (8), 1925-1937.
- Paredes D., Kusch P., Mbwette T. S. A., Stange F., Muller R. A. Koser H. (2007)** New aspects of microbial nitrogen transformations in the context of wastewater treatment – A review. *Engineering in Life Sciences*, **7**(1), 13-25.
- Paul A.L., Ferl R.J., Meisel M.W. (2006)** High magnetic field induced changes of gene expression in *arabinopsis*. *BioMagnetic Research and Technology*, **4**, 7.

- Perrin A., Souques M. (2010).** Champs électromagnétiques, environnement et santé. Springer (ed) Verlag France, Paris, p: 1-17.
- Prina-Mello A., Campbell V., Coey J. (2005)** Static magnetic field effects on cells. A possible road to cell differentiation. *NSTI-Nanotech*, **1**, 96-99.
- Pujol R., Lemmel H., Gousailles M. (1998)** A keypoint of nitrification in an upflow biofiltration reactor. *Water Science and Technology*, **38**(3), 43-49.
- Qambrani N.A., Jung S.H., Ok Y.S., Kim Y.S., Oh S.E. (2013).** Nitrate-contaminated groundwater remediation by combined autotrophic and heterotrophic denitrification for sulfate and pH control: batch tests. *Journal of Environmental Sciences*, **20**, 9084–9091.
- Qiu L., Zhang S., Wang G., M. Du. (2010)** Performances and nitrification properties of biological aerated filters with zeolite, ceramic particle and carbonate media. *Bioresource Technology*, **101**, 7245–7251.
- Rieti S., Manni V., Lisi A., Giuliani L., Sacco D., D’Emilia E., Cricenti A., Generosi R., Luce M., Grimaldi S. (2004)** SNOM and AFM microscopy techniques to study the effect of non-ionizing radiation on the morphological and biochemical properties of human keratinocytes cell line (HaCaT). *Journal of Microscopy*, **213**, 20–28.
- Rivett M.O., Buss S.R., Morgan P., Smith J.W.N., Bemment C.D. (2008)** Nitrate Attenuation in Groundwater: A Review of Biogeochemical Controlling Processes. *Water Research*, **42**, 4215–4232.
- Rocher V., Laverman A.M., Gasperi J., Azimi S., Guérin S., Mottelet S., Villières T., Pauss A. (2015)** Nitrite accumulation during denitrification depends on the carbon quality and quantity in wastewater treatment with biofilters. *Environmental Science and Pollution Research*, **22**, 10179–10188.
- Rocher V., Paffoni C., Goncalves A., Azimi S. et Briand C. (2011b)** Conditions d’apparition des nitrites lors de la dénitrification des eaux usées par biofiltration. 1. Importance de la charge appliquée en azote. *L’Eau, l’Industrie, les Nuisances*, **344**, 92-96.
- Rocher V., Paffoni C., Gonçalves A., Azimi S., Gousailles M. (2008)** La biofiltration des eaux résiduaires urbaines : Retour d’expérience du SIAAP. *Revue des Sciences de l’Eau*, **21**, 475-485.

- Rosen A. (1996)** Inhibition of calcium channel activation in GH3 cells by static magnetic fields. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, **1282**, 149-155.
- Rosen, A. D. (2003)** Effect of a 125 mT static magnetic field on the kinetics of voltage activated Nap channels in GH3 cells. *Bioelectromagnetics*, **24**, 517-523.
- Saliling W. J. B., Westerman P. W., Losordo T. M. (2007)** Wood chips and wheat straw as alternative media biofilter for denitrification reactors treating aquaculture and other wastewaters with high nitrate concentration. *Aquacultural Engineering*, **37**, 222-233.
- Sangave P.C., Gogate P.R., Pandit A.B. (2007)** Ultrasound and ozone assisted biological degradation of thermally pretreated and anaerobically pretreated distillery wastewater. *Chemosphere*, **68**, 42-50.
- Sangave P.C., Pandit A.B. (2004)** Ultrasound pre-treatment for enhanced biodegradability of the distillery wastewater. *Ultrasonics Sonochemistry*, **11**, 197-203.
- Schlafer O., Sievers M., Klotzbucher H., Onyeche T.I. (2000)** Improvement of biological activity by low energy ultrasound assisted bioreactors. *Ultrasonics*, **38**, 711-716.
- Sedgely CM., Lee EH., Martin MJ., Flannagan SE. (2008)** Antibiotic resistance gene transfer between *Streptococcus gordonii* and *Enterococcus faecalis* in root canals of teeth ex vivo. *Journal of Endodontics*, **34**, 570-574.
- Serghini M.A., Ritzenthaler C., Pinck L. (1989)** A rapid and efficient 'miniprep' for isolation of plasmid DNA. *Nucleic Acids Research*, **17**(9), 3604.
- Sinisterra J.V. (1992)** Application of Ultrasound to Biotechnology: An Overview. *Ultrasonics*, **30**, 180–185.
- Su J.J., Liu B.Y., Liu C.Y. (2001)** Comparison of aerobic denitrification under high oxygen atmosphere by *Thiosphaera pantotropha* ATCC 35512 and *Pseudomonas stutzeri* SU2 newly isolated from the activated sludge of a piggery wastewater treatment system. *Journal of Applied Microbiology*, **90** (3), 457-462.
- Subhedar P.B., Babu N.R., Gogate P.R. (2015)** Intensification of enzymatic hydrolysis of waste newspaper using ultrasound for fermentable sugar production. *Ultrasonics*, **22**, 326–332.
- Sun F., Wu S., Liu J., Li B., Chen Y., Wu W. (2012)** Denitrification capacity of a landfilled refuse in response to the variations of COD/NO₃-N in the injected leachate. *Bioresource Technology*, **103** (1), 109-115.

