

Influence possible des protozoaires sur le taux de mortalité des bactéries autotrophes nitrifiantes

Possible effect of protozoa on the autotrophic decay rate value

Y. LE BIHAN¹, V. MARTINAGE², P. LESSARD^{1,*}, E. PAUL²

Reçu le 25 octobre 1999, accepté le 5 décembre 2000**.

SUMMARY

Designing biological wastewater treatment plants with the aid of the model developed by the IAWQ requires the knowledge of biological kinetic parameters. For nitrifying activated sludge, these parameters are related to nitrifying bacteria: maximum autotrophic growth rate μ_{Amax} , yield coefficient Y_A and the autotrophic decay rate b_A . Although variables influencing μ_{Amax} and Y_A values are well known, this is not the case for b_A . MARTINAGE and PAUL (2000) have recently shown that the b_A value is strongly influenced by the influent quality, leading to the assumption that influent quality has a strong effect on microfauna composition, and consequently on the grazing rate of microfauna on nitrifying bacteria. In fixed-film processes, protozoan grazing reduces the bacterial population considerably (NATUSCKA and WELANDER, 1994). However, although many data are available concerning the grazing rates of different protozoa, the effect of microfaunal grazing on nitrification is still a matter of debate (RATSAK *et al.*, 1994) and its effect on the b_A value is still unknown. These two topics are investigated here.

Nitrifying activated sludges were grown in two identical batch reactors, but in one, cycloheximide was added to inhibit eucaryotic growth (MAURINES CARBONEILL *et al.*, 1998). Microfauna organism numbers were quantified in both reactors by microscopic observations of flagellated protozoa ($> 8 \mu m$), amoebae, ciliates, rotifers and higher invertebrates (*figure 3*). Microbial counts were then correlated with the b_A value. The latter was determined using the procedure proposed by SALZER (1992) which consists of characterising the time behaviour of the maximum nitrification rate measured by respirometry of activated sludge under substrate starvation. Under these conditions bacteria die and organic nitrogen is released into the bulk phase. This nitrogen is ammonified, and nitrifying bacteria use this substrate to pro-

1. Département de génie civil, Pavillon Pouliot, Université Laval, Ste-Foy, Québec, Canada, G1K 7P4.

2. Département de génie des procédés industriels, LIPE EA 833, Institut national des sciences appliquées de Toulouse, 31077 Toulouse cedex 04, France.

* Correspondance. E-mail : Plessard@gci.ulaval.ca

** Les commentaires seront reçus jusqu'au 31 janvier 2002.

duce nitrate, and then autotrophic bacterial growth occurs. This method takes this growth into account by characterising nitrate production during the experiment (figure 2).

The effect of cycloheximide on nitrification was first determined to make sure that this compound is not inhibitory toward nitrifiers. Results obtained (table 1) show that cycloheximide was not inhibitory toward nitrate production or the maximum nitrification oxygen uptake rate (rO_2N) after 4 hours of contact with nitrifying biomass. Cycloheximide addition in the activated sludge had an important impact on rotifers and flagellates but no effect on ciliates; it also seemed to stimulate amoebae growth. In both reactors, flagellates were mainly *Peranama*, attached ciliates were mainly *Opercularia* and *Epistylis* and a few *Vorticella*. Free ciliates like *Aspidisca* and *Euplotes* were found in both reactors.

Variation with time of the abundance of microfauna organisms is shown in figures 4 and 5 for both reactors. In the reference reactor the number of microfauna organisms decreased with time (figure 4) probably due to substrate starvation. Microfauna composition remained however diversified. For the inhibited reactor (figure 5), three periods were observed. During period I, the microfauna was mainly composed of ciliates and the number of microfaunal organisms decreased rapidly. During period II, an important growth of amoebae was observed. Cycloheximide was then added during this period to reduce their number. This growth of amoebae seems to be caused by the resistance of these micro-organisms toward inhibiting compounds (SRISKANTH et BERK, 1993). During period III, the number of microfaunal organisms was lower than during period II, and microfauna was mainly composed of ciliates.

Nitrate concentration behaviour, necessary for b_A calculation, is shown on figure 6. In the reference reactor, nitrate concentrations varied linearly. For the inhibited reactor, the linear pattern was not observed during period II. This result was probably caused by an important nitrogen assimilation need of amoebae (ELDRIGE and JACKSON, 1993). Because organic nitrogen released by bacterial decay is consumed by amoebae assimilation, less nitrogen is available for the ammonification process and therefore for nitrification. Ammonia concentrations remained below $0.2 \text{ mg N}\cdot\text{L}^{-1}$ during all the experiment for both reactors. When amoebae disappeared from the inhibited reactor (period III) nitrate concentration varied linearly again.

Variations of the maximum nitrification oxygen uptake rate (rO_2N_{\max}) with time are presented in figure 7 (A & B) for both reactors. For the reference reactor (figure 7A), a value for b_A of 0.08 d^{-1} can be calculated and can be considered constant for a constant microfauna composition.

Three b_A values can be estimated for the reactor inhibited with cycloheximide (figure 7B), corresponding to the three periods observed for microfauna composition. During period I, the b_A value is 0.05 d^{-1} ; a decrease in the microfaunal organism numbers implies a decrease of the b_A value. During period II, when a development of amoebae is observed, the b_A value increases and reaches 0.15 d^{-1} . During period III with reduced grazing, the b_A value is 0.13 d^{-1} . Since during periods I and III the microfauna is mainly composed of ciliates, this difference between b_A values is likely due to the observed difference in floc size between periods I and III.

The results obtained during this study tend to prove (1) that the use of cycloheximide reduces microfaunal populations but can lead to a development of amoebae, and (2) that microfauna grazing seems to have an influence on the b_A value, which can vary from 0.05 to 0.15 d^{-1} depending on microfaunal composition and abundance.

Key-words: protozoa, grazing, nitrification, decay rate, wastewater, respirometry, activated sludge.

RÉSUMÉ

Le modèle de l'IAWQ du processus de boues activées représente les mécanismes endogènes de la biomasse nitrifiante par le décès des micro-organismes (équation d'ordre 1 par rapport à la biomasse). La constante de décès, ou taux de mortalité b_A , est aujourd'hui encore mal connue, et en particulier les facteurs influants sur sa valeur. De récentes études ont montré que la prédation par la microfaune pourrait être un facteur déterminant sur la valeur de b_A . Cette étude se propose donc de quantifier l'effet de la prédation sur la valeur de b_A . Deux réacteurs maintenus sans alimentation en substrat ont été caractérisés en parallèle : l'un a reçu une dose d'antibiotique spécifique aux eucaryotes (cycloheximide) afin de diminuer la quantité d'organismes de la microfaune, alors que l'autre n'a reçu aucun antibiotique (témoin). Les résultats obtenus montrent que le cycloheximide inhibe la plupart des organismes de la microfaune sauf les amibes ; celles-ci semblent plutôt stimulées par cet antibiotique. En ce qui concerne la nitrification, un ralentissement de la production de nitrate dans le réacteur traité à l'antibiotique est observé à partir du sixième jour. Cette diminution de production de nitrate est probablement causée par une réduction de l'azote nitrifiable (qui est mobilisé par les amibes) couplée à une prédation des organismes nitrifiants par les amibes. D'ailleurs, l'augmentation de la prédation par les amibes à partir du jour 6 a diminué l'activité nitrifiante également mesurée par respirométrie (r_{O_2Nmax}). Cette diminution du taux de respiration indique une augmentation du taux de mortalité (b_A) des organismes nitrifiants. En effet, la valeur du taux de mortalité mesurée dans le réacteur témoin est de $0,08 \text{ d}^{-1}$ alors que selon la microfaune présente dans le réacteur inhibé au cycloheximide, la valeur de ce taux de mortalité a varié entre $0,05 \text{ d}^{-1}$ et $0,15 \text{ d}^{-1}$.