- Tadevosyan H., Kalantaryan V., Trchounian A. (2008)** Extremely high frequency electromagnetic radiation enforces bacterial effects of inhibitors and antibiotics. *Cell Biochemistry and Biophysics*, **51**, 97-103.
- Taskin M., Esim N., Genisel M., Ortucu S., Hasenekoglu I., Canli O., Erdal S. (2013)** Enhancement of invertase production by *Aspergillus niger* OZ-3 using low-intensity static magnetic fields. *Preparative Biochemistry and Biotechnology*, **43**(2), 177-188.
- Tomska, A., Wolny, L. (2008)** Enhancement of biological wastewater treatment by magnetic field exposure. *Desalination*, **222**, 368–373.
- Torgomyan H., Kalantaryan V., Trchounian A. (2011)** Low intensity electromagnetic irradiation with 70.6 and 73 GHz frequencies affects *Escherichia coli* growth and changes water properties. *Cell Biochemistry and Biophysics*, **60**, 275-281.
- Torgomyan H., Ohanyan V., Bibulyan S., Kalantaryan V., Trchounian A. (2012)** Electromagnetic irradiation of *Enterococcus hirae* at low-intensity 51.8- and 53.0-GHz frequencies: changes in bacterial cell membrane properties and enhanced antibiotics effects. *FEMS Microbiology Letters*, **329**, 131-137.
- Tu R., Jin W., Xi T., Yang Q., Han S.-F. (2015)** Effect of static magnetic field on the oxygen production of *Scenedesmus obliquus* cultivated in municipal wastewater. *Water Research*, **86**, 132-138.
- Valverde-Sarmiento C., Espinosa-Iglesias D., Bautista-Toledo M.I., Alvarez-Merino M.A., Maldonado-Hodar F.J., Carrasco-Marín F., Perez-Cadenas A.F., (2015)** Bacteria supported on carbon films for water denitrification. *Chemical Engineering Journal*, **259**, 424-429.
- Van Spanning R.J.M., Richardson D. J., Ferguson S. J. (2007)** Introduction to the biochemistry and molecular Biology of Denitrification. *Biology of the Nitrogen cycle*, eds. Bothe H., Ferguson S.J., Newton W.E; Elsevier. UK. pp 3-20.
- Vanags J., Sonck M., Pugachev V., Priede A., Vavere D. (2010)** The influence of magnetic fields on the growth of *Escherichia coli* microorganisms. *Latvian Journal of Physics and Technical Sciences*, **47**, 62-67.
- Vigne E. (2007)** Etude et modélisation dynamique d'un procédé par biofiltration en nitrification tertiaire, *Thèse de doctorat*, université Laval-Canada.
- Vigne E., Choubert J.M., Canler J.P., Héduit A., Lessard P. (2007)** Toward an operational dynamic model for tertiary nitrification by submerged biofiltration. *Water Science and Technology*, **55**(8-9), 301-308.

- Waldie B., Robinson T. (1980)** Granulation in Spouted Beds - Attrition and Other Mechanisms, *Powder Technology*, **27**, 163 - 169.
- Wan C.Y., De Wever H., Diels L., Thoeye C., Liang J.B., Huang L.N. (2011)** Biodiversity and population dynamics of microorganisms in a full-scale membrane bioreactor for municipal wastewater treatment. *Water Research*,. **45** (3), 1129-1138.
- Wang J., Chu L. (2016)** Biological nitrate removal from water and wastewater by solid-phase denitrification process. *Biotechnology Advances*, **34** (6), 1103-1112.
- Wang X. H., Diao M-H., Yang Y., Shi Y-J., Gao M-M., Wang S-G. (2012)** Enhanced aerobic nitrifying granulation by static magnetic field. *Bioresource Technology*, **110**, 105–110.
- Wang X., Hu M., Xia Y., Wen X., Ding K. (2012)** Pyrosequencing analysis of bacterial diversity in 14 wastewater treatment systems in China. *Applied and Environmental Microbiology*, **78** (19), 7042-7047.
- Wang Y.Z., Xie X.W., Zhu X., Liao Q., Chen R., Zhao X., Duu-Jong L. (2012)** Hydrogen production by *Rhodospseudomonas palustris* CQK 01 in a continuous photobioreactor with ultrasonic treatment. *International Journal of Hydrogen Energy* **37**(20), 15450–15457.
- Wang Z., Hao F., Ding C., Yang Z., Shang P. (2014)** Effects of static magnetic field on cell biomechanical property and membrane ultrastructure. *Bioelectromagnetics*, **35**, 251-261.
- Wildi T., Sybille G. (2003)** Électrotechnique: 3e édition, De Boeck Université.
- Wu C., Tang D., Wang Q., Wang J., Liu J., Guo Y., Liu S. (2015)** Comparison of denitrification performances using PLA/starch with different mass ratios as carbon source. *Water Science and Technology*, **71** (7), 1019–1025.
- Wu J.Y., Ge, X.C. (2004)** Oxidative Burst, Jasmonic Acid Biosynthesis, and Taxol Production Induced by Low-Energy Ultrasound in *Taxus chinensis* Cell Suspension Cultures. *Biotechnology and Bioengineering*, **85**, 714–720.
- Xia S., Li J., Wang R. (2008)** Nitrogen removal performance and microbial community structure dynamics response to carbon nitrogen ratio in a compact suspended carrier biofilm reactor. *Ecological Engineering*, **32** (3), 256-262.
- Xia S., Li J., Wang R., Li J., Zhang Z. (2010)** Tracking composition and dynamics of nitrification and denitrification microbial community in a biofilm reactor by PCR-DGGE

and combining FISH with flow cytometry. *Biochemical Engineering Journal*, **49** (3), 370-378.

Xu Z., Chen H., Wu H., Li L. (2010) 7 mT static magnetic exposure enhanced synthesis of poly-3-hydroxybutyrate by activated sludge at low temperature and high acetate concentration. *Process Safety and Environmental Protection*, **88**, 292–296.

Xuan Y., Pingfang H., Xiaoping L., Yanru W. (2004) A review on the dewaterability of bio-sludge and ultrasound pretreatment. *Ultrasonics Sonochemistry*, **11**, 337-348.

Yan L., Zhu Y., He S., Cao Z. (1997) Effect of static magnetic field on activity of immobilized α -amylase. *Chinese. Science Bulletin*, **42**, 127-130.

Yusuf C. (2003). Sonobioreactors: using ultrasound for enhanced microbial productivity. *Trends in Biotechnology*, **21**, 89-93.

Zhang G., Zhang P., Gao J., Chen Y. (2008) Using acoustic cavitation to improve the bio-activity of activated sludge. *Bioresource Technology*, **99**, 1497-1502.

Zhang Q.-M., Tokiwa M., Doi T., Nakahara T., Chang P.W., Nakamura N., Hori M., Miyakoshi J., Yonei S. (2003) Strong static magnetic field and the induction of mutations through elevated production of reactive oxygen species in *Escherichia coli* soxR. *International Journal of Radiation Biology*, **79**, 281-286.

Zhao Y., Feng C., Wang Q., Hao C. (2011) Nitrate removal from groundwater by cooperating heterotrophic with autotrophic denitrification in a biofilm electrode reactor. *Journal of Hazardous Material*, **192**, 1033–1039.

Zheng M., Liu Y., Xu K., Wang C., He H., Zhu W., Dong Q. (2013) Use of Low Frequency and Density Ultrasound Stimulate Partial Nitrification and Simultaneous Nitrification and Denitrification. *Bioresource Technology*, **146**, 537–542.

Zhong W., Sit W.H., Wan J.M.F., Yu A.C.H. (2011) Sonoporation Induces Apoptosis and Cell Cycle Arrest in Human Promyelocytic Leukemia Cells. *Ultrasound in Medicine & Biology*, **37**, 2149–2159.

Zidane F., Berrada B., Lekhlif B., Lounes M.,Blais J. (2006) Performance of a biofilter with plastic packing to treat effluents highly contaminated with phenol, cadmium, and chromium. *Journal of Environmental Engineering and Science*, **5**(4), 317-327.

First results on biostimulation of denitrifying activated sludge using low frequency ultrasound

Nabil Ben youcef^{1,2,3}, André Paus², Claude-Olivier Sarde², Nabil Mameri¹, Hakim Lounici¹ & Nadia Abdi¹

¹École Nationale Polytechnique, Département de Génie de l'Environnement, rue Hassan Badi El-Harrach, Algérie; ²EA 4297 TIMR, Centre de Recherches Royallieu, CS 60319, Sorbonne universités, Université de Technologie de Compiègne, Compiègne, 60203, France; and ³Faculté des Sciences de la Nature et de la vie et sciences de la terre et de l'Univers, El Anasser, Université de Bordj-Bou-Arréridj, BBA, Algérie

Keywords

activated sludge; biostimulation; denitrification; Ultrasound; water treatment.

Correspondence

Nabil Benyoucef, École Nationale Polytechnique, Département de Génie de l'Environnement, rue Hassan Badi El-Harrach-Algérie.
Email: nabil.benyoucef@g.enp.edu.dz

doi:10.1111/wej.12264

Abstract

Reduction of nitrate to nitrogen is critical for wastewater treatment process. The present work proposed a promising approach to improve the activity of denitrifying activated sludge by using low frequency ultrasonic treatment. Batch activity assays showed that when ultrasound was applied, denitrification performance was 2.64 higher than the control. Kinetic analysis of nitrate removal rate versus ultrasonic power and duty cycle was performed to investigate the effect of operational parameters on activated sludge activities. The best stimulating effect was observed at 40 W ultrasonic power and 40% duty cycle. The above results demonstrated that ultrasonic stimulation can be used as a technique for enhancing bacterial activities for water treatment. Studies of other parameters that also affect the denitrification under ultrasound are under way.

Introduction

Biological denitrification is the usual process in wastewater treatment plants for complete reduction of nitrates and nitrites to nitrogen (Andalib *et al.* 2011; Wu *et al.* 2012). It is widely applied because of its easiness, low cost and high ability to treat important amount of wastewater (Lu *et al.* 2015), but the process is somewhat sensitive to hydraulic retention time and can be affected by the shock load (Soares 2000). Recently, numerous new physical-chemical techniques have been proposed to improve the activated sludge performance such as UV irradiation, electro-stimulation and heating that can stimulate the growth of bacteria (Carrera *et al.* 2003; Hao *et al.* 2013; Lu *et al.* 2015).

The beneficial effects and potential significance of ultrasound has been shown in biological systems and biotechnological processes, particularly within the low intensity ranges (Biradar *et al.* 2010; Wang *et al.* 2012; Subhedar *et al.* 2015). The variety of physical and chemical effects induced by ultrasound irradiation is mainly due to the acoustic cavitation; a localised pressure drop below the evaporating pressure appears at the liquid gas interface (Guo *et al.* 2011). Such cavitation effect was observed using low-frequency ultrasound, typically in the 20–200 kHz range. For example, commercial ultrasonic cleaner used for cleaning, degassing, cell lysis, operates at around 30–40 kHz. The chemical and

biological effects of ultrasound are largely attributed to the formation of free radicals in the cavitation bubbles, which may catalyse reactions and kill living cells (Suslick, 1990). But conversely low frequency ultrasound may enhance the growth of microbial cells. Pitt & Ross (2003) demonstrated that this effect could be credited to better mixing in the medium, favouring the access of oxygen and nutrients and the removal of waste products away from cells. Low frequency ultrasound could also affect the settling properties of the sludge and, therefore, increase energy demand, but no results are available concerning this aspect.

Besides, Deng *et al.* (2004) defined as sonoporation a cavitation-based technique for controlled and reversible membrane opening. As shown by Ohl *et al.* (2006), in this technique, microbubbles temporarily create a cell membrane pore which enhances the transmembrane permeability in a reversible way. Sonoporation has been suggested as an innovative method for drug delivery and cellular uptake of large molecules that otherwise cannot diffuse into the cell membrane (Mitragotri 2005; Wiklund 2012). It thus appears that cells could remain unaffected even if cavitation phenomenon is present, at least for standing-wave types and when the range of cavitation effects is lower than the antinode-to-node distance $\lambda/4$ (approximately 0.4 mm at 1 MHz in water) (Wiklund 2012).