Mots clés : protozoaires, prédation, nitrification, taux de mortalité, eaux usées, respirométrie, boue activée.

1 – INTRODUCTION

Le traitement d'effluents industriels nécessite le développement de filières de traitement spécifiques aux types d'effluents à traiter. Ces rejets sont caractérisés par des compositions (carbone et azote) très variables selon le type d'industrie et les techniques utilisées. Ces différences de composition sont à l'origine de variations importantes de la charge appliquée au traitement biologique qui doit rester efficace et fiable pour l'enlèvement de la pollution carbonée et azotée (nitrification) en tout temps.

En particulier, lors d'une période d'augmentation de la charge en azote nitrifiable, la concentration en biomasse nitrifiante augmentera sous l'effet de la croissance. En revanche, lors d'une diminution de la charge en azote, la concentration en bactéries nitrifiantes dans l'installation va diminuer sous l'effet conjoint de la purge des boues et du décès de ces organismes.

Si de nombreuses études ont porté sur les mécanismes de croissance des micro-organismes, d'importantes questions existent encore sur les phénomènes se déroulant durant les périodes de carence en substrat (respiration endogène). VAN LOOSDRECHT et HENZE (1999) ont récemment passé en revue les différents concepts pouvant s'appliquer durant cette période. Le modèle de l'IAWQ (GUJER *et al.*, 1995), très souvent utilisé pour la simulation des systèmes

à boues activées, suppose toutefois que seul le phénomène de décès de la biomasse intervient au cours des carences en substrat. Le décès de la biomasse nitrifiante est caractérisé par un paramètre appelé taux de mortalité des bactéries nitrifiantes et noté b_A . Comme le modèle de l'IAWQ (GUJER *et al.*, 1995) modélise la réaction de nitrification comme une réaction directe de transformation de l'ammonium en nitrate par une seule souche biologique, un seul taux de mortalité est suffisant pour représenter le décès de la biomasse nitrifiante. Cette hypothèse est valable tant que la réaction de nitrification est limitante par rapport à la réaction de nitrification.

À l'heure actuelle, peu d'auteurs ont travaillé sur la détermination de la valeur du taux de mortalité des bactéries nitrifiantes, ainsi que sur les paramètres influents sur sa valeur (MARTINAGE et PAUL, 2000). L'analyse bibliographique de ces auteurs montre qu'à 30 °C la valeur de b_A varie entre 0,06 et 0,34 d⁻¹, et ils concluent que la valeur du taux de mortalité des organismes nitrifiants doit être influencée par des facteurs environnementaux du système biologique. Leur étude montre que la qualité du substrat alimentant les boues activées est un de ces facteurs. Une des hypothèses émises par ces auteurs est de considérer que cette variabilité des valeurs de b_A en fonction de la qualité du substrat est due à une variation du nombre et du type de micro-organismes présents dans la microfaune. Ces auteurs ont en effet observé que les conditions d'anoxie favorisent une diminution importante des organismes de la microfaune, mais il apparaît qu'il est difficile de découpler l'effet de l'anoxie et de la diminution de protozoaires sur le taux de mortalité des organismes nitrifiants.

Il est connu que les protozoaires de même que certains métazoaires comme les rotifères et nématodes s'alimentent (prédation) de particules et de bactéries libres formant la biomasse. Ainsi, des études montrent que la présence de la microfaune, en l'occurrence les protozoaires, tend à diminuer la concentration en biomasse nitrifiante par prédation (NATUSCKA et WELANDER, 1994 ; MÜLLER, 1998). Cette hypothèse est également présentée par RATSACK *et al.* (1994) qui soutiennent que la prédation peut être responsable d'une diminution importante des organismes à faible taux de croissance comme les bactéries nitrifiantes.

Cet aspect de prédation et de diminution de l'activité nitrifiante est toutefois controversé. D'autres études suggèrent plutôt que les protozoaires ont un effet stimulant sur la nitrification (GRIFFITHS, 1989 ; VERHAGEN et LAANBROEK, 1992)

Certaines études à caractère un peu plus fondamental analysent les taux de prédation des protozoaires. Selon les espèces de protozoaires ainsi que les espèces bactériennes, il ressort que l'ensemble des protozoaires d'un sédiment marin est apte à consommer entre 61-73 bactéries-ind⁻¹ h⁻¹ (STARINK *et al.*, 1994). Pour les ciliés (*Euplote* sp.), la consommation est de 120 *Vibrio natrigens*/(protozoaire-h) et de 882 *Pseudomonas fluorescens*/(protozoaire-h) (LAWRENCE et SNYDER, 1998). D'autres taux de consommation ont été mesurés par DECAMP et WARREN (1998) et les résultats obtenus montrent des taux de consommation de *E. coli* par les ciliés variant de 5 à 110 bactéries-ind⁻¹ h⁻¹ selon les espèces de ciliés. En ce qui concerne les amibes, l'espèce *Paramoeba invadens* peut consommer en moyenne 30 bactéries-ind⁻¹ h⁻¹ (JELLET et SCHEIBLING, 1988), tandis que d'autres espèces d'amibes provenant de l'Antarctique et incubées à des températures variant de - 2 à 4 °C sont aptes à consommer entre 0,6 et 52 bactéries-ind⁻¹ h⁻¹ (MAYES *et al.*, 1997).

Selon ces données, il ressort que la prédation des protozoaires pourrait avoir un impact assez marqué sur les populations bactériennes. Cet effet serait d'autant plus élevé lorsque celles-ci sont en croissance limitée ou en phase de décroissance : ainsi lors d'une carence en azote nitrifiable dans une installation de traitement des eaux, une importante prédation par la microfaune pourrait être à l'origine d'une forte diminution de la concentration en biomasse nitrifiante, ce qui peut entraîner des problèmes d'exploitation lorsque la station est soumise à une augmentation de la charge en azote après une période de carence.

De ce fait, pour compléter l'étude de MARTINAGE et PAUL (2000), une approche permettant de séparer l'effet des conditions d'anoxie et la présence des protozoaires sur la valeur de b_A est donc nécessaire afin de bien identifier l'influence de ces paramètres sur la nitrification.

Pour cette étude, l'effet de la présence et de l'absence des protozoaires sera étudié sur une biomasse nitrifiante en phase de décroissance (sans alimentation en substrat) en conditions aérobies.

2 – MATÉRIEL ET MÉTHODES

2.1 Le dispositif expérimental

Les boues nitrifiantes utilisées pour cette étude ont un âge de 10 d et proviennent d'une installation pilote traitant de l'eau résiduaire urbaine. Deux réacteurs de 11,5 l chacun, agités (48 tours/min) et tempérés à 20 °C, ont été utilisés pour le maintien de la biomasse en condition de jeûne. L'aération a été contrôlée et maintenue à des concentrations supérieures à 5 mg O₂·L⁻¹ pendant toute la durée de l'expérience. Le pH a été maintenu constant à une valeur de consigne de 7,5 par des ajouts de bases (NaHCO₃ à 50 g·L⁻¹).