Several studies have shown that low-frequency ultrasound can be used to enhance the performance of wastewater treatment. Xie *et al.* (2009) showed that low-intensity ultrasound can promote the biological activity of anaerobic sludge as indicated by the increase of dehydrogenase activity and the content of coenzyme F420. Chemical oxygen demand (COD) removal efficiency was also increased by 30% after ultrasonic treatment. Another effect of ultrasonic stimulation pretreatment is to facilitate the particle solubilisation, which in turn increases the biodegradability of complex organic compounds (Lehne *et al.* 2001).

The cavitation mechanism was proposed by Onyeche *et al.* (2002) to explain the effect of ultrasounds applied to wastewater activated sludge. First, the shear forces generated by the cavitation-bubble disaggregate the extracellular polymeric substances and second open the cell walls of the microorganisms.

Recently, Zinadini *et al.* (2015) demonstrated that high frequency ultrasound led to a huge increase in sludge settling velocity for high-suspended solids. But the COD removal and final turbidity were almost similar with and without ultrasonic treatment, indicating no any adverse effect on the microbial activity.

The present study focused on the practicability of using low-frequency ultrasound (20 kHz) to enhance nitrate removal. The denitrification was chosen as a first step in the study of potential stimulation of ultrasound on biological nitrogen removal because of its sensitivity to operating conditions. We also selected 20 kHz as frequency to check if a quite low frequency could affect bacterial activity, with a synthetic effluent, before more in-depth experiments.

The influences of ultrasonic powers, duty cycle were investigated, transient nitrite accumulation and denitrification efficiency were measured and compared.

Material and methods

Acclimation of sludge

Activated sludge for inoculation of denitrifying bacteria was collected from the Baraki WWTP (1 800 000 PE, activated sludge, Algiers, Algeria), and then washed three times with tap water prior to cultivation in 1 L liquid nutrient medium (Cheikh *et al.* 2013). The basal salt medium (BSM) (per litre of distilled water) contained: NaNO₃, 0.595 g; CH₃COONa, 1.171 g; K₂HPO₄, 0.9 g; KH₂PO₄, 0.45 g; NH₄Cl, 0.45 g; MgSO₄, 0.2 g; CaCl₂ 2 H₂O, 0.02 g; FeCl₃, 0.005 g; and a trace element solution.

The sludge was cultivated in anoxic conditions (with gentle mixing but without nitrogen) in a batch mode at the laboratory conditions until complete nitrate removal, that is for almost 4 days, assuming a zero-order kinetic that corresponded to an average removal rate of 4.14 mg NO₃⁻

N.L⁻¹.h⁻¹. Sludge was then settled and a new denitrification process replaced the nutrient medium. After three successive batches, sludge was centrifuged, washed and finally stored at -80°C in several 1.5 mL tubes with glycerol 20%. For each experiment a new tube was thawed, ensuring similar conditions for all subsequent steps.

Experimental device and protocols

The denitrification experiments were achieved in two home-made Plexiglas 500 mL reactors, Agitation was maintained with a magnetic stirrer at 100 rpm, in a batch mode.

An ultrasonic transformer with a tip of 6 mm in diameter (JY92-IID Ultrasonic cell crusher, Lorderan, China) was used to treat the activated sludge. The ultrasonic transducer has a fixed frequency (20 kHz) and variable efficient powers from 20 to 900 W. For ultrasonic exposure, the transducer was immersed at 2 cm deep from the liquid level (Fig. 1). The temperature and flow rate of circulating water bath was set to maintain the reaction temperature at 30 ± 0.5°C.

In the experiments, sodium acetate was used as a carbon source for denitrification process. It is known that the denitrification potential depends on the available organic carbon, usually expressed as carbon to nitrogen (C/N) ratio; for complete denitrification a C/N of 3 was advised when acetate was used as the sole carbon source (Montalvoa *et al.* 2014; Rocher *et al.* 2015). Cultivation medium contained 350 mL of BSM, 0.29 g_{T5}.L⁻¹ of sludge, 22.6 mg NO₃⁻.N.L⁻¹ (i.e. 137.2 mg NaNO₃.L⁻¹) and 67.8 mg CH₃COO⁻.C.L⁻¹ (i.e. 231.7 mg CH₃COONa.L⁻¹); the initial pH was adjusted to 7.6.

During the batch experiments, which are more or less about 8 hours, due to the low sludge content, liquid medium was sampled for analysis every 30 min. As control, experiments without ultrasonic treatment were carried out at the same initial inoculate and operational conditions. The bioreactor performances were measured for various ultrasonic powers (20–900 W), and for different times of ultrasonic agitation (from 1 to 5 s for a total duration of 10 s). All experimentations were achieved in triplicate.

Analytical method

Samples were centrifuged at 4000 rpm for three minutes for analysis, the supernatant was used for nitrate and nitrite analysis. Measurements were performed in accordance with AFNOR Standard methods (AFNOR, 1994), NFT 90–012 and NFT 90–013 using an Optizen view spectrophotometer controlled by a computer. Hydrogen potential (pH) was determined with an EC 124 pH meter (HANNA Instrument, USA).

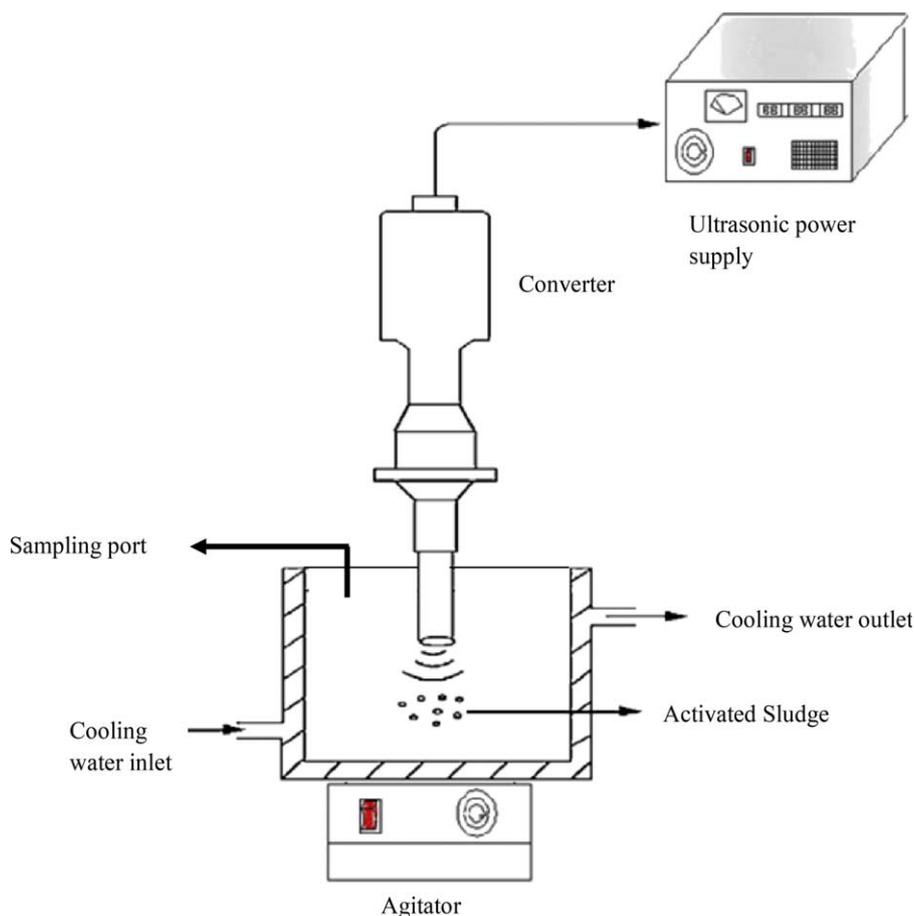


Fig. 1. Scheme of the experimental setup.

Results and discussion

Evaluation of ultrasonic effect on activated sludge denitrification activity

Effect of ultrasonic power

At first, the effect of the ultrasonic power was evaluated fixing the other factors: duty cycle was 20% and initial pH was 7.6.

As shown in Fig. 2a, nitrate naturally decreased slowly from 24.12 to 11.56 ± 0.04 mg $\text{NO}_3^- \cdot \text{N} \cdot \text{L}^{-1}$ during the first 3 hours without ultrasonic stimulation, while 4.13 ± 0.12 , 0.64 ± 0.04 , 0.41 ± 0.02 , 0.76 ± 0.04 and 6.29 ± 1.22 mg $\text{NO}_3^- \cdot \text{N} \cdot \text{L}^{-1}$ was observed for the same experiment duration at ultrasonic power of 20, 40, 60, 80 and 160 W, respectively. In this figure, error bars correspond to the standard error calculated from the triplicated results. For most data, the experiments were highly reproducible and the standard error was about 2–5%, except for both highest powers. These results demonstrate that ultrasonic waves largely increased the biological denitrification. The kinetic coefficients and their standard errors were identified using the 'linest' function of Excel software, with a determination

coefficient [$R^2 > 0.9$]. For all conditions, zero-order kinetic model gave the best fit. This is in agreement with what was reported by Moore & Schroeder (1971); Foglar *et al.* (2005); Dhamole *et al.* (2007). Degradation of nitrate takes place in four consecutive steps but generally it is considered that nitrate is first converted to nitrite (rate-limiting step) and then to nitrogen gas by a zero-order kinetic for the first reaction. Figure 2b shows that the nitrate removal rate constants increased with the ultrasonic power, from 4.85 mg $\text{NO}_3^- \cdot \text{N} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$, for the control, to 8.48 mg $\text{NO}_3^- \cdot \text{N} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ for the 60 W irradiation conditions, and then the constant rate slowly decreased. Statistically speaking, with the standard errors, the zero-order coefficient is more or less constant from 40 to 80 W. For 60 W, the nitrate removal rate was improved by 73% as compared to the control. It was obviously expected that low ultrasonic power brought weak effect on the membrane and cellular metabolism, probably by improving the mass transfer of chemicals and products through the cellular wall and membrane, and potentially by stimulating some enzyme activity by increasing the transfer rate of the reagents to the active site (Sinisterra 1992). As also suggested by Lin *et al.* (2001) and Wu & Ge (2004) the defense responses of cells may also lead to the increase of

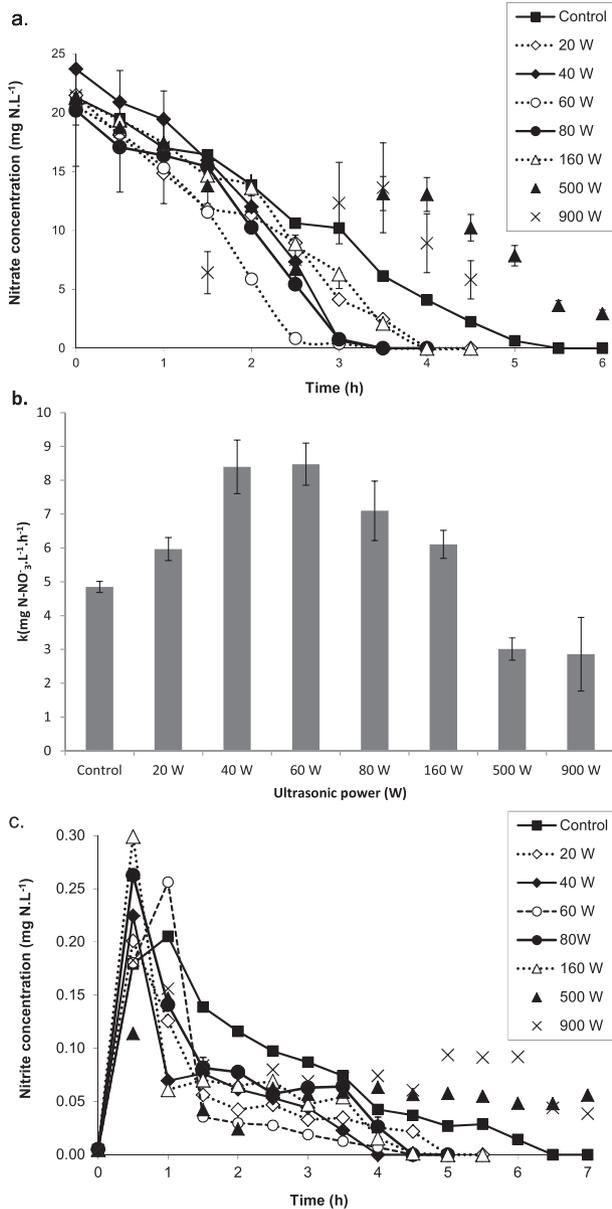


Fig. 2. Effect of ultrasonic power on denitrification performance: 20% duty cycle; ultrasonic frequency = 20 KHz; initial NO₃-N concentration = ±20 mg.L⁻¹. a. nitrate concentration versus time, b. nitrate removal rate constant versus the applied ultrasonic power, c. nitrite concentration versus time.