2.2 Inhibition des protozoaires

Afin de vérifier l'effet de prédation des protozoaires sur la biomasse nitrifiante, deux réacteurs aérés et non alimentés en substrat ont été utilisés en parallèle. L'un d'eux a servi de témoin (aucun inhibiteur ajouté) et l'autre a reçu une dose d'antibiotique inhibiteur des eucaryotes. Dans ce dernier, 200 mg·L⁻¹ de cycloheximide (Acros, produit par *Streptomyces griseus*) a été ajouté dès le départ à T = 0 d. Cette substance a déjà été préalablement utilisée par différents auteurs pour inhiber la croissance des protozoaires et autres organismes de la microfaune (NATUSCKA et WELANDER, 1994 ; MAURINES-CARBONEILL *et al.*, 1998). Les deux réacteurs ont été suivis pour une durée d'environ 3 semaines. Pour contrer le développement d'une résistance aux antibiotiques des ajouts supplémentaires de cycloheximide ont été effectués à T = 6 d et T = 8 d pour des concentrations respectives de 50 et 100 mg·L⁻¹.

Avant l'ajout du cycloheximide, un test d'inhibition de l'activité nitrifiante par cet antibiotique a été vérifié selon la norme Afnor T90-341 (Afnor, 1990). Cette vérification a été effectuée par comparaison de la production de nitrate et du taux maximal de nitrification durant 4 heures entre des boues témoins et des boues ayant reçu du cycloheximide à 200 mg·L⁻¹.

2.3 Système respirométrique

Le suivi du taux maximal de nitrification a été effectué par respirométrie fermée de type LSS (Liquid dissolved oxygen measurement with Static liquid and Static gas) comme décrit par SPANJERS *et al.* (1998). La figure 1 présente le système utilisé pour ces expériences. Ce respiromètre est composé d'une cellule de 250 ml agitée à 750 tours/min par l'intermédiaire d'un agitateur magnétique. La température dans la cellule respirométrique a été maintenue constante à 20 °C tout au long des essais de respirométrie. L'évolution de la concentration en oxygène dissous dans la cellule a été compilée en continu.

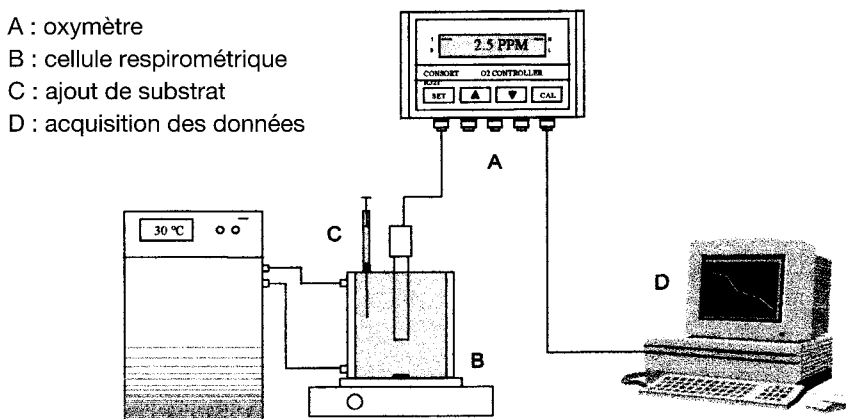


Figure 1 Système respirométrique utilisé pour l'évaluation du r_{O_2N} max.
Respirometric device used for NOUR max determination.

Dans ce type de respiromètre, la pente de la concentration d'oxygène est directement proportionnelle au taux de respiration des bactéries en $mg\ O_2/(l \cdot h)$. Durant toute cette étude le protocole de respirométrie suivant a été suivi :

- retrait de 250 ml de biomasse des deux réacteurs en état de jeûne ;
- aération de la biomasse extraite avec de l'oxygène pur (grade C), jusqu'à une concentration en oxygène dissous de $20\ mg\ O_2 \cdot L^{-1}$;
- ajout d'ammonium à une concentration de $20\ mg\ N \cdot L^{-1}$ dans la cellule respirométrique. On obtient alors une première décroissance linéaire de la concentration en oxygène dissous, la pente de cette droite correspond à la somme des taux de respiration exogène maximum de nitrification et endogène autotrophe et hétérotrophe (pente 1)
- ajout de $20\ mg \cdot L^{-1}$ d'allylthiourée (ATU) afin d'inhiber la nitrification. La pente de la droite obtenue correspond au taux de respiration endogène des hétérotrophes (pente 2).

À partir de ces résultats de respirométrie, il est possible de déterminer quotidiennement dans chacun des réacteurs non-alimentés, le taux maximum de respiration r_{O_2Nmax} calculé à partir de la différence entre ces deux pentes (pente 1 - pente 2).

2.4 Détermination de la valeur du taux de mortalité des autotrophes

Pour déterminer la valeur de b_A , paramètre du modèle de l'IAWQ (GUJER *et al.* 1995), la méthode utilisée a été celle décrite par SALZER (1992) basée sur les équations caractéristiques du décès développées par ce modèle. Ces équations sont fondées sur plusieurs hypothèses :

- la réaction de nitrification est représentée par une seule réaction biologique. Cette hypothèse est valide tant que la nitritation est l'étape limitante de la réaction, ce qui est très souvent le cas à 20 °C.
- le taux de respiration obtenu par respirométrie est proportionnel à la concentration en biomasse nitrifiante active X_A .
- le substrat est utilisé pour faire de la croissance.

Ces hypothèses de modélisation, même si elles limitent la validité du modèle, permettent d'obtenir de très bons accords entre les résultats obtenus par simulation et les résultats expérimentaux (ECKENFELDER et MUSTERMAN, 1995).

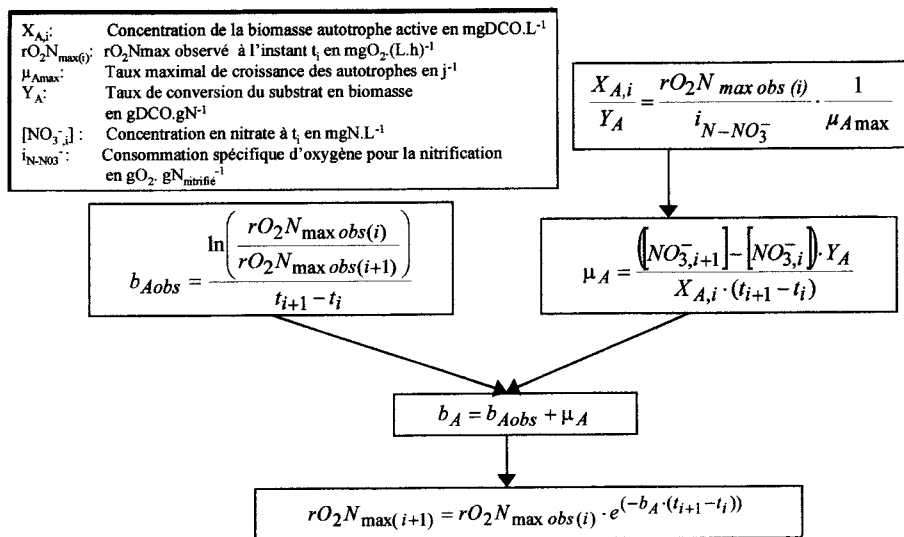


Figure 2 Représentation graphique de la méthode de détermination de la valeur de b_A .