enzymatic, cellular metabolic activity and cell growth. However, when the ultrasonic power was further strengthened over 200 W, the denitrification rate dramatically decreased suggesting an over-stimulation for the cells or even death cells by the ultrasonic treatment. This could explain why denitrification rates for 500 and 900 W were weaker than the control without ultrasound.

It is generally accepted that the reduction of nitrite proceeds in a three-step process (Karanasios *et al.* 2010),

microorganism reduce nitrites NO₂⁻ to nitric oxide, then to nitrous oxide and finally to nitrogen gas N₂. The nitrite concentration behaviour was depicted in Fig. 2c. The initial nitrite concentration was lower than 0.02 mg NO₂⁻.N.L⁻¹ in all set-ups. For all conditions, the nitrite concentration first increased then decreased going down to below the detection limits (0.02 mg NO₂⁻.N.L⁻¹), with the maximum accumulation of 0.21 ± 0.01 mg NO₂⁻.N.L⁻¹ for the control without ultrasounds, and 0.21 ± 0.01, 0.22 ± 0.01, 0.26 ± 0.01, 0.26 ± 0.01 and 0.30 ± 0.01 mg NO₂⁻.N.L⁻¹ for 20, 40, 60, 80 and 160 W respectively. As before, highest ultrasonic powers also affected the nitrite removal, which remained in the medium even after seven hours.

In light of the results obtained in this section, the ultrasonic treatment has various effects on denitrifying activated sludge, for example, the maximum nitrite accumulation was higher at 160 W than for smaller powers. This could be attributed to the action of ultrasonic waves on the enzyme nitrate reductase to such power levels, affecting their ability to reduce a large amount of nitrate to nitrite. Nitrites accumulated in the first hours of the experiment largely due to the activity of nitrate reductase and lack of further reduction for all powers. As observed by Rivett *et al.* (2008), the nitrite then later decreased, which might be due to the onset of nitrite reduction appearing later than the onset of nitrate reduction.

Subhedhar *et al.* (2015) had established that low intensity ultrasound has a positive effect on cellulase activity. The maximum activity of cellulase was observed when the enzyme was treated with ultrasound power at 60 W and duty cycle about 70% under which the enzyme activity increased by nearly 2.4 times compared to the untreated sample.

Zheng *et al.* (2013) indicated that low frequency and density ultrasound with the irradiation time of 2 hours actually stimulate partial nitrification and simultaneous nitrification and denitrification (SND) processes at full aerobic in a sequential batch reactor. It improved the nitrite accumulation ratio and the SND efficiency to 73.9% and 72.8%, respectively. These results suggest that ultrasound radiation enhance the opening pores of the cellular membrane and, therefore, the reduction of important amounts of nitrate into nitrite through the respiratory chain, but also stimulate the enzyme nitrite reductive.

Effect of duty cycle

Along with period of treatment, ultrasonic duty cycle is one of the important operating parameters for the biodenitrification with activated sludge Zhong *et al.* (2011). Duty cycle is the fraction of ON and OFF times by which an ultrasonic system is operated. For example, duty cycle of 10% corresponds to irradiation of ultrasound for 1 s followed by a rest period (no sonication) of 9 s. The effect of different duty cycles (10,

20, 40 and 50%) on the denitrification performance was investigated by varying ON and OFF times of ultrasonic irradiation. The ultrasonic power was set at 60 W, and the initial pH was 7.6.

Results in Fig. 3a show that the nitrate removal rate increased with the duty cycle. After 1.5 hours of operation, the remaining nitrate was $16.43 \pm 0.31 \text{ mg NO}_3^- \cdot \text{N} \cdot \text{L}^{-1}$