Graphical representation of the b_A value determination methodology.

La méthode utilisée est exhaustivement présentée et analysée par MARTINAGE et PAUL (2000). Lors de la carence en substrat le décès des micro-organismes entraîne le rejet dans le milieu de produits de lyse, qui en subissant le processus d'ammonification servent de substrat aux bactéries nitrifiantes. Compte tenu de cette croissance, la diminution de l'activité nitrifiante ne permet donc d'estimer qu'un taux de mortalité observé. La méthode de SALZER (1992) en prenant en compte la croissance sur les produits de lyse permet de déterminer le vrai taux de mortalité des bactéries nitrifiantes. La *figure 2* présente de manière schématique la méthodologie de calcul de b_A .

À partir de la valeur mesurée par respirométrie du taux maximal de nitrification des boues activées il est possible de déduire $X_{A,i}$ la concentration en biomasse nitrifiante active dans les boues activées. En analysant l'évolution de la concentration en nitrate dans le réacteur il est alors possible de déduire la valeur de μ_A , le taux de croissance observé dans les boues à cause de la nitrification des produits de lyse.

La régression semi-logarithmique de l'évolution du taux maximum de nitrification mesuré par respirométrie permet de déduire la valeur de $b_{A,obs}$, le taux de mortalité observé. La somme des taux de croissance et de décès observés permet d'obtenir la valeur du taux de mortalité vrai dans le réacteur. La connaissance de ce taux de mortalité vrai b_A va ainsi permettre de recalculer la valeur du taux maximal de nitrification que l'on aurait observé dans les boues activées si aucune croissance sur les produits de lyse n'était intervenue. La régression semi-logarithmique sur l'évolution de ce taux maximum de nitrification calculé sans croissance permet alors de déterminer la valeur de b_A .

Pour ces calculs, certains paramètres ont été fixés à des valeurs constantes dont :

- Y_A : 0,24 g DCO/(g Nnitrifié)
- μ_{Amax} : 0,7 d⁻¹
- i_{N-NO_3} : 4,33 g O₂/(g Nnitrifié)
- Température : 20°C.

Pour tous les essais, le coefficient de variation de la technique d'évaluation du RO₂N a été inférieur à 0,06.

2.5 Observations microscopiques et dénombrement des protozoaires

Des observations microscopiques ont permis de réaliser des comptages des diverses populations de la microfaune. Une procédure rapide de dénombrement des organismes visibles à un grossissement de 100 × a été réalisée selon une technique inspirée de JENKINS *et al.* (1993), MADONI (1993) et SHAHWANI et HORAN (1991). Parmi les organismes quantifiés, l'attention a porté principalement sur les protozoaires flagellés visible à 100 × (> 8 μm), les amibes, les ciliés libres, les ciliés fixes, les rotifères et les invertébrés supérieurs (vers, arthropodes, insectes...). Ces observations ont été faites à l'aide d'un microscope à contraste de phase.

Les montages humides sont effectués par observation de 50 μl de biomasse déposée sur une lame couverte par une lamelle de 24 × 32 mm. Afin de s'assurer de l'homogénéité des comptes, le dénombrement est réalisé par observations de 10 champs de vision verticaux au centre de la lamelle et 10 champs de vision horizontaux de part et d'autre de la lamelle. Ensuite, une seconde lame est montée de façon identique et le dénombrement est effectué par observation de 10 champs de vision verticaux, également au centre de la lamelle. Les moyennes pour les différentes catégories de micro-organismes observés sont ensuite calculées et compilées pour les 30 champs de vision observés. La précision d'une telle technique semble variable. Un coefficient de variation moyen de 0,55 a été observé lors des comptes faibles (< 10⁵) ind·L⁻¹.

Toutefois, ce coefficient de variation est passé à 0,15 pour des dénombrements supérieurs à 10^6 ind·L⁻¹. La *figure 3* présente la technique de comptage employée.

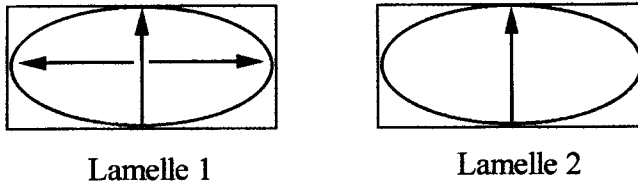


Figure 3 Technique de quantification de la microfaune par comptage au microscope.

Method used to count microfauna.

Au cours de ces comptages, une brève description du floc quant à sa taille et la quantité de bactéries filamenteuses a été effectuée selon la méthodologie préconisée par JENKINS *et al.* (1993).

2.6 Analyses physicochimiques des deux réacteurs

Pour chaque réacteur, des échantillons de surnageant ont été filtrés sur des filtres en Nylon (Gelman) de porosité 0,2 μm afin d'effectuer l'analyse des fractions azotées dissoutes. La détermination de la concentration en nitrate a été réalisée par l'intermédiaire d'une chaîne Technicon (Technicon LTD, Sword Co., Dublin Ireland). L'ion ammonium a été dosé par la méthode de Nessler.

3 – RÉSULTATS ET DISCUSSION

3.1 Vérification de l'effet inhibiteur du cycloheximide sur la biomasse nitrifiante

Les résultats de l'essai de toxicité du cycloheximide sur la nitrification sont présentés au *tableau 1*. Pour la biomasse des deux réacteurs (cycloheximide et témoin), la comparaison du taux de production du nitrate ou du rO_2N_{max} (respiration des organismes nitrifiants en présence de NH_4^+) montre des valeurs similaires ou du moins comprises dans les erreurs expérimentales. De ce fait, il apparaît qu'à court terme (4 heures), le cycloheximide n'a pas d'effet inhibiteur sur la nitrification. D'ailleurs, selon l'étude de NATUSCKA et WELANDER (1994), même à long terme (plus de 400 jours), l'activité nitrifiante d'un procédé à culture fixée n'est pas inhibée par l'addition continue d'antibiotiques comme le nystatin et le cycloheximide.

Tableau 1 Résultats de la caractérisation de l'effet inhibiteur du cycloheximide sur la nitrification (moyenne \pm écart-type).

Table 1 Verification of cycloheximide inhibitor effect on the nitrification reaction (mean \pm standard deviation).

Échantillons	Taux de production de NO_3 ($\text{mg N} \cdot \text{NO}_3 / \text{l} \cdot \text{h}$) ^a	$r\text{O}_2\text{N}_{\text{obs}}$ ($\text{mg O}_2 / \text{L} \cdot \text{h}$)
Témoin	$7,6 \pm 0,7$	$30,7 \pm 1,4$
Cycloheximide $200 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$	$7,2 \pm 0,5$	$31,1 \pm 0,7$

a) Selon la norme Afnor T90-341.

3.2 Observations de la microfaune des deux réacteurs de suivi

Les figures 4 et 5 présentent l'évolution quantitative de la microfaune durant l'étude pour le réacteur témoin et contenant du cycloheximide respectivement. Afin d'alléger la présentation, les invertébrés supérieurs (annélides, nématodes, arthropodes...) n'ont pas été présentés compte tenu de leurs observations rares et ponctuelles.

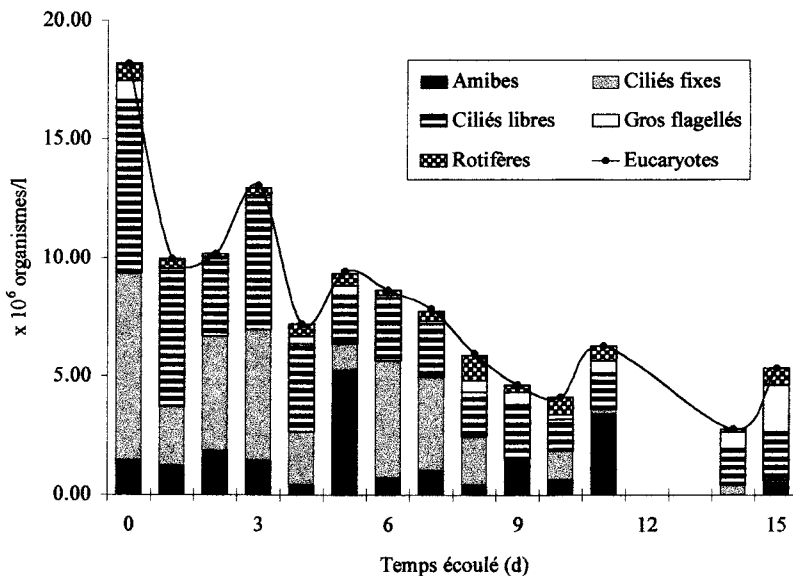


Figure 4 Suivi des comptes de la microfaune pour le réacteur témoin.
Evolution of microfauna in the starving reactor without antibiotics.

Dans le réacteur témoin, le nombre d'organismes de la microfaune diminue au cours de la carence en substrat. En effet, comme la quantité de bactéries diminue au cours de cette période, moins de substrat est disponible pour la croissance des organismes de la microfaune. Or comme, le taux de mortalité de ces micro-organismes demeure constant, une diminution de leur nombre au cours du temps est observable. Ces résultats sont cohérents avec les observa-

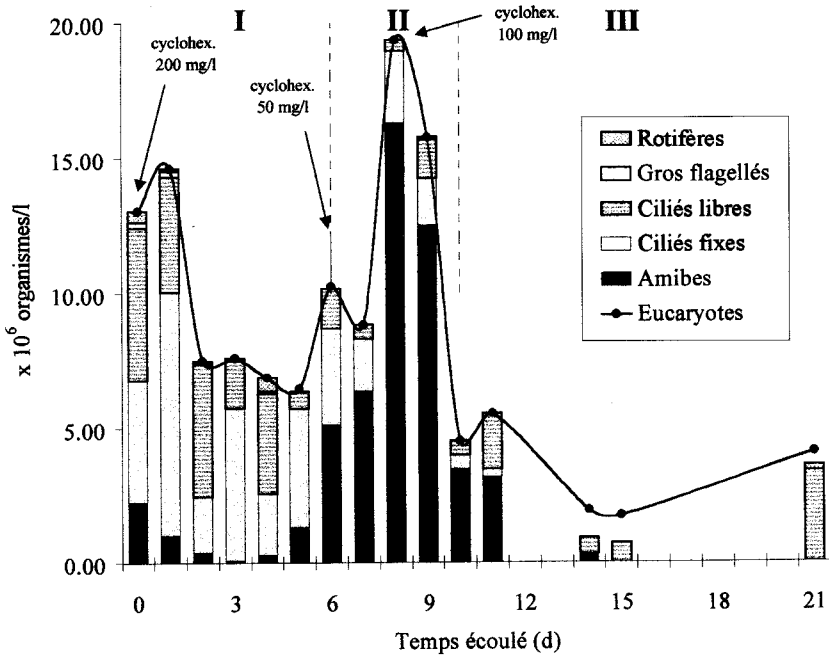


Figure 5 Suivi des comptes de la microfaune pour le réacteur traité au cycloheximide.

Evolution of microfauna in the starving reactor treated with cycloheximide.

tions de GRIFFITHS (1997) qui relie la concentration des organismes de la microfaune avec la quantité de bactéries disponibles dans les boues activées. Sous ces conditions de mesure, MARTINAGE (1999) a montré qu'une unique valeur de b_A pouvait être obtenue, et que cette valeur était représentative du décès des organismes nitrifiants dans les boues activées.

Les observations microscopiques de la microfaune montrent, dans le réacteur témoin, une prédominance des organismes de types protozoaires ciliés libres et fixes. Pour le réacteur traité avec du cycloheximide, les organismes dominants sont des protozoaires de types ciliés libres, ciliés fixes et amibes, en particulier. Les amibes ont largement dominé en présence du cycloheximide. Les protozoaires de types flagellés et les rotifères ont été rapidement inhibés par l'antibiotique ; leur nombre et proportion ont été très faibles dans le réacteur contenant le cycloheximide.

Les flagellés identifiés dans le réacteur témoin ont été dans la plupart des cas du genre *Peranema*. Pour les protozoaires de types ciliés fixes, les organismes du genre *Opercularia* et *Epistylis* et quelques *Vorticella* ont été observés dans les deux réacteurs. Les genres les plus fréquents de ciliés libres observés durant toute l'étude ont été *Aspidisca* et *Euplotes*. Pour les rotifères, au moins 4 ou 5 espèces différentes ont été retrouvées dans le réacteur témoin. Quant aux invertébrés supérieurs, quelques nématodes et de rares vers du genre *Aelosoma* ont été observés principalement en début de suivi.

L'analyse de la *figures 5*, pour le réacteur traité au cycloheximide, montre, à partir du jour 5, une disparition importante des Rotifères suite au premier traitement au cycloheximide. Ces organismes sont reconnus comme étant sensibles aux antibiotiques des eucaryotes (NATUSCKA et WELANDER, 1994). Pour la période des jours 6 à 11, la diversité est plus faible, les amibes et les ciliés étant largement dominant. Vers le jour 8, les amibes atteignent des quantités voisines de 1.6×10^7 organismes \cdot L $^{-1}$, soit une proportion d'environ 84 % de la microfaune eucaryote totale. Dans ce cas, le cycloheximide semble stimuler le développement des amibes. Bien que les résultats de GRIFFITHS (1989) montrent une inhibition des amibes et des flagellés dans un réacteur traité avec du cycloheximide et du Triton X-100, il apparaît que le seul cycloheximide n'est pas un inhibiteur suffisamment puissant pour inhiber le développement complet de ces protozoaires. De plus, les amibes ont la capacité de s'enkyster pour se protéger des conditions défavorables de l'environnement (ANDERSON, 1988). Certaines études montrent également que ces organismes peuvent s'acclimater à des substances inhibitrices. En effet, SRIKANTH et BERK (1993) ont observé une stimulation de la croissance des amibes traitées avec un biocide dans des tours de refroidissement. De plus, selon une autre étude de ces auteurs, les amibes ont également la capacité de s'adapter et de résister aux biocides (SRIKANTH et BERK 1994). Il apparaît que dans notre cas, le même phénomène est observé. Il est également possible que la diminution des autres protozoaires causée par le cycloheximide favorise le développement des amibes sur lesquelles l'antibiotique n'aurait aucun effet. La littérature scientifique ne possède toutefois aucune information pertinente sur l'effet du cycloheximide sur les amibes.