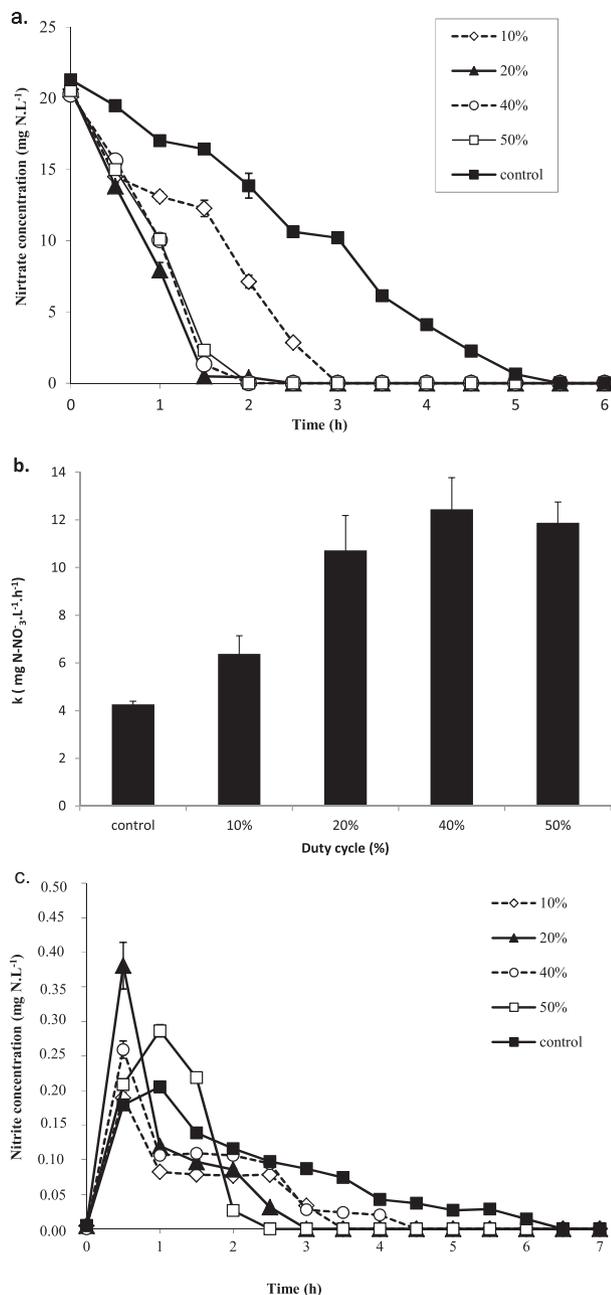


Fig. 3. Effect of duty cycle on denitrification performance: Ultrasonic power 60 W; ultrasonic frequency = 20 KHz; pH = 6.4; initial $\text{NO}_3^- \cdot \text{N}$ concentration $\pm 20 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$. a. nitrate concentration versus time, b. nitrate removal rate constant versus the applied ultrasonic power, c. nitrite concentration versus time

for the control without ultrasound, and 12.26 ± 0.57 , 0.48 ± 0.04 , 1.31 ± 0.08 and $2.30 \pm 0.14 \text{ NO}_3^- \cdot \text{N} \cdot \text{L}^{-1}$ at duty cycle of 10%, 20%, 40% and 50% respectively.

As above, the zero-order kinetic constants and their standard error were identified using the 'linest' function of Excel software. Figure 3b shows that the maximum rate was obtained for a duty cycle of 40% (4 s 'ON' and 6 s 'OFF'), with a kinetic constant increased by 192% as compared to the control. Such a result was also observed by Zhong *et al.* (2011) who demonstrated the relationship between time exposure and process efficiency. Ultrasonic irradiation can be applied in pulsed and continuous mode. Application of ultrasound in continuous mode may generate problems like erosion of the probe tip and temperature increase. Additionally, no significant statistical difference was observed between duty cycles from 20 to 50% with, however, a maximum for 40% duty cycle, which was set as the optimum to minimize the energy input.

Concerning nitrite, results of Fig. 3c indicate that the concentrations increased with the duty cycle. The maximum nitrite concentration was $0.205 \pm 0.001 \text{ mg NO}_2^- \cdot \text{N} \cdot \text{L}^{-1}$ without ultrasonic treatment. When the time of ultrasonic exposure was 1, 2, 4 and 5 s for a total duration of 10 s, the nitrite concentration increased to 0.189 ± 0.008 , 0.380 ± 0.03 , 0.259 ± 0.01 and $0.286 \pm 0.008 \text{ mg NO}_2^- \cdot \text{N} \cdot \text{L}^{-1}$ respectively, and then decreased in the same way. It might be explained by the sensitivity of the enzyme nitrate reductase to the large amount of nitrate to be reduced to nitrite, as observed by Korner & Zumft (1989). Our results showed that without ultrasonic stimulation, the productions as well as the removal rates of nitrite were generally lower than those using ultrasounds.

Conclusions

The current study examined the feasibility of ultrasound-assisted denitrification for water treatment:

(1) Low frequency ultrasound-assisted denitrification showed better yield in nitrate reduction as compared to conventional denitrification without ultrasound.

(2) about 2.64 times increase in reducing nitrate concentration was achieved in ultrasonic power of 60 W and 40% duty cycle as compared to conventional biodenitrification.

Acknowledgments

The authors gratefully acknowledge the financial support from the Algerian ministry of higher education and scientific research.

To submit a comment on this article please go to <http://mc.manuscriptcentral.com/wej>. For further information please see the Author Guidelines at wileyonlinelibrary.com