La croissance observée des amibes est conforme avec les valeurs répertoriées dans la littérature scientifique. À l'aide de la *figure 5* entre les jours 4 et 8, on observe un accroissement exponentiel des amibes correspondant à un taux de croissance spécifique de $0,039$ h $^{-1}$ (temps de génération de 18 h). Cette valeur correspond très bien à celle retrouvée dans la littérature scientifique où des taux de croissance variant selon les espèces et la température de l'eau sont compris entre $0,004$ à $0,04$ h $^{-1}$ (BALDOCK et BERGER, 1984 ; MAYES *et al.*, 1997 ; JELLET et SCHEIBLING, 1988).

En ce qui concerne l'aspect général du floc, la dimension de celui-ci est demeurée pratiquement stable dans le réacteur témoin (moyen 150-500 μ m), comparativement au réacteur contenant le cycloheximide où la dimension du floc est passée de moyenne (150-500 μ m) à petite (< 150 μ m) à partir du jour 9.

L'observation des bactéries filamenteuses a montré des quantités qui ont varié de « commun » (1-5 filaments/floc) à « très commun » (5-20 filaments/floc) dans les deux réacteurs.

3.3 Analyses des formes azotées du surnageant des deux réacteurs de suivi

L'analyse des formes azotée solubles n'a montré aucune accumulation en NH $_4^+$ dans les deux réacteurs ; dans tous les cas, la mesure a été sous le seuil de détection (< 0,2 mg \cdot L $^{-1}$). L'azote ammoniacal est donc en concentration limitante dans les deux cas. Pour les formes nitrite, il est bon de mentionner que dans tous les cas ces formes n'ont pas excédé 5 mg N \cdot L $^{-1}$, ce qui est largement sous le seuil d'inhibition de la nitrification à pH 7,5.

Malgré l'absence d'apport de substrat exogène (ammonium), la nitrification a eu lieu dans les deux réacteurs. La source d'ammonium est générée par les processus d'ammonification de l'azote organique provenant de la lyse des micro-organismes en carence d'alimentation. Ce comportement déjà observé par MARTINAGE et PAUL (2000) montre une accumulation linéaire de NO_3^- dans un réacteur maintenu en absence d'alimentation de substrat.

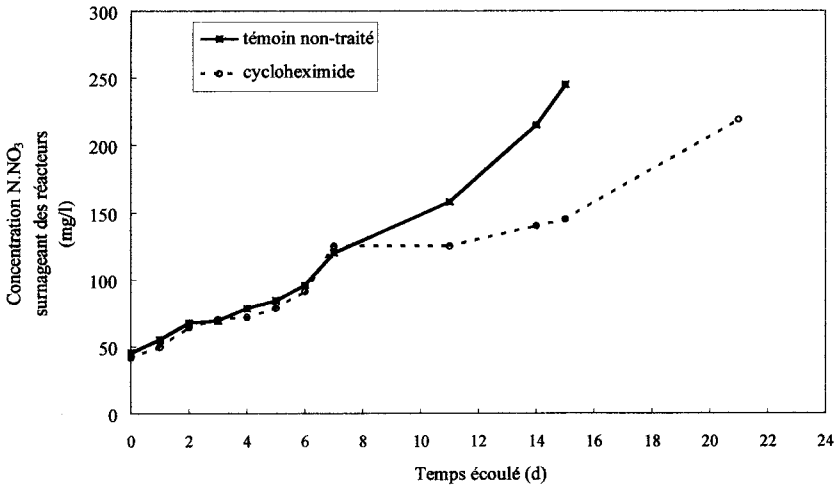


Figure 6 Évolution de la concentrations en nitrate dans le surnageant des deux réacteurs.

Evolution of nitrate concentrations in the starving reactors. Untreated reactor (solid line) and cycloheximide treated reactor (dashed-line).

La figure 6 présente l'accumulation des formes NO_3^- mesurées dans les réacteurs. Jusqu'au jour 7, cette accumulation est similaire dans les deux cas. Toutefois, à partir de ce jour, l'accumulation ralentit de façon notable dans le réacteur traité au cycloheximide. Or comme aucune accumulation de NH_4^+ n'a été observée dans le surnageant des deux réacteurs, ce phénomène indique que la nitrification a toujours lieu à un taux supérieur à celui de la production d'ammonium issue de la lyse cellulaire. Toutefois, ce phénomène de ralentissement de la production de NO_3^- peut être expliquée par l'accumulation importante des amibes dans le réacteur traité au cycloheximide. Comme la plupart des protozoaires, les amibes consomment des bactéries et par conséquent peuvent diminuer la quantité de matériel potentiellement hydrolysable dans la biomasse en phase de lyse. Il est d'ailleurs démontré que la prédation par les protozoaires s'effectue d'une façon sélective ; certains types de protozoaires ont des préférences quant à la dimension de leur proie ainsi qu'à certaines bactéries spécifiques (GONZALEZ *et al.*, 1990).

De plus, une étude sur les protozoaires dans les sédiments marins montre que ces organismes doivent consommer des bactéries riches en azote puisque leur composition cellulaire a un ratio typique C/N de 5,0 (ELDRIDGE et JACKSON, 1993). De ce fait, cette hypothèse tend à expliquer que la biodisponibilité de l'azote nitrifiable est moindre dans le réacteur traité au cycloheximide où une

expansion massive des amibes a été observée. Cette transformation de l'azote en protéines d'organisme vivant (celles des amibes) diminue la quantité d'azote organique ammonifiable éventuellement disponible pour les organismes nitrifiants. De ce fait, l'effet de prédation par les protozoaires sur une biomasse bactérienne en décroissance favorise la diminution de la biomasse hétérotrophe et autotrophe mais également diminue la biodisponibilité de l'azote ammonifiable.

PIKE et CURDS (1971) mentionnent une diminution de 50 % de la concentration d'azote organique dans un effluent d'un procédé biologique contenant des protozoaires ciliés. Il est probable qu'un tel comportement puisse également être observé avec les amibes. En ce qui concerne les besoins de croissance, les amibes ont besoin d'acides aminées (provenant du substrat) pour se développer. Entre 5 et 11 types d'acides aminés différents sont essentiels à leur croissance et elles doivent les assimiler via leur alimentation (ANDERSON, 1988). De plus, ELDRIDGE et JACKSON (1993) ont montré que dans un environnement aérobie, la majorité du carbone et de l'azote ingéré par les protozoaires demeurent retenue à l'intérieur de ceux-ci pour plusieurs mois.

Cette consommation de l'azote par les protozoaires viendrait diminuer la quantité d'azote nitrifiable et par le fait même expliquer la diminution du taux de production des nitrates lors d'une abondance de protozoaires.

Cependant, les amibes relarguent dans le milieu des produits azotés (COÛTEAUX *et al.*, 1988) mais probablement en quantité inférieure à ceux consommés par leur assimilation sous forme particulière. Cette hypothèse expliquerait éventuellement la diminution de production de NO_3^- et l'absence d'accumulation de NH_4^+ dans le surnageant.

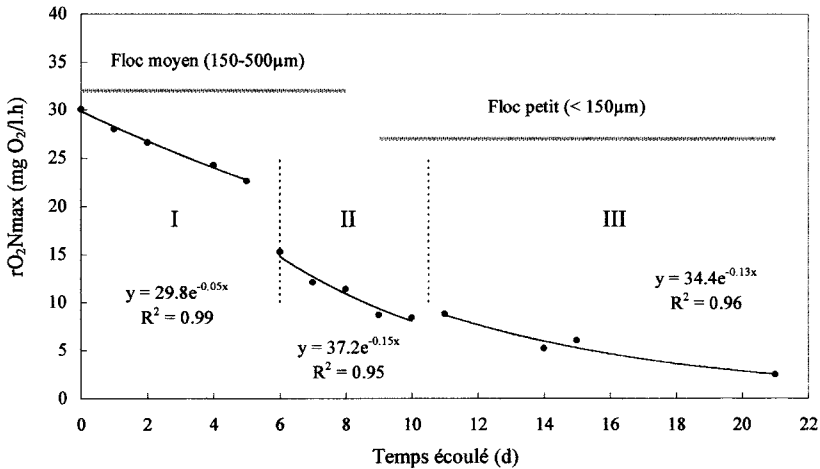
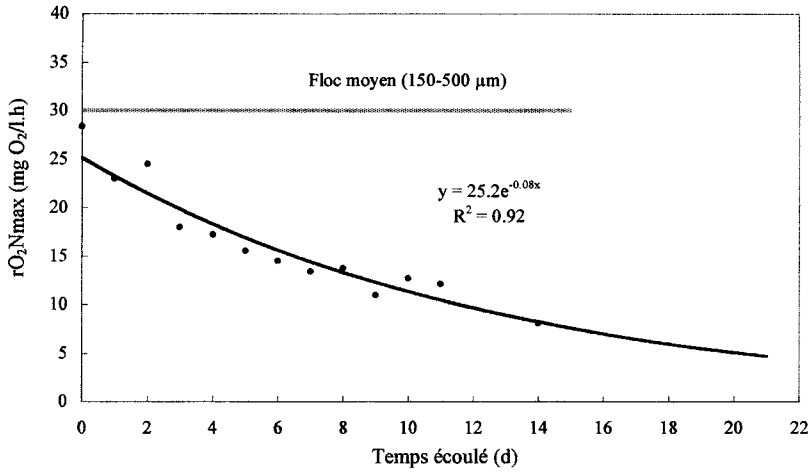
Quant au réacteur témoin, la décroissance progressive des protozoaires (*figure 4*) limite la prédation des organismes du floc et n'entrave pas la biodisponibilité de l'azote nitrifiable.

3.4 Mesures du taux de mortalité (b_A) sur les deux réacteurs de suivi

Les *figures 7A* et *7B* présentent l'évolution du taux maximal de nitrification déterminé par respirométrie dans le réacteur témoin et le réacteur inhibé au cycloheximide respectivement.

La *figure 7A* montre que dans le réacteur témoin, où la diversité de la microfaune reste stable au cours de l'expérience, l'évolution du taux maximal de nitrification diminue régulièrement en raison du décès causé par l'absence de substrat exogène, et la régression exponentielle sur la courbe obtenue permet de calculer une valeur de b_A de $0,08 \text{ d}^{-1}$. Ce résultat est conforme avec les résultats de MARTINAGE et PAUL (2000).

L'évolution du taux maximal de nitrification observé sur la *figure 7B* montre que trois périodes distinctes semblent apparaître au cours de l'expérience. Pour la période I, la valeur de b_A obtenue est de $0,05 \text{ d}^{-1}$. Cette valeur est légèrement plus faible que celle de $0,08 \text{ d}^{-1}$ obtenue dans le réacteur témoin pendant toute l'expérience. La détermination du nombre d'organismes constituant la microfaune a montré qu'au cours de cette première partie le nombre d'organismes présents dans le réacteur témoin entre le jour 1 et 5 est de $1,19 \times 10^7$ organismes·L⁻¹ est légèrement supérieur à celui de la zone I dans le réacteur



Figures 7A-B Évolution du taux de respiration sans croissance de la biomasse du réacteur témoin (7A) et du réacteur traité au cycloheximide (7B).
Nourmax profile of the biomass from the untreated reactor (7A) and cycloheximide treated reactor (7B).

inhibé au cycloheximide ($8,65 \times 10^6$ organismes \cdot L $^{-1}$). Cette observation suggère que lorsque la pression de prédation par la microfaune diminue, la valeur de b_A diminue aussi.

Au cours de la période II, la *figure 7B* indique une forte augmentation de la valeur de b_A : cette valeur atteint $0,15$ d $^{-1}$, soit une valeur trois fois plus importante que celle obtenue durant la période I. Cette autre observation indique que le développement des amibes dans le réacteur inhibé au cycloheximide (*figure 5*) a entraîné une augmentation de la valeur de b_A . De ce fait, lorsque le nombre d'organismes de la microfaune augmente, le taux de mortalité des organismes nitrifiants (b_A) augmente.

Enfin, au cours de la période III (*figure 7B*), la valeur de b_A reste plus importante dans le réacteur inhibé au cycloheximide par rapport au réacteur témoin. Ainsi, comme la valeur de b_A est plus importante durant la période III que lors de la période I, et comme la quantité des organismes de la microfaune est légèrement plus faible pour cette période, ce résultat tendrait à montrer que la taille des floccs a également un effet sur la valeur de b_A . En effet, à la *figure 7B*, pour la fin de la période II et toute la période III, la dimension du flocc du réacteur traité au cycloheximide a été inférieure à 150 μm comparativement à une taille de 150-500 μm en début d'expérience (période I). Également, pour le réacteur témoin (*figure 4*) en fin d'expérience, la quantité d'organismes de la microfaune a été semblable à celle du réacteur traité au cycloheximide pour la période III (*figure 5*). Toutefois, la taille du flocc du réacteur témoin a été supérieure (150-500 μm) à celle du réacteur traité au cycloheximide (< 150 μm). Comme la valeur du b_A du réacteur témoin (0,08 d^{-1}) est inférieure à celle du réacteur traité au cycloheximide pour la zone III (0,13 d^{-1}), selon ces observations, il apparaît que pour une même quantité d'organismes de la microfaune, la taille du flocc a un impact sur la prédation et par le fait même la valeur du b_A . D'ailleurs, selon les résultats de LEE et WELANDER (1996), il apparaît que la dimension du flocc a un impact sur la prédation.

4 – CONCLUSION

L'expansion des amibes causée par l'ajout du cycloheximide a augmenté le taux de prédation des bactéries. Cette augmentation de la prédation à partir du jour 6 a diminué l'activité nitrifiante mesurée par le $r\text{O}_2\text{Nmax}$. Cette diminution de respiration indique par le fait même une augmentation du taux de mortalité (b_A) des organismes nitrifiants.

La concentration en nitrate produit dans le réacteur traité au cycloheximide a également diminué de façon considérable à partir du jour 6 comparativement au réacteur témoin. Ce ralentissement de la nitrification est probablement causé par une réduction, par les amibes, de la quantité d'azote nitrifiable disponible pour les organismes nitrifiants.