References

- AFNOR (1994) *Qualité de l'Eau: Environnement, Association Française De Normalisation* (1st edn). AFNOR, Paris, 861 p.
- Andalib, M., Nakhla, G., McIntee, E. and Zhu, J. (2011) Simultaneous Denitrification and Methanogenesis (SDM): Review of Two Methanogenesis Decades of Research. *Desalination*, **279**, 1–14.
- Biradar, P.M., Roy, S.B., D'souza, S.F. and Pandit, A.B. (2010) Excess Cell Mass as an Internal Carbon Source for Biological Denitrification. *Bioresource Technol*, **101**, 1787–1791.
- Carrera, J., Vicent, T. and Lafuente, J. (2003) Influence of Temperature on Denitrification of an Industrial High-Strength Nitrogen Wastewater in a Two-Sludge System. *Water SA*, **29**, 11–16.
- Cheikh, A., Yala, A., Drouiche, N., Abdi, N., Lounici, H. and Mameri, N. (2013) Denitrification of Water in Packed Beds using Bacterial Biomass Immobilized on Waste Plastics as Supports. *Ecol. Eng.*, **53**, 329–334.
- Deng, C.X., Sieling, F., Pan, H. and Cui, J. (2004) Ultrasound-Induce Cell Membrane Porosity. *Ultrasound Med. Biol.*, **30**, 519–526.
- Dhamole, P.B., Nair, R.R., D'souza, S.F. and Lele, S.S. (2007) Denitrification of High Strength Nitrate Waste. *Bioresource Technol.*, **98**, 247–252.
- Foglar, L., Briski, F., Sipos, L. and Vukovic, M. (2005) High Nitrate Removal from Synthetic Wastewater with the Mixed Bacterial Culture. *Bioresource Technol.*, **96**, 879–888.
- Guo, W.Q., Ding, J., Cao, G.L., Ren, N.Q. and Cui, F.Y. (2011) Treatability Study of Using Low Frequency Ultrasonic Pretreatment to Augment Continues Biohydrogen Production. *Int. J. Hydrogen Eng.*, **36**, 14180–14185.
- Hao, R., Li, S., Li, J. and Meng, C. (2013) Denitrification of Simulated Municipal Wastewater Treatment Plant Effluent Using a Three-Dimensional Biofilm Electrode Reactor: Operating Performance and Bacterial Community. *Bioresource Technol.*, **143**, 178–186.
- Karanasios, K., Vasiliadou, I., Pavlou, S. and Vayenas, D. (2010) Hydrogenotrophic Denitrification of Potable Water: A Review. *J. Hazard. Mater.*, **180**, 1–3.
- Korner, H. and Zumft, W.G. (1989) Expression of Denitrification Enzymes in Response to the Dissolved Oxygen Level and Respiratory Substrate in Continuous Culture of *Pseudomonas stutzeri*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **55**, 1670–1676.
- Lehne, G., Muller, A. and Schwedes, J. (2001) Mechanical Disintegration of Sewage Sludge. *Water Sci. Technol.*, **43**, 19–26.
- Lin, L.D., Wu, J.Y., Ho, K.P. and Qi, S.Y. (2001) Ultrasound Induced Physiological Effects and Secondary Metabolite (saponin) Production in Panax Ginseng Cell Cultures. *Ultrasound Med. Biol.*, **27**, 1147–1152.
- Lu, H., Chandran, K. and Stensel, D. (2015) Microbial Ecology of Denitrification in Biological Wastewater Treatment. *Water Res.*, **64**, 237–254.
- Mitragotri, S. (2005) Healing Sound: The Use of Ultrasound in Drug Delivery and Other Therapeutic Application. *Nat. Rev. Drug Discov.*, **4**, 255–260.
- Moore, S. and Schroeder, E. (1971) The Effect of Nitrate Feed Rate on Denitrification. *Water Res.*, **5**, 445–452.
- Montalvoa, S., Guerrero, L., Roblesa, M., Meryb, C., Huilini, C. and Borja, R. (2014) Start-Up and Performance of UASB Reactors Using Zeolite for Improvement of Nitrate Removal Process. *Ecol. Eng.*, **70**, 437–445.
- Ohl, C.D., Arora, M., Ikink, R., De Jong, N., Versluis, M., Delius, M. and Lohse, D. (2006) Sonoporation from Jetting Cavitation Bubbles. *Biophys. J.*, **91**, 4285–4295.
- Onyeche, T.I., Schläfer, O., Bormann, H., Schröder, C. and Sievers, M. (2002) Ultrasonic Cell Disruption of Stabilized Sludge with Subsequent Anaerobic Digestion. *Ultrasonics*, **40**, 31–35.
- Pitt, W.G. and Ross, S.A. (2003) Ultrasound Increases the Rate of Bacterial Cell Growth. *Biotechnol. Prog.*, **19**, 1038–1044.
- Rivett, M.O., Buss, S.R., Morgan, P., Smith, J.W.N. and Bemment, C.D. (2008) Nitrate Attenuation in Groundwater: A Review of Biogeochemical Controlling Processes. *Water Res.*, **42**, 4215–4232.
- Rocher, V., Laverman, A.M., Gasperi, J., Azimi, S., Guerin, S., Mottelet, S., Villières, T. and Pauss, A. (2015) Nitrite Accumulation During Denitrification Depends on the Carbon Quality and Quantity in Wastewater Treatment with Biofilters. *Environ. Sci. Pollut. Res.*, **22**, 10179–10188.
- Sinisterra, J.V. (1992) Application of Ultrasound to Biotechnology: An Overview. *Ultrasonics*, **30**, 180–185.
- Soares, M. (2000) Biological Denitrification of Groundwater. *Water Air Soil Poll.*, **123**, 183–193.
- Subhedar, P.B., Babu, N.R. and Gogate, P.R. (2015) Intensification of Enzymatic Hydrolysis of Waste Newspaper Using Ultrasound for Fermentable Sugar Production. *Ultrasonics*, **22**, 326–332.
- Suslick, K.S. (1990) Sonochemistry. *Science*, **247**, 1439–1445.
- Wang, Y.-Z., Xie, X.-W., Zhu, X., Liao, Q., Chen, R., Zhao, X. and Lee, D.-J. (2012) Hydrogen Production by *Rhodospseudomonas palustris* CQK 01 in a Continuous Photobioreactor with Ultrasonic Treatment. *Int. J. Hydrogen Energy*, **37**, 15450–15457.
- Wiklund, M. (2012) Acoustofluidics 12: Biocompatibility and Cell Viability in Microfluidic Acoustic Resonators. *Royal Soc. Chem.*, **12**, 2018–2028.
- Wu, J.Y. and Ge, X.C. (2004) Oxidative Burst, Jasmonic Acid Biosynthesis, and Taxol Production Induced by Low-Energy Ultrasound in *Taxus chinensis* Cell Suspension Cultures. *Biotechnol. Bioeng.*, **85**, 714–720.
- Wu, W., Yang, F. and Yang, L. (2012) Biological Denitrification with a Novel Biodegradable Polymer as Carbon Source and Biofilm Carrier. *Bioresource Technol.*, **118**, 136–140.
- Xie, B.Z., Liu, H. and Yan, Y.X. (2009) Improvement of the Activity of Anaerobic Sludge by Low-Intensity Ultrasound. *J. Environ. Manag.*, **90**, 260–264.
- Zhao, Y., Feng, C., Wang, Q. and Hao, C. (2011) Nitrate Removal from Groundwater by Cooperating Heterotrophic with Autotrophic Denitrification in a Biofilm Electrode Reactor. *J. Hazard. Mater.*, **192**, 1033–1039.

Zheng, M., Liu, Y., Xu, K., Wang, C., He, H., Zhu, W. and Dong, Q. (2013) Use of Low Frequency and Density Ultrasound Stimulate Partial Nitrification and Simultaneous Nitrification and Denitrification. *Bioresource Technol.*, **146**, 537–542.

Zhong, W., Sit, W.H., Wan, J.M.F. and Yu, A.C.H. (2011) Sonoporation Induces Apoptosis and Cell Cycle Arrest in

Human Promyelocytic Leukemia Cells. *Ultrasound Med. Biol.*, **37**, 2149–2159.

Zinadini, S., Rahimi, M., Zinatizadeh, A.A. and Mehrabadi, Z.S. (2015) High Frequency Ultrasound-Induced Sequence Batch Reactor as a Practical Solution for High Rate Wastewater Treatment. *J. Environ. Chem. Eng.*, **3**, 217–226.