Enfin, cette étude a montré un effet possible de la prédation par la microfaune sur la valeur de b_A . En particulier, il est apparu que pour des boues actives identiques issues d'un même inoculum la valeur de b_A à 20 °C peut varier de 0,05 à 0,15 d^{-1} à cause de la variation de la composition de la microfaune ainsi que la taille des floccs.

REMERCIEMENTS

Les auteurs remercient la Coopération scientifique franco-québécoise, l'École supérieure d'ingénieurs en électrotechnique et électronique ainsi que le ministère des Relations Internationales-Direction générale France pour l'organisation du séjour ainsi que l'appui financier. Une attention particulière est également portée à A. Moro et E. Mengelle pour la contribution technique à la réalisation de ce projet.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- AFNOR, 1990. Méthode pour l'évaluation de l'effet inhibiteur sur la nitrification par des micro-organismes de boues activées par des produits chimiques ou des eaux résiduaires. Afnor NFT90-341. Afnor [Ed]. Paris, 9 p.
- ANDERSON O.R., 1988. Comparative protozoology, ecology, *Physiology*, Life History, Springer-Verlag [Ed], 482 p.
- BALDOCK B.M., BERGER J., 1984. The effects of low temperature on the growth of four fresh-water amoebae (Protozoa: Gymnamoebia). *Trans. Am. Microsc. Soc.*, 103, 233-239
- COÛTEAUX M.M., FAURIE G., PALKA L., STEINBERG C., 1988. La relation prédateur-proie (protozoaire-bactéries) dans les sols : rôle dans la régulation des populations et conséquences sur les cycles du carbone et de l'azote. *Rev. Écol. Biol. Sol.*, 25, 1-31.
- DECAMP O., WARREN A., 1998. Bacterivory in ciliates isolated from constructed wetlands (Reed Beds) used for wastewater treatment. *Wat. Res.*, 32, 1989-1996.
- ECKENFELDER W.W., MUSTERMAN J., 1995. Activated sludge treatment of industrial wastewater. Technomic Publishing, Lancaster, PA, USA, 279 p.
- ELDRIDGE P.M., JACKSON G.A., 1993. Benthic trophic dynamics in California coastal basin and continental slope communities inferred using inverse analysis. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 99, 115-135.
- GONZALEZ J.M., EVELYN B.S., SHERR B.F., 1990. Size-selective grazing on bacteria by natural assemblages of estuarine flagellates and ciliates. *Appl. Environ. Microbiol.*, 56, 583-589.
- GRIFFITHS B.S., 1989. Enhanced Nitrification in the presence of bacteriophagous protozoa., *Soil Biol. Biochem.*, 21, 1045-1051.
- GRIFFITHS P., 1997. The rate of death and predation in activated sludge systems incorporating anoxic zones. BNR3 conference. Brisbane.
- GUJER W., HENZE M., MINO T., MATSUI T., WENTZEL M.C., MARAIS G.V.R (1995). The activated sludge model n° 2 : biological phosphorus removal. *Wat. Sci. Tech.* 31 (2), 1-11.
- JELLET J.F., SCHEIBLING R.E., 1988. Effect of temperature and prey availability on growth of *Paramoeba invadens* in monoxenic culture. *Appl. Environ. Microbiol.*, 54, 1848-1854.
- JENKINS D., RICHARD M.G., DAIGGER G.T., 1993. Manual on the causes and control of activated sludge bulking and foaming. 2nd Edition, Lewis Publishers, Michigan, 193 p.
- LAWRENCE J.R., SNYDER R.A., 1998. Feeding behaviour and grazing impacts of a *Euplotes* sp. on attached bacteria. *Can. J. Microbiol.*, 44, 623-629.
- LEE N.M., WELANDER T., 1996. Use of protozoa and metazoa for decreasing sludge production in aerobic wastewater treatment. *Biotech. Letters*, 18, 429-434.
- MADONI P., 1993. A sludge biotic index (SBI) for the evaluation of the biological performance of activated sludge plants based on the microfauna analysis. *Wat. Res.*, 28, 67-75.
- MARTINAGE V., 1999. Traitement biologique d'eaux résiduaires engendrant des variations du rapport C/N : analyse de la nitrification. Thèse de doctorat n° 527 INSA de Toulouse (France).
- MARTINAGE V. et PAUL E., 2000. Effect of environmental parameters of the autotrophic decay rate (b_A) value. *Env. Technology* 21 (1), 31-41.
- MAURINES-CARBONEILL C., PERNELLE J.-J., MORIN L., SACHON G., LEBLON G., 1998. Relevance of the INT test response as an indicator of erts activity in monitoring heterotrophic aerobic bacterial populations in activated sludges. *Wat. Res.*, 32, 1213-1221.
- MAYES D.F., ROGERSON A., MARCHANT H., LAYBOURN-PARRY J., 1997. Growth and consumption rates of bacterivorous antarctic naked marine amoebae. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 160, 101-108.
- MÜLLER N., 1998. Implement biofilm carriers into activated sludge process-15 years of experience. *Wat. Sci. Tech.*, 37 (9), 167-174.
- NATUSCKA M.L., WELANDER T., 1994. Influence of predators on nitrification in aerobic biofilm processes. *Wat. Sci. Tech.*, 29 (7), 355-363.

- PIKE E.B., CURDS C.R., 1971. The microbial ecology of the activated sludge. In: G. Sykes, F.A. Skinner (eds.), *Microbial Aspects of Pollution*. Academic Press London, pp. 123-147.
- RATSAK C.H., KOOI B.W., VERSEVELD H.W. VAN. 1994. Biomass reduction and mineralization increase due to the ciliate *Tetrahymena pyriformis* grazing on the bacterium *Pseudomonas fluorescens*. *Wat. Sci. Tech.*, 29 (7), 119-128.
- SALZER R., 1992. A contribution to the determination of kinetic parameters for nitrification in activated sludge plants treating industrial wastewaters (In German). M.E. Thesis, Institute for water quality, Technical University of Vienna.
- SHAHWANI S.M.AI, HORAN N.J. 1991. The use of protozoa to indicate changes in the performance of activated sludge plants. *Wat. Res.* 25, 633-638.
- SPANJERS H., VANROLLEGHEM P.A., OLSSON G., DOLD P.L., 1998. Respirometry in control of the activated sludge process: principles. Scientific and Technical Report N° 7, AIWQ, 48 p.
- SRIKANTH S., BERK S.G., 1993. Stimulatory effect of cooling tower biocides on amoebae. *Appl. Environ. Microbiol.*, 59, 3245-3249.
- SRIKANTH S., BERK S.G., 1994. Adaptation of amoebae to cooling tower biocides. *Microb. Ecol.*, 27, 293-301.
- STARINK.M, KRYLOVAI.N, BÄR-GILISSEN M.J., BAK R.P.M., CAPPENBERG T.E., 1994. Rates of benthic protozoan grazing on free and attached sediment bacteria measured with fluorescently stained sediment. *Appl. Environ. Microbiol.*, 60, 2259-2264.
- VAN LOOSDRECHT M.C.M ET HENZE M., 1999. Maintenance, endogenous respiration, lysis decay and predation. *Wat. Sci. Tech.*, 39 (1), 107-117
- VERHAGEN F.J.M., LAANBROEK H.J., 1992. Effects of grazing by flagellates on competition for ammonium between nitrifying and heterotrophic bacteria in chemostat. *Appl. Environ. Microbiol.*, 58, 1962-1969